

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Plzni  
Ústav anatomie



## **STUDIUM MORFOLOGIE ANEURYZMATU BŘIŠNÍ AORTY**

Autoreferát dizertační práce

Obor: Anatomie, histologie a embryologie

MUDr. Lada Eberlová  
Plzeň 2013



Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Plzni  
Ústav anatomie



## **STUDIUM MORFOLOGIE ANEURYZMATU BŘIŠNÍ AORTY**

Autoreferát dizertační práce

Obor: Anatomie, histologie a embryologie

MUDr. Lada Eberlová  
Plzeň 2013

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního doktorandského studia na Ústavu anatomie a Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni.

**Doktorand:** MUDr. Lada Eberlová, Ústav anatomie LF v Plzni, Karlovarská 48, Plzeň

**Školitel:** prof. MUDr. Jiří Valenta, DrSc., Ústav anatomie LF v Plzni

**Školitel – specialista:** doc. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D., Ústav histologie a embryologie LF v Plzni

**Oponenti:** Prof. MUDr. Josef Stingl, CSc., 3. LF UK v Praze

doc. MUDr. Pavel Šebesta, CSc., Klinikum Chemnitz, SRN a Chirurgická klinika  
2. LF UK

Stanovisko k dizertační práci vypracovalo vedení Ústavu anatomie LF UK v Plzni.

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu  
v oboru Anatomie, histologie a embryologie se koná dne 21. 6. 2013 v 10 hod.

Místo obhajoby: Ústav histologie a embryologie LF v Plzni, Karlovarská 48, Plzeň.

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

### **Prohlášení**

Předkládanou dizertační práci jsem vypracovala samostatně. Všechny použité prameny byly  
řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni dne 23. 4. 2013

MUDr. Lada Eberlová

doc. MUDr. Jitka Kočová, CSc.

předsedkyně komise pro obhajobu dizertačních prací  
studijního programu Anatomie, histologie a embryologie

## Obsah

1	Seznam použitých zkratk	4
2	Úvod do problematiky	5
3	Cíle dizertační práce	6
4	Metodiky	7
4.1	Metodika histopatologické kvantifikace a biochemického zpracování lidských AAA	7
4.2	Histopatologická kvantifikace prasečích AAA ovlivněných atorvastatinem	9
4.3	Metodika přípravy a hodnocení mikrokorozivních preparátů	10
5	Výsledky	10
5.1	Morfologie aneuryzmatu lidské aorty	10
5.2	Morfologie modelu prasečího AAA	13
5.3	Naše zkušenosti s mikrokorozivními preparáty	15
6	Závěr	15
7	Možné pokračování výzkumu	17
8	Přehled publikovaných prací se vztahem ke zkoumané problematice	17
9	Prezentace publikovaných prací	18
10	Použitá literatura	19
11	Souhrn	21
12	Summary	22

### **Práce vznikala za finanční podpory těchto projektů:**

FAD č. 200647

VZ MSM 0021620819

TIP č. TI1/328 MPO

SVV LF UK v Plzni č. 264808

IGA MZ ČR 13326

# 1 Seznam použitých zkratek

AA – plošný podíl (area fraction, area per area)

AAA – aneuryzma abdominální aorty

$\alpha$ -SM aktin – izoforma aktinu typická pro myofibrily buněk hladké svaloviny

cP – Centipoise, jednotka dynamické viskozity

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

ELISA – imunologická metoda využívající vazby enzymu na specifickou protilátku (enzyme-linked immunosorbent assay)

f – relativní vzdálenost cévy od adventicie

ICAM-1 – mezibuněčná adhezivní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)

IL – interleukin

IMT – tloušťka intimy a medie

INF- $\gamma$  – interferon gama

IT – tloušťka intimy

LA – délková hustota

KOH – hydroxid draselný

mikro-CT – vysokorozlišovací výpočetní tomografie (micro-computed tomography)

mikro-PET – vysokorozlišovací pozitronová emisní tomografie (micro-perfusion tomography)

MMP – matrix metaloproteináza (matrix metalloproteinase)

PAI-1 – inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1 (plasminogen activator inhibitor-1)

QA – mikrovazální hustota (quantity per area, microvessel density)

TIMP – tkáňový inhibitor metaloproteináz (tissue inhibitor of metalloproteinases)

tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator)

uPA – urokinázový aktivátor plazminogenu (urinary plasminogen activator)

VCAM-1 – vaskulární adhezivní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

xMAP technologie – technologie pro multiplexní molekulární analýzy

## 2 Úvod do problematiky

Aneuryzma (výduť) je ohraničené rozšíření tepny způsobené strukturálními změnami její stěny. Tepenná aneuryzmata se vyskytují v celém arteriálním stromu, extrakraniální výduť postihují predilekčně infrarenální aortu a jsou často spojena s pokročilou aterosklerotickou degenerací. Rozlišujeme pravé aneuryzma, které je definované jako permanentní, lokalizovaná dilatace všech vrstev cévní stěny se zvětšením průměru na alespoň 1,5 násobek normy. U břišní aorty diagnóze aneuryzmatu odpovídá průměr větší než 3 cm. Etiologie je u většiny případů nejasná, roli zde hraje pravděpodobně i autoimunní a genetická dispozice [1].

Aneuryzma břišní aorty (AAA) je velmi závažné onemocnění. Většinou totiž probíhá asymptomaticky a jeho prvním příznakem bývá nezřídka ruptura. Tou končí asi čtvrtina neléčených AAA [2], celková mortalita ruptur se pohybuje kolem 70 % [3]. Růst AAA však není lineární [4], vývoj onemocnění proto nelze s jistotou předvídat. Protože se riziko ruptury zvyšuje s velikostí aneuryzmatu [5], je snahou kliniků diagnostikovat onemocnění v co nejčasnějším stádiu. Operační zákrok je běžně indikován u asymptomatických aneuryzmat od velikosti 5,5 cm, kdy riziko ruptury převyšuje riziko perioperační mortality [6]. Vzniká proto značný prostor pro farmakologické ovlivnění časně zachycených AAA.

Výzkumu etiopatogeneze [7] a cílené farmakologické intervenci byla v posledních letech věnována velká pozornost [8, 9]. Studium kroků patogeneze AAA vychází buď ze zkoumání tkání pacientů operovaných s pokročilou aneuryzmatickou degenerací nebo experimentálních animálních modelů. Specifická etiologie AAA zůstává ale nejasná. Obecně je akceptováno, že se na vzniku a růstu AAA podílejí rizikové faktory spolu s genovým polymorfismem imunoregulačních genů, metaloproteináz a cytokinů. Jako iniciační se předpokládá léze aortální stěny. Hlavními patologickými procesy vedoucími k dilataci aorty jsou zánětlivá reakce spolu s navazující imunitní odpovědí, degradace proteinů extracelulární matrix, biomechanický stres a genetické vlivy. Pravé AAA vzniká nejčastěji jako komplikace dilatační formy aterosklerózy. Někteří autoři na ně nahlíží jako na specifický typ aterotrombózy [7], u které progresivní degenerace vede k dilataci a ruptuře. Aneuryzmatická degenerace zahrnuje několik vzájemně propojených procesů: chronický zánět spojený s neovaskularizací, fragmentací elastinu a jeho náhradou kolagenem, dále s úbytkem a fenotypovou modulací buněk hladké svaloviny v medii. Ve většině AAA je přítomen nástěnný trombus [10], jeho vliv na progresi AAA byl také intenzivně zkoumán [7]. Zevrubný histologický popis AAA byl uveden již v předchozích publikacích z našich pracovišť [11, 12]. Aplikace stereologických metod však umožnila přinést do této problematiky nový vhled [13–16].

Epidemiologický profil AAA doznává v posledních letech změn. Výsledky nejnovějších epidemiologických studií ukazují nejvyšší výskyt malých AAA (průměr < 4 cm). Výstupy ukazují, že v zemích se zavedeným skríníngem došlo ke snížení prevalence i mortality tohoto onemocnění [17]. Nově vyvstala potřeba standardizace měření aneuryzmatu [18], jako i opakovaného sonografického vyšetření u pacientů s průměrem aorty mezi 25–29 mm [19]. Výsledky studií dále ukazují, že prevalence i incidence AAA jsou populačně specifické a dynamické nejen v důsledku měnících se demografických parametrů, ale i míry expozice rizikovým faktorům [17].

### 3 Cíle dizertační práce

I přes usilovný výzkum není doposud jednoznačně prokázáno, které procesy a změny nejvíce ovlivňují progresi a tím i prognózu AAA. Jejich identifikace by mohla pomoci nalézt markery progresu a možných komplikací tohoto onemocnění, a přispět tak k indikaci vhodné terapie. Znalost patogeneze AAA pak může pomoci při hledání účinné farmakoterapie. Cílem našich studií i této dizertační práce bylo přispět k osvětlení patogeneze AAA sledováním histopatologických rozdílů mezi aortou normální a aneuryzmatickou (I, II), jako i sledováním změn stavby stěny v závislosti na symptomatologii a velikosti AAA (I) a účincích statinu (II). Dále jsme se pokusili optimalizovat protokol pro získání korozivních preparátů mikrocév (III). Jejich vizualizace v mikro-CT nabízí rozlišení odpovídající běžným histologickým metodám vč. kvantifikace nebo 3D rekonstrukce. Analýza mikro-CT skenů by mohla být velmi přínosnou pro další výzkum vasa vasorum aorty, jejichž význam v progresi AAA byl opakovaně prokázán a potvrdily ho i naše výsledky.

#### I. Kvantitativní histopatologie vzorků lidských AAA

V naší prospektivní nerandomizované studii Eberlová et al. 2013 [15] jsme navázali na studii z roku 2002 [11]. Ve vzorcích AAA stěn (n = 65), trombů (n = 55) a kontrolních aort (n = 6) odebraných z infrarenální aorty pacientů operovaných na Chirurgické klinice FN v Plzni jsme s použitím stereologických metod a imunoanalýzy zjišťovali rozdíly mezi kvantitativními histopatologickými parametry normální a aneuryzmatické aorty, porovnávali jsme zánětlivý infiltrát stěny a naléhajícího trombu, dále jsme sledovali histopatologické změny v závislosti na velikosti a symptomatologii AAA.

Ve statistické analýze získaných dat jsme testovali následující **nulové hypotézy**:

- Mezi kvantitativními histopatologickými parametry normální a aneuryzmatické aorty není rozdíl.
- Zánětlivý infiltrát stěny a naléhajícího trombu se neliší.
- Kvantitativní histopatologické parametry AAA se s velikostí aneuryzmatu nemění.
- Kvantitativní histopatologické parametry AAA se nemění se symptomatologií tohoto onemocnění.
- Histopatologická a imunoanalytická data spolu nekorelují.

#### II. Kvantitativní histopatologie experimentálního modelu AAA u prasete, jeho ovlivnění atorvastatinem

V kvantitativní histopatologické studii Houdek et al. [16] jsme sledovali vliv atorvastatinu na experimentálně vyvolané AAA, které bylo indukované u prasete kombinací účinku prasečí elastázy a stenozující manžety [20]. Získaná data nám umožnila porovnat odlišnost stavby stěny tohoto animálního modelu od normálních prasečích aort (n = 6) a sledovat změny struktury aneuryzmatické stěny po 28 denním podávání atorvastatinu u statiny ovlivněné (n = 14) a kontrolní skupiny (n = 13) prasat.

Testované **nulové hypotézy**:

- Mezi strukturou normální prasečí aorty, stěnou prasečí aorty s indukovaným AAA bez a s podáním atorvastatinu není rozdíl.



- Histopatologická data spolu nekorelují.

## **II. Optimalizace protokolu pro získání korozivního preparátu cévního mikrořečiště, využití mikro-CT zobrazení**

Nižší vaskularita břišní aorty bývá uváděna jako jeden z možných důvodů predilekce aneuryzmat v této části srdečnice [21]. Nám se podařilo najít jen jedinou studii srovnávající vasa vasorum hrudní a břišní aorty [22]. Autoři pro jejich zobrazení použili nástřík rentgen-contrastní látkou po předchozím podvazu odstupujících tepen a následném vynětí aorty z retroperitonea. Při hledání metodiky pro morfologickou studii vasa vasorum aorty jsme využili možnosti mikro-CT vyšetření na Západočeské univerzitě v Plzni [23]. Po vzoru jiných [24, 25, 26] jsme se pokusili použít mikro-CT zobrazení u korozivního preparátu. V dizertační práci uvádíme optimalizovaný protokol přípravy korozivního preparátu plicních cév myši a portálního řečiště jater prasete, srovnání testovaných pryskyřic a pilotní výsledky mikro-CT vyšetření.

## **4 Metodiky**

### **4.1 Metodika histopatologické kvantifikace a biochemického zpracování lidských AAA**

Ve studii Eberlová et al. 2013 [15] jsme hodnotili vzorky infrarenálních aort od 65 pacientů (z toho bylo 51 mužů, 14 žen) a 55 naléhajících trombů. Tkáně jsme získali od pacientů operovaných pro aterosklerotické AAA na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Plzeň, vzorky byly odebírány z přední části aneuryzmatického vaku. 6 normálních abdominálních aort pocházelo od orgánových dárců. Průměrný věk pacientů byl 73 let, průměrný věk dárců 47 let. Podle symptomatologie byli pacienti rozděleni do skupin AAA asymptomatických ( $n = 44$ ), symptomatických ( $n = 7$ ) a ruptur ( $n = 14$ ). Za symptomatické byli považováni pacienti s lumbagií, bolestí břicha, palpační bolestivostí nebo periferní embolizací. Podle velikosti byli pacienti rozděleni do skupiny malých ( $< 5\text{cm}$ ), středních ( $5\text{--}7\text{ cm}$ ) a velkých AAA ( $> 7\text{ cm}$ ). Velikost vaku byla měřena v nejširším místě výdutě CT angiografií.

Histopatologii získaných vzorků jsme hodnotili podle předem zvoleného postupového schématu. Výběr tkáně, roviny krájení, histologického barvení, následné focení i interaktivní hodnocení byly prováděny tak, aby byla ve všech krocích zajištěna náhodnost výběru a zároveň dostatek dat pro nevyčýlené odhady. Pro detekci hodnocených struktur byly použity histo- nebo imunohistochemické metody (tabulka 4.1). Pro kvantifikaci jednotlivých parametrů jsme použili interaktivní značení průsečíků hodnocených struktur s náhodně přiloženou mřížkou, data byla zpracována v softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovensko). Získané spojité proměnné jsme použili pro následnou statistickou analýzu.

Přehled proteinů hodnocených ve stěně a plazmě pacientů s AAA ukazuje tabulka 4.2. Pro měření bylo použito multiplexní imunoanalýzy (xMAP technologie) založené na principu průtokové fluorometrie a sekundární protilátce značené fluorescenční molekulou. TIMP-1 a TIMP-2 byly měřeny metodou ELISA.

**Tabulka 4.1** – Přehled hodnocených veličin, referenčních ploch a použitých markerů ve studii lidských AAA [15]

<b>měřená veličina (objekt)</b>	<b>referenční plocha</b>	<b>použité barvení nebo imunogen</b>
<b>plošný podíl elastinu</b> A <sub>A</sub> (elastin)	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>délková hustota elastinu</b> L <sub>A</sub> (elastin)	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>plošný podíl kolagenu</b> A <sub>A</sub> (kolagen)	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>plošný podíl granulocytů</b> A <sub>A</sub> (granulocyty)	intima + media + adventicie, <b>trombus</b>	myeloperoxidáza granulocytů
<b>plošný podíl makrofágů</b> A <sub>A</sub> (makrofágy)	intima + media + adventicie, <b>trombus</b>	makrofágový kalprotektin
<b>plošný podíl aktinu</b> A <sub>A</sub> (aktin)	intima + media	α-SM aktin
<b>plošný podíl desminu</b> A <sub>A</sub> (desmin)	intima + media	desmin
<b>plošný podíl vimentinu</b> A <sub>A</sub> (vimentin)	intima + media	vimentin
<b>plošný podíl PAI-1</b> A <sub>A</sub> (PAI-1)	intima + media + adventicie	C-9
<b>plošný podíl uPA</b> A <sub>A</sub> (uPA)	intima + media + adventicie	C-20
<b>plošný podíl tPA</b> A <sub>A</sub> (tPA)	intima + media + adventicie	C-16
<b>mikrovazální hustota</b> Q <sub>A</sub>	intima+media+adventicie	CD-31

**Tabulka 4.2** – Přehled proteinů měřených ve tkáni a plazmě metodou multiplexové imunoanalýzy [15]:

IL-6, -8, -10, -12
MMP-1, -2, -7, -9
ICAM, VCAM, E-selektin
VEGF, EGF
TIMP-1, -2
Osteoprotegerin, adiponektin

## 4.2 Histopatologická kvantifikace prasečích AAA ovlivněných atorvastatinem

Ve studii Houdek et al. [16] bylo experimentální aneuryzma u prasat domácích (průměrná hmotnost 25 kg, stáří 70–75 dní) vytvořeno kombinací účinku prasečí elastázy a stenozující manžety [20]. Přeživší zvířata ( $n = 27$ ) byla následně rozdělena do dvou skupin. Statinové skupině ( $n = 14$ ) byl po následující čtyři týdny podáván atorvastatin v dávce 1 mg/kg/den (Atorvastatin Ratiopharm 20 mg, KRKA, d.d., Novo Mesto, Slovenia). Druhá skupina ( $n = 13$ ) byla ponechána bez medikace. Na konci druhého a čtvrtého týdne byl zvířatům obou skupin ultrasonograficky měřen maximální rozměr aneuryzmatu. Na konci čtvrtého týdne byla zvířata utracena a byly odebrány vzorky subrenální aorty k histopatologickému hodnocení. Přehled kvantifikovaných parametrů ukazuje tabulka 4.3:

**Tabulka 4.3** – Přehled hodnocených veličin, referenčních ploch a použitých markerů ve studii prasečích AAA [16]

měřená veličina (objekt)	referenční plocha	použité barvení nebo imunogen
<b>plošný podíl elastinu</b> $A_A(\text{elastin})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>délková hustota elastinu</b> $L_A(\text{elastin})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>plošný podíl kolagenu</b> $A_A(\text{kolagen})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
<b>plošný podíl granulocytů</b> $A_A(\text{granulocyty})$	intima + media + adventicie	myeloperoxidáza granulocytů
<b>plošný podíl makrofágů</b> $A_A(\text{makrofágy})$	intima + media + adventicie	makrofágový kalprotektin
<b>plošný podíl aktinu</b> $A_A(\text{aktin})$	intima + media	$\alpha$ -SM aktin
<b>plošný podíl desminu</b> $A_A(\text{desmin})$	intima + media	desmin
<b>plošný podíl vimentinu</b> $A_A(\text{vimentin})$	intima + media	vimentin
<b>mikrovazální hustota</b> $Q_A$	intima + media + adventicie	CD-31
<b>tloušťka intimy a medie</b> IMT		
<b>tloušťka intimy</b> IT		
<b>relativní vzdálenost cévy od adventicie (<math>f</math>)</b>		

### 4.3 Metodika přípravy a hodnocení mikrokorozivních preparátů

Obecným principem korozivního preparátu je naplnění dutiny polymerizujícím materiálem a následné odleptání okolních tkání. Korozivní preparát je tedy odlitkem lumina. Mikrovaskulární preparát cílí na úroveň kapilárního řečiště a mikrocév, tedy cév průměru pod cca 70  $\mu\text{m}$ . Postup přípravy korozivního preparátu ukazuje tabulka 4.4.

**Tabulka 4.4** – Přehled kroků přípravy korozivního preparátu u zvířete

krok	upřesnění
1. <b>premedikace</b>	heparinizace zvířete
2. <b>anestézie</b> (usmrcení)	
3. <b>výplach řečiště</b>	heparinizovaným iontovým roztokem fyziologické osmolality, teploty, pH
4. <b>injikace pryskyřice</b>	
5. <b>polymerace</b>	ve vodní lázni 12–24 hodin při teplotě 40–60 °C
6. <b>macerace</b>	24–48 hod v 10% roztoku KOH
7. <b>vymytí preparátu a sušení preparátu</b>	
8. <b>mikro-CT zobrazení</b>	velikost vzorku by měla být 500-1000krát větší než velikost požadovaného detailu

## 5 Výsledky

### 5.1 Morfologie aneuryzmatu lidské aorty

Výsledky naší studie Eberlová et al. 2013 [15] nás vedou k zamítnutí všech výchozích nulových hypotéz, obrázek 5.1:

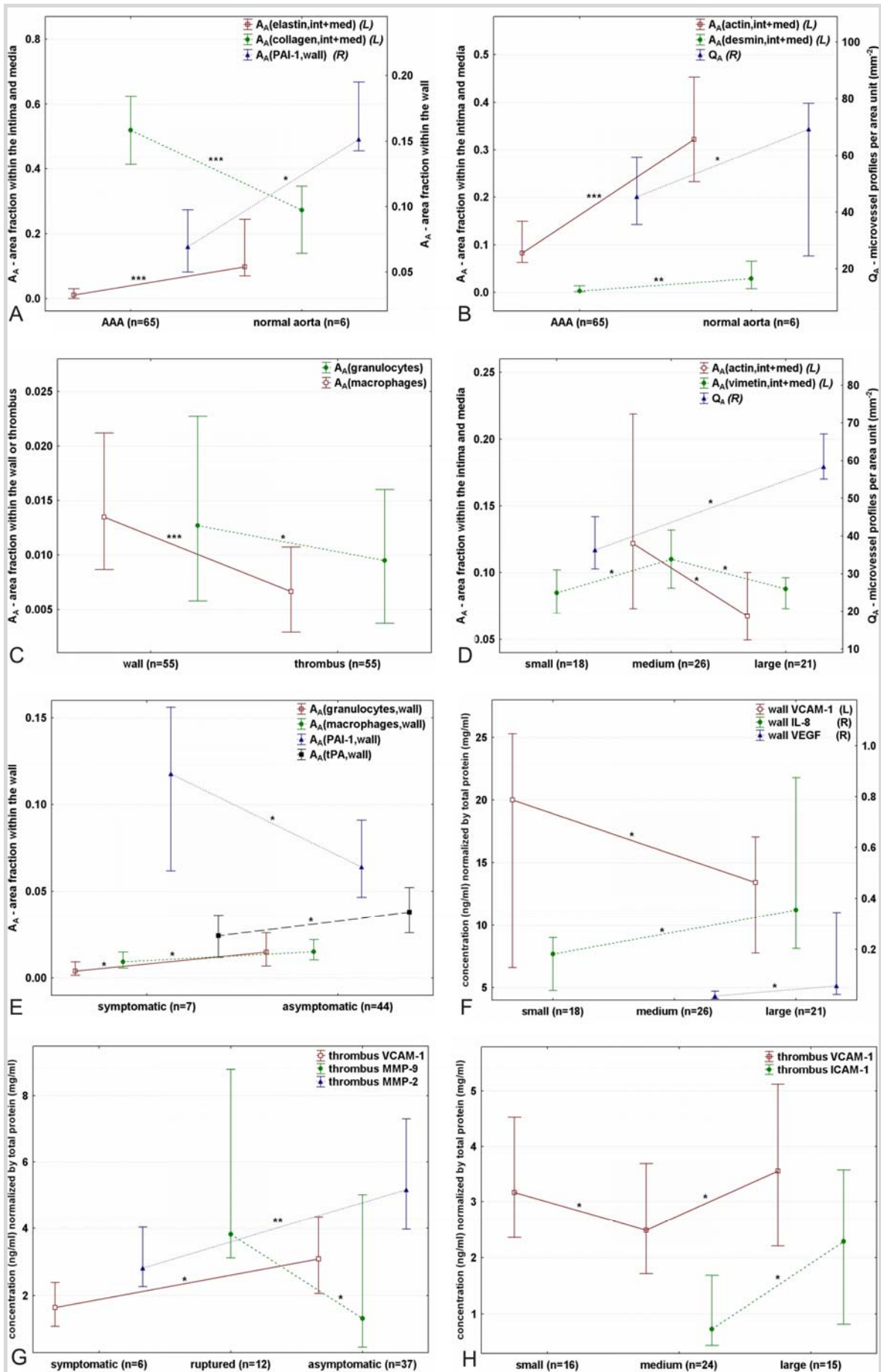
- Stěna normální aorty obsahuje ve srovnání s aneuryzmatickými vzorky více kontraktilních elementů, více elastinu a vyšší množství PAI-1. Podíl kolagenu byl naopak vyšší ve vzorcích aneuryzmatických aort. Normální aorta je více vaskularizovaná.
- Aneuryzmatická stěna vykazovala ve srovnání s naléhajícím trombem větší zánětlivý infiltrát.
- Plošný podíl aktinu a vimentinu je nejvyšší u středně velkých aneuryzmat (5–7 cm), počet profilů mikrocév se s velikostí AAA zvyšuje, nejvíce vaskularizovaná jsou velká aneuryzmata (> 7 cm). Ve stěně aneuryzmatu této skupiny pacientů jsme prokázali i zvýšenou expresi VEGF a IL-8, v trombu pak zvýšenou expresi VCAM-1 a ICAM-1. Množství VCAM-1 bylo vyšší ve stěně pacientů s malým AAA (< 5 cm).

- Plošný podíl granulocytů a makrofágů byl překvapivě vyšší u pacientů s asymptomatickým AAA. Tato skupina pacientů vykazovala i zvýšenou fibrinolýzu – ve stěně asymptomatických pacientů jsme prokázali nižší plošný podíl PAI-1 a naopak vyšší pozitivitu tPA. V trombu asymptomatických pacientů byla vyšší exprese VCAM-1 a MMP-2, hladina MMP-9 byla vyšší v trombu pacientů s rupturou.

**Tabulka 5.1** – Přehled Spearmanových koeficientů korelace  $R > 0,4$  při  $p < 0,05$  u kvantitativních parametrů hodnocených ve stěně (trombu) lidských AAA ve studii Eberlová et al. 2013 [15]

	$A_A(\text{elastin}),$ <i>int+med</i>	$A_A(\text{granulocyty}),$ <i>stěna</i>	$Q_A,$ <i>stěna</i>	$A_A(\text{aktin}),$ <i>int+med</i>	$A_A(\text{desmin}),$ <i>int+med</i>	$A_A(\text{vimentin}),$ <i>int+med</i>	$A_A(\text{granulocyty}),$ <i>trombus</i>	$IL-6,$ <i>stěna</i>	$IL-8,$ <i>trombus</i>	$MMP-1,$ <i>trombus</i>	$TIMP-1,$ <i>trombus</i>	$TIMP-2,$ <i>stěna</i>
$L_A(\text{elastin}),$ <i>int+med</i>	<b>0,94</b>	n.s.	n.s.	0,35	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,37
$A_A(\text{elastin}),$ <i>int+med</i>	-	n.s.	n.s.	0,32	0,35	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,35
$A_A(\text{kolagen}),$ <i>int+med</i>	-	n.s.	n.s.	-0,30	n.s.	n.s.	n.s.	-0,36	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$A_A(\text{makrofágy}),$ <i>stěna</i>	-	<b>0,43</b>	0,39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$A_A(\text{granulocyty}),$ <i>stěna</i>	-	-	<b>0,46</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,43</b>	n.s.	<b>0,47</b>	n.s.	<b>-0,44</b>
$Q_A,$ <i>stěna</i>	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,32	n.s.	n.s.
$A_A(\text{aktin}),$ <i>int+med</i>	-	-	-	-	0,37	0,33	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,44</b>	n.s.
$A_A(\text{desmin}),$ <i>int+med</i>	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,33	n.s.
$A_A(\text{makrofágy}),$ <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	<b>0,41</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$A_A(\text{granulocyty}),$ <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	<b>0,42</b>	n.s.	n.s.	n.s.
$IL6,$ <i>stěna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	<b>-0,48</b>
$IL8,$ <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31	n.s.	n.s.
$MMP-1,$ <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.
$MMP-2,$ <i>stěna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35	n.s.

**Obrázek 5.1** » Kvantitativní histopatologie aortální stěny a trombu [15]. Označen medián a interkvartilové rozpětí (25.–75. percentil). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . A, B: plošný podíl elastinu, kolagenu, aktinu a desminu v intimě a medii (L = levá osa); plošný podíl PAI-1 a počet profilů mikrocév na jednotku plochy ve stěně (R = pravá osa). C: Porovnání plošného podílu makrofágů a granulocytů ve stěně a v naléhajícím trombu. D: Plošný podíl aktinu a vimentinu ve stěně (levá osa) a počet profilů mikrocév na jednotku plochy (pravá osa) v malých, středních a velkých AAA. E: Plošný podíl granulocytů, makrofágů, PAI-1 a tPA ve stěně symptomatických a asymptomatických AAA. F, G, H: Koncentrace proteinů IL-8, VEGF, MMP-2, MMP-9, VCAM-1 a ICAM-1 v homogenátech AAA stěny (F) a naléhajícího trombu (G, H).



## 5.2 Morfologie modelu prasečího AAA

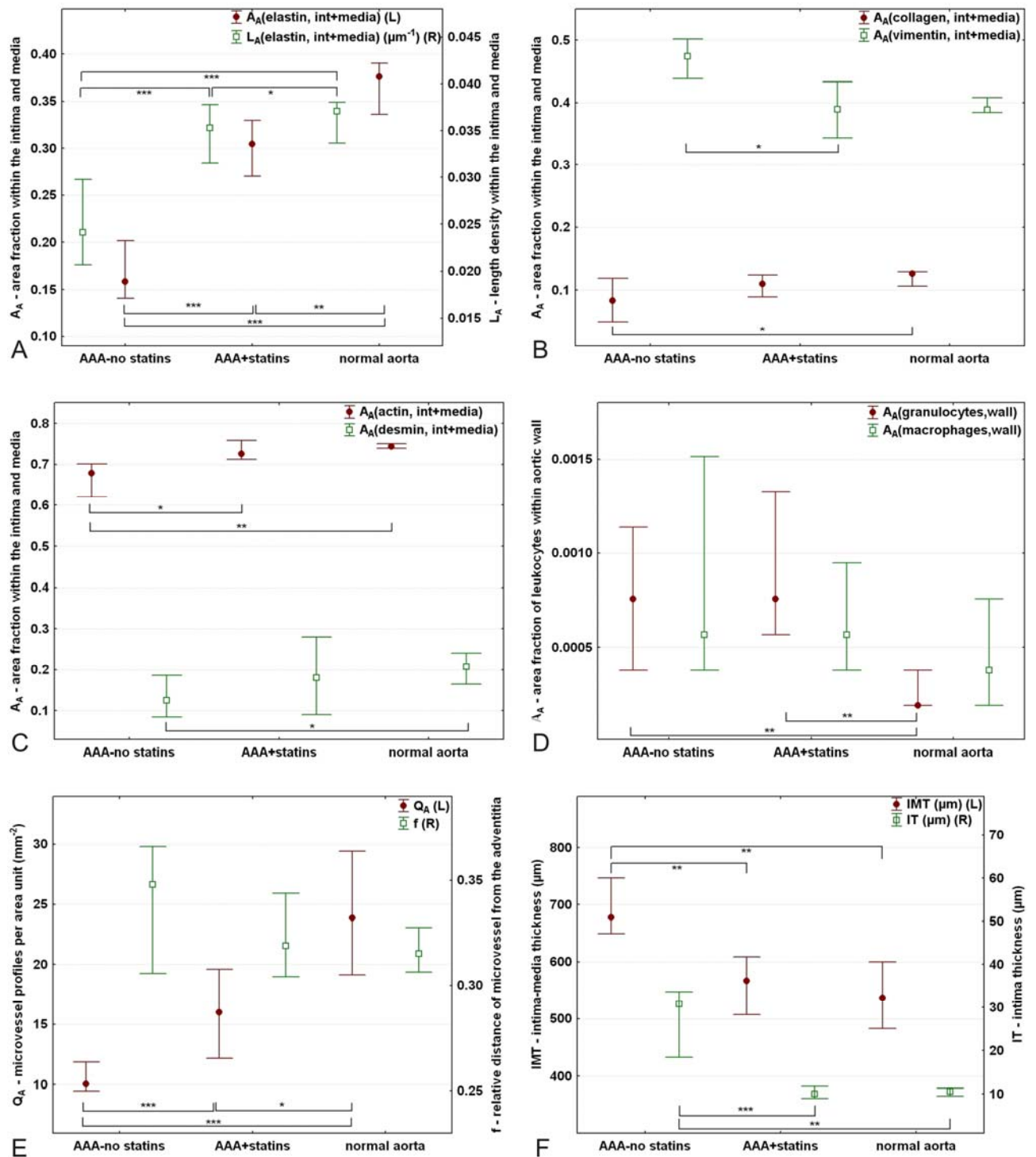
Také výsledky studie Houdek et al. [16, 26] zkoumající vliv atorvastatinu na experimentálně vytvořené AAA u prasete nás vedou k zamítnutí obou nulových hypotéz (obrázek 5.2). Intima a medie normální aorty obsahuje nejen více elastinu, ale i kolagenu, aktinu a desminu. Atorvastatinem neovlivená aneuryzmata vykazují ve stejné referenční ploše vyšší vimentin pozitivitu. Ve stěně stejné skupiny vzorků jsme prokázali větší zánětlivý infiltrát, ztluštělou intimu i medii. Hustota vasa vasorum byla větší ve stěně normálních aort, jejich distribuce blíže adventicii. Aorta statinem ovlivněných prasat obsahovala více elastinu, více kontraktálních elementů, méně vimentinu. Také hustota cévních profilů byla vyšší u statiny ovlivněné skupiny, jejich distribuce převažovala v zevní vrstvě aorty. Atorvastatin zabránil vzniku neointimy, zmírnil zbytnění medie i růst aneuryzmatu. Zánětlivý infiltrát se statinovou léčbou překvapivě nezměnil.

Tabulka 5.2 ukazuje přehled středně silně a silně korelujících kvantitativních parametrů [16]. Množství elastinu v intimě a medii korelovalo pozitivně s plošným podílem aktinu ve stejné referenční ploše, plošný podíl aktinu pak koreloval pozitivně s plošným podílem desminu. Počet mikrocév ve stěně prasečího AAA koreloval pozitivně s množstvím elastinu a aktin-pozitivních elementů v intimě a medii. Tloušťka intimy a medie korelovala pozitivně s plošným podílem makrofágů ve stěně AAA a vimentin-pozitivních buněk v intimě a medii. Naopak, čím více bylo ve stěně mikrocév, tím tenčí byla intima a medie. Tloušťka intimy a medie negativně korelovala s plošným podílem elastinu a kolagenu, tloušťka samotné intimy pak s plošným podílem elastinu a aktinu v intimě a medii. Tloušťka intimy pozitivně korelovala s tloušťkou intimy a medie.

**Tabulka 5.2** – Přehled Spearmanových koeficientů korelace  
 $R > 0,4$  při  $p < 0,05$  u kvantitativních parametrů hodnocených ve stěně elastázou  
indukovaných prasečích AAA [16]

	$L_A$ (elastin) <i>int+med</i>	$A_A$ (aktin) <i>int+med</i>	$A_A$ (desmin) <i>int+med</i>	$Q_A$	$f$	IMT	IT
$A_A$ (elastin), <i>int+med</i>	<b>0,83</b>	<b>0,58</b>	n.s.	<b>0,66</b>	-0,33	<b>-0,42</b>	<b>-0,54</b>
$A_A$ (kolagen), <i>int+med</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,31	<b>-0,49</b>	n.s.
$L_A$ (elastin), <i>int+med</i>	-	<b>0,58</b>	n.s.	<b>0,43</b>	n.s.	n.s.	<b>-0,52</b>
$A_A$ (aktin), <i>int+med</i>	-	-	<b>0,52</b>	<b>0,54</b>	n.s.	n.s.	<b>-0,46</b>
$A_A$ (desmin), <i>int+med</i>	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$A_A$ (vimentin), <i>int+med</i>	-	-	-	n.s.	n.s.	<b>0,44</b>	n.s.
$A_A$ (granulocyty), <i>stěna</i>	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$A_A$ (makrofágy), <i>stěna</i>	-	-	-	n.s.	n.s.	<b>0,47</b>	n.s.
$Q_A$	-	-	-	-	n.s.	<b>-0,57</b>	n.s.
$f$	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.
IMT	-	-	-	-	-	-	<b>0,59</b>

$A_A$  – plošný podíl,  $L_A$  – délková hustota,  $Q_A$  – mikrovazální hustota,  $f$  – relativní vzdálenost mikrocév od adventicie, IMT – tloušťka intimy a medie, IT – tloušťka intimy, *int+media* – intima a media, n.s. – nesignifikantní korelace ( $|R| < 0,3$ )



**Obrázek 5.2** [16] – Kvantitativní hodnocení stěny normální, aneuryzmatické a atorvastatinem ovlivněné prasečí aorty. Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . **A.** Plošný podíl (levá osa) a délková hustota (pravá osa) elastinu v intimě a medii. Plošný podíl kolagenu a vimentinu (**B**), aktinu a desminu (**C**) v intimě a medii. **D.** Plošný podíl granulocytů a makrofágů ve stěně porovnávaných skupin. **E.** Mikrovazální hustota (levá osa) a relativní vzdálenost mikrocév vasa vasorum od adventicie (pravá osa). Tloušťka intimy (pravá osa) a intimy + + medie (levá osa).



### 5.3 Naše zkušenosti s mikrokorozivními preparáty

V rámci optimalizace protokolu přípravy korozivního preparátu cévního mikrořečiště vhodného pro následné mikro-CT zobrazení jsme testovali tři polymery: Mercox II, Biodur E20 a Microfil MV-120. K testování byla použita myš Wild, B6CBA a prase domácí. Biodur E20 se ukázal nejvhodnější pro velkoobjemové preparáty (tabulka 5.3). S ním se nám podařilo vytvořit preparát jaterní mikrocirkulace, prokázali jsme u něho i výbornou radioopacitu. Naše výsledky ukázaly, že mikro-CT snímky mohou být použity pro účely interaktivní kvantifikace nebo 3D rekonstrukce.

Tabulka 5.3 – Příklady odlitkových médií a jejich vlastnosti

název, výrobce	druh nástřikové látky	viskozita (cP)	manipulační čas	další vlastnosti
<b>Mercox II</b> <i>Ladd Research, Williston, Vermont, USA</i>	akrylátová pryskyřice	10–15	velmi variabilní, v řádech minut	Mercox II je dvousložková pryskyřice, její hlavní výhodou je snadná manipulace. Zásadní nevýhodou je ale velmi měnlivý manipulační čas. Maximální objem vhodný k nástřiku je 20 ml, u vyššího objemu vzniká extrémní exotermická reakce. Pro mikro-CT jeví hraniční radioopacitu.
<b>Biodur E20</b> <i>Biodur products, Heidelberg, Germany</i>	epoxidová pryskyřice	výrobce neuvádí	40 minut	Výhodou Bioduru E20 je ohebnost zpolymerované pryskyřice, dlouhý manipulační čas a relativně nízká cena. Pro mikro-CT má výbornou radioopacitu.
<b>Microfil MV-120</b> <i>Flow Tech, Inc., Carver, Massachusetts, USA</i>	olovem obohacený silikon	25	20 minut	Není vhodný pro korozivní zpracování. Výhodou je velmi vysoká radioopacita.

## 6 Závěr

### I. Kvantitativní histopatologie vzorků lidských AAA [15]

Výsledky naší studie nás vedou k zamítnutí všech výše uvedených hypotéz. Stěna normální aorty obsahovala ve srovnání s aneuryzmatickými vrozky více kontraktilních elementů, více elastinu a vyšší množství inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1. Podíl kolagenu byl naopak vyšší ve vzorcích aneuryzmatických aort. Normální aorta byla více vaskularizovaná než stěna aneuryzmatická. Aneuryzmatická stěna vykazovala ve srovnání s naléhajícím trombem větší zánětlivý infiltrát. Plošný podíl aktinu a vimentinu byl nejvyšší u středně velkých aneuryzmat (5–7 cm), počet profilů mikrocév se s velikostí AAA zvyšoval, nejvíce vaskularizovaná byla velká aneuryzmata (> 7 cm). Ve stěně

aneuryzmatu této skupiny pacientů jsme prokázali i zvýšenou expresi VEGF a IL-8, v trombu pak zvýšenou expresi VCAM-1 a ICAM-1. VCAM-1 bylo nejvyšší ve stěně pacientů s malým AAA (< 5 cm).

Jako nejvýznamnější hodnotíme výsledky spojené s analýzou vzorků aort asymptomatických pacientů. Ty vykazovaly ve srovnání se symptomatickými pacienty vyšší plošný podíl granulocytů, makrofágů jako i tkáňového aktivátoru plazminogenu, exprese PAI-1 byla naopak nižší. V trombu asymptomatických pacientů jsme prokázali vyšší hladinu MMP-2 a VCAM-1, množství MMP-9 bylo zvýšeno v trombu pacientů s rupturou. Lze tedy shrnout, že asymptomatická aneurysmata vykazují větší zánětlivý infiltrát i zvýšenou fibrinolýzu, ačkoli více než 80 % těchto pacientů bylo v době operace léčeno léky s protizánětlivým účinkem.

## II. Kvantitativní histopatologie experimentálního modelu AAA u prasete, jeho ovlivnění atorvastatinem [16]

I v této studii naše výsledky umožnily zamítnutí všech nulových hypotéz. Kvantitativní histopatologické vyšetření ukázalo, že ve skupině statiny ovlivněných prasat byla destrukce elastinu menší, podíl kontraktilních VSMC byl naopak vyšší než u prasat neléčených. Aplikace atorvastatinu zmenšila zesílení aortální stěny a naopak zvýšila hustotu vasa vasorum, jejich distribuce v aortální stěně se ukázala četnější v adventicii a médiu. Zánětlivý infiltrát byl v obou skupinách bez signifikantního rozdílu. Lze shrnout, že naše výsledky prokazují převážně příznivé účinky atorvastatinu na stěnu AAA, aorta zvířat ovlivněných statiny vykazovala histologický obraz cévní stěny méně destruované, stabilnější a bližší normální aortě. Výsledky ukazují také rozdíl mezi stavbou lidských AAA a elastázou indukovaného prasečího AAA. Zatímco ve vzorcích lidského AAA bylo ve srovnání s normální aortou více kolagenu, u prasat s indukovaným aneurysmatem byl plošný podíl kolagenu ve ztlustělé intimě a médiu nižší než u zdravých zvířat. Dále byl ve stěně experimentálního aneurysmatu vyšší plošný podíl granulocytů a makrofágů. V neposlední řadě jsme u prasečích aneurysmat nezaznamenali přítomnost trombu, ten ale doprovází většinu lidských AAA. Naopak hustota vasa vasorum byla shodně vyšší u normálních aort lidských i prasečích.

## III. Optimalizace protokolu pro získání korozivního preparátu cévního mikrořečiště, využití mikro-CT zobrazení [22, 27]

Ze dvou testovaných pryskyřic vychází ve všech sledovaných parametrech lépe Biodur E20 (Biodur products, Heidelberg, Germany). Tato epoxidová pryskyřice je ve srovnání s akrylátovou pryskyřicí Mercox II (Ladd Research, Williston, Vermont, USA) asi pětikrát levnější, testovaný žlutý odstín se ukázal jako více rentgenkontrastní. Mercox II se jeví jako zcela nevhodný pro přípravu preparátů o objemu vyšším než 20 ml. S vyšším množstvím přidaného katalyzátoru se totiž dramaticky zkracuje manipulační čas a pryskyřice tuhne do několika minut. Její vlastnosti se navíc mění i v průběhu skladování. Biodur E20 naopak umožňuje přípravu odlitků kompletního krevního řečiště celých orgánů, a to i díky dostatečnému manipulačnímu času (asi 40 minut). Ten se s objemem připravované pryskyřice ani s délkou skladování neměnil. S ohledem na technické nároky přípravy považujeme získání korozivního preparátu jaterního mikrořečiště za značný úspěch. Pokud je nám známo, podobný výsledek publikovalo zatím jen pracoviště z Ghentu [28]. Mikro-CT zobrazení nabízí rozlišení obdobné histologickému preparátu v mikroskopickém obraze. Naše výsledky ukázaly, že mikro-CT snímky mohou být

použity nejen pro 3D rekonstrukce, při dodržení stereologických principů i pro účely interaktivní kvantifikace. Technikami používanými v kvantitativní histologii jsme z CT skenů určovali délku, délkovou hustotu, tortuozitu, objemový podíl a povrchovou hustotu cév [27].

## 7 Možné pokračování výzkumu

Naše studie prokazují význam vasa vasorum v progresi AAA, avšak dosud nebyla publikována žádná kvantitativní morfologická studie vasa vasorum lidské nebo prasečí aorty. Liší se průběh vasa vasorum normální a aneuryzmatické aorty? Pro doplnění hypotéz o etiopatogenezi AAA by byla jistě přínosem také studie založená na principech stereologie, srovnávající stavbu různých částí lidské aorty. Nástřik vasa vasorum aorty je pro nás výzvou pro další výzkum. Jako inspirativní se jeví studie Lametschwandtner et al. 2004 [25], kde byla pod mikroskopem nástřikována vasa vasorum vena saphena magna, a to s použitím skleněné mikropipety a mikromanipulátoru. Podobně přínosné by nejspíš bylo diferencovat ve vzorcích AAA hypoxií indukovanou angiogenezi. Nové metody pro zobrazení mikrocév a angiogeneze, jakými jsou mikro-CT umožňující 3D analýzu mikrokorozičních preparátů vasa vasorum aorty nebo mikro-PET s radiofarmakem navázaným na protilátku proti markeru hypoxie, skýtají v tomto ohledu veliký potenciál a dosud neprobádanou kapitolu.

## 8 Přehled publikovaných prací se vztahem ke zkoumané problematice

1. **Eberlová L**, Tonar Z, Witter K, Křížková V, Nedorost L, Korabečná M, Tolinger P, Kočová J, Boudová L, Třeška V, Houdek K, Moláček J, Vrzalová J, Pešta M, Topolčan O, Valenta J. Asymptomatic abdominal aortic aneurysms show histological signs of progression: A quantitative histochemical analysis. *Pathobiology*. 2013;80:11-23. (**IF 1,18**)
2. **Eberlová L**, Tonar Z, Křížková V, Kočová J, Korabečná M, Třeška V, Moláček J, Houdek K, Boudová L, Topolčan O, Vrzalová J, Pešta M, Kulda V, Nedorost L, Valenta J. Morphology and etiopathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cas Lek Cesk*. 2012;151:55-63.
3. Houdek K, Moláček J, Třeška V, Křížková V, **Eberlová L**, Boudová L, Nedorost L, Tolinger P, Kočová J, Kobr J, Baxa J, Liška V, Witter W, Tonar Z. Focal histopathological progression of porcine experimental abdominal aortic aneurysm is mitigated by atorvastatin. *International Angiology*, přijato k tisku (**IF 1,7**)
4. Houdek K, Moláček J, Třeška V, Tonar Z, Křížková V, **Eberlová L**, Baxa J, Kobr J. Pharmacological influencing of abdominal aortic aneurysm model - animal experimental study, primary results. *Rozhl Chir*. 2012;91:475-80.
5. Tonar Z, Witter K, Křížková V, **Eberlová L**, Kočová J, Moláček J, Houdek K, Kočová P, Vrzalová J, Topolčan O, Třeška V. Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: Méndez-Vilas A, Díaz J [Eds.]. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Applications in Biology and Medicine*. Vol. 2. Formatex Research Centre, Badajoz: 2010; s. 926-935.

6. Gregor T, Kochová P, **Eberlová L**, Nedorost L, Prosecká E, Liška V, Mírka H, Kachlík D, Pirner I, Zimmerman P, Králíčková A, Králíčková M, Tonar Z. Correlating Micro-CT Imaging with Quantitative Histology. - In: Goswami T. [Ed]: Injury and Skeletal Biomechanics. InTech, Rijeka: 2012; s. 173-196.

7. Tonar Z, **Eberlová L**, Polívka J, Daum O, Witter K, Králíčková A, Gregor T, Nedorost L, Kochová P, Rohan E, Kalusová K, Pálek R, Skála M, Glanc D, Králíčková M, Liška V: Stereological methods for quantitative assessment of hepatic microcirculation. Accepted for publication. - In: Méndez-Villas A. [Ed]: Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series – 2012 Edition. Formatex Research Centre, Badajoz, Spain. In Press.

U žádné z uvedených prací není v databázi Scopus k 1. 4. 2013 uveden citační ohlas.

## 9 Prezentace publikovaných prací

Název příspěvku	Konference	Typ účasti	Termín
Quantitative Histopathological Analysis of Abdominal Aortic Aneurysms	Světový angiologický kongres, Praha	přednáška <b>1. autor</b>	červenec 2012
	Fighting aneurysmal disease, Madrid		květen 2012
	Fighting aneurysmal disease, Istanbul		květen 2011
Quantitative Micro-CT of Microvascular Corrosion Casts	Stereology, Spatial Statistics and Stochastic Geometry, Praha	přednáška, <b>spoluautor</b>	červen 2012
Experimental Model of Abdominal Aortic Aneurysm Treated with Atorvastatin	Abdominal Aortic Aneurysm: Epidemiology, Genetics, and Pathophysiology, Danville, USA	poster <b>spoluautor</b>	říjen 2011

## 10 Použitá literatura

1. Treska V, Moláček J, Certík B, Kuntscher V, Ferda J. An inflammatory aneurysm of the abdominal aorta. *Rozhl Chir.* 2005;84:112-6.
2. Darling RC, Messina CR, Brewster DC, Ottinger LW. Autopsy study of unoperated abdominal aortic aneurysms. The case for early resection. *Circulation.* 1977;56:161-4.
3. Heikkinen M, Salenius JP, Auvinen O. Ruptured abdominal aortic aneurysm in a well-defined geographic area. *J Vasc Surg.* 2002;36:291-6.
4. Kurvers H, Veith FJ, Lipsitz EC, Ohki T, Gargiulo NJ, Cayne NS, Suggs WD, Timaran CH, Kwon GY, Rhee SJ, Santiago C. Discontinuous, staccato growth of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg.* 2004;199:709-15.
5. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Ballard DJ, Jordan WD Jr, Blebea J, Littooy FN, Freischlag JA, Bandyk D, Rapp JH, Salam AA; Veterans Affairs Cooperative Study #417 Investigators. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA.* 2002;287:2968-72.
6. Šebesta P. Břišní aorta a pánevní tepny. In: Krajíček M, et al. *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění.* Praha: Grada Publishing, 2007, s. 192.
7. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J; FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011;90:18-27.
8. Bergqvist D. Pharmacological interventions to attenuate the expansion of abdominal aortic aneurysm (AAA) - a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41:663-7.
9. Golledge J, Norman PE. Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2011;217:57-63.
10. Harter LP, Gross BH, Callen PW, Barth RA. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. *J Ultrasound Med.* 1982;1:315-8.
11. Treska V, Kocova J, Boudova L, Neprasova P, Topolčan O, Pecen L, Tonar Z. Inflammation in the wall of abdominal aortic aneurysm and its role in the symptomatology of aneurysm. *Cytokines Cell Mol Ther.* 2002;7:91-7.
12. Eberlová L, Tonar Z, Krížková V, Kocová J, Korabecná M, Treska V, Moláček J, Houdek K, Boudová L, Topolčan O, Vrzalová J, Pesta M, Kulda V, Nedorost L, Valenta J. Morphology and etiopathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cas Lek Cesk.* 2012;151:55-63.
13. Tonar Z, Janáček J, Poledne R. Kvantitativní popis aterosklerotických lézí na úrovni optické mikroskopie. *Cor Vasa.* 2007; 49: 95-101.
14. Tonar Z, Witter K, Krížková V, Eberlová L, Kočová J, Moláček J, Houdek K, Kochová P, Vrzalová J, Topolčan O, Třeška V. Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: Méndez-Vilas A, Díaz J (Eds.). *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Applications in Biology and Medicine.* Vol. 2. Badajoz: Formatex Research Centre, 2010, s. 926-935.
15. Eberlová L, Tonar Z, Witter K, Krížková V, Nedorost L, Korabecná M, Tolinger P, Kočová J, Boudová L., Třeška V., Houdek K., Moláček J, Vrzalová J, Pešta M, Topolčan O, Valenta J. Asymptomatic abdominal aortic aneurysms show histological signs of progression: A quantitative histochemical analysis. *Pathobiology.* 2013;80:11-23.

16. Houdek K, Moláček J, Třeška V, Křížková V, Eberlová L, Boudová L, Nedorost L, Tolinger P, Kočová J, Kobr J, Baxa J, Liška V, Witter W, Tonar Z. Focal histopathological progression of porcine experimental abdominal aortic aneurysm is mitigated by atorvastatin. *International angiology*, přijato k tisku
17. Svensjö S, Björck M, Gürtelschmid M, Djavan G, Hellberg A, Wanhainen A. Low Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysm Among 65-Year-Old Swedish Men Indicates a Change in the Epidemiology of the Disease. *Circulation*. 2011;124:1118-23.
18. Long A, Rouet L, Lindholt JS, Allaire E. Measuring the maximum diameter of native abdominal aortic aneurysms: review and critical analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43:515-24.
19. Hafez H, Druce PS, Ashton HA. Abdominal aortic aneurysm development in men following a "normal" aortic ultrasound scan. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;36:553-8.
20. Moláček J, Třeška V, Kobr J, Certík B, Skalický T, Kuntscher V, Křížková V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm--experiment in an animal model. *J Vasc Res*. 2009;46:1-5.
21. Baxter T, Worth J. Aneurysm or occlusive disease - factors determining the course of atherosclerosis of the distal aorta. In: Sakalihasan N, Kuvaniemi H, Michel JB. *Aortic aneurysms New insights into an old problem*, Les Éditions de l'Université de Liege, 2008;16:325.
22. Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res*. 1969;25:677-86.
23. Gregor T, Kochová P, Eberlová L, Nedorost L, Prosecká E, Liška V, Mírka H, Kachlík D, Pirner I, Zimmerman P, Králíčková A, Králíčková M, Tonar Z. Correlating Micro-CT Imaging with Quantitative Histology. - In: Goswami T. (Ed): *Injury and Skeletal Biomechanics*. InTech, Rijeka: 2012, s. 173-196.
24. Gössl M, Rosol M, Malyar NM, Fitzpatrick LA, Beighley PE, Zamir M, Ritman EL. Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272:526-37.
25. Lametschwandtner A, Minnich B, Kachlík D, Setina M, Stingl J. Three-dimensional arrangement of the vasa vasorum in explanted segments of the aged human great saphenous vein: scanning electron microscopy and three-dimensional morphometry of vascular corrosion casts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;281:1372-82.
26. Zagorchev L, Oses P, Zhuang ZW, Moodie K, Mulligan-Kehoe MJ, Simons M, Couffinhal T. Micro computed tomography for vascular exploration. *J Angiogenesis Res*. 2010;2:7.
27. Tonar Z, Eberlová L, Polívka J, Daum O, Witter K, Králíčková A, Gregor T, Nedorost L, Kochová P, Rohan E, Kalusová K, Pálek R, Skála M, Glanc D, Králíčková M, Liška V: Stereological methods for quantitative assessment of hepatic microcirculation. Accepted for publication. - In: Méndez-Villas A. [Ed]: *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series – 2012 Edition*. Formatex Research Centre, Badajoz, Spain. In Press.
28. Debbaut C, Monbaliu D, Casteleyn C, Cornillie P, Van Loo D, Masschaele B, Pirenne J, Simoons P, Van Hoorebeke L, Segers P. From vascular corrosion cast to electrical analog model for the study of human liver hemodynamics and perfusion. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2011;58:25-35.

## 11 Souhrn

Aneuryzma abdominální aorty (AAA) je závažné onemocnění postihující v rozvinutých zemích asi 3 % mužů nad 65 let. Za aneuryzma je u břišní aorty považována dilatace všech vrstev stěny nad 3 cm. Většina AAA je malých a asymptomatických, a ačkoli riziko jejich ruptury roste s velikostí aneurysmatického vaku, praskají i malá aneuryzmata. Mortalita ruptur se pohybuje kolem 70 %. Operace je u asymptomatických pacientů indikována u průměru AAA nad 5,5 cm. Jelikož je průměrná rychlost růstu AAA 0,3 cm za rok, vzniká u časně diagnostikovaných pacientů několikaletý interval pro farmakologické ovlivnění progresu tohoto onemocnění. Znalost patogeneze je nezbytná pro každou cílenou farmakoterapii. Základem našich prospektivních nerandomizovaných studií je použití stereologických metod pro histopatologická hodnocení vzorků AAA. Získaná data pak umožňují statistické hodnocení včetně testování hypotéz.

V naší prospektivní nerandomizované studii Eberlová et al. 2013 [15] jsme zkoumali vzorky AAA stěn (n = 65), trombů (n = 55) a kontrolních aort (n = 6) odebraných z přední stěny infrarenální aorty pacientů operovaných na Chirurgické klinice FN v Plzni. S použitím stereologických metod jsme zjišťovali rozdíly mezi kvantitativními histopatologickými parametry normální a aneurysmatické aorty, porovnávali jsme zánětlivý infiltrát stěny a naléhajícího trombu, dále jsme sledovali histopatologické změny v závislosti na velikosti a symptomatologii. Ve stěně a trombu AAA jsme hodnotili tyto parametry: délkovou hustotu elastinu, plošný podíl elastinu a kolagenu v intimě a medii, plošný podíl aktinu, desminu a vimentinu ve stejné referenční ploše. V celé stěně jsme odhadovali počet cévních profilů na jednotku plochy, plošný podíl granulocytů a makrofágů, dále plošný podíl uPA, tPA a PAI-1. V trombu jsme hodnotili plošný podíl granulocytů a makrofágů. S pomocí multiplexové imunoanalýzy byly ve stejných vzorcích i plazmě pacientů měřeny hladiny interleukinů IL-6, -8, -10, -12, matrix metaloproteináz MMP-1, -2, -7, ligandů ICAM-1, VCAM-1, E-selektinu, dále růstových faktorů VEGF, EGF a proteinů osteoprotegerinu a adiponektinu. Inhibitory metaloproteináz TIMP-1 a TIMP-2 byly měřeny metodou ELISA. Výsledky ukázaly, že normální aorta obsahuje více elastinu, kontraktilních elementů, mikrocév i PAI-1, aneurysmatické vzorky byly bohatší na kolagen. Mikrovazální hustota byla ve vzorcích AAA nižší než u normálních aort, s velikostí aneurysmatického ale rostla, velká aneuryzmata (> 7 cm) se ukázala jako nejvíce vaskularizovaná. V jejich stěně byla současně zvýšená exprese IL-8 a VEGF. Středně velká AAA (velikost 5–7 cm) obsahovala nejvíce aktinu a vimentinu. Asymptomatická aneuryzmata nesla známky většího zánětu: měla vyšší plošný podíl granulocytů i makrofágů, vykazovala známky zvýšené fibrinolýzy. V trombu asymptomatických pacientů byla zvýšená exprese MMP-2 a VCAM-1. Trombus byl obecně méně zánětlivě infiltrován než přilehlá stěna, v trombu velkých AAA (>7 cm) byla zvýšená hladina VCAM-1 a ICAM-1. Výsledky naší studie nepotvrdily některé ze široce uznávaných principů patogeneze AAA – množství kolagenu, elastinu ani zánětlivého infiltrátu se s velikostí AAA neměnilo. Překvapivé jsou také výsledky analýzy u asymptomatických AAA – ty s ohledem na větší zánětlivý infiltrát a zvýšenou fibrinolýzu ukazují větší potenciál progresu a podporují tak význam screeningového vyšetření u rizikové skupiny populace. Nejvíce vaskularizovaná byla stěna normální aorty. Hustota vasa vasorum u vzorků AAA rostla s velikostí, což ukazuje na jejich význam v progresi tohoto cévního onemocnění.

V kvantitativní histopatologické studii Houdek et al. [16] jsme sledovali vliv atorvastatinu na experimentálně vyvolané AAA, které bylo indukované u prasete kombinací účinku prasečí elastázy a stenozující manžety [20]. Získaná data nám umožnila porovnat odlišnost stavby stěny tohoto animálního modelu od normálních prasečích aort (n = 6). Dále

jsme sledovali změny struktury aneuryzmatické stěny po 28 denním podávání atorvastatinu. Aorta statinem ovlivněných prasat obsahovala více elastinu, více kontraktálních elementů, méně vimentinu. Také hustota cévních profilů byla vyšší u statiny ovlivněné skupiny, jejich distribuce v zevní vrstvě aorty. Atorvastatin zabránil vzniku neointimy, zmírnil zbytnění médié i růst aneuryzmatu. Je zajímavé, že zánětlivý infiltrát nebyl statinovou léčbou ovlivněn. Lze shrnout, že naše výsledky prokazují převážně příznivé účinky atorvastatinu na stěnu AAA, aorta zvířat ovlivněných statiny vykazovala histologický obraz cévní stěny méně destruované, stabilnější a bližší normální aortě. Studie ukazuje také na histopatologické rozdíly mezi prasečím experimentálním modelem a lidskými AAA. Na rozdíl od vzorků lidských AAA byl u prasat s elastázou indukovaným aneuryzmatem plošný podíl kolagenu intimě a medii nižší než u zdravých zvířat. Plošný podíl granulocytů, makrofágů a hladkosvalových buněk sekrečního fenotypu byl naopak vyšší. V neposlední řadě jsme u prasečích aneuryzmat nezaznamenali přítomnost trombu, ten ale doprovází většinu lidských AAA. Ve shodě s lidskými AAA byl v intimě a medii elastázou indukovaných prasečích aneuryzmat nižší plošný podíl elastinu, aktinu a desminu, stěna lidských i prasečích aneuryzmat byla méně vaskularizovaná.

Výsledky obou našich studií dokládají význam vasa vasorum pro progresi AAA. Nástřík vasa vasorum aorty a vytvoření jejich korozivního preparátu s jejich následnou kvantifikací a 3D rekonstrukcí je pro nás výzvou pro další výzkum. V dizertační práci proto překládám optimalizovaný protokol k přípravě korozivních preparátů jaterního mikrorečiště. Ověřili jsme, že mikro-CT skeny nabízejí možnost 3D rekonstrukce, jednotlivé skeny mohou být při dodržení stereologických principů použity i pro potřeby kvantifikace.

## 12 Summary

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a serious disease. Its prevalence is about 3% in the developed countries. As an aneurysm is considered a dilatation of all layers of a vessel wall over 3 cm. Majority of AAA are small and asymptomatic. Although the risk of rupture increases with the size of aneurysm sack, even the small aneurysms rupture. The rupture mortality ranges about 70 %. Surgical treatment is indicated in the asymptomatic patients in diameter of AAA over 5 cm. The average speed of growth of AAA is 0.3 cm per year, e.g. there is a several years interval for a pharmacological influencing of the AAA progression in the early diagnosed patients. Knowledge of pathogenesis is essential for any targeted pharmacological treatment. Our prospective, non-randomised studies are based on the application of the stereological methods for the histopathological assessment of the AAA samples. The acquired data enable the statistical analysis, including the null hypothesis testing.

In our prospective non-randomised study [15] we analysed the histopathology of 65 AAA patients (65 walls and 55 thrombi) and 6 organ donors normal abdominal aortae. Specimens were taken from the anterior part of infrarenal aorta of patients undergoing AAA surgery in University Hospital in Pilsen. The following parameters were assessed: the area fractions of collagen and elastin, and the length density of elastin in intima and media, the area fraction of actin, desmin and vimentin in the same reference space. In the intima, media, and adventitia we estimated the number of microvessel profiles, the area fractions of granulocytes and macrophages, area fraction of uPA, tPA and PAI-1. The mean area fractions of macrophages and granulocytes were assessed in the thrombus. In thrombus and wall the levels of interleukins IL-6, -8, and -10, matrix metalloproteinases MMP-1, -2, -7, and -9 were measured with the use of the multiplex immunoanalysis. The tissue inhibitor of matrix metalloproteinases TIMP-1, and -2 were measured in the same samples by ELISA.



Comparing with the aneurysmatic aorta, the normal aorta contained more elastin, more contractile elements, more microvessels and more PAI-1-positive elements. AAA samples contained more collagen. Microvessel density was lower in AAA samples than in normal aortae, it grew with the size of aneurysm, big AAAs (> 7 cm) appeared to be the most vasculated. Asymptomatic AAAs had more abundant inflammatory infiltrates, they showed the increased fibrinolysis. In thrombus of the asymptomatic patients, expression of MMP-2 and VCAM-1 was increased. In general, thrombus was less inflammatory infiltrated than the adjacent wall. In thrombus of big AAAs (diameter >7 cm) expression of VCAM-1 and ICAM-1 was increased. Results of our study did not confirm some of the generally accepted principles of AAA pathogenesis – the amount of collagen and elastin, also the inflammatory infiltrate did not change with the AAA size. Our results show that asymptomatic AAA walls often have more potentially deleterious histopathological alterations than symptomatic AAA walls. This result indicates that a progression from an asymptomatic AAA to rupture can be expected and screening patients who are at-risk for rupture could be beneficial. Normal aorta is the most vasculated. Microvessel density grew with the size of AAA, which indicates its importance in the progression of this disease.

In the quantitative histopathological study focused on the influence of atorvastatin on the experimental porcine AAA [16] we assessed samples of 14 AAA influenced by statin (administered for 28 days in dose 1 mg/kg/d), non-statin AAA group (n = 3) and 6 normal abdominal aortae. The model aneurysm was induced by the intraluminal infusion of porcine pancreatic elastase into the abdominal aortic segment, and by application of plastic cuff [20]. Aortae of the statin group contained more elastin, more contractile elements, less vimentin. Microvessel density was higher in the statin group, microvessels were predominantly found in the outer layer of aorta. Atorvastatin prevented the thickening of intima and media and enlargement of AAA. Interestingly, the inflammatory infiltrate did not change with the statin treatment. In conclusion, most of the effects of atorvastatin seem to prevent the histopathological progression of AAA. Our study indicates also the differences between the human and porcine experimental AAA histopathology. The area fraction of collagen in intima and media was higher in healthy animals (cf. human AAA samples), on the other hand area fraction of granulocytes, macrophages and smooth muscle cells of the synthetic phenotype was higher AAA samples. We did not notice any presence of thrombus in the porcine experimental AAA, that is very featuring for the human AAAs. Both in the human and in the porcine experimental AAA there was a lower content of contractile elements in intima and media, the wall was less vasculated comparing with the healthy samples.

The results of both of our studies indicate the importance of vasa vasorum in AAA progression. Creation of the aortic vasa vasorum corrosion cast is still a challenge for us, we proved that micro-CT scans could be used for both quantification and 3D reconstruction. That is why our pilot proceedings of the liver microvascular corrosion casts are also being presented.