

ÚSTAV HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE LF UK V PLZNI



Atlas kvantitativní histologie

PŘÍRUČKA PRO STUDENTY

MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

Spolupráce na aplikacích jednotlivých metod: Ing. Petra Kochová, Ph.D.,
Doc. MVDr. Dr.med.vet. Kirsti Witter, Ph.D., Lukáš Nedorost,
Karla Maštálková, Vít M. Matějka, Dr. RNDr. Jiří Janáček,
MUDr. Věra Tomanová, Tomáš Kural, Mag. Luis Quintino

prosinec 2008

Práce byla podporována grantem FRVŠ F3 1071/2008
Multimediální atlas kvantitativní histologie

1 Poděkování autorů

Domníváme se, že z pochopení principů a omezení současných možností kvantitativní histologie mohou profitovat pregraduální studenti zejména ve studiu preklinických oborů (patologie), na něž je studium histologie připravuje. Autoři doufají, že po zveřejnění výsledků na WWW stránkách LF UK v Plzni, umožněném díky dotaci FRVŠ, atlas poslouží ve výuce a vědecké práci i odborné veřejnosti a zároveň doufají, že na základě její odezvy bude možné tento atlas i nadále zkvalitňovat.

Z těch spolupracovníků, kteří nejsou jmenovitě uvedeni v autorském kolektivu, avšak bez jejichž příspěvku či rady by tato publikace pravděpodobně nevznikla, autoři děkují RNDr. Lucii Kubínové, CSc., a MUDr. Petru Karenovi, CSc., z Fyziologického ústavu AV ČR v Praze, doc. Ing. Zoltánu Tomori, CSc., z Ústavu experimentálnej fyziky SAV, MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D., a MUDr. Jitce Švíglerové, Ph.D., z Ústavu fyziologie LF UK v Plzni, Dr.med.vet Birgitt Wolfesberger a Magdalena Helmreich z Veterinärmedizinische Universität Wien, organizátorům a vyučujícím The EMBO practical course on Electron Microscopy and Stereology (Prof. MUDr. Ivan Raška, DrSc., Ing. Jana Nebesářová, CSc., Prof. Terry Mayhew, Dr. John Lucocq) a paní Jaroslavě Beránkové z Ústavu histologie a embryologie v Plzni.

Obsah

1	Poděkování autorů	1
2	Seznam zkratk a symbolů	5
3	Přehled problematiky a cíle práce	9
3.1	Motivace	9
3.2	Cíle práce	9
3.3	Historie kvantifikace v mikroskopii a přehled literatury	10
3.3.1	Základní východiska stereologie	10
3.3.2	„Unbiased stereology“	10
3.3.3	Variabilita výsledků a optimalizace biologických studií	12
4	Analýza obrazu a stereologie	14
4.1	Matematická morfologie	14
4.2	Výhody analýzy obrazu a stereologie	14
5	Stereologie	15
5.1	Dimenze sond a kvantifikovaných veličin	16
5.2	Strategie zajištění náhodnosti stereologických sond vůči vzorkům	17
5.3	Poměry a hustoty	18
5.4	Odhady ploch a objemů bodovými testovacími mřížkami	18
5.5	Odhad délek pomocí rovin ve 3-D a lineárními sondami ve 2-D	19
5.6	Odhady plochy povrchu a povrchové hustoty	20
5.7	Kvantifikace mikrocév	21
5.8	Odhady numerické hustoty částic disektorem	22
5.9	Přímý odhad počtu objektů pomocí optického frakcionátoru	23
5.10	Využití délkové hustoty pro analýzu trhlin	24
5.11	Relative labelling index	24
5.12	Analýza shluků a kolokalizace objektů	25
5.13	Analýza anizotropie struktur ve 2-D	25
5.14	Petri-metrics	26
5.14.1	2-D frakcionátor	26
5.14.2	Odhad délek ve 2-D pomocí pravoúhlé lineární sítě	27
5.14.3	Odhad délek ve 2-D pomocí cirkulárních oblouků	28
5.15	Odhad síly stěny tubulárních struktur	29
6	Výchylka, správnost a přesnost	30
6.1	Příklady zdrojů výchylky	30
6.2	Biologická variance	32
6.3	Výběrová chyba (sampling error)	32
6.4	Poměry složek celkové pozorované variance	33
6.4.1	Vzorkování	34
6.4.2	Hodnocení koeficientu chyby	35
6.5	Význam pilotních studií	35
6.6	Stereologické studie u archivního materiálu a „reprezentativní řezy“	36
6.7	Základní doporučení pro publikaci kvantitativních výsledků	37
6.8	Odhady vs. měření	38

7	Trojrozměrné rekonstrukce	39
7.1	Rekonstrukce ze série histologických řezů	39
8	Morfometrie tepen elastického typu	42
8.1	Příklad vzorkování obrazových polí	42
8.2	Plošné a objemové poměry složek cévní stěny a cévního lumina	42
8.2.1	Odhad koeficientu chyby	45
8.3	Elastinová síť a lamelární jednotka	46
8.4	Fourierova transformace mikrofotografií elastinové sítě	49
8.5	Numerická hustota buněk v cévní stěně	49
8.6	Shlukování buněk v cévní stěně	50
8.7	Lokalizace profilů vasa vasorum	51
8.8	2-D orientace hladkých svalových buněk ve stěně aorty	51
8.9	2-D (an)izotropie profilů hladkých svalových buněk ve stěně aorty	52
9	Morfometrie žilní stěny	54
10	Kvantifikace mikrocév v lymfatických uzlinách	56
10.1	Příklad histologického zpracování a vzorkování	56
10.2	Vzorkování a kvantifikace	57
10.3	Variabilita při opakovaném hodnocení a různé orientaci roviny řezu	58
10.4	Vliv strategie vzorkování obrazových polí	58
11	Morfometrie hladké svalové a pojivové tkáně	60
11.1	Objemový podíl hladkých svalových buněk	60
11.2	Objem hladkých svalových buněk	61
11.3	Orientace (směrová růžice) hladkých svalových buněk	65
12	Morfometrie centrálního nervového systému	69
12.1	Objemový podíl imunohistochemicky značených neuronů	69
12.2	Odhad absolutního počtu neuronů pomocí frakcionátoru	71
12.2.1	Příklad postupu	71
12.2.2	Odhad koeficientu chyby vzorku	73
13	Morfometrie kosti	75
13.1	Numerická hustota osteocytárních lakun	76
13.2	Hodnocení plošného podílu a distribuce profilů cévních kanálků	78
13.3	Trojrozměrná rekonstrukce mikroskopické stavby lamelární kosti	81
14	Kvantitativní hodnocení inzulinové positivity ve vzorcích pankreatu	82
14.1	Příklad histologického zpracování	82
14.2	Vzorkování a kvantitativní analýza	82
15	Kvantitativní hodnocení krevních cév biopsie peritonea	86
15.1	Příklad histologického zpracování	86
15.2	Příklady kvantitativních parametrů	87
15.3	Analýza CE	94
15.4	Interpretace parametrů	94

16 Morfometrie vaginální stěny	96
16.1 Příklad histologického zpracování	96
16.2 Objemový poměr hemoragií v subepitelovém vazivu	96
16.2.1 Analýza <i>estCE</i>	97
16.3 Povrch větších krevních cév a vaginálního epitelu	97
16.4 Numerická hustota CD68+ v subepitelovém vazivu	98
16.4.1 Fyzický disektor	98
16.4.2 Optický disektor	99
17 Kvantifikace Langerhansových buněk v epidermis	100
17.1 Příklady histologického zpracování	100
17.2 Série fyzických registrovaných řezů	101
17.3 Silné histologické řezy – série optických řezů s odstupem 1 μm	101
17.4 Silné histologické řezy – série optických řezů s odstupem 3 μm	102
17.5 Plošný preparát epidermis – série optických řezů s odstupem 1 μm	102
17.6 Doporučení na základě pilotní studie	102
18 Kvantitativní analýza mikrotrhlin v parenchymu ledvin	104
18.1 Příklad vzorkování ledvin a histologického zpracování	104
18.2 Hodnocení průběhu trhlin	105
18.3 Počítání ruptur kanálků nefronu, hodnocení L_A a l	105
19 Literatura	107
20 Seznam příloh	111

2 Seznam zkratek a symbolů

Není-li kodifikován závazný a jednoznačný český překlad původně cizojazyčného termínu, resp. je-li to vhodné pro pochopení symbolu či zkratky, uvádíme ve vybraných případech i původní anglickou terminologii tak, jak se obvykle vyskytuje v publikacích.

0-D – bodový, bezrozměrný

1-D – jednorozměrný

2-D – dvojrozměrný

3-D – trojrozměrný

α -SM actin – alfa aktin hladkých svalových buněk

a – konstanta bodové testovací sítě, plocha příslušející statisticky jednomu bodu sítě; u disektoru odpovídá ploše hodnotícího rámečku (m^2)

$\frac{a}{l}$ – poměr plochy a délky jednotkového tvaru testovacího systému použitého k odhadu délek ve 2-D dle Buffonova principu (m)

A, B, C – koeficienty pro odhad $estCE_n$ (GJ)

a, b, c – hlavní, první vedlejší a druhá vedlejší poloosa elipsoidu

A – plocha (area, surface area) (m^2)

A_A – plošný podíl hodnocené složky v referenční ploše vzorku (area per area, area fraction)

AAA – aneuryzma abdominální aorty

ANOVA – analýza variance (analysis of variance) nebo její neparametrická obdoba

apoE-KO – apolipoprotein E-deficience (knock out)

asf – podíl plochy hodnotících rámečků vůči celé ploše řezů v druhém stupni vzorkování optického frakcionátoru (area sampling fraction)

BV² – biologická variance (čtverec rozdílů mezi odhadem a očekávanou hodnotou)

C – vnější obvod profilu tubulárního orgánu na řezu, přičemž rovina řezu je přibližně kolmá na dlouhou osu trubice (m)

CE – koeficient chyby (coefficient of error), poměr druhé odmocniny z rozptylu a aritmetického průměru výběru

CE_n(GJ) – koeficient chyby (CE) podle Gundersena a Jensenové

CE² – celková výběrová chyba (relativní variance, sampling error)

CT – výpočetní tomografie (computer tomography)

CV – variační koeficient (coefficient of variation), poměr směrodatné odchylky populace k populačnímu průměru

CV² – celková variance odhadu (total observed variance)

d, d' – síla histologického řezu (m)

d – mřížková konstanta (výška) Merzovy mřížky (m)

D – rozměr (dimension)

d1 – vzdálenost bodu od lumina cévy (m)

d2 – vzdálenost bodu od vnější hranice adventicie cévy (m)

DT(P) – Delaunayova triangulace pro množinu bodů **P**

E – efektivita ($E = \frac{\text{přesnost}}{\text{čas}}$)

$E(X)$ – střední hodnota experimentálně zjištěné hodnoty veličiny X

eGFP – zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein)

est – odhad kvantitativního parametru (estimate, estimation)

f – obecné označení pro podíl (frakci) konečného výběru hodnoceného objemu v celkovém objemu vzorku; také označení pro funkci

ϕ – úhel rotace bločku kolem vertikální osy u VUR řezů ($^\circ$)

FFT – rychlá Fourierova transformace (fast Fourier transform)

H – počet rovnoběžek vymezujících horizontální segmenty na myšlené polokouli u vyhodnocování 3-D orientace

h – celková výška disektoru (m)

H_0 – nulová hypotéza

HE – přehledné barvení hematoxylinem a eosinem

hsf – podíl výšek optických disektorů vůči celé výšce řezů ve třetím stupni vzorkování optického frakcionátoru (height sampling fraction)

I_i – počet průsečíků povrchu s lineární sondou pro obrázek s indexem i

I_L – počet průsečíků povrchu s lineární testovací sondou

IL-6, IL-8 – interleukin 6 a 8

IMT – střední síla intima a media na řezu kolmém na dlouhou osu cévy (intima media thickness) (m)

ISS – International Society for Stereology

IUR – izotropní rovnoměrný náhodný (isotropic uniform random)

K – poměr počtu objektů ve vzdálenosti nižší nežli poloměr r od typického objektu dané třídy ku průměrné hustotě částic

l – délka (např. délka profilu trhliny v řezu, délka testovací sondy apod.) (m)

L – celková délka (m)

\hat{L} – délka hranice objektu odhadnutá podle modifikovaného Buffonova principu (m)

L_A – délková hustota profilů objektů v řezu (intensity of planar fibre process) (m^{-1})

LC – Langerhansovy buňky kůže

L_L – délkový podíl (length per length)

l/p – délka testovací linie připadající na bod mřížky (length per point) (m)

LUT – střední vzdálenost mezi sousedními profily elastinových lamel na řezu (lamellar unit thickness) (m)

L_V – délková hustota (length density) (m^{-2})

μ – skutečná (očekávaná a zpravidla neznámá) hodnota parametru

m – počet řezů vybraných z histologické série k hodnocení Cavalieriho metodou

MGT – zelený trichrom s Verhoeffovým železitým hematoxylinem modifikovaný dle Kočové [24]

MRI – magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

MVD – mikrovazální hustota (microvessel density) (m^{-2})

MTE – střední síla epitelu vypočtená jako poměr jeho objemu a jedné z ploch povrchu kolmých na *MTE* (mean thickness of epithelium) (m)

N – počet

n – počet vzorků; nebo náhodné číslo $\subset (0;1)$; nebo valence uzlového bodu

\hat{N} – celkový počet hodnocených objektů ve vzorku

NA – počet profilů trojrozměrných struktur na jednotku plochy řezu (z historických důvodů a věcně nesprávně prezentovaný jako počet objektů na jednotku plochy)

N_V – numerická hustota (numerical density) (m^{-3})

p – počet bodů pomocné mřížky v disektoru

P – počet průsečíků testovací sítě s hodnoceným objektem

(P) – množina bodů (**P**)

P_i – počet bodů pomocné bodové mřížky zasahujících referenční prostor obrázku s indexem *i*

P_L – teoreticky vypočtená intenzita počtu průsečíků profilu trhliny na řezu s profily hodnocené složky cévní stěny

P'_L – skutečně pozorovaná intenzita počtu průsečíků profilu trhliny na řezu s profily hodnocené složky cévní stěny

P_n – počet uzlových bodů kapilární sítě o valenci *n*

PCF – párová korelační funkce (pair-correlation function)

Q – počet objektů

Q⁻ – počet částic započítaných v disektoru

Q_A – počet profilů objektů v řezu o ploše *A* (m^{-2})

R_o – poloměr vnějšího obvodu tubulárního orgánu (m)

r_i – poloměr vnitřního obvodu tubulárního orgánu (m)

r – poloměr (radius) (m)

RAAA – ruptura aneuryzmatu abdominální aorty

ROI – oblast zájmu, např. definovaná uživatelem v obraze nebo v sérii obrazů (region of interest)

Σ – suma

ΣI – celkový počet průsečíků objektů s testovacím systémem

$\Sigma v(dis)$ – celkový objem disektorů (m^{-3})

S – povrch (topologický útvar), jehož kvantitu lze vyjádřit plochou povrchu (viz plocha, surface area, m^2)

SD – směrodatná odchylka výběru (standard deviation)

ssf – podíl řezů z celého vzorku v prvním stupni vzorkování optického frakcionátoru (section sampling fraction)

SURS – systematický rovnoměrný náhodný výběr (systematic uniform random sampling)

S_V – povrchová hustota (surface density) (m^{-1})

T – vzdálenost mezi dvěma sousedními hodnocenými řezy (m) nebo mřížková konstanta u lineárního testovacího systému (m)

t – síla řezu (m)

TH – tyrosinhydroxyláza

θ – odklon od vertikální osy u techniky VUR řezů ($^\circ$)

TNF- α – tumor necrosis factor- α

UCF – 2-D stereologický hodnotící rámeček (unbiased counting frame)

V – počet poledníků vymezujících vertikální segmenty na myšlené polokouli u vyhodnocování 3-D orientace

V – objem (volume) (m^3)

VEGF A-20 – vascular endothelial growth factor A-20

$V(ref)$ – referenční objem (m^3)

V_V – objemový podíl hodnocené složky v referenčním objemu vzorku (volume per volume, volume fraction)

VUR – vertikální rovnoměrný náhodný (vertical uniform random)

vWF – von Willebrandův faktor

WGA – wheat germ agglutinin

WT – zvířata bez cílené mutace s genotypem a fenotypem běžným pro daný druh, resp. bez známé mutace, která by měla vztah ke studovanému problému (wild type)

\bar{x} – aritmetický průměr výběru

XY – horizontální osy posuvu stolku mikroskopu

Z – vertikální osa posuvu stolku mikroskopu

3 Přehled problematiky a cíle práce

3.1 Motivace

Praktická výuka normální histologie a embryologie na Lékařské fakultě UK v Plzni je dosud zaměřena převážně na kvalitativní popis tkáňových řezů. Význam kvantifikace mikroskopických struktur však dlouhodobě roste, a to nejen při řešení výzkumných otázek, ale z hlediska výuky zejména v mikroskopické průpravě pro patologickou histologii, kde nezřídka histologický grading či klasifikace některých onemocnění vychází ze (semi)kvantitativního hodnocení preparátů. Metodika histomorfometrie je velmi často závislá na konkrétních možnostech softwarového vybavení různých pracovišť a není standardizována, což dosud podle našeho názoru komplikuje smysluplné zařazení této problematiky do výuky. Z hlediska studentů morfologických oborů se jako nejvhodnější jeví názorný přehled kvantifikačních metod s vysvětlením principů a s uvedením příkladů nezávislých na implementaci v konkrétním software. Ucelené a veřejně dostupné zpracování kvantitativní histologie v českém jazyce ve formě přístupné studentům morfologických oborů pre- i postgraduálních studijních programů chybí (podle současného vědomí navrhovatele). Ze zkušeností našeho pracoviště nabytých při práci s nadanými studenty vyplývá potřeba předložit studentům multimediální prezentaci, která by zahrnovala přehled dostupných metod, geometrických (stereologických) principů hodnocení počtu, délek, povrchů, objemů, orientace a anizotropie mikroskopických struktur. Současně je vhodné doprovodit každou z metod příkladem konkrétní aplikace na normální či patologické preparáty (včetně biopsií) a pro studenty s hlubším zájmem i srozumitelně vysvětleným matematickým aparátem, na němž je konkrétní metoda založena. Další kapitolou nesmírně významnou z hlediska diagnostiky tkáňových bločků je strategie vzorkování bločků a biopsií na úrovni makroskopické, úrovni výběru řezů z histologických sérií i na úrovni výběru mikroskopických zorných polí v rámci daného preparátu, tj. na výběru (samplingu) té části materiálu, na němž je diagnostika založena. Domníváme se, že z pochopení principů a omezení současných možností kvantitativní histologie budou profitovat pregraduální studenti zejména ve studiu preklinických oborů (patologie), na něž je studium histologie připravuje. Atlas poslouží i odborné veřejnosti po zveřejnění výsledků na WWW stránkách LF UK v Plzni bez jakýchkoliv omezení.

3.2 Cíle práce

- vytvoření přehledu historie a základních východisek stereologie jako geometrického a kvantitativního popisu mikroskopických objektů studovaných histologickými technikami,
- zpracování problematiky variability morfologických dat (biologická variabilita a variabilita způsobená výběrem),
- přehledné zpracování způsobu výpočtu ploch, povrchové hustoty, objemu, délky, mikrovazální hustoty, numerické hustoty buněk, hodnocení orientace a anizotropie,
- vytvoření obrazové dokumentace a flashových animací s příklady pro každou z kvantitativních metod,
- zpřístupnění výsledků studentům i odborné veřejnosti na WWW stránkách pracoviště (www.lfp.cuni.cz/histologie),

- lepší orientovanost studentů v možnostech a limitech kvantitativní histologie a porozumění některým histopatologickým diagnostickým schémátům založeným na (semi)kvantitativním hodnocení preparátů.

3.3 Historie kvantifikace v mikroskopii a přehled literatury

3.3.1 Základní východiska stereologie

Historický vývoj kvantitativních metod v mikroskopických oborech se z velké části kryje s vývojem stereologie [5, 30]. Tento termín vychází z řeckého $\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\acute{o}\varsigma$, což lze přeložit jako „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 5.4, str. 19).
- 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 [50] je princip užíván k odhadu plochy a délky objektů (dále viz oddíl 5.5, str. 19).
- 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 5.4, str. 19). V r. 1898 byl Delesseho přístup doplněn rovněž empirickým Rosiwalovým pravidlem usnadňujícím odhad plošných podílů pomocí praktičtějších podílů délkových.

3.3.2 „Unbiased stereology“

V 70. letech 20. století přibývá stereologických prací v Journal of Microscopy, Acta Stereologica (nyní Image Analysis & Stereology), Microscopy Research and Technique a v dalších

časopisech (především z oboru neurověd). 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 ($\sigma\tau\acute{o}\chi\omicron\varsigma$ – “cíl”, stochastický = náhodný) 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 nezatíženým *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 apod.).

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 [51], 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. 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 [28]. Kritický rozbor Abercrombieho metody, používané pro výpočet skutečného počtu objektů ve 3-D korekcí počtu profilů objektů hodnocených na řezech, přináší [18] (spolu s rozбором dalších empirických postupů). 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 [42], je první robustní, modelovými předpoklady a korekčními faktory nezatíženou metodou pro odhad počtu objektů v objemové jednotce tkáně. Princip je i s potřebným aparátem popsán v oddílu 5.8 (str. 22). V roce 1985 je publikována technika jiné stereologické objemové sondy, tzv. „unbiased brick“ [20], která slouží ke stejnému účelu jako disektor, ovšem postupuje podle odlišných pravidel, která jsou 3-D rozšířením 2-D nevychýleného hodnotícího rámečku (unbiased counting frame) (5.7, str. 21) publikovaného již dříve [12]. Kombinace disektoru se systematickým vzorkováním přinesla techniku frakcionátoru (fractionator) [13] 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 čás-

tic aplikací sondy zvané nukleátor (nucleator) na izotropní či vertikální uniformní řezy a odhad objemově váženého středního objemu objektů [15]. 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).

Výsledky novějších stereologických metod tak nejsou zatíženy výchyly způsobenými různou mírou plnění modelových předpokladů o povaze analyzovaných tkání, protože uvedené metody již tyto předpoklady neobsahují.

3.3.3 Variabilita výsledků a optimalizace biologických studií

Při podrobnějším studiu variability dat [14, 17] je užitečné si uvědomit, 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“ (podrobněji viz oddíl (6)).

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 atd.). Popsaný přístup bývá označován též jako „Do more, less well“ [16]. Pokud lze např. z literatury odhadnout rozdíl v hodnotách sledovaného parametru mezi porovnávanými skupinami, je v konkrétním případě ještě vhodné upravit volbu rozsahu výběru (tj. počet jedinců ve skupině) k zajištění požadované síly testu.

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).

4 Analýza obrazu a stereologie

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 pořázené v čase (např. time-lapse techniky) či v různých místech zkoumaného objektu (např. tomografie). Vzhledem k tomu, že předkládaný atlas je zaměřen zejména na stereologické metody (viz. Oddíl 5), odkazujeme zájemce o podrobné informace o obrazové analýze na obsažné a současně přehledné monografie [25, 35, 53].

4.1 Matematická morfologie

Při zpracování obrazu je častým úkolem segmentace, tj. odlišení oblastí či objektů našeho zájmu od námi definovaného pozadí. Takto segmentovaný či naprahovaný 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 – odebrání povrchové vrstvy objektu,

dilatace – přidání povrchové vrstvy objektu,

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

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

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

Eroze, dilatace, otevření a uzavření jsou definovány typem matice (kernel, tj. strukturální 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 [53].

4.2 Výhody analýzy obrazu a stereologie

Obrazová analýza často využívá postupů, při nichž po úpravě a filtrování mikrofotografií dochází k segmentaci obrazu (např. pomocí různých typů prahování a obdobných postupů)

a aplikaci operací matematické morfologie a měřících nástrojů na segmentované části obrazu. Většinu kroků lze snadno automatizovat do rychlých procedur (včetně uživatelsky editovatelných skriptů v jazycích typu C či JAVA), v nichž mohou být zařazeny různé interakce s uživatelem (např. kontrola správnosti a odstranění chyb automatických segmentačních postupů, drobné úpravy apod.). Proto jsou nástroje obrazové analýzy v současné dostupné podobě zpravidla efektivnější pro zpracování velkého množství preparátů spíše uniformního vzhledu a kontrastu a s ne příliš častými artefakty vzniklými při preparaci, krájení či barvení vzorků. Sofistikované programy dokáží kombinovat řadu segmentačních kritérií a disponují mnohdy schopností „učit se“ na základě interakce s uživatelem, který má zpravidla jasnou představu, které části preparátu mají být segmentovány a které hrají pro daný problém úlohu pozadí.

V realitě se však velmi často setkáváme právě s preparáty nestejnoměrné barvitelnosti a s řadou artefaktů, což nemusí být vždy pouze důsledek nekvalitního laboratorního zpracování, ale může být ovlivněno okolnostmi odběru vzorku, které histologická laboratoř nemůže ovlivnit, dále např. změnou či testováním nových histologických detekčních systémů apod. Zejména vzorky patologických tkání či vzorky archivní se mohou z hlediska barvicích technik chovat nestandardně. Některé typy fragilních vzorků se i přes využití speciálních zalévacích postupů drobí či v nich přinejmenším vznikají četné praskliny narušující souvislost oblastí, které mají být vybrány k segmentaci, či souvislost referenčních ploch. Využitelnost nadefinovaných rutin v obrazových analyzátořech a je pak u takových vzorků omezená, což vyžaduje časté zásahy a korekce obsluhy, čímž se zase snižuje reprodukovatelnost hodnocení. Časová náročnost identifikace a odstraňování chyb vzniklých automatickými rutinami nezřídka řádově dosahuje (či překračuje) úspory vzniklé automatizací.

V současnosti má většina stereologických postupů podobu interaktivních či semi-automatických postupů, při nichž zpravidla uživatel sám na základě svých zkušeností rozhoduje, zdali je či není započítána platná interakce vyhodnocovaného objektu s testovacím systémem. Tím odpadá řada potenciálních zdrojů chyb měření, neboť pro každou interakci se lze rozhodnout v rámci binární logiky ano/ne, což přispívá k vysoké reprodukovatelnosti [47, 46] většiny metod. Počítání událostí s sebou obecně nese méně chyb, nežli měření. Automatizace stereologických metod je naproti tomu dosti omezená, ale vzhledem k tomu, že hodnocení provádí pozorovatel se svými zkušenostmi, jsou stereologické postupy často velmi robustní vůči odchýlkám v barvení a některým artefaktům. To má za důsledek lepší využití materiálu pro sampling, neboť lze do hodnocení zahrnout prakticky všechny preparáty produkované při rutinním provozu laboratoře, včetně těch, u nichž by nestejnoměrnost barvení, praskliny, prach, či jiné artefakty neúnosně komplikovaly obrazovou analýzu. Využitelnost naprosté většiny řezů je rovněž podmínkou pro efektivní vzorkování bločků a snižuje variabilitu výsledků. Uvedené ovšem neznamená, že by bylo možné v přípravě preparátů pro stereologii rezignovat na maximální kvalitu přípravy preparátů.

5 Stereologie

Ke studiu odvození níže uvedených vztahů a širších souvislostí lze doporučit přehledné učebnice stereologie a morfometrie [19, 11, 30, 36, 35], které byly současně velkou inspirací pro předkládanou příručku. Konkrétní aplikace stereologických metod v cévní biologii jsou rozebrány i s příklady v přehledném článku [45].

5.1 Dimenze sond a kvantifikovaných veličin

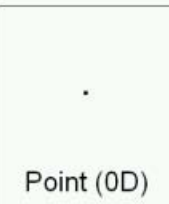
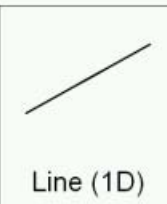
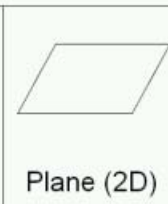

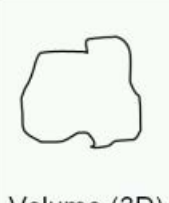

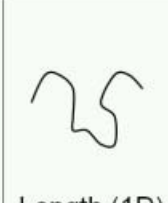
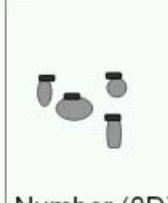
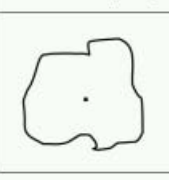
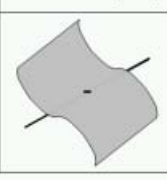
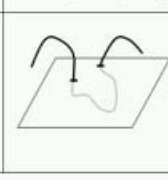
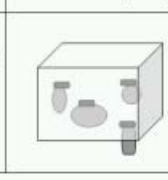
Správný postup vyžaduje určitý vztah mezi dimenzemi testovací geometrické sondy a dimenzemi kvantifikované veličiny u stereologických parametrů prvního řádu (V, A, L, N). Jako parametry prvního řádu se označují:

V – objem (volume)

A – plocha (area)

L – délka (length)

N – počet (number)

Probe	 Point (0D)	 Line (1D)	 Plane (2D)	 Volume (3D)
\cap	 Volume (3D)	 Surface (2D)	 Length (1D)	 Number (0D)
=	 Countable events	 Countable events	 Countable events	 Countable events

Obr. 1: Součet dimenzí veličiny a stereologické sondy je vždy roven třem. Přepracováno podle Howard et Reed, 2005 [19].

Dimenze geometrické sondy	Dimenze kvantifikované veličiny
Bod (L^0)	Objem (L^3)
Linie (L^1)	Plocha povrchu (L^2)
Rovina (L^2)	Délka (L^1)
Objem (L^3)	Počet (L^0)

Tabulka 1: Vztahy mezi rozměry sond a kvantifikovaných veličin

Abychom se nedopustili zásadní chyby vedoucí k nenapravitelné výchylce v námi získaných datech (tzv. stereological bias), nesmí celkový počet dostupných dimenzí ve tkáni (tj. tři) překračovat součet dimenzí geometrické sondy a kvantifikované veličiny.

Pokud bychom například při úloze, jejímž cílem je „počítání buněk“, zhodnotili pouze počet (bezrozměrný, tj. 0-D) profilů těchto buněk v rovině řezu tkání (řez je idealizovaně dvojrozměrný, 2-D), činí tento součet $2 + 0 = 2$, což je menší nežli 3 dimenze skutečné tkáně obsahující buňky. Buňky se totiž jakožto objekty, jejichž trojrozměrnost nemůžeme v mikroskopickém měřítku zanedbat, vyskytují i v třetí dimenzi analyzované tkáně.

Obecně se tak díky své velikosti a orientaci mezi sebou liší pravděpodobností, že se jejich profily ocitnou v rovině řezu, výsledkem čehož je vychýlený kvantitativní údaj, v němž jsou nadhodnoceny buňky větších rozměrů a buňky orientované svou delší osou kolmo na řeznou rovinu.

5.2 Strategie zajištění náhodnosti stereologických sond vůči vzorkům

Aplikace stereologických sond na hodnocené vzorky musí být náhodná a tato náhodnost musí být ve smyslu vzájemné pozice (posunu, pro všechny veličiny), tak ve smyslu orientace (u linií a povrchů). Jak již bylo zmíněno, historicky je s touto náhodností nakládáno dvěma odlišnými způsoby.

Stereologie založená na modelových předpokladech (model-based stereology) – zahrnuje metody, v jejichž základech jsou předpoklady o určité velikosti, tvaru a orientaci kvantifikovaných objektů. Taková metoda může například poskytovat spolehlivé výsledky tehdy, je-li aplikována na buňky přibližně kulovitěho tvaru, uniformní velikosti a izotropního rozložení ve tkáni. Vzhledem ke zjevné nereálnosti takovýchto předpokladů jsou reálné biologické vzorky idealizovány a připodobněny modelovým vzorkům, které požadavkům dané metody vyhovují. Reálné odchylky od těchto modelů jsou poté korigovány různými konstantami, korekčními faktory, apod. Vzhledem k tomu, že je velmi obtížné určit přesně míru odchylky reálné tkáně od modelového idealizovaného vzorku, zůstává v principu i velikost a použití těchto korekčních faktorů zpochybnitelné a mnohdy prakticky neověřitelné. Tato skupina metod dominovala ve stereologii cca do 80. let 20. století a příkladem může být:

- „počítání buněk“ na základě počítání jejich profilů na řezu,
- odhady „délky střevních klků“ z délky profilů střevních klků na řezu určité orientace, apod.

Stereologie založená na vhodném designu aplikované metody (design-based stereology) – zahrnuje metody, jejichž schopnost poskytovat validní data nezávisí na restriktivních předpokladech o vlastnostech (tvaru, velikosti, distribuci) kvantifikovaných struktur, nýbrž na vhodném vzorkování hodnocených mikroskopických částí objektů. Strategie nestranného vzorkování a randomizace sond vůči vzorkům je základem těchto metod a je minimálně stejně důležitá, jako vlastní aplikace geometrických sond či správnost interaktivního hodnocení preparátu pozorovatelem. Vzhledem k absenci *a priori* předpokladů o vlastnostech vzorku se tyto metody označují také jako „assumption-free“ a nepoužívají žádné „korekční faktory“. Od 80. let 20. století se tyto metody stávají metodami volby či zlatými standardy pro většinu aplikací stereologie. Příkladem může být:

- dvojrozměrný hodnotící rámeček (unbiased counting frame) pro planární studie,
- disektor,
- frakcionátor, atd.

5.3 Poměry a hustoty

Kromě parametrů prvního řádu lze vyjadřovat výsledky i formou vzájemných poměrů, k nimž nejčastěji patří:

Objemový podíl (volume fraction, volume density), V_V , podíl vybrané fáze v referenčním objemu,

⇒ např. objemový podíl tunica muscularis v jednotce objemu střevní stěny.

Povrchová hustota (surface density), S_V , plocha povrchu vztažená na jednotku objemu (mm^{-1})

⇒ např. resorpční povrch střevního epitelu v jednotce objemu střevní stěny.

Délková hustota (length density), L_V , délka lineárního útvaru vztažená na jednotku objemu (mm^{-2})

⇒ např. délka kapilár v jednotce objemu lamina propria mucosae střevní stěny.

Numerická hustota (numerical density), N_V , počet objektů nacházející se v jednotce objemu (mm^{-3})

⇒ např. počet osteocytárních lakun přítomných v objemové jednotce kompaktní kosti.

Poměry a hustoty mohou být výrazně ovlivněny kontrakcí tkáně během fixace a vlivem teplotních změn při zalévání řezů v parafinovém procesu, ev. různou mírou jejich rozvinutí po napnutí na sklíčko. Navíc tkáně pocházející z různých orgánů a z různých jedinců rozličného stáří a rozličného stupně hydratace jeví odlišnou míru těchto objemových změn (tzv. „differential shrinkage“). To může vést k chybné interpretaci těchto poměrů. Příkladem toho může být tradovaný masivní úbytek neuronů v mozku starších osob vyvozený na základě nižší numerické hustoty neuronů, která ovšem byla z velké části způsobena výraznější kontrakcí více hydratované tkáně mladších jedinců, což vedlo k nepoměrně menší hodnotě jmenovatele numerické hustoty a tím k přecenění počtu neuronů na jednotku objemu ve srovnání v méně se kontrahující tkáni starších jedinců. Při hodnocení referenčního objemu je tedy třeba mít toto na paměti a vyvarovat se při interpretaci výsledků této „referenční pasti“ (reference trap, podrobněji viz [6]), což hrozí zejména v případech, kdy jsou závěry vyvozovány pouze z poměrů a hustot. Stereologické poměry a denzity lze plnohodnotně interpretovat jedině tehdy, je-li referenční prostor předem znám, nikoliv měřen. Toho lze prakticky dosáhnout např. odběrem přesně známého objemu tkáňového vzorku kalibrovanými biotickými jehlami.

5.4 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 $\text{est } A$ 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:

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

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.

5.5 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 $V(ref)$.

Dvojměrným 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:

$$est L_V = 2 \cdot Q_A, \quad (6)$$

kde Q_A je počet profilů zachycených systémem IUR rovin vztážený na součet ploch těchto testovacích rovin.

Odhad délek lineárních struktur ve 2-D lze s výhodou provést pomocí modifikované Buffonovy metody, při níž je délka objektů \hat{L} odhadována z celkového počtu průsečíků $\sum I$ testovacího systému (linie či křivky) s hodnocenými vláknitými objekty dle rovnice 7.

$$\hat{L} = \frac{\pi}{2} \times \frac{a}{l} \times \sum I, \quad (7)$$

kde $\frac{a}{l}$ je poměr plochy a délky jednotkového tvaru testovacího systému (např. obdélníku či čtverce u pravoúhlých lineárních testovacích systémů).

V rámci řezů pak lze vyjadřovat i délkovou hustotu hodnocených profilů v řezu (intensity of planar fibre process) L_A dle rovnice 8:

$$L_A = \frac{L}{A}, \quad (8)$$

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

5.6 Odhady plochy povrchu a povrchové hustoty

Povrchová hustota je často užívaným kvantitativním parametrem ploch v objemovém elementu vzorku a je definována podle rovnice 9:

$$S_V(Y, ref) = \frac{S(Y)}{V(ref)}, \quad (9)$$

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 10:

$$est S_V = \frac{2I_L}{L_V(test)}, \quad (10)$$

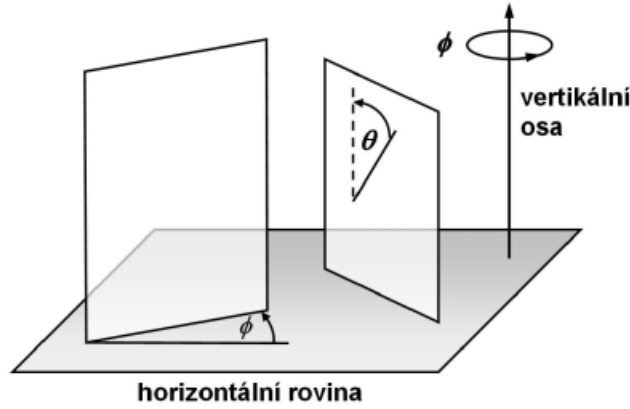
kde I_L je počet průsečíků povrchu s lineární testovací sondou o délkové hustotě $L_V(test)$.

Při použití většího počtu obrázků k odhadu povrchové hustoty počítáme tento parametr dle rovnice 11:

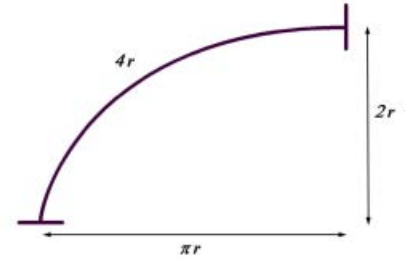
$$est S_V(Y, ref) = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n I_i}{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}, \quad (11)$$

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 plochy 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 (Obr. 2). Horizontální rovinu si u dané série vzorků sami volíme a termíny „horizontální“ a „vertikální“ nemají žádný vztah k anatomickým rovinám, neboť metodu lze aplikovat na celé orgány, jejich části nebo např. jehlové bioptické vzorky. 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 (Obr. 3), 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.



Obr. 2: Princip vertikálních náhodných řezů pro odhad povrchu a objemu (VUR). Při abitrárně zvolené horizontální rovině je provedena rotace bločku o náhodný úhel ϕ kolem vertikální osy. Řezná rovina při histologickém zpracování je pak kolmá na rovinu horizontální.



Obr. 3: Geometrické vlastnosti cykloidy.

5.7 Kvantifikace mikrocév

Při kvantifikaci kapilár, pre- a postkapilár ve větších tkáňových bločcích je možné zvolit několik přístupů:

1. V sérii optických řezů z konfokálního mikroskopu lze přímo sledovat jednotlivé kapiláry a měřit či odhadovat jejich délku $L(cap, ref)$ a vyjádřit ji jako délkovou hustotu kapilár na jednotku objemu $L_V(cap, ref)$ nebo ji vztáhnout na jednotku délky přilehlých struktur (např. svalových vláken těmito kapilárami zásobovaných, viz [7]).
2. Topologicky lze systém kapilár charakterizovat jako trojrozměrnou síť s uzlovými body, v nichž se kapiláry větví. Je tedy možné v silných izotropních rovnoměrných náhodných (IUR) řezech optickým disektorem (viz oddíl 5.8) kvantifikovat numerickou hustotu těchto uzlových bodů (míst větvení kapilár). Ve stejných řezech jejich délkovou hustotu $L_V(cap, ref)$. Kapilára je definována jako úsek cévy mezi dvěma uzlovými body. Konektivita sítě kapilár je popsána pomocí těchto uzlových bodů a pro každý z pozorovaných uzlových bodů je zaznamenán počet cév, které se v něm stýkají (valence uzlového bodu), z čehož vyplyne parametr P_n jako počet uzlových bodů o valenci n . Odtud lze vypočítat numerickou hustotu kapilár, tj. počet kapilár v jednotce objemu tkáně $N_V(cap, ref)$ podle rovnice 12, viz [26].

$$N_V(cap, ref) = \frac{N(cap)}{V(ref)} = \frac{\sum (\frac{n-2}{2} \cdot P_n) + 1}{\sum v(dis)} \quad (12)$$

3. Máme-li k dispozici pouze jednotlivé histologické řezy, je možné i 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 13:

$$Q_A = \frac{Q}{A}, \quad (13)$$

kde Q je počet profilů mikrocév zachycených na řezu o referenční ploše A . Pravidlo k započítání profilů objektů ve 2-D je znázorněno na Obr. 5. Plochu hodnotícího rámečku známe z kalibrace, event. ji můžeme při nepravidelnostech obrysů referenční plochy hodnotit bodovou testovací mřížkou. Tento přístup je vhodné doplnit analýzou (an)izotropie Q_A , tj. porovnat hodnoty tohoto parametru ve třech na sebe kolmých rovinách, viz [46].

5.8 Odhady numerické hustoty částic disektorem

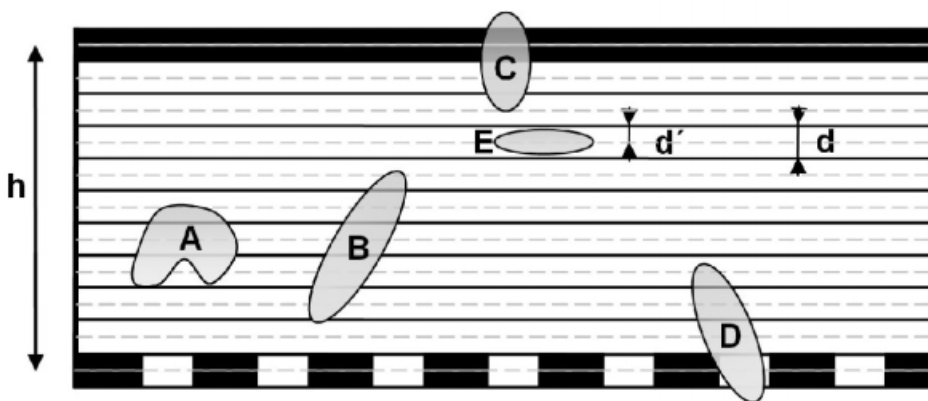
Disektor je stereologická objemová testovací sonda k počítání objektů v referenční objemové jednotce. Z počtu objektů a znalosti referenčního objemu můžeme odhadnout jejich numerickou hustotu. Dodržení pravidel disektoru zaručuje výsledek nevychýlený (unbiased) rozdíly ve velikosti a orientaci počítaných objektů (např. buněk). V závislosti na technice pořízení řezů rovinami tkáňového bločku lze použít disektor:

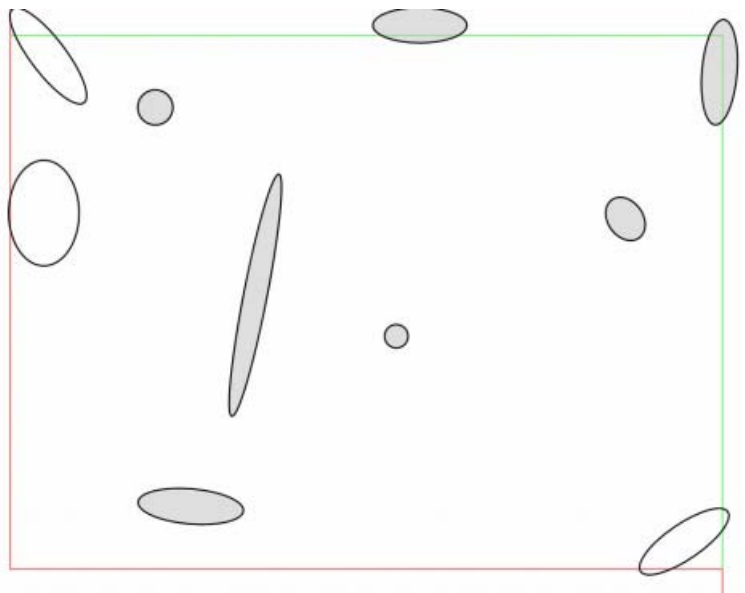
- fyzický** – založený na obrazech dvou či více fyzických řezů registrovaných v ose Z ,
- optický** – postupným proostřováním preparátu procházíme jednotlivé roviny, v nichž počítáme jednotlivé objekty.

Výpočet odhadu hustoty provádíme podle rovnice 14:

$$est N_v(par) = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i^-(par)}{\sum_{i=1}^n P_i(ref)} \cdot \frac{p}{a \cdot h}, \quad (14)$$

kde $est N_v(par)$ je odhad (estimátor) počtu částic v objemové jednotce referenčního prostoru, $Q^-(par)$ 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. Grafické znázornění bočního pohledu na 3-D sérii řezů disektoru podává Obr. 4. V rovině jednotlivých řezů se pak aplikuje počítací pravidlo shodné s 2-D hodnotícím rámečkem, jak je popsáno u Obr. 5.





Obr. 5: Schéma mikrofotografie s profily několika objektů (např. krevních cév) a s projekcí hodnotícího rámečku sestávajícího ze dvou povolených (zeleně) a dvou zakázaných (červeně) linií. Kolem rámečku je ještě bezpečnostní pásmo umožňující vyhodnotit event. kontakt profilů s prodloužením zakázaných linií směrem vzhůru i dolů do nekonečna. Započítány jsou profily vyznačené šedě, které plně spadají dovnitř rámečku nebo protínají povolené linie a současně neprotínají linie zakázané.

5.9 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 5.8, str. 22) a jedno- či víceúrovňového vzorkování (oddíl 6.4.1, str. 34). 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 15:

$$est \hat{N} = \frac{Q}{f} = \frac{Q}{ssf \cdot asf \cdot hsf}, \quad (15)$$

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.

5.10 Využití délkové hustoty pro analýzu trhlín

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 trhlina 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 16 [43] 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:

$$\text{est } P_L = l \cdot \frac{2}{\pi} \cdot L_A, \quad (16)$$

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.

5.11 Relative labelling index

Tento nástroj [29] je užitečný v případě, že potřebujeme zodpovědět otázku, zda jsou objekty (buňky, profily buněk) v různých kompartmentech (např. jednotlivých vrstvách střešní stěny nebo cévní stěny apod.) distribuovány náhodně a pokud nejsou, který morfologicky definovatelný kompartment (např. vrstva) je daným typem buněk (objektů) preferován? Nulovou hypotézu o rovnoměrné distribuci objektů v kompartmentech lze testovat následujícím způsobem:

1. Stanovíme plošné poměry A_A či objemové poměry V_V jednotlivých kompartmentů v celkovém referenčním prostoru např. pomocí bodové testovací mřížky,
2. z poměrů A_A , resp. V_V kompartmentů získáme poměrné předpokládané náhodné rozdělení objektů mezi kompartmenty,
3. spočítáme skutečný výskyt objektů v každém z testovaných kompartmentů.
4. spočítáme relative labelling index (RLI) jako poměr (pozorovaný/předpokládaný počet objektů) pro každý kompartment (μm^{-2}),
5. pro kompartmenty osídlené úměrně jejich plošnému či objemovému podílu získáme $RLI \approx 1$, a pro preferenčně osídlené kompartmenty $RLI > 1$,
6. k testování statistické významnosti odchylek skutečných hodnot RLI od hodnot očekávaných podle plošných a objemových poměrů kompartmentů použijeme např. χ^2 analýzu.

Pozn: Termín „relative labelling index“ nebo „labelling index“ je používán i ve zcela jiném významu pro označení poměrného zastoupení buněk (či jejich profilů na řezu) označených libovolnou metodou v celkové populaci buněk (či jejich profilů na řezu), např. v histopatologické charakteristice tumorů, buněk získaných z exsudátů apod.

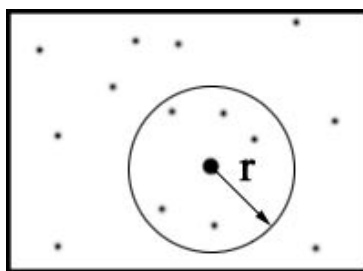
5.12 Analýza shluků a kolokalizace objektů

Tyto techniky jsou určeny k testování statistické ne/náhodnosti rozložení buněk v referenčním prostoru prostřednictvím analýzy lokálních maxim (clustering) a minim (inhibition) denzity objektů. Využívá funkce popsané rovnicí 17:

$$PCF(r) = \frac{1}{2\pi r} \cdot \frac{dK(r)}{dr}, \quad (17)$$

kde PCF je párová korelační funkce [43], K je poměr počtu objektů ve vzdálenosti nižší nežli r od typického objektu určitého typu ku průměrné hustotě těchto částic.

Potřebný aparát, softwarové implementace a i příklady aplikací metody jsou podrobně popsány [34].



Obr. 6: Grafické znázornění K-funkce podle [34].

Kolokalizace je obdobnou analýzou pro objekty více než jedné třídy.

5.13 Analýza anizotropie struktur ve 2-D

Popisujeme-li distribuci objektů v histologických řezech, může být užitečné posoudit např. jejich střední vzdálenost ve směru osy X a ptát se, zdali je stejná, jako střední vzdálenost těchto objektů ve směru osy Y (tj. ve směru kolmém na X). Pokud by tyto střední vzdálenosti ve dvou na sebe kolmých směrech byly podobné, můžeme hovořit o 2-D izotropním rozmístění objektů na řezu. Pokud by se vzdálenosti významně lišily, svědčilo by to o vrstevnatosti v rozložení objektů, resp. o jejich 2-D anizotropii.

Vhodným nástrojem pro tento úkol je statistické vyhodnocení Delaunayovy triangulace (DT) [8] spojující těžiště analyzovaných objektů. DT pro množinu bodů \mathbf{P} v rovině je taková triangulace $DT(\mathbf{P})$, kdy se žádný z bodů množiny \mathbf{P} nenachází uvnitř kružnice opsané kterémukoliv trojúhelníku (tj. uvnitř takové kružnice, která u daného trojúhelníku prochází všemi třemi vrcholy). $DT(\mathbf{P})$ maximalizuje nejmenší vnitřní úhly všech trojúhelníků spojujících množinu bodů (Obr. 7).

Po označení zkoumaných objektů a po jejich triangulaci (například pomocí software Qhull [3]) vyhodnocujeme výslednou síť trojúhelníků tak, že vypočítáme parametry takové sítě geometrických objektů, která je za daných okolností nejvhodnějším modelem pro skutečně triangulovanou síť. Modelovými sítěmi mohou být např. síť čtyřúhelníků, zejména však trojúhelníků rovnostranných (v případě izotropní sítě) či rovnoramenných (v případě anizotropie). Lze pak vypočítat strany a výšky těchto troj- či čtyřúhelníků a rozhodnout, který z nich se nejvíce blíží skutečnému rozmístění sledovaných objektů v ploše.



Obr. 7: Delaunayova triangulace bodů.

5.14 Petri-metrics

Jako „petri-metrics“ se označují dvojrozměrné stereologické techniky používané pro řešení častých rutinních biologických problémů (např. odhady délek planárních struktur či počítání buněk), u nichž není zapotřebí brát v úvahu třetí rozměr. Příkladem jsou například *in vitro* studie v kultivačních miskách či sklíčcích, vyžadující počítání buněk a mikrostruktur v bakteriologii, mykologii, cytologii, při výzkumu kancerogeneze, angiogeneze apod.

5.14.1 2-D frakcionátor

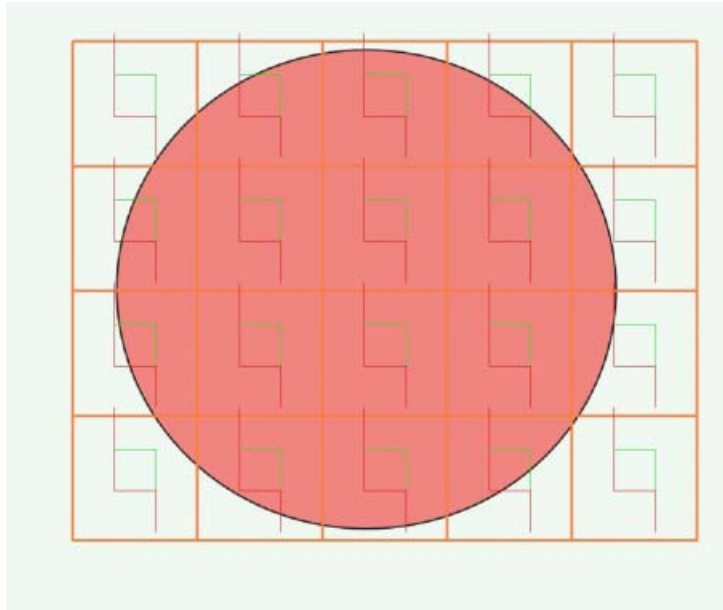
Plocha kultivační misky či sklíčka může obsahovat miliony buněk. Jednou z možností je spočítat „hrubou silou“ všechny dostupné objekty, nejčastěji s využitím automatizovaného zařízení. Druhou strategií je provést nejprve vzorkování a vyhodnotit pouze výběr ze základní populace všech zorných polí, výsledkem čehož je ovšem pouze *odhad* skutečného počtu přítomných objektů. Dvojrozměrný frakcionátor je obdobou trojrozměrného, tj. jedná se o techniku nezávislou na kalibraci a zvětšení, která je založena na spočítání objektů v přesně známé části (frakci) celého prostoru.

Použijeme-li jako příklad Obr. 8, pak plocha hodnotícího rámečku (UCF, unbiased counting frame) činí:

$$UCF = \frac{1}{9} \cdot (\text{plocha čtyřúhelníku}). \quad (18)$$

Celkový počet 2-D objektů pak činí:

$$N_{total} = \sum Q \times \frac{1}{asf} = \sum Q \times 9. \quad (19)$$



Obr. 8: Mřížka pro aplikaci 2-D fracionátoru. Pro první odhad je zapotřebí napočítat $100 < \sum Q < 300$ bodů \Rightarrow v závislosti na variabilitě mezi porovnávanými Petriho miskami lze vystačit i s nižším počtem průsečíků.

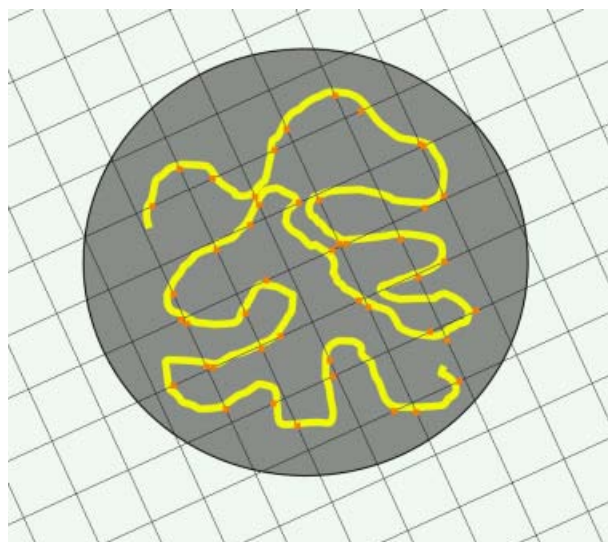
5.14.2 Odhad délek ve 2-D pomocí pravoúhlé lineární sítě

Tyto techniky se používají např. pro *in vitro* hodnocení růstu neuritů, cév, vláknitých mycelií apod. Využívá modifikovaný Buffonův princip:

$$\hat{L} = \frac{\pi}{2} \times \frac{a}{l} \times \frac{1}{asf} \times \sum I. \quad (20)$$

Mřížkovou konstantu $\frac{a}{l}$ (tj. plocha testovacího systému vztažená na jednotku délky) si pro čtvercovou testovací mřížku (Obr. 9) s hranou čtverce T můžeme vyjádřit jako:

$$\frac{a}{l} = \frac{T^2}{2T} = 0,5 \cdot T. \quad (21)$$

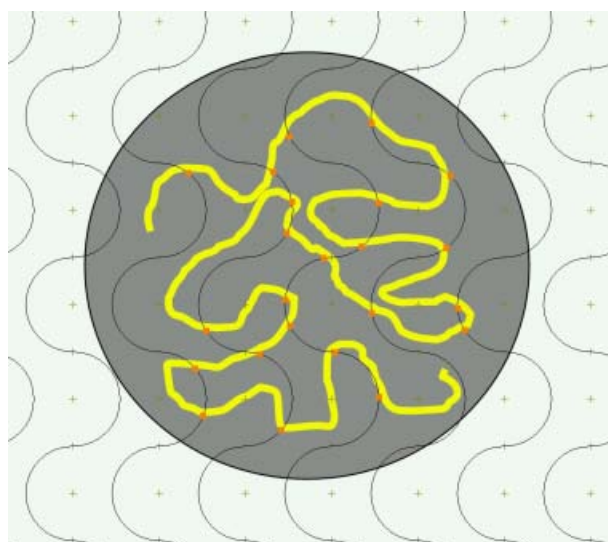


Obr. 9: Čtvercová testovací mřížka pro odhad délek ve 2-D byla vůči podkladu náhodně roto-
vána a posunuta.

5.14.3 Odhad délek ve 2-D pomocí cirkulárních oblouků

Pro praktické použití je výhodné použít takový typ mřížky, který používá izotropní li-
neární systém, čímž odpadá nutnost náhodně rotovat mřížku vůči podkladu. Příkladem
takového systému je Merzova mřížka. Jednotkovým tvarem této mřížky jsou cirkulární
oblouky, kdy celému oblouku o délce $\pi \cdot d$ lze opsat obdélník o výšce průměru kruhu d a
délce $2d$. Výpočet lze provést dle rovnice 20 s tím, že mřížková konstanta pro Merzovu
mřížku (Obr. 10) pak činí:

$$\frac{a}{l} = \frac{(2 \cdot d) \cdot d}{\pi \cdot d} = \frac{2d}{\pi}. \quad (22)$$



Obr. 10: 2-D izotropní a náhodně posunutá cir-
kulární testovací mřížka. Při 23 pouhých průse-
čících činil rozdíl v odhadu délky oproti před-
chozímu obrázku č. 9 jen 4 %.

5.15 Odhad síly stěny tubulárních struktur

V případě odhadu střední síly trubicovitých struktur (např. střevní stěny, ureteru apod.), jejichž vnitřní nebo vnější povrchy mají komplikovaný tvar, jsou zřasené apod., lze použít následující postup. Uvažujme úsek střevní trubice o délce L , kde:

$estV_{wall}$ je objem střevní stěny odhadnutý dle Cavalieriho principu,

$estV_{intestine}$ je objem celého úseku střeva (včetně lumen) o délce L ,

$estV_{lumen}$ je objem střevního lumen odhadnutý dle Cavalieriho principu nebo vyjádřený jako rozdíl dle rovnice 23:

$$estV_{lumen} = estV_{intestine} - estV_{wall}, \quad (23)$$

C je vnější obvod profilu střevní trubice na řezu, přičemž rovina řezu je přibližně kolmá na dlouhou osu střevní trubice; tuto hodnotu lze obvykle s dostatečnou přesností změřit přímo z nasnímaných či naskenovaných řezů, protože vnější obvod pokrytý serózou má jednoduchou morfologii,

R_o je poloměr vnějšího obvodu profilu střeva na řezu dle rovnice 24,

$$R_o = \frac{C}{2 \cdot \pi}, \quad (24)$$

r_i je poloměr vnitřního obvodu profilu střeva na řezu.

Střední sílu stěny si pak lze definovat dle rovnice 25:

$$\text{střední síla stěny} = R_o - r_i \quad (25)$$

Parametr r_i však popisuje poloměr střevního lumen, což je vzhledem k členitosti střevního povrchu spíše virtuální parametr, který nelze přímo změřit. Lze jej však vypočítat následujícím postupem dle rovnic 26–28:

$$estV_{lumen} = \pi \cdot r_i^2 \cdot L \quad (26)$$

$$r_i^2 = \frac{V_{lumen}}{\pi \cdot L} = \frac{V_{intestine} - estV_{wall} \text{ WS}}{\pi \cdot L} = \frac{(\pi \cdot R_o^2 \cdot L) - estV_{wall} \text{ WS}}{\pi \cdot L} \quad (27)$$

$$r_i = \sqrt{\frac{(\pi \cdot R_o^2 \cdot L) - estV_{wall} \text{ WS}}{\pi \cdot L}}. \quad (28)$$

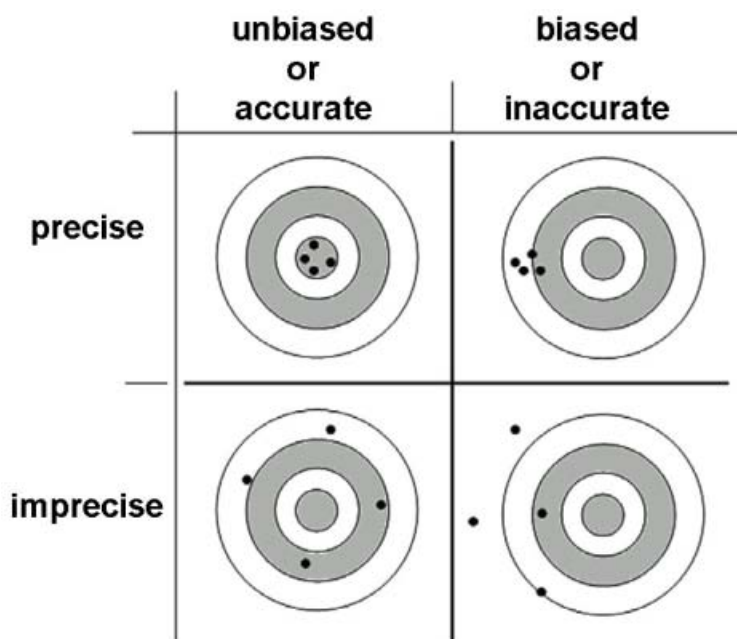
6 Výchylka, správnost a přesnost

Kromě vlastních technik počítání objektů, délek, ploch, objemů apod., je nedílnou součástí kvantitativních studií i statistické hodnocení výsledků, analýza správnosti a přesnosti odhadů a design vzorkování analyzovaných částí vybraných z původně makroskopické úrovně až na úroveň mikroskopickou.

Termín bias se při analýze variability používá ve smyslu výchylky či předpojatosti. Je-li $E(X)$ experimentálně zjištěná hodnota libovolného parametru X a μ skutečná (tj. očekávaná a neznámá) hodnota, můžeme bias vyjádřit jako:

$$\text{bias} = E(X) - \mu. \quad (29)$$

Je třeba rozlišovat **správnost** a **přesnost** našich výsledků. Ve stereologii je termínem **správnost** obvykle označována míra, s níž odhady parametrů (zásahy v terči) konvergují k očekávané hodnotě (střed terče). Naproti tomu **přesnost** je používána ve smyslu opakovatelnosti výsledků, tj. jakožto míra shody mezi předchozími a následujícími měřeními (reproducibility, repeatability). Graficky lze jejich vztah vyjádřit pomocí analogie při vyhodnocování zásahů v terči (Obr. 11), kdy výsledky mohou být přesné a současně správné, nebo přesné a nesprávné, nebo nepřesné (s větším rozptylem) a se správnou střední hodnotou, či nepřesné a se střední hodnotou vychýlenou od středu.



Obr. 11: Vztah správnosti (accuracy) a přesnosti (precision), upraveno podle [19, 27].

6.1 Příklady zdrojů výchylky

Odhad tedy může být nesprávný a mírou této nesprávnosti je výchylka (bias, deviation). Z hlediska designu experimentu a volby vhodné metody a interpretace výsledků nás bude nadále zajímat zejména systematická výchylka (systematic error, systematic bias), která se může skládat ze:

stereologické výchylky (stereological bias), která je důsledkem:

- nesplněných předpokladů kladených zvolenou metodou na kvantifikované objekty,
- nesplněním nutnosti vzájemného vztahu mezi počtem dimenzí sondy a hodnoceného parametru,
- použitím korekčních faktorů apod,

(viz oddíl 5.2). Při použití principiálně vychýlených metod založených na modelových předpokladech je tato výchylka neodstranitelná.

výchylky z jiných nežli stereologických příčin (nonstereological bias, uncertainty) mohou být odstraněny za předpokladu, že lze identifikovat jejich zdroj, např.

- nekompletní či nestejněměrné barvení řezů (např. střední vrstvy tlustých řezů nebo okraje řezů u histochemických metod)
- chyby pozorovatele a odchylky mezi opakovaným hodnocením týchž vzorků stejným pozorovatelem, odchylky mezi dvěma a více pozorovateli,
- nesprávná kalibrace, odchylky ve zvětšení způsobené některými fotoaparáty při použití automatického ostření a zoomu pomocí objektivů kompaktních fotoaparátů, zkreslení způsobené nerovnoběžností roviny záznamu a roviny zaostření objektivu při chybné adjustaci mikroskopického stolku či záznamového zařízení,
- kontrakce tkáně (nejvýraznější zpravidla v ose Z)
- nepřesnost a nerovnoměrnost síly řezu při chybném nastavení mikrotomu,
- chyby v matematickém zpracování výsledků.

Důsledkem všech těchto možných zdrojů výchylky je potom chyba ve smyslu zvýšené odchylky nalezených výsledků od očekávaných hodnot. Z hlediska další analýzy odchylky a zejména z hlediska optimalizace kvantitativních studií je užitečné rozlišovat v rámci chyby tyto složky:

- **Systematická chyba** (systematic error, bias) v sobě obsahuje:
 - stereologickou výchylku (inaccuracy, nesprávnost) a
 - výchylku z jiných nežli stereologických příčin (uncertainty, nejistota), viz výše.
- **Chyba nesystematická** (nonsystematic error, unbiased) zahrnuje:
 - biologickou různorodost (ta je zjistitelná *teoreticky* nevychýleným způsobem při aplikaci správné metody) a
 - výběrovou chybu (sampling error) (*teoreticky* nevychýlená), která vzniká v důsledku toho, že v histologii nekvantifikujeme zpravidla celou plochu všech řezů z bločků, které by byly kompletně prokrájené a zachycovaly celou původní makroskopický orgán; obvykle totiž zkoumáme pouze výběr obrazových polí, řezů a bločků.

V případě, že aplikujeme nevychýlenou metodu a vyvarujeme se nejistoty při aplikaci správné metody, zkoumáme dále zdroje nesystematické chyby.

6.2 Biologická variance

Biologická variance je jednou ze složek celkové pozorované variance odhadu [44], kterou lze vyjádřit jako:

$$CV^2 = BV^2 + CE^2 \quad (30)$$

$$BV^2 = CV^2 - CE^2, \quad (31)$$

kde CV^2 je celková variance odhadu (total observed variance), BV^2 je biologická variance (čtverec rozdílů mezi odhadem a očekávanou hodnotou) a CE^2 je celková výběrová chyba (relativní variance, sampling error).

CV^2 a CE^2 lze určit z hodnocení výsledků odhadu a rovnicí 30 proto můžeme vyřešit pro BV^2 a zjistit tak příspěvek BV k celkové varianci. Známe-li pak hodnotu BV^2 , můžeme tento zdroj variability daný interindividuálními rozdíly mezi jedinci porovnávaných populací v naší studii:

- **snížit** tím, že zařadíme do porovnávaných skupin **větší počet jedinců**,
- **zvýšit** tím, že vybereme z porovnávaných skupin **menší počet jedinců** pro vlastní kvantifikaci.

Biologickou varianci můžeme tedy snížit pouze extenzivějším vzorkováním základních porovnávaných populací, tj. zahrnutím více hodnot reprezentujících jednotlivá individua. To je současně nástrojem k optimalizaci designu studie.

Kdybychom však na počátku chybně zvolili místo nevychýlené metody metodu založenou na modelových předpokladech (oddíl 5.2), vedlo by zvýšené vzorkování nikoliv nutně k větší *správnosti*, ale daleko spíše pouze k větší *přesnosti* výsledků. Protože stereologická výchylka (bias) není vyšší frekvencí vzorkování odstranitelná, je v principu velmi obtížné až nemožné optimalizovat efektivitu studií založených na aplikaci vychýlených metod.

6.3 Výběrová chyba (sampling error)

CE^2 je příspěvek celkové variance vycházející z intenzity vzorkování bločků a řezů v rámci *téhož jedince*. Lze jej vyjádřit jako relativní varianci (CE^2) nebo jako koeficient chyby **coefficient of error** (CE) a za předpokladu odběru jednoho tkáňového bločku z každého jedince závisí na dvou faktorech:

- **počet řezů** analyzovaných z bločku (between-section variation),
- **počet mikroskopických obrazových polí** vybraných při daném zvětšení v rámci každého řezu (within-section variation).

Výběrovou chybu lze:

- **zmenšit** tím, že **zvýšíme** vzorkovací frekvenci, tj. vybereme více řezů ze všech skutečně zhotovených či potenciálně zhotovitelných a vybereme více obrazových polí z každého řezu **within-subject sampling**
- **zvětšit** tím, že **snížíme** vzorkovací frekvenci na úrovni jedince.

Analýzou výběrové chyby mezi řezy a v rámci každého řezu je možné efektivně zvýšit *přesnost* výsledků u každého jedince z porovnávaných populací, avšak pouze za předpokladu, že **vzorkování** referenčního prostoru je **náhodné**.

Častým a doporučovaným schématem vzorkování je systematické rovnoměrné náhodné vzorkování (SURS, systematic uniform random sampling, 6.4.1). Náhodné vzorkování zajišťuje, aby u všech částí referenčního prostoru byla stejná pravděpodobnost, že se stanou součástí výběru, který podstoupí vlastní kvantifikaci (zde je vhodné uvědomit si zásadní rozdíl mezi touto „spravedlivou“ vzorkovací strategií a výběrem tzv. „reprezentativních řezů“, o nichž se mnohdy výzkumník pouze *a priori domnívá*, že poskytují hodnotu blízkou střední hodnotě základní populace všech řezů (viz oddíl 6.6.)

Jednotlivé složky CE^2 lze pro systematický náhodný výběr (SRS, systematic random sampling) ještě rozepsat tak, že jej demonstrujeme jako součet příspěvku variance mezi vzorkovanými řezy (between-section variance) a variance parametru z obrazových polí a průsečíků napočítaných v rámci jednoho řezu (within-section variance, tzv. nugget), viz rovnice 32:

$$CE^2 = \text{between} - \text{sectionvariance} + \text{within} - \text{sectionvariance}(\text{nugget}). \quad (32)$$

Na základě výsledků publikovaných ve stereologické literatuře převažuje v současnosti názor, že příspěvek variance v rámci jednoho řezu (nugget) do celkové výběrové chyby je obvykle významnější nežli příspěvek daný rozdíly mezi vybranými řezy. Do variance v rámci jednoho řezu ovšem přispívá např. i konkrétní superpozice testovací mřížky, neboť při opakované náhodné superpozici mřížky na tentýž řez (mikrofotografii) můžeme nad stejnými strukturami napočítat různý počet průsečíků.

6.4 Poměry složek celkové pozorované variance

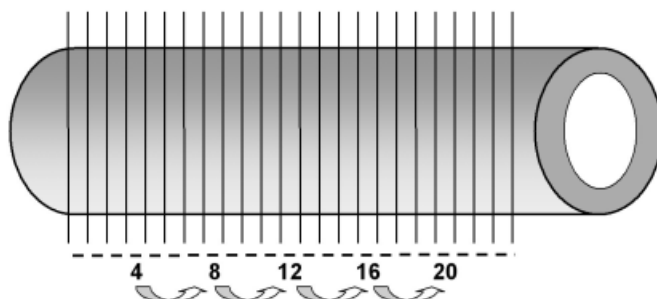
U typického biologického experimentu [16] při kvantifikaci morfologických struktur připadá z celkové pozorované variance:

- cca 70 % na interindividuální (biologickou) varianci,
- cca 20 % na varianci způsobenou výběrem mezi tkáňovými bločky odebranými z daného jedince,
- cca 5 % na varianci způsobenou výběrem mezi řezy vybranými z daného bločku,
- 3 % na varianci způsobenou výběrem zorných polí hodnocených v rámci téhož řezu
- a cca 2 % na varianci při opakovaných měřeních.

Z uvedeného vyplývá, že největší míra úsilí by v rámci kvantitativní studie měla být vynaložena na řádný odběr tkáňových bločků a na výběr dostatečného počtu řezů vzorkovaných rovnoměrně systematicky z každého z nich. Soustředěním se na velmi přesné hodnocení nedostatečného počtu řezů a snímků můžeme i při použití např. pokročilých metod obrazové analýzy dosáhnout zvětšení přesnosti celého experimentu o cca 2 %. Naproti tomu lze na základě distribuce příspěvků celkové variance doporučit hodnocení založená na co největším počtu jedinců v porovnávaných skupinách a na větším počtu bločků odebíraných z každého z nich, což je lapidárně shrnuto v heslu 'Do more less well!' [16].

6.4.1 Vzorkování

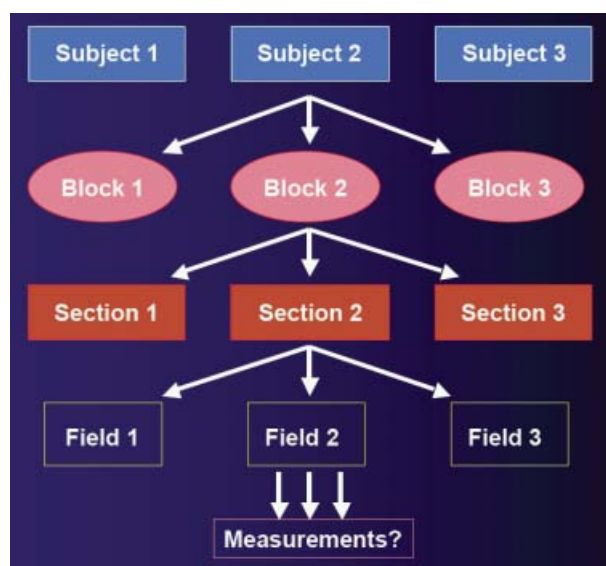
Systematický rovnoměrný náhodný výběr (SURS, Obr. 12) je vhodné provádět na každé úrovni odběru, kdy dochází k redukci, resp. vzorkování odebrané tkáně z makroskopického orgánu, redukci počtu hodnocených histologických řezů, či výběru zorných polí pořizovaných silnějším objektivem v rámci jednoho histologického řezu.



Obr. 12: Schéma příkladu systematického uniformního náhodného výběru.

Pro případ výběru řezů lze použít např. následující postup. Bloček tkáně o délce $m \times t$ je rozkrájen do m sériových řezů o tloušťce t . Pozice p prvního vzorku v sérii je určena náhodně, tj. $p = m \times n$, kde $n \in (0; 1)$ je náhodné číslo mezi 0 a 1. Pozice dalších vzorků jsou ekvidistantní vzhledem k prvnímu, od nějž dále je vybírán každý i -tý řez. Vzorkovací perioda (tj. vzdálenost mezi dvěma řezy vybranými k analýze) je pak $i \times t$. Hustota výběru vzorků se řídí požadovaným koeficientem chyby (viz oddíl 6.4.2). Rozptyl SURS je vždy minimálně stejný jako u prostého náhodného výběru (u nějž jsou pozice jednotlivých vybíraných položek vzájemně nezávislé), většinou je však význačně nižší.

Pro ostatní úrovně vzorkování (počet jedinců ve skupině, počet tkáňových bločků z jedince, počet obrazových polí z řezu, Obr. 13) lze postupovat zcela analogicky tak, aby každé části biologického materiálu redukované vzorkováním byla dána zpočátku stejná pravděpodobnost, že se stane součástí výběru.



Obr. 13: Výběr jedinců, tkáňových bločků, řezů a obrazových polí by měl být na každé úrovni rovnoměrný a náhodný.

6.4.2 Hodnocení koeficientu chyby

Koeficient chyby (CE) je užitečnou mírou variability, která je pro základní soubor definována rovnicí 33:

$$CE = \frac{SD}{\bar{x}}. \quad (33)$$

Posouzení variability řezů při odhadu objemu $estV$ či počtu objektů $est\hat{N}$ je možné u prostorově korelovaných objektů provést hodnocením variability způsobené výběrem (sampling error) pomocí odhadu $estCE$ (rovnice 34, 35) dle Gundersena a Jensenové [14]:

$$estCE_n(GJ) = \frac{1}{\sum a_i} \cdot \sqrt{\frac{3a + c - 4b}{12}}, \quad (34)$$

kde koeficienty a , b , c jsou definovány jako:

$$a = \sum_{i=1}^n A_i \cdot A_i, \quad b = \sum_{i=1}^{n-1} A_i \cdot A_{i+1}, \quad c = \sum_{i=1}^{n-2} A_i \cdot A_{i+2}. \quad (35)$$

Pro hladké funkce se používá jiná modifikace [17], viz rovnice 36:

$$estCE_n(GJ) = \frac{1}{\sum a_i} \cdot \sqrt{\frac{3a + c - 4b}{240}}, \quad (36)$$

6.5 Význam pilotních studií

Hodnoty biologické variance a výběrové chyby se pro konkrétní typ tkáně, stáří pokusných zvířat či frekvenci vzorkování dozvíme z literatury jen výjimečně. Z výše uvedeného vyplývá, že před naplánováním a zahájením hlavního experimentu s kvantitativním hodnocením mikroskopických parametrů je více než vhodné provést méně rozsáhlou pilotní studii. Hlavním cílem pilotní studie je dosáhnout efektivního designu hlavní studie. Jednotlivé dílčí kroky pilotní studie jsou následující:

- zachytit maximum biologické variance při vyhodnocení nejmenšího potřebného počtu jedinců ve studii,
- zachytit maximum biologické variance s co nejmenší vzorkovací chybou (tj. co nej přesněji),
- nalézt nejvhodnější dostupné barvení (např. k zamezení nedokonalé detekce v rámci silných řezů),
- provést zpočátku nadměrně podrobné vzorkování (oversampling) a systematicky snižovat vzorkovací frekvenci až k nejvyšší akceptovatelné hodnotě vzorkovací chyby ($estCE$),
- při nedostatku původních dat využít např. empirického postupu s 3–5 jedinci v každé z porovnávaných skupin a alespoň 8–10 řezy a 200 průsečíky testovací sondy s kvantifikovanými objekty u každého jedince,

- po nalezení takové hodnoty CE, kdy další zpřesňování výběru již nevede k významnému poklesu variability, je vhodné navýšit počet hodnocených jedinců ve studii (obvykle 5–10 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 atd.),
- při volbě optimální vzorkovací frekvence zohlednit i typ statistických nástrojů, jimiž budou výsledné hodnoty analyzovány a porovnávány (např. testování hypotéz o shodě středních hodnot mezi skupinami, regresní analýza, parametrické a neparametrické metody, zvolená síla testu apod.) a při nejasnostech o vhodnosti dat pro zodpovězení pracovních hypotéz konzultovat statistika.

Vlastní efektivitu E , k jejíž maximalizaci by měla pilotní studie vést, lze vyjádřit jako:

$$E = \frac{\text{přesnost}}{\text{čas}}. \quad (37)$$

Míra přesnosti závisí u každého parametru na biologické variabilitě tohoto parametru. Přesnost lze vyjádřit např. pomocí:

- variačního koeficientu $CV = \frac{SD}{\text{průměr}}$ (má být co nejmenší) nebo celkové pozorované variance $(CV)^2 = \left(\frac{SD}{\text{průměr}}\right)^2$, kde SD je směrodatná odchylka výběru
- vzorkovací chyby $CE = \frac{CV}{\sqrt{n}}$.

6.6 Stereologické studie u archivního materiálu a „reprezentativní řezy“

I při snaze dodržet výše uvedené zásady vzorkování mohou nastat situace, kdy nemáme možnost sami volit způsob krájení a výběr řezů pro kvantifikaci. Taková situace nastává např. při kvantitativním hodnocení archivních řezů, k nimž již nejsou dostupné původní tkáňové bločky dostatečné velikosti, nebo máme-li řezy pouze např. zapůjčené z jiného pracoviště. Rovněž v případě, že používáme k detekci jednotlivých typů struktur celou sadu histochemických metod, může být z ekonomických důvodů opodstatněné používat z daného bločku pouze jeden řez na každou takovouto metodu.

Chceme-li v takovém případě přesto aplikovat správnou metodu (design-based stereology), je to možné i s použitím jednotlivých řezů, avšak za splnění těchto podmínek:

- Řezy musejí být vybrány způsobem, který neupřednostňuje některou z částí referenční oblasti (region of interest, ROI). Pokud není podmínka splněna, lze z takových řezů vyvozovat závěry pouze pro tu část bločku, z níž bylo potenciálně skutečně možné řezy vybírat a která byla tak přístupná vzorkování.
- Kvantifikované struktury (event. i referenční oblast) musejí být zvolenou barvicí metodou detekovatelné v celé ROI.
- Všem částem ROI nebo všem kvantifikovaným strukturám původně přítomné v bločku, které má řez reprezentovat, byla původně dána stejná možnost stát se tímto vybraným řezem.

Pokud autor práce není schopen doložit splnění těchto podmínek, je otázkou, zda může řezy, na jejichž základě studii provádí, považovat i nadále za reprezentativní. **Reprezentativní řez** je takový, který lze považovat za vzorek velmi blízký střední hodnotě získatelné z celé oblasti (ROI), kterou „reprezentuje“. Velmi často (a to i ve vědeckých člancích a prezentacích) se lze setkat s nadužíváním tohoto termínu, a to i pro řezy, které byly vybrány na základě jiných kritérií, jako je např. kvalitní vzhled a nepřítomnost artefaktů, zvláště technicky zdařile nasnímaný řez se zajímavým seskupením objektů, podobnost s jinými snímky již publikovanými v kvalitním periodiku, či z důvodů známých pouze dotyčnému autorovi.

6.7 Základní doporučení pro publikaci kvantitativních výsledků

Uvažujeme-li o publikaci našich kvantitativních dat, měli bychom ještě před zahájením studie vzít v potaz skutečnost, že počet recenzentů obeznámených se základy stereologie se stále zvyšuje, podobně jako množství článků, které stereologické techniky v renomovaných periodících propagují. Jsme-li zprvu sami sobě poctivými recenzenty, ušetříme si pak zklamání či práci navíc při odmítnutí naší publikace z důvodů nerespektování některých základních pravidel. Zejména lze doporučit následující body:

- Definujme zřetelně a co nejkonkrétněji, **co** kvantifikujeme a zda má sledování zvoleného parametru v daném případě smysl z biologického hlediska, např.:
 - Pro kvantifikaci imunohistochemicky značených neuronů ve skupině mezencefalických jader použijeme spíše objemový podíl pozitivní značené cytoplazmy perikaryí neuronů v referenčním objemu jader $estV_V$, nebo raději absolutní počet takto značených neuronů v oblasti těchto jader $est\hat{N}$, event. obojí? Zajímá nás v tomto případě spíše objem nebo počet buněk? Potřebujeme rozlišit hypertrofii od hyperplazie?
 - Pro kvantifikaci adaptace střevní sliznice na potravní stimuly použijeme raději vychýlenou metodu založenou na hodnocení délky projekce profilů střevních klků do roviny řezu dané orientace, nebo nevychýlenou metodu odhadu povrchové hustoty lamina epithelialis mucosae na jednotku objemu sliznice $estS_V$?
 - Značí použitá protilátka cytoplazmu, buněčnou membránu, jaderné struktury či pouze některé organely? Jak se to projeví na distribuci positivity při daném zvětšení a na započítávání interakcí této positivity s testovacími sondami?
- Je známo, které z parametrů lze v rámci studie považovat za nezávislé a které za závislé proměnné?
- Pro předběžné zmapování variability parametrů a pro volbu vhodného počtu porovnávaných jedinců, bloků, řezů a obrazových polí je vhodné provést pilotní studii 6.5, pokud nejsou tyto údaje známy z literatury. Výsledky pilotní studie lze rovněž publikovat v metodické části hlavní studie, neboť jsou zdůvodněním zvoleného vzorkování.
- Tkáňové bločky a řezy by měly být označeny tak, aby byla studie pro hodnotícího pozorovatele zaslepená, tzn. aby pozorovatel nevěděl, ke kterým z porovnávaných skupin (experimentální či kontrolní) materiál náleží.
- Od počátku práce definujme jasnou statistickou hypotézu,

- např. H_0 : Objemově vážený střední objem inzulin-pozitivních buněk v Langerhansových ostrůvcích pankreatu se u populace potkanů vystavených účinku látky A nezmění oproti kontrolní populaci potkanů stejného stáří a zastoupení pohlaví.
- raději než „budeme potkanům podávat látku X a uvidíme, co to udělá s pankreatem“.

Ke konkrétním požadavkům recenzentů dle naší zkušenosti dále mj. patří i upřesnění údajů technického charakteru v manuskriptu, např.:

- přesně dokumentované schéma všech úrovní vzorkování,
- celkový vzorkovaný objem tkáně či plocha řezů,
- deklarovaná správnost metody ospravedlňující vyvozování závěrů z výsledků (správnost a přesnost lze vyhodnotit např. popisem vzorků s *a priori* známým složením),
- deklarovaná přesnost a opakovatelnost metody včetně testování variability při opakovaném hodnocení týmž pozorovatelem a více pozorovateli s využitím vhodných nástrojů jako např. intraclass correlation coefficient [38] či Bland-Altmanovy rozdílové grafy [4],
- deklarovaná časová náročnost metody (vyjádřená např. na vyhodnocení jednoho preparátu),
- údaje o velikostech a zdrojích stereologických a nesterologických chyb v metodice,
- informace o numerické apertuře objektivů (u optických řezů silnými preparáty), přesnosti a opakovatelnosti posuvu motorizovaných stolků mikroskopu.

6.8 Odhady vs. měření

Při analýze mikroskopických objektů je většinou zřejmé, že neprovádíme přímá *měření* skutečných hodnot, tj. např. neměříme přímo délku všech vláken či plochu všech povrchů či nepočítáme přímo počet všech buněk přítomných v tkáňovém bločku. Naproti tomu většinou provádíme *odhady* těchto hodnot na základě navzorkovaných bločků, řezů, obrazových polí či mikrofotografií. Provádíme tedy odhady, nikoliv měření.

Uvedli jsme, že správnost kvantitativního hodnocení je mírou toho, jak blízko se hodnota *získaná* nachází vůči hodnotě *očekávané*. Při stereologických odhadech s aplikací nevychýlených metod se zpravidla *žádná* z jednotlivých konkrétních hodnot odhadů kvantifikovaného parametru přesně neshoduje s hodnotou očekávanou. Správnost je v tomto případě definována jako míra shody střední hodnoty (zpravidla průměru) množiny odhadů s očekávanou hodnotou v tom smyslu, jak tato střední hodnota při dostatečném vzorkování konverguje k očekávané hodnotě. Jinými slovy, hodnota metodiky, správnost výsledků a jejich schopnost testovat výzkumné hypotézy nezávisí až tolik na tom, jak přesné budou jednotlivé hodnoty, ale jak správná bude jejich střední hodnota.

Pro testování rozdílů mezi populacemi vzorků, např. mezi skupinou bločků cév z experimentálních zvířat vystavených účinku testovaného léku proti ateroskleróze se skupinou bločků cév kontrolních zvířat, jsou zpravidla odhady mnohem výhodnější strategií nežli měření.

7 Trojrozměrné rekonstrukce

Vzorky, které mikroskopicky analyzujeme, jsou v řadě případů 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 objektů (např. vasa vasorum cév apod.) 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 trojrozměrná data jako např. velikost povrchu a objemu (u uzavřených objektů).

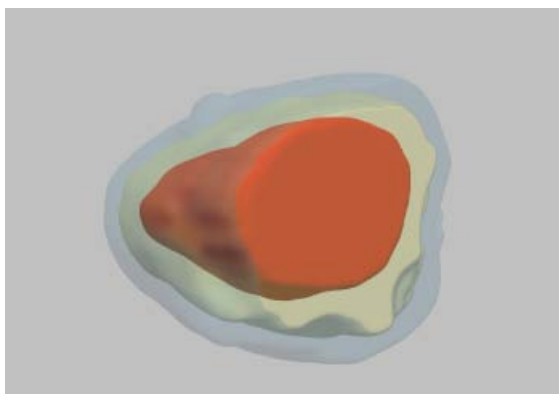
U mikroskopických rekonstrukcí založených na optických řezech dominuje v současné době jako zdroj obrazů konfokální mikroskopie, viz např. [21, 23]. Alternativou ke klasickým histologickým řezům mohou být i silnější řezy nedeparafinované, v jejichž případě je restituce původních prostorových vztahů jednodušší a rychlejší nežli u klasických histologických řezů [22]. 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. Velkou inspirací pro naši práci byla monografie [10], 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 popsaných 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.

7.1 Rekonstrukce ze série histologických řezů

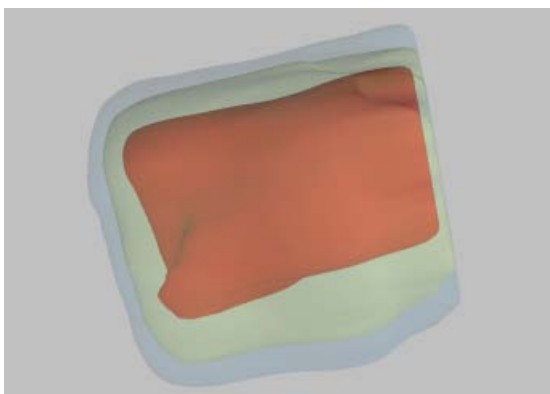
Následující postup vychází z použití programu ImagReg pro registraci řezů a Ellipse3D (viz dále) pro segmentaci a vlastní rekonstrukci. Při použití jiného programového vybavení může být vhodné jednotlivé kroky modifikovat, změnit jejich pořadí apod.

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 sklíček 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 ImagReg (Jiří Janáček, Fyziologický ústav 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 dobře vynikne v negativu.

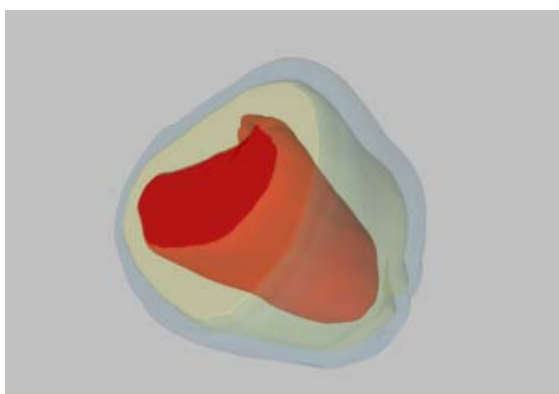
4. V registrovaných obrazech pak segmentujeme oblasti našeho zájmu (kontury význačných struktur), např. programem Ellipse3D (ViDiTo, Košice, Slovensko). Volíme mezi poloautomatickými nástroji (princip prahování, watershed, LiveWire apod.) či manuálním obkreslováním grafickým tabletem. Řezy nepoužitelné 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 vymezíme požadované axiální roviny.



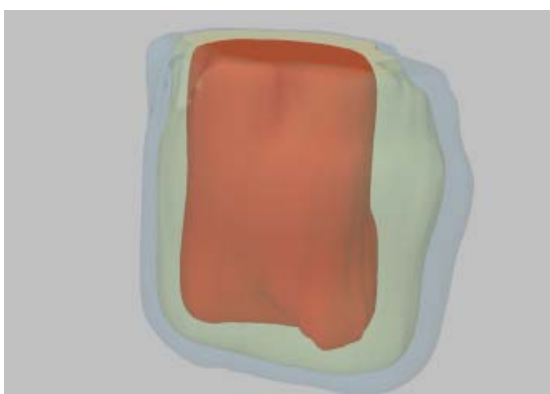
Obr. 14: Ukázka rekonstrukce tunica media (modře), arteriosklerotické léze (žlutě) a cévního lumen (červeně) u aorty apoE-KO myši.



Obr. 15: Totožný segment v jiném úhlu pohledu.



Obr. 16: Totožný segment v jiném úhlu pohledu a s volbou průhlednosti vrstev.



Obr. 17: Dtto. U obrázku 14–17 děkuji za technickou pomoc kolegovi Vítu M. Matějkovi.

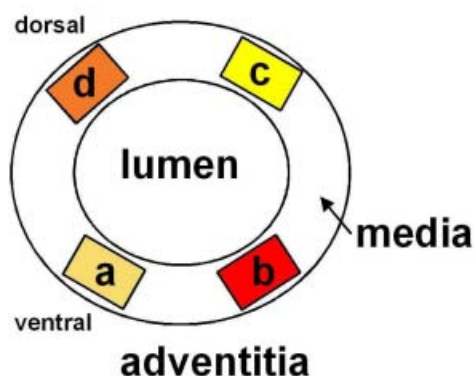
7. Modul Surface nejprve vytvoří volumetrický model objektů ze série kontur dané třídy. Pak pro zobrazení vytváří model povrchu těchto objektů (Obr. 14–17) tím,

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 odstupy mezi sousedními konturami (u orgánů s menší nepravidelostí nebývá nutné segmentovat kontury v každé rovině).

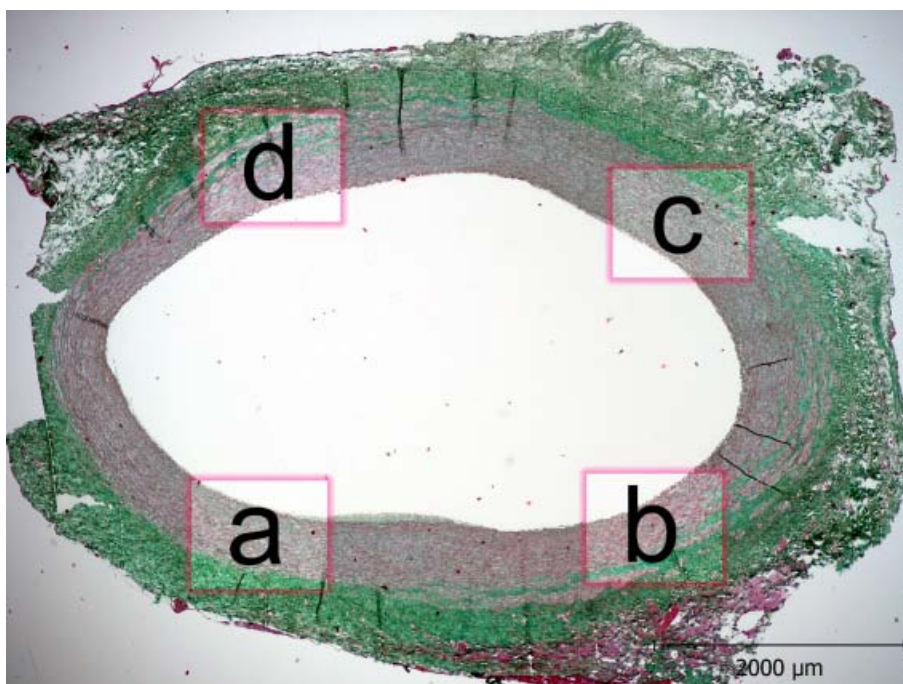
8 Morfometrie tepen elastického typu

8.1 Příklad vzorkování obrazových polí

Je-li poměr velikostí mezi tkáňovým řezem a obrazovým polem v mikroskopu při nejmenším potřebném zvětšení takový, že obrazové pole zachycuje jen malou část cévní stěny, je vhodné provést systematický náhodný výběr více obrazových polí z každého řezu (např. Obr. 18–19), a to v minimálním rozlišení umožňujícím jednoznačnou identifikaci jednotlivých hodnocených struktur, tj. např. hladkých svalových buněk a elastinových lamel.



Obr. 18: Schéma výběru čtyř zorných polí z každého řezu.



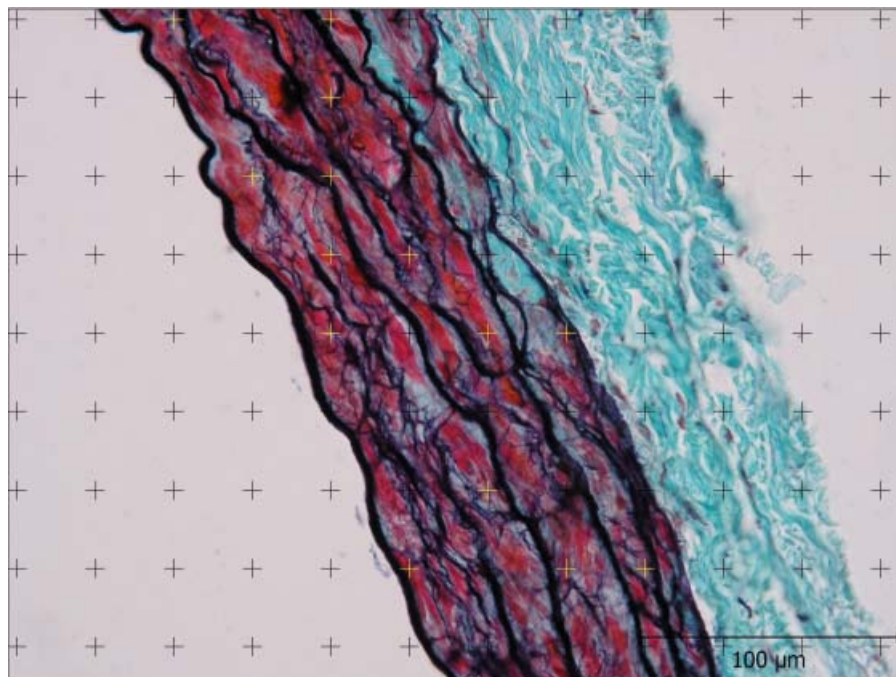
Obr. 19: Výběr čtyř zorných polí z každého řezu. Zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin.

8.2 Plošné a objemové poměry složek cévní stěny a cévního lumina

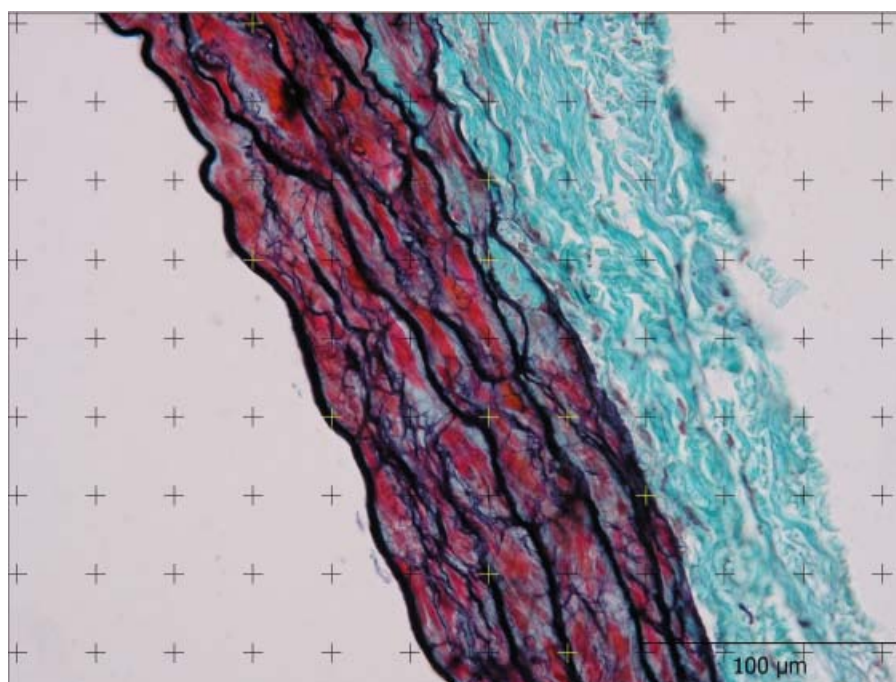
Při morfometrii aorty lze kvantifikovat řadu parametrů v závislosti na biologické otázce hodnoceného experimentu či na původu vzorků, např.

$V_V(\text{elastin, media})$, $V_V(\text{SMC, media})$ (%) – relativní objemové zastoupení elastinu a hladkých svalových buněk (SMC, smooth muscle cells) v tunica media; k odhadu lze použít Cavalieriho princip a bodové testovací mřížky (Obr. 20–22).

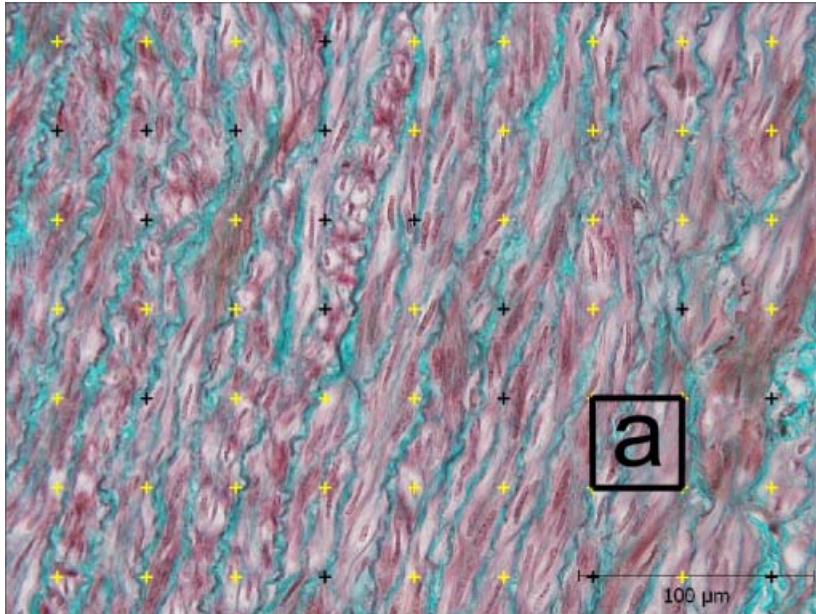
Předpokládaný biologický význam: průkaz ev. degradace elastinu, resp. hypertrofie či hyperplazie hladkých svalových buněk; předpokládali jsme korelaci $V_V(\text{elastin, media})$ s $L_A(\text{elastin})$ a korelaci $V_V(\text{SMC, media})$ s LUT .



Obr. 20: Průřezy testovací mřížky s profily hladkých svalových buněk. Referenční oblastí je tunica media aorty potkana. MGT.

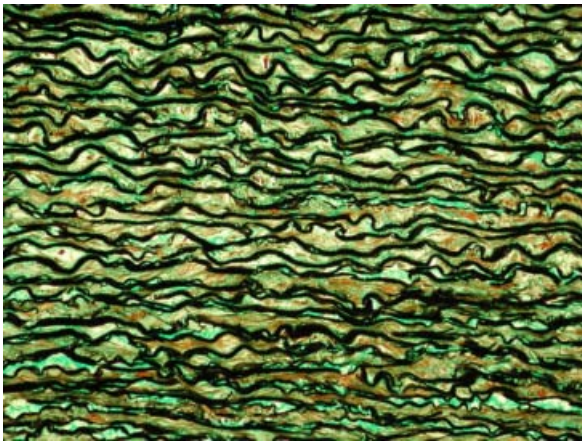


Obr. 21: Průřezy testovací mřížky s profily elastinových lamel. Pravděpodobnost výskytu průřezy s elastinem je přímo úměrná podílu elastinu v celkové ploše řezu. Referenční oblastí je tunica media aorty potkana. MGT.

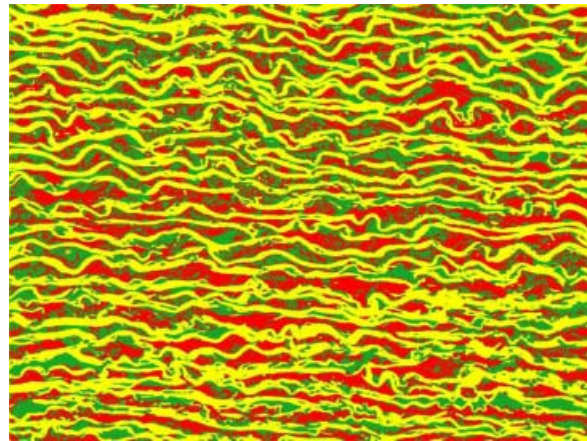


Obr. 22: Průsečíky (žlutě) bodové mřížky (mřížková konstanta a) s profily hladkých svalových buněk v tunica media prasete. Zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin.

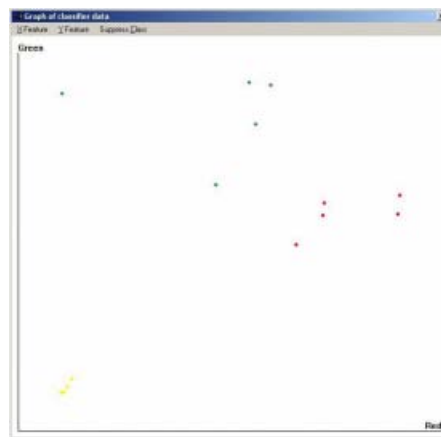
U vhodně obarvených mikrofotografií uniformního vzhledu lze použít i technik klasifikace obrazových bodů v obrazovém analyzátoru (Obr. 23–25).



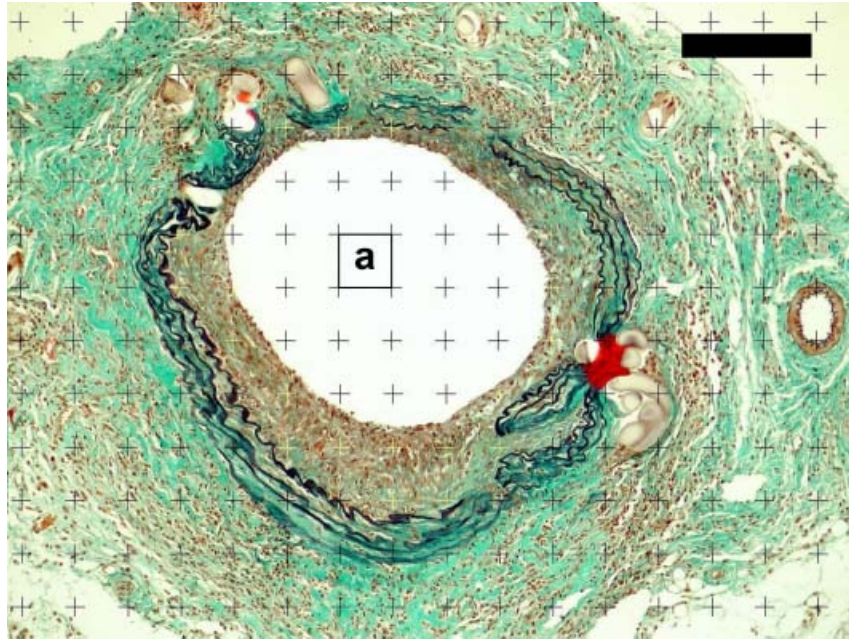
Obr. 23: Elastin, kolagen a hladké svalové buňky v hrudní aortě. MGT.



Obr. 24: Klasifikace pixelů do tří fází.



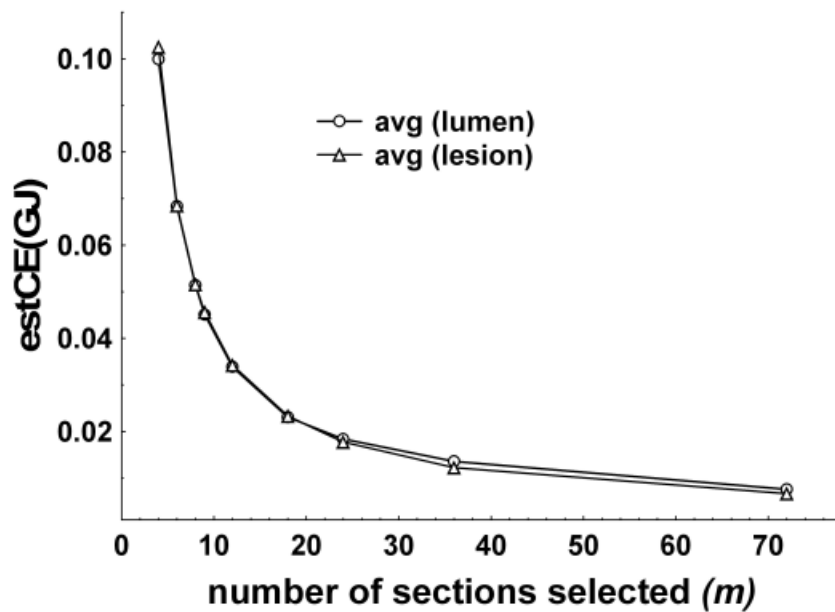
Obr. 25: Klasifikátor v RGB barevném prostoru.



Obr. 26: Projekce bodové testovací mřížky o parametru a při určování objemu aortální neointimy u myši. Započítané body jsou zvýrazněny žlutě. Měřítko $170 \mu\text{m}$, MGT.

8.2.1 Odhad koeficientu chyby

Podle postupu popsaného v oddílu 6.4.2 zjistíme pak pro dva z parametrů $estA(lesion)$ a $estA(lumen)$ následující závislost (Obr. 27):



Obr. 27: Průměrné hodnoty odhadu koeficientu chyby Gundersena a Jensenové $estCE(\text{GJ})$ pro všechny kombinace parametrů $estV(\text{lumen})$ a $estV(\text{lesion})$ vzniklé výběrem počtu řezů m (osa X). V rámci pilotní studie byl zjištěn prakticky stejný pokles variability s rostoucím m u objemu lumina i objemu arteriosklerotické léze, kdy $CE \approx 0,05$ pro $m = 8$.

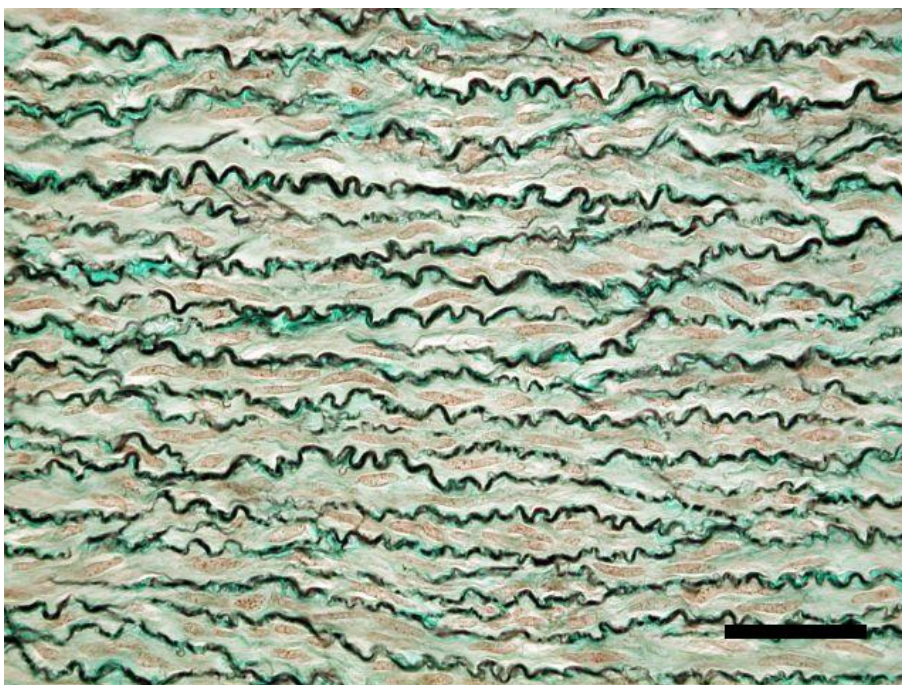
AFFVL – plošný podíl volné části cévního lumina v celkové ploše profilu lumina na řezu (AFFVL, area fraction of the free vessel lumen) jakožto parametr charakterizující poměrné zúžení cévního lumina (Obr. 26) podle rovnice 38,

$$AFFVL = \left[1 - \frac{A(lesion)}{A(lumen)}\right] \cdot 100(\%), \quad (38)$$

kde $A(lesion)$ je plocha vlastní arteriosklerotické léze, $A(lumen)$ je celková plocha lumina a event. neointimy ohraničená na vnějším obvodu první elastickou lamelou.

8.3 Elastinová síť a lamelární jednotka

Lamelární jednotka je definována jako jedna elastická lamela a k ní příslušející vrstva kolagenu a hladkých svalových buněk a je typickou strukturální jednotkou elastických arterií [37] (Obr. 28).

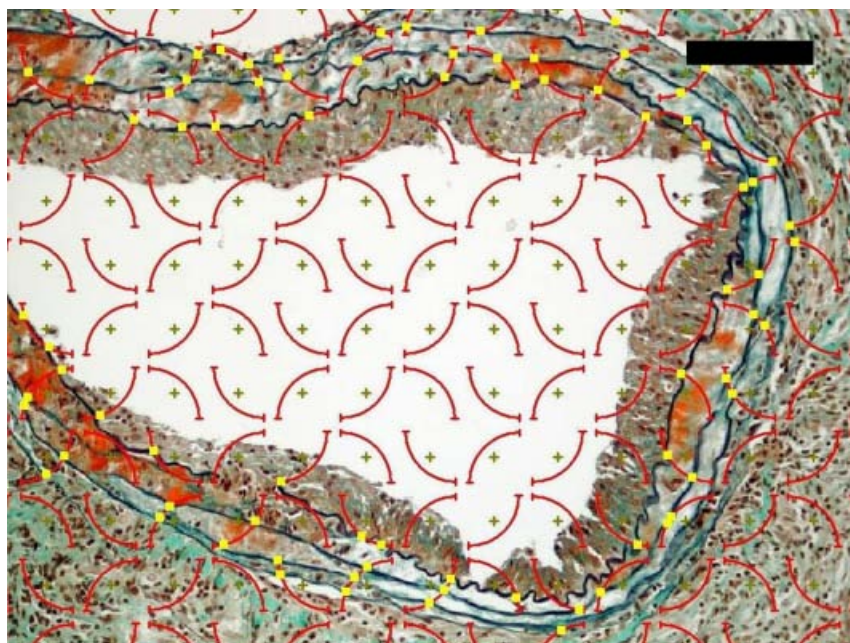


Obr. 28: Kolagen (zeleně), hladká svalovina (hnědě) a elastin (černě) v tunica media aorty. MGT, měřítko 50 μm .

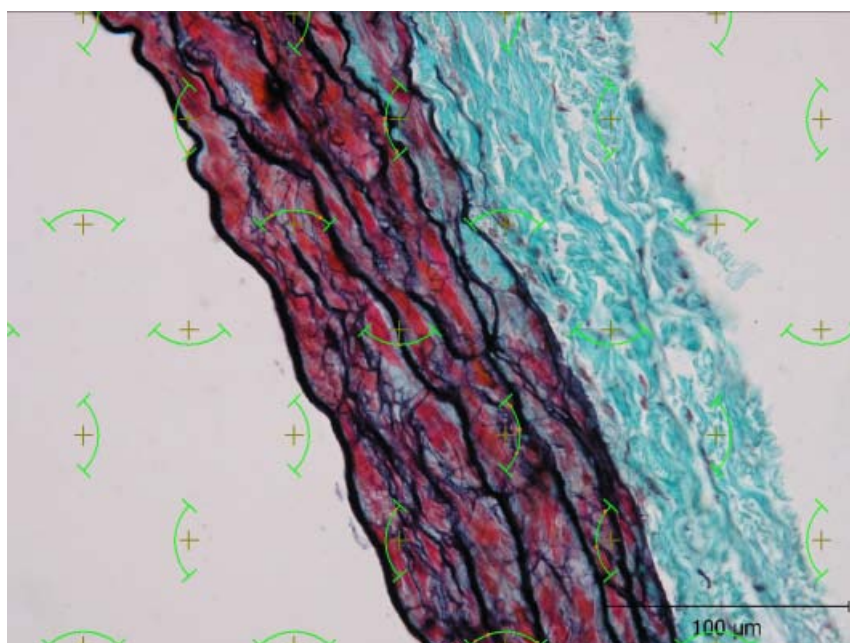
Vzhledem ke komplikované prostorové struktuře elastinové sítě nemusí být informace o objemovém podílu elastinu v cévní stěně považována za dostačující. Kromě objemového podílu elastinu lze tedy k charakteristice elastinové sítě použít následující parametry:

$L_A(\text{elastin})$ (μm^{-1}) – délková hustota profilů elastinových vláken na řezu vztažená k referenční ploše profilu tunica media, (Obr. 29), tj. podíl délky profilů elastinu na jednotku plochy řezu referenční oblastí; k odhadu lze použít modifikované Buffonovy metody a systému cirkulárních oblouků (Obr. 30).

Předpokládaný biologický význam: průkaz fragmentace elastinové sítě, event. relativního zmnožení hladké svaloviny, která od sebe roztlačuje elastinové lamely; lze testovat korelaci s parametry $V_V(\text{elastin})$ a LUT .



Obr. 29: Cirkulární oblouky při hodnocení 2-D délkové hustoty profilů elastinu ve stěně tunica media aorty myši. Měřítka 60 μm , MGT.



Obr. 30: Průsečíky testovací mřížky cirkulárních oblouků s profily elastinových vláken abstrahovaných do jednorozměrných linií. Referenční oblastí je tunica media. MGT.

lamellar number (–), tj. počet elastinových lamel tunica media napočítaných v radiálním směru, tj. podél kolmice spuštěné z povrchu intimy směrem k hranici medie/adventicie na příčném průřezu cévní stěnou; pro každý snímek lze použít střední hodnotu získanou pomocí několika (např. čtyř) testovacích linií (kolmic) systematicky náhodně pokrývajících každý snímek (Obr. 31, 33); za samostatnou elastinovou lamelu lze považovat arbitrárně definovaný profil (dle typu a intenzity barvení), např. profil elastinu o síle $\geq 1,83 \mu\text{m}$ (jako u parametru LUT , Obr. 32, 34).

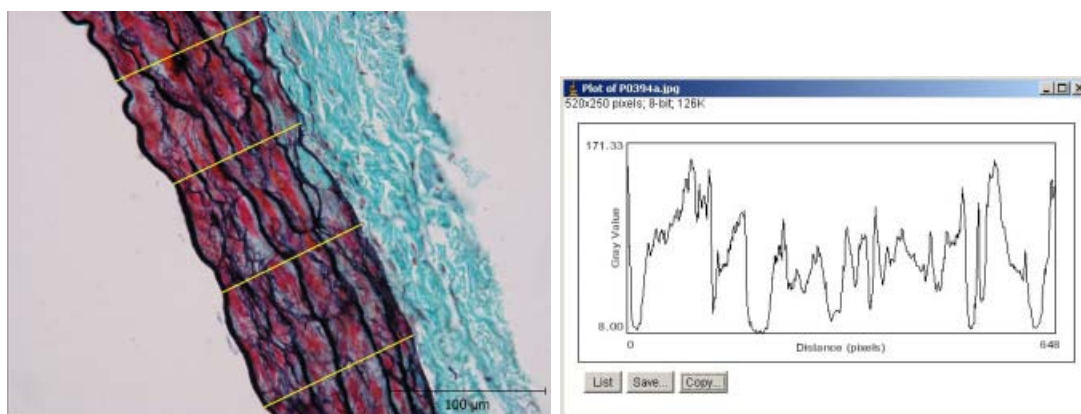
Biologický význam: počet lamel v medii by měl být u jedinců daného druhu a srovnatelného věku a tělesné velikosti relativně konzervativní [37].

IMT (μm) – *intima-media thickness*, střední síla intimy a medie na řezu kolmém na dlouhou osu cévy; pro každý snímek lze použít střední hodnotu délky několika (např. čtyř) testovacích linií radiálně probíhajících od povrchu intimy až k hranici medie/adventicie a systematicky náhodně pokrývajících každý snímek; testovací linie jsou totožné jako u *lamellar number*.

Biologický význam: zesílení cévní stěny hodnocené společně pro intimu i medii.

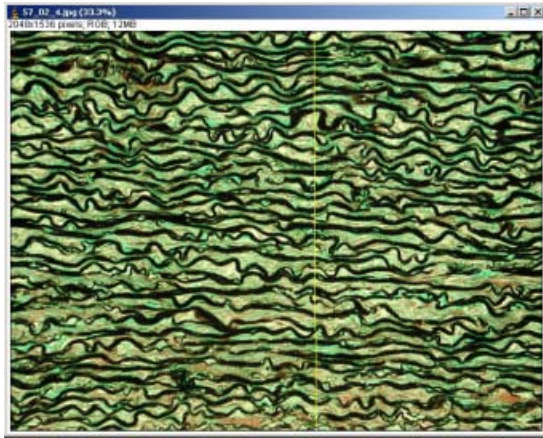
LUT (μm) – *lamellar unit thickness*, též *MID*, *mean interlamellar distance*, střední vzdálenost mezi sousedními profily elastinových lamel na řezu jako poměr $\frac{\text{IMT}}{\text{lamellar number}}$; vzhledem k postupnému větvení elastinu v síť tenčících se vláken bylo nutné pro tento účel definovat minimální tloušťku profilu elastinových struktur jako kritérium pro to, aby tento elastinový profil byl považován za samostatnou lamelu – tato arbitrární hranice byla definována u všech snímků jako $\geq 1,83 \mu\text{m}$; parametr *LUT* byl vypočten z následujících dvou přímo měřených hodnot.

Biologický význam: stejný jako u $L_A(\text{elastin})$, předpokládáme korelaci s $V_V(\text{elastin})$ a $L_A(\text{elastin})$.

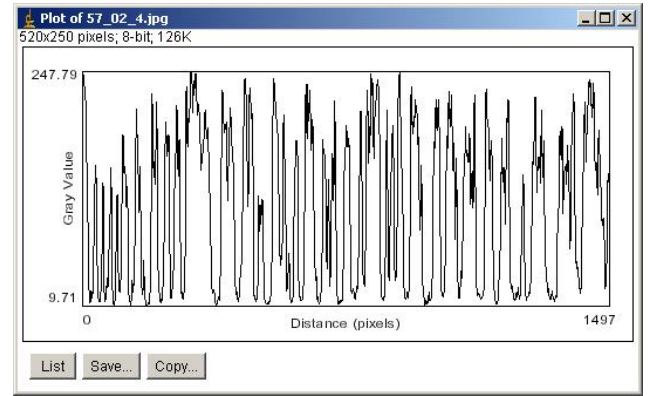


Obr. 31: Systematicky náhodně umístěné testovací linie kolmé na povrch intimy. MGT.

Obr. 32: Profil intenzit pixelů podél jedné z testovacích linií. Průsečíky linie s elastinovými lamelami byly pro dané standardizované barvení definovány jako pokles pod práh intenzity ≤ 80 při šířce $\geq 1,83 \mu\text{m}$. Software ImageJ (W. Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA) [1].



Obr. 33: Abdominální aorta s testovací linií ($l = 477 \mu\text{m}$). MGT.



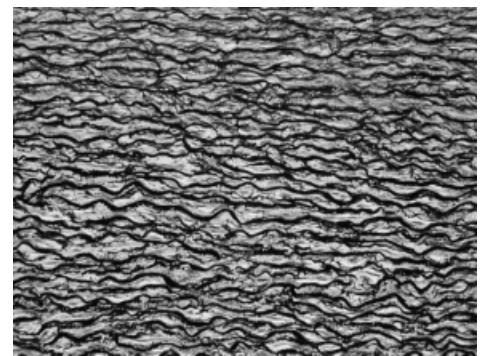
Obr. 34: Profil intenzit podél testovací linie. Periodická minima odpovídají průsečíkům testovací linie s profily elastinových lamel.

8.4 Fourierova transformace mikrofotografií elastinové sítě

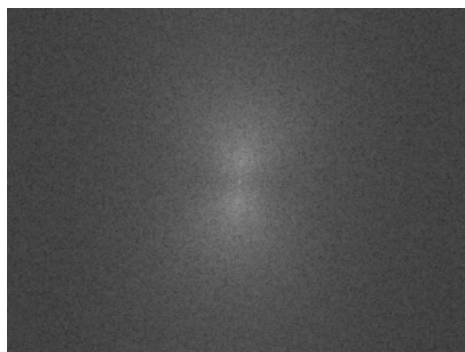
Výsledky Fourierovy transformace (FFT) mikrofotografií tunica media (Obr. 35–38) lze kvantifikovat tvarovým faktorem cirkulárního histogramu FFT, který je citlivý na změny v orientaci a fragmentaci elastinové sítě.



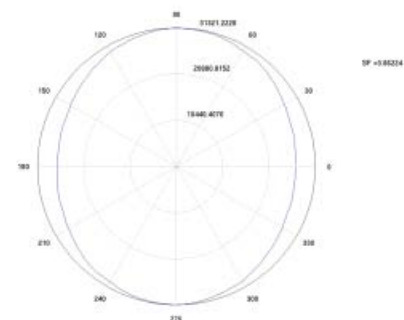
Obr. 35: Mikrofotografie. MGT.



Obr. 36: 8bitová barevná hloubka.



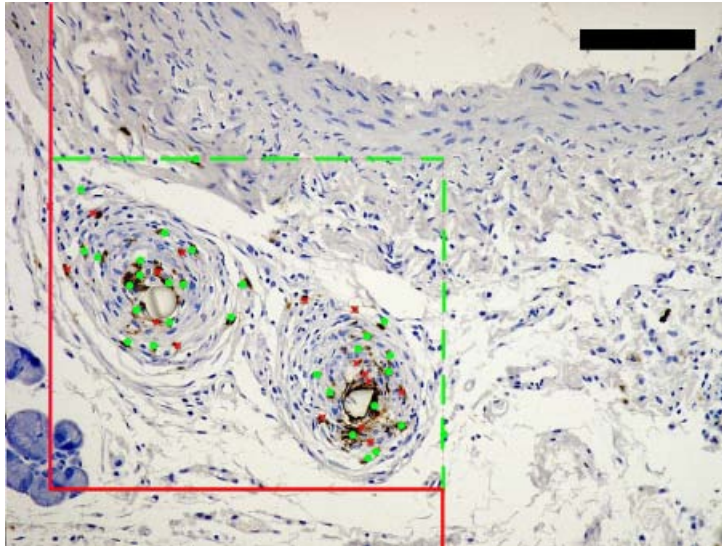
Obr. 37: FFT předchozího snímku (Matlab).



Obr. 38: Cirkulární histogram FFT, SF (Shape factor, Feret's ratio) = 0.86.

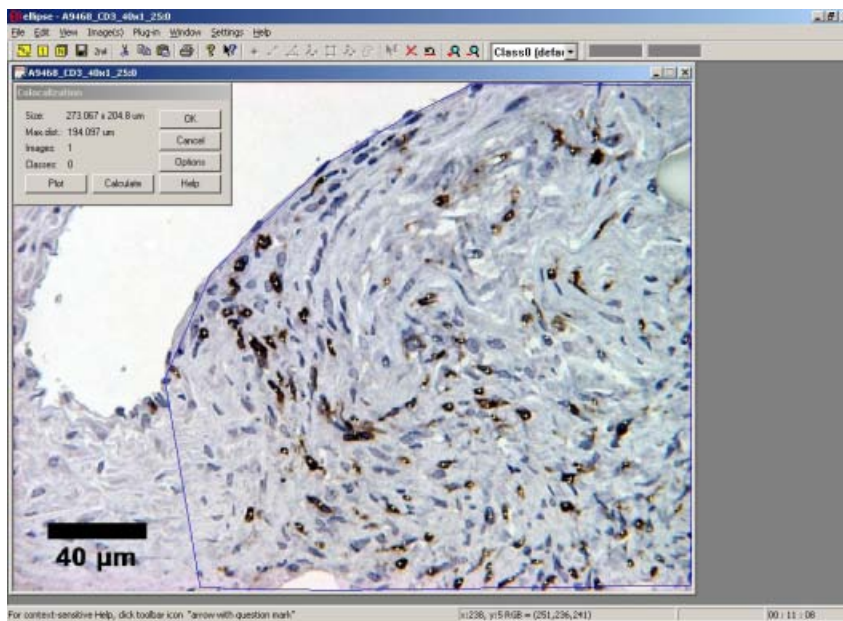
8.5 Numerická hustota buněk v cévní stěně

Numerickou hustotu imunohistochemicky značených buněk v definované vrstvě cévní stěny hodnotíme dle pravidel disektoru (Obr. 39).



Obr. 39: Hodnotící 2-D rámeček fyzického disektoru zaměřeného na imunohistochemicky označené buňky v cévní stěně. Započítány jsou zeleně značené buňky, které jsou uvnitř disektoru či protínají jeho povolené boční hranice a nezasahují do náhledové roviny (ta není zobrazena). Buňky protínající zakázanou hranici či náhledovou rovinu jsou označeny červeně a nezapočítávají se. Imunohistochemický průkaz neutrofilních granulocytů, měřítko 70 μm .

8.6 Shlukování buněk v cévní stěně



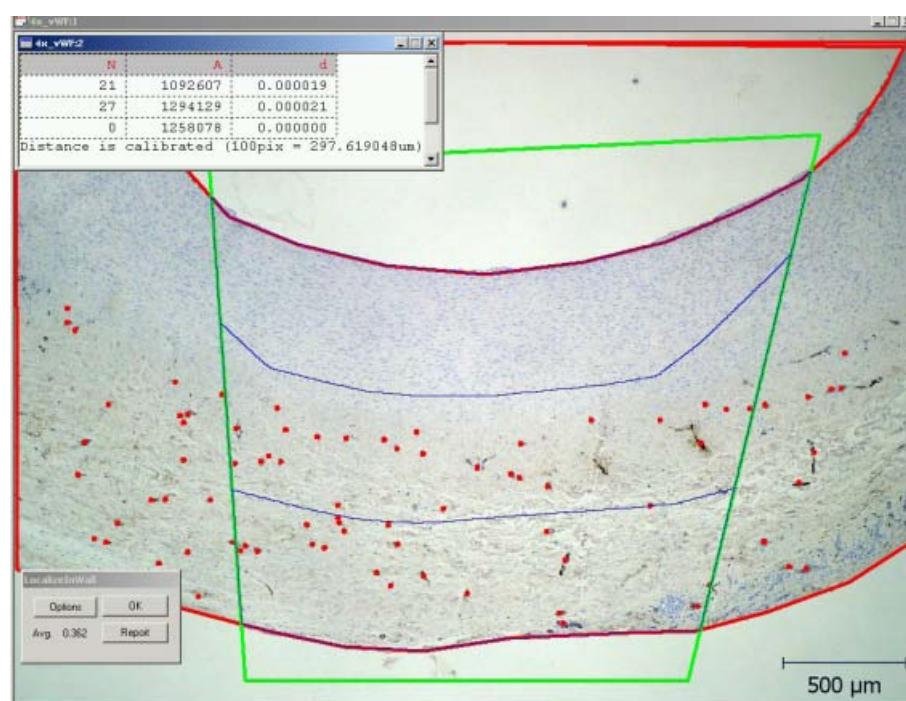
Obr. 40: Test shlukování CD3+ buněk (T-lymfocytů) infiltrujících stěnu aorty apoE-KO myši, pokus s transplantačním modelem regrese aterosklerózy. Vyznačení oblasti zájmu (ROI). Z testování lze vyvodit, že v rámci intervalu 0–50 μm **existují nenáhodné shluky** CD3+ buněk. Počet vzdáleností v tomto intervalu je **vyšší** na hladině významnosti 0,01, nežli odpovídá Monte Carlo testu s 1000 simulacemi modelového Poissonova procesu v analyzované oblasti (vysvětlení metody v oddílu 5.12).

8.7 Lokalizace profilů vasa vasorum

Relativní pozici profilů vasa vasorum (s endotelem značeným imunohistochemicky proti von Willebrandovu faktoru) lze popsat například pomocí vzdálenosti profilu od zevního okraje adventicie $d1$ a vzdálenosti profilu od lumina $d2$ a prostřednictvím funkce v rovnici 39, kde f nabývá hodnoty 0 na vnějším okraji adventicie a 1 na povrchu intimy.

Pokud nás zajímá distribuce profilů vasa vasorum v závislosti na vrstvě cévní stěny, lze si pomocí funkce 39 rozdělit profil cévní stěny na řezu arbitrárně do libovolného počtu koncentrických vrstev a porovnat jejich lokální mikrovazální hustotu Q_A (viz oddíl 5.7). Tento nástroj může být užitečný například pro posouzení pozánětlivé angiogeneze, kdy mohou být vasa vasorum zmnožena i v medii či intimě.

$$f = \frac{d1}{(d1 + d2)} \quad (39)$$



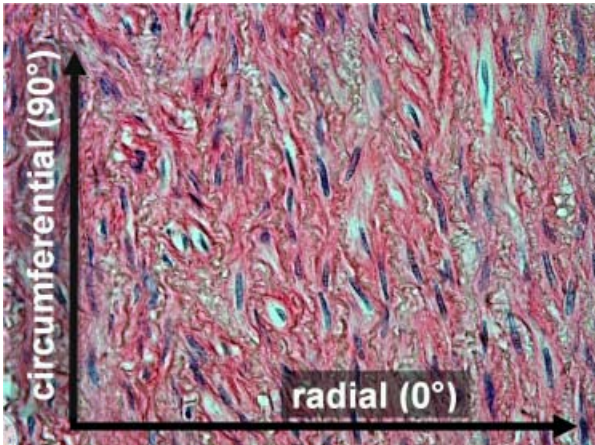
Obr. 41: Lokalizace vasa vasorum ve stěně břišní aorty prasete, imunohistochemický průkaz endotelu pomocí von Willebrandova faktoru.

8.8 2-D orientace hladkých svalových buněk ve stěně aorty

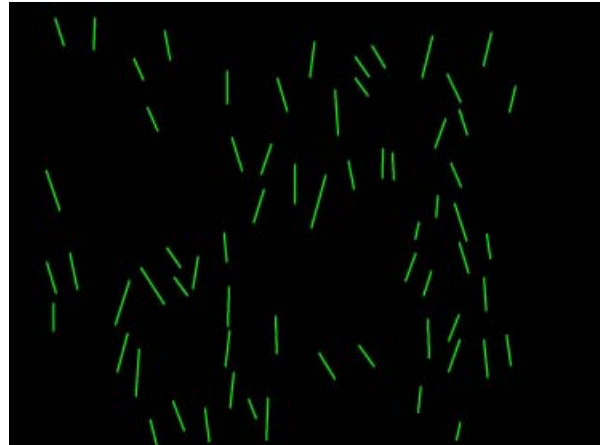
Při modelování arteriální stěny (např. v biomechanice) může být požadován popis orientace hladkých svalových buněk v tunica media. Pro obtížnost plnohodnotné 3-D rekonstrukce těchto buněk může být částečným přínosem i popis jejich 2-D orientace v řezu. Díky lamelární struktuře tunica media elastických tepen je popis orientace svalových buněk i dobrou aproximací orientace kolagenních vláken, které jsou produktem těchto buněk. Podobnou a přijatelnou aproximací je ztotožnění směru dobře patrných jader svalových buněk se směrem vlastních buněk. Terminologii užitou při orientaci roviny řezu demonstruje Obr. 44.

Na transverzálních řezech barvených hematoxylinem-eosinem při zachování orientace mikrofotografií dle vyznačených os proložíme úsečky profily jader (Obr. 42–43). Je zapotřebí vyhodnotit alespoň několik set takovýchto profilů ($n = 528$ v demonstrovaném

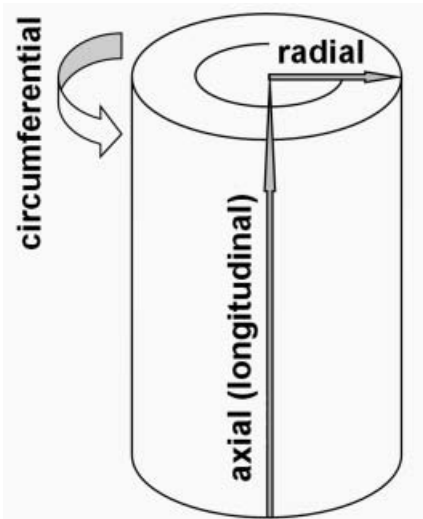
případě) a pomocí *a priori* připraveného rastru útvarů známé orientace vyhodnotit celkovou chybu měření, danou nepřesností orientace snímků a nepřesností kreslení úseček (v demonstrováném případě byla chyba menší než $\pm 1.5^\circ$). Výsledné hodnoty orientace úseček (modul Orientation, software Ellipse) znázorňuje Obr. 45, z něhož je patrné, že úhel mezi dlouhou osou profilů jader a radiálním směrem byl v rozpětí od 45° do 135° , přičemž u více než 99 % jader byl tento úhel v intervalu od 52° do 125° , tj. v rozmezí $\langle -38; 35 \rangle^\circ$ vzhledem k obvodovému směru.



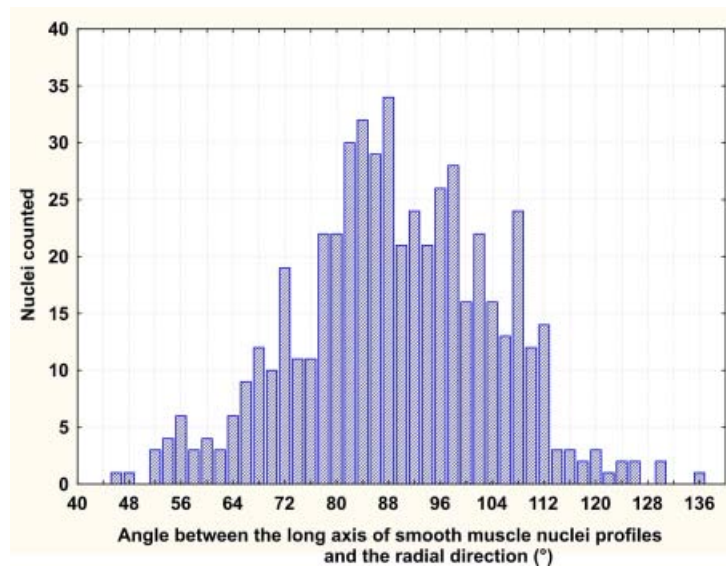
Obr. 42: Příčný průřez tunica media s vyznačením směru, cf. Obr. 44. HE.



Obr. 43: Úsečky vyznačující orientaci profilů jader svalových buněk na příčném řezu tunica media orientovaném dle Obr. 42.



Obr. 44: Obvodový (circumferential), radiální a axiální směr u cévy nebo tubulárního orgánu obecně.

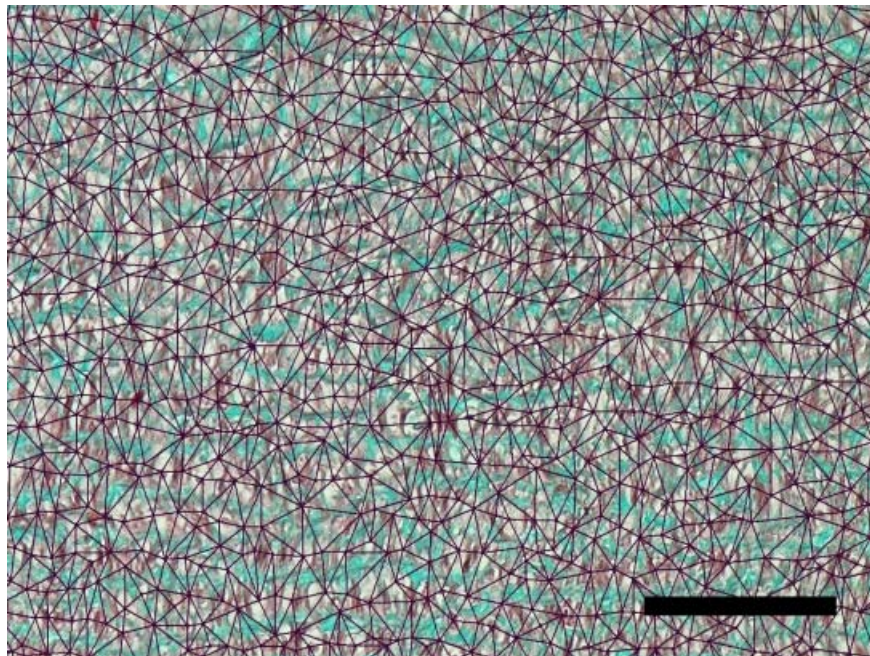


Obr. 45: Distribuce úhlů mezi dlouhou osou profilů jader hladkých svalových buněk a radiálním směrem.

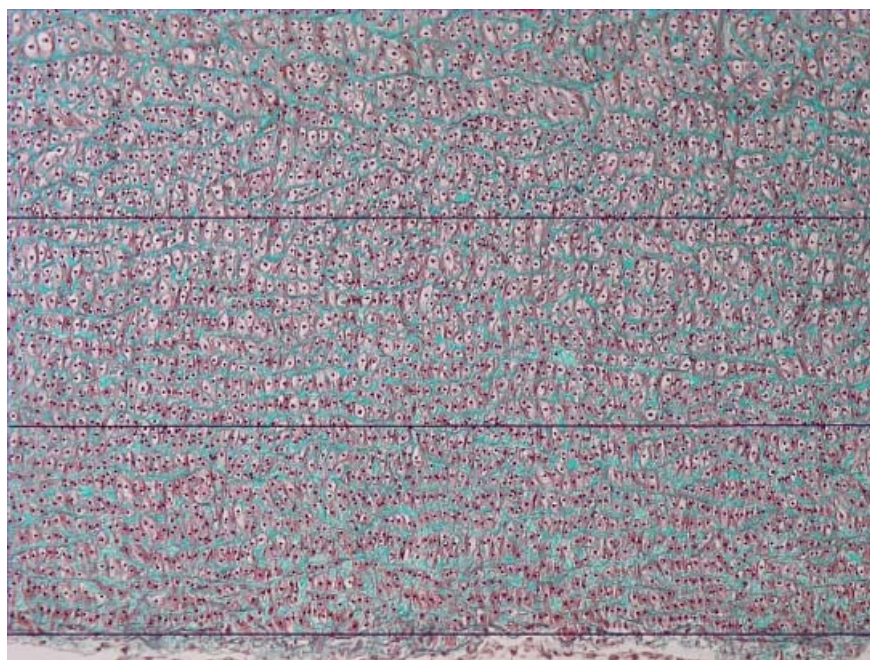
8.9 2-D (an)izotropie profilů hladkých svalových buněk ve stěně aorty

V oddíle 5.13 věnovaném Delaunayově triangulaci byl vysvětlen její přínos pro popis 2-D anizotropie. V následujícím případě může tato metoda odpovědět na otázku, zdali je

střední vzdálenost mezi středy profilů svalových buněk na podélném řezu aortou srovnatelná ve směru radiálním či longitudinálním, neboli zda tvoří hladké svalové buňky radiální vrstvy. Protože se jedná o statistický popis, je nutné použít větší počet buněk v dané oblasti zájmu (v demonstrovaném případě jich bylo 15 257 na šesti řezech, viz Obr. 46). Případnou vrstevnatost můžeme dále testovat hodnocením počtu profilů buněk na jednotku plochy Q_A ve virtuálních arbitrárně definovaných vrstvách (Obr. 47).



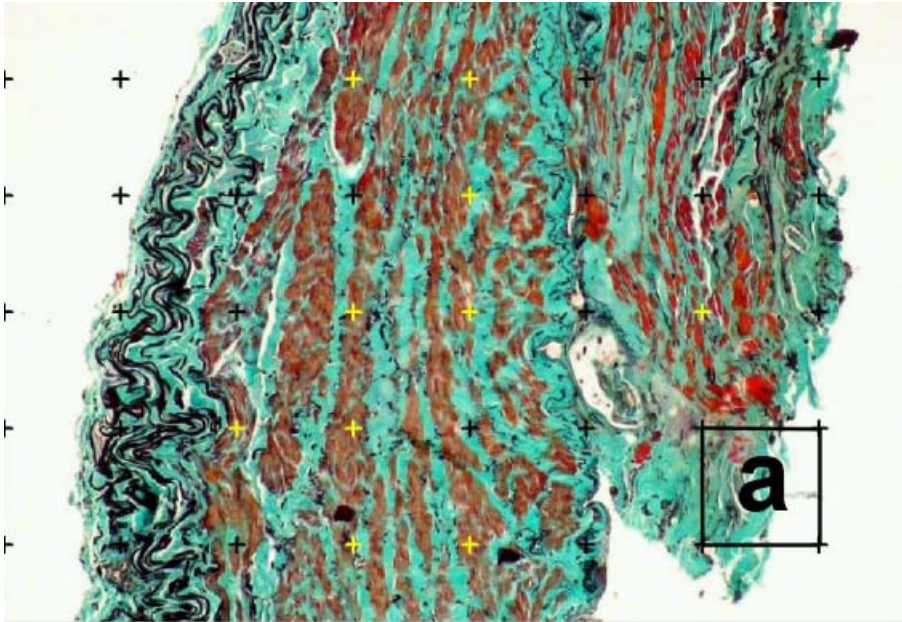
Obr. 46: Delaunayova triangulace center profilů hladkých svalových buněk v longitudinálním řezu stěnou břišní aorty. MGT, měřítko 50 μm . V ilustrovaném případě tvoří vrcholy trojúhelníků izotropní síť.



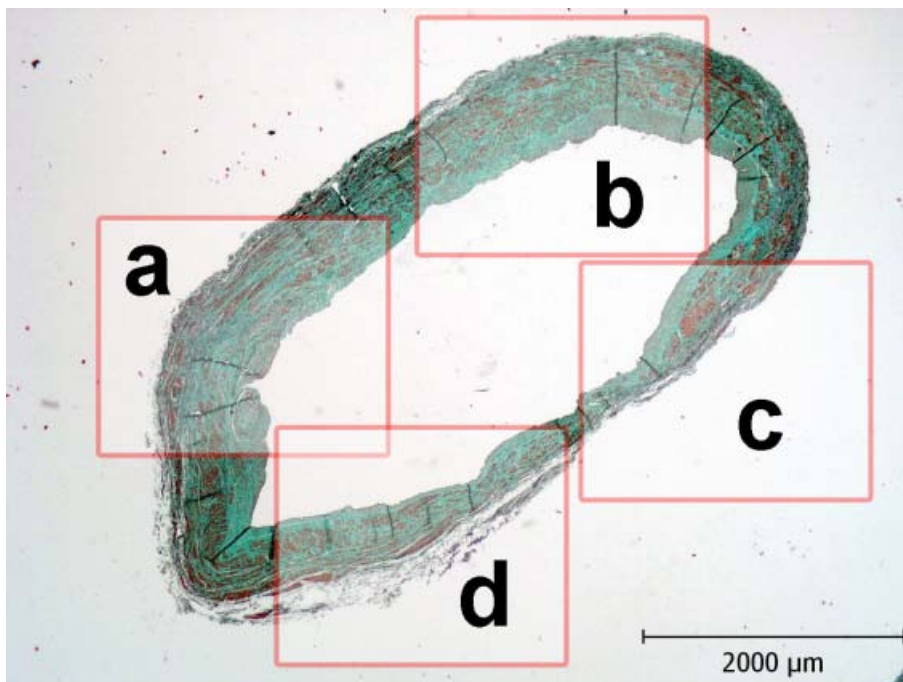
Obr. 47: Hodnocení počtu profilů svalových buněk na jednotku plochy arbitrárních třetin v radiálním směru na podélném řezu aortou. V ilustrovaném případě se Q_A mezi těmito třetinami neliší.

9 Morfometrie žilní stěny

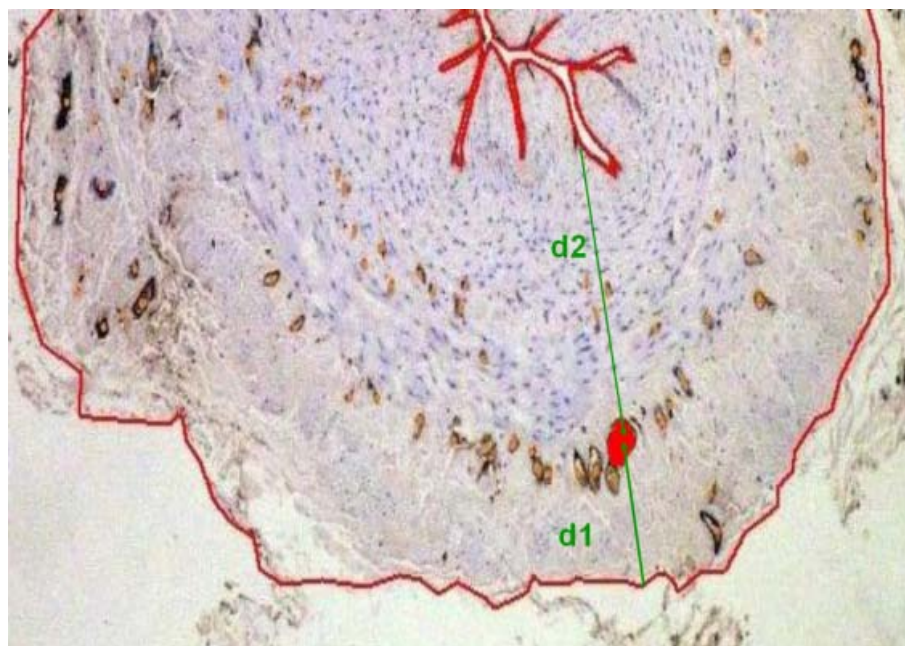
V závislosti na formulaci problému lze u žilní stěny použít velkou část parametrů popsaných u tepen v oddílu 8, jako např. objemové poměry složek cévní stěny, distribuce vasa vasorum apod. Pro ilustraci uvádíme několik příkladů s komentářem (Obr. 48–52).



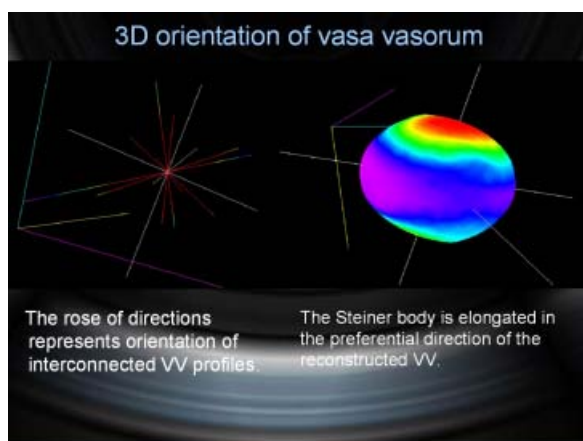
Obr. 48: Průsečíky testovací mřížky s profily hladkých svalových buněk v tunica media et adventitia venae saphenae magnae. MGT.



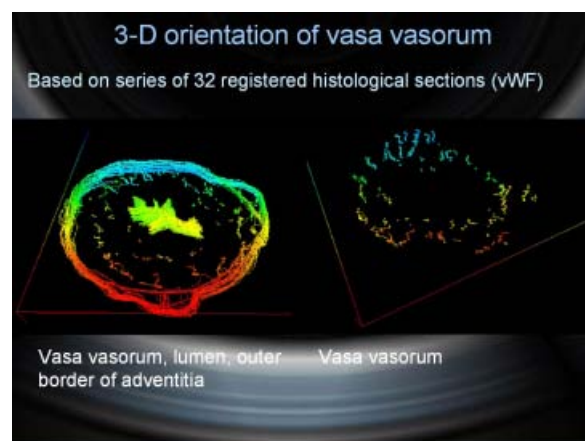
Obr. 49: Vzorkování fotografií po obvodu žilní stěny k posouzení rotační a/symetrie jejího složení. MGT.



Obr. 50: Relativní pozici profilů vasa vasorum (s endotelem značeným imunohistochemicky proti von Willebrandovu faktoru) lze popsat například pomocí $d1$ (vzdálenost profilu od zevního okraje adventicie) a $d2$ (vzdálenost profilu od lumina) a prostřednictvím funkce $f = \frac{d1}{(d1+d2)}$, která nabývá hodnoty 0 na vnějším okraji adventicie a 1 na povrchu intimy.



Obr. 51: Směrová růžice (vlevo) a Steinerův kompakt (vpravo) jako příklady grafických nástrojů k vyhodnocení 3-D orientace vasa vasorum.



Obr. 52: Vizualizace registrovaných profilů vasa vasorum ve stěně vena saphena magna.

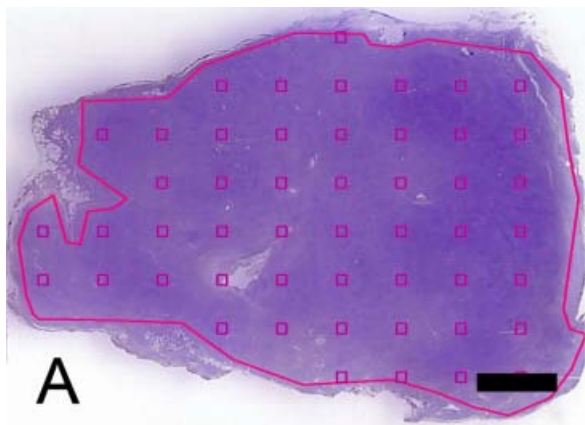
10 Kvantifikace mikrocév v lymfatických uzlinách

Přestože je síť mikroskopických cév (kapilár, pre- a postkapilár) trojrozměrná, může být histolog postaven před úkol vyhodnotit míru přítomnosti cév pouze na základě jednoho či několika málo 2-D řezů, např. z důvodu analýzy archivních řezů. V tom případě je nutné kromě vhodné techniky vzorkování obrazových polí z preparátu (ke spolehlivé identifikaci mikrocév je totiž nutné větší zvětšení, tj. malé zorné pole) získat představu i o závislosti počtu profilů cév viditelných na 2-D řezu na orientaci roviny řezu, jinými slovy o izotropii či anizotropii sítě mikrocév. Tyto techniky budeme demonstrovat na případu mikrovazální hustoty lymfatických uzlin.

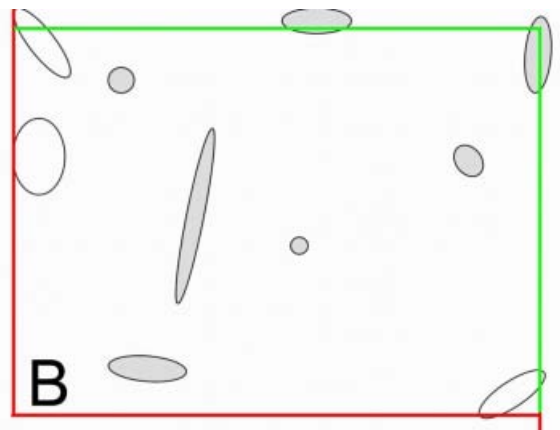
10.1 Příklad histologického zpracování a vzorkování

- archivní bločky lymfatických uzlin i biopsie lymfatických uzlin psa, v nichž lze prokázat endotel pomocí kombinované imunohistochemie (von Willebrandův faktor, vWF) a lektinové histochemie (wheat germ agglutinin, WGA)
- průkaz bazální laminy pomocí imunohistochemie (laminin) a impregnace stříbrem
- systematické rovnoměrné náhodné vzorkování obrazových polí ($n = 50$) z každého řezu \Rightarrow celková plocha $6,92 \text{ mm}^2$ z řezu
- porovnání systematického vzorkování s výběrem obrazových polí založeným na předběžném výběru nejhustěji vaskularizovaných oblastí preparátu (tzv. “hot spots”)
- porovnání výsledků při opakovaném hodnocení týmž pozorovatelem a více pozorovateli s využitím intraclass correlation coefficient [38] a Bland-Altmanových rozdílových grafů [4]
- porovnání mikrovazální hustoty u třech řezů s třemi vzájemně kolmými rovinami řezu identickým tkáňovým bločkem
- tzv. mikrovazální hustotu (microvessel density), lze stereologicky vyjádřit jako parametr $Q_A = \frac{Q}{A}$, kde Q je počet profilů mikrocév zachycených na řezu o referenční ploše A . Pravidlo k započítání profilů objektů ve 2-D je nestranné [12], viz oddíl 5.7. Plochu hodnotícího rámečku známe z kalibrace, event. ji můžeme při nepravidelnostech obrysů referenční plochy hodnotit bodovou testovací mřížkou. Za počítanou událost je považován každý zřetelně nezávislý shluk pozitivních buněk (přítomnost viditelného lumina není podmínkou). Postup vzorkování – 2-D počítání profilů mikrocév – odhad referenční plochy je v daném pořadí na snímcích 53–56.

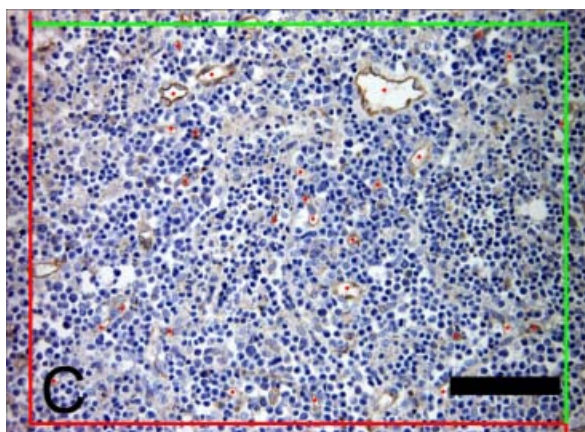
10.2 Vzorkování a kvantifikace



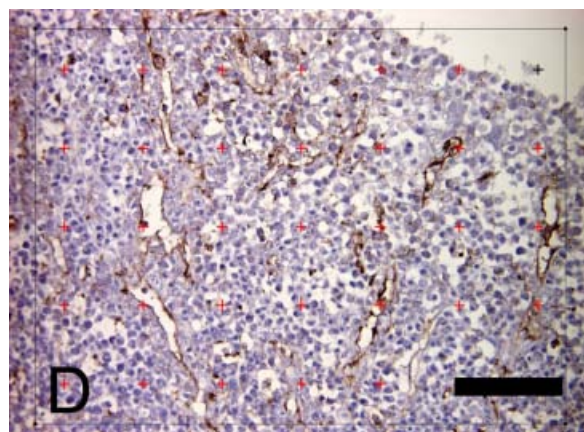
Obr. 53: Vzorkování 50 obrazových polí pořízených pod objektivem 40× z řezu. Měřítko 3 mm.



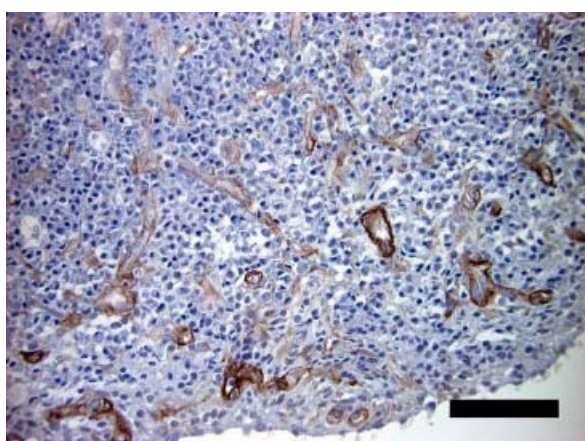
Obr. 54: Použití 2-D hodnotícího rámečku na modelovém příkladu.



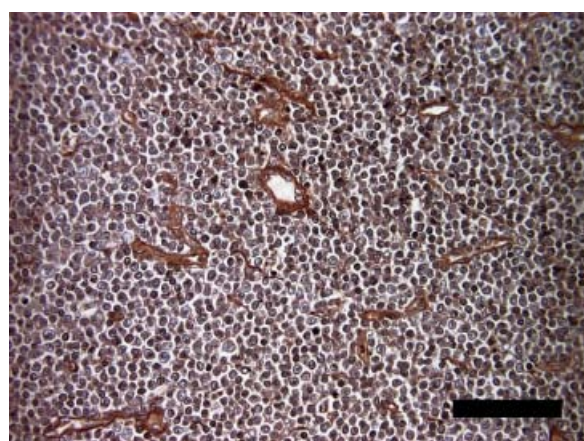
Obr. 55: Použití 2-D hodnotícího rámečku vede k započítání červeně označených profilů mikrocév. Měřítko 80 μm .



Obr. 56: Nezaujímá-li plocha řezu celý hodnotící rámeček, vyhodnotíme referenční plochu pomocí bodové testovací mřížky. Měřítko 80 μm .



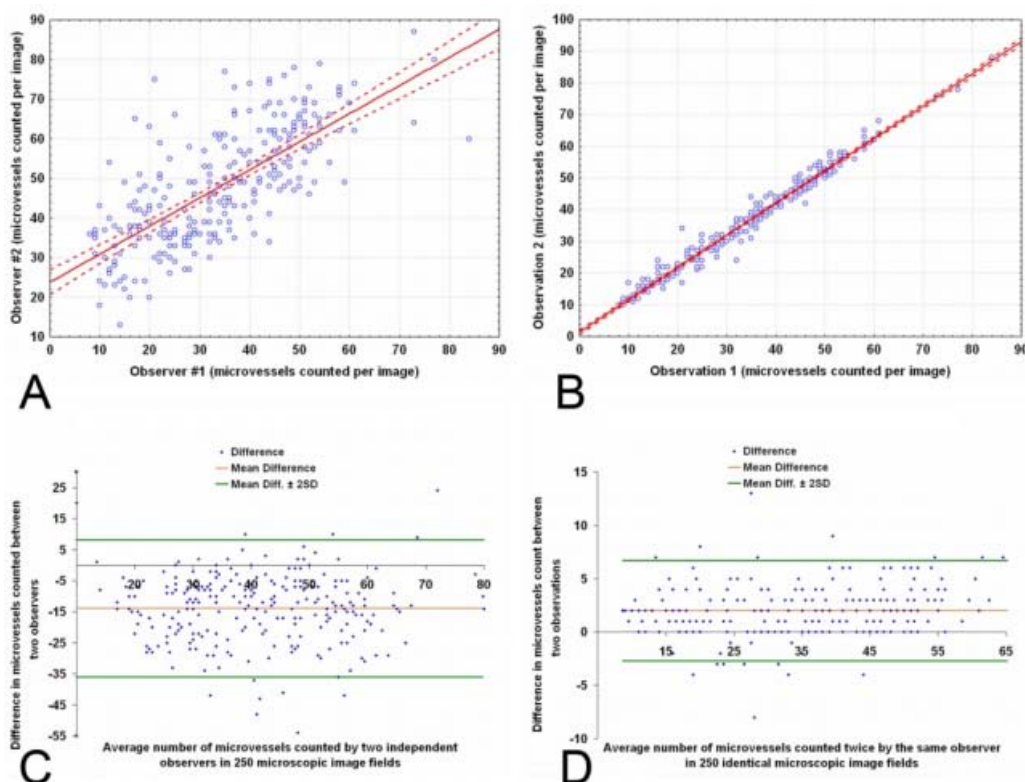
Obr. 57: Průkaz bazálních lamin mikrocév pomocí imunohistochemie na laminin. Některé novotvořené kapiláry s nesouvislou bazální laminou mají slabou či žádnou reakci. Měřítko 80 μm .



Obr. 58: Průkaz bazálních lamin mikrocév pomocí impregnace stříbrem. Kapiláry s nesouvislou laminou mají slabou reakci a bazální laminy často splývají s argyrofilními retikulárními vlákny stromatu uzliny. Měřítko 80 μm .

10.3 Variabilita při opakovaném hodnocení a různé orientaci roviny řezu

Koeficient ICC pro opakované hodnocení (Obr. 59) týměž pozorovatelem byl v demonstrováném případě 0,847 (hranice intervalu spolehlivosti 0,114 a 0,968), a pro opakované hodnocení dvěma různými pozorovateli byl 0,631 (hranice intervalu spolehlivosti 0,014 a 0,840). K posouzení rozdílu mezi dvěma opakovanými hodnoceními lze použít standardních statistických testů (zde v párové variantě).

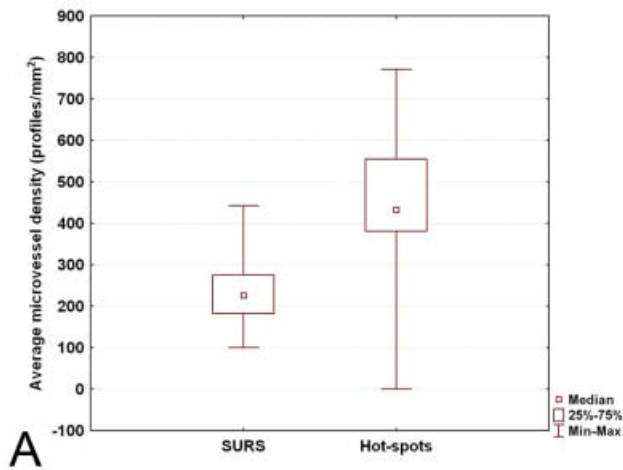


Obr. 59: Opakované hodnocení počtu profilů mikrocév na jednotku plochy řezu dvěma pozorovateli (A, C) a stejným pozorovatelem (B, D) formou bodových grafů (A, B, hranice intervalu spolehlivosti při $p=0,05$ červeně) a Bland-Altmanových grafů s průměrným rozdílem mezi opakovaným hodnocením.

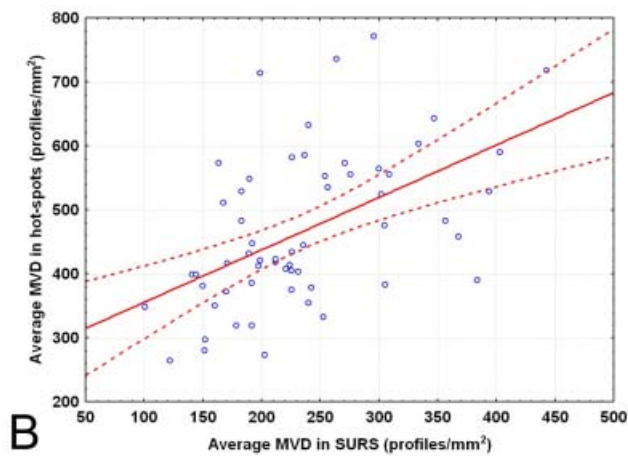
Při testování (an)izotropie profilů mikrocév porovnáním hodnot získaných ve třech vzájemně kolmých rovinách řezu nebyly prokázány (ANOVA) významné rozdíly mezi těmito směry u dvou a byly prokázány u jedné ze třech takto porovnávaných uzlin. Lze z toho vyvodit, že trojrozměrný systém mikroskopických cév obecně může, ale také nemusí být izotropní. Protože eventuální anizotropie by tak mohla zkreslovat výsledky 2-D studií, je vhodné zajistit náhodnou orientaci uzlin před krájením.

10.4 Vliv strategie vzorkování obrazových polí

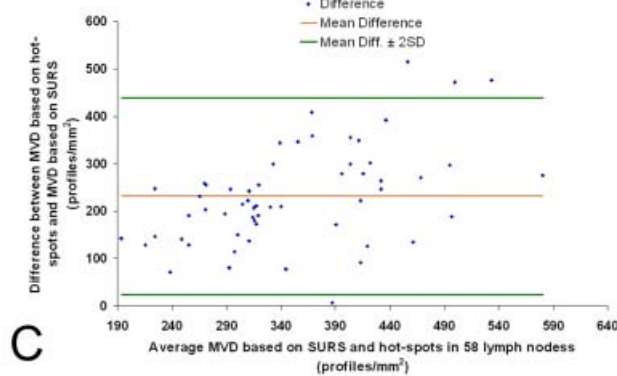
Porovnáním výsledků získaných stejnou technikou počítání mikrocév, avšak rozdílnou metodou výběru nasnímaných obrazových polí zjišťujeme, že výsledky statisticky významně závisí na způsobu vzorkování. Významně vyšších hodnot mikrovazální hustoty je dosaženo při výběru polí z oblastí “hot spots” ve srovnání se systematickým nestranným vzorkováním (SURS), což je příkladem zásadního vlivu výběru hodnocených částí preparátu na celkový výsledek kvantitativní studie (Obr. 60–61).



Obr. 60: 2-D plošná hustota profilů mikrocév hodnocených u “hot-spots” je u identických řezů významně vyšší nežli hodnota získaná u systematicky vzorkovaných snímků.



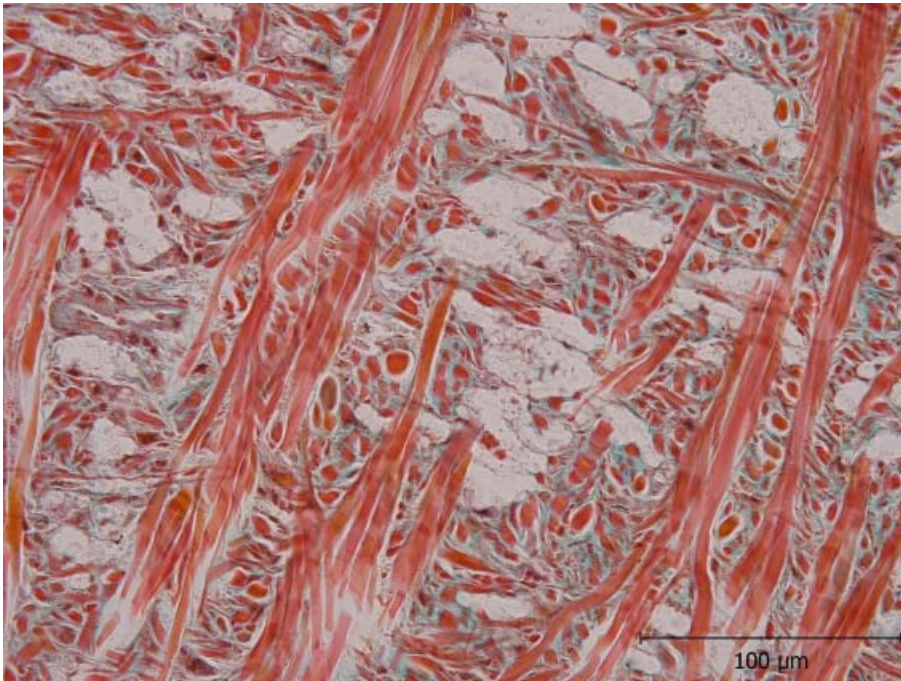
Bland-Altman difference plot for microvessel density (MVD) based on SURS and hot-spots



Obr. 61: Spearmanova korelace mezi oběma způsoby výběru polí není vysoká (Spearman $R=0,55$) (B), což může být pravděpodobně způsobené nevyhnutelnou subjektivitou míst a priori vybraných pozorovatelem jakožto “hot spots”. Průměrný rozdíl mezi oběma postupy je 231 profilů mikrocév/ mm^2 (Bland-Altmanův graf, C).

11 Morfometrie hladké svalové a pojivové tkáně

Jedním z příkladů hladké svalové a pojivové tkáně je tkáň odebraná z chodila plže rodu *Arion sp.* Tato tkáň je tvořena především hladkými svalovými buňkami, kolagenní pojivovou tkání a haemocoelickými dutinami (Obr. 62). Hladké svalové buňky uvnitř této tkáně jsou vřetenovitého tvaru a tvoří složitou trojrozměrnou síť. Parametry, které mohou být později využity např. pro počítačové modelování této tkáně, jsou: objemové podíly hlavních složek tkáně, tedy. hladkých svalových buněk a okolní mezibuněčné hmoty, objem jednotlivých hladkých svalových buněk a jejich orientace v prostoru.



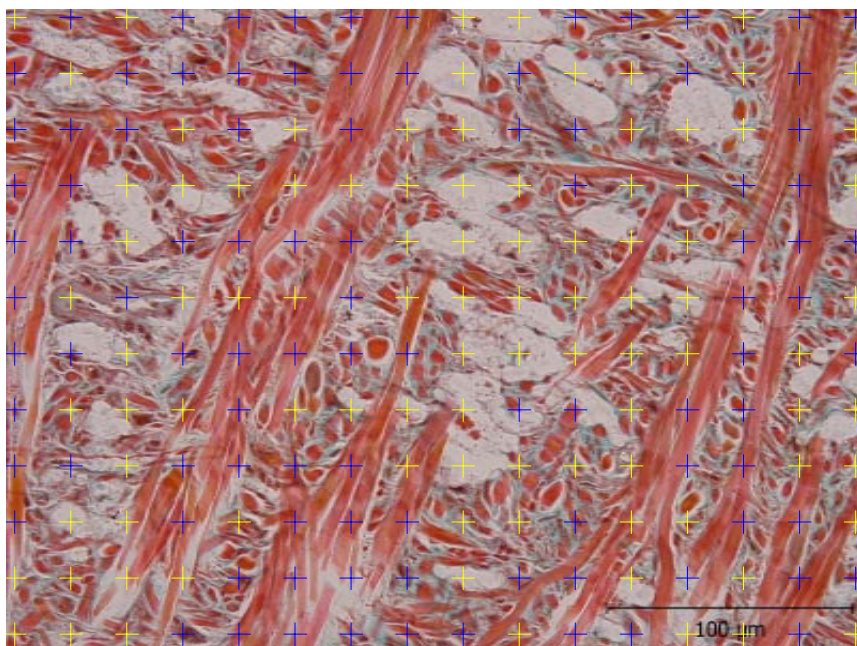
Obr. 62: Hladká svalová a pojivová tkáň plžů: hlubší vrstva nohy plže. Subepiteliální kolagenní pojivová tkáň (modře) s trojrozměrnou sítí vláken hladkých svalových buněk (červeně). Opticky prázdné dutiny (bíle) jsou haemocoelické sinusy, které jsou za normálních fyziologických podmínek naplněny tělní tekutinou. MGT, měřítko = 100 μm .

11.1 Objemový podíl hladkých svalových buněk

1. V prvním kroku je nutné zvolit potřebné zvětšení tak, abychom mohli identifikovat jednotlivé svalové buňky a současně měli dostatečně velké zorné pole. Dále je nutné vybrat oblast, kterou budeme kvantifikovat tak, abychom se nedostali na okraj tkáně, kde je velké množství mukózních buněk, ale zaměřili se na vnitřní oblast tkáně.
2. Dalším krokem je určení potřebného počtu řezů dle Gundersena a Jensenové [14] (oddíl 6.4.2). U mikrosnímků hladké svalové a pojivové tkáně plžů pořízených se zvětšením 20x je počet řezů roven 12.
3. Samotný objemový podíl hladkých svalových buněk $V_V(SMC, tissue)$ definovaný jako podíl objemu hladkých svalových buněk v referenční oblasti $V(SMC)$ a objemu referenční oblasti $V(ref)$ odhadneme pomocí rovnice 40:

$$estV_V(SMC, ref) = \frac{\sum_{i=1}^m P_i}{P_T}, \quad (40)$$

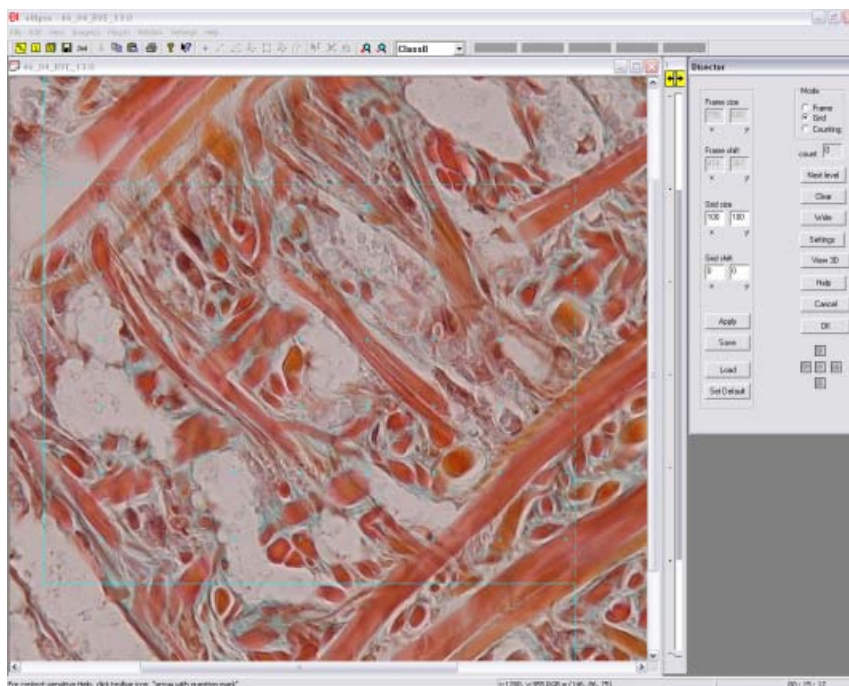
kde P_i je počet bodů testovací sondy tvořené mřížkou ekvidistantních bodů, které protínají profily hladkých svalových buněk na i -tém řezu, P_T je počet všech bodů testovací mřížky a $m = 12$ je počet řezů použitých pro kvantifikaci. Metoda je tedy založena na počítání průsečíků mezi bodovou testovací sondou a profily hladkých svalových buněk na 2-D mikrosnímčích (Obr. 63).



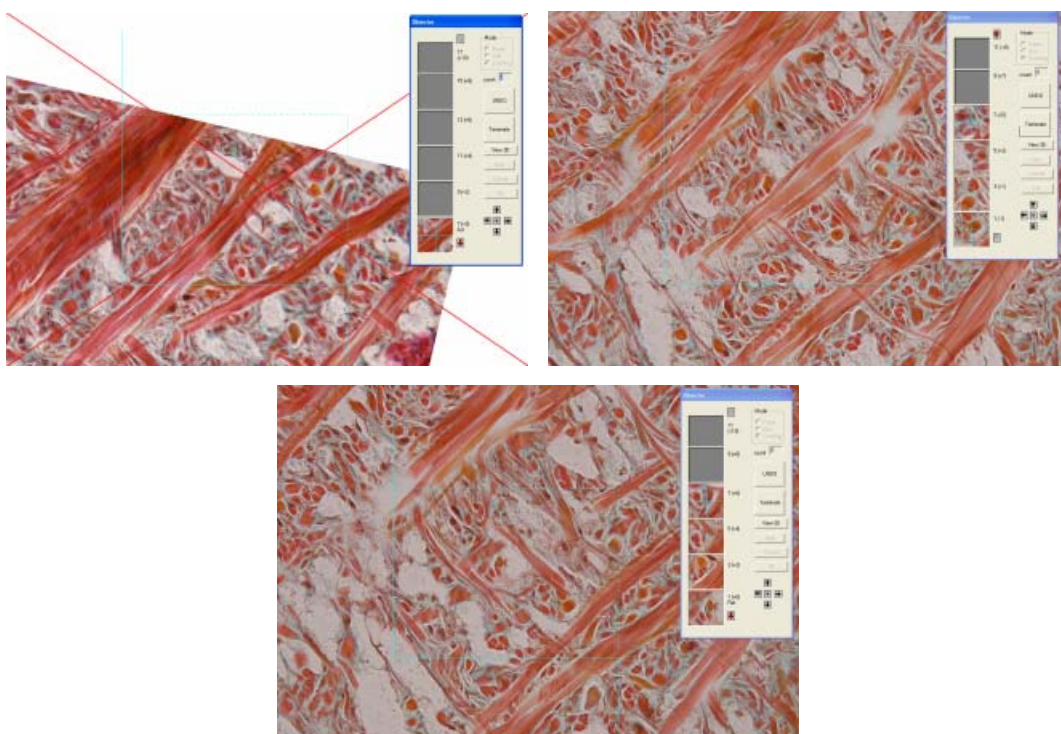
Obr. 63: Průsečíky profilů hladkých svalových buněk na 2-D řezech s testovací sondou tvořenou ekvidistantní sítí bodů. MGT.

11.2 Objem hladkých svalových buněk

1. Nejprve je nutné stanovit numerickou hustotu hladkých svalových buněk uvnitř referenčního objemu $estN_V(SMC, ref)$, kterou můžeme odhadnout pomocí testovací sondy fyzický disektor (oddíl 5.8):
 - (a) Provedeme registraci sériových řezů ve směru osy Z se zohledněním průběhu hladkých svalových buněk v prostoru.
 - (b) Vybereme vhodnou oblast zájmu tedy referenční objem disektoru, který je na jednotlivých řezech charakterizovaný obdélníkovým rámečkem (Obr. 64). Základní řezy disektoru představují: náhledkový řez (look-up section), který tvoří zakázanou rovinu, referenční řez (reference section), který tvoří povolenou rovinu a vnitřní řezy (middle sections) disektoru (Obr. 65).



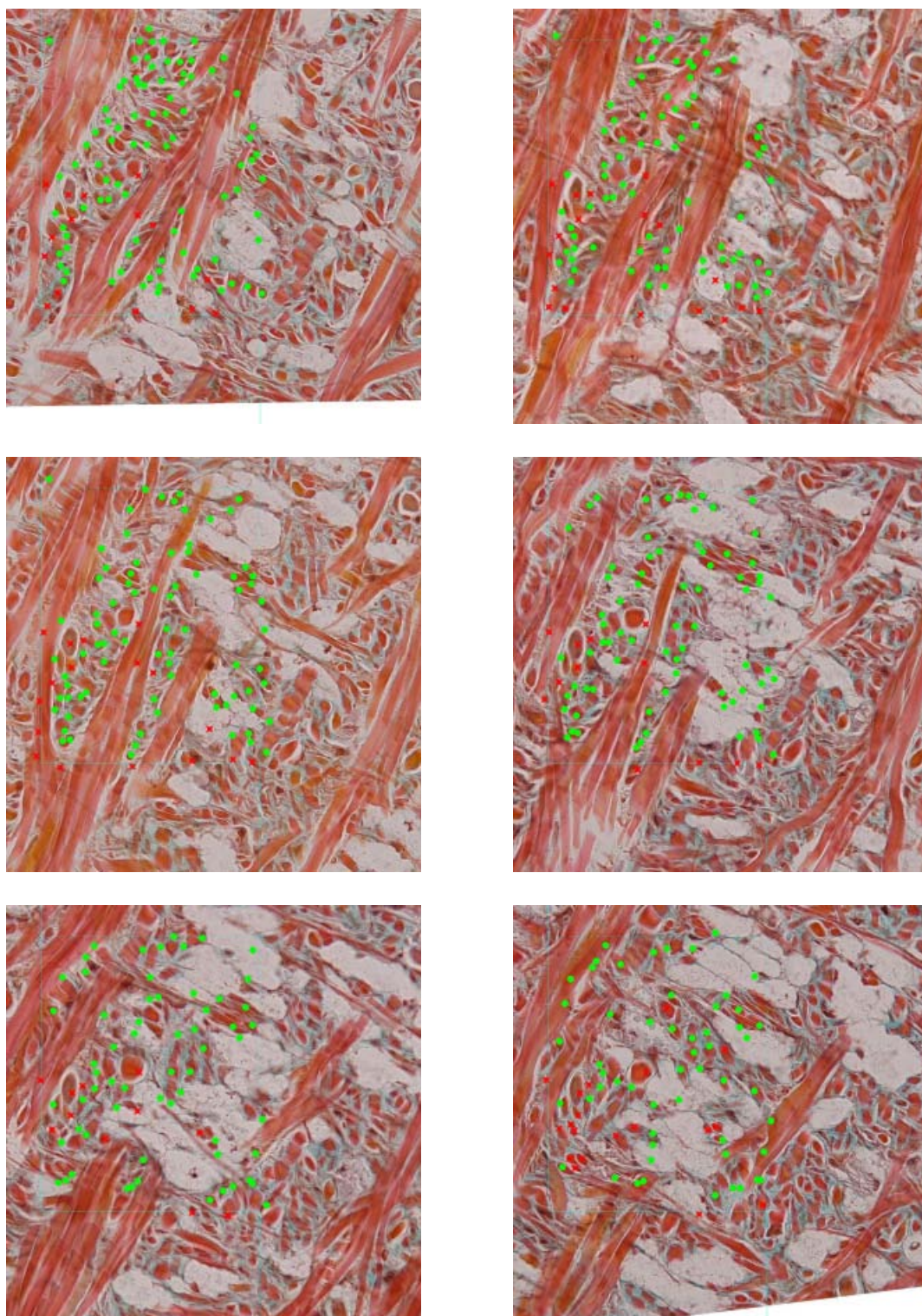
Obr. 64: Rámeček disektoru na jednom z registrovaných řezů. Plné čáry reprezentují zakázané linie a přerušované čáry představují povolené linie disektoru.



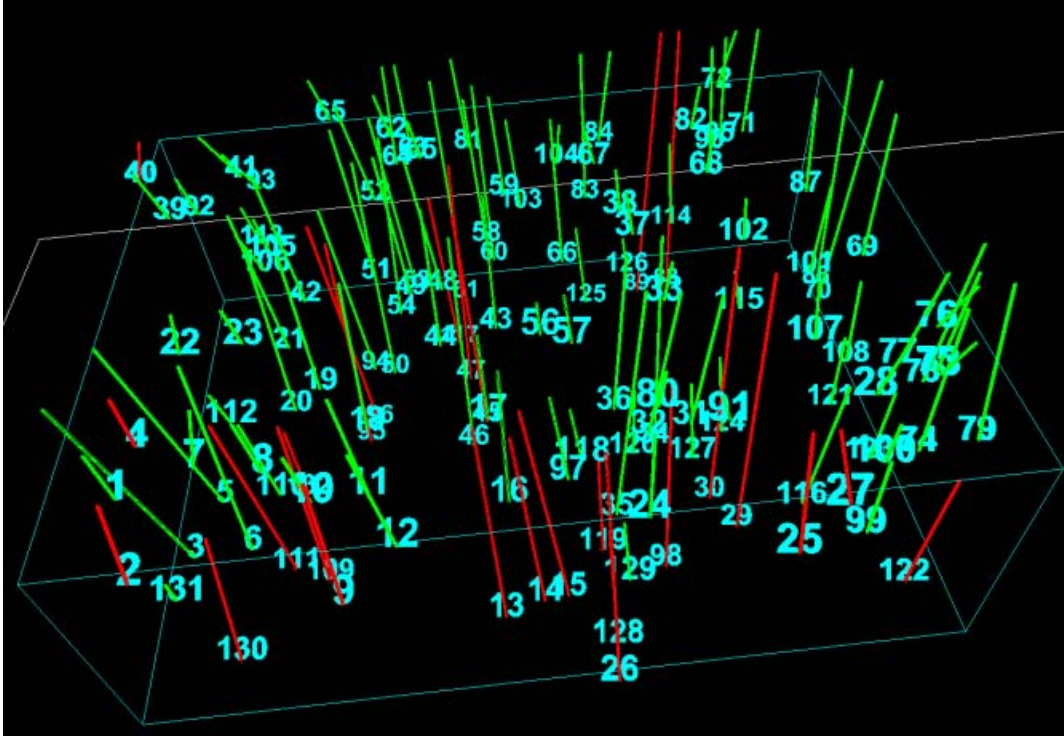
Obr. 65: Vlevo nahoře: Náhledová rovina (look-up section, horní řez ze série). Vpravo nahoře: Jeden z prostředních řezů disektoru. Dole: Referenční rovina (look down (reference) section).

- (c) Procházíme jednotlivé řezy a počítáme buňky (profily buněk na 2-D řezech), které se nacházejí uvnitř referenční oblasti definované rámečkem disektoru a nedotýkají se nebo neprotínají zakázané linie ani zakázanou náhledovou rovinu. V případě, že se buňka nachází v referenční oblasti a zasahuje povolenou

referenční rovinu je započítána jako buňka uvnitř disektoru (Obr. 66). Výsledné započtené a nezapočtené buňky uvnitř disektoru můžeme graficky zobrazit ve 3-D (Obr. 67).



Obr. 66: Registrované řezy o tloušťce $5 \mu\text{m}$. Body (středů profilů buněk na jednotlivých 2-D řezech), které se započítávají jsou označeny zeleně. Body, které se nezapočítávají (protínají zakázané linie nebo zakázanou rovinu) jsou označeny červeně.



Obr. 67: Trojrozměrné schéma započtených (zelené) a nezapočtených (červené) hladkých svalových buněk uvnitř disektoru.

- (d) Počet hladkých svalových buněk uvnitř disektoru je spojen s objemem disektoru (referenční oblasti), který je roven ploše oblasti rámečku disektoru na 2-D řezech vynásobené vzdáleností mezi jednotlivými řezy. Nevychýlený odhad numerické hustoty hladkých svalových buněk $estN_V(SMC, ref)$ uvnitř referenčního objemu je pak dán rovnicí 41:

$$estN_V(SMC, ref) = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i^-(SMC)}{\sum_{i=1}^n P_i(ref)} \cdot \frac{p}{a \cdot h}, \quad (41)$$

kde n je počet disektorů (sampling bricks), $Q_i^-(SMC)$ je počet buněk napočtených uvnitř i -tého disektoru, $P_i(ref)$ je počet bodů bodové sondy v i -tém disektoru, které protnou referenční prostor, a je aktuální plocha rámečku disektoru a h představuje výšku disektoru.

2. Při znalosti objemového podílu hladkých svalových buněk $V_V(SMC, ref)$ a hodnoty numerické hustoty hladkých svalových buněk $N_V(SMC, ref)$ může vypočítat střední hodnotu objemu jednotlivých hladkých svalových buněk $V(SMC)$ pomocí rovnice 42:

$$V(SMC) = \frac{V_V(SMC, ref)}{N_V(SMC, ref)}. \quad (42)$$

3. Hladké svalové buňky mající vřetenovitý tvar můžeme je tedy aproximovat pomocí elipsoidu, jehož objem je definován rovnicí 43:

$$V(elipsoid) = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c, \quad (43)$$

kde a je hlavní poloosa, b je první vedlejší poloosa a c druhá vedlejší poloosa elipsoidu. Za předpokladu, že vedlejší osy budou mít stejnou velikost, tedy $b = c$, přejde

vztah pro objem elipsoidu (43) na zjednodušený tvar 44:

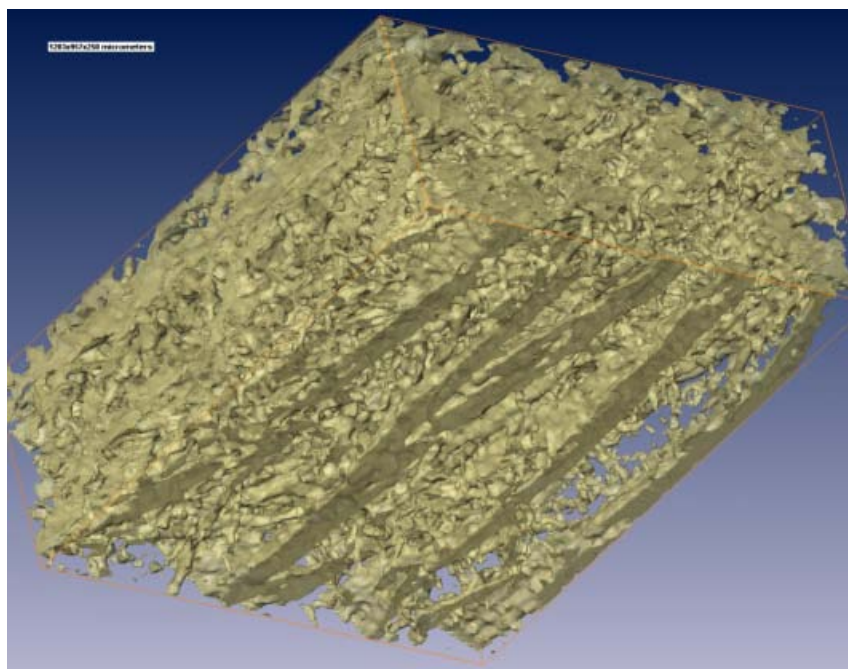
$$V(\text{elipsoid}) = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b^2. \quad (44)$$

Užitím tohoto vztahu, středního objemu hladké svalové buňky $V(SMC)$ a hodnoty vedlejší poloosy elipsoidu $b(SMC)$ odhadnuté z mikrosnímků, můžeme vypočítat hlavní poloosu elipsoidu aproximujícího hladkou svalovou buňku dle rovnice 45:

$$a = \frac{3 \cdot V(SMC)}{4 \cdot \pi \cdot b(SMC)^2}. \quad (45)$$

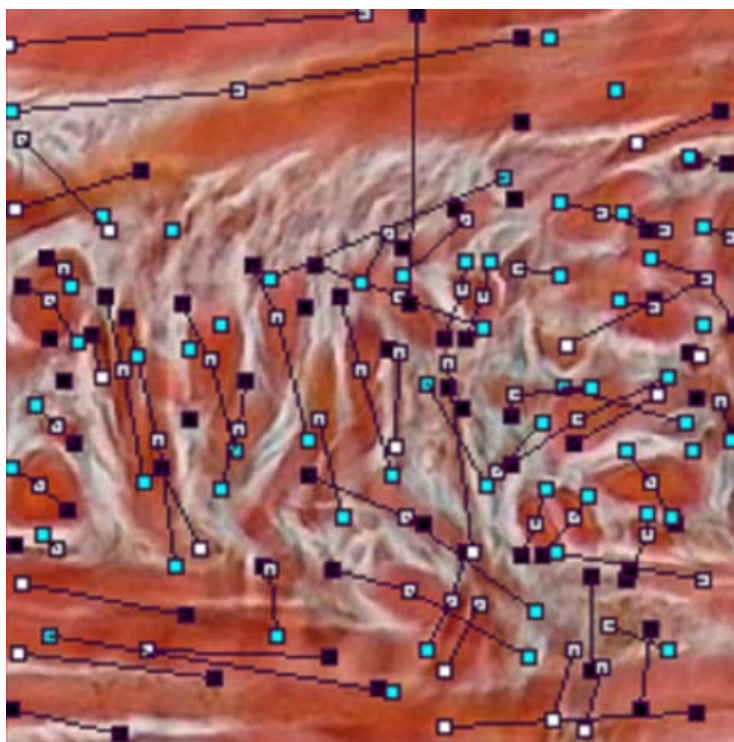
11.3 Orientace (směrová růžice) hladkých svalových buněk

1. Pro posouzení (an)izotropie (tj. nepřítomnosti, resp. přítomnosti význačně preferovaných směrů) hladkých svalových buněk chodidla plže (Obr. 68), nejprve zvolíme vhodný objemový element, ve kterém budeme orientaci buněk zjišťovat. Je nutné zohlednit velikost zkoumaných buněk, resp. jejich délku a tloušťku, a tloušťku řezů tak, abychom testovali orientaci buněk uvnitř krychle. V případě hodnocení orientace svalových buněk uvnitř tkáně plže použijeme objemový element o velikosti $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$. Před samotným měřením je nutné jednotlivé sériové mikrosnímky zaregistrovat podle osy Z se zohledněním návaznosti jednotlivých tkáňových komponent v sérii řezů (oddíl 7).

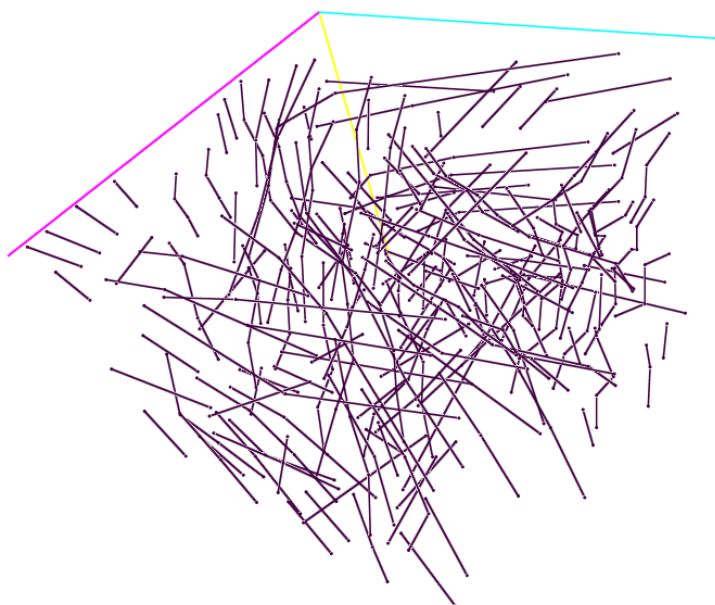


Obr. 68: 3D rekonstrukce hladkých svalových buněk uvnitř hladké svalové a pojivové tkáně plže. Na obrázku je patrné prostorové uspořádání svalových buněk.

2. V objemovém elementu procházíme jednotlivé mikrosnímky a označujeme středy profilů jednotlivých svalových buněk tak, že vytváříme soubor přímek aproximujících středy hmotnosti jednotlivých buněk v celém objemovém elementu (Obr. 69). Získáme tak systém přímek, které jsou definovány směry jednotlivých přímek a jejich délkou (Obr. 70).



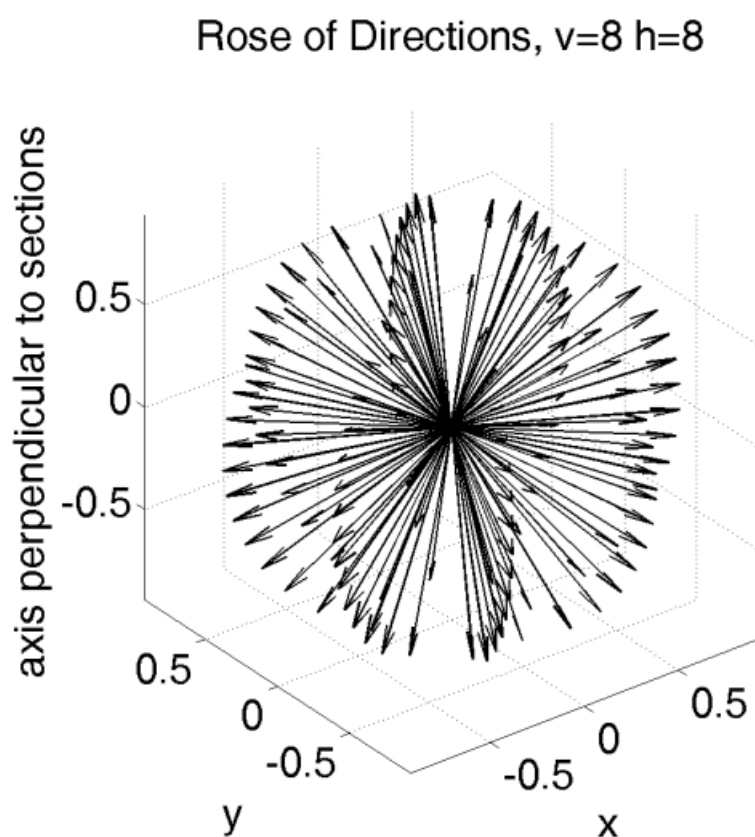
Obr. 69: Středů profilů svalových buněk označené na řezech a propojené úsečkami ve 3-D. Body na mikrosnímku příslušející jednotlivým buňkám: sledovaný snímek: bílé, předchozí snímek: černé, následující snímek: modré.



Obr. 70: Výsledný systém přímek definovaný směry jednotlivých přímek a jejich délkou.

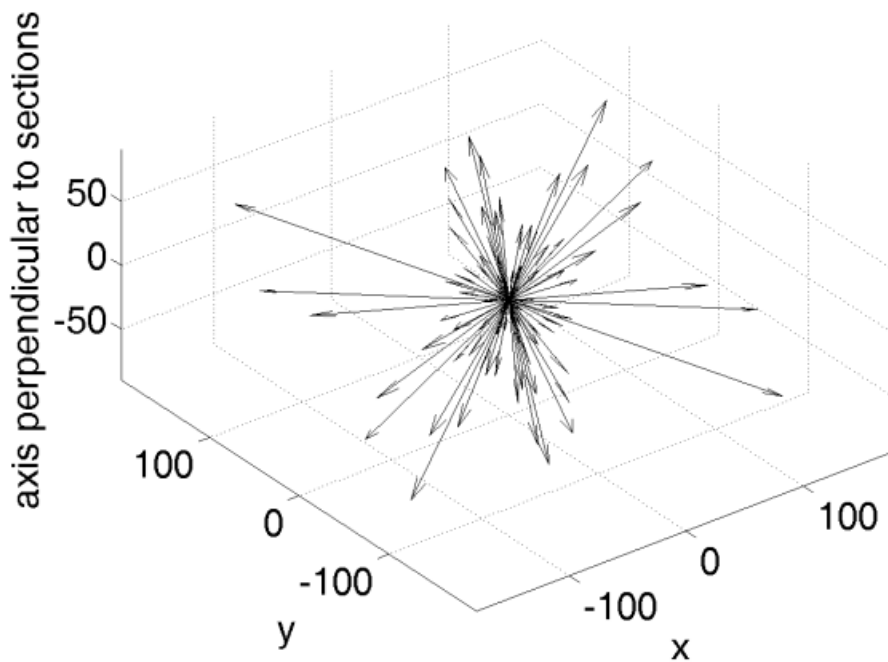
3. Pro stanovení směrové růžice nejprve rozdělíme polokouli v \mathbb{R}^3 na H rovnoběžek a V poledníků tak, aby čtyřúhelníky, které jsou ohraničeny těmito rovnoběžkami a poledníky, měly stejnou plochu. Propojením středů těchto ploch se středem polokoule dostaneme izotropní systém jednotkových vektorů (přímek) (Obr. 71). Výsledný

system jednotkových vektorů pronásobíme velikostí přímk v daných směrech a získáme směrovou růžici hladkých svalových buněk (Obr. 72). Pro dvou dimensionální zobrazení této směrové růžice můžeme použít histogram, jehož osu X představují úhly azimutu, osu Y představují úhly elevace a barevná škála nám ukazuje délku hladkých svalových buněk nacházejících se v daných směrech (Obr. 73).

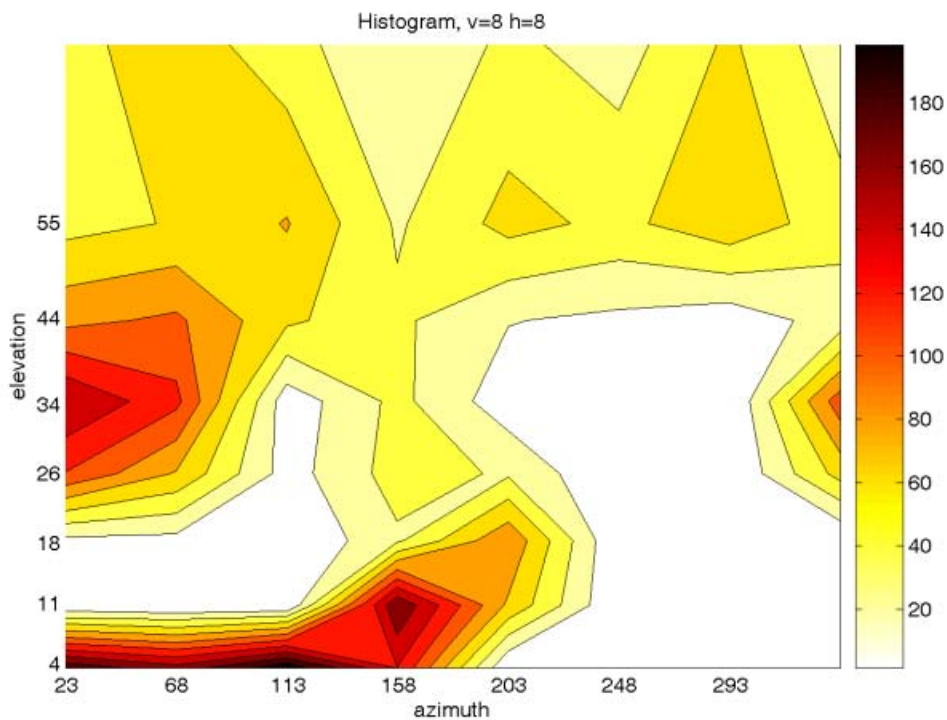


Obr. 71: Izotropní jednotkový systém vektorů (přímek) získaný rozdělením polokoule na osm poledníků a osm rovnoběžek.

Rose of Directions Multiplied by Length of Vectors $v, h=8$



Obr. 72: Směrová růžice hladkých svalových buněk pro rozdělení polokoule na osm rovnoběžek a osm poledníků.



Obr. 73: Směrová růžice hladkých svalových buněk ve 2-D pro rozdělení polokoule na osm rovnoběžek a osm poledníků. Osa X představuje úhly azimutu, osa Y představuje úhly elevace a barevná škála ukazuje délku hladkých svalových buněk nacházejících se v daných směrech.

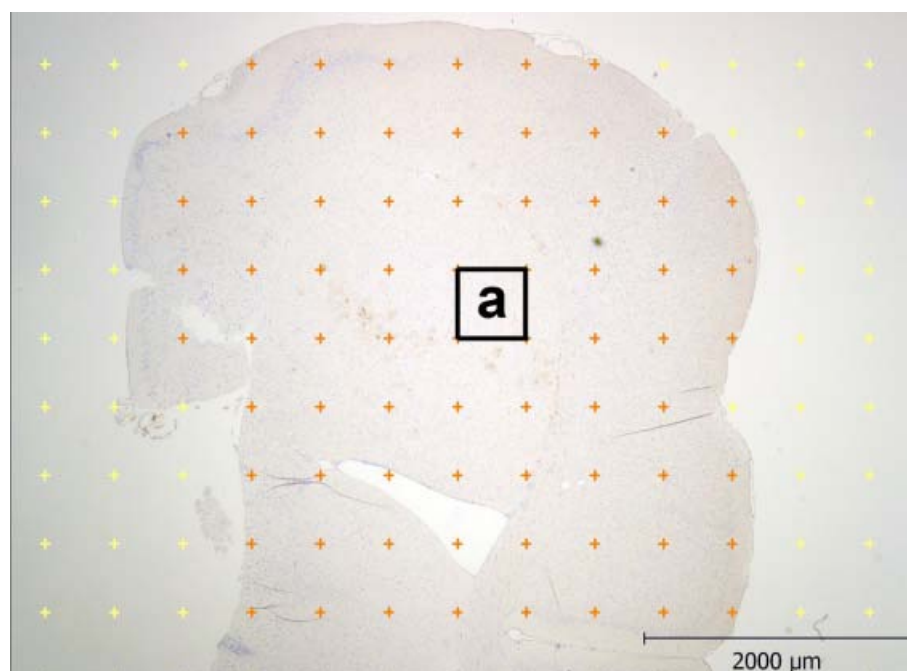
12 Morfometrie centrálního nervového systému

12.1 Objemový podíl imunohistochemicky značených neuronů

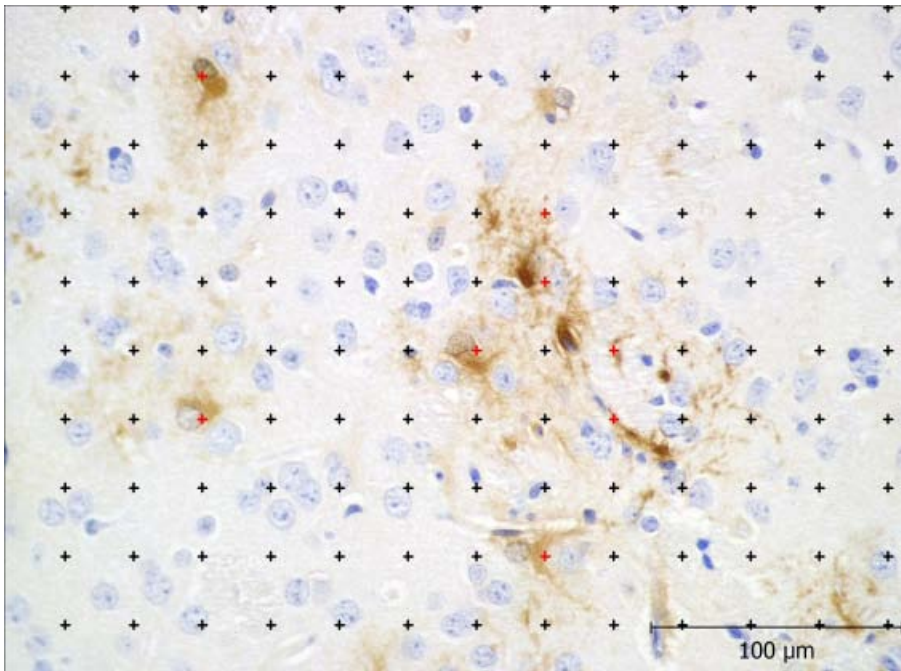
Řešíme-li objemový podíl značených neuronů v anatomicky definované oblasti, vhodným příkladem pro úlohu tohoto typu může být objemový podíl eGFP-pozitivních neuronů po aplikaci transgenních virionů s reportérovým genem eGFP (eGFP, enhanced green fluorescent protein) v oblasti našeho zájmu, např. v corpus striatum et corpus callosum (rovnice 46) nebo v celé hemisféře (rovnice 47) (Obr. 74–77). Volba referenční oblasti v sérii histologických řezů mozku závisí samozřejmě na biologické otázce, kterou sledujeme, na způsobu aplikace látek, jejichž přítomnost prokazujeme (např. injekce vektorů s reportérovým genem eGFP apod.).

$$V_V(eGFP, striatum + callosum) = \frac{estV(eGFP)}{estV(striatum + callosum)} \times 100(\%), \quad (46)$$

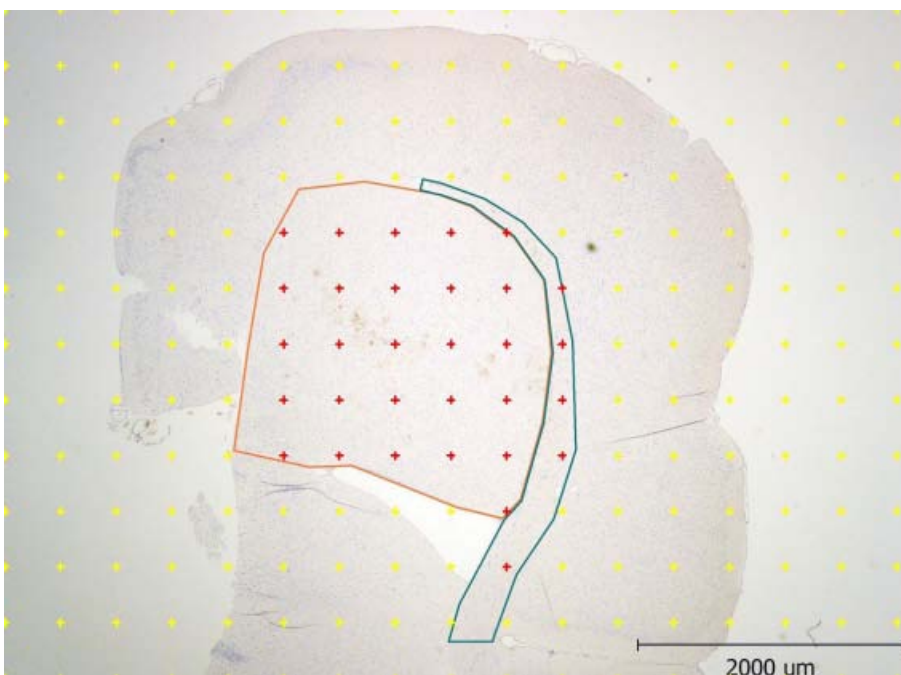
$$V_V(eGFP, hemisphere) = \frac{estV(eGFP)}{estV(hemisphere)} \times 100(\%). \quad (47)$$



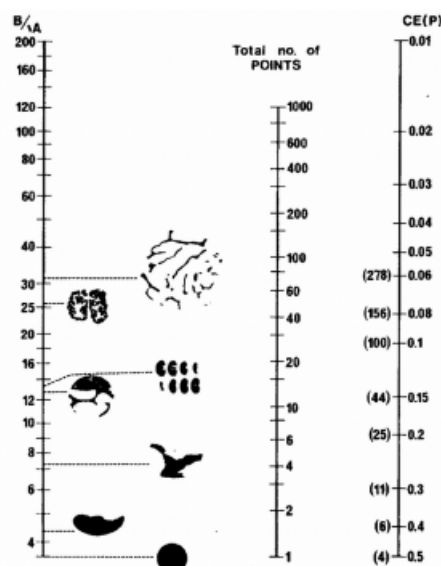
Obr. 74: Průsečíky bodové testovací mřížky s plochou profilu hemisféry myši a vyznačení mřížkové konstanty a .



Obr. 75: Průsečíky bodové testovací mřížky s plochou profilů neuronů značených pomocí eGFP.



Obr. 76: Průsečíky bodové testovací mřížky s plochou profilu corpus striatum (ohrazeno červeně) a corpus callosum mozku myši.



Obr. 77: Nomogram pro predikci počtu průsečíků stereologického testovacího systému při daném koeficientu chyby (CE) odhadu podle Gundersena a Jensenové [14]. Levá osa $circumference/\sqrt{area}$. V případě náhodně vybraných neuronů byla hodnota $circumference/\sqrt{area}$ rovna 6.8, což při požadované hodnotě CE odhadu $CE \approx 0.01$ dává potřebu cca 300 průsečíků u každého z hodnocených mozků.

12.2 Odhad absolutního počtu neuronů pomocí frakcionátoru

Zajímá-li nás spíše absolutní počet vhodně značených nervových buněk ve zvoleném kompartmentu (např. pro posouzení jejich numerické atrofie či naopak nárůstu jejich počtu), aplikujeme techniku frakcionátoru, který využívá kombinaci systematického vzorkování a optického či fyzického disektoru. Principem odhadu je spočítání zjistitelného počtu buněk ve známé části (frakci) celého (makroskopického) kompartmentu, viz oddíl 5.9 a rovnice 48. Hranice tohoto kompartmentu vyplývají vždy z biologické otázky a např. u myši je lze mapovat podle Paxinos Mouse Brain Atlas [33].

Protože odhad je založen na vzorkování, je vhodné se přesvědčit, zda je hustota vzorkování dostatečná. Pokud nemáme z již publikovaných prací nebo z vlastní zkušenosti *a priori* informaci o rozdělení četností hodnocených buněk v sériích fyzických či optických řezů zvolené síly, můžeme si v pilotní studii provést vlastní výpočet koeficientu chyby CE, který odráží míru odlišnosti mezi řezy vybranými k hodnocení.

12.2.1 Příklad postupu

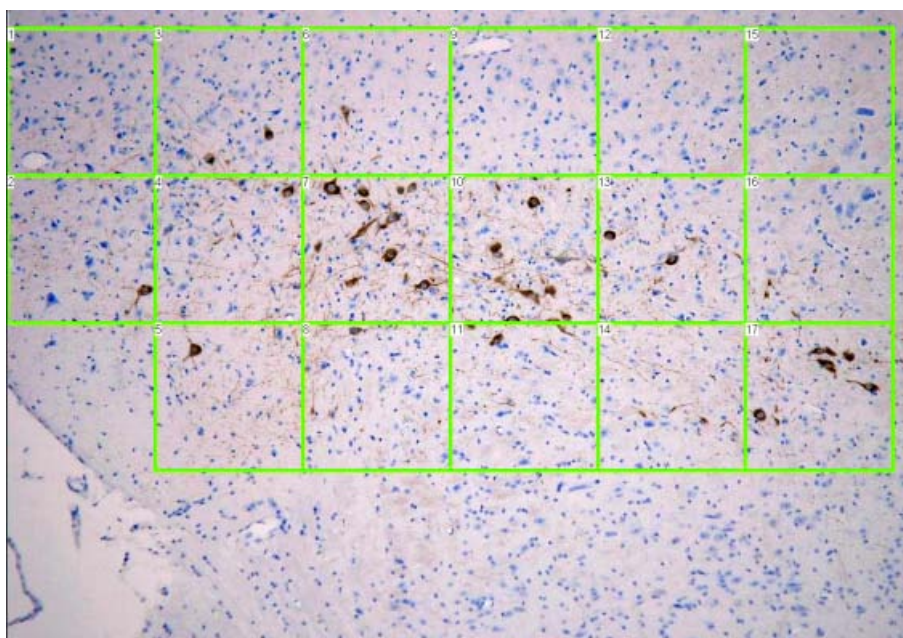
- cílem je zjistit absolutní počet tyrosin-hydroxyláza (TH)-pozitivních neuronů v substantia nigra myši u modelu Parkinsonovy choroby
- z celkového počtu 360 fyzických řezů o síle $6 \mu\text{m}$, které zachycují studovanou část mozku (Obr. 78), vybereme každý 12. pár, tj. 15 párů fyzických řezů (resp., každý 24. řez jakožto referenční a k němu vždy následující řez jako náhledová rovina); tato část řezů vybraných k dalšímu hodnocení tvoří známý podíl (frakci) označenou ssf (section sampling fraction) a hodnota tohoto podílu je známa ($\frac{1}{12}$)
- definujeme si počitatelné objekty (countable events), pokud možno v souladu s výsledky již publikovanými v daném oboru, např: TH-immunoreaktivní perikaryon

(soma) s viditelným neobarveným jádrem, nebo TH-imunoreaktivní část perikarya srovnatelné velikosti

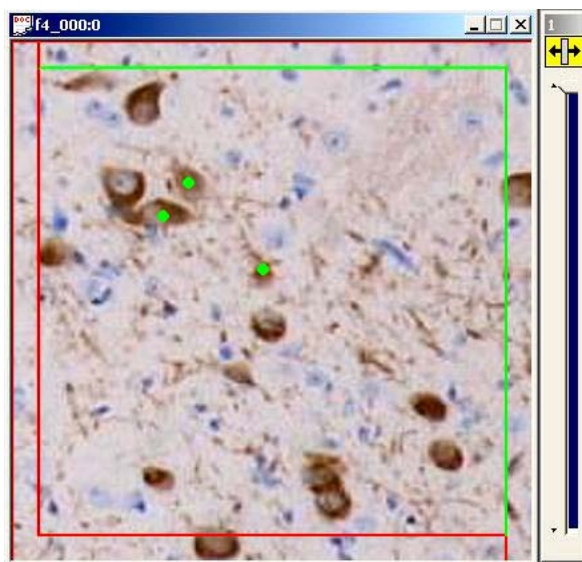
- dle pravidel disektoru počítáme buňky (Obr. 79–80, bilaterálně nebo pravou a levou polovinu mozku zvlášť) ve všech řezech vybraných ze série řezů u daného zvířete, čímž získáme hodnotu $\sum Q^-$; podíl ploch 2-D hodnotících rámečků disektoru vůči ploše řezů je označen asf (area sampling fraction) a je znám
- podíl výšky disektoru a síly řezu je označen hsf (height sampling fraction)
- vypočteme odhad celkového počtu buněk ve vzorku $est \hat{N}$ dle rovnice 48:

$$est \hat{N} = \frac{Q}{f} = \frac{Q}{ssf \cdot asf \cdot hsf}, \quad (48)$$

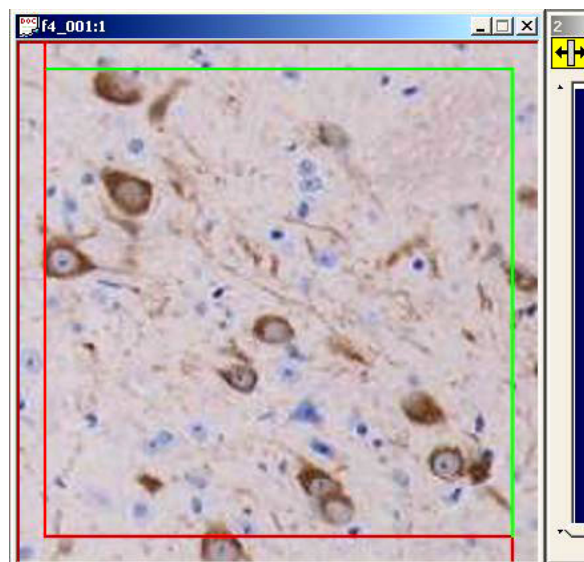
kde Q je celkový počet objektů započítaných v disektorech, f je obecné označení pro podíl konečného výběru hodnoceného objemu v celkovém objemu vzorku a hsf , asf a ssf jsou podíly rozepsané v jednotlivých stupních vzorkování.



Obr. 78: Frontální řez pravou polovinou mozku. Plocha profilu substantia nigra na řezu je pokryta čtyřúhelníky o straně x, y , které reprezentují posun motorizovaného stolku. Plocha spojená s každým x, y krokem $a(x, y \text{ step})$, je $49\,386 \mu\text{m}^2$. Imunohistochemický průkaz tyrosinhydroxylázy.



Obr. 79: Referenční rovina fyzického disektoru s hodnotícím rámečkem (unbiased counting frame). Zeleně jsou označena perikarya neuronů, která splňují kritéria disektorů a jsou tudíž započítána. Ostatní profily nejsou započítány, neboť jsou viditelné na náhledové rovině (Obr. 80) nebo se dotýkají červených zakázaných hranic hodnotícího rámečku.



Obr. 80: Náhledová rovina fyzického disektoru s hodnotícím rámečkem o ploše $40000 \mu\text{m}^2$. Profily neuronů označených v referenční rovině (předchozí snímek) zde již nejsou zachyceny.

12.2.2 Odhad koeficientu chyby vzorku

Odchyly v počtu pozitivních neuronů v systematicky vybraném vzorku individua lze provést obdobným způsobem, jaký byl popsán pro odhad koeficientu chyby při hodnocení objemu, tj. kvadratickým aproximativním vzorcem dle Matherona, modifikovaným pro stereologické použití Gundersenem a Jensenovou [14]:

$$CE = \frac{1}{\sum Q_i} \cdot \sqrt{\frac{3A + C - 4B}{12}}, \quad (49)$$

kde koeficienty A , B , C jsou definovány jako:

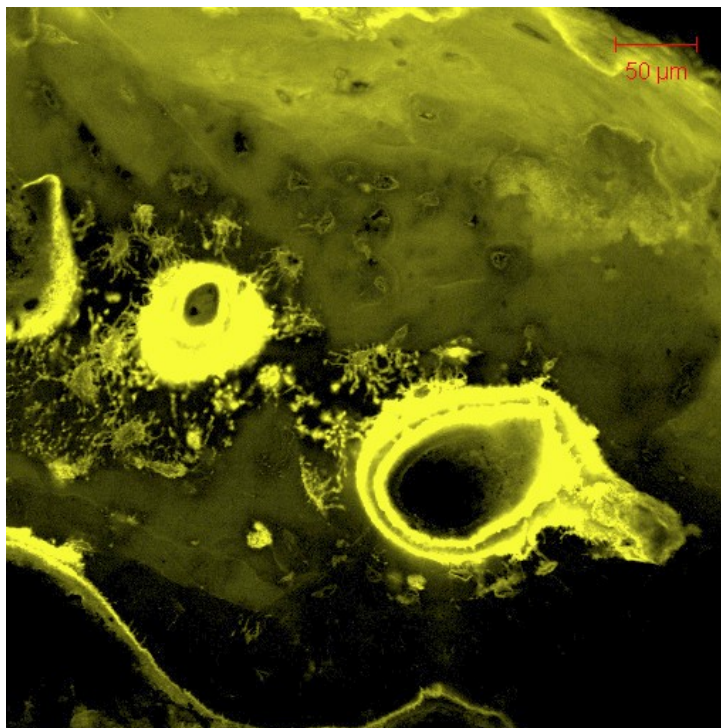
$$A = \sum_{i=1}^n Q_i^- \cdot Q_i^-, \quad B = \sum_{i=1}^{n-1} Q_i^- \cdot Q_{i+1}^-, \quad C = \sum_{i=1}^{n-2} Q_i^- \cdot Q_{i+2}^-. \quad (50)$$

Referenční řez #, i	Q_i^-	$Q_i^- \cdot Q_i^-$	$Q_i^- \cdot Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \cdot Q_{i+2}^-$
12	2	4	38	46
24	19	361	437	627
36	23	529	759	805
48	33	1089	1155	726
60	35	1225	770	1015
72	22	484	638	660
84	29	841	870	986
96	30	900	1020	1020
108	34	1156	1156	884
120	34	1156	884	782
132	26	676	598	260
144	23	529	230	138
156	10	100	60	
168	6	36		
SUM	$\sum Q^- = 326$	$A = 9086$	$B = 8615$	$C = 7949$
ssf	0,86			
asf	0,81			
$a(frame), \mu m^2$	40000			
$a(x, y step), \mu m^2$	49383			
$\frac{h}{t}$	1			
výška disektoru $h, \mu m$	6			
síla disektoru $t, \mu m$	6			
$\frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$	14.362			
$est \hat{N} = 4862$				
$CE_n(GJ)=0,024$				

Tabulka 2: Jednotlivé fáze výpočtu koeficientu chyby pro odhad celkového počtu neuronů $est \hat{N}$ v substantia nigra jednoho mozku myši jsou založené na počtech neuronů zachycených v jednotlivých párech řezů pro disektor Q_i^- . Hodnota koeficientu chyby $CE_n(GJ)$ je přijatelně nízká, počet řezů vzorkovaných pro výběr je tedy pravděpodobně dostačující.

13 Morfometrie kosti

Morfometrie kosti je nejčastěji založena na pozorování výbrusů nedemineralizovanými vzorky. Velký zájem je věnován zejména zkoumání účinků preparátů ovlivňujících rovnováhu mezi resorpcí a syntézou kosti (Obr. 81).



Obr. 81: Fluorescenční snímek výbrusu kosti po dvojitým značení tetracyklinem (double tetracycline labelling (TTC 250 mg po 6 hodinách) (den 1-2, 15-16) následovaném biopsií mediálního kondylu tibie (den 23) u pacienta léčeného preparátem alderonátu sodného (za poskytnutí vzorku děkujeme Dr. Jirsákové).

Pro tyto účely je etablována řada parametrů [32], např.:

parametr	jednotka	parametr	jednotka
bone volume	%	mineralizing surface	%
osteoid volume	%	mineral apposition rate	mm/d
osteoid surface	%	trabecular thickness	mm
osteoblast surface	%	trabecular number	mm ⁻¹
osteoid index	%	trabecular volume	%
osteoid thickness	mm	trabecular separation	mm
eroded surface	%	resorption surface	%
osteoclast surface	%	adjusted apposition rate	mm/d
osteoclast number	mm ⁻²	bone formation rate	mm ³ /y
bone surface	mm ²	mineralization lag time	d
wall thickness	mm	formation period	d

Tabulka 3: Nomenklatura parametrů užívaných v morfometrii kosti dle [32].

Názvy některých z těchto parametrů jsou však částečně zavádějící, protože nesouhlasí s jednotkami, v nichž jsou udávány. Např. u parametru nazvaného „osteoclast number“ bychom mohli očekávat, že udává počet osteoklastů v definovaném vzorku. Osteoklasty jsou trojrozměrné útvary, jednotky parametru jsou však (mm^{-2}), což je v rozporu se základním vztahem mezi dimenzemi geometrických testovacích sond (zde rovina řezu, tj. dva rozměry) a dimenzemi kvantifikované veličiny (zde počet, tj. nula rozměrů), jejichž součet by správně měl být v tomto případě roven třem dimenzím skutečné tkáně obsahující buňky (blíže viz oddíl 5.1). Buňky se totiž jakožto objekty, jejichž trojrozměrnost nemůžeme v mikroskopickém měřítku zanedbat, vyskytují i v třetí dimenzi analyzované tkáně, a obecně se díky své velikosti a orientaci mezi sebou liší pravděpodobností, že se jejich profily ocitnou v rovině řezu, výsledkem čehož je vychýlený kvantitativní údaj, v němž jsou nadhodnoceny buňky větších rozměrů a buňky orientované svou delší osou kolmo na řeznou rovinu. Správný název parametru by měl být tedy nikoliv „osteoclast number“, nýbrž „number of osteoclast profiles per sectional area“.

Metodou volby u hodnocení počtu buněk v objemových jednotkách tkání je disektor. Není bez zajímavosti, že pro počítání kostních lakun byl navržen již v r. 1985 [20]. Přesto se v osteologii stále setkáváme s publikacemi, v nichž jsou buňky kosti kvantifikovány jakožto počet profilů buněk na jednotku plochu výbrusu - pro osteocyty např. [48, 49]. Takováto dvojrozměrná data NA lze v případě přípustnosti tzv. Abercrombieho metody (pro kritický přehled viz [18]) dodatečně přepočítat na trojrozměrné údaje N_V teoreticky získatelné aplikací disektoru na stejný vzorek, a to podle rovnice 51:

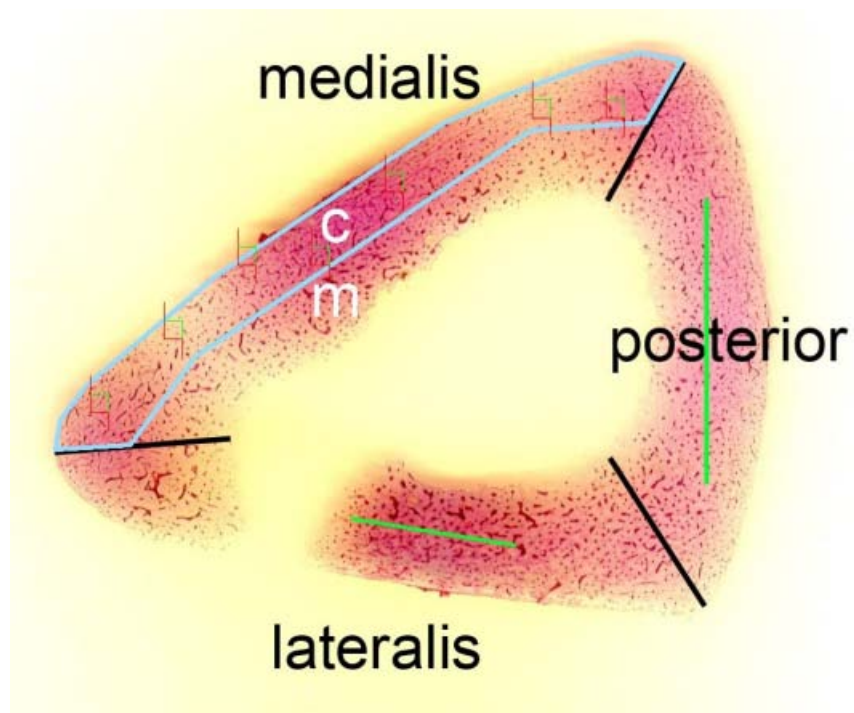
$$N_V = (t/(d + t)) \cdot N_A, \quad (51)$$

kde t je výška disektoru (tj. tloušťka optického řezu $5 \mu\text{m}$), d je průměrná výška lakun ve směru kolmém na rovinu výbrusu (empiricky např. $15 \mu\text{m}$).

Hustotu 3-D objektů (lakun) v objemové jednotce však nelze udávat v počtu profilů na jednotku plochy. Objemovou hustotu nelze z tohoto poměru bez dalších informací o rozměrech a orientaci objektů ani přesně vypočítat.

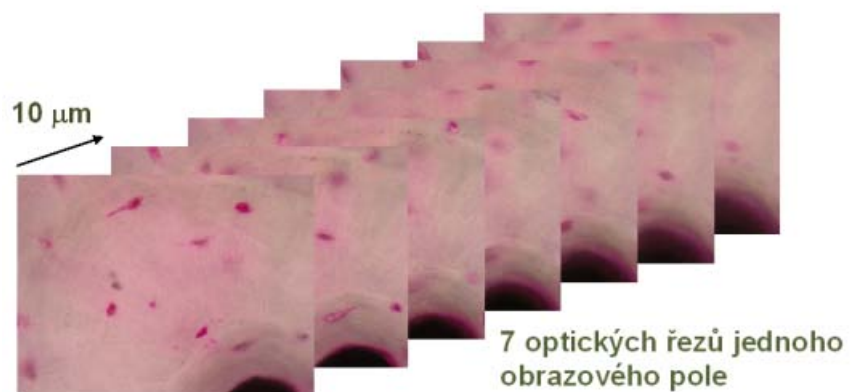
13.1 Numerická hustota osteocytárních lakun

1. V prvním kroku je třeba zvolit potřebné zvětšení pro počítání lakun. Vzhledem k principu získávání optických řezů a je k eliminaci vlivu lomu na zkreslení posunu v ose Z zapotřebí použít imerzního objektivu. Vzhledem k velikosti lakun volíme k jejich bezpečnému odlišení objektiv $100\times$, který má však malé zorné pole, což kompenzujeme dostatečným počtem zorných polí disektoru systematicky náhodně vzorkovaných v rámci výbrusu (Obr. 82).



Obr. 82: Příčný výbrus diafýzou tibie 70leté ženy, bazický fuchsin. Systematický náhodný výběr disektorů v kortikální i medulární polovina síly kompakty pod laterální, mediální a zadní plochou \Rightarrow 42 disektorů, tj. 294 snímků.

2. V každém z vybraných zorných polí získáme sedm optických řezů vzdálených od sebe vždy $10 \mu\text{m}$ (Obr. 83).

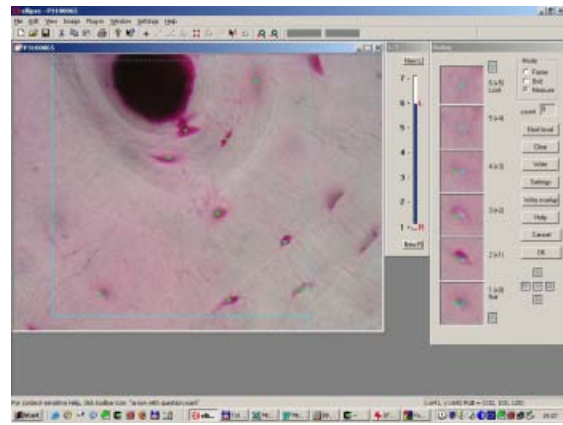


Obr. 83: Optické řezy výbrusem pro optický disektor. Obrazová pole vybrána náhodným výběrem.

3. Pokud chceme vyloučit z referenčního objemu kompartmenty, v nichž se osteocyty principiálně vyskytovat nemohou (např. cévní kanálky kosti), učiníme tak pomocí bodové testovací mřížky v celém objemu disektoru (Obr. 84). Dále již můžeme započítat lakuny dle pravidel disektoru (oddíl 5.8, Obr. 85).

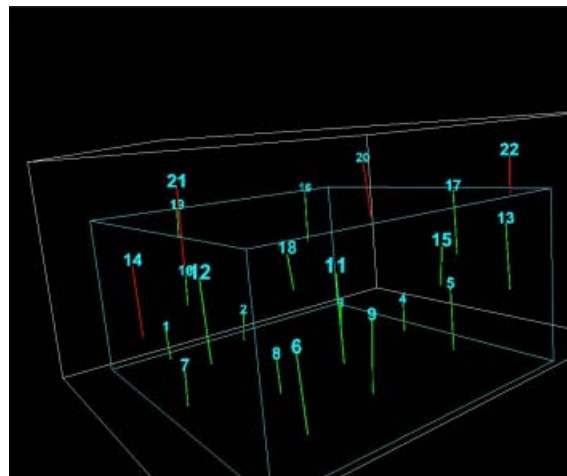


Obr. 84: Body pomocné mřížky: celkem 36, Haversův kanál vyloučen, vybráno $p = 31$ pro referenční prostor. Bazický fuchsin.



Obr. 85: Lakuna je označena v rovině prvního řezu, v němž je viditelná. Označení je zachováno pro všechny další roviny a lakuna je započítána do disektoru pouze jednou (pokud nedosahuje úrovně náhledové roviny).

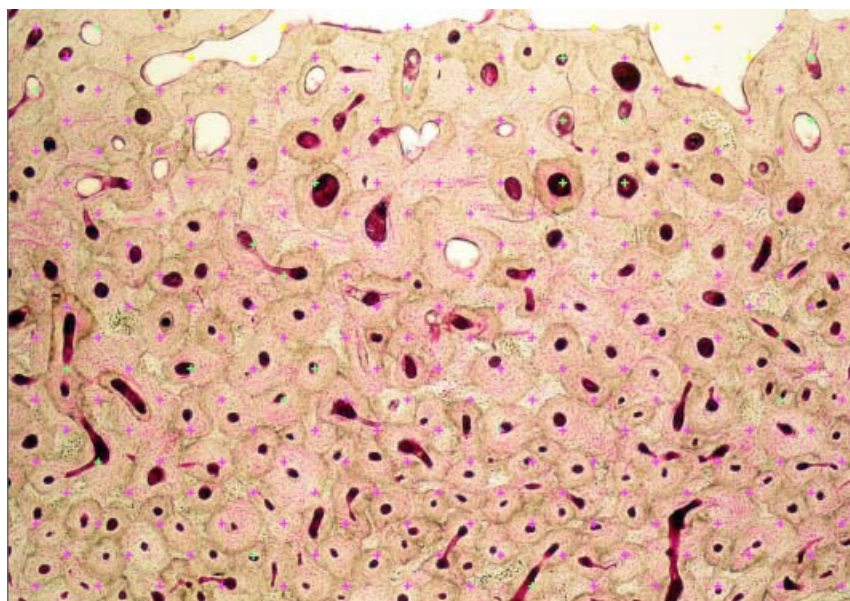
4. Výsledky počítání lze průběžně vizualizovat i v trojrozměrném náhledu (Obr. 86).



Obr. 86: 3-D náhled hodnocení počtu objektů v objemové jednotce disektoru. Zeleně označené objekty jsou započítány, červeně označené objekty nikoliv.

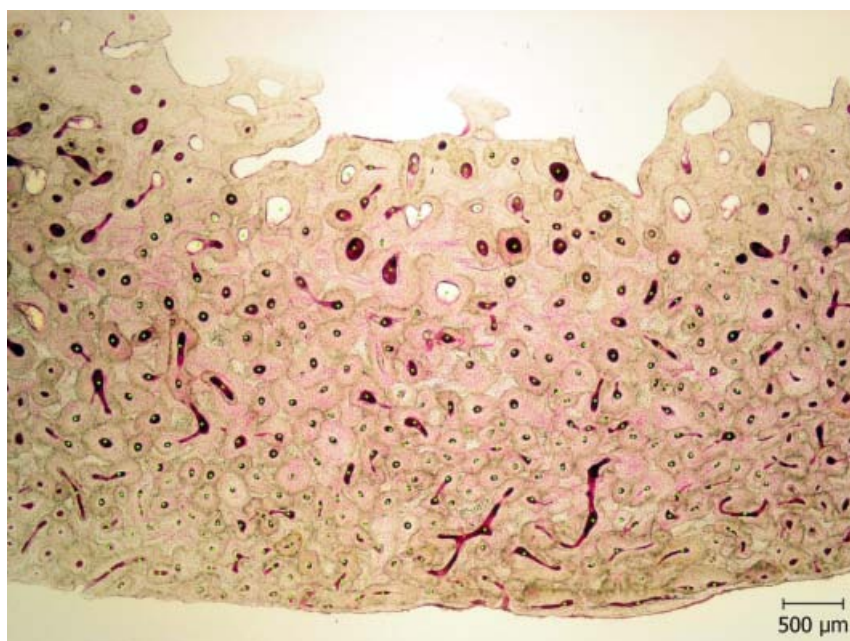
13.2 Hodnocení plošného podílu a distribuce profilů cévních kanálků

1. Pokud nás zajímá podíl objemu cévních kanálků v celkovém objemu kosti, využijeme Delesseho princip a bodovou testovací mřížku na analýzu výbrusu (Obr. 87).

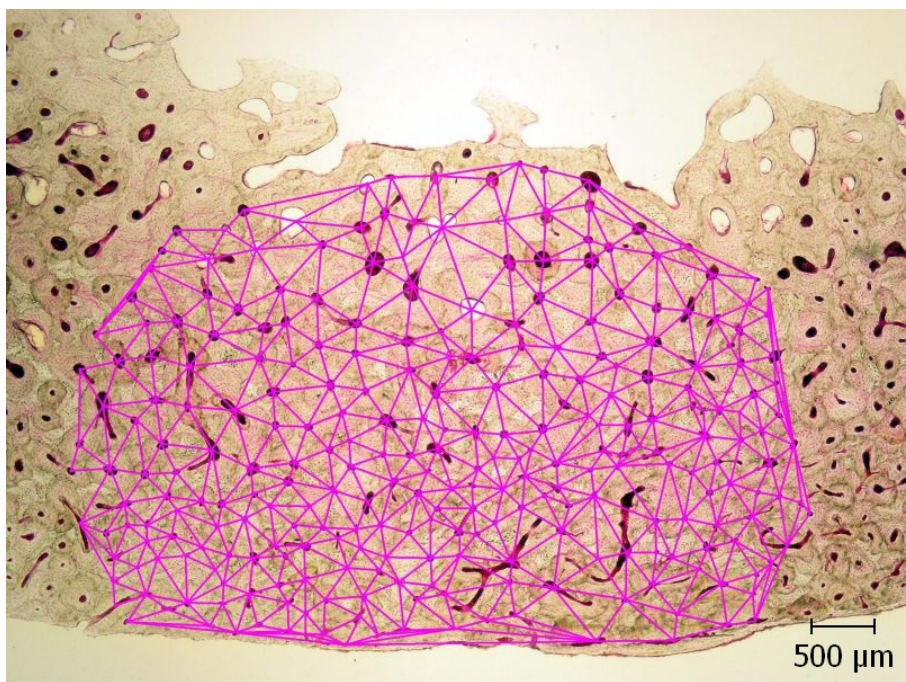


Obr. 87: Plošný podíl profilů cévních kanálků ve výbrusu byl 10,5 %. Bazický fuchsin.

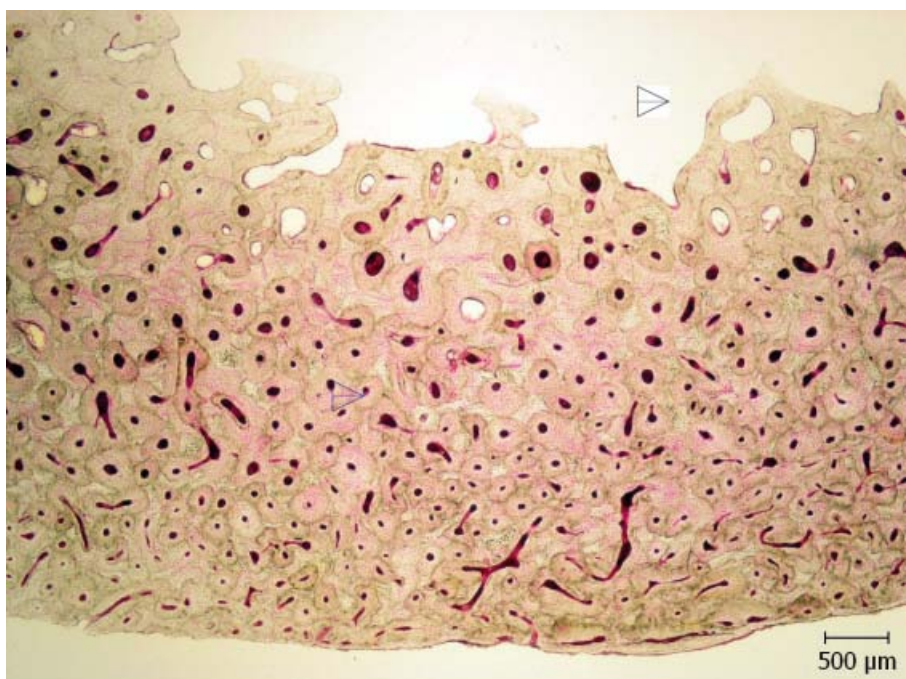
2. Dvojměrnou izotropii v rozložení profilů cévních kanálků můžeme testovat pomocí Delaunayovy triangulace popsané v oddílu 5.13 (Obr. 88–90).



Obr. 88: Označení těžišť profilů cévních kanálků ($n = 1194$) před triangulací.



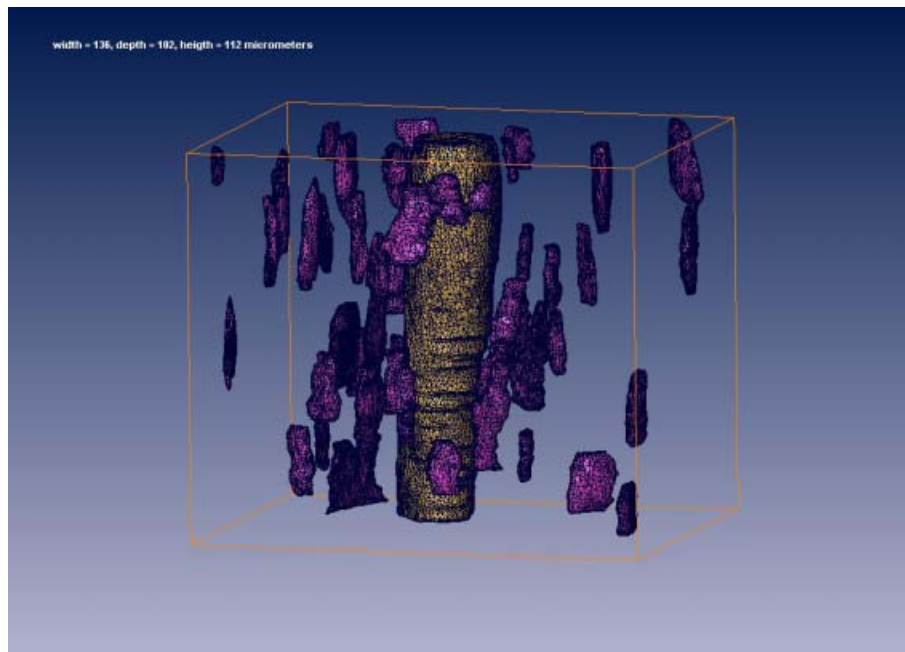
Obr. 89: Delaunayova triangulace profilů cévních kanálků.



Obr. 90: Uspořádání profilů kanálků v rovině výbrusu bylo modelováno sítí vrcholů rovnoramenných trojúhelníků s podstavou $251 \pm 13 \mu\text{m}$ (kolmo na povrch kosti) a výškou $258 \pm 24 \mu\text{m}$ (paralelně s povrchem kosti).

13.3 Trojrozměrná rekonstrukce mikroskopické stavby lamelární kosti

Na základě metodiky popsané v oddílu 7 lze po rekonstrukci optických řezů nasnímaných ze silnějších, avšak kvalitních výbrusů, vizualizovat prostorové vztahy mikroskopických objektů (Obr. 91).



Obr. 91: Rekonstrukce osteocytárních lakun a části Haversova kanálu.

14 Kvantitativní hodnocení inzulinové positivity ve vzorcích pankreatu

Další ilustrací použití bodových testovacích systémů je kvantifikace objemového podílu Langerhansových ostrůvků ve vzorcích pankreatu potkana a objemového podílu inzulin-pozitivních buněk v těchto ostrůvcích.

14.1 Příklad histologického zpracování

Ze vzorků pankreatů skupiny potkanů jsme vybrali metodou nestranného systematického náhodného výběru tři pankreaty a každý byl zalit do bločku. Bločky jsme prokrájeli na řezy o síle $5\ \mu\text{m}$ a barvili hematoxylinem-eosinem (HE), zeleným trichromem a Malloryho modrým trichromem. Pro imunohistochemický průkaz inzulinu v cytoplazmě buněk jsme použili Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin (DAKO Corporation, USA) a detekční systém Novostain Super ABC Kit (universal) (Novocastra Laboratories Ltd., Velká Británie) s avidin-biotin komplexem značeným peroxidázou a s vizualizací pomocí diaminobenzidinu. Imunohistochemické řezy byly dobarveny Gillovým hematoxylinem.

14.2 Vzorkování a kvantitativní analýza

- ze série 72 řezů z každého bločku bylo pro kvantitativní hodnocení objemu ostrůvků přítomných v referenčním objemu vybrán každý osmý řez, tj. celkem 9 řezů pro každý bloček
- počátek každé série byl vybrán nestranným systematickým náhodným výběrem, kdy pozice prvního řezu mezi 72 řezy byla získána součinem náhodného čísla z intervalu $(0; 1)$ a počtu řezů
- při síle jednoho řezu $5\ \mu\text{m}$ činila vzorkovací perioda (odstup mezi po sobě následujícími hodnocenými řezy) $40\ \mu\text{m}$; celková síla vzorku, z něhož vycházelo kvantitativní srovnání, činila u všech vzorků $360\ \mu\text{m}$ (síla řezu $5\ \mu\text{m}$ násobena počtem řezů, tj. 72).

Použili jsme bodové testovací mřížky k odhadu:

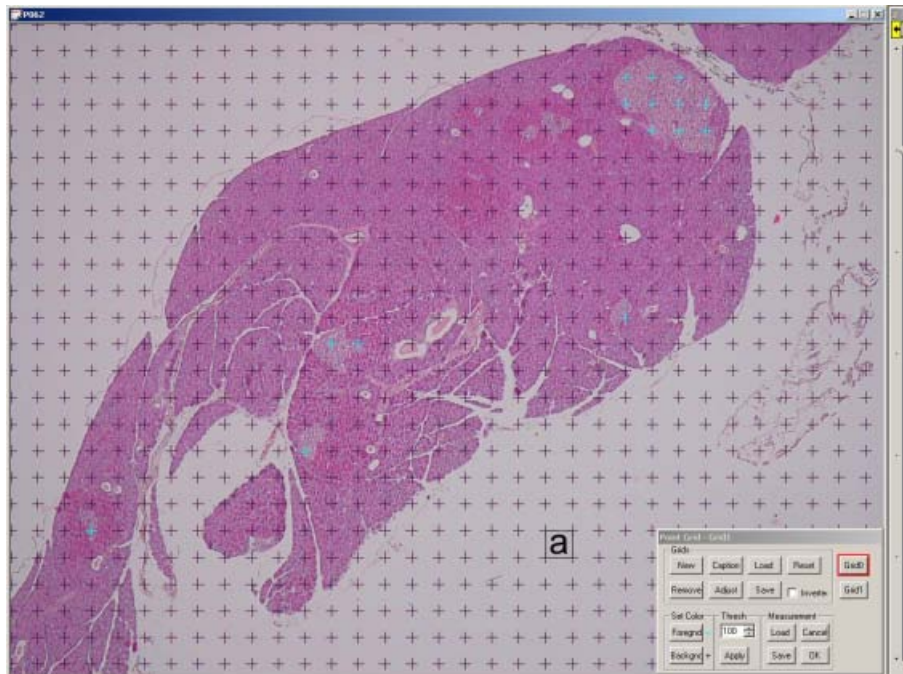
- objemového podílu Langerhansových ostrůvků ve vyšetřovaném vzorku pankreatu – $V_V(islets1, pancreas)$
- objemového podílu cytoplazmy inzulin-pozitivních buněk v Langerhansových ostrůvcích – $V_V(insulin, islets2)$.

Tyto objemové parametry byly odvozeny z plošných odhadů. Pro výpočet odhadu plochy v rovině jsme použili bodovou testovací sondu (mřížku). Výpočet byl prováděn podle rovnice 52,

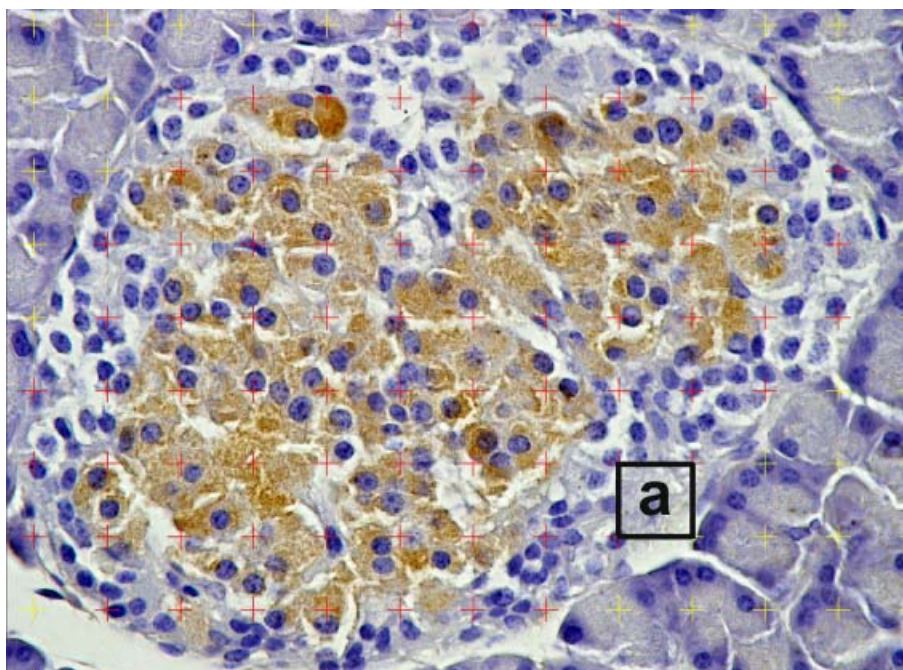
$$estA = a \cdot P, \quad (52)$$

kde $estA$ je odhad plochy měřeného objektu, a je parametr použité testovací sítě – jde o plochu příslušející jednomu testovacímu bodu sítě a P je počet testovacích bodů protínajících měřenou strukturu. Celkový počet průsečíků byl vždy min. 200. Hodnocenými plochami byly v našem případě:

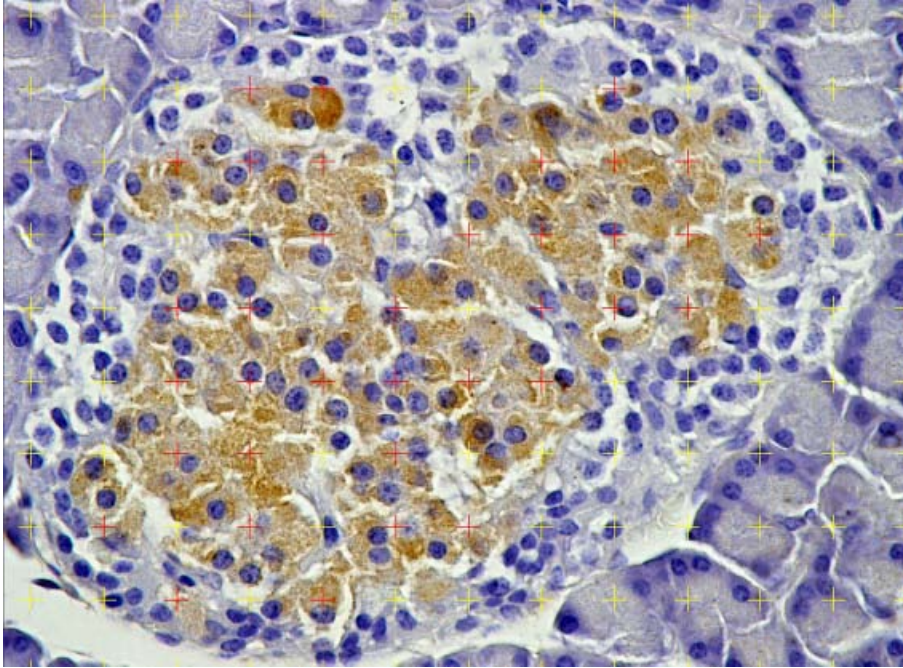
- celá plocha řezu pankreatem při barvení HE – $A(\text{pancreas})$
- plocha řezu ostrůvky při barvení HE – $A(\text{islets1})$ (Obr. 92)
- plocha řezu ostrůvky na imunohistochemických preparátech – $A(\text{islets2})$ (Obr. 93)
- plocha řezu inzulin-pozitivními buňkami na imunohistochemických preparátech – $A(\text{insulin})$ (Obr. 94).



Obr. 92: Průsečíky bodové testovací sítě s ostrůvky, a – parametr testovací sítě (jednotková plocha); hematoxylin-eosin.



Obr. 93: Průsečíky testovací mřížky (charakterizované konstantou a) s plochou řezu ostrůvkem na imunohistochemickém preparátu s průkazem inzulinu.



Obr. 94: Průřezy testovací mřížky s plochou inzulin-pozitivních buněk.

Pro výpočet odhadu poměrného objemu ostrůvků RIV jsme použili Cavalieriho metody, která je založena na hodnocení série paralelních systematicky náhodně vybraných řezů, mezi nimiž je konstantní známá vzdálenost T (v našem případě se rovná $40 \mu\text{m}$). Pomocí bodové testovací sondy se zjistí plochy jednotlivých řezů a součet těchto n ploch A se poté vynásobí vzdáleností T podle rovnice 53.

$$estV = T \cdot (A_1 + A_2 + \dots + A_n). \quad (53)$$

Objemový poměr ostrůvků v pankreatu $V_V(islets, pancreas)$ je vyjádřen rovnicí 54,

$$V_V(islets1, pancreas) = \frac{estV(islets1)}{estV(pancreas)}, \quad (54)$$

kde $estV(islets)$ a $estV(pancreas)$ jsou objemy ostrůvků, resp. pankreatu v sérii konvenčně barvených (HE) řezů.

Při hodnocení populace buněk produkujících inzulin jsme vycházeli z Delesseho principu, využívajícího odhad objemové frakce komponenty $estV$ na základě jejího podílu na plošných řezech $estA$, viz rovnice 55. Podkladem pro hodnocení bylo vždy min. 6 řezů ostrůvky na min. 4 řezech. Ostrůvky i řezy byly zvoleny systematickým nestranným náhodným výběrem.

$$estA = estV. \quad (55)$$

Objemový podíl inzulin-pozitivní cytoplazmy v ostrůvcích $V_V(insulin, islets2)$ ukazuje vztah 56,

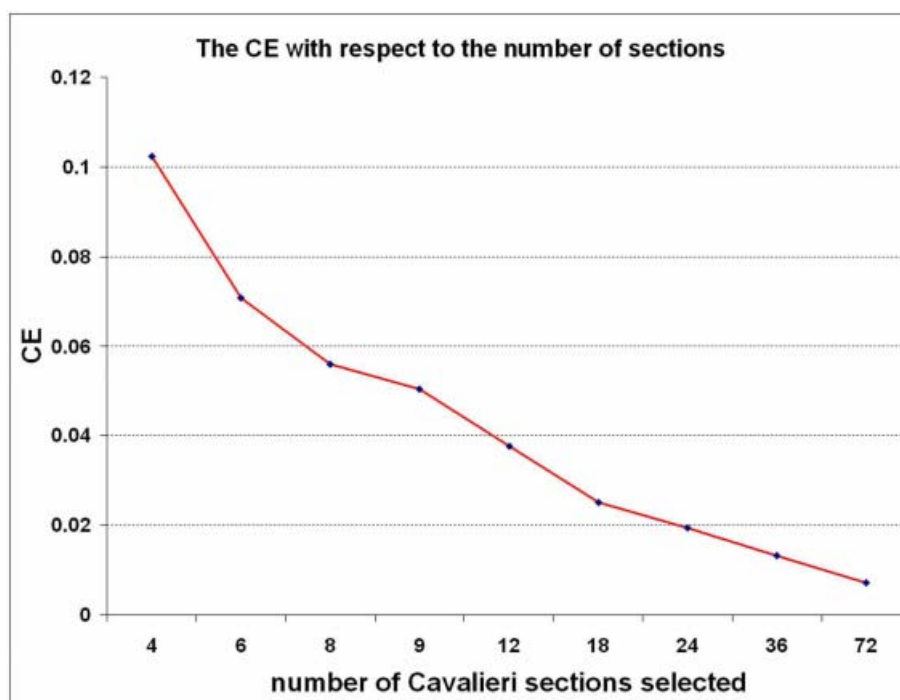
$$V_V(insulin, islets2) = \frac{estV(insulin)}{estV(islets2)}, \quad (56)$$

kde $estV(insulin)$ a $estV(islets2)$ jsou objemy cytoplazmy inzulin pozitivních buněk, resp. celých ostrůvků v imunohistochemicky zpracovaných řezech.

Objemový podíl inzulin-pozitivní cytoplazmy v celém vzorku pankreatu můžeme vyjádřit jako $V_V(\text{insulin,pancreas})$ pomocí vztahu 57,

$$V_V(\text{insulin,pancreas}) = V_V(\text{islets1,pancreas}) \cdot V_V(\text{insulin,islets2}). \quad (57)$$

V rámci pilotní studie bylo zapotřebí posoudit variabilitu výsledků způsobenou hodnocením nespojité série řezů získané vzorkováním původní série. Analyzujeme-li jen výběr ze série řezů, použijeme pro hodnocení variability způsobené výběrem (sampling error) odhad CE (rovnice 35, 34) dle Gundersena a Jensenové [14] (Obr. 95).



Obr. 95: Pilotní studie pro analýzu CE u vzorků pankreatu ukazuje vhodnost hustoty vzorkování na 9 řezů v rámci série 72 řezů, kdy $CE \approx 0,05$.

Histologické artefakty většinou nebrání využití vybraného řezu pro hodnocení. Vzhledem k tvaru ostrůvků je nutno použít dostatečný celkový počet bodů protínajících hodnocený objekt. V našem případě činil tento teoretický počet bodů cca 150–200. Toto číslo je založeno na nomogramu podle tvarového faktoru léze a požadovaného koeficientu chyby odhadu [14] a bylo v naší práci bezpečně překročeno. Při odhadu objemu inzulin-pozitivních buněk byla brána v potaz pouze pozitivita či negativita reakce, hodnocení tedy nebylo ovlivněno intenzitou zbarvení produktu peroxidázové reakce, jak tomu bývá při použití metod obrazové analýzy založených na prahování v barevném prostoru.

15 Kvantitativní hodnocení krevních cév biopsie peritonea

Jako příklad morfometrie serózních blan uvádíme techniky použitelné ke kvantitativnímu hodnocení vzorků peritonea. U pacientů s peritoneální dialýzou [9] dochází u peritonea k deskvamaci, přeměně plochého epitelu na kubický, ztrátě mikrokřků, vakuolizaci, hromadění inkluzí, otevření mezibuněčných spojů, polyploidizaci buněk. V submezotelovém vazivu se objevuje fragmentace bazální membrány vystřídaná po čase opětovným zesílením bazální membrány mezotelu i kapilár, k submezotelovému edému, zvýšené buněčnosti, aktivaci fibroblastů profibrotickými cytokiny z mezotelu, zmnožení myofibroblastů v submezotelu, zesílení kolagenního vaziva nad $50\ \mu\text{m}$ (simple sclerosis), resp. nad $150\ \mu\text{m}$ [52]. V cévách submezotelu jsou pozorovány mikroangiopatie (zejména u diabetes mellitus), obliterace a hyalinizace cév, pokles počtu lymfatických cév (s možným nárůstem transportní role zmnožených krevních cév), zvýšená vaskularizace na úrovni (pre)kapilár [31], peritoneální neoangioneze přes VEGF z mezotelu [2].

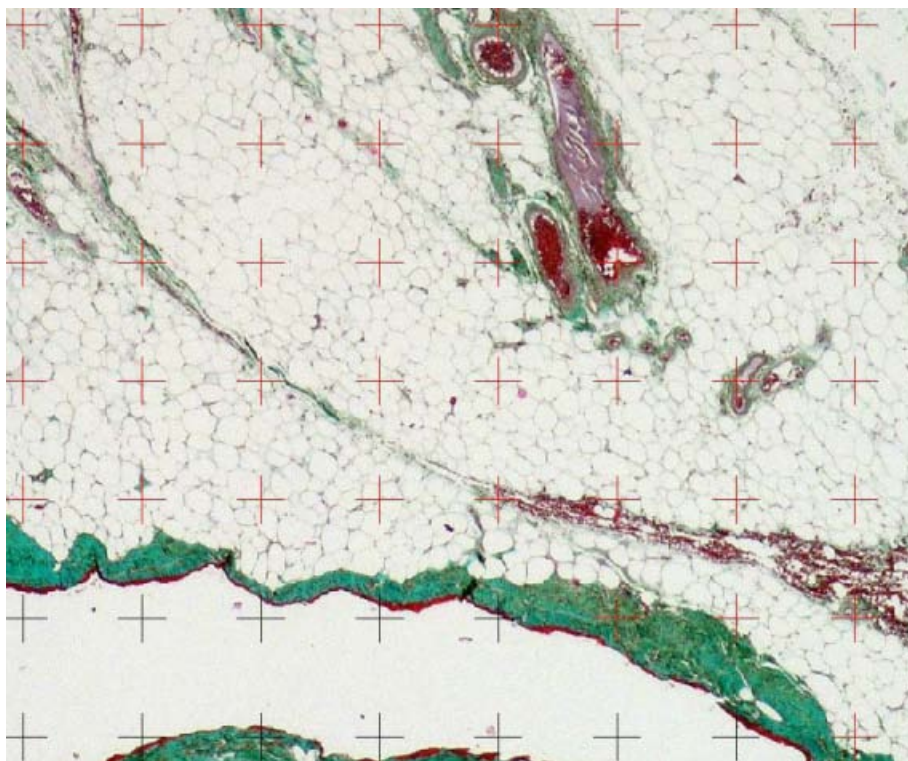
Ke kvantitativnímu popisu těchto komplexních změn nejsou dosud dostupné morfometrické nástroje schopné tyto změny zcela vystihnout. K tomu přispívá např. i nedostatečný popis a standardizace techniky biopsie i histologického hodnocení v publikacích, omezená velikost vzorku a nespecifita změn (některé ze změn jsou nacházeny např. i u urémie bez peritoneální dialýzy).

Můžeme si tedy navrhnout soubor parametrů pro kvantifikaci krevních cév peritonea a síly submezotelového vaziva a porovnat rozdíly při hodnocení těchto parametrů různými pracovníky.

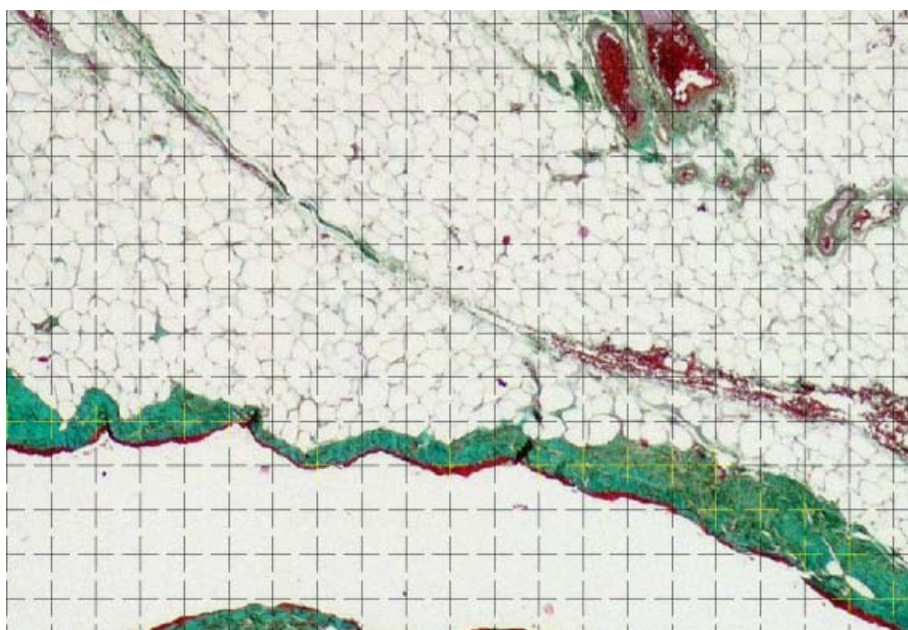
15.1 Příklad histologického zpracování

- 72 sériových řezů (síla $5\ \mu\text{m}$) bločkem biopsie parietálního peritonea
- zelený trichrom s Verhoeffovým železitým hematoxylinem
- imunohistochemie - von Willebrandův faktor k detekci endotelových buněk, α -SM-aktin k detekci hladkých svalových buněk ve stěně krevních cév (mimo kapiláry)
- moduly PointGrid, LineSystem a CountingFrame SW Ellipse3D (ViDiTo, Košice, SR)
- výběr 9 řezů ze série \Rightarrow z každého řezu ještě 4 zorná pole při větším zvětšení

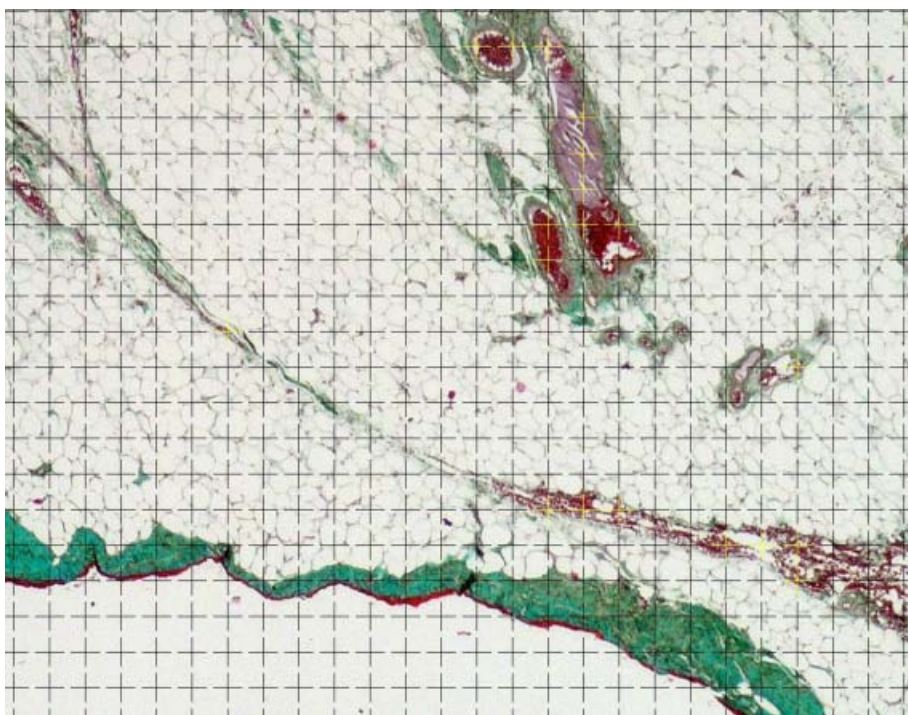
15.2 Příklady kvantitativních parametrů



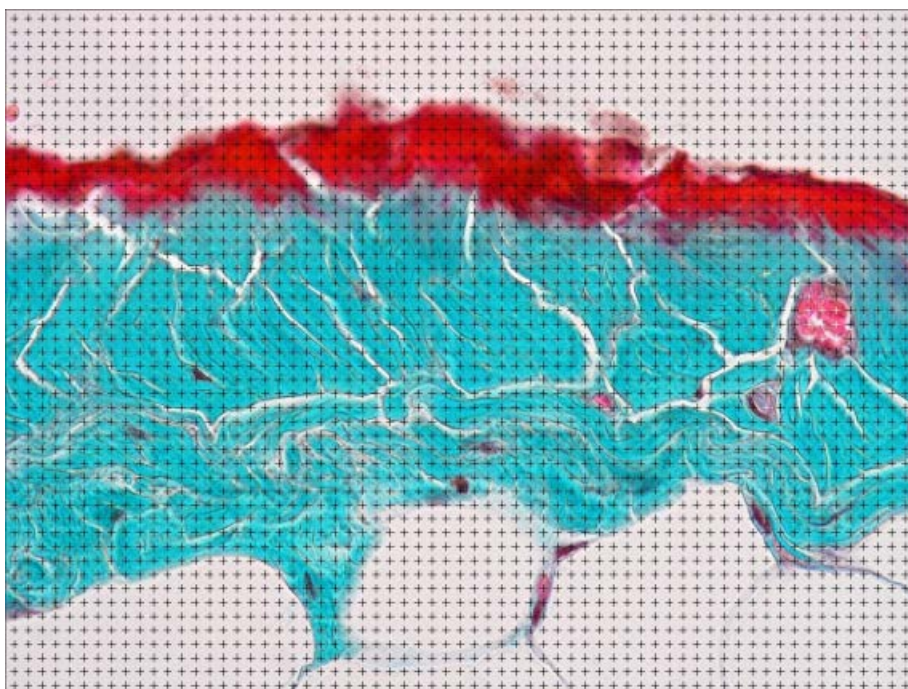
Obr. 96: Odhad estV1, objem celého vzorku na řezu. MGT.



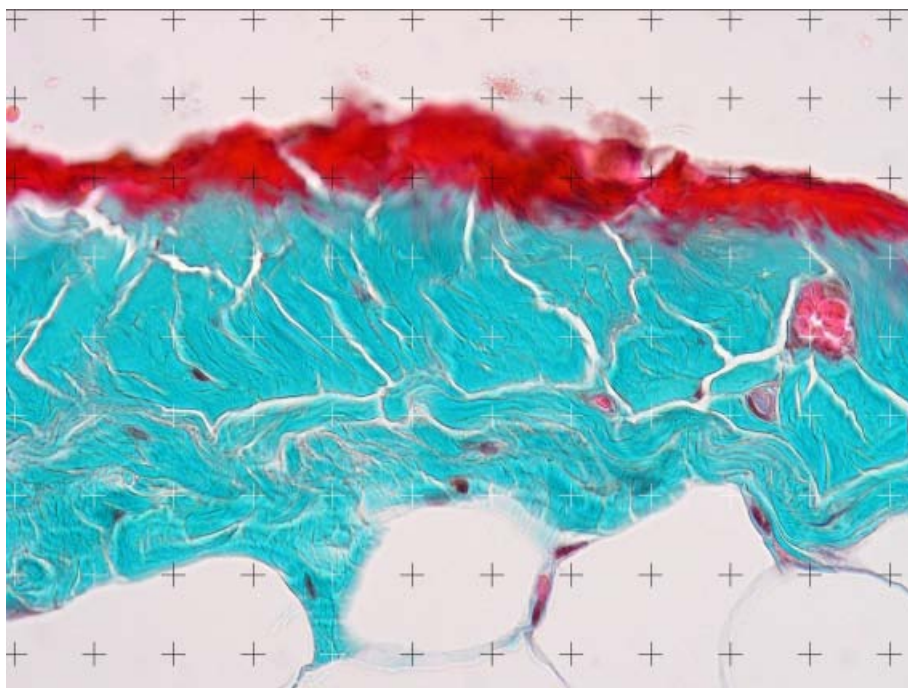
Obr. 97: Odhad estV2, objem submezotelového kolagenního vaziva. MGT.



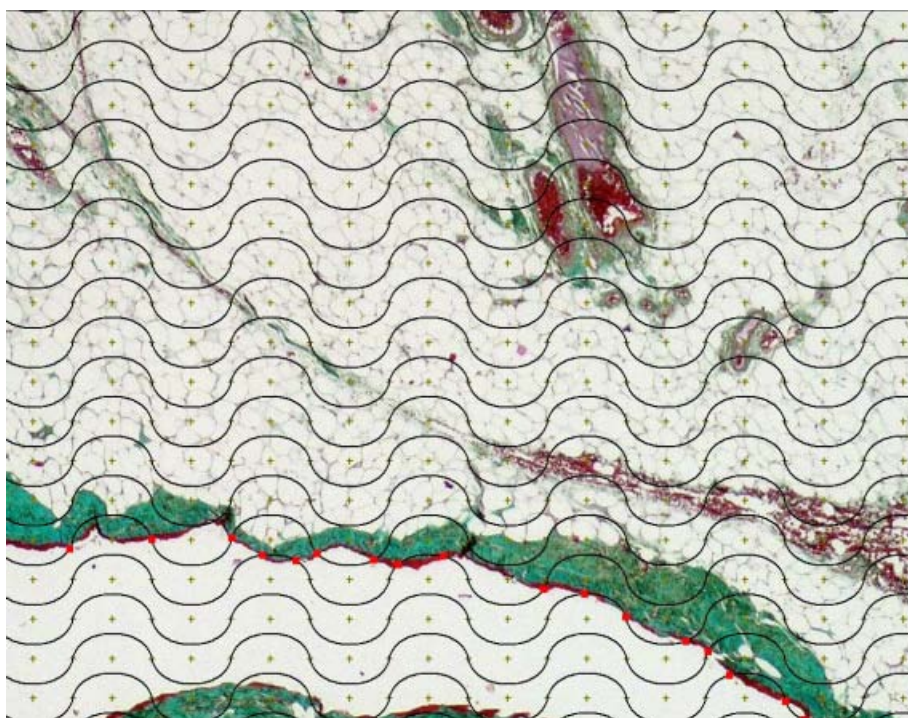
Obr. 98: Odhad estV3, objem všech cév rozlišitelných při daném zvětšení v subserózním vazivu. MGT.



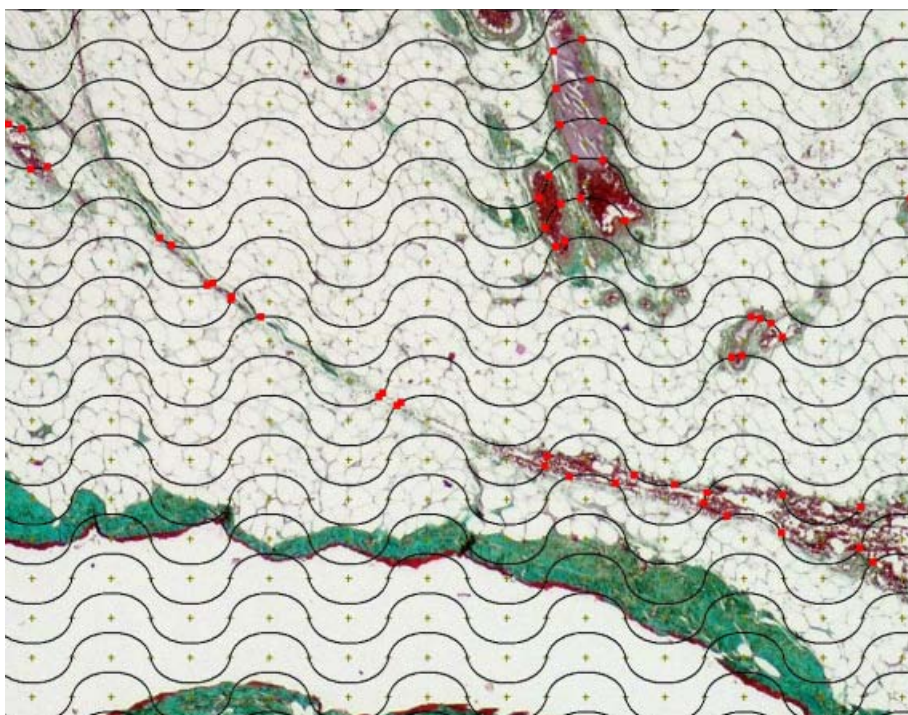
Obr. 99: Odhad estV4, objem drobných cév v kolagenním submezoteliálním vazivu (celkem ze 4 zorných polí z každého z 9 řezů), MGT.



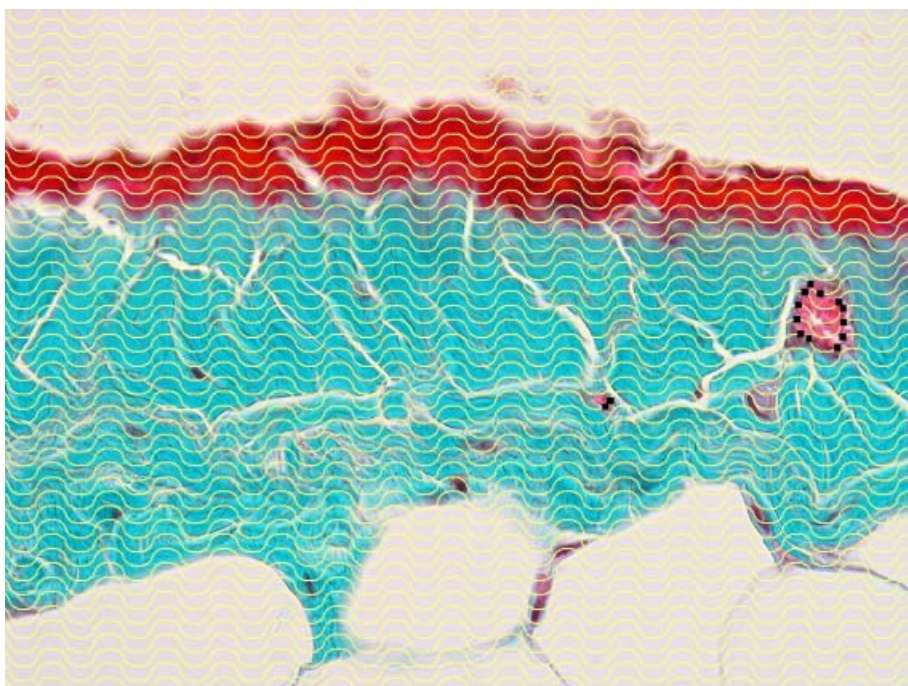
Obr. 100: Odhad estV5, objem submezotelového kolagenního vaziva (při velkém zvětšení) = referenční objem pro estV4 (celkem ze 4 zorných polí z každého z 9 řezů), MGT.



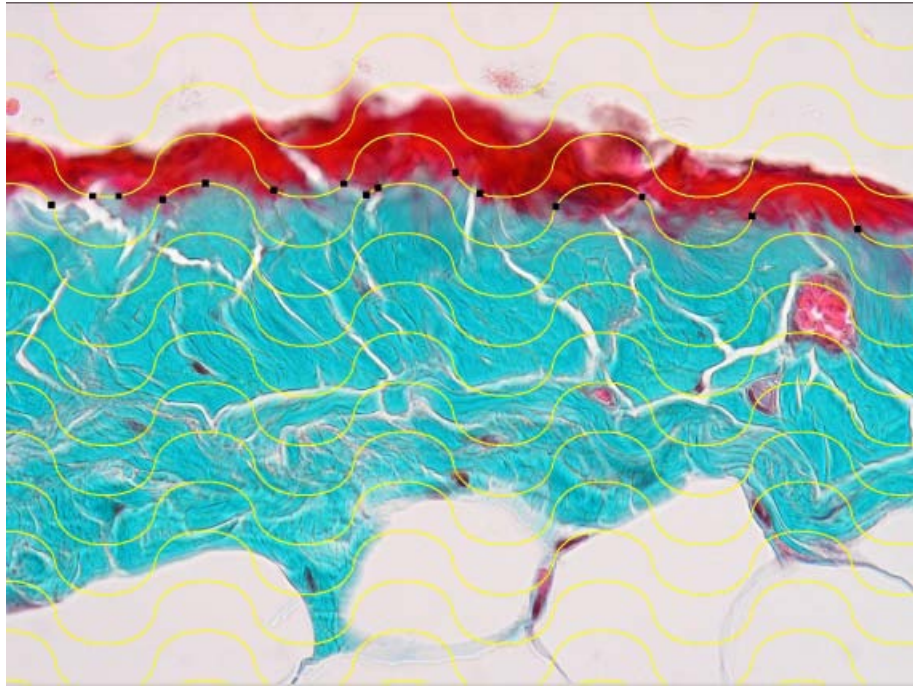
Obr. 101: Odhad estS1, plocha peritoneálního povrchu vzorku, MGT.



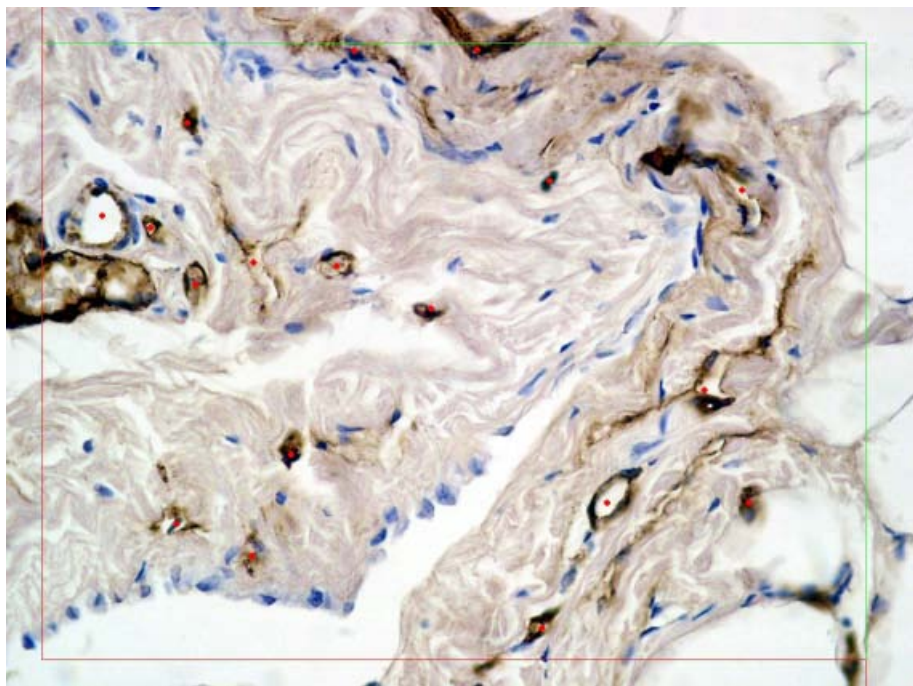
Obr. 102: Odhad estS2, vnitřní povrch všech cév rozlišitelných při daném zvětšení v tukovém subserózním vazivu, MGT.



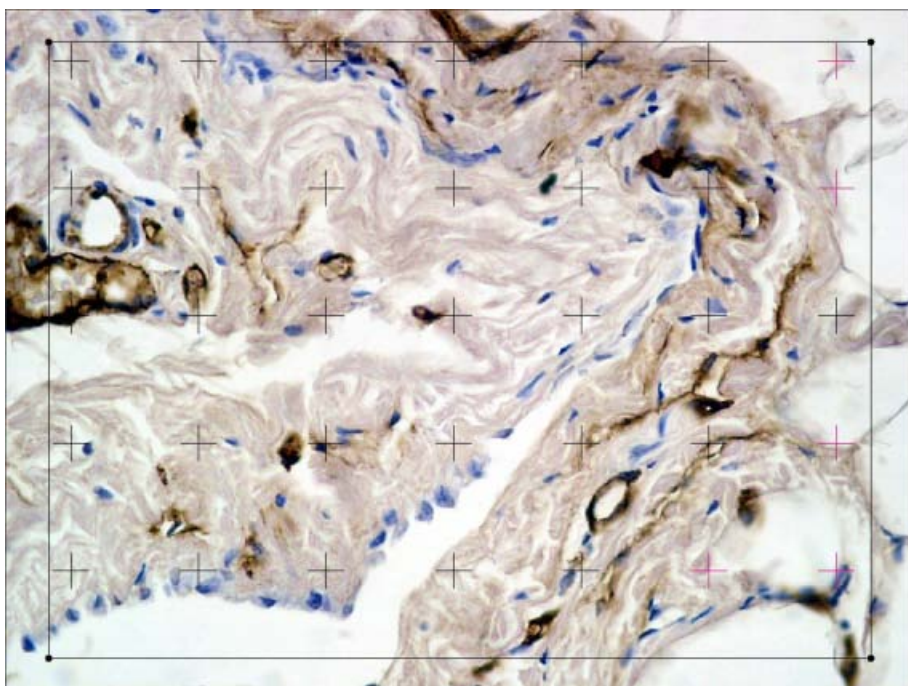
Obr. 103: Odhad estS3, vnitřní povrch malých cév v submezotelovém kolagenním vazivu při velkém zvětšení, MGT.



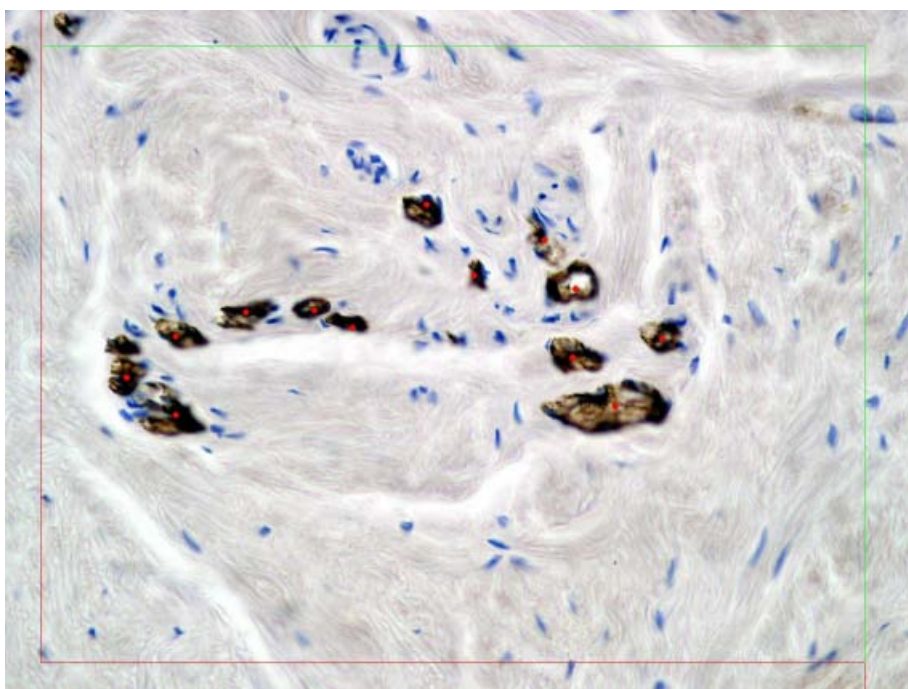
Obr. 104: Odhad estS4, povrch hranice mezotel/kolagen u snímků při velkém zvětšení, MGT.



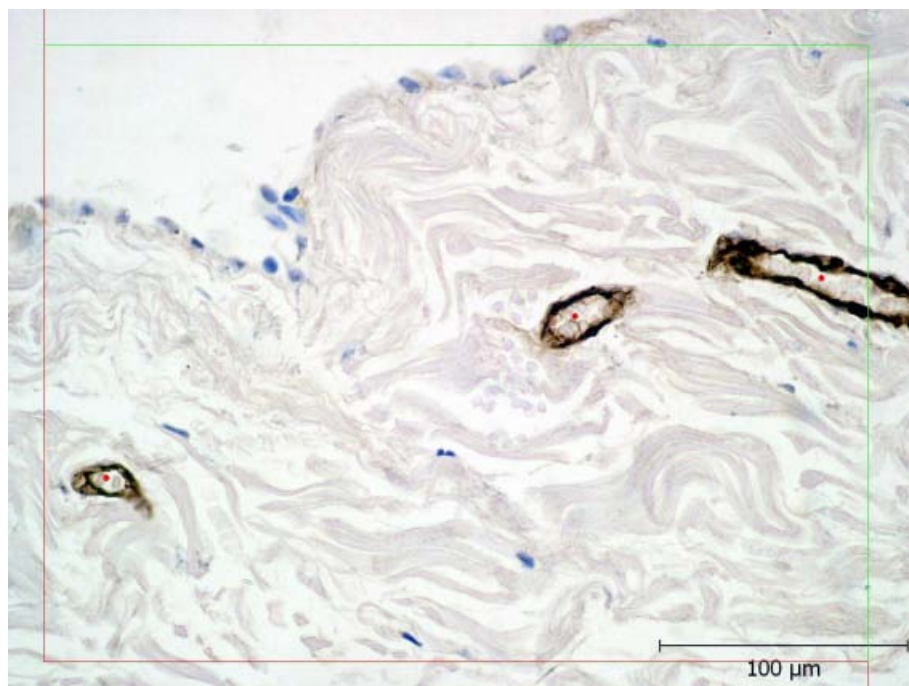
Obr. 105: Počítání profilů von Willebrand Factor-pozitivních shluků (kapilár), Q_A jakožto počet profilů krevních cév v ploše řezu.



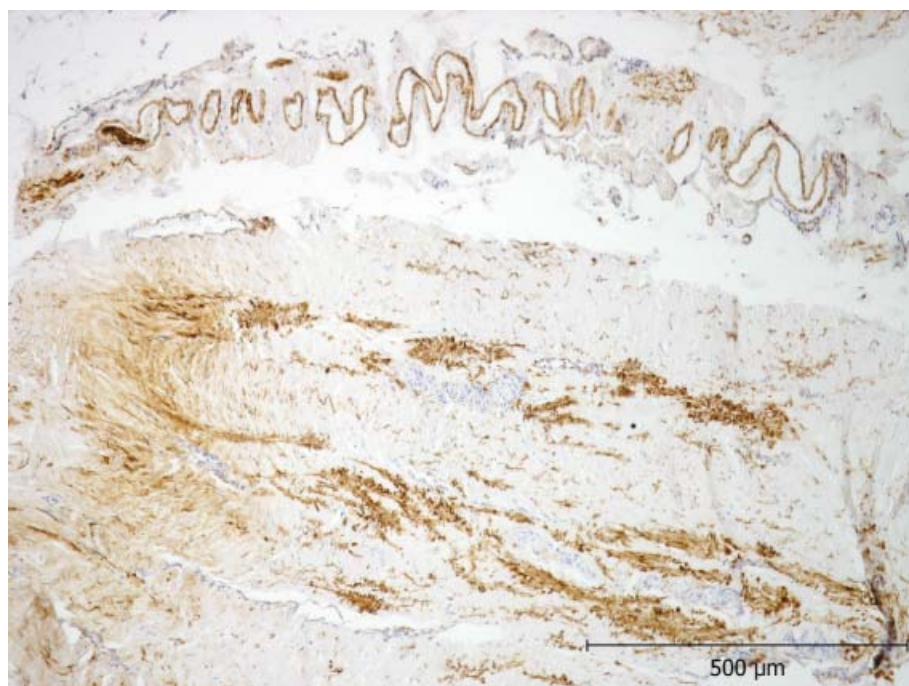
Obr. 106: Hodnocení referenční plochy submezotelového vaziva.



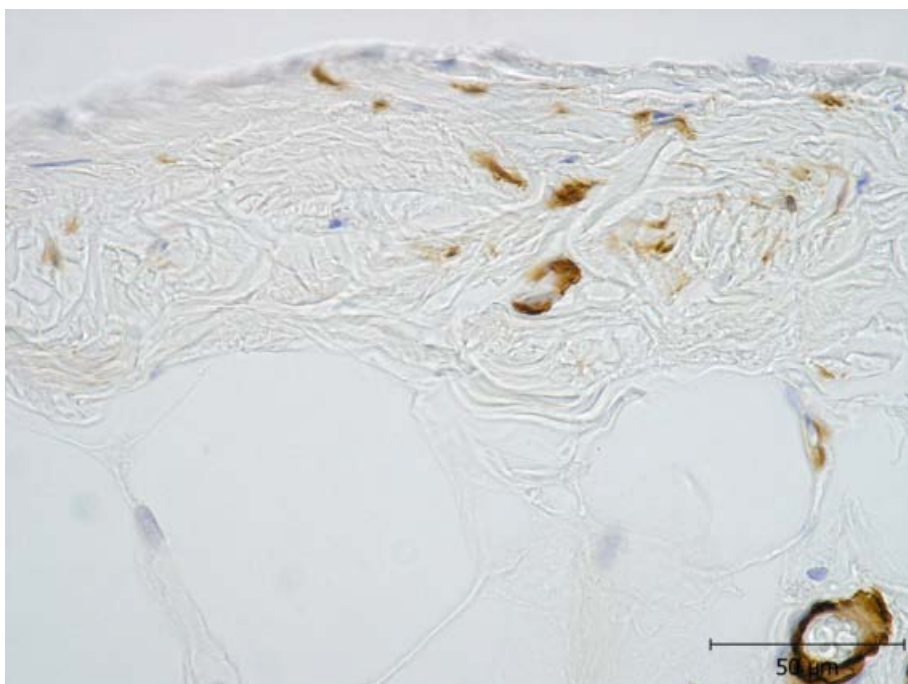
Obr. 107: Počítání profilů vWF-pozitivních shluků (kapilár).



Obr. 108: Počítání profilů vWF-pozitivních shluků (kapilár).



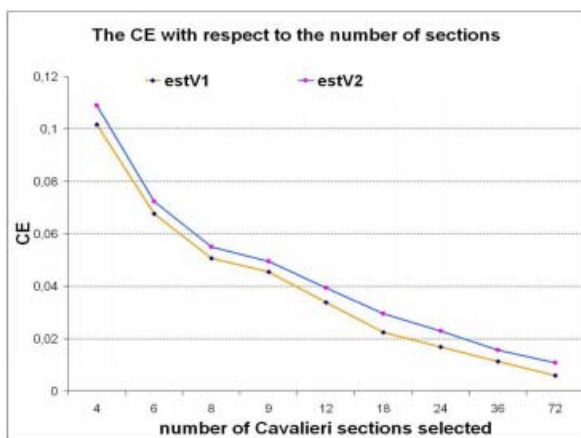
Obr. 109: α -SM aktin-pozitivní buňky mohou být významné v submesothelovém vazivu.



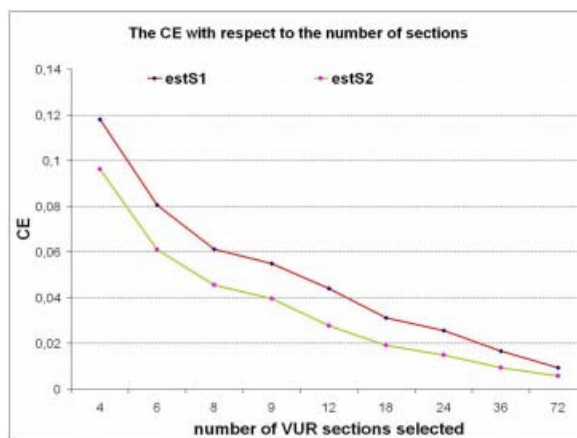
Obr. 110: Aktin-pozitivní buňky mohou být významné v submezotelovém vazivu.

estVP1: počet profilů drobných cév v sérii řezů s velkým zvětšením (celkem ze 4 zorných polí z každého z 9 řezů při velkém zvětšení)

15.3 Analýza CE



Obr. 111: Pro $CE \approx 0,05$ je nutno hodnotit min. 9 řezů ze série 72.



Obr. 112: Pro $CE \approx 0,05$ je nutno hodnotit min. 10 řezů ze série 72.

15.4 Interpretace parametrů

- poměr $estV2/estS1$ udává **střední sílu** submezotelového kolagenního vaziva
- poměr $estS2/estV1$ ukazuje **povrchovou hustotu** velkých cév v tukovém subserózním vazivu
- poměr $estS3/estV5$ ukazuje **povrchovou hustotu** malých cév v submezotelu

- poměr $Q_A = VP1/estV5$ je analogický „relative microvessel number“ a poměr $estV4/estV5$ je obdobný parametru „relative microvessel area“ [31]
- profily cév jsou 2-D struktury (průměty do roviny řezu) a jejich počet/plocha \sim úhlu mezi osou cévy a rovinou řezu a **délce cévy**
- hodnocení povrchů cév má v.s. větší biologický význam
- hodnocení Q_A „relative microvessel number, density of microvessel profiles“ je jednoduché, použitelné i u vzorků variabilního vzhledu, efektivní a může vypovídat o ev. angiogenezi.

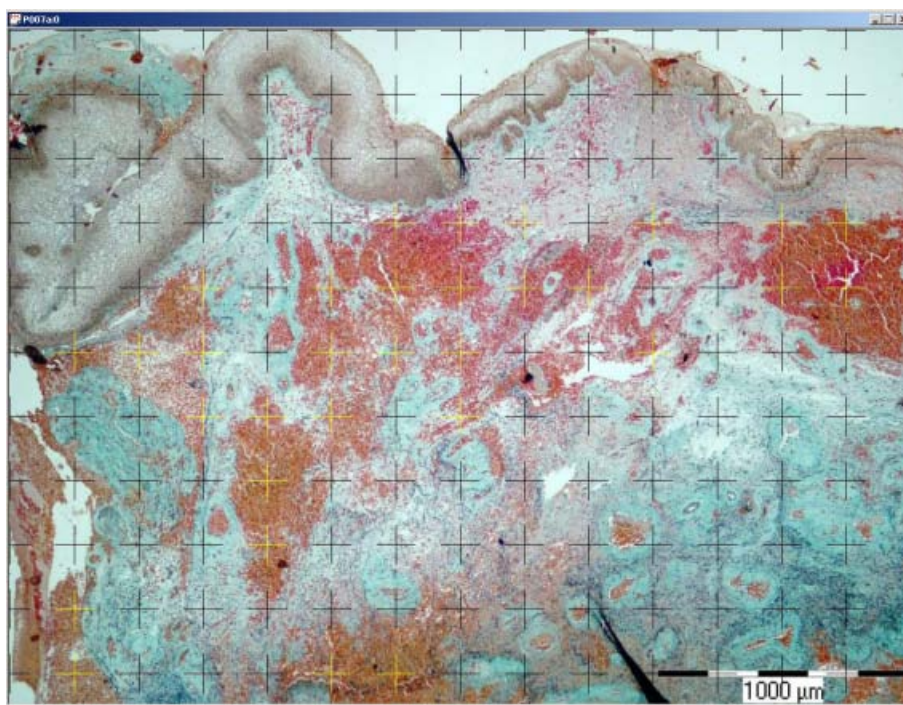
16 Morfometrie vaginální stěny

V případě studia náchylnosti stěny dutého orgánu ke vzniku mikrotrhlin lze kvantifikovat parametry jako např. síla epitelu, míra leukocytární infiltrace, prokrvení subepitelového vaziva či přítomnost prokrvácení z narušených cév ve vzorku. Takovým případem může být vyhodnocování mikroskopické stavby povrchových vrstev stěny vaginy u porodních poranění vaginy a perinea v závislosti na provedení či neprovedení epiziotomie, přítomnosti vaginální infekce a dalších rizikových faktorů tohoto poranění.

16.1 Příklad histologického zpracování

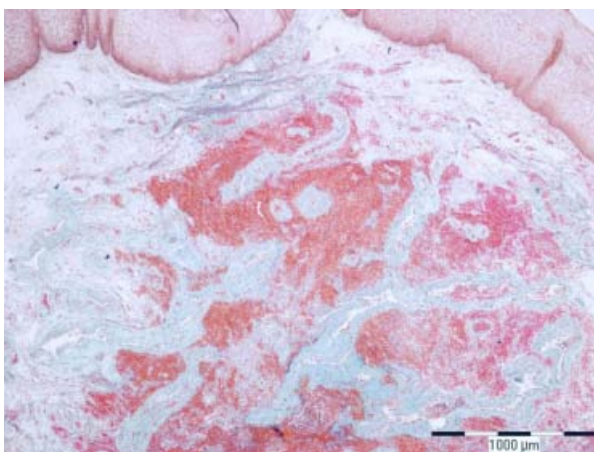
- vzorky vaginální stěny ($10 \times 5 \times 5$ mm)
- víceúrovňový systematický nestranný náhodný výběr vertikálních sériových řezů z tkáňových bločků
- rutinní barvení hematoxylin eosin, zelený trichrom s Verhoeffovým železitým hematoxylinem
- imunohistochemický průkaz makrofágů (CD68+) a hladké svaloviny a pericytů ve stěně krevních cév s výjimkou kapilár tvořených pouze endotelem (α -SM actin).

16.2 Objemový poměr hemoragií v subepitelovém vazivu

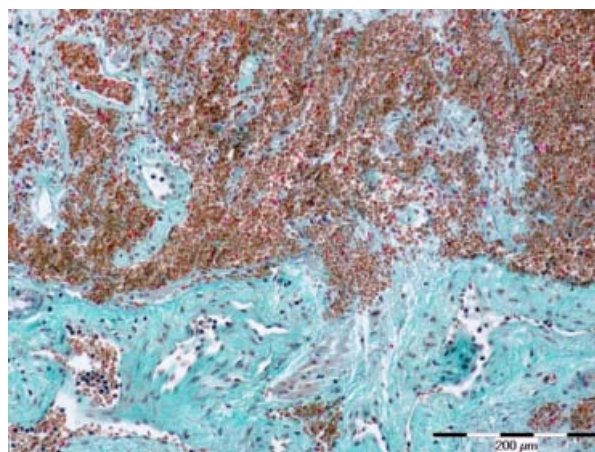


Obr. 113: Průřezy bodové testovací sítě s hemoragiemi použité pro odhad objemového poměru hemoragií $estV(haem)$ v subepitelovém vazivu $estV(connective\ tissue)$. MGT.

$$V_V(haem, connective\ tissue) = \frac{estV(haem)}{estV(connective\ tissue)}. \quad (58)$$

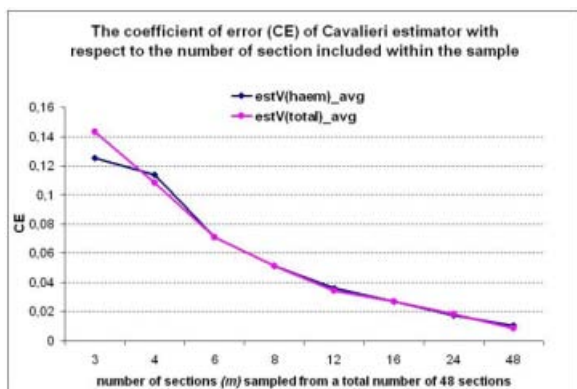


Obr. 114: Vaginální epitel a subepiteliální vazivo s $V_V(\text{haem}, \text{connective tissue}) = 0.3767$. MGT.

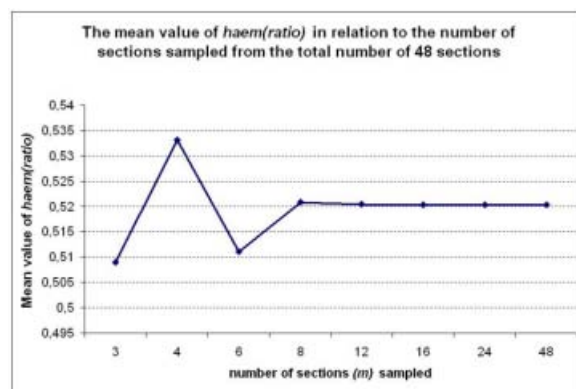


Obr. 115: Hlubší vrstva téhož vzorku při větším zvětšení. MGT.

16.2.1 Analýza $estCE$



Obr. 116: Pokud prokrájíme bloček na 48 sériových řezů, je pro $CE \leq 0.05$ vhodné vybírat z nich $m = 8$ řezů k vlastnímu hodnocení.



Obr. 117: Závislost střední hodnoty $estV(\text{haem})$ na počtu vzorků vybraných k analýze.

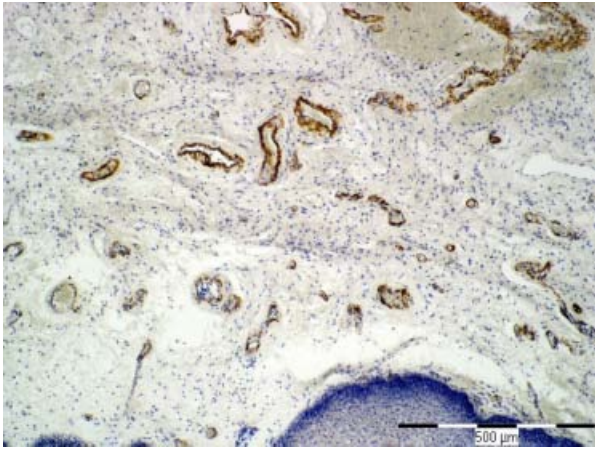
16.3 Povrch větších krevních cév a vaginálního epitelu

Vzhledem ke zpracování na vertikální uniformní řezy lze k odhadu povrchu krevních cév $estS(\text{vessels})$ i k odhadu povrchu vaginálního epitelu $estS(\text{epithelium})$ použít testovací síť cykloidálních oblouků a výsledky vyjádřit jako povrchové hustoty S_V .

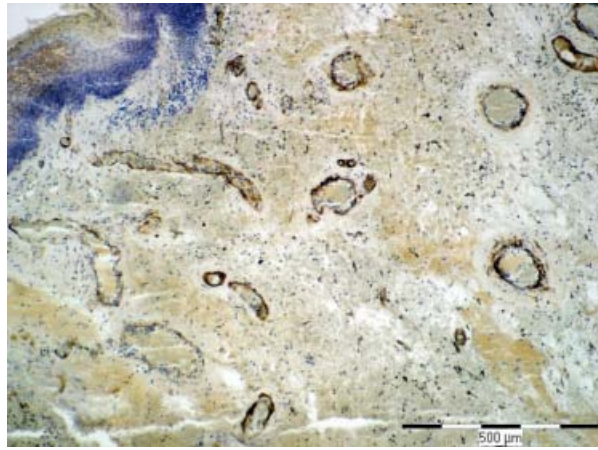
$$S_V(\text{vessels}) = \frac{estS(\text{vessels})}{estV(\text{connective tissue})}, S_V(\text{epithelium}) = \frac{estS(\text{epithelium})}{estV(\text{epithelium})}. \quad (59)$$

Pomocí odhadnutých povrchů lze definovat i další poměry s možným biologickým významem, např.: $MTE = \frac{estV(\text{epithelium})}{estS(\text{epithelium})}$, kde MTE je střední síla vaginálního epitelu, dále $\frac{S(\text{epithelium})}{estV(\text{haem})}$, $\frac{S(\text{epithelium})}{V_V(\text{haem}, \text{connective tissue})}$, $\frac{S(\text{epithelium})}{S_V(\text{vessels})}$, nebo $\frac{S(\text{epithelium})}{estN_v(\text{par})}$.

Je pak možné testovat, zda pravděpodobnost ruptury vaginální stěny během porodu je či není nepřímo závislá na hodnotě těchto parametrů, tj. zda slabý epitel, rozsáhlejší hemoragie, přítomnost četných krevních cév či infiltrace makrofágy vztažené na povrch vaginální stěny zvyšuje tuto pravděpodobnost.



Obr. 118: Hladkosvalový aktin ve stěně krevních cév v subepitelovém vazivu vagíny.



Obr. 119: Dtto.

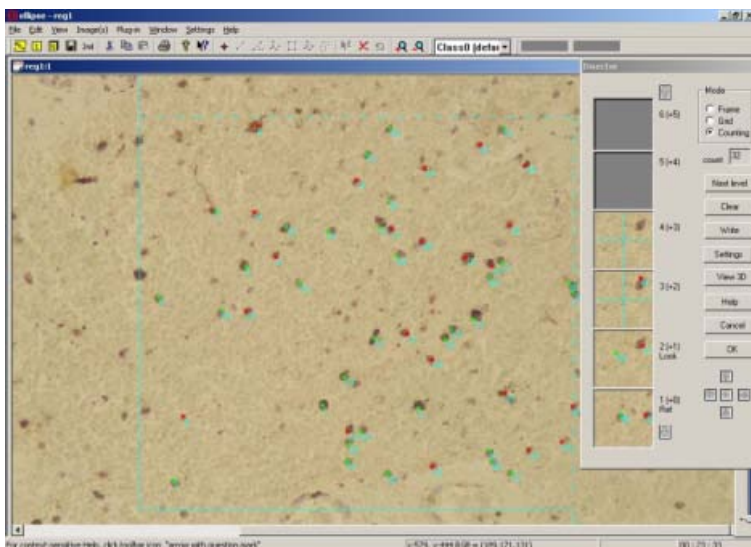
16.4 Numerická hustota CD68+ v subepitelovém vazivu

Pro porovnání metodiky uvádíme postup a výsledky pro obě nabízející se varianty disektoru, přičemž u každé z variant bylo vyhodnocováno pět objemových sond v rámci tkáňového bločku.

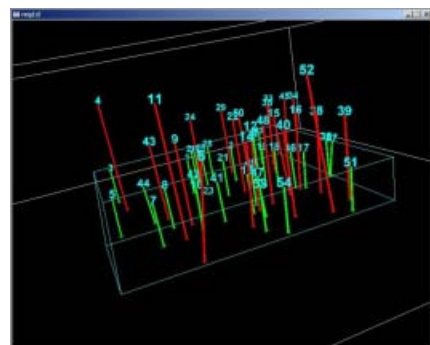
pro fyzický disektor – dva fyzické řezy o síle 5 μm registrované v ose Z,

pro optický disektor – čtyři optické řezy pořízené s odstupem 5 μm s imerzním objektivem (100 \times /1.25) uvnitř 20 μm silného řezu

16.4.1 Fyzický disektor

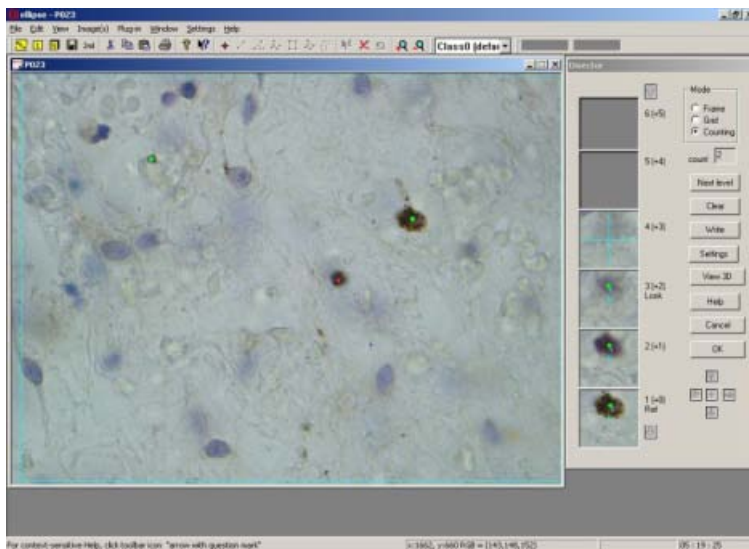


Obr. 120: Fyzický disektor (započítané buňky zeleně, nezapočítané červeně), $estNv(par) = 62509$ CD68(+) buněk/ mm^{-3} .

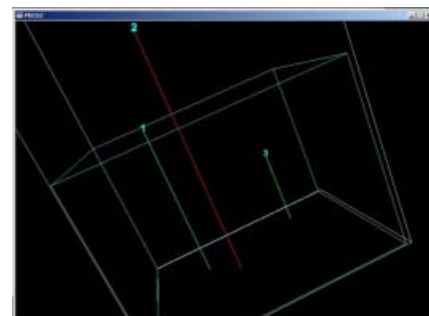


Obr. 121: 3-D náhled téhož disektoru.

16.4.2 Optický disektor



Obr. 122: Optický disektor (započítané buňky zeleně, nezapočítané červeně), $estNv(par) = 14288$ CD68+ buněk/mm⁻³.



Obr. 123: 3-D náhled téhož disektoru.

Při porovnání výsledků získaných výše uvedeným vzorkováním zjišťujeme, že fyzický disektor při srovnatelném objemu práce umožňuje napočítat větší množství buněk a variabilita jednotlivých disektorů je nižší nežli u optického disektoru. Hodnocení fyzickým disektorem totiž probíhalo při zvětšení 40×, zatímco optický disektor vyžadující imerzní objektiv byl aplikován na snímky pořízené 100násobným zvětšením. V případě dostupnosti imerzního objektivu s nižším (např. 40–60×) zvětšením vhodného pro optický disektor bylo možné tuto nevýhodu optického disektoru kompenzovat a naopak těžit z nepřítomnosti chyb daných tím, že optické řezy není (na rozdíl od fyzického disektoru) zapotřebí registrovat.

disector	$estNv(par)$ [mm ⁻³]	SD	coeff. var.	cells
physical	50007.14	9526.174	0.1905	104
optical	13335.67	15579.33	1.1682	14

Tabulka 4: $estNv(par)$ – numerická hustota (průměr z 5 disektorů), SD – standard deviation, $coeff. var.$ – coefficient of variation, $cells$ – celkový počet CD68+ buněk napočítaných v 5 disektorech.

17 Kvantifikace Langerhansových buněk v epidermis

Langerhansovy dendritické buňky epidermis (LC) jsou významnou součástí imunitního systému kůže (skin associated lymphatic tissue, SALT). Nacházejí se převážně suprabazálně v epidermis. Na příkladech si představíme možný způsob kvantitativního hodnocení jejich přítomnosti v rámci morfologického posuzování kožní imunity.

17.1 Příklady histologického zpracování

V ukázce můžeme porovnat mikroskopii klasických fyzických řezů pozorovaných ve světlem poli s kvantifikací založenou na konfokální mikroskopii silnějších řezů, resp. plošného preparátu celé epidermis. U jednotlivých způsobů zpracování je vysvětlen i parametr, pro jehož stanovení lze danou metodiku odběru a zpracování použít.

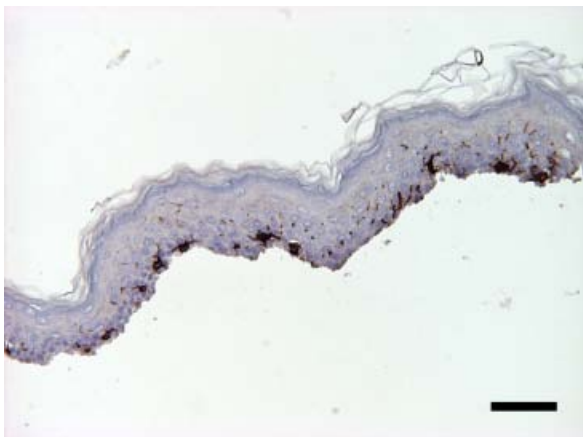
- nekroptické vzorky odebrané silnou jehlou, z nichž byla separována epidermální lišta
 - 21 sériových vertikálních řezů (VUR) o síle $3\ \mu\text{m}$, imunohistochemický průkaz vimentinu v LC

- * numerická hustota jader LC v jednotce objemu epidermis
- * plocha povrchu bazální vrstvy epidermis přiléhající k bazální membráně
- * z poměru odhadu objemu epitelu $estV$ a plochy povrchu jeho bazální membrány $estS$ můžeme vyjádřit i střední sílu epitelu MTE (mean epithelial thickness)

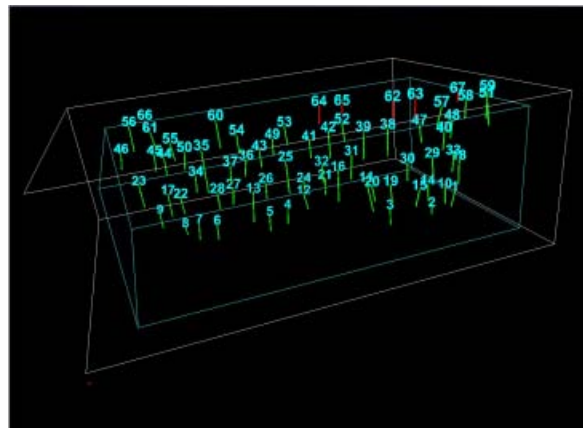
$$MTE = \frac{estV}{estS} \quad (60)$$

- silné řezy $20\ \mu\text{m}$ pro konfokální mikroskopii, imunohistochemický průkaz vimentinu v LC
 - * numerická hustota jader LC v jednotce objemu epidermis
 - * numerická hustota jader ostatních epidermálních buněk (převážně keratinocytů) v jednotce objemu epidermis
 - * plocha povrchu bazální vrstvy epidermis přiléhající k bazální membráně
- plošné preparáty epidermis pozorované konfokálním mikroskopem, imunohistochemický průkaz vimentinu v LC
 - numerická hustota jader LC v jednotce objemu epidermis
 - numerická hustota jader ostatních epidermálních buněk (převážně keratinocytů) v jednotce objemu epidermis

17.2 Série fyzických registrovaných řezů

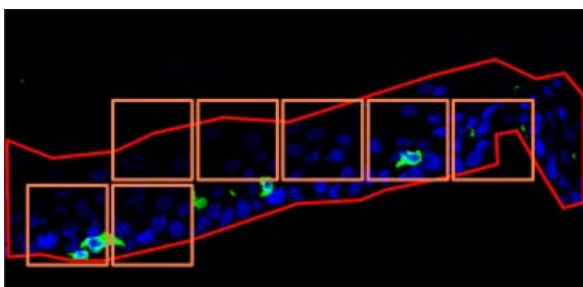


Obr. 124: Klasické sériové vertikální řezy epidermis, imunohistochemie proti vimentinu, měřítko 50 μm .

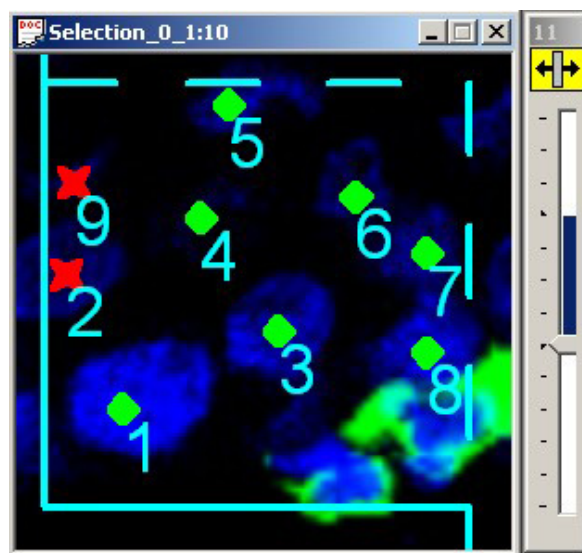


Obr. 125: Registrovaná série 21 řezů, rozměry disektoru 412 \times 662 \times 42 μm .

17.3 Silné histologické řezy – série optických řezů s odstupem 1 μm

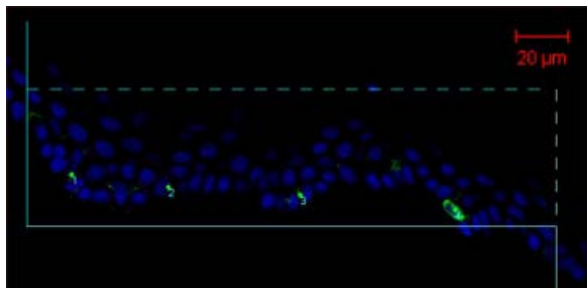


Obr. 126: Sedm disektorů vzorkovaných v sérii optických řezů, imunohistochemie proti vimentinu. Rozměry každého z disektorů jsou 26 \times 26 \times 8 μm .

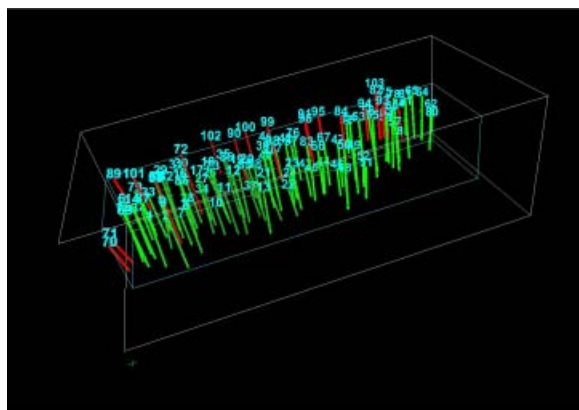


Obr. 127: Počítání jader epidermálních buněk v rámci jednoho z disektorů. Velikost rámečku 26 \times 26 μm .

17.4 Silné histologické řezy – série optických řezů s odstupem 3 μm

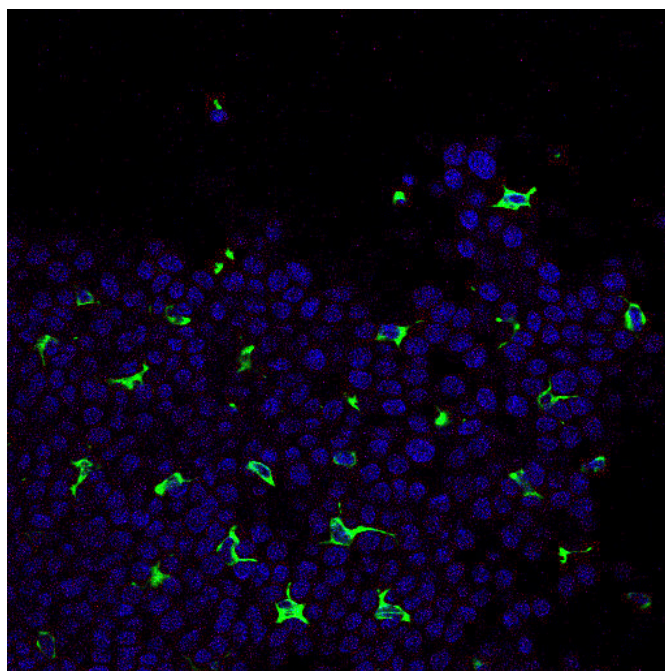


Obr. 128: Jeden z disektorů, rámeček 220 \times 68 μm .



Obr. 129: 3-D náhled na objemovou sondu disektoru o rozměrech 220 \times 68 \times 15 μm se započítanými (zeleně) a nezapočítanými jádry.

17.5 Plošný preparát epidermis – série optických řezů s odstupem 1 μm



Obr. 130: Pohled na plochu epidermis, imunohistochemie proti vimentinu, hodnotící rámeček o velikosti 188 \times 180 μm .

17.6 Doporučení na základě pilotní studie

Smyslem výše uvedených ukázek je demonstrovat, že obdobnou pilotní studií lze dospět k praktickým závěrům pro další zpracování vzorků v případě, že se zpočátku nabízelo několik možností, jak vzorky zpracovávat. Vyhodnotíme-li nároky na přípravu preparátů a rychlost celého postupu spolu s opakovatelností získávání preparátů a možností napočítat

v dostupném materiálu dostatečný počet objektů daných rozměrů, můžeme pro tento účel doporučit:

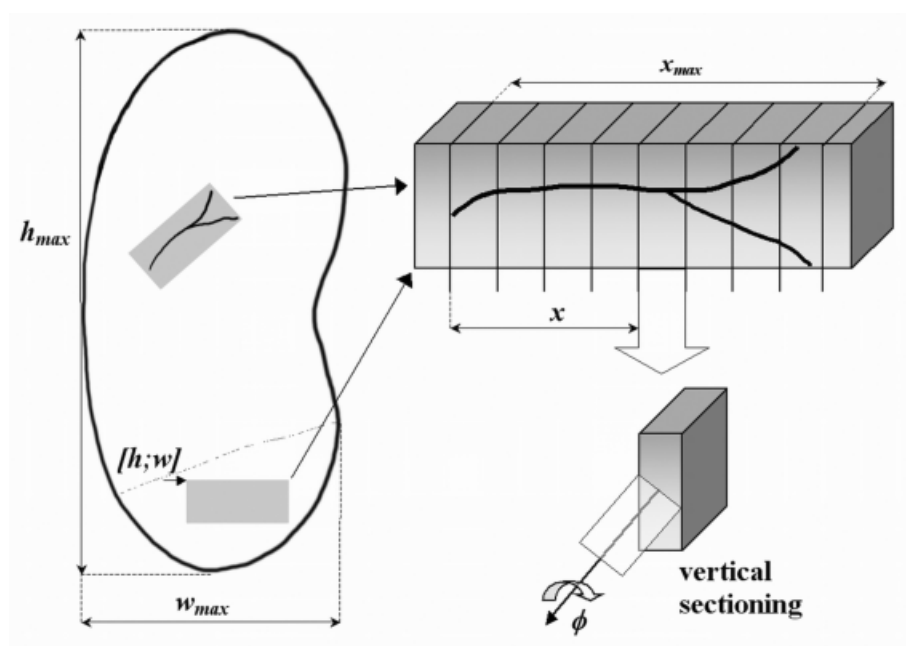
- pro odhad poměru mezi Langerhansovými buňkami a ostatními buňkami epidermis se nejlépe osvědčily 20 μm silné řezy pozorované konfokálním mikroskopem,
- v případě 20 μm silných řezů pak pořizovat 6–7 optických řezů vzdálených 3 μm ,
- pro odhad poměru počtu Langerhansových buněk vztahených na plochu povrchu bazální vrstvy epidermis se osvědčila série registrovaných fyzických řezů epidermis; kombinace silných řezů a konfokální mikroskopie by byla použitelná i k tomuto účelu pouze za předpokladu, že by bylo možné provést dvojité značení Langerhansových buněk a bazální membrány současně, což by však vyžadovalo použití celého řezu kůže, neboť při separaci epidermální lišty je část bazální laminy poškozena a část zůstává na dermis.

18 Kvantitativní analýza mikrotrhlin v parenchymu ledvin

Další nástroje kvantitativní mikroskopické analýzy lze demonstrovat na příkladu popisu morfologie trhlin traumatického původu vzniklých v kůře a dřeni ledvin prasete při biomechanickém experimentu – pádových zkouškách, kdy je třeba zhodnotit, zda trhliny probíhají preferenčně oddíly nefronu či intersticiálním vazivem, nebo zda se šíří kůrou či dřením náhodným způsobem.

18.1 Příklad vzorkování ledvin a histologického zpracování

- náhodně vybrané prasečí ledviny, které dříve prošly vlastním mechanickým experimentem $n = 3$
- tkáňové bločky $n = 6$ zasahující od vnějších povrchu ledviny až po dutý systém, odebrané podle Obr. 131 z:
 - ventrální plochy $n = 2$
 - dorzální plochy $n = 2$
 - * systematické vzorkování makroskopicky patrných ruptur délky 0,5 – 22 mm i odběr z oblastí bez makroskopicky patrných ruptur
 - kaudálního pólu ledviny $n = 2$ (bez makroskopicky zjevných ruptur)
- po zalití a orientaci bločků podle konceptu vertikálních řezů byl každý bloček nakrájen na 200 řezů barvených hematoxylin-eosinem a Malloryho trichromem, z nich systematicky vybráno 10 ekvidistatních řezů z každého z 18 tkáňových bločků



Obr. 131: Vzorkování tkáňových bločků z ledviny.

18.2 Hodnocení průběhu trhlin

Každý bloček byl prokrájen na 200 sériových řezů barvených střídavě Malloryho trichromem a hematoxylin-eosinem. Z nich bylo pro kvantitativní analýzu vybráno metodou systematického náhodného výběru vždy 10 řezů na bloček. Na jejich mikrofotografiích byla zvlášť pro kůru a zvlášť pro dřevň stanovena délková hustota vnitřního obvodu proximálních a distálních tubulů (v kůře), resp. Henleových kliček a sběracích kanálek (ve dřevni), a to podle vztahu:

$$L_A = \frac{L}{A}, \quad (61)$$

kde L_A je délková hustota profilů vnitřního obvodu stěn tubulů (length density, intensity of planar fibre process) dle [43], L je naměřená délka vnitřních obvodů relevantních kanálek a A je referenční plocha tohoto měření.

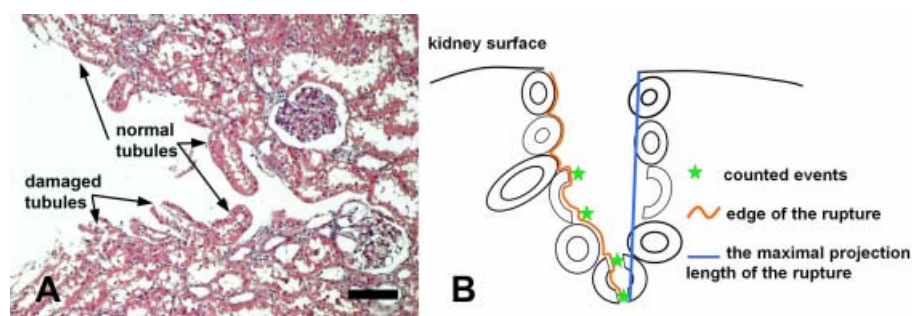
Tímto byla odhadnuta referenční hodnota délkové hustoty. Použili jsme ji pro získání teoretického počtu průsečíků trhliny s tubuly, který by platil za předpokladu, že dráha trhliny ve tkáni je náhodná, tj. bez preferenčního průběhu napříč přetrženými tubuly či napříč intersticiálním vazivem:

$$P_L = l \cdot \frac{2}{\pi} \cdot L_A, \quad (62)$$

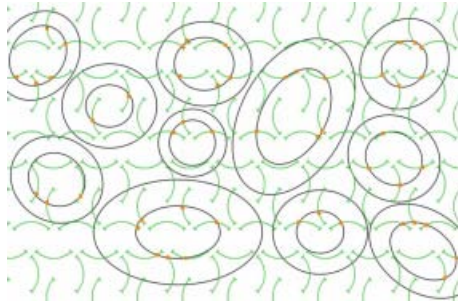
kde P_L je intenzita průsečíků profilu trhliny na řezu s profilem vnitřního obvodu stěny tubulů a l je maximální projekce délky trhliny do roviny řezu.

S využitím modulu LineSystems programu Ellipse (ViDiTo, Košice, SR) lze pro kůru i dřevň v okolí trhlin pomocí čárového testovacího systému (cirkulární oblouky s náhodným nastavením) odhadnout lokální hodnotu L_A (rovnice 61). Z té je možné podle rovnice 62 vypočítat teoretickou hodnotu P_L . Poté lze spočítat na řezech ledvinami skutečnou intenzitu průsečíků profilu trhliny s tubuly nefronu P'_L s tím, že na jeden kompletně přetržený tubulus připadají dva tyto průsečíky. Maximální projekci délky trhliny do roviny řezu lze odhadnout u obou ramen trhliny pomocí nástroje na měření délky (polygon, s použitím grafického tabletu). Význačný rozdíl mezi teoretickou a pozorovanou hodnotou může pak vést k vyvrácení předpokladu náhodného šíření trhlin, kdy $P'_L < P_L$ svědčí o preferenčním průběhu trhliny přes intersticiální vazivo, zatímco $P'_L > P_L$ svědčí o vyšším zastoupení tubulárních profilů v trhlíně, nežli by odpovídalo náhodnému průběhu (viz také oddíl 5.10). Rozdíly mezi P'_L a P_L lze při dostatečném počtu bločků a řezů vyhodnotit standardními statistickými testy.

18.3 Počítání ruptur kanálek nefronu, hodnocení L_A a l



Obr. 132: Příklad ruptury ledvinné kůry (A) a počítání profilů prasklých kanálek a maximální projekce délky trhliny na řezu l (B).



Obr. 133: Cirkulární oblouky a jejich průsečíky s profily vnitřní stěny kanálků slouží k odhadu 2-D délkové hustoty těchto profilů L_A .

19 Literatura

- [1] Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. (2004): Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36–42.
- [2] Aguilera A., Yanez-Mo M., Selgas R., Sanchez-Madrid F., Lopez-Cabrera M.: Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005, 6:262–268.
- [3] Barber CB, Dobkin DP, Huhdanpaa HT. The Quickhull Algorithm for Convex Hulls. *ACM Transactions on Mathematical Software*, 1996 22:469–483.
- [4] Bland J.M., Altman D.G. (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 8:307–310.
- [5] Bolender R.P. (1992): Biological stereology: history, present state, future directions. *Microscopy Research and Technique* 21:255–261.
- [6] Braendgaard H, Gundersen HJ. (1986): The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 18:39–78.
- [7] Cebasek V., Kubínová L., Janáček J., Ribaric S., Erzen I. (2007): Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. *Cell Tissue Res*. 330:279–289.
- [8] Delaunay B. Sur la sphere vide. *Izvestia Akademii Nauk SSSR*. 1934, 7:793–800.
- [9] Di Paolo N., Sacchi G.: Atlas of peritoneal histology in normal conditions and peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2000, Vol. 20, Suppl.3.
- [10] Gaunt P.N., Gaunt W.A. (1978): Three dimensional reconstruction in biology. 1st edition. Pitman Medical Publishing Co., Tunbridge Wells, 174 pp.
- [11] Glaser J., Greene G., Hendricks S. (2007): Stereology for biological research with a focus on neuroscience. 2nd edition. MBF Press, Williston, 104 pp.
- [12] Gundersen H.J.G. (1977): Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy* 111:219–223.
- [13] 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. *Journal of Microscopy* 143:3–45.
- [14] Gundersen H.J.G., Jensen E.B. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 147:229–263.
- [15] 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.
- [16] Gundersen H.J., Østerby R. (1981): Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *Journal of Microscopy*. 121:65–73.
- [17] Gundersen H.J., Jensen E.B., Kieu K., Nielsen J. (1999): The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. *Journal of Microscopy* 193:199–211.

- [18] Hedreen J.C. (1998): What was wrong with the Abercrombie and empirical cell counting methods? A review. *Anatomical Record* 250:373–380.
- [19] Howard C.V., Reed M.G. (2005): *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. 2nd edition. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbook Series No. 41. Springer-Verlag, New York, 246 pp.
- [20] Howard V., Reid S., Baddeley A., Boyde A. (1985): Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *Journal of Microscopy* 138:203–212.
- [21] Jirkovská M., Kubínová L., Krekule I., Hach P. (1998): Spatial arrangement of fetal placental capillaries in terminal villi: a study using confocal microscopy. *Anatomy and Embryology (Berl)*. 197:263–272.
- [22] Jirkovská M., Naprstková I., Janáček J., Kučera T., Macášek J., Karen P., Kubínová L. (2005): Three-dimensional reconstructions from non-deparaffinized tissue sections. *Anatomy and Embryology (Berl)*. 210:163–173.
- [23] 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.
- [24] Kočová, J. (1970): Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels. *Folia Morphol*. 18:293–295.
- [25] Kurzydowski K.J., Ralph B. (1995): *The quantitative description of the microstructure of materials*. CRC Press, Boston, 418 pp.
- [26] Løkkegaard A., Nyengaard J.R., West M.J. (2001): Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus*. 11:726–40.
- [27] Mandarim-de-Lacerda C.A. (2003): Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 75:469–486.
- [28] 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. *Journal of Anatomy* 188:1–15.
- [29] Mayhew T.M., Lucocq J.M., Griffiths G. (2002): Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *Journal of Microscopy* 205:153–164.
- [30] Mouton P.R. (2002): *Principles and Practices of Unbiased Stereology. An Introduction for Bioscientists*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 214 pp.
- [31] Numata M., Nakayama M., Nimura S. et al.: Association between an increased surface area of peritoneal microvessels and a high peritoneal solute transport rate. *Perit. Dial. Int.* 2003, 23:116–122.
- [32] Parfitt A.M. (1988): Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. *Bone* 9:67–69.
- [33] Paxinos G, Franklin, KBJ. (2001): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed., Academic Press, San Diego.

- [34] Philimonenko A.A., Janacek J., Hozak P. (2000): Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labelling experiments. *Journal of Structural Biology* 132:201–210.
- [35] Russ, J.C. (2006): *The Image Processing Handbook*. 5th edition. CRC, Boca Raton, 818 pp.
- [36] Russ J.C., Dehoff R.T. (2001): *Practical Stereology*. 2nd edition. Plenum Press, New York, 307 pp.
- [37] Shadwick R.E. (1999): Mechanical design in arteries. *Journal of Experimental Biology* 202:3305–3313.
- [38] Shrout P.E., Fleiss J.L. (1979): Intraclass Correlations: Uses in Assessing Rater Reliability. *Psychological Bulletin* 2:420–428.
- [39] Stary 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.
- [40] Stary 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 R.W. 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. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 15:1512–1531.
- [41] Stary H.C. (2000): Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. An update. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20:1177–1178.
- [42] Sterio D.C. (1984): The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 134:127–136.
- [43] Stoyan D., Kendall W.S., Mecke J. (1995): *Stochastic geometry and its applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 456 pp.
- [44] Tang Y., Nyengaard J.R. (1997): A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter. *Journal of Neuroscience Methods*. 73:193–200.
- [45] 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 et Vasa* 49:95–101.
- [46] Tonar Z., Egger G.F., Witter K., Wolfesberger B. (2008): Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microscopy Research and Technique*. 71:760–772.
- [47] Van Vre E.A., van Beusekom H.M., Vrints C.J., Bosmans J.M., Bult H., Van der Giessen W.J. (2007): Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. *Cardiovascular Pathology* 16:43–50.
- [48] Vashishth D., Verborgt O., Divine G., Schaffler M.B., Fyhrie D.P.: Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone*. 2000 26:375–80.

- [49] Vashishth D., Gibson G.J., Fyhrie D.P: Sexual dimorphism and age dependence of osteocyte lacunar density for human vertebral cancellous bone. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005 282:157–62.
- [50] Weibel E.R. (1979): *Stereological Methods. Vol.1: Practical Methods for Biological Morphometry.* Academic Press, London, 415 pp.
- [51] Wicksell S.D. (1925): The Corpuscle Problem: A Mathematical Study of a Biometric Problem. *Biometrika.* 17:84–99.
- [52] Williams J.D., Craig K.J., Topley N., Von Ruhland C., Fallon M., Newman G.R., Mackenzie R.K., Williams G.T. (2002): Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 13:470–479.
- [53] Wojnar L. (1999): *Image analysis – Applications in materials engineering.* CRC Press, Boca Raton, 256 pp.

20 Seznam příloh

V HTML verzi dokumentu na adrese www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/quanthistol/index.html jsou k dispozici následující flashové animace ve formátu *.swf:

1. Kalibrace X , Y , Z snímku
2. Kontrola linearit zvětšení při použití více objektivů
3. Odhad plochy a objemu pomocí bodové testovací mřížky u přehledného barvení
4. Odhad plochy a objemu pomocí bodové testovací mřížky u imunohistochemie
5. Odhad délky a délkové hustoty pomocí systému cirkulárních oblouků
6. Odhad plochy povrchu a povrchové hustoty pomocí systému cykloid
7. Odhad numerické hustoty objektů pomocí optického disektoru v sérii řezů z optického mikroskopu
8. Odhad numerické hustoty objektů pomocí fyzického disektoru v sérii registrovaných řezů
9. Registrace fyzických řezů
10. Odhad počtu profilů objektů na jednotku plochy řezu
11. Systematický uniformní náhodný výběr obrazových polí ze snímku o vysokém rozlišení
12. Delaunayova triangulace 2-D bodové sítě
13. Analýza shluků ve 2-D
14. Orientace struktur ve 2-D
15. Odhad délek ve 3-D a orientace struktur ve 3-D
16. Ukázka 3-D rekonstrukce kontur objektů
17. Ukázka 3-D rekonstrukce povrchu objektů

Poznámky:

- K odhadu je obvykle zapotřebí min. 200 průsečíků testovacího systému s hodnocenými strukturami.
- Profily vláken jsou pro účely odhadu délek pomocí cirkulárních oblouků abstrahovány do lineárních jednorozměrných struktur (tj. vláken, která mají pouze délku, nikoliv sílu). Za tím účelem je před vlastní kvantifikací jako část vlákna relevantní pro vznik průsečíků s testovacím systémem vybrána např. pravá horní hrana vlákna.
- K ukázkám byly použity programy Ellipse (ViDiTo, Košice, SR) a ImagReg (Dr. Jiří Janáček, FgÚ AV ČR v Praze).