

Abstrakt

Zvířecí modely jsou hojně využívány při studiu patogeneze a progresu jaterních onemocnění či při vývoji nových strategií jejich terapeutického ovlivnění. Zaměření této dizertační práce na velký zvířecí model, prase domácí, odráží současný trend na poli experimentální medicíny, tedy využití modelů co nejbližších člověku tak, aby byly výsledky experimentů co nejpřesněji přenositelné do humánní medicíny. V rutinní patologické praxi je histologické hodnocení nedílnou součástí procesu stanovení diagnózy a závažnosti jaterního poškození. Analogicky je tedy histopatologické vyšetření tkáně zařazeno do designu experimentálních studií na játrech prasete. Naším cílem bylo aplikovat metody kvalitativního a kvantitativního histologického hodnocení a ověřit jejich využitelnost na játrech prasete. Metody kvantifikace zahrnovaly jak automatickou obrazovou analýzu dat, tak stereologické metody zaručující vysokou reprodukovatelnost studií a porovnatelnost výsledků z různých experimentů. Dizertační práce je založena na celkem 10 pracích: třech přehledových pracích a sedmi výsledkových pracích. Výsledkové práce vycházejí ze šesti studií, jejichž šest závěrů můžeme shrnout následovně:

Závěr 1: Vyvinuli jsme open-source software QuantAn pro automatickou analýzu mikrocév nasnímaných pomocí 3D zobrazovacích metod, např. pomocí výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (mikro-CT). Metody, na nichž je hodnocení v softwaru QuantAn založeno, jsou v souladu se standardy používanými ve stereologických metodách. Analýza dat získaných automatickou kvantifikací pomocí softwaru QuantAn identifikovala pravděpodobné zdroje chyb v měření, které je třeba při nastavování kvantitativních algoritmů zohlednit. QuantAn je volně dostupný pro výzkumníky zabývající se stochastickou geometrií mikrocév.

Závěr 2: Vyvinuli a otestovali jsme open-source software TeIGen pro generování virtuálních modelů vláknitých a porézních struktur se známými morfometrickými parametry. Software TeIGen je vhodným nástrojem pro kalibraci a testování nastavení kvantifikace obrazových dat získaných a hodnocených pomocí mikro-CT zařízení. Zároveň může sloužit k testování nastavení stereologických mřížek užívaných při kvantitativních analýzách trojrozměrných struktur.

Závěr 3: Objemový podíl vaziva v játrech zdravých zvířat byl větší u samců než u samic a byl větší na periférii jater než kolem žil v parakavální a paraportální oblasti. Primární zdrojová data popisující objemový podíl vaziva v jednotlivých lalocích a v oblastech jater souvisejících s cévním zásobením jsou ve formě kontinuálních proměnných volně přístupná pro výzkumníky zabývající se studiem jaterní fibrózy na velkém zvířecím modelu. Data mohou být využita

k výpočtu minimálního počtu vzorků nutného k prokázání nárůstu nebo poklesu množství vaziva v experimentech na játrech prasete.

Závěr 4: Délková hustota jaterních sinusoid a žlučových kapilár v játrech zdravých zvířat byla nižší u samců než u samic a byla nižší na periférii jater než kolem žil v parakavální a paraportální oblasti. Zároveň byla vyšší délková hustota jaterních sinusoid a žlučových kapilár spojena s lokálním nárůstem počtu menších hepatocytů a s menším výskytem vaziva. Nalezená intrahepatická a intersexuální variabilita v morfologii jater prasete by měla být zohledněna při plánování a vyhodnocování experimentů využívajících histologické hodnocení vzorků. Primární data popisující délkovou hustotu jaterních sinusoid a žlučových kapilár v šesti lalocích a ve třech oblastech vztažených k cévnímu zásobení jsou volně k dispozici ve formě kontinuálních proměnných. Data mohou být využita pro výpočet minimálního počtu vzorků nutného k odhalení změn v játrech prasete.

Závěr 5: Na základě biochemické, ultrasonografické a histologické analýzy se nám podařilo pomocí aplikace pyrrolizidinového alkaloidu monokrotalinu vytvořit velký zvířecí model sinusoidálního obstrukčního syndromu. Podání jedné intravenózní dávky mezenchymálních kmenových buněk zlepšilo celkové přežití zvířat se sinusoidálním obstrukčním syndromem po parciální jaterní resekcii.

Závěr 6: Experiment simulující poranění jater prasete při nárazu poskytl komplexní pohled na mechanismus vzniku jaterního poranění na makroskopické i mikroskopické úrovni. Primární biomechanická data byla zveřejněna spolu s publikací a mohou sloužit k validaci výpočetních modelů mechanické odpovědi jater v okamžiku nárazu. Mikroskopická analýza prokázala, že se trhliny v játrech nešíří náhodně, ale jejich propagace je závislá na orientaci hlavních vláknitých složek stromatu jater a interlobulárních sept. Toto zjištění je významné zejména pro přenos dat z experimentů na játrech prasete se signifikantně větším množstvím vaziva na játra lidská.

Závěry vyplývající z rešerše literatury a z dat předložených výsledkových studií lze shrnout následovně. Postupy využívající automatické softwary pro obrazovou analýzu dat by měly být vždy kalibrovány, neboť výsledky jejich měření jsou ovlivněny kvalitou vstupních dat a nastavením segmentačních algoritmů. Pro kalibraci postupů a validaci dat lze s výhodou využít robustní a reprodukovatelné metody, jako je např. stereologie. Rozsáhlé zmapování mikroskopických parametrů, jako je množství vaziva a délková hustota jaterních sinusoid a žlučových kapilár, v odlišných oblastech jater prasete umožňuje nyní na základě uveřejněných dat a popisných statistik plánování experimentů s eticky opodstatněným počtem jedinců a

tkáňových vzorků. Na základě našich experimentálních studií bylo demonstrováno, že játra prasete jsou vhodným orgánem pro modelování různorodých fyziologických i patologických stavů vyskytujících se u lidí. V předložené práci jsme popsali experimenty na játrech prasete zahrnující regeneraci, rozvoj jaterního onemocnění, ale i mechanické chování jater prasete během simulace nárazu a tupého poranění orgánů. Všechny studie byly zveřejněny společně s primárními naměřenými daty.