

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



Mikroskopická stavba a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Microscopic structure and mechanical properties
of aorta and pulmonary artery

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Tereza Kubíková



Plzeň 2017

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

Uchazeč: Mgr. Tereza Kubíková

Školitel: doc. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

Konzultant: Ing. Petra Kochová, Ph.D.

Oponenti: doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.
přednosta Ústavu histologie a embryologie
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D.
Laboratoř kardiiovaskulární mechaniky
Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Fakulta strojní, ČVUT v Praze

Autoreferát byl rozeslán dne:

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

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

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

dne: v: hod.

místo obhajoby:

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

Abstrakt

Úvod: Předkládaná dizertace je souborem sedmi studií, jejichž společným cílem byl popis funkční histologie aorty a jejich některých větví, popř. popis plicnice. Práce se zaměřuje na analýzu mikroskopického složení různých segmentů celé prasečí aorty během ontogeneze jako často užívaného experimentálního modelu, lidských kryoprezervovaných vzorků aorty, plicnice a jejich chlopní, dále na hodnocení poškození renální tepny při její katetrizační denervaci a na hodnocení osídlení umělých cévních náhrad po implantaci štěpu do myši břišní aorty. Úvod podává přehled o stavbě aorty a plicnice a jejich chlopní, o vybraných onemocněních postihující velké tepny a o histologických a biomechanických metodách používaných pro jejich charakterizaci.

Metody: V práci jsme využili metody parafinových řezů s histologickým barvením, imunohistochemickým průkazem antigenů (α -hladký svalový aktin, desmin, vimentin, chondroitinsulfát, von Willebrandův faktor, neurofilamentový protein, tyrosin hydroxyláza) a biomechanické testy (jednoosé tahové zkoušky) k určení meze pevnosti, mezní deformace a Youngova modulu pružnosti. Ke kvantifikaci plošných podílů jednotlivých složek a k určení délkové hustoty elastinu v cévní stěně jsme použili stereologické metody založené na interakci testovacích mřížek o známých geometrických vlastnostech s mikrofotografiemi. K hodnocení míry poškození renální tepny ovci po radiofrekvenční ablaci okolních nervů jsme použili námi modifikovaný semikvantitativní skórovací systém.

Výsledky: Prokázali jsme, že sestupná hrudní aorta prasete měla ze všech segmentů nejvyšší podíl elastinu, který se snižoval proximálně k oblouku aorty stejně jako distálně k břišní aortě. Podíl kolagenu ve stěně se snižoval od vzestupné aorty a aortálního oblouku směrem k sestupné aortě. Segmenty břišní aorty měly nejvyšší podíl aktinu, desminu a vimentinu a všechny tyto markery hladkých svalových buněk měly v hrudních segmentech aorty nižší hodnoty. Při srovnání suparenální s infrarenální břišní aorty nebyly zjištěny žádné kvantitativní rozdíly. Plošný podíl aktinu v medii byl srovnatelný ve všech věkových skupinách a byl úměrný postnatálnímu růstu do sedmi měsíců věku. Segmenty aorty s větší tloušťkou měly větší podíl elastinu i kolagenu a menší podíl kontraktilních buněk než segmenty s menší tloušťkou. Ve vzorcích s menším podílem elastinu a větším podílem aktin- a desmin-positivních hladkých svalových buněk byly šroubovice hladkých svalových buněk těsně navzájem uspořádány a byly více soustředěné než ve vzorcích s větším podílem elastinu a s menším podílem kontraktilních hladkých svalových buněk.

Elastická vlákna v tunica media aorty a plicnice člověka zůstala i po kryoprezervaci v tkáňové bance její hodnotnou složkou. Biomechanické vlastnosti kryoprezervované aorty a plicnice, jako je Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací a mezní deformace, mírně pozitivně korelovaly s tloušťkou intima-media. Mezní deformace mírně negativně korelovala s plošným podílem elastinu a plošným podílem kalcifikace v intima-media a mírně pozitivně korelovala s plošným podílem kolagenu ve stěnách aorty a plicnice. U cípů aortální a pulmonální chlopně slabě pozitivně korelovala tloušťka stěny s mezí pevnosti a Youngovým modulem v oblasti malých i velkých deformací.

Prokázali jsme, že použití vícebodového katetru při denervaci renální tepny vedlo k většímu poškození renální tepny a nervových pletení obklopující renální tepnu ve srovnání s jednobodovým katetrem. Avšak, žádný testovaný způsob denervace renální tepny nevedl k úplné ablaci nervů doprovázející renální tepnu.

Prokázali jsme, že hodnocené nanovlákněné nosiče u myši zastoupily po dobu šesti měsíců úlohu aorty, přičemž došlo k jejich postupné endotelizaci, k osídlení buňkami, ke vzniku rozvrstvení obdobnému intimě a medii skutečných elastických tepen, dále k diferenciaci buněk s kontraktilním fenotypem, k tvorbě a zrání kolagenu I a v některých případech i k tvorbě elastických lamel. Štěpy byly dobře snášeny a jejich průsvit byl průchodný.

Diskuze: Výsledky mechanických analýz kryoprezervovaných štěpů aorty, plicnice a jejich chlopní nemohly být zcela vysvětleny objemovými poměry hlavních tkáňových složek. Proto by měly být obě metody považovány za komplementární a měly by být použity v dalších studiích na zjištění použitelnosti kryoprezervovaných aort, plicnic a jejich chlopní a vlivu dlouhodobé kryoprezervace na jejich vlastnosti.

Účinnost a bezpečnost zkoumaných katetrů určených k denervaci renální tepny schválených pro klinické použití, se zdá být do značné míry závislá na anatomické interindividuální variabilitě stěny renální tepny a přilehlých nervových pletení.

Studie, zabývající se histologickým složením a biomechanickými vlastnostmi lidských či zvířecích velkých tepen, se prozatím soustředily na prvky mezibuněčné hmoty jako je elastin, kolagen, hladké svalové buňky nebo glykosaminoglykany, ale opomíjeli další složky např. strukturální glykoproteiny, které zprostředkovávají vazby mezi buňkami a složkami mezibuněčné hmoty.

Kromě vlastních výsledků jednotlivých studií je v metodické části obsažena řada praktických postupů a doporučení s ohledem na způsoby víceúrovňového vzorkování při odběru a hodnocení materiálu, volbu barvicích metod a volbu mikroskopického zvětšení vhodného pro řešení konkrétních otázek.

Závěr: Za hlavní doménu histologických metod při studiu cévní stěny považujeme kvantitativní i kvalitativní popis mikroskopického složení přibližně v měřítku jednotek až tisíců mikrometrů, charakteristiku buněčných fenotypů, popis přestavby cévní stěny za různých podmínek a v neposlední řadě i popis rozložení a prostorových vztahů mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou. Největší přínos histologické analýzy spočívá především v poskytnutí informací o vzájemné pozici histologických struktur oproti technikám, analyzující homogénizované tkáňové vzorky využívané v biochemii a molekulární biologii. Propojení histologické analýzy s dalšími metodami, především biomechanickými je přínosné pro porozumění funkčních adaptací cévní stěny za různých podmínek.

Abstract

Introduction: This dissertation thesis consists of seven studies, the common aim of which was to describe the functional histology of the aorta and some of its branches, as well as the pulmonary artery. The thesis focuses on analysis of the microscopic composition of various segments of the porcine aorta during ontogenesis as an experimental model, as well as cryopreserved samples of human aorta, pulmonary artery and their valves. Further it assesses damage to the renal artery during its denervation, and evaluates cell colonization of synthetic vascular substitutes after their implantation into the abdominal aortas of mice. The introduction gives an overview of the structure of the aorta and pulmonary artery and their valves, selected diseases affecting large vessels, and histological and biomechanical methods used for their characterization.

Methods: We used the paraffin section method with basic and advanced stains, immunohistochemical detection of antigens (α -smooth muscular actin, desmin, vimentin, chondroitin sulfate, von Willebrand factor, neurofilament protein, tyrosine hydroxylase) and biomechanical tests (uniaxial tensile tests) for determination of ultimate strain, ultimate stress and Young's modulus of elasticity. We used stereological methods based on the interaction of test grids of known geometric properties with photomicrographs to quantify the area fraction of individual components and to determine the length density of elastic fibres in the vessel wall. We used a modified semiquantitative scoring test to evaluate the degree of damage to the ovine renal artery after radiofrequency ablation.

Results: We have shown that the porcine descending thoracic aorta had the highest area fraction of elastin, which decreased proximally to the aortic arch as well as distally to the abdominal aorta. The area fraction of collagen in the vessel wall decreased in the direction from the ascending aorta and the aortic arch towards the descending aorta. The abdominal aorta segments had the highest area fraction of actin, desmin and vimentin, and all of these smooth muscle markers had lower values in the aortic thoracic segments. There were no quantitative differences between the suprarenal and the infrarenal abdominal aorta. The area fraction of actin in the tunica media was comparable in all age groups and was proportional to postnatal growth up to seven months of age. Segments of the aorta with greater wall thickness had more elastin and more collagen and fewer contractile cells than thinner segments. In the samples with more contractile vascular smooth muscle cells and less elastin, the symmetrical helices of vascular smooth muscle cells were arranged closer to each other and they were more concentrated than in samples with fewer actin- and desmin-positive vascular smooth muscle cells and more elastin.

Propagation of experimentally induced microcracks avoided elastic fibres. The biomechanical properties of cryopreserved aortas and pulmonary arteries, such as the Young's modulus of elasticity in the large deformation regions and ultimate strain, all correlated positively with the thickness of the intima-media. The ultimate strain negatively correlated with the area fraction of elastin and the area fraction of calcification in the intima media and positively correlated with the area fraction of collagen in the wall of the aorta and pulmonary artery. Wall thickness correlated positively with the ultimate stress and Young's modulus in the small and large deformation regions in the cusps of aortic and pulmonary valves.

We have shown that using the single-point ablation catheter resulted in greater damage to the renal artery and the nerves surrounding it compared with the multi-point ablation catheter. Neither procedure of renal denervation led to complete ablation of nerves surrounding the renal artery.

Finally, we have demonstrated that the evaluated nanofibrous scaffolds in the mouse have successfully substituted for the role of the aorta for six months with gradual endothelialization, cell colonization, formation of layers similar to the intima and media of actual elastic arteries, differentiation of cells with contractile phenotype, formation and

maturation of collagen I and, in some cases, the formation of elastic lamellas. The scaffolds did not induce any inflammatory reaction and had freely passable vascular lumina.

Discussion: Studies of histological composition and biomechanical properties of human or animal large arteries have so far focused on elements of the extracellular matrix such as elastin, collagen, smooth muscle cells or glycosaminoglycans, but have omitted other components such as structural glycoproteins that mediate bonds between cells and extracellular components.

In addition to the results of the individual studies, the methodological part contains a number of practical procedures and recommendations with regard to the methods of multilevel sampling and evaluation of materials, the choice of staining methods and the choice of microscopic magnification suitable for addressing specific questions.

Conclusion: The results of mechanical analysis of cryopreserved aortas, pulmonary artery and their valves could not be completely explained by the quantified histological parameters of the major tissue components. Therefore, the two methods should be considered complementary and should be used together in future studies to determine the usability of cryopreserved aortas, pulmonary arteries and their valves and the effects of long-term cryopreservation on their properties.

The safety and efficacy of investigated catheters used for denervation of the renal artery appear to be largely dependent on the interindividual anatomical variability of the wall of the renal artery and adjacent nerve plexus.

We consider the main contribution of histological methods in the study of the vascular wall to be the quantitative and qualitative description of the microscopic composition in the range of ones to thousands of micrometers, characteristics of cell phenotypes, description of reconstruction of the vessel wall under various conditions, and description of the distribution and spatial relations between the cells and the extracellular matrix. The greatest benefit of histological analysis over techniques analyzing homogenized tissue samples used in biochemistry and molecular biology is, especially, providing information on the reciprocal position of histological structures. Linking histological analysis with other methods, especially biomechanical, is beneficial for understanding the functional adaptations of the vascular wall under various conditions.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	8
2	Přehled problematiky a cíle práce.....	8
	2.1 Mikroskopická stavba a mechanické vlastnosti elastických tepen a jejich chlopní	8
	2.2 Základní východiska studie.....	9
	2.3 Cíle a hypotézy	10
3	Metody	11
	3.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří	11
	3.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete.....	12
	3.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty, plicnice a jejich chlopní	12
	3.4 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici po kryoprezervaci	13
	3.5 Poškození renální tepny ovce při radiofrekvenční ablacii autonomních nervů	14
	3.6 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci	16
4	Výsledky	16
	4.1 Rozdíly ve složení aorty prasete mezi různými segmenty a v závislosti na stáří a rozdíly v orientaci hladkých svalových buněk.....	16
	4.2 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty, plicnice a jejich chlopní a šíření experimentálně navozených trhlín v aortě a plicnici	19
	4.3 Poškození renální tepny ovce při radiofrekvenční ablacii autonomních nervů.....	19
	4.4 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci	23
5	Diskuze.....	24
6	Závěr práce	24
7	Literatura	25
8	Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce	28
	8.1 Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce	28
	8.2 Publikace autorky nevztahující se k tématu dizertační práce.....	29
9	Životopis autorky	30

1 Seznam zkratek

A	-	plocha [m^2]
A_A	-	area fraction – plošný podíl hodnocené složky v referenční ploše vzorku
ANOVA	-	analysis of variance - analýza variace nebo její neparametrická obdoba
CD	-	cluster of differentiation
CS	-	chondroitinsulfát
DAPI	-	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
E	-	Youngův modul pružnosti [Pa]
IMT	-	intima-media thickness – tloušťka tunica intima a media
l	-	délka [m]
L_A	-	délková hustota profilů objektů v řezu [m^{-1}]
NO	-	oxid dusnatý
p	-	počet průsečíků testovací mřížky s hodnoceným objektem
p-hodnota	-	mezí hladina významnosti statistických testů
PAS	-	periodic acid Schiff
PCL	-	polykaprolaktanová kyselina
P_L	-	teoretická hustota průsečíků sledované složky s profilem trhliny
P'_L	-	skutečná hustota průsečíků sledované složky s profilem trhliny
Q_A	-	počet profilů objektů v řezu o ploše A [m^{-2}]
SMC	-	smooth muscle cells - hladké svalové buňky
WT	-	wall thickness - tloušťka celé stěny cévy
κ	-	míra koncentrace von Misesova rozdělení
$I_0(\kappa)$	-	modifikovaná Besselova funkce prvního druhu
μ	-	míra polohy von Misesova rozdělení

2 Přehled problematiky a cíle práce

2.1 Mikroskopická stavba a mechanické vlastnosti elastických tepen a jejich chlopní

Stěna elastických tepen je členěna na tunica intima, media a adventitia. Průsvit elastických tepen je vystlán endotelovými buňkami. Ty spolu se subendotelovým vazivem, tvoří tenkou vrstvu tunica intima. Tunica media je nejsilnější vrstvou a obsahuje především hladké svalové buňky, elastické lamely a další složky mezibuněčné hmoty, jako jsou kolagenní vlákna a základní hmota. Dalšími složkami mezibuněčné hmoty tepen jsou glykosaminoglykany, glykoproteiny a proteoglykany. Tyto složky jsou produkovány hladkými svalovými buňkami, zejména během vývoje těchto tepen, ale také při patologických procesech, jako je ateroskleróza. Ve stáří dochází k fragmentaci elastických lamel a usazování vápníku, což vede ke zvýšení tuhosti tepen. Velké elastické tepny mohou být také změněny při genetických poruchách, např. při Marfanově syndromu, osteogenesis imperfecta nebo Ehlers-Danlosově syndromu.

Aortální a pulmonální chlopně jsou tvořeny třemi cípy, které jsou ukotveny v prstenci vazivové tkáně. Cípy chlopní mají poloměščitý tvar a jsou obvykle tenčí než 1 mm [1]. Cípy chlopní jsou pokryté endotelem a jejich vazivový skelet se skládá ze dvou vrstev: z hustého vaziva – lamina fibrosa, a z vrstvy řídkého vaziva – lamina spongiosa [2]. Tento skelet obsahuje buňky pojivové tkáně (fibroblasty, fibrocyty) a mezibuněčnou hmotu, především kolagenní a elastická vlákna a proteoglykany [3]. Nejčastější vývojová

onemocnění aortální a pulmonální chlopně jsou stenóza chlopní, insuficience chlopní a snížení počtu jejich cípů.

Viscerální větev aorty, např. renální tepna, již od svého odstupu od aorty (elastická tepna) získává stavbu tepny svalového typu. Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami a tenkou vrstvou řídkého kolagenního vaziva. Lamela elastica interna odděluje tunica intima a media. Hlavní složkou tunica media jsou spirálovitě uspořádané hladké svalové buňky, tvořící přibližně 40 vrstev. Mezi buňkami mohou být cirkulárně orientované elastické lamely, např. v renální tepně. Velké množství základní hmoty tvoří proteoglykany. Tunica adventitia je tvořena longitudinálně a šroubovicově uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny a nachází se zde nemyelinizovaná nervová vlákna autonomního nervového systému (Silver et al., 2001).

K charakterizaci mikroskopické stavby a chlopní můžeme využít histologické analýzy parafinových řezů. Pomocí histologických a imunohistochemických metod můžeme zviditelnit hledané struktury, jako jsou elastická a kolagenní vlákna, glykoproteiny, proteoglykany, glykosaminoglykany, kalcifikace, mikrofilamenta přítomná v hladkých svalových buňkách pro posouzení jejich fenotypu, endotelové buňky, vasa vasorum a nervi vasorum ve stěně tepen, popř. zánětlivá infiltrace a tyto složky kvantifikovat, posuzovat jejich vzájemnou interakci, také jejich expresi nebo degradační procesy.

Jednoosá tahová zkouška je nejzákladnější metodou k charakterizaci biomechanických vlastností cév, chlopní a jejich náhrad. Můžeme pomocí nich získat parametry jako je mez pevnosti, mezní deformace a Youngův modul pružnosti. Pokročilejší metodou je dvouosá tahová zkouška, která zatěžuje vzorek ve dvou osách a poskytuje tedy komplexnější údaje o vzorku.

2.2 Základní východiska studie

2.2.1 Stavba prasečí aorty jakožto modelu v experimentální chirurgii

Prasečí aorta se používá například při modelování změn aorty během hypertenze [4], po vagotomii [5], po hrudní sympatektomii [6] a jako model výdutě břišní aorty [7,8]. Prasečí model výdutě břišní aorty se užívá pro zavedení mezenchymálních kmenových buněk do poraněné aorty [9], pro simulaci opravy ruptury výdutě břišní aorty [10], pro testování technik endovaskulárních zákroků [11] a pro testování stentů [12]. Histologické a biomechanické rozdíly mezi segmenty aorty byly sledovány Sokolisem [13,14], který prokázal převládající elastin nad kolagenem v proximálních segmentech aorty stejně jako převládající kolagen nad elastinem v distálních segmentech. Kim [15,16] se zabýval biomechanickými odlišnostmi obvodových a podélných segmentů aorty, přičemž našel největší moduly pružnosti v dorzální oblasti distálních segmentů. Nicméně systematické histologické a histopatologické studie, zahrnující celou aortu, jako v případě Sokolise [14], jsou vzácné, zvláště u prasečích aort. Důvodem naší studie bylo přispět k rozšíření vědomostí o segmentálních rozdílech a s věkem souvisejících rozdílech v prasečí aortě.

2.2.2 Mikroskopická stavba a mechanické vlastnosti alogenních štěpů aortální a pulmonální chlopně

Lidské kryoprezervované alogenní štěpy pulmonálních a aortálních chlopní, stejně jako kořeny těchto velkých elastických tepen, jsou rutinně používány jako náhrady kořene aorty, plicnice a jejich chlopní u vybrané skupiny pacientů. Tato operace je nezbytná zejména při valvulární aortální stenóze [17,18], ale alografty srdečních chlopní se používají také při jiných aortálních a pulmonálních chlopenní patologii, kdy chirurgická oprava není možná. Spolu s chirurgickou technikou, jsou dostatečné biomechanické vlastnosti a zachovaná

histologická struktura štěpů považovány za nezbytné pro řádný výsledek rekonstrukční chirurgie [19]. Doba použitelnosti kryoprezervovaných alograftů byla libovolně stanovena na pět let ve většině tkáňových bank ve světě. Nicméně kryoprezervace může vést ke změnám těchto náhrad. K hodnocení kvality štěpů můžeme použít histologickou a mechanickou analýzu. Dosud není známo, jak koreluje histologická stavba s mechanickými vlastnostmi kryoprezervovaných lidských aortálních a pulmonálních chlopní a kořenů velkých elastických tepen.

Elastická vlákna jsou považována za odolný prvek mezibuněčné hmoty cévní stěny [20]. Není však známo, zda elastické lamely plní tuto úlohu i po kryoprezervaci. Proto jsme studovali šíření experimentálně navozených trhlin přes stěnu kryoprezervovaných alograftů aort a plicnic.

2.2.3 Akutní změny renální tepny po radiofrekvenční ablacii autonomních nervových pletení

Zvýšená aktivita sympatického nervového systému je jedním z rozhodujících faktorů při rozvoji a udržování hypertenze [21]. U pacientů s tzv. rezistentní hypertenzí, kteří nereagují na standardní antihypertenzní terapii [22], může být použita k léčbě hypertenze denervace renální tepny. Ačkoli tato metoda byla v posledních pěti letech velmi rozšířená a u vybraných pacientů vedla účinně ke snížení krevního tlaku [23,24], dosud nejsou k dispozici uspokojivé údaje o bezpečnosti a účinnosti této metody. Důkazy z preklinických experimentálních studií, týkající se bezpečnosti a účinnosti různých systémů pro radiofrekvenční denervaci renální tepny, jsou omezené a prozatím poskytly pouze nepřesvědčivé údaje týkající se účinnosti denervací. Jednobodový katetr (Symplicity Flex od společnosti Medtronic) byl široce využíván ve studiích na prasatech, ovcích i lidech [22–26]. Inovativní vícebodový ablační katetr pracuje ve více vrstvách renální tepny současně [27–29]. Přílehlý nervový svazek má být tedy více ovlivněn aplikovanou radiofrekvenční energií. Na druhé straně může být vážně poškozena renální tepna. Dosud nebyly poskytnuty žádné údaje pro porovnání morfologických účinků jednobodového a vícebodového katetru v akutní fázi, proto jsme tyto dva systémy sledovaly a histologicky porovnávaly poškození renální tepny po její katetrizační denervaci [30].

2.2.4 Hodnocení složení a buněčné osídlení cévních náhrad po *in vivo* experimentu

Syntetické cévní náhrady s velkým průměrem jsou již úspěšně používány v klinické praxi. K náhradě cév s průměrem menším než šest milimetrů jsou stále první volbou biologické štěpy. Jejich kvalita a délka nemusí být vždy dostatečná. Tkáňové inženýrství se v současné době zaměřuje na výrobu právě malopřůměrových cévních náhrad, které prozatím v klinické praxi chybí [31].

2.3 Cíle a hypotézy

Při řešení základní otázky mikroskopického složení a mechanických vlastností aorty a plicnice vstalo mnoho otázek, proto jsem si vytyčila níže popsané dílčí cíle a postupně je řešila. Pro experimentální chirurgii a biomechaniku elastických tepen je často jako model používána prasečí aorta, proto jsem studovala otázku rozdílů histologického složení prasečí aorty v závislosti na lokalizaci a věku. A následně jsem řešila hypotézu korelace lokálního složení aorty s orientací hladkých svalových buněk v její stěně. Poté jsem studovala korelaci mechanických vlastností s histologickým složením kryoprezervovaných lidských alograftů aortálních a pulmonálních chlopní a aort a plicnic a také vliv elastických

lamel na šíření experimentálně navozených trhlin u kryoprezervovaných vzorků aort a plicnic. Dále jsem sledovala akutní poškození renální tepny a přilehlých nervových pletení po radiofrekvenční ablacii. V neposlední řadě jsem porovnávala dva typy cévních náhrad při in vivo experimentu na myši břišní aortě.

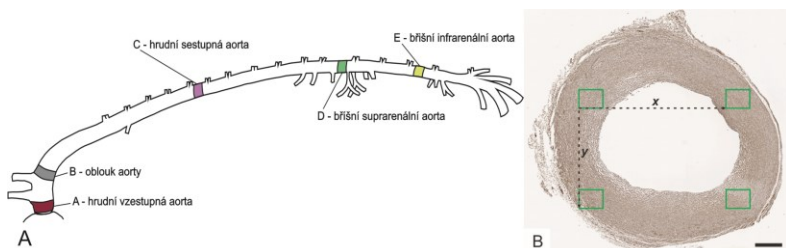
K ověření těchto hypotéz jsem definovala následující cíle:

- Kvantifikovat zastoupení elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu v různých proximodistálních segmentech aorty odlišných věkových skupin prasete jakožto modelu pro experimentální chirurgii a biomechaniku elastických tepen.
- Zjistit, zda orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete statisticky koreluje s lokálním složením tepenné stěny.
- Zjistit, do jaké míry spolu statisticky koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alograftů aorty, plicnice a jejich chlopní s jejich mechanickými vlastnostmi.
- Zjistit, jakou úlohu hraje systém elastických lamel při šíření experimentálně navozené trhliny v kryoprezervovaných alograftech aorty a plicnice.
- Zjistit rozsah poškození renální tepny ovce na histologické úrovni při experimentální renální denervaci a posoudit účinnost dvou typů katetrů používaných k radiofrekvenční ablacii.
- Zjistit rozdíl v osídlení a stavbě dvou typů cévních náhrad po jejich implantaci místo myši břišní aorty po deseti dnech a šesti měsících.

3 Metody

3.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří

Jedinci byli rozděleni do tří skupin podle věku: 0-28 dní (selata); 29-75 dní (odstavená selata) a 180-230 dní (výkrmová prasata). Pro analýzu bylo použito 25 celých aort prasat, které byly po chemické fixaci formaldehydem rozděleny na pět segmentů (obr.1A): hrudní vzestupná aorta, oblouk aorty, hrudní sestupná aorta, břišní aorta suparenální a infrarenální. Z každého segmentu byl vytvořen parafinový tkáňový bloček, který by krájen kolmo na podélnou osu cévy na řezy o síle 4 μm . Z každého bločku bylo odkrojeno šest řezů, které byly barveny kombinací Verhoeffova hematoxylinu se zeleným trichromem, pikrosiriovou červení, orceinem a imunohistochemicky byly detekovány antigeny: α -hladkosvalový aktin, vimentin a desmin. Z každého řezu byly nasnímány a hodnoceny čtyři fotografie (obr.1B), při zachování náhodného výběru. Byly hodnoceny tyto parametry: tloušťka intima-media, celá tloušťka stěny, plošný podíl kolagenu, elastinu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu. Ke stereologickému odhadu plošných podílů byla využita bodovací testovací mřížka v programu Elipse (VIDITO, Košice, Slovenská Republika).



Obr. 1. Vzorkování prasečí aorty a výběr zorných polí pro odhad plošných podílů složek stěny prasečí aorty [32]. A – Schéma odběru 5 segmentů aorty. B - Stěna aorty prasete; barveno imunohistochemicky protilátkou anti- α -smooth muscle actinu; měřítko 500 μ m.

3.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete

Pro analýzu bylo použito 17 prasečích aort, rozdělených na pět segmentů jako v předešlé studii (obr. 1A). Řezná rovina byla tangenciální k aortě. Řezy z vytvořených tkáňových bločků byly barveny hematoxylinem-eosinem. Orientaci hladkých svalových buněk jsme sledovali s využitím orientace jejich jader. Směr každého jádra hladké svalové buňky na fotografiích tangenciálních řezů aorty byl označen pomocí orientované čáry rovnoběžné s dlouhou osou jádra. Histogramy distribuce byly získány za použití dvou von Misesových rozdělení charakterizovaných parametry: μ míra umístění a κ míra koncentrace (převrácená hodnota rozptylu). Pokud $\kappa = 0$, distribuce je uniformní. Jestliže je hodnota κ velká, distribuce je soustředěná kolem úhlu μ [33], viz rovnice 1.

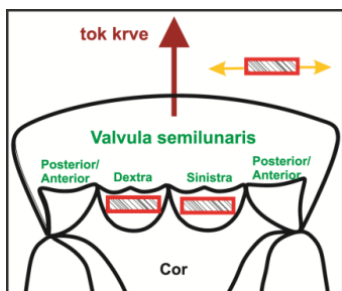
$$f(x|\mu, \kappa) = \frac{e^{\kappa \cdot \cos(x-\mu)}}{2\pi I_0(\kappa)} \quad (1)$$

kde $I_0(\kappa)$ je modifikovaná Besselova funkce prvního druhu s $p = 0$. Parametr μ ukazuje polohu, kolem které je distribuce seskupena a je analogická střední hodnotě normálního rozdělení; κ ukazuje koncentraci distribuce [34]. Větší hodnoty κ reprezentují orientace populace hladkých svalových buněk více soustředěných kolem jejich úhlu μ , zatímco nižší hodnoty κ reprezentují více rozptýlenou orientaci hladkých svalových buněk [33]. Použili jsme předpoklad [35] existence centrálního úhlu symetrie, který rozděljuje populace hladkých svalových buněk na dva hlavní směry (šroubovice), z nichž každý je charakterizován vlastním parametrem μ_1 a μ_2 . Střední úhel mezi oběma směry charakterizuje blízkost mezi oběma předpokládanými symetrickými šroubovicemi hladkých svalových buněk. Centrální úhel symetrie oddělující dvě šroubovice hladkých svalů do dvou hlavních směrů jsme statisticky porovnali s informacemi o složení stěny aorty z předchozí studie, jako byl objemový podíl elastinu, kolagenu, α -hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu a také s hodnotou tloušťky intima-media.

3.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty, plicnice a jejich chlopní

Ke studii bylo použito 12 aortálních a 8 pulmonálních kryoprezervovaných alograftů chlopní, které byly odebrány, zpracovány a skladovány při teplotě -196°C na Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol podle etablovaného protokolu [36]. Z každého alograftu byl po rozmrazení vyříznut prstenek kořene aorty nebo plicnice a dva proužky

z cípů chlopní. Schéma odběru cípů chlopní je na obr. 2. Tyto vzorky byly následně mechanicky testovány v laboratoři centra excelence NTIS Fakulty aplikovaných věd ZČU. K analýze pasivních mechanických vlastností těchto vzorků byl použit jednoosý tahový test prstenců tepen. Směr zatížení cípů chlopní je znázorněn na obr. 2. Získali jsme hodnoty následujících parametrů: Youngův modul pružnosti v oblasti malých a velkých deformací, mez pevnosti a mezní deformaci. Poté byly vzorky chemicky fixovány a doručeny na Ústav histologie a embryologie LF v Plzni, kde byly odvodněny a zalaty do parafinových bločků kolmo ke své dlouhé ose. Parafinové bločky byly krájeny na řezy o síle 5 μm a získané řezy byly barveny kombinací Verhoeffova hematoxylinu se zeleným trichromem, pikrosiriovou červení, orceinem, metodou von Kossa (u tepen) a imunohistochemicky byly detekovány antigeny: chondroitinsulfát a α -hladkosvalový aktin (u tepen). Byly hodnoceny tyto parametry: tloušťka tunica-media (u tepen), celá tloušťka stěny, plošný podíl kolagenu, elastinu, hladkosvalového aktinu (u tepen), chondroitinsulfátu a kalcifikace (u tepen). Ke stereologickému odhadu plošných podílů byla využita bodovací testovací mřížka v programu Eclipse (VIDITO, Košice, Slovenská Republika). U parametrů z mechanické a histologické analýzy jsme sledovali jejich vzájemnou statistickou korelaci.



Obr. 2. Schéma odběru vzorků z cípů aortální/pulmonální chlopně a směr jejich zatěžování při mechanické analýze [40]. Z cípů srdečních chlopní byly vyříznuty vždy dva vzorky z každé chlopně podle schématu, valvula semilunaris dextra a sinistra (červené obdelníky). Směr zatěžování při analýze mechanických vlastností je naznačen žlutými šipkami.

3.4 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici po kryoprezervaci

Pro studium mikrotrhlin bylo použito deset kořenů aorty a deset plicnic po mechanickém zatížení. Pro histologickou analýzu mikrotrhlin vyvolaných experimentálním mechanickým zatížením byla použita již dříve zavedená metoda [37]. Abychom určili vztah mikrotrhlin a elastických vláken, porovnali jsme odhadovanou hodnotu hustoty průsečíků elastických vláken podél trhliny P'_L s jeho teoretickou hodnotou P_L vypočítanou za předpokladu nezávislosti trhlin na elastických vláknech. Hustota průsečíků elastických vláken v mikrotrhlinách byla definována následovně:

$$P_L = \frac{p}{l} \quad (2)$$

kde p je počet průsečíků podél trhliny o délce l .

Hustota průsečíků profilů trhlin s elastickými vlákny P'_L byla spočtena dělením skutečného počtu těchto průsečíků (p') počítaných v úsecích maximální projekční délkou profilů (l). Maximální délku projekce trhliny jsme použili jako spodní hranici skutečné

délky. Maximální projekční délku trhliny (l) jsme odhadli jako nejkratší vzdálenost mezi počátkem a koncem profilu trhliny.

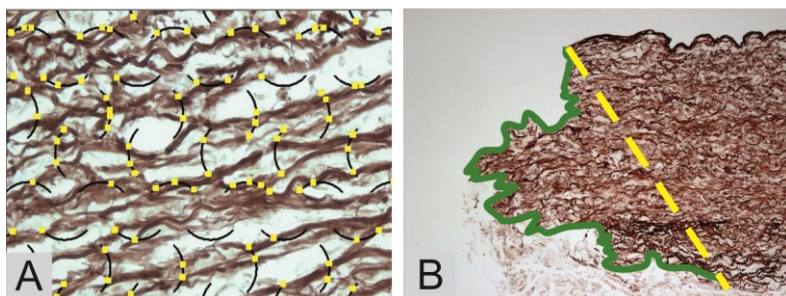
Teoretická hustota průsečíků byla za předpokladu nezávislosti trhlín a elastických vláken vypočtena jako hustota průsečíků náhodně orientované linie (tj. profilu trhliny) s elastickými vlákny [38] podle rovnice:

$$P_L = \frac{2}{\pi} \cdot L_A \quad (3)$$

kde L_A byla 2D hustota elastických vláken v tunica media. Pro každou elastickou tepnu jsme stanovili délkovou hustotu L_A elastických vláken následovně:

$$L_A = \frac{L}{A} \quad (4)$$

kde L_A je délková hustota, L je délka elastických vláken a A je oblast referenčního prostoru tunica media. Délka (L) byla odhadnuta počítáním průsečíků mezi elastickými vlákny a kruhovými oblouky umístěnými náhodně na mikrofotografii, obr. 3. Pro odhad parametrů L a A jsme použili modul LineSystem v programu Ellipse (VIDITO, Košice, Slovensko) [39,37,40].



Obr. 3. Studium vztahu mezi mikrotrhlinami a elastickými vlákny [40]. A - Kruhové obloučky, které jsou v kontaktu s elastickými vlákny, byly použity pro stanovení dvojrozměrné délkové hustoty elastických vláken L_A . B - Okraj trhliny je zvýrazněn zeleně. Maximální délka projekce l je nakreslena jako žlutá čára. Červeno-hnědá elastická vlákna byla obarvena orceinem.

3.5 Poškození renální tepny ovce při radiofrekvenční ablacii autonomních nervů

K hodnocení účinků dvou katetrů, jednobodového – Symplicity Flex™, Medtronic a vícebodového EnligHTN™, užitých k denervaci nervové pleteně doprovázející renální tepnu, bylo použito 12 ovcí rozdělených do dvou skupin. Experiment probíhal v Centru experimentální medicíny IKEM. Vždy byla denervována jedna renální tepna. Z každé ovce byla odebrána renální tepna, která byla denervována a pro porovnání také renální tepna, která nebyla ovlivněna. Každá tepna byla rozdělena na osm až devět úseků po 3 mm. Tyto vzorky byly chemicky fixovány a dále zpracovány na Ústavu histologie a embryologie LFP. Z každého vzorku byly připraveny parafinové tkáňové bločky, které byly krájeny a na vzniklé řezy byly použity čtyři barvicí metody: hematoxylin-eosin; Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom; Malloryho trichrom a orcein. Dále byly použity

imunohistochemické metody za použití protilátek anti- α -smooth muscle actin, anti-neurofilament protein, anti-von Willebrand factor a anti-tyrosine hydroxylase.

Klasifikace hodnocení histologických změn po 48 hodinách po denervaci renální tepny je uvedena v tabulce 1. Byly posuzovány vždy 4 kvadranty cévní stěny na řezu. Způsob vyhodnocení získaných hodnot pro každý studovaný vzorek je uveden v tabulce 2. Bodový systém odráží buď závažnost (nebo stupeň) poškození stěny tepny a přilehlých nervových vláken a relativní rozsah těchto změn.

Tabulka 1. Semikvantitativní stupnice pro hodnocení poškození renální tepny a přilehlých nervových pletení v příčně orientovaných řezech segmentů tepny [30].

	body pro každý segment tepny	zjištěné histologické poškození renální tepny
hodnocení poškození renální tepny po její denervaci	0	nebylo pozorováno žádné poškození
	1,2,3,4	excentrické poškození a zeslabení stěny tepny
	1,2,3,4	denaturace kolagenu
	1,2,3,4	poškození elastických membrán
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na α -hladkosvalový aktin
hodnocení poškození periferních nervových pletení doprovázející renální tepnu po její denervaci	1	přítomnost intraluminálních trombů
	body pro každý segment nervů	zjištěné histologické poškození nervů obklopující renální tepnu
	0	nebylo pozorováno žádné poškození
	1,2,3,4	hyperémie nervových pletení
	1,2,3,4	destruktivní fragmentace nebo kompletní ztráta Schwannových buněk
	1,2,3,4	poškození vnitřních struktur nervu: ztráta nervové pochvy a struktury endoneuriální pojivové tkáně
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na neurofilamentový protein
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na tyrosin hydroxylázu

Pozn. Body (1-4) byly přiděleny každému kvadrantu tepny a ukazují poranění tepny nebo nervových vláken ve studovaném segmentu.

Tabulka 2. Způsob vyhodnocení získaných hodnot ze skórovacího systému [30].

parametr	definice
součet bodů vaskulárního poškození a součet bodů nervového poškození na jedince	vypočítáno součtem bodů ze všech 3 mm dlouhých segmentů renální tepny (typicky 8 segmentů); toto bylo provedeno pro cévní poškození a poškození nervů zvlášť
maximální vaskulární poškození a maximální poškození nervů	maximální hodnota zjištěná u studovaných segmentů u daného zvířete a orgánu
průměrný počet bodů vaskulárního nebo nervového poškození na segment	aritmetická střední hodnota skórovacích výsledků na segment, vypočtená dělením součtu skóre vaskulárního poškození nebo součtu skóre poranění nervu počtem segmentů tepny v daném jedinci a orgánu

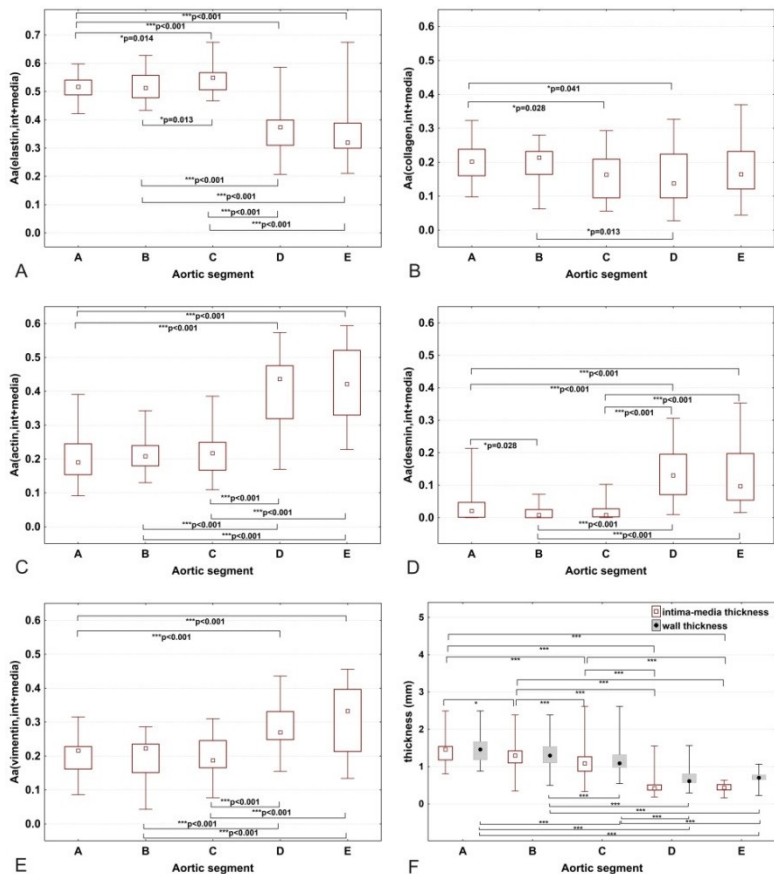
3.6 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

Hodnoceny byly dva typy cévních náhrad: jeden z čistého polykaprolaktanu a druhý z polykaprolaktanu, který navíc uvolňoval oxid dusnatý. Od každého typu náhrady bylo použito sedm vzorků. Štěpy byly implantovány na místo myší břišní aorty. Po deseti dnech byly odebrány od každého typu náhrady tři vzorky, po šesti měsících zbývající čtyři. Vzorky byly fixovány mrazem a krájeny na histologické řezy o síle 10 μm s rovinou řezu rovnoběžnou s dlouhou osou aorty. Tyto řezy byly pořízeny na Technické univerzitě v Liberci a následně doručeny na Ústav histologie a embryologie LFP. Zde byly barveny pěti histologickými metodami: hematoxylinem-eosinem, Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem, orceinem, pikrosiriovou červení a kombinací barvení alcianové modří a PAS (Periodic Acid Schiff). Dále byly barveny imunohistochemickými metodami, pomocí protilátek: anti- α -smooth muscle actin, anti-CD34, anti-CD31, anti-von Willebrand factor. Byly hodnoceny tyto parametry: počet profilů jader buněk nalezených uvnitř nejnižší/prostřední/vnější třetiny tloušťky štěpu na podélném řezu; průměrný počet profilů jader buněk nalezených uvnitř celého štěpu na podélném řezu; relativní průměrná vzdálenost profilů jader od vnějšího okraje štěpu nalezených uvnitř štěpu; tloušťka náhrady; plošný podíl elastinu, kolagenu a hladkosvalového aktinu na průřezu štěpem. Kvantitativní parametry, které byly hodnoceny v programu Elipse (VIDITO, Košice, Slovenská Republika).

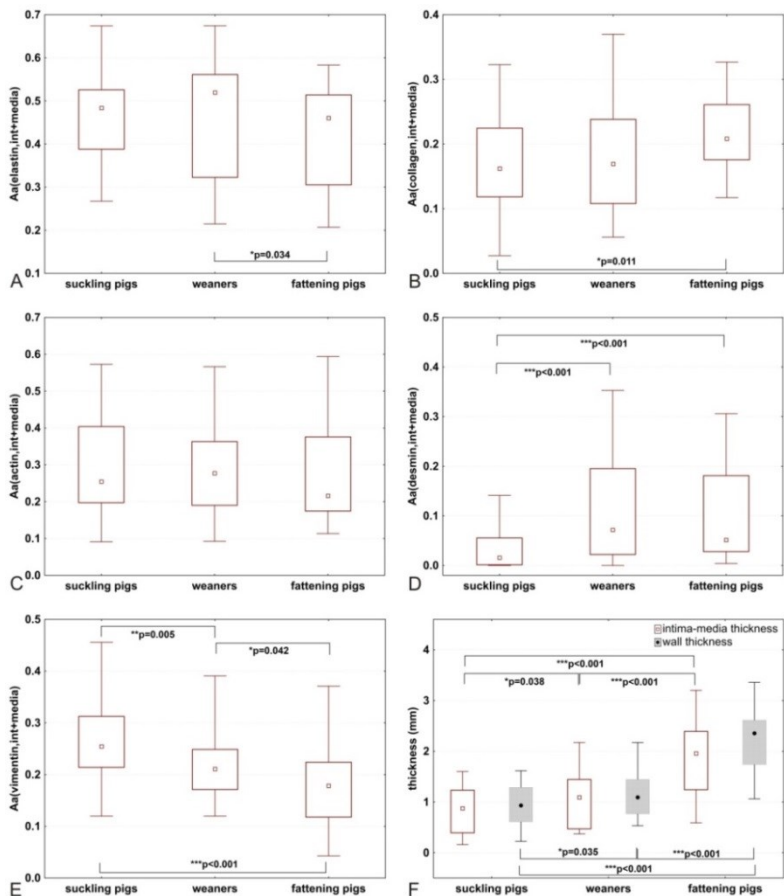
4 Výsledky

4.1 Rozdíly ve složení aorty prasete mezi různými segmenty a v závislosti na stáří a rozdíly v orientaci hladkých svalových buněk

Prokázali jsme, že sestupná hrudní aorta prasete měla ze všech segmentů nejvyšší podíl elastinu, který se snižoval proximálně k oblouku aorty stejně jako distálně k břišní aortě. Podíl kolagenu ve stěně se snižoval od vzestupné aorty a aortálního oblouku směrem k sestupné aortě. Segmenty břišní aorty měly nejvyšší podíl aktinu, desminu a vimentinu a všechny tyto markery hladkých svalových buněk měly v hrudních segmentech aorty nižší hodnoty. Při srovnání suprafrenální s infrarenální břišní aorty nebyly zjištěny žádné kvantitativní rozdíly. Porovnání jednotlivých segmentů prasečí aorty je na obr. 4. Plošný podíl aktinu v medii byl srovnatelný ve všech věkových skupinách a byl úměrný postnatálnímu růstu do sedmi měsíců věku (obr. 5). Segmenty aorty s větší tloušťkou měly větší podíl elastinu i kolagenu a menší podíl kontraktilních buněk než segmenty s menší tloušťkou. Ve vzorcích s menším podílem elastinu a větším podílem aktin- a desmin-pozitivních hladkých svalových buněk byly šroubovice hladkých svalových buněk těsně navzájem uspořádány a byly více soustředěné než ve vzorcích s větším podílem elastinu a s menším podílem kontraktilních hladkých svalových buněk.



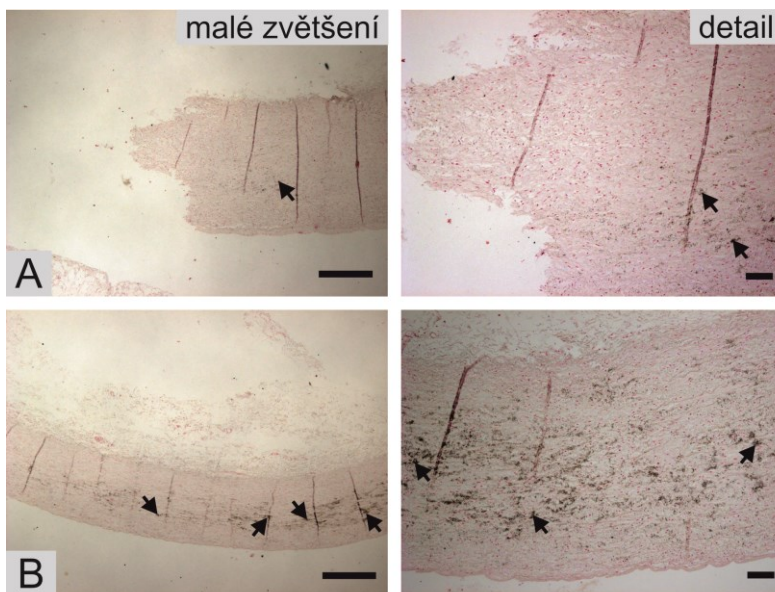
Obř. 4. Plošný podíl (A_A) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tlouřka stěny aorty ve třech věkových skupinách prasat [32]. Pro toto srovnání byly segmenty aorty sloučeny. Porovnány byly tři věkové skupiny prasat: suckling pigs - selata, weaners – odstavená selata a fattening pigs – výkrmová prasata. Znázorněny jsou významné statistické p-hodnoty pro Mann-Whitneyův test. Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu.



Obr. 5. Plošný podíl ($A_{i,j}$) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tloušťka stěny aorty ve třech věkových skupinách prasat [32]. Pro toto srovnání byly segmenty aorty sloučeny. Porovnány byly tři věkové skupiny prasat: suckling pigs - selata, weaners – odstavená selata a fattening pigs – výkrmová prasata. Znázorněny jsou významné statistické p-hodnoty pro Mann-Whitneyův test. Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu.

4.2 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty, plicnice a jejich chlopní a šíření experimentálně navozených trhlin v aortě a plicnici

Elastická vlákna v tunica media aorty a plicnice člověka zůstala i po kryoprezervaci v tkáňové bance její hodnotnou složkou, experimentálně navozené trhliny se elastickým vláknům vyhýbaly. Nenašli jsme zjevné rozdíly v rozložení kalcifikace v oblastech trhlin ve srovnání s ostatními částmi vzorků elastických tepen (obr. 6). Biomechanické vlastnosti kryoprezervované aorty a plicnice, jako je Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací a mezní deformace, mírně pozitivně korelovaly s tloušťkou intima-media. Mezní deformace mírně negativně korelovala s plošným podílem elastinu a plošným podílem kalcifikace v intima-media a mírně pozitivně korelovala s plošným podílem kolagenu ve stěnách aorty a plicnice. U cípů aortální a pulmonální chlopně slabě pozitivně korelovala tloušťka stěny s mezí pevnosti a Youngovým modulem v oblasti malých i velkých deformací.



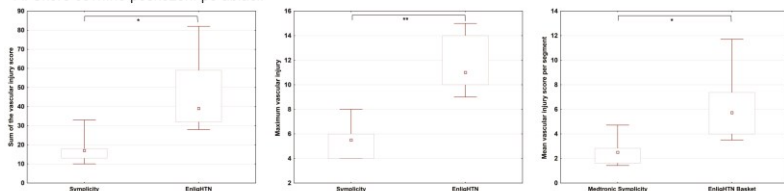
Obr. 6. Kalcifikace ve stěně plicnice [40]. V oblastech trhlin (A) nebylo více kalcifikace (černé šipky) než v jiných oblastech vzorku (B) vzdálených od oblasti trhliny. Barvení metodou von Kossa. Měřítka 1000 μm (levý sloupec) a 50 μm (pravý sloupec).

4.3 Poškození renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů

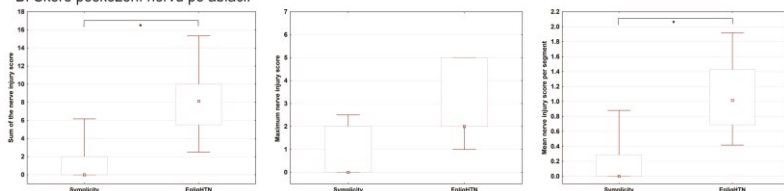
Prokázali jsme, že použití vícebodového katetru při denervaci renální tepny vedlo k většímu poškození renální tepny a nervových pletení, které obklopují renální tepnu, ve srovnání s jednobodovým katetrem (obr. 7). Avšak, žádný testovaný způsob denervace

renální tepny nevedl k úplné ablaci nervů doprovázející renální tepnu. Typické nálezy v renálních tepnách a nervových vlákních doprovázejících renální arterie jsou znázorněny na obr. 8, 9.

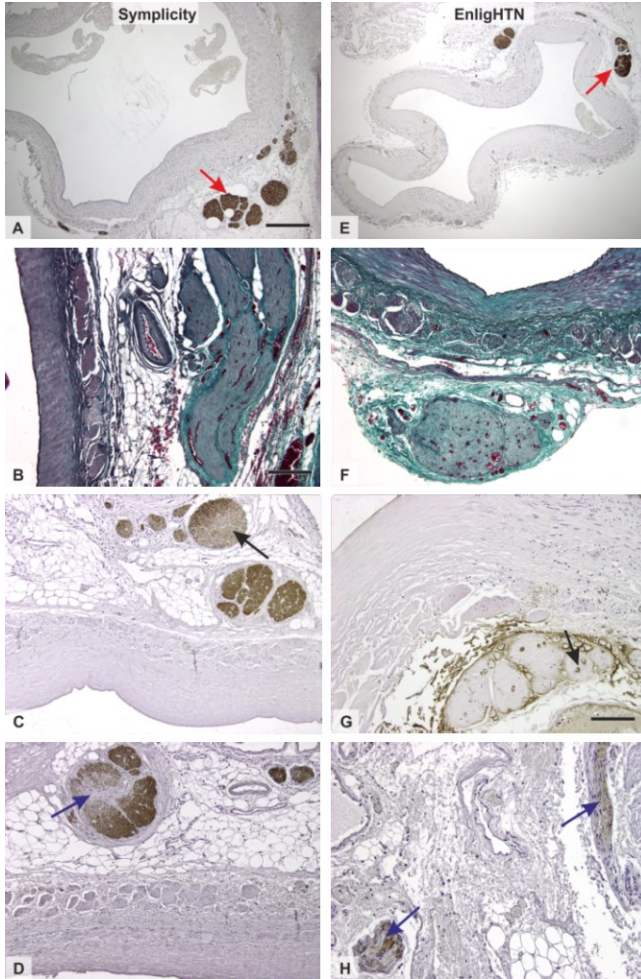
A: Skóre cévního poškození po ablaci.



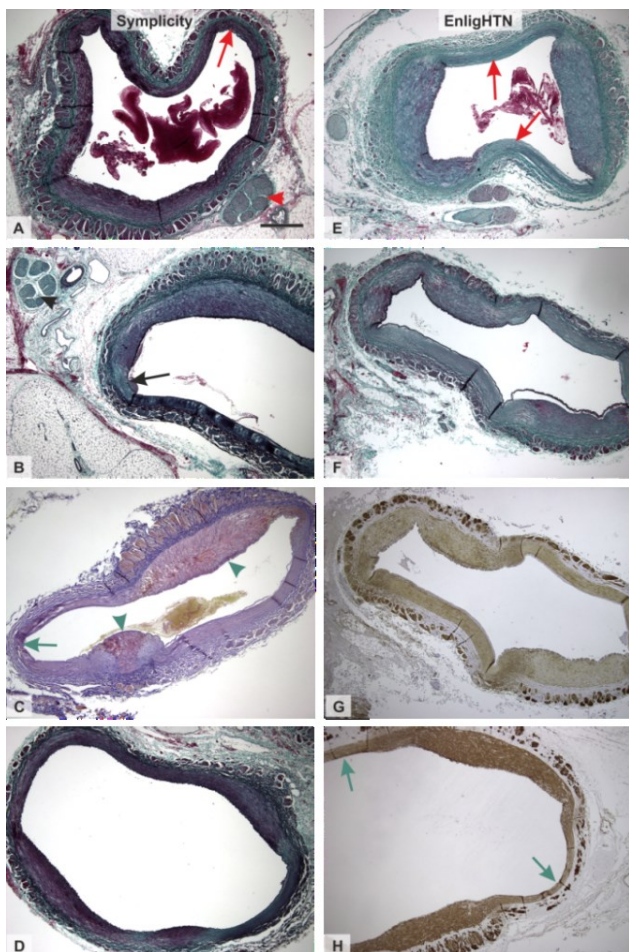
B: Skóre poškození nervů po ablaci.



Obr. 7. Porovnání účinků dvou typů katetrů na renální tepnu a nervová vlákna probíhající kolem ní po ablaci [30]. Použití katetru EnligHTN vedlo k většímu poškození renální tepny ve srovnání s katetrem Symplicity Flex (A). Použití EnligHTN katetru vedlo k většímu součtu bodů poranění nervů a k průměrnému skóre poranění nervů ve srovnání s katetrem Symplicity Flex (B). Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu, a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu. Statisticky významné rozdíly byly vyznačeny (* $p < 0,05$; ** $0,01 > p > 0,001$), Mann Whitney U test. Pozn. Sum of the vascular/nerve injury score – součet bodů cévního/nervového poškození, maximum vascular/nerve injury – maximální cévní/nervové poškození, mean vascular/nerve injury score per segment – průměrný počet bodů cévního/nervového poškození na segment.



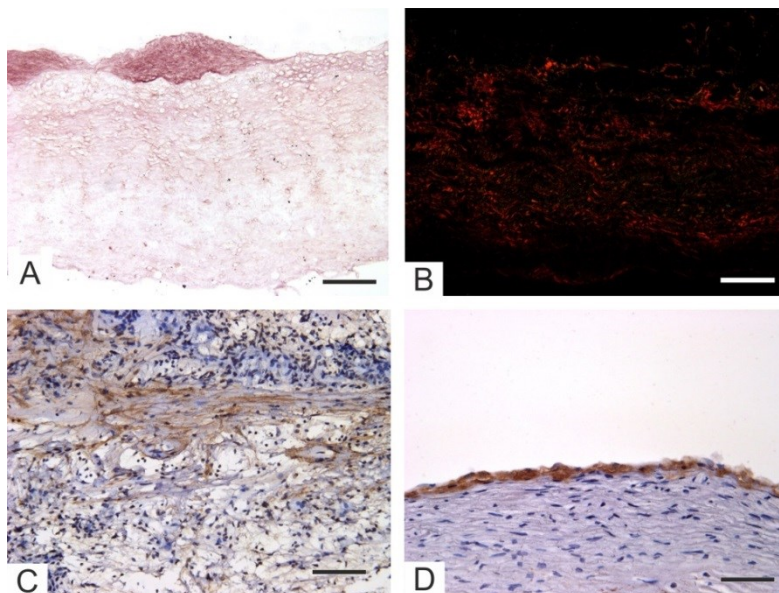
Obr. 8. Příklady histologických nálezů poškozených nervů u obou skupin zvířat po ablaci katetrem Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN (vpravo) [30]. V mnoha částech byly nalezeny zdravé a morfologicky a imunohistochemicky normální nervy (A, E, červené šipky) v blízkosti renální tepny. V obou skupinách zvířat byla běžně nalezena hyperémie nervů bez dalšího poškození nervové mikrostruktury (B, F). Některé nervové svazky byly pouze částečně poškozeny a vykazovaly lokální ztrátu imunopozitivity na neurofilamentový protein (C) nebo tyrosin hydroxylázu (D, H, tmavě hnědá pozitivita), imunohistochemická detekce tyrosin hydroxylázy (D, H, tmavě hnědá pozitivita), Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (B, F). Měřítka 500 μm (A, E), 200 μm (B-D, F) a 100 μm .



Obr. 9. Příklady histologických nálezů cévního poškození u obou skupin zvířat po ablaci s použitím katetru Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN katetru (vpravo) [30]. U tepen ošetřených katetrem Symplicity byly léze cévní stěny méně rozsáhlé, často postihující pouze jeden kvadrant cévní části (A, B, šipky). Doprovodné nervy byly často zcela normální a nedotčené (A, B, špičky šipek). Někdy bylo oslabení stěny a denaturace kolagenu při ztrátě hladkého svalstva (C, šipka) doprovázeno sousedícím edémem tkáňové vrstvy (C, špička šipky). U jednoho zvířete bylo postiženo více kvadrantů (D). U tepen ošetřených katetrem EnligHTN byly cévní léze rozsáhlejší a často ovlivňovaly více kvadrantů v průřezech několika segmentů (E-H, šipky). Všechny snímky ukazují, že renální tepny u ovcí mají nejen kruhovou vrstvu hladkého svalstva, ale také značně tlustou vrstvu podélného hladkého svalstva. Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (A, B, E-F), Malloryho trichrom (C), imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu (G-H, tmavě hnědá pozitivita). Měřítko 500 μ m (A-H).

4.4 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

Prokázali jsme, že hodnocené nanovláknenné nosiče u myši zastoupily po dobu šesti měsíců úlohu aorty, přičemž došlo k jejich postupné endotelizaci (obr. 10D), k osídlení buňkami, ke vzniku rozvrstvení obdobnému intimě a medii skutečných elastických tepen, dále k diferenciaci buněk s kontraktilním fenotypem (obr. 10C), k tvorbě a zrání kolagenu I (obr. 10 B) a v některých případech i k tvorbě elastických lamel (obr. 10A). Štěpy byly dobře snášeny a jejich průsvit byl průchodný.



Obr. 10. Tvorba složek mezibuněčné hmoty a diferenciacie buněk v cévní náhradě z polykaprolaktanu obohaceného oxidem dusnatým, po 6 měsících. Všechny vzorky jsou orientovány tak, aby průsvit směřoval nahoru. A – Štěpy byly pokryty neointimálním endotelem, pod kterým byly uloženy různé elastické vrstvy (červenohnědé). B - Štěpy vykazovaly tendenci k homogennímu rozložení kolagenu (červený). C - Štěpy měly dobře diferencovanou vaskulární vrstvu, která vykazovala pravidelné uspořádání hladkých svalových buněk vřetenovitého tvaru i v hlubších vrstvách. (tmavě hnědá). D – Náhrady byly kompletně pokryty endotelem pozitivním na von Willebrandův faktor. Barvení orceinem (A), barvení pikrosiriovou červení a pozorované v polarizovaném světle (B), imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu v hladkých svalových buňkách cév (C), imunohistochemická detekce von-Willebrandovu faktoru v endotelových buňkách (D). Měřítka 200 μ m (A, B), 100 μ m (C), 100 μ m (D).

5 Diskuze

Znalost rozdílů mezi segmenty prasečí aorty během ontogeneze při plánování experimentů umožňuje zvolit nejvhodnější segment pro studii, vzájemnou porovnatelnost výsledků, analýzu síly testu a odhadu počtu vzorků pro dosažení požadované úrovně přesnosti

Výsledky mechanických analýz kryoprezervovaných štěpů aorty, plicnice a jejich chlopní nemohly být zcela vysvětleny objemovými poměry hlavních tkáňových složek. Proto by měly být obě metody považovány za komplementární a měly by být použity v dalších studiích na zjištění použitelnosti kryoprezervovaných aort, plicnic a jejich chlopní a vlivu dlouhodobé kryoprezervace na jejich vlastnosti.

Účinnost a bezpečnost zkoumaných katetrů určených k denervaci renální tepny schválených pro klinické použití, se zdá být do značné míry závislá na anatomické interindividuální variabilitě stěny renální tepny a přilehlých nervových pletení.

Studie, zabývající se histologickým složením a biomechanickými vlastnostmi lidských či zvířecích velkých tepen, se prozatím soustředily na prvky mezibuněčné hmoty jako je elastin, kolagen, hladké svalové buňky nebo glykosaminoglykany, ale opomíjeli další složky např. strukturální glykoproteiny, které zprostředkovávají vazby mezi buňkami a složkami mezibuněčné hmoty.

Kromě vlastních výsledků jednotlivých studií je v metodické části obsažena řada praktických postupů a doporučení s ohledem na způsoby víceúrovňového vzorkování při odběru a hodnocení materiálu, volbu barvicích metod a volbu mikroskopického zvětšení vhodného pro řešení konkrétních otázek.

6 Závěr práce

Pro plánování chirurgických experimentů jsme posoudili rozdílné kvantitativní složení prasečí aorty v pěti segmentech. Při porovnání hrudní vzestupné aorty a břišní suparenální aorty jsme našli význačné rozdíly v zastoupení všech hodnocených složek, tj. elastinu, kolagenu, aktinu, desminu i vimentinu. Nenašli jsme žádné rozdíly ve složení suparenální a infrarenální břišní aorty a mimo rozdílu v zastoupení vimentinu je složení vzestupné hrudní aorty stejné jako v případě oblouku aorty. Přesná znalost těchto rozdílů při plánování experimentů umožňuje zvolit nejvhodnější segment pro studii, vzájemnou porovnatelnost výsledků, analýzu síly testu a odhadu počtu vzorků pro dosažení požadované úrovně přesnosti.

Ve stěně aorty prasete jsme zjistili, že statistické rozdělení orientací dvou symetrických šroubovic hladkých svalových buněk medie souvisí s lokálními změnami zastoupení kontraktilního fenotypu těchto buněk a rovněž se změnami zastoupení kolagenu a elastinu. Tato data jsou vhodná pro biomechanické modelování založené na mikrostruktuře.

Histologická analýza kryoprezervovaných štěpů aorty a plicnice po biomechanickém měření ukázala, že elastin omezuje šíření trhlin jejich stěnou. Dále jsme zjistili, že čím větší tloušťka intima-media, tím větší měli vzorky mezní deformaci a Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací. Navržená kvantitativní histologická analýza je vhodná k charakterizaci kryoprezervovaných štěpů aorty, plicnic a jejich chlopní. Samotné histologické složení nevysvětluje mechanické vlastnosti těchto náhrad, proto by měly být při hodnocení vlivu dlouhodobé kryoprezervace na vlastnosti štěpů použity jak morfologické, tak biomechanické testy.

U ovčích modelů jsme popsali rozsah a intenzitu poškození tepenné stěny a jejího okolí při použití dvou typů katetrů testovaných pro radiofrekvenční ablací endovaskulární cestou. Koncept skórovacího systému použitého v naší studii umožňuje zhodnotit

poškození nervových pletení doprovázejících renální tepnu a taktéž stěnu samotné tepny po ošetření katetrem při denervaci.

Přístup kvantitativní histologie poskytuje možnost posoudit biomateriály při *in vivo* experimentech. Prokázali jsme, že vhodně vytvarované nanovláknenné nosiče mohou u myši plnit po dobu 6 měsíců úlohu aorty, přičemž dochází k jejich postupné endotelizaci, k osídlení buňkami, ke vzniku rozvrstvení obdobnému intimě a medii skutečných elastických tepen, dále k diferenciaci buněk s kontraktilním fenotypem, k tvorbě a zrání kolagenu I a v některých případech i k tvorbě elastických lamel, to vše při poměrně dobré snášenlivosti a jen omezené zánětlivé reakci příjemce štěpu.

V předložené dizertační práci jsme testovali metody kvantitativní histologie na velmi rozmanitém spektru převážně experimentálně chirurgických studií. Kromě vlastních výsledků jednotlivých studií je v části věnované metodice obsažena řada praktických postupů a doporučení s ohledem na způsoby víceúrovňového vzorkování při odběru a hodnocení materiálu, volbu barvicích metod a volbu mikroskopického zvětšení vhodného pro řešení konkrétních otázek. Na základě studií, které jsou přiloženy k dizertaci, lze shrnout, že klasické histologické postupy podávají jen částečnou informaci o trojrozměrné stavbě skutečných cév a obvykle ve světle současné úrovně poznání nepostačují samy o sobě k vysvětlení mechanismů funkční adaptace cévní stěny za různých podmínek. Ani při použití kombinací řady histologických barvicích metod není dosud znám způsob, jak přímočaře extrapolovat informace ze strukturálního mikroskopického obrazu do oblasti mechanických vlastností cévní stěny a naopak.

Tato omezení potvrzují i dosavadní praxi v tom smyslu, že pro komplexní posouzení funkce aorty, plicnice a dalších velkých tepen jsou kromě histologických vyšetření zapotřebí i paralelní vyšetřování metodami biomechaniky, popřípadě biochemie a buněčné biologie. Naopak za hlavní doménu histologických postupů při studiu cévní stěny považujeme kvalitativní i kvantitativní popis mikroskopického složení přibližně v měřítku jednotek až tisíců mikrometrů, charakteristiku buněčných fenotypů, popis přestavby (remodelace) cévní stěny za různých podmínek a v neposlední řadě i popis rozmístění a prostorových vztahů mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou. Při vhodné orientaci histologických řezů zůstává pozice mikroskopických struktur přístupná mikroskopickému vyšetření, což je přetrvávající výhoda histologického vyšetření oproti technikám homogenizovaných tkáňových vzorků využívaných v biochemii a molekulární biologii. Za velmi perspektivní způsob odečítání kvantitativních dat z mikroskopických obrazů považujeme stereologické postupy založené na aplikaci geometrických sond na mikroskopické obrazy. Tyto metody se v našich studiích plně osvědčily, jeví značnou odolnost vůči drobným technickým chybám rutinních a archivních preparátů a při správném použití v souladu s designem dané metody poskytují vzorků libovolné povahy nevychýlená data, která je možné testovat standardními statistickými metodami.

7 Literatura

- [1] R.B. Hinton, K.E. Yutzey, Heart Valve Structure and Function in Development and Disease, Annual Review of Physiology. 73 (2011) 29–46. [2] R. Lüllmann-Rauch, Histologie, Grada, Praha, 2012.
- [3] R.A. Hopkins, R.A. Hopkins, Cardiac reconstructions with allograft tissues, Springer-Verlag, New York, 2005.
- [4] J.-J. Hu, A. Ambrus, T.W. Fossom, M.W. Miller, J.D. Humphrey, E. Wilson, Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination, J. Histochem. Cytochem. 56 (2008) 359–370.

- [5] D.P. Sokolis, N. Zarbis, T. Dosios, V. Papalouka, L. Papadimitriou, H. Boudoulas, P.E. Karayannacos, Post-vagotomy mechanical characteristics and structure of the thoracic aortic wall, *Ann Biomed Eng.* 33 (2005) 1504–1516. [6] D.C. Angouras, T.J. Dosios, C.A. Dimitriou, T.P. Chamogeorgakis, C.K. Rokkas, T.A. Manos, D.P. Sokolis, Surgical thoracic sympathectomy induces structural and biomechanical remodeling of the thoracic aorta in a porcine model, *J. Surg. Res.* 172 (2012) 68–76.
- [7] L. Eberlová, Z. Tonar, K. Witter, V. Křížková, L. Nedorost, M. Korabečná, P. Tolinger, J. Kočová, L. Boudová, V. Třeška, K. Houdek, J. Moláček, J. Vrzalová, M. Pešta, O. Topolčan, J. Valenta, Asymptomatic abdominal aortic aneurysms show histological signs of progression: a quantitative histochemical analysis, *Pathobiology.* 80 (2013) 11–23.
- [8] K. Houdek, J. Moláček, V. Třeška, V. Křížková, L. Eberlová, L. Boudová, L. Nedorost, P. Tolinger, J. Kočová, J. Kobr, J. Baxa, V. Liška, K. Witter, Z. Tonar, Focal histopathological progression of porcine experimental abdominal aortic aneurysm is mitigated by atorvastatin, *Int Angiol.* 32 (2013) 291–306.
- [9] I.C. Turnbull, L. Hadri, K. Rapti, M. Sadek, L. Liang, H.J. Shin, K.D. Costa, M.L. Marin, R.J. Hajjar, P.L. Faries, Aortic implantation of mesenchymal stem cells after aneurysm injury in a porcine model, *J. Surg. Res.* 170 (2011) e179–188. [10] P. Suk, I. Cundrle, J. Hruđa, L. Vocilková, Z. Konecny, M. Vlasin, M. Matejovic, M. Pavlik, V. Zvoniček, V. Sramek, Porcine model of ruptured abdominal aortic aneurysm repair, *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 43 (2012) 698–704.
- [11] A. Lederman, F.T. Saliture Neto, R. Ferreira, L.F.P. de Figueiredo, J.P. Otoch, R. Aun, E.S. da Silva, Endovascular model of abdominal aortic aneurysm induction in swine, *Vasc Med.* 19 (2014) 167–174. [12] P. Saari, M. Lähteenvuo, K. Honkonen, H. Manninen, Antegrade in situ fenestration of aortic stent graft: in-vivo experiments using a pig model, *Acta Radiol.* 53 (2012) 754–758. doi:10.1258/ar.2012.120263.
- [13] D.P. Sokolis, Passive mechanical properties and structure of the aorta: segmental analysis, *Acta Physiol (Oxf).* 190 (2007) 277–289. [14] D.P. Sokolis, H. Boudoulas, P.E. Karayannacos, Segmental differences of aortic function and composition: clinical implications, *Hellenic J Cardiol.* 49 (2008) 145–154.
- [15] J. Kim, S. Baek, Circumferential variations of mechanical behavior of the porcine thoracic aorta during the inflation test, *J Biomech.* 44 (2011) 1941–1947. [16] J. Kim, J.-W. Hong, S. Baek, Longitudinal differences in the mechanical properties of the thoracic aorta depend on circumferential regions, *J Biomed Mater Res A.* 101 (2013) 1525–1529. [17] F. Rader, E. Sachdev, R. Arsanjani, R.J. Siegel, Left Ventricular Hypertrophy in Valvular Aortic Stenosis: Mechanisms and Clinical Implications, *The American Journal of Medicine.* 128 (2015) 344–352. [18] S.A. Huygens, M.M. Mokhles, M. Hanif, J.A. Bekkers, A.J.J.C. Bogers, M.P.M.H. Rutten-van Mölken, J.J.M. Takkenberg, Contemporary outcomes after surgical aortic valve replacement with bioprostheses and allografts: a systematic review and meta-analysis, *Eur J Cardiothorac Surg.* 50 (2016) 605–616. [19] B. Arabkhani, A. Mookhoek, I. Di Centa, E. Lansac, J.A. Bekkers, R. De Lind Van Wijngaarden, A.J.J.C. Bogers, J.J.M. Takkenberg, Reported Outcome After Valve-Sparing Aortic Root Replacement for Aortic Root Aneurysm: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Ann. Thorac. Surg.* 100 (2015) 1126–1131.
- [20] J. Xu, G.-P. Shi, Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 1842 (2014) 2106–2119.
- [21] V. Monhart, Renální denervace, *Interní Med.* 2013 (2013) 349–351.

- [22] M.K. Rippey, D. Zarins, N.C. Barman, A. Wu, K.L. Duncan, C.K. Zarins, Catheter-based renal sympathetic denervation: chronic preclinical evidence for renal artery safety, *Clin Res Cardiol.* 100 (2011) 1095–1101.
- [23] F. Mahfoud, T.F. Lüscher, B. Andersson, I. Baumgartner, R. Cifkova, C. Dimario, P. Doevendans, R. Fagard, J. Fajadet, M. Komajda, T. Lefèvre, C. Lotan, H. Sievert, M. Volpe, P. Widimsky, W. Wijns, B. Williams, S. Windecker, A. Witkowski, T. Zeller, M. Böhm, European Society of Cardiology, Expert consensus document from the European Society of Cardiology on catheter-based renal denervation, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 2149–2157.
- [24] D.L. Bhatt, D.E. Kandzari, W.W. O’Neill, R. D’Agostino, J.M. Flack, B.T. Katzen, M.B. Leon, M. Liu, L. Mauri, M. Negoita, S.A. Cohen, S. Oparil, K. Rocha-Singh, R.R. Townsend, G.L. Bakris, SYMPLICITY HTN-3 Investigators, A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 1393–1401.
- [25] L.C. Booth, E.E. Nishi, S.T. Yao, R. Ramchandra, G.W. Lambert, M.P. Schlaich, C.N. May, Reinnervation of renal afferent and efferent nerves at 5.5 and 11 months after catheter-based radiofrequency renal denervation in sheep, *Hypertension.* 65 (2015) 393–400.
- [26] K. Sakakura, S. Tunev, K. Yahagi, A.J. O’Brien, E. Ladich, F.D. Kolodgie, R.J. Melder, M. Joner, R. Virmani, Comparison of histopathologic analysis following renal sympathetic denervation over multiple time points, *Circ Cardiovasc Interv.* 8 (2015) e001813.
- [27] S.G. Worthley, C.P. Tsioufis, M.I. Worthley, A. Sinhal, D.P. Chew, I.T. Meredith, Y. Malaiapan, V. Papademetriou, Safety and efficacy of a multi-electrode renal sympathetic denervation system in resistant hypertension: the EnligHTN 1 trial, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 2132–2140.
- [28] J.R. Henegar, Y. Zhang, R. De Rama, C. Hata, M.E. Hall, J.E. Hall, Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs, *Am. J. Hypertens.* 27 (2014) 1285–1292.
- [29] F. Mahfoud, L.B. Moon, C.A. Pipenhagen, J.A. Jensen, A. Pathak, V. Papademetriou, S. Ewen, D. Linz, M. Böhm, Catheter-based radio-frequency renal nerve denervation lowers blood pressure in obese hypertensive swine model, *J. Hypertens.* 34 (2016) 1854–1862.
- [30] M. Táborský, D. Richter, Z. Tonar, T. Kubíková, A. Herman, J. Peregrin, L. Červenková, Z. Husková, L. Kopkan, Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters, *Physiol Res.* (2017).
- [31] J. Horáková, Nanofibrous vascular grafts, *Technická univerzita v Liberci*, 2015.
- [32] Z. Tonar, T. Kubíková, C. Prior, E. Demjén, V. Liška, M. Králíčková, K. Witter, Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta, *Ann. Anat.* 201 (2015) 79–90.
- [33] Z. Tonar, P. Kochová, R. Cimrman, J. Perktold, T. Kubíková, E. Demjen, V. Liška, M. Králíčková, K. Witter, Links between the Orientation of Vascular Smooth Muscle and Microscopical Composition of Aortic Segments, *Solid State Phenomena.* 258 (2016) 329–332.
- [34] F. Gao, K.-S. Chia, I. Krantz, P. Nordin, D. Machin, On the application of the von Mises distribution and angular regression methods to investigate the seasonality of disease onset, *Stat Med.* 25 (2006) 1593–1618.
- [35] G.A. Holzapfel, Determination of material models for arterial walls from uniaxial extension tests and histological structure, *J. Theor. Biol.* 238 (2006) 290–302.

- [36] J. Špatenka, M. Kostelka, P. Kobylka, B. Hucín, T. Honěk, O. Lochmann, T. Hájek, T. Tláskal, V. Povýsilová, B. Fiser, [Preparation, storage, transportation and use of heart valves for allotransplantation], *Rozhl Chir.* 76 (1997) 118–125.
- [37] Z. Tonar, J. Janáček, L. Nedorost, R. Grill, V. Báca, F. Zátura, Analysis of microcracks caused by drop shatter testing of porcine kidneys, *Ann. Anat.* 191 (2009) 294–308.
- [38] D. Stoyan, W.S. Kendall, J. Mecke, *Stochastic geometry and its applications*, 2nd ed, Wiley, Chichester ; New York, 1995.
- [39] P.R. Mouton, *Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists*, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2002.
- [40] T. Kubíková, P. Kochová, J. Brázdil, J. Špatenka, J. Burkert, M. Králíčková, Z. Tonar, The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps, *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 212 (2017) 17–26.

8 Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce

8.1 Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce

8.1.1 Časopisy s impakt faktorem

Kubíková, T., Kochová, P., Brázdil, J., Špatenka, J., Burkert, J., Králíčková, M., Tonar, Z. The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Ann Anat.* 2017; 212:(17-26). DOI: 10.1016/j.aanat.2017.03.004. IF=1.308.

Tonar, Z., **Kubikova, T.**, Prior, C., Demjen, E., Liska, V., Kralickova, M., WITTER, K. Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2015; 201:79-90. DOI: 10.1016/j.aanat.2015.05.005. ISSN 0940-9602. IF=1.483.

Táborský, M., Richter, D., Tonar, Z., **Kubíková, T.**, Herman, A., Peregrin, J., Červenková, L., Husková, Z., Kopkan, L. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. *Physiol Res* 2017. IF=1.643.

8.1.2 Recenzované časopisy

Kubikova, T., Kochova, P., Fiala, R., Špatenka, J., Burkert, J., Kralickova, M., Tonar, Z. Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. *Solid State Phenomena* 2017; 341-344.

Tonar, Z., Kochova, P., Cimrman, R., Perktold, J., **Kubikova, T.**, Demjen, E., Liska, V., Kralickova, M., Witter, K. Links between the orientation of vascular smooth muscle and microscopical composition of aortic segments. *Solid State Phenomena*; 2017; 329-332.

8.1.3 Kapitola v knize

Kubikova, T., Kochova, P., Holecsek, M., Plencner, M., Prosecka, E., Filova, E., Rampichova, M., Tonar, Z. In vivo microscopic and mechanical characteristics of bioengineered and biodegradable tissue scaffolds and nanomaterials. In: Grumezescu A. M. (Ed): *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering Applications of Nanobiomaterials*, Volume 5. Elsevier, Amsterdam, 2016; 457-490.

8.2 Publikace autorky nevztahující se k tématu dizertační práce

8.2.1 Časopisy s impakt faktorem

Babuska, V., Moztarzadeh, O., Kubikova, T., Moztarzadeh, A., Hrusak, D., Tonar, Z. Evaluating the osseointegration of nanostructured titanium implants in animal models: Current experimental methods and perspectives. *Biointerphases* 2016. IF=2.677.

Junats, K. L., Tonar, Z., Kubikova, T., Liska, V., Palek, R., Mik, P., Kralickova, M., Witter, K. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. *Journal of Anatomy* 2016. IF= 2.154.

Jarkovska, D., Bludovska, M., Mistrova, E., Krizkova, V., Kotyzova, D., Kubikova, T., Slavikova, J., Chottova Dvorakova, M. Expression of classical mediators in the hearts of rats with hepatic dysfunction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. IF=1.91. Accepted for publication.

Polivka, J., Holubec, L., Kubikova, T., Priban, V., Hes, O., Pivovarcikova, K., Treskova, I. Advances in experimental targeted therapy and immunotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Anticancer Research* 2017; 21-33. IF=1.895.

Holubec, L., Polivka, J., Lisnerova, L., Kubikova, T., Safanda, M. The Effectiveness of Fibrile Neutropenia Prophylaxis with Lippegfilgrastim in Routine Clinical Practice. *In Vivo* 2017; 31(3):303-306. IF=0.832.

8.2.2 Recenzované časopisy

Kubikova, T., Filova, E., Prosecka, E., Plencner, M., Kralickova, M., Tonar, Z. Histological evaluation of the impact of in vivo application of biomaterials on the healing of cartilage, bone and skin. *Journal of Czech Physicians* 2015; 154(3):110-4. Review. Czech.

Tomasek, P., Dohnalova, P., Kubikova, T., Kralickova, M., Beran, M., Tonar, Z. Aryanogenic ventricular cardiomyopathy. *Forensic Medicine* 2015; 60(4):51-6. Czech.

9 Životopis autorky

Příjmení, Jméno, titul: Kubíková, Tereza, Mgr.

Adresa: Budovatelů 561, 330 03 Chrást, ČR

Státní příslušnost: Česká republika

Datum narození: 3. 4. 1987



Vysokoškolské zdělání

Magisterské studium

2009 – 2011

Obor: Učitelství pro střední školy – chemie, biologie
Fakulta pedagogická, Západočeská univerzita v Plzni

Zahraněční stáž

Karl Donath Laboratory for Hard Tissue and Biomaterial Research

Videň, Rakousko

2016 Hlavní řešitelka projektu podporovaného Grantovou agenturou UK
Histologické složení a mechanické vlastnosti kryoprezervovaných
vzorků allotraftů aortálních a pulmonálních chlopní

Přednášky přednesené autorkou dizertační práce

2014 Bioimplantologie VI.

Název příspěvku: Přínos histology v hodnocení in vivo hojení ran
při aplikaci biomateriálů

2014 Engineering Mechanics 2014

Název příspěvku: Morphometry and reconstruction of hepatic lobules in pig
based on serial histological sections.

2015 2. místo na 55. Studentské vědecké konferenci, LF v Plzni

Název příspěvku: Histologické hodnocení biomateriálů na podporu hojení
kostí

2015 7th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy

Název příspěvku: Evaluating regeneration of in vivo experimental organ
defect using quantitative histology

2016 Materials Structure & Micromechanics of fracture VIII

Název příspěvku: Histological composition and mechanical properties
cryopreserved samples of aortic and pulmonary valve allografts

2016 Biomateriály a jejich povrchy VIII.

Název příspěvku: Kvantitativní histologie při hodnocení in vivo experimentů

2017 Bioimplantologie IX.

Název příspěvku: Histologické složení a mechanické vlastnosti
kryoprezervovaných vzorků allotraftů aortálních a pulmonálních chlopní