

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
ÚSTAV ANATOMIE



Studium morfologie aneuryzmatu břišní aorty

Morphology of the Abdominal Aortic Aneurysm

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Lada Eberlová

Plzeň 2013

Bibliografické informace

Autor: Lada Eberlová

Název práce: Studium morfologie aneuryzmatu břišní aorty

Jazyk práce: český, anglický

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

Univerzita: Univerzita Karlova v Praze

Fakulta: Lékařská fakulta v Plzni

Ústav: Ústav anatomie

Obor postgraduálního studia: Všeobecné lékařství

Specializace: Anatomie, histologie a embryologie

Forma studia: kombinovaná

Školitel: prof. MUDr. Jiří Valenta, DrSc.

Školící konzultant: doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

Datum odevzdání: duben 2013

Klíčová slova: Morfologie; aneuryzma břišní aorty; kvantifikace; vasa vasorum; korozivní cévní preparát; mikro-CT

Název práce v angličtině: Morphology of the Abdominal Aortic Aneurysm

Klíčová slova v angličtině: Morphology; abdominal aortic aneurysm; quantification; vasa vasorum; vascular corrosion casting; micro-CT

Citování práce: Eberlová L. Studium morfologie aneuryzmatu břišní aorty. Dizertační práce. Lékařská fakulta v Plzni, 2013, 85 pp.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kdo mi vytvořili podmínky ke studiu. Děkuji doc. RNDr. Pavlu Fialovi, CSc., vedoucímu Ústavu anatomie Lékařské fakulty v Plzni. Bez pevného pracovního zázemí by tato práce nevznikla. Děkuji také všem, kdo mi pomohli důvěrou a přizvali mě ke spolupráci.

Za pomoc s dizertační prací jmenovitě děkuji:

Prof. MUDr. Jiřímu Valentovi, DrSc., a doc. MUDr. et Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D., svým školitelům, za odborné vedení, vstřícnost a inspirující profesionalitu, doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D., a MUDr. Václavu Liškovi, Ph.D., za podporu a důvěru při testování metodiky získávání mikrokorozivních preparátů, profesoru Aloisi Lametschwandtnerovi, Univ. Prof. Mag. Dr., za odborné konzultace a možnost stáže na ústavu Organismische Biologie, Universität Salzburg, Dr. Örsi Petneházymu za cennou radu při výběru pryskyřice, doc. MUDr. Davidu Kachlíkovi, Ph.D., za možnost stáže na Ústavu anatomie 3. LF UK v Praze, Ing. Tomáši Gregorovi, Ph.D., MUDr. Janu Cendelínovi, Ph.D., MUDr. Lence Černé, Mgr. Kristýně Kalusové, paní Jaroslavě Beránkové a paní Jindře Horákové za pomoc při přípravě a zpracování korozivních preparátů, doc. MUDr. Jitce Kočové, CSc., MUDr. Věře Křížkové, Ph.D., a MUDr. Lukáši Nedorostovi za cenné konzultace a laskavé poskytnutí mikroskopických preparátů, doc. MUDr. Jaromíru Kotyzovi, CSc., RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D., doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D. a MUDr. Vlastimilu Kuldovi za kontrolu vybraných kapitol, slečně Lence Jetelebové za pomoc při přípravě schémat, Mgr. Petru Míkovi za trpělivé konzultace při úpravě fotografií a panu Jiřímu Tuškovi za technickou pomoc a zkonstruování mikromanipulátoru. V neposlední řadě děkuji své rodině za vytrvalou podporu, péči, toleranci a shovívavost.

V Plzni 23. 1. 2013

Prohlášení o autorském podílu na předkládané práci

Jsem první autorkou [Eberlová et al. 2012; Eberlová et al. 2013] nebo spoluautorkou [Tonar et al. 2010, Gregor et al. 2012, Tonar et al. 2012, Houdek et al. 2012, Houdek et al., přijato k tisku] předkládaných prací. Ve studii [Eberlová et al. 2013] jsem se podílela na fotografické dokumentaci histologických preparátů a následné kvantifikaci plošného podílu kolagenu a elastinu ve stěně lidských aort, ve studii Houdek et al. (přijato k tisku) jsem kvantifikovala plošný podíl desminu. U mezioborových kapitol do monografie [Gregor et al. 2012, Tonar et al. 2012] jsem autorkou části o korozivních preparátech, jako hlavní řešitelka jsem prováděla optimalizaci protokolu k přípravě mikrokorozivních preparátů (výsledky nebyly dosud publikovány).

Při sepisování uvedených prací jsem postupovala podle etických zásad vědecké činnosti. Projekty a granty, jimiž bylo jejich řešení podporováno, jsou v publikacích řádně citovány.

Půjčování práce

S dizertační prací je možné se seznámit na Oddělení pro vědu a vzdělání na děkanátu Lékařské fakulty Univezity Karlovy v Plzni nebo Středisku vědeckých informací téže fakulty. Se zapůjčováním práce souhlasím.

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

Abstrakt

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 aneurymatického 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.

Ve studii zaměřené na histopatologii vzorků jsme u 65 pacientů s AAA (65 stěn a 55 trombů) a 6 normálních břišních aort od orgánových dárců 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, aneurymatické vzorky byly bohatší na kolagen. Mikrovazální hustota byla ve vzorcích AAA nižší než u normálních aort, s velikostí aneurymatického 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.

Ve studii vlivu atorvastatinu na experimentálně indukované aneuryzma u prasete jsme hodnotili vzorky břišních aort u 14 statiny ovlivněných, 13 neovlivněných a 6 normálních prasat bez AAA. Aorta statinem ovlivněných prasat obsahovala ve srovnání s neléčenou skupinou více elastinu, více kontraktilních 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 medie i růst aneuryzmatu. Zánětlivý infiltrát se se statinovou léčbou nezměnil. 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 prasečnických aneuryzmat nižší plošný podíl elastinu, aktinu a desminu, stěna lidských i prasečnických aneuryzmat byla méně vaskularizovaná.

Výsledky obou našich studií dokládají význam vasa vasorum pro progresi AAA. V dizertační práci proto překládám protokol k přípravě korozivních preparátů cévního mikrořečiště. Mikro-CT skeny pak nabízejí možnost jejich 3D rekonstrukce, jednotlivé skeny mohou být při dodržení stereologických principů použity i pro potřeby kvantifikace.

Dissertation Abstract

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a serious disease. Its prevalence is in the developed countries about 3%. As an aneurysm is considered a dilatation of all layers of a vessel wall over 3 cm. Majority of AAA are small and asymptomatic, and 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. in the early diagnosed patients there is a several years interval for a pharmacological influencing of the progression of this disease. 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 study analyzing the histopathology of AAA aortae of 65 patients (65 walls and 55 thrombi) and 6 normal abdominal aortae from the organ donors we assessed the following parameters: 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 study focused on the influence of atorvastatin on the experimental porcine AAA we assessed samples of 14 AAA influenced by statin, non-statin AAA group (n=13) and 6 normal abdominal aortae. Aortae of the statin group contained, comparing with the non-statin group, 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. 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 lower in porcine AAA than in healthy animals, on the other hand area fraction of granulocytes, macrophages and smooth muscle cells of the synthetic phenotype was higher here.

We did not notice any presence of thrombus in the porcine experimental AAA, which is very featuring for the human AAAs. Both in the human and in the porcine experimental AAA there was a lower content of elastin, actin and desmin in intima and media, the wall of AAA was less vasculated comparing with the healthy samples.

The results of both of our studies indicate the importance of vasa vasorum in AAA progression. That is why the proceedings of corrosion microvascular casts are also being presented. Micro-CT scans allow the 3D reconstruction, particular scans may be, under conditions stereology principles, used for the needs of quantification.

Obsah

1	Seznam zkratk a symbolů	13
2	Úvod do problematiky	17
2.1	Aneuryzma abdominální aorty	17
2.2	Prevalence AAA	20
2.3	Některé faktory etiopatogeneze AAA	21
2.3.1	Trombus a AAA	21
2.3.2	Ateroskleróza a AAA	22
2.3.3	Zánět a AAA	23
2.4	Vasa vasorum a angiogeneze	25
2.4.1	Vasa vasorum a angiogeneze ve stěně normální a aneuryzmatické aorty	27
3	Stavba normální aorty	29
3.1	Obecná stavba aorty	29
3.2	Proteiny extracelulární matrix	31
3.2.1	Kolageny	31
3.2.2	Elastin a elastické mikrofibrily	33
3.2.3	Proteoglykany	35
3.2	Buňky normální aorty	38
3.2.1	Fibroblasty, fibrocyty	38
3.2.2	Makrofágy	40
3.2.3	Žírné buňky (mastocyty)	40
3.2.4	B-lymfocyty a plazmatické buňky	40
3.2.5	Buňky hladké svaloviny	40
3.2.6	Apoptóza, anoikis	41
3.2.7	Buňky endotelu	42
3.2.8	Kmenové buňky ve výzkumu AAA	42
4	Farmakologické ovlivnění AAA	45
5	Cíle dizertační práce	47
6	Metodiky	49
6.1	Metodika histopatologické kvantifikace lidských AAA	49
6.1.2	Metodika biochemického zpracování	51
6.1.3	Statistická analýza	51
6.2	Histopatologická kvantifikace prasečích AAA	52

6.2.1	Statistická analýza	53
6.3	Metodika přípravy mikrokorozičních preparátů	53
6.3.1	Předpříprava napouštěného vzorku	54
6.3.2	Pryskyřice	54
6.3.3	Příprava místa pro injikaci.....	55
6.3.4	Základy perfuze a perfuzní techniky	56
6.3.5	Chemické roztoky pro maceraci	57
6.4	Mikro-CT.....	57
6.4.1	Kontrastní látky	57
7	Výsledky.....	59
7.1	Hlavní výsledky a nálezy	59
7.1.1	Morfologie aneuryzmatu lidské aorty	59
7.1.2	Morfologie modelu prasečího AAA.....	62
7.2	Naše zkušenosti s mikrokorozičními preparáty	64
7.2.1	Nástřik myši.....	64
7.2.2	Koroziční preparát portálního řečiště jater prasete	66
7.3	Diskuse	69
7.4	Závěr.....	70
7.5	Možné pokračování výzkumu	71
8	Literatura pro dizertační práci	73
9	Publikované práce	85
9.1	Seznam publikovaných prací.....	85
9.2	Kopie vybraných publikovaných prací.....	85

1 Seznam zkratek a symbolů

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

AAA – aneuryzma abdominální aorty

AOD – aorto-okluzivní choroba (aorto-occlusive disease)

AS – ateroskleróza

ACE – angiotenzin konvertující enzym

α -SM aktin-izoforma aktinu typická pro myofibrily buněk hladké svaloviny

CD4, CD31, CD40, CD44, CD68 – povrchové molekuly leukocytů (cluster of differentiation)

COL1A1, COL1A2 – gen kódující $\alpha 1(2)$ řetězec kolagenu

cP – Centipoise, jednotka dynamické viskozity

CT – výpočetní tomografie (computed tomography)

EC – buňky endotelu (endothelial cells)

ECM – mezibuněčná hmota (extracelulární matrix)

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

FN – fibronektin

FACIT – nefibrilární kolageny (fibril-associated collagens with interrupted triple helices)

GAG – glykosaminoglykany

GER – granulární (zrnité) endoplazmatické retikulum

H – receptor pro histamin

HA – hyaluronan

HAS – hyaluronan syntáza

HIF-1 α – hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 (hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit)

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

IL – interleukin

IMT – tloušťka intimy a medie

INF- γ – interferon gama

IT – tloušťka intimy

L_A – délková hustota

KB – kmenové buňky

KOH – hydroxid draselný

LDL – nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)

MASS – multicentrická studie skrínungu AAA ve Velké Británii (Multicentre Aneurysm Screening Study)

MF – makrofág

MHC II – glykoproteiny na buňkách prezentujících antigen (major histocompatibility complex)

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

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

mikro-USG – vysokorozlišovací ultrasonografie (micro-ultrasonography)

MMP – matrix metaloproteináza (matrix metalloproteinase)

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NO – oxid dusnatý

OMIM – databáze genů spojených s patologiemi u člověka (Online Mendelian Inheritance in Man)

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

PAP – plazmin-antiplazminové komplexy

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDGF – destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)

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

RGD – sekvence označující triplet aminokyselin argininu (R), glycinu (G) a aspartátu (D), zajišťuje vazbu na integrin

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

RTG – rentgen, rentgenový

SEM – rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)

SLRP – na leucin bohaté malé proteoglykany (small leucin-rich proteoglycans)

SM myosin – myosin typický pro hladkou svalovinu (smooth muscle myosin)

TCR – T-buněčný receptor (T-cell receptor)

TGF- β – transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)

TIMP – tkáňový inhibitor metaloproteináz (tissue inhibitor of metalloproteinases)

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)

tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator)

UI – měrná jednotka pro množství účinné látky

uPA – urokinázový aktivátor plazminogenu (urinary plasminogen activator)

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

VCI – vena cava inferior

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

VSMC – buňka hladké svaloviny (vascular smooth muscle cell)

VV – vasa vasorum, cévy vyživující cévní stěnu

VVE – vasa vasorum externa

VVI – vasa vasorum interna

vWF – von Willebrandův faktor

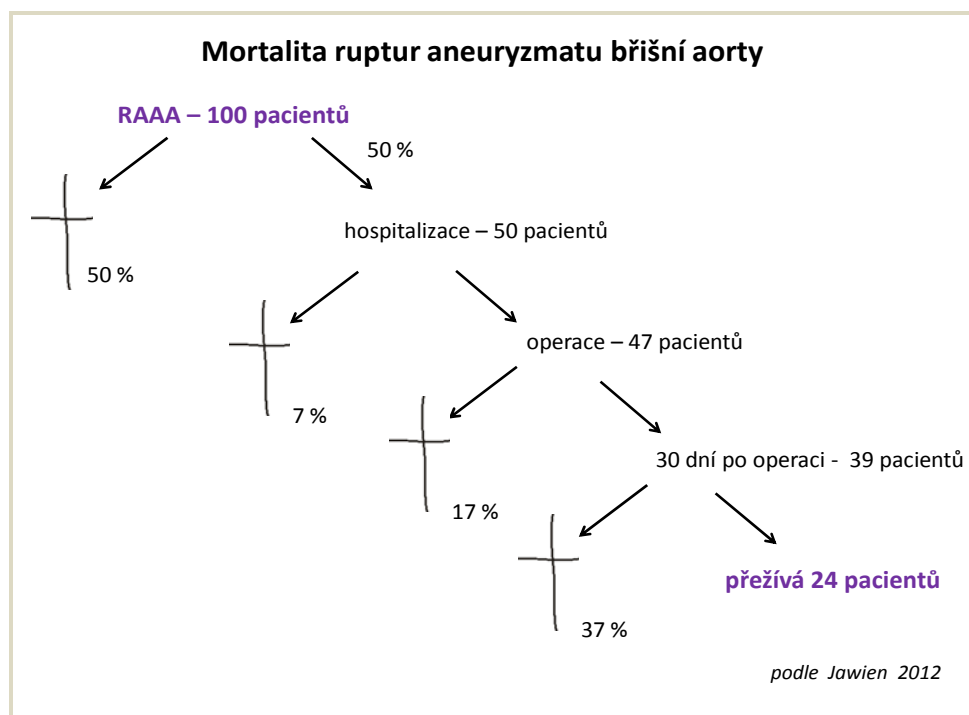
xMAP technologie – technologie pro multiplexní molekulární analýzy

2 Úvod do problematiky

2.1 Aneuryzma abdominální aorty

Aneuryzma (výduť) je ohraničené rozšíření tepny způsobené strukturálními změnami její stěny. Obvyklá klasifikace aneuryzmat vychází z jejich etiologie, lokalizace a tvaru. Příčiny vzniku jsou spojené s degenerací cévní stěny (nejčastěji aterosklerózou, cystickou medionekrózou nebo mykotickou embolií), cévní výduť může vzniknout ale i na základě poranění nebo vrozené dispozice. 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. Zvláštní variantou pravého aneuryzmatu postihující asi 3–10 % pacientů s AAA je tzv. zánětlivé aneuryzma, které vzniká embolizací bakteriálního agens (*Salmonella species*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) do vasa vasorum aorty. V řadě případů je však etiologie nejasná a roli zde hraje pravděpodobně i autoimunní a genetická dispozice [Treska et al. 2005]. Pro histologický nález zánětlivého aneuryzmatu je typické výrazné ztlustění cévní stěny a masivní zánětlivý infiltrát s převahou v adventicii. **Nepravé, falešné aneuryzma** (pulzující hematoma), je v podstatě hematoma opouzdřený adventicií a komunikující s lumenem cévy. Od ruptury AAA je nutno odlišit akutní **disekci**, při níž následkem poškození intimy proniká krev mezi vnitřní a zevní vrstvu medie s vytvořením nepravého kanálu, falešného lumen. Tvarem je většina pravých aneuryzmat břišní aorty koncentricky vřetenovitých (fuziformních), tedy postihujících celý obvod stěny. Excentrické (sakulární) formy jsou typické pro nepravá aneuryzmata [Krajíček 2007].

AAA je velmi závažné onemocnění. Většina aneuryzmat je totiž asymptomatických a nezdědka bývá jejich prvním příznakem ruptura, kterou končí asi čtvrtina neléčených AAA [Darling et al. 1977] a jejíž celková mortalita se pohybuje kolem 70 % [Heikkinen et al. 2002, obrázek 2.1].

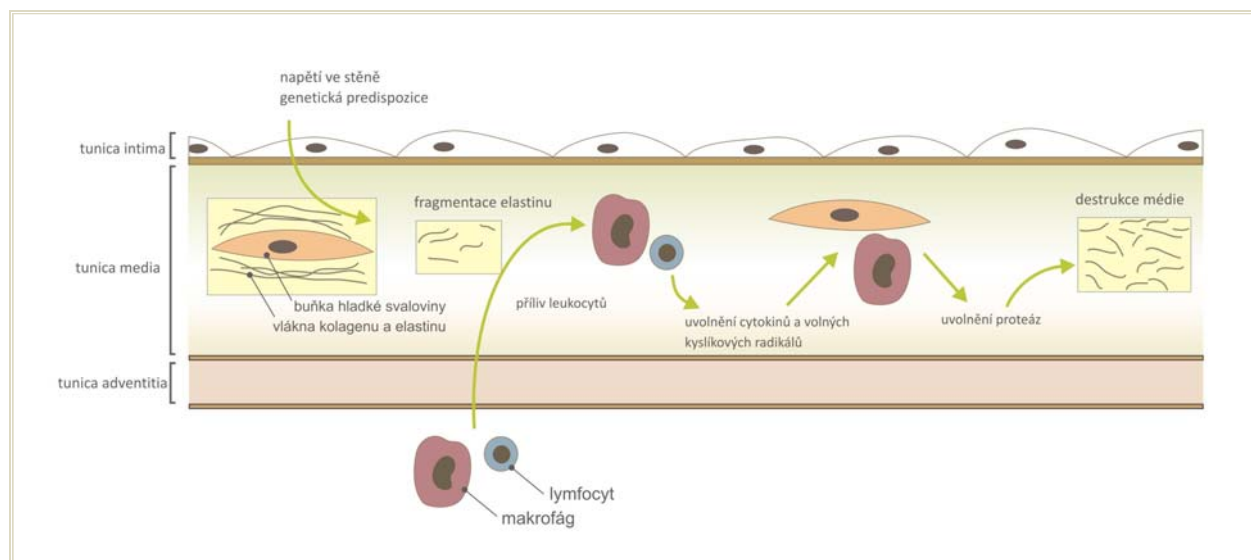


Obrázek 2.1 – Mortalita ruptur AAA, upraveno podle Jawien [2012]

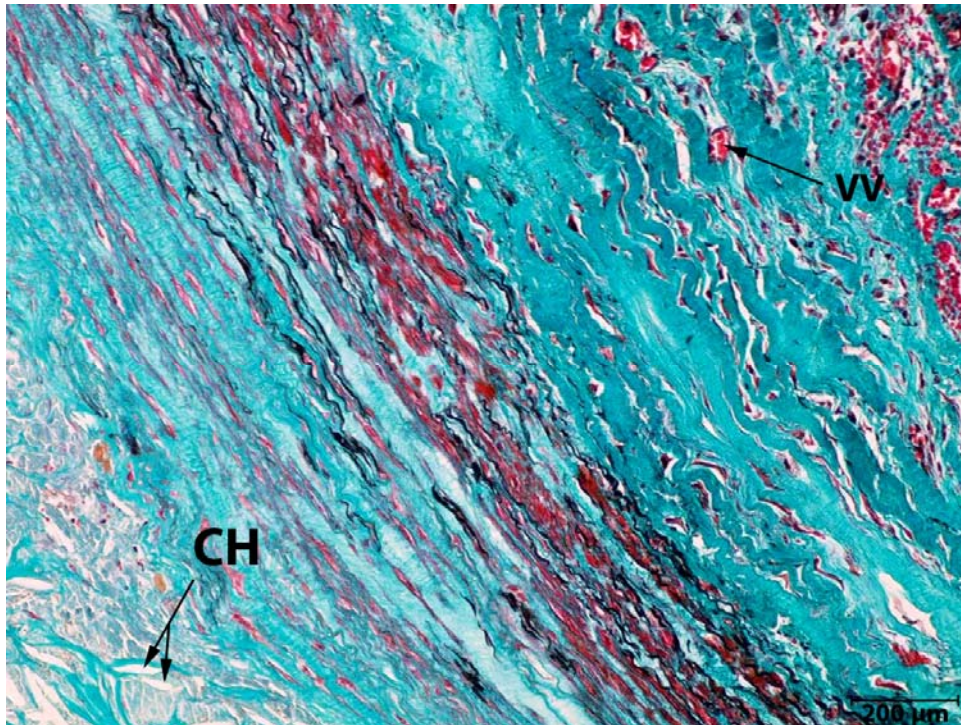
Růst AAA však není lineární [Kurvers et al. 2004], vývoj onemocnění proto nelze s jistotou předvídat. Protože se riziko ruptury zvyšuje s velikostí aneuryzmatu [Lederle et al. 2002], je snahou kliniků diagnostikovat onemocnění v co nejčasnějším stádiu. Operační zákrok je běžně indikován u asymptomatických aneuryzmat od velikosti 5,5 cm, kdy riziko ruptury převyšuje riziko perioperační mortality [Šebesta 2007]. Vzniká proto značný prostor pro farmakologické ovlivnění časně zachycených AAA.

Výzkumu etiopatogeneze [Michel et al. 2011] a s ní související cílené farmakologické intervence byla v posledních letech věnována velká pozornost [Bergqvist 2011, Golledge et Norman 2011]. 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 zánětlivé reakce spolu s navazující imunitní odpovědí, degradace proteinů extracelulární matrix, biomechanický stres a genetické vlivy (obrázek 2.2). Detailní přehled a popis faktorů patogeneze AAA je uveden v našem přehledovém článku Eberlová et al. [2012].

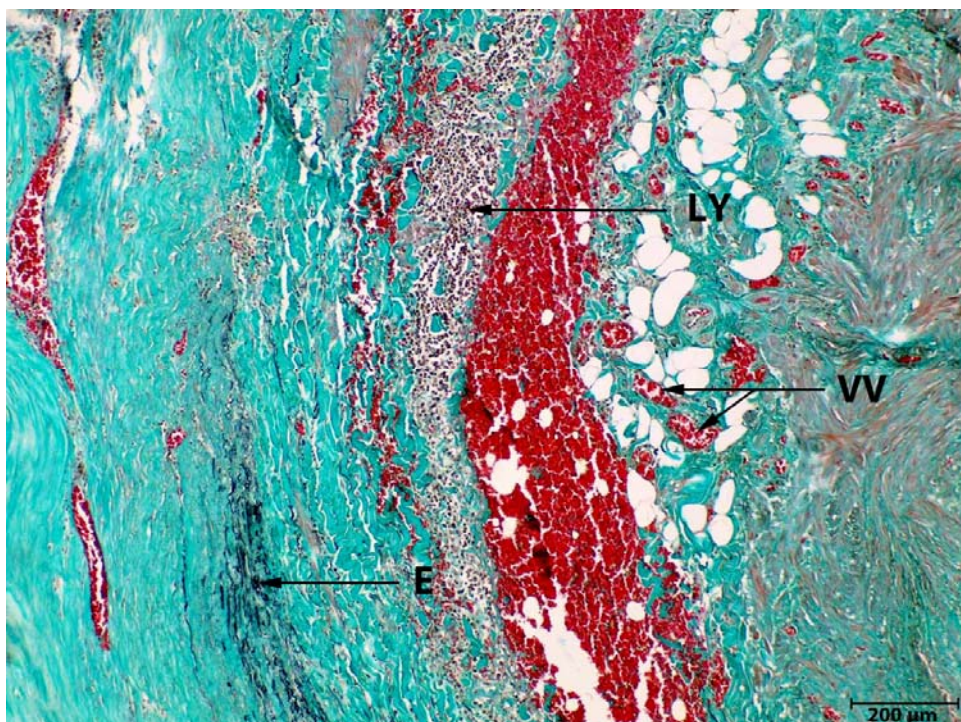
Pravé AAA vzniká nejčastěji jako komplikace dilatační formy aterosklerózy. Někteří autoři na ně nahlízejí jako na specifický typ atherotrombózy [Michel et al. 2011], u které progresivní degenerace vede k dilataci a ruptuře. Aneuryzmatická degenerace zahrnuje několik vzájemně propojených procesů (obrázek 2.2–4): chronický zánět spojený s neovaskularizací, fragmentací elastinu a jeho náhradou kolagenem, dále úbytkem a fenotypovou modulací buněk hladké svaloviny v medii. Ve většině AAA je přítomen nástěnný trombus [Harter et al. 1982], jeho vliv na progresi AAA byl také intenzivně zkoumán [Michel et al. 2011]. Zevrubný histologický popis AAA byl uveden již v předchozích publikacích z našich pracovišť [Třeška et al. 2002, Eberlová et al. 2012]. Aplikace stereologických metod však umožnila přinést do této problematiky nový vhled [Tonar 2007, Tonar et al. 2010, Eberlová et al. 2013, Houdek et al., přijato k tisku].



Obrázek 2.2 – Přehled nejdůležitějších faktorů patogeneze AAA



Obrázek 2.3 – Asymptomatické aneuryzma břišní aorty. Vlevo intima s krystaly cholesterolu (CH), v medii patrná elastolýza, úbytek hladké svaloviny, zmnožení kolagenu, překrvení vasa vasorum (VV) a hemorhagie ve stěně. Barveno Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem modifikovaným podle Kočové [1970] – černě elastin, hnědočerveně hladká svalovina, modrozeleně kolagen; měřítko 200 μm .



Obrázek 2.4 – Symptomatické aneuryzma břišní aorty. Prokrváčená tunica media se zbytky elastických lamel (E), lymfocytární infiltrát (LY), překrvení vasa vasorum (VV), zmnožení kolagenu. Barveno Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem modifikovaným podle Kočové [1970]; měřítko 200 μm .

2.2 Prevalence AAA

Epidemiologický profil AAA doznává v posledních letech změn (Stather et al. 2013). Prevalence AAA byla v minulém století nejvyšší u mužů věku nad 65 let, onemocnění bylo diagnostikováno v průměru u jednoho ze dvaceti mužů této skupiny populace (odpovídá prevalenci 5 %). Tento poznatek zohledňovala i kritéria randomizace pacientů do studií, následně se stala tato věková hranice prahovou v zemích, kde byl zaveden skrínig – v USA [Lederle 2003], Kanadě [Mastracci et al. 2007], Austrálii [Lamont 2005], Velké Británii [Darwood et al. 2012] a Švédsku [Wanhainen et al. 2006]. Výsledky některých randomizovaných studií z 90. let minulého století uvádí tabulka 2.1:

Tabulka 2.1 – Výsledky epidemiologických studií z přelomu tisíciletí podle Fleming et al. 2005 (MASS = Multicentre Aneurysm Screening Study)

	MASS (Velká Británie)	západní Austrálie	Viborgské hrabství (Dánsko)	Chichester (Velká Británie) muži	Chichester (Velká Británie) ženy
publikace	Ashton et al. 2002	Norman et al. 2004	Lindholt et al. 2002	Scott et al. 1995	Scott et al. 2002
věk	65–74	65–83	65–73	65–80	65–80
pohlaví	muži	muži	muži	muži	ženy
počet vyšetřených	27 147	12 203	12 658	5 934	9 342
prevalence AAA > 3 cm	4,9 %	7,2 %	4,0 %	7,6 %	1,3 %

Tabulka 2.2 – Prevalence AAA podle nejnovějších epidemiologických studií

	Švédsko	Gloucester (Velká Británie)	Jihozápadní Londýn	Janov (Itálie)	Severní Irsko
publikace	Svensjö et al. 2011	Earnshaw 2012	Conway et al. 2012	Palombo et al. 2010	Badger et al. 2011
pohlaví, věk	muži > 65 let	muži > 65 let	muži > 65 let	muži i ženy > 65 let	muži > 65 let
počet vyšetřených	22 187	100 000	4 216	8 234	5 931
délka sledování (roky)	neuveдена	3 roky (pokračuje)	15 měsíců (pokračuje)	2,5 roku	cca 6 let
prevalence AAA >3 cm	2,2 %	1,7 %	1,6 %	6,2 %:	5,4 %

Epidemiologické studie s daty sbíranými do roku 2000 prokazovaly rostoucí jak incidenci [Eickhoff 1993], tak i mortalitu tohoto onemocnění [Filipovic et al. 2005]. Tento trend byl vysvětlován stárnutím populace spolu se zvýšenou dostupností stále dokonalejších zobrazovacích metod. Výsledky nejnovějších epidemiologických studií ukazuje tabulka 2.2, ve všech byl nejvyšší výskyt malých AAA (průměr < 4 cm). Výstupy ukazují, že v zemích se zavedeným skríníngem došlo ke snížení prevalence, ale i mortality tohoto onemocnění [Svensjö et al. 2011]. Nově vyvstala potřeba standardizace měření aneuryzmatu [Long et al. 2012], jako i opakovaného sonografického vyšetření u pacientů s průměrem aorty mezi 25–29 mm [Hafez et al. 2008].

Výsledky epidemiologických studií ukazují, že prevalence i incidence AAA jsou populačně specifické a dynamické nejen v důsledku měnících se demografických parametrů, ale i míry expozice rizikovým faktorům [Svensjö et al. 2011, Stather et al. 2013]. Kritéria skríníngu AAA by proto měla být přizpůsobena na danou populaci.

2.3 Některé faktory etiopatogeneze AAA

Jak již bylo uvedeno, aneuryzmatická dilatace vzniká nejčastěji v ateroskleroticky degenerované břišní aortě. I s ohledem na design naší studie [Eberlová et al. 2013] se v následující části budu věnovat právě zánětu, ateroskleróze a vlivu trombu na AAA.

2.3.1 Trombus a AAA

Nástěnný trombus je typickou strukturou velkých aneuryzmat, ale nachází se i v aneuryzmatech malých [Faggioli et al. 1994]. Je to porézní, organizovaná struktura obvykle s lamelární stavbou [Adolph et al. 1997]. Biologicky neaktivnější je **luminální**, fibrinová vrstva trombu, ve které se v důsledku aktivace destiček a trombinu tvoří fibrin, vlivem hemaglutinace erytrocytů se uvolňuje hemoglobin. Tato vrstva je bohatá na složky fibrinolytického systému [Houard et al. 2007], jsou zde vychytávány zejména neutrofilní leukocyty, které jsou zdrojem proteáz [Fontaine et al. 2002] a cytokinů [Houard et al. 2009]. Luminální vrstva kryje **střední**, na krevní elementy chudou vrstvu. Vrstva **abluminální** je v přímém kontaktu se zeslabenou aortální stěnou, ve které byly prokázány známky fibrinu – i proteolýzy. Protože plazminogen byl detekován pouze ve trombu a naopak plazmin pouze v naléhající stěně, je předpoklad, že trombus je významným zdrojem proteáz [Fontaine et al. 2002]. Tuto hypotézu potvrzují i jiné studie, podíl trombu na dilataci cévní stěny byl prokázán i v jiných typech aneuryzmat [Frösen et al. 2004]. Ve ztenčené stěně pod trombem byla prokázána výraznější elastolýza, úbytek buněk hladké svaloviny a výraznější zánětlivý infiltrát [Kazi et al. 2003].

Vývoj AAA je spojen také se změnami napětí aortální stěny. To je ovlivněno mnoha faktory, je výstupem dynamických interakcí mezi prouděním krve a mechanikou stěny. Napětí stěny lze odvodit z Laplaceova zákona, který vyjadřuje jeho závislost na transmurním tlaku, poloměru cévy a tloušťce její stěny. Pro válcovitý útvar reprezentující cévu má tvar:

$$\sigma = (P \times r)/t,$$

kde σ je napětí stěny, P je transmurní tlaková diference, r je vnitřní poloměr cévy a t je tloušťka stěny.

Z uvedeného lze odvodit i protektivní úlohu přítomnosti intraluminálního trombu. Trombus zmenšuje vnitřní poloměr cévy, ztlušťuje aortální stěnu, a tak snižuje její napětí.

2.3.2 Ateroskleróza a AAA

Ateroskleróza (AS) je z patologického hlediska považována za zvláštní typ arteritidy nejasné etiologie, v jejíž patogenезi se uplatňují mechanismy nespecifického zánětu.

Za prvotní je považováno idiopatické poškození endotelu, za agens byly zvažovány některé mikroorganismy (např. *Chlamydia pneumoniae*), homocystein, kouření cigaret nebo hemodynamické vlivy. Následně zvýšená permeabilita cévní stěny umožňuje zvýšené pronikání nízkodenzitního lipoproteinu (LDL) do intimy. Lipidová složka LDL podléhá oxidaci (ta je potencována kouřením), proteinová pak glykosylaci (potencována hyperglykemií). Na změněný LDL reagují endotelie expresí adhezivních molekul, které usnadňují vcestování makrofágů a T-lymfocytů do cévní stěny, a sekrecí cytokinů, které stimulují diferenciaci monocytů na makrofágy. Na jejich povrchu se aktivují receptory pro oxidovaný LDL, jehož fagocytózou vznikají z makrofágů nebo VSMC pěnové buňky (lipofágy). Kumulací lipofágů vznikají lipoidní proužky. Makrofágy aktivují T-lymfocyty, jejichž cytokiny potencují zánět i proliferaci a migraci VSMC. Ty na povrchu vznikajícího plátu syntetizují kolagen a proteoglykany za vzniku fibrotické čepičky. Nestabilita a exulcerace plátu je vyvolána exacerbací zánětu spojeného s apoptózou makrofágů a buněk hladké svaloviny (VSMC) a uvolněním mediátorů, které naruší pevnost kolagenních vláken. Při styku vzniklého debris (ateromové kaše) s krví vzniká trombus. Starší ateromové pláty mohou podléhat dystrofické kalcifikaci.

Tabulka 2.3 – Přehled rizikových faktorů aterosklerózy, vzniku a progresu AAA podle Schoen 2005, Choke et al. 2005

ateroskleróza	vznik AAA	ruptura AAA
hyperlipidémie (hypercholesterolémie, zvýšená hladina LDL)	pozitivní RA	pozitivní RA
hypertenze	kouření cigaret	průměr, rychlost růstu AAA
kouření cigaret	mužské pohlaví	kouření cigaret
diabetes mellitus	muži > 65 let	ženské pohlaví
riziko vzniku AS se u mužů a žen po 55. roce věku vyrovnává (mizí protektivní vliv estrogenů)	hypertenze	hypertenze
hyperhomocysteinémie	CHOPN	CHOPN
	hyperlipidémie	

AAA se vyvíjí jako komplikace dilatační formy aterosklerózy. Aneurymatická stěna může vykazovat všechny typy aterosklerotické degenerace [Stary 2000, Tonar et al. 2007]. Rizikové faktory vývoje a progresu AAA se s rizikovými faktory AS shodují jen částečně

(tabulka 2.3). U AAA byl např. prokázán protektivní účinek diabetu, a to nejspíš díky zvýšené glykaci proteinů extracelulární hmoty (ECM), které jsou odolnější vůči proteolýze [Norman et al. 2007, Lederle 2012]. Zvýšené riziko progese a ruptury bylo prokázáno u žen [Sweeting et al. 2012]. Také zánětlivý infiltrát u AS ve srovnání s AAA vykazuje rozdíly. Zatímco u aterosklerózy jsou zánětlivé buňky lokalizovány primárně v poškozené intimě, zánětlivý infiltrát u AAA je obvykle transmuralní, s převahou v medii a adventicii [Koch et al. 1990].

2.3.3 Zánět a AAA

Význačným histologickým rysem stěny AAA jsou známky chronického zánětu – přítomnost extenzivní transmuralní infiltrace s převahou lymfocytů a makrofágů [Koch et al. 1990, Třeška et al. 2002], obrázek 2.2, 2.4.

Za chronický zánět označujeme zánět s vleklým průběhem v řádech týdnů nebo měsíců. Chronický zánět může nasedat na zánět akutní, často však probíhá plíživě a asymptomaticky. Příčina chronického zánětu u AAA zatím není známa, byl zkoumán vliv *Chlamydia pneumoniae* [Tambiah et al. 2001] nebo autoimunní reakce [Gregory 1996]. Ve stěně AAA byl prokázán chemotaktický účinek produktů vzniklých degradací elastinu a jiných struktur mezibuněčné hmoty [Hance et al. 2002]. Makrofágy prezentují antigen T-lymfocytům, zároveň produkují cytokiny podporující jejich stimulaci (např. IL-6, -12). Také aktivované T-lymfocyty produkují cytokiny, z nich hlavním stimulatorem makrofágů je INF- γ , TNF působí chemotakticky. Z aktivovaných B-lymfocytů se vyvíjejí plazmatické buňky. Dlouhodobý chronický zánět s kumulací lymfocytů, antigenprezentujících buněk a buněk plazmatických může vést k vytvoření až lymfoidních struktur typu lymfatických uzlíků. Následuje destrukce tkáně zánětlivými buňkami a reparace spojená s angiogenezí a fibrózou [Třeška et al. 2002]. Přehled některých cytokinů zkoumaných ve vztahu k AAA ukazuje tabulka 2.4:

Tabulka 2.4 – Přehled některých cytokinů zkoumaných ve vztahu k AAA [Eberlová et al. 2012]

cytokin	publikované nálezy (citace)
IL-6	zvýšené hladiny IL-6 byly prokázány v AAA stěně a korelovaly s hladinami v plazmě [Dawson et al. 2006]; plazmatické hladiny korelovaly s průměrem AAA [Rohde et al. 1999]
IL-12	hladina IL-12 mRNA nebyla ve tkáni pacientů s AAA vyšší ve srovnání se vzorky pacientů s aorto-okluzivní chorobou (AOD) [Davis et al. 2001]
TNF- α	signifikantně vyšší [Juvonen et al. 1997] a plazmatické hladiny u pacientů s AAA [Třeška et al. 2000]
INF- γ	signifikantně vyšší sérové hladiny u žen s AAA [Juvonen et al. 1997]

Imunitní buňky jsou spolu s VSMC a fibroblasty zdrojem nejen cytokinů, ale i endopeptidáz. Ty stimulují zánětlivou reakci, štěpí proteiny ECM a podporují neovaskularizaci. Nejvýznamnějšími proteázami s elastolytickým účinkem jsou metaloproteinázy MMP-2, -9, -12, katepsiny a neutrofilní elastáza. Chymáza působí VSMC apoptózu, MMP-1, -3, -8, -13 jsou nejvýznamnějšími kolagenázami a podporují progresi AAA [Choke et al. 2005, Rizas et al. 2009].

Aktivita metaloproteináz je regulována v několika stupních: transkripcí a translací neaktivních prekurzorů, následnou aktivační proteolýzou a interakcí s jejich inhibitory (TIMP). Aktivitu metaloproteináz významně ovlivňuje také fibrinolytický systém [Lijnen et al. 2001]. Přehled některých některých matrix metaloproteináz a jejich inhibitorů zkoumaných ve vztahu k AAA ukazuje tabulka 2.5.

Tabulka 2.5 – Matrix-degradující enzymy a jejich inhibitory exprimované v aneuryzmatické tkáni

	publikované nálezy (citace)
MMP-1, -3	zvýšená hladina MMP-1 a mRNA ve srovnání se zdravou aortou [Irizarry et al. 1993]; zvýšená MMP-1 a -3 imunoreaktivita u pacientů s aortookluzivní chorobou (AOD) a AAA [Knox et al. 1997]
MMP-2	zvýšená hladina MMP-2 a mRNA u AAA ve srovnání s normální aortou a AOD [Davis et al. 1998]; zvýšená produkce MMP-2 ve VSMC tkáňových kultur pacientů s AAA [Crowther et al. 2000]; zvýšená MMP-2 imunoreaktivita u pacientů s AOD a AAA [Knox et al. 1997]; MMP-2 a -9 zvýšena u hypoxických VSMC z AAA [Erdozain et al. 2011]
MMP-7	exprese MMP-7 nebyla prokázána v žádném z aortálních vzorků, vč. aneuryzmat [Elmore et al. 1998]; MMP-7 prokázána pouze ve stěně AAA, ne trombu [Fontaine et al. 2002]
MMP-9	hladiny MMP-9 ve stěně AAA významně vyšší než u AOD nebo normální aorty [Thompson et al. 1995]; zvýšená exprese MMP-9 (mRNA a proteinu) ve stěně AOD a AAA [Davis et al. 1998]
MMP-13	zvýšené množství MMP-13 ve stěně AAA, imunopozitivita a MMP-13 m-RNA ve VSMC [Mao et al. 1999]
TIMP	zvýšený poměr (MMP-1 a -9) a inhibitorů (TIMP-1 a 2) mRNA v AAA vs. norm. aorta (MMP/TIMP ratio) [Tamarina et al. 1997]; nižší hladiny TIMP-2 a PAI-1 mRNA v AAA než AOD aortách [Defawe et al. 2003]; TIMP-2 mRNA vyšší ve tkáni AAA [Elmore et al. 1998]

Aktivita metaloproteináz je významně ovlivňována fibrinolytickým systémem. Fibrinolytický systém je funkčním protipólem koagulačních kaskád. Během fyziologické fibrinolýzy dochází ke konverzi plazminogenu na plazmin působením aktivátorů plazminogenu. Tento proces je regulován aktivátory a inhibitory plazminogenu. Tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) zajišťuje proteolýzu v krvi, typ urokinázový (uPA) pak ve tkáni. Hlavním inhibitorem aktivátorů plazminogenu je inhibitor typu 1 (PAI-1). Plazmin štěpí fibrin, je ale schopen štěpit i struktury ECM, a to buď přímo nebo aktivací metaloproteináz i jiných endopeptidáz [Lijnen et al. 2001, Carmeliet et al. 1997]. Poté, co se plazmin dostane do cirkulace, je okamžitě inaktivován antiplazminem za vzniku plazmin-antiplazminových (PAP) komplexů. Plazmatické hladiny PAP a tPA byly prokázány jako statisticky signifikantní markery expanze AAA [Lindholt et al. 2001, Lindholt 2006]. Křížková et al. 2009 popsala korelaci mezi plošným podílem PAI-1 pozitivních elementů stěny a klinickou klasifikací AAA – množství PAI-1 pozitivních elementů bylo nejvyšší u asymptomatických AAA, nejnižší u ruptur.

2.4 Vasa vasorum a angiogeneze

Funkce a novotvorba vasa vasorum v patologii cév byla a je intenzivně zkoumána [Mulligan-Kehoe 2010]. S ohledem na překvapivé výsledky našich studií [Eberlová et al. 2013, Houdek et al., přijato k tisku] věnuji tématice vasa vasorum a novotvorbě cév samostatnou kapitulu.

Vasa vasorum (VV) tvoří mikrořečiště sestávající z tepenné, kapilární a žilní části [Lowenberg et Shumacker 1948]. Funkcí vasa vasorum je zásobovat kyslíkem a živinami zevní vrstvu cévní stěny, která u větších cév nemůže být zásobena prostou difúzí. Hustota a hloubka penetrace vasa vasorum je tak závislá na tloušťce cévy i oxygenaci krve, která cévou proudí. U zdravé aorty se VV objevují od tloušťky stěny 0,5 mm, v aortě dospělých savců od 29. lamelární jednotky [Wolinsky et Glagov 1967]. U zdravých cév většina vasa vasorum, **vasa vasorum externa** (VVE), odstupuje z periadventiciálních tepen [Gössl et al. 2003, Kachlík et al. 2003]. **Vasa vasorum interna** (VVI) byla pozorována u koronárních tepen prasete v místech s nižší denzitou VVE [Gössl et al. 2003] nebo u intimální hyperplazie [Kumamoto et al. 1995]. Vasa vasorum tepen jsou drenována do doprovodných žil [Gössl et al. 2003], vasa vasorum žilní stěny do přítoků kmenové žíly [Kachlík et al. 2003].

Architektonika větvení VVE je obdobná jako u běžného tepenného řečiště [Gössl et al. 2003, Zamir 1999]. Velká tepenná VV jsou doprovázena často zdvojenými venózními VV [Lowenberg et Shumacker 1948]. Rozlišujeme VV prvního řádu, která odstupují z hlavního kmene a běží obvykle podél cévy, kterou zásobují. VV druhého řádu jsou periferními větvemi mikrovaskulárního stromu a běží obvykle cirkulárně [Lametschwandtner et al. 2004]. Architektonika větvení VV se ale může s patologií cévní stěny měnit [Bayer et al. 2002]. Ve stěně VV byly prokázány cirkulárně orientované buňky hladké svaloviny [Scotland et al. 2000], které mohou svým napětím průtok krve cévní stěnou regulovat.

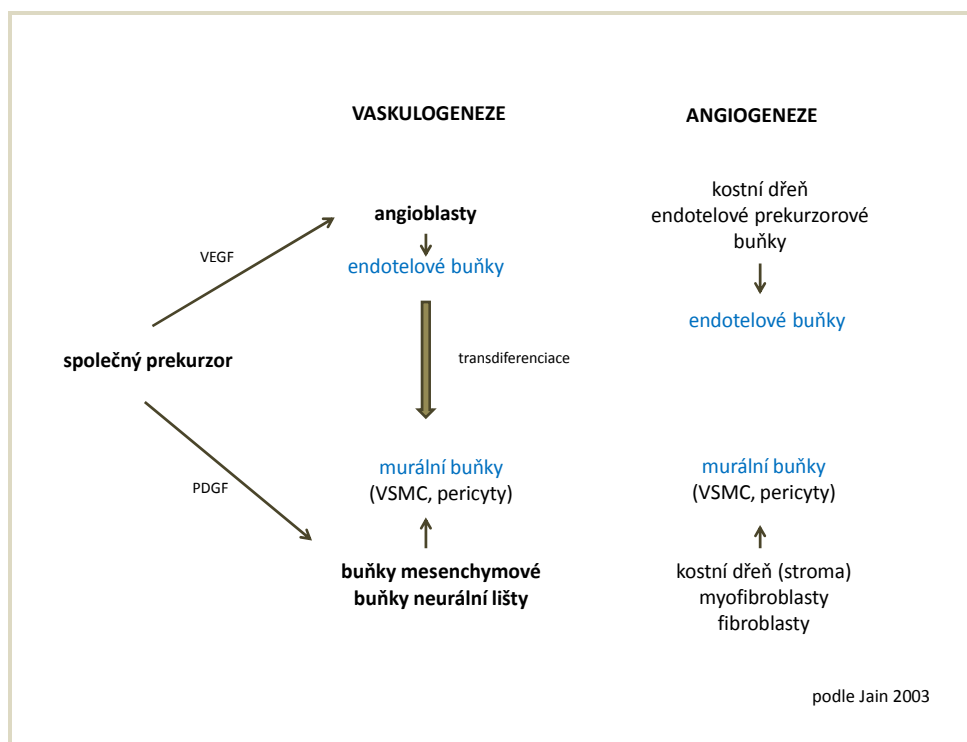
Pro přehledné zobrazení vasa vasorum lze použít nástřik černou tuší [Kachlík et al. 2003, Kachlík et Hoch 2009], detailní hodnocení jejich prostorového uspořádání jakož i možnost kvantifikace v 3D obrazu nabízejí mikrokorozivní preparáty v kombinaci s rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) [Bayer et al. 2002, Lametschwandtner et al. 2004] nebo mikro-CT [Gössl et al. 2003]. O této metodice pojednává kapitola 6.3.

V novotvorbě cév je nutné rozlišovat dva procesy: 1. Založení embryonálního cévního stromu, tzv. **vaskulogenezi**, kdy primární cévní pletěň vzniká splynutím krevních ostrůvků tvořených angioblasty (obrázek 2.5). 2. Následná **angiogeneze** vychází z rašení slepě končících cév z již vytvořeného cévního stromu [Folkman 1997, Risau 1997].

Vaskulogeneze je ve zdravém organismu výsadním procesem časně embryogeneze, kardiovaskulární systém je prvním založeným orgánovým systémem. Těsně po zahájení srdeční pulzace (21. den) se vaskulární systém začíná významně měnit a diferencovat. Ačkoli proces diferenciaci není zatím plně objasněn, předpokládá se veliký význam hemodynamických sil. Ukončení proudění krve znamená regresi cévy, zatímco zvýšení tlaku a smykového napětí vede k lokálnímu doplňování VSMC a diferenciaci kapiláry v artérii nebo vénu [Bushman et Schaper 1999].

Angiogeneze je proces tvořený několika kroky: endoteliální proliferací a migrací, extracelulární proteolýzou a vaskulární remodelací. Postnatálně dochází ve zdravé tkáni k angiogenezi jen vzácně, např. v rámci menstruačního cyklu. Endoteliální proliferace a migrace je ale jen krátkodobá a cévy rychle mizí. Angiogeneze doprovází i reparační procesy, zánět nebo solidní tumory. Při angiogenezi stimulované hypoxií dochází ke zvýšení exprese endoteliálních mitogenů, jako např. endoteliálního růstového faktoru (VEGF) nebo regulátoru jeho transkripce – hypoxií indukovaného faktoru HIF-1 α [Bayer et al. 2002, Egginton 2009]. Vzniklý oxid dusnatý

dilatuje cévní stěnu, která i pod vlivem VEGF zvyšuje svou permeabilitu. Bylo prokázáno, že se endotelové buňky (EC) dělí jen za určitých prostorových podmínek, pro účinek růstových faktorů, cytokinů a hormonů na buňku endotelu jsou důležité i mechanické síly. Nerozpustné molekuly, např. kolagen nebo fibronectin, se jako struktury ECM váží na receptory a integriny membrány endotelu. Tlakové změny způsobují přenosem přes cytoskelet deformaci jádra, jejímž výstupem je genová exprese a syntéza DNA [Ingber 1990]. Sekrecí a aktivací metaloproteináz (nebo suprese sekrece jejich inhibitorů) se rozpouští ECM, vlivem VEGF a jiných mitogenů extracelulární matrix EC proliferují, interakcí ligandů a integrinů pak vycestovávají. Novotvořené cévy jsou trubice z endotelu s deficitní lamina basalis. Mají proto zvýšenou propustnost [Zhang et al. 1993], mohou být fragilní stejně jako selhávat v adaptaci na chemické nebo mechanické podněty [Bushman et Schaper 1999]. S dozráváním cévy se dotváří bazální lamina a kotví řídce se vyskytující pericyty, u větších cév se přidávají buňky hladké svaloviny. Ze společného prekursoru se pod vlivem VEGF diferencují EC, stimulací destičkového růstového faktoru PDGF (platelet-derived growth factor) pak buňky murální (obrázek 2.5). U prenatální vaskulogeneze pocházejí EC z angioblastů, murální buňky se diferencují z různých zdrojů, včetně embryonálního mezenchymu. V dospělosti se murální buňky mohou diferencovat z buněk kostní dřevě nebo jejího stromatu, fibroblasty mohou přecházet do myofibroblastů v reakci na biochemické nebo mechanické podněty. Z nich se mohou vytvořit jak pericyty, tak i buňky hladké svaloviny. EC se při angiogenezi diferencují z buněk kostní dřevě, migrací a proliferací EC stávajících nebo jejich endoteliálních prekursorů [Hungerford et Little 1999, Sartore et al. 2001].



Obrázek 2.5 – Přehled prekursorů buněk cévní stěny

Morfologii novotvořených cév shrnuli Christofferson et Nilson [1992], kteří pro svá zkoumání použili metodiku mikrokorozičních preparátů a rastrovací elektronové mikroskopie. **Morfologii angiogeneze** popsali v pěti krocích: 1. Nejčastěji z konvexity mateřské kapiláry nebo malé venuly vybíhá směrem k angiogennímu stimulu prstovitě zakončená céva. 2. Dochází k prodlužování nově založených cév, 3. jejich splnutí 4. diferenciaci nového, funkčního kapilárního řečiště. Se zánikem angiogenních stimulů novotvořené cévy regredují. Nové metody vhodné pro zobrazení angiogeneze jsou odvozené od zobrazovacích metod běžně

používaných v lékařství, můžeme je rozdělit na strukturální (mikro-CT) a funkční (mikro-PET a mikro-USG). Nejnovější technologie umožňují jejich kombinaci a vytvoření multimodálního obrazu s možností současné diferenciaci jak tvaru, tak i biologických procesů zobrazených struktur. Jejich použití bylo testováno na malých animálních modelech [Zagorchev et Mulligan-Kehoe 2009]. Jako velmi nadějná se jeví pozitronová emisní mikrotomografie (mikro-PET) s radiofarmakem navázaným na protilátky proti angiogenním růstovým faktorům nebo integrinům spojeným s angiogenezí [Delbaldo et al. 2008]. Pro rozlišení zralé od nezralé cévy, tzv. **vaskulárního fenotypu**, dosud nebyl v histopatologii nalezen jednoznačný marker, což souvisí s velmi složitou molekulární regulací diferenciaci cévy [Jain 2003].

Je otázkou, jak angiogenezi v cévní stěně interpretovat. VVE a adventicie hrají v udržení integrity cévní stěny klíčovou roli, ta byla zkoumána zejména v souvislosti s aterosklerózou [Ritman et Lerman 2007]. Hypoxie způsobená okluzí vasa vasorum vede k aterosklerotickým změnám cévní stěny [Nakata et al. 1977] a hraje roli i v indukci experimentálního aneuryzmatu [Moláček et al. 2009]. Nová VV jsou zdrojem kyslíku, hormonů a růstových faktorů, snižují přítomnost volných kyslíkových radikálů a lze u nich předpokládat ateroprotektivní účinek [Mulligan-Kehoe 2010]. Na druhou stranu je zmnožení VV spojeno i s progresí AS [Moreno et al. 2004], kdy jsou zejména novotvořené cévy intimy spojeny s nestabilitou AS plátu [Kumamoto et al. 1995, Moreno et al. 2004].

2.4.1 Vasa vasorum a angiogeneze ve stěně normální a aneuryzmatické aorty

Morfologie vasa vasorum aorty byla studována již v polovině 60. let minulého století. Clarke ve své mikroradiografické studii z roku 1965 sledoval vasa vasorum u normální ascendentní lidské aorty [Clarke 1965a] a popisuje jejich prostup až do vnitřní třetiny medie (bylo zkoumáno 50 aort věkového rozmezí 15–80 let). Wolinsky et Glagov [1967] v rozsáhlé studii srovnávající distribuci vasa vasorum aort u 12 druhů savců popisují maximálních $29 \pm 2,5$ avaskulárních lamelárních jednotek. Navíc vyslovují hypotézu, že lamely přibývají právě z vaskularizovaných zón. VV hrudní aorty odstupují z interkostálních tepen, v abdominálním segmentu z tepen lumbálních a mesenterických, byly popsány jejich mnohočetné anastomózy s periaortální tkání včetně okolních svalů [Nakata et al. 1977]. Hustota vasa vasorum i hloubka jejich prostupu stěnou aorty se s věkem mění [Clarke 1965b], u normální aorty dospělého člověka dosahují do zevní třetiny medie [Grabenwöger et al. 1998].

Neovaskularizace hraje v progresi AAA nejspíš zásadní roli. Její až patnáctinásobné zvýšení ve srovnání s normální aortou prokázal Holmes et al. [1995]. Jiná studie prokazuje zvýšenou angiogenezi na okraji ruptury [Choke et al. 2006], novotvorba vasa vasorum pokračuje i u pokročilých AAA [Paik et al. 2004]. Zvýšená neovaskularizace koreluje se stupněm zánětlivé infiltrace [Thompson et al. 1996]. I naše výsledky ukazují, že novotvorba cév roste s progresí onemocnění: velká aneuryzmata (> 7 cm) byla nejvíce vaskularizovaná, ve stěnách AAA stejné skupiny pacientů byla i signifikantně vyšší exprese VEGF [Eberlová et al. 2013].

Angiogeneze byla ve stěně AAA prokazována imunohistopozitivitou α_v integrinů [Paik et al. 2004, Choke et al. 2006] nebo lektinů [Holmes et al. 1995]. My jsme se novotvořené cévy pilotně pokoušeli prokázat imunohistochemicky endoteliální nestin pozitivitou. Nestin je jako protein středních (intermediárních) filamentů typu VI. exprimován zejména buňkami nervové tkáně, byl ale zkoumán i jako marker angiogeneze [Mokrý et al. 2008, Suzuki et al. 2010]. Ve vzorcích AAA byla jeho pozitivita buněčně nespecifická a nestin se jako marker angiogeneze v tomto druhu tkáně neukázal jako vhodný.

3 Stavba normální aorty

K popisu a zkoumání patologických změn stejně jako pochopení patogeneze jakéhokoli onemocnění je nezbytná znalost stavby normální, zdravé tkáně. Kromě stavby normální aorty věnuji v této kapitole pozornost také strukturám a procesům, které byly v souvislosti s aneuryzmatem břišní aorty zkoumány.

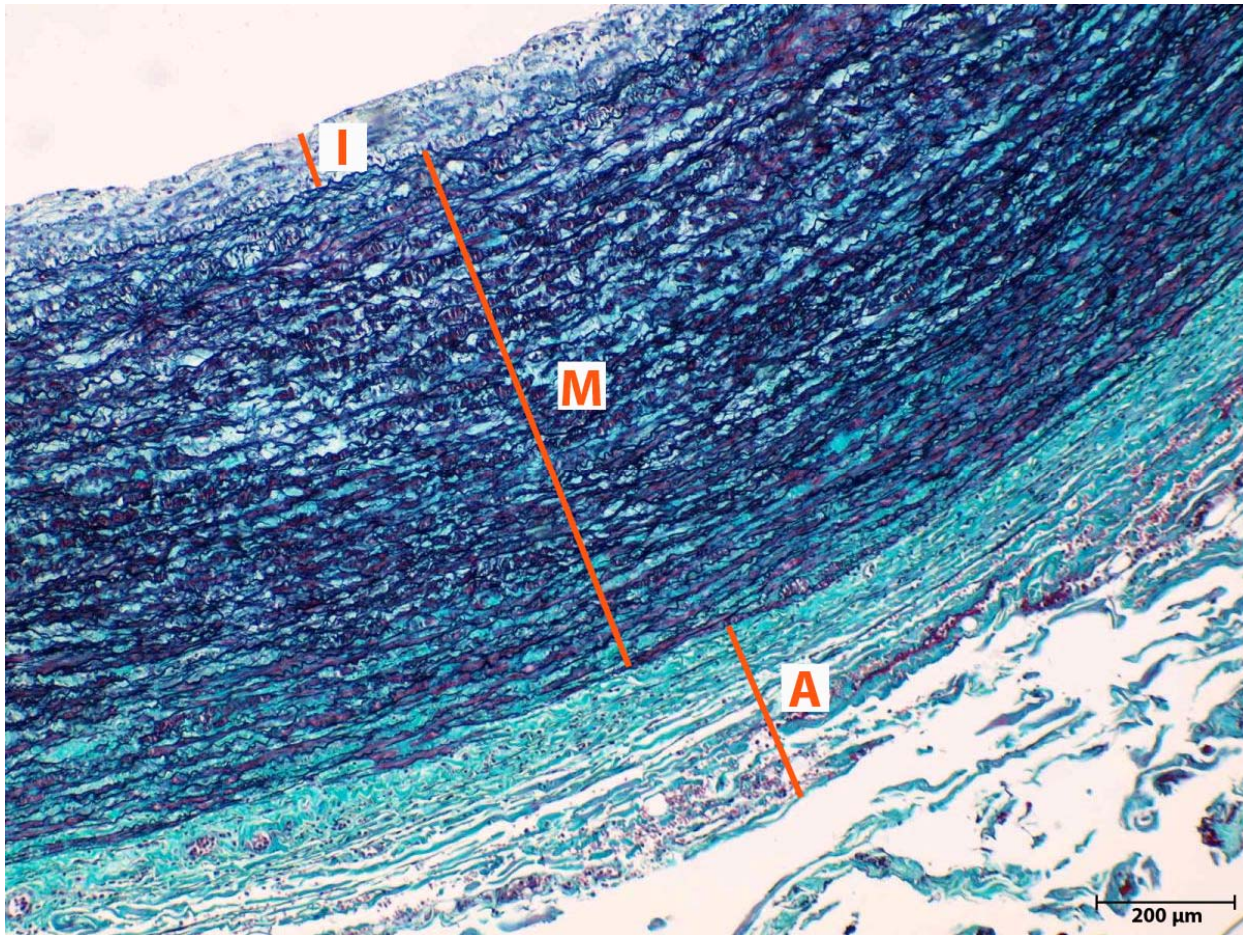
3.1 Obecná stavba aorty

Aorta je tepna elastického typu, její vrstvy odpovídají obecné stavbě tepny: tunica intima, tunica media a tunica adventitia (obrázek 3.1).

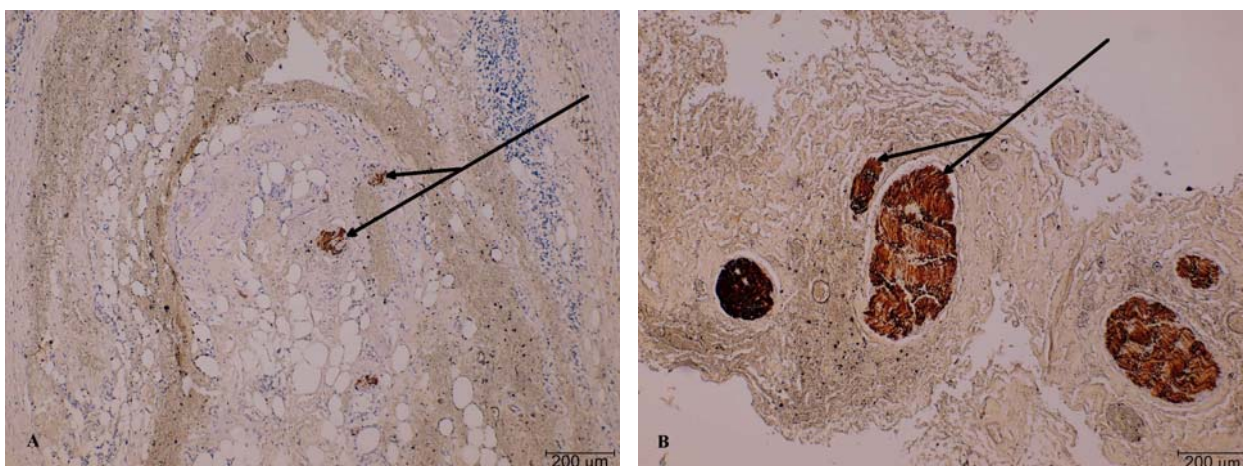
Tunica intima je u lidské aorty silná 80–140 μm , je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk a s věkem narůstající vrstvou subendotelovou. Endotelové buňky jsou kotveny v lamina basalis a jsou mezi sebou spojeny spoji typu zonula occludens nebo nexus (tight a gap junctions). V cytoplazmě endotelu se nacházejí Weibel-Paladeho tělíska obsahující von Willebrandův faktor (koagulační faktor VIII). Ten je spolu s transmembránovými proteiny CD 31 a CD 34 používán k imunohistochemické detekci endotelových buněk. Jemné kolagenní fibrily a elastická vlákna subendotelu mají převážně podélnou orientaci, z buněk zde nacházíme buňky hladké svaloviny, případně makrofágy. Membrana elastica interna je tvořena fenestrovanou vrstvou elastinu, která v mikroskopickém obraze splývá s elastickými membránami medie.

Tunica media je nejsilnější částí aortální stěny, u dospělého člověka se její tloušťka v břišní části pohybuje mezi 500–700 μm . Stavba medie je přizpůsobena velikým mechanickým nárokům a má výrazně lamelární strukturu, hlavními strukturami jsou rozvětvené fenestrované elastické membrány a buňky hladké svaloviny. Na příčném řezu se střídají lamely elastinu s interlamelárním prostorem. Elastická lamela se sousedním interlamelárním prostorem pak tvoří **lamelární jednotku** [Wolinsky et Glagov 1964]. Aorta dospělého člověka obsahuje 40–70 lamelárních jednotek o tloušťce asi 15 μm . Do koncentrických, fenestrovaných blanek (membrán) se upínají buňky hladké svaloviny. Strukturou interlamelárního prostoru se ve své studii podrobně věnuje Dingemans et al. [2000]. Buňky hladké svaloviny jsou obklopeny vrstvou bohatou na fibronektin, která připomíná laminu basalis. Kolagenní vlákna jsou tvořena kolagenem typu I, III a V, jejich svazky naléhají na elastické lamely a mají zhruba cirkulární orientaci. **Interlamelární prostory** tvoří asi 50 % tloušťky stěny aorty. Elastin tu tvoří pruhy, které vybíhají ze sousedních elastických lamel a zabíhají do záhybů plazmalemy buněk hladké svaloviny. K elastickým lamelám jsou VSMC poutány i oxytalanovými vlákny pozitivními na fibrilin a kolagen typu IV. Struktury bazální laminy (kolagen IV a heparan sulfát) zde vytvářejí vločkovité kondenzáty, dále byla prokázána přítomnost lamininu, dermatan a chondroitin sulfátu. Zevní třetinu medie penetrují adventiciální vasa vasorum [Grabenwöger et al. 1998]. Nejzevnější elastická lamela, lamina elastica externa, odděluje medii od adventicie.

Tunica adventitia je silná 200–500 μm . Silná vlákna kolagenu typu I a vlákna elastická tu mají spíše longitudinální uspořádání. Tunica adventitia dále obsahuje fibroblasty, makrofágy, vasa vasorum, začínají zde lymfatické kapiláry. Adventicie aorty obsahuje také nervy z autonomní pleteně plexus aorticus abdominalis, do které vstupují nn. splanchnici (major, minor, imus et lumbales), n. vagus a rr. vasculares z bederního sympatiku (L1–3). Aortální autonomní pleteň je tedy smíšená a obsahuje vlákna sympatická, parasympatická i viscerosenzitivní [Čihák 2004]. Dilatace břišní aorty ale často probíhá zcela skrytě, na obrázku 3.2 jsou patrné nervi vasorum ve stěně aneuryzmatické aorty. Je otázkou, zda je případná symptomatika AAA spojena se zmnožením senzitivních nervů ve stěně aorty, v naší studii [Eberlová et al. 2013] jsme tento parametr nezhodnotili (publikováno se svolením MUDr. Lukáše Nedorosta).



Obrázek 3.1 – Normální břišní aorta ve třetím decéniu. Přehled vrstev stěny aorty: I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventicia. Barveno Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem modifikovaným podle Kočové [1970] – černě elastin, hnědočerveně hladká svalovina, modrozeleně kolagen; měřítko 200 μm .



Obrázek 3. 2 – Imunohistopozitiva proteinu neurofilament (sytě hnědá, označeno šipkou) v adventicii AAA ve stěně asymptomatického (A) a symptomatického (B) pacienta; měřítko 200 μm . Použita monoklonální myší protilátka proti lidskému proteinu neurofilament klon 2F11, Dako, Glostrup, Dánsko.

V následující části bude uveden detailnější popis buněčných i mezibuněčných struktur stěny normální aorty a jejich vztah k AAA.

3.2 Proteiny extracelulární matrix

Extracelulární matrix je tvořena vzájemně propojenou sítí fibrilárních proteinů a nefibrilárních proteoglykanů, které váží vodu a ionty. Původní pohled na extracelulární matrix jako na pasivní médium sestávající ze složky amorfni a vláknité a poskytující prostředí pro tkáňově specifické buňky se s prohlubujícím poznáním posunul. Kromě architektonické sítě poskytuje ECM rezidentním buňkám i roli kontrolní, koordinační a regulační [Ramirez a Rifkin 2003]. Makromolekuly ECM mohou ovlivňovat aktivitu signálních molekul, poskytovat informace tkáňovým buňkám a modulovat tak buněčnou proliferaci, genovou expresi nebo apoptózu [Theocharis et al. 2010].

Hlavní extracelulární složkou aorty, která zásadně určuje mechanické vlastnosti stěny, jsou vlákna kolagenní a elastická vlákna spolu s mikrofibrilami. Avšak i přidružené proteoglykany a glykoproteiny hrají ve stabilitě cévní stěny důležitou roli [Wight 1989], kterou naznačují patologie spojené s jejich alterací. Cílem následující molekulárně biologické části je poukázat na stav současného poznání proteinových struktur prokázaných v extracelulární matrix normální i aneuryzmatické aorty [Lapiere et al. 2008].

3.2.1 Kolageny

Kolagen je součástí všech pojiv, v současnosti je známo 28 typů kolagenů. Jsou označeny římskou číslicí v pořadí, v jakém byly objeveny. Jejich klasifikace je zevrubně uvedena v přehledovém textu Gordon a Hahn [2010], zde uvedené typy zahrnují kolageny prokázané ve stěně aorty. Kolageny jsou základně děleny do dvou skupin: kolageny **fibrilární**, tvořící lineární vlákna (např. typ I, II, III, V a XI) a kolageny **nefibrilární**, mezi které patří podskupina FACIT kolagenů (fibril-associated collagens with interrupted triple helices), které se váží na povrch kolagenních vláken (např. kolageny IX, XII a XIV), a podskupina sít' tvořících kolagenů (meshwork-forming collagens) - kolageny IV, VIII a X [Elleder 1999].

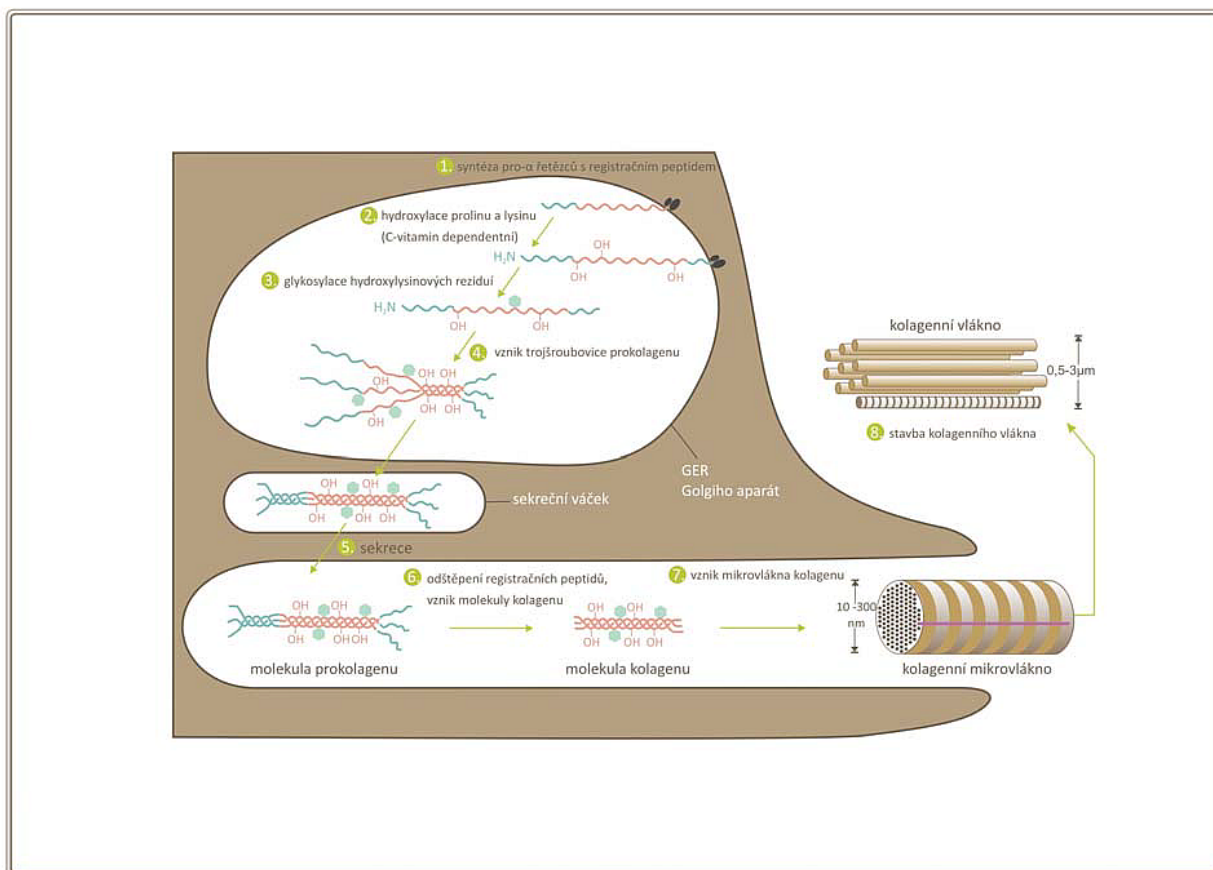
Obecně jsou kolageny tvořeny spojením buď tří shodných alfa řetězců pro tvorbu homotrimerních molekul (např. kolagen typu II a III), nebo dvou či tří rozdílných alfa řetězců tvořících heterotrimerní molekuly (např. kolagen typu I a XI). Tyto řetězce jsou kódovány více než čtyřiceti geny [Myllyharju a Kivirikko 2004], aminokyselinové sekvence všech řetězců jsou známy. Polypeptidové řetězce jsou označovány písmenem α , podtřídy řetězců pak arabskou číslicí. Římská číslice v závorce označuje typ kolagenu, ke kterému řetězec patří.

Spojení tří alfa řetězců do trojšroubovice je základním strukturálním znakem všech kolagenů, tvorba takového helixu je závislá na opakování glycinových reziduí v pozici každé třetí aminokyseliny – opakující se aminokyselinová sekvence (Glycin–X–Y)_n tvořící levotočivou šroubovici je popisovaná jako **kolagenní doména**. Trojšroubovice je pak tvořena buď souvislým řetězcem opakujících se kolagenních domén ($\alpha 1(I)$), nebo jsou vmezeřeny zóny nekolagenních řetězců ($\alpha 1(IV)$). Kvartérní struktura molekul kolagenu poskytuje vysokou rezistenci k proteolytickým enzymům. *In vivo* degradují kolagen jen metalo- a serinové proteinázy. Po denuraci (rozpadu trimerové struktury) je kolagen natrávitelný i ostatními proteázami.

Expresí kolagenu byla prokázána u celé řady buněk, v cévní stěně u fibroblastů, buněk hladké svaloviny a endotelu. V diagnostice kolagenů lze využít jejich anizotropie (dvojlomu), typizaci *in situ* je možno provádět imunohistochemicky. Biochemická typizace vyžaduje extrakci

kolagenu s následnou denaturací a separací elektroforézou. Pro průkaz intracelulární produkce je nutná detekce příslušného transkriptu (mRNA) metodou PCR, případně in situ hybridizace.

Kolagen typu I, *collagen vulgaris*, je dominantní strukturou extracelulární matrix a obecně nejvíce zastoupenou bílkovinou v těle. Nejčastěji je tvořen jedním $\alpha 2$ a dvěma $\alpha 1$ řetězci ($\alpha 1(I)_2 \alpha 2(I)$) s vysokým zastoupením glycinu a prolinu. Je kódován dvěma geny – COL1A1 a COL1A2. Expresi genů pro kolagen je jako u jiných proteinů kontrolována transkripčními faktory, významnou roli zde hrají cytokiny. TGF- β (transforming growth factor β) expresi kolagenu zvyšuje, TNF- α (tumor necrosis factor α) působí antagonisticky [Verrecchia a Mauviel 2004].



Obrázek 3.3 – Syntéza kolagenu. Překresleno a upraveno podle Alberts et al. 1994.

Kroky syntézy kolagenu ukazuje obrázek 3.3. Syntéza **prokolagenu** začíná na ribosomech, odkud je primární transkript mRNA translokován do granulárního endoplazmatického retikula (1). Zde probíhají posttranslační modifikace nezbytné pro vytvoření trojšroubovice: hydroxylace prolinových a lyzinových reziduí (2), dále glykosylace (3) a tvorba disulfidických vazeb (4). Vzniklý prokolagen je tvořen trojšroubovicí tří polypeptidových řetězců. Je následně skladován v Golgiho aparátu, během jeho sekrece do ECM (5) dochází k následujícím dějům: 1. odštěpením signálních peptidů v ECM (6) vzniká ve vodě rozpustná molekula **tropokolagenu** 2. agregací molekul tropokolagenu a pravidelným řazením systémem „hlava–ocas“ se tvoří kolagenní **mikrovlákna (mikrofibrily)**¹ (7). Mikro fibrily jsou detekovatelné pouze v elektronovém

¹ Pozn. k terminologii: anglické termíny collagen fibril – fibre – bundle jsou v textu překládány jako mikrovlákno (mikrofibrila) – vlákno (fibrila) – svazek.

mikroskopu, kde na příčném řezu jeví pruhování o periodicitě 64 nm – molekuly tropokolagenu jsou v mikrofibrile uspořádané v paralelních řadách a přesahují se o 1/4 své délky (místo přesahu je tmavší). S kovalentními vazbami vznikají z mikrofibril kolagenní **vlákna**, (**fibrily**).

Kolagenní vlákno je nejtenčí struktura rozlišitelná světelným mikroskopem, je tlustá 0,5–3 μm . Kolagenní vlákna jsou eozinofilní, v tzv. modrých trichromových barveních (AZAN, Malloryho barvení) se barví modře, Massonovým trichromem zeleně. Vlákna kolagenu I jsou měkká, ohebná, nepružná a vysoce pevná v tahu. Sdružují se do **svazků**, které ve svém centru často obsahují různé množství kolagenu III a V, a jejichž velikost ovlivňují na povrchu vázané FACIT kolageny spolu s malými proteoglykany jako decorin nebo biglykan.

Kolagen typu III je homotrimer ($\alpha 1(\text{III})$)₃, v těle je také široce zastoupen - často ve spojení s kolagenem typu I, může ale polymerovat i s jinými typy kolagenů. Tvoří hlavní složku retikulárních vláken, lamina reticularis bazální laminy, je prvním kolagenem secernovaným při posttraumatické fibroprodukcii. Kolagen typu III je tvořen buňkami hladké svaloviny nebo fibroblasty. Retikulární vlákna jsou příčně pruhovaná a tenká (tloušťky do 60 nm), jsou argyrofilní (barví se černě při impregnaci solemi stříbra - Gomoriho metoda) i PAS pozitivní (vlákna obsahují vysoké množství glykoproteinů).

Zásadní úlohu, kterou kolagen zejména typu III v cévní integritě hraje, můžeme vidět na některých genetických poruchách. Ehlersův-Danlosův syndrom (EDS) zahrnuje více než 10 forem genetického defektu syntézy nebo organizace kolagenních fibril [De Paepe a Malfait 2004] spojeného s hyperelasticitou kůže a hypermobilitou kloubů. Nejzávažnější, EDS typ IV – vaskulární forma, je způsobena mutací genu COL3A1 a abnormální tvorbou kolagenu typu III. Onemocnění je provázáno zvýšenou cévní fragilitou, rupturami dutých orgánů, vznikem arteriovenózních píštělí nebo žilními varikozitami.

Metabolický obrat kolagenu III lze sledovat měřením prokolagenových propeptidů. Satta et al. [1997] prokázal zvýšenou hladinu prokolagen III N-terminálního propeptidu (PIIINP) v séru pacientů s AAA, jeho hladina se s růstem aneuryzmatu zvyšovala. Obdobného výsledku dosáhl i Třeška et al. [1999] při vyšetřování vzorků plazmy.

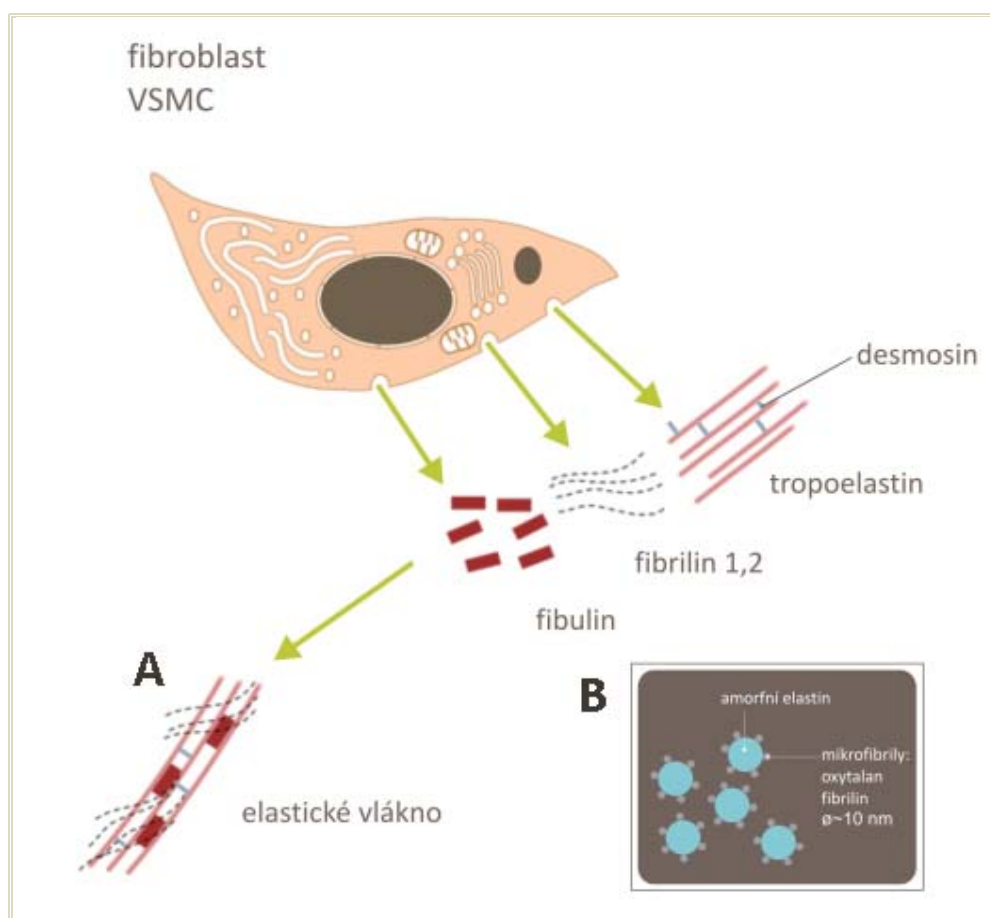
Kolagen typu IV je heteropolymer, jeho triplety vznikají kombinací šesti různých řetězců. Netvoří vlákna. Je součástí lamina basalis, kde se váže na vazebná místa molekul lamininu a tvoří prostorovou síť.

Kolagen typu V je heterotrimer ($\alpha 1(\text{V}) \alpha 2(\text{V}) \alpha 3(\text{V})$). Byl prokázán v placentě a plodových obalech, ale také v cévní stěně. Je pokládán za jádrový („core“) kolagen vláken kolagenu typu I. Ačkoli patří do skupiny vláknitých kolagenů, jeho fibrily nejeví příčné pruhování.

3.2.2 Elastin a elastické mikrofibrily

Elastin je nerozpustný skleroprotein, jehož název je odvozen od jeho elastických vlastností. V lidském těle se vyskytuje méně než kolagen. Aminokyselinové složení elastinu je podobné kolagenu, kromě bohatě zastoupeného glycinu jsou zde i vzácné aminokyseliny jako desmosin a isodesmosin, které se podílejí na vzniku příčných kovalentních vazeb a podmiňují pryžovité vlastnosti tohoto proteinu. Na rozdíl od kolagenu je elastin kódován jediným genem na 7. chromosomu (7q1.23), tropoelastin je transkribován díky alternativnímu sestřihu v několika izoformách. Obdobně jako kolagen je i elastin posttranslačně upravován v cisternách granulárního endoplazmatického retikula (GER), kde je molekula tropoelastinu hydroxylována (chybí ale hydroxyprolin i hydroxylysin, neprobíhá glykosylace). Intracelulárně je vázán na galaktonektin, který brání jeho polymeraci. Té se extracelulárně účastní enzym lysyl-oxidáza, který se podílí i na tvorbě kolagenních fibril.

Vlákna elastinu jsou obvykle tenčí než kolagenová (10-20 nm), jejich syntéza probíhá několikastupňově (obrázek 3.4). 1. **Oxytalanová vlákna** se skládají z mikrofibril tvořených fibriliny [Smith et al. 2011], neobsahují elastin. 2. Následně se do oxytalanové sítě ukládají molekuly elastinu, čímž vznikají vlákna **elauninová**. Ta jsou výrazně tenčí než vlákna zralého elastinu. 3. Agregací a splýváním elastinu vzniká centrální amorfni substance, kolem které se na způsob pochvy řadí mikrofibrily a vznikají **elastická vlákna**. Elastická vlákna nevykazují žádný strukturální vzorec, na příčném řezu je v elektronovém mikroskopu patrné denzní jádro tvořené elastinem, které obklopují mikrofibrily. Elastická vlákna jsou výrazně autoflorescentní a opticky izotropní (nejsou dvojlomná). Poměr elastinu a mikrofibril ve vláknech se tkáňově různí, také struktura mikrofibril je tkáňově specifická [Kielty 2006]. Ve stěně tepen se elastin vyskytuje v nefibrilární formě, tvoří zde koncentrické lamely (fenestrované membrány), jeho zdrojem jsou hladkosvalové buňky nebo fibroblasty.



Obrázek 3.4 – Schéma syntézy elastinu, upraveno podle Kierszenbaum et Tres 2012, Witter (nepublikované sdělení). Stavba nezralého (A) a zralého (B) elastického vlákna.

Elastin je vysoce rezistentní vůči chemickým i fyzikálním noxám. Může být hydrolyzován elastázou pankreatického nebo bakteriálního původu – infúze prasečí elastázou se používá k indukci aneuryzmatu u experimentálních modelů AAA [Moláček et al. 2009]. Pankreatické elastázy jsou za fyziologických podmínek neaktivní, jsou inhibovány různými faktory (např. α_1 -antitrypsinem nebo α_2 -makroglobulinem). Ke štěpení elastinu dochází teprve při jejich defektu [Pelouch a Matouš 2010]. Metabolický obrat zralého elastinu je za normálních okolností velmi pomalý. Barví orceinem hnědě, pro jeho detekci v cévní stěně s výhodou používáme modifikovaný

zelený trichrom [Kočová 1970], ve kterém se elastin znázorní černě vlivem Verhoeffova hematoxylinu (obrázek 2.3, 2.4, 3.1).

Složky elastických vláken nemají jen strukturální, nýbrž i regulační funkci. Disrupce elastinu indukují subendoteliální migraci, proliferaci [Li et al. 1998] a fenotypovou transdiferenciaci VSMC [Karnik et al. 2003], fragmenty elastinu působí i chemotakticky [Uemura et al. 1997]. A naopak, periadventiciální aplikace elastin stabilizujícího polyfenolu u animálních modelů významně snížila expanzi AAA [Isenburg et al. 2007].

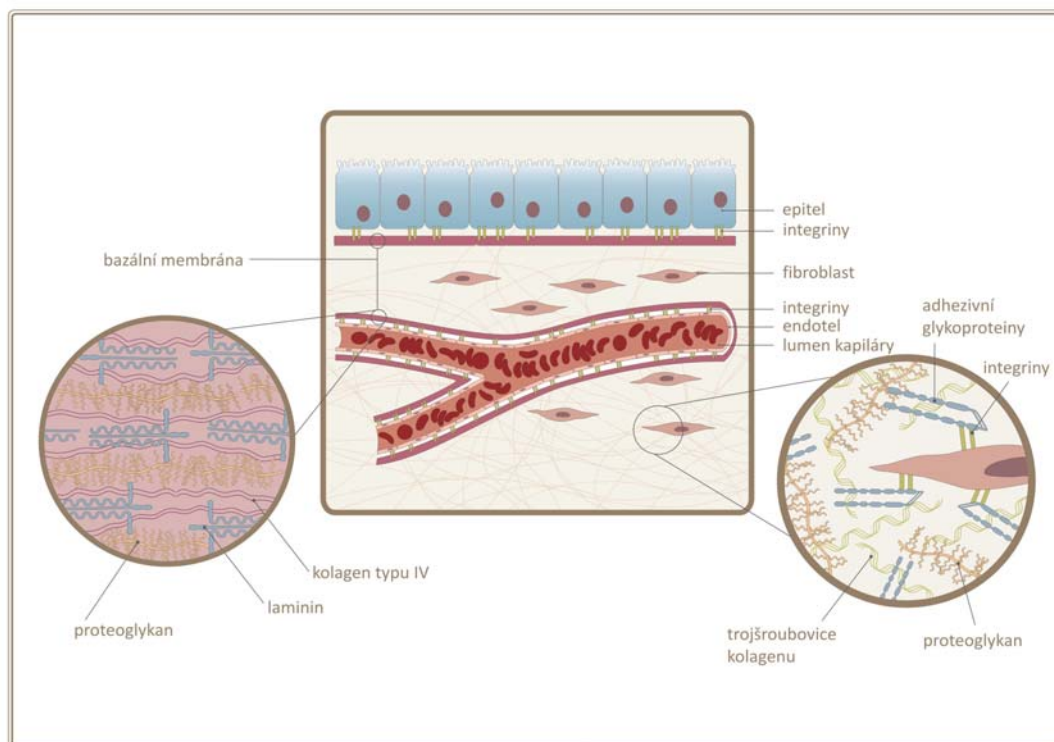
Elastická vlákna sestávají nejen z elastinu, ale i z mikrofibril (obrázek 3.4). Ty jsou tvořeny zejména fibriliny, dále fibuliny a přidruženými glykoproteiny (microfibril associated glycoproteins). **Fibriliny** jsou relativně velké (~350kDa) glykoproteiny. Lidský genom kóduje 3 fibriliny, z nich jsou nejčetněji zastoupeny fibriliny typu 1 a 2. Podílejí se nejen na mechanické stabilitě pojiv, ovlivňují ale také aktivitu růstových faktorů skupiny TGF- β [Hubmacher et al. 2006]. Fibriliny obsahují Arg-Gly-Asp (RGD) sekvence, které interagují s integriny a heparan sulfátem a mohou ovlivňovat buněčnou migraci a adhezi [Bax et al. 2007]. Monomér fibrilinu polymerizuje do mikrofibril, v nich jsou molekuly uspořádány systémem „hlava–ocas“. Fibrilinové mikrofibrily jsou 10–12 nm silné shluky fibrilinových polymerů, jsou viskoelastické o pevnosti vyšší než elastin. Vykazují anizotropii (příčné pruhování), rozsah periodicity je mezi 50–200 nm podle typu tkáně.

V souvislosti s fibriliny a aneuryzmaty nelze nezmínit **Marfanův syndrom**, kdy bodová mutace v genu pro fibrilin-1 způsobuje poruchu jeho terciární i kvartérní struktury. Fibrilin-1, jak bylo zmíněno, je součástí mikrofibril, které tvoří kostru pro stavbu elastických vláken. Marfanův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění (OMIM 154700) se značnou fenotypovou variabilitou postihující kardiovaskulární systém a lokomoční aparát, přidružené mohou být i oční defekty (luxace čočky). Mezi nejzávažnější komplikace patří mitrální prolaps nebo disekce hrudní aorty. Pacienti se vyznačují štíhlou, vysokou postavou s dlouhými končetinami a štíhlými prsty (arachnodaktylie). Projevy onemocnění lze vysvětlit přímo alterací syntézy fibrilinu-1, některé vývojové poruchy jsou spojovány s poruchami regulace TGF- β signalizace [Neptune et al. 2003].

Další skupinou glykoproteinů spojených s mikrofibrilami elastických vláken jsou **fibuliny**. V současnosti je jich známo 7 typů (izoforem). Fibuliny 1–5 se váží k molekulám tropoelastinu [Kobayashi et al. 2007], fibulin-5 i k fibrilinu-1 [Freeman et al. 2005] a je považován za klíčový v organizaci elastických vláken [Yanagisawa et al. 2002].

3.2.3 Proteoglykany

Proteoglykany jsou hlavní strukturou ECM (obrázek 3.5). Jsou tvořeny různými typy glykosaminoglykanů (GAG) kovalentně vázanými na osový protein. **Glykosaminoglykany** (mukopolysacharidy) sestávají z nevětvených řetězců repetitivních disacharidových jednotek tvořených kyselinou uronovou a většinou sulfatovaným aminosacharidem. GAG jsou pojmenovány podle tkáně, ve které byly nejdříve objeveny (koncovka -an odpovídá nomenklatuře glykanů): hyaluronan (kyselina hyaluronová) ve sklivci, chondroitin ve chrupavce, dermatan v kůži, keratan v rohovce a heparan v játrech. Jejich rozšíření je ale mnohem extenzivnější. Proteinová složka určuje tkáňovou specificitu příslušného proteoglykanu, viz níže. Prostorové uspořádání základních struktur v molekule proteoglykanu připomíná štětku na zkumavky – proteinové jádro tvoří rukojeť, radiálně uspořádané řetězce disacharidů (GAG) připomínají stětiny. Molekuly proteoglykanů jsou pak přes spojovací protein nekovalentně navázány na molekulu kyseliny hyaluronové (mohou se ale vyskytovat i samostatně) a mohou tak vytvářet obrovské **proteoglykanové agregáty**.



Obrázek 3.5 – Schéma stavby extracelulární matrix, překresleno a upraveno podle Kumar et al. 2005

Hyaluronan (kyselina hyaluronová, HA) se nachází v extracelulární matrix většiny tkání, je důležitou strukturou i embryonální a vyvíjející se tkáně, v cévní stěně je produkován VSMC nebo endoteliemi. Navzdory své poměrně jednoduché struktuře (je tvořen dlouhým řetězcem nesulfatovaných disacharidů), reaguje s mnoha typy buněčných receptorů, z nichž nejvýznamnější je CD44. **CD44** (lymphocyte homing receptor) je adhezivní receptor patřící do skupiny povrchových glykoproteinů, byl prokázán ve stěně VSMC, buněk imunitních nebo endotelových [Aruffo et al. 1990]. U lymfocytů jeho interakce s endoteliemi exprimujícími hyaluronan umožňuje primární adhezi, tzv. rolling. Biologické vlastnosti CD44 závisí na jeho velikosti. Hyaluronan je základním kamenem proteoglykanů, může ale sloužit také jako signální molekula vyvolávající proliferační a/nebo sekreční odpověď. Malé fragmenty HA vznikající štěpením hyaluronidázou mají angiogenní a prozánětlivý účinek [West et al. 1985]. Pro celkový přehled pleiotropních funkcí i receptorů HA odkazují na přehledový článek Jiang et al. 2011. K syntéze HA dochází na vnitřní straně buněčné membrány (nikoli v GER) aktivitou hyaluronan syntázy (HAS 1–3).

Proteoglykany ECM představují masu hydratovaných polyaniontů, které mají zásadní vztah k formování a orientaci kolagenních vláken. Podle proteinové složky je lze dále dělit dvě podskupiny. Jedna je příznačná malou velikostí proteinu a doménou bohatou na leucin – SLRP (small leucin-rich proteoglycans). **Proteoglykany bohaté na leucin** jsou tvořeny proteinovým jádrem, ke kterému je připojeno 1–5 GAG řetězců. SLRP mohou vázat různé molekuly ECM jako kolageny, fibronectin nebo fibriliny, ale neváží se s hyaluronanem. Skupina SLRP je tvořena devíti proteoglykany, z nich exprese **biglykanu** a **decorinu** byla ve stěně aneuryzmantické aorty změněná [Theocharis et Karamanos 2002].

Druhá skupina, někdy nazývaná jako **hyalektany** (hyaluronan- and lectin-binding modular proteoglycans), obsahuje multidoménové proteiny vysoce homologní s imunoglobuliny, lamininem a selektinem. Hyalektany jsou proteoglykany s třídoménovou strukturou: N-koncová doména váže hyaluronan, centrální část je tvořena GAG řetězcem, C-terminální konec pak váže lektiny [Iozzo et Murdoch 1996]. Patří sem **versican**, **aggrecan**, **neurocan** a **brevican**. Hlavním

zástupcem hyalektanů v cévní stěně je versican, který byl prokázán také v endotelu i medii lidských aort [Yao et al. 1994]. Pleiotropní funkci versicanu lze částečně vysvětlit existencí jeho čtyř izoform (versican 0–3). Kromě funkce strukturální byla prokázána také řada jeho regulačních funkcí [Theocharis et al. 2010]. Vazbou na CD-44 receptor (receptor pro hyaluronan) a vznikem komplexu versican-hyaluronan dává pericelulární matrix viskoelastické vlastnosti, které mohou ovlivňovat tvar, proliferaci i buněčnou migraci. Z jiných molekul ECM je známa interakce versicanu s fibuliny a fibrilinem-1 [Wu et al. 2005], což naznačuje jeho roli ve shlukování elastických vláken. Bylo prokázáno, že i degradační produkty versicanu, které se vyskytují ve stěně aterosklerotické i aneuryzmatické cévy, mají biologickou aktivitu [Kenagy et al. 2006].

Další samostatnou skupinou proteoglykanů jsou **membránové proteoglykany**. Bílkovinná část membránových proteoglykanů je buď zakotvena v zevní vrstvě plazmalemy, nebo prochází celou plazmatickou membránou. Skupinou transmembránových proteoglykanů jsou **adheziny**, CAM (cells adhesion molecules), mezi které patří **adhezivní imunoglobuliny**, **kadheriny**, **selektiny** a **integriny**. Jejich interakce může být homotypická (zprostředkávající kontakt mezi buňkami stejného typu) nebo heterotypická.

Skupina **kadherinů** (calcium dependent adherence protein) čítá asi 90 typů, které se účastní homotypických interakcí při tvorbě mezibuněčných spojů typu zonula nebo macula adherens (desmosom). Kadheriny se pomocí α - nebo β -kateninů váží na cytoskelet a regulují buněčnou motilitu, proliferaci nebo diferenciaci. **β -katenin** je protein duální funkce. Je znám jako součást mezibuněčných spojovacích komplexů, kde v klidovém stavu spolu s kadheriny váže aktinová mikrofilamenta, volný v cytoplazmě pak podléhá lyzozomální degradaci. V přítomnosti Wnt signálních molekul je ale transportován do jádra, kde ovlivňuje transkripci řady genů. Jejich proteiny pak modulují buněčnou proliferaci [Zhou et al. 2011], ale i zánětlivou reakci a složení extracelulární matrix [Cheng et al. 2010].

Integriny čítají asi 30 strukturálně homologních proteinů, jsou tvořeny heterodiméry nekovalentně vázaného α a β řetězce. Jejich funkcí je podobně jako u selektinů koordinace, „integrace“ ligandu s cytoskeletem. Vazba je ale heterotypická a ovlivňuje buněčnou motilitu, změnu tvaru nebo fagocytózu. α_V integriny hrají roli v průběhu angiogeneze [Eliceiri et Cheresch 1999]. Jsou exprimovány aktivovanými endoteliemi (obrázek 3.5) a mají zásadní roli v adhezivní interakci s proteiny ECM (např. denaturovaným kolagenem, kolagenem I a IV, lamininem, fibrinogenem nebo fibronektinem). Exprese integrinu $\alpha_V\beta_3$ byla prokázána ve stěně vasa vasorum pokročilých AAA [Paik et al. 2004], což ukazuje na pokračující angiogenezi ve stěně velkých aneuryzmat.

V současnost jsou známy 3 druhy **selektinů**: L, E a P. E- a L-selektin byl prokázán na povrchu endotelu. P-selektin byl nejprve identifikován na povrchu sekrečních granul destiček (odtud P – platelet) a hraje významnou roli při vzniku trombu [Wakefield et al. 2009]. Všechny selektiny usnadňují adhezi bílých krvinek. V naší studii [Eberlová et al. 2013] jsme stanovovali hladinu ICAM-1, VCAM-1 a E-selektinu ve stěně AAA a trombu, prokázali jsme signifikantně vyšší expresi VCAM-1 v trombu pacientů s asymptomatickým AAA a dále ve stěně pacientů s malým aneuryzmatem (< 5 cm).

Dalšími vazebnými proteiny jsou laminin a fibronectin. **Fibronectin** (FN) je dimerní, adhezivní glykoprotein. Je produktem jediného genu, existuje v mnoha sestříhových variantách. Základně je homodimer, který je znám ve dvou formách: plazmatický (solubilní) fibronectin je syntetizován hepatocyty, nerozpustný (buněčný) FN je přítomen v tkáních ve formě vláken, jeho zdrojem jsou buňky mezenchymového původu. Molekula FN nese RGD sekvenci podmiňující nspecifickou adhezivitu k buněčným povrchům. FN tak může být ligandem celé řady receptorů a molekul, včetně kolagenů, heparinu, integrinů nebo fibrinu a zdá se být zásadní molekulou pro přežití nebo diferenciaci některých buněk.

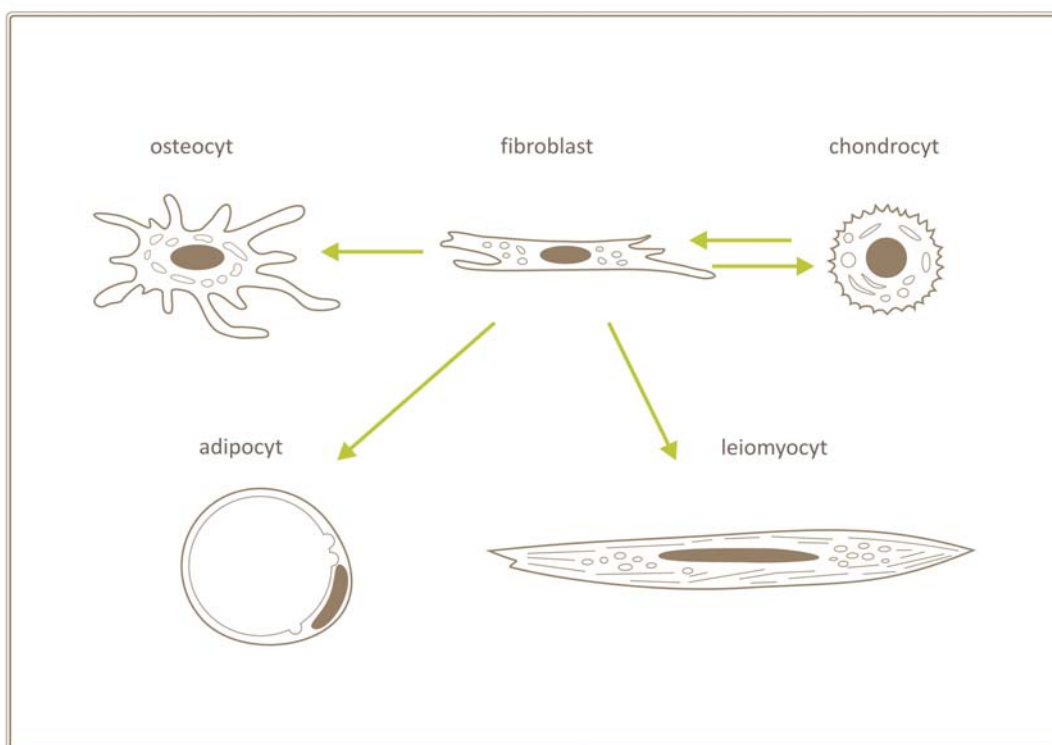
Laminin (obrázek 3.5) je heterotrimerní glykoprotein tvaru nepravidelného kříže. Každý ze tří proteinových řetězců existuje v několika izoformách – v současnosti je jich známo více než patnáct, u některých z nich existují ještě i sestříhové varianty. Tato variabilita je podmínkou tkáňové specificity lamininu. Je totiž součástí lamina lucida bazální laminy, kde tvoří kotvící vlákna spojující integriny epitelů s lamina densa.

3.2 Buňky normální aorty

Základními buňkami pojiva jsou fibroblasty (fibrocyty), makrofágy, buňky žírné (mastocyty) a plazmatické. Největší zastoupení v cévní stěně však mají buňky hladkosvalové, zásadní význam má i endotel.

3.2.1 Fibroblasty, fibrocyty

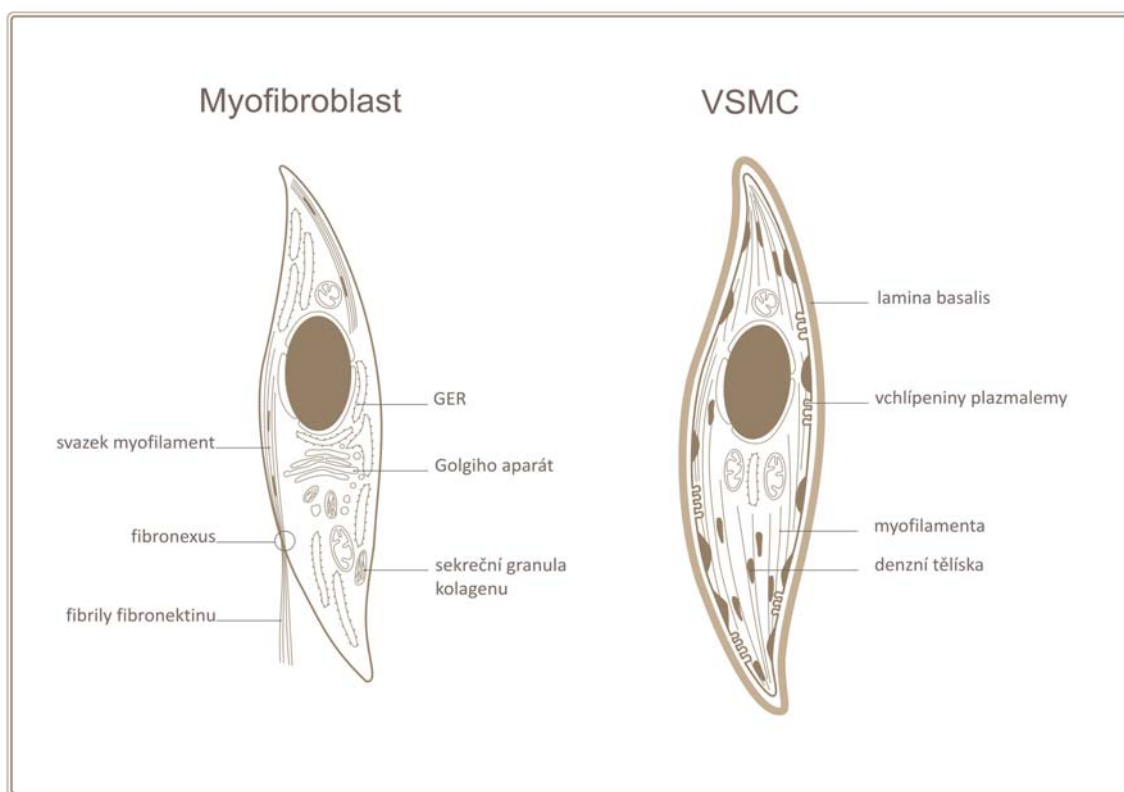
Fibroblasty jsou nejuniverzálnějšími a zároveň základními buňkami pojiv. Jsou schopny nepřetržité syntézy proteoglykanů, glykoproteinů, stejně jako prekurzorů elastinu a všech typů kolagenů s výjimkou kolagenu typu II. Fibroblasty se podílejí také na sekreci růstových faktorů (fibroblast growth factors) a zásadně tak ovlivňují kvalitu ECM a stavbu celé tkáně. Ve světelném mikroskopu se fibroblast jeví jako buňka vřetenovitého tvaru s protáhlým jádrem a světlou cytoplazmou. Ta vybíhá do velmi jemných výběžků, které vytvářejí spolu s výběžky sousedních fibroblastů prostorovou síť [Langevin et al. 2004]. Elektronovým mikroskopem lze prokázat rysy intenzivní proteosyntézy: dobře vyvinuté granulární endoplazmatické retikulum (GER) a Golgiho komplex. V GER probíhá syntéza proteinů, je zde započata i jejich posttranslační modifikace (hydroxylace a glykosylace). Produkt je následně kondenzován do transportních váčků vznikajících vypučením z GER a přesouván do Golgiho aparátu, kde se posttranslační modifikace dokončuje a produkt je uvolňován z buňky exocytózou sekrečních granul (obrázek 3.3).



Obrázek 3.6 – Vývoj buněk pojiva, upraveno podle Alberts et al. 1994

Univerzalita fibroblastů spočívá v jejich funkční plasticitě. Fibroblasty se vyvíjejí z pluripotentních mezenchymových buněk a mohou se diferencovat v různé, specializovanější buněčné typy (obrázek 3.6): osteocyty, chondrocyty [Choi et al. 2010] nebo i myofibroblasty [Junker et al. 2008]. Role myofibroblastů je známa zejména u reparačních procesů, ale i patogeneze fibróz. **Myofibroblast** (obrázek 3.7) je definován jako buňka mající:

- vřetenovitý nebo hvězdicovitý tvar
- slabě eozinofilní cytoplazmu
- objemnou pericelulární matrix
- imunofenotyp:
 - α -SM aktin pozitivní
 - vimentin pozitivní
 - fibronektin pozitivní
 - SM myosin negativní
 - desmin negativní
- mikrostrukturu:
 - výrazné GER
 - Golgiho aparát uvolňující sekreční granula kolagenu
 - periferní myofilamenta
 - spoje typu fibronexus a nexus



Obrázek 3.7 – Schéma základních morfologických znaků myofibroblastu a buňky hladké svaloviny. Fibronexus je označení pro transmembránové spojení aktinových a fibronektinových mikrofilament. Upraveno podle Eyden [2008].

Z výše uvedeného vyplývá, že diagnostiku myofibroblastů umožňuje z histologických metod elektronová nebo konfokální mikroskopie, případně imunohistochemie. A také, že myofibroblasty mají imunofenotyp nápadně podobný sekrečnímu typu hladkosvalových buněk, viz kapitola 3.2.5.

Fibrocyt je označení pro klidovou formu fibroblastu. Tomu odpovídá i jeho morfologie – buňka je vřetenovitého tvaru s minimem cytoplazmatických výběžků, má redukované endoplazmatické retikulum a eozinofilní cytoplazmu.

3.2.2 Makrofágy

Makrofágy (MF) vznikají z **monocytů**. Po vyplavení z kostní dřeně kolují monocyty v krvi asi 8 hodin, poté vstupují do tkání a mění se na **makrofágy**. Tkáňové makrofágy žijí v řádech měsíců až let. Aby se monocyt přeměnil na makrofág, musí projít několika změnami: zvětšuje svou velikost, zvyšuje počet lyzosomů, receptorů pro IgG a schopnost fagocytózy. V závislosti na rezidentní tkáni pak MF vykazují četnou tvarovou i strukturální heterogenitu. Aktivace makrofágů je stimulována řadou cytokinů (např. INF- γ), fibronektinem nebo chemickými mediátory. Aktivovaný makrofág produkuje řadu biologicky aktivních působků podporujících fibroprodukcii a chronický zánět.

Makrofágy jsou základní buňkou vrozené imunity, prezentací antigenu zprostředkovávají i získanou imunitní reakci. Fagocytovaný antigen je skladován ve fagozomu, jehož fúzí s lyzosomem vzniká fagolyzosom. Část proteinů vzniklých hydrolýzou je následně navázána na MHC II molekuly a prezentována CD4+ T-lymfocytům (helpery). Ty secernují interleukiny, které mimo jiné potencují fagocytózu a stimulují B-lymfocyty k přeměně na buňky plazmatické. Makrofágy exprimují CD68. V cévní stěně hrají MF klíčovou roli v patogenezi aterosklerózy, kde se fagocytózou LDL přeměňují v pěnové buňky (viz kapitola 2.3.2).

3.2.3 Žírné buňky (mastocyty)

Žírné buňky jsou velmi podobné bazofilním granulocytům, vznikají z mezenchymových buněk kostní dřeně. Jejich cytoplazmu vyplňují četná granula, která obsahují heparin (příp. chondroitin sulfát) a histamin a vykazují metachromázii. Heparin je sulfatovaný glykosaminoglykan s antikoagulačním účinkem, funkce histaminu je spojena s typem receptoru (H1–4), na který se váže. Vazba histaminu na H2 receptor způsobuje relaxaci buněk hladké svaloviny, H4 histaminový receptor byl nalezen na bazofilních neutrofilech a účastní se chemotaxe. Povrch mastocytů spolu s bazofily nese receptory pro IgE, buňky se účastní hypersenzitivní reakce 1. typu (anafylaxe). Význam mastocytů v progresi AAA byl opakovaně zkoumán a prokázán na animálních modelech [Tsuruda et al. 2008, Sun et al. 2009].

3.2.4 B-lymfocyty a plazmatické buňky

B-lymfocyty se vyvíjejí z mezenchymových prekurzorů kostní dřeně. Zralé B-lymfocyty tvoří v periferní krvi asi 20 % z celkového počtu lymfocytů, další se nacházejí v cestovalech v lymfatických foliklech a B zónách lymfatických orgánů. Na svém povrchu nesou IgM a IgD tvořící součást antigen specifických receptorů. K rozpoznání antigenu potřebují CD4+ T-lymfocyty. Po vazbě antigenu na receptor CD40 se B-lymfocyt mění v buňku plazmatickou, která je schopna syntézy a sekrece všech typů imunoglobulinů a zprostředkovává tak humorální imunitu.

3.2.5 Buňky hladké svaloviny

Buňky hladké svaloviny jsou v normální arteriální stěně buňkami nejčetnějšími. Mají vřetenovitý tvar s centrálně uloženým jádrem, ve zralých cévách vykazují jen minimální mitotickou i metabolickou aktivitu [Owens 1995]. Jejich fenotyp je ale nadán značnou plasticitou a může se měnit pod vlivem mechanických nebo biochemických stimulů z **kontraktilního** na tzv. **syntetický**

(děj je v anglosaské literatuře nazýván VSMC shift, česky posun, výměna), přičemž kritéria fenotypové modulace se vztahují jak na tvarové změny buňky, tak i na změny genové exprese, signálních cest nebo kontraktility [Owens et al. 2004]. Také zánětlivé cytokiny indukují VSMC shift [Badier-Commander et al. 2001] nebo apoptózu [Henderson et al. 1999].

VSMC syntetického fenotypu mohou migrovat, proliferovat, syntetizují složky ECM [Owens 1995, Chan-Park et al. 2009]. V současnosti ale není znám žádný fenotypově specifický marker [Owens et al. 2004, Boccardi et al. 2007]. V našich studiích [Witter et al. 2010, Tonar et al. 2010, Eberlová et al. 2013, Houdek et al., přijato k tisku] jsme pro diferenciaci sekrečního fenotypu použili vimentin-, kontraktilního pak desmin- pozitivitu. Jak bylo zmíněno, VSMC produkují struktury ECM, mají ale i auto- a parakrinní funkci [Sprague a Khalil, 2009], ve stěně AAA jsou zdrojem metaloproteináz [Patel et al. 1996] i jejich inhibitorů [Allaire et al. 2002].

VSMC shift a původ buněk účastnících se tvorby neointimy byl detailně zkoumán v souvislosti s aterosklerózou. Jsou původcem ztlustění neointimy v cestovalé VSMC medie [Merrilees et al. 1990], nebo se jedná o fibroblasty adventiciálního původu [Shi et al. 1996]? Zvažována byla i účast cirkulujících stromálních buněk kostní dřevě (viz kapitola 3.2.8), ze kterých se VSMC a myofibroblasty posléze diferencují [Han et al. 2001]. Výše zmíněné otázky lze rozšířit: Není myofibroblast, syntetická hladkosvalová, nezralá mesenchymová buňka či transdiferencovaná endotelová buňka vlastně totéž? K odpovědi bychom museli znát markery specifické pro danou buněčnou subpopulaci.

VSMC shift i apoptóza hrají v patogenezi i progresi AAA zásadní roli, což naznačují i naše výsledky. Úbytek kontraktilních VSMC elementů jsme pozorovali ve stěně aneurysmat prasečích modelů [Houdek et al., přijato k tisku, Houdek et al. 2012] i vzorků pacientů s AAA [Eberlová et al. 2013]. Plošný podíl aktinu a vimentinu v tunica intima a media byl nejvyšší u pacientů se středně velkým AAA (5–7 cm), jejich pokles u velkých aneurysmat lze nejspíš přičíst apoptóze, která je pro patogenezi AAA příznačná [López-Candales et al. 1997].

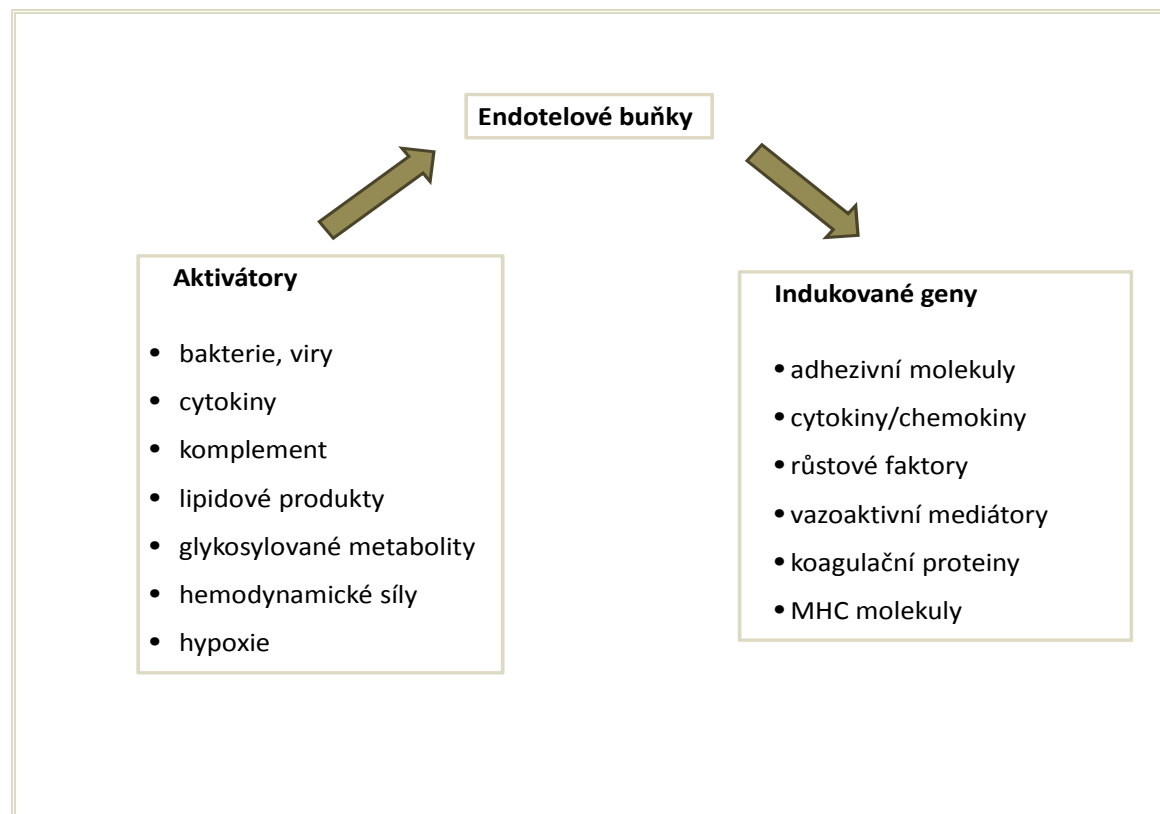
3.2.6 Apoptóza, anoikis

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je buňkou aktivovaná sebedestrukce prostřednictvím vlastních enzymů destruujičích zejména DNA. Během apoptózy zůstává plazmalema intaktní, a tak na rozdíl od nekrózy nedochází k zánětlivé reakci. Apoptóza provází řadu fyziologických i patologických procesů. Za iniciační se považuje mitochondriální dysfunkce a uvolnění cytochromu C [Guaragnella et al. 2012]. Apoptotické buňky jsou menší velikosti, vykazují poruchu adherence a zvýšenou propustnost mitochondriální i buněčné membrány, která se svrašťuje rozpadem cytoskeletu (tzv. blebbing). Kondenzovaný a rozštěpený chromatin se hromadí pod jadernou membránou, dochází ke svrašťení jádra a jeho rozpadu (*karyorrhexis*). Aktivací kaspáz následně dochází k rozpadu buňky na apoptotická tělíčka. Ta jsou fagocytována makrofágy nebo dendritickými buňkami, které vylučují protizánětlivé cytokiny.

Anoikis je zvláštní druh apoptózy indukované ztrátou mezibuněčných interakcí. Pro fixní buňky tkání je ukotvení v ECM nezbytnou podmínkou přežití. Je zprostředkováno adhezivními proteiny jako jsou fibronectin a laminin. Ty mohou být štěpěny řadou proteáz (plazminem, trombinem, elastázou, chymázou), odštěpené RGD domény pak mohou interagovat s molekulami fibronectinu a aktivovat buněčnou apoptózu [Hadden et Henke 2000]. Obdobný účinek má i vazba inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1 na vitronectin. Anoikis se zřejmě podílí i v progresi AAA [Michel 2003]. Ztráta endotelových buněk je spojována s aterosklerotickou lézí, dilatace aortální stěny pak s destrukcí ECM a úbytkem svalových buněk [Ortiz-Muñoz et al. 2009].

3.2.7 Buňky endotelu

Endotelové buňky (EC) tvoří jednovrstevnou výstelku kardiovaskulárního systému. Jejich strukturální i funkční integrita je pro udržení homeostázy zcela zásadní. Intaktní endotelie jsou schopny reakcí na různé stimuly (tzv. endoteliální aktivace), základní přehled induktorů a možných reakcí ukazuje následující schéma podle Schoena [2005]:



Obrázek 3.8 – Mechanismy endoteliální aktivace

EC obvykle obsahují Wiebel-Paladeho tělíska s von Willebrandovým faktorem (vWF) a P-selektinem. Detekce endotelových buněk je možná imunohistochemicky vazbou protilátek proti CD31, CD34 nebo vWF. V našich studiích jsme pro kvantifikaci mikrocév ve stěně aorty využívali CD31 pozitivitu endotelií [Witter et al. 2010, Eberlová et al. 2013, Houdek et al., přijato k tisku].

V závěru přehledu buněk cévní stěny zařazují základní informace o kmenových buňkách, jejichž genetická modifikace je základem knockoutování a jejichž terapeutický potenciál se zvažuje i pro terapii AAA.

3.2.8 Kmenové buňky ve výzkumu AAA

Kmenové buňky (KB) jsou nediferencované buňky, které mají schopnost dělení a přeměny na jiný buněčný typ [Filip et al. 2006]. **Totipotentní** kmenové buňky jsou buňky zygoty nebo buňky vzniknuvší po jejím prvním dělení, schopné přeměny v jakýkoli typ buněk. **Pluripotentní**, tzv. embryonální KB, se získávají izolací z embryoblastu blastocysty 4.–6. den po oplodnění a mohou

dát vznik buňkám všech zárodečných listů. Studie ukazují, že pluripotence je u člověka podmíněna mimo jiné Wnt- β -katenin signální dráhou [Sato et al. 2004]. Embryonální kmenové buňky mohou být udržovány v kultivačních médiích v nediferencovaném stavu nebo u nich může být indukována diferenciace. **Knockoutováním** je možné inaktivovat expresi určitého genu a takto upravené, geneticky modifikované buňky následně injikovat zpět do blastocysty. Ta může být implantována do uteru náhradní matky. Vyvíjí se pak geneticky modifikované embryo. Knockoutované myši se staly široce používanými animálními modely pro studium funkce genů *in vivo*.

Terapeutické klonování znamená produkci geneticky modifikovaných embryí nikoliv za účelem reprodukce, tedy implantace do uteru, ale s cílem produkce kmenových buněk pro terapeutické použití. Takové buňky skýtají možnost dokonalé náhrady poškozené tkáně pro řadu postižených tkání.

Multipotentní kmenové buňky dávají vznik buňkám příbuzného nebo stejného druhu, jejich zdrojem může být kostní dřeň, ale i řada dalších tkání jako je tuk, sliznice či podslizniční vazivo. Kostní dřeň obsahuje různé druhy kmenových buněk, tzv. dospělých, adultních, jako jsou **hematopoetické** kmenové buňky, z nichž se mohou diferencovat všechny linie krevních elementů. Dalším příkladem multipotentních kmenových buněk jsou **mezenchymální kmenové buňky**, z nichž se mohou diferencovat i buňky hladké svaloviny. Při jejich aplikaci u animálních AAA modelů byl opakovaně prokázán příznivý vliv na progresi tohoto onemocnění [Hashizume et al. 2011, Sharma et al. 2012].

4 Farmakologické ovlivnění AAA

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, většina nově diagnostikovaných AAA je malých, tedy menších než 5 cm. Hledají se proto cesty pro oddálení chirurgického výkonu, který je u asymptomatických AAA běžně indikován od velikosti AAA $\geq 5,5$ cm. Jelikož je AAA degenerativní onemocnění postihující většinou polymorbidní pacienty léčené pro přidružená kardiovaskulární onemocnění, jsou prospektivní kohortové studie sledující vliv vybraného farmaka při nemožnosti vysazení ostatních léčiv jen obtížně hodnotitelné. Spektrum léků vytipovaných pro terapii AAA vychází ze znalostí patogeneze tohoto onemocnění, jedná se zejména o antihypertenziva a léky s protizánětlivým účinkem. Jejich testování se provádí na animálních modelech (tabulka 4.1). Účinky těchto skupin léčiv na pacienty s AAA ukazuje tabulka 4.2, rozdílné výsledky studií stejných léčiv jsou nejspíš ovlivněny počtem probandů. Metaanalýza účinků farmakoterapie na AAA [Guessous et al. 2008] ukazuje příznivý efekt statinů a protizánětlivých léků.

Tabulka 4.1 – Příklady léků testovaných v terapii AAA na malých animálních modelech

generikum	léková skupina	způsob indukce AAA	pozorovaný účinek	citace
atorvastatin	statin	elastáza	snížení exprese MMP-12, ICAM, zvýšení syntézy kolagenu i elastinu	Shiraya et al. 2009
simvastatin	statin	elastáza	snížení exprese MMP-9, zvýšení TIMP-1; brání elastolýze a apoptóze VSMC	Steinmetz et al. 2005
propranolol	β -blokátor	elastáza	snížení krevního tlaku, stimulace lysyl oxidázy, stabilizace elastinu	Boucek et al. 1983
doxycyklin	antibiotikum	elastáza	redukce aortální dilatace	Bartoli et al. 2006
rapamycin	antibiotikum	elastáza	působí protizánětlivě, snižuje expresi MMP-9	Lawrence et al. 2004
captopril lisinopril enalapril	ACE inhibitor	elastáza	redukce elastolýzy	Liao et al. 2001
losartan	ACE inhibitor	elastáza	účinek na progresi AAA neprokázán	Liao et al. 2001
indometacin	nesteroidní antiflogistikum	elastáza	snížená exprese MMP-9	Holmes et al. 1996
fasudil	inhibitor ROCK (Rho-associated) kinázy	angiotenzin II	inhibice proteolýzy a apoptózy	Wang et al. 2005
tamoxifen	modulátor estrogenového receptoru	elastáza	snižuje infiltraci neutrofilů, zvyšuje expresi katalázy	Grigoryants et al. 2005

Tabulka 4.2 – Příklady účinku farmakoterapie u prospektivních studií lidských AAA

léková skupina	studie	počet pacientů	vliv na AAA
statiny	Schouten et al. 2006	59	zpomalení růstu AAA
statiny	Schlösser et al. 2008	147	zpomalení růstu AAA
statiny	Mosorin et al. 2008	121	zpomalení růstu AAA
statiny	Ferguson et al.2010	652	zpomalení růstu AAA nebylo prokázáno
ACE inhibitory	Sweeting et al. 2010	1701	zpomalení růstu AAA nebylo prokázáno

Současná léčba AAA je nespecifická a zahrnuje [Karetová 2012]:

- kuřáckou abstinenci
- léčbu vysokého krevního tlaku a dyslipidémie
- případně specifickou (antiproteolytickou nebo protizánětlivou) terapii statiny, ACE inhibitory, antibiotiky nebo nesteroidními antiflogistiky.

Na objevení „zázračného“ léku, který by podobně jako náhodně objevený propranolol u dětského hemangiomu způsobil radikální regresí onemocnění [Léauté-Labrèze et al. 2008], aneuryzma břišní aorty teprve čeká.

5 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 jednak mezi aortou normální a aneurymatickou (**I**, **II**), jako i sledováním změn stavby aortální stěny v závislosti na symptomatologii a velikosti (**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. Analýza mikro-CT snímků by proto mohla být vhodnou pro další výzkum vasa vasorum aorty, jejichž význam pro 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] jsme navázali na studii z roku 2002 [Třeška et al. 2002]. 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 nebo imunoanalýzy zjišťovali rozdíly mezi kvantitativními histopatologickými parametry normální a aneurymatické 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 aneurymatické aorty není rozdíl.
- Zánětlivý infiltrát stěny a naléhajícího trombu se neliší.
- Kvantitativní histopatologické parametry AAA se s velikostí aneurysmatu 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., přijato k tisku, Houdek et al. 2012] jsme sledovali vliv atorvastatinu na experimentálně vyvolané AAA, které bylo indukované u prasete kombinací účinku prasečí elastázy a stenozující manžety [Moláček et al. 2009]. Získaná data nám umožnila porovnat odlišnost stavby stěny tohoto animálního modelu od normálních prasečích aort (n = 6) a sledovat změny struktury aneurymatické 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.

III. Optimalizace protokolu pro získání korozivního preparátu cévního mikrořečiště, využití mikro-CT zobrazení

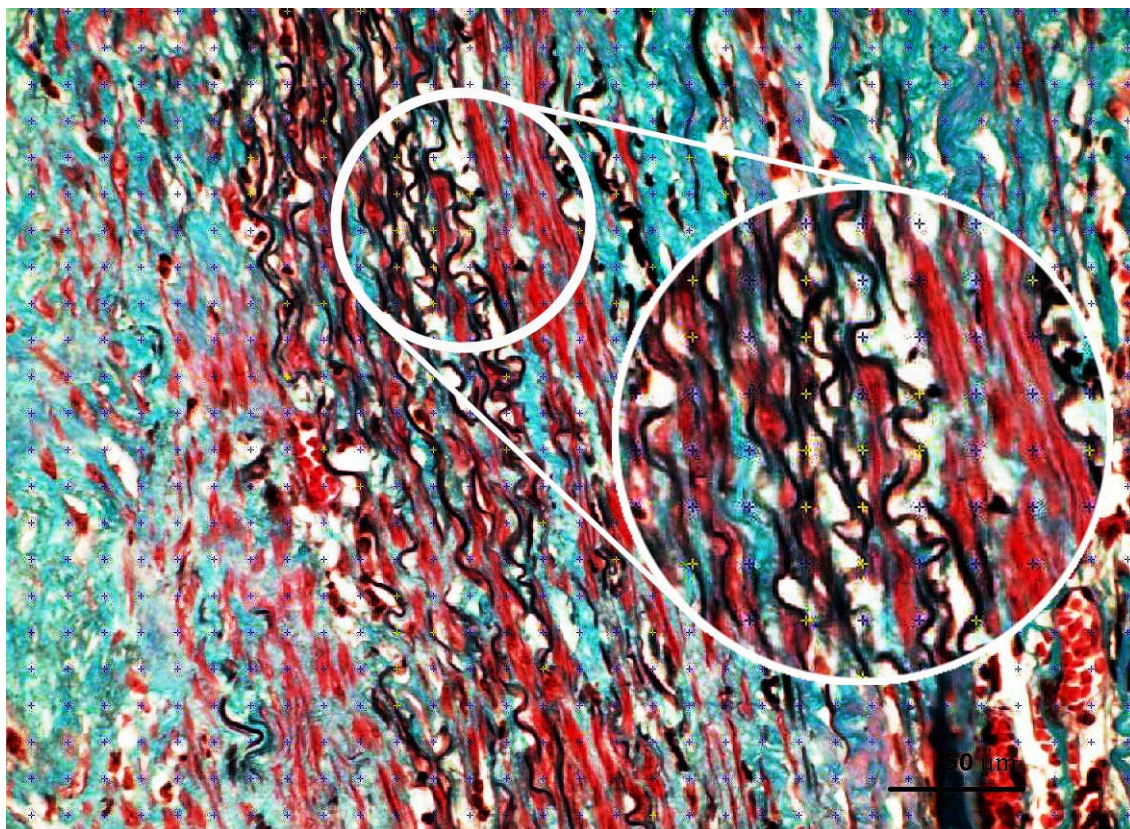
Nižší vaskularita břišní aorty bývá uváděna jako jeden z možných důvodů predilekce aneuryzmat v této části srdečnice [Třeška 1999, Baxter et Worth 2009]. Nám se podařilo najít jen jedinou studii srovnávající vasa vasorum hrudní a břišní aorty [Wolinsky et Glagov 1969]. Autoři pro jejich zobrazení použili nástřik 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 [Gregor et al. 2012]. Po vzoru jiných [Gössl et al. 2003, Lametschwandtner et al. 2004, Zagorchev et al. 2010] jsme se pokusili použít mikro-CT zobrazení u korozivního preparátu. V dizertační práci uvádíme optimalizovaný protokol přípravy korozivního preparátu portálního řečiště jater prasete, srovnání testovaných pryskyřic a pilotní výsledky mikro-CT vyšetření.

6 Metodiky

6.1 Metodika histopatologické kvantifikace lidských AAA

Ve studii [Eberlová et al. 2013] 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 lumbalgií, 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 nevychýlené odhady [Tonar 2007]. Pro detekci hodnocených struktur byly použity histo- nebo imunohistochemické metody (tabulka 6.1). Pro kvantifikaci jednotlivých parametrů jsme použili interaktivní značení průsečíků hodnocených struktur s náhodně přiloženou mřížkou (obrázek 6.1), data byla zpracována v softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovensko). Získané spojité proměnné jsme použili pro následnou statistickou analýzu.



Obrázek 6.1 – Mřížka k hodnocení plošného podílu elastinu ve stěně AAA. Každému bodu mřížky odpovídá určitá plocha řezu, tzv. mřížková konstanta. Plošný podíl je pak násobkem mřížkové konstanty a bodů mřížky protínajících hodnocenou strukturu [Tonar et al. 2010]; měřítko $50\ \mu\text{m}$.

Odhad plošného podílu A_A v rovině řezu pomocí bodové testovací mřížky vychází z rovnice:

$$A_A = \frac{a \cdot P}{a \cdot N} = \frac{P}{N} [\%],$$

kde a je parametr použité testovací sítě (plocha příslušející jednomu testovacímu bodu), P je počet průsečíků s hodnoceným objektem, N je celkový počet bodů přiložené mřížky.

Odhad délkové hustoty L_A v řezech hodnocených struktur vychází z rovnice:

$$L_A = \frac{L}{A} [\text{m}^{-1}],$$

kde L je naměřená délka a A je referenční plocha.

Odhad mikrovazální hustoty Q_A stanovujeme podle rovnice:

$$Q_A = \frac{Q}{A} [\text{m}^{-2}],$$

kde Q je počet profilů mikrocév zachycených na řezu o referenční ploše A .

Tabulka 6.1 – Přehled hodnocených veličin, referenčních ploch a použitých markerů ve studii lidských AAA [Eberlová et al. 2013]

měřená veličina (objekt)	referenční plocha	použité barvení nebo imunogen
plošný podíl elastinu $A_A(\text{elastin})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
délková hustota elastinu $L_A(\text{elastin})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
plošný podíl kolagenu $A_A(\text{kolagen})$	intima + media	modifikovaný zelený trichrom
plošný podíl granulocytů $A_A(\text{granulocyty})$	intima + media + adventicie, trombus	myeloperoxidáza granulocytů
plošný podíl makrofágů $A_A(\text{makrofágy})$	intima + media + adventicie, trombus	makrofágový kalprotektin
plošný podíl aktinu $A_A(\text{aktin})$	intima + media	α -SM aktin
plošný podíl desminu $A_A(\text{desmin})$	intima + media	desmin
plošný podíl vimentinu $A_A(\text{vimentin})$	intima + media	vimentin
plošný podíl PAI-1 $A_A(\text{PAI-1})$	intima + media + adventicie	C-9
plošný podíl uPA $A_A(\text{uPA})$	intima + media + adventicie	C-20
plošný podíl tPA $A_A(\text{tPA})$	intima + media + adventicie	C-16
mikrovazální hustota Q_A	intima+media+adventicie	CD-31

6.1.2 Metodika biochemického zpracování

Přehled proteinů hodnocených ve stěně a plazmě pacientů s AAA ukazuje tabulka 6.2 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 6.2 – Přehled proteinů měřených ve tkáni a plazmě metodou multiplexové imunoanalýzy [Eberlová et al. 2013]. Jejich biologický účinek odlišen barevně: aktivátory černě, inhibitory modře

prozánětlivý protizánětlivý	angiogenní antiangiogenní	elastolytický	kolagenolytický
IL-6, -8, -12 MMP-1, -2, -7, -9 ICAM, VCAM, E selektin VEGF IL-10 TIMP-1, -2 Osteoprotegerin Adiponektin	IL-8 VEGF, EGF IL-12 TIMP-2	MMP-2, -7, -9	MMP-1

6.1.3 Statistická analýza

Statistická signifikance byla stanovena pro hodnotu $p < 0,05$ (při hladině významnosti $\alpha = 0,05$). Protože analýza získaných dat nepotvrdila jejich normální rozložení (testováno Shapiro-Wilksovým W testem), použili jsme pro testování hypotéz neparametrické testy: pro porovnání zánětlivého infiltrátu AAA stěny a naléhajícího trombu jsme použili Wilcoxonův párový test, pro porovnání aort normálních a aneuryzmatických, vzorků řazených podle velikosti nebo symptomatologie jsme použili Mannův-Whitneyův test. Pro zjištění závislosti zkoumaných parametrů byl použit Spearmanův koeficient korelace.

6.2 Histopatologická kvantifikace prasečích AAA ovlivněných atorvastatinem

Ve studii Houdek et al. [přijato k tisku], Houdek et al. [2012] bylo experimentální aneuryzma u prasat domácích (průměrná hmotnost 25 kg, stáří 70–75 dní) vytvořeno kombinací účinku prasečí pankreatické elastázy a stenozující manžety [Moláček et al. 2009]. 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, 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 6.3:

Tabulka 6.3 – Přehled hodnocených veličin, referenčních ploch a použitých markerů ve studii prasečích AAA [Houdek et al., přijato k tisku]

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

Způsob odhadu plošného podílu, délkové hustoty a hustoty mikrocév byl popsán již v kapitole 6.1.

Relativní vzdálenost cévy od adventicie f byla hodnocena podle vzorce:

$$f = d1/(d1+d2),$$

kde $d1$ je radiální vzdálenost profilu cévy od zevního okraje adventicie, $d2$ pak od lumen. Hodnota f tedy roste s hloubkou průniku vasa vasorum cévní stěnou směrem k intimě.

6.2.1 Statistická analýza

Statistická signifikance byla i v této studii stanovena pro hodnoty $p < 0,05$ (při hladině významnosti $\alpha = 0,05$). Z výše uvedených důvodů byly i zde použity neparametrické testy. Pro porovnání vzorků aort normálních, aneuryzmatických a aort ovlivněných statiny byl použit Mannův-Whitneyův test. Pro zjištění závislosti zkoumaných parametrů byl použit Spearmanův koeficient korelace.

6.3 Metodika přípravy mikrokorozičních preparátů

Obecným principem korozivního preparátu je naplnění dutiny polymerizujícím materiálem a následné odleptání okolních tkání. Korozivní preparát je tedy odlitkem lumina. U cévních preparátů rozlišujeme vaskulární a mikrovaskulární preparát – ten cílí na úroveň kapilárního řečiště a mikrocév, tedy cév o průměru pod cca 70 μm . Kapitola 6.3 a 6.4 je věnována obecným principům získání korozivního preparátu cév a mikro-CT zobrazení. Protokoly z našich experimentů jsou uvedeny v kapitole 7.2.

Z našich zkušeností i průběžných konzultací vyplývá, že protokol přípravy korozivních preparátů nelze unifikovat [Aharinejad a Lametschwandtner 1992a]. Na počátku každé studie je nutné metodiku pečlivě zvážit. Obecně platí, že při injikaci pryskyřice do cév musíme předejít vzniku koagul a zabránit vzniku turbulentního proudění i vzduchové embolie. Vhodnou pryskyřici volíme podle celkové velikosti i průsvitu zobrazovaného řečiště (jen některé nástřikové hmoty procházejí mikrořečištěm, mezi sebou se liší také rychlostí polymerace). Pryskyřici injikujeme do řečiště v dostatečném množství a co nejbližší pozorovaným strukturám. Při polymeraci i následném odleptávání okolních tkání musíme dbát na prevenci vzniku artefaktů. Výše uvedené kroky přípravy korozivního preparátu shrnuje tabulka 6.4

Tabulka 6.4 – Přehled kroků přípravy korozivního preparátu u zvířete

krok	upřesnění
1. premedikace	antikoagulancia, případně vazoaktivní látky
2. anestézie (usmrcení)	
3. výplach řečiště	nejčastěji heparinizovaným iontovým roztokem fyziologické osmolality, teploty, pH
4. perfúzní prefixace	vhodná jen u elastických tepen
5. injikace pryskyřice	pozor na výběr typu pryskyřice, místa, tlaku a objemu injikace
6. polymerace	ve vodní lázni 12–24 hodin při teplotě 40–60 °C
7. macerace	může být úplná nebo částečná
8. vymytí preparátu a sušení preparátu	

6.3.1 Předpříprava napouštěného vzorku

Jsou dva hlavní faktory, které mohou kompletní naplnění vaskulárního řečiště ovlivnit: přítomnost sraženin a vazospasmus. Každý postup napouštění by proto měl tato rizika zohledňovat a minimalizovat. Nejběžněji užívanou lékovou skupinou pro přípravu mikrokorozičních preparátů jsou antikoagulanty, konkrétně heparin. Ten se podává zvířeti *in vivo* intravenózně nebo intraperitoneálně, v rámci předpřípravy většího zvířete se *post mortem* řečiště promývá heparinovaným solným roztokem. Před použitím jiných lékových skupin je nutné zohlednit cíl studie. Např. vazoaktivní látky jsou kontraindikované pro morfologické studie cévního řečiště, neboť mění jeho kvalitu.

6.3.2 Pryskyřice

Při přípravě korozivních preparátů můžeme vybírat ze dvou skupin pryskyřic: akrýlátových nebo epoxidových. Obojí jsou toxická, a je proto při manipulaci s nimi nanejvýš vhodné používat ochranných pomůcek. Pro vyplnění celého cévního řečiště je u daného média nezbytné sledovat následující parametry:

- vhodná, dostatečně nízká viskozita
- rychlost polymerace
- rezistence vůči maceračním činidlům
- elektrokonduktivita, případně radioopacita (dle metody následné vizualizace)

Viskozita je hydrodynamickou vlastností kapaliny. Je ovlivněna strukturou a interakcemi mezi molekulami, tedy také teplotou. Důležitost viskozity pro reologické vlastnosti kapaliny ukazuje Poiseuilleův zákon,

$$Q = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot l \cdot \rho}$$

kde průtok kapaliny Q je přímo úměrný tlakovému gradientu uvnitř trubice Δp a čtvrté mocnině jejího poloměru r , nepřímo úměrný pak viskozitě ρ a délce trubice l . Vidíme, že s rostoucí viskozitou i délkou trubice klesá průtok injikovaného média, což zabraňuje plnění malých cév. Například zvětšení poloměru kanyly z 1 na 1,2 průtok zdvojnásobí. Proto se snažíme zavádět kanylu co nejširší, která kopíruje lumen cévy, a dále vytvořit co nejkratší cestu plnění (lze ovlivnit výběrem místa injekce i složením injekčního setu). Viskozita odlitkových médií se pohybuje v řádech desítek cP (tabulka 6.5), pro srovnání voda má ve 20 °C viskozitu 1 cP, krev 2–3 cP.

Viskozitu pryskyřice ovlivňuje celá řada faktorů, včetně délky a způsobu skladování. Proto je velmi vhodné testovat rychlost polymerace v malém objemu před každým experimentem. Vyšší viskozita vede k rychlejší polymeraci, v extrémním případě ztuhnutí látky ještě před její úplnou injikací. Na preparátu pak pozorujeme prstovitý tvar konců odlitků v místech, kde pryskyřice neprošla celým řečištěm. Naopak příliš nízká viskozita dosažená malým množstvím katalyzátoru může být příčinou neúplné polymerace, na preparátu pak pozorujeme prosakování pryskyřice do intersticia (obrázek 7.4, 7.5). Manipulační čas lze prodloužit nízkou teplotou vstupních látek a menším množstvím přidaného katalyzátoru.

Tabulka 6.5 – Příklady odlitkových médií a jejich vlastnosti

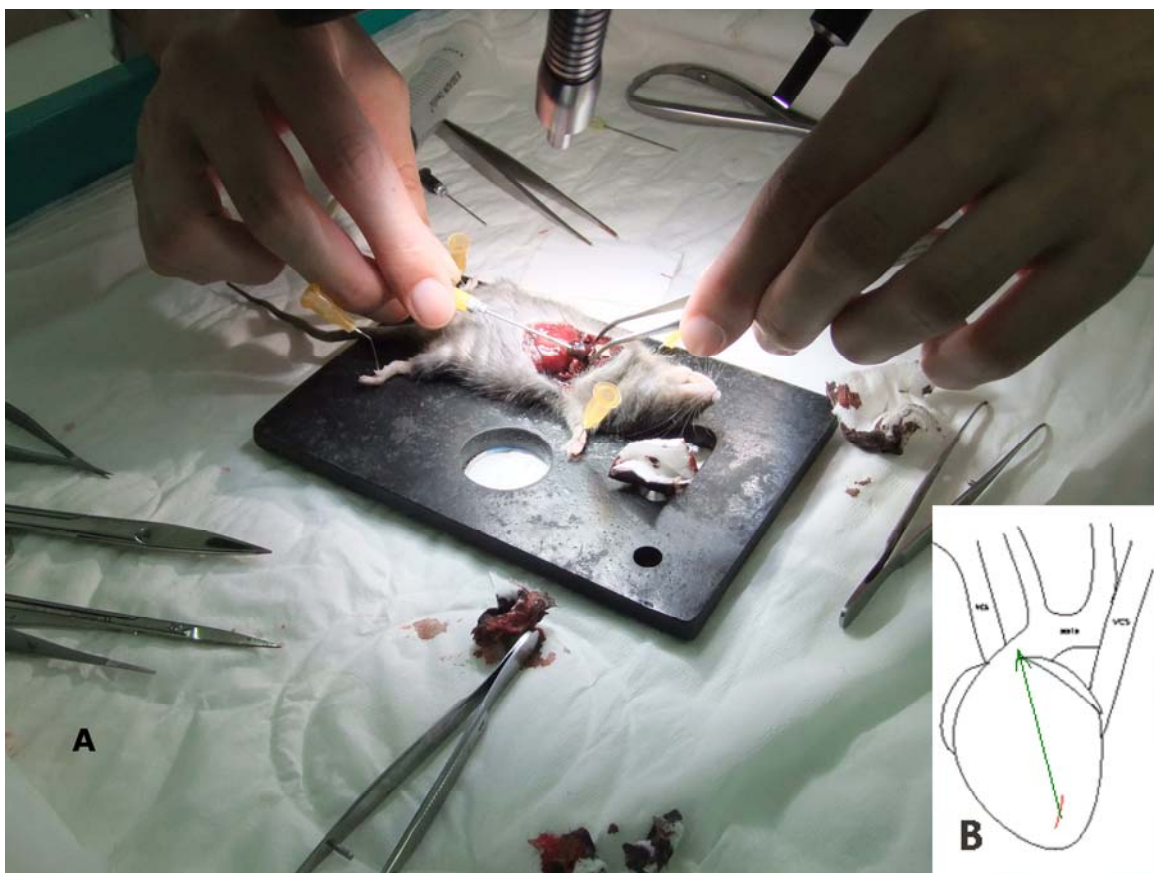
název, výrobce	druh nástřikové látky	viskozita (cP)	manipulační čas	další vlastnosti
Mercox II <i>Ladd Research, Williston, Vermont, USA</i>	akrylátová pryskyřice	10–15	velmi variabilní, v řádech minut	Mercox II je dvousložková pryskyřice, její hlavní výhodou je snadná manipulace. Zásadní nevýhodou je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

6.3.3 Příprava místa pro injikaci

Rovněž i výběr místa vstupu do řečiště musí zohledňovat cíl práce. Chceme-li získat korozivní preparát celého cévního systému, je u malých zvířat nejvhodnějším místem vstupu levá (případně společná) komora. Zamýšlíme-li ale vyplnění cév konkrétního orgánu, pak vybíráme logicky orgánově specifickou nutritivní nebo funkční cévu. Obecným pravidlem je zavádět kanylu co nejbliž cílovému objektu (viz Poisselieuův zákon – zvyšujeme tím průtok, také minimalizujeme riziko nežádoucího odtoku média cestou kolaterál). Jak již bylo zmíněno, měla by šířka kanyly kopírovat průsvit kanylované cévy. Konec kanyly by neměl být ostrý ani kónický, jeho tvar by měl maximálně snižovat riziko vzniku turbulentního proudění i zhmoždění cévy (v našich experimentech jsme u myši používali zabroušenou injekční jehlu, pro kanylací v. portae prasete zastřížený Nelatonův katetr). Kanylací malých cév je nutno provádět pod mikroskopickou kontrolou za použití mikroinstrumentária včetně mikrokanyly a mikromanipulátoru.

Injikace levou srdeční komorou při současném otevření pravé síně pro zajištění odtoku vytlačovaného obsahu je metodou volby pro naplnění celého vaskulárního systému **u malých zvířat**, avšak s ohledem na přítomnost chlopní, četné anastomózy a zkraty je úplné napuštění řečiště velmi obtížné. **Injikace ascendentní aortou** je pro celkové naplnění vhodnější, při podvazu hrudní aorty plníme hlavu, krk, trup a horní končetiny. Katetr se zavádí po jemné incizi svalovinou levé komory nad aortální chlopeň (obrázek 6.2). Pro naplnění břišního řečiště a dolních končetin je místem vstupu břišní část aorty. Pro vytvoření korozivního preparátu cév plic u savců zavádíme kanylu do **vena cava inferior**, pro odtok vytváříme otvor v levé síni. Při napuštění jednotlivých orgánů je už při jejich odběru nutné dbát na **prevenci vzduchové embolie**, neboť ta

znemožňuje vstup média cévním stromem. V ideálním případě vypreparujeme cévu ještě *in situ*, tedy před vyjmutím orgánu, předejdeme tím i nežádoucí retrakci tepenné stěny po jejím protěti.



Obrázek 6.2 – Nástřiku ascendentní aortou (A), schéma vedení jehly (B)

6.3.4 Základy perfuze a perfuzní techniky

Ať už pro další zobrazení korozivního preparátu vybereme jakoukoli metodiku, pro jeho kvalitu a výpovědní hodnotu má zásadní význam stupeň naplnění a co nejmenší přítomnost artefaktů. Ty mohou vzniknout v jakékoli fázi přípravy preparátu – výběrem perfuzátu, preparací, prefixací, vlastní injekcí nebo při polymeraci. Při samotné perfúzi hrají roli tyto faktory: perfúzní tlak a rychlost průtoku, teplota, osmolalita (viskozita) a chemické složení perfuzátu.

Abychom získali odlitky odpovídající stavu *in vivo*, měl by se perfúzní tlak blížit tlaku přirozenému. Ovšem s ohledem na Poiseuilleův zákon a relativně vysokou viskozitu pryskyřice by měl a může být aplikační tlak významně vyšší, aniž by došlo k traumatizaci cév. Pro spolehlivé vyplnění mikrořečiště by objem injikované pryskyřice měl být alespoň dvakrát větší než předpokládaný objem řečiště. Po ukončení injekce ponecháváme kanylu v místě vpichu a ligujeme výstupní cévu, dokud nepozorujeme známky tuhnutí. Poté přendáme preparát do vodní lázně o pokojové teplotě, abychom zabránili vzniku artefaktů způsobených kompresí. Zde necháváme napuštěný preparát polymerovat v řádu hodin. Pro urychlení polymerace je možné zvýšit teplotu vodní lázně až na 60 °C.

6.3.5 Chemické roztoky pro maceraci

Chemické roztoky pro maceraci mohou být alkalické, kyselé, případně lze pro šetrnější odstranění okolní tkáně použít enzymy. Délka macerace pak závisí na koncentraci roztoku, teplotě a frekvenci výměny maceračního roztoku. V neposlední řadě i na velikosti preparátu a typu tkáně, což ve výsledku znamená časový rozptyl mezi několika hodinami až dny. Ohledně macerační teploty lze říci, že by neměla překročit 40 °C – u vyšší teploty hrozí poškození odlitku. Nižší teploty odleptávání zpomalují. Koncentraci korozivního agens musíme přizpůsobit požadovanému výsledku, typu tkáně i kvalitě použité pryskyřice tak, aby odleptáváním nedošlo k jejímu poškození. Další proměnnou je délka macerace. Obecně platí, že poškození vzorku hrozí u macerace rychlé, která je potencována agresivnější roztokem nebo vyšší teplotou. Pomalejší macerace by vzorek neměla poškodit, ovšem kvalitu preparátu je nutné zkontrolovat, aby nebyl kontaminován zbytky tkání. Macerační roztok měníme denně.

6.4 Mikro-CT

Mikro-CT (Micro Computed Tomography) je zobrazovací metoda, která pomocí rentgenového záření umožňuje diferenciaci struktur s rozdílnou absorpcí záření. Podobně jako u běžného CT je zkoumaný objekt prozářen v jedné rovině z nejrůznějších úhlů, plošný řez je následně počítačově zrekonstruován. Zatímco se maximální rozlišení u běžného CT pohybuje kolem 0,4 mm, umožňují nejnovější *in vivo* mikro-CT přístroje rozlišení 100–30 µm, *ex vivo* pak až v řádech nanometrů [Zagorchev et Mulligan-Kehoe 2009]. **In vivo mikro-CT** (jinak také mini-CT) skenery jsou konstruovány pro CT obvyklým způsobem - skenovaný objekt je fixní, rotují detektor a rentgenka – jejich vzdálenost je dána výrobcem a většinou je neměnná [Schambach et al. 2010]. Nižší rozlišení u *in vivo* mikro-CT je ovlivněno nutností omezení délky skenovacího času a radiační zátěže. Vyšetření pro získání přehledového skenu o rozlišení (pixel size) 10 µm trvá asi 1 hodinu, skenování s rozlišením 1 µm asi 24 hodin. **Ex vivo mikro-CT** přístroje jsou konstruovány odlišně – rotuje vyšetřovaný objekt (RTG paprsek svírá s osou pohybu vzorku pravý úhel), rentgenka i detektor jsou stacionární. S ohledem na požadované rozlišení a velikost vzorku je ale možné jejich vzdálenost měnit. Velikost vyšetřovaného vzorku by měla být 500–1000x větší než velikost požadovaného detailu. Vyšetření mikro-CT je dvoustupňové. V první fázi získáváme 2D obrazy objektu (s rozlišením obdobným histologickému preparátu v mikroskopickém obraze), ty mohou být následně upraveny odstraněním artefaktů, segmentací nebo prahováním, a použity pro 3D rekonstrukci. Naše výsledky ukázaly, že mikro-CT snímky mohou být použity 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 [Tonar et al. 2012].

6.4.1 Kontrastní látky

Mikro-CT zobrazení bylo testováno (aplikováno) již na většině typů tkání [Schambach et al. 2010], pro studium cév nabízí jedinečnou možnost 3D zobrazení struktur s rozlišením pod 1 µm včetně možnosti diferenciaci novotvorby cév [Zagorchev et al. 2010]. Nativní cévy jsou pro rentgenová vyšetření málo kontrastní, pro jejich zobrazení je nutná aplikace rentgen-kontrastní látky. Ta by kromě radioopacit u aplikace *in vivo* měla být co nejméně toxická, měla by prostupovat cévním stromem, avšak co nejméně do okolních tkání. Běžně užívaný, ve vodě rozpustný iodidový kontrast je proto málo vhodný. Pro potřeby mikro-CT se používají makromolekulární kontrastní látky [Barrett et al. 2006], ve kterých jsou molekuly rentgen-kontrastního agens navázány např. na plazmatické proteiny [Montet et al. 2006] nebo liposomy [Montet et al. 2007] tak, aby byla během vyšetření zajištěna jejich dostatečná koncentrace. Přehled námi testovaných pryskyřic (polymerů) uvádí tabulka 6.5.

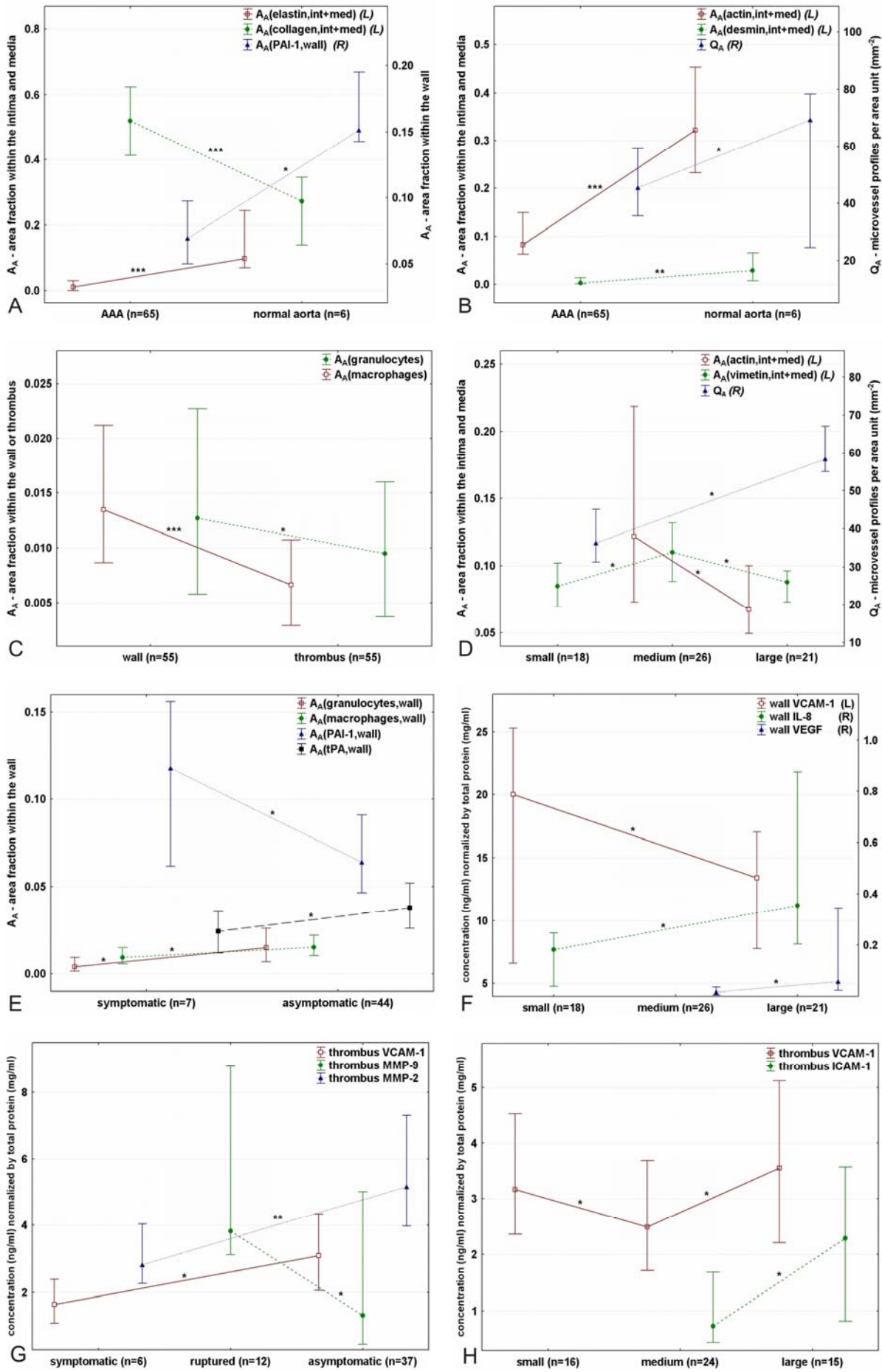
7 Výsledky

7.1 Hlavní výsledky a nálezy

7.1.1 Morfologie aneuryzmatu lidské aorty

Výsledky naší studie [Eberlová et al. 2013] nás vedou k **zamítnutí všech výchozích nulových hypotéz** (viz kapitola 5), obrázek 7.1:

- 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.
- Výsledky korelace histopatologických a imunoanalytických dat ukazují středně silnou ($0,4 < R \leq 0,6$) nebo silnou ($R > 0,6$) korelaci u následujících parametrů (tabulka 7.1 a):



Tabulka 7.1 a – 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.

	A_A (elastin), <i>int+med</i>	A_A (granulocyty), <i>stěna</i>	Q_A , <i>stěna</i>	A_A (aktin), <i>int+med</i>	A_A (desmin), <i>int+med</i>	A_A (vimentin), <i>int+med</i>	A_A (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 (elastin), <i>int+med</i>	0,94	n.s.	n.s.	0,35	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,37
A_A (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 (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 (makrofágy), <i>stěna</i>	-	0,43	0,39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (granulocyty), <i>stěny</i>	-	-	0,46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,43	n.s.	0,47	n.s.	-0,44
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 (aktin), <i>int+med</i>	-	-	-	-	0,37	0,33	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,44	n.s.
A_A (desmin), <i>int+med</i>	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,33	n.s.
A_A (makrofágy), <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	0,41	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (granulocyty), <i>trombus</i>	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	0,42	n.s.	n.s.	n.s.
IL6, <i>stěna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	-0,48
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.

A_A – plošný podíl, L_A – délková hustota, Q_A – mikrovazální hustota, *int+media* – intima a media, **n.s.** – nesignifikantní korelace ($|R| < 0,3$)

◀ **Obrázek 7.1** [Eberlová et al. 2013] – Kvantitativní histopatologie aortální stěny a trombu. 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**).

Tabulka 7.1 b – Popis korelujících parametrů z tabulky 7.1 a – pozitivní korelace černě, negativní korelace červeně, vpravo citace studie s podobným výsledkem.

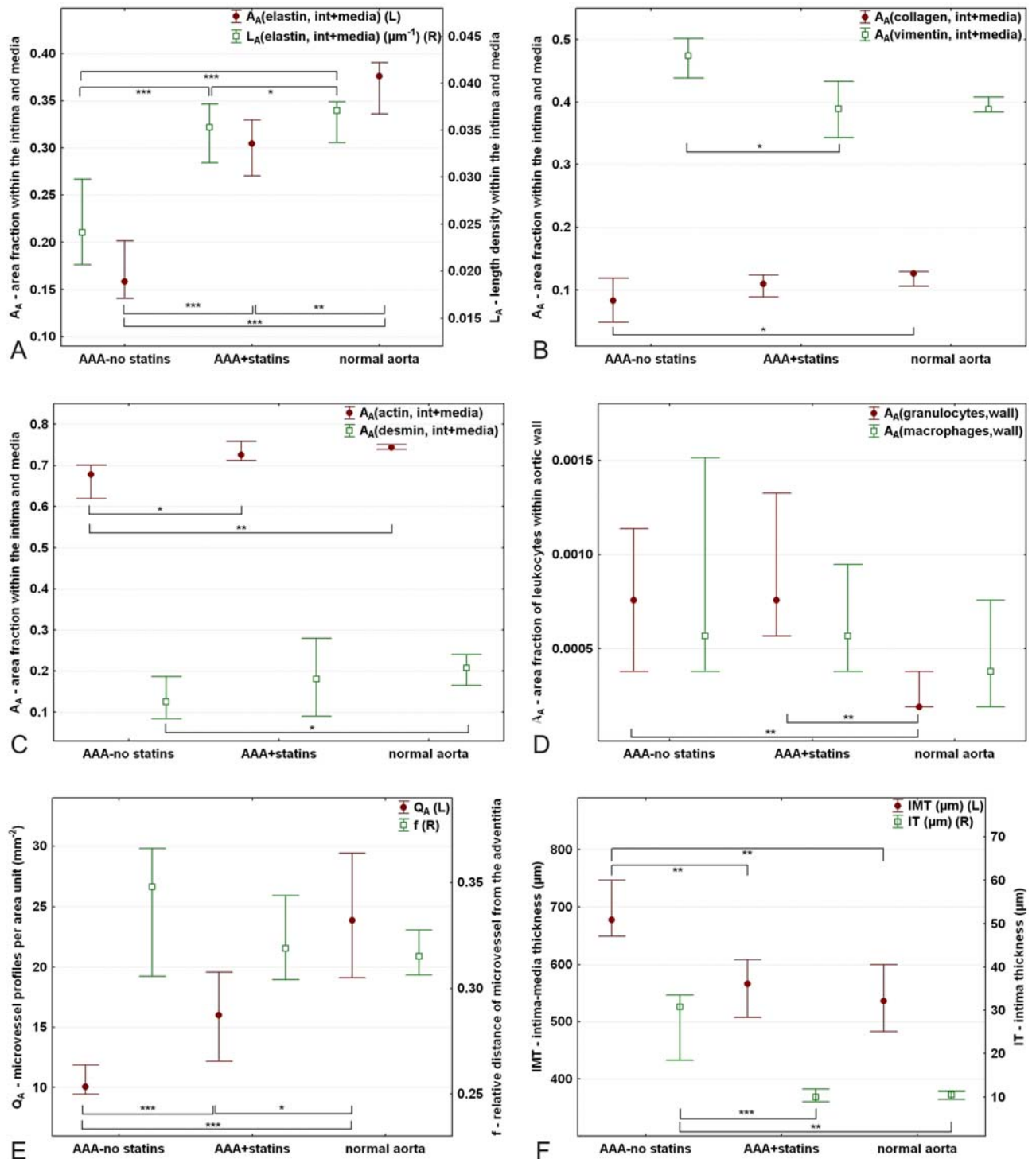
korelující parametry		dříve publikované výsledky
plošný podíl elastinu ve stěně	délková hustota elastinu ve stěně	délková hustota je pro detekci fragmentace elastických lamel senzitivnější parametr než plošný podíl [Kochová et al. 2009]
plošný podíl granulocytů ve stěně	plošný podíl makrofágů ve stěně	vyšší zánětlivý infiltrát v medii AAA kryté trombem [Kazi et al. 2003]
plošný podíl granulocytů v trombu	plošný podíl makrofágů v trombu	
plošný podíl granulocytů ve stěně	počet profilů mikrocév ve stěně	zánětlivý infiltrát pozitivně koreluje s neovaskularizací [Reeps et al. 2009]
plošný podíl granulocytů ve stěně	IL-6 ve stěně	<i>podobný výsledek nenalezen</i>
plošný podíl granulocytů v trombu	IL-8 v trombu	prokázána kolokalizace IL-8 a neutrofilů v lumenální vrstvě trombu [Houard et al. 2009]
plošný podíl granulocytů ve stěně	MMP-1 v trombu	IL-8 zvýšil chemotaxi způsobenou MMP-1 [Estrada-Gutierrez et al. 2011]
plošný podíl aktinu ve stěně	TIMP-1 v trombu	TIMP-1 inhibuje apoptózu [Chirco et al. 2006]
plošný podíl granulocytů ve stěně	TIMP-2 ve stěně	TIMP-2 inhibuje angiogenezi [Seo et al. 2003]
IL-6 ve stěně	TIMP-2 ve stěně	<i>podobný výsledek nenalezen</i>

7.1.2 Morfologie modelu prasečího AAA

Také výsledky studie [Houdek et al., přijato k tisku, Houdek et al. 2012] zkoumající vliv atorvastatinu na experimentálně vytvořené AAA u prasete nás vedou k zamítnutí obou nulových hypotéz (kapitola 5, obrázek 7.2). 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, ztlustělou 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 se statinovou léčbou nezměnil.

Tabulka 7.2 ukazuje přehled středně silně a silně korelujících kvantitativních parametrů [Houdek et al., přijato k tisku]. 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.



Obrázek 7.2 [Houdek et al., přijato k tisku] – 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).

Tabulka 7.2 [Houdek et al., přijato k tisku] – Přehled Spearmanových koeficientů korelace $R > 0,4$ při $p < 0,05$ u kvantitativních parametrů hodnocených ve stěně elastázou indukovaných prasečích AAA

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

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 ($|R| < 0,3$)

7.2 Naše zkušenosti s mikrokorozivními preparáty

Cílem našeho úsilí bylo rozšířit spektrum metodik zkoumání aortální stěny, konkrétně aortálních vasa vasorum.

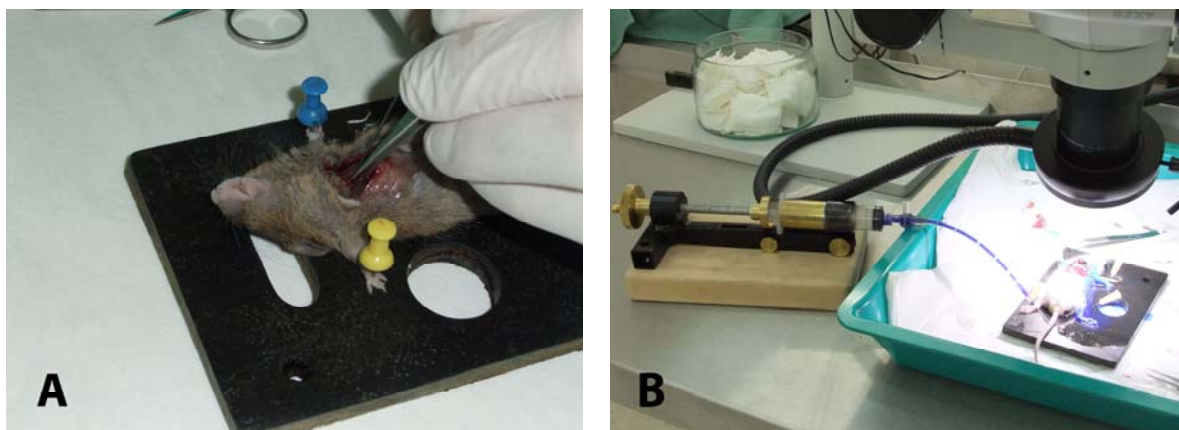
7.2.1 Nástřík myši

Cíl: Praktické osvojení anatomie myši, vytvoření mikrokorozivního preparátu.

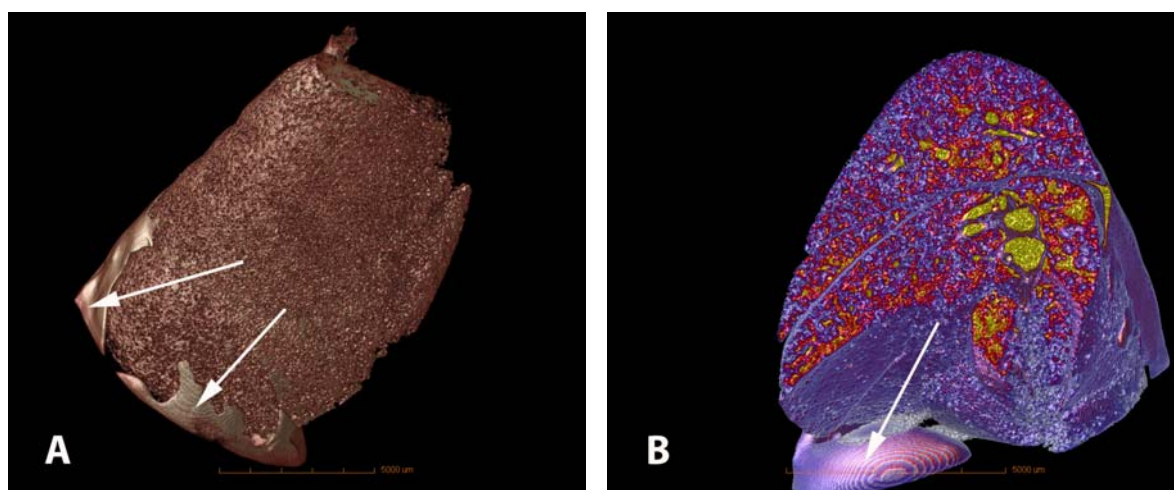
Úvod: U myši je vytvořena dlouhá a substernálně dobře přístupná vena cava inferior, zatímco aorta se svým obloukem v horním mediastinu rychle zanořuje a pokračuje sestupnou částí paravertebrálně.

Metoda a materiál: Dospělá samice Wild, B6CBA, hmotnost 30 g, byla uspána Thiopentalem (aplikován intraperitoneálně), následně bylo intraperitoneálně aplikováno 500 UI heparinu. Odstřížením skeletu přední stěny hrudníku byl zjednan široký přístup (obrázek 7.3 A) a aplikována 2. dávka heparinu (500 UI intraperitoneálně). I přesto, že jsme pracovali pod lupou, nebylo možné spolehlivě rozlišit struktury malého a velkého oběhu. Abychom odlišili aortu, rozhodli jsme se pro injekci tuše do levého srdce [Kachlík a Hoch 2008]. Následně jsme provedli podvaz hrudní části sestupné aorty v zadním mediastinu, bylo nastříženo ouško pravé síně. Do tuší označené cévy byla zavedena pryskyřici předplněná kanyla (pryskyřice Mercocox II: 10 ml pryskyřice smícháno s 0,2 g katalyzátorem), obsah byl vstříkovan do řečiště (aorty?) za použití mikromanipulátoru (obrázek 7.3 B). Po ukončení aplikace jsme jehlu odstanili a zvíře bylo ponořeno na 12 hodin do vodní

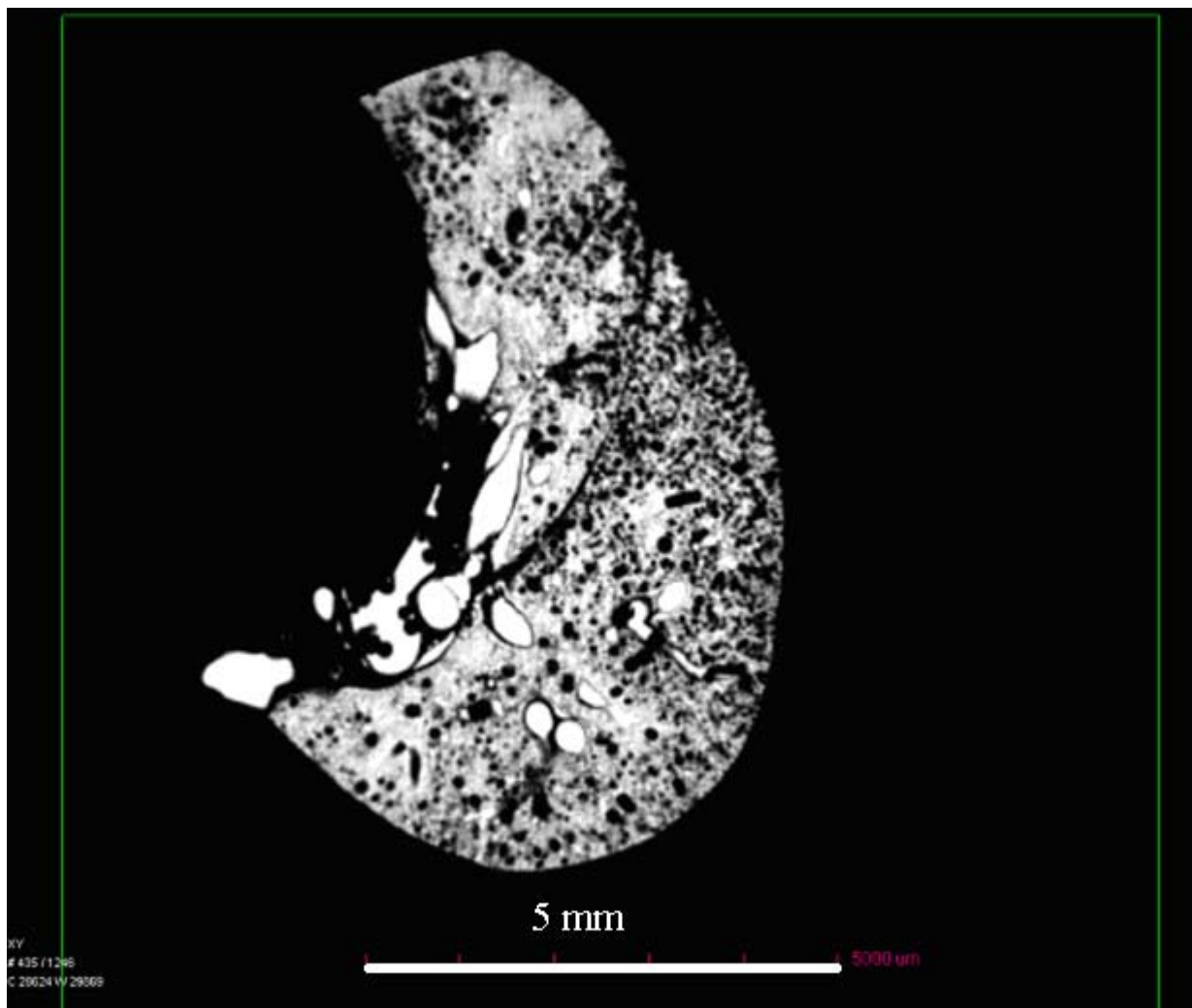
lázně o pokojové teplotě. Poté bylo provedeno odleptání měkkých tkání 24 hodinovou lázní v 15% roztoku KOH.



Obrázek 7.3 – Široké otevření hrudníku (A), použití mikromanipulátoru pro nástřik pryskyřice (B)



Obrázek 7.4 – Přehledové skeny mikro-CT vyšetření levé plíce myši, vylití pryskyřice do pleurální dutiny označeno šipkou (A, B). Červená barva odpovídá místům o vyšší hustotě cév (B). Měřítko 5 mm (A, B).



Obrázek 7.5 – Mikro-CT vyšetření korozivního preparátu plicní cirkulace levé plíce myši, horizontální řez; měřítko 5 mm.

Výsledek: Prostým okem vidíme odlitky cév obou plicních laloků, srdce a částečně i mozku. Mikro-CT vyšetření ukázalo plné naplnění plicní mikrocirkulace, je patrný masivní přestup pryskyřice do intersticia (obrázek 7.4, 7.5).

Diskuse: Při injekci tuše zřejmě došlo k propíchnutí mezikomorové přepážky a retrográdnímu naplnění dolní duté žíly, kam byla injikována i pryskyřice. Vznikl tak preparát plicní cirkulace.

7.2.2 Korozivní preparát portálního řečiště jater prasete

Cíl: V rámci studie zaměřené na zvyšování resekability maligních ložiskových procesů v játrech jsme optimalizovali protokol pro získání korozivního preparátu jaterních cév. Data získaná z mikro-CT skenů mají být použita pro vytvoření modelu jaterní perfuze.

Metoda a materiál: Za součinnosti anesteziologa a chirurgického týmu bylo prase o hmotnosti 25 kg uvedeno do celkové anestézie (použit azaperon 4 mg/kg, thiopental 5 mg/kg, ketamin 1 mg/kg, fentanyl 0,04 mg/kg).

Operační protokol: Do dutiny byl břišní zjednán přístup z horní střední laparotomie rozšířen pod pupek, poté protažena hadička kolem ligamentum hepatoduodenale pro případný Pringleův

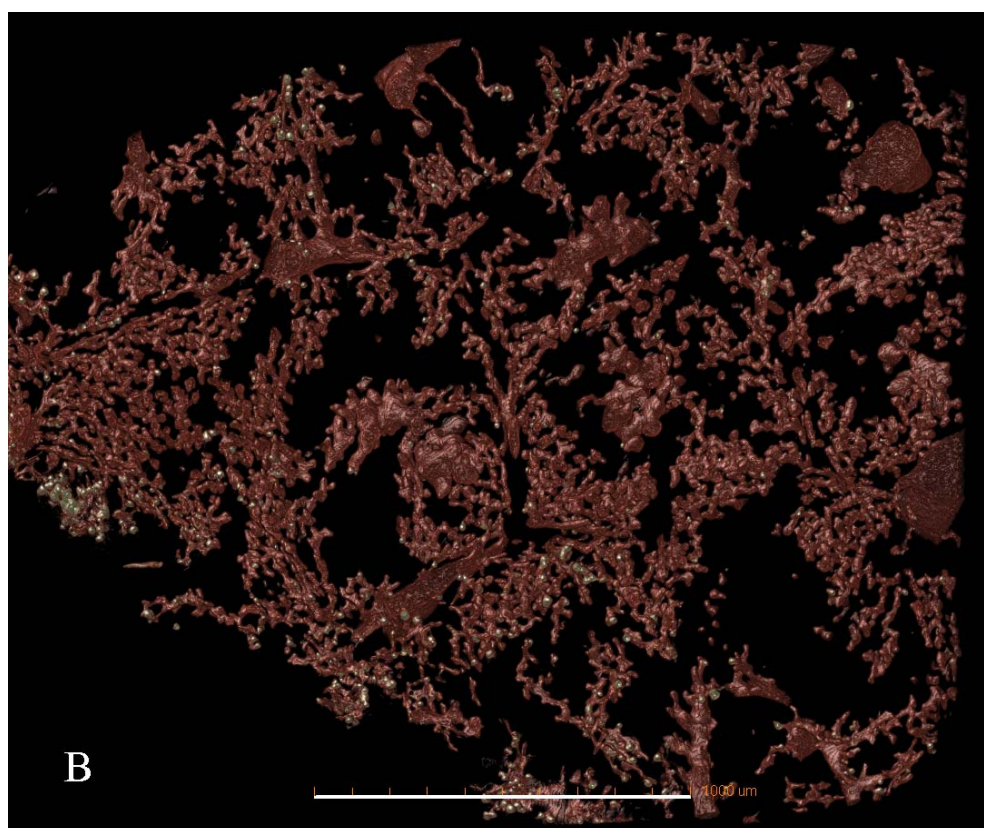
manévr. Játra uvolněna ze závěsů při falx fibrosa hepatis, prořato omentum minus, zpřístupněna vena cava inferior (VCI) nad játry. Preparujeme v. portae tak, že provádíme částečný Kocherův manévr a jsme schopni si případně portální žílu zajistit nad soutokem vena mesenterica superior a vena lienalis. Obcházíme ji a zajišťujeme hadičkou. Preparujeme a. hepatica communis s větvemi. Zajištěny na hadičce. Preparujeme kmen VCI pod játry až k renálním žilám, nad nimi VCI obcházíme a zajišťujeme hadičkou. Podáváme Heparin 30 000 UI i.v. Poté provádíme nastřížení bránice včetně podvazu bráničních žil tak, aby byl vytvořen dostatečný prostor pro cévní svorku nad játry a nedošlo ke kompresi jaterních žil. Nakládáme cévní svorku na VCI v mediastinu a další na VCI nad renálními žilami. Provádíme venotomii VCI, jí zavádíme dva katetry připravené z infuzního setu sestřížením koncovky a fixujeme je ligaturou. Zahajujeme proplach izotonickým roztokem (Hartmann 4 000 ml, chlazený, zbavený případných bublinek) s Heparinem (10 000 UI na každý litr). Na cévní svorce protínáme ligamentum hepatoduodenale, abychom zajistili drenáž proplachového roztoku jak v. portae, tak a. hepatica – obě směrem k játrům ponechány bez svorky. Během asi dvou minut dochází k vyblednutí jater, pomalý průplach ukončíme až po vytékání čiré tekutiny (obrázek 7.6).

Příprava korozivního preparátu: Játra jsme po předchozím podvazu hlavních cév vyjmuli z dutiny břišní. Všechny následující kroky byly prováděny z důvodu prevence vzduchové embolie pod vodní hladinou. Do v. portae jsme zavedli Nelatonův katetr a uvolnili suturu z VCI. Namíchali jsme celkem 435 ml pryskyřice Biodur E20 (Biodur products, Heidelberg, Germany) v poměru 300 g E 20, 135 g E 2(0), přidáno 0,5 g žluté barvicí pasty. Pryskyřice byla injikována do v. portae, nástříž byl ukončen poté, co jsme pozorovali její vytékání z VCI. Doba tuhnutí byla asi 40 minut. Napuštěný preparát byl ve vodě ponechán přes noc (obrázek 7.6). Druhý den byla játra přendána do 15% KOH a ponechána 48 hod v termostatu při teplotě 40 °C. Roztok KOH byl měněn po 24 hodinách.



Obrázek 7.6 – Příprava jater k hepatektomii (A), kanylace v. portae (B), preparát jater před začátkem koroze (C)

Výsledek: Po odleptání měkkých tkání je patrné vyplnění cév všech laloků včetně a. hepatica communis (obrázek 7.7 A).



Obrázek 7.7 – Mikro-CT vyšetření vzorku (**B**) z korozivního preparátu jaterního řečiště (**A**). Odlitek pryskyřice kopíruje cévní lumen, nejmenší průsvit zachycených cév (jaterních sinusoid) při plném naplnění řečiště byl asi 20 μm. Měřítko 5 cm (**A**), 1 mm (**B**).

7.3 Diskuse

Jako nejvýznamnější hodnotíme výsledky spojené s analýzou vzorků aneuryzmatických aort asymptomatických pacientů. Ty vykazovaly ve srovnání se symptomatickými pacienty vyšší plošný podíl granulocytů, makrofágů, jako i tkáňového aktivátoru plazminogenu. Expres PAI-1 byla u této skupiny pacientů naopak nižší. Asymptomatická aneuryzmata tedy vykazovala větší zánětlivý infiltrát i zvýšenou fibrinolýzu i přesto, že více než 80 % těchto pacientů bylo v době operace léčeno léky s protizánětlivým účinkem. Tento jev přičítáme skrytému, a tedy nejspíš i delšímu průběhu onemocnění.

Výsledky obou našich kvantitativních studií [Eberlová et al. 2013, Houdek et al., přijato k tisku, Houdek et al. 2012] naznačují morfologické rozdíly mezi lidským a modelovým AAA, tedy i jistou omezenost interpretace výsledků u experimentálního modelu AAA prasete. Zatímco ve vzorcích lidského AAA bylo ve srovnání s normální aortou více kolagenu, u prasat s indukovaným aneuryzmatem byl plošný podíl kolagenu ve ztlustělé intimě a medii nižší než u zdravých zvířat. Dále byl ve stěně experimentálního aneuryzmatu vyšší plošný podíl granulocytů a makrofágů, lidská AAA ve srovnání se zdravou aortou rozdíl v zánětlivém infiltrátu v intimě a medii nevykazovala. V neposlední řadě jsme u prasečích aneuryzmat nezaznamenali přítomnost trombu, ten ale doprovází většinu lidských AAA. Hustota vasa vasorum, množství elastinu a kontraktilních elementů byly ve srovnání s aneuryzmatickými vzorky shodně vyšší u normálních aort lidských i prasečích. Je velice zajímavé, že podávání statinů neovlivnilo velikost zánětlivého infiltrátu, ačkoli dávka 1 mg/kg je vyšší než obvyklá.

Ačkoli z výsledků korelace hodnocených parametrů nelze odvozovat příčinnou souvislost, některé z nich potvrzují již dříve popsané vztahy, jako např. vzájemnou interakci mezi trombem a stěnou nebo vztah mezi zánětem a angiogenezí AAA. Výsledky obou našich studií ukazují velmi silnou korelaci mezi plošným podílem a délkovou hustotou elastinu v intimě a medii. Také plošný podíl elastinu v obou studiích pozitivně koreloval s plošným podílem aktinu a desminu, tedy kontraktilních elementů ve stejné referenční ploše. Jak již bylo zmíněno, ve stěně experimentálního AAA jsme ve srovnání s normální aortou prokázali méně kolagenu. V této souvislosti jsou zajímavé i výsledky korelací. Ty naznačují, že se plošný podíl aktinu významně snižuje zejména v medii. S přibývajícím tloušťkou intimy a medie klesá také hustota vasa vasorum, exprese vimentinu se naopak zvyšuje. Výsledky tedy naznačují, že úbytek vasa vasorum může být relativní, způsobený zmnožením intersticiální hmoty, např. proteoglykanů ve ztlustělé intimě a medii.

V morfologii AAA existuje celá řada nepotvrzených nebo sporných hypotéz. Fragmentace elastinu a úbytek kolagenu jsou považovány za základní faktory vzniku a progresu AAA [Sakalihan et al. 1993, Dobrin et Mrkvicka 1994], v naší studii [Eberlová et al. 2013] se obsah těchto proteinů s velikostí AAA neměnil. Rozdíl obsahu elastinu v hrudní a břišní části aorty byl popsán ve studii Wolinsky et Glagov [1969] a je považován za základní příčinu abdominální predilekce tohoto onemocnění. Avšak pilotní morfometrická studie autorů Tonar et al. [2005 a, b] hodnotící rozdíly hrudní a břišní části aorty prasete neprokázala intra- ani interindividuelní rozdíly v relativním podílu elastinu obou částí aorty, jen menší tloušťku elastických lamel v břišním segmentu. Výsledky naší poslední studie [Eberlová et al. 2013] nepotvrdily ani některé další výsledky z našich předchozích studií: exprese PAI-1 byla nižší u asymptomatických AAA [cf. Křížková et al. 2009], zánětlivý infiltrát byl větší u asymptomatických pacientů [cf. Třeška et al. 2002]. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílným počtem probandů, ale i rozdílností spektra sledovaných zánětlivých elementů.

Výsledky obou našich studií ukázaly, že mikrovazální hustota byla ve stěně normální aorty signifikantně vyšší než ve stěně aorty aneuryzmatické (obrázek 7.1, 7.2). Podobný nálezní popsal Acoltzin et al. [2004] ve studii srovnávající vaskularitu aorty normální a aterosklerotické. Naše výsledky ukazují, že vaskularita aneuryzmatické stěny rostla s velikostí AAA [Eberlová et al.

2013], vyskularita malých AAA je tedy výrazně nižší než u normální aorty. Tento náleznaznačuje význam hypoxie při vzniku AAA. Námi počítaný parametr mikrovazální hustoty je definován jako počet profilů mikrocév na jednotku plochy [Tonar et al. 2010], jeho snížení ve stěně AAA může být proto způsobeno i zvětšením plochy při dilataci stěny (nejpravděpodobnější u malých AAA) nebo zmnožením mezibuněčné hmoty (u středních AAA doprovázené zvýšenou vimentinpozitivitou). Tloušťku stěny jsme u pacientů s AAA neměřili, avšak zmnožení kolagenu v medii bylo patrné ve všech hodnocených vzorcích. Stěna intimy i medie byla významně hypertrofická u experimentálního AAA prasete (obrázek 7.2). Dalším faktorem, který může výsledek hustoty mikrocév ovlivnit, je jejich prostorová orientace. V patologiích cévní stěny přibývají vasa vasorum druhého řádu [Kwon et al. 1998], která mají cirkulární průběh a mají tedy nižší pravděpodobnost záchytu při transverzálním řezu cévní stěnou [Tonar 2007]. Zvyšování mikrovazální hustoty s růstem aneurymatického vaku by tedy mohlo být způsobeno i prostou změnou orientace vasa vasorum a zvýšením počtu mikrocév s podélným průběhem. Trojrozměrný systém mikroskopických cév obecně může, ale i nemusí být izotropní. Možné zkreslení výsledků 2-D odhadu mikrovazální hustoty jsme minimalizovali náhodnou orientací tkáně před krájením [Tonar 2008]. Vhodného 3D mikroskopického obrazu vasa vasorum bychom dosáhli buď použitím SEM [Lametschwandner et al. 2004], konfokálního mikroskopu [Kubínová a Janáček 2001] nebo mikro-CT zobrazením [Gössl et al. 2003]. Mikro-CT sice nabízí dostatečné rozlišení pro zobrazení celého řečiště, tato technologie je ale nevhodná pro vyšetření *in vivo*. Metodiku přípravy korozivního preparátu vasa vasorum břišní aorty zatím hledáme. Vzhledem k tomu, že od pacientů s AAA dostáváme téměř výlučně resekáty přední stěny aneurymatického vaku, jeví se použití animálního modelu jako nezbytné. Epoxidová pryskyřice Biodur E20 prochází i mikrocévami, na mikro-CT vyšetření jsme u ní neprokázali artefakty typu extravazací. Základní protokol přípravy korozivního preparátu cévního mikrořečiště jsme si ověřili na prasečích játrech.

7.4 Závěr

I. Kvantitativní histopatologie vzorků lidských AAA [Eberlová et al. 2013]

Výsledky naší studie nás vedou k zamítnutí všech výše uvedených hypotéz (kapitola 5). Stěna normální aorty obsahovala ve srovnání s aneurymatickými vrozky více kontraktilních elementů, více elastinu a vyšší množství inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1. Podíl kolagenu byl naopak vyšší ve vzorcích aneurymatických aort. Normální aorta byla obecně více vaskularizovaná než stěna aneurymatická. Aneurymatická stěna vykazovala ve srovnání s naléhajícím trombem větší zánětlivý infiltrát. Plošný podíl aktinu a vimentinu byl nejvyšší u středně velkých aneurymat (5–7 cm), počet profilů mikrocév se s velikostí AAA zvyšoval, nejvíce vaskularizovaná byla velká aneurymata (> 7 cm). Ve stěně aneurymatu 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 aneurymata 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 [Houdek et al., přijato k tisku]

I v této studii naše výsledky umožnily zamítnutí všech nulových hypotéz (kapitola 5). Kvantitativní histopatologické vyšetření ukázalo, že ve skupině statiny ovlivněných prasat byla destrukce elastinu menší, podíl kontraktálních 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 [Gregor et al. 2012, Tonar et al. 2012]

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 pětkrát levnější, testovaný žlutý odstín se ukázal jako více rentgenkontrastní. Mercox II se jeví jako zcela nevhodný pro přípravu preparátů o objemu větším 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 E 20 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 [Debbaut et al. 2011]. Mikro-CT zobrazení korozivních preparátů mikrocév nabízí rozlišení obdobné histologickému preparátu v mikroskopickém obraze. Naše výsledky ukázaly, že mikro-CT snímky mohou být použity 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 [Tonar et al. 2012].

7.5 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 aneurysmatické 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, kde byla pod mikroskopem nastříkována 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 mikrokorozivních 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 Literatura pro dizertační práci

- Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 1997;25:916-26.
- Aharinejad SH, Lametschwandtner A. *Microvascular Corrosion Casts in Scanning Electron Microscopy.* Wien: Springer, 1992; s.12-39(a), 111(b). ISBN 3-211-82377-8.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 3rd ed. Garland Publishing, New York: 1994; s. 981 (a), 1179 (b) ISBN 0-8153-1620-8.
- Acoltzin Vidal C, Maldonado Villaseñor I, Rodríguez Cisneros L, Muñiz Murguía JJ. Diminished vascular density in the aortic wall. Morphological and functional characteristics of atherosclerosis. *Arch Cardiol Mex.* 2004;74:176-80.
- Allaire E, Muscatelli-Groux B, Mandet C, Guinault AM, Bruneval P, Desgranges P, Clowes A, Mélière D, Becquemin JP. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg.* 2002; 36:1018-26.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990;61:1303-13.
- Ashton HA, Buxton MJ, Day NE, Kim LG, Marteau TM, Scott RA, Thompson SG, Walker NM. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360:1531-39.
- Badger SA, Jones C, Murray A, Lau LL, Young IS. Implications of attendance patterns in Northern Ireland for abdominal aortic aneurysm screening. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;42:434-9.
- Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel JB, Jacob MP. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An in situ study. *J Pathol.* 2001;193:398-407.
- Bartoli MA, Parodi FE, Chu J, Pagano MB, Mao D, Baxter BT, Buckley C, Ennis TL, Thompson RW. Localized administration of doxycycline suppresses aortic dilatation in an experimental mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg.* 2006;20:228-36.
- Barrett T, Kobayashi H, Brechbiel M, Choyke PL. Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis. *Eur J Radiol.* 2006;60:353-66.
- Bax DV, Mahalingam Y, Cain S, Mellody K, Freeman L, Younger K, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Couchman JR, Kielty CM. Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci.* 2007;120:1383-92.
- Baxter T, Worth J. Aneurysm or occlusive disease - factors determining the course of atherosclerosis of the distal aorta. In: Sakalihasan N, Kuvianiemi H, Michel JB. *Aortic aneurysms New insights into an old problem,* Les Éditions de l'Université de Liege, 2008;16:325.
- Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL. Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. *Cell Tissue Res.* 2002;307:303-13.
- 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.
- Boccardi C, Cecchetti A, Caselli A, Camici G, Evangelista M, Mercatanti A, Rainaldi G, Citti L. A proteomic approach to the investigation of early events involved in the activation of vascular smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* 2007; 329:119-2.

- Boucek RJ, Gunja-Smith Z, Noble NL, Simpson CF. Modulation by propranolol of the lysyl cross-links in aortic elastin and collagen of the aneurysm-prone turkey. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:275-80.
- Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci.* 1999; 14:121-125.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D: Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997; 17:439-444.
- Clarke JA(a). An x-Ray microscopic study of the vasa vasorum of the normal human ascending aorta. *Br Heart J.* 1965;27:99-104.
- Clarke JA(b). An x-ray microscopic study of the postnatal development of the vasa vasorum in the human aorta. *J Anat.* 1965;99:877-89.
- Conway AM, Malkawi AH, Hinchliffe RJ, Holt PJ, Murray S, Thompson MM, Loftus IM. First-year results of a national abdominal aortic aneurysm screening programme in a single centre. *Br J Surg.* 2012;99:73-7.
- Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2000;32:575-83.
- Čihák R. *Anatomie 3. 2. vydání.* Praha: Grada publishing, 2004, s. 554-5.
- 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.
- Darwood R, Earnshaw JJ, Turton G, Shaw E, Whyman M, Poskitt K, Rodd C, Heather B. Twenty-year review of abdominal aortic aneurysm screening in men in the county of Gloucestershire, United Kingdom. *J Vasc Surg.* 2012;56:8-13.
- Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1625-33.
- Davis VA, Persidskaia RN, Baca-Regen LM, Fiotti N, Halloran BG, Baxter BT. Cytokine pattern in aneurysmal and occlusive disease of the aorta. *J Surg Res.* 2001;101:152-6.
- Dawson J, Cockerill G, Choke E, Loftus I, Thompson MM. Circulating cytokines in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:324-6.
- 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.
- Defawe OD, Colige A, Lambert CA, Munaut C, Delvenne P, Lapière CM, Limet R, Nusgens BV, Sakalihasan N. TIMP-2 and PAI-1 mRNA levels are lower in aneurysmal as compared to athero-occlusive abdominal aortas. *Cardiovasc Res.* 2003;60:205-13.
- De Paepe A, Malfait F. Bleeding and bruising in patients with Ehlers-Danlos syndrome and other collagen vascular disorders. *Br J Haematol.* 2004;127:491-500.
- Delbaldo C, Raymond E, Vera K, Hammershaimb L, Kaucic K, Lozahic S, Marty M, Faivre S. Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2008;26:35-43.
- Dingemans K. P., Teeling P., Lagendijk J. H., Becker A. E. Extracellular Matrix of the Human Aortic media: An Ultrastructural Histochemical and Immunohistochemical Study of the Adult Aorti Media *The Anatomical Record.* 2000;258:1-14.
- Dobrin PB, Mrkvicka R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg.* 1994;2:484-8.
- Earnshaw JJ. Triumphs and tribulations in a new national screening programme for abdominal aortic aneurysm. *Acta Chir Belg.* 2012;112:108-10.
- Eberlová L, Tonar Z, Krížková V, Kocová J, Korabecná M, Treska V, Moláček J, Houdek K, Boudová L, Topolcan 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.
- 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.
- Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflugers Arch.* 2009;457:963-77.
- Eickhoff JH. Incidence of diagnosis, operation and death from abdominal aortic aneurysms in Danish hospitals: results from a nation-wide survey, 1977-1990. *Eur J Surg.* 1993;159:619-23.
- Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest.* 1999;103:1227-30.
- Elmore JR, Keister BF, Franklin DP, Youkey JR, Carey DJ. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1998;12:221-8.
- Elleder M. Vybrané kapitoly z patologie buňky II. Praha: Karolinum, 1999, s. 8-16.
- Estrada-Gutierrez G, Cappello RE, Mishra N, Romero R, Strauss JF 3rd, Walsh SW. Increased expression of matrix metalloproteinase-1 in systemic vessels of preeclamptic women: a critical mediator of vascular dysfunction. *Am J Pathol.* 2011;178:451-60.
- Erdozain OJ, Pegrum S, Winrow VR, Horrocks M, Stevens CR. Hypoxia in abdominal aortic aneurysm supports a role for HIF-1 α and Ets-1 as drivers of matrix metalloproteinase upregulation in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2011;48:163-70.
- Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med.* 2008;12:22-37.
- Faggioli GL, Stella A, Gargiulo M, Tarantini S, D'Addato M, Ricotta JJ. Morphology of small aneurysms: definition and impact on risk of rupture. Morphology of small aneurysms: definition and impact on risk of rupture. *Am J Surg.* 1994;168:131-5.
- Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, Walker PJ, Dear A, Buckenham T, Norman P, Golledge J. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J.* 2010;159:307-13.
- Filip S, Mokřý J, Hruška I. Kmenové buňky. 1. vydání. Praha: Galén, 2006.
- Filipovic M, Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D, Duncan ME, Cook-Mozaffari P. Trends in mortality and hospital admission rates for abdominal aortic aneurysm in England and Wales. 1979-1999. *Br J Surg.* 2005;92:968-75.
- Fleming C, Whitlock EP, Beil TL, Lederle FA. Screening for abdominal aortic aneurysm: a best-evidence systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2005;142:203-11.
- Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS.* 1997;79:1-8.
- Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002;161:1701-10.
- Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, Jääskeläinen J. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke.* 2004;35:2287-93.
- Freeman LJ, Lomas A, Hodson N, Sherratt MJ, Mellody KT, Weiss AS, Shuttleworth A, Kielty. Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. *Biochem J.* 2005;388:1-5.
- Golledge J, Norman PE. Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2011;217:57-63.
- Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010;339:247-57.
- 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.

- Grabenwöger M, et al. Endothelialization of biosynthetic vascular prostheses after laser perforation. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66: 110-114.
- 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.
- Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg.* 1996;131:85-8.
- Grigoryants V, Hannawa KK, Pearce CG, Sinha I, Roelofs KJ, Ailawadi G, Deatrck KB, Woodrum DT, Cho BS, Henke PK, Stanley JC, Eagleton MJ, Upchurch GR. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2005;41:108-14.
- Guaragnella N, Zdravlević M, Antonacci L, Passarella S, Marra E, Giannattasio S. The role of mitochondria in yeast programmed cell death. *Front Oncol.* 2012;2:70.
- Guessous I, Periard D, Lorenzetti D, Cornuz J, Ghali WA. The efficacy of pharmacotherapy for decreasing the expansion rate of abdominal aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2008;3:1895.
- Hadden HL, Henke CA. Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1553-60.
- 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.
- Han CI, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res.* 2001;38:113-9.
- Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg.* 2002;35:254-61.
- Harter LP, Gross BH, Callen PW, Barth RA. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. *J Ultrasound Med.* 1982;1:315-8.
- Hashizume R, Yamawaki-Ogata A, Ueda Y, Wagner WR, Narita Y. Mesenchymal stem cells attenuate angiotensin II-induced aortic aneurysm growth in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Surg.* 2011;54:1743-52.
- Heikkinen M, Salenius JP, Auvinen O. Ruptured abdominal aortic aneurysm in a well-defined geographic area. *J Vasc Surg.* 2002;36:291-6.
- Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittmore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999;99:96-104.
- Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg.* 1995;21:761-71.
- Holmes DR, Petrinc D, Wester W, Thompson RW, Reilly JM. Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat. *J Surg Res.* 1996;63:305-9.
- Houard X, Rouzet F, Touat Z, Philippe M, Dominguez M, Fontaine V, Sarda-Mantel L, Meulemans A, Le Guludec D, Meilhac O, Michel JB. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol.* 2007;212:208.
- Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2009;82:532-41.
- 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*

- 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.
- Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol.* 2006;75:93-123.
- Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res.* 1999;36:2-27.
- Chan-Park MB, Shen JY, Cao Y, Xiong Y, Liu Y, Rayatpisheh S, Kang GC, Greisler HP. Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels. *J Biomed Mater Res.* 2009;A 88:1104-21.
- Cheng SL, Shao JS, Halstead LR, Distelhorst K, Sierra O, Towler DA. Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ Res.* 2010;107:271-82.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:99-113.
- Choi YH, Burdick MD, Strieter RM. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:662-71.
- Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, Thompson MM. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:315-9.
- Choke E, Cockerill G, Wilson WR, Sayed S, Dawson J, Loftus I, Thompson MM. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;30:227-44.
- Christofferson RH, Nilson BO. Microvascular Corrosion Casting in Angiogenesis Research. In: Motta PM, Murakami T. *Scanning Electron Microscopy of Vascular casts: Methods and Applications.* USA: Kluwer Academic Publishers, 1992, s. 27-36.
- Ingber DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3579-83.
- Irizarry E, Newman KM, Gandhi RH, Nackman GB, Halpern V, Wishner S, Scholes JV, Tilson MD. Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res.* 1993;54:571-4.
- Isenburg JC, Simionescu DT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin stabilization for treatment of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2007;115:1729-37.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9:685-93.
- Jawien A. Screening of Abdominal aortic aneurysms. 25th World Congress of the International Union of Angiology. *Int Angiol.* 2012;31(3):129.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011;91:221-64.
- Junker JP, Kratz C, Tollbäck A, Kratz G. Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars. *Burn.* 2008;34:942-6.
- Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjälä H, Airaksinen J, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2843-7.
- Kachlík D, Hoch J. *The blood supply of the large intestine.* Praha: Karolinum Press, 2008, s. 67.
- Kachlík D, Lametschwandtner A, Rejmontová J, Stingl J, Vanek I. Vasa vasorum of the human great saphenous vein. *Surg Radiol Anat.* 2003;24:377-81.
- Karetova D. Pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysm. 25th World Congress of the International Union of Angiology. *Int Angiol.* 2012;31(3):93.
- Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development.* 2003;130:411-23.

- Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, Swedenborg J. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 2003;38:1283-92.
- Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican degradation and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16:209-15.
- Kielty CM. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8:1-23.
- Kierszenbaum LA, Tres LL. histology and cell biology. An introduction to Pathology. 3rd ed. Elsevier Saunders, Philadelphia: 2012; s. 116. ISBN 978-0-323-07842-9.
- Knox JB, Sukhova GK, Whittmore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 1997;95:205-12.
- Kobayashi N, Kostka G, Garbe JH, Keene DR, Bächinger HP, Hanisch FG, Markova D, Tsuda T, Timpl R, Chu ML, Sasaki T. A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J Biol Chem.* 2007;282:11805-16.
- Kocova J. Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels. *Fol Morphol.* 1970;18:293-295.
- Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosевич JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immunemediated response. *Am J Pathol.* 1990;137:1199-213.
- Kochová P, Tonar Z, Matějka VM, Švíglerová J, Štengl M, Kuncová J. Aorta Remodelling Associated with Calcitonin Gene Related Peptide Concentration in Rats with Arterial Hypertension. *Acta Vet Brno.* 2009;78:595-602
- Krajíček M. Břišní aorta a pánevní tepny. In Krajíček M, Peregrin JH, Roček M, Šebesta P et al. *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění.* Praha: Grada Publishing, 2007. s. 186.
- Kříková V, Korabecná M, Kocová J, Treska V, Moláček J, Tonar Z, Tolinger P, Nedorost L. Quantification of plasminogen activator inhibitor type 1 in the aortic wall. *Int Angiol.* 2009;28:44-9.
- Kubínová L, Janáček J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. *Microsc Res Tech.* 2001;53:425-35.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol.* 1995;26:450-6.
- Kumar V, Abbas A, Fausto F. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. 7th ed. Elsevier Saunders, China: 2005, s. 103. ISBN 0-8089-2302-1.
- 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.
- Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR Jr, Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998;101:1551-6.
- Lametschwandtner A, Minnich B, Kachlik 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.
- Lamont P. Screening for abdominal aortic aneurysm: headline is misleading. *BMJ.* 2005;330:601.
- Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ. Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochem Cell Biol.* 2004;122:7-15.
- Lapierre CM, Courtois A, Nussgens BV. Extracellular matrix proteins in normal and aneurysmal aorta. In: Sakalihasan N, Kuvaniemi H, Michel JB. *Aortic aneurysms: New insights into an old problem.* Les Éditions de l'Université de Liege, 2008, s.67-83.

- Lawrence DM, Singh RS, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Rapamycin suppresses experimental aortic aneurysm growth. *J Vasc Surg.* 2004;40:334-8.
- Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med.* 2008;358:2649-51.
- 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.
- Lederle FA. The strange relationship between diabetes and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;43:254-6.
- Lederle FA. Ultrasonographic screening for abdominal aortic aneurysms. *Ann Intern Med.* 2003;139:516-22.
- Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.* 1998;393:276-80.
- Liao S, Miralles M, Kelley BJ, Curci JA, Borhani M, Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg.* 2001;33:1057-64.
- Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 324-333.
- Lindholt JS. Activators of plasminogen and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:139-50.
- Lindholt JS, Jørgensen B, Fasting H, Henneberg EW. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. *J Vasc Surg.* 2001;34:611-5.
- Lindholt JS, Juul S, Fasting H, Henneberg EW. Hospital costs and benefits of screening for abdominal aortic aneurysms. Results from a randomised population screening trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;23:55-60.
- 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.
- López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 1997;150:993-1007.
- Lowenberg RI, Shumacker HB Jr. Experimental studies in vascular repair; morphologic observations of normal vasa vasorum. *Yale J Biol Med.* 1948;20:395-401.
- Mao D, Lee JK, VanVickle SJ, Thompson RW. Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261:904-10.
- Mastracci TM, Cinà CS; Canadian Society for Vascular Surgery. Screening for abdominal aortic aneurysm in Canada: review and position statement of the Canadian Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2007;45:1268-1276.
- Merrilees MJ, Campbell JH, Spanidis E, Campbell GR. Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis.* 1990;81:245-54.
- Michel JB, Martin-Ventura JL, Egado 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.
- Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2146-54.
- Mokry J, Ehrmann J, Karbanová J, Cízková D, Soukup T, Suchánek J, Filip S, Kolár Z. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2008;51:173-9.

- Moláček J, Treska V, Kobr J, Certík B, Skalický T, Kuntscher V, Krížková V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm--experiment in an animal model. *J Vasc Res.* 2009;46:1-5.
- Montet X, Pastor CM, Vallée JP, Becker CD, Geissbuhler A, Morel DR, Meda P. Improved visualization of vessels and hepatic tumors by micro-computed tomography (CT) using iodinated liposomes. *Invest Radiol.* 2007;42:652-8.
- Montet X, Rajopadhye M, Weissleder R. An albumin-activated far-red fluorochrome for in vivo imaging. *ChemMedChem.* 2006;1:66-9.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2004;110:2032-8.
- Mosorin M, Niemelä E, Heikkinen J, Lahtinen J, Tiozzo V, Satta J, Juvonen T, Biancari F. The use of statins and fate of small abdominal aortic aneurysms. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2008;7:578-81.
- Mulligan-Kehoe MJ. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H295-305.
- Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;20:33-43.
- Nakata Y, Shionoya S, Tamura J, Hirabayashi N. Vasa vasorum and vascular lesions in the human abdominal aorta. *Vasa.* 1977;6:255-8.
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407-11.
- Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect Tissue Res.* 2007;48:125-31.
- Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM, Le MT, Spencer CA, Tuohy RJ, Parsons RW, Dickinson JA. Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *BMJ.* 2004;329:1259.
- Ortiz-Muñoz G, Houard X, Martín-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, Moreno JA, Kane JP, Chalkley RJ, Burlingame AL, Michel JB, Meilhac O. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J.* 2009;23:3129-39.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
- Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell.* 1995;87:1069-78.
- Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp Mol Med.* 2004;36:524-33.
- Palombo D, Lucertini G, Pane B, Mazzei R, Spinella G, Brascesco PC. District-based abdominal aortic aneurysm screening in population aged 65 years and older. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2010;51:777-82.
- Patel MI, Melrose J, Ghosh P, Appleberg M. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1996;24:82-92.
- Pelouch V, Matouš B. Biochemie extracelulární matrix (ECM), adhezní molekuly, intercelulární spojení. In: Matouš B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2010, s.423-4.
- Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol.* 2003;22:101-7.
- Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, Eckstein HH. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology.* 2009;76:243-52.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-4.

- Rizas KD, Ippagunta N, Tilson MD 3rd. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev.* 2009;17:201-10.
- Ritman EL, Lerman A. The dynamic vasa vasorum. *Cardiovasc Res.* 2007;75:649-58.
- Rohde LE, Arroyo LH, Rifai N, Creager MA, Libby P, Ridker PM, Lee RT. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1695-9.
- Sakalihan N, Heyeres A, Nusgens BV, Limet R, Lapière CM. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7:633-7.
- Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res.* 2001 Dec 7;89:1111-21.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* 2004;10:55-63.
- Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997;25:909-15.
- Scotland RS, Vallance PJ, Ahluwalia A. Endogenous factors involved in regulation of tone of arterial vasa vasorum: implications for conduit vessel physiology. *Cardiovasc Res.* 2000;46:403-11.
- Scott RA, Bridgewater SG, Ashton HA. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg.* 2002;89:283-5.
- Scott RA, Wilson NM, Ashton HA, Kay DN. Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: 5-year results of a randomized controlled study. *Br J Surg.* 1995;82:1066-70.
- Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell.* 2003;114:171-80.
- Sharma AK, Lu G, Jester A, Johnston WF, Zhao Y, Hajzus VA, Saadatzadeh MR, Su G, Bhamidipati CM, Mehta GS, Kron IL, Laubach VE, Murphy MP, Ailawadi G, Upchurch GR Jr. Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation.* 2012;126:S38-45.
- Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;94:1655-64.
- Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis.* 2009;202:34-40.
- Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods.* 2010;50:2-13.
- Schlösser FJ, Tangelder MJ, Verhagen HJ, van der Heijden GJ, Muhs BE, van der Graaf Y, Moll FL; SMART study group. Growth predictors and prognosis of small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2008;47:1127-33.
- Schoen JF. Blood Vessels. In: Kumar V, Abbas A, Nalson F. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 7. vydání. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. s. 520-521.
- Schouten O, van Laanen JH, Boersma E, Vidakovic R, Feringa HH, Dunkelgrün M, Bax JJ, Koning J, van Urk H, Poldermans D. Statins are associated with a reduced infrarenal abdominal aortic aneurysm growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;32:21-6.
- Smith KD, Vaughan-Thomas A, Spiller DG, Innes JF, Clegg PD, Comerford EJ. The organisation of elastin and fibrillins 1 and 2 in the cruciate ligament complex. *J Anat.* 2011;218:600-7.
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78:539-52.

- Stary HC. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. An Update. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1177-8.
- Stather PW, Dattani N, Bown MJ, Earnshaw JJ, Lees TA. International Variations in AAA Screening. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;45:231-4.
- Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle-Chavez SJ, Mao D, Goeddel LA, Hawkins CJ, Thompson RW. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg.* 2005;241:92-101.
- Sun J, Zhang J, Lindholt JS, Sukhova GK, Liu J, He A, Abrink M, Pejler G, Stevens RL, Thompson RW, Ennis TL, Gurish MF, Libby P, Shi GP. Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2009;119:973-82.
- Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 2010;58:721-30.
- Svensjö S, Björck M, Gürtelschmid M, Djavan G, Gidlund K, 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.
- Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Greenhalgh RM, Powell JT. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2010;52:1-4.
- Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT; RESCAN collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 2012;99:655-65.
- Šebesta P. Břišní aorta a pánevní tepny. In: Krajíček M, et al. *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění.* Praha: Grada Publishing, 2007, s.192.
- Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 1997;122:264-71.
- Tambiah J, Franklin IJ, Trendell-Smith N, Peston D, Powell JT. Provocation of experimental aortic inflammation and dilatation by inflammatory mediators and *Chlamydia pneumoniae*. *Br J Surg.* 2001;88:935-40.
- Theocharis AD, Karamanos NK. Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2002;165:221-30.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2010;277:3904-23.
- Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 1995;96:318-26.
- Thompson MM, Jones L, Nasim A, Sayers RD, Bell PR. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;11:464-9.
- Tonar Z. Atlas kvantitativní histologie, příručka pro studenty. 2008. Dostupné na World Wide Web: <http://www.ellipse.sk/Doc/atlas_kvantit_histologie_lowres.pdf>.
- 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.
- Tonar Z, Janáček J, Poledne R. Kvantitativní popis aterosklerotických lézí na úrovni optické mikroskopie. *Cor Vasa.* 2007; 49: 95-101.
- Tonar Z, Němeček S, Holota R. Microscopic image analysis of elastin and morphometry of wall of thoracic nad abdominal porcine aorta. *IFMBE Proc.* 2005(a):1474-1479.

- Tonar Z, Němeček S, Mužík T. Morphology of elastin network in porcine aorta. - In: Chraponski J, Cwajna J, Wojnar L (wds): Proceedings of 9th European Congress on Stereology and Image Analysis and 7th STERMAT International Conference on Stereology and Image Analysis in Materials Science. 2005(b):Vol. II, pp. 368-375.
- Tonar Z. Kvantifikace v deskriptivním a experimentálním studiu funkční morfologie cévní stěny. Dizertační práce. LF UK v Plzni 2007, 156 pp.
- Tonar Z, Kochová P, Králíčková A, Eberlová L, Gregor T, Janáček J: Quantitative micro-CT of microvascular corrosion casts. - In: Lechnerová R., Beneš V. (Eds.): Book of abstracts S4G, 7th International Conference on Stereology. Spatial Statistics and Stochastic Geometry. Prague: MatfyzPress, 2012, s.140-141.
- Tonar Z, Witter K, Křížková 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.
- Třeška V. Aneuryzma břišní aorty. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 1999, s.15
- Treska V, Kocova J, Boudova L, Neprasova P, Topolcan 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.
- Treska V, Moláček J, Certík B, Kuntscher V, Ferda J. An inflammatory aneurysm of the abdominal aorta. Rozhl Chir. 2005;84:112-6.
- Treska V, Topolcan O, Kocová J, Pecen L, Tonar Z. Type I and III procollagen in patients with abdominal aorta aneurysms. Cas Lek Cesk. 1999;1;138:142-6.
- Treska V, Topolcan O, Pecen L. Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm. Clin Chem Lab Med. 2000;38:1161-4.
- Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, Nakamura K, Nakamura-Uchiyama F, Matsushima Y, Imamura T, Onitsuka T, Asada Y, Nawa Y, Eto T, Kitamura K. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. Circ Res. 2008;102:1368-77.
- Uemura Y, Okamoto K. Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. Biochem Mol Biol Int. 1997;41:1085-92.
- Verrecchia F, Mauviel A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. Cell Signal. 2004;16:873-80.
- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Role of selectins and fibrinolysis in VTE. Thromb Res. 2009;4:S35-40.
- Wang YX, Martin-McNulty B, da Cunha V, Vincelette J, Lu X, Feng Q, Halks-Miller M, Mahmoudi M, Schroeder M, Subramanyam B, Tseng JL, Deng GD, Schirm S, Johns A, Kauser K, Dole WP, Light DR. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting apoptosis and proteolysis. Circulation. 2005;111:2219-26.
- Wanhainen A, Lundgren E, Bergqvist D, Björck M. Abdominal aortic aneurysm screening starts now. First out with the invitation of all 65-year old men is the county of Uppsala. Lakartidningen. 2006;11;103:2038-9.
- West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. Science. 1985;228:1324-6.
- Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. Arteriosclerosis. 1989;9:1-20.
- Witter K, Tonar Z, Matejka VM, Martinca T, Jonák M, Rokosný S, Pirk J. Tissue reaction to three different types of tissue glues in an experimental aorta dissection model: a quantitative approach. Histochem Cell Biol. 2010;133:241-59.
- 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.

- Wolinsky H, Glagov S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res.* 1967;20:409-21.
- Wolinsky H., Glagov S. Structural Basis for the Static mechanical Properties of the Aortic Media. *Circ. Res.* 1964;14:400-413.
- Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res.* 2005;15:483-94.
- Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature.* 2002;415:168-71.
- Yao LY, Moody C, Schönherr E, Wight TN, Sandell LJ. Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol.* 1994;14:213-25.
- Zagorchev L, Mulligan-Kehoe MJ. Molecular imaging of vessels in mouse models of disease. *Eur J Radiol.* 2009;70:305-11.
- Zagorchev L, Oses P, Zhuang ZW, Moodie K, Mulligan-Kehoe MJ, Simons M, Couffinhal T. Micro computed tomography for vascular exploration. *J Angiogenes Res.* 2010;2:7.
- Zamir M. On fractal properties of arterial trees. *J Theor Biol.* 1999;197:517-26.
- Zhang Y, Cliff WJ, Schoebl GI, Higgins G. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1993;143:164-72.
- Zhou B, Margariti A, Zeng L, Habi O, Xiao Q, Martin D, Wang G, Hu Y, Wang X, Xu Q. Splicing of histone deacetylase 7 modulates smooth muscle cell proliferation and neointima formation through nuclear β -catenin translocation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2676-84.

9 Publikované práce

9.1 Seznam publikovaných prací

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, 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. 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.

9.2 Kopie vybraných publikovaných prací

Errata

Strana	Řádek	Chybně	Správně
--------	-------	--------	---------

