

Kvantitativní popis aterosklerotických lézí na úrovni optické mikroskopie*

Zbyněk Tonar^{*,**}, Jiří Janáček^{***}, Rudolf Poledne^{*}

^{*}Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha,

^{**}Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni, Plzeň,

^{***}Oddělení biomatematiky, Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha, Česká republika

Tonar Z^{*,**}, Janáček J^{***}, Poledne R^{*} (*Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, **Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni, Plzeň, ***Oddělení biomatematiky, Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha, Česká republika). **Kvantitativní popis aterosklerotických lézí na úrovni optické mikroskopie.** *Cor Vasa* 2007;49(3):95–101.

Cílem práce je shrnout dostupné metody morfometrie aterosklerotických lézí a pojednat o jejich praktické použitelnosti pro hodnocení vulnerability lézí. Vysvětlujeme princip stereologického odhadu délek, povrchů, objemů, buněčné hustoty, mikrovazální hustoty, shlukování buněk a jejich preferenční distribuce v různých kompartmentech vzorků. Pozornost je věnována i problematice vzorkování histologických sérií a uspořádání stereologické studie tak, aby splňovala základní předpoklady současné morfometrie. Diskutujeme o zdrojích variability v mikroskopii cév a srovnáváme některé metody analýzy obrazu a stereologie. Zmíněny jsou doporučené zásady pro odběr materiálu.

Klíčová slova: Mikroskopie – Stereologie – Kvantifikace – Krevní cévy

Tonar Z^{*,**}, Janáček J^{***}, Poledne R^{*} (*Atherosclerosis Research Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, **Institute of Histology and Embryology, Charles University School of Medicine at Pilsen, Pilsen, ***Division of Biomathematics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic). **Quantitative description of atherosclerotic lesions in optical microscopy.** *Cor Vasa* 2007;49(3):95–101.

The aim of this paper is to review current methods available for quantitative morphometry of lesions in blood vessels as well as to discuss their applicability for assessing the vulnerability of vascular lesions. The principles of stereological estimation of the length, surface, volume, numerical density, cluster analysis, microvessel density, and relative labeling index are explained. The key rules of unbiased sampling in histology and designing a morphometric study are discussed. The distribution of the overall observed variance in a typical biological experiment is reviewed, and a comparison of some image processing vs. stereological methods is provided. We discuss several common pitfalls in quantification studies and provide practical recommendations to be followed when harvesting tissue samples for histological assessment.

Key words: Microscopy – Stereology – Quantification – Blood vessels

Adresa: MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta UK v Plzni, Karlovarská 48, 301 66 Plzeň, Česká republika; e-mail: zbynek.tonar@lfp.cuni.cz

HISTOPATOLOGICKÁ KLASIFIKACE ATERO SKLERÓZY

V histopatologické klasifikaci aterosklerózy je dlouhodobě zaveden přehledný a výborně dokumentovaný systém podle Satoryho, který se stal základem pro klasifikaci navrženou American Heart Association (AHA).^(1–4) Iniciální léze typu I sestává ze zvětšeného množství lipidů obsahujících makrofágy (pěnové buňky), které jsou izolovaně rozptýleny v adaptivně zesílené intimě bohaté na proteoglykany. V lézi typu II jsou pěnové buňky akumulovány v souvislých vrstvách a kapénky lipidů se objevují i v některých hladkých svalových buňkách intimy. Intermediární léze typu III (preateromy) obsahují již extracelulární depo-

zita lipidů, které se uvolnily rozpadem části populace pěnových buněk, a proto nalézáme v mezibuněčném prostoru na rozhraní intimy a medie zbytky rozpadlých buněk. Ve stadiu IV (aterom) pozorujeme masivní nárůst extracelulárních lipidů do podoby lipidového jádra krytého vrstvou pěnových buněk a intimou. Narůstá množství lipidů i v hladkých svalových buňkách, které se z původního tzv. kontraktálního fenotypu postupně mění na fenotyp syntetický, charakterizovaný vedle obsahu tukových kapének i množstvím granulárního endoplazmatického retikula, dystrofickou kalcifikací některých organel a zesílením bazální laminy. Od stadia IV se léze může vyvíjet různým způsobem v závislosti na

^{*}Angiologická část práce byla podpořena projektem MŠMT ČR 1M6798582302, histologické metody výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM0021620819 a rozvoj stereologických technik granty AVCR A100110502 a AV0Z 50110509.

typu cévy, lokalizaci uvnitř cévy, lipidovém profilu, hypertenzi, reaktivitě cévní stěny a dalších faktorech. Pro stadium V je typické reparativní zmnožení fibromuskulárního krytu (čepičky), pod nímž vedle lipidového jádra nacházíme i vápenaté inkrustace. Dochází ke zvýšení rigidity cévní stěny a výraznějšímu uzávěru cévního lumen. Za stadium VI považujeme přítomnost eroze, hematomu či trombózy, nasedající na lézi typu IV či V a tyto komplikace mohou (zejména v případech opakování) vést k velmi rychlé okluzi cévy. Při výrazném rozvoji kalcifikace či dokonce při osteoidní metaplasii popisujeme lézi typu VII. U typu VIII převažuje reparativní fibroprodukce. Regrese či změna v lipidových depozitech v cévní stěně mohou vést k remodelaci lézí IV–VI v typ VII–VIII. Klasifikace ještě rozlišuje různá dílčí substadia. Pro zvýšení přehlednosti a zjednodušení byly navrženy i modifikace tohoto systému stadií,⁽⁵⁾ ty jsou však podle klasifikace AHA konzistentní.

KVANTIFIKACE PARAMETRŮ PŘI STUDIU VULNERABILITY ATEROSKLEROTICKÝCH LÉZÍ

K popsání „gradingu“ aterosklerotických změn je často zapotřebí doplnit i kvantitativní hodnocení některých složek cévní stěny, zejména pak pro posouzení vulnerability lézí podle uznávaných kritérií,^(6,7) (tabulka I).

Kvantitativní posouzení cévního řečiště na mikroskopické úrovni poskytuje nepostradatelné výsledky zejména v experimentálním výzkumu aterosklerózy. Postupy používané v současnosti lze většinou zařadit buď mezi metody obrazové analýzy nebo stereologie. Zdaleka ne všechny současné publikace respektují či sdílejí společné metodické zásady kvantifikace, a proto jsou výsledky jednotlivých pracovišť jen obtížně porovnatelné. Cílem tohoto příspěvku je proto

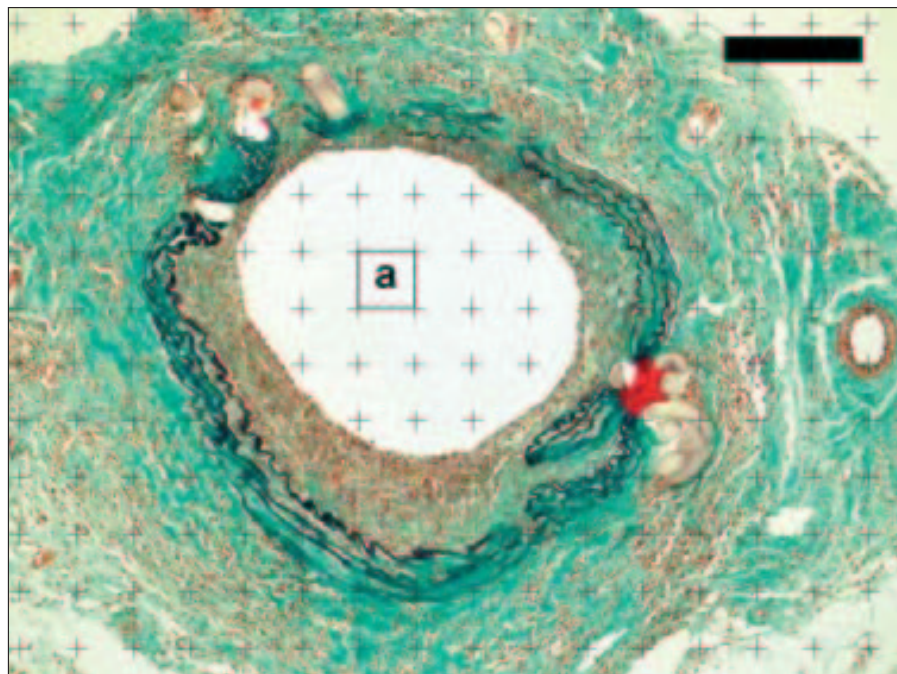
shrnout dostupné metody morfometrie cév a diskutovat o jejich praktické použitelnosti pro jednotlivé aplikace. Zvláštní pozornost bude dále věnována metodám spadajícím do stereologie, tj. postupům založeným na statistickém odvozování geometrických vlastností hodnocených struktur a objektů z aplikace bodových, lineárních, rovinných či objemových testovacích sond na orientované řezy vzorkem.^(8,9)

ROZSAH LÉZÍ A JEJICH KOMPONENT

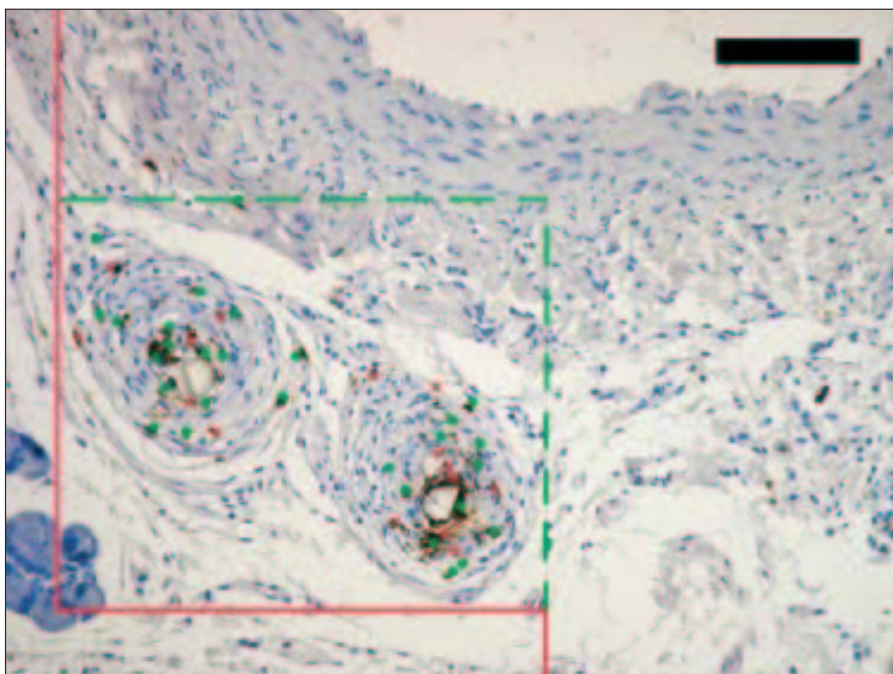
Plošné míry, tj. např. plochy profilů cév, lézí⁽¹⁰⁾ (obrázek 1), hemoragií či relativní pozitivitu adhezních molekul⁽¹¹⁾ na řezu, lze odhadovat z počtu průsečíků hodnocené struktury s náhodnou sítí bodů superponovaných se snímkem. Využíváme skutečnosti, že pravděpodobnost zasažení hodnoceného objektu (plátu, kalcifikace, cévního lumen apod.) body testovací mřížky je přímo úměrná ploše této struktury v řezu. S využitím Cavalieriho principu⁽¹²⁾ lze při znalosti síly řezů stanovit i objem celých lézí či jejich složek. Pokud jsou analyzované objekty v rámci série histologických řezů od sebe dostatečně vzdáleny a jejich prostorové korelace je možné zanedbat, považujeme je za nezávislé a variabilitu výsledků zpracováváme běžným způsobem. Pokud se můžeme domnívat, že sousední vzorky mohou být závislé, analyzujeme např. celou sérii řez po řezu a zjistíme závislost koeficientu chyby podle Gundersena a Jensenové.⁽¹³⁾

HUSTOTA LEUKOCYTŮ V CÉVNÍ STĚNĚ

K hodnocení hustoty buněk, např. imunohistochemicky detekovaných leukocytů, v referenční objemové jednotce tkáně lze použít techniky optického nebo fyzického disektoru.⁽¹⁴⁾ Disektor je stereologická objemová testovací sonda k počítání objektů v objemové

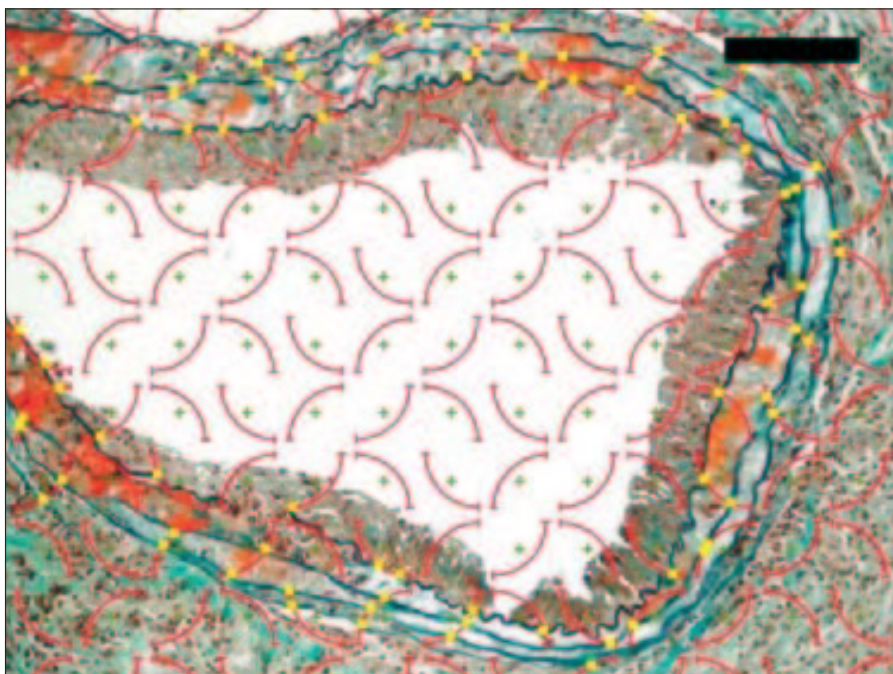


Obr. 1
Projekce bodové testovací mřížky o parametru *a* při určování objemu aortální neointimy u transplantačního modelu regrese aterosklerózy u apoE-deficientní myši. Měřítka 170 μ m, zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin.



Obr. 2

Horní pohled na hodnoticí rámeček fyzického disektoru zaměřeného na neutrofilní granulocyty (hnědě) v adventicii aorty apoE-deficientní myši po heterotopní transplantaci. Započítány jsou zeleně značené buňky, které jsou uvnitř disektoru či protínají jeho povolené boční hranice (zeleně). Buňky protínající zakázanou hranici (červeně) či náhledovou rovinu se nezapočítávají. V adventiciálním vazivu kolem cévního stehu byla hustota neutrofilů $101\,000/\text{mm}^3$. Měřítka 70 μm , imunohistochemie proti „anti-mouse neutrophils“ s dobarvením Gillovy hematoxylinem.



Obr. 3

Církulární oblouky při hodnocení délkové hustoty ($0,083\ \text{m}^{-1}$) profilů elastinu v řezu tunica media aorty myši. Měřítka 60 μm , zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin.

jednotce. Fyzický disektor využívá obrázků dvou či více fyzických řezů registrovaných (sesazených) v ose Z. Optický disektor využívá silných řezů, uvnitř kterých postupným zaostřováním procházíme jednotlivé optické intervaly. Z počtu objektů můžeme při kalibraci referenčního objemu cévní stěny odhadnout hustotu označených buněk. Dodržení pravidel disektoru zaručuje nevychýlený výsledek („unbiased estimation“), v němž objekty různé velikosti i orientace mají stejnou

pravděpodobnost, že budou do disektoru započítány (obrázek 2). Zároveň je vyloučeno opakované započítání těchž objektů zasahujících do více řezů.

DÉLKA VLÁKEN MEZIBUNĚČNÉ HMOTY A VASA VASORUM, MIKROVAZÁLNÍ HUSTOTA

Uvažujeme-li délku vláken a lamel elastinové sítě nebo délku vasa vasorum ve 3D, lze definovat délko-

Tabulka I
Mikroskopické markery vulnerability aterosklerotických lézí

	Kvantitativní parametr	Jednotky
Stenóza lumen	Objem cévního lumina a cévní stěny	(mm ³)
	Poměrné zúžení lumina tepny aterosklerotickou lézí	(%)
Velikost lipidového jádra	Absolutní objem lipidových depozit	(mm ³)
	Relativní podíl extracelulárních lipidů v celé lézi	(%)
Síla krytu lipidového jádra	Tloušťka fibrózní čepičky léze	(m)
Přítomnost abnormálních složek v mezibuněčném prostoru a alterace mechanických vlastností cévní stěny	Relativní objemový podíl lipidů, kalcifikací, hemoragií v lézi (%)	(%)
Narušení základní stavby tepenné stěny, zejména u elastických tepen	Střední interlamelární vzdálenost mezi sousedními elastickými membránami	(m)
	Tloušťka cévní stěny a jejích vrstev	(m)
Fragmentace elastinu ve stěně velkých elastických tepen	Délková hustota elastinu	(mm ⁻¹)
Rozvoj zánětlivé reakce	Numerická hustota buněk infiltrujících referenční objem cévní stěny	(m ⁻³)
	Rozměr buněčných shluků a kolokalizace jednotlivých typů leukocytů	(m)
	Plocha/objem pozitivitu imunohistochemického průkazu adhezčních molekul, metaloproteináz apod. na řezu/sérii řezů	(mm ²), resp. (mm ³)
Trofika cévní stěny a vliv neoangiogeneze	Povrch cév včetně vasa vasorum	(mm ²)
	Povrchová hustota cév v referenčním objemu cévní stěny	(mm ⁻¹)

vou hustotu jako poměr délky struktury v referenční ploše, resp. objemu. K tomuto odhadu lze použít trojrozměrný testovací systém, tj. množinu izotropních systematických náhodných rovin, které zachytí hodnocený objekt s pravděpodobností přímo úměrnou jeho délce. K odhadu délek lineárních struktur ve 2D (např. obvod profilu cévy na řezu, délka profilu vláken mezibuněčné hmoty apod.) lze s výhodou použít modifikované Buffonovy metody,⁽¹⁵⁾ při níž je délka objektů odhadována z počtu průsečíků testovacího systému (linie či křivky) s hodnocenými vláknitými objekty (obrázek 3). V rámci řezů pak lze vyjadřovat i délkovou hustotu hodnocených profilů.⁽¹⁶⁾ Pro nepřímou kvantifikaci velkého množství drobných vasa vasorum je zavedena metodika odhadu mikrovasální hustoty (microvessel density), jako poměr počtu profilů cév na jednotku plochy řezu. Kromě kvantifikace patologické angiogeneze v jednotlivých vrstvách cévní stěny je vhodnou aplikací i možné vysvětlení vlivu trofiky cévní stěny na predispozici některých částí cévního řečiště k ateroskleróze.⁽¹⁷⁾

POVRCH CÉV A LÉZE

Při odhadu velikosti vnitřního povrchu cév musíme zajistit, aby všechny stejně velké části plochy endotelu měly stejnou šanci být zasaženy lineární sondou. Tento předpoklad platí, použijeme-li izotropně orientovanou sondu nebo aplikujeme-li sondu na izotropně náhodně orientované řezy. Z praktických důvodů je často vhodnější namísto zcela izotropních řezů připravovat tzv. vertikální uniformní náhodné (VUR) řezy, které však již nejsou izotropní ve 3D, ale jen v horizontální rovině. Vzorak pak krájíme systematickými řezy kolmo na horizontální rovinu a povrch je

dán množstvím průsečíků s křivkami zvanými cykloidy. Řezy VUR můžeme s výhodou použít současně s určováním plochy i k odhadu objemu Cavalieriho metodou, která nevyžaduje náhodnou orientaci řezů.

SHLUKY A KOLOKALIZACE BUNĚK V CÉVNÍ STĚNĚ

Pro hodnocení tvorby shluků buněk v preparátech (např. imunohistochemicky značených makrofágů v cévní stěně) je k dispozici testování ne/náhodnosti rozložení buněk v referenčním prostoru, jakožto analýza lokálních maxim a minim denzity objektů ve vymezené oblasti preparátu. Hodnotíme,⁽¹⁸⁾ zda počet vzdáleností mezi sousedícími buňkami v určitém vzdálenostním intervalu je vyšší či nižší na dané hladině významnosti, než by odpovídalo mnohonásobné simulaci zcela náhodného rozložení buněk v analyzované oblasti. Obdobnou analýzou pro objekty více než jedné třídy lze hodnotit jejich kolokalizaci, například společný výskyt různých typů leukocytů infiltrujících cévní stěnu. Pro analýzu preferenčního osídlení některých částí léze, populací určitých buněk, se používá tzv. „relative labelling index“ (RLI).⁽¹⁹⁾ Lze tak odpovědět na otázku, zda je distribuce objektů (buněk) v různých kompartmentech (např. jednotlivých vrstvách cévní stěny či v aterosklerotické lézi a mimo ni) náhodná, a pokud není náhodná, který kompartment je daným typem buněk upřednostňován.

STRATEGIE PŘÍPRAVY VZORKŮ

Vedle samotného hodnocení mikroskopických parametrů je u kvantitativní studie velice důležité

vzorkování materiálu, jako významná součást jejího uspořádání. V publikacích někdy uváděný výběr „reprezentativních“ vzorků je nejednoznačný, zpravidla nereprodukovatelný a může podle preferencí autora znamenat např. tu část materiálu, která se mu jeví jako vhodná pro publikační výstup, která koresponduje s referenční literaturou na dané téma, jejíž laboratorní zpracování je zdařilé, či která se z nějakého jiného subjektivního důvodu jeví jako vhodná pro analýzu. Uvedené a jim podobné metody výběru reprezentativních vzorků jsou tzv. vychýlené („biased“), protože bývají vybrány na základě a priori známé informace či předpokladů. Takový výběr může být zdrojem systematické chyby a nedává všem částem zkoumaného orgánu či histologického bločku stejnou pravděpodobnost, že se stane součástí výběru. Princip spravedlivého výběru je přitom základem správného vzorkování a žádná část vzorku, který chceme zkoumat, by neměla být upřednostňována. Jen tak lze zajistit, aby se struktury staly součástí výběru s pravděpodobností přímo závislou na frekvenci jejich výskytu ve vzorku (právě tato jejich četnost je zpravidla tím, co stanovujeme). Častým úkolem histologického pracoviště je výběr tkáňového bločku z makroskopického vzorku analyzovaného orgánu, výběr konkrétních řezů hodnocených v rámci bločku či výběr obrazových polí v rámci daného řezu. Na každé úrovni odběru či redukce materiálu by měl proběhnout systematický nestranný náhodný výběr, kdy celek rozdělíme na podjednotky (řezy), pozice prvního vzorku v sérii je určena náhodným číslem a pozice dalších vzorků (řezů) jsou vždy ve stejné vzdálenosti od nejbližšího předchozího vzoru (řezu). Rozptýl tohoto výběru je vždy minimálně stejný jako u prostého náhodného výběru, většinou je však význačně nižší.

ZDROJE VARIABILITY V MIKROSKOPII CÉV

Analýza variability kvantitativních parametrů (*tabulka 1*) na jednotlivých stupních vzorkování vyžaduje zpravidla pilotní studii. Při plánování experimentů však můžeme využít studií zabývajících se variabilitou. Ukazuje se, že u typického biologického experimentu při kvantifikaci morfologických struktur připadá zhruba 70 %⁽²⁰⁾ z celkové variability údajů na interindividuální (biologickou) variabilitu, dále asi 20 % na variabilitu mezi tkáňovými bločky odebranými z daného jedince, kolem 5 % na variabilitu mezi řezy vybranými z daného bločku, 3 % na variabilitu mezi zornými poli hodnocenými v rámci téhož řezu a přibližně 2 % na variabilitu při opakovaných měřeních. Citovaná rozsáhlá studie nás přesvědčuje, že soustředíme-li se na provedení velmi přesného a opakovatelného měření na úrovni mikrofotografií (například obrazovým analyzátozem), může být naším výsledkem v nejlepším případě zpřesnění ve výsledcích celého experimentu asi o 2 %. Chceme-li tedy zvýšit kvalitu kvantitativní studie, je zapotřebí investovat větší úsilí do analýzy většího počtu zvířat a z nich odebíraných vzorků, resp. nakrájených histologických řezů, na což je vhodné myslet při přípravě experimentů se zvířaty. Při této filozofii mohou být kvantitativní studie dosti účinné, zvláště uvažujeme-li, že k dostatečně přesným výsledkům lze u většiny z postupů uvedených v přehledu výše dospět při

započítání asi 200 průsečíků na sérii řezů či dokonce na jeden vzorek.^(21,22) Při analýze cév větších savců či vzorků krevního řečiště člověka může být vhodné analyzovat raději více sérií, zvláště když máme důvod se domnívat, že náchylnost ke vzniku lézí se v různých úsecích téže cévy liší například vlivem větvení, lokálního zakřivení apod.

SROVNÁNÍ STEREOLOGICKÝCH METOD A OBRAZOVÉ ANALÝZY

Metody obrazové analýzy jsou ve srovnání se stereologií relativně populární a prakticky každé současné mikroskopické pracoviště alespoň některými z nich disponuje. K jejich výhodám při kvantifikaci patří možnost automatizace prostřednictvím skriptování. Tuto skutečnost oceníme zejména v případě zpracovávání velkého počtu histologických vzorků uniformního vzhledu. Při rozličné kvalitě vzorků v daném experimentu se však setkáváme s tím, že reprodukovatelnost obrazové analýzy barevně odlišitelných fází silně závisí na kvalitě preparátů; tím pádem je omezená například u patologických vzorků či tam, kde i při nejlepší snaze nelze vyloučit přítomnost artefaktů v preparátech (prach, precipitované barvivo, nespecifická reakce u metod afinitní histochemie). U stereologických metod bývá možnost automatizace omezena obvykle např. na prahování a většina metod vyžaduje významnou interaktivní spoluúčast kvalifikovaného hodnotitele. Reprodukovatelnost je však v tomto případě vysoká, neboť podkladem stereologických metod je obvykle počítání událostí (nikoliv měření geometrických parametrů), kdy o každé události (průsečík testovací linie s objektem) lze zcela jednoznačně rozhodnout v rámci binární logiky „započítat“ nebo „nezapočítat“.

Přestože může být podíl interaktivní práce uživatele se software pro stereologickou analýzu v některých případech významnější, než například u rutinně zavedených metod automatizované obrazové analýzy, prostor pro subjektivní chybu je minimalizován jednoznačností rozhodovacích pravidel. Hodnocení uživatelem umožňuje zahrnout do studie i preparáty s odchylkami v histologickém barvení či s nepodstatnými artefakty. Toto hospodárnější využití materiálu patří k nejsilnějším stránkám stereologie v mikroskopii, protože preparátů s odchylkami od ideálu je v rutinním provozu mnoho. Lepší využití řezů rozšiřuje hodnocenou část makroskopických orgánů, což nám umožňuje účinně snižovat variabilitu v experimentu (viz výše). Jednoznačnost pravidel vede u stereologie samozřejmě i k nízké variabilitě výsledků při opakovaných měřeních či mezi různými pozorovateli. Poslední dva typy variability hodnotíme například pomocí „intraclass correlation coefficient“.⁽²³⁾ Obecnou vlastností stereologických metod je skutečnost, že při jejich návrhu a testování byla věnována velká pozornost tomu, aby tyto metody poskytovaly údaje nevychýlené různými vlastnostmi vzorků „unbiased methods“, a aby v sobě zahrnovaly minimum či žádné předpoklady těchto vlastností (velikost, tvar, orientace, distribuce hodnocených objektů, tzv. „assumption-free methods“). Pokud metoda přesto nějaké předpoklady má, jsou dobře dokumentované.

PRAKTICKÉ POSTUPY PŘI ODBĚRU MATERIÁLU PRO HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Přestože odběr vzorků pro mikroskopické hodnocení může probíhat např. v peroperační časové tísní, vyplatí se dodržovat před odesláním materiálu na histologické pracoviště některé zásady, zejména není-li histolog odběru osobně přítomen.

1. Je třeba dokumentovat místo odběru a orientaci vzorku při zalévání do bločku (je-li zaléván v místě odběru). Pokud se může vyskytnout nejednoznačnost v jeho orientaci, je možné důsledně označovat konvenční stranu preparátu černou či zelenou tuší (například k odlišení proximálního a distálního konce cévy, u velkých cév i ventrální a dorzální strany apod.) nebo stehem. V takovém případě se lze vyjádřit k otázce, zda jsou např. léze rozmístěny náhodně nebo preferenčně na ventrální, dorzální či laterální stěně cévního lumen, nebo jaká je distribuce lézí vzhledem k odstupujícím větvím hlavního cévního kmene. Tím se otevírá možnost diskutovat lokální hemodynamické vlivy na predilekční výskyt lézí.

2. Dokumentujeme, zda byla fixace provázena průplachem cévy fixačním roztokem nebo jen ponořením do fixativa. Znalost této okolnosti může usnadnit mikroskopické odlišení některých suspektních dosud neorganizovaných čerstvých mikrotrombů od post-mortálně vzniklých koagul, zejména v malých cévách. Průplachem cévy fixačním roztokem také klesne počet buněk adheřujících na endotel, se kterými se lze v cévách často setkat.

3. Používáme dostatečné množství fixativa – optimální je asi 100násobek objemu tkáňového bločku, jehož rozměry by vzhledem k rychlosti penetrace formaldehydového roztoku neměly přesahovat 1 x 1 x 1 cm u solidní tkáně. Pokud je vzorek větší, je třeba provést nástřik cév, resp. jiných dutin vzorku fixativem.

4. Omezujeme preparaci tkáňových bločků před jejich fixací, resp. zalitím do paraplastu na naprosté minimum. Je vhodné vyhnout se nadbytečné preparaci cév, při níž se často poškodí či odtrhne tunica adventitia a nelze se pak vyjádřit např. k její leukocytární infiltraci či ke stavu vasa vasorum. Ideální je ponechat cévu v okolní tkáni, kterou je zpravidla řídké kolagenní vazivo, a zalít ji „en bloc“, jako větší bloček.

5. Je-li to možné, vyhýbáme se deformaci hodnoceného úseku cévy instrumentáři. Po kompresi cévy pinzetou, cévními kleštěmi či svorkami, nelze již rekonstruovat prostorové vztahy v cévní stěně, poměr plát/volné lumen atd. Je-li nutné s cévou manipulovat, navrhuje se činit tak za konec, který bude nakonec před zalitím do bločku odstřižen.

Respektováním uvedených zásad, které mohou být modifikovány podle zvyklostí a potřeb konkrétního hodnotícího pracoviště, předcházíme nejistotě v odečítání a komentáři některých preparátů a zpravidla je možno vytěžít z mikroskopického vyšetření více informací. I pak je ale nutné se smířit se skutečností, že kvantitativní údaje získané mikroskopickým hodnocením nelze u měkkých tkání považovat za absolutně

správná čísla, ale spíše lze jimi poměřovat jednotlivé skupiny experimentu. Od odběru tkáně po vlastní mikroskopování prochází vzorek totiž řadou procedur, které mění zejména objemové poměry tkání: fixace po odběru, dehydratace, prosycování zalévacím médiem, zalévání vzorku do paraplastu zhruba při 56 °C, chlazení zalitého vzorku, krájení, rozpuštění paraplastu, hydratace vzorku, barvení, dehydratace vzorku a montování do trvalého preparátu. U většiny deformací, které během zpracování proběhnou, navíc nelze předpokládat izotropii,⁽²⁴⁾ zejména u kompozitních vzorků s převládající orientací buněk i mezibuněčné hmoty, jak je tomu například u cévní stěny.

ZÁVĚR

Stereologické metody umožňují provádět kvantitativní odhady počtu objektů, délek, ploch a objemů. Společným principem je hodnocení interakce geometrických sond, jako jsou objemové elementy, roviny (řezy), linie a body, s hodnoceným vzorkem histologicky zpracovaných tkáňových bločků. Nedílnou součástí kvantitativního hodnocení je i hospodárný výběr částí makroskopických orgánů i nakrájených bločků k hodnocení. Při volbě správné strategie je tak v současnosti možné účinně kvantifikovat popis cév v normální cévní stěně i v experimentu.

LITERATURA

1. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. 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* 1994;89:2462–78.
2. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1512–31.
3. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177–8.
4. Stary HC. Slide atlas of atherosclerosis: Progression and regression. CD-ROM. New York: Parthenon Publishing, 2002.
5. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1262–75.
6. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies. Part I. *Circulation* 2003;108:1664–72.
7. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies. Part II. *Circulation* 2003;108:1772–8.
8. Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy. 1st ed. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbook Series No. 41. New York: Springer-Verlag, 1998:246.
9. Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology: An introduction to bioscientists. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2002:232.
10. Bobková D, Tonar Z. Effect of long-term cholesterol diet

- on cholesterol concentration and development of atherosclerosis in homozygous apolipoprotein e-deficient mice. *Acta Vet Brno* 2005;74:501–7.
11. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M, et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherosclerosis. *Pathology – Research and Practice* 2004; 200:219–29.
 12. Russ JC, DeHoff RT. *Practical Stereology*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 2001:382.
 13. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229–63.
 14. Tomori Z, Krekule I, Kubínová L. Disector program for unbiased estimation of particle number, numerical density and mean volume. *Image Anal Stereol* 2001;20:119–30.
 15. Weibel ER. *Stereological Methods*. Vol.1: *Practical Methods for Biological Morphometry*. London: Academic Press, 1979:396.
 16. Stoyan D, Kendall WS, Mecke J. *Stochastic geometry and its applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1996:456.
 17. Galili O, Herrmann J, Woodrum J, Sattler KJ, Lerman LO, Lerman A. Adventitial vasa vasorum heterogeneity among different vascular beds. *J Vasc Surg*. 2004;40:529–35.
 18. Philimonenko AA, Janáček J, Hozák P. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labelling experiments. *J Struct Biol* 2000;132:201–10.
 19. Mayhew TM, Lucocq JM, Griffiths G. Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *J Microsc* 2002;205:153–64.
 20. Gundersen HJG, Østerby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or: "Do more less well!". *J Microsc* 1987;121:65–73.
 21. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988;96:857–81.
 22. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988;96:379–94.
 23. Muller R, Buttner P. A critical discussion of intraclass correlation coefficients. *Statistics in Medicine* 1994;13: 2465–76.
 24. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 2001;204:232–46.
-
- Došlo do redakce 6. 7. 2006*
Přijato k otištění 8. 11. 2006

PRESTARIUM® COMBI

Procoralan 5_{mg}

TENAXUM®

PRESTARIUM®

PREDUCTAL® MR

