

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



ANATOMIE JATER PRASETE DOMÁČÍHO JAKO MODELOVÉHO
ORGÁNU V BIOMEDICÍNĚ

PORCINE LIVER ANATOMY APPLIED IN BIOMEDICINE

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Bc. Patrik Mik



Plzeň 2021

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenční formy doktorského studijního programu Anatomie, histologie a embryologie na Ústavu anatomie a na Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni.

Uchazeč: Mgr. Bc. Patrik Mik

Školitel: MUDr. Lada Eberlová, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

Oponenti:

prof. MUDr. David Kachlík, Ph.D., vedoucí Ústavu anatomie, 2. LF UK v Praze

prof. MUDr. Josef Stingl, CSc., Ústav anatomie, 3. LF UK v Praze

Autoreferát byl rozeslán dne:

Předsedkyně oborové rady pro doktorský studijní program Anatomie, histologie a embryologie:

prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D., vedoucí Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Anatomie, histologie a embryologie se koná

dne: v: hod.

Místo obhajoby:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Abstrakt

Úvod: Předkládaná práce vychází ze sedmi publikací, jejichž cílem bylo jednak shrnutí využití jater prasete domácího v biomedicinském výzkumu a jednak popis základních kvantitativních parametrů pro plánování chirurgických experimentů s následnou regenerací jater. V úvodních kapitolách popisujeme základní anatomické poznatky o játrech člověka s klinickým dopadem. U anatomického popisu jater prasete domácího se pak zaměřujeme na analogické morfologické poznatky, které byly doposud popsány. Z potřeb experimentální chirurgie a jaterní regenerace, která je studována na prasečích modelech, vyplývá mimo jiné potřeba znalosti základních kvantitativních parametrů jater – oblasti zásobení větvemi portální žíly, množství a velikost jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů a množství a distribuce jaterního vaziva.

Metody: Pro popis větvení v. portae jsme využili mikro CT snímků korozivních preparátů jater, morfometrické parametry hepatocytů a jaterního vaziva jsme hodnotili na systematických, nestranných, náhodných parafinových řezech ze tří oblastí (ROI) jaterního parenchymu (periferní, parakavální a paraportální) za využití stereologických metod. Jaterní cévy jsme vyplnili pryskyřicí Biodur E20®, s následným odleptáním v hydroxidu draselném, pro kvantifikaci parametrů hepatocytů jsme řezy obarvili PAS reakcí, pro kvantifikaci vaziva jsme použili barvení anilínovou modří.

Výsledky: Játra přeštického černostrakatého prasete mají pět až šest laloků – lobus quadratus je plně vyvinut v 35 % případů. V. portae hepatis vstupuje do jater v jejich kranální části na úrovni hranice pravého mediálního a pravého laterálního laloku. Před vstupem do jater se v. portae dělí ostře vlevo a vpravo do dvou větví, v jednom případě jsme pozorovali trifurkaci – tato kaudální větev zásobovala pravý mediální lalok. Celkem zásobuje pravá větev v. portae hepatis 19–40 % jaterního parenchymu, levá větev vyživuje 60–81 % jaterního parenchymu. Zásobení jaterních laloků v levé části jater probíhá větvemi v. portae hepatis různých generací, v pravé části jater může být lobus dexter medialis zásoben samostatnou větví v. portae hepatis v případě její trifurkace. Játra přeštického černostrakatého prasete bylo možno rozdělit do osmi segmentů.

Průměrný objem jednojaderných hepatocytů po korekci smrštění byl ve všech zkoumaných vzorcích $3670 \pm 805 \mu\text{m}^3$. Průměrný objem dvoujaderných hepatocytů byl $7050 \pm 2550 \mu\text{m}^3$. Podíl dvoujaderných hepatocytů tvořil 4 ± 2 %. Počet všech hepatocytů činil 146997 ± 15738 na mm^3 jaterního parenchymu. Průměrně nejobjemnější jednojaderné hepatocyty se nacházely na periférii jaterních laloků (periferní ROI), kde bylo rovněž nalezeno nejmenší objemové množství hepatocytů. Mezi jednotlivými prasaty jsme však detekovali signifikantní interindividuální rozdíly ve všech zkoumaných morfometrických parametrech hepatocytů.

V případě jaterního vaziva jsme pozorovali značnou variabilitu na všech úrovních vzorkování: mezi pohlavími, mezi jedinci, mezi jaterními laloky i mezi jednotlivými ROI. Průměrný objemový podíl interlobulárního vaziva byl signifikantně větší u samců v porovnání se samicemi. V samčích játrech byl průměrný podíl interlobulárního vaziva $4,7 \pm 2,4$ % v rozsahu 0 až 11,4 %, zatímco v samicích játrech $3,6 \pm 2,2$ % v rozsahu 0 až 12,3 %. Průměrný podíl intralobulárního vaziva (tj. vaziva perisinusoidální i pericentrálního dohromady) činil $< 0,2$ % obou pohlaví.

Závěr: Poměr objemu jaterního parenchymu zásobeného levou a pravou větví v. portae je u přeštického černostrakatého prasete v porovnání s člověkem opačný. Vzhledem k pozorovaným rozdílům ve velikosti a počtu hepatocytů v závislosti na jejich poloze v jaterním řečišti může být morfometrie hepatocytů poměrně snadno zkreslena, když budeme provádět kvantitativní histologii na vzorcích odebraných z blízkosti velkých jaterních cév a z periferie jaterních laloků. Z naší další analýzy jaterního vaziva jednoznačně vyplývá důležitost znalosti pozice bločku v játrech (lalok a ROI) a jejího respektování při následné histologické analýze. V případě, že bude vzorkovací schéma reflektovat rozdíly v množství vaziva mezi jednotlivými laloky a ROI, k detekování stejného nárůstu v množství vaziva bude zapotřebí menšího počtu vzorků a vzorkování se tak stane efektivnější a šetrnější v porovnání s nahodilým vzorkováním bez udání anatomického původu vzorku.

Abstract

Introduction: This dissertation summarizes our research published in seven articles where we described both the ways of utilization of porcine liver in biomedical research and the basic morphometric parameters of hepatocytes and liver connective tissue useful in experimental surgery followed by liver regeneration experiments. We set off with the description of anatomical concepts of human liver applied to clinical investigation followed by summary of porcine liver morphology with special stress on its potential clinical utilization. The studies in experimental surgery followed by liver regeneration where the porcine liver model proved its utility, reveals that the distribution of portal blood to the liver parenchyma, the number and the volume of mononuclear and binuclear hepatocytes, and the amount and the distribution of liver connective tissue being among the most useful ones.

Methods: For the mapping of portal vein branching we used μ CT scans of porcine liver corrosion casts, and both the quantitative parameters of the hepatocytes and of the connective tissue were evaluated on systematic uniform random paraffin-embedded samples that were harvested from three different regions of interest (ROI) of liver parenchyma (peripheral, paracaval and paraportal). For the quantification, we followed standard stereological protocols. For the casting, we filled the vessel of liver with Biodur E20® resin, followed by corroding in potassium hydroxide. The quantification was performed on PAS- and aniline blue-stained histological sections.

Results: The liver of Prestice Black Pied pigs comprises of five to six hepatic lobes (quadrate lobe is fully developed in 35 % of cases only). Hepatic portal vein enters the liver in its cranial part on the level of the border between the right medial and right lateral lobes. Just before its entrance to the liver parenchyma the hepatic portal vein bifurcates into left and right branch, in one instance we observed a trifurcation – this caudal branch then supplied the right medial lobe. In total, the right branch of the portal vein supplies 19–40 % of the liver and the left branch 60–81 % of the liver in Prestice Black Pied pigs. Hepatic portal vein branches of the third generation are not exclusive suppliers of the respective liver lobes both in the left half of the porcine liver and both for the right medial lobe that, in the case of the hepatic portal vein trifurcation, can be fed by a direct portal branch. Nevertheless, it was possible to compartmentalize the porcine liver into eight segments according to Couinaud.

After the correction for tissue shrinkage, the mean number-weighted volume of porcine mononuclear hepatocytes was $3670 \pm 805 \mu\text{m}^3$ and the mean number-weighted volume of binuclear hepatocytes was $7050 \pm 2550 \mu\text{m}^3$ with the fraction of binuclear hepatocytes being $4 \pm 2\%$. The numerical density of all hepatocytes was $146997 \pm 15738 \text{ cells mm}^{-3}$. Peripheral regions of hepatic lobes contained the largest mononuclear hepatocytes with the smallest numerical

density. However, the hepatocyte size and density, as well as the fraction of binuclear hepatocytes exhibited considerable interindividual differences even in healthy young animals.

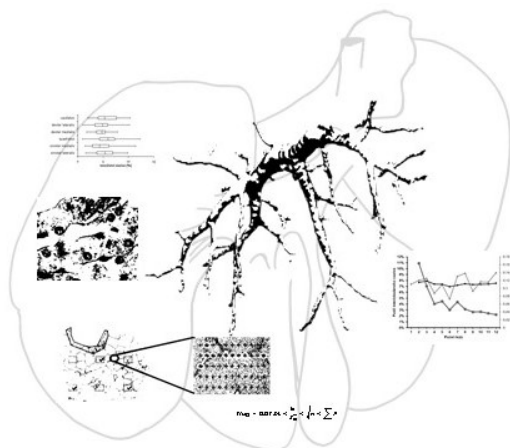
There was also considerable variability in the fraction of connective tissue at all sampling levels: between sexes, among individual animals, liver lobes and ROIs. The mean fraction of connective tissue was greater in males than in females. In males, the mean fraction of interlobular connective tissue was $4.7 \pm 2.4\%$ and ranged from 0% to 11.4%. In females, the mean fraction of interlobular connective tissue was $3.6 \pm 2.2\%$ and ranged from 0% to 12.3%. The mean fraction of intralobular connective tissue (perisinusoidal summed with pericentral) was < 0.2 both in males and in females.

Conclusion: The volume ratio of the vascular territories of the left and right branches of the hepatic portal vein in our sample of porcine livers was reversed when compared to human liver. The morphometry of hepatocytes can be easily biased when the differences resulting from different position in ROI are not accounted for, especially, when tissue probes are harvested from the vicinity of large liver vessels and from the periphery of the liver lobes. According to the analysis of the liver connective tissue, it is important to know the exact position of the tissue block within the liver – both the lobe and the ROI for the subsequent histological analysis. When the sampling scheme of experiments using the porcine liver reflects the differences between the lobes and the ROIs, the same quantitative information may result from a smaller number of samples and therefore provide a more efficient comparison to the situation in which the tissue blocks are harvested in a purely random manner.

Obsah

1	Využití prasečích jater v biomedicínském výzkumu	1
2	Východiska	1
3	Cíle.....	2
4	Materiál a metody	4
4.1	Charakteristika zkoumaných prasat a popis vyjmutí jater	4
4.1.1	Hepatektomie.....	4
4.2	Příprava korozivních preparátů	4
4.3	Odběr tkáňových bločků	5
4.4	Histologické zpracování tkáňových bločků.....	5
4.4.1	Korekce smrštění jaterní tkáně vlivem histologického zpracování.....	5
4.5	Mikroskopické vzorkování a kvantifikace morfometrických parametrů jaterních buněk a jaterního vaziva.....	7
4.5.1	Morfometrické parametry hepatocytů	7
4.5.2	Kvantifikace jaterního vaziva	9
4.6	Segmentace jater	9
5	Výsledky	11
5.1	Makroskopické charakteristiky jater přeštického černostrakatého prasete	11
5.2	Variabilita velikosti hepatocytů, podílu dvoujaderných hepatocytů a počtu hepatocytů mezi jedinci, mezi jaterními laloky a mezi jednotlivými oblastmi jaterního parenchymu	13
5.3	Variabilita v objemovém podílu jaterního vaziva vzhledem k pohlaví, mezi jedinci, mezi jaterními laloky a mezi jednotlivými oblastmi jaterního parenchymu	17
5.4	Výpočet koeficientu chyby.....	19
6	Diskuze	20
6.1	Anatomická podobnost.....	20
6.2	Morfometrické parametry jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů	20

6.3	Kvantifikace interlobulárního a intralobulárního vaziva.....	21
7	Závěr.....	24
8	Citovaná literatura.....	26
9	Publikace autora.....	38
10	Životopis autora.....	39



1 Využití prasečích jater v biomedicinském výzkumu

Velké zvířecí modely jsou nezbytné pro přenos experimentální práce do humánní medicíny. Vedle v menší míře používaných ovčích jater (Ghodsizad et al. 2012) jsou prasečí játra v současnosti nejčastějším velkým zvířecím modelem (Bruha et al. 2015) pro výzkum invazivních i neinvazivních metod managementu jaterních onemocnění (Croome et al. 2015) a pro následnou interpretaci a přenos výsledků experimentů na zvířecích modelech do humánní medicíny (Budai et al. 2017). Prasečí játra jsou v současnosti nevhodnějším modelem velkého zvířete pro játra lidská ve smyslu velikosti orgánu, údajné anatomické a histologické podobnosti i fyziologické kompatibility (Ribitsch et al. 2020). Játra prasete domácího můžou být napojena na mimotělní oběh (Hubert et al. 2003), mohou sloužit k nácvičce chirurgických technik (Liška 2016), navíc může docházet i k opakovaným odběrům krve a to již od brzkého věku (Hu et al. 1993).

2 Východiska

Na základě praxe jaterních chirurgů vyvstala potřeba zmapovat úseky jaterní tkáň, které jsou vzhledem k cévnímu zásobení na sobě nezávislé a tvoří povodí, tzv. segmenty (dílece). Tyto části by pak bylo možno resekovat. Claude Couinaud (Couinaud 1954), navrhl systém funkčního dělení jater do čtyř sektorů a osmi segmentů na základě průběhů tří jaterních žil – v. hepatica dextra, media et sinistra – a bifurkace v. portae a vyslovil hypotézu o jejich nezávislosti (Bonnichon 2007). Játra jsou tzv. Rexovou–Cantlieho linií rozdělena na dvě povodí (hemiliver), která jsou dále členěna na sektory a segmenty. Roviny procházející třemi jaterními žilami oddělují čtyři úseky jaterní tkáň – tzv. sektory. Rozdělení jater do segmentů však neodpovídá anatomickému členění jater do laloků.

Znalost variability morfometrických parametrů hepatocytů a jaterního vaziva je klíčová pro plánování histologického vzorkování. Množství jaterního vaziva ovlivňuje funkčnost jater: hlavní komplikací jaterního onemocnění je narušení rovnováhy fibrogenese/fibrolýzy ve prospěch fibrogenese. Histopatologickým výsledkem porušené rovnováhy je jaterní fibróza. Mechanismus vzniku a šíření jaterní fibrózy je studován na malých i velkých zvířatech, tento výzkum je obvykle doprovázen analýzou regenerační kapacity a hojení jater. Regenerace jater je často spojena se zmnožením jaterního vaziva, tj. jaterní fibrózou nebo cirhózou (Goodman 2007). Vyšší podíl vaziva v játrech zdravého prasete domácího je dobře znám – vazivo ohraničuje lalůčky v. centralis (interlobulární vazivo), zabíhá i do jaterních lalůček (intralobulární vazivo), v nichž se vyskytuje ve formě občasně přítomných intralobulárních sept a retikulárního vaziva kolem jaterních sinusoid, malé množství vaziva bylo popsáno také kolem v. centralis (Ekataksin a Wake 1991).

Množství jaterního vaziva je obvykle odhadováno při rutinní analýze jaterních biopsií dle rozšířených skórovacích systémů (Scheuer 1991; Ishak et al. 1995;

Bedossa a Poynard 1996). Standish et al. (2006) však poukázal na významná omezení při užívání těchto semikvantitativních či subjektivních skórovacích systémů: přítomnost velké interobservační a intraobservační chyby znemožňuje užití takto získaných výsledků pro komparativní studie nebo pro vyhodnocení neinvazivních metod hodnocení jaterní fibrózy. Z toho důvodu je nutné vytvořit objektivní, reprodukovatelnou metodu hodnocení množství jaterního vaziva s upřednostněním takové metody, která by užívala kontinuální škálu (Saxena 2011).

Hepatocyty hrají klíčovou roli v přirozené imunitě proti bakteriální infekci a jsou odpovědné za většinu jaterních funkcí, proto může být jakýkoli inzult, který má za následek dysfunkci hepatocytů, příčinou jaterního selhání (Zhou et al. 2016). Pro kvantifikaci hepatocytů se obvykle užívá metod, které využívají zejména analýzu buněčné proliferace, obsahu DNA a koncentrace proteinů, případně obsahu cytochromu P450 ve zkoumaném jaterní homogenátu nebo jaterní buněčné suspenzi (Carlile et al. 1997; Stegemann et al. 2000; Haga et al. 2005; Sohlenius-Sternbeck 2006; Deng et al. 2009; Miyaoka et al. 2012; Garrido et al. 2013; Best et al. 2015; Asaoka et al. 2016). Pro ověření výsledků těchto analýz je však zapotřebí nestranný odhad poměru jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v játrech a jejich objemu, protože právě tyto parametry určují vlastnosti zkoumaného jaterního homogenátu či jaterní buněčné suspenze (Marcos et al. 2007).

Pro prasečí játra však kvantitativní histologické parametry zahrnující běžnou interindividuální i intraindividuální variabilitu velikosti a objemové hustoty hepatocytů a množství interlobulární a intralobulárního vaziva v závislosti na poloze v kontextu cévního stromu jater doposud nebyly publikovány. Doposud bylo vazivo objektivně kvantifikováno za pomoci stereologie jen v játrech potkana (Fallowfield et al. 2014; Marcos et al. 2015; Marcos a Correia-Gomes 2015; Hoy et al. 2018) a myši (Clapper et al. 2013), morfometrické parametry hepatocytů byly objektivně kvantifikovány rovněž u potkana (Marcos et al. 2016; Marcos a Correia-Gomes 2016), částečně u myši (Neves et al. 2006) a do jisté míry také u člověka (Moudi et al. 2018). Cílem našeho výzkumu tak bylo kvantifikovat morfometrické parametry jaterních buněk a jaterního vaziva, a tím vytvořit referenční soubor pro plánování experimentů na prasečích játrech.

3 Cíle

Stanovili jsme následující otázky (tabulka 1):

1. Jaká je normální variabilita v množství jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v játrech přeštického černostrakatého prasete?
2. Jaká je normální variabilita v objemu a v počtu jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v játrech přeštického černostrakatého prasete?

Těmito otázkami jsme se zabývali v práci Junatas et al. (2017).

3. Jaká je normální variabilita v množství jaterního vaziva u přeštického černostrakatého prasete?
4. Liší se množství jaterního vaziva mezi samci a samicemi přeštického černostrakatého prasete?
5. Jaký je podíl v rámci distribuce jaterního vaziva uvnitř jaterního lalůčku a vně jaterního lalůčku přeštického černostrakatého prasete?

Těmito otázkami jsme se zabývali v práci Mik et al. (2018).

V této souvislosti jsme také na naší sbírce korozivních preparátů a na játrech vyjmutých v rámci aktuálního výzkumu (Malečková et al. 2021) prozatím preliminárně zhodnotili i proklamovanou podobnost anatomie a segmentového uspořádání jaterního parenchymu prasečích a lidských jater:

6. Jaké je schéma větvení segmentových větví v. portae u přeštického černostrakatého prasete?
7. Jaký je podíl levé a pravé větve v. portae na zásobení jater u přeštického černostrakatého prasete?

K zodpovězení těchto otázek jsme použili materiál z prací Eberlova et al. (2017), Pálek et al. (2018), Malečková et al. (2021) a přehledové práce Malečková et al. (2019) a Eberlova et al. (2020).

Tab. 1 Přehled našich výzkumných témat, využitých studií a materiálu.

Zaměření výzkumu	Publikované práce	Počet jedinců
Morfometrie hepatocytů	Junatas et al. 2017	7 (♂5, ♀2)
Kvantifikace jaterního vaziva	Mik et al. 2017	7 (Junatas et al. 2017) +5 = (♂6, ♀6)
Větvení v. portae	Eberlová et al. 2017, Pálek et al. 2018	6
Anatomie prasečích jater	Eberlová et al. 2020*, Malečková et al. 2021	18

* přehledové sdělení

4 Materiál a metody

4.1 Charakteristika zkoumaných prasat a popis vyjmutí jater

Vzorky pro kvantifikaci morfometrických parametrů hepatocytů a jaterního vaziva stejně, jako játra pro segmentovou analýzu pocházejí z přeštického černostrakatého plemene prasete domácího (Vrtková 2015). Zvířata byla stáří 9 až 15 týdnů o váze 25 až 45 kg.

4.1.1 Hepatektomie

Ve všech čtyřech fázích odběru jater probíhalo vyjmutí jater v Biomedicinském centru Lékařské fakulty v Plzni obdobně podle standardizované procedury. Prasatům byl intramuskulárně vpraven 1 mg atropinu, 200 mg ketaminu ($5\text{--}10\text{ mg kg}^{-1}$) a 160 mg azaperonu ($2\text{--}8\text{ mg kg}^{-1}$). Pro zajištění celkové anestezie byl prasatům kontinuálně podáván propofol (1% směs $5\text{--}10\text{ mg kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$) a fentanyl ($1\text{--}2\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$). Během operace byla prasata intubována a byla zajištěna jejich mechanická ventilace. V případě nutnosti byla prasatům podána infuze k náhradě tekutin a k doplnění krevního objemu (Plasmalyte; Baxter, Vídeň, Rakousko, a Gelofusine; B-Braun, Maria Enzersdorf, Rakousko). Všechny operační procedury probíhaly v aseptickém a antiseptickém prostředí. Po vyjmutí jater byla zvířata utracena v hluboké anestézii nitrožilní aplikací kardiplegického roztoku (KCl) a ihned po utracení byla jejich játra vyjmuta.

4.2 Příprava korozivních preparátů

Pro optimalizaci přípravy korozivních preparátů jater prasete domácího bylo do cévního řečiště jater před jejich vyjmutím vpraveno přes suprahepatickou část kaudální duté žíly pět litrů heparinizovaného Hartmannovo roztoku (2000 IU l^{-1}). Po přerušení jaterních cév, byla játra opět propláchnuta stejnou cestou heparinizovaným Hartmannovo roztokem (10000 IU l^{-1}). Pro zajištění odtoku aplikovaného roztoku zůstaly v. portae i jaterní tepny průchozí.

Při vyjmutí jater pro přípravu korozivních preparátů byly v. portae a a. hepatica propria opatřeny kanylou a i s játry ponořeny do vody, abychom zabránili vniknutí vzduchu do cévního řečiště. K vyplnění cévních stromů jsme použili pryskyřici Biodur E20® (Biodur Products, Heidelberg, Německo), kterou jsme smíchali v poměru 100 g Biodur E20® Plus na 45 g katalyzátoru E2(0). Portální žíla byla proplněna pryskyřicí manuálně a jaterní tepna byla vyplněna pomocí mikromanipulátoru (Aharinejad a Lametschwandtner 1992). Poté, co pryskyřice vytékala z v. cava caudalis, jsme játra ponořili na 24 hodin do nádoby s vodou o pokojové teplotě. Po vytvrzení jsme játra umístili do 15% hydroxidu draselného pro odleptání jaterní tkáně (40° C ; 2–3 dny). Po vyjmutí jsme játra vyprali v kohoutkové vodě a uskladnili v 50% denaturovaném alkoholu.

4.3 Odběr tkáňových bločků

Z každého ze šesti jaterních laloků jsme odebrali šest tkáňových bločků vždy po dvou ze tří různých oblastí ve vztahu k jaterním cévám: dva bločky jsme odebrali z jaterní periferie, dva bločky z parakavální oblasti a dva bločky z paraportální oblasti (obr. 1). Na jedna játra tak připadlo 36 tkáňových bločků (každý o rozměru přibližně 25 x 25 x 25 mm). Vzorky byly fixovány 10% pufrovaným formaldehydem. Jaterní periferie byla definována jako oblast jaterního parenchymu do maximální hloubky jednoho centimetru od povrchu jater. Parakavální oblastí jsme označili jaterní parenchym v bezprostředním sousedství ústí jaterních žil do v. cava caudalis. Paraportální bločky pocházely z oblasti jaterního parenchymu při hlavních větvích v. portae do jednotlivých jaterních laloků.

Poloha bločku byla před rozřezáním randomizována pomocí tzv. orientátoru podle postupu navrženého Nyengaardem a Gundersenem (2006) a Mühlfeldem et al. (2010). Tímto postupem jsme získali izotropní, nestranné, náhodné histologické řezy. Přestože můžeme hepatocyty považovat za izotropní objekty, a tak by bylo prosté vyjmutí tkáňového bločku a ukrojení histologického dostačující, bločky jsme znáhodnili uvedeným postupem pro jejich budoucí použití pro kvantifikaci mikrocév.

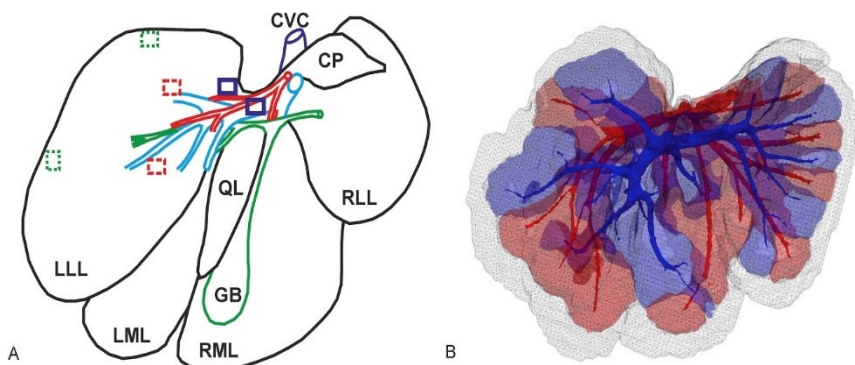
4.4 Histologické zpracování tkáňových bločků

Pro kvantifikaci morfometrických parametrů hepatocytů byly po jejich zalití do parafínu z bločků ukrojeny dva náhodně orientované sériové řezy o tloušťce 16 μm . Řezy jsme nanесли na silanizovaná histologická sklíčka a obarvili imunohistochemickou metodou PAS dle Romeis (1989) za použití PAS barvicí sady pro zvýraznění obrysů hepatocytů.

Pro kvantifikaci interlobulárního i intralobulárního vaziva jsme po jejich zalití do parafínu z bločků ukrojili tři náhodně orientované sériové řezy o tloušťce 3 μm , z nichž jsme vždy jeden náhodně vybraný použili pro kvantifikaci. Po deparafinaci a zavodnění řezů jsme jádra obarvili jádrovou červení a po jejich opláchnutí v destilované vodě jsme řezy diferencovali v 5% kyselině fosfowolframové a opět opláchnuli v destilované vodě. Kolagenní vlákna jsme pak obarvili půlprocentní anilinovou modří.

4.4.1 Korekce smrštění jaterní tkáně vlivem histologického zpracování

Histologické zpracování vzorku (formalínová fixace, dehydratace i zalití do parafínu) vede k zmenšení objemu vzorku (Dorph-Petersen et al. 2001; Gardella et al. 2003). Marcos et al. (2012) popsali 38% zmenšení objemu jater potkana mezi jejich vyjmutím a histologickým zpracováním, což mělo za následek menší objem kvantifikovaných buněk a jejich větší hustotu v porovnání se stavem před zpracováním a můžeme očekávat dva zdroje smrštění tkáně: 1. formalínová fixace a zalití do parafínu, 2. ztenčení silných řezů v ose z, jako výsledek procesu



Obr. 1 Odběrové schéma jaterních bločků prasečích jater pro kvantitativní histologii a relativní objem jednotlivých oblastí jaterního parenchymu.

(A) Schéma ukazuje viscerální plochu prasečích jater s obrysy např. levého laterálního laloku (LLL), na příkladu LLL je znázorněno odběrové schéma tkáňových bločků z různých oblastí jater: parakavální oblast (tmavě modré obdélníky ohraničené souvislou čarou), paraportální oblast (červeně čárkované obdélníky a periferie (zeleně tečkované obdélníky). Z ostatních laloků byly tkáňové bločky odebrány obdobně. (B) Pro analýzu velikosti jednotlivých ROI byla naskénována výpočetním tomografem, na zobrazené rekonstrukci jsou játra orientována viscerální plochou. Vizualizace jednotlivých ROI ukazuje, že každý ze tří ROI zaujímal přibližně třetinu objemu jater. Zdroj: Mik et al. 2018.

narovnání histologického řezu v teplé vodní lázni. Z toho důvodu jsme použili dvě korekce morfometrických parametrů hepatocytů.

Ad 1.: Průměrný poměr objemů po a před zalitím (SD) byl $0,675 \pm 0,058$ (naměřené kvantitativní parametry jsme tedy upravili koeficientem $1/0,675$), pro konkrétní osy pak byl poměr smrštění po a před zalitím následující: $x'/x = 0,897 \pm 0,071$, $y'/y = 0,938 \pm 0,043$ a $z'/z = 0,803 \pm 0,033$. Friedmanova ANOVA naznačila anizotropní smrštění ($p = 0,002$), pomocí post-hoc Wilcoxonova znaménkového testu jsme odhalili větší míru smrštění bločku v ose z v porovnání s osou x ($p = 0,003$) a s osou y ($p = 0,008$).

Ad 2.: Velikost smrštění v ose z vlivem vyrovnání řezu v teplé vodní lázni jsme změřili pomocí z-stack tool v programu světelného mikroskopu Axio Imager Z2 (Zeiss, Vídeň, Rakousko): průměrná vzdálenost mezi první a poslední ostrou rovinou řezu byla $13 \mu\text{m}$, původní tloušťka mikrotomových řezů byla však $16 \mu\text{m}$ – tím jsme získali poměrné smrštění v ose z $13/16 = 0,8125$. Z toho důvodu jsme kvantifikovaný objem hepatocytů i disektorové objemové hodnoty vynásobili koeficientem $1/0,8125$.

4.5 Mikroskopické vzorkování a kvantifikace morfometrických parametrů jaterních buněk a jaterního vaziva

4.5.1 Morfometrické parametry hepatocytů

Ke kvantifikaci morfometrických parametrů hepatocytů jsme hodnotili 502 náhodně orientovaných histologických řezů, na nichž jsme zachytili vždy čtyři zorná pole (FOV). Pro zachycení FOV jsme použili mikroskop Leica DM2000 (Leica, Wetzlar, Německo), který byl vybaven kamerou Leica DFC425C a olejovým imerzním objektivem s 100násobným zvětšením (s numerickou aperturou 1,25). Samotné vzorkování proběhlo jako systematické náhodné vzorkování, kdy byly generováním náhodné dvojice čísel (funkce Microsoft Excel RAND) a určeny souřadnice prvního FOV jako vzdálenosti od levého a horního okraje zkoumaného řezu v μm . V závislosti na velikosti vzorku jsme vzdálenost mezi jednotlivými čtyřmi FOV proporcionálně upravili. Postup vzorkování shrnuje obrázek 2.

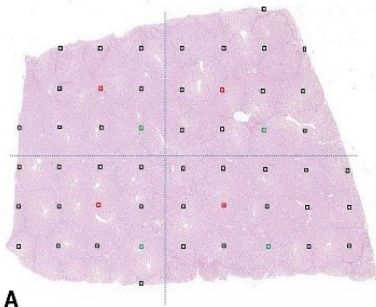
V dalším kroku jsme hledali hladinu ostrosti optických řezů. Rozestup mezi optickými řezy (krok na ose z na mikroskopu Leica DM2000) jsme ověřili pomocí mikroskopu Zeiss Imager.Z2 s kamerou AxioCam MRc5 (Zeiss, Vídeň, Rakousko) a s programem ZEN PRO2012 (vzdálenost mezi dvěma měřítky o velikosti 1 μm odpovídala ověřené tloušťce řezu 0,97 μm). Na každém FOV jsme zachytili vždy čtyři optické řezy s rozestupem 3 μm tak, abychom jednak neztratili přehled o návaznosti řezu a jednak byli schopni určit na každém optickém řezu odpovídající buňku a její jádro. Vzorkování optických řezů začínalo vždy od první roviny spodní plochy řezu, na níž bylo možno zaostřit chromatin v jádře, obrys jádra a obrys hepatocytu. Na celkem 8032 optických řezech z 2008 FOV jsme za použití software Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovakia) kvantifikovali čtyři morfometrické parametry hepatocytů.

Počet hepatocytů na mm^3 jaterní tkáně

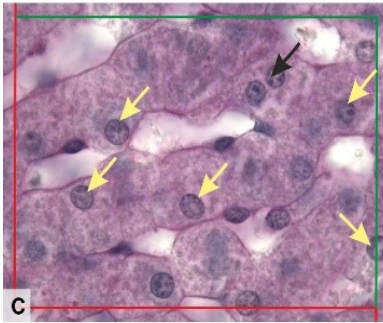
Hepatocyty jsme kvantifikovali pomocí optického disektoru (obr. 2) podle Gundersena (1988) na sériích optických řezů. Byly započítány jen ty hepatocyty, jejichž jádro s jedním či více jadérky bylo na optickém řezu jasně viditelné a ostré za předpokladu, že se celý buněčný profil hepatocytu nacházel uvnitř počítacího rámečku a nedotýkal se nezapočítávající se části hranice počítacího rámečku. Sledovali jsme hepatocyt i jeho jádro vždy na všech čtyřech optických řezech a hepatocyt byl započítán jedině v případě, že bylo jeho jádro přítomno na prvním optickém řezu a nebylo přítomno na posledním optickém řezu.

Podíl dvoujaderných hepatocytů

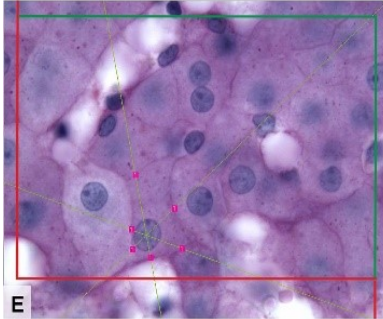
Na každém vzorku jsme kvantifikovali hepatocyty s dvěma viditelnými jádry jako poměr počtu těchto hepatocytů vůči celkovému počtu hepatocytů započítaných ve stejném referenčním prostoru. Přestože jsme výjimečně



A



C



E

Obr. 2. Vzorkování zorných polí a kvantifikace parametrů hepatocytů na mikrofotografiích jater a aplikace disektoru a nukleátoru.

(A) Systematické nestranné náhodné vzorkování zorných polí (FOV) je založené na náhodně zvoleném prvním FOV a ekvidistantním rozložení následných FOV, z nichž čtyři byly zachyceny pro první řez (červené čtverečky) z každého tkáňového bločku a další čtyři pro druhý řez (zelené čtverečky). (C) Odhad hustoty počtu hepatocytů (žlutá šipka) a podílu dvoujaderných hepatocytů (černá šipka): započteny byly jen ty buňky, jejichž celý profil se nacházel uvnitř počítacího rámečku disektoru nebo se dotýkal zelené započítávací hranice, bez toho, aby se dotýkal červené nezapočítávací hranice a navíc musela být jejich jádra v rovině ostrosti ve spodním počítacím rámečku (nebo v nejméně dvou následujících optických řezech) zaostřená s jasně viditelným chromatinem, ve čtvrtém optickém řezu jádra musela být buď nepřítomna, nebo jednoznačně mimo rovinu ostrosti. (E) Metoda disektoru pro výpočet počtem váženého objemu hepatocytů: na hepatocyt bylo promítnuto šest izotropně orientovaných paprsků nukleátoru. Zdroj: Junatas et al. 2017.

pozorovali i trojjaderné hepatocyty, žádný z nich nebyl započítán dle pravidel disektoru.

Průměrný objem jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů

K odhadu objemu hepatocytů jsme použili lokální stereologickou sondu nukleátor. Na optických řezech byly předchozí metodou vybrány hepatocyty pro započítání. Objem každého z těchto hepatocytů byl měřen vždy v prostřední části, v níž bylo jasně viditelné jádro s jadérky. Za použití modulu Nucleator v programu Ellipse jsme přes buněčný profil hepatocytů promítlí šest izotropicky

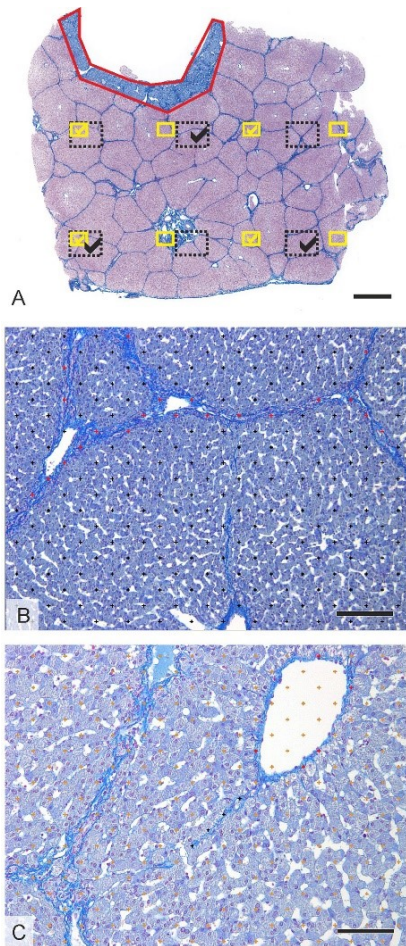
orientovaných paprsků s jedním počátkem přibližně uprostřed jádra hepatocytu. Tímto způsobem jsme získali šest průsečíků s hranicí buněčného profilu (obr. 2). Počet paprsků jsme optimalizovali v pilotní studii, v níž jsme zjistili, že použití pěti šesti nebo sedmi paprsků dále nesnižuje variabilitu dohady v porovnání se čtyřmi paprsky. Průměrnou hodnotu objemu jsme počítali zvláště pro jednojaderné $V_N(MnHEP)$ a dvoujaderné $V_N(BnHEP)$ hepatocyty. Celkem jsme kvantifikovali 29054 hepatocytů.

4.5.2 *Kvantifikace jaterního vaziva*

Kvantifikovali jsme tři typy vaziva dle vztahu ke klasickému jaternímu lalůčku: jednalo se o vazivo interlobulární (vazivo obkružující klasický jaterní lalůček), vazivo perisinusoidální (vazivo přiléhající k jaterním sinusoidám) a vazivo pericentrální (vazivo obkružující v. centralis). V prvním kroku jsme provedli systematické náhodné vzorkování na řezech obarvených anilinovou modří: tři systematické náhodné FOV byly zachyceny objektivem s 10násobným zvětšením pro kvantifikaci interlobulárního vaziva, čtyři systematické náhodné FOV byly zachyceny objektivem s 20násobným zvětšením pro kvantifikaci perisinusoidálního i pericentrálního vaziva. V druhém kroku jsme přes pořízené snímky položili stereologickou bodovou mřížku v programu Ellipse, abychom kvantifikovali objemový podíl každého z typů vaziva (obr. 3). Podle Delesseovo principu (Mouton 2011) odpovídá plošný podíl, který vazivo zabírá, objemovému podílu vaziva. Vazivové pouzdro, které bylo přítomno na vzorcích z jaterní periferie, nebylo kvantifikováno, stejně tak byly z referenčního prostoru kvantifikace vyřazeny jakékoli snímky s artefakty po histologickém zpracování (mikrotrhliny, sklady apod.). Rozdílnou míru smrštění vaziva a jaterního parenchymu vlivem histologického zpracování jsme nepozorovali.

4.6 *Segmentace jater*

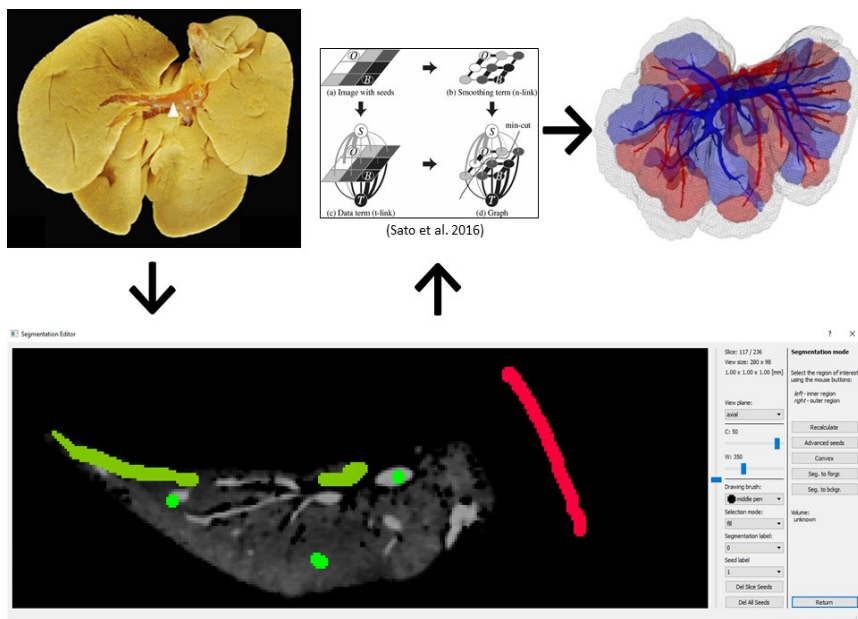
Volumetrická analýza jater a větvení v. portae bylo založeno na datech z výpočetní tomografie našich korozivních preparátů jater prasete domácího pořízených na Klinice zobrazovacích metod Fakultní nemocnice Plzeň. Játra byla skenována pomocí výpočetního tomografu Somatom Definition Flash Dual Source Computed Tomography Scanner (Siemens, Erlagen, Německo) se zabudovaným software Syngo. Tloušťka jednotlivých skenů byla 0,65 mm, rozměry voxelu byly $0,65 \times 0,65 \times 0,40$ mm. Běžný soubor skenů jednoho korozivního preparátu jater obsahoval 700 až 800 snímků. Jaterní parenchym jsme rozdělili do tří oblast (ROI): parakavální (parenchym při jaterních žilách), paraportální (parenchym při v. portae) a periferní (na periférii jaterních laloků). Hranice mezi jednotlivými ROI odpovídaly přibližně třetinovému objemu pro každý ze tří ROI u každého z jaterních laloků. Z toho důvodu není výše zmíněné vzorkování zkruseno rozdílným poměrem objemů ROI. K vymezení jater na CT snímcích jsme použili open-source software LISA (Liver Surgery Analyzer) (Jířík nedatováno; Mik et al. 2018). Samotná segmentace jater proběhla za použití algoritmu 3D Graph-Cut (Boykov a Jolly 2000). Pro měření objemů ROI



Obr. 3. Vzorkování zorných polí a kvantifikace jaterního vaziva pomocí bodové mřížky.

(A) Systematické nestranné náhodné vzorkování zorných polí (FOV) je založené na náhodně zvoleném prvním FOV a ekvidistantním rozložení následných FOV. Pro kvantifikaci interlobulárního vaziva (ICT) byly použity tři FOV zachycené objektivem s 10násobným zvětšením (černě tečkované obdélníky), pro kvantifikaci perisinusoidálního (PSCT) a pericentrálního vaziva (PCCT) byly zachyceny čtyři FOV objektivem s 20násobným zvětšením (žluté obdélníky). Vazivo ve vazivovém pouzdrú jater (ohraničeno červeně) nebylo kvantifikováno. (B) Stereologická bodová mřížka byla použita pro kvantifikaci ICT, průsečíky s vazivem jsou označeny červeně. (C) Stereologická bodová mřížka pro kvantifikaci PSCT (průsečíky označeny černě) i PCCT (průsečíky označeny červeně). Zdroj: Mik et al. 2018.

jsme segmentovali odděleně řečiště v. portae (paraportální ROI) a řečiště jaterních žil (parakavální ROI) (Jirik et al. 2016). K nasegmentovaným řečištím byl přiřazen jaterní parenchym vzhledem k jeho vzdálenosti k jednomu z řečišť za použití mapy eukleidovských vzdáleností (Euclidean Distance Transform). V druhém kroku jsme vymezili periferní třetinu laloků jako periferní ROI (obr. 4).

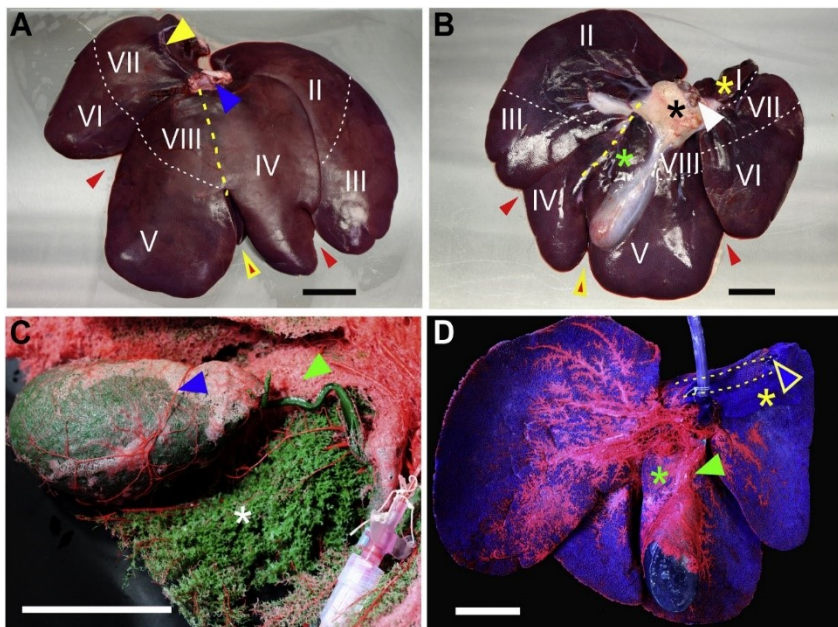


Obr. 4 Segmentace korozivních preparátů prasečích jater v software LISA.

5 Výsledky

5.1 Makroskopické charakteristiky jater přeštického černostrakatého prasete

Játra přeštického černostrakatého prasete měla pět až šest laloků (lobus quadratus nebývá vždy vytvořen). V naší sbírce 20 korozivních preparátů jater přeštického černostrakatého prasce byl lobus quadratus plně vyvinut u sedmi jedinců (35 % případů) (obr. 5). Jaterní branka se nacházela na viscerální ploše jater, v. portae se obvykle dělila několik centimetrů před vstupem do jaterního parenchymu před pravými laloky (obr. 5). Žlučník byl zanořen do lobus dexter medialis a odděloval lobus quadratus – byl-li tento přítomen (obr. 5). V. portae vstupovala do jater v jejich kranální části na úrovni hranice pravého mediálního a pravého laterálního laloku (obr. 5). Před vstupem do jater se v. portae dělila ostře vlevo a vpravo do dvou větví, v jednom případě jsme pozorovali trifurkaci (obr. 5). Ramus dexter v. portae zásoboval lobus caudatus, lobus dexter lateralis a zásoboval i část lobus dexter medialis. Celkem zásoboval ramus dexter v. portae u přeštického černostrakatého prasete 19–40 % jaterního parenchymu (pravé hemiliver) (obr. 5). Ramus sinister větve v. portae měl po oddělení buď delší průběh bez větvení (kaudální větve pro lobus dexter medialis vychází z pravé větve), nebo vydával kaudální větve pro lobus dexter medialis (obr. 6). Ramus sinister v. portae zásoboval 60–81 % jaterního parenchymu (levé hemiliver) (obr.

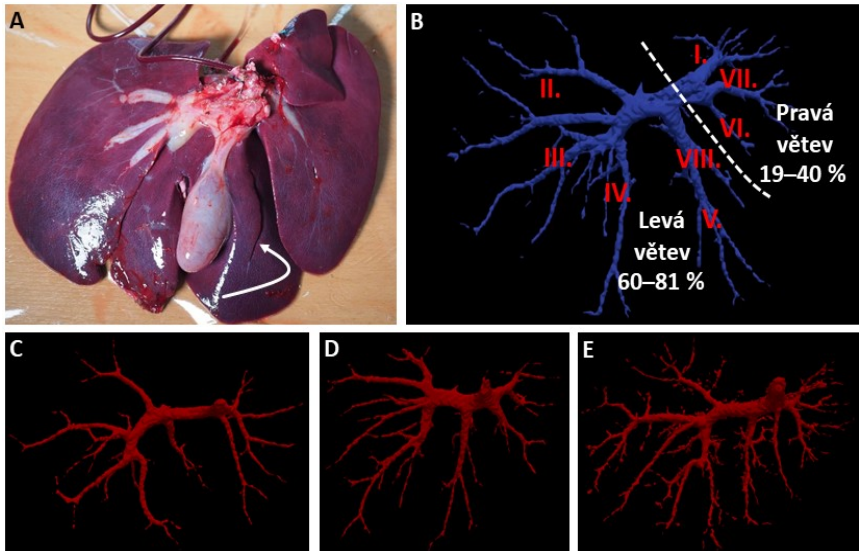


Obr. 5 Anatomie jater přeštického černostrakatého prasete a jeho korozivní preparát.

(A, B) Naznačení segmentů dle Couinauda na diafragmatické (A) a viscerální ploše (B). Mezilalokové rýhy (červené hroty), fissura ligamenti teretis (žlutočervený hrot), Rexova-Cantlieho linie (žluté přerušované čáry), lig. coronarium (žlutý hrot), v. cava caudalis (modrý hrot), v. portae (bílý hrot), lig. hepatoduodenale (černá hvězdička), lobus caudatus (žlutá hvězdička) a lobus quadratus (zelená hvězdička). (C, D) Korozivní preparát proplněný obarvenou pryskyřicí Biodur E20 Plus (Heidelberg, Německo) cestou v. portae (modrá), jaterní tepny (červená) a ductus hepaticus communis (zelený). Lobus caudatus (žlutá hvězdička), lobus quadratus (zelená hvězdička), a. cystica (modrý hrot), kapilární síť vyživující ductus cysticus (zelený hrot), drobné žlučové vývody (bílá hvězdička), v. cava caudalis (žlutá přerušovaná čára) s ústím (modrožlutý hrot). Měřítka odpovídá 5 cm. Zdroj: Eberlova et al. 2020.

6). Rovněž hned po oddělení obvykle vydával lalokovou větev pro lobus dexter medialis, segmenty V a VIII (obr. 6). Před svou bifurkací vydával ramus sinister v. portae laterokraniální větve pro kraniální část lobus sinister lateralis, nebo tato větev vycházela z kraniální větve bifurkace. Zásobení jaterních laloků v levé části jater probíhalo větvemi v. portae hepatis různých generací, v pravé části jater může být lobus dexter medialis zásoben samostatnou větví v. portae v případě její trifurkace. Objem jater přeštického černostrakatého prasete se pohyboval v rozmezí 735 až 1167 ml. Na viscerální ploše pravých jaterních

laloků jsme pozorovali záhyb jaterního parenchymu. Záhyb byl různě orientován a na zbývajících lalocích jsme jej nepozorovali (obr. 6).



Obr. 6 Záhyb jaterního parenchymu a variabilita zásobení prasečích jaterních segmentů portální žilou.

(A) Na viscerální ploše pravých laloků jsme pozorovali záhyb jaterního parenchymu (bílá šipka). (B) Ramus dexter v. portae zásoboval u přeštického černostrakatého prasete 19 až 40 % jaterního parenchymu (segmenty I, VI, VII), ramus sinister v. portae zásoboval zbývající část jaterního parenchymu. (C) Při vstupu do jater se v. portae ostře dělila na levou a parvou větev, v jednom případě jsme pozorovali trifurkaci. (D, E) Pro kraniální část lobus sinister lateralis (segment II) jsme pozorovali variabilní schémata odstupu segmentové větve v. protae.

5.2 Variabilita velikosti hepatocytů, podílu dvoujaderných hepatocytů a počtu hepatocytů mezi jedinci, mezi jaterními laloky a mezi jednotlivými oblastmi jaterního parenchymu

Průměrný objem jednojaderných hepatocytů po korekci smrštění byl ve všech zkoumaných vzorcích $3670 \pm 805 \mu\text{m}^3$ (průměr \pm SD). Průměrný objem dvoujaderných hepatocytů byl $7050 \pm 2550 \mu\text{m}^3$. Podíl dvoujaderných hepatocytů byl $4 \pm 2\%$. Počet všech hepatocytů činil 146997 ± 15738 na mm^3 jaterního parenchymu. V žádných ze zkoumaných jater jsme nepozorovali patologické změny (zánět, nekróza, fibróza, rozsáhlé tukovatění). Koeficient

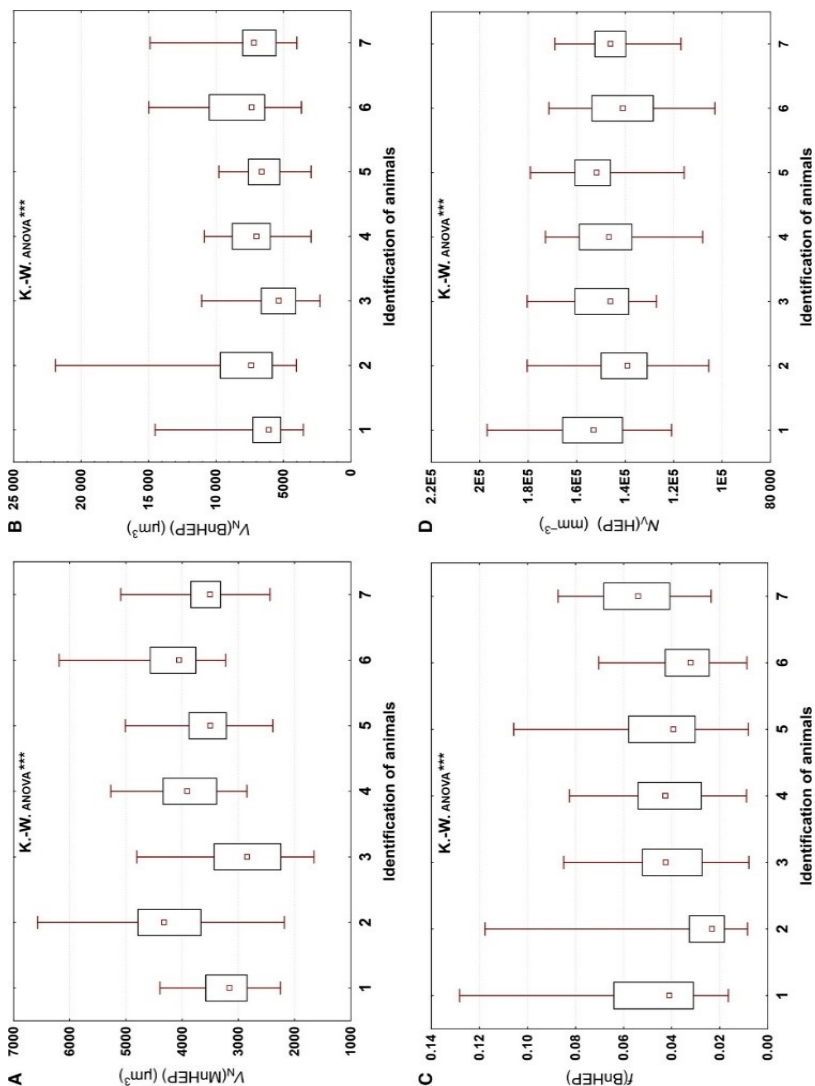
chyby (coefficient of error) se pohyboval v rozmezí 0,084 až 0,125 na úrovni tkáňových bločků a mezi 0,014 až 0,018 na úrovni jedinců.

Při vzájemném porovnání jednotlivých jaterních laloků Kruskalova–Wallisova ANOVA neukázala na významné mezilalokové rozdíly v žádném ze čtyř kvantifikovaných parametrů hepatocytů.

Při porovnávání jednotlivých ROI jsme detekovali průměrně nejobjemnější jednojaderné hepatocyty na periférii jaterních laloků ($p < 0,05$), mezi paraportálním a parakaválním ROI jsme významné rozdíly v objemu jednojaderných hepatocytů nepozorovali (obr. 7). Průměrné objemy dvoujaderných hepatocytů ani jejich podíl se mezi jednotlivými ROI významně nelišily (obr. 7). Nejmenší objemové množství hepatocytů bylo na jaterní periférii, která se v tomto lišila jednak od parakaválního ROI ($p < 0,01$), jednak od paraportálního ROI ($p < 0,001$, obr. 7).

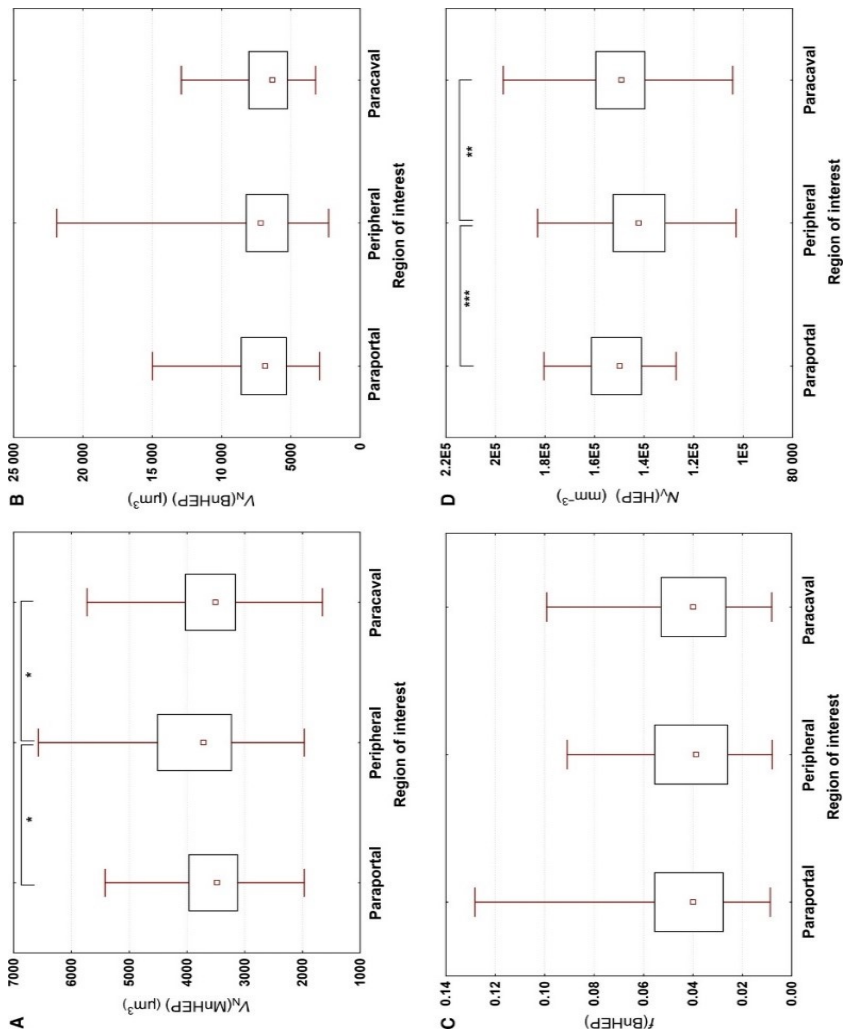
V případě porovnávání jednotlivých prasad jsme detekovali signifikantní interindividuální rozdíly ve všech čtyřech zkoumaných parametrech (obr. 8).

Při porovnání jednotlivých parametrů jsme zaznamenali střední korelaci mezi průměrným objemem jednojaderných hepatocytů a průměrným objemem dvoujaderných hepatocytů (Spearmanovo $r = 0,55$) identifikovanými na stejných histologických vzorcích. Objemové množství hepatocytů pak vykazovalo střední negativní korelaci s průměrným objemem jednojaderných hepatocytů ($r = -0,52$) a s průměrným objemem dvoujaderných hepatocytů ($r = -0,33$).



Obr. 7 Odhady velikosti, počtu a poměru jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů u zkoumaných prasat.

U všech zkoumaných parametrů jsme detekovali signifikantní rozdíly mezi prasaty. Rozdíly jsou zobrazeny pro (A) průměrný objem jednojaderných hepatocytů MnHEP, (B) průměrný objem jednojaderných hepatocytů BnHEP, (C) pro poměrné zastoupení dvoujaderných hepatocytů $f(\text{BnHEP})$ a (D) pro počet hepatocytů na mm^3 jaterního parenchymu $N_v(\text{HEP})$. K určení signifikance rozdílů jsme použili Kruskalovu-Wallisovu ANOVA (***) $P < 0,001$. Zdroj: Junatas et al. 2017.



Obr. 8 Odhady velikosti, počtu a poměru jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v závislosti na poloze vůči větvím v. portae, vv. hepaticae a na jaterní periférii.

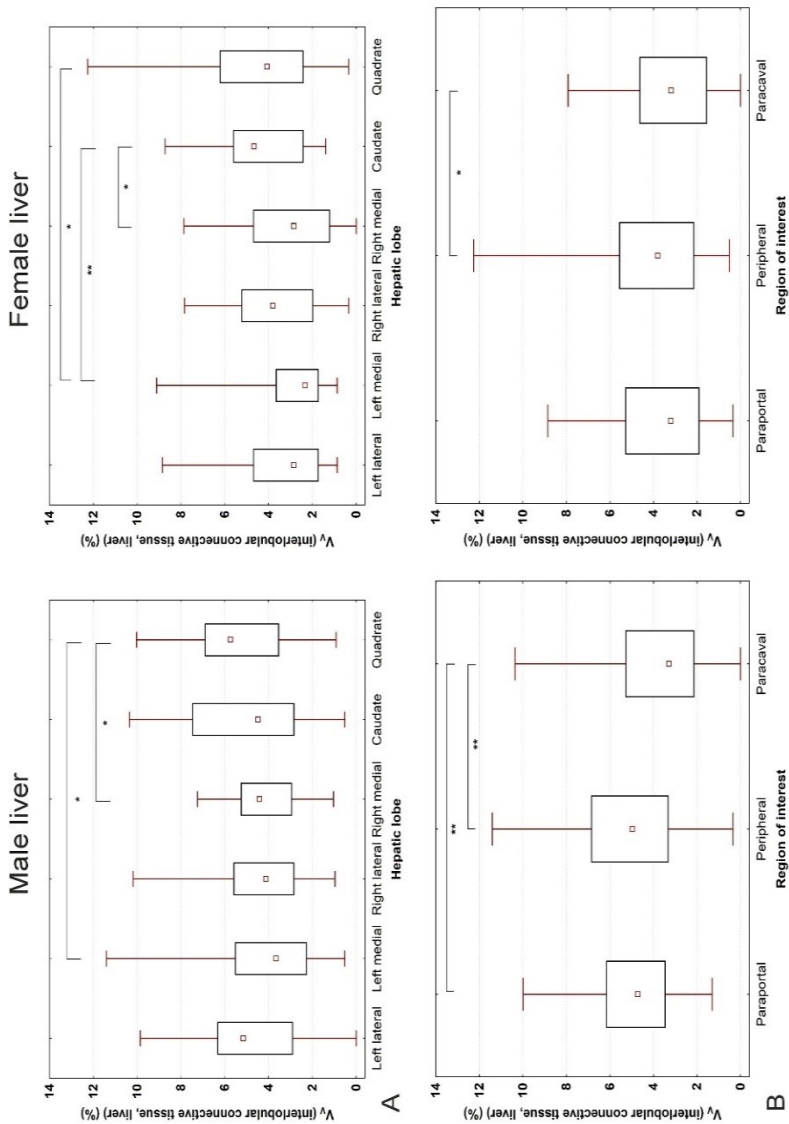
(A) Nejobjemnější jednojaderné hepatocyty jsme našli na jaterní periférii (periferní ROI). (B) U dvoujaderných hepatocytů jsme nepozorovali významné rozdíly v jejich objemu v závislosti na ROI. (C) Poměrné zastoupení dvoujaderných hepatocytů $f(\text{BnHEP})$ se nelišilo v závislosti na ROI. (D) Nejmenší počet hepatocytů – $N_v(\text{HEP})$ jsme detekovali na jaterní periférii. Mann-Whitney test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Zdroj: Junatas et al. 2017.

5.3 Variabilita v objemovém podílu jaterního vaziva vzhledem k pohlaví, mezi jedinci, mezi jaterními laloky a mezi jednotlivými oblastmi jaterního parenchymu

V případech jaterního vaziva jsme pozorovali značnou variabilitu na všech úrovních vzorkování: mezi pohlavími, mezi jedinci, mezi jaterními laloky i mezi ROI. Průměrný objemový podíl interlobulárního vaziva byl signifikantně větší u samců v porovnání se samicemi ($p < 0,001$). V samčích játrech byl průměrný podíl interlobulárního vaziva $4,7 \pm 2,4\%$ v rozsahu 0 % až 11,4%. V samičích játrech byl průměrný podíl vaziva $3,6 \pm 2,2\%$ v rozsahu 0% až 12,3%. Podíl intralobulárního vaziva (tj. vaziva perisinusoidálního i pericentrálního dohromady) činil $< 0,2\%$ jak u samců, tak u samic: průměrný podíl perisinusoidálního vaziva byl u samců $0,003 \pm 0,02\%$ a $0,002 \pm 0,02\%$ u samic, průměrný podíl pericentrálního vaziva pak byl $0,03 \pm 0,1\%$ u samců a $0,04 \pm 0,1\%$ u samic. Na rozdíl od samičích jater, byl podíl samčího pericentrálního vaziva větší než poměr perisinusoidálního vaziva ($p < 0,01$). Interlobulární vazivo představovalo $> 99,9\%$ celkového množství jaterního vaziva a jeho podíl koreloval s celkovým podílem jaterního vaziva (Spearmanovo $r = 0,998$, $p < 0,05$).

V samičích játrech jsme při mezilalokovém porovnání zaznamenali signifikantní rozdíl v podílu interlobulárního vaziva pouze mezi lobus quadratus a lobus sinister medialis ($p < 0,05$) a mezi lobus quadratus a lobus dexter medialis ($p < 0,05$) (obr. 10). ROI s nejmenším podílem interlobulárního vaziva byl parakavální ROI ($3,9 \pm 2,3\%$, $p < 0,01$). Paraportální ($4,9 \pm 2,0\%$) a periferní ROI ($5,2 \pm 2,5\%$) obsahovaly větší podíl vaziva (obr. 10). Další pozorované rozdíly v podílu interlobulárního vaziva nebyly signifikantní. Shodné rozdíly v množství vaziva jsme detekovali při porovnávání celkového podílu vaziva. Podíl perisinusoidálního i pericentrálního vaziva byl zanedbatelný ($< 0,2\%$).

Objemový podíl interlobulárního vaziva v samičích játrech se lišil mezi lobus sinister medialis a lobus caudatus ($p < 0,05$) a lobus quadratus ($p < 0,05$) a také se objemový podíl vaziva lišil mezi lobus dexter medialis a lobus caudatus ($p < 0,05$, obr. 11). Při porovnání ROI jsme detekovali vyšší podíl interlobulárního vaziva v periferním ROI ($4,1 \pm 2,4\%$) v porovnání s parakaválním ROI ($3,1 \pm 2,0\%$) ($p < 0,05$, obr. 10). Podíl perisinusoidálního i pericentrálního vaziva byl zanedbatelný ($< 0,2\%$).

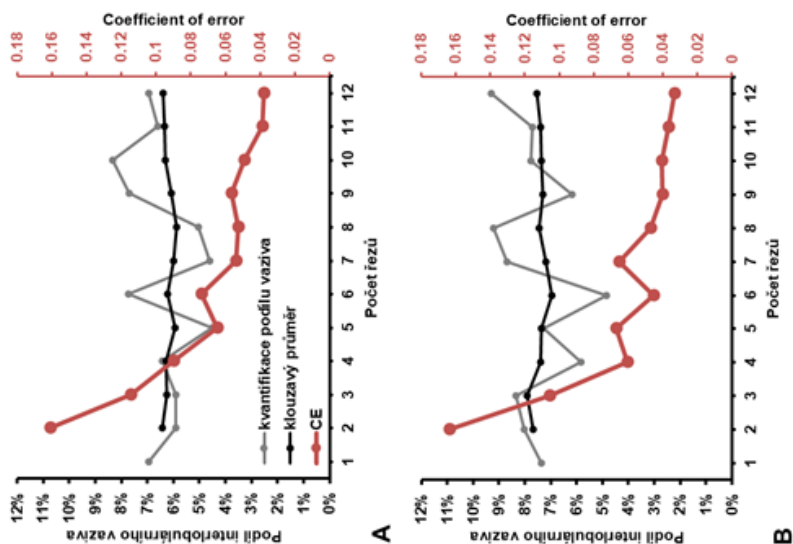


Obr. 9 Podíl interlobulárního vaziva v játrech samců a samic přeštického černostrakatého prasete.

Data jsou zobrazena odděleně pro jaterní laloky (A) a pro jednotlivé oblasti jaterního parenchymu ve vztahu k jaterním cévám (ROI) (B). ROI. K určení signifikance rozdílů (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$) jsme použili Mannův–Whitneyův test. Zdroj: Mik et al. 2018.

5.4 Výpočet koeficientu chyby

Ve stereologické praxi neznáme velikost rozdílu mezi výsledným odhadem a skutečnou velikostí zkoumaného parametru. Velikost koeficientu chyby (CE) nám udává, jaká část chyby je způsobena vzorkováním. Výpočet CE uvádíme na příkladu kvantifikace interlobulárního vaziva, pro kvantifikaci ostatních parametrů byl výpočet CE podobný (obr. 10). Analýza čtyř souborů 12 sériových naznačila (na obr. 10 zobrazeny pouze dva soubory: A, B), že kvantifikace ze čtyř řezů na bloček namísto jednoho by snížila CE na přijatelnou hodnotu přibližně 0,11. Obdobně při analýze CE morfometrických parametrů hepatocytů data naznačují, že při použití 36 tkáňových bločků na jedna játra je velikost CE přijatelná (0.014–0.018).



Obr. 10 Klesající koeficient chyby kvantifikace jaterního vaziva v závislosti na množství použitých sériových histologických řezů.

(A, B) Variabilita odhadu množství vaziva mezi sériovými histologickými řezy (šedá čára, levá osa y) ovlivňuje velikost klouzavého průměru množství vaziva v tkáňovém bločku (černá čára, levá osa y), výsledný koeficient chyby (CE, červená čára, červená osa y vpravo), odhadnutý dle Gundersen a Jensen (1987), se zvyšujícím se počtem vyhodnocených řezů (osa x) klesá, což ilustruje vliv histologického vzorkování na výsledný odhad. Grafy ukazují, že neohledě na pozici vzorku v jaterním laloku či ve vztahu k jaterním cévám (ROI), kvantifikace na základě čtyř histologických řezů snižuje hodnotu CE na přibližně 0,1, což je považováno za dostatečně nízkou hodnotu.

6 Diskuze

Při hodnocení anatomické podobnosti jater prasete domácího s játry lidskými narážíme na zásadní nedostatek. Přestože byla játra prasete domácího navržena jako vhodný modelový orgán v biomedicinském výzkumu a jsou považována za podobná játrům lidským, nebylo doposud definováno, co je za tuto podobnost považováno. Nedefinováním anatomické podobnosti je čtenář implicitně odkazován na domnělý obecný konsenzus o podobnosti.

Ovšem bez jasně stanovené hypotézy není možné tuto testovat, a tak se případný závěr stává relativním. V této práci jsme předložili několik možných pohledů na mezidruhovou klinicky aplikovatelnou definici konceptu anatomické podobnosti, které jsme přetavili do testovatelných otázek.

6.1 *Anatomická podobnost*

Počet jaterních laloků přeštického černostrakatého prasete odpovídá horní hranici publikovaného počtu prasečích jaterních laloků. Určitou roli zde může sehrávat meziplemenná variabilita, zhodnocení jejího významu však komplikuje fakt, že plemeno zkoumaného prasete nebývá vždy uváděno (viz např. Court et al. 2003). Další proměnnou je věk zkoumaných prasat: protože jsme zkoumali nedospělé jedince, je potřeba počítat i s morfologickou nedefinitivností jaterního parenchymu.

Rexova-Cantlieho linie, která odděluje embryonální a morfologické poloviny jater (hemiliver), může být dobře patrna po podvazu jedné z větví v. portae (Liška 2016). U námi zkoumaného souboru prasat se ale hranice mezi pravou a levou polovinou jater (hemiliver) povrchově nachází v místě levé mezilalokové rýhy, což je v rozporu s publikovanými pracemi, které naznačují průběh Rexovy-Cantlieho linie ve fissura ligamenti teretis. Podíl na zásobení jaterního parenchymu z ramus dexter et sinister v. portae je navíc u námi zkoumaného souboru šesti prasat domácích v porovnání se zásobením jater člověka opačný. Ovšem i přes tyto rozdíly bylo možno játra rozdělit do osmi jaterních segmentů dle Couinauda na základě větvení v. portae. Naopak ve shodě s publikovanými závěry se jaterní branka nacházela na viscerální ploše jater a v. portae se obvykle dělila několik centimetrů před vstupem do jaterního parenchymu před pravými laloky (Court et al. 2003) (obr. 5 a 6). Žlučník byl také zanořen do lobus dexter medialis a odděloval lobus quadratus – je-li tento přítomen (König a Liebich 2002) (obr. 5 a 6).

6.2 *Morfometrické parametry jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů*

Objem dvoujaderných hepatocytů prasete domácího je podobný s objemem dvoujaderných hepatocytů potkaních jater (tabulka 4). Navíc jsme zjistili, že objem dvoujaderných hepatocytů je v porovnání s jednojadernými hepatocyty téměř dvojnásobný. Dle zjištění Watanabe a Tanaka (1982) a Peinado et al.

(1990) odpovídá velikost hepatocytů součtu chromozómových sad všech jader hepatocytu (ploidie) a objemu uskladněných tukových kapének.

Tab. 2 Stereologická kvantifikace objemu hepatocytů u vybraných živočichů.

Genus	Objem hepatocytů [μm^3]		Citace
	Jednojaderné	Dvoujaderné	
Homo		11305	Rohr et al. 1976
Mus		5128	Hammad et al. 2014
		5300	Karbalay-Doust a Noorafshan 2009
Rattus	♀ 4740	♀ 6930	Jack et al. 1990
	♂ 6044 ♀ 4789	♂ 7503 ♀ 6565	Marcos et al. 2016
Sus	3670	7050	Náš výzkum (Junatas et al. 2017)

Mezi jaterními laloky přeštického černostrakatého prasete jsme nepozorovali signifikantní rozdíly ve velikosti hepatocytů, v jejich množství a v podílu jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů. Z toho vyplývá, že pro experimentální studium jaterní regenerace např. po hepatektomii či částečné lobektomii (Bruha et al. 2015) mohou být využívány jednotlivé laloky a to i pro kvantitativní histologii. Za předpokladu, že pro vzorkování nebude využito signifikantně méně vzorků než v naší studii, bude morfometrie hepatocytů nezkrácená i v případě, že vzorky budou pocházet z různých jaterních laloků.

Jak je patrné z našich výsledků, zdravá prasata domácího stejného plemene, o stejném věku, s podobně velkými játry (813 ± 85 ml), která konzumovala stejnou stravu a o něž bylo pečováno identicky, se mohou signifikantně odlišovat ve velikosti a počtu hepatocytů a v poměru množství dvoujaderných hepatocytů.

V oblastech s většími hepatocyty jsme napočítali méně hepatocytů. Vysvětlení tohoto jevu je nasnadě: jestliže pozorujeme ve stejném referenčním prostoru větší buňky, vejde se nám jich sem méně a méně jich i spočítáme.

Kdybychom měli naše poznatky zobecnit do praktických doporučení, vzhledem k pozorovaným rozdílům ve velikosti a počtu hepatocytů v závislosti na jejich poloze v jaterním řečišti, morfometrie hepatocytů může být poměrně snadno zkrácena, budeme-li provádět kvantitativní histologii na vzorcích odebraných z blízkosti velkých jaterních cév a z periférie jaterních laloků.

6.3 Kvantifikace interlobulárního a intralobulárního vaziva jater

Po navýšení počtu zkoumaných jedinců na šest samců a šest samic jsme v případě kvantifikace jaterního vaziva detekovali signifikantní mezipohlavní rozdíly. Detekovaná variabilita v množství jaterního vaziva může být zapříčiněna vlivem pohlavních hormonů, především pak estrogenu, který má protektivní účinky vůči fibrogenézi (Yang et al. 2014). Pravděpodobně z toho důvodu dosahuje množství jaterního vaziva u žen před menopauzou (Yang et al. 2014), stejně tak jako u samic potkanů (Marcos a Correia-Gomes 2015), nižších hodnot v porovnání s muži/samci. Hlavním rozdílem v nárůstu jaterního vaziva

u samců potkanů je v ukládání perisinusoidálního vaziva s věkem (Marcos a Correia-Gomes 2015). Náš výzkum tak podporuje hypotézu o obecně vyšším množství vaziva u samců daného druhu. Interpretaci však opět komplikuje věk námi zkoumaných nedospělých selat, u nichž očekávat pouze minimální vliv pohlavních hormonů. Duhou linií interpretace pozorovaného dimorfizmu by mohl být vztah relativní velikosti jater a jaterního vaziva: při menší velikosti jater u samic je potřeba relativně méně vaziva jako kotevní struktury pro jaterní cévy, nervy a buňky a pro buněčnou signalizaci v porovnání s většími játry samčími. Ovšem v této linii interpretace chybí relevantní data pro či proti této hypotéze.

Pokud je nám známo, doposud neexistují relevantní data, která by vysvětlovala námi pozorované rozdíly v množství vaziva mezi jaterními laloky a v různých oblastech jaterních laloků. Dosud publikované práce studující distribuci jaterního vaziva poukazují na kolokalizaci kolagenů typu I a typu III, a to jak vně jaterního lalůčku v portálních prostorech, tak uvnitř jaterního lalůčku (Mak et al. 2012), zatímco kolagen typu IV se nachází pouze uvnitř jaterního lalůčku (Mak et al. 2013).

Při porovnání množství vaziva vně (interlobulární) a uvnitř jaterního lalůčku (pericentrální a perisinusoidální sumarizované do intralobulárního vaziva) je zarážející jeho zanedbatelné množství uvnitř jaterního lalůčku ($< 0,2\%$ jak u samců, tak u samic): podíl perisinusoidálního vaziva byl u samců $0,003 \pm 0,02\%$ a $0,002 \pm 0,02\%$ u samic, podíl pericentrálního vaziva pak byl $0,03 \pm 0,1\%$ u samců a $0,04 \pm 0,1\%$ u samic. To je v rozporu s publikovanými výsledky pro potkaní játra (Marcos et al. 2015a), kde byl pozorován 70% podíl intralobulárního kolagenu (součet kolagenů označených autory jako „intralobulární“ a „kolem centrální veny“). Mezi množstvím intralobulárního kolagenu a počtem hepatocytů ($r = 0,47$) a Itoových buněk ($r = 0,50$) byla navíc u potkanů detekována střední míra korelace (Marcos a Correia-Gomes 2016). V našem výzkumu jater přeštického černostrakatého prasete jsme však pozorovali opačnou tendenci: menší počet relativně větších hepatocytů byl pozorován na periférii jaterních laloků (ROI), kde bylo současně nalezeno větší množství vaziva. V kontextu interpretace rozdílné distribuce jaterního vaziva vzhledem k jaternímu lalůčku byla vznesena hypotéza o nárůstu kolagenu podél sinusoid se stárnutím jedince (Marcos a Correia-Gomes 2016). Protože jsme zkoumali nedospělé jedince, nejsme schopni navržit evidenci žádným směrem.

Relativní objem jaterního vaziva přeštického černostrakatého prasete v naší studii zapadá do obecné kvalitativní představy o větším množství jaterního vaziva u prasete domácího v porovnání s jinými živočichy i člověkem: u psa, kozy, koně, kočky a člověka je jaterní vazivo s těžší viditelné, zatímco u morčete, křečka, ovce a prasete je zřetelné (Chen et al. 2013; Madhan a Raju 2014; Witter 2017). Ovšem při pokusu o kvantitativní porovnání narážíme na zásadní a častý nedostatek studií kvantifikace jaterního vaziva, a sice nereprezentativní vzorkování (Marcos et al. 2012): kvantifikace jaterního vaziva obvykle probíhá

jen na malé části jaterního parenchymu, který bývá ve většině případů odebrán z blíže nespecifikované části jater o neznámé velikosti. Nestandardizovaná metoda kvantifikace pak může stát za publikovanými rozdíly v množství jaterního vaziva u různých laboratorních zvířat (tabulka 3): z celkového počtu 165 publikací (Google – Obrázky, „liver collagen“, leden a únor 2021), v nichž bylo kvantifikováno vazivo na barvených histologických řezech, byly výsledky založeny na nezkreslené metodice pouze u pěti studií (tabulka 4).

Tab. 3 Přehled publikovaných extrémních rozdílů v množství jaterního vaziva u laboratorních zvířat, kvantifikace na histologických řezech.

Za povšimnutí stojí práce Sobrevals et al. 2016, kde autoři publikovali téměř třináctinásobný rozdíl v množství jaterního vaziva mezi dvěma zdravými populacemi laboratorních potkanů. Symbol ~ značí přibližnou hodnotu, která byla odečtena z grafu.

genus	citace	množství
Bos	Atmaca et al. 2019	žádná pozitivita
	Yarpuzlu et al. 2014	6.17%
Cavia	Sarr et al. 2016	1.70%
Leporidae (familia)	Wang et al. 2013	0.03%
	Zou et al. 2007	6.23%
Mesocricetus	Masubuchi et al. 2013	0.13%
	Serna-Salas et al. 2018	~5%
Mus	Erstad et al. 2018	~7%
	Huang et al. 2020	0%
	Hung et al. 2005	0%
	Zhao et al. 2019	5%
Rattus	Grgurevic et al. 2017	~0%
	Chen et al. 2020	~0.06%
	Qiu et al. 2020	5%
	Sobrevals et al. 2016	~0.5%/~6.3%
	Yang et al. 2020	~8%

Pro přenos našich poznatků do humánní medicíny pro výzkum lidských jaterních chorob, jako je chronická hepatitida C (Besusparis et al. 2014), alkoholem podmíněné onemocnění jater (ALD) a nealkoholové jaterní choroby (NALD) (Sakhuja 2014), primární biliární cirhóza (Working Subgroup (English version) for Clinical Practice Guidelines for Primary Biliary Cirrhosis 2014) nebo sklerotizující cholangitida (de Vries et al. 2015), je na prasečím experimentálním jaterním modelu potřeba počítat s větším množstvím jaterního vaziva u zdravých jedinců, které připomíná fibrózu na játrech lidských (Saxena et al. 1999). Navíc má intralobulární a interlobulární vazivo u prasete odlišnou distribuci v porovnání s játry lidskými.

Tab. 4 Objektivně kvantifikované množství vaziva laboratorních saveců, barveno (pikro)siriovou červení.

Genus	Množství vaziva	Pohlaví	Citace
Mus	1.45 ± 0.07 %	♂	Clapper et al. 2013*
	~1.5 %	♂	Fallowfield et al. 2014
	2.0 ± 0.3 %	♂	Marcos et al. 2015a
Rattus	3.2 ± 0.2 %	♂	Marcos a Correia-Gomes 2016
	~2.0 %	♀	Hoy et al. 2018
	~0.5 %	♂	
Sus	4.7 ± 2.4 %	♂	Mik et al. 2018
	3.6 ± 2.2 %	♀	

*kvantifikace na základě dvou laloků – levý laterální a pravý mediální

7 Závěr

Ve světle našich poznatků se pokusíme odpovědět na sedm otázek, které jsme položili na úvod našeho výzkumu v kapitole 2.

Ad 1. Jaká je normální variabilita v množství jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v játrech přeštického černostrakatého prasete?

Ad 2. Jaká je normální variabilita v objemu a v počtu jednojaderných a dvoujaderných hepatocytů v játrech přeštického černostrakatého prasete?

Průměrný objem jednojaderných hepatocytů po korekci smrštění byl ve všech zkoumaných vzorcích $3670 \pm 805 \mu\text{m}^3$. Průměrný objem dvoujaderných hepatocytů byl $7050 \pm 2550 \mu\text{m}^3$. Podíl dvoujaderných hepatocytů tvořil $4 \pm 2\%$. Počet všech hepatocytů činil 146997 ± 15738 na mm^3 jaterního parenchymu. Při vzájemném porovnání jednotlivých jaterních laloků jsme neprokázali významné rozdíly v žádném ze čtyř kvantifikovaných parametrů. Při porovnávání jednotlivých ROI jsme detekovali průměrně nejobjemnější jednojaderné

hepatocyty na periférii jaterních laloků, mezi paraportálním a parakaválním ROI jsme významné rozdíly v objemu jednojaderných hepatocytů nepozorovali. Průměrné objemy dvoujaderných hepatocytů ani jejich podíl se mezi jednotlivými ROI významně nelišily. Nejmenší objemové množství hepatocytů bylo na jaterní periférii, která se v tomto lišila jednak od parakaválního ROI, jednak od paraportálního ROI. V případě porovnávání jednotlivých prasat jsme detekovali signifikantní interindividuální rozdíly ve všech čtyřech zkoumaných parametrech.

Ad 3. Jaká je normální variabilita v množství jaterního vaziva u přeštického černostrakatého prasete?

Ad 4. Liší se množství jaterního vaziva mezi samci a samicemi přeštického černostrakatého prasete?

Ad 5. Jaký je podíl v rámci distribuce jaterního vaziva uvnitř jaterního lalůčku a vně jaterního lalůčku přeštického černostrakatého prasete?

V případě jaterního vaziva jsme pozorovali značnou variabilitu na všech úrovních vzorkování: mezi pohlavími, mezi jedinci, mezi jaterními laloky i mezi ROI. Průměrný objemový podíl interlobulárního vaziva byl signifikantně větší u samců v porovnání se samicemi. V samčích játrech byl průměrný podíl interlobulárního vaziva $4,7 \pm 2,4$ % v rozsahu 0 až 11,4 %. V samicích játrech byl průměrný podíl vaziva $3,6 \pm 2,2$ % v rozsahu 0 až 12,3 %. Průměrný podíl intralobulárního vaziva (tj. vaziva perisinusoidální i pericentrálního dohromady) činil $< 0,2$ % jak u samců, tak u samic. Na základě výpočtu koeficientu chyby u souborů sériových doporučujeme kvantifikovat množství vaziva ze čtyř řezů na jeden tkáňový bloček. Z naší další analýzy jednoznačně vyplývá důležitost znalosti pozice bločku v játrech (lalok a ROI) a jejího respektování při následné histologické analýze. V případě, že bude vzorkovací schéma reflektovat rozdíly v množství vaziva mezi jednotlivými laloky a ROI, k detekování stejného nárůstu v množství vaziva bude zapotřebí menšího počtu vzorků a vzorkování se tak stane efektivnější a šetrnější v porovnání s nahodilým vzorkováním bez udání anatomického původu vzorku.

Přestože se v literatuře opakovaně tvrdí, že množství vaziva v játrech prasete domácího je v porovnání s ostatními laboratorními zvířaty i člověkem obecně větší, existují práce na myších, potkanech, turech, případně zajícovitých, kde bylo (pravděpodobně vlivem nevhodného vzorkování) prokázáno naopak průměrně větší množství jaterního vaziva v porovnání s našimi výsledky množství jaterního vaziva přeštického černostrakatého prasete.

Ad 6. Jaké je schéma větvení segmentových větví v. portae u přeštického černostrakatého prasete?

Ad 7. Jaký je podíl na zásobení jater levé a pravé větve v. portae u přeštického černostrakatého prasete?

Játra přeštického černostrakatého prasete mají pět až šest laloků – lobus quadratus je plně vyvinut v 35 % případů. V. portae vstupuje u prasete do jater v jejich kraniální části na úrovni hranice pravého mediálního a pravého laterálního laloku. Před vstupem do jater se v. portae dělí ostře vlevo a vpravo do dvou větví, v jednom případě jsme pozorovali trifurkaci – tato kaudální větev zásobovala pravý mediální lalok. Celkem zásobuje pravá větev v. portae u přeštického černostrakatého prasete 19–40 % jaterního parenchymu (pravé hemiliver), levá větev v. portae zásobuje 60–81 % jaterního parenchymu.

Ramus dexter v. portae zásobuje lobus caudatus a lobus dexter lateralis a může zásobovat část lobus dexter medialis (pozorováno v jednom případě z celkových šesti). Ramus sinister v. portae má po oddělení buď delší průběh bez větvení (kaudální větev pro lobus dexter medialis vychází z pravé větve), nebo vydává kaudální větev pro lobus dexter medialis. Levá větev také hned po oddělení obvykle vydává lalokovou větev pro lobus dexter medialis, segmenty V a VIII. Před svou bifurkací vydává levá větev laterokraniální větve pro kraniální část lobus sinister lateralis, nebo tato větev vychází z kraniální větve bifurkace.

Zásobené jaterních laloků v levé části jater probíhá větvemi v. portae hepatis různých generací, v pravé části jater může být lobus dexter medialis zásoben samostatnou větví v. portae hepatis v případě její trifurkace. Játra přeštického černostrakatého prasete bylo přesto možno rozdělit do osmi segmentů.

8 Citovaná literatura

AHARINEJAD, S. H. a Alois LAMETSCHWANDTNER, 1992. Microvascular Corrosion Casting in Scanning Electron Microscopy: Techniques and Applications [online]. Wien: Springer-Verlag [vid. 2020-12-12]. ISBN 978-3-7091-9232-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7091-9230-6

ASAOKA, Yoshiji, Yuko TOGASHI, Mayu MUTSUGA, Naoko IMURA, Tomoya MIYOSHI a Yohei MIYAMOTO, 2016. Histopathological image analysis of chemical-induced hepatocellular hypertrophy in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 68(4), 233–239. ISSN 0940-2993. Dostupné z: doi:10.1016/j.etp.2015.12.005

ATMACA, Hasan Tarik, Aycan Nuriye GAZYAGCI, Osman Safa TERZI a Tuğçe SUMER, 2019. Role of stellate cells in hepatic echinococcosis in cattle. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology* [online]. 43(4), 576–582. ISSN 0971-7196. Dostupné z: doi:10.1007/s12639-019-01129-z

BEDOSSA, P. a T. POYNARD, 1996. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* (Baltimore, Md.) [online]. 24(2), 289–293. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.510240201

BEST, Jan, Paul MANKA, Wing-Kin SYN, Laurent DOLLÉ, Leo A. VAN GRUNSVEN a Ali CANBAY, 2015. Role of liver progenitors in liver regeneration. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* [online]. 4(1), 48–58. ISSN 2304-3881. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.16

BONNICHON, Philippe, 2007. Le foie et les chirurgiens. *Histoire des sciences médicales* [online]. 41(1). Dostupné z: https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Le_foie_et_les_chirurgiens_Dr_Philippe_Bonichon_.pdf

BOYKOV, Yuri a Marie-Pierre JOLLY, 2000. Interactive Organ Segmentation Using Graph Cuts. In: Scott L. DELP, Anthony M. DIGIOIA a Branislav JARAMAZ, ed. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2000* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, s. 276–286. *Lecture Notes in Computer Science*. ISBN 978-3-540-40899-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-40899-4_28

BRUHA, Jan, Ondrej VYCITAL, Zbynek TONAR, Hynek MIRKA, Lenka HAIDINGEROVA, Jan BENES, Richard PALEK, Martin SKALA, Vladislav TRESKA a Vaclav LISKA, 2015. Monoclonal Antibody Against Transforming Growth Factor Beta 1 Does Not Influence Liver Regeneration After Resection in Large Animal Experiments. *In Vivo*. 29(3), 327–340. ISSN 0258-851X, 1791-7549.

BUDAI, Andras, Andras FULOP, Oszkar HAHN, Peter ONODY, Tibor KOVACS, Tibor NEMETH, Miklos DUNAY a Attila SZIJARTO, 2017. Animal Models for Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): Achievements and Future Perspectives. *European Surgical Research* [online]. 58(3–4), 140–157. ISSN 0014-312X, 1421-9921. Dostupné z: doi:10.1159/000453108

CARLILE, D. J., K. ZOMORODI a J. B. HOUSTON, 1997. Scaling factors to relate drug metabolic clearance in hepatic microsomes, isolated hepatocytes, and the intact liver: studies with induced livers involving diazepam. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 25(8), 903–911. ISSN 0090-9556.

CLAPPER, Jason R., Michelle D. HENDRICKS, Guibao GU, Carrie WITTMER, Carrie S. DOLMAN, John HERICH, Jennifer ATHANACIO, Christiane VILLES CAZ, Soumitra S. GHOSH, Joseph S. HEILIG, Carolyn LOWE a Jonathan D. ROTH, 2013. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 305(7), G483–G495. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00079.2013

COUINAUD, Claude, 1954. Lobes et segments hépatiques: notes sur l'architecture anatomiques et chirurgicale du foie. *La Presse Medicale*. 62(33), 709–712. ISSN 0032-7867.

COURT, Fiona G, S. A. WEMYSS-HOLDEN, C. P. MORRISON, B. D. TEAGUE, P. E. LAWS, J. KEW, A. R. DENNISON a G. J. MADDERN, 2003. Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy. *BJS (British Journal of Surgery)* [online]. 90(4), 440–444. ISSN 1365-2168. Dostupné z: doi:10.1002/bjs.4053

CROOME, Kristopher P., Shennen A. MAO, Jaime M. GLORIOSO, Murli KRISHNA, Scott L. NYBERG a David M. NAGORNEY, 2015. Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy. *HPB* [online]. 17(12), 1130–1136. ISSN 1365-182X. Dostupné z: doi:10.1111/hpb.12465

DE VRIES, Elisabeth M. G., Joanne VERHEIJ, Stefan G. HUBSCHER, Mariska M. G. LEEFLANG, Kirsten BOONSTRA, Ulrich BEUERS a Cyriel Y. PONSIOEN, 2015. Applicability and prognostic value of histologic scoring systems in primary sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology* [online]. 63(5), 1212–1219. ISSN 1600-0641. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2015.06.008

DENG, Meihong, Robert KLEINERT, Hai HUANG, Qing HE, Fotima MADRAHIMOVA, Olaf DIRSCH a Uta DAHMEN, 2009. Statistical and Economical Efficiency in Assessment of Liver Regeneration Using Defined Sample Size and Selection in Combination With a Fully Automated Image Analysis System: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. [vid. 2020-11-26]. Dostupné z: doi:10.1369/jhc.2009.953869

EBERLOVA, Lada, Vaclav LISKA, Hynek MIRKA, Zbynek TONAR, Stanislav HAVIAR, Milos SVOBODA, Jan BENES, Richard PALEK, Michal EMINGR, Jachym ROSENDORF, Patrik MIK, Sarah LEUPEN a Alois LAMETSCHWANDTNER, 2017. The use of porcine corrosion casts for teaching human anatomy. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* [online]. 213, 69–77. ISSN 0940-9602. Dostupné z: doi:10.1016/j.aanat.2017.05.005

EBERLOVA, Lada, Anna MALECKOVA, Patrik MIK, Zbynek TONAR, Miroslav JIRIK, Hynek MIRKA, Richard PALEK, Sarah LEUPEN a Vaclav LISKA, 2020. Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. *Journal of Surgical Research* [online]. 250, 70–79. ISSN 0022-4804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2019.12.038

EKATAKSIN, W. a K. WAKE, 1991. Liver units in three dimensions: I. organization of argyrophilic connective tissue skeleton in porcine Liver with particular reference to the “compound hepatic lobule”. *American Journal of Anatomy* [online]. 191(2), 113–153. Dostupné z: doi:10.1002/aja.1001910202

ERSTAD, Derek J., Christian T. FARRAR, Sarani GHOSHAL, Ricard MASIA, Diego S. FERREIRA, Yin-Ching Iris CHEN, Ji-Kyung CHOI, Lan WEI, Phillip A. WAGHORN, Nicholas J. ROTILE, Chuantao TU, Katherine A. GRAHAM-O'REGAN, Mozhdah SOJOODI, Shen LI, Yang LI, Guogiang WANG, Kathleen E. COREY, Yat Sun OR, Lijuan JIANG, Kenneth K. TANABE, Peter CARAVAN a Bryan C. FUCHS, 2018. Molecular magnetic resonance imaging accurately measures the antifibrotic effect of EDP-305, a novel farnesoid X receptor agonist. *Hepatology Communications* [online]. 2(7), 821–835. ISSN 2471-254X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/hep4.1193>

FALLOWFIELD, Jonathan A., Annette L. HAYDEN, Victoria K. SNOWDON, Rebecca L. AUCOTT, Ben M. STUTCHFIELD, Damian J. MOLE, Antonella PELLICORO, Timothy T. GORDON-WALKER, Alexander HENKE, Joerg SCHRADER, Palak J. TRIVEDI, Marc PRINCIVALLE, Stuart J. FORBES, Jane E. COLLINS a John P. IREDALE, 2014. Relaxin modulates human and rat hepatic myofibroblast function and ameliorates portal hypertension in vivo. *Hepatology* [online]. 59(4), 1492–1504. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/hep.26627>

GARDELLA, Dean, William J HATTON, Howard B RIND, Glenn D ROSEN a Christopher S VON BARTHELD, 2003. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 124(1), 45–59. ISSN 0165-0270. Dostupné z: doi:[10.1016/S0165-0270\(02\)00363-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00363-1)

GARRIDO, Rosario, Tanja S. ZABKA, Jianhua TAO, Mark FIELDEN, Adrian FRETLAND a Mudher ALBASSAM, 2013. Quantitative Histological Assessment of Xenobiotic-Induced Liver Enzyme Induction and Pituitary-Thyroid Axis Stimulation in Rats Using Whole-Slide Automated Image Analysis: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. [vid. 2020-11-26]. Dostupné z: doi:[10.1369/0022155413482926](https://doi.org/10.1369/0022155413482926)

GHODSIZAD, A., B.N. FAHY, S. WACLAWCZYK, S. LIEDTKE, J.M. GONZALEZ BERJON, R. BARRIOS, A. MEHRABI, M. KARCK, A. RUHPARWAR a G. KÖGLER, 2012. Portal application of human unrestricted somatic stem cells to support hepatic regeneration after portal embolization and tumor surgery. *ASAIO Journal* [online]. 58(3), 255–261. Dostupné z: doi:[10.1097/MAT.0b013e31824cc922](https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31824cc922)

GOODMAN, Zachary D., 2007. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology* [online]. 47(4), 598–607. ISSN 0168-8278. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jhep.2007.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006)

GRGUREVIC, Lovorka, Igor ERJAVEC, Ivica GRGUREVIC, Ivo DUMIC-CULE, Jelena BRKLJACIC, Donatella VERBANAC, Mario MATIJASIC, Hana Cipcic PALJETAK, Rudjer NOVAK, Mihovil PLECKO, Jadranka

BUBIC-SPOLJAR, Dunja ROGIC, Vera KUFNER, Martina PAUK, Tatjana BORDUKALO-NIKSIC a Slobodan VUKICEVIC, 2017. Systemic inhibition of BMP1-3 decreases progression of CCl4-induced liver fibrosis in rats. *Growth Factors* [online]. 35(6), 201–215. ISSN 0897-7194. Dostupné z: doi:10.1080/08977194.2018.1428966

GUNDERSEN, H. J., 1988. The nucleator. *Journal of Microscopy* [online]. 151(Pt 1), 3–21. ISSN 0022-2720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.1988.tb04609.x

HAGA, Sanae, Wataru OGAWA, Hiroshi INOUE, Keita TERUI, Tetsuya OGINO, Rumi IGARASHI, Kiyoshi TAKEDA, Shizuo AKIRA, Shin ENOSAWA, Hiroyuki FURUKAWA, Satoru TODO a Michitaka OZAKI, 2005. Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *Journal of Hepatology* [online]. 43(5), 799–807. ISSN 0168-8278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2005.03.027

HAMMAD, Seddik, Stefan HOEHME, Adrian FRIEBEL, Iris VON RECKLINGHAUSEN, Amnah OTHMAN, Brigitte BEGHER-TIBBE, Raymond REIF, Patricio GODOY, Tim JOHANN, Amruta VARTAK, Klaus GOLKA, Petru O. BUCUR, Eric VIBERT, Rosemarie MARCHAN, Bruno CHRIST, Steven DOOLEY, Christoph MEYER, Iryna ILKAVETS, Uta DAHMEN, Olaf DIRSCH, Jan BÖTTGER, Rolf GEBHARDT, Dirk DRASDO a Jan G. HENGSTLER, 2014. Protocols for staining of bile canalicular and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis. *Archives of Toxicology* [online]. 88(5), 1161–1183. ISSN 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-014-1243-5

HOY, Anna M., Natasha MCDONALD, Ross J. LENNEN, Matteo MILANESI, Amy H. HERLIHY, Timothy J. KENDALL, William MUNGALL, Michael GYNGELL, Rajarshi BANERJEE, Robert L. JANICZEK, Philip S. MURPHY, Maurits A. JANSEN a Jonathan A. FALLOWFIELD, 2018. Non-invasive assessment of liver disease in rats using multiparametric magnetic resonance imaging: a feasibility study. *Biology Open* [online]. 7(7) [vid. 2021-02-19]. ISSN 2046-6390. Dostupné z: doi:10.1242/bio.033910

HU, C., A. CHEANG, L. RETNAM a E. H. YAP, 1993. A simple technique for blood collection in the pig. *Laboratory Animals* [online]. 27(4), 364–367. ISSN 0023-6772. Dostupné z: doi:10.1258/002367793780745606

HUANG, Ping, Minyu ZHOU, Shaoyun CHENG, Yue HU, Minzhao GAO, Yubin MA, Yanin LIMPANONT, Hongli ZHOU, Paron DEKUMYOY, Yixin CHENG a Zhiyue LV, 2020. Myricetin Possesses Anthelmintic Activity and Attenuates Hepatic Fibrosis via Modulating TGFβ1 and Akt Signaling and Shifting Th1/Th2 Balance in *Schistosoma japonicum*-Infected Mice. *Frontiers in*

Immunology [online]. 11 [vid. 2021-02-11]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.00593

HUBERT, M. B., I. SALAZKIN, J. DESJARDINS a G. BLAISE, 2003. Cardiopulmonary bypass surgery in swine: a research model. *Journal of Experimental Animal Science* [online]. 42(3), 135–149. ISSN 0939-8600. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-8600(03)80007-X

HUNG, Kung-Sheng, Tsung-Hsing LEE, Wen-Ying CHOU, Chia-Ling WU, Chung-Lung CHO, Cheng-Nan LU, Bruno JAWAN a Cheng-Haung WANG, 2005. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 336(1), 324–331. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.085

CHEN, Xiao-li, Tian-wu CHEN, Xiao-ming ZHANG, Zhen-lin LI, Hang LI, Nan-lin ZENG, Hong-jie TANG, Yu PU, Nan CHEN, Qi YANG, Li LI, Xian-yong XIE a Jiani HU, 2013. Spleen magnetic resonance diffusion-weighted imaging for quantitative staging hepatic fibrosis in miniature pigs: An initial study. *Hepatology Research* [online]. 43(11), 1231–1240. ISSN 1872-034X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/hepr.12076

CHEN, Xiaoxiao, Yawen ZHANG, Pengfei ZHAO, Yan CHEN, Yunli ZHOU, Shenghao WANG a Lina YIN, 2020. Preparation and evaluation of PEGylated asiatic acid nanostructured lipid carriers on anti-fibrosis effects. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 46(1), 57–69. ISSN 0363-9045, 1520-5762. Dostupné z: doi:10.1080/03639045.2019.1701002

CHOW, Shein-Chung, Hansheng WANG a Jun SHAO, 2007. *Sample Size Calculations in Clinical Research* [online]. 2. vyd. New York: Chapman and Hall/CRC [vid. 2021-05-27]. ISBN 978-0-429-14463-9. Dostupné z: doi:10.1201/9781584889830

ISHAK, K., A. BAPTISTA, L. BIANCHI, F. CALLEA, J. DE GROOTE, F. GUDAT, H. DENK, V. DESMET, G. KORB a R. N. MACSWEEN, 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*. 22(6), 696–699. ISSN 0168-8278.

JACK, Elspeth M., Philip BENTLEY, Françoise BIERI, Samar F. MUAKKASSAH-KELLY, Willy STÄUBLI, Joseph SUTER, Felix WAECHTER a Luis M. CRUZ-ORIVE, 1990. Increase in hepatocyte and nuclear volume and decrease in the population of binucleated cells in preneoplastic foci of rat liver: A stereological study using the nucleator method. *Hepatology* [online]. 11(2), 286–297. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:10.1002/hep.1840110220

JIRIK, M., J. KUNES a M. ZELEZNY, 2016. Structure of organic compounds semantic quantitative evaluation of micro-CT data. *Pattern Recognition and*

Image Analysis [online]. 26(1), 144–149. ISSN 1555-6212. Dostupné z: doi:10.1134/S1054661816010119

JIRÍK, M., nedatováno. LISA (Liver Surgery Analyser). lisa [online] [vid. 2020-12-12]. Dostupné z: <http://mjirik.github.io/lisa/>

JUNATAS, Khan L., Zbyněk TONAR, Tereza KUBÍKOVÁ, Václav LIŠKA, Richard PÁLEK, Patrik MIK, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Kirsti WITTER, 2017. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. Journal of Anatomy [online]. 230(4), 575–588. ISSN 1469-7580. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12585

KARBALAY-DOUST, Saied a Ali NOORAFSHAN, 2009. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the mouse liver. Micron [online]. 40(4), 471–475. ISSN 0968-4328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2008.12.006

KÖNIG, H. E. a H. G. LIEBICH, 2002. Anatomia domácich cicavcov 2 / Anatomie domácích savců 2 [online]. Bratislava: Hajko a Hajková [vid. 2020-12-14]. Dostupné z: <https://www.martinus.cz/?uItem=119643>

LIŠKA, Václav, ed., 2016. Experimental Surgery [online]. Plzeň: Nava Publishing [vid. 2020-12-14]. Dostupné z: <https://knihy.abz.cz/prodej/experimental-surgery>

MADHAN, K. E. a S. RAJU, 2014. Comparative histology of human and cow, goat and sheep liver. Journal of Surgical Academia. 4(1), 10–13. ISSN 2231-7481.

MAK, Ki M., Lucy L. CHEN a Ting-Fang LEE, 2013. Codistribution of Collagen Type IV and Laminin in Liver Fibrosis of Elderly Cadavers: Immunohistochemical Marker of Perisinusoidal Basement Membrane Formation. The Anatomical Record [online]. 296(6), 953–964. ISSN 1932-8494. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/ar.22694>

MAK, Ki M., Edward CHU, K.H. Vincent LAU a Allison J. KWONG, 2012. Liver Fibrosis in Elderly Cadavers: Localization of Collagen Types I, III, and IV, α -Smooth Muscle Actin, and Elastic Fibers. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology [online]. 295(7), 1159–1167. ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.22504

MALEČKOVÁ, A., Z. TONAR, P. MIK, K. MICHALOVÁ, V. LIŠKA, R. PÁLEK, J. ROSENDORF, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. TŘEŠKA, 2019. Animal models of liver diseases and their application in experimental surgery. Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti. 98(3), 100–109. ISSN 0035-9351.

MALEČKOVÁ, Anna, Petra KOCHOVA, Richard PÁLEK, Václav LIŠKA, Patrik MIK, Tomasz BOŃKOWSKI, Miroslav HORÁK a Zbyněk TONAR, 2021. Blunt injury of liver – mechanical response of porcine liver in experimental

impact test. *Physiological Measurement* [online]. [vid. 2021-02-24]. ISSN 0967-3334. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6579/abdf3c

MARCOS, Ricardo, Bruno BRAGANÇA a Ana Patrícia FONTES-SOUSA, 2015. Image Analysis or Stereology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* [online]. 63(9), 734–736. ISSN 0022-1554. Dostupné z: doi:10.1369/0022155415592180

MARCOS, Ricardo a Carla CORREIA-GOMES, 2015. Liver and gender: Are there differences in fibrous tissue before the onset of fibrosis? *Hepatology* [online]. 61(3), 1093–1094. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/hep.27336

MARCOS, Ricardo a Carla CORREIA-GOMES, 2016. Long live the liver: immunohistochemical and stereological study of hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatic stellate cells of male and female rats throughout ageing. *Cell and Tissue Research* [online]. 366(3), 639–649. ISSN 1432-0878. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-016-2490-y

MARCOS, Ricardo, Célia LOPES, Fernanda MALHÃO, Carla CORREIA-GOMES, Sónia FONSECA, Margarida LIMA, Rolf GEBHARDT a Eduardo ROCHA, 2016. Stereological assessment of sexual dimorphism in the rat liver reveals differences in hepatocytes and Kupffer cells but not hepatic stellate cells. *Journal of Anatomy* [online]. 228(6), 996. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12448

MARCOS, Ricardo, Rogério A. F. MONTEIRO a Eduardo ROCHA, 2007. Determination of hepatocellularity number in the rat. *Toxicology in Vitro* [online]. 21(8), 1692–1693. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2007.09.006

MARCOS, Ricardo, Rogério AF MONTEIRO a Eduardo ROCHA, 2012. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of Anatomy* [online]. 220(4), 303–317. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01475.x

MASUBUCHI, Shinsuke, Shinji TAKAI, Denan JIN, Keitaro TASHIRO, Koji KOMEDA, Zhong-Lian LI, Yoshinori OTSUKI, Haruki OKAMURA, Michihiro HAYASHI a Kazuhisa UCHIYAMA, 2013. Chymase inhibitor ameliorates hepatic steatosis and fibrosis on established non-alcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet. *Hepatology Research* [online]. 43(9), 970–978. ISSN 1872-034X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/hepr.12042

MIK, P., Z. TONAR, A. MALEČKOVÁ, L. EBERLOVÁ, V. LIŠKA, R. PÁLEK, J. ROSENDORF, M. JIŘÍK, H. MÍRKA, M. KRÁLÍČKOVÁ a K. WITTER, 2018. Distribution of Connective Tissue in the Male and Female Porcine Liver: Histological Mapping and Recommendations for Sampling.

Journal of Comparative Pathology [online]. 162, 1–13. ISSN 0021-9975. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcpa.2018.05.004

MIYAOKA, Yuichiro, Kazuki EBATO, Hidenori KATO, Satoko ARAKAWA, Shigeomi SHIMIZU a Atsushi MIYAJIMA, 2012. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. *Current Biology* [online]. 22(13), 1166–1175. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2012.05.016

MOUDI, Bitu, Zahra HEIDARI a Hamidreza MAHMOUDZADEH-SAGHEB, 2018. Study of liver in HBV-related hepatocellular carcinoma: Stereology shows quantitative differences in liver structure. *European Journal of Histochemistry : EJH* [online]. 62(3) [vid. 2021-02-22]. ISSN 1121-760X. Dostupné z: doi:10.4081/ejh.2018.2950

MOUTON, Peter R., 2011. *Unbiased Stereology: A Concise Guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. ISBN 978-0-8018-9985-0.

MÜHLFELD, Christian, Jens Randel NYENGAARD a Terry M. MAYHEW, 2010. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovascular Pathology* [online]. 19(2), 65–82. ISSN 1054-8807. Dostupné z: doi:10.1016/j.carpath.2008.10.015

NEVES, Renata Heisler, Alba Cristina Miranda de Barros ALENCAR, Marcia Barbosa AGUILA, Carlos Alberto MANDARIM-DE-LACERDA, José Roberto MACHADO-SILVA a Delir Corrêa GOMES, 2006. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 101, 253–260. ISSN 0074-0276. Dostupné z: doi:10.1590/S0074-02762006000900039

NYENGAARD, J. R. a H. J. G. GUNDERSEN, 2006. Sampling for stereology in lungs. *European Respiratory Review* [online]. 15(101), 107–114. ISSN 0905-9180, 1600-0617. Dostupné z: doi:10.1183/09059180.00010101

PÁLEK, R., V. LIŠKA, L. EBERLOVÁ, H. MÍRKA, M. SVOBODA, S. HAVIAR, M. EMINGR, O. BRZOŇ, P. MIK a V. TŘEŠKA, 2018. [Experimental processing of corrosion casts of large animal organs]. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 97(5), 222–228. ISSN 0035-9351.

PEINADO, Angeles, Pilar VILDA, Adoración QUESADA, Manuel MARTINEZ a Antonio RIOS, 1990. Binucleated hepatocyte subpopulations in male and female rats fed with olive and sunflower oils. *Acta Stereologica* [online]. 9(1) [vid. 2021-05-26]. ISSN 0351-580X. Dostupné z: <https://popups.uliege.be/0351-580x/index.php?id=2658>

QIU, Rong, Soichiro MURATA, Katsutomo OSHIRO, Yumi HATADA a Hideki TANIGUCHI, 2020. Transplantation of fetal liver tissue coated by ultra-

purified alginate gel over liver improves hepatic function in the cirrhosis rat model. *Scientific Reports* [online]. 10(1), 8231. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-65069-y

RIBITSCH, Iris, Pedro M. BAPTISTA, Anna LANGE-CONSIGLIO, Luca MELOTTI, Marco PATRUNO, Florian JENNER, Eva SCHNABL-FEICHTER, Luke C. DUTTON, David J. CONNOLLY, Frank G. VAN STEENBEEK, Jayesh DUDHIA a Louis C. PENNING, 2020. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 8 [vid. 2020-11-18]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00972

ROHR, H. P., J. LÜTHY, F. GUDAT, M. OBERHOLZER, C. GYSIN a L. BIANCHI, 1976. Stereology of liver biopsies from healthy volunteers. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histology* [online]. 371(3), 251–263. ISSN 0340-1227. Dostupné z: doi:10.1007/BF00433072

ROMEIS, Benno, 1989. *Mikroskopische Technik*. 16. vyd. Munich: Urban und Schwarzenberg. ISBN 978-3-486-77703-1.

SAKHUJA, Puja, 2014. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World Journal of Gastroenterology* [online]. 20(44), 16474–16479. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v20.i44.16474

SARR, Ousseynou, Alexandra BLAKE, Jennifer A. THOMPSON, Lin ZHAO, Katherine RABICKI, Joanna C. WALSH, Ian WELCH a Timothy R. H. REGNAULT, 2016. The differential effects of low birth weight and Western diet consumption upon early life hepatic fibrosis development in guinea pig. *The Journal of Physiology* [online]. 594(6), 1753–1772. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1113/JP271777

SATO, Masatoshi, Hideharu TODA, Hisashi AOMORI, Tsuyoshi OTAKE a Mamoru TANAKA, 2016. Image Segmentation Using Graph Cuts Based on Maximum-Flow Neural Network. In: Akira HIROSE, Seiichi OZAWA, Kenji DOYA, Kazushi IKEDA, Minhoo LEE a Derong LIU, ed. *Neural Information Processing* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 403–412. *Lecture Notes in Computer Science*. ISBN 978-3-319-46687-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-46687-3_45

SAXENA, Romil, 2011. *Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach*. B.m.: Elsevier/Saunders. ISBN 978-0-443-06803-4.

SAXENA, Romil, Neil D. THEISE a James M. CRAWFORD, 1999. Microanatomy of the human liver—exploring the hidden interfaces. *Hepatology* [online]. 30(6), 1339–1346. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:10.1002/hep.510300607

SERNA-SALAS, Sandra Alejandra, Yesenia Danyeli NAVARRO-GONZÁLEZ, Sandra Luz MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, Luis Fernando BARBA-GALLARDO, Esperanza SÁNCHEZ-ALEMÁN, Liseth Rubí ALDABA-MURUATO, José Roberto MACÍAS-PÉREZ, Javier VENTURA-JUÁREZ a Martin Humberto MUÑOZ-ORTEGA, 2018. Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *BioMed Research International* [online]. 2018 [vid. 2021-02-08]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2018/4706976

SCHEUER, P. J., 1991. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology*. 13(3), 372–374. ISSN 0168-8278.

SOBREVALS, Luciano, Mónica ENGUITA, Jorge QUIROGA, Jesús PRIETO a Puri FORTES, 2016. Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Expressed from an AAV1 Vector Leads to a Complete Reversion of Liver Cirrhosis in Rats. *PLOS ONE* [online]. 11(9), e0162955. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0162955

SOHLENIUS-STERNBECK, Anna-Karin, 2006. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. *Toxicology in Vitro* [online]. 20(8), 1582–1586. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2006.06.003

STANDISH, R. A., E. CHOLONGITAS, A. DHILLON, A. K. BURROUGHS a A. P. DHILLON, 2006. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* [online]. 55(4), 569–578. ISSN 0017-5749, 1468-3288. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2005.084475

STEGEMANN, Jan P., Santosh RAINA, Donald T. NICHOLSON, Pedro JIMENEZ, Lisa SHAH, Shawn CAIN, Barbara CHANDLER, Zorina PITKIN, Claudy MULLON a Linda CUSTER, 2000. Comparison of Analytical Methods for Quantitation of Isolated Porcine Hepatocyte Yields. *Tissue Engineering* [online]. 6(3), 253–264. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/10763270050044434

VON BARTHELD, Christopher S., 2012. Distribution of Particles in the Z-axis of Tissue Sections: Relevance for Counting Methods. *NeuroQuantology: an interdisciplinary journal of neuroscience and quantum physics*. 10(1), 66–75. ISSN 1303-5150.

VRTKOVÁ, I., 2015. Genetic admixture analysis in Prestice Black-Pied pigs. *Archives Animal Breeding* [online]. 58(1), 115–121. ISSN 0003-9438. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.5194/aab-58-115-2015

WANG, Yong, Bin XIONG, Bin LIANG, Hui ZHAO, Hui LI, Jun QIAN, Hui-Min LIANG, Gan-Sheng FENG a Chuan-Sheng ZHENG, 2013. Hepatic Parenchymal Changes following Transcatheter Embolization and

- Chemoembolization in a Rabbit Tumor Model. PLoS ONE [online]. 8(8) [vid. 2021-02-03]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0070757
- WATANABE, T. a Y. TANAKA, 1982. Age-related alterations in the size of human hepatocytes. A study of mononuclear and binucleate cells. Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology [online]. 39(1), 9–20. ISSN 0340-6075. Dostupné z: doi:10.1007/BF02892832
- WITTER, Kirsti, 2017. Osobní sdělení.
- WORKING SUBGROUP (ENGLISH VERSION) FOR CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS, 2014. Guidelines for the management of primary biliary cirrhosis: The Intractable Hepatobiliary Disease Study Group supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology [online]. 44 Suppl S1, 71–90. ISSN 1386-6346. Dostupné z: doi:10.1111/hepr.12270
- YANG, Jing-Jing, Yang YANG, Chong ZHANG, Jun LI a Yan YANG, 2020. Epigenetic silencing of LncRNA ANRIL enhances liver fibrosis and HSC activation through activating AMPK pathway. Journal of Cellular and Molecular Medicine [online]. 24(4), 2677–2687. ISSN 1582-4934. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/jcmm.14987
- YANG, Ju Dong, Manal F. ABDELMALEK, Herbert PANG, Cynthia D. GUY, Alastair D. SMITH, Anna Mae DIEHL a Ayako SUZUKI, 2014. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology [online]. 59(4), 1406–1414. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/hep.26761
- YARPUZLU, Berkay, Mehmet AYYILDIZ, Olgu Enis TOK, Ranan Gulhan AKTAS a Cagatay BASDOGAN, 2014. Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials [online]. 29, 403–416. ISSN 1751-6161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2013.09.016
- ZHAO, Huajie, Huaping LI, Yanbo FENG, Yiwen ZHANG, Fangfang YUAN, Jianjun ZHANG, Haixia REN a Le JIA, 2019. Mycelium Polysaccharides from Termitomyces albuminosus Attenuate CCl4-Induced Chronic Liver Injury Via Inhibiting TGFβ1/Smad3 and NF-κB Signal Pathways. International Journal of Molecular Sciences [online]. 20(19), 4872. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20194872
- ZHOU, Zhou, Ming-Jiang XU a Bin GAO, 2016. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. Cellular & Molecular Immunology [online]. 13(3), 301–315. ISSN 2042-0226. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2015.97

ZOU, Wei-Long, Zhen YANG, Yun-Jin ZANG, Dong-Jian LI, Zhi-Peng LIANG a Zhong-Yang SHEN, 2007. Inhibitory effects of prostaglandin E1 on activation of hepatic stellate cells in rabbits with schistosomiasis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT.* 6(2), 176–181. ISSN 1499-3872.

9 Publikace autora

EBERLOVA, Lada, Vaclav LISKA, Hynek MIRKA, Zbynek TONAR, Stanislav HAVIAR, Milos SVOBODA, Jan BENES, Richard PALEK, Michal EMINGR, Jachym ROSENDORF, Patrik **MIK**, Sarah LEUPEN a Alois LAMETSCHWANDTNER, 2017. The use of porcine corrosion casts for teaching human anatomy. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* [online]. 213, 69–77. ISSN 0940-9602. Dostupné z: doi:10.1016/j.aanat.2017.05.005. **IF**₂₀₁₆=**1,864**, **Q1**(Anatomy & Morphology).

EBERLOVA, Lada, Anna MALECKOVA, Patrik **MIK**, Zbynek TONAR, Miroslav JIRIK, Hynek MIRKA, Richard PALEK, Sarah LEUPEN a Vaclav LISKA, 2020. Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. *Journal of Surgical Research* [online]. 250, 70–79. ISSN 0022-4804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2019.12.038. **IF**₂₀₁₉=**1,841**, **Q3**(Surgery).

JUNATAS, Khan L., Zbyněk TONAR, Tereza KUBÍKOVÁ, Václav LIŠKA, Richard PÁLEK, Patrik **MIK**, Milena KRÁLÍČKOVÁ a Kirsti WITTER, 2017. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. *Journal of Anatomy* [online]. 230(4), 575–588. ISSN 1469-7580. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12585. **IF**₂₀₁₇=**2,182**, **Q1**(Anatomy & Morphology).

MALEČKOVÁ, A., Z. TONAR, P. **MIK**, K. MICHALOVÁ, V. LIŠKA, R. PÁLEK, J. ROSENDORF, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. TŘEŠKA, 2019. Animal models of liver diseases and their application in experimental surgery. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti.* 98(3), 100–109. ISSN 0035-9351. Bez IF.

MALEČKOVÁ, Anna, Petra KOCHOVA, Richard PÁLEK, Václav LIŠKA, Patrik **MIK**, Tomasz BOŃKOWSKI, Miroslav HORÁK a Zbyněk TONAR, 2021. Blunt injury of liver – mechanical response of porcine liver in experimental impact test. *Physiological Measurement* [online]. [vid. 2021-02-24]. ISSN 0967-3334. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6579/abdf3c. **IF**₂₀₂₀=**2,833**, **Q2**(Biomedical, Engineering).

MIK, Patrik, D. SOSNA a P. GALETA, 2016. Zhodnocení možností odhadu pohlaví autorů paleolitických nástěnných maleb z otisků ruky. *Archeologické rozhledy.* 68(1), 3–18. Bez IF.

MIK, P., Z. TONAR, A. MALEČKOVÁ, L. EBERLOVÁ, V. LIŠKA, R. PÁLEK, J. ROSENDORF, M. JIŘÍK, H. MÍRKA, M. KRÁLÍČKOVÁ a K.

WITTER, 2018. Distribution of Connective Tissue in the Male and Female Porcine Liver: Histological Mapping and Recommendations for Sampling. *Journal of Comparative Pathology* [online]. 162, 1–13. ISSN 0021-9975. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcpa.2018.05.004 **IF**₂₀₁₇=**1,364**, **Q2**(*Veterinary sciences*).

PÁLEK, R., V. LIŠKA, L. EBERLOVÁ, H. MÍRKA, M. SVOBODA, S. HAVIAR, M. EMINGR, O. BRZOŇ, P. **MIK** a V. TŘEŠKA, 2018. Experimental processing of corrosion casts of large animal organs. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 97(5), 222–228. ISSN 0035-9351. Bez IF.

PALEK, Richard, Alena JONASOVA, Jachym ROSENDORF, Patrik **MIK**, Kristyna BAJCUROVA, Petr HOSEK, Vladimira MOULISOVA, Lada EBERLOVA, Lenka HAIDINGEROVA, Ondrej BRZON, Lukas BEDNAR, Tomas KRIZ, Martin DOLANSKY, Vladislav TRESKA, Zbynek TONAR, Jan VIMMR a Vaclav LISKA, 2019. Allogeneic Venous Grafts of Different Origin Used for Portal Vein Reconstruction After Pancreaticoduodenectomy - Experimental Study. *Anticancer Research* [online]. 39(12), 6603–6620. ISSN 1791-7530. Dostupné z: doi:10.21873/anticanres.13876. **IF**₂₀₁₈=**1,935**, **Q4**(*Oncology*)

10 Životopis autora

Příjmení, jméno, titul: Patrik Mik, Mgr., Bc.

Adresa: Do Kopce 9/3, 32600 Plzeň, ČR

Datum narození: 7. 12. 1987



Vzdělání

- | | |
|---------------|--|
| od října 2016 | Ph.D., Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni
Anatomie jater prasete domácího jako modelového orgánu v biomedicíně |
| září 2014 | Mgr., Západočeská univerzita, Plzeň
Vztah délky ruky a kostí ruky: využití v odhadu pohlaví z otisků ruky u paleolitických umělců |
| červen 2013 | Bc., Západočeská univerzita, Plzeň
Guerrilla Gardening jako fomra prostorové sociální rezistence |
| září 2012 | Bc., Západočeská univerzita, Plzeň
Otázka protonacionalismu v raně novověkých Čechách |

Zahraníční stáž

- duben 2018 Department of Anatomy and Embryology, Ghent University, prof. D'Herde.
- červenec 2013 INTER-16 Freemovers Program Scholarship (University of Louisville), terénní výzkum v jeskyni Lapa do Picareiro, Minde, Portugalsko

Grantové projekty

- 2017–2018 Hlavní řešitel: Morfologická variabilita a kvantitativní zastoupení vaziva v játrech prasete domácího, Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt č. 1206417
- 2018–2022 Spoluřešitel: Aplikace moderních technologií v medicíně a průmyslu, Evropský fond pro regionální rozvoj, reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280
- 2018–2022 Spoluřešitel: Centrum výzkumu infekčních onemocnění (Excelentní výzkum), Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR, financovaného z Evropského Fondu pro Regionální Rozvoj, projekt č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787

Konference

21. 5. 2019 59. Studentská vědecká konference LF v Plzni. Příspěvek Segmentace prasečích jater v software LISA
27. 6. 2018 Stereology, Spatial Statistics and Stochastic Geometry, Praha. Příspěvek: Connective tissue in porcine liver
30. 5. 2018 2. místo na 58. Studentské vědecké konferenci LF v Plzni. Příspěvek: Pohlavní rozdíly v distribuci vaziva v játrech prasete domácího
11. 9. 2017 9th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, Innsbruck. Příspěvek: Sampling desing for experimental surgery studies in porcine liver.
17. 5. 2017 2. místo na 57. Studentské vědecké konferenci LF v Plzni. Příspěvek: Mapování rozložení jaterního vaziva u prasete domácího
23. 10. 2014 10. mezinárodní studentská vědecká konference Antropowebu, Plzeň. Příspěvek: Odhad pohlaví tvůrců/tvůrkyň paleolitických nástěnných maleb z otisků ruky: mezioborové setkání.