

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
ÚSTAV HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE



Kvantifikace v deskriptivním a experimentálním studiu funkční morfologie cévní stěny

Quantification in descriptive and
experimental study of functional
morphology of vascular wall

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar

Plzeň 2007

Dizertační práce byla vypracována na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni v rámci prezenční formy studia doktorského studijního programu v oboru všeobecné lékařství, specializace anatomie, histologie a embryologie.

Uchazeč: MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar
odborný asistent Ústavu histologie a embryologie
Karlovarská 48
301 66 Plzeň

Školitel: Doc. MUDr. Jitka Kočová, CSc.
Ústav histologie a embryologie
Karlovarská 48
301 66 Plzeň

Školitel specialista: Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.
Laboratoř pro výzkum aterosklerózy
Institut klinické a experimentální medicíny
Václavská 1958/9
140 21 Praha 4

Oponenti: Doc. MUDr. Petr Hach, CSc.
Prof. Ing. Jiří Křen, CSc.
Prof. MUDr. Ivan Míšek, CSc.

Datum odevzdání práce: 10. 4. 2007

Autoreferát byl rozeslán dne: 2007

Předseda oborové rady pro doktorský studijní program v oboru anatomie, histologie a embryologie: Doc. MUDr. Jitka Kočová, CSc.
vedoucí Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni

Stanovisko k dizertační práci vypracovala vedoucí Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni.

Obhajoba dizertační práce se koná dne v hodin před komisí pro obhajoby dizertačních prací v oboru anatomie, histologie a embryologie.

S dizertační prací je možné se seznámit na Oddělení pro vědu a vzdělání děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, 306 05 Plzeň.

1 Přehled problematiky a cíle práce

1.1 Historie kvantifikace v mikroskopii a přehled literatury

1.1.1 Základní východiska stereologie

Historický vývoj kvantitativních metod v mikroskopických oborech se z velké části kryje s vývojem stereologie [1, 17]. Tento termín vychází z řeckého στερεός („tuhý, pevný, prostorový“). Přestože jako obor se v mezinárodní komunitě biologů, geologů a pracovníků v analýze materiálů etabluje od počátku 60. let 20. století, její kořeny sahají hlouběji.

Stereologie vychází z geometrie, jejíž poznatky aplikuje na analýzu vzorků rozmanitého původu, velikosti a vnitřní struktury. Zabývá se statistickým odvozováním geometrických vlastností hodnocených struktur a objektů z aplikace testovacích sond na orientované řezy vzorkem. Jedním ze základních problémů, které motivovaly rozvoj stereologie, byly diskuze nad možnostmi kvantitativního hodnocení trojrozměrných (3-D) objektů na základě studia jejich dvojrozměrných (2-D) řezů či výbrusů. Přestože záběr moderní stereologie je v současnosti širší a pochopení jejího teoretického zázemí vyžaduje vhléd do některých oblastí matematiky, zůstává jedním z nezbytných nástrojů v interpretaci informací obsažených v sériích fyzických či optických řezů pořízených různými mikroskopickými technikami.

Šedesátá léta 20. století jsou považována za první dekádu moderní historie stereologie. Při lepší dostupnosti kvalitní a korigované optiky, s rozvojem imunocytochemie a elektronové mikroskopie rostl význam kvantitativního hodnocení popisovaných mikrostruktur. V roce 1961 byla založena International Society for Stereology (ISS). Své aplikace si rychle nacházely již v minulosti popsané postupy:

- Bonaventura Cavalieri, student Galilea Galileiho, formuloval r. 1637 postup umožňující dostatečně přesný odhad středního objemu těles pomocí součtu ploch, která tělesa zaujímají na sérii ekvidistantních řezů. Cavalieriho princip říká, že mají-li dvě tělesa stejnou základnu a stejný profil na řezech paralelních se základnami v téže výšce u obou těles, pak je objem těchto těles totožný (dále viz oddíl 2.2.1, str. 8).
- Hrabě George-Louis Leclerc Buffon popsal r. 1733 tzv. problém „Buffonovy jehly“, v němž popisoval vztah mezi pravděpodobností vzniku průsečíku náhodně hozené jehly (hůlky) se systémem paralelních ekvidistantních spár v podlaze, na niž jehly dopadly, délkou jehel (hůlek) a rozestupem spár. V modifikované podobě [25] je princip užíván k odhadu plochy a délky objektů (dále viz oddíl 2.2.2, str. 8).
- Geolog Achille Delesse v r. 1847 popsal empirickou techniku pro odhad objemových frakcí minerálů v hornině na základě plošných podílů těchto minerálů na výbrusu horninou (dále viz oddíl 2.2.1, str. 8). V r. 1898 byl Delesseho přístup doplněn rovněž empirickým Rosiwalovým pravidlem usnadňujícím odhad plošných podílů pomocí praktičtějších podílů délkových.

1.1.2 „Unbiased stereology“

V 70. letech 20. století přibývá stereologických prací v Journal of Microscopy a Acta Stereologica (nyní Image Analysis & Stereology). S přispěním matematiků se ukazuje, že řada kvantitativních studií v biologii obsahuje nepodložené a obtížně ověřitelné předpoklady o tvarech hodnocených objektů, resp. že se tyto předpoklady často neshodují se skutečností. Strategie oprav těchto předpokladů různými korekčními faktory je postupně opouštěna a nahrazována teoreticky podloženější stochastickou geometrií a implementací teorie pravděpodobnosti do popisu biologických objektů. Stereologické postupy postavené na tomto novém základě a využívající nevychýlené vzorkování (unbiased sampling) dávají vznik škálově univerzálnějším

kvantifikačním technikám nezátíženým *a priori* předpoklady o povaze studovaného materiálu (assumption-free, model-free unbiased methods). Tento přístup je souborně v literatuře označován jako „unbiased stereology“. Termínem „stereologický bias“ je označována odchylka výsledků od skutečné hodnoty vzniklá vlivem systematické chyby. Metody „unbiased stereology“ se vyznačují tím, že nárůstem počtu hodnocených vzorků ve studii klesá rozptyl výsledků kolem centrální tendence, která není od „skutečné, pravdivé“ hodnoty na rozdíl od „unbiased“ metod vychýlena (toto tvrzení se vztahuje jen na bias stereologický, nikoliv např. na chybnou volbu metody a zpracování vzorků, vliv artefaktů).

V 80. letech 20. století je řešena jedna ze základních otázek stereologie – problém spolehlivého a univerzálního počítání trojrozměrných objektů z dvojrozměrných řezů. Jak formuloval S. D. Wicksell v r. 1925 [26], počet profilů v jednotce plochy histologického řezu neodpovídá počtu reálných trojrozměrných objektů v objemu tkáně. Tato teze je známa pod pojmem „the corpuscle problem“. Podstatou problému je skutečnost, že různé objekty mají v závislosti na svém tvaru, velikosti a orientaci odlišnou pravděpodobnost výskytu v rovině řezu – konkrétně velké objekty komplexního tvaru a s dlouhou osou směřující kolmo na rovinu řezu mají vyšší pravděpodobnost, že budou ve 2-D hodnocení zachyceny a započítány, nežli odpovídá jejich skutečnému podílu na celkovém počtu objektů v 3-D vzorku. Snahy řešit tento rozpor matematickými faktory korigujícími heterogenitu rozměrů, orientace a asféricitu objektů však opět vnášely do metodiky obtížně ověřitelné modelové předpoklady a byly tak potenciálně zdrojem systematické chyby [16]. Kritický rozbor hojně používané Abercrombieho metody a dalších empirických postupů přináší [9]. Za situace, kdy síla histologických řezů není vzhledem k rozměrům hodnocených částic zcela zanedbatelná, se navíc uplatňuje projekce hlubších částí netransparentních měřených objektů do pozorované roviny a nadhodnocení maximálních rozměrů profilů částic (tj. síla řezu ovlivňuje pozorované rozměry objektů, tzv. Holmesův efekt). Nejen z těchto důvodů je ve stereologii zvykem terminologicky rozlišovat částečně transparentní a trojrozměrný histologický řez určité síly (slab, slice) a idealizovanou dvojrozměrnou projekci struktur do roviny řezu (section).

Řešení problému, které je anglicky publikováno v r. 1984 jako princip disektoru [23], je první robustní, modelovými předpoklady a korekčními faktory nezátíženou metodou pro odhad počtu objektů v objemové jednotce tkáně. Princip je i s potřebným aparátem popsán v oddílu 2.2.5 (str. 9). V roce 1985 je publikována technika jiné stereologické objemové sondy, tzv. „unbiased brick“ [11], která slouží ke stejnému účelu jako disektor, ovšem postupuje podle odlišných pravidel, která jsou 3-D rozšířením 2-D nevyčýleného hodnotícího rámečku (unbiased counting frame) (2.2.4, str. 9) publikovaného již dříve [3]. Kombinace disektoru se systematickým vzorkováním přinesla techniku frakcionátoru (fractionator) [4] k odhadu celkového počtu mikroskopických objektů v makroanatomických vzorcích nezávisle na objemových změnách způsobených fixací a zaléváním do médií pro krájení. K dalším technikám zavedeným v tomto období patří odhad velikosti částic aplikací sondy zvané nukleátor (nucleator) na izotropní či vertikální uniformní řezy a odhad objemově váženého středního objemu objektů [6]. Zkušenost ukázala, že je zapotřebí respektovat minimální součet dimenzí (D) testovaných objektů (bodů, linií, ploch, těles) a použitých stereologických sond tak, aby byl větší nebo roven třem: ke kvantifikaci objemů (3-D) se tak používá bodová testovací síť (0-D), ke kvantifikaci povrchů (2-D) lineární testovací systém (1-D), odhad délek (1-D) se provádí pomocí systému rovin (2-D) a odhad počtu objektů (0-D) s využitím objemových testovacích systémů (3-D).

1.1.3 Variabilita výsledků a optimalizace biologických studií

U novějších stereologických metod se již nevyskytovala ta část variability výsledků, která by byla způsobená různou mírou plnění modelových předpokladů o povaze analyzovaných tkání, protože výše prezentované metody tyto předpoklady již neobsahovaly. Tím se otevřela cesta k podrobnějšímu studiu variability dat [5, 8] a ukázalo se, že variabilitu dat (posuzovanou např. pomocí variačního koeficientu, CV) lze rozdělit na složky rozdílného původu:

Biologická variabilita zahrnuje rozdíly interindividuální (mezi zkoumanými jedinci), jež mohou být způsobeny kombinací evolučních faktorů, genotypu, vlivu prostředí apod., a obvykle představuje hlavní zdroj variability dat v biologických studiích. S rostoucím počtem jedinců zkoumaných v dané populaci její vliv klesá.

Variabilita způsobená výběrem vzorků pocházejících z téhož individua (intraindividuální, sampling error) se vyjadřuje pomocí koeficientu chyby výběru (CE). Lze ji redukovat navýšením počtu tkáňových bločků či řezů vybraných k analýze, což je zpravidla ekonomičtější nežli navyšovat počet jedinců ve studii a snižovat tak variabilitu biologickou.

Samostatné posouzení těchto dvou složek umožňuje optimalizovat design studie a zvyšovat její efektivitu. Na otázku „jaký je optimální počet zkoumaných jedinců a histologických řezů potřebný pro spolehlivou stereologickou kvantifikaci daného parametru?“ lze pak odpovědět: „takový, jehož způsob výběru (jedinců, řezů) nejefektivněji snižuje celkovou variabilitu výsledných dat vztáženou na čas a náklady spotřebované na analýzu“.

V praxi se osvědčuje např. tento postup: objem vzorku obsahující kvantifikované objekty je zpracován do cca 10 systematických náhodných řezů, je provedena kvantifikace a tento proces se zopakuje na 2–3 jedincích pro každou z porovnávaných skupin. Pilotní výsledky umožňují odhadnout příspěvek biologické variability a variability způsobené vzorkováním. Po nalezení takové hodnoty CE, kdy další zpřesňování výběru již nevede k významnému poklesu variability, je vhodné navýšit počet hodnocených jedinců ve studii (obvykle 5 až 10 v každé skupině) a hledat odpověď např. na otázku, zda mezi porovnávanými skupinami je kvantitativní rozdíl v daném mikroskopickém parametru (např. počet buněk v orgánu etc). Popsaný přístup bývá označován též jako „Do more, less well“ [7].

Od devadesátých let do současnosti popularita stereologie i počet jejích aplikací v biologickém výzkumu stoupá a s ní i dostupnost kurzů pořádaných např. Society For Neurosciences, International Brain Research Organization, International Society for Stereology, European Molecular Biology Organization aj. Nárůst stereologických publikací v recenzovaných časopisech od 60. let do konce 20. století je přibližně exponenciální. Zvyšuje se dostupnost software i hardware pro stereologii (motorizovaný XY- i Z-posuv, digitální snímání obrazu, konfokální mikroskopie). Další literární zdroje jsou pak citovány u konkrétních sdělení předkládaných v této dizertační práci [29]–[45].

1.2 Přehled otázek a hypotéz dizertační práce

Cílem publikací obsažených v předkládané dizertační práci bylo odpovědět na následující otázky a testovat dále uvedené hypotézy.

1.2.1 Metody kvantitativního popisu cévní stěny

1. Jak závisí aplikovatelnost, reprodukovatelnost, variabilita výsledků a možná míra automatizace metod obrazové analýzy a stereologie na strategii a technice histologického zpracování tkáňových bločků [29]?

1.2.2 Studium aterogeneze a jejích komplikací

2. Které z morfometrických postupů jsou aplikovatelné jako zpřesnění histopatologické klasifikace aterosklerózy podle Stary a American Heart Association [20, 21, 22] se zaměřením na posouzení vulnerability aterosklerotických lézí [29]?
3. Existují rozdíly v histologickém nálezu u vzorků cévní stěny symptomatického nebo rostoucího, resp. praskajícího aterosklerotického aneuryzmatu břišní aorty (AAA) člověka [30, 31, 32]? Souvisí histologický nálezn s cytoplazmatickými hodnotami zánětlivých cytokinů a metabolismem kolagenu typu III?
4. Jak se liší objemová frakce hladkých svalových buněk, elastinu a kolagenu v tunica media normální subrenální aorty a aneuryzmatu břišní aorty člověka? Je Fourierova transformace (FFT) mikrofotografií pořízených při standardizovaném zvětšení nástrojem umožňujícím odlišení morfologie elastinu ve stěně aorty normální, postižené aterosklerotickými lézemi a postižené rozvojem aneuryzmatu [33]?
5. Je heterotopická transplantace srdce u apolipoprotein E-deficientní (apoE-KO) myši vhodným modelem pro studium regrese aterosklerózy aortálního sinu a koronárních arterií [34]?
6. Jaká je závislost rozsahu aterosklerotického poškození hrudní descendentní aorty apoE-KO myši na délce podávání cholesterolem obohacené diety [35]?
7. Je syngenní heterotopická transplantace aorty u juvenilní apolipoprotein E-deficientní myši vhodným modelem pro studium regrese aterosklerotických lézí [36, 37]?

1.2.3 Morfometrie a 3-D rekonstrukce v biomechanice cévní stěny

8. Je FFT vhodnou metodou k popisu rozdílu morfologie elastinové sítě v hrudních a břišních segmentech téže aorty u prasete? Existují rozdíly mezi morfologií elastinu ventrální a dorzální stěny aorty prasete, které lze detekovat pomocí FFT? Je síla lamelární jednotky tvořené sendvičovitě uspořádanými komplexy elastin-kolagen-myocyt-elastin stejná v hrudní a břišní aortě těchto jedinců [38, 39]?
9. Jaká je objemová frakce hladkých svalových buněk, elastinu a kolagenu, jaká je síla stěny a úhel rozevření vlivem předpětí ve stěně hrudní a břišní aorty prasete a jak lze uplatnit tato data v modelování stěny elastických arterií [40, 41, 42]?
10. Jaký je vhodný přístup pro vazbu mezi modelem šíření vzruchové aktivity myokardem a konečněprvkovým modelem svaloviny srdečních komor s respektováním anizotropního uspořádání vrstev kardiomyocytů [43]?
11. Jak vhodným způsobem modelovat distribuci napětí cévní stěny a rychlostních profilů proudící kapaliny v závislosti na reálné geometrii modelu vakovitého aneuryzmatu břišní aorty s implementací interakce mezi stěnou a kapalinou? Je možné odhadnout vliv asymetrického intramurálního trombu na další vývoj aneuryzmatu [44, 45]?

2 Metody

2.1 Analýza obrazu

Pro přehled uvádíme vybrané nejčastější postupy spadající pod skupinu operací prováděných nad obrazem (image processing), kdy vstupem jsou vlastní obrazová data a výstupem je modifikovaný obraz nebo popis vlastností vstupního obrazu. Většina metod přistupuje

k obrazu jako ke dvojrozměrným datům, a to standardizovanými postupy analýzy digitálního signálu. Problémů, jimiž se analýza obrazu zabývá, je veliké množství, ať už se jedná o rozlišení, dynamický rozsah, šířku pásma a bitovou hloubku, filtrace, Fourierovu transformaci, aplikaci operátorů diferenciálního počtu, detekci hran, redukci šumu, konektivitu, geometrické transformace, úpravy barev a konverze mezi barevnými prostory, vzájemnou registraci (sesazování) více obrázků, logické operace mezi obrázky, segmentaci, retuš apod. Kromě statických 2-D obrázků lze ke zpracování obrazu řadit i jejich série pořízené v čase (např. time-lapse techniky) či v různých místech zkoumaného objektu (např. tomografie). Přehled i detailní informace o metodách lze čerpat např. z monografií [15, 18, 28].

2.1.1 Matematická morfologie

Při zpracování obrazu je častým úkolem segmentace, tj. odlišení oblastí či objektů našeho zájmu od námi definovaného pozadí. Takto segmentovaný či naprahaný obraz je možné např. pomocí masek binarizovat a dále zpracovávat jako obraz binární (tj. takový digitální obraz, jehož každý pixel má právě dvě možné hodnoty) pomocí metod matematické morfologie. Základní pojmy matematické morfologie jsou:

eroze – ubrání šířky objektu,

dilatace – přidání slupky objektu,

otevření – eroze následovaná dilatací, maže malé objekty a rozpojuje částice spojené tenkou šíjí,

zavření – dilatace následovaná erozí, vyhladí obrysy, zaplní malé trhliny, spojí blízké objekty,

homotropické transformace – na rozdíl od předchozích čtyř operací nemění spojitost objektů a děr; typickými příklady jsou operace skeletonizace, homotypické značkování a zesílení.

Eroze, dilatace, otevření a zavření jsou definovány typem matice (kernel, tj. strukturní element v bitmapě, s nímž operaci provádíme) a počtem iterací (tj. údajem, kolikrát za sebou bude operace provedena). Aplikování transformací matematické morfologie v analýze počítačových obrazů je omezeno diskrétním vzorkováním spojitého analogového signálu, k němuž dochází při snímání digitálního obrazu, a z toho vyplývajících vlastností obrazu jako je např. typ mřížky a konektivita pixelů, blíže viz [28].

2.2 Stereologie

Protože aplikace stereologických metod v cévní biologii jsou rozebrány i s příklady v přehledném článku [29], na tomto místě uvádíme pouze způsoby výpočtu jednotlivých kvantitativních parametrů. Ke studiu odvození některých vztahů a širších souvislostí lze doporučit monografie [10, 17, 19].

2.2.1 Odhady ploch a objemů bodovými testovacími mřížkami

Odhad plochy v rovině řezu pomocí bodové testovací sondy (mřížky), rovnice 1:

$$\text{est } A = a \cdot P, \quad (1)$$

kde *est A* je odhad plochy měřeného objektu, *a* je parametr použité testovací sítě (plocha příslušející jednomu testovacímu bodu) a *P* je počet průsečíků sítě s hodnoceným objektem.

Delesseho princip – plošný podíl A_A dává odhad objemového podílu V_V téže složky, rovnice 2:

$$est A_A = est V_V. \quad (2)$$

Rosiwalovo pravidlo – plošný podíl A_A je roven délkovému podílu L_L , rovnice 3:

$$est A_A = est L_L. \quad (3)$$

Výpočet odhadu objemu podle Cavalieriho principu, rovnice 4:

$$est V = T \cdot (A_1 + A_2 + \dots + A_m), \quad (4)$$

kde $est V$ je odhadnutý objem, T je vzdálenost mezi dvěma sousedními hodnocenými řezy, A_i je plocha odhadnutá u i -tého řezu při počtu m hodnocených řezů.

2.2.2 Odhad délek pomocí rovin ve 3-D a lineárními sondami ve 2-D

Délková hustota je vhodným vyjádřením délek biologických struktur ve známém objemu tkáně a lze ji vyjádřit jako $L_V(Y, ref)$ dle rovnice 5:

$$L_V(Y, ref) = \frac{L(Y)}{V(ref)}, \quad (5)$$

kde $L(Y)$ je délka objektů Y v referenčním prostoru o objemu $V(ref)$.

Dvojozměrným testovacím systémem použitelným k tomuto odhadu je množina izotropních systematických náhodných rovin (IUR, isotropic uniform random sections), které zachytí hodnocený objekt s pravděpodobností přímo úměrnou jeho délce. V systému těchto řezů odhadujeme délkovou hustotu dle rovnice 6:

$$est L_V = \frac{2}{S'_V} \cdot Q_A, \quad (6)$$

kde Q_A je počet profilů zachycených systémem rovin v objemu vymezeném těmito rovinami a S'_V je plošná hustota testovacích rovin.

Odhad délek lineárních struktur ve 2-D lze s výhodou provést pomocí modifikované Buffonovy metody, při níž je délka objektů odhadována z počtu průsečíků testovacího systému (linie či křivky) s hodnocenými vláknitými objekty. V rámci řezů pak lze vyjadřovat i délkovou hustotu hodnocených profilů v řezu (intensity of planar fibre process) L_A dle rovnice 7:

$$L_A = \frac{L}{A}, \quad (7)$$

kde L je odhad délky a A je referenční plocha řezu, v níž se dané lineární struktury vlákna vyskytují a v níž odhad provádíme.

2.2.3 Odhady povrchu a povrchové hustoty

Povrchová hustota je často užívaným kvantitativním parametrem ploch v objemovém elementu vzorku a je definována podle rovnice 8:

$$S_V(Y, ref) = \frac{S(Y)}{V(ref)}, \quad (8)$$

kde $S_V(Y, ref)$ je povrchová hustota plochy povrchu $S(Y)$ v referenčním objemu $V(ref)$.

Odhad povrchové hustoty vyžaduje aplikaci lineárních sond na izotropní uniformní náhodně orientované (IUR) nebo vertikální uniformní (VUR) řezy, kdy výsledek získáme dle rovnice 9:

$$\text{est } S_V = 2I_L, \quad (9)$$

kde I_L je počet průsečíků povrchu s lineární testovací sondou.

Při použití většího počtu obrázků k odhadu povrchové hustoty počítáme tento parametr dle rovnice 10:

$$\text{est } S_V(Y, ref) = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n I_i}{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}, \quad (10)$$

kde $S_V(Y, ref)$ je povrchová hustota povrchu $S(Y)$ v referenčním objemu $V(ref)$, I_i je počet průsečíků povrchu se sondou pro obrázek s indexem i , P_i je počet bodů pomocné bodové mřížky zasahujících referenční prostor obrázku s indexem i a l/p je délka l testovací linie připadající na bod p pomocné mřížky.

Předpokladem pro tento odhad povrchu je náhodnost orientace řezů, tj. testovací linie prokládané vzorkem musí být izotropní IUR či VUR řezy. Z praktických důvodů je často vhodnější namísto zcela izotropních řezů připravovat VUR řezy, které však již nejsou izotropní ve 3-D, ale jen v horizontální rovině. Izotropii zajistíme v arbitrárně zvolené horizontální rovině rotací kolem zvolené vertikální osy o náhodný úhel ϕ . Horizontální rovinu si u dané série vzorků sami volíme a termíny „horizontální“ a „vertikální“ nemají žádný vztah k anatomickým rovinám. Vzorek pak krájíme systematickými řezy kolmo na horizontální rovinu. Vertikální rovina, kterou jsme preparát prokrájeli, zasáhne s vyšší pravděpodobností horizontální plochy, nežli vertikálně orientované plochy. Abychom toto vychýlení vyrovnali, potřebujeme použít takové testovací linie, jejichž délková hustota je úměrná $\sin\theta$, kdy θ je odklon od vertikály a průběh těchto linií je spíše horizontální nežli vertikální. Takové vlastnosti splňují křivky zvané cykloidy, jsou-li orientovány svou kratší osou paralelně se zmíněnou vertikální osou. Kombinace roviny generované VUR otočením o úhel ϕ a aplikací sítě cykloid odpovídá použití izotropního čárového testovacího systému. VUR řezy můžeme s výhodou použít současně s určováním plochy i k odhadu objemů Cavalieriho metodou, která nevyžaduje náhodnou orientaci řezů.

2.2.4 Mikrovazální hustota

Při kvantifikaci kapilár, pre- a postkapilár ve větších tkáňových bločcích je vhodné přes trojrozměrnou povahu cév použít dvojrozměrné kritérium míry jejich přítomnosti, tzv. mikrovazální hustotu (microvessel density), kterou lze stereologicky vyjádřit jako parametr Q_A podle rovnice 11:

$$Q_A = \frac{Q}{A}, \quad (11)$$

kde Q je počet profilů mikrocév zachycených na řezu o referenční ploše A . Pravidlo k započítání profilů objektů ve 2-D je nestranné [3]. Plochu hodnotícího rámečku známe z kalibrace, event. ji můžeme při nepravidelnostech obrysů referenční plochy hodnotit bodovou testovací mřížkou.

2.2.5 Odhady numerické hustoty částic disektorem

Disektor je stereologická objemová testovací sonda k počítání objektů v referenční objemové jednotce. Z počtu objektů a znalosti referenčního objemu můžeme odhadnout jejich numerickou hustotu. Dodržení pravidel disektoru zaručuje výsledek nevychýlený

(unbiased) rozdíly ve velikosti a orientaci počítaných objektů (např. buněk). V závislosti na technice pořízení řezů rovinami tkáňového bločku lze použít disektor:

fyzický – založený na obrazech dvou či více fyzických řezů registrovaných v ose Z ,

optický – postupným proostřováním preparátu procházíme jednotlivé roviny, v nichž počítáme jednotlivé objekty.

Výpočet odhadu hustoty provádíme podle rovnice 12:

$$est N_v(par) = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i^-(par)}{\sum_{i=1}^n P_i(ref)} \cdot \frac{p}{a \cdot h}, \quad (12)$$

kde $est N_v(par)$ je odhad (estimátor) počtu částic v objemové jednotce referenčního prostoru, $Q_i^-(par)$ je počet částic započítaných v disektoru, $P_i(ref)$ je počet bodů mřížky připadající na referenční prostor, p celkový počet bodů pomocné mřížky, a plocha hodnotícího rámečku a h je celková výška disektoru. V rovině jednotlivých řezů se pak aplikuje počítací pravidlo shodné s 2-D hodnotícím rámečkem.

2.2.6 Přímý odhad počtu objektů pomocí optického frakcionátoru

Technika disektoru umožňuje odhad počtu částic v referenčním prostoru přepočtem z jejich numerické hustoty. V případě, že jediným parametrem významným pro biologickou otázku je prostý počet mikroskopických objektů, je metodou volby optický frakcionátor jakožto kombinace optického disektoru (viz oddíl 2.2.5, str. 9) a jedno- či víceúrovňového vzorkování (oddíl 2.2.7, str. 10). Aplikace frakcionátoru je obvykle trojstupňová:

1. Celý vzorek je zalit do média umožňujícího jeho kompletní rozkrájení na řezy. Část řezů vybraných k dalšímu hodnocení tvoří známý podíl (frakci) označenou ssf (section sampling fraction) a hodnota tohoto podílu je známa.
2. V každém z vybraných řezů jsou pomocí optického disektoru spočítány hodnocené objekty. Podíl ploch 2-D hodnotících rámečků disektoru vůči ploše řezů je označen asf (area sampling fraction) a je znám.
3. Podíl výšky disektoru a síly řezu je označen hsf (height sampling fraction).

Celkový počet hodnocených objektů ve vzorku \hat{N} pak odhadujeme podle rovnice 13:

$$est \hat{N} = \frac{Q}{f} = \frac{Q}{ssf \cdot asf \cdot hsf}, \quad (13)$$

kde Q je celkový počet objektů započítaných v optických disektorech, f je obecné označení pro podíl konečného výběru hodnoceného objemu v celkovém objemu vzorku a hsf , asf a ssf jsou podíly rozepsané v jednotlivých stupních vzorkování.

2.2.7 Vzorkování

Systematický uniformní náhodný výběr (SURS) je vhodné provádět na každé úrovni odběru, kdy dochází k redukci, resp. vzorkování odebrané tkáně z makroskopického orgánu, redukci počtu hodnocených histologických řezů, či výběru zorných polí pořizovaných silnějším objektivem v rámci jednoho histologického řezu.

Pozice prvního vzorku v sérii je určena náhodným číslem. Pozice dalších vzorků jsou ekvidistantní vzhledem k prvnímu. Hustota výběru vzorků se řídí požadovaným koeficientem chyby (viz oddíl 2.2.8, str. 11). Rozptyl SURS je vždy minimálně stejný jako u prostého náhodného výběru, většinou je však význačně nižší.

2.2.8 Hodnocení koeficientu chyby

Koeficient chyby (CE) je užitečnou mírou variability, která je pro základní soubor definována rovnicí 14:

$$CE = \frac{SD}{\bar{x}}. \quad (14)$$

Posouzení variability Cavalieriho řezů prostorově korelovanými objekty je možné provést hodnocením variability způsobené výběrem (sampling error) odhadem CE (rovnice 15, 16) dle Gundersena a Jensenové [5]:

$$est CE_n(GJ) = \frac{1}{\sum a_i} \cdot \sqrt{\frac{3a + c - 4b}{12}}, \quad (15)$$

kde koeficienty a , b , c jsou definovány jako:

$$a = \sum_{i=1}^n A_i \cdot A_i, \quad b = \sum_{i=1}^{n-1} A_i \cdot A_{i+1}, \quad c = \sum_{i=1}^{n-2} A_i \cdot A_{i+2}. \quad (16)$$

Využití délkové hustoty pro analýzu trhlin

Při analýze průběhu ruptury či disekce cévní stěnou lze s výhodou použít znalosti délkové hustoty profilů jednotlivých složek cévní stěny na řezu L_A k mikroskopickému posouzení toho, kterou ze složek se trhlinka preferenčně šíří. Lze postupovat testováním nulové hypotézy H_0 : Ruptura či disekce probíhá cévní stěnou náhodným způsobem, tj. bez preferenčního průběhu napříč určitými strukturami (např. elastinovými vlákny).

Z odhadu referenční hodnoty délkové hustoty profilů objektů v řezu lze podle rovnice 17 [24] vypočítat teoretický počet průsečíků trhliny s danou strukturou (např. s elastinovými vlákny) při platnosti nulové hypotézy H_0 , která předpokládá náhodnou dráhu trhliny ve tkáni:

$$est P_L = l \cdot \frac{2}{\pi} \cdot L_A, \quad (17)$$

kde P_L je vypočtený počet průsečíků profilu trhliny na řezu s hodnocenou složkou cévní stěny (např. s elastinovými vlákny) a l je délka profilu trhliny v řezu. Při signifikantním rozdílu teoretické hodnoty P_L a hodnoty P'_L skutečně napočítané v histologických řezech lze zamítnout H_0 . Při signifikantním výsledku párového porovnání $P_L < P'_L$, resp. při $P_L > P'_L$ lze pak usoudit na skutečnost, zda ruptura protíná složku cévní stěny více, resp. méně, nežli by odpovídalo náhodě.

2.3 Trojrozměrné rekonstrukce

Cévy, jejichž stěnu mikroskopicky analyzujeme, jsou většinou současně anatomickými objekty, jejichž makroskopické rozměry nelze vzhledem k síle histologických řezů a délce histologických řezů zanedbat. Potřebujeme-li ozřejmit prostorové vztahy jednotlivých součástí většího vzorku či naopak vizualizovat geometricky složitý průběh drobných cév (např. vasa varosum) se současným zachováním informace o histologické skladbě preparátu, můžeme využít potenciál počítačových trojrozměrných modelů založených na rekonstrukci optických či fyzických sériových řezů. Kromě vizualizačního efektu lze z rekonstruovaných objektů vytěžit i další kvantitativní data jako např. velikost povrchu a objemu (u uzavřených objektů).

U mikroskopických rekonstrukcí založených na optických řezech dominuje v současné době jako zdroj obrazů konfokální mikroskopie, viz např. [12, 14]. Alternativou ke klasickým

histologickým řezům mohou být i silnější řezy nedeparafinizované, v jejichž případě je restituce původních prostorových vztahů jednodušší a rychlejší nežli u klasických histologických řezů [13]. Volba vhodného zdroje obrazových dat je však vázána na rozměry rekonstruovaných struktur, přičemž pro některé objekty zůstává v histologii a zejména v embryologii rekonstrukce založená na fyzických sériových řezech doposud metodou volby, viz např. [27]. Velkou inspirací pro naši práci byla monografie [2], pojednávající podrobně jak o vhodné přípravě sériových řezů použitelných k rekonstrukcím, tak o restituci řezů. Přestože tato publikace patří ke klasickým pracím v oboru, většina zásad v ní popsanych má obecnou platnost a je využitelná i v době počítačových rekonstrukcí. Technika rekonstrukcí ze sériových řezů, jejíž variantu popisujeme v následujícím textu, je dosti pracná, má řadu úskalí (sesazování řezů v ose Z , odstranění vlivu artefaktů vzniklých krájením) a dosud skýtá prostor pro tvůrčí práci potřebnou k jejich překonávání.

2.3.1 Rekonstrukce ze série histologických řezů

1. Snímky objektů získáme klasickou mikrofotografickou cestou. Pokud objekty (např. větší cévy) svou velikostí přesahují možnosti mikrofotografie, mohou být proto naskenovány běžným stolním skenerem, kdy vhodným rozlišením může být např. 1200–2400 dpi.
2. Byly-li řezy skenovány, pro rychlou separaci jednotlivých řezů ze série sklíčků můžeme s výhodou použít kombinaci posouvání výběru o konstantní velikosti a automatizovaného snímání obrazovky pomocí volně dostupných programů IrfanView (Irfan Skiljan) a WinGrab (Per Skjerpe, Stavanger, Norsko). Výsledkem je neregistrovaná série.
3. Hlavní přípravnou fází je registrace obrazů, tj. snaha o restituci řezů do stavu před rozkrájením. Při delších sériích se nevyhneme manuálním korekcím (translace, rotace), např. v programu ImagReg1 (Jiří Janáček, FgÚ AV ČR v Praze). Metody elastické registrace mohou vyrovnat deformace vzniklé krájením řezů, u dlouhých sérií však zpravidla nejsou použitelné. Optimální překryv mezi sousedními řezy vynikne v negativu.
4. V registrovaných obrazech pak segmentujeme oblasti našeho zájmu (kontury význačných struktur), např. programem Ellipse3D (ViDiTo, Košice, Slovensko). Volíme mezi poloautomatickými nástroji (princip prahování, watershed, LiveWire apod.) či manuálním obkreslováním grafickým tabletem. Řezy nepoužitelné pro rekonstrukci (roztržené, deformované, neúplné) ponecháme v sérii a při segmentaci je přeskočíme a interpolujeme. Jednotlivé kontury patřící k téže struktuře sdružujeme jako objekty určité třídy.
5. Pro orientaci mezi objekty a hledání chyb můžeme před vlastní rekonstrukcí zviditelnit kontury ve 3-D (např. modulem Contours v programu Ellipse3D).
6. Rekonstrukci povrchu zobrazíme modulem Surface (Ellipse3D). V něm volíme pro každou třídu nastavení průhlednosti, stupně vyhlazení, barvu, intenzitní práh pro zobrazení, kvalitu (a tím i výpočetní náročnost) rekonstrukce (zvlášť pro XY a zvlášť pro Z) apod. V globálním nastavení můžeme provést řez objektem pomocí masky. Pokud požadujeme rekonstrukci jen některých rovin, vrátíme se zpět na sérii zdrojových obrázků s konturami a Processing Crop vymežíme požadované axiální roviny.
7. Modul Surface nejprve vytvoří volumetrický model objektů ze série kontur dané třídy. Pak pro zobrazení vytváří model povrchu těchto objektů tím, že v sérii obrázků detekuje tzv. isosurface, což je povrch vytvářený při renderingu spojením série 2-D kontur. Je možné nastavit citlivost propojení těchto kontur, což je užitečné např. pokud máme

u různých orgánů různé odstupky mezi sousedními konturami (u orgánů s menší nepravidelností nebývá nutné segmentovat kontury v každé rovině).

3 Výsledky a závěry

3.1 Hlavní výsledky a nálezy

Za hlavní přínos kvantitativních metod v předkládané práci považujeme hodnocení morfologických vlastností tkáňových vzorků pomocí spojitých kvantitativních proměnných, což v kombinaci se systematickým a nestranným výběrem vzorků umožňuje aplikovat na porovnávané skupiny standardní statistické postupy a testy. Díky tomu poskytují předložené publikace následující odpovědi na otázky formulované v oddílu 1.2:

3.1.1 Metody kvantitativního popisu cévní stěny

1. K výhodám metod obrazové analýzy patří možnost automatizace (skriptování) při zpracování velkého počtu histologických vzorků uniformního vzhledu. Velká část biologického materiálu, zejména patologicky změněné vzorky a biopsie, má při přehledných metodách i afinitní histochemii variabilní barvitelnost, resp. obsahuje artefakty, což činí mnohdy automatické zpracování obrazu nepoužitelným. Stereologické postupy mají většinou větší podíl interaktivní práce uživatele, avšak prostor pro subjektivní chybu je minimalizován aplikací jednoznačných pravidel. Přítomnost artefaktů a variabilita vzorků obvykle nelimituje využití histologických řezů a zpracování mnohdy cenného materiálu je hospodárnější. Většina stereologických metod je velmi dobře dokumentována v řadě prestižních publikací a poskytuje nevychýlené (unbiased) výsledky. Na každé úrovni odběru či redukce materiálu by měl proběhnout systematický uniformní náhodný výběr (SURS), který zajistí, aby se analyzované struktury staly součástí mikroskopického výběru s pravděpodobností přímo závislou na frekvenci jejich výskytu ve vzorku. SURS přináší efektivní a rovnoměrné pokrytí materiálu výběrem, tj. stejnou šanci pro všechny části vzorku, aby se staly součástí hodnoceného výběru, a snížení variability způsobené výběrem [29].

3.1.2 Studium aterogeneze a jejích komplikací

2. Pro posouzení vulnerability aterosklerotických lézí je k doplnění stávající kvalitativní klasifikace vhodné měřit poměrné zúžení cévního lumina lézí, objemový podíl lipidových depozit, hemoragií, kolagenního vaziva a hladké svaloviny v lézi, sílu fibrózní čepičky léze. Rozvoj zánětlivé infiltrace lze kvantifikovat jako numerickou hustotu jednotlivých druhů leukocytů značených afinitní histochemií či jako plošnou nebo objemovou frakci zánětlivých cytokinů, adhezních molekul a metaloproteináz. Neoangiogeneze se projeví zvýšením počtu profilů specificky značených endoteliálních shluků na řezu tunica adventitia či tunica media. Tyto parametry je vhodné doplnit posouzením fragmentace elastinu pomocí střední vzdálenosti sousedních elastických lamel, objemového podílu elastinu v tunica media a délkové hustoty elastinu [29].
3. Prokázali jsme význačnou roli zánětlivého procesu u pacientů s rupturou aneuryzmatu abdominální aorty (AAA), a to na úrovni zánětlivých ložisek [31, 32] infiltrujících neovaskularizované oblasti stěny ruptur AAA ve srovnání s asymptomatickými AAA. Histologický obraz zánětu odpovídal vyšším hladinám IL-6, IL-8 a TNF- α [32] a zvýšení metabolismu kolagenu typu III s převahou jeho degradace [30] u ruptur AAA.

4. U aneuryzmatické aorty dochází k význačnému poklesu objemové frakce kontraktilního fenotypu hladkých svalových buněk v tunica media, zatímco objemová frakce kolagenu je oproti normální aortě relativně zvýšená a objemová frakce elastinu se pohybuje v rozpětí od nuly až k normálním hodnotám. Výsledky Fourierovy transformace (FFT) mikrofotografií tunica media lze kvantifikovat tvarovým faktorem cirkulárního histogramu FFT, který je citlivý na změny v orientaci a fragmentaci elastinové sítě. Metodika je citlivá k rozdílům mezi normální a patologickou stěnou aorty, avšak pro extrémní rotační asymetrii stavby stěny AAA se výsledky pro aterosklerotickou aortu a AAA překrývají [33].
5. U transplantovaných srdcí apolipoprotein E-deficientních (apoE-KO) myší i transplantovaných srdcí wild-type myší byly aterosklerotické léze aortálního sinu většinou atrombogenní a stabilnější nežli pláty apoE-KO myší, u nichž transplantace nebyla provedena. Posttransplantační reakce cév myokardu maskovala potenciální regresí aterosklerózy v koronárním řečišti. Transplantace srdce apoE-KO myší nepředstavuje vhodný experimentální model pro studium regrese aterosklerózy [34].
6. Dlouhodobé podávání cholesterolem obohacené diety je u apoE-KO myší spojeno s masivnějším rozvojem aterosklerotických změn hrudní aorty v důsledku akcelerovaného ukládání cholesterolu do cévní stěny [35].
7. Při pokusu navodit regresí aterosklerotických lézí heterotopickou transplantací aorty u juvenilních jedinců apolipoprotein E-deficientní myší došlo k transplantační arteritidě s tvorbou neointimy, elastinolýzou a infiltrací arteriální stěny T- a B-lymfocyty, makrofágy a neutrofilů. Tyto změny převážily nad možnou regresí aterosklerotických lézí, a to i u skupiny kontrolních wild-type myší. U juvenilních zvířat považujeme tedy tuto techniku za příliš invazivní zásah, který pro poškození vasa vasorum transplantovaného úseku není pro regresní studie vhodný [36, 37].

3.1.3 Morfometrie a 3-D rekonstrukce v biomechanice cévní stěny

8. Přínos FFT u studia normálních vzorků aorty prasete je poměrně omezený. Nebyly nalezeny rozdíly v morfologii elastinové sítě hrudní vs. břišní aorty ani ventrální vs. dorzální stěny aorty. Střední vzdálenost sousedních elastinových lamel na transverzálním řezu aortou prasete byla větší u břišních nežli u hrudních segmentů týchž aort [38, 39].
9. Morfometrické údaje o geometrii a složení hrudní a břišní aorty prasete byly využity jako vstupní data pro kompozitní model aortální stěny. Počítačová simulace založená na histologické analýze ukázala, že význam reziduálního napětí mezibuněčné hmoty (převážně elastinu) převažuje ve stěně arterie elastického typu nad tonusem hladkých svalových buněk. Naproti tomu v periférii arteriálního systému, kde zastoupení hladké svaloviny v cévní stěně výrazně převažuje nad přítomností elastinu, hraje aktivace myocytů při regulaci průsvitu cév hlavní roli [40]. Upřesněná data byla použita i v navazujících numerických simulacích s kompozitním jedno- [41] a dvojrstevným [42] modelem arteriální stěny.
10. V adaptovaném makroskopickém konečněprvkovém modelu geometrie srdečních komor psa byl definován průběh drah převodního systému srdečního. Šíření vzruchové aktivity převodním systémem i jeho přestup na pracovní myokard byl simulován pomocí matematické metody buněčných automatů [43].
11. Model s reálnou geometrií lumen a stěny AAA založenou na CT-angiografii a s respektováním anatomických okrajových podmínek rekonstruovaných z CT ukazuje detailně

vliv lokálních nepravidelností výdutě, vliv větvení a redistribuce toku kapaliny a vliv rotačně asymetrického trombu a síly aortální stěny na distribuci napětí ve stěně AAA a na rychlostní profily proudící kapaliny během systolicko-diastolického cyklu. Přínos navržené studie by mohl být významný zejména při sledování pacientů s asymptomatickým AAA o rozměru pod 5 cm a s vyšším operačním rizikem [45, 44]. Bez dat získaných magnetickou rezonancí (MRI) či endoskopickou sonografií nelze doplnit model o údaje o složení cévní stěny konkrétního pacienta. Model vyžaduje validaci a korekci na základě klinických zkušeností cévního chirurga.

3.2 Možné pokračování výzkumu

Na základě dosavadní práce považujeme za perspektivní následující problémy, na jejichž řešení se podílíme:

1. Ve spolupráci s Ústavem fyziologie Lékařské fakulty UK v Plzni studujeme mikroskopickou strukturu subrenální aorty u modelu chronického renálního selhání potkanů s parciální nefrektomií a hypertenzí. V přípravné studii jsme zmapovali variabilitu objemového podílu elastinu a hladkých svalových buněk, délkové hustoty elastinu, středního počtu elastinových lamel a střední vzdálenosti mezi sousedními elastinovými lamelami v sériích histologických řezů tunica media normálních kontrolních zvířat. Optimalizovali jsme metodiku vzorkování histologických řezů výběrem mikroskopických zorných polí a vyhodnotili jejich potřebný počet vzhledem k variabilitě uvedených parametrů a rotační asymetrii aortální stěny. V navazující práci testujeme následující hypotézu H_0 : Při 10 týdnů trvající hypertenzi v systémovém oběhu modelu chronického renálního selhání nedochází u potkana k remodelaci stěny subrenální aorty, která by se projevila změnou výše uvedených parametrů.
2. Ve spolupráci s Klinikou kardiovaskulární chirurgie Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze jsme navrhli histologické hodnocení vlivu aplikace tří druhů tkáňových lepidel do falešného lumen modelu disekce aorty u miniprasete. V probíhající studii testujeme hypotézu H_0 : Aplikace konkrétního druhu lepidla (Gelatin-resorcinol-formaldehyd, BioGlue, Tissucol) není faktorem vysvětlujícím variabilitu v histopatologických nálezech po dobu 1–12 měsíců od aplikace lepidla v modelu aortální disekce u miniprasete.
3. Ve spolupráci s Flebologickým centrem Praha jsme provedli pilotní studii k porovnání objemové frakce hladké svaloviny v tunica media a tunica adventitia vzorků vena saphena magna et parva odebraných pacientům s chronickou insuficiencí povrchových žil dolních končetin. V současnosti sbíráme materiál k ověření hypotézy H_0 : Ve skupině pacientů Flebologického centra Praha není významného rozdílu v zastoupení hladké svaloviny ve stěně varikózních vzorků vena saphena parva ve srovnání se vzorky vena saphena magna.
4. Ve spolupráci s Katedrou mechaniky Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni hodnotíme orientaci jader hladkých svalových buněk ve vzorku aorty prasete poté, co vzorek podstoupil mechanické testování. Cílem hodnocení je měřením dostatečného počtu jader myocytů získat histogramy úhlů mezi dlouhou osou myocytů a radiálním (axiálním) směrem cévy tak, aby bylo možno posoudit modelový koncept uspořádání myocytů tunica media a přilehlých vláken mezibuněčné hmoty do systému dvojité šroubovice obtáčející tunica media aorty.

5. Ve spolupráci s Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, kvantifikujeme plošnou hustotu profilů krevních cév s endotelem značeným kombinací lektinové histochemie a imunohistochemie v histologických řezech nádorově transformovanými a kontrolními vzorky lymfatických uzlin psa (studie je vůči našemu pracovišti zaslepena). Cílem práce je statisticky popsat vztah hustoty mikrocirkulace uzlin vůči ne/přítomnosti histologického gradingu neoplazie a expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF A-20). Druhotným cílem je zpřesnit dosud nejasný popis angioarchitektoniky mikrocév v lymfomech prostřednictvím analýzy shluků tvořených profily cév na řezu a testováním an/izotropie těchto profilů pomocí Delaunayovy triangulace za účelem posouzení teorie tzv. „hot spots“ (předpokládaných center neoangiogeneze, na jejichž hodnocení jsou postaveny některé práce zkoumající novotvorbu cév v lymfomech). Současně na řezech identickou uzlinou porovnáváme senzitivitu a specificitu pěti různých protokolů imunohistochemie a lektinové histochemie použitelných pro průkaz endotelu u psa a variabilitu kvantifikace mikrocév při opakovaném hodnocení týmě pozorovatelem a dvěma nezávislými pozorovateli.

4 Literatura pro úvodní a metodickou část

- [1] Bolender R.P. (1992): Biological stereology: history, present state, future directions. *Microsc Res Tech.* 21:255–261.
- [2] Gaunt P.N., Gaunt W.A. (1978): Three dimensional reconstruction in biology. 1st ed. Pitman Medical Publishing Co., Tunbridge Wells, 174 pp.
- [3] Gundersen H.J.G. (1977): Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 111:219–223.
- [4] Gundersen H.J. (1986): Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 143:3–45.
- [5] Gundersen H.J.G., Jensen E.B. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147:229–263.
- [6] Gundersen H.J., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., et al. (1988): The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96:857–881.
- [7] Gundersen H.J., Østerby R. (1981): Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *J Microsc.* 121:65–73.
- [8] Gundersen H.J., Jensen E.B., Kieu K., Nielsen J. (1999): The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. *J Microsc.* 193:199–211.
- [9] Hedreen J.C. (1998): What was wrong with the Abercrombie and empirical cell counting methods? A review. *Anat Rec.* 250:373–380.
- [10] Howard C.V., Reed M.G. (1998): Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy. 2nd ed. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbook Series No. 41. Springer-Verlag, New York, 246 pp.
- [11] Howard V., Reid S., Baddeley A., Boyde A. (1985): Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *J Microsc.* 138:203–212.

- [12] Jirkovská M., Kubínová L., Krekule I., Hach P. (1998): Spatial arrangement of fetal placental capillaries in terminal villi: a study using confocal microscopy. *Anat Embryol (Berl)*. 197:263–272.
- [13] Jirkovská M., Naprstková I., Janáček J., Kučera T., Macášek J., Karen P., Kubínová L. (2005): Three-dimensional reconstructions from non-deparaffinized tissue sections. *Anat Embryol (Berl)*. 210:163–173.
- [14] Karen P., Jirkovská M., Tomori Z., Demjenová E., Janáček J., Kubínová L. (2003): Three-dimensional computer reconstruction of large tissue volumes based on composing series of high-resolution confocal images by GlueMRC and LinkMRC software. *Microsc Res Tech*. 62:415–422.
- [15] Kurzydowski K.J., Ralph B. (1995): The quantitative description of the microstructure of materials. CRC Press, Boston, 418 pp.
- [16] Mayhew T.M., Gundersen H.J. (1996): “If you assume, you can make an ass out of u and me”: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat*. 188:1–15.
- [17] Mouton P.R. (2002): Principles and Practices of Unbiased Stereology. An Introduction for Bioscientists. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 214 pp.
- [18] Russ, J.C. (2006): The Image Processing Handbook. 5th ed. CRC, Boca Raton, 818 pp.
- [19] Russ J.C., Dehoff R.T. (2001): Practical Stereology. 2nd ed. Plenum Press, New York, 307 pp.
- [20] Sary H.C., Chandler A.B., Glagov S., Guyton J.R., Insull W. Jr., Rosenfeld M.E., Schaffer S.A., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. et al. (1994): A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 89:2462–2478.
- [21] Sary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler RW. et al. (1995): A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1512–1531.
- [22] Sary H.C. (2000): Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1177–1178.
- [23] Sterio D.C. (1984): The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 134:127–136.
- [24] Stoyan D., Kendall W.S., Mecke J. (1995): Stochastic geometry and its applications. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 456 pp.
- [25] Weibel E.R. (1979): Stereological Methods. Vol.1: Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press, London, 415 pp.
- [26] Wicksell S.D. (1925): The Corpuscle Problem: A Mathematical Study of a Biometric Problem. *Biometrika*. 17:84–99.
- [27] Witter K., Pavlíková H., Matulová P., Míšek I. (2005): Relationship between vestibular lamina, dental lamina, and the developing oral vestibule in the upper jaw of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *J Morphol*. 265:264–270.
- [28] Wojnar L. (1999): Image analysis – Applications in materials engineering. CRC Press, Boca Raton, 256 pp.

5 Soubor vlastních prací se vztahem k problematice

U některých prací uvádíme impakt faktor (IF) periodik v roce publikace podle ISI Web of Knowledge Journal Citation Reports. Počet citací odkazujících na tyto práce je dle ISI Web of Knowledge k datu 2. 4. 2007.

- [29] Tonar Z., Janáček J., Poledne R. (2007): Stereologické metody kvantitativního popisu aterosklerotických lézí na úrovni optické mikroskopie. [Stereological methods for quantitative description of atherosclerotic lesions in optical microscopy]. *Cor Vasa* 49:95–101.
- [30] Třeška V., Topolčan O., Kočová J., Pecen L., Tonar Z. (1999): Prokolagen typu I a III u nemocných s aneuryzmaty břišní aorty [Procollagen Type I and III in Patients with an Aneurysm of the Abdominal Aorta.]. *Cas Lek Cesk.* 138:142–146.
- [31] Kočová J., Boudová L., Třeška V., Křížková V., Tonar Z., Moláček J. (2003): Cellular and extracellular elements in the aortic wall including aneurysm and rupture of abdominal aorta. *Plzeň lék Sborn Supplementum.* 78:115–122.
- [32] Treska V., Kocova J., Boudova L., Neprasova P., Topolcan O., Pecen L., Tonar Z. (2002): Inflammation in the wall of abdominal aortic aneurysm and its role in the symptomatology of aneurysm. *Cytokines Cell Mol Ther.* 7:91–97. **IF = 1,560; citace: 4**
- [33] Tonar Z., Němeček S., Holota R., Kočová J., Třeška V., Moláček J., Kohoutek T., Hadravská Š. (2003): Microscopic image analysis of elastin network in samples of normal, atherosclerotic and aneurysmatic abdominal aorta and its biomechanical implications. *J Appl Biomed.* 1:149–160.
- [34] Bobková D., Kočová J., Tonar Z., Lácha J., Havlíčková J., Poledne R. (2004): Heart transplantation in apolipoprotein E-deficient mice as a model of atherosclerosis regression. *Cor Vasa* 42:68–72.
- [35] Bobková D., Tonar Z. (2005): Effects of Long-term Cholesterol Diet on Cholesterol Concentration and Development of Atherosclerosis in Homozygous Apolipoprotein E-deficient Mice. *Acta vet Brno.* 74:501–507. **IF=0,353; citace: 0**
- [36] Tonar Z., Bobkova D., Havlickova J., Poledne R. (2005): Vessel transplantation of apolipoprotein E-deficient mice as a model of atherosclerosis regression. Abstracts of the 75th Congress of the European Atherosclerosis Society. *Atherosclerosis Supplements.* 6:45. **IF= 4,457; citace: 0**
- [37] Tonar Z., Bobková D., Witter K., Matejka V.M., Havlíčková J., Lánská V., Poledne R. (2007): Aorta transplantation in juvenile apolipoproteinE-deficient mice: Possible model for studies on regression of atherosclerotic lesions? Submitted for publication in *Veterinarni Medicina.*
- [38] Tonar Z., Nemecek S., Muzik T. (2005): 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 STEREMAT International Conference on Stereology and Image Analysis in Materials Science. Vol. II, pp. 368–375.
- [39] Tonar Z., Němeček S, Holota R (2005): Microscopic image analysis of elastin and morphometry of wall of thoracic and abdominal porcine aorta. *IFMBE Proc.* 11:1474–1479.
- [40] Rohan E., Cimrman R., Tonar Z. (2002): On modelling arteries using composite model of soft tissue. – In: Jelen K., Kušová S., Chalupová M., Otáhal J. (eds): Proceedings of international conference on biomechanics of man 2002, Czech Society of Biomechanics,

12th-15th November 2002, Čejkovice. Charles University in Prague, Faculty of Physical Education and Sport, pp. 275–278.

- [41] Demjančuková L., Rohan E., Boiron O., Tonar Z. (2005): Numerical and experimental aspects of arterial wall modelling. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*. 3:71–72.
- [42] Demjančuková, L., Tonar, Z., Boiron, O., Polanský, J., Rohan, E., Cimrman, R. (2006): Composite model of healthy arterial wall: material identification based on uniaxial tensile tests and morphometric analysis. *J Biomech.* 39(Suppl. 1):S622. **IF= 2,364; citace: 0**
- [43] Cimrman R., Kroc J., Rohan E., Rosenberg J., Tonar Z. (2003): On coupling cellular automata based activation and finite element muscle model applied to heart ventricle modelling. – In: Arnež Z.M., Brebbia C.A., Solina F., Stankovski V. (eds): *Simulations in Biomedicine V*. WIT Press, Southampton, pp. 29–34.
- [44] Tonar Z., Jeník J., Třeška V., Novák M. (2005): Computer simulation of the flow in the abdominal aneurysmatic aorta. *IFMBE Proc.* 11:2009–2014.
- [45] Jeník J., Tonar Z., Třeška V., Novák M. (2006): Blood-Structure Interaction in Abdominal Aorta Aneurysms. *Fluent News* 15:S11–S12.

Dissertation abstract

The dissertation thesis consists of seventeen papers dealing with quantitative histological assessment of vascular wall and with application of morphometry in atherosclerosis research as well as in biomechanics of elastic arteries. History of microscopic morphometry with an emphasis on stereology is reviewed in the Introduction. The principles of mathematical morphology and of stereological estimation of volume, surface, area, length, and numerical density of objects in tissue blocks are explained in the Methods. The key rules of unbiased sampling of histological series and designing morphometric studies are summarized. The distribution of the overall observed variance in biological experiments, its sources and management are discussed. Procedures necessary for three-dimensional reconstructions based on scanned histological series are described.

We proved that inflammatory process was significant in patients with ruptured aneurysm of abdominal aorta (AAA). There were more pronounced inflammatory infiltrates in areas of neovascularization in ruptured AAA than in asymptomatic AAA patients. Histological findings were in agreement with higher cytosol cytokine levels (IL-6, IL-8, TNF- α), enhanced collagen III metabolism and degradation in ruptured AAA. We found lower volume fraction of the contractile phenotype of smooth muscle cells, higher volume fraction of collagen, and minimal to normal elastin volume fraction within the tunica media of AAA than in normal aorta.

Apolipoprotein E-deficient (apoE-KO) mice fed with a cholesterol-rich diet for five months developed accelerated atherosclerosis of thoracic aorta with atherosclerotic lesions of higher volume than the group fed for two months only. In another study, heterotopic heart transplantation in apoE-KO mice didn't prove itself to be a reliable experimental model for study of atherosclerosis regression, although the lesions found in aortic sinus were more stable in some of the transplanted than in non-transplanted animals. In another study, no regression of initial atherosclerotic lesion was achieved by syngeneic heterotopic transplantation of thoracic aorta segments of 12-week-old apoE-KO mice to wild-type recipients of the same age. On the contrary, neointima formation, arteriosclerosis and degradation of elastin

prevailed in all transplanted specimens, even in control groups. It was suggested that the minute and sensitive wall of juvenile aorta suffered from severe disturbance of vasa and nervi vasorum caused by the invasive intervention in the transplanted animals, so that it became vulnerable to inflammation and transplant arteriopathy. The reproducibility of the promising regression model in 12-week-old mice was derogated by the striking dependence of the results upon the operation technique. Thoracic to abdominal aorta transplantation did not offer a method which would enable us to study atherosclerosis regression in 12-week-old apoE KO mice.

The mean distance between adjacent elastic lamellae was higher in paired transversal sections through abdominal than thoracic segments of porcine aortae. Volume fraction of elastin within tunica media did not differ between paired samples of thoracic and abdominal porcine aorta. We assessed volume fractions of collagen and smooth muscle, as well as elastin length density in porcine aorta. Computer simulation performed with a composite model of aortic wall and based on histomorphometry suggested that in the aorta the residual strain in the extracellular matrix (mainly in elastin fibres) was much more important for the proper function of the arterial wall than the tone of smooth muscle cells. In another paper, morphometric analysis succeeded mechanical uniaxial traction tests in order to supply a two-layer composite mathematical model of the aorta with sufficient data.

A three-dimensional geometry model of canine heart ventricles considering anisotropy of the cardiac muscle was presented. Simulation of excitation of the cardiac conducting system and myocytes was done with cellular automata and coupled with a finite element model of heart mechanics.

We developed a computer model of the blood flow and vascular wall mechanics in AAA. Morphology of the model including its boundary conditions was based on real patient-specific geometry data obtained with computer tomography. Dependence of wall stress contours and velocity profiles upon the realistic geometry of vessel lumen, thickness of arterial wall and intramural thrombus, and branching was simulated during the cardiac cycle. This approach was suggested to be suitable for follow-up study of patients with high surgical risk but smaller aneurysms observed for the aneurysm growth, where simulations could be correlated with surgeon's clinical experience.

Stereological quantification of microscopic structure of blood vessels was found reliable, and reproducible. Most of the stereological methods used nowadays had been designed as unbiased, and assumption-free. Description of morphological properties of tissue specimen with use of continuous variables and systematic unbiased sampling permitted us to apply standard statistical procedures and tests to morphometric data. Due to our experience, stereological quantification might be useful for other topics of vascular research, e.g. for describing histology of hypertensive aorta remodelling in a model of chronic renal failure in rats, for assessment of alteration of aortic wall caused by application of biological glues into a model of aortic dissection, or for description of angioarchitectonics of microvessels in normal and tumourous lymph nodes.