

UNIVERZITA KARLOVA / CHARLES UNIVERSITY  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI / FACULTY OF MEDICINE  
IN PILSEN



Kvantifikace mikrocév v histologii  
Stereologie mikrocév cévní stěny a mozku

Histological quantification of microvessels  
Stereology of vasa vasorum and brain microvessels

**Dizertační práce/Ph.D. Thesis**

**MUDr. Petr Tomášek**

**Školitel/Advisor: prof. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.**



**Plzeň/Pilsen 2021**

## **Bibliografické informace**

**Autor:** MUDr. Petr TOMÁŠEK

**Název práce:** Kvantifikace mikrocév v histologii

**Podtitul:** Stereologie mikrocév cévní stěny a mozku

**Jazyk práce:** český, anglický

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

**Univerzita:** Univerzita Karlova

**Fakulta:** Lékařská fakulta v Plzni

**Ústav:** Ústav histologie a embryologie

**Specializace:** Anatomie, histologie, embryologie

**Forma studia:** kombinovaná

**Školitel:** prof. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

**Počet stran:** 162

**Klíčová slova:** kvantitativní histologie; stereologie; mikrocévy; vasa vasorum; aorta

**Title:** Histological quantification of microvessels

**Subtitle:** Stereology of vasa vasorum and brain microvessels

**Keywords:** quantitative histology; stereology; microvessels; vasa vasorum; aorta

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a 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, 8. 2. 2021

Petr Tomášek

Podpis

## Abstrakt

Z dosavadního shrnutí poznatků o histologii mikrocév je patrné, že samotná kvantifikace mikrocév by měla být provázena i popisem tkáně jimi zásobované. Tento tkáňový kontext se však v měřítku větších orgánů, jako je např. aorta velkých savců či mozek člověka, může na makroskopickém měřítku v řádu centimetrů či decimetrů významně měnit. Vzhledem k tomu, že dosavadní poznatky o rozmanitosti hustoty, uspořádání a orientace mikrocév jsou zpravidla omezeny na makroskopicky malé oblasti těchto orgánů, považujeme zmapování distribuce mikrocév na makroskopickém měřítku za poměrně zásadní problém, jehož řešení bylo jednotícím prvkem této dizertační práce. Hlavní zjištění ze šesti provedených studií jsou následující:

**Zjištění 1:** Existuje značná segmentální variabilita v hustotě a hloubce průniku vasa vasorum v aortě prasete. Denzita vasa vasorum je nejvyšší v hrudních segmentech, stejně jako hloubka průniku do tunica media, která zde přesahuje dříve publikované výsledky. Denzita vasa vasorum s věkem zvířat klesá, relativní hloubka průniku však nikoliv. Jednotlivé segmenty aorty prasete nejsou pro studie zabývající se vaskularizací krevní stěny vzájemně zaměnitelné.

**Zjištění 2:** Numerická i délková hustota mikrocév je v šedé hmotě vyšší nežli v bílé hmotě lidského mozku; v rámci šedé hmoty je pak srovnatelná mezi korovými oblastmi a bazálními ganglii. Vysoká denzita mikrocév je statisticky spojena se ztrátou jejich preferenční orientace.

**Zjištění 3:** Námi vyšetřované tenkostěnné tubulární štěpy nebyly ani po 6 měsících in vivo implantace do krkavic králíka invadovány vrůstáním vasa vasorum, což však při vysoké prostupnosti štěpů nebránilo diferenciaci hladkých svalových buněk.

**Zjištění 4:** Ke kalibraci mikro-CT je k dispozici generátor virtuálních (fantomových) dat vygenerovaných na základě zadání uživatele, v němž upřesní požadované geometrické charakteristiky, jako objem, povrch, délku a počet objektů. Tato obrazová data lze pak včetně realistického šumu zpracovat na mikro-CT konzoli a výsledné geometrické charakteristiky porovnat s předem známým popisem fantomových dat. Z rozdílu lze usoudit na chybu vzniklou segmentačními procedurami mikro-CT konzole a usoudit, zda velikost této chyby nějak ohrožuje závěry celého měření. Z analýzy citlivosti

vidíme, že rozlišení by nemělo být horší nežli 1/10 typického rozměru vyšetřovaných mikrocév.

**Zjištění 5:** Vzorky výdutě břišní aorty člověka se vyznačovaly vyšší hustotou profilů vasa vasorum nežli normální aorty. Hustota vasa vasorum současně korelovala s mírou zánětlivé infiltrace, s markerem hypoxie, s expresí pentraxinu 3 a s makroskopickým průměrem AAA. Současný výskyt a kolokalizaci zvýšené vaskularizace stěny AAA s expresí hypoxického markeru pokládáme za morfologický obraz hypoxicky podmíněné neoangiogeneze jakožto jevu, který je v literatuře podezříván z významné role v patogenezi AAA a ze zvyšování její náchylnosti k ruptuře.

**Zjištění 6:** Na základě dat popisujících složení stěny krkavic prasete, avšak dosud bez znalosti hustoty a distribuce vasa vasorum lze říci, že při vyloučení anatomických variet větvení lze sdružovat pravostranné cévy s levostrannými a cévy od kastrovaných samic a samců. Naopak lze očekávat významné rozdíly mezi proximálním, středním a distálním úsekem krkavic, kde se tepna v krátkém úseku 2-3 cm mění z elastické na svalovou. Vyslovujeme předpoklad, že proximální úsek s koncentrickými elastinovými lamelami bude při nízké prostupnosti elastinu pro difuzi látek prostoupen vasa vasorum hustěji, nežli úseky distální. Tato hypotéza musí být však nejprve ověřena daty z dosud probíhající studie. Za účelné považujeme rovněž porovnání stavby krkavice prasete s dalším obdobným velkým modelem v experimentální kardiovaskulární chirurgii, jímž je krkavice ovce.

Těchto šest závěrů nás opravňuje k následujícímu shrnutí a zobecnění: U orgánů makroskopických rozměrů (aorta či krkavice velkých zvířat, mozek člověka) nemůžeme oprávněně předpokládat uniformitu v rozmístění, hustotě či orientaci mikrocév na mikroskopickém měřítku. Rozmanitost těchto mikroskopických parametrů vyžaduje jejich důkladné mapování. To v případě mikroskopické variability orgánů velkých zvířecích modelů užívaných v experimentální medicíně umožňuje plánovat experimenty s eticky opodstatněnými počty jedinců či tkáňových vzorků. Ani u trojrozměrných zobrazovacích metod typu výpočetní tomografie s vysokým rozlišením nelze vynechat kalibraci všech postupů, které dosud postrádají standardizaci. Silně podporujeme publikaci primárních naměřených dat v každé morfometrické studii.

## Abstract

Considering the current knowledge on histology of microvessels suggested that quantification of the tissue microvessels itself should be accompanied by a description of the surrounding tissue components supplied by these microvessels. However, the microscopic anatomy of this tissue context can vary considerably on the scale of large-sized organs, such as the aorta of large mammals or the human brain. Given that the present knowledge on the variability of densities, spatial arrangement, and orientation of microvessels is usually limited to macroscopically small areas of these large organs, we consider mapping of the microvessels on a large macroscopic scale to be a matter of great importance. This became the unifying element of this thesis. The main findings based on six studies presented in the thesis were as follows:

**Finding #1:** The density and the penetration depth of the vasa vasorum has a considerable segmental variability in the porcine aorta. The density of the vasa vasorum was greatest in thoracic aortic segments, as was the depth of penetration into the tunica media, which exceeded previously published findings. The vasa vasorum density declined with age, but the relative depth of their penetration did not. The individual segments of the porcine aorta were not interchangeable for being used in further experimental studies on the vascularization of porcine aorta.

**Finding #2:** Both the numerical density as well as the length density of microvessels was greater in the grey matter than in the white matter of the human brain. These parameters were comparable between the brain cortex and the basal ganglia. Greater density of microvessels was statistically correlated with the loss of their preferential orientation.

**Finding #3:** Synthetic thin-walled tubular grafts examined in our study were not invaded by the ingrowth of vasa vasorum even after 6 months of being implanted in vivo into rabbit carotid arteries. The absence of the vasa vasorum did not prevent local differentiation of smooth muscle cells within these highly permeable thin-walled grafts.

**Finding #4:** A software generator of virtual (phantom) image stacks simulating micro-CT scans was made available, including a realistic noise generator. The user input decided on precisely known geometrical characteristics of the microvessels-mimicking objects, such as their volumes, surfaces, lengths, and numbers. The image data sets were

processed on a micro-CT console and the error between the true known and estimated data was quantified. The sensitivity analysis showed that resolution decreasing below 1/10 of the typical size of the microvessels resulted in a considerable error of the segmentation procedure, thus introducing a bias threatening the conclusions drawn from the measurements.

**Finding #5:** Human abdominal aortic aneurysms (AAA) had a greater density of vasa vasorum profiles than samples of normal aortae. The density of the vasa vasorum positively correlated with the inflammatory infiltration, with the marker of hypoxia, with the expression of pentraxin 3, and with the macroscopic AAA diameter. The colocalization of increased vascularization of the AAA wall with the expression of a hypoxia marker was considered as a morphological correlate of hypoxia-induced neoangiogenesis. This phenomena was suggested to play a significant role in the AAA pathogenesis and to increase its susceptibility to rupture.

**Finding #6:** The data mapping the relative quantities of the main tissue components the wall of porcine carotid arteries suggested that, by excluding anatomical variations of branching, right-sided and left-sided vessels and vessels from castrated females and males can be pooled during experiments on these vessels. On the contrary, significant differences were found between the proximal, middle and distal sections of the carotid arteries, where the artery changed from elastic to muscular phenotype within a short interval of 2-3 cm. As the mapping of the vasa vasorum is still in progress, we hypothesize that the proximal segments with concentric elastin lamellae will be more densely and deeply penetrated with vasa vasorum than the distal segments due to the low diffusion permeability of elastin-rich proximal segments. However, this hypothesis must first be verified by data from an ongoing study. We also consider it useful to compare the structure of the pig carotid artery with another similarly large model in experimental cardiovascular surgery, which is the sheep carotid artery.

We believe that these conclusions entitle us to the following summary: Uniformity in the distribution, density or orientation of microvessels can not be reasonably assumed on a macroscopic scale in large organs (such as aorta or carotid arteries of large animals, or the human brain). The diversity of these microscopic parameters requires their thorough mapping. In the case of microscopic variability of organs of large animal models used in

experimental medicine, this makes it possible to perform a power sample analysis to plan experiments with ethically justified numbers of individuals or tissue samples. Even with three-dimensional imaging methods such as high-resolution computed tomography, the calibration of all procedures that still lack standardization cannot be omitted. We strongly support the publication of primary measured data in each morphometric study.



## Předmluva

Dizertační práce vznikla na školícím pracovišti, kterým byl Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy. Původním tématem mé dizertace byla „Kvantifikace histologických změn u arytmogenní kardiomyopatie“. K tomuto tématu se mi podařilo nasbírat vzorky pro pilotní studii a zpracovat přehledný článek otištěný v tuzemském časopise. Oproti původnímu předpokladu se mi nepodařilo vytvořit dostatečně početný soubor probandů pro výsledkovou studii o arytmogenní kardiomyopatii, což bylo nepochybně dáno zlepšenou in vivo diagnostikou i relativně nově zavedeným screeningem sportovců (jakožto rizikové skupiny ve vztahu k této diagnóze). Po poradě se školitelem jsme dospěli ke dvěma zásadním závěrům:

1. Soubor by s velkou pravděpodobností neposkytl dostatečný objem dat a po statistickém zpracování by výsledky práce mohly být neobhajitelné
2. V průběhu posledních let se výrazně zdokonalila diagnostika arytmogenní kardiomyopatie, a to zejména v oblasti genetiky. Práce by tedy vyžadovala pro úspěšné obhájení zahrnout do výzkumu probandů i genetiku. Za soudobé právní úpravy v ČR, kdy nebylo možné provádět genetický výzkum materiálu od živých i zemřelých pacientů bez jejich souhlasu, resp. bez souhlasu osob blízkých zemřelému, a to, dle některých právních výkladů, ani anonymizovaně, se nejevilo jako smysluplné pokračovat v původním tématu. V praxi by nebylo možné dohledat osoby blízké a získat jejich souhlasy s genetickým vyšetřením probandů a práce by skončila ve slepé uličce. Proto jsem se na školícím pracovišti zapojil do dalších studií zaměřených na kvantifikaci mikrocév a jejich tkáňového kontextu. U některých z nich jsem se připojil k týmu řešícímu již běžící studie. V poslední, prvoautorské práci, jsem se pak účastnil všech fází od návrhu studie po publikační proces.

Mé postgraduální studium se tak prodloužilo, nicméně základními pilíři dizertace se tak postupně stalo šest originálních výsledkových prací, které prošly standardním oponentním řízením v časopisech *Annals of Anatomy*, *Journal of Chemical Anatomy*, *Biomedical Materials*, *Microscopy*, *Research and Technique*, *PLoS One* a opět *Annals of Anatomy*. Můj podíl na těchto studiích byl následující:

1. Tonar Z, **Tomášek P** et al. (Ann Anat, 2016), Příloha I: Rešerše publikací o prokrvení aorty u různých druhů, histologická kvantifikace, příprava části textu pro manuskript.
2. Kubíková T, Kochová P, **Tomášek P** et al. (J Chem Neuroanat, 2018), Příloha II: Odběr, zpracování a vyhodnocení vzorků mozku v rámci analýzy smrštění tkáně při histologickém zpracování pro výpočet korekčního faktoru a příprava odstavců této části manuskriptu.
3. Horakova J, ... **Tomasek P**, Tonar Z (Biomed Mater, 2018), Příloha III: Rešerše literatury o osídlení tepenných štěpů in vivo u animálních modelů, příprava části textu pro manuskript.
4. Jiřík M, Bartoš M, **Tomášek P** et al. (Microsc Res Tech, 2018), Příloha IV. Rešerše parametrů využívaných k morfometrii vláknitých struktur v histologii tkáňových nosičů a biomateriálů, příspěvek do manuskriptu.
5. Blassova T, Tonar Z, **Tomasek P** et al (PLos One, 2019), Příloha V: Rešerše oblasti histopatologických markerů výdutě břišní aorty, příspěvek k manuskriptu.
6. Tomášek P et al. (Ann Anat, 2020), Příloha VI: Prvoautorská práce, kde jsem se podílel na designu studie, odebíral jsem veškerý materiál z cév člověka, provedl jsem makroskopickou fotodokumentaci, provedl jsem skórování aterosklerózy koronárních tepen, provedl jsem veškerou mikroskopickou fotodokumentaci pro všechny vzorky a všechny metody a z nich vycházející kvantitativní histologické hodnocení. Podílel jsem se na statistickém vyhodnocení a sepsání a revizi manuskriptu.

V Plzni dne 15.03.2021

## Poděkování

Na prvním místě chci poděkovat svému školiteli, prof. MUDr. Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D., kterého si velmi vážím nejen po stránce odborné, ale i lidské. Bez jeho cenných nápadů, připomínek, pomoci a zejména obdivuhodné vlídnosti a trpělivosti, se kterou mě po celou dobu studia vedl, by tato práce vůbec nemohla vzniknout. Spolupráce s ním je velmi inspirativní a po předchozích letech mojí sice intenzivní, ale víceméně stále jen rutinní práce v mém oboru, znamená pro mě natrvalo pozitivní změnu jednak v náhledu na vědu a jednak ve způsobu myšlení. A to má pro mě daleko širší smysl, než jen získání titulu ze tří písmenek za jménem.

Také chci poděkovat přednostce Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni, prof. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D., za to, že mi umožnila postgraduální studium v jí vedeném ústavu a že mě po našich opakovaných odborných debatách nasměrovala ke správnému školiteli.

Pokud se člověk rozhodne pro boj na poli vědy, asi nemůže uspět bez pomoci a podpory své rodiny, svých blízkých, a také svých kolegů. Jim patří samozřejmě také moje upřímné díky.

A nakonec děkuji panu profesorovi MUDr. RNDr. Jaroslavu Slípkovi, DrSc. za to, jakým úžasným způsobem nás tenkrát, před mnoha lety v pregraduálním studiu, učil a jak nás dokázal při svých přednáškách nadchnout pro obor histologie a embryologie. V mém případě toto nadšení trvá dodnes.

# Obsah

<b>Bibliografické informace .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>Předmluva .....</b>	<b>9</b>
<b>Poděkování.....</b>	<b>11</b>
<b>Použité zkratky .....</b>	<b>15</b>
<b>1 Teoretický úvod.....</b>	<b>17</b>
1.1 Typy mikrocév .....	17
1.1.1 Základní rozdělení .....	17
1.1.2 Podrobnější klasifikace dle Terminologia Histologica .....	17
1.2 Histologická stavba mikrocév .....	18
1.3 Detekce a vizualizace mikrocév v histologii.....	20
1.3.1 Imunohistochemie mikrocév.....	21
1.3.2 Lektinová histochemie mikrocév .....	21
1.4 Mikrocévy v ostatních zobrazovacích modalitách .....	22
1.5 Kvantitativní popis mikrocév .....	23
1.5.1 Používané kvantitativní parametry.....	23
<b>2 Cíle a hypotézy dizertace.....</b>	<b>26</b>
2.1 Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete .....	27
2.1.1 Motivace a cíle práce .....	27
2.1.2 Hypotézy .....	27
2.2 Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka .....	28
2.2.1 Motivace a cíle práce .....	28
2.2.2 Hypotézy .....	28
2.3 Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného <i>in vivo</i> .....	29
2.3.1 Motivace a cíle práce .....	29
2.3.2 Hypotézy .....	29
2.4 Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT .....	30
2.4.1 Motivace a cíle práce .....	30

2.5	Denzita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí .....	30
2.5.1	Motivace a cíle práce .....	30
2.5.2	Hypotézy.....	31
2.6	Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum .....	31
2.6.1	Motivace a cíle práce .....	31
2.6.2	Hypotézy.....	32
<b>3</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>33</b>
3.1	Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete .....	33
3.2	Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka.....	34
3.3	Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného <i>in vivo</i> .....	35
3.4	Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT	36
3.5	Denzita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí .....	36
3.6	Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum .....	38
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse.....</b>	<b>39</b>
4.1	Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete .....	39
4.1.1	Hlavní zjištění .....	39
4.1.2	Publikace .....	39
4.2	Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka.....	40
4.2.1	Hlavní zjištění.....	40
4.2.2	Publikace .....	40
4.3	Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného <i>in vivo</i> .....	41
4.3.1	Hlavní zjištění.....	41
4.3.2	Publikace .....	41
4.4	Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT .....	42
4.4.1	Hlavní zjištění.....	42
4.4.2	Publikace .....	42
4.5	Denzita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí .....	43

4.5.1	Hlavní zjištění.....	43
4.5.2	Publikace.....	43
4.6	Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum.....	44
4.6.1	Hlavní zjištění.....	44
4.6.2	Publikace.....	46
<b>5</b>	<b>Závěry práce.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Publikační činnost autora .....</b>	<b>57</b>
8.1	Publikace vztahující se k tématu dizertační práce.....	57
8.1.1	Časopisy s faktorem impaktu.....	57
8.2	Publikace autora mimo rámec dizertační práce.....	58
8.2.1	Časopisy s faktorem impaktu.....	58
8.2.2	Ostatní recenzované časopisy .....	58
8.2.3	Kapitoly v monografii.....	59
<b>9</b>	<b>Přílohy – plná znění publikovaných výsledků.....</b>	<b>61</b>
9.1	Příloha I.....	61
9.2	Příloha II .....	77
9.3	Příloha III.....	90
9.4	Příloha IV .....	108
9.5	Příloha V .....	128
9.6	Příloha VI.....	143

## Použité zkratky

$A_A$	- Plošný podíl (area per area)
AAA	- Výduť břišní aorty (abdominal aortic aneurysm)
ANOVA	- Analýza rozptylu (analysis of variance)
AT	- Tloušťka adventicie (adventitia thickness)
CD3	- Proteinový koreceptor T-lymfocytů, používáný jako marker T-lymfocytů
CD20	- B-lymfocytární antigen exprimovaný na povrchu B-lymfocytů, používáný jako jejich marker
CD31	- Povrchový transmembránový glykoprotein, používáný jako marker endotelových buněk
CD34	- Povrchový transmembránový glykoprotein, používáný jako marker endotelových buněk
CD68	- Transmembránový glykoprotein používaný jako marker makrofágů a dalších buněk monocytární linie
CT	- Výpočetní tomografie (computer tomography)
f	- střední hodnota relativní vzdálenosti profilů vasa vasorum od vnější (abluminální) hranice vrstvy cévní stěny (hodnota 0) k vnitřní (adluminální) hranici vrstvy (hodnota 1)
FICAT	- Federative International Committee on Anatomical Terminology
$H_0$	- Nulová hypotéza formulovaná pro účely statistického testování
HIF 1- $\alpha$	- Podjednotka heterodimerického transkripčního faktoru HIF-1 (hypoxia-inducible factor), jeden z regulátorů odpovědi na hypoxii
HRP	- Křenuvová peroxidáza (horseradish peroxidase)
IMT	- Součet tloušťky intimy a medie (intima+media thickness)
IUR	- Izotropní uniformní náhodné řezy (isotropic uniform random sections)
LEA	- Lycopersicon esculentum lektin, používáný jako marker endotelových buněk
$L_v$	- Délková hustota (length per volume, length density)
$N_v$	- Numerická hustota (number per volume, numerical density)
n-hodnota	- Počet jedinců či hodnocených vzorků
OPG	- Osteoprotegerin, glykoprotein vážící celou řadu ligandů

p-hodnota	Mezní hladina významnosti statistických testů
PBS	- Fosfátovým pufrém obohacený isotonický roztok NaCl (phosphate-buffered saline)
PET/CT	- Pozitronová emisní tomografie a výpočetní tomografie, hybridní metoda (Positron emission tomography–computed tomography)
PET/MRI	- Pozitronová emisní tomografie a magnetická rezonance, hybridní metoda (Positron emission tomography–magnetic resonance imaging)
PTX3	- Pentraxin 3, jeden z mnoha multifunkčních proteinů produkovaných během akutní zánětlivé odpovědi
$Q_A$	- Quantity per area - počet profilů objektů $Q$ v řezu o ploše $A$ ( $m^2$ )
$S_v$	- Povrchová hustota (Surface density, surface per volume)
SMCs	- Hladké svalové buňky (Smooth muscle cells)
UEA	- Lektin <i>Ulex europaeus</i> agglutinin
v.v.	- Cévy cév ( <i>vasa vasorum</i> )
$V_v$	- Objemový podíl (volume per volume, volume fraction, volume density)
vWF	- von Willebrandův faktor, používaný jako marker endotelových buněk
WGA	- Lektin Wheat germ agglutinin, používaný jako marker endotelových buněk
WT	- Tloušťka celé stěny cévy (wall thickness)



# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Typy mikrocév

### 1.1.1 Základní rozdělení

Krevní oběh je zajišťován elektromechanickou činností srdce, na nějž je napojen uzavřený systém krevních cév. Vlastní krevní řečiště se dělí na část tepennou, žilní a na oblast tzv. mikrocirkulace. Zatímco tepny zajišťují transport krve ze srdce do příslušných orgánů a tkání a žíly návrat krve do srdce, oblast mikrocirkulace je stěžejní pro obousměrnou výměnu dýchacích plynů, živin a produktů látkové přeměny mezi krví, mezibuněčným prostorem a buňkami. Přejít mezi tepnami, mikrocirkulací a žilami je plynulý a umožňuje postupnou transformaci pulsace krve do kontinuálního proudění. Ze srdce odstupuje jedna tepna pro systémový oběh a jedna tepna pro plicní oběh. Tepny se postupně větví na menší větve a takto dochází k rozvětvení až na vlastní mikrocirkulaci, jejímiž nejdůležitějšími součástmi jsou arterioly, kapiláry a postkapilární venuly. Návrat krve k srdci začíná na úrovni venul, které se postupně spojují v žíly o zvětšujícím se průměru (Lüllmann-Rauch, 2012).

### 1.1.2 Podrobnější klasifikace dle Terminologia Histologica

S rozvojem histologie jako vědního oboru vyvstala potřeba sjednotit názvosloví jednotlivých histologických struktur. Aby mohlo být ve výzkumu jednoznačně definováno, co bylo zkoumáno a mohla být prováděna i komparace výsledků výzkumu konkrétních oblastí a struktur, je nutné používat jednotnou terminologii. Ta byla sestavena Federálním mezinárodním výborem pro anatomickou terminologii (FICAT) a publikována v monografii Terminologia Histologica (FICAT, 2008). Podrobnou klasifikaci a terminologii týkající se oblasti mikrocirkulace shrnuje tabulka 1.

S průběžným uváděním jednotné terminologie dle Terminologia Histologica do praxe vyvstávají nové problémy, týkající se např. nesouladu mezi jednotlivými terminologiemi (Terminologia Histologica, Terminologia Anatomica, Terminologia Embryologica), dále pak výskytu synonym (např. nexus – macula communicans – synapsis electrica aj.) či opakování termínů (např. cellula uninucleata – cellula mononucleata aj.). Většina termínů má původ v latině, případně v řečtině, nicméně s pokrokem ve vědeckém bádání vznikají

## Teoretický úvod

i termíny relativně nové, pro které neexistuje latinský ekvivalent. Proto řada expertů navrhuje úpravy a doplnění stávajícího kodifikovaného názvosloví tak, aby zůstalo živé, funkční a odpovídající současnému stavu poznání (Varga et al., 2018, 2019).

**Tabulka 1 - Klasifikace mikrocév podle Terminologia Histologica (české ekvivalenty dle: Kachlík, 2010)**

Nomina Latina	Anglický ekvivalent	Český ekvivalent
Arteriola	Arteriole	Tepénka
Arteriola precapillaris; Metarteriola	Precapillary arteriole; Metarteriole	
Vas capillare	Capillary vessel	Vlásečnice
Vas capillare arteriale; Vas precapillare	Arterial capillary	
Vas capillare intermedium	Midcapillary	
Vas capillare venosum; Vas postcapillare	Venous capillary	
Vas capillare sinusoidum	Sinusoid capillary	Děrovnice
Venula	Venule	Žilka
Venula postcapillaris	Postcapillary venule	
Venula colligens	Collecting venule	
Venula muscularis	Muscular venule	

## 1.2 Histologická stavba mikrocév

Samotný pojem „mikrocévy“ je velmi často využíváný, např. v databázi Web of Science se heslo „microvessels“ vyskytuje více než 12 000krát. Bez přesného vymezení jej chápeme spíše z hlediska praktického – zahrnuje ty cévy, které nejčastěji vidíme v mikroskopických preparátech studovaných tkání a orgánů, tj. od tepének přes vlásečnice až k žilkám. Z hlediska složení cévní stěny můžeme použít např. pojetí shrnuté v tabulce 2.

**Tabulka 2 - Složení stěny mikrocév (upraveno dle Silver et al., 2001 a Ross et Pawlina, 2016)**

Typ cévy	Průměr	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Malá tepna	0,1-2 mm	Endotel		
		Vazivo	8-10vrstev	
		Hladké svalové buňky	hladkých	Kolagenní vazivo
		Vnitřní elastická membrána	svalových buněk	Ojedinelá elastická vlákna
Tepénka	10-100 $\mu$ m	Endotel	Hladké svalové	
		Vazivo	buňky (1-2	Neostře definovaná
		Hladké svalové buňky	vrstvy)	vazivová vrstva
Kapilára	4-25 $\mu$ m	Endotel	Chybí	Chybí
Postkapilární žilka	10-50 $\mu$ m	Endotel		
Žilka svalového typu	50-100 $\mu$ m	Pericyty	Chybí	Chybí
		Endotel		Silnější nežli media
Žilka	0,1-1 mm	Vazivo	Hladké svalové	Vazivo
		Hladké svalové buňky (1-3 vrstvy)	buňky (1-12 vrstvy)	s ojedinelými elastickými vlákny
				Silnější než tunica media
			Hladké svalové buňky (12-3 vrstvy spojitě s intimou)	Vazivo s ojedinelými elastickými vlákny

Při pohledu na tabulku 2 jsou patrné některé nedůslednosti této klasifikace, jako je například nejednoznačnost, zda při průměru dáváme přednost vnějšímu či vnitřnímu průměru. Vezměme rovněž v potaz, že průměr cévních profilů na rutinních histologických řezech hrubě neodpovídá skutečnému průměru cév v živém organismu, jednak vlivem posmrtné vazokonstrikce, jednak vlivem kolapsu u kapilár, jednak vlivem smrštění způsobeného samotnou fixací a parafinovým procesem. Dále je zjevné, že hranice mezi některými typy je čistě arbitrární a neostrá, zejména pokud je založena na průměru či počtu svalových buněk v jednotlivých vrstvách stěny. Rovněž přítomnost pericytů zřejmě není v různých orgánových systémech rovnoměrná a dosud se vedou spory, zda cévu vzhledu vlásečnice s pericyty považovat již za postkapilární žilku (Ross et Pawlina, 2016) nebo stále za vlásečnici (Kolinko et al., 2018). Tato otázka je poměrně komplikovaná tím, že pericytů

může přibývat či ubývat v závislosti na věku či funkčním stavu mikrocév (Kolinko et al., 2018). Jejich identifikaci neusnadňuje ani skutečnost, že nejsou dostupné specifické markery pericytů použitelné současně ve více orgánových systémech a k jejich identifikaci je vhodná spíše transmisní elektronová mikroskopie, spolehlivě zachycující jejich polohu a stavbu.

Tyto a další nejednoznačnosti klasifikace mikrocév je nutno mít na paměti při interpretaci morfometrických výsledků. Na druhou stranu bereme v potaz, že četnost cév zachycených v preparátech statisticky zákonitě prudce roste směrem k vlásečnicím, tj. s nejjemnějšími cévami se setkáváme nejčastěji. Z morfologického pohledu je vhodné dodržovat jistou zdrženlivost při snaze korelovat morfologii mikrocév (tj. to, co vidíme na preparátech) s mikrocirkulací, tj. s funkčním parametrem prokrvení v živém organismu (Kolinko et al., 2015). Tento rozpor bude patrně v budoucnu překlenut rozvojem in vivo zobrazování mikrocirkulace pokročilými modifikacemi zobrazovacích metod (např. fotoakustické zobrazování s vysokým rozlišením, Keša et al., 2021), paralelním zpracováním vzorků histologickými metodami a vzájemnou korelací těchto postupů. Z hlediska praktické vyšetřitelnosti vzorků však budou tyto zobrazovací metody patrně ještě nějakou dobu vyhrazeny zvířecím modelům, neboť daní za co nejvyšší rozlišení, blížící se mikroskopii, jsou malé rozměry vyšetřovaných vzorků a co nejmenší odstup fyzikálních sond od tkání a orgánů, což omezuje použití dosud jen na zvířecí modely.

### **1.3 Detekce a vizualizace mikrocév v histologii**

Z praktického hlediska je k detekci mikrocév obvykle využíván endotel či bazální lamina endotelu, ať už s využitím imunohistochemie nebo lektinové histochemie. Univerzální marker endotelu, který by byl použitelný k průkazu endotelových buněk různých orgánových systémů různých živočišných druhů, v literatuře nenalzáme. Při jakékoli detekci mikrocév lze silně doporučit perfuzní fixaci vyšetřovaných tkání a orgánů. U větších cév, kde počítáme s výskytem hladkých svalových buněk, lze užít rovněž markery těchto buněk (např. hladkosvalový aktin).

### 1.3.1 Imunohistochemie mikrocév

Imunohistochemické metody v současnosti v histopatologii převažují. S automatizací a standardizací imunohistochemických protokolů, jak je běžné v patologických laboratořích, lze docílit značné uniformity barvení. Metody s nejvyšší užitnou hodnotou jsou v tabulce 3. Jde o metody využitelné pro morfologická hodnocení. Hodnocení funkce či dysfunkce endotelu jsou mimo záběr tohoto úvodu, pro přehled lze doporučit např. práci Chia et al., 2020.

**Tabulka 3 - Imunohistochemické metody využívané k detekci mikrocév**

<b>Prokazovaný antigen a příklad studie jej používající</b>	<b>Lokalizace, význam a funkce antigenu</b>
CD31 (Norrby and Ridell, 2003)	Transmembránový glykoprotein endotelu, u lidských tkání obvykle poskytuje velmi dobře hodnotitelné preparáty.
CD34 (Veselá et al, 2014)	Transmembránový glykoprotein prekurzorů endotelu a endotelu krevních cév, velmi často poskytuje ekvivalentní informaci jako CD34.
vWF (Norrby and Ridell, 2003)	Jeden z glykoproteinových faktorů krevní srážlivosti, přítomný ve Weibel-Paladeho tělískách endotelu. K výhodám patří použití u více živočišných druhů. K nevýhodám patří jeho absence např. v kapilárách centrálního nervového systému.
CD105 (Polívka et al., 2018)	Marker nezralého endotelu, vhodný například k odlišení subpopulace nezralých novotvořených nádorových mikrocév
Laminin (Kubíková et al., 2018)	Bazální lamina endotelu kapilár kontinuálního typu, vhodné například u mikrocév centrálního nervového systému. Naopak nepoužitelný u kapilár typu sinusoid.

### 1.3.2 Lektinová histochemie mikrocév

Velmi užitečným nástrojem k vizualizaci endotelu je lektinová histochemie. Na rozdíl od imunohistochemie, která využívá vazeb mezi protilátkou a antigenem, je lektinová histochemie založena na detekci polysachariových či oligosacharidových sekvencí v molekulách glykokalyx na povrchu buňky pomocí bílkovin zvaných lektiny. Výskyt různých typů sacharidů na jednotlivých buněčných typech za normálních či patologických okolností, stejně tak jako volba vhodného lektinu, vázícího se na tyto sacharidy, je dosud

## Teoretický úvod

z velké části jen empiricky zmapován. To však nebrání velmi efektivnímu užití těchto metod. Ve srovnání s imunohistochemickými postupy zde může být nižší citlivost na fixaci (Wolfesberger et al., 2008; Tonar et al., 2008) a odpadající nutnost revitalizace antigenů, tak běžná u imunohistochemie. Protokoly lektinové histochemie poskytují v případě úspěšného zvládnutí metody velmi předvídatelné výsledky a vysokou uniformitu barvení. Lektiny a selektiny se využívají jako markery normálního endotelu, ale také markery aktivace či dysfunkce endotelu (Ushiyama et al., 2016; Goncharov et al., 2017). Příklady častěji využívaných a osvědčených lektinů jsou v tabulce 4.

**Tabulka 4 - Metody lektinové histochemie využívané k detekci mikrocév**

<b>Prokazovaný lektin</b>	<b>Příklad aplikace</b>
UEA (Ulex europaeus agglutinin)	Nakamura-Ishizu et al., 2008
WGA (wheat germ agglutinin)	Nanka et al., 2001; Wolfesberger et al., 2008; Tonar et al., 2008
RCA-I (Ricinus communis agglutinin-I)	Nakamura-Ishizu et al., 2008
LEA (Lycopersicon esculentum lectin)	Nanka et al., 2001; Nakamura-Ishizu et al., 2008
ConA (Concanavalin A)	Nakamura-Ishizu et al., 2008

## 1.4 Mikrocévy v ostatních zobrazovacích modalitách

Zatímco v minulosti byly mikroskopické cévy z hlediska zobrazovacích metod, jako je ultrazvuk, magnetická rezonance, či výpočetní tomografie (CT), součástí šumu na pozadí, v posledních letech se rozlišovací schopnost některých zobrazovacích technik zvyšuje natolik, že se již v řádu milimetrů a někdy i stovek či desítek mikrometrů částečně překrývá s mikroskopickými metodami. To se týká např. fotoakustického zobrazování in vivo (Keša et al., 2021) nebo kapilaroskopie (Ingegnoli et al., 2018). U ex vivo zobrazování mikrocév lze výborných výsledků dosáhnout skenováním korozivních preparátů výpočetní tomografií s vysokým rozlišením (mikro-CT) (Eberlova et al., 2016, 2017). Jednoznačnou výhodou mikro-CT je nativně trojrozměrná informace o mikrocévách, která je velmi dobře využitelná

při jejich kvantifikaci (Jiřík et al., 2016). Velmi slibnou metodou je mikro-angio-CT (Hluschuk et al., 2018). Výsledky těchto nových metodických postupů dosud však nejsou dostatečně korelovány se studii založenými na histologických metodách. Vzájemnou porovnatelnost dat z těchto metod lze ozřejmit studii, které by současně hodnotily tytéž nebo velmi blízké vzorky více metodami současně (např. nejprve nedestruktivním zobrazováním a poté teprve histologicky), ovšem takové studie dosud až na výjimky chybí.

## **1.5 Kvantitativní popis mikrocév**

### **1.5.1 Používané kvantitativní parametry**

V literatuře existuje celá řada přístupů, jak kvantifikovat mikrocévy. Jednoznačným trendem je využívání stereologie, konkrétně postupů tzv. design-based stereology (Mühlfeld, 2014). Tyto postupy jsou v souladu se zákonitostmi tzv. stochastické geometrie (Baddeley and Jensen, 2005) a nejsou založeny na obtížně ověřitelných či nesplnitelných předpokladech, jako v minulosti používané techniky tzv. model-based stereology (Howard and Reed, 2005). K těmto problematickým předpokladům patřil v minulosti například předpoklad izotropního rozložení směrů cév nebo předpoklad jejich rovnoměrného rozložení v orgánech. Stereologie, která respektuje trojrozměrnou stavbu cévního řečiště, se stává metodou volby. Současná měřítka kladená na morfometrické studie cév v histologii zahrnují vždy i otázku orientace a systematické strategie vzorkování na kterémkoliv z úrovní, na níž dochází k redukci materiálu, tj. od makroskopického orgánu ke tkáňovým bločkům, od bločků k řezům, od řezů k zorným polím a od mikroskopických zorných polí až k samotným kvantifikovaným strukturám (Tschanz et al., 2014). Přestože jistá výběrová chyba je v mikroskopii nevyhnutelná, hlavní filozofií těchto postupů je kvantifikovat míru této chyby a zjistit, zdali může nebo nemůže mít vliv na celkové vyznění studie (Howard et Reed, 2005). Strategii vzorkování se tak věnuje stejná péče, jako samotné kvantifikaci. Z hlediska stereologie lze rozdělit parametry prvního řádu (tabulka 5) a parametry vyšších řádů (tabulka 6).

**Tabulka 5 - Kvantitativní parametry prvního řádu využívané v morfometrii mikrocév (Lokkegaard et al., 2001; Howard and Reed, 2005; Mühlfeld 2014).**

<b>Kvantitativní parametr / Anglický pojem (rozměr veličiny)</b>	<b>Příklady biologické interpretace, výhody a nevýhody</b>
Dvojměrná mikrovasální hustota / density of microvessel profiles $Q_A(\text{mm}^{-2})$	Počet profilů cév na jednotku plochy referenční oblasti histologického řezu. Pokud byla rovina řezu znáhodněna do podoby tzv. izotropních uniformních řezů (IUR), lze z tohoto parametru vypočítat trojrozměrnou délkovou hustotu mikrocév dle vztahu $L_V=2*Q_A$ . Pokud rovina řezu není náhodná a nebylo prokázáno izotropní rozložení orientace mikrocév, může být tento parametr zkreslen tím, že cévy kolmé na rovinu řezu se vyskytují s mnohem větší pravděpodobností, nežli přísluší jejich skutečné četnosti ve trojrozměrné tkáni.
Numerická hustota mikrocév / numerical density of microvessels $N_V(\text{mm}^{-3})$	Počet mikrocév na jednotku objemu tkáně, kdy mikrocéva je definována jako úsek mezi dvěma uzlovými body cévní sítě. Neodráží zastoupení mikrocév různého průměru a délky, ani jejich povrch, pouze jejich počet. Vyžaduje silné řezy pro optický disektor nebo zaregistrované řezy sériové (fyzický disektor).
Délková hustota / Length density $L_V(\text{mm}^{-2})$	Délka mikrocév na jednotku objemu tkáně. Neodráží zastoupení mikrocév různého průměru a povrchu, ani jejich počet. Vyžaduje IUR řezy nebo silné řezy. Parametr silně závisí na použitém zvětšení.
Povrchová hustota / Surface density $S_V(\text{mm}^{-1})$	Povrch mikrocév na jednotku objemu tkáně. U cév podílejících se na látkové výměně zohledňuje dostupný transportní povrch, i když tento je nutné interpretovat podle jejich různé prostupnosti. Vyžaduje znáhodnění roviny řezu (IUR) nebo dostatečně silné řezy či jejich série. Podobně jako délka, i povrch silně závisí na použitém zvětšení.
Objemový podíl / Volume fraction $V_V(-)$	Ukazuje, jaká část objemu tkáně či orgánu je vyplněna cévami. Může být zkreslena stlačením a deformací cév v důsledku manipulace s odebíraným vzorkem a nevratného kolapsu lumina mikrocév, což je velmi běžný jev.
Plošný podíl ve tkáni / Area fraction $(-)$	Dvojměrná obdoba objemového podílu, s nímž je ekvivalentní dle Delesseho principu $A_A=V_V$ .



**Tabulka 6 - Kvantitativní parametry vyššího řádu využívané v morfometrii mikrocév**

<b>Kvantitativní parametr</b> <b>/ Anglický pojem</b>	<b>Příklady biologické interpretace, výhody a nevýhody</b>
Shlukování / clustering	Kvantitativní měřítko toho, zda se objekty téže třídy (např. buňky či cévy) vyskytují ve shlucích, které lze z hlediska vyplnění prostoru považovat na daném intervalu vzdáleností za nenáhodné (Philimonenko et al., 2000).
Kolokalizace / colocalization	Kvantitativní měřítko toho, zda se objekty různých tříd vyskytují ve shlucích, které lze z hlediska vyplnění prostoru považovat na daném intervalu vzdáleností za nenáhodné (Philimonenko et al., 2000). Nerovnoměrnou distribuci ve dvojrozměrných řezech či v trojrozměrném prostoru lze měřit pomocí relativních distribučních indexů (Mayhew et al., 2009; Prosecká et al., 2015).
Míra izotropie /isotropy	Existuje více indexů, které porovnávají, do jaké míry je rozložení směrů mikrocév v trojrozměrném prostoru náhodné (izotropie) či naopak nenáhodné, tj. s upřednostňováním některých směrů na úkor jiných (anizotropie) (Kochová et al., 2011).
Tortuozita / tortuosity	Poměr skutečné trojrozměrné délky cév ku spojnici jejich konců (Jířík et al., 2016).
Fraktální rozměr / fractal dimension	Popis komplexity sítě mikrocév se snahou vystihnout, jakou část objemu tkáně či jejího plošného řezu vyplňuje jednorozměrný skelet cévního řečiště. Odlišné parametry mohou rozlišit např. růstové vzorce nádorových cév od nenádorových (Lang et al., 2012).
Konektivita sítě / connectivity	Topologická míra četností vzájemných spojek mezi součásti cévní sítě, je vyjádřitelná například jako počet spojek, které by bylo nutno rozrušit k tomu, aby se síť rozpadla na menší nezávislé celky. Lze ji odvodit z tzv. Euler-Poincarého čísla (Nyengaard, 1999).

## 2 Cíle a hypotézy dizertace

Z dosavadního shrnutí poznatků o histologii mikrocév podaného v předchozím přehledu je patrné, že samotná kvantifikace mikrocév by měla být provázena i popisem tkáně jimi zásobované. Tento tkáňový kontext se však v měřítku větších orgánů, jako je např. aorta velkých savců či mozek člověka, může na makroskopickém měřítku v řádu centimetrů či decimetrů významně měnit. Vzhledem k tomu, že dosavadní poznatky o rozmanitosti hustoty, uspořádání a orientace mikrocév jsou zpravidla omezeny na makroskopicky malé oblasti těchto orgánů, považujeme zmapování distribuce mikrocév na makroskopickém měřítku za poměrně zásadní problém, jehož řešení bylo jednotícím prvkem této dizertační práce. Formulovali jsme proto několik výzkumných otázek, které i při částečném souběhu na sebe chronologicky navazovaly takto:

1. Jak se v makroskopickém měřítku liší hustota mikrocév a jejich distribuční hloubka v různých segmentech aorty prasete, která je významným modelem v experimentální chirurgii?
2. Jak se v makroskopickém měřítku liší trojrozměrná hustota mikrocév různých topograficky vzdálených oblastí šedé a bílé hmoty lidského mozku?
3. Jak se uplatňuje novotvorba vasa vasorum u buněčného osídlení syntetických kopolymerních tubulárních štěpů implantovaných *in vivo* do krkavice králíka?
4. Jak kalibrovat vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT?
5. Jak souvisí denzita mikrocév ve stěně výdutě břišní aorty (abdominal aortic aneurysm, AAA) s ostatními markery remodelace stěny u pacientů
6. S jakou variabilitou v histologické stavbě je třeba počítat pro budoucí analýzu vasa vasorum v různých segmentech krkavice prasete, která je významným modelem v experimentální chirurgii?

Zodpovězení těchto šesti výzkumných otázek představuje šest cílů, které se staly předmětem šesti studií. U nich nyní ve stejném pořadí blíže rozebereme jejich motivaci a upřesníme hypotézy v těchto studiích testované.

## **2.1 Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete**

### **2.1.1 Motivace a cíle práce**

Vasa vasorum vyživují stěnu tepen i žil, přičemž se významně uplatňují jak v její homeostáze, tak při patologických stavech (Kachlik et al., 2003; Ritman et Lerman, 2007; Kachlik et al., 2007; Kachlík et al., 2008; Witter et al., 2010; Tonar et al., 2012; Houdek et al., 2013; Patzelt et al., 2019). Aorta prasete je významným modelem v experimentální chirurgii elastických tepen. Má všechny výhody velkého a pro lidskou aortu již poměrně realistického zvířecího modelu. Před publikací této studie bylo známo, že vasa vasorum zásobují vnější vrstvu (tunica adventitia) a částečně i střední vrstvu (tunica media) tepenné stěny, značně se však lišily údaje o relativní hloubce, do níž směrem zvenku tyto drobné cévy pronikají. Zcela pak v literatuře chybělo kvantitativní porovnání různých segmentů aorty (vzestupná aorta, aortální oblouk, hrudní sestupná aorta, břišní suprerenální a infrarenální aorta). Nebylo tedy zjevné, do jaké míry jsou výsledky získané na různých segmentech vzájemně porovnatelné. Cílem této studie se proto stalo vytvoření mapy mikroskopické distribuce vasa vasorum mezi pěti segmenty aorty prasete a s respektováním různých věkových skupin, které se v experimentech obvykle používají.

### **2.1.2 Hypotézy**

Při mapování vasa vasorum jsme testovali čtyři následující nulové hypotézy:

- A.  $H_0(A)$ : Dvojměrná hustota profilů vasa vasorum vztažená na jednotku plochy příčného řezu se u téhož jedince neliší při porovnání pěti proximálních a distálních segmentů aorty u rostoucích prasat (0–230 dnů). Hypotéza byla testována zvlášť pro medii, pro adventicii, i pro stěnu jako celek. Vzhledem k tomu, že v pilotní studii byly zaznamenány značné rozdíly v tloušťce tunica media, byla tloušťka medie ještě podrobněji rozdělena na arbitrárně definované rovnoměrné pětiny.
- B.  $H_0(B)$ : Střední hodnota hloubky, do níž v medii a adventicii pronikají profily vasa vasorum, se při porovnání těchto aortálních segmentů neliší ve věkových skupinách sajících selat, odstavených selat, a dále rostoucích prasat. Porovnání bylo provedeno zvlášť pro medii a zvlášť pro adventicii.

- C.  $H_0(C)$ : Dvojměrná hustota profilů vasa vasorum vztažená na jednotku plochy příčného řezu se neliší při porovnání adventicie a medie (včetně jejich pěti vrstev). Porovnání bylo provedeno pro všechny tři věkové skupiny zvlášť.
- D.  $H_0(D)$ : Hustota a distribuce vasa vasorum nekorelují s tloušťkou aortální stěny ani s histologickým složením této stěny publikovaným v předchozí studii (Tonar et al., 2015b).

Podrobná metodika, výsledky, diskuse a závěry jsou v plném rozsahu součástí publikace v časopise *Annals of Anatomy* (Tonar et al., 2016). Publikace je v příloze I této dizertační práce.

## **2.2 Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka**

### **2.2.1 Motivace a cíle práce**

Mikroskopická stavba centrálního nervového systému je v porovnání s ostatními orgánovými systémy kvantitativně mapována již poměrně dlouho, od samých počátků stereologie, tj. již několik desetiletí. K nejprobádanějším částem zde patří zejména hippocampus a další oblasti se vztahem k paměti. Znalost distribuce a hustot mikrocév v mozku má využití pro interpretaci funkčních zobrazovacích metod, pro distribuci kyslíku, živin, kontrastních látek, či léčiv v různých oblastech šedé a bílé hmoty. V době plánování a provedení naší studie však nebyla k dispozici data porovnávací numerickou a délkovou hustotu mikrocév v různých částech lidského mozku. Cílem této studie bylo zmapovat pomocí stereologie alespoň přibližné rozdíly a variabilitu v hustotě mikrocév v šedé a bílé hmotě hemisfér koncového mozku, v bazálních gangliích, v mozkovém kmeni a v mozečku, a to u 16 vzorků jednoho makroskopicky normálního mozku dospělého člověka v 6. deceniu a u 16 vzorků druhého mozku člověka v 8. deceniu s předpokládanou již probíhající věkově podmíněnou atrofií mikrocév.

### **2.2.2 Hypotézy**

Při mapování mikrocév mozku člověka jsme testovali následující nulové hypotézy:

## Cíle a hypotézy dizertace

- A.  $H_0(A)$ : Trojrozměrná délková hustota a numerická hustota mikrocév se u obou mozků neliší.
- B.  $H_0(B)$ : Trojrozměrná délková hustota a numerická hustota mikrocév se neliší při porovnání šedé hmoty koncového mozku, podkorové šedé hmoty a bílé hmoty.
- C.  $H_0(C)$ : Trojrozměrná délková hustota a numerická hustota mikrocév nekoreluje s hodnotami prostorové anizotropie mikrocév publikovanými dříve u těchto mozků (Kochová et al., 2011).

Podrobná metodika, výsledky, diskuse a závěry jsou v plném rozsahu součástí publikace v časopise *Journal of Chemical Neuroanatomy* (Kubíková et al., 2018). Publikace je v příloze II této dizertační práce.

## **2.3 Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného *in vivo***

### **2.3.1 Motivace a cíle práce**

Jednou z významných oblastí tkáňového inženýrství je vývoj umělých cévních štěpů a náhrad. Ty materiály a výrobky, které projdou úspěšně sérií *in vitro* testů, pokračují do testů *in vivo*, v nichž se zkoumá, zda a jak jsou tolerovány organismem příjemce, jaká je míra jejich průchodnosti v čase a zda se vnitřní prostory tkáňového nosiče osidlují buňkami a mezibuněčnou hmotou příjemce. Ve studii, v níž jsme hodnotili osidlování štěpů vyrobených z poly(L-laktid-co- $\epsilon$ -kaprolaktonu) a implantovaných jako interpozit a. carotis králíka, jsme se po histologické stránce zaměřili na rozdíly v expresi komponent cévní stěny a vaskularizaci štěpů po 10 týdnech a po 6 měsících přežívání.

### **2.3.2 Hypotézy**

Při zkoumání vaskularizace štěpů jsme plánovali testovat následující nulovou hypotézu:

- A.  $H_0(A)$ : Expres kolagenu typu I, hladkosvalového aktinu, CD31-pozitivních vasa vasorum a neurofilament protein-pozitivních nervi vasorum se neliší po 10 týdnech a 6 měsících přežívání.

## **2.4 Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT**

### **2.4.1 Motivace a cíle práce**

Výpočetní tomografie s vysokým rozlišením, zvaná též mikro-CT, se stává metodou volby pro trojrozměrnou charakteristiku a kvantifikaci rentgen-contrastních biomateriálů a tvrdých tkání. Při rozlišovací schopnosti blízké se desítkám až jednotkám mikrometrů se tato metoda překrývá s mikroskopií. Zpracování obrazových dat u materiálů s nízkou či vzájemně se překrývající radioopacitou vyžaduje při segmentaci obrazových dat pokročilé segmentační metody. Tato obrazová segmentace dat může být zdrojem artefaktů a zkreslení neznámé velikosti. Naším cílem bylo proto vyvinout a otestovat software, který dokáže generovat přesně kalibrovaná trojrozměrná virtuální obrazová data vláknitých a porézních struktur o známých objemech, površích, délkách a počtech objektů. Tato obrazová data by pak bylo možno použít ke kalibraci segmentačních procedur používaných v postprocessingu mikro-CT vyšetření s cílem kvantifikovat chybu vnesenou segmentačními algoritmy. Software by měl rovněž simulovat realistický šum.

U tohoto úkolu nebyly testovány hypotézy ve vědeckém slova smyslu, protože cílem bylo vytvořit funkční nástroj. Byla však provedena rozsáhlá citlivostní analýza parametrů používaných pro generování virtuálních trojrozměrných obrazových dat.

## **2.5 Densita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí**

### **2.5.1 Motivace a cíle práce**

Přestože histologický popis změn ve stěně aterosklerotickým zánětem podmíněných výdutí břišní aorty v posledních dekadách značně pokročil, stále se nedostává hlubšího pochopení souvislostí mezi jednotlivými vyšetřovanými markery, a to jak přímo ve stěně výdutě, popřípadě naléhajícího trombu, tak u markerů cirkulujících v plazmě. Jen málo studií totiž současně vyšetřuje rozsáhlejší panely stávajících či nově testovaných markerů a velký deficit poznání dosud panuje v oblasti kvantitativní histologie AAA. Cílem naší studie bylo proto porovnat histologicky zjevnou expresi celkem dvanácti složek AAA oproti stěně normální aorty; mezi vyšetřované složky patřily strukturální proteiny (elastin, kolagen, aktin, desmin),

Cíle a hypotézy dizertace

faktory imunity (T-lymfocyty, B-lymfocyty, makrofágy, neutrofilní granulocyty, pentraxin 3 (PTX3)), osteoprotegerin (OPG), vasa vasorum a marker hypoxie (HIF 1-alpha).

## 2.5.2 Hypotézy

Na základě návrhů z ostatních publikací zveřejněných v době plánování naší studie jsme testovali následující nulovou hypotézu:

- A.  $H_0(A)$ : Expresse výše uvedených dvanácti složek má u AAA i normální aorty podobné hodnoty i vzájemné statistické korelace.

## 2.6 Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum

### 2.6.1 Motivace a cíle práce

Pro tepny s průměrem cca 4-6 mm a méně dosud nejsou k dispozici umělé náhrady, které by byly dlouhodobě průchodné a mohly tak plnit svoji funkci. Protože revaskularizace myokardu vyžaduje právě tepny o těchto průměrech, jedná se o oblast intenzivního výzkumu, které týmy soustředící se na vývoj umělých cév věnují velkou pozornost. Arteria carotis prasete a ovce odpovídá těmto tepnám svou velikostí a její průchodnost je snadno opakovaně vyšetřitelná ultrazvukem, proto jsou tyto tepny významným modelem pro testování nově vyvíjených umělých cévních štěpů pro oblast kardiochirurgie. Naše pilotní pozorování naznačovala, že mikroskopická stavba proximálních úseků krkavic prasete se dramaticky liší od distálních úseků. Při rešerši jsme zjistili, že tyto poměrně dlouhé tepny ještě nebyly histologicky zmapovány, což činí výsledky získané na tomto modelu jen obtížně vzájemně porovnatelné. Navíc nebylo známo, do jaké míry tyto zvířecí tepny svojí histologickou stavbou vůbec odpovídají skutečným koronárním tepnám člověka ve věku obvyklých revaskularizačních zákroků a do jaké míry odpovídají i tepenným štěpům první volby pro revaskularizaci jako je arteria thoracica interna, tj. do jaké míry je zvířecí model vůbec možno považovat za realistický s ohledem na konečnou možnou aplikaci u lidských pacientů. Cílem naší vlastní studie bylo proto zaplnit tuto mezeru v poznání a v interpretaci výsledků získávaných na modelu krkavic prasete. Protože na základě předchozích studií kombinujících popis vasa vasorum se složením cévní stěny (Tonar et al., 2016; Blassová et

al., 2019) se domníváme, že nelze interpretovat jedno z těchto témat odděleně od druhého a současně se jedná u každé z oblastí (vasa vasorum a složení stěny) o velmi rozsáhlé studie čítající tisíce preparátů, volili jsme analýzu složení stěny jako první krok před plánovanou kvantifikací samotných vasa vasorum.

## 2.6.2 Hypotézy

Na základě vyšetření pilotních vzorků, literární rešerše a experimentální praxe s modelem a. carotis prasete jsme testovali následující nulové hypotézy:

- A.  $H_0(A)$ : Histologická stavba pravostranné a levostranné a. carotis prasete se u téhož jedince neliší a lze je proto vzájemně zaměnitelně používat jako experimentální a kontrolní tepny.
- B.  $H_0(B)$ : Histologická stavba odpovídajících segmentů a. carotis prasete se neliší mezi samci a samicemi a jedince obou pohlaví lze proto z histologického pohledu kombinovat do výzkumných skupin experimentů.
- C.  $H_0(C)$ : Histologická stavba proximálních, středních a distálních úseků a. carotis prasete se u téhož jedince neliší a nezáleží proto na místě implantace cévních štěpů.
- D.  $H_0(D)$ : Histologická stavba a. carotis prasete se významně neliší od koronárních tepen a arteria thoracica interna člověka.



### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete

Aortální segmenty pocházely z již dříve publikovaných studií o orientaci buněk hladké svaloviny v aortě prasete (Tonar et al., 2015a) a histologickém složení aorty (Tonar et al., 2015b). Studie byla založena na 25 jedincích (12 samců, 11 samic, 1 kastrovaný samec, 1 jedinec bez dokumentovaného pohlaví) tří věkových skupin: sající selata ve věku 0-28 dní (n=13 jedinců, 64 aortálních segmentů); odstavená selata ve věku 29-75 dní (n=7; 35 aortálních segmentů); dále rostoucí prasata (180-230 dní; n=5 jedinců, 24 aortálních segmentů). Po fixaci formolem bylo z aorty každého jedince vyšetřeno pět segmentů: vzestupná aorta, aortální oblouk, hrudní sestupná aorta, břišní suprerenální a infrarenální aorta. Z každého segmentu byly vyšetřeny dva příčné histologické řezy, jeden barvený kombinací Verhoeffova hematoxylinu a zeleného trichromu (Kočová, 1970), druhý s imunohistochemickým průkazem endotelu pomocí protilátky proti von Willebrandovu faktoru. Z každého řezu byly fotografovány dva snímky z protilehlých oblastí stěny (objektiv 4×), tj. celkem 246 snímků ze 123 řezů.

V každém vzorku byly vyhodnoceny následující parametry:

- i)  $Q_A(\text{media})$ : dvojrozměrná hustota von Willebrand-pozitivních profilů vasa vasorum na jednotku plochy řezu medie
- ii)  $f(\text{media})$ : střední hodnota relativní vzdálenosti profilů vasa vasorum od vnější (abluminální) hranice medie (hodnota 0) k vnitřní (adluminální) hranici medie (hodnota 1)
- iii) Int+media thickness (IMT): součet tloušťky intimy a medie jako střední vzdálenost intimálního profilu a abluminální hranice medie
- iv)  $Q_A(\text{adventitia})$ : dvojrozměrná hustota von Willebrand-pozitivních profilů vasa vasorum na jednotku plochy řezu adventicie
- v)  $f(\text{adv})$ : střední hodnota relativní vzdálenosti profilů vasa vasorum od vnější (abluminální) hranice adventicie (hodnota 0) k vnitřní (adluminální) hranici adventicie (hodnota 1)

## Materiál a metody

- vi) Adventitia thickness (AT): tloušťka adventicie jako střední vzdálenost adluminální a abluminální hranice adventicie
- vii)  $Q_A(\text{wall})$ : dvojrozměrná hustota von Willebrand-pozitivních profilů vasa vasorum na jednotku plochy řezu celou stěnou
- viii) Wall thickness (WT): součet IMT+AT
- ix)  $A_A(\text{elastin, collagen, actin, desmin, vimentin})$ : plošné podíly elastinu, kolagenu, aktinu, desminu a vimentinu v referenčním prostoru intimy a medie

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze I. na str. 61.

### 3.2 Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka

K analýze bylo odebráno vždy 16 tkáňových bločků ze dvou mozků člověka vyšetřovaných v rámci zdravotní pitvy. Mozek č. 1 pocházel od 53leté ženy bez makroskopických známek postižení mozku. Mozek č. 2. pocházel od 70letého muže s předpokládanou věkově podmíněnou mikrovaskulární atrofií mozku. U žádného ze zemřelých nesouvisela příčina smrti s postižením mozku, ani nebylo při pitvě nalezeno žádné zjevné postižení mozku. Smyslem výběru těchto odlišných věkových skupin a pohlaví bylo zachytit maximální možnou biologickou variabilitu. Bločky byly odebrány z těchto oblastí: kůra koncového mozku (3×, povodí a. cerebri anterior, media et posterior), putamen et globus pallidus, thalamus, šedá hmota mozečkových hemisfér; dále bílá hmota koncového mozku (opět 3× z téhož povodí jako šedá hmota plus dvě interteritoriální oblasti na hranici mezi zásobením sousedních tepen), přední a zadní raménko capsula interna, bílá hmota Varolova mostu, bílá hmota mozečku.

Ze všech oblastí byly zhotoveny jednak 20  $\mu\text{m}$  silné řezy s přesnou znalostí anatomické roviny řezu, jednak série čtyř rutinních 4  $\mu\text{m}$  silných řezů po znáhodnění orientace principem orientátoru (Mattfeld et al., 1990; Nyengaard et Gundersen, 2006; Mühlfeld et al., 2010). V řezech byly mikrocévy prokázány pomocí imunohistochemického průkazu lamininu, který tvoří v centrálním nervovém systému souvislou vrstvu pod endotelem mikrocév. V silných řezech jsme pomocí optického disektoru (Sterio, 1984) kvantifikovali numerickou hustotu

## Materiál a metody

krevních mikrocév  $N_V$  (Lokkegaard et al., 2001), přičemž pro každý z 16 tkáňových bločků každého mozku bylo vyšetřeno 144 mikrofotografií. V sérii náhodně orientovaných rutinních fyzických řezů jsme technikou nevychýleného počítacího rámečku (Gundersen, 1977) kvantifikovali délkovou hustotu  $L_V$  přepočtem z dvojrozměrné hustoty profilů mikrocév  $Q_A$  (Baddeley and Jensen, 2005), přičemž pro každý z tkáňových bločků bylo vyšetřeno 256 mikrofotografií a počítáno v průměru 210 cévních profilů na vzorek.

Pro korekci smrštění tkáňových bločků vlivem formolové fixace a parafinového procesu jsme porovnali objemy nativních bločků před fixací, po fixaci formolem a na konci celého histologického zpracování, a to zvláště u korové šedé hmoty, bazálních ganglií a u bílé hmoty. Výsledné koeficienty smrštění byly použity pro korekci dat získaných z parafinových řezů tak, aby upřesnily hodnoty hustot do stavu před zpracováním.

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze II. na str. 77.

### **3.3 Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného *in vivo***

Umělé štěpy byly explantovány společně s proximálním i distálním úsekem a. carotis králíka po 10 týdnech ( $n=5$  jedinců) a po 6 měsících ( $n=5$  králíků). Jako vnitřní kontrola byla pro každý štěp vyšetřena i druhostranná krkavice téhož jedince. Po fixaci formolem byly vzorky zpracovány na parafinové řezy o síle  $4\ \mu\text{m}$  s orientací řezu kolmou i podélnou vůči ose cévy. Řezy byly barveny hematoxylinem-eosinem (celková morfologie), Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (elastin a cévní svalovina), orcein (elastin), pikrosiriová červeň (kolagen typu I a III při pozorování v cirkulárně polarizovaném světle). Imunohistochemicky byl prokázán alfa-hladkosvalový aktin (cévní svalovina a myofibroblasty), CD31 (marker endotelu), neurofilament protein (marker periferních nervů) a CD68 (marker makrofágů). Preparáty byly pak vyšetřeny optickou mikroskopií.

Vzhledem k rozsáhlé dezintegraci vrstev štěpu na řezech jsme upustili od kvantitativního hodnocení. Vzhledem k nízkému počtu zvířat, která přežila v každé z porovnávaných skupin, nebylo možné provést standardní statistické testování.

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze III. na str. 90.

### **3.4 Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT**

Z hlediska morfoložů se jednalo o intenzivní spolupráci s programátory. K ní jsme přispěli výběrem takových kvantifikovaných parametrů, které jsou obvyklé v morfometrii biomateriálů, konkrétně: objemový podíl  $V_V$  (volume per volume), povrchová hustota  $S_V$  (surface per volume), délková hustota  $L_V$  (length per volume) a numerická hustota  $N_V$  (number per volume). Pro realistické testování a ladění programu jsme využívali data ze skutečně existujících biomateriálů, konkrétně:

- i) polykaprolaktonové cévní štěpy s vlákny o průměru 1-6  $\mu\text{m}$ , která vyplňovala prostor s objemovým podílem 25-70 % (Horáková et al., 2018; Plencner et al., 2014)
- ii) kompozitní porézní tkáňové nosiče sestávající z kolagenu, polyDL-laktidových submikronových vláken a hyaluronátu sodného s porozitou v rozmezí 70-80 % (Prosecká et al., 2015; Suchý et al., 2015).

Software jsme testovali na platformě Windows s nainstalovaným programovým prostředím python. Standardní obrazová data o rozměrech  $500 \times 500 \times 500$  voxelů s rozlišením 35 pixelů byla generována přibližně 4 minuty. Vygenerovaná data jsme nechali zpracovat u našich spolupracovníků dále na mikro-CT konzoli Skyscan. Výsledná data jsme shromáždili a porovnali s a priori známými vygenerovanými hodnotami a provedli citlivostní analýzu pomocí korelačních grafů, Bland-Altmanových grafů a s vyhodnocením relativní chyby objemů i povrchů při různých rozlišeních (20-70 pixelů).

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze IV. na str. 108.

### **3.5 Denzita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí**

Histologicky jsme vyšetřili tkáňové bločky stěny AAA u pacientů ( $n=39$ ) podstupujících elektivní otevřenou AAA, jejíž součástí byla i resekce části vaku AAA. Pro porovnání jsme

## Materiál a metody

vyšetřili i normální subrenální aortu získanou od nebijících dárců ledvin (n=8). Formolem fixované parafinové řezy byly barveny panelem 14 metod (tabulka 7):

**Tabulka 7 - Histologické metody barvení použité při vyšetřování AAA**

<b>Metoda barvení</b>	<b>Účel barvení a vizualizace složek aortální stěny</b>
Hematoxylin-eosin	Celková morfologie stěny
Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom	Celková morfologie, pojivové tkáně a svalovina
Pikrosiriová červeně	Kolagen typu I a typu III při pozorování v cirkulárně polarizovaném světle
Orcein	Elastické membrány či jejich fragmenty
Imunohistochemický průkaz alfa-hladkosvalového aktinu	Kontraktilní fenotyp hladkých svalových buněk
Imunohistochemický průkaz desminu	Kontraktilní fenotyp hladkých svalových buněk
Imunohistochemický průkaz MAC387	Infiltrace stěny aorty makrofágy
Imunohistochemický průkaz myeloperoxidázy	Infiltrace aortální stěny neutrofilními granulocyty
Imunohistochemický průkaz CD3	T-lymfocyty
Imunohistochemický průkaz CD20	B-lymfocyty
Imunohistochemický průkaz CD31	Endotel vasa vasorum
Imunohistochemický průkaz HIF 1- $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ , marker tkáňové hypoxie
Imunohistochemický průkaz Pentraxinu-3	Pentraxin-3, součást proteinů akutní zánětlivé odpovědi
Imunohistochemický průkaz osteoprotegerinu	Osteoprotegerin, polyvalentní glykoprotein

Pro každou z barvicích metod jsme pořídili čtyři snímky systematicky náhodně pokrývající dva histologické řezy. V mikrofotografiích jsme pak bodovou testovací mřížkou kvantifikovali plošné podíly ( $A_A$ ) pozitivity či imunopozitivity ve stěně aorty; v případě vasa vasorum šlo o dvojrozměrnou hustotu jejich CD31-pozitivních cévních profilů ( $Q_A$ ).

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze V. na str. 128.

### **3.6 Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum**

Vyšetřili jsme 41 krkavic od 21 jedinců (12 samic a 9 samců) přeštických černostrakatých prasat o stáří 12-21 týdnů a hmotnosti 20-65 kg. Vypreparované tepny, které měřily 8-13 cm, byly rozděleny do segmentů po 1 cm a každý segment byl pak vyšetřován histologicky zvlášť.

Vzorky koronárních tepen byly získány v rámci pitvy prováděné u 21 jedinců ve věku 57-78 let. Poměr pohlaví 2:1 ve prospěch mužů (14 mužů a 7 žen) i věkové rozmezí odpovídalo typickým pacientům podstupujícím revaskularizaci myokardu. Byly odebrány vzorky z míst typicky překlenovaných při koronární revaskularizaci, konkrétně u arteria coronaria sinistra to byly segmenty ramus circumflexus, ramus marginalis sinister, ramus interventricularis anterior, ramus diagonalis; u arteria coronaria dextra to byly segmenty ramus marginalis sinister, ramus interventricularis posterior a ramus posterolateralis dexter. Rovněž byly odebrány proximální, střední a distální segmenty arteria thoracica interna. U koronárních tepen jsme klasifikovali stupeň aterosklerózy (Stary et al, 1994; Stary, 2000).

Všechny cévní segmenty byly po fixaci formalinem zpracovány na histologické řezy barvené hematoxylinem-eosinem, Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem, pikrosiriovou červení a imunohistochemicky s průkazem hladkosvalového aktinu. Po systematickém nestranném vzorkování zorných polí jsme v mikrofotografiích kvantifikovali plošný podíl elastinu v intimě a medii a zvlášť rovněž v adventicii, plošný podíl kolagenu v intimě a v medii a zvlášť ještě i v adventicii, plošný podíl hladkosvalového aktinu v intimě a medii, tloušťku intimy a medie a celkovou tloušťku cévní stěny.

Další podrobnosti nutné pro reprodukovatelnost studie jsou uvedeny v publikované příloze VI. na str. 143.

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Mapování vasa vasorum v tunica media a tunica adventitia aorty prasete

#### 4.1.1 Hlavní zjištění

Tunica media v hrudních segmentech aorty měla vyšší hustotu a hlubší průnik profilů vasa vasorum nežli v segmentech břišní aorty. Hustota vasa vasorum postupně klesala s věkem zvířat, a to jak v medii, tak v adventicii. Relativní hloubka průniku vasa vasorum do medie zůstávala konstantní nezávisle na stáří zvířat a tloušťce medie. Během stárnutí zvířat zůstával poměr tloušťky medie a adventicie v rámci týchž segmentů neměnný. Media starších zvířat byla zásobena nižší hustotou vasa vasorum nežli u mladších zvířat, ale jejich rozmístění uvnitř medie se s věkem neměnilo. Hustota vasa vasorum v medii pozitivně korelovala s tloušťkou medie a s množstvím elastinu v ní.

V porovnání s dříve publikovanými studii jsme pomocí imunohistochemické kvantifikace vasa vasorum ukázali, že tato pronikají hlouběji směrem adluminálně do oblastí, které byly dříve v literatuře považovány za avaskulární. V příloze práce jsme zveřejnili veškerá primární morfometrická data v podobě spojitých proměnných. Domníváme se, že mapování hustot profilů a hloubky průniku vasa vasorum je vhodným nástrojem pro histologické studie zabývající se u prasečího modelu aterosklerózou, zánětlivou novotvorbou cév, výdutěmi aorty či distribucí látek uvolňovaných z aortálních stentů.

#### 4.1.2 Publikace

Tonar Z, **Tomášek P**, Loskot P, Janáček J, Králíčková M, Witter K. Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2016 May;205:22-36. doi: 10.1016/j.aanat.2016.01.008.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze I na str. 61.

## 4.2 Mapování denzity mikrocév ve vzorcích šedé a bílé hmoty mozku člověka

### 4.2.1 Hlavní zjištění

Numerická hustota i délková hustota krevních mikrocév šedé hmoty koncového mozku byla srovnatelná s hodnotami u podkorové šedé hmoty bazálních ganglií. Obě hustoty byly vyšší u šedé hmoty nežli v bílé hmotě. Numerická hustota středně silně korelovala s délkovou hustotou. Oblasti mozku s vyšší numerickou hustotou mikrocév se vyznačovaly ztrátou přednostní orientace mikrocév.

Námi získaná data se překrývala s dříve publikovanými údaji pro některé z oblastí mozku, avšak publikaci mapující mikrocévy mozku člověka ve stejném rozsahu vzorkování jsme v literatuře nenalezli. Všechna primární kvantitativní data jsme publikovali spolu s článkem. Střední hodnoty i míru variability cévního řečiště mozku, kterou jsme zmapovali, lze využít jak v počítačovém modelování prokrvení různých částí centrálního nervového systému, tak např. k vysvětlení distribuce kontrastních látek u zobrazování mozku (CT angiografie, PET/CT, PET/MRI), popř. při mapování distribuce účinných látek do těchto oblastí. Zmapování variability hustot mikrocév u našich pilotních vzorků rovněž umožňuje provedení analýzy síly testu při odhadu minimálního počtu vzorků potřebného k průkazu biologických rozdílů v hustotách při plánování a optimalizaci dalších studií.

### 4.2.2 Publikace

Kubíková T, Kochová P, **Tomášek P**, Witter K, Tonar Z. Numerical and length densities of microvessels in the human brain: Correlation with preferential orientation of microvessels in the cerebral cortex, subcortical grey matter and white matter, pons and cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 2018 Mar;88:22-32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.11.005.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze II na str. 77.



### **4.3 Úloha vasa vasorum v osídlení syntetického cévního štěpu implantovaného *in vivo***

#### **4.3.1 Hlavní zjištění**

Po 10 týdnech byly ve stěně štěpu nalezeny jen izolované hladké svalové buňky, zatímco po 6 měsících se již jednalo o vrstvy aktin-pozitivních svalových buněk. Tyto vrstvy byly nalezeny jen v těch štěpech, jejichž průsvit zůstal dobře průchodný. Množství kolagenu typu I a III bylo jen velmi nízké. Elastin nebyl přítomen u žádného štěpu. Endotelizaci štěpů nebylo možné posoudit pro křehkost štěpů, která vedla k značnému poškození a dezintegraci štěpů. V žádném ze štěpů nebyly nalezeny žádné cévy typu vasa vasorum ani žádné nervy (nervi vasorum), a to ani po 10 týdnech, ani po 6 měsících.

Z histologického pohledu se jednalo o dobře tolerované štěpy, kolem nichž nebyla nalezena žádná reakce svědčící o nedostatečné biokompatibilitě. Nebyla přítomna ložiska obrovských buněk z cizích těles. Štěpy byly vzhledem ke kontrolním nativním krkavicím velmi tenkostěnné a naše nálezy interpretujeme tak, že tento typ štěpů neposkytuje dostatečnou oporu a niky vhodné pro rozsáhlejší buněčné osídlení. Jako perspektivnější se jeví vícevrstevné typy štěpů, jejichž tloušťka by realisticky odrážela tloušťku tepny, kterou má štěp nahrazovat. Za zajímavé pokládáme zjištění, že usídlení několika málo (3-5) vrstev buněk hladké svaloviny ve skeletu nosiče nevyžadovala vrůstání vasa vasorum, což nasvědčuje tomu, že permeabilita a poréznost nosiče, která byla zdokumentována *ex vivo*, přetrvává i v podmínkách *in vivo*.

#### **4.3.2 Publikace**

Horakova J, Mikes P, Lukas D, Saman A, Jencova V, Klapstova A, Svarcova T, Ackermann M, Novotny V, Kalab M, Lonsky V, Bartos M, Rampichova M, Litvinec A, Kubikova T, **Tomasek P**, Tonar Z. Electrospun vascular grafts fabricated from poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) used as a bypass for the rabbit carotid artery. *Biomed Mater.* 13(6):065009. doi: 10.1088/1748-605X/aade9d.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze III na str. 90.

## 4.4 Generování virtuálních obrazových dat pro kalibraci vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT

### 4.4.1 Hlavní zjištění

Našemu mezioborovému týmu se podařilo navrhnout a detailně otestovat program TeiGen, který byl včetně kódu volně zveřejněn pro kalibraci segmentačních procedur mikro-CT konzolí. Program je schopen dle zadání generovat fantomová obrazová data s přesně známými objemy, povrchy, délkami a počty struktur. Podle simulovaného materiálu lze generovat virtuální stacky trojího typu: nedotýkající se válcovité struktury či vlákna, protínající se struktury a porézní materiál. Program je schopen volitelně generovat šum zcela realistický vůči reálným mikro-CT skenům.

Kvantifikovali jsme míru chyby po evaluaci 48 sad virtuálních stacků a eliminovali chybu objemů a povrchů kolidujících objektů, což se ukázalo jako velmi netriviální zadání. Analýza citlivosti jednotlivých vstupních parametrů ukázala hranice rozlišení a šumu, mimo jejichž bezpečné rozmezí již významně stoupá chyba kvantifikace takových dat pomocí mikro-CT. Velikost chyby rostla, pokud velikost voxelu přesáhla 1/10 typického rozměru zobrazovaných struktur. Tím jsme simulovali efekt nejmenších detailů v hodnocených obrazech na skutečnost, při jakém rozlišení ještě mohou být spolehlivě kvantifikovány. Tyto procedury si pomocí našeho software mohou nyní výzkumníci nasimulovat předem bez plýtvání drahým strojovým časem a zvolit tak optimální rozlišení pro ty struktury, které chtějí pomocí mikro-CT spolehlivě kvantifikovat. Program dokáže ukládat generovaná obrazová data a metadata ve formátu DICOM, běžném v oblasti trojrozměrného zobrazování. Program tak vyplňuje metodickou mezeru, která dosud nebyla řešena výrobcí mikro-CT konzolí, kdy výzkumníci neměli v minulosti žádnou možnost vnitřní kontroly nad velikostí chyby, které se při využití různých segmentačních procedur a při následné automatizované morfometrii vláknitých a porézních mikrostruktur nutně dopouštěli. Kromě publikace algoritmu, všech primárních dat a protokolů je i samotný program TeiGen volně dostupný jako open source.

### 4.4.2 Publikace

Jířík M, Bartoš M, **Tomášek P**, Malečková A, Kural T, Horáková J, Lukáš D, Suchý T, Kochová P, Hubálek Kalbáčová M, Králíčková M, Tonar Z. Generating standardized image

data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech.* 2018 Jun;81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze IV na str. 108.

## **4.5 Densita mikrocév ve stěně AAA v kontextu ostatních markerů remodelace výdutí**

### **4.5.1 Hlavní zjištění**

Vzorky stěny AAA obsahovaly v porovnání se stěnou normálních aort menší podíly aktinu, méně desminu, méně elastinu a méně osteoprotegerinu. Naproti tomu obsahovaly vzorky AAA větší podíly kolagenu, makrofágů, neutrofilních granulocytů, T-lymfocytů, B-lymfocytů, HIF-1 $\alpha$  a pentraxinu 3. Vzorky AAA měly vyšší hustotu CD31-pozitivních profilů vasa vasorum nežli normální aorty. Marker hypoxie pozitivně koreloval s podílem aktinu a negativně s podílem kolagenu. Hustota vasa vasorum korelovala se zánětlivými infiltráty, s markerem hypoxie, s expresí pentraxinu 3 a s makroskopickým průměrem AAA. Kompletní primární morfometrická data byla publikována společně s článkem.

Relativně nižší exprese osteoprotegerinu u AAA podporuje ve světle ostatních literárních zdrojů jeho v literatuře navrhovanou protektivní roli v remodelaci AAA. Vyšší exprese pentraxinu 3 a kolokalizace jeho exprese se zánětlivou infiltrací spíše podporuje další výzkum solubilní formy pentraxinu 3 jako možného kandidáta na marker AAA tak, jak je zvažována i v dalších publikacích. Přes zvýšenou vaskularizaci zmnožených vasa vasorum jsme v týchž vzorcích zaznamenali i zvýšenou expresi hypoxického markeru, což pokládáme za morfologický obraz hypoxicky podmíněné neoangiogeneze jakožto jevu, který je v literatuře podezříván z významné role v patogenezi AAA a ze zvyšování její náchylnosti k ruptuře.

### **4.5.2 Publikace**

Blassova T, Tonar Z, **Tomasek P**, Hosek P, Hollan I, Treska V, Molacek J. Inflammatory cell infiltrates, hypoxia, vascularization, pentraxin 3 and osteoprotegerin in abdominal aortic

aneurysms - A quantitative histological study. PLoS One. 2019 Nov 8;14(11):e0224818. doi: 10.1371/journal.pone.0224818. eCollection 2019.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze V na str. 128.

## **4.6 Mapování histologické variability segmentů krkavice prasete jako základ pro budoucí studii variability vasa vasorum**

### **4.6.1 Hlavní zjištění**

Neplánovaným zjištěním byl popis abnormalit ve větvení karotického systému prasete, které byly zachyceny u třech z 21 jedinců. Šlo o aberantní odstup z a. subclavia dextra, aberantní větev pro štítnou žlázu z a. carotis communis a zdvojení pravé a. carotis externa.

Z hlediska kvantitativně vyšetřených histologických parametrů nebylo rozdílů mezi pravostrannou a levostrannou tepnou téhož jedince, až na hraničně vyšší podíl elastinu v levé a. carotis communis. Tento rozdíl vymizel po vyřazení jedinců s výše uvedenými anatomickými abnormalitami větvení. Porovnání stavby od proximálních k distálním úsekům ukázalo prudký pokles podílu elastinu směrem distálně a současně nárůst podílu aktinu v témže směru. Podíl kolagenu přitom zůstával přibližně stejný. Proximální úseky měly stavbu elastických tepen s koncentrickými elastickými lamelami, zatímco distální úseky se v rozmezí cca 2-3 cm změnilly na tepny svalového typu. Zatímco tloušťka intimy a medie směrem proximodistálně klesala, celková tloušťka tepny zůstávala stejná, až se s rozšiřující adventicií v distálních úsecích rozšiřovala. Pokud bychom předpokládali, že elastin snižuje permeabilitu cévní stěny a účinnost difuze, pak bychom v proximálních úsecích s bohatšími elastinovými lamelami mohli očekávat vyšší hustotu vasa vasorum a jejich průnik hlouběji adluminálně – tento předpoklad bude ověřen v právě probíhající studii.

Porovnáním krkavic prasete s lidskými tepnami jsme zjistili značné kvantitativní rozdíly v jejich histologické stavbě. U krkavic prasete dominovalo vyšší zastoupení elastinu a aktinu. U koronárních tepen člověka bylo patrné rozrušení elastinu a ztráta kontraktilního fenotypu cévní svaloviny vlivem aterosklerózy. Naproti tomu a. thoracica interna týchž jedinců byla téměř prosta aterosklerózy a elastin byl v ní velmi dobře zachován. Tloušťka stěny i poměr intimy a medie ku celkové tloušťce stěny se u krkavic prasete svojí variabilitou

## Výsledky a diskuse

částečně překrývaly s hodnotami u lidských tepen. Spolu se shrnutím jsme publikovali i veškerá primární morfometrická data.

Výsledky analýz mají značný praktický dopad do plánování dalších in vivo studií využívajících krkavice prasete jako model pro kardiovaskulární chirurgii. Díky variabilitě zmapovaných a publikovaných parametrů lze nyní provádět analýzu síly testu s odůvodněním počtu jedinců a vzorků nutných pro průkaz změn předpokládané velikosti, což je standardní a eticky nutný krok pro opodstatnění ztrát na životech experimentálních zvířat. Například, pokud v experimentu očekáváme pokles podílu aktinu o 20 % u středních segmentů krkavice (tj. z 54,3 % na 42,7 %), potřebujeme minimálně 9 takových vzorků v každé z porovnávaných skupin, pokud použijeme typickou sílu testu  $\beta=0.8$  (chyba II. druhu) a  $\alpha=0.05$  (chyba I. druhu) (Chow et al. 2008). Podobně, detekce 25% nárůstu tloušťky intimy a medie v proximálních segmentech (tj. ztlustění z 634  $\mu\text{m}$  na 792  $\mu\text{m}$ ) by vyžadovalo 13 vzorků v každé z porovnávaných skupin. Dále z našeho zjištění plyne, že lze používat pravou i levou krkavici zaměnitelně a lze sdružovat zvířata různého pohlaví, aniž by to narušilo interpretaci histologických výsledků získaných na těchto tepnách. Ukázalo se, že pro morfometrii in vivo experimentů je zcela zásadní dodržovat místo a délku testovaných štěpů, protože stavba krkavice se prudce mění v rámci několika málo centimetrů.

Přestože se již před naší studií dalo očekávat, že stavba krkavic mladých a zdravých prasat se bude lišit od stavby koronárních tepen pacientů v 6.-8. deceniu, nyní máme kvantitativní představu o velikosti a významu těchto rozdílů a tím pádem i o interpretačních limitech in vivo testů prováděných na modelu krkavice prasete. Přes zmapování těchto rozdílů, anebo právě díky nim, zůstává krkavice prasete nejvíce realistickým a nejlépe dokumentovaným a etablovaným modelem pro in vivo testování maloprůměrových umělých cévních náhrad. Naše morfometrická data navíc ukazují limity, v nichž by se měly pohybovat nově vyráběné pokročilé umělé cévní náhrady v tkáňovém inženýrství, kde jedním ze slibných trendů se jeví konstrukce vícevrstevných umělých cév simulujících komplex intima+medie a adventicie a s tloušťkou stěny vhodně se adaptující jak na model krkavice prasete, tak na vrstevnatost reálných koronárních tepen člověka.

Shromážděná morfometrická data popisující segmentální variabilitu histologického složení krkavic považujeme za významný podklad pro nyní probíhající kvantifikaci

samotných vasa vasorum v řezech pocházejících z týchž tkáňových bločků. Samotná morfometrie vasa vasorum, která v současnosti probíhá, by byla jen obtížně interpretovatelná bez kontextu složení stěny, tj. hlavních buněčných typů a dominantních složek mezibuněčné hmoty.

#### **4.6.2 Publikace**

**Tomášek P**, Tonar Z, Grajciarová M, Kural T, Turek D, Horáková J, Pálek R, Eberlová L, Králíčková M, Liška V. Histological mapping of porcine carotid arteries - An animal model for the assessment of artificial conduits suitable for coronary bypass grafting in humans. *Ann Anat.* 2020 Mar;228:151434. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151434.

Plné znění publikace včetně obrazové dokumentace je v příloze VI na str. 143.

## 5 Závěry práce

Otázky formulované v kapitole 3 byly tedy zodpovězeny následujícím způsobem:

1. Jak se v makroskopickém měřítku liší hustota mikrocév a jejich distribuční hloubka v různých segmentech aorty prasete, která je významným modelem v experimentální chirurgii?

**Závěr 1:** Existuje značná segmentální variabilita v hustotě a hloubce průniku vasa vasorum. Denzita vasa vasorum je nejvyšší v hrudních segmentech, stejně jako hloubka průniku do tunica media, která zde přesahuje dříve publikované výsledky. Denzita vasa vasorum s věkem zvířat klesá, relativní hloubka průniku však nikoliv. Jednotlivé segmenty aorty prasete nejsou pro studie zabývající se vaskularizací cévní stěny vzájemně zaměnitelné.

2. Jak se v makroskopickém měřítku liší trojrozměrná hustota mikrocév různých topograficky vzdálených oblastí šedé a bílé hmoty lidského mozku?

**Závěr 2:** Numerická i délková hustota mikrocév je v šedé hmotě vyšší nežli v bílé hmotě; v rámci šedé hmoty je pak srovnatelná mezi korovými oblastmi a bazálními ganglii. Vysoká denzita mikrocév je statisticky spojena se ztrátou jejich preferenční orientace.

3. Jak se uplatňuje novotvorba vasa vasorum u buněčného osídlení syntetických kopolymerních tubulárních štěpů implantovaných *in vivo* do krkavic králíka?

**Závěr 3:** Námi vyšetřované tenkostěnné tubulární štěpy nebyly ani po 6 měsících *in vivo* invadovány vrůstáním vasa vasorum, což však při vysoké prostupnosti štěpů nebránilo diferenciaci hladkých svalových buněk.

4. Jak kalibrovat vyšetřování mikrocév pomocí mikro-CT?

**Závěr 4:** K dispozici je generátor virtuálních (fantomových) dat vygenerovaných na základě zadání uživatele, v němž upřesní požadované geometrické charakteristiky, jako objem, povrch, délku a počet objektů. Tato obrazová data lze pak včetně realistického šumu zpracovat na mikro-CT konzoli a výsledné geometrické charakteristiky porovnat s předem známým popisem fantomových dat. Z rozdílu lze

usoudit na chybu vzniklou segmentačními procedurami mikro-CT konzole a usoudit, zda velikost této chyby nějak ohrožuje závěry celého měření. Z analýzy citlivosti vidíme, že rozlišení by nemělo být horší nežli 1/10 typického rozměru vyšetřovaných mikrocév.

5. Jak souvisí denzita mikrocév ve stěně výdutě břišní aorty (abdominal aortic aneurysm, AAA) s ostatními markery remodelace stěny u pacientů

**Závěr 5:** Vzorky AAA se vyznačovaly vyšší hustotou profilů vasa vasorum nežli normální aorty. Hustota vasa vasorum současně korelovala s mírou zánětlivé infiltrace, s markerem hypoxie, s expresí pentraxinu 3 a s makroskopickým průměrem AAA. Současný výskyt a kolokalizaci zvýšené vaskularizace stěny AAA s expresí hypoxického markeru pokládáme za morfologický obraz hypoxicky podmíněné neoangiogeneze jakožto jevu, který je v literatuře podezříván z významné role v patogenezi AAA a ze zvyšování její náchylnosti k ruptuře.

6. S jakou variabilitou v histologické stavbě je třeba počítat pro budoucí analýzu vasa vasorum v různých segmentech krkavice prasete, která je významným modelem v experimentální chirurgii?

**Závěr 6:** Na základě dat popisujících složení tepenné stěny, avšak dosud bez znalosti hustoty a distribuce vasa vasorum lze říci, že při vyloučení anatomických variet větvení lze sdružovat pravostranné cévy s levostrannými a cévy od kastrovaných samic a samců. Naopak lze očekávat významné rozdíly mezi proximálním, středním a distálním úsekem krkavic, kde se tepna v krátkém úseku 2-3 cm mění z elastické na svalovou. Vyslovujeme předpoklad, že proximální úsek s koncentrickými elastinovými lamelami bude při nízké propustnosti elastinu pro difuzi látek prostoupen vasa vasorum hustěji a blíže průsvitu, nežli úseky distální. Tato hypotéza musí být však nejprve ověřena daty z dosud probíhající studie. Za účelné považujeme rovněž porovnání stavby krkavice prasete s dalším obdobným velkým modelem v experimentální kardiovaskulární chirurgii, jímž je krkavice ovce.

Domníváme se, že zkušenosti nabyté při práci na šesti přiložených studiích a získané při formulaci uvedených šesti dílčích závěrů nás opravňují k následujícímu shrnutí a zobecnění:



## Závěry práce

U orgánů makroskopických rozměrů (aorta či krkavice velkých zvířat, mozek člověka) nemůžeme oprávněně předpokládat uniformitu v rozmístění, hustotě či orientaci mikrocév na mikroskopickém měřítku. Rozmanitost těchto mikroskopických parametrů vyžaduje jejich důkladné mapování. To v případě mikroskopické variability orgánů velkých zvířecích modelů užívaných v experimentální medicíně umožňuje plánovat experimenty s eticky opodstatněnými počty jedinců či tkáňových vzorků. Ani u trojrozměrných zobrazovacích metod typu výpočetní tomografie s vysokým rozlišením nelze vynechat kalibraci všech postupů, které dosud postrádají standardizaci. Silně podporujeme publikaci primárních naměřených dat v každé morfometrické studii.

## 6 Literatura

- 1 Baddeley A, Jensen EBV. Stereology for statisticians. Monographs on statistics and applied probability. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2005. ISBN 1-58488-405-3.
- 2 Eberlova L, Liska V, Mirka H, Gregor T, Tonar Z, Palek R, Skala M, Bruha J, Vycital O, Kalusova K, Haviar S, Kralickova M, Lametschwandtner A. Porcine liver vascular bed in Biodur E20 corrosion casts. *Folia Morphol (Warsz)*. 2016;75(2):154-161. doi: 10.5603/FM.a2015.0094.
- 3 Eberlova L, Liska V, Mirka H, Tonar Z, Haviar S, Svoboda M, Benes J, Palek R, Eminger M, Rosendorf J, Mik P, Leupen S, Lametschwandtner A. The use of porcine corrosion casts for teaching human anatomy. *Ann Anat*. 2017 Sep;213:69-77. doi: 10.1016/j.aanat.2017.05.005.
- 4 FICAT - Federative International Committee on Anatomical Terminology. Terminologia Histologica. XII. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008. ISBN 978-0-7817-6610-9.
- 5 Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9759735. doi: 10.1155/2017/9759735.
- 6 Hira VVV, Wormer JR, Kakar H, Breznik B, van der Swaan B, Hulsbos R, Tigchelaar W, Tonar Z, Khurshed M, Molenaar RJ, Van Noorden CJF. Periarteriolar Glioblastoma Stem Cell Niches Express Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche Proteins. *J Histochem Cytochem*. 2018 Mar;66(3):155-173. doi: 10.1369/0022155417749174.
- 7 Hlushchuk R, Zubler C, Barré S, Correa Shokiche C, Schaad L, Röthlisberger R, Wnuk M, Daniel C, Khoma O, Tschanz SA, Reyes M, Djonov V. Cutting-edge microangiography: new dimensions in vascular imaging and kidney morphometry. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Mar 1;314(3):F493-F499. doi: 10.1152/ajprenal.00099.2017.
- 8 Houdek K, Moláček J, Třeška V, Křížková V, Eberlová L, Boudová L, Nedorost L, Tolinger P, Kočová J, Kobr J, Baxa J, Liška V, Witter K, Tonar Z. Focal histopathological progression of porcine experimental abdominal aortic aneurysm is mitigated by atorvastatin. *Int Angiol*. 2013 Jun;32(3):291-306.

## Literatura

- 9 Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd edition. QTP Publications, Coleraine, 2005. ISBN 978-0-9565132-0-5.
- 10 Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Oct 7;7:542567.
- 11 Ingegnoli F, Smith V, Sulli A, Cutolo M. Capillaroscopy in Routine Diagnostics: Potentials and Limitations. *Curr Rheumatol Rev*. 2018 Apr 20;14(1):5-11. doi: 10.2174/1573397113666170615084229.
- 12 Jiřík M, Tonar Z, Králíčková A, Eberlová L, Mírka H, Kochová P, Gregor T, Hošek P, Svobodová M, Rohan E, Králíčková M, Liška V. Stereological quantification of microvessels using semiautomated evaluation of X-ray microtomography of hepatic vascular corrosion casts. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2016 Oct;11(10):1803-19. doi: 10.1007/s11548-016-1378-3.
- 13 Kachlík D, Baca V, Stingl J, Sosna B, Lametschwandtner A, Minnich B, Setina M. Architectonic arrangement of the vasa vasorum of the human great saphenous vein. *J Vasc Res*. 2007;44(2):157-66. doi: 10.1159/000099142.
- 14 Kachlík D, Lametschwandtner A, Rejmontová J, Stingl J, Vanek I. Vasa vasorum of the human great saphenous vein. *Surg Radiol Anat*. 2003 Feb;24(6):377-81. doi: 10.1007/s00276-002-0067-9.
- 15 Kachlík D, Stingl J, Sosna B, Straka Z, Lametschwandtner A, Minnich B, Fára P. Morphological features of vasa vasorum in pathologically changed human great saphenous vein and its tributaries. *Vasa*. 2008 May;37(2):127-36. doi: 10.1024/0301-1526.37.2.127.
- 16 Kachlík D. České tělovědné názvosloví. Brno: vydáno nákladem autora, tisk Tribun EU, 2010. ISBN 978-80-254-5684-2.
- 17 Keša P, Pokorná E, Grajciarová M, Tonar Z, Vočková P, Trochet P, Kopeček M, Jakša R, Šefc L, Klener P. Quantitative In Vivo Monitoring of Hypoxia and Vascularization of Patient-Derived Murine Xenografts of Mantle Cell Lymphoma Using Photoacoustic and Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med Biol*. 2021 Jan 14:S0301-5629(20)30566-4. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.010. Online ahead of print.

## Literatura

- 18 Kochová P, Cimrman R, Janáček J, Witter K, Tonar Z. How to assess, visualize and compare the anisotropy of linear structures reconstructed from optical sections--a study based on histopathological quantification of human brain microvessels. *J Theor Biol.* 2011 Oct 7;286(1):67-78. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.07.004.
- 19 Kolinko Y, Krakorova K, Cendelin J, Tonar Z, Kralickova M. Microcirculation of the brain: morphological assessment in degenerative diseases and restoration processes. *Rev Neurosci.* 2015;26(1):75-93. doi: 10.1515/revneuro-2014-0049.
- 20 Kolinko Y, Kralickova M, Tonar Z. The impact of pericytes on the brain and approaches for their morphological analysis. *J Chem Neuroanat.* 2018 Sep;91:35-45. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.04.003.
- 21 Kubíková T, Kochová P, Tomášek P, Witter K, Tonar Z. Numerical and length densities of microvessels in the human brain: Correlation with preferential orientation of microvessels in the cerebral cortex, subcortical grey matter and white matter, pons and cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 2018 Mar;88:22-32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.11.005.
- 22 Lang S, Müller B, Dominiotto MD, Cattin PC, Zanette I, Weitkamp T, Hieber SE. Three-dimensional quantification of capillary networks in healthy and cancerous tissues of two mice. *Microvasc Res.* 2012 Nov;84(3):314-22. doi: 10.1016/j.mvr.2012.07.002.
- 23 Lokkegaard A, Nyengaard JR, West MJ. Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus.* 2001;11(6):726-40. doi: 10.1002/hipo.1088.
- 24 Lüllmann-Rauch, R. *Histologie. Překlad 3. vydání.* Grada Publishing, Praha, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- 25 Mayhew TM, Mühlfeld C, Vanhecke D, Ochs M. A review of recent methods for efficiently quantifying immunogold and other nanoparticles using TEM sections through cells, tissues and organs. *Ann Anat.* 2009 Apr;191(2):153-70. doi: 10.1016/j.aanat.2008.11.001.
- 26 Mühlfeld C. Quantitative morphology of the vascularisation of organs: A stereological approach illustrated using the cardiac circulation. *Ann Anat.* 2014 Jan;196(1):12-9. doi: 10.1016/j.aanat.2012.10.010.

## Literatura

- 27 Nakamura-Ishizu A, Morikawa S, Shimizu K, Ezaki T. Characterization of sinusoidal endothelial cells of the liver and bone marrow using an intravital lectin injection method. *J Mol Histol.* 2008 Oct;39(5):471-9. doi: 10.1007/s10735-008-9186-x.
- 28 Nanka O, Peumans WJ, Van Damme EJ, Pfüller U, Valásek P, Halata Z, Schumacher U, Grim M. Lectin histochemistry of microvascular endothelium in chick and quail musculature. *Anat Embryol (Berl).* 2001 Nov;204(5):407-11. doi: 10.1007/s004290100212.
- 29 Norrby K, Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS.* 2003 Apr;111(4):483-9. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.1110406.x.
- 30 Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May;10(5):1100-23.
- 31 Patzelt M, Kachlik D, Stingl J, Sach J, Stibor R, Benada O, Kofronova O, Musil V. Morphology of the vasa vasorum in coronary arteries of the porcine heart: A new insight. *Ann Anat.* 2019 May;223:119-126. doi: 10.1016/j.aanat.2019.02.006.
- 32 Philimonenko AA, Janáček J, Hozák P. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *J Struct Biol.* 2000 Dec;132(3):201-10. doi: 10.1006/jsbi.2000.4326.
- 33 Polívka J Jr, Pešta M, Pitule P, Hes O, Holubec L, Polívka J, Kubíková T, Tonar Z. IDH1 mutation is associated with lower expression of VEGF but not microvessel formation in glioblastoma multiforme. *Oncotarget.* 2018 Feb 20;9(23):16462-16476. doi: 10.18632/oncotarget.24536.
- 34 Prosecká E, Rampichová M, Litvinec A, Tonar Z, Králíčková M, Vojtová L, Kochová P, Plencner M, Buzgo M, Míčková A, Jančář J, Amler E. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Feb;103(2):671-82. doi: 10.1002/jbm.a.35216.
- 35 Ritman EL, Lerman A. The dynamic vasa vasorum. *Cardiovasc Res.* 2007 Sep 1;75(4):649-58. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.020
- 36 Ross MH, Pawlina W. *Histology. A text and atlas.* 7th edition, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2016. ISBN 978-1-4698-8931-3, pp. 411-427.

## Literatura

- 37 Silver M D, Gotlieb A I, Choen F J. Cardiovascular pathology, 3rd edition, Churchill Livingstone, 2001, Philadelphia. ISBN 0-443-06535-7, pp. 32-34.
- 38 Tonar Z, Egger GF, Witter K, Wolfesberger B. Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microsc Res Tech.* 2008 Oct;71(10):760-72. doi: 10.1002/jemt.20619.
- 39 Tonar Z, Kural T Jr, Kochová P, Nedorost L, Witter K. Vasa vasorum quantification in human varicose great and small saphenous veins. *Ann Anat.* 2012 Sep;194(5):473-81. doi: 10.1016/j.aanat.2012.02.019.
- 40 Tschanz S, Schneider JP, Knudsen L. Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Ann Anat.* 2014 Jan;196(1):3-11. doi: 10.1016/j.aanat.2013.04.011.
- 41 Ushiyama A, Kataoka H, Iijima T. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies. *J Intensive Care.* 2016 Sep 8;4(1):59. doi: 10.1186/s40560-016-0182-z.
- 42 Varga I, Blankova A, Konarik M, Baca V, Dvorakova V, Musil V. The Terminologia Histologica after 10years: Inconsistencies, mistakes, and new proposals. *Ann Anat.* 2018 Sep;219:65-75. doi: 10.1016/j.aanat.2018.05.005.
- 43 Varga I, Gálfiová P, Blanková A, Konarik M, Báča V, Dvořáková V, Musil V, Turyna R, Klein M. Terminologia Histologica 10 years on: some disputable terms in need of discussion and recent developments. *Ann Anat.* 2019 Nov;226:16-22. doi: 10.1016/j.aanat.2019.07.005.
- 44 Veselá P, Tonar Z, Sálek D, Vokurka S, Trněný M, Kodet R, Moulis M, Kašparová P, Vernerová Z, Velenská Z, Strítěský J, Michal M, Boudová L. Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma international prognostic index in 177 cases. *Virchows Arch.* 2014 Nov;465(5):587-97. doi: 10.1007/s00428-014-1632-4.
- 45 Witter K, Tonar Z, Matejka VM, Martinca T, Jonák M, Rokosný S, Pirk J. Tissue reaction to three different types of tissue glues in an experimental aorta dissection model: a quantitative approach. *Histochem Cell Biol.* 2010 Feb;133(2):241-59. doi: 10.1007/s00418-009-0656-3.
- 46 Wolfesberger B, Tonar Z, Witter K, Guija de Arespacohaga A, Skalicky M, Walter I, Thalhammer JG, Egger GF. Microvessel density in normal lymph nodes and

lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. Res Vet Sci. 2008 Aug;85(1):56-61. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.07.008.

## 7 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Klasifikace mikrocév podle Terminologia Histologica (české ekvivalenty dle: Kachlík, 2010) ....	18
Tabulka 2 - Složení stěny mikrocév (upraveno dle Silver et al., 2001 a Ross et Pawlina, 2016) .....	19
Tabulka 3 - Imunohistochemické metody využívané k detekci mikrocév .....	21
Tabulka 4 - Metody lektinové histochemie využívané k detekci mikrocév .....	22
Tabulka 5 - Kvantitativní parametry prvního řádu využívané v morfometrii mikrocév (Lokkegaard et al., 2001; Howard and Reed, 2005; Mühlfeld 2014). .....	24
Tabulka 6 - Kvantitativní parametry vyššího řádu využívané v morfometrii mikrocév .....	25
Tabulka 7 - Histologické metody barvení použité při vyšetřování AAA .....	37



## **8 Publikační činnost autora**

### **8.1 Publikace vztahující se k tématu dizertační práce**

#### **8.1.1 Časopisy s faktorem impaktu**

Tonar Z, **Tomášek P**, Loskot P, Janáček J, Králíčková M, Witter K. Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2016 May;205:22-36. doi: 10.1016/j.aanat.2016.01.008. **IF<sub>(JCR2015)</sub>=1.441. Q2 (Anatomy&Morphology).**

Kubíková T, Kochová P, **Tomášek P**, Witter K, Tonar Z. Numerical and length densities of microvessels in the human brain: Correlation with preferential orientation of microvessels in the cerebral cortex, subcortical grey matter and white matter, pons and cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 2018 Mar;88:22-32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.11.005. **IF<sub>(JCR2017)</sub>=2.162. Q3 (Neurosciences).**

Horakova J, Mikes P, Lukas D, Saman A, Jencova V, Klapstova A, Svarcova T, Ackermann M, Novotny V, Kalab M, Lonsky V, Bartos M, Rampichova M, Litvinec A, Kubikova T, **Tomasek P**, Tonar Z. Electrospun vascular grafts fabricated from poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) used as a bypass for the rabbit carotid artery. *Biomed Mater.* 13(6):065009. doi: 10.1088/1748-605X/aade9d. **IF<sub>(JCR2018)</sub>=3.440. Q2 (Materials Science, Biomaterials).**

Jiřík M, Bartoš M, **Tomášek P**, Malečková A, Kural T, Horáková J, Lukáš D, Suchý T, Kochová P, Hubálek Kalbáčová M, Králíčková M, Tonar Z. Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech.* 2018 Jun;81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011. **IF<sub>(JCR2018)</sub>=1.327. Q3 (Microscopy).**

Blassova T, Tonar Z, **Tomasek P**, Hosek P, Hollan I, Treska V, Molacek J. Inflammatory cell infiltrates, hypoxia, vascularization, pentraxin 3 and osteoprotegerin in abdominal aortic aneurysms - A quantitative histological study. *PLoS One.* 2019 Nov

8;14(11):e0224818. doi: 10.1371/journal.pone.0224818. **IF<sub>(JCR2018)</sub>=2.776. Q2**  
**(Multidisciplinary Sciences)**

**Tomášek P**, Tonar Z, Grajciarová M, Kural T, Turek D, Horáková J, Pálek R, Eberlová L, Králíčková M, Liška V. Histological mapping of porcine carotid arteries - An animal model for the assessment of artificial conduits suitable for coronary bypass grafting in humans. *Ann Anat.* 2020 Mar;228:151434. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151434.  
**IF<sub>(JCR2019)</sub>=2.388. Q1(Anatomy&Morphology).**

## **8.2 Publikace autora mimo rámec dizertační práce**

### **8.2.1 Časopisy s faktorem impaktu**

Krebsova A, Votypka P, Peldova P, Ruecklova K, Zoubkova V, Pohlova-Kucerova S, Pilin A, Kulvajtova M, Kubanek M, Bilek M, Tavacova T, Petrkova J, Dobias M, Tomasek P, Macek M. Sr., Macek M Jr., Janousek J, Kautzner J. Comparison of variant detection rate in 100 candidate genes between two representative cohorts of Czech living patients versus victims of sudden cardiac death with clinical. or post mortem diagnosis of dilated-, arrhythmogenic- and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* Volume: 28 Issue: SUPPL 1 Supplement: 1 Pages: 265-266 Meeting Abstract: P05.32.B Published: DEC 2020 IF(2019) 3.657

Huel T, Uchytlova E, Markvartova J, Tomasek P, Kieslichova E, Spicak J, Martinek J. Cardiac arrest as a fatal periprocedural complication of peroral endoscopic myotomy (POEM) *Endoscopy.* 2020 Nov;52(11):E411-E412. doi: 10.1055/a-1149-1055. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32330949. IF(2019) 7.341

### **8.2.2 Ostatní recenzované časopisy**

Tomášek P, Dohnalová P, Kubíková T, Králíčková M, Beran M, Tonar Z. [Arytmogenic ventricular cardiomyopathy]. *Soud Lek.* 2015;60(4):51-6. Czech. PubMed PMID: 26585306.

Votrubova J, Brzobohata H, Brestovansky P, Tomasek P, Vanek D. DNA analysis of lineage markers from skeletons from a mass grave related to the Battle of Reichenberg in 1757 *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, Volume 6, 2017, Pages e122-e124, ISSN 1875-1768, <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.033>

Josefiova J, Matura R, Votrubova J, Vojacek T, Tomasek P, Vanek D. Comparison of fluorometric and real-time PCR quantification of DNA extracted from formalin fixed tissue *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, Volume 6, 2017, Pages e137-e139, ISSN 1875-1768, <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.028>

Hložek J, Menšík P, Dobisíková M, Tomášek P. Ein versorgtes Schädeltrauma aus dem Bereich der Aunjetitzer Kultur. Ein versorgtes Schädeltrauma aus dem Bereich der Aunjetitzer Kultur. Zu einem Grabfund aus Holubice (okr. Praha-západ / CZ) *Archäologisches Korrespondenzblatt*, 2017, roč. 47, č. 4, s. 475-488. ISSN: 0342-734X

### **8.2.3 Kapitoly v monografii**

Tomášek P, Šustek P, Holčapek T. Lékař jako svědek, znalec. Lékařská zpráva, odborné vyjádření, znalecký posudek, in: M. Beran et al.: *Forenzní traumatologie*, s. 18–23, nakladatelství Karolinum, 2009, ISBN 978-80-246-1734-3

Beran M, Krajsa J, Tomášek P. Poranění ostrým předmětem, in: M. Hirt et al.: *Soudní lékařství I. díl*, s.99 – 116, nakladatelství Grada Publishing, a.s., 2015, ISBN 978-80-247-5680-6

Tomášek P, Beran M, Šidlo J. Poranění horních končetin, in: M. Hirt et al.: *Soudní lékařství II. díl*, s.138 – 141, nakladatelství Grada Publishing, a.s., 2016, ISBN 978-80-271-0268-6

## Publikační činnost autora

Tomášek P. Kůže a terorismus – radiační, chemické a biologické noxy, in: J. Hercogová et al.: Klinická dermatovenerologie, 1. díl, s. 639 – 643, nakladatelství Mladá fronta a.s., 2019, ISBN: 978-80-204-5321-1

## **9 Přílohy – plná znění publikovaných výsledků**

### **9.1 Příloha I**

Tonar Z, **Tomášek P**, Loskot P, Janáček J, Králíčková M, Witter K. Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2016 May;205:22-36. doi: 10.1016/j.aanat.2016.01.008. **IF(JCR2015)=1.441. Q2 (Anatomy&Morphology).**



## 9.2 Příloha II

Kubíková T, Kochová P, **Tomášek P**, Witter K, Tonar Z. Numerical and length densities of microvessels in the human brain: Correlation with preferential orientation of microvessels in the cerebral cortex, subcortical grey matter and white matter, pons and cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 2018 Mar;88:22-32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.11.005.  
**IF<sub>(JCR2017)</sub>=2.162. Q3 (Neurosciences).**

### 9.3 Příloha III

Horakova J, Mikes P, Lukas D, Saman A, Jencova V, Klapstova A, Svarcova T, Ackermann M, Novotny V, Kalab M, Lonsky V, Bartos M, Rampichova M, Litvinec A, Kubikova T, **Tomasek P**, Tonar Z. Electrospun vascular grafts fabricated from poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) used as a bypass for the rabbit carotid artery. *Biomed Mater.* 13(6):065009. doi: 10.1088/1748-605X/aade9d. **IF<sub>(JCR2018)</sub>=3.440. Q2 (Materials Science, Biomaterials).**





## 9.4 Příloha IV

Jířík M, Bartoš M, **Tomášek P**, Malečková A, Kural T, Horáková J, Lukáš D, Suchý T, Kochová P, Hubálek Kalbáčová M, Králíčková M, Tonar Z. Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech.* 2018 Jun;81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011. **IF<sub>(JCR2018)</sub>=1.327. Q3 (Microscopy).**



## 9.5 Příloha V

Blassova T, Tonar Z, **Tomasek P**, Hosek P, Hollan I, Treska V, Molacek J. Inflammatory cell infiltrates, hypoxia, vascularization, pentraxin 3 and osteoprotegerin in abdominal aortic aneurysms - A quantitative histological study. PLoS One. 2019 Nov 8;14(11):e0224818. doi: 10.1371/journal.pone.0224818. **IF(JCR2018)=2.776. Q2 (Multidisciplinary Sciences)**

## 9.6 Příloha VI

**Tomášek P.**, Tonar Z, Grajciarová M, Kural T, Turek D, Horáková J, Pálek R, Eberlová L, Králíčková M, Liška V. Histological mapping of porcine carotid arteries - An animal model for the assessment of artificial conduits suitable for coronary bypass grafting in humans. *Ann Anat.* 2020 Mar;228:151434. doi: 10.1016/j.aanat.2019.151434. **IF<sub>(JCR2019)</sub>=2.388.**  
**Q1(Anatomy&Morphology).**