

**Univerzita Karlova v Praze**

**1.lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Morfologické a funkční změny kapilárního řečiště a endomysia v lidském atriálním myokardu při fibrilaci  
síní

MUDr. Natalia Smorodínova

2023

Doktorské studijní programy v biomedicině  
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Tomáš Kučera, PhD.

Školící pracoviště: Ústav histologie a embryologie 1. LF UK v Praze

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Kučera, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## **Obsah**

<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>8</b>
3.1 <i>Pacienti</i> .....	8
3.2 <i>Odběr vzorků tkáně</i> .....	8
3.3 <i>Histologické barvení</i> .....	9
3.4 <i>Imunohistochemické značení</i> .....	9
3.5 <i>Imunofluorescenční značení</i> .....	10
3.6 <i>Histomorfometrie</i> .....	10
3.7 <i>Statistická analýza</i> .....	11
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>11</b>
4.1 <i>Kolagen I a kolagen III v síňovém myokardu</i> .....	11
4.2 <i>Elastin v síňovém myokardu</i> .....	12
4.3 <i>VEGF v síňovém myokardu</i> .....	12
4.4 <i>Mikrovaskulární denzita v síňovém myokardu</i> .....	12
4.5 <i>Pericytové pokrytí síňových kapilár</i> .....	12
4.6 <i>Detekce a kvantifikace CD45+ buněk v síňovém myokardu</i> .....	12
4.7 <i>CD3-pozitivní T-lymfocyty v síňovém myokardu</i> .....	13
4.8 <i>CD68-KP1-pozitivní buňky v síňovém myokardu</i> .....	13
4.9 <i>DC-SIGN- pozitivní dendritické buňky, žírné buňky a B-lymfocyty v síňovém myokardu</i> .....	14
4.10 <i>Kolagenová histomorfometrie</i> .....	14
4.11 <i>Imunohistochemická analýza exprese TGF-<math>\beta</math> a CTG</i> .....	14
<b>5. Diskuse</b> .....	<b>15</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>19</b>
<b>7. Použitá literatura</b> .....	<b>20</b>
<b>8. Seznam publikací doktoranda</b> .....	<b>25</b>

## 1. Abstrakt

Tato disertační práce byla zaměřena na morfologické a funkční změny kapilárního řečiště a endomysia v lidském atriálním myokardu při fibrilaci síní. Fibrilace síní (FS) je jednou z nejčastějších arytmií, se kterou se setkáváme v klinické praxi, je spojena se zvýšeným rizikem úmrtnosti a silně souvisí se stářím. Její patogenese stále není dostatečně prozkoumána. Jeden ze známých faktorů přispívajících k udržení FS je strukturální přestavba myokardu. Strukturální remodelace se projevuje jednak změnami samotných síňových kardiomyocytů, ale také změnami v endomysiu.

Studovali jsme síňové biopsie získané od pacientů kteří podstoupili aorto-koronární bypass nebo operaci mitrální chlopně. Pacienti měli pravidelný sinusový rytmus nebo fibrilaci síní. Imunohistochemie byla použita k vizualizaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, aktinu hladkého svalstva a VEGF ve vzorcích síní. Pro detekci kapilár byl použit UEA-lektin. Pro detekci různých typů imunitních buněk byly imunohistochemicky detekovány následující markery: CD45 jako marker panleukocytů, CD3 pro T-lymfocyty, CD68 pro monocyty/makrofágy, tryptáza z žírných buněk pro žírné buňky a DC-SIGN pro nezralé dendritické buňky.

Naše výsledky dokumentují, že u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci lze nalézt variabilní hladinu ECM proteinů, ale množství kolagenu I, kolagenu III a elastinu se neliší, když je skupina pacientů rozdělena na základě přítomnosti fibrilace síní nebo sinusového rytmu. Objemová frakce elastinu je vyšší v pravé síni ve srovnání s levou, což může odrážet odlišnou biomechaniku nebo embryonální původ. VEGF je přítomen v myokardu pacientů, ale jeho množství není závislé na srdečním rytmu. Většina síňových kapilár je spojena s pericyty, ale podobně jako u mikrovaskulární hustoty jsme nepozorovali změny během fibrilace síní nebo při porovnávání levé a pravé síně. CD45+ buňky jsou heterogenní buněčná populace v síňovém myokardu u pacientů podstupujících otevřenou operaci srdce a tyto buňky mohou být detekovány bez ohledu na srdeční rytmus. Vyšší frekvence CD45+ leukocytů s prodlouženými výběžky ve vzorcích AF naznačuje aktivaci zánětlivých buněk při této arytmií.

**Klíčová slova:** fibrilace síní, myokard, endomysium, kolagen, fibróza

## 2. Abstract

This doctoral thesis was focused on morphological and functional changes in microvasculature and endomysium in human atrial myocardium with atrial fibrillation. Atrial fibrillation (AF) is one of the most common arrhythmias in the clinical practice and it is associated with an increase in mortality risk that is strongly related with old age. Its pathogenesis is still not sufficiently explored. One of the generally recognized factors contributing to the initiation and maintenance of atrial fibrillation is structural remodeling of the myocardium. Structural remodeling is reflected by changes that affect both atrial cardiomyocytes as well as endomysium.

We analyzed atrial biopsies obtained from patients undergoing bypass or mitral valve surgery. The patients had a regular sinus rhythm or were suffering from AF. Immunohistochemistry was used to visualize collagen I, collagen III, elastin, desmin, smooth muscle actin and VEGF in the atrial samples. To detect capillaries UEA-lectin was used. For detection of different types of immune cells the following markers were detected immunohistochemically: CD45 as a pan-leukocyte marker, CD3 for T-lymphocytes, CD68 for monocyte/macrophages, mast cell tryptase for mast cells and DC-SIGN for immature dendritic cells.

Our results document that in patients undergoing open heart surgery variable level of ECM proteins can be found but the amount of collagen I, collagen III and elastin do not differ when the patient group is divided based on the presence of atrial fibrillation or sinus rhythm. Elastin volume fraction is higher in the right atrium compared to the left possibly reflecting different biomechanics or embryonic origin. VEGF is present in myocardia of patients but its amount is not dependent on the heart rhythm. Most of atrial capillaries are associated with pericytes but similar to microvascular density we did not observe changes during atrial fibrillation or when left and right atrium was compared. CD45<sup>+</sup> cells are a heterogeneous cell population in atrial myocardium from patients undergoing open heart surgery and these cells can be detected regardless of the heart rhythm. The finding of higher frequency of CD45<sup>+</sup> leukocytes with elongated processes in the AF samples suggests the activation of inflammatory cells in this arrhythmia.

**Key words:** atrial fibrillation, myocardium, endomysium, collagen, fibrosis

### 3. Úvod

Fibrilace síní (FS) je supraventrikulární arytmie, charakterizovaná rychlou, nekoordinovanou akcí síní. Jako fibrilace síní se označují epizody trvající minimálně 30 sekund (Čichák 2016; Šmíd and Rokyta 2017).

Mortalita pacientů s fibrilací síní je přibližně 2x vyšší než u pacientů se sinusovým rytmem. V evropské populační studii (Rotterdam study) byla celková incidence fibrilace síní 9,9 případů na 1000 obyvatel za rok. U většiny pacientů fibrilace síní vzniká jako důsledek souběžně působících mnohočetných faktorů. U další skupiny pacientů je možné zaznamenat genetickou predispozici, kardiochirurgický výkon, obezitu, užívání alkoholu, spánkovou apnoe a diabetes mellitus (DM). U pacientu s fibrilací síní byly nalezeny strukturální změny v myokardu síní, které byly charakterizované ztrátou masы svalové tkáně spolu s fibrotickými změnami souvisejícími s dilatací síní. Tyto změny ve struktuře stěny síní pak udržují FS a FS přechází do permanentní formy (Lukl 2009). Mechanismus vzniku FS je multifaktoriální a komplexní. Vyvolávajícím faktorem FS jsou ložiska ektopické aktivity vedoucí ke vzniku reentry okruhu. Vznik, vývoj i vlastnosti spouštěcího zdroje a substrátu ovlivňují četné faktory (Chen et al. 2006). Pod vlivem neustálých ektopických impulzů dochází k remodelaci síní, a to na elektrické, kontraktilní i strukturální úrovni (Allessie, Ausma, and Schotten 2002). Při elektrické remodelaci probíhají změny v intervalu minut a při strukturální remodelaci - dny a měsíce. Strukturální a elektrofyziologické vlastnosti kardiomyocytů se navíc mění s rostoucím věkem a při různých kardiovaskulárních i jiných onemocněních.

Patologickou změnou, která nejčastěji provází vznik atriální fibrilace, je fibrotizace síní a ztráta kontraktilní svaloviny. Vazivo oddělující kardiomyocyty vede k nehomogennímu vedení vzruchu v síních (Táborský 2013). Kromě fibrotizace myokardu dochází i ke změnám v důsledku poruch šíření impulzů mezi kardiomyocyty, a také k částečnému bloku mezibuněčného spojení umožňujícího vznik a udržení AF. Remodelace struktury síní a elektrická remodelace jsou dva důležité rysy AF, které mohou vést ke vzniku a perzistenci fibrilace. Aktivované fibroblasty jsou centrální buněčné efekторы fibrózy myokardu, které slouží jako hlavní buňky produkující ECM. Přeměna fibroblastů na sekreční, matrix produkující a kontraktilní buňky, nazývané myofibroblasty, je klíčovou buněčnou událostí u mnoha fibrotických stavů. Imunitní buňky (makrofágy, lymfocyty, žírné buňky a eozinofily) mohou podporovat aktivaci fibroblastů vylučováním cytokinů, růstových faktorů a matricelulárních proteinů

## **Cíle disertační práce**

Cílem práce bylo zjištění možných morfologických a funkčních změn endomysia (intersticia) lidského atriálního myokardu typických pro atriální fibrilaci. Zvláštní pozornost byla věnována množství a složení mezibuněčné hmoty síňového endomysia a výskytu různých typů imunitních buněk. Dále byl sledován stav kapilárního řečiště, novotvorba kapilár a zrání jejich stěny. Při porovnání různých faktorů jsme také brali v potaz věk pacientů, současné onemocnění diabetem II. typu a ischemickou chorobou srdeční.

Materiál byl shromážděn ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny a histologické nálezy jsme v rámci této spolupráce vztahovali ke klinickým a biochemickým parametrům. Histologický materiál zahrnoval biopsie z pravých a levých před síní (pravé ouško, levé ouško a volná stěna levé síně) pacientů se sinusovým rytmem a atriální fibrilací, kteří představovali skupinu pacientů se spíše mírnějším stupněm srdečního onemocnění (Část II). K tomu jsme se dále zaměřili na pacienty s pokročilým srdečním selháním, kde jsme provedli analýzu explantovaného myokardu získaného při srdeční transplantaci (Část I). Cílem bylo zjistit, v jaké fázi srdečního onemocnění lze případné morfologické změny typické pro atriální fibrilaci detekovat. Kvantitativní parametry endomysia zahrnující buněčné struktury a mezibuněčnou hmotu jsme porovnávali s expresí různých růstových faktorů.

Rozhodli jsme se využít především histologické metody - s užitím obrazové analýzy jsme zjišťovali zastoupení vláknité složky mezibuněčné hmoty pomocí speciálního histologického barvení. Kvantifikovány byly také jednotlivé složky endomysia (kolagen I, kolagen III, elastin). Imunohistochemické metody jsme zvolili i pro analýzu imunitních buněk myokardu síní a hodnocení exprese růstových faktorů.

### **Část I**

První část naší práce byla zaměřena na zjištění souvislostí mezi charakteristikami tkáně myokardu a přítomností fibrilace síní u pacientů s pokročilým srdečním selháním. Vzhledem ke známým souvislostem mezi těmito srdečními patologiemi nás zajímala především míra fibrózy myokardu vyjádřená objemovou frakcí kolagenu (CVF). Současně jsme se zaměřili na expresi profibrotických růstových faktorů - transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) a růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF) u pacientů se srdečním selháním s AF a bez ní. Vstupní hypotéza předpokládala vyšší fibrózu a vyšší expresi profibrotických růstových faktorů v myokardu pacientů s atriální fibrilací.

### **Část II**

Cílem druhé části práce bylo hodnocení endomysia atriálního myokardu u pacientů s atriální fibrilací (AF) a sinusovým rytmem (SR), kteří podstoupili operaci na otevřeném srdci. Materiál pocházel z více lokalizací, protože jsme chtěli postihnout případné anatomické rozdíly v míře postižení. Peroperační bioptické vzorky levé a pravé síně byly vyšetřeny a hodnoceny pomocí imunohistochemie pro vizualizaci a kvantifikaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, hladkého svalového aktinu a vaskulárního endotelového

růstového faktoru (VEGF). Dále byly charakterizované a kvantifikované morfologické a funkční populace zánětlivých buněk pozitivní na CD45-, CD3-, CD68-KP1 v síňovém myokardu pacientů s AF ve srovnání se sinusem rytmem (SR). Vstupní hypotéza předpokládala vyšší fibrózu, nižší mikrovaskulární denzitu a vyšší expresi VEGF v myokardech pacientů s atriální fibrilací. Dále jsme očekávali vyšší zastoupení imunitních buněk – zejména T-lymfocytů a makrofágů - v myokardech pacientů s atriální fibrilací. Rozdíly mezi pacienty s atriální fibrilací a se sinusovým rytmem jsme očekávali především v levé síni.

(Pozn.: Dělení práce na Část I a Část II je chronologické. Ve výsledcích však nejprve prezentuji výsledky Části II, protože se opírá o stěžejní prvoautorské publikace.)

## **Materiály a metody**

### **Pacienti**

V prvním projektu studovaná skupina se skládala z pacientů s trvalou fibrilací síní (n = 10), kteří byli věkově podobní s kontrolní skupinou se sinusovým rytmem (n = 11). Vzorky myokardu přední volné stěny pravé síně a levé komory byly získány při transplantaci srdce ze všech explantovaných srdcí těchto 21 pacientů (ve věku  $51,6 \pm 8,9$  let) s pokročilým HF, kteří podstoupili operaci v Institutu klinické a experimentální medicíny IKEM. Základní etiologie HF byla ischemická choroba srdeční (10 pacientů), dilatační kardiomyopatie (9 pacientů), těžká chlopní dysfunkce (1 pacient) a restriktivní kardiomyopatie (1 pacient). Echokardiografie byla provedena u všech pacientů před transplantací. Rozměry pravé komory (RV) a levé komory (LV), velikost LA, tloušťka stěny mezikomorové přepážky a ejekční frakce LV byly měřeny standardními technikami. Hemodynamické měření bylo získáno před transplantací srdce. Napětí stěny levé síně (WS) bylo vypočteno podle vzorce:  $WS = 0,334 * P(LAD)/WT(1+WT/LAD)$ , kde P = tlak levé síně, který byl získán při srdeční katetrizaci, LAD = rozměr levé síně a WT = tloušťka stěny. Na základě předchozích anatomických a zobrazovacích studií byla tloušťka stěny použitá u těchto vzorků všech pacientů odhadnuta na 2 mm.

Ve druhém projektu se studované skupiny skládaly ze 46 pacientů (19 s dlouhodobě perzistující AF a 27 v SR). Pacienti podstoupili kardiochirurgické zákroky v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Ve skupinách AF i SR byli pacienti, kteří podstoupili operaci bypassu koronární arterie nebo operaci chlopně.

Protokoly studií byly schváleny etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a studie odpovídala zásadám uvedeným v Helsinské deklaraci. Všichni pacienti zařazení do studie podepsali písemný informovaný souhlas s transplantačním postupem a použitím explantovaného srdce, resp. biopsií pro výzkumné účely.



## **Odběr vzorků tkáně**

Vzorky tkáně byly získány během operace na otevřeném srdci nebo při transplantaci. Kousek síňové či komorové tkáně byl vyříznut jako příčný řez z pravého ouška, levé volné síňové stěny, levého ouška a levé komory. Odebrané vzorky myokardu byly fixovány paraformaldehydem, zality do parafinu a nakrájeny na tkáňové řezy o tloušťce 7  $\mu\text{m}$ . Řezy byly následně odparafinovány a rehydratovány.

## **Histologické barvení**

Deparafinované tkáňové řezy byly histologicky vyšetřeny pomocí rutinního barvení hematoxylinem a eosinem. Pro kvantifikaci objemové frakce kolagenu (CVF) v myokardu explantovaných srdcí byly řezy obarveny barvením picrosirius.

## **Imunohistochemické metody**

Expresce CTGF a TGF-beta byla hodnocena imunohistochemicky v prvním projektu. Na parafinových řezech byla provedena třístupňová detekce imunoperoxidázy. Po revitalizaci antigenu citrátovým pufrům (pH = 6,0) byla blokována aktivita endogenní peroxidázy a vazebná místa nespecifických protilátek. Dále byly řezy inkubovány s primární myší monoklonální protilátkou anti-human CTGF/CCN2 C (MAB660; R&D system) 1:50 nebo myší monoklonální protilátkou anti-TGF-beta (MAB1032; Chemicon Int.) 1:500 po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí soupravy LSAB+ peroxidáza (Dako). Vynechání primární protilátky, stejně jako aplikace izotypově odpovídající kontrolní protilátky ve stejné koncentraci jako specifické protilátky, vedly k negativnímu značení.

Imunohistochemie byla také použita ve druhém projektu k vizualizaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, aktinu hladkého svalstva a VEGF v těchto vzorcích.

Třístupňová imunoperoxidázová detekce byla provedena také na parafinových řezech. Po revitalizaci antigenu citrátovým pufrům (pH = 6,0) nebo TRIS + EDTA pufrům (pH = 9,0) byla blokována aktivita endogenní peroxidázy a nespecifická vazebná místa protilátek byla blokována 5% prasečím nebo kozím sérem v PBS. Poté byly řezy inkubovány s primární protilátkou přes noc při teplotě 4°C nebo po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí detekčního kitu LSAB+ peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko).

K detekci kapilár v síňové tkáni jsme použili biotinylovaný Ulex europaeus aglutinin I (Vector Laboratories, USA), který byl aplikován (1:200) přes noc při teplotě 4 °C. Vizualizace lektinové vazby byla provedena pomocí Standard Vectastain Elite ABC kit - peroxidase (Vector Laboratories, USA).

Imunohistochemie byla dále použita k vizualizaci CD45, CD3, CD68-KP1, DC-SIGN (dc-specifický ICAM-3 grabbing nonintegrin), tryptázy žírných buněk a CD20 v těchto vzorcích. Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí detekčního kitu LSAB+ peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko). Pro všechny imunohistochemické detekce byly použity negativní kontroly s vynecháním primární protilátky.

## **Imunofluorescenční značení**

Pro posouzení exprese desminu v pericytech a dalších buňkách jsme použili imunofluorescenční značení s použitím primární monoklonální myši protilátky proti lidskému desminu 1:100 (viz tabulka 2) v 1% kozím séru v PBS a sekundárního anti-myšního Alexa Fluor 532 (Invitrogen, Life Technologies) 1:500 v 5% kozím séru v PBS protilátkách.

K detekci pericytů pro hodnocení indexu pokrytí pericytů kapilár jsme použili monoklonální myši anti-lidské aktinové protilátky proti hladkému svalstvu (viz Tabulka 3) a biotinylovaný Ulex europaeus agglutinin I (Vector Laboratories, USA) zředěný 1:200 v 1% kozím séru v PBS. Streptavidin Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies) 1:100 a anti-mouse Alexa Fluor 532 (Invitrogen, Life Technologies) 1:500 v 5% kozí sérum v PBS byly použity v dalším kroku. Jádra byla obarvena DAPI 1:1000.

## **Histomorfometrie**

Pro kvantifikaci kolagenu I, kolagenu III a objemové frakce elastinu jsme použili program Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Snímky pro kvantifikaci byly získány systematickým náhodným výběrem pomocí 40x suchého objektivu mikroskopu Leica DMLB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Z každého vzorku síňového myokardu bylo zaznamenáno 10 snímků z jednoho řezu. Jednotlivé snímky byly od sebe odděleny jedním vynechaným zorným polem o velikosti obrazového rámečku. Obrázky byly převedeny do 8bitového formátu stupnice šedi a práh byl nastaven nad intenzitu barvení pozadí. Imunoreaktivní oblasti byly automaticky detekovány a frakce značené plochy byla vypočtena pro kolagen I, kolagen III a elastin. V této analýze byla kvantifikována pouze endomysiální kolagenová a elastinová vlákna.

Pro kvantifikaci mikrovaskulární denzity bylo použito barvení Ulex europaeus agglutininin I. Měření bylo provedeno pomocí programu Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Snímky pro kvantifikaci byly sbírány, jak je popsáno výše, a mikrovaskulární hustota byla vypočtena jako počet kapilár na jednotku plochy (mm<sup>2</sup>).

Expres VEGF byla analyzována semikvantitativně. Skóre intenzity se skládalo ze čtyř stupňů (0–3), přičemž 0 představuje žádné značení a 3 označuje maximální intenzitu značení.

Pro kvantifikaci indexu pericytového pokrytí kapilár jsme použili imunofluorescenční značení síňového myokardu. Pericyty byly identifikovány jako buňky imunoreaktivní pro aktin hladkého svalstva a charakterizovány jako protáhle buňky obklopující kapiláry. Kapiláry byly imunoreaktivní na Ulex europaeus agglutinin I. Náhodné oblasti byly vyfotografovány pomocí konfokálního laserového skenovacího biologického mikroskopu Fluoview FV1000 Spectral Type (Olympus) vybaveného 40× olejovým imerzním objektivem a analyzovány softwarem Olympus Fluoview 10-ASW 3.1. Bylo spočítáno procento kapilár s pericytovým pokrytím.

Pro kvantifikaci CD45+buněk, CD3+buněk, CD68-KP1+buněk a žírných buněk jsme použili program Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Frekvence buněk byla vyjádřena jako počet buněk na milimetr čtvereční.

Snímky pro kvantifikaci byly získány systematickým jednotným náhodným výběrem vzorků tkáňových řezů pomocí 40x suchého objektivu mikroskopu Leica DMLB (Leica Microsystems). Všechny morfometrické parametry pro první část projektu byly získány pomocí interaktivního softwaru pro analýzu obrazu (LeicaQWin, Leica Microsystems). CVF bylo kvantifikováno jako plošná frakce tkáně myokardu obsahující kolagenová vlákna značená barvením Sirius Red. Imunohistochemické barvení (DAB-hnědá barva) pro CTGF a TGF-beta bylo kvantifikováno následovně. Obrázky byly převedeny do 8bitového formátu ve stupních šedi a nad intenzitou barvení pozadí byla nastavena prahová hodnota. Průměrná optická intenzita nad touto prahovou úrovní byla měřena na stupnici 0-255 (0=bílá barva, 255=černá barva) (A.U.- zvolená jednotka optické hustoty).

### **Statistická analýza**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr±SD (směrodatná odchylka). Uváděn je také rozsah hodnot. Statistické testování morfometrické analýzy porovnávající hodnoty ze skupin AF a SR v různých anatomických lokalitách bylo provedeno pomocí neparametrického testu - Mann-Whitney U testu. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami pacientů v různých charakteristikách pacientů byla testována pomocí Studentova t-testu, Fisherova exaktního testu nebo chí-kvadrát testu, jak bylo pro konkrétní data vhodné. Pro tyto analýzy byly použity statistické programy Microsoft Office Excel, InStat a Statistica. Hodnota  $P < 0,05$  byla považována za významnou.

### **Výsledky**

#### **Kolagen I a kolagen III v síňovém myokardu**

Pro porovnání úrovně fibrózy ve vzorcích srdečních síní pacientů se SR a AF jsme se nejprve zaměřili na kolagen I v síňovém endomyziu pomocí imunohistochemické detekce. Variabilní množství kolagenu I bylo nalezeno ve vzorcích z obou skupin pacientů. Objemový podíl kolagenu I byl podobný při porovnávání vzorků ze skupiny AF a SR. Dále jsme porovnali objemovou frakci kolagenu I ve vzorcích z různých anatomických oddílů srdce a zjistili jsme, že v pravém oušku byla významně vyšší objemová frakce kolagenu I ve srovnání s levým ouškem, stejně jako ve srovnání se směsnými vzorky z levé volné stěny síní a levého ouška. Distribuce imunoreaktivity kolagenu III byla podobná jako u kolagenu I. Objemová frakce kolagenu III byla také podobná při porovnávání vzorků ve skupinách pacientů s AF a SR. V pravé oušku byla významně vyšší objemová frakce kolagenu III ve srovnání s levým a také ve srovnání se smíšenými vzorky z levé síňové stěny a levého ouška.

### **Elastin v síňovém myokardu**

Elastin byl detekován ve vzorcích lidských síní ve variabilním množství. Kvantitativní morfometrická analýza objemové frakce elastinu neodhalila žádné významné rozdíly mezi vzorky od pacientů s AF a SR. Ve srovnání s obsahem kolagenu (objemová frakce kolagenu I a III) byly zjištěny podobné, ale výraznější rozdíly v objemové frakci elastinu mezi třemi anatomickými lokalizacemi. Výrazně vyšší obsah elastinu byl zjištěn v pravém oušku ve srovnání s levým, levou síňovou stěnou nebo směsnými vzorky z levé síňové stěny a levého ouška.

### **VEGF v síňovém myokardu**

Imunoreaktivita VEGF byla detekována ve všech vzorcích síňové tkáně, které byly zkoumány. Zaměřili jsme se nejen na myokard, ale také na endokardovou a epikardovou vrstvu. V epikardu byla imunoreaktivita VEGF zjištěna v mezotelových buňkách a adipocytech, jakož i v kardiomyocytech a cévách, zejména kapilárách. Expres VEGF byla variabilní. Úroveň imunoreaktivity VEGF byla podobná u pacientů s AF a SR. Srovnání exprese VEGF kardiomyocytů na základě anatomického původu vzorků od všech pacientů odhalilo vyšší expresi VEGF v pravém oušku ve srovnání s levým. Rozdíl oproti pravému síňovému oušku byl zjištěn také u vzorků z levého ouška a levé síňové stěny.

### **Mikrovaskulární denzita v síňovém myokardu**

Mikrovaskulární denzita byla analyzována ve vzorcích tkáně ve stejných skupinách pacientů. Pomocí UEA-lectinu byl vizualizován endotel cév v síňovém myokardu; mikrovaskulární denzita byla kvantifikována ve vzorcích síní ve skupinách pacientů s AF i SR. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v úrovni mikrovaskulární denzity u pacientu s AF a s SR. Mikrovaskulární denzita v pravém oušku byla významně nižší ve srovnání s levým ouškem a volnou stěnou levé síně.

### **Pericytové pokrytí síňových kapilár**

Pro vyhodnocení možných rozdílů v aktivitě angiogenního procesu v síňovém myokardu pacientů s AF a SR bylo analyzováno pokrytí kapilár pericyty ve vzorcích síňové tkáně. Kvantitativní analýza indexu pokrytí kapilár pericyty ukázala, že mezi skupinami pacientů s AF a SR nebyl žádný významný rozdíl. Srovnání indexu pokrytí kapilár pericyty ve vzorcích z různých anatomických míst ukázalo, že podobné pokrytí pericyty je v levém a pravém síňovém myokardu.

### **Detekce a kvantifikace CD45+ buněk v síňovém myokardu**

Pro vizualizaci zánětlivých buněk jsme použili protilátku proti panleukocytárnímu markeru CD45. Imunoperoxidázová reakce odhalila CD45+ buňky ve všech vzorcích analyzovaných ze SR a AF skupiny. Buňky imunoreaktivní pro CD45+ byly nalezeny v intersticiálním kompartmentu myokardu jak v perimysiu, tak v endomysiu. CD45+ buňky umístěné v myokardu byly kvantifikovány v tkáňových řezech levého a pravého ouška a volné stěny levé síně. Při porovnávání vzorků ze skupiny SR a skupiny AF byla tendence k vyšší frekvenci CD45+ buněk ve skupině AF, aniž by však bylo dosaženo statistické

významnosti. V pravém oušku byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 42,4±25,5 (rozmezí 12,2-103,8) ve skupině SR a 58,4±31,3 (rozmezí 12,6-118,5) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 36,1±16,7 (rozmezí 14,4-61,7) ve skupině SR a 54,2±52,2 (rozmezí 17,8-186,2) ve skupině AF. Ve volné stěně levé síně byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 36,2±14,2 (rozmezí 20,6-59,3) ve skupině SR a 39,0±23,7 (rozmezí 11,9-95,5) ve skupině AF. Ve sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 36,1±15,9 (rozmezí 14,3-61,7) ve skupině SR a 46,6±41,2 (rozmezí 11,9-186,2) ve skupině AF.

### **CD3-pozitivní T-lymfocyty v síňovém myokardu**

Dalším cílem bylo charakterizovat populaci zánětlivých buněk a provést analýzu různých subpopulací CD45+ buněk. Jako další krok byly tedy T-lymfocyty imunohistochemicky detekovány ve vzorcích síní pomocí protilátky proti markeru CD3. Stejně jako CD45+ buňky, T-lymfocyty byly nalezeny ve všech vzorcích ze skupin pacientů s SR i AF a byly lokalizovány v celé síňové stěně včetně myokardu, nicméně byly mnohem méně početné než CD45+ buňky. Kvantifikace CD3+ T-lymfocytů odhalila jejich signifikantně vyšší frekvenci v levé síni pacientů s AF. Když byly seskupeny vzorky levého ouška a levé síňové volné stěny, rozdíl mezi AF a SR skupinou byl statisticky významný. V pravém oušku byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 6,5±6,0 (rozmezí 1,08-26,8) ve skupině SR a 5,3±4,2 (rozmezí 1,2-15,3) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 3,5±2,3 (rozmezí 1,1-8,4) ve skupině SR a 8,6±10,1 (rozmezí 1,7-36,2) ve skupině AF. V sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 3,5±2,2 (rozmezí 1,1-8,4) ve skupině SR a 9,8±10,0 (rozmezí 1,7-36,2) ve skupině AF.

### **CD68-KP1-pozitivní buňky v síňovém myokardu**

Zánětlivé buňky včetně monocytů/makrofágů a dendritických buněk lze detekovat pomocí markeru CD68-KP1. Kvantitativní analýza ukázala, že buněčná populace CD68-KP1+ byla nejhojnější populací zánětlivých buněk a byla častější ve vzorcích od pacientů s AF. U pacientů s AF byl významně vyšší počet CD68-KP1+ buněk v levém oušku a v poolovaných vzorcích levého ouška a levé síňové stěny ve srovnání s pacienty se SR. V pravém síňovém oušku byl průměrný počet buněk CD68-KP1+ na 1 mm<sup>2</sup> 44,3±19,3 (rozmezí 7,7-76,7) ve skupině SR a 52,0±27,0 (rozmezí 14,0-109,0) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD68-KP1+ buněk na 1 mm<sup>2</sup> 40,8±24,4 (rozmezí 9,9-96,3) ve skupině SR a 67,2±25,0 (rozmezí 41,6-122,4) ve skupině AF. Ve sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet buněk CD68-KP1+ na 1 mm<sup>2</sup> 38,5±23,7 (rozmezí 9,9-96,3) ve skupině SR a 60,2±28,4 (rozmezí 18,0-122,4) ve skupině AF.

DC-SIGN- pozitivní dendritické buňky, žírné buňky a B-lymfocyty v síňovém myokardu

Dendritické buňky patří mezi buňky imunoreaktivní pro CD68-KP1+. Pro potvrzení jejich přítomnosti v síňovém myokardu pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdce jsme provedli imunohistochemickou detekci markeru DC-SIGN, označujícího nezralé dendritické buňky. DC-SIGN+ buňky byly často nalezeny ve vzorcích síňového myokardu ze skupin AF i SR. Měly stejnou morfologii jako buňky dříve imunoreaktivní pro antigen CD68. Žírné buňky byly detekovány pomocí protilátky proti tryptáze žírných buněk. V síňovém myokardu byla podobná frekvence žírných buněk u pacientů ze skupin AF a SR. B-lymfocyty byly detekovány pomocí protilátky proti markeru CD20 v síňovém myokardu pacientů ve skupině AF a SR. CD20+ buňky byly příležitostně nalezeny jako malé shluky v epikardové vrstvě. V myokardu byly tyto buňky velmi vzácné.

### **Kvantifikace fibrózy v atriálním myokardu pacientů s AF a SR**

Určité množství síňové fibrózy vyjádřené jako objemová frakce kolagenu - collagen volume fraction (CVF) bylo zjištěno ve všech vzorcích myokardu nezávisle na srdečním rytmu. V CVF nebyl žádný významný rozdíl mezi skupinami AF a SR. CVF v pravé síni skupiny pacientů s AF však korelovala ( $r=0,8$ ,  $p=0,006$ ) s trváním AF. V myokardu levé komory nebyl významný rozdíl v expresi CVF mezi skupinami SR a AF ( $11,0\pm 9,9$  vs.  $18,3\pm 8,3$ ;  $p=0,1$ ).

### **Imunohistochemická analýza exprese TGF- $\beta$ a CTGF**

Imunohistochemická detekce neodhalila žádné významné rozdíly v expresi CTGF mezi vzorky myokardu síní/komor u pacientů s AF a SR. Nicméně exprese CTGF ve ventrikulárním myokardu byla významně nižší ( $117,3\pm 17,9$  vs.  $126\pm 15,0$ ,  $p=0,003$ ) ve skupině SR i AF ve srovnání s odpovídajícími síněmi. CTGF byl exprimován v kardiomyocytech síňového myokardu obou skupin. Úroveň CTGF imunoreaktivity u jednotlivých kardiomyocytů v rámci jednoho vzorku byla velmi podobná. TGF- $\beta$  byl detekován na velmi nízké úrovni v obou skupinách a nebyl mezi nimi žádný rozdíl. Ve většině případů byl TGF- $\beta$  exprimován pouze vaskulárním endotelem. V subendokardových oblastech síňové stěny byly také imunoreaktivní kardiomyocyty spolu s endotelovými buňkami. Na rozdíl od exprese CTGF se úroveň imunoreaktivity TGF- $\beta$  u jednotlivých kardiomyocytů lišila. Exprese TGF- $\beta$  nepřímo korelovala s trváním AF.

## Diskuse

### Část I

Naše práce ukázala, že pacienti s HF a SR mají pokročilou atriální fibrózu, jak ukázala kvantifikace CVF. Ve srovnání s jinými pracemi jsme pozorovali 2x-3x více fibrózy u těchto pacientů se SR než v pravých síních pacientů bez HF, kteří podstoupili operaci na otevřeném srdci (Goette et al. 2002; Gramley et al. 2010). V jiné studii bylo ukázáno, že pacienti s HF, ale bez atriální tachyarytmie mají v atriálním myokardu významné elektrofyziologické abnormality (Sanders et al. 2003). V atriích těchto pacientů byly nalezeny oblasti s prodlouženým vedením vzruchu, snížením napětím a prodlouženou refrakterní fází. Naše nálezy potvrzují přítomnost rozsáhlé fibrózy u takovýchto pacientů. Domníváme se, že tato rozsáhlá fibróza může být důsledkem neurohumorální aktivace, což dokazuje skutečnost, že několik pro-fibrotických faktorů je ve zvýšené míře exprimováno při HF, jak dokládají některé práce (Everett and Olgin 2007; Koitabashi et al. 2007; Li et al. 2001).

V podobné studii na pacientech s terminálním srdečním selháním byla zjištěna zvýšená objemová frakce kolagenu I v levé síni pacientů s AF ve srovnání s pacienty s SR (Xu et al. 2004). Tento nesoulad s našimi výsledky může být způsoben dvěma hlavními příčinami. Zaprvé, zde mohou být rozdíly v charakteristikách pacientů mezi sledovanými skupinami, jako je zastoupení různé etiologie HF, jeho závažnost a trvání. Toto vysvětlení má svou oporu v práci zaměřené na pacienty s HF a zachovalou ejekční frakcí, kde samotná AF nebyla asociovaná s atriální fibrózou, ale místo toho byla zjištěna souvislost s přítomným strukturálním postižením srdce (Anne et al. 2005). Zadruhé, tyto rozdíly mohou být ovlivněny místem odběru vzorků, neboť je známo, že atriální fibróza není v myokardu rozšířena rovnoměrně.

V naší práci jsme pozorovali korelaci mezi trváním AF a mírou fibrózy vyjádřenou pomocí CVF, což naznačuje, že persistentní AF podporuje vznik fibrózy v AF. Podobná souvislost byla publikována v práci analyzující levé síně získané post mortem od osob bez HF (Platonov et al. 2011).

Profibrotický cytokin TGF-beta je zapojen do fibrotických procesů v mnoha tkáních a orgánech (Frangogiannis 2020). Jedna dřívější studie se věnovala expresi TGF-beta u větší skupiny pacientů (n=163), kteří podstoupili kardiochirurgický výkon (Gramley et al. 2010). Bylo zjištěno, že obsah kolagenu a exprese TGF-beta byla vyšší u pacientů s chronickou AF ve srovnání s pacienty s paroxysmální AF nebo SR. Autoři práce dále ukázali, že exprese TGF-beta přímo úměrně rostla s dobou trvání AF. Zvýšená tkáňová exprese TGF-beta byla dána do souvislosti s rozvojem atriální fibrózy u experimentálního modelu HF navozeného u psů pomocí zrychlení srdeční frekvence (Hanna et al. 2004). V naší studii jsme zaznamenali, že exprese TGF-beta v síních a komorách je u pacientů s AF a se SR podobná. Dále naše výsledky ukázaly sice hraničně signifikantní, ale patrnou negativní korelaci mezi expresí TGF-beta a trváním AF. Zdá se tedy, že exprese TGF-beta zřejmě hraje roli při časné odpovědi síní na hemodynamické přetížení a v časné fázi atriální remodelace.

CTGF je protein, který je zapojen do řízení hojení ran a tkáňové reparace (Chen et al. 2020). Zvýšená a protrahovaná exprese CTGF je dávana do souvislosti s tkáňovou fibrózou (Sonnylal et al. 2010). Do doby zahájení našeho projektu nebyla k dispozici relevantní data ohledně role CTGF při AF asociované s HF. U pacientů bez HF, kteří podstoupili operaci srdce, měla skupina s AF signifikantně zvýšenou expresi CTGF v pravém atriálním oušku ve srovnání se skupinou se SR (Ko et al. 2011). U pacientů v našem projektu jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v expresi CTGF při srovnání skupin s AF a SR. V jiné studii zaměřené na pacienty bez HF, kteří podstoupili operaci chlopně, byla zaznamenána zvýšená exprese CTGF a TGF-beta v síních pacientů s AF oproti skupině se SR (Li et al. 2013). Zdá se tedy, že se tyto faktory aktivují již na počátku remodelace síní a v pozdějších fázích srdečního onemocnění se rozdíly podmíněné srdečním rytmem vytrácí, což byla zřejmě situace u naší skupiny s pokročilým srdečním selháním. Jelikož jsme pracovali pouze s pravou síní, není možné vztah mezi expresí CTGF v srdečních síních a AF při HF zcela vyloučit.

## Část II

V této části dizertace jsme přinesli výsledky, které dokládají dilataci obou atrií u pacientů s AF, přičemž nebyly zaznamenány rozdíly u parametrů levé komory, což je také známo ze studií provedených s podobnými skupinami pacientů (de Oliveira et al. 2013; Ogi et al. 2010). Pacienti s HF mají zvýšené riziko AF (Darby and Dimarco 2012; Hindricks et al. 2021). Nicméně, pacienti ze skupiny s AF a SR zařazení do naší studie neměli signifikantní rozdíly ve funkci levé komory a ve třídě NYHA. Naše práce naznačuje, že intersticiální fibróza a další morfologické změny souvisí spíše se strukturálním srdečním onemocněním než s AF jako takovou. Tento pohled je v protikladu k obecně přijímané představě o strukturální remodelaci atriálního myokardu se vztahem k AF. Vysvětlením může být možná úloha jiných faktorů, které mají úlohu v etiopatogenezi AF, jako je přítomnost spouštěčů nebo ovlivnění autonomním nervovým systémem, zánětem apod.

Dále je třeba zmínit, že dřívější práce, které ukázaly významné rozdíly v morfologických parametrech síní u pacientů s AF, využívaly odlišnou metodiku pro detekci a kvantifikaci kolagenu (Boldt et al. 2004; Kostin et al. 2002; Polyakova et al. 2008). V této části projektu jsme zabývali komplexní charakteristikou atriálního intersticia a především jeho endomysiální složky. Jednotlivé typy vláken tvořené kolagenem I, kolagenem III a elastinem jsme kvantifikovaly zvlášť. Překvapivě a oproti předchozím údajům, jsme našli srovnatelné zastoupení těchto vláken vyjádřené jako objemová frakce atriální tkáně u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci nezávisle na tom, jestli tito pacienti měli SR nebo AF. Naše výsledky jsou podporovány nedávno publikovanou podrobnou morfologickou analýzou vzorků lidského atriálního myokardu, které byly získány při autopsii, přičemž tato práce zahrnovala histomorfometrii rutinně obarvených řezů (de Oliveira et al. 2013). Když tito autoři porovnávali pacienty s AF a se SR, bylo zjištěno, že tyto dvě skupiny mají podobný rozsah fibrózy. V naší práci jsme přinesli výsledky, které dále rozšiřují data publikovaná dříve jinými výzkumnými skupinami, zejména s ohledem na naši analýzu zastoupení elastinu v síňovém myokardu pacientů s AF a SR. S ohledem na zmíněné anatomické rozdíly se v této souvislosti jeví jako



významný náš nález několikanásobně vyššího zastoupení elastinu v pravém síňovém myokardu ve srovnání s levým síňovým myokardem, přičemž vzorky z levé síně zahrnovaly ouško i volnou stěnu. Podobné, nikoliv však stejně velké rozdíly jsme našli v případě objemové frakce kolagenu I a kolagenu III. Tyto regionální rozdíly v zastoupení hlavních složek vláknité komponenty atriálního endomysia považujeme za nález vyžadující další vysvětlení, které mohou přinést navazující práce. Naše data dále ukazují, že VEGF může být běžně detekován ve vzorcích atrií pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci nezávisle na jejich srdečním rytmu. Při porovnání exprese VEGF, kterou jsme detekovali imunohistochemickou metodou, jsme nezaznamenali významné rozdíly při porovnání pacientů se SR a AF. V této souvislosti považujeme přítomnost VEGF za možnou známku aktivní angiogeneze nebo za nutnou podmínku pro udržení funkčního mikrovaskulárního řečiště v myokardu pacientů s různými srdečními chorobami, kteří také tvořili námi sledovanou skupinu. Jedna studie provedená na biopsiích z pravého atriálního ouška přinesla výsledky ukazující vyšší expresi VEGF u pacientů s AF (Gramley et al. 2010). Ačkoliv autoři ve své práci také zvolili imunohistochemickou detekci, nezmiňují buňky, které byly v jejich vzorcích imunoreaktivní na VEGF.

V souladu s podobnou expresí VEGF ve skupinách pacientů se SR a s AF, jsme zjistili srovnatelnou mikrovaskulární denzitu v atriálním myokardu obou skupin pacientů. Podobná data přinesla i jedna již zmíněná studie. V této práci autoři nepozorovali rozdíl v mikrovaskulární denzitě v biopsiích pravého atriálního ouška u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci se SR a s AF (Gramley et al. 2010). Analýza kapilární hustoty byla také provedena v studii pracující s autoptickým materiálem z levé síně a atriálního septa, přičemž autoři rovněž nepozorovali rozdíl mezi skupinou pacientů se SR a s AF (Platonov et al. 2011). V naší práci jsme v případě exprese VEGF opět pozorovali rozdíly mezi anatomickými lokalizacemi odebíraných vzorků stěny srdečních síní. Vyšší exprese VEGF v kardiomyocytech ve stěně pravé síně může znamenat zvýšenou potřebu angiogenní stimulace kardiomyocytů, které jsou obklopeny v pravé síni větším množstvím endomysialní mezibuněčné hmoty bohaté na vláknitou složku, přičemž takto remodelované endomysium bylo zároveň chudší na kapiláry.

Další možností jak charakterizovat mikrocirkulaci v atriálním myokardu je stanovení indexu pericytového pokrytí kapilár. V případě námi analyzovaných vzorků atriálního myokardu jsme zjistili podobné hodnoty indexu pericytového pokrytí kapilár nezávislé na srdečním rytmu. Nezaznamenali jsme ani žádné rozdíly v tomto parametru mezi levou a pravou síní. Index pericytového pokrytí kapilár síňového myokardu pocházejícího z naší sledované skupiny pacientů odpovídá hodnotám nalezeným v atriálním myokardu zdravých potkanů, kde činil přibližně 84% (Tilton, Kilo, and Williamson 1979). Výsledky části dizertace věnované strukturální remodelaci síňového myokardu u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci s AF a SR mohou být do určité míry ovlivněny velikostí naší skupiny pacientů. Vzorky mohly být získány jen z určitých anatomických lokalizací, což bylo ovlivněno chirurgickým přístupem. Na základě některých studií je zřejmé, že architektura svalové tkáně síní je značně variabilní (Zhao et al. 2012). V naší skupině pacientů s AF byl významně vyšší podíl osob podstupujících operaci na

chlopních. Vyšší míra fibrózy detekovaná u těchto pacientů by byla možná vysvětlitelná touto diagnózou. Nicméně i u některých těchto pacientů byl při vyšší míře fibrózy stále zachován SR.

### Část III

Několik dříve publikovaných prací ukázalo zvýšený počet zánětlivých buněk v srdečních síních pacientů trpících A (Begieneman et al. 2015; Frustaci et al. 1997; Chen et al. 2008; Nakamura et al. 2003; Nguyen et al. 2009; Platonov et al. 2011; Yamashita et al. 2010; Yamashita et al. 2015). Ve srovnání s naší studií se v jiných projektech autoři zaměřili na vzorky pouze z levé či pravé síně (Begieneman et al. 2015; Nakamura et al. 2003; Yamashita et al. 2010; Yamashita et al. 2015), případně byla analýza provedena na nekroptickém materiálu (Platonov et al. 2011). Výsledky naší práce v zásadě odpovídají nálezům učiněným ve výše zmíněných studiích, které byly provedeny na různě charakterizovaných skupinách pacientů. Hlavním poznatkem, ke kterému jsme dospěli, je skutečnost, že významně vyšší infiltrace imunitními buňkami u pacientů s AF byla pouze v levé síni. Jedním z možných vysvětlení pro tento nález může být vyšší hustota mikrovaskulárního řečiště, které je vstupní branou pro zánětlivé buňky do myokardu síní. Ta byla zjištěna v levé síni a tento anatomický rozdíl mezi levou a pravou síní jsme v naší práci zaznamenali na téměř identických vzorcích.

Kromě CD3+ (T-lymfocytů) a CD 68+ buněk (makrofágů/dendritických buněk) jsme v atriálním myokardu také stanovili zastoupení buněk žírných a B-lymfocytů. Jedna dřívější experimentální studie poukázala na důležitou roli žírných buněk při vzniku AF (Liao et al. 2010). Nedávno publikované výsledky z naší skupiny ukázaly vyšší zastoupení žírných buněk v epikardiální tukové tkáni pacientů s ischemickou chorobou srdeční (Rozsivalova et al. 2020). V atriálním myokardu pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci, kteří byli analyzováni v rámci této části dizertační práce, jsme v myokardu síní pozorovali jen malé množství žírných buněk, převážně lokalizovaných perivaskulárně a perimysiálně, a žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinou pacientů se SR a AF jsme nezjistili.

Naše data ukazují spíše mírnější zvýšení počtu imunitních buněk v myokardu levé síně u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci, kteří měli AF ve srovnání s pacienty se SR. Je pravděpodobné, že námi pozorovaný zvýšený počet imunitních buněk zastoupených především populací CD3+ a CD68+ odráží zvýšenou úroveň zánětlivé odpovědi myokardu jako reakci na mechanický stres působený atriální dilatací (De Jong et al. 2011). V nedávno publikované práci autoři porovnávali zastoupení imunitních buněk reprezentovaných populací CD45+ a CD3+ buněk v levé síni v závislosti na typu AF, nicméně nenalezli žádnou korelaci (Wu et al. 2020). Avšak v rámci skupiny pacientů s dlouhodobou perzistentní nebo permanentní AF, počet CD45+ buněk v myokardu pozitivně koreloval s věkem pacientů

Jak již bylo zmíněno, v této části dizertace zaměřené na imunitní buňky v myokardu jsme jako nejpočetnější buněčnou populaci identifikovali CD68+ buňky, které měli většinou tvar těla tvořený tělem s jádrem a delšími cytoplazmatickými výběžky, které byly nataženy v prostoru endomyšia, mezi kapilárami a těly kardiomyocytů. Velké množství buněk s touto morfologií bylo také imunoreaktivních na marker DC-SIGN,

který bývá někdy označován, jako marker buněk dendritických (van Kooyk 2008). Otázka, jaká frakce CD68+ buněk je tvořena právě dendritickými buňkami, a jestli jsou tyto DC-SIGN+ buňky rozdílně zastoupeny v síňovém myokardu pacientů s AF oproti osobám se SR by mohla být vyřešena další charakterizací této buněčné populace. Úloha dendritických buněk v patologii srdečních onemocnění je popsána stále jen nedostatečně (Afanasyeva, Georgakopoulos, and Rose 2004). V rámci dizertace jsme také nepřistoupili k další charakterizaci populace makrofágů, přičemž v poslední době je stále více patrné, že se jedná o rozmanitou populaci imunitních buněk, která se může z hlediska svého charakteru měnit v závislosti na vývoji i jako reakce na různé patologické stavy (Frodermann and Nahrendorf 2018; Hou et al. 2019; Nicolas-Avila, Hidalgo, and Ballesteros 2018; Pierzynova et al. 2019).

Zánětlivá infiltrace epikardiálního tuku byla pozorována u pacientů s AF opakovaně (Begieneman et al. 2016; Wu et al. 2020). Postupně přibývá i dalších dokladů o těsném vztahu mezi chronickým zánětem epikardiálního tuku a dalšími srdečními patologiemi (Iacobellis 2022; Malavazos et al. 2022; Mraz et al. 2019; Pierzynova et al. 2019; Rozsivalova et al. 2020).

## **Závěr**

Komplexní analýza biopsických vzorků síňové tkáně u pacientu podstupujících operaci na otevřeném srdce ukázala, že interstitium má variabilní morfologii, zejména pokud jde o množství a složení ECM. Nemohli jsme však potvrdit vyšší úroveň fibrózy specifické pro AF. Toto zjištění naznačuje, že intersticiální fibróza a další morfologické změny v síňové tkáni jsou spíše spojeny se strukturálním srdečním onemocněním než s AF jako takovou. Zda se u takového pacienta rozvine AF, závisí s největší pravděpodobností na další přítomnosti spouštěčů a modulačních faktorů. Výrazné rozdíly v množství kolagenu I, III a elastinu u pacientů s SR a AF nebyly nalezeny. Obě skupiny pacientů neměly žádné rozdíly v expresi VEGF a mikrovaskulární denzitě. Množství kolagenu I,III a elastinu v pravé síni myokardu bylo výrazně vyšší, než ve vzorcích získaných z levé síni. VEGF exprese kardiomyocytů byla výrazně vyšší oproti levé síni. Mikrovaskulární denzita byla vyšší v levé síni myokardu ve srovnání s pravou síni.

Dále jsme ukázali, že rozdíly ve stupni strukturální remodelace mezi levou a pravou síní mohou být důležitější pro etiopatogenezi AF. Regionální rozdíly v obsahu ECM, mikrovaskulární hustotě a expresi VEGF zaslouží další zkoumání.

Imunohistochemická analýza vzorků tkáně u pacientů prokázala mírný a místně specifický nárůst zánětlivých buněk v síňovém myokardu pacientů s FS ve srovnání s pacienty se SR. Nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk byly CD3+ T-lymfocyty a CD68-KP1+ subpopulace monocytů/makrofágů, což odpovídalo převážně dendritickým buňkám. Žírné buňky a B-lymfocyty byly méně časté. Pouze CD3+ a CD68-KP1+ buňky byly zvýšeny v levé síni pacientů s FS, zatímco v síňovém myokardu nebyla zjištěna žádná zánětlivá ložiska. Toto lokální zvýšení některých populací CD45+ buněk může odrážet progresi AF.

## Použitá literatura

1. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, and N. R. Rose. 2004. 'Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction', *Autoimmun Rev*, 3: 476-86.
2. Allesie, M., J. Ausma, and U. Schotten. 2002. 'Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation', *Cardiovasc Res*, 54: 230-46.
3. Anne, W., R. Willems, T. Roskams, P. Sergeant, P. Herijgers, P. Holemans, H. Ector, and H. Heidbuchel. 2005. 'Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation', *Cardiovascular Research*, 67: 655-66.
4. Armulik, A., G. Genové, and C. Betsholtz. 2011. 'Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises', *Dev Cell*, 21: 193-215.
5. Ashizawa, N., K. Graf, Y. S. Do, T. Nunohiro, C. M. Giachelli, W. P. Meehan, T. L. Tuan, and W. A. Hsueh. 1996. 'Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction', *J Clin Invest*, 98: 2218-27.
6. Babapoor-Farrokhran, S., D. Gill, J. Alzubi, and S. K. Mainigi. 2021. 'Atrial fibrillation: the role of hypoxia-inducible factor-1-regulated cytokines', *Mol Cell Biochem*, 476: 2283-93.
7. Begieneman, M. P., R. W. Emmens, L. Rijvers, B. Kubat, W. J. Paulus, A. B. Vonk, L. Rozendaal, P. S. Biesbroek, D. Wouters, S. Zeerleder, M. van Ham, S. Heymans, A. C. van Rossum, H. W. Niessen, and P. A. Krijnen. 2016. 'Ventricular myocarditis coincides with atrial myocarditis in patients', *Cardiovasc Pathol*, 25: 141-8.
8. Begieneman, M. P., L. Rijvers, B. Kubat, W. J. Paulus, A. B. Vonk, A. C. van Rossum, C. G. Schalkwijk, W. Stoker, H. W. Niessen, and P. A. Krijnen. 2015. 'Atrial fibrillation coincides with the advanced glycation end product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the atrium', *Am J Pathol*, 185: 2096-104.
9. Boldt, A., U. Wetzel, J. Lauschke, J. Weigl, J. Gummert, G. Hindricks, H. Kottkamp, and S. Dhein. 2004. 'Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease', *Heart*, 90: 400-5.
10. Boos, C. J., R. A. Anderson, and G. Y. Lip. 2006. 'Is atrial fibrillation an inflammatory disorder?', *Eur Heart J*, 27: 136-49.
11. Caforio, A. L., S. Pankuweit, E. Arbustini, C. Basso, J. Gimeno-Blanes, S. B. Felix, M. Fu, T. Helio, S. Heymans, R. Jahns, K. Klingel, A. Linhart, B. Maisch, W. McKenna, J. Mogensen, Y. M. Pinto, A. Ristic, H. P. Schultheiss, H. Seggewiss, L. Tavazzi, G. Thiene, A. Yilmaz, P. Charron, P. M. Elliott, Myocardial European Society of Cardiology Working Group on, and Diseases Pericardial. 2013. 'Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases', *Eur Heart J*, 34: 2636-48, 48a-48d.
12. Cipollone, F., M. Fazio, G. Mincione, A. Iezzi, B. Pini, C. Cucurullo, S. Uchino, F. Spigonardo, M. Di Nisio, F. Cucurullo, A. Mezzetti, and E. Porreca. 2004. 'Increased expression of transforming growth factor-beta 1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques', *Stroke*, 35: 2253-57.
13. Cleutjens, J. P., M. J. Verluyten, J. F. Smiths, and M. J. Daemen. 1995. 'Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart', *Am J Pathol*, 147: 325-38.
14. Corradi, D., S. Callegari, S. Benussi, R. Maestri, P. Pastori, S. Nascimbene, S. Bosio, E. Dorigo, C. Grassani, R. Rusconi, M. V. Vettori, R. Alinovi, E. Astorri, C. Pappone, and O. Alfieri. 2005. 'Myocyte changes and their left atrial distribution in patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease', *Hum Pathol*, 36: 1080-9.
15. Corradi, D., S. Callegari, S. Benussi, S. Nascimbene, P. Pastori, S. Calvi, R. Maestri, E. Astorri, C. Pappone, and O. Alfieri. 2004. 'Regional left atrial interstitial remodeling in patients with chronic atrial fibrillation undergoing mitral-valve surgery', *Virchows Archiv*, 445: 498-505.

16. Corradi, D., S. Callegari, R. Maestri, S. Benussi, and O. Alfieri. 2008. 'Structural remodeling in atrial fibrillation', *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5: 782-96.
17. Corradi, D., S. Callegari, R. Maestri, D. Ferrara, D. Mangieri, R. Alinovi, P. Mozzoni, S. Pinelli, M. Goldoni, Y. A. Privitera, V. Bartoli, E. Astorri, E. Macchi, A. Vaglio, S. Benussi, and O. Alfieri. 2012. 'Differential Structural Remodeling of the Left-Atrial Posterior Wall in Patients Affected by Mitral Regurgitation with or Without Persistent Atrial Fibrillation: A Morphological and Molecular Study', *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 23: 271-79.
18. Corradi, D., S. Callegari, L. Manotti, D. Ferrara, M. Goldoni, R. Alinovi, S. Pinelli, P. Mozzoni, R. Andreoli, A. Asimaki, A. Pozzoli, G. Becchi, A. Mutti, S. Benussi, J. E. Saffitz, and O. Alfieri. 2014. 'Persistent lone atrial fibrillation: Clinicopathologic study of 19 cases', *Heart Rhythm*, 11: 1250-58.
19. Čihák, R., P. Heinc, L. Haman, M. Fiala, P. Neužil, and O. Toman. 2012. 'Fibrilace síní. Doporučený diagnostický a léčebný postup České kardiologické společnosti vypracovaný Pracovní skupinou arytmie a trvalé kardiostimulace', *Vnitřní lékařství*, 58: 41-69.
20. Čichák. 2016. *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání* (Grada Publishing, a.s.).
22. Darby, A. E., and J. P. Dimarco. 2012. 'Management of atrial fibrillation in patients with structural heart disease', *Circulation*, 125: 945-57.
23. De Jong, A. M., A. H. Maass, S. U. Oberdorf-Maass, D. J. Van Veldhuisen, W. H. Van Gilst, and I. C. Van Gelder. 2011. 'Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation', *Cardiovasc Res*, 89: 754-65.
24. de Oliveira, I. M., B. D. Oliveira, M. I. Scanavacca, and P. S. Gutierrez. 2013. 'Fibrosis, myocardial crossings, disconnections, abrupt turns, and epicardial reflections: do they play an actual role in human permanent atrial fibrillation? A controlled necropsy study', *Cardiovasc Pathol*, 22: 65-9.
25. Eckstein, J., S. Verheule, N. M. de Groot, M. Allessie, and U. Schotten. 2008. 'Mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation in chronically dilated atria', *Prog Biophys Mol Biol*, 97: 435-51.
26. Everett, T. H., and J. E. Olgin. 2007. 'Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation', *Heart Rhythm*, 4: S24-S27.
27. Fomovsky, G. M., S. Thomopoulos, and J. W. Holmes. 2010. 'Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart', *J Mol Cell Cardiol*, 48: 490-6.
28. Frangogiannis, N. G. 2020. 'Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis', *Journal of Experimental Medicine*, 217.
29. Frodermann, V., and M. Nahrendorf. 2018. 'Macrophages and Cardiovascular Health', *Physiological Reviews*, 98: 2523-69.
30. Frustaci, A., C. Chimenti, F. Bellocci, E. Morgante, M. A. Russo, and A. Maseri. 1997. 'Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation', *Circulation*, 96: 1180-84.
31. Goette, A., G. Juenemann, B. Peters, H. U. Klein, A. Roessner, C. Huth, and C. Rocken. 2002. 'Determinants and consequences of atrial fibrosis in patients undergoing open heart surgery', *Cardiovascular Research*, 54: 390-96.
32. Gramley, F., J. Lorenzen, C. Knackstedt, O. R. Rana, E. Saygili, D. Frechen, S. Stanzel, F. Pezzella, E. Koellensperger, C. Weiss, T. Munzel, and P. Schauerte. 2009. 'Age-related atrial fibrosis', *Age (Dordr)*, 31: 27-38.
33. Gramley, F., J. Lorenzen, E. Koellensperger, K. Kettering, C. Weiss, and T. Munzel. 2010. 'Atrial fibrosis and atrial fibrillation: The role of the TGF-beta(1) signaling pathway', *International Journal of Cardiology*, 143: 405-13.

34. Guo, Y., G. Y. Lip, and S. Apostolakis. 2012. 'Inflammation in atrial fibrillation', *J Am Coll Cardiol*, 60: 2263-70.
35. Hanna, N., S. Cardin, T. K. Leung, and S. Nattel. 2004. 'Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure', *Cardiovascular Research*, 63: 236-44.
36. Hindricks, G., T. Potpara, N. Dagres, E. Arbelo, J. J. Bax, C. Blomstrom-Lundqvist, G. Boriani, M. Castella, G. A. Dan, P. E. Dilaveris, L. Fauchier, G. Filippatos, J. M. Kalman, M. La Meir, D. A. Lane, J. P. Lebeau, M. Lettino, G. Y. H. Lip, F. J. Pinto, G. N. Thomas, M. Valgimigli, I. C. Van Gelder, B. P. Van Putte, C. L. Watkins, and E. S. C. Scientific Document Group. 2021. '2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC', *Eur Heart J*, 42: 373-498.
37. Ho, S. Y., D. Sanchez-Quintana, J. A. Cabrera, and R. H. Anderson. 1999. 'Anatomy of the left atrium: implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10: 1525-33.
38. Hou, X. Z., G. B. Chen, W. Bracamonte-Baran, H. S. Choi, N. L. Diny, J. Sung, D. Hughes, T. Won, M. K. Wood, M. V. Talor, D. J. Hackam, K. Klingel, G. Davogusto, H. Taegtmeier, I. Coppens, J. G. Barin, and D. Cihakova. 2019. 'The Cardiac Microenvironment Instructs Divergent Monocyte Fates and Functions in Myocarditis', *Cell Reports*, 28: 172-+.
39. Chen, M. C., J. P. Chang, W. H. Liu, C. H. Yang, Y. L. Chen, T. H. Tsai, Y. H. Wang, and K. L. Pan. 2008. 'Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation', *Am J Cardiol*, 102: 861-5.
40. Chen, P. S., C. C. Chou, A. Y. Tan, S. Zhou, M. C. Fishbein, C. Hwang, H. S. Karagueuzian, and S. F. Lin. 2006. 'The mechanisms of atrial fibrillation', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17 Suppl 3: S2-7.
41. Chen, Z. H., N. Zhang, H. Y. Chu, Y. Y. Yu, Z. K. Zhang, G. Zhang, and B. T. Zhang. 2020. 'Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
42. Iacobellis, G. 2022. 'Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology', *Nature Reviews Cardiology*, 19: 593-606.
43. Ihara, K., T. Sasano, Y. Hiraoka, M. Togo-Ohno, Y. Soejima, M. Sawabe, M. Tsuchiya, H. Ogawa, T. Furukawa, and H. Kuroyanagi. 2020. 'A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice', *Scientific Reports*, 10.
44. Jugdutt, B. I. 2003. 'Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways', *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 3: 1-30.
45. Ko, W. C., C. Y. Hong, S. M. Hou, C. H. Lin, E. T. Ong, C. F. Lee, C. T. Tsai, and L. P. Lai. 2011. 'Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Atrial Fibrillation and Angiotensin II-Treated Cardiomyocytes', *Circulation Journal*, 75: 1592-600.
46. Koitabashi, N., M. Arai, S. Kogure, K. Niwano, A. Watanabe, Y. Aoki, T. Maeno, T. Nishida, S. Kubota, M. Takigawa, and M. Kurabayashi. 2007. 'Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis', *Hypertension*, 49: 1120-27.
47. Komatsubara, I., T. Murakami, S. Kusachi, K. Nakamura, S. Hirohata, J. Hayashi, S. Takemoto, C. Suezawa, Y. Ninomiya, and Y. Shiratori. 2003. 'Spatially and temporally different expression of osteonectin and osteopontin in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats', *Cardiovasc Pathol*, 12: 186-94.
48. Kostin, S., G. Klein, Z. Szalay, S. Hein, E. P. Bauer, and J. Schaper. 2002. 'Structural correlate of atrial fibrillation in human patients', *Cardiovasc Res*, 54: 361-79.

49. Kovanen, P. T., and I. Bot. 2017. 'Mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease - Activators and actions', *Eur J Pharmacol*, 816: 37-46.
50. Krystel-Whittemore, M., K. N. Dileepan, and J. G. Wood. 2015. 'Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell', *Front Immunol*, 6: 620.
51. Kučera, T., I. Vyletěl, M. Moravcová, V. Krejčí, Z. Zizka, and M. Jirkovská. 2010. 'Pericyte coverage of fetoplacental vessels in pregnancies complicated by Type 1 diabetes mellitus', *Placenta*, 31: 1120-2.
52. Li, D. S., K. Shinagawa, L. Pang, T. K. Leung, S. Cardin, Z. G. Wang, and S. Nattel. 2001. 'Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure', *Circulation*, 104: 2608-14.
53. Li, Y., Z. Jian, Z. Y. Yang, L. Chen, X. F. Wang, R. Y. Ma, and Y. B. Xiao. 2013. 'Increased Expression of Connective Tissue Growth Factor and Transforming Growth Factor-Beta-1 in Atrial Myocardium of Patients with Chronic Atrial Fibrillation', *Cardiology*, 124: 233-40.
54. Liao, C. H., H. Akazawa, M. Tamagawa, K. Ito, N. Yasuda, Y. Kudo, R. Yamamoto, Y. Ozasa, M. Fujimoto, P. Wang, H. Nakauchi, H. Nakaya, and I. Komuro. 2010. 'Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts', *J Clin Invest*, 120: 242-53.
55. Litvinukova, M., C. Talavera-Lopez, H. Maatz, D. Reichart, C. L. Worth, E. L. Lindberg, M. Kanda, K. Polanski, M. Heinig, M. Lee, E. R. Nadelmann, K. Roberts, L. Tuck, E. S. Fasouli, D. M. DeLaughter, B. McDonough, H. Wakimoto, J. M. Gorham, S. Samari, K. T. Mahbubani, K. Saeb-Parsy, G. Patone, J. J. Boyle, H. B. Zhang, H. Zhang, A. Viveiros, G. Y. Oudit, O. A. Bayraktar, J. G. Seidman, C. E. Seidman, M. Nosedá, N. Hubner, and S. A. Teichmann. 2020. 'Cells of the adult human heart', *Nature*, 588: 466-+.
56. Longden, T. A., G. Zhao, A. Hariharan, and W. J. Lederer. 2023. 'Pericytes and the Control of Blood Flow in Brain and Heart', *Annu Rev Physiol*, 85: 137-64.
57. Lukl, J. 2009. '[How to improve response to cardiac resynchronization therapy?]', *Vnitr Lek*, 55: 808-11.
58. Maisch, B., A. Richter, A. Sandmoller, I. Portig, S. Pankuweit, and B. MBF-Heart Failure Network. 2005. 'Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI)', *Herz*, 30: 535-44.
59. Malavazos, A. E., A. Di Vincenzo, G. Iacobellis, S. Basilico, C. Dubini, L. Morricone, L. Menicanti, T. Luca, A. Giordano, S. Castorina, M. Carruba, E. Nisoli, S. Del Prato, and S. Cinti. 2022. 'The density of crown-like structures in epicardial adipose tissue could play a role in cardiovascular diseases', *Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia Bulimia and Obesity*, 27: 2905-10.
60. Matloch, Z., A. Cinkajzlova, M. Mraz, and M. Haluzik. 2018. 'The Role of Inflammation in Epicardial Adipose Tissue in Heart Diseases', *Curr Pharm Des*, 24: 297-309.
61. Mazurek, T., L. Zhang, A. Zalewski, J. D. Mannion, J. T. Diehl, H. Arafat, L. Sarov-Blat, S. O'Brien, E. A. Keiper, A. G. Johnson, J. Martin, B. J. Goldstein, and Y. Shi. 2003. 'Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators', *Circulation*, 108: 2460-6.
62. Mraz, M., A. Cinkajzlova, J. Klouckova, Z. Lacinova, H. Kratochvilova, M. Lips, M. Porizka, P. Kopecky, A. Pierzynova, T. Kucera, V. Melenovsky, I. Striz, J. Lindner, and M. Haluzik. 2019. 'Coronary Artery Disease Is Associated with an Increased Amount of T Lymphocytes in Human Epicardial Adipose Tissue', *Mediators of Inflammation*, 2019.
63. Nakamura, Y., K. Nakamura, K. Fukushima-Kusano, K. Ohta, H. Matsubara, T. Hamuro, C. Yutani, and T. Ohe. 2003. 'Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis', *Thromb Res*, 111: 137-42.
64. Nguyen, B. L., M. C. Fishbein, L. S. Chen, P. S. Chen, and S. Masroor. 2009. 'Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans', *Heart Rhythm*, 6: 454-60.

65. Nicolas-Avila, J. A., A. Hidalgo, and I. Ballesteros. 2018. 'Specialized functions of resident macrophages in brain and heart', *Journal of Leukocyte Biology*, 104: 743-56.
66. Ogi, H., Y. Nakano, S. Niida, K. Dote, Y. Hirai, K. Suenari, Y. Tonouchi, N. Oda, Y. Makita, S. Ueda, K. Kajihara, K. Imai, T. Sueda, K. Chayama, and Y. Kihara. 2010. 'Is structural remodeling of fibrillated atria the consequence of tissue hypoxia?', *Circ J*, 74: 1815-21.
67. Pierzynova, A., J. Sramek, A. Cinkajzlova, H. Kratochvilova, J. Lindner, M. Haluzik, and T. Kucera. 2019. 'The number and phenotype of myocardial and adipose tissue CD68+cells is associated with cardiovascular and metabolic disease in heart surgery patients', *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29: 946-55.
68. Platonov, P. G., L. B. Mitrofanova, V. Orshanskaya, and S. Y. Ho. 2011. 'Structural abnormalities in atrial walls are associated with presence and persistency of atrial fibrillation but not with age', *J Am Coll Cardiol*, 58: 2225-32.
69. Polyakova, V., S. Miyagawa, Z. Szalay, J. Risteli, and S. Kostin. 2008. 'Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation', *J Cell Mol Med*, 12: 189-208.
70. Porter, K. E., and N. A. Turner. 2009. 'Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling', *Pharmacol Ther*, 123: 255-78.
71. Qu, Y. C., Y. M. Du, S. L. Wu, Q. X. Chen, H. L. Wu, and S. F. Zhou. 2009. 'Activated nuclear factor-kappaB and increased tumor necrosis factor-alpha in atrial tissue of atrial fibrillation', *Scand Cardiovasc J*, 43: 292-7.
72. Rozsivalova, K., A. Pierzynova, H. Kratochvilova, J. Lindner, M. Lips, T. Kotulak, P. Ivak, I. Netuka, M. Haluzik, and T. Kucera. 2020. 'Increased Number of Mast Cells in Epicardial Adipose Tissue of Cardiac Surgery Patients With Coronary Artery Disease', *Physiological Research*, 69: 621-31.
73. Sanders, P., J. B. Morton, N. C. Davidson, S. J. Spence, J. K. Vohra, P. B. Sparks, and J. M. Kalman. 2003. 'Electrical remodeling of the atria in congestive heart failure - Electrophysiological and electroanatomic mapping in humans', *Circulation*, 108: 1461-68.
74. Sims, D. E. 2000. 'Diversity within pericytes', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27: 842-6.
75. Smorodinova, N., L. Lantova, M. Blaha, V. Melenovsky, J. Hanzelka, J. Pirk, J. Kautzner, and T. Kucera. 2015. 'Bioptic Study of Left and Right Atrial Interstitium in Cardiac Patients with and without Atrial Fibrillation: Interatrial but Not Rhythm-Based Differences', *Plos One*, 10.
76. Sonnylal, S., S. W. Xu, P. Leoni, K. Naff, C. S. Van Pelt, H. Nakamura, A. Leask, D. Abraham, G. Bou-Gharios, and B. de Crombrughe. 2010. 'Selective Expression of Connective Tissue Growth Factor in Fibroblasts In Vivo Promotes Systemic Tissue Fibrosis', *Arthritis and Rheumatism*, 62: 1523-32.
77. Sperr, W. R., H. C. Bankl, G. Mundigler, G. Klappacher, K. Grossschmidt, H. Agis, P. Simon, P. Laufer, M. Imhof, T. Radaszkiewicz, D. Glogar, K. Lechner, and P. Valent. 1994. 'The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization', *Blood*, 84: 3876-84.
78. Šmíd, Jiří, and Richard Rokyta. 2017. 'Atrial fibrillation and its relation to cardiac diseases and sudden cardiac death', *Cor et Vasa*, 59: e325-e31.
79. Táborský, M. 2013. *Fibrilace síní: novinky v léčbě 2013* (Axonite CZ).
80. Tilton, R. G., C. Kilo, and J. R. Williamson. 1979. 'Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries', *Microvasc Res*, 18: 325-35.
81. van Kooyk, Y. 2008. 'C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses', *Biochemical Society Transactions*, 36: 1478-81.
82. Varricchi, G., and G. Marone. 2020. 'Mast Cells: Fascinating but Still Elusive after 140 Years from Their Discovery', *Int J Mol Sci*, 21.



83. Wu, L. H., R. W. Emmens, J. van Wezenbeek, W. Stoker, C. P. Allaart, A. B. A. Vonk, A. C. van Rossum, H. W. M. Niessen, and P. A. J. Krijnen. 2020. 'Atrial inflammation in different atrial fibrillation subtypes and its relation with clinical risk factors', *Clinical Research in Cardiology*, 109: 1271-81.
84. Xu, J., G. G. Cui, F. Esmailian, M. Plunkett, D. Marelli, A. Ardehali, J. Odum, H. Laks, and L. Sen. 2004. 'Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation', *Circulation*, 109: 363-68.
85. Xue, J., S. V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M. R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T. C. Freeman, T. Ulas, and J. L. Schultze. 2014. 'Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation', *Immunity*, 40: 274-88.
86. Yamashita, T., A. Sekiguchi, Y. K. Iwasaki, T. Date, K. Sagara, H. Tanabe, H. Suma, H. Sawada, and T. Aizawa. 2010. 'Recruitment of immune cells across atrial endocardium in human atrial fibrillation', *Circ J*, 74: 262-70.
87. Yamashita, T., A. Sekiguchi, S. Suzuki, T. Ohtsuka, K. Sagara, H. Tanabe, T. Kunihara, H. Sawada, and T. Aizawa. 2015. 'Enlargement of the left atrium is associated with increased infiltration of immune cells in patients with atrial fibrillation who had undergone surgery', *J Arrhythm*, 31: 78-82.
88. Zhao, J., T. D. Butters, H. Zhang, A. J. Pullan, I. J. LeGrice, G. B. Sands, and B. H. Smaill. 2012. 'An image-based model of atrial muscular architecture: effects of structural anisotropy on electrical activation', *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5: 361-70.

## Seznam publikací doktoranda:

### Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

1. Aldhoon, B., T. Kučera, N. **Smorodinová**, J. Martínek, V. Melenovský, and J. Kautzner. 2013. 'Associations between cardiac fibrosis and permanent atrial fibrillation in advanced heart failure', *Physiological Research*, 62: 247-55. IF 1.77
2. **Smorodinova, N.**, L. Lantova, M. Blaha, V. Melenovsky, J. Hanzelka, J. Pirk, J. Kautzner, and T. Kucera. 2015. 'Biopic Study of Left and Right Atrial Interstitium in Cardiac Patients with and without Atrial Fibrillation: Interatrial but Not Rhythm-Based Differences', *Plos One*, 10. IF 3.057
3. **Smorodinova, N.**, M. Blaha, V. Melenovsky, K. Rozsivalova, J. Pridal, M. Durisova, J. Pirk, J. Kautzner, and T. Kucera. 2017. 'Analysis of immune cell populations in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation or sinus rhythm', *Plos One*, 12. . IF 2.766

### Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

1. **Smorodinova N**, Kaltner H, Jirsová K, Hrdličková-Cela E, André S, Kučera T, Smetana K Jr, Gabius HJ. Regulatory Impact of Amniotic Membrane Transplantation on Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins-1 and -7 in Corneal Explants from Acanthamoeba Keratitis Patients: Clinical Note. *Curr Eye Res*. 2016 Jun;41(6):740-6 IF 2.025
2. Pathak M, Olstad OK, Drolsum L, Moe MC, **Smorodinova N**, Kalasova S, Jirsova K, Nicolaissen B, Noer A. The effect of culture medium and carrier on explant culture of human limbal epithelium: A comparison of ultrastructure, keratin profile and gene expression. *Exp Eye Res*. 2016 Dec;153:122-132. IF 3.77