



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

**ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY  
A BIOMECHANIKY**

INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND BIOMECHANICS

**ANALÝZY STRUKTURY KOLAGENNÍCH VLÁKEN VE  
STĚNĚ TEPNY POMOCÍ MODERNÍCH METOD  
SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE**

ANALYSES OF STRUCTURE OF COLLAGEN FIBRES IN ARTERIAL WALL USING MODERN METHODS  
OF LIGHT MICROSCOPY

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

DOCTORAL THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Ing. Michaela Turčanová**

**ŠKOLITEL**

SUPERVISOR

**prof. Ing. Jiří Burša, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Abstrakt

Disertační práce se zabývá analýzou uspořádání kolagenních vláken v tepnách a jejich správným vyhodnocením a použitím ve strukturně motivovaných konstitutivních modelech materiálu. První část práce je zaměřena na rešerši mechanických vlastností tepen a na přehled dostupných metod pro detekci vlnitosti, orientace a rozptylu vláken. Většina prací identifikuje úhly vláken jako další parametr z mechanických zkoušek a tím degraduje strukturní podstatu modelu. Druhá část práce popisuje automatický algoritmus, který dokáže vyhodnotit lokální směry vláken a jejich rozptyl ze snímků z polarizačního mikroskopu a strukturní hyperelastické konstitutivní modely. Dále je zde kladen důraz na vybrání nejvhodnější zobrazovací metody založené na fluorescenční mikroskopii, která nám pomůže rozlišit vlnitost a rozptyl vláken. V další části práce jsou prezentovány dva experimenty na prasečích tepnách za účelem zjištění vlivu různé velikosti biaxiální deformace na orientaci a rozptyl vláken. Poslední část práce uvádí vyhodnocené strukturní parametry pro prasečí a lidské aorty, které byly analyzovány nejen pod polarizovaným světlem, ale i pod laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem, díky kterému byla získána vlnitost vláken a jejich globální směr.

## Abstract

The doctoral thesis deals with the analysis of the arrangement of collagen fibres in arteries and their correct evaluation and use in structurally motivated constitutive models of the material. The first part of the work is focused on the literature search of mechanical properties of arteries and on an overview of available methods for the detection of waviness, orientation and dispersion of fibres. Most works identify fibre angles as additional parameter from mechanical tests and thus degrade the structural nature of the model. The second part describes an automatic algorithm that can evaluate the local directions of fibres and their scattering from images from a polarizing microscope and structure-based hyperelastic constitutive models. Furthermore, there is an emphasis on choosing the most appropriate imaging method based on fluorescence microscopy, which will help us to distinguish the waviness and scattering of fibres. In the next part of the thesis, two experiments on porcine arteries are presented in order to determine the influence of different magnitudes of biaxial deformation on fiber orientation and dispersion. The last part of the work presents the evaluated structural parameters for porcine and human aortas, which were analyzed not only under polarized light, but also under a laser scanning confocal microscope, thanks to which the waviness of the fibers and their global direction were obtained.

## Klíčová slova

Struktura měkkých tkání, orientace a rozptyl kolagenních vláken, vlnitost, světelná polarizační mikroskopie, konfokální mikroskopie, mechanické vlastnosti

## Keywords

Soft tissue structure, collagen fibre direction and dispersion, waviness, polarized light microscopy, confocal microscopy, mechanical properties

TURČANOVÁ, Michaela. *Analýzy struktury kolagenních vláken ve stěně tepny pomocí moderních metod světelné mikroskopie*. Brno, 2023. 94 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Jiří BURŠA.

Prohlašuji, že jsem disertační práci *Analýzy struktury kolagenních vláken ve stěně tepny pomocí moderních metod světelné mikroskopie* vypracovala samostatně pod vedením prof. Ing. Jiřího Burši, Ph.D., s použitím materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....  
Místo a datum

.....  
Ing. Michaela Turčanová

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali a podporovali mne v průběhu doktorského studia. Nejprve bych ráda poděkovala svému vedoucímu prof. Ing. Jiřímu Buršovi, Ph.D., za odborné vedení, čas, ochotu, motivaci a podporu, kterou mi dal při studiu a psaní disertační práce. Dále bych ráda poděkovala svým kolegům a kamarádům z Ústavu mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky za pomoc a přínosné diskuze, ale hlavně za přátelství, skvělou atmosféru a zábavu v laboratoři, kanceláři, na společných grilovačkách, chatách i ve sklepech. Velké poděkování patří i mým holkám z marketingu, Katce a Ivetce, které mne vždy ve studiu podporovaly, vycházely mi vstříc a daly mi příležitost pracovat na skvělých projektech a akcích. Dále jsem velmi vděčná za ochotu, pomoc a skvělou spolupráci s lékaři a laborantkami z Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a z Anatomického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, bez kterých by výzkum nebyl možný. Speciální poděkování patří i na Fakultu elektrotechniky a komunikačních technologií VUT v Brně, Inně Zumberg, za všechen čas a ochotu při snímkování na konfokálním mikroskopu a jejímu vedoucímu, Vratislavovi Čmielovi, za spolupráci a poskytnutí přístroje pro výzkum na lidských aortách, bez kterého by nemohly vzniknout poslední kapitoly této práce. Nakonec to největší poděkování patří mé rodině a mému manželovi Igorovi za neutuchající lásku, podporu, trpělivost a to největší štěstí, které mi do života přináší.

Ing. Michaela Turčanová

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
1.1. Cíle práce . . . . .	2
<b>2. Lékařské minimum</b>	<b>3</b>
2.1. Anatomie zdravé stěny tepny . . . . .	3
2.1.1. Mechanické vlastnosti zdravých tepen . . . . .	5
<b>3. Metody pro detekci vlnitosti, orientace a směrového rozptylu kolagen- ních vláken</b>	<b>8</b>
3.1. Světelná polarizační mikroskopie . . . . .	8
3.2. Laserová skenovací konfokální mikroskopie . . . . .	9
3.3. Shrnutí současného stavu poznání . . . . .	11
3.3.1. Polarizační světelná mikroskopie - manuální metody . . . . .	11
3.3.2. Polarizační světelná mikroskopie - poloautomatické a automatické metody . . . . .	13
3.3.3. Second harmonic generation . . . . .	15
3.3.4. Transmisní mikroskopie . . . . .	17
3.3.5. Small Angle Light Scattering . . . . .	17
3.3.6. Fluorescenční mikroskopie . . . . .	17
3.3.7. Zhodnocení . . . . .	25
<b>4. Automatický algoritmus pro detekci orientace kolagenních vláken</b>	<b>28</b>
4.1. Verifikace algoritmu . . . . .	31
4.2. Validace algoritmu . . . . .	33
4.3. Počet mikrosnímků potřebných k detekci orientace kolagenních vláken . . .	33
<b>5. Hyperelastické konstitutivní modely materiálu</b>	<b>37</b>
5.1. Izotropní . . . . .	37
5.2. Anizotropní . . . . .	37
5.3. Použití parametrů z histogramů do konstitutivních modelů . . . . .	41
<b>6. Experimenty pro zjištění vlivu různé velikosti biaxiální deformace na orientaci a rozptyl vláken</b>	<b>44</b>
6.1. Příprava histologických řezů . . . . .	44
6.2. Hodnocení směrů při radiálním stlačení . . . . .	45
6.3. Hodnocení směrů při dvouosém tahu . . . . .	49
6.4. Matematický model jednoosého zatížení . . . . .	56
<b>7. Vyhodnocené strukturní parametry pro prasečí aortu</b>	<b>58</b>
7.1. Metodika . . . . .	58

7.2. Statistická analýza . . . . .	61
7.3. Výsledky . . . . .	62
7.4. Diskuze . . . . .	63
7.5. Limitace metody . . . . .	64
7.6. Závěr . . . . .	64
<b>8. Vyhodnocené strukturní parametry pro lidskou aortu</b>	<b>66</b>
8.1. PLM . . . . .	66
8.2. CLSM . . . . .	69
8.2.1. Metodika . . . . .	69
8.2.2. Výsledky . . . . .	69
8.2.3. Limitace metodiky . . . . .	73
8.3. Diskuze . . . . .	73
<b>9. Vlnitost</b>	<b>75</b>
9.1. Globální směry . . . . .	78
9.2. Diskuze . . . . .	80
<b>Závěr</b>	<b>81</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>83</b>
<b>Literatura</b>	<b>85</b>

# 1. Úvod

Kolagen je nejčastěji zastoupený protein v lidském těle. Vyskytuje se např. v cévách, chrupavkách, šlachách, rohovkách, srdeční svalovině (myokardu) nebo srdečních chlopních. Kolagenní vlákna jsou tvořena z kolagenních fibril (svazek tropokolagenových molekul). V cévách hraje jejich prostorová orientace velmi důležitou roli a je zodpovědná za anizotropní mechanické chování. Kolagenní vlákna chrání stěnu cévy při vysokých tlacích nebo při velkých deformacích a za těchto podmínek jsou hlavními nositeli zatížení. Bez zatížení jsou vlákna zvlněná a je obtížné rozlišit mezi jejich vlnitostí a rozptylem. [1, 2]

Výpočtové modelování zdravých i patologických stavů tepen může pomoci při vyhodnocování rizika ruptury aortálního aneurysmatu nebo správného načasování operativního zákroku. Obsahuje konkrétní model geometrie tepny, model zatížení, okrajové podmínky a model materiálu. Většina studií používá výsledky z mechanických zkoušek jako vstupy do konstitutivních modelů materiálu. V nedávno publikované práci [1] je ukázána důležitost stanovení strukturních parametrů kolagenních vláken v tepnách (počet rodin vláken, jejich hlavní směry, rozptyl kolem těchto směrů a vlnitost) a jejich nalezení na základě analýzy mikrohistologických snímků.

Pro zjištění těchto parametrů se používají snímky ze světelné nebo fluorescenční mikroskopie a jejich manuální nebo automatické vyhodnocení. Levnou a přesnou alternativu představuje polarizační mikroskopie, jelikož kolagenní vlákna mají schopnost dvojlomu, dokážou stočit rovinu polarizace a jsou tak viditelná pod polarizovaným světlem při kolmých polarizátorech. Omezení ale nastává při analýze vlnitosti vláken, kdy jsou informace získávány z tenkých řezů tkáně pod diaskopickým osvětlením (procházejícím světlem). Pro zjištění trojrozměrné orientace kolagenu, a tedy i jeho vlnitosti, je výhodnější použití fluorescenční mikroskopie, která umožňuje pozorování tlustších vzorků pod episkopickým osvětlením (odraženém světle).

V první části práce je popis stěny tepny a rešerše metod pro detekci orientace vláken, jejich rozptylu a vlnitosti. Druhá část práce popisuje nově vytvořený automatický algoritmus pro detekci orientace a rozptylu z mikrosnímků cév pod polarizovaným světlem a shrnutí hyperelastických konstitutivních modelů. Algoritmus byl verifikován, validován a použit pro vyhodnocení několika experimentů pro zjištění vlivu různé velikosti biaxiální deformace na orientaci a rozptyl vláken. Ty jsou popsány ve třetí části práce spolu s již vyhodnocenými strukturními parametry pro prasečí a lidskou aortu. Lidské aorty byly vyhodnocovány nejen s použitím polarizované mikroskopie, ale i pod laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem pro vyhodnocení vlnitosti kolagenních vláken a jejich globálních směrů, jelikož většina metod včetně polarizované mikroskopie nám je schopna dát pouze informace o lokálních směrech vláken buď přímo v pixelech nebo malých oblastech (např.  $10 \times 10$  px). Tyto nové poznatky o strukturních parametrech cévní stěny budou moci být použity jako vstupy do konstitutivních modelů, které pomohou zlepšit biomechanické simulace.

## 1.1. Cíle práce

1. Vyvinout automatizovaný algoritmus pro detekci směrů kolagenních vláken pomocí polarizované mikroskopie a posoudit jeho využitelnost pro určení strukturních parametrů vláken.
2. Srovnat další dostupné metody pro určování směrů kolagenních vláken a vybrat z nich nejvhodnější pro další řešení.
3. Zvládnout odlišení vlnitosti a směrového rozptylu kolagenních vláken na vybrané tkáni.
4. Pomocí výše uvedených metod určit strukturní konstitutivní parametry pro vybrané tkáně.



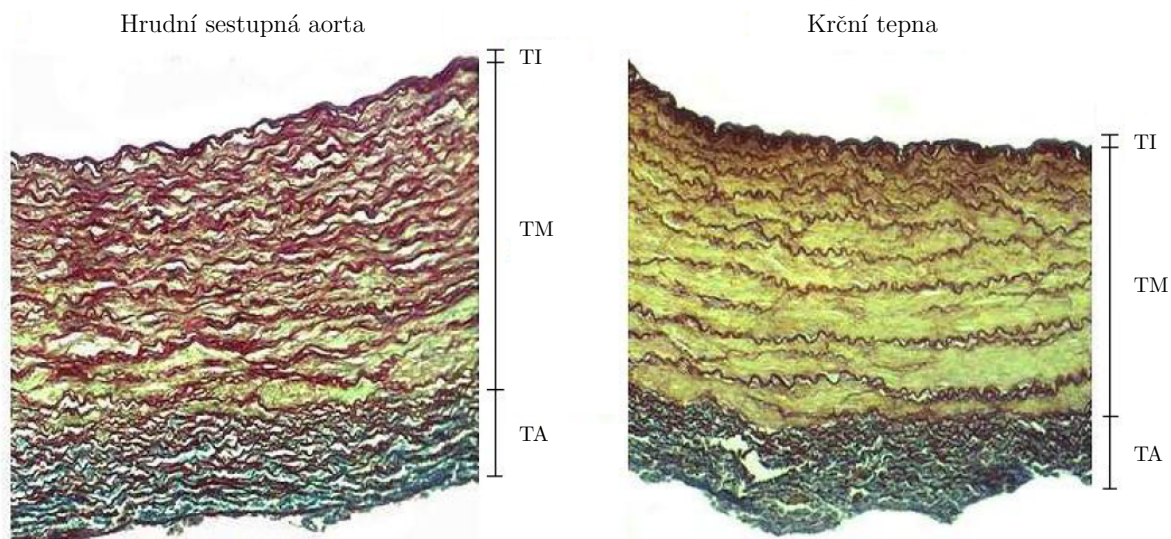
## 2. Lékařské minimum

Vzhledem k zaměření této disertační práce, je nutné uvést několik pojmů z anatomie tepen a detailní informace o jejich mikrostruktuře.

### 2.1. Anatomie zdravé stěny tepny

Tepny jsou cévy vedoucí okysličenou krev od srdce do jednotlivých orgánů mající zpravidla trojvrstevnou strukturu. [3] Jednotlivé vrstvy stěny tepny (tunica intima - TI, media - TM a adventitia - TA) budou popsány v následujících podkapitolách. Podle převahy určitých buněk v TM rozeznáváme dva typy tepen:

- **tepny elastického typu** - jsou tepny s velkým průměrem (>10 mm) blízko u srdce (aorta a její hlavní větve - viz obrázek 2.1) s větším množstvím elastinu v TM,
- **tepny svalového typu** - je většina tepen střední a malé velikosti (2-10 mm v průměru) na periferiích s větším množstvím svalových buněk, např. krční tepna (viz obrázek 2.1). [4]



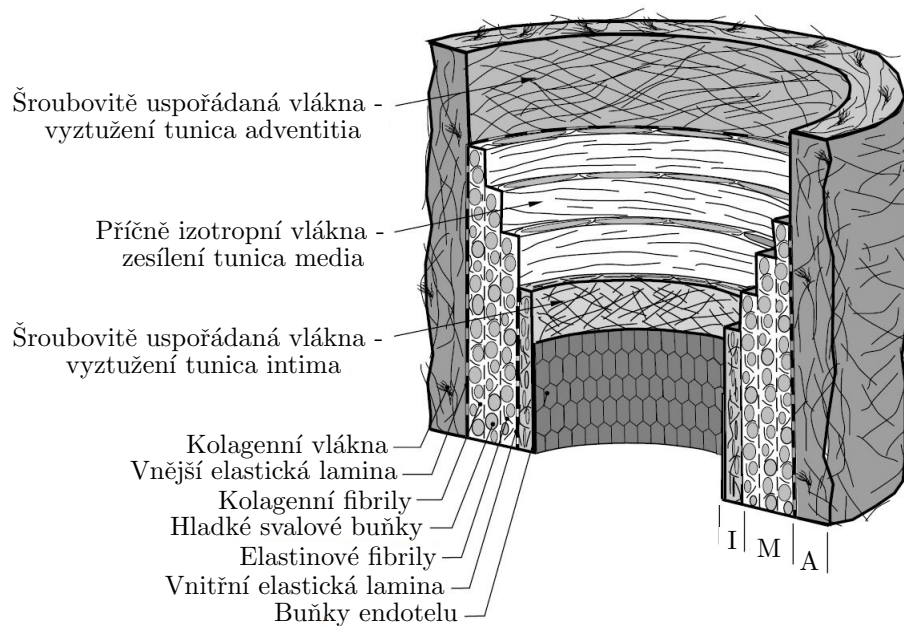
**Obrázek 2.1:** Mikrosnímky ovčích tepen obarvených orceinem pomocí metody Cajal-Gallengo, která umožňuje rozlišení tří hlavních složek stěny, které určují biomechanické chování tepen: buňky hladkého svalstva (žlutá), elastin (tmavě červená) a kolagen (modrá). V krční tepně je znatelný vyšší podíl buněk hladkého svalstva, zatímco aorta má více elastinových vláken než karotida. Převzato a upraveno z [5].

## Tunica intima

Tunica intima je vnitřní vrstva cév. Céva je z vnitřní strany vystlána mnohostrannými buňkami endotelu, které zajišťují kontrolovaný transport látek přes cévní stěnu a hladký povrch pro proudění krve. Poté následuje tenká bazální membrána a subendoteliální vrstva, která je tvořena z buněk hladkého svalstva a svazků kolagenních vláken, viz obrázek 2.2. [6]

Bylo zjištěno, že uspořádání jednotlivých vrstev kolagenu v subendoteliální vrstvě není rovnoměrné po její tloušťce. Např. Canham a kol. [7] určil pět rozdílně orientovaných vrstev svazků kolagenních vláken v koronárních tepnách a Finlay a kol. [8] tři v mozkových tepnách.

Obecně udávaná tloušťka zdravé TI se udává jako 20 % z celkové tloušťky cévy. Průměrná tloušťka TI v břišní aortě podle Holzapfel a kol. [9] je  $0,29 \pm 0,21$  mm.



**Obrázek 2.2:** Idealizovaná zdravá elastická tepna. Na obrázku vpravo jsou vyznačené jednotlivé vrstvy: tunica intima (TI), tunica media (TM) a tunica adventitia (TA). Vnitřní vrstva TI je tvořena z jedné vrstvy endotelových buněk, tenké bazální membrány a subendoteliální vrstvy. Vrstva TM je tvořena buňkami hladkého svalstva, sítí elastických a kolagenních fibril a elastických lamel. Vnější vrstva TA je složená z tlustých šroubovitě uspořádaných svazků kolagenních vláken. Převzato a upraveno z [6].

## Tunica media

Media je prostřední a zpravidla nejtlustší vrstva stěny tepen. Sestává z hladkých svalových buněk, elastinových a kolagenních fibril, které dohromady tvoří komplexní mediální lamelární jednotky (*medial lamellar unit* - MLU) uspořádané do vláknitých šroubovic. Tyto šroubovice jsou téměř obvodově orientovány [7, 8], media tak dobře odolává obvodovému zatížení od krevního tlaku a je považována za hlavní nosnou vrstvu. [6]

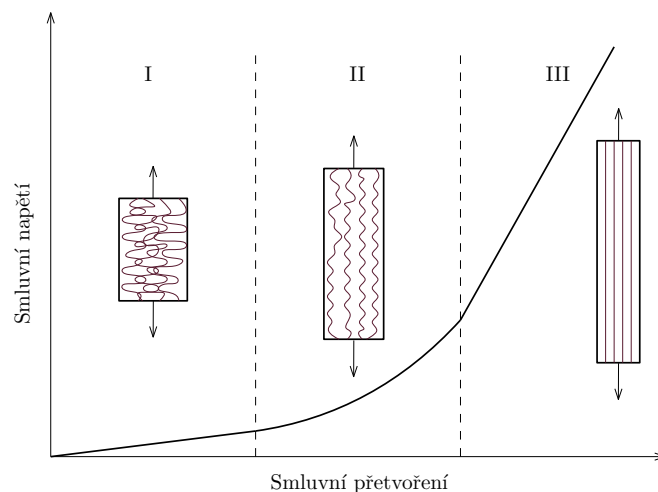
TM je obvykle oddělená od TI a tunica adventitia (TA) vnitřní a vnější elastickou laminou (*internal/external elastic lamina*). [6]

Tloušťka TM byla určena pro břišní aortu  $0,59 \pm 0,10$  mm [9], přes  $0,81 \pm 0,24$  mm pro sestupnou aortu až po  $1,46 \pm 0,27$  mm pro vzestupnou aortu [10]. Obě dvě studie udávají, že její tloušťka je přibližně 50 % z její celkové tloušťky stěny.

## Tunica adventitia

Adventitia je vnější vrstva cév a je tvořena z fibroblastů, fibrocytů a tlustých svazků kolagenu. Tyto svazky jsou uspořádány ve dvou šroubovicích, uvnitř kterých je velký rozptyl v orientacích jednotlivých vláken. [7, 8] Kolagenní vlákna jsou zvlněná a s rostoucím zatížením se narovnávají, zpevňují celou stěnu cévy a zabraňují tak nadměrné deformaci nebo vzniku ruptury (viz obrázek 2.3). Stěna cév je v důsledku strukturního uspořádání anizotropní a vykazuje hyperelastické chování s velkým deformačním zpevněním kvůli postupnému napřimování kolagenních vláken. [6] Mechanické vlastnosti TA jsou dány především organizací kolagenních vláken, tedy vlnitostí a úhlovým rozptylem. [11]

Její tloušťka závisí na jejím místě a fyziologické funkci. Podle [9] je tloušťka TA u břišní aorty  $0,41 \pm 0,12$  mm.



**Obrázek 2.3:** Schematické zobrazení zatěžovací křivky u měkkých tkání. V první fázi jsou kolagenní vlákna v TA zvlněná a za protahování jsou zodpovědná pouze elastinová vlákna. S přibývajícím zatížením se vlákna narovnávají a céva se zpevňuje, než se vlákna začnou porušovat (po překročení meze pevnosti v tahu). Převzato a upraveno z [12].

Znalost orientace kolagenních vláken hraje významnou roli v pochopení mechanického chování tepen. V další kapitole bude jejich detailní popis se zaměřením i na další významné stavební jednotky cév, elastinu a buněk hladkého svalstva.

### 2.1.1. Mechanické vlastnosti zdravých tepen

#### Elastinová vlákna

Elastin dává cévám schopnost vratných deformací a zajišťuje tuhost (poddajnost) při fyziologickém zatížení [13]. V nezatíženém stavu jsou vlákna zvlněná, s rostoucím se zatížením se narovnávají [14].

Elastin je dále zodpovědný za podélné předpětí tepen, které také ubývá s věkem. Axiální, neboli podélné předpětí chrání tepny před ztrátou tvarové stability při ohybu [15].

Vlákná degradují s rostoucím věkem, nemocemi a nezdravým životním stylem, často bývají nahrazovány kolagenem nebo kalcifikacemi a tím se zvyšuje tuhost cévní stěny [16].

### Buňky hladkého svalstva

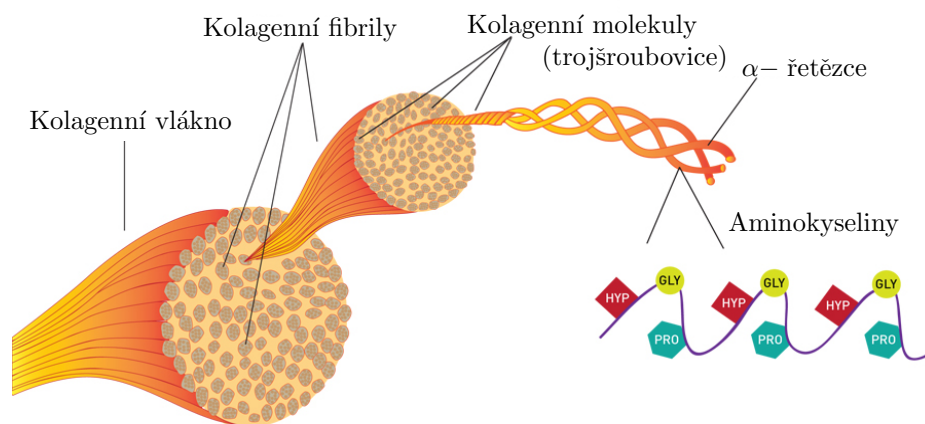
Hladko-svalové buňky jsou protáhlé a jejich délka závisí na výskytu v lidském těle. Jsou složeny z jádra a cytoplazmy. Hlavní funkce je regulace průtoku jejich kontrakcí, která je ale u velkých tepen minimální [17, 18].

### Kolagenní vlákna

Kolagen<sup>1</sup> je nejvíce zastoupený protein v našem těle ( $\sim 25 - 30\%$  ze všech proteinů). Jeho stavba je schematicky znázorněná na obrázku 2.4. V cévách jsou nejvíce zastoupeny kolageny typů I, III, IV, V a VI, přičemž kolagen typu I a III tvoří až  $90\%$  z celkového zastoupení kolagenu v cévách.

Jeho primární schopností je zajišťovat cévám dostatečnou pevnost a zabraňovat selhání při vysokých tlacích (např. při bungee jumpingu, porodu, kýčání) [20]. Jak už bylo řečeno v předešlé kapitole, vlákna jsou zvlněná a s rostoucím zatížením se narovnávají, ale oproti elastinovým vláknům, je jich méně než  $10\%$  narovnáno při fyziologických tlacích [21]. Kolagenní vlákna jsou  $100 - 1000\times$  tužší než elastinová vlákna [15].

Mechanické změny v uspořádání kolagenu mohou být příčinou vzniku a růstu mozkových aneurysmat. Zvyšuje se tím riziko ruptury a celková úmrtnost, která se nyní pohybuje v rozmezí  $35 - 50\%$  [22].

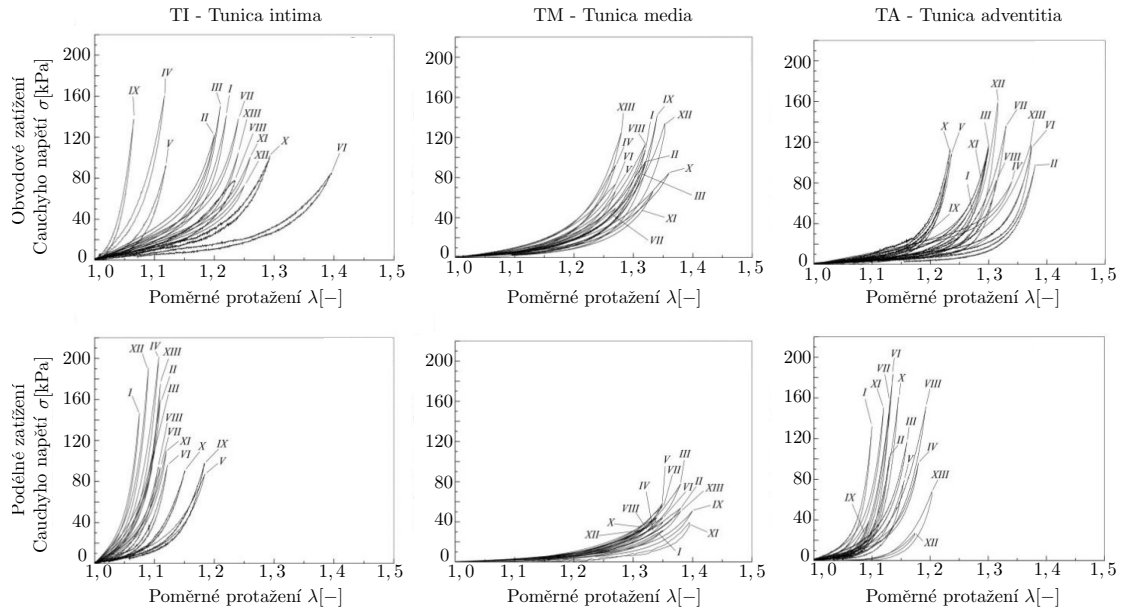


**Obrázek 2.4:** Schematické znázornění stavby kolagenních vláken. Molekuly kolagenu, ze kterých jsou vytvořené fibrily a dále potom jednotlivá vlákna, jsou složeny z řetězců aminokyselin, které tvoří trojitou spirálu, neboli tropokolagen. Průměr fibrily u kolagenu typu I je cca  $3,5-4\text{ nm}$  [23]. Převzato a upraveno z [24].

Holzapfel a kol. [25] v roce 2005 publikovali práci, jejíž hlavním cílem bylo stanovit specifické mechanické vlastnosti jednotlivých vrstev zdravé stěny koronárních tepen, viz obrázek 2.5. Koronární tepny přivádí krev do srdečního svalu a vyživují ho. Vzorky byly nejprve předcyklovány pěti zatěžovacími cykly při konstantní rychlosti  $1\text{ mm/min}$  a poté podrobeny cyklickému kvazistatickému jednoosému zatěžování v obvodovém a podélném směru vzorku při stejné rychlosti  $1\text{ mm/min}$ . Pořízené deformačně-napěťové křivky dobře

<sup>1</sup>V lidském těle je známo 28 různých typů kolagenu [19].

## 2.1. ANATOMIE ZDRAVÉ STĚNY TEPNY



**Obrázek 2.5:** Deformačně-napětové křivky jednotlivých vrstev při obvodovém a podélném zatížení vzorků. Převzato a upraveno z [25].

ukazují heterogenitu mezi mechanickým chováním jednotlivých vrstev. Článek [25] hodnotí TI jako nejtuzší vrstvu v celé deformační oblasti a TM jako nejměkčí při axiálním zatěžování. Všechny vzorky vykazovaly malou hysterezi, anizotropní a nelineární chování v obou směrech zatěžování.

Příspěvkem této práce bude analýza struktury kolagenních vláken ve stěně tepny pomocí světelné mikroskopie. Z prostudovaných studií je evidentní, že každá vrstva cévy má trochu jiné vlastnosti (je nehomogenní) a jsou anizotropní, tzn. žádoucí použití strukturálního konstitutivního modelu materiálu.

## 3. Metody pro detekci vlnitosti, orientace a směrového rozptylu kolagenních vláken

Metod pro zjištění strukturních parametrů do konstitutivních modelů materiálu je velké množství a liší se podle použitého vybavení a příp. softwaru. Nejčastěji používanou metodou je světelná polarizační mikroskopie (*Polarized Light Microscopy* - PLM), která je relativně levná oproti ostatním metodám, spolehlivá a došlo u ní k významnému pokroku od manuálního měření orientací kolagenních vláken až po automatizované algoritmy. V posledních desetiletích výrazně nastoupila fluorescenční mikroskopie, která ale vyžaduje dražší vybavení a mnohdy i složitější a nákladnější přípravu vzorků. Mezi dalšími hojně používanými metodami je *Small Angle Light Scattering* - SALS, *Small Angle X-ray Scattering* - SAXS, *Second Harmonic Generation* - SHG, transmisní mikroskopie a jiné.

V následujících dvou podkapitolách 3.1 a 3.2 bude přiblížen princip jednak polarizačního mikroskopu, který je k dispozici na Ústavu mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky, a laserového skenovacího konfokálního mikroskopu, který patří mezi fluorescenční mikroskopy, a který je k dispozici na Fakultě elektrotechniky a komunikačních technologií.

Detailní shrnutí aktuálního stavu poznání v oblasti detekce orientace, rozptylu a vlnitosti kolagenních vláken v tepnách je rozebráno v podkapitole 3.3.

### 3.1. Světelná polarizační mikroskopie

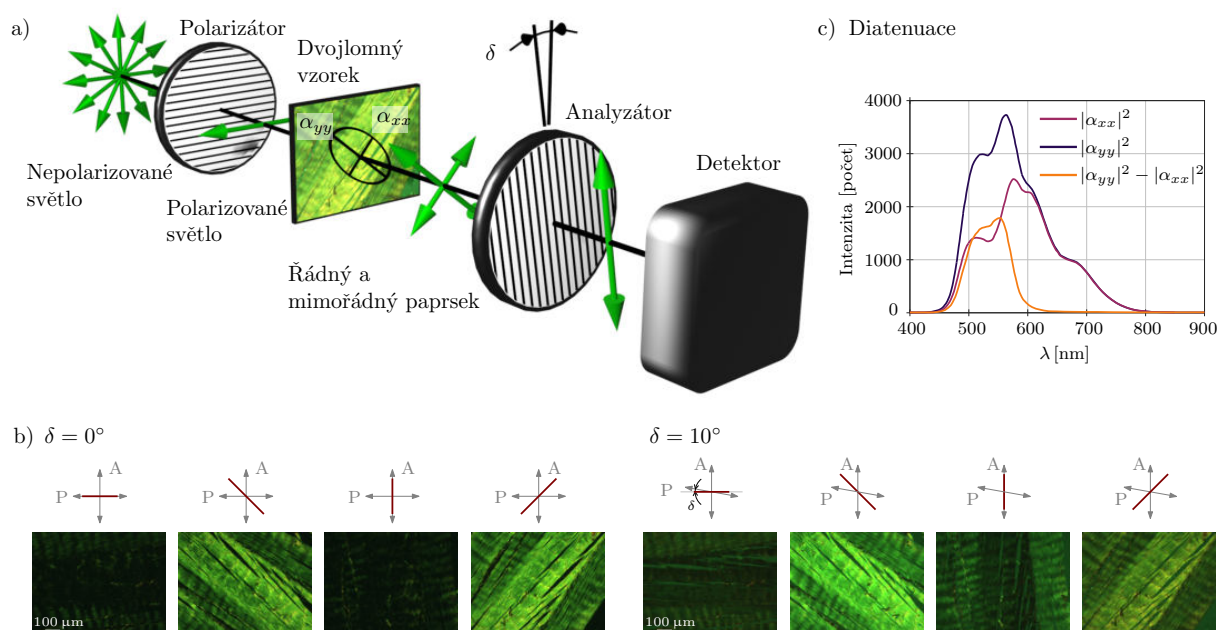
PLM využívá lineárně polarizované světlo. Nepolarizovaný světelný paprsek vycházející z lampy kmitá z principu elektromagnetického vlnění vždy kolmo na směr šíření, ale ve všech směrech, tedy neuspořádaně. První filtr ve světelné cestě, polarizátor, propouští jen tu část světla, jejíž vektor elektrické intenzity kmitá pouze v jednom směru (směru polarizátoru) a zbytek světla je pohlcen. Světlo následně vstupuje do vzorku. V případě kolagenních vláken se jedná o anizotropní strukturu. Po obarvení barvivem Picro Sirius Red (v dalším bude použita zkratka PSR) se až sedmkrát zvýrazní vlastnost vnitřní stavby vláken - dvojlomnost [26]. Dvojlomnost způsobí, že se polarizované světlo rozdělí na dva paprsky – řádný a mimořádný. Ty jsou vůči sobě fázově posunuty. Ve světelné cestě potom stojí druhý filtr, analyzátor (viz obrázek 3.1). [27]

Podle vzájemného natočení obou filtrů pozorujeme různé obrazy vloženého vzorku tkáně. Při vzájemném natočení polarizátoru a analyzátoru o  $90^\circ$  u světelného polarizačního mikroskopu neprojde soustavou žádné světlo. Za pomoci interference řádného a mimořádného paprsku, která vede k natočení původní roviny kmitání polarizovaného světla, můžeme pozorovat světlou strukturu tkáně na původním tmavém pozadí. Pomocí videokamery a softwaru na analýzu obrazu můžeme dobře pozorovat tuto optickou anizotropii

### 3.2. LASEROVÁ SKENOVACÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

na tenkých vzorcích měkkých tkání (optimální tloušťka řezu je 5 – 7  $\mu\text{m}$ ), viz obrázek 3.1. Dvojlomnost vykazují i některé průhledné krystaly, např. křemen, kalcit, turmalín aj. Pokud se přes ně podíváme na určitý objekt, uvidíme ho dvakrát, tzn. že jsou opticky anizotropní a mají index lomu různý v různých směrech. [27]

Další účinek způsobený optickou anizotropií vláken je diatenuace, která se nyní nejčastěji pozoruje na mozkové tkáni. Diatenuace je celkový anizotropní útlum světla, který je způsoben absorpcí i rozptylem. Intenzita vysílaného světla zde závisí na polarizačním stavu dopadajícího světla, tj. intenzita vysílaného světla je maximální pro světlo polarizované v určitém směru a minimální pro světlo polarizované v odpovídajícím ortogonálním směru, viz obrázek 3.1. [28]



**Obrázek 3.1:** a) Experimentální schéma mikroskopu s polarizovaným světlem s jednosměrnými vlákny (prasečí Achillova šlacha). b) Mikrosnímky vzorku prasečí Achillovy šlachy s polarizátory buď kolnými (čtyři obrázky vlevo), nebo vychýlenými o úhel  $\delta$  (čtyři obrázky vpravo). c) Spektrální závislost složek přenosové matice  $\alpha_{xx}$ ,  $\alpha_{yy}$  a jejich rozdíl. Anizotropie kolagenových vláken je nejvýraznější na vlnových délkách mezi 550 a 570  $\mu\text{m}$ , jak ukazuje rozdíl mezi  $|\alpha_{xx}|^2$  a  $|\alpha_{yy}|^2$ , které představují intenzity světla řádných a mimořádných paprsků přenášených vzorkem s paralelním nastavením polarizátorů.

Ve studii Dayana a kol. [29] popsali, že se tlustší kolagenní vlákna (1,6 – 2,4  $\mu\text{m}$ ) obarvená barvivem PSR a pozorovaná pod PLM se zkříženými filtry zobrazují v širokém spektru od zelené přes žlutou až po červenou, zatímco tenká vlákna (0,8  $\mu\text{m}$  a méně) dosahují pouze zelené barvy.

## 3.2. Laserová skenovací konfokální mikroskopie

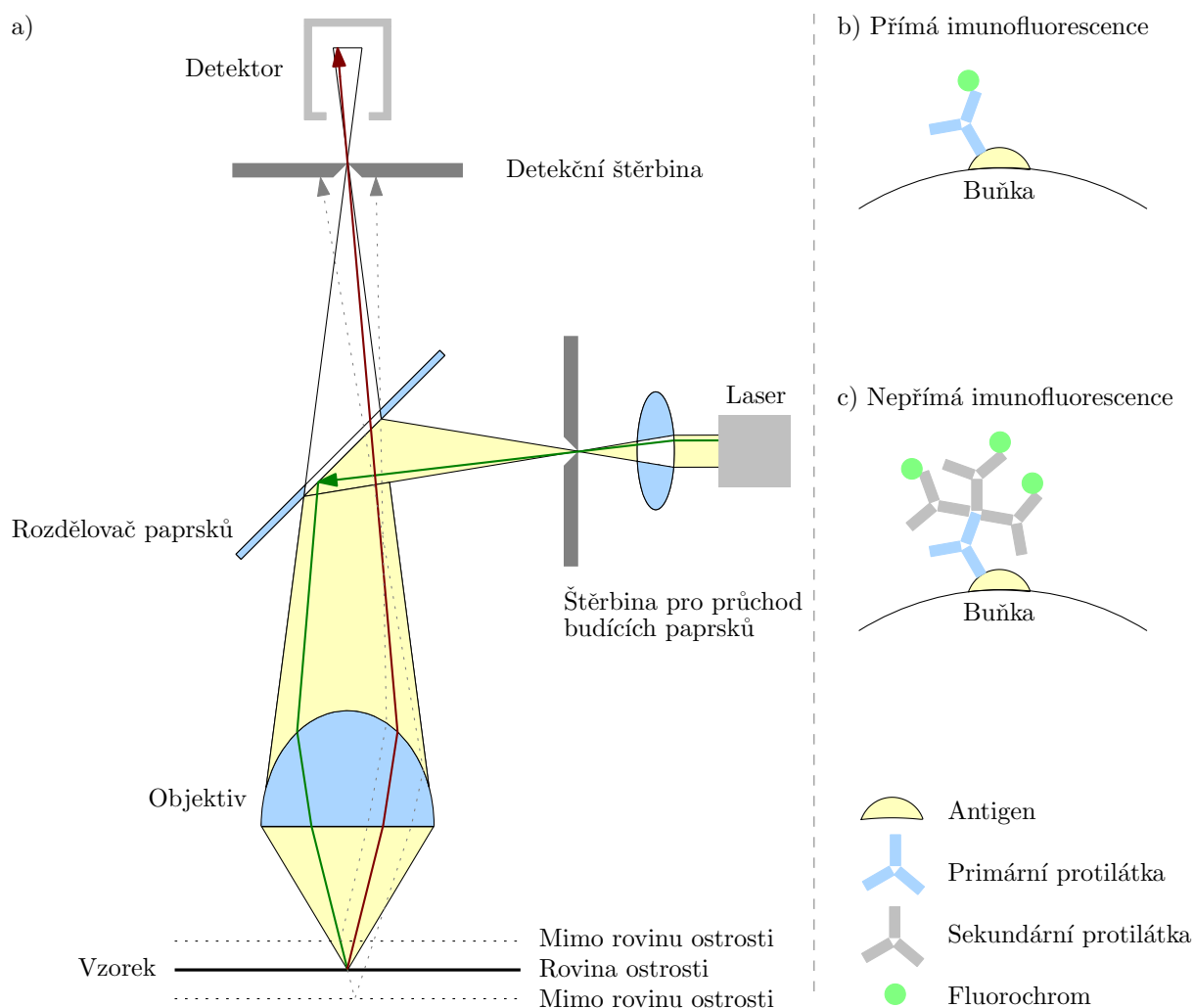
Konfokální mikroskop spadá pod optické světelné mikroskopy, ale např. od polarizačního mikroskopu se odlišuje vysokou rozlišovací schopností<sup>1</sup>, která je daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu, ostatní roviny jsou potlačeny. Složením vícero samostatně

<sup>1</sup>Minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů objektu [27].

### 3.2. LASEROVÁ SKENOVACÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

nasnímaných optických řezů získáme 3D obraz struktury vzorku. Konfokální mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy - CLSM*) je vhodná pro pozorování tlustších biologických vzorků, např. až 50  $\mu\text{m}$ , takže není ztracena informace o radiálním směru a zvlnění vlákna jako u PLM. [27]

Zdrojem světla je laser, který je fokusován na zrcadlovou bodovou clonku. Paprsek poté dopadá na dichroické zrcadlo (interferenční filtr), které rozděljuje dopadající světlo podle vlnové délky. Zrcadlo je umístěné pod úhlem 45° ke zdroji světla. V tomto úhlu odráží krátké excitační vlnové délky (cca 90 %) v úhlu 90° podél optické osy do objektivu a do určitého bodu vzorku. Odražené (emitované) světlo prochází objektivem zpět k dichroickému zrcadlu, které tyto delší emitované vlnové délky propouští do bariérového filtru, konfokální clony a do detektoru fotonásobiče, viz obrázek 3.2. Fotonásobič je schopný zachytit i velmi slabý signál, který je poté v počítači digitalizován a zpracován na výsledný obraz. [27]



**Obrázek 3.2:** a) Schéma optické cesty laserového paprsku konfokálním mikroskopem, překresleno z [30]. b) a c) schéma přímé a nepřímé imunofluorescence, kde je zřetelná výhoda zesílení signálu u nepřímé imunofluorescence, překresleno z [31].

Výhodou laserového mikroskopu je bezkontaktní měření profilu a drsnosti povrchu vzorku. Opakovaným osvětlováním jednoho bodu vzorku může ale dojít k tzv. *photobleaching*, neboli vysvícení (úbytku fluorescence) fluorochromů nejen v místě snímání, ale i v místech průchodu paprsku k místu zaostření. [27]



### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

Materiál, který nemá schopnost vlastní fluorescence, je potřeba nabarvit fluorescenčním barvivem, např. barvivo DAPI se váže na úseky DNA bohaté na nukleové báze adeninu a thyminu. Pro kolagenní vlákna typu I a III je nejvhodnější fluorescenční barvivo CNA35-OG488. CNA35 je adhezni protein, díky kterému jsme schopni na kolagen navázat příslušné barvivo - OG488 (Oregon Green 488 - excitační maximum 496 nm, emisní maximum 510 – 524 nm). [32] Pro přípravu řezů obarvených tímto barvivem je ale potřeba speciální laboratoř s možností práce s geneticky modifikovanými organismy.

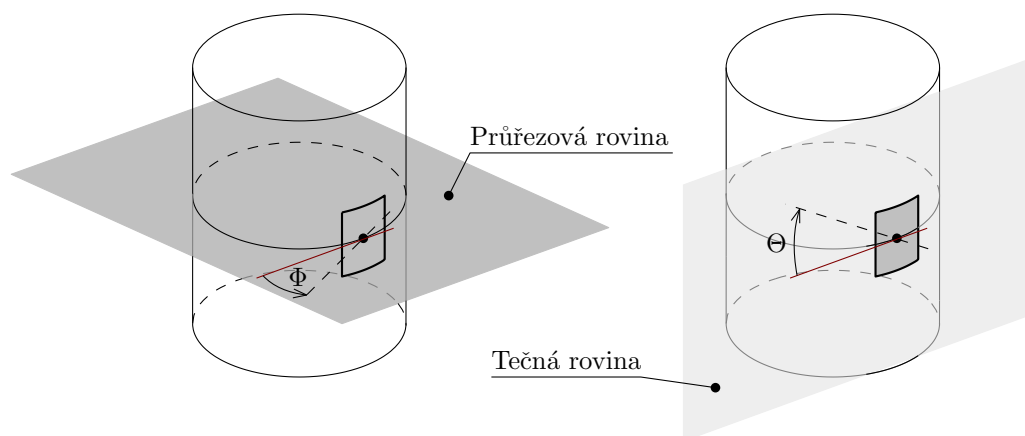
Další možnou cestou je tzv. imunofluorescence, která může být přímá nebo nepřímá (viz obrázek 3.2). Tato metoda využívá speciální protilátky sloužící k označení cílového antigenu fluorescenčním barvivem (neboli fluorochromem). Přímá imunofluorescence používá jednu protilátku, která je přímo konjugovaná s fluorochromem, nepřímá používá protilátky dvě. Primární je nekonjugovaná a pro detekci je použita sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem namířená proti primární protilátce. Pro použití na kolagen je vhodnější nepřímá imunofluorescence, jednak se na primární protilátku může navázat více sekundárních, což zesiluje signál, a dále můžeme použít jednu primární protilátku pro dvě sekundární, kdy jedna je zacílená na kolagen typu I a druhá na kolagen typu III. [31]

Rozdíl oproti konfokální mikroskopii u dvoufotonové a multifotonové spočívá ve snímání světlem, jehož energie je příliš nízká pro excitaci fluorochromu. V místě zaostření dochází k setkání dvou nebo tří nízkoenergetických paprsků. Jejich sečtením získáme energii dostatečnou pro excitaci určitého fluorochromu. [27]

## 3.3. Shrnutí současného stavu poznání

### 3.3.1. Polarizační světelná mikroskopie - manuální metody

Jak již bylo uvedeno, PLM se začala nejprve používat pro vyhodnocování směrů kolagenních vláken jako manuální metoda. Kromě polarizačního mikroskopu je potřeba ještě univerzální otočný stolek, na který se umístí vzorek. Výsledná orientace vlákna se určí na základě azimutálního a elevačního úhlu vyhasnutí pozorovaného vlákna, viz obrázek 3.3. Tedy na výstupu z kamery nebo v okulárech si operátor určí vlákno nebo bod na vlákně, které bude sledovat a točí s rotačním stolem tak dlouho, než mu vlákno vyhasne. Poté musí ze stolku odečíst azimutální a elevační úhel, pod kterým vlákno zhaslo.



**Obrázek 3.3:** Schématické znázornění průřezové a tečné roviny a azimutálního  $\Theta$  a elevačního  $\Phi$  úhlu. Převzato a upraveno z [2].

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

Mezi nevýhody manuálního měření patří velká časová náročnost, dále únava operátora od většího množství měření může vést ke špatnému vyhodnocení orientace a rozptylu a naopak malý počet analyzovaných bodů může vést k nesprávnému rozlišení mezi disperzí a vlnitostí. Dále podstata elevačního úhlu se vytrácí při použití tenkých řezů, které mívají např.  $4\mu\text{m}$  (tloušťka kolagenního vlákna ve šlaše je  $2 - 0,5\mu\text{m}$ , viz [33]). I přes tyto nevýhody se manuální měření stále a často používá.

Studie Smitha a kol. z roku 1981 [34] se zaměřila na orientaci kolagenu v TA u lidských mozkových cév (velice malé průměry  $0,5 - 2,0\text{mm}$ ). Jedenáct vzorků z pěti mozkových cév bylo zafixováno pod tlakem  $100\text{mmHg}$  ( $\approx 13,3\text{kPa}$ ) a obarveno barvivem PSR. Výsledky ukazují na výrazně obvodové rozložení kolagenních vláken v TA s izotropní sítí vláken na povrchu vrstvy. Potvrdili tak jednu z prvních studií zabývajících se směrem kolagenních vláken (Benninghoff - 1930).

Práce Canhama a kol. z roku 1989 a 1991 [7, 35] ukázala na snímcích lidských mozkových cév z polarizovaného mikroskopu obvodovou orientaci v TA a TM.

Finlay a kol. [8] v roce 1995 oproti Smithovi rozšířili poznání směrů kolagenních vláken v mozkových tepnách o vrstvy TI a TM a o vliv zvyšujícího se tlaku na organizaci vláken (měření při  $30, 120$  a  $200\text{mmHg}$ ). Řezy byly vedeny tečně ke stěně, na jednom řezu mohli pozorovat jak TI, tak i TM a TA, jelikož vzorky byly prohnuté. Měření pod stále větším tlakem potvrdilo stále větší přibližování vláken k obvodovému směru v TA. V TM byl kolagen také obvodově uspořádán.

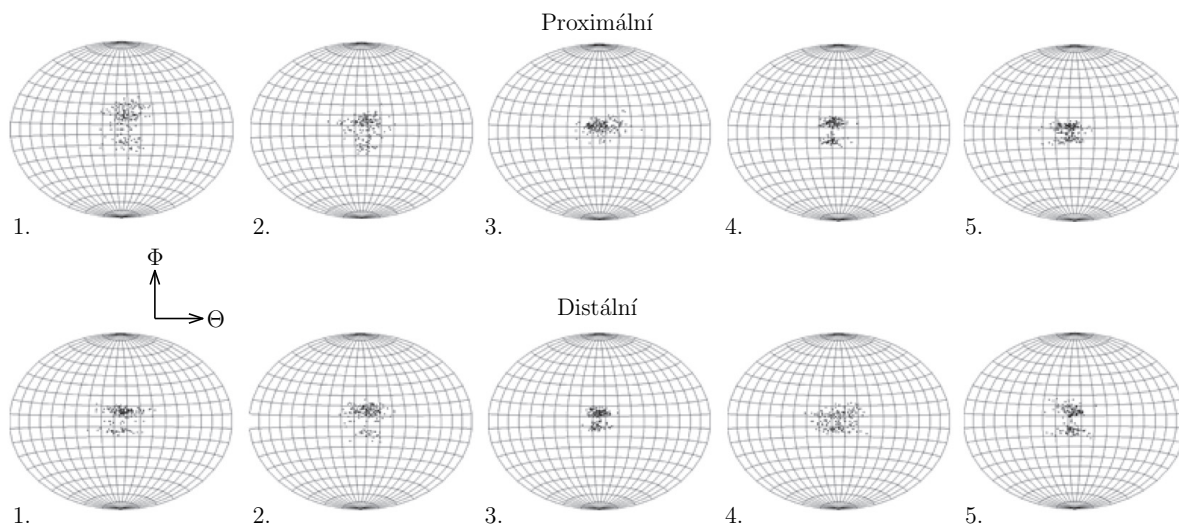
Studie Canhama a kol. z roku 1996 [36] se zaměřuje na mozková aneurysmata. Řezy byly vedeny tečně, jako v předešlé studii. Výsledky jsou ve studii znázorněné v Lambertově projekční rovině. Všechny zmíněné studie Canhama a jeho kol. neukazují jejich přínos, nebo použití při výpočtech. Potvrdili jen obecný fakt obvodové orientace vláken v TM a TA.

Práce Schriebla a kol. z roku 2011 [37] se zabývá určením hlavních směrů kolagenních vláken ve zdravých lidských hrudních (*thoracic aorta* - ThA) a břišních aortách (*abdominal aorta* - AA) a v kyčelních tepnách (*common iliac arteries* - CIA). Výsledky u ThA a AA ukazují existenci dvou rodin vláken v TM a TA a  $2 - 4$  rodin vláken v TI ( $3.$  a  $4.$  blízko k axiálnímu a obvodovému směru). Dvojice rodin vláken byly téměř symetricky uspořádány k ose válce, např. v ThA v TA blíže k axiálnímu směru ( $53,21^\circ$  a  $-50,55^\circ$ ), v TM blíže k obvodovému ( $27,75^\circ$  a  $-27,19^\circ$ ) a v TI něco mezitím ( $41,15^\circ$  a  $-39,48^\circ$ ). V CIA byly nalezeny dvě rodiny vláken v TI a TA a jedna rodina vláken v TM.

Gasser a kol. se ve studii [2] z roku 2012 věnují identifikaci strukturních parametrů kolagenních vláken z lidských břišních aortálních aneurysmat (*Abdominal Aortic Aneurysm* - AAA) za pomoci manuální metody PLM a jejich použití ve dvou vybraných konstitutivních modelech materiálu. Podlouhlé vzorky  $1 \times 0,5\text{cm}$  byly před fixací uloženy mezi dvě skla a zmáčknuty pro redukci vlnitosti vláken. Dále byly vzorky zality voskem, rozřezány na  $7\mu\text{m}$  plátky a obarveny barvivem PSR. Zjistili ortotropní orientaci kolagenních vláken s širokým rozptylem v TA a TM u AAA, což je v rozporu s dosavadním věděním mikrostruktury zdravých tepen, např. [7, 8, 37].

Studie Saéze a kol. [38] se zabývá směrovým uspořádáním kolagenu a mechanickými vlastnostmi zdravých prasečích karotid. Uspořádání zkoumali pod polarizačním mikroskopem a zároveň udělali jednoosou tahovou zkoušku. Vzorky byly nejprve axiálně předeptuty a poté  $5 \times$  cyklicky natlakovány z  $0$  na  $300\text{mmHg}$  při  $2\text{mmHg/s}$ . Data z posledního cyklu byla použita k nalezení parametrů pro konstitutivní model. Použili manuální metodu, kdy na každém vzorku (vždy  $3$  přes tloušťku stěny) pozorovali vyhasnutí  $30$  různých bodů a u nich si zapsali elevační a azimutální úhel ( $\Phi, \Theta$  - v publikaci je opačné značení

úhlů). Výsledky znázorněné v Lambertově projekční rovině Binghamovým rozdělením na obrázku 3.4 ukazují, že vlákna jsou ve společné karotidě rozložena okolo obvodového směru (shluk bodů uprostřed Lambertovy roviny, kde  $\Theta = 0$  a  $\Phi = 0$ ). U většiny vzorků lze také pozorovat dvě rodiny vláken, viz dva shluky bodů okolo obvodového směru ve vertikální ose znázorňující elevační úhel. Výsledkem jsou materiálové charakteristiky<sup>2</sup> pro dvanáct vzorků proximální společné karotidy a dvanáct vzorků distální společné karotidy, viz tabulky 3, 4 a 5 v [38]. Nevýhody tohoto přístupu jsou v použití manuální metody a v odlišení rozptylu vláken od vlnitosti, které není prozatím vyřešeno.



**Obrázek 3.4:** Lambertova projekční rovina směrového rozložení kolagenních vláken v proximální a distální části společné prasečí karotidy. Převzato a upraveno z [38].

### 3.3.2. Polarizační světelná mikroskopie - poloautomatické a automatické metody

PLM je silný nástroj pro detekci orientace a rozptylu kolagenních vláken, při použití automatické metody musela být ale nejdříve překonána limitace v  $90^\circ$  periodicitě intenzity polarizovaného světla, jelikož např. vlákna pod  $45^\circ$  mohl algoritmus vyhodnotit jako  $45^\circ$  nebo  $135^\circ$ .

Skupina Oldenbourga přišla na překonání této limitace přidáním univerzálního kompenzátoru před vzorek a publikovala to v několika studiích pod označením LC-PolScope, např. [39–41]. Kompenzátor se skládá z řízené otočné půlvlnové a čtvrtvlnové destičky, které mají schopnost otáčet rovinu polarizace lineárně polarizovaného světla. Nejnovější studie, která tuto metodu využívá je od autora Tani a jeho kolektivu z roku 2021 [42], která se zabývá strukturou a vývojem bazilární membrány Cortiho orgánu u savců.

Skupina Axera a kol. [43] nad touto limitací vyzrála přidáním čtvrtvlnové destičky za vzorek a ve studii se zaměřila na orientace nervových vláken v tkáni mozku v roce 2011. Stejnou metodu použila i skupina Schmitze a kol. ve své studii nervových vláken z roku 2020 [44].

Studie Polzera a kol. [45] z roku 2013 se zabývala modifikací nejpoužívanější metody 2D FFT. Nevýhodou algoritmu je, že umí detekovat jen dominantní směr, ale neumí věrohodně popsat disperzi vláken kolem tohoto směru. Dalším z nedostatků této metody

<sup>2</sup>Ve studii byl použit konstitutivní model Holzapfel 2000, viz podkapitola 5.2.

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

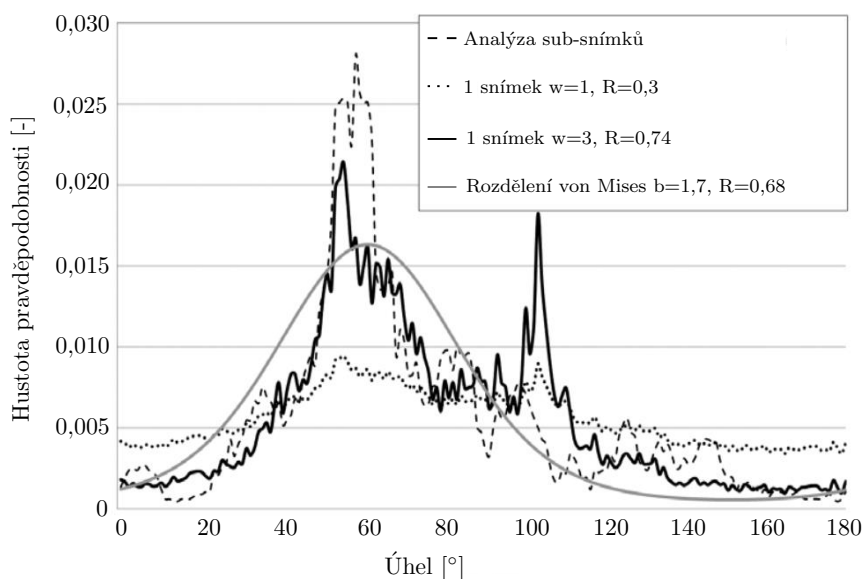
bylo, že vyhodnocuje i částečně pozadí snímku, což je nežádoucí a může vést k nepřesnostem. Modifikace algoritmu spočívala v umocnění původního histogramu  $h(\alpha)$  exponentem  $w > 1$ , který závisí na kvalitě obrazu, kameře a analyzované struktuře:

$$s(\alpha) = h^w(\alpha). \quad (3.1)$$

Exponent  $w$  je kalibrován tak, aby Pearsonův koeficient a koeficient determinace byly maximální, viz obrázek 3.5. Data byla proložena von Misesovým rozdělením:

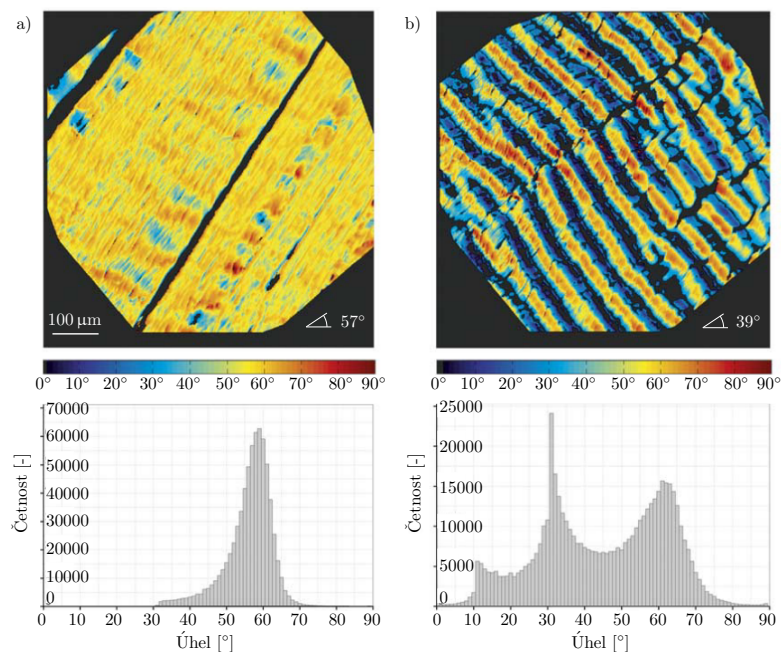
$$\varrho_\alpha = \frac{\exp \left[ b \cos \left( \frac{\pi}{180} (\alpha - \mu) \right) \right]}{\frac{1}{\pi 180} \int_0^\pi \exp (b \cos (\beta)) d\beta}, \quad (3.2)$$

kde  $\mu$  je hlavní směr vláken a  $b$  je parametr jejich koncentrace. Hlavním omezením jakékoli metody založené na FFT je to, že nerozlišuje mezi různými histologickými strukturami (vlákný), i když se objevují v různých barvách. Za tímto účelem by mohly být odlišné struktury odděleny zvážením různých částí frekvenčních spekter. Podobně mohou být odlišné zbarvené struktury (elastin) odděleny použitím pouze definované části barevného spektra obrazu. Výhodou FFT je, že je předem naprogramována v matematických softwarech a je tak jednoduché její použití.



**Obrázek 3.5:** Histogram četností globálních směrů kolagenních vláken v cévách. Na ose  $y$  je záznamována hustota pravděpodobnosti pro jednostupňové rozmezí úhlu kolagenních vláken. Tečkovaná křivka je distribuce směrů vláken pouze z jednoho obrázku. Čárkovaná křivka je analýza sub-snímků, které byly podrobeny FFT, s jejich lokálními směry. Při umocnění  $w = 3$  (tučná křivka) dojde k maximální korelaci ( $R^2 = 0,74$ ). Tenká plná křivka je proložení dat distribuční funkcí von Mises s parametrem koncentrace  $b = 1,7$  a koeficientem determinace  $R^2 = 0,68$ . Převzato a upraveno z [45].

Novák a kol. [46] v roce 2015 publikovali článek o nové automatizované metodě pro určení orientace kolagenních vláken od  $0^\circ$  do  $90^\circ$ . Histologické řezy byly nasnímkovány pomocí kamery a polarizačního mikroskopu. První nevýhodou algoritmu je, že představené výsledky jsou pouze z jedné roviny a ne ve 3D, to lze ale vyřešit měřením v dalších rovinách (další histologické řezy). Dalším omezením je, že algoritmus posoudí úhel vláken jen od  $0^\circ$



**Obrázek 3.6:** Rozložení kolagenních vláken v Achillově šlaše prasete. Mikrosnímek a) představuje výsledek z algoritmu místa s rovnými vlákny a globálním směrem  $57^\circ$  změřeným ručně operátorem. Mikrosnímek b) ukazuje vzorek se zvlněnými vlákny. Ve spodní části jsou uvedené histogramy. U rovných vláken vidíme jeden peak, který odpovídá globálnímu směru a u zvlněných vláken vidíme tři peaky, které jsou rozdílné od hlavního globálního směru. Převzato a upraveno z [46].

do  $90^\circ$ , viz obrázek 3.6. Při zkřížených filtrech nelze tedy rozeznat vzájemně kolmé směry v rozmezí  $0^\circ - 90^\circ$  a  $90^\circ - 180^\circ$ . Algoritmus byl korektně verifikován i validován. Jedním z cílů práce je nový rozšířený algoritmus od  $0^\circ$  do  $180^\circ$ , který tuto chybu odstraňuje a vede k přesnějším a rychlejším výsledkům.

### 3.3.3. Second harmonic generation

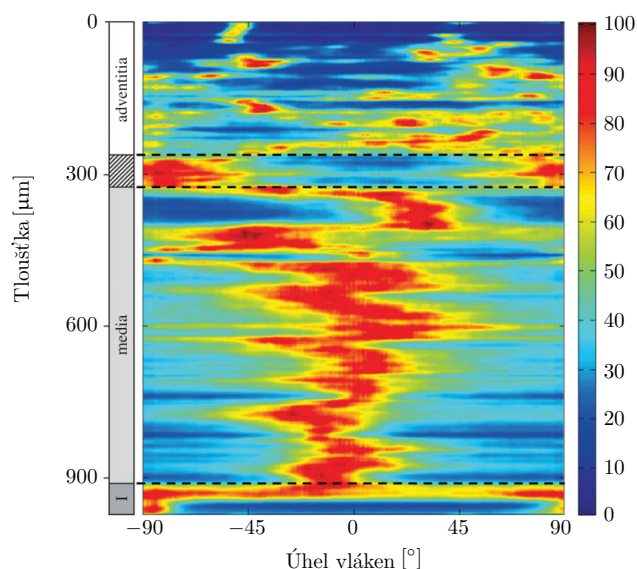
Metoda generace druhé harmonické frekvence je složitý fyzikální jev vyplývající z interakcí fotonů s hmotou. Dva fotony se stejnou energií současně interagují s hmotou a spojí se do jediného fotonu znovu emitovaného s přesně dvojnásobnou energií. Aby bylo možné prakticky dosáhnout podmínek vysoké intenzity vyžadovaných pro SHG v daném bodě, musí být na tento bod zaostřen zdroj pulzního laseru, jako je femtosekundový laser. Přístroj nedokáže skenovat přes celou tloušťku vzorku. [47] Další limitací této metody je její použitelnost na velmi malém množství strukturálních proteinů. Kolagen, ale díky své krystalické trojšroubovitě struktuře, dokáže vytvářet SHG signál a to bez použití barvení. [48] Dále se SHG využívá pro výzkum myosinu a mikrotubulů. [47]

Studie Schriebla a kol. z roku 2012 [49] se věnuje určení dvou základních parametrů (preferovaná orientace vláken a rozptyl) s jejich zavedením do konstitutivního modelu. Používají zde vzorky ze zdravé hrudní aorty z TI. Snímky byly pořízeny z polarizačního mikroskopu SHG (*second harmonic generation*) zobrazováním kolagenu a vzorky byly připraveny tak, jako v předešlé studii [37]. Metoda je dále založena na vytvoření výkonového spektra z FFT a použití šedého klínu (*wedge filter*). Distribuce dat byla provedena von Misesovým rozdělením s hustotou pravděpodobnosti podle [6]. Výsledky ukazují dvě rodiny vláken symetricky uspořádaných kolem obvodového směru v TI. Nevýhodou SHG

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

metody je, že u velkých tepen, které mají tlustší stěnu, se špatně pořizují snímky po celé tloušťce. Tyto tkáně pak vyžadují další techniky zobrazování, které ale pak snižují signál z mikroskopu.

Poloautomatizovanou metodu představil Schriebl a kol. v roce 2013 [50]. Používali zdravé vzorky z lidských břišních aort a opět pomocí SHG zobrazování zjistili 3D rozložení kolagenu přes celou tloušťku tkáně. Vzorky byly před fixací nataženy s 22% deformací v obvodovém směru simulující konstantní střední arteriální krevní tlak (130 mmHg) a s 12% deformací v axiálním směru simulující podélné předpětí. Natlakování a axiální předpětí nejsou pouze předpokladem k napodobení podmínek *in vivo*, ale také většinou vedou k napřimání kolagenních vláken, což je nezbytné pro správné určení jejich úhlů. Do strukturních konstitutivních modelů materiálu by se ale měly dosazovat parametry nezatížené tkáně (hlavní směry vláken, jejich rozptyly a vlnitost/přímot), zatížení by mělo ukázat globální směr vláken a jejich případnou reorientaci oproti nezatíženému stavu. Vzorky byly podrobeny optickému dočištění, nařezány na 5  $\mu\text{m}$  tenké řezy a nabarveny barvivem PSR. Získaná data byla opět proložena von Misesovým rozdělením s hustotou pravděpodobnosti podle [6]. Zjištěná 3D orientace vláken je na obrázku 3.7. TA popisují



**Obrázek 3.7:** 3D zobrazení kolagenních vláken přes tloušťku stěny zdravé břišní aorty.  $0^\circ$  a  $\pm 90^\circ$  znamená obvodový a axiální směr, modrá a červená barva korespondují s 0% a 100% relativní amplitudou. Červené oblasti ukazují globální směr vláken. Převzato a upraveno z [50].

se zarovnanými vlákny do dvou protiběžně rotujících rodin obecně orientovanými mezi hlavními osami cév. Na obrázku 3.7 ale spíše můžeme pozorovat více zvlněná vlákna vyznačující se menšími peaky v amplitudě uspořádaným blíže k axiálnímu směru, jasné dvě rodiny vláken zde nepozorujeme. Dále je zde vyznačená přechodová vrstva, kde je jedna rodina axiálně orientovaných vláken. V TM pak převažuje dominantně obvodový směr. V TI blízko lumenu byla vlákna zarovnaná v axiální rovině s orientací ve směru průtoku krve. U TA by bylo vhodné provést analýzu v několika řezech přes její tloušťku a porovnat zde unimodální a bimodální von Misesovu distribuci. Dále studie slibuje strukturní parametry pro konstitutivní modely, jenže ty zde chybí, jsou vyjádřeny pouze obrázkem 3D rozložení orientací kolagenu.

Tanaka a kol. představili ve své studii [51] z roku 2014 spojení polarizace a SHG. Vznikl tak výkonný nástroj pro kvantitativní zkoumání orientace kolagenních vláken založený

na rychlém přepínání polarizace při skenování ohniska. Zobrazovali orientaci kolagenních vláken v lidské pokožce obličeje in vivo. Tato metoda se ukázala být zvláště vhodná pro pozorování a analýzu orientace kolagenu v relativně jednoduchých tkáních, např. v kůži nebo šlachách, podle autorů ale není příliš vhodná pro složitější tkáně.

#### 3.3.4. Transmisní mikroskopie

Elbischger a kol. v roce 2004 [52] zkoumali nejvrchnější vrstvu cévní stěny - TA. Použili transmisní mikroskop a jako jedni z prvních automatizovanou metodu. Příprava vzorků byla podobná jako u jiných metod. Obsahovala fixaci v parafínu, nařezání na tenké proužky ( $3\mu\text{m}$ ) a obarvení barvivem Elastice van Gieson (EVG). Podle dosavadních zkušeností je možno konstatovat, že jejich tloušťka je velmi malá a mohlo dojít k potrhání vláken. Doporučená tloušťka v literatuře je  $5 - 8\mu\text{m}$ . Dalším nedostatkem je, že algoritmus nefunguje správně když v obraze je méně jak 50 % vláken, což znamená znemožnění analýzy v některých částech, kde se nacházejí díry, trhliny a okraje. Dále metoda vyhodnocuje pouze orientaci kolagenu v rovině řezu a ne ve 3D. Jeden snímek metoda dokázala vyhodnotit za cca 30 s, ten stejný snímek byl manuálně vyhodnocován několik hodin. V průměru automatizovaná metoda vyhodnocovala 60 % plochy snímku v jednotlivých podoblastech, kdežto u manuální segmentace operátor postihl v průměru pouze 14 %. Metoda nebyla dále použita ani zlepšena. V práci je provedeno i srovnání s manuální segmentací dat.

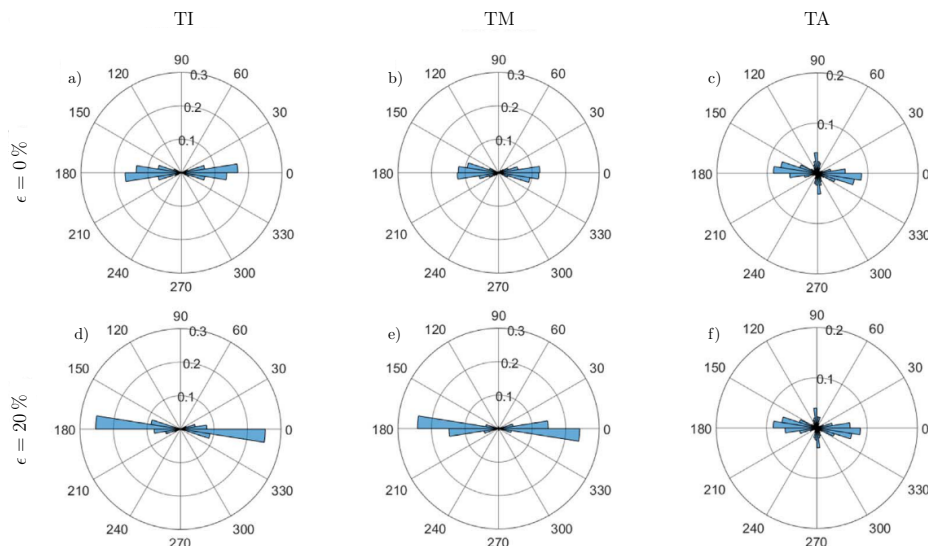
#### 3.3.5. Small Angle Light Scattering

Hlavním cílem práce Gaula a kol. z roku 2017 [53] bylo nedestruktivně určit orientaci kolagenních vláken v prasečích společných krčních tepnách pomocí metody SALS, která využívá laser s nepolarizovaným výstupem, zaostřovací čočky, automatický polohovací držák vzorku, rozptylovací desku a kameru. Nedestruktivně znamená, bez řezání mikrotomem na malé tloušťky, protože tato metoda je schopná určit orientaci vláken v jednotlivých vrstvách přímo na vyseknutém neporušeném vzorku z cévy. Nespornou výhodou SALS je také schopnost měřit změny orientace vláken v reálném čase v závislosti na zatížení. Vyšší tloušťka vzorku už ale může zkreslovat výsledky. Snímky poté posuzuje naprogramovaný kód v Matlabu, který v prosvětleném poli hledá geometrický střed a pak pro každý úhel spočítá intenzitu. Kolmice na hlavní osu světelného pole je dominantní směr vlákna. Excentricita světelného pole  $E$  pak udává rozložení vláken v daném pozorovaném bodě (např.  $E = 1$  značí zarovnání vláken do jednoho směru). Zvyšujícím se zatížením se zvyšovala excentricita, tzn. snižoval se rozptyl vláken. Výsledky byly srovnány i s klasickou destruktivní metodou. V TI a TM byl nalezena jedna rodina vláken v obvodovém směru ( $5,5^\circ$  a  $4,7^\circ$ ), zatímco v TA byly nalezeny dvě rodiny vláken pod úhly  $37,7^\circ$  a  $39,9^\circ$ , viz obrázek 3.8. Toto konstatování ale není v souladu s uveřejněnými grafy, kde je již od pohledu zřejmá hlavní orientace kolem obvodového směru, ale i určitá malá skupina vláken orientovaných v axiálním směru. Nevýhodou metody je vysoká časová náročnost, což může být problém při zkoumání více vzorků. Zařízení nemáme k dispozici, ale může být inspirací do dalších let výzkumu i kvůli pozorování při zatěžování v reálném čase.

#### 3.3.6. Fluorescenční mikroskopie

Ve studii Razakhanihové a kol. z roku 2012 [11] byly vzorky TA králíčích společných krčních tepen obarveny fluorescenčním barvivem CNA35-OG488 pro zobrazování pod

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ



**Obrázek 3.8:** Histogram distribuce vláken pod a-c) 0% deformací a d-f) 20% deformací. Převzato a upraveno z [53].

konfokálním mikroskopem. Pro určení všech charakteristik použili manuální, poloautomatizované i automatizované metody na nefixovaných vzorcích při nulovém napětí. Vlnitost vláken stanovili podle následujícího parametru přímosti:

$$P_S = \frac{L_0}{L_f}, \quad (3.3)$$

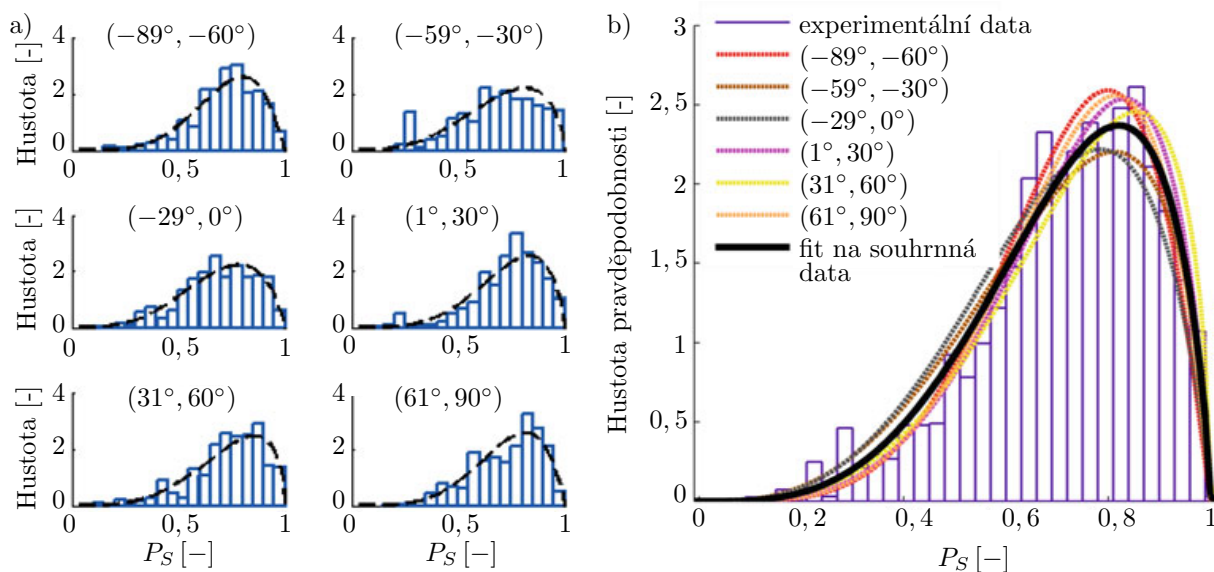
kde  $L_0$  je přímá vzdálenost mezi dvěma konci vlákna a  $L_f$  je manuálně naměřená délka zvlněného vlákna. Pokud se parametr rovná 1 je vlákno dokonale přímé, pokud jde k nule, tak se vlákno více vlní. Pro analýzy použili volně dostupný software ImageJ a plugin NeuronJ, vyvinutý pro trasování neuronových vláken [54]. Jedním z výsledků je, že vlnitost vláken nezávisí na jejich globálních směrech, viz obrázek 3.9.

Globální směry vláken určili ze souřadnic jejich konců k axiální ose snímku vzorku, viz obrázek 3.10 a). V obrázku je zachyceno rozložení parametru přímosti  $P_S$  v závislosti na globálním úhlu vláken, kde bohužel chybí rozložení kolem úhlu  $0^\circ$  (axiální směr). Jejich automatická analýza lokálních směrů za pomoci pluginu OrientationJ ukázala existenci čtyř rodin vláken (první v axiální směru, druhá v obvodovém směru, třetí a čtvrtá pod úhlem  $43^\circ$  a  $-43^\circ$ ), viz obrázek 3.10 b), kde jsou znázorněny hodnoty jednak pro rozříznutý segment (stav nulového napětí) a také pro nerozříznutý, nezatížený segment s von Misesovou distribucí. Otázkou ale je, jestli se nejedná o dvě zvlněné rodiny vláken, jelikož měření probíhalo bez zatížení, které by vlákna mohlo narovnat. V práci chybí porovnání výsledných lokálních směrů s globálními v závislosti na vlnitosti vláken.

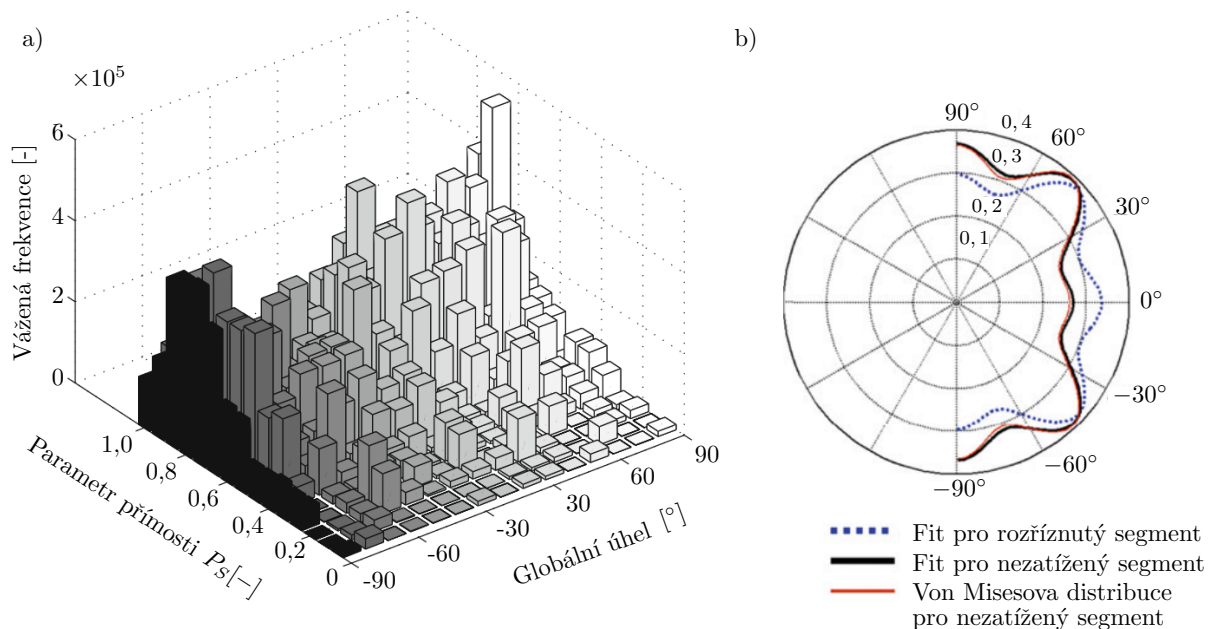
Schrauwen a kol. ve stejném roce publikovali navazující práci [55] se zaměřením opět na TA králičí společné krční tepny pod konfokálním mikroskopem s barvením CNA35-OG488. Vyříznutá část tepny byla axiálně protažena na  $\lambda = 1,4$  a upevněna mezi dvě trubičky. Zařízení bylo v lázni s fyziologickým roztokem, tlakování (mezi 0 a 80 mmHg po 5 mmHg, mezi 80 a 140 mmHg po 10 mmHg) proběhlo také pomocí fyziologického roztoku, vše při  $37^\circ\text{C}$ . Přímost vláken získali jednoduchým podílem vzdálenosti mezi koncovými body vlákna a jeho celkovou délkou. Tyto základní parametry i s hlavním směrem vláken získali pomocí *Diffusion Tensor Imaging* (DTI). V průběhu zatěžování lze pozorovat přibližování vláken k obvodovému směru, zvyšování přímosti vláken, a tedy snižování jejich vlnitosti.



### 3.3. SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ



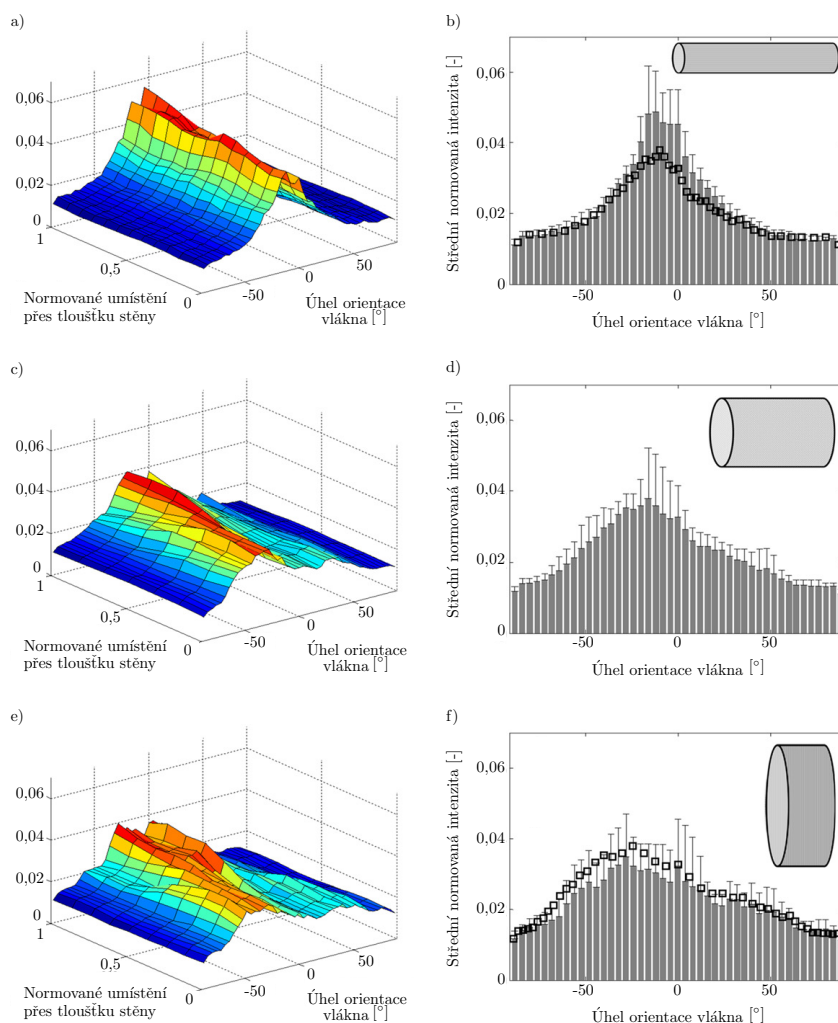
**Obrázek 3.9:** Rozložení parametru přímosti  $P_S$  v různých rozmezech globálních směrů. Experimentální data byla nejprve rozdělena na šest tříd podle jejich naměřených globálních směrů. Byla nafitována a) beta distribuce (čárkovaná křivka) na jednotlivé třídy (sloupce) a b) srovnání všech těchto distribucí s nezávislým rozdělením fitovaným na všech experimentálních datech. Převzato a upraveno z [11].



**Obrázek 3.10:** a) Dvourozměrný histogram parametru přímosti  $P_S$  a globálních úhlů vzhledem k axiálnímu směru tepny na základě celého souboru dat. b) Naměřená distribuce lokálních úhlů pro rozříznutý segment (tečkovaně) a pro nerozříznutý, nezatížený segment (plně černě) s von Misesovou distribuční funkcí (plně červeně). Převzato a upraveno z [11].

### 3.3. SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

Cílem Wana a kol. v práci [56] bylo kvantifikovat úhly kolagenních vláken v myších karotidách při různých poměrech dvojsoého zatížení a začlenit tato data do strukturních konstitutivních modelů. Použili k tomu multifotonový fluorescenční mikroskop, metodu SHG s vyhodnocením pomocí FFT. Při vysokém axiálním protažení a nízkém obvodovém zatížení byla vlákna zarovnaná převážně do axiálního směru. S přibývajícím tlakem a ubývajícím axiálním protažením se začala snižovat koncentrace v axiálním směru, pořád ale tento směr převažoval, viz obrázek 3.11, což je v rozporu s většinou studií kromě např. [50]. Z jejich výsledků je ale patrné unimodální rozdělení s měnícím se rozptylem podle zatížení. Limitací této studie je, že byli schopni zobrazit pouze TA, nezahrnuli tak změnu rozložení vláken po celé tloušťce stěny. Dále zde nerozlišili vlnitost vláken od jejich rozptýlu. Více o jejich použití strukturních parametrů do strukturních konstitutivních modelů je v kapitole 5.3.

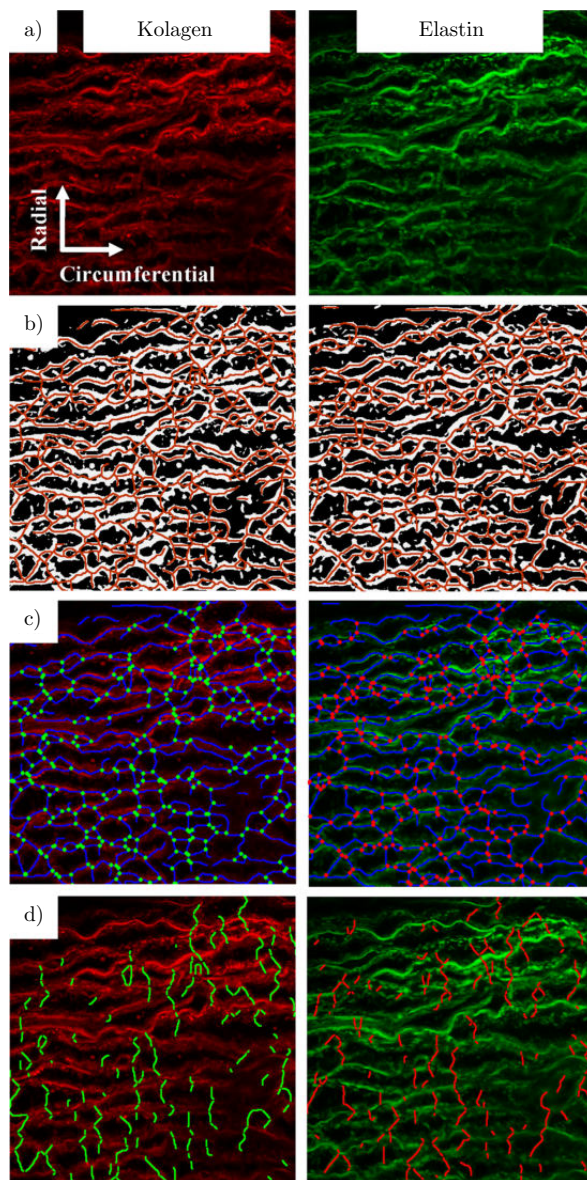


**Obrázek 3.11:** Distribuce uspořádání vláken měnící se přes hloubku TA cévy. Vložené obrázky válců odpovídají přibližným geometriím zatížení, které nejsou v měřítku. V grafech a), c) a e) byla normována tloušťka části stěny, 1 představuje vnější část TA a 0 vnitřní část TA, popř. rozhraní mezi TA a TM. Nulový úhel orientace vlákna představuje axiální směr a  $\pm 90^\circ$  obvodový směr. Převzato z [56].

Práce Kocha a kol. z roku 2014 [57] představuje vyvinutý automatizovaný algoritmus v programu MATLAB pro vyhodnocení strukturních parametrů elastinu a kolagenu ve vzorcích z lidské aorty pomocí snímků z multifotonové mikroskopie. Vzorky nenabarvili

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

fluorescenčním barvívem ani protilátkou, která by zviditelnila kolagen nebo elastin. Na obrázcích tak jdou vidět stejná vlákna, která při osvětlení laserem s vlnovou délkou v červeném spektru nazvali kolagen a při zeleném spektru elastin, přitom to jsou tatáž vlákna a nejspíše jde o vazivovou tkáň s elastinovými vlákny, viz obrázek 3.12. Algoritmus dokáže vyhodnotit i vlnitost vláken, software ImageJ je ale pořád propracovanější a je volně dostupný.



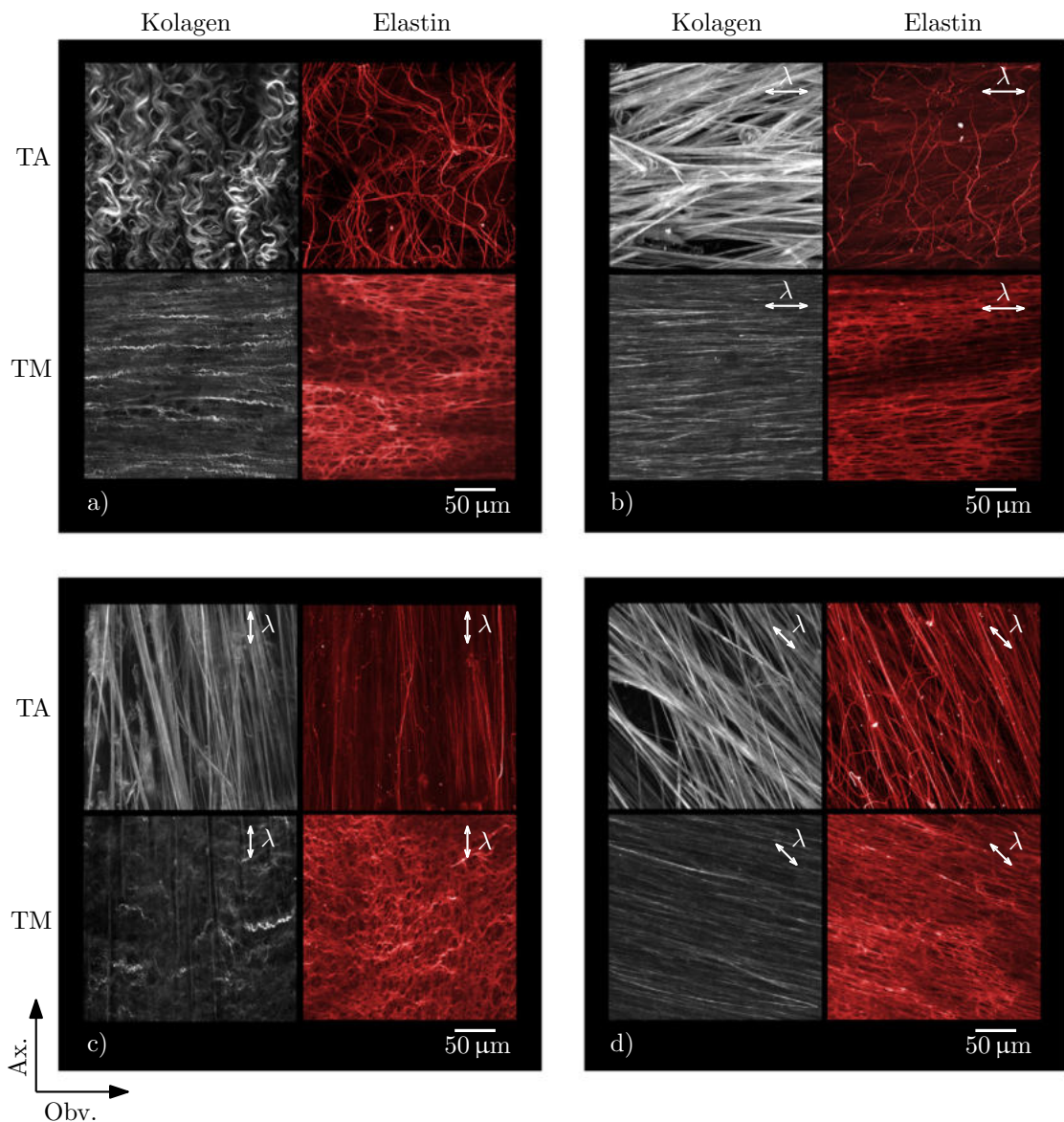
**Obrázek 3.12:** a) První dva snímky ( $245 \times 245 \mu\text{m}^2$ ) podle studie ukazují kolagen (levý sloupec) a elastin (pravý sloupec). Jednoznačně ale jde o stejná vlákna. b) Černobílý obraz struktury vláken, c) modře vyznačená kostra vláken s vyznačenými průsečíky s kolagenem (zelené tečky) a elastinem (červené tečky), d) zvýrazněná radiální vlákna. Technická specifika nastavení mikroskopu jsou rozepsána ve studii. Převzato a upraveno z [57].

Ve studii Morrillové a kol. z roku 2016 [58] je představen veřejný freeware FibreFit, který je i validován na umělých obrazech. Algoritmus vyhodnocuje lokální směry vláken a jejich rozptyl ze snímků z konfokálního mikroskopu a histogramy prokládá von Misesovou distribuční funkcí. Je založen na FFT s pásmovou propustí. Algoritmus byl srovnán

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

s metodou založenou na strukturním tenzoru a byla potvrzena cca  $5\times$  lepší přesnost FFT s pásmovou propustí. Větší přesnost zajišťuje použití obrazu ve stupních šedi. Algoritmus nedokáže určit vlnitost vláken.

Krasny a kol. se v roce 2017 [59] zaměřili na 2D pozorování přeuspořádání kolagenních vláken ve vzorcích králíčích karotid při jednoosém zatížení ve třech různých směrech deformace pomocí multifotonové mikroskopie a SHG bez použití barvení. Výsledky ukazují, že přeskupení kolagenu v TM a elastinu v TM i TA probíhalo v rámci malých úhlů. Kolagen v TA se ale choval odlišně, vykazoval pozoruhodný potenciál přeorientovat se v jakémkoli z aplikovaných směrů zatížení (obvodový, podélný, diagonální).

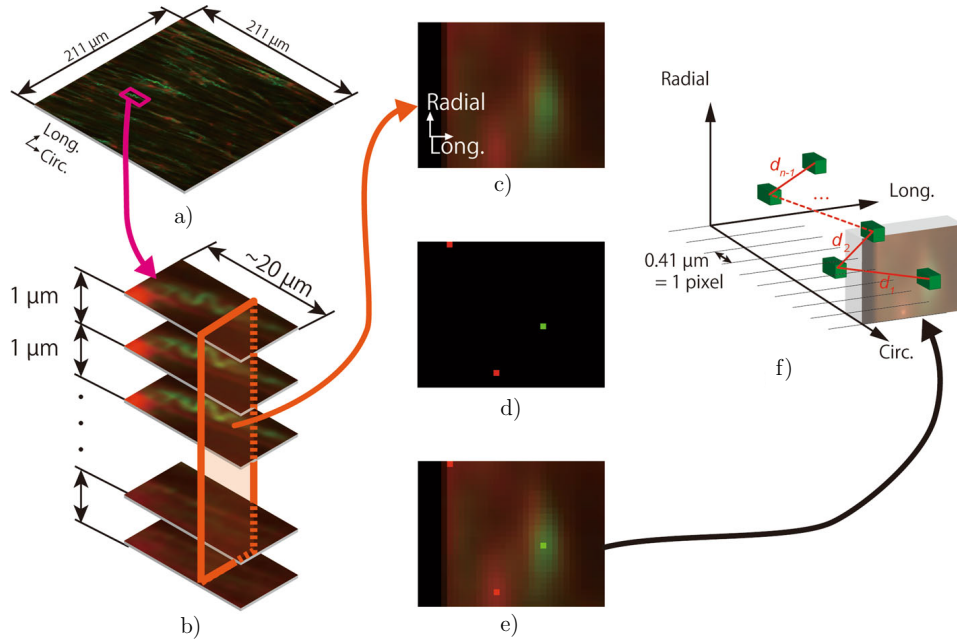


**Obrázek 3.13:** Mikrostruktura vzorku králíčí karotidy pod multifotonovým mikroskopem při a) nultém, b) obvodovém, c) podélném a d) diagonálním zatížení silou  $F = 0,8\text{ N}$ . Převzato a upraveno z [59].

V práci [60] se Sugita a Matsumoto zaměřili na vyhodnocení mikrostrukturních změn elastinových a kolagenních vláken při zatěžování (po 20 mmHg až do 80 mmHg) v TM myši a králíčí hrudní aorty. Vybraných 27 vláken si manuálně vytrasovali, udělali snímky pod

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

dvou-fotonovým mikroskopem obvodově-axiální roviny přes jejich zvlněnou část. Získali tak sadu snímků přes radiální směr, kde zanalyzovali body o nejvyšší intenzitě, viz obrázek 3.14, které pak použili pro výpočet celkové délky vlákna jeho multilineární aproximací. Elastin má schopnost autofluorescence a pro zachycení informací o kolagenních vláknech



**Obrázek 3.14:** a) Obvodově-axiální snímek kolagenu a elastinu v TM králičí hrudní aorty na dvou-fotonovém mikroskopu, b) seřazení snímků obvodově-axiální roviny v radiálním směru, c), d) a e) získání maxim kolagenu a elastinu (zelená a červená barva), f) schéma jednotlivých úseků vlákna a představa výpočtu jeho délky a vlnitosti. Převzato z [60].

byla použita metoda *Second Harmonic Imaging Microscopy*, která je založená na nelineárním optickém efektu - *Second Harmonic Generation* (SHG). Nemuselo tak být použito barvení vláken nebo fixace a vlákna mohla být pozorována i při zatížení. Pomocí výpočtu délky vlákna  $L$  získali vlnitost vlákna  $w$  pomocí těchto vztahů:

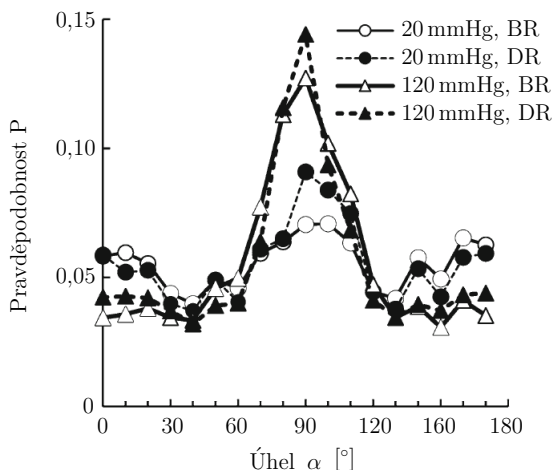
$$d_i = \sqrt{(Ax_i - Ax_{i+1})^2 + (Rad_i - Rad_{i+1})^2 + (Obv_i - Obv_{i+1})^2}, \quad (3.4)$$

$$L = \sum_i^{n-1} d_i, \quad (3.5)$$

$$w = \frac{L}{\sqrt{(Ax_1 - Ax_n)^2 + (Rad_1 - Rad_n)^2 + (Obv_1 - Obv_n)^2}}, \quad (3.6)$$

kde  $d_i$  je délka úseku  $i$  vlákna,  $Ax$ ,  $Rad$  a  $Obv$  jsou souřadnice v axiálním, radiálním a obvodovém směru. Změny ve vlnitosti během zatěžování byly analyzovány za pomoci 2D-FFT. Zatěžování simulovalo fyziologický tlak krve (80 mmHg), podélné poměrné protažení bylo cca 1,3 a obvodové cca 1,6. Ze získaných rozdělení pravděpodobnosti vyvodili, že s rostoucím peakem se snižuje vlnitost vláken, viz obrázek 3.15. V obvodově-axiální rovině byla vlnitost kolagenu vyšší než v obvodově-radiální rovině, viz graf 5e) ve studii. Vlnitost kolagenu je podstatně vyšší než elastinu, viz graf 5f) ve studii.

Ayyalomasajula a kol. v roce 2019 publikovali studii [61], ve které představili vyvinutý MKP model sítě kolagenních vláken v obvodově-axiální rovině vzorku TA pro



**Obrázek 3.15:** Rozdělení orientace vláken, které ukazuje jejich zarovnání dominantně k obvodovému směru ( $90^\circ$ ) ve všech případech. DR (*dark region*) a BR (*bright region*) koresponduje s hladko-svalovou vrstvou a elastickou lamínou. Převzato z [60].

jednoosou tahovou zkoušku. Jednoosou tahovou zkoušku provedli na základě protokolu z [59]. Strukturální parametry (distribuce orientace a přímot vláken) byly získány z von Misesovy distribuční funkce z analýzy jednoho místa vzorku zdravé králičí karotidy za pomoci konfokálního mikroskopu, SHG, FFT a softwaru ImageJ. Z mikroskopických snímků byla zřejmá přítomnost dvou odlišných rodin vláken a počet vláken v každé rodině nebyl stejný, jak se předpokládalo. Za tímto účelem byl zaveden váhový parametr  $p$ , který bere v úvahu příspěvek každé skupiny vláken. Model také bere v úvahu počáteční přímot kolagenu. Ta byla získána poloautomaticky jako podíl délky od jednoho konce k druhému ku délce zvlněného vlákna.

Ve studii Jadidiho a kol. [62] z roku 2021 bylo cílem charakterizovat mikrostrukturu a ex vivo biaxiální mechanické vlastnosti lidských femorálních (stehenních) tepen v širším věkovém rozmezí (12-70 let, průměr byl  $48 \pm 19$  let). Preferovaný směr kolagenních vláken a jejich rozptyl kolem tohoto směru byly stanoveny pomocí multifotonové mikroskopie se zobrazením SHG. Tato data byla následně použita do strukturálně motivovaných konstitutivních modelů materiálu se dvěma a čtyřmi rodinami vláken. Vzorky byly histologicky připraveny, nařezány a obarveny Massonovým trichromem. Zjistili diagonální orientaci kolagenu I v TA a obvodovou v TM. Model čtyř rodin vláken logicky zajistil lepší přizpůsobení než model dvou rodin vláken, vkládá ale také do modelu dvojnásobný počet strukturálních parametrů.

Na získání průměru kolagenních vláken a jejich vlnitosti ve zdravém a patologickém stavu se zaměřila Niestrawska a kol. v roce 2022 [63]. Použili k tomu konfokální mikroskop a SHG. Vlnitost a její získávání je zde v úvodu velmi dobře rozebráno s velkým množstvím citací, detaily a porovnáním. Pro získání distribuce a vlnitosti kolagenních vláken zvolili software ImageJ, distribuci proložili von Misesovou distribuční funkcí pro získání hlavního směru a parametru koncentrace a pro vlnitost vytrasovali 10 vláken na každém z 10 snímků jednoho vzorku. Medián průměru vlákna v TM byl pouze  $3 \mu\text{m}$  a v TA  $21,9 \mu\text{m}$ . Kolagenní vlákna ve zdravé TM byla orientována převážně v obvodovém směru  $\alpha = 10^\circ$ , v TA více diagonálně  $\alpha = 53^\circ$ .

Další nedávná studie Pukalukové a kol. z roku 2023 [64] se zaměřila na změny kolagenu a elastinu při biaxiálním zatížení 8 lidských vzorků TA břišní aorty (AA) a jednoho vzorku aneurysmatu břišní aorty (AAA) pomocí multifotonové mikroskopie a SHG ( $66 \pm 11$  let, 5 mužů, 4 ženy). Mikrostrukturální změny svazků kolagenních a elastinových vláken byly určeny pomocí parametrů orientace, rozptylu, vlnitosti a průměru. Zatížením se významně snížil rozptyl i vlnitost kolagenních vláken. V referenční konfiguraci, tj. bez zatížení, byly pozorovány v TA jedna diagonální ( $\alpha = 45^\circ$ ) nebo dvě rodiny kolagenních vláken. Po

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

biaxiálním natažení ( $\lambda_x = \lambda_y = 1,2$ ) byly pozorovány dvě hlavní rodiny vláken a jejich přiblížení se k axiálnímu směru bez významného statistického rozdílu. Tohle tvrzení je ale v rozporu s ukázanými výsledky, nebo v jejich nepřesné specifikaci. Interpretace počtu rodin a jejich hlavních směrů je zmatená, v tabulce 4 (viz tabulka 3.1) mísí unimodální a bimodální rozdělení, a není zde řečeno, jak z těchto hodnot vypočítali medián, který je zde uveden pouze pro unimodální rozdělení. Z nedeformovaných 8 vzorků vyšla unimodální distribuce u 5, z deformovaných u 4. Stálo by tedy za to tyto výsledky více prodiskutovat, jelikož i jejich rozptyl byl významný, viz tabulka 3.1.

**Tabulka 3.1:**  $PR$  značí počet rodin kolagenních vláken,  $\alpha$  jejich hlavní směr/y a  $\kappa$  jejich rozptyl/y v referenční (1,0) a zatížené (1,2) konfiguraci. Převzato z [64]

Č. dárce	$PR_{1,0}$ [-]	$\alpha_{1,0}$ [°]	$\kappa_{1,0}$ [-]	$PR_{1,2}$ [-]	$\alpha_{1,2}$ [°]	$\kappa_{1,2}$ [-]
AA-1	1	51	0,124	2	-71;26	0,013;0,033
AA-2	2	-45;60	0,042;0,060	2	-58;69	0,076;0,066
AA-3	1	-75	0,073	2	-61;90	0,006;0,004
AA-4	2	-85;2	0,200;0,500	1	-27	0,007
AA-5	1	-79	0,122	1	-77	0,103
AA-6	2	-31;44	0,061;0,130	1	45	0,018
AA-7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AA-8	1	-41	0,052	1	-30	0,009
AAA-1	1	12	0,066	2	41;85	0,003;0,003
Medián	1	45	0,073	2	60	0,011
$[Q_1; Q_3]$	[1;2]	[34;72]	[0,060;0,129]	[1;2]	[36;74]	[0,005;0,050]

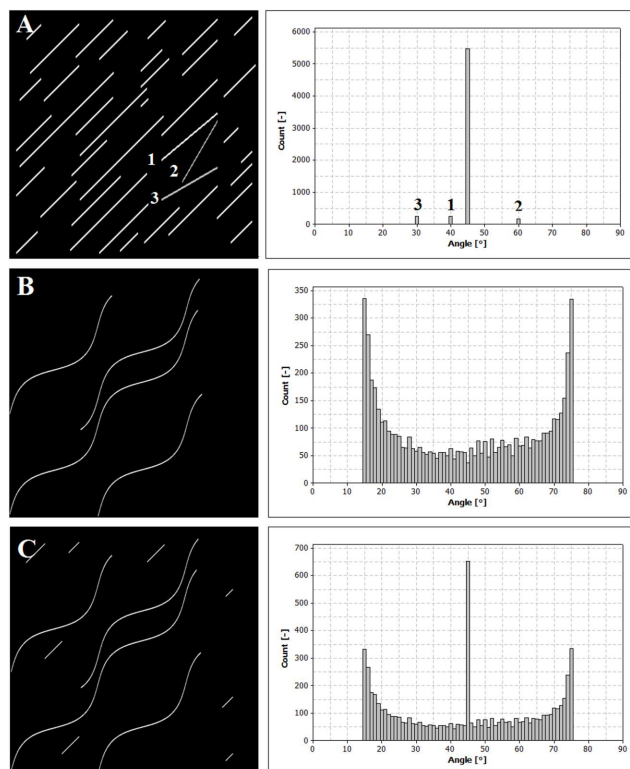
#### 3.3.7. Zhodnocení

Do roku 2014 se práce zabývají mikrostrukturou zdravých cév. Většina autorů se shoduje na obvodovém rozložení kolagenních vláken v TM [7, 8, 35, 36, 50, 53, 63]. U TA jsou výsledky už rozdílnější. Pro mozkové cévy je určeno obvodové rozložení s mnoha směrovou sítí vláken na jejím povrchu [8, 34, 36], pro břišní aortu byly určeny dvě rodiny vláken blíže k axiálnímu směru [37, 50, 64], nebo jedna diagonální rodina vláken [63, 64], pro krční tepny jedna dominantní rodina v obvodovém směru [53, 55], nebo čtyři rodiny vláken [11]. Zde se ale může jednat i o dvě zvlněné rodiny vláken, jelikož měření probíhalo bez zatížení. O TI se objevují také různorodé informace. Převažuje názor na dvě rodiny vláken uspořádaných blízko obvodovému směru [37, 49], studie [53] na prasečích krčních tepnách uvádí jednu obvodovou skupinu vláken.

U většiny prací se jedná o vyhodnocené lokální směry vláken, protože to vychází z podstaty při vyhodnocování snímků z PLM, pomocí SHG, FFT i fluorescenční mikroskopie, a žádná z prací nediskutuje vliv zvlnění vláken na jejich globální směr, který se oproti lokálním směrům může významně lišit. Dalším problémem je nesprávné použití bimodální distribuce, jelikož ji používají hlavní strukturálně motivované konstitutivní modely, aniž by bylo provedeno srovnání s unimodální distribucí, která by mohla poskytnout srovnatelnou kvalitu přizpůsobení [53, 55, 65]. Dále nehomogenita tkáně v jednotlivých vrstvách je často mylně vykládána a prezentována jako bimodální distribuce [49, 66]. Podíváme-li se na analýzu umělých obrazů 3.16 z práce [46] můžeme problém vidět i na umělých sinusovkách

### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

nakloněných pod  $45^\circ$ , kde jsou vyhodnocené lokální směry, neboli vzestupné a sestupné části vlny, a globální směr je znázorněn minimem v histogramu.



**Obrázek 3.16:** Analýza umělých obrazů, kde vidíme vyhodnocení lokálních směrů. Převzato a upraveno z [46].

Dále je v této době oblíbené použití manuální metody pomocí PLM. Na její nedostatky upozorňuje až Schriefl a kol. [37], přitom ji mnoho autorů dál používá. Shrnutí nevýhod manuální metody:

- časová náročnost,
- různá intenzita vláken může způsobit špatné vyhodnocení (např. podhodnocení rozptylu vláken nebo určení více dominantních směrů, než ve tkáni ve skutečnosti je),
- velká plocha vzorku a velký počet naměřených bodů může vést k únavě operátora a tedy k nesprávnému zaznamenání úhlu, naopak malý počet analyzovaných bodů může vést k nesprávnému vyhodnocení hlavních směrů vláken.

Práce [46] ukazuje na TM prasečí aorty variabilitu v měření orientace kolagenu dvou operátorů a srovnává ji s automatickým algoritmem. Výsledky obou se lišily od střední hodnoty automatického algoritmu až o  $9^\circ$  se směrodatnou odchylkou také cca  $9^\circ$ . Rozdíl vznikl z toho důvodu, že operátoři nezachytili minimální intenzitu daného bodu, jelikož citlivost lidského oka není tak velká. Metoda je tedy velmi závislá na operátorovi nebo operátorech.

Existuje několik přístupů, jak zobrazit kolagenní vlákna v měkkých tkáních, ale každý má určitá omezení. Například SALS [53], je přesný, ale velmi časově náročný. Metody založené na fluorescenční mikroskopii, jako je konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM) [11, 55] nebo multifotonová mikroskopie [56], jsou přesné a rychlé, ale vyžadují drahé mikroskopické vybavení a většinou složité barvení vzorku v kombinaci adhezivního



### 3.3. SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

proteinu (CNA35) a speciálního fluorescenčního barviva (OG488). Nesymetrická krystalická trojšroubovicová struktura kolagenu umožňuje emitovat světlo druhé harmonické generace (SHG) používané v multifotonové nebo konfokální mikroskopii. Tanaka a kol. použili polarizační mikroskopii se SHG k zobrazení orientace kolagenu v lidské pokožce obličejové *in vivo* [51]. Tato metoda se ukázala jako zvláště vhodná pro pozorování a analýzu orientace kolagenu v relativně jednoduchých tkáních, např. v kůži nebo šlachách, ale není příliš vhodná pro složitější tkáň (cévní stěny).

Z představených studií jde vidět, že fluorescenční mikroskopie je vhodná metoda pro získání vlnitosti vláken. Studie získaly číselné záznamy o vlnitosti ve formě parametru vlnitosti (přímosti) nebo amplitudy zvlnění, podle dostupných informací se ale nikdo nezabýval, jak ji lze odlišit od rozptylu samotných svazků vláken nebo zahrnout do strukturního modelu materiálu [56, 61, 63], kromě přístupu Rezakhanihové a kol. [11], kde vyhodnotili zvláště lokální a globální směry vláken a jejich přímost.

## 4. Automatický algoritmus pro detekci orientace kolagenních vláken

Původní algoritmus byl navržen, verifikován, validován a publikován Novákem a jeho kolektivem v práci [46]. Jeho princip byl založen na sledování změny intenzity světla jednotlivých pixelů třech otočených mikrosnímků pod polarizovaným světlem. Závislost intenzity světla na rotaci vzorku se chová podle funkce kosinus při kolmých filtrech a je periodická po  $90^\circ$ , viz obrázek 4.1 a). Algoritmus tedy nebyl schopen vyhodnotit dva navzájem kolmé směry. Klasická polarizovaná mikroskopie je jednoduchá a široce používaná optická metoda preferovaná při analýzách struktury kolagenu, protože umožňuje hodnocení na velké ploše vzorku a nevyžaduje žádné drahé vybavení nebo složitou přípravu vzorku [2, 8, 38]. Studie Nováka a kol. [46] je zároveň první, kde automatický algoritmus vycházel pouze ze snímků pod zkříženými (později vychýlenými) polarizátory a nepotřeboval tak ke korektnímu vyhodnocení hlavních směrů kolagenních vláken a jejich rozptylu žádné přídatné zařízení jako jsou čtvrtvlnové destičky nebo univerzální kompenzátory [39–44].

Navržené řešení rozšířeného algoritmu v disertační práci Nováka [67] bylo pomocí snímků s vychýlenými polarizátory oproti jejich původnímu kolmému nastavení. Vychýlení polarizátorů způsobuje změnu v periodicitě průběhu intenzity světla ve sledovaném pixelu vlákna z  $90^\circ$  na  $180^\circ$ , viz obrázek 4.1 b). Jedno z původních maxim se zvýší a druhé zeslábně.

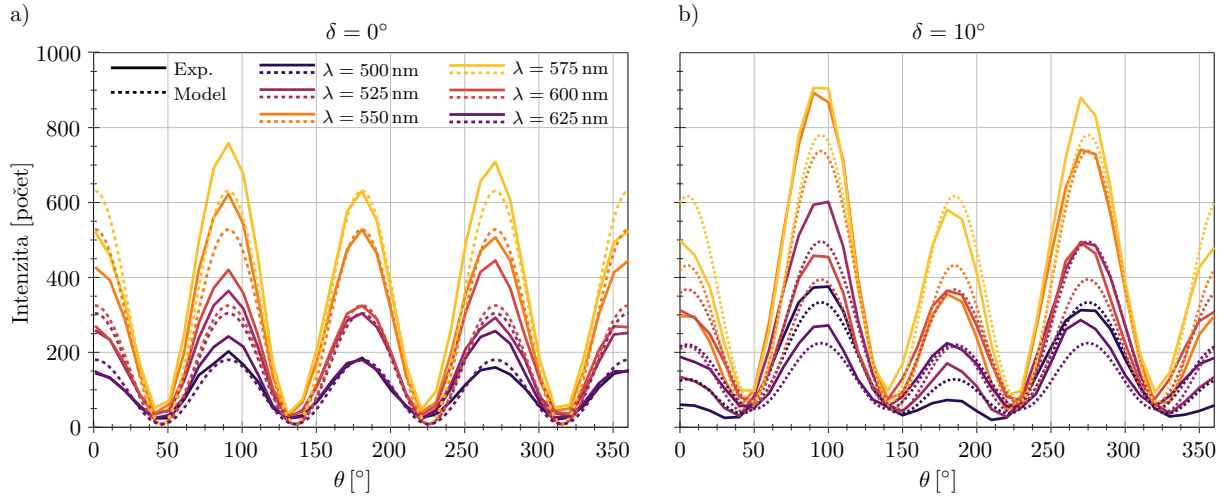
Mírné odchylky naměřených křivek od periodických teoretických závislostí jsou způsobeny pravděpodobně tím, že při otáčení vzorku se osa rotace stolku neshoduje s osou rotace vzorku. Protože se však tyto nesrovnalosti týkají pouze amplitudy a nikoli fáze  $\pi/2$ -periodických křivek pro zkřížené polarizátory, nemají žádný vliv na hodnocený úhel vlákna. Naproti tomu mezi sudými a lichými lokálními maximy pro  $\delta = 10^\circ$  dochází k výraznému rozdílu, což nám umožňuje rozlišovat mezi dvěma vzájemně kolmými orientacemi.

Ačkoliv byla tato limitace již několikrát překonána přidáním univerzálního kompenzátoru před vzorek [39, 41, 42] nebo čtvrt-vlnové destičky za něj ve světelné cestě polarizačního mikroskopu [43, 44], prezentovaný algoritmus je vhodný pro použití se snímkem z jakéhokoliv polarizovaného mikroskopu bez přidání komponent.

Podle postupu ve studii [46] je nejprve oblast na tkáni snímkována po  $10^\circ$  (celkem 18 snímků) s analyzátozem kolmým k polarizátoru; tato pozice polarizátorů odpovídá úhlu analyzátoru  $\delta = 0^\circ$ . Algoritmus tyto snímky orotuje zpět a sesadí na první snímek (pomocí fázové korelace obrazů) a vyhodnotí intenzitu světla v každém pixelu. Tyto hodnoty jsou následně nafitovány na následující kosinovou funkci:

$$I(\theta) = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos [4(\theta - p)] , \quad (4.1)$$

kde  $\theta$  je úhel natočení vzorku vzhledem k polarizátoru a  $p$  představuje úhlový (fázový) posuv této funkce určující orientaci vlákna ve zkoumaném pixelu. Je tak jediným neznámým



**Obrázek 4.1:** a), b) Závislosti intenzity procházejícího polarizovaného světla na úhlu vlákna  $\theta$  pro šest různých vlnových délek  $\lambda$  a dva různé úhly natočení analyzátoru  $\delta$  měřené pomocí vláknového optického spektrometru StellarNet BW-VIS2 (s aperturou optického vlákna  $600\ \mu\text{m}$ ); signál pocházel z malé kruhové oblasti (průměr  $30\ \mu\text{m}$ ) ve středu vzorku kolagení tkáň.

parametrem, který je určen na základě nejlepší korelace s naměřenými hodnotami maximalizací Pearsonova koeficientu [68]. Orientace vlákna se rovná úhlu vyhasnutí vlákna (minimu intenzity).

Druhá sada 18 snímků s vychýlenými polarizátory ( $\delta \neq 0^\circ$ ) pomáhá v rozhodnutí, které ze dvou možností vyhodnocení (hledané minimum) v rozsahu  $180^\circ$  je to správné. Minimum nalevo od vzrostlého maxima je ono hledané minimum.

Oproti původnímu algoritmu Nováka a kol. byl významně snížen nárok na výpočetní čas a vyhodnocení probíhá v každém pixelu, namísto vyhodnocování v ROI, neboli v oblastech  $10 \times 10$  px. Dále byl zvýšen nárok na počet vstupních snímků. Pro popsání sinusovky stačí tři hodnoty, pro  $\pi$ -periodickou funkci už ale nikoliv. Minimální počet snímků nutných ke správné detekci směrů vláken bude uveden v podkapitole 4.3. Původní algoritmus je detailně popsán v článku [46] a nebude zde dále rozebrán.

Pro stanovení průběhu intenzity světla při vychýlených filtrech je zapotřebí uvést několik matic. Vlna po průchodu prvním filtrem:

$$\mathbf{E}_0 = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4.2)$$

matice rotace vzorku:

$$R(\theta) = \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta \\ -\sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix}, \quad (4.3)$$

matice rotace druhého polarizátoru:

$$R(\delta) = \begin{bmatrix} \cos \delta & \sin \delta \\ -\sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix}, \quad (4.4)$$

pro  $\delta = 0^\circ$  matice rotace druhého polarizátoru:

$$R(\delta = 0^\circ) = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (4.5)$$

přenosová matice:

$$\alpha = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{yx} \\ \alpha_{xy} & \alpha_{yy} \end{bmatrix}, \quad (4.6)$$

$P_2$  matice:

$$P_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}. \quad (4.7)$$

Vektor elektrického pole vycházející z nastavení polarizačního mikroskopu je dán:

$$\mathbf{E} = R^{-1}(\delta) P_2 R(\delta) R^{-1}(\theta) \alpha R(\theta) \mathbf{E}_0. \quad (4.8)$$

Pro kolmé filtry ( $\delta = 0^\circ$ ) se vektor elektrické intenzity zjednoduší. Mimodiagonální prvky přenosové matice můžeme zanedbat, protože signál z experimentu je prakticky nulový pro násobky  $\pi/2$ . Signál zachycený kamerou je úměrný intenzitě světla vycházejícího z nastavení filtrů:

$$I = |\mathbf{E}|^2 = \frac{1}{8} |\alpha_{xx} + \alpha_{yy}|^2 (1 - \cos 2\delta) + \frac{1}{8} |\alpha_{xx} - \alpha_{yy}|^2 (1 - \cos 4\theta \cos 2\delta - \sin 4\theta \sin 2\delta) + \frac{1}{4} (|\alpha_{xx}|^2 - |\alpha_{yy}|^2) [\cos 2\theta (1 - \cos 2\delta) - \sin 2\theta \sin 2\delta]. \quad (4.9)$$

Než bude použit výraz 4.9 v dalších výpočtech, je vhodné, aby byly omezeny drobné hodnoty  $\delta$  (rozšířením goniometrické funkce v Taylorovu řadu a zachováním pouze nejnižších členů). Finální výraz intenzity světla je nyní:

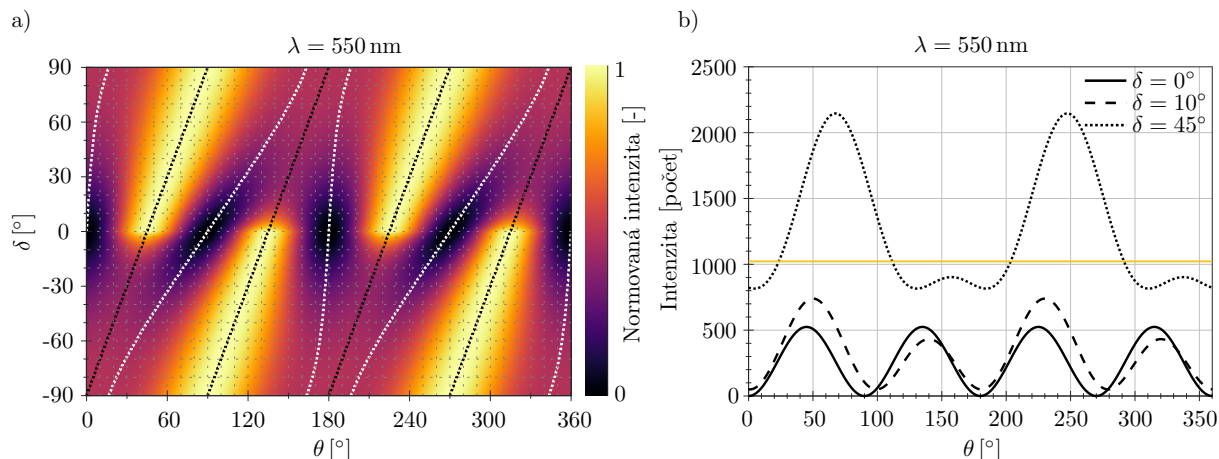
$$I(\theta) \approx \frac{1}{8} |\alpha_{xx} - \alpha_{yy}|^2 [1 - \cos(4(\theta - p)) \cos 2\delta - \sin(4(\theta - p)) \sin 2\delta] + \frac{1}{4} (|\alpha_{xx}|^2 - |\alpha_{yy}|^2) [\cos(2(\theta - p)) (1 - \cos 2\delta) - \sin(2(\theta - p)) \sin 2\delta] + \frac{1}{8} |\alpha_{xx} + \alpha_{yy}|^2 (1 - \cos 2\delta), \quad (4.10)$$

kde  $\alpha_{ii}$  představuje amplitudu prostupu světla polarizovaného podél hlavní osy  $i$ , viz obrázek 3.1 c).

První část vztahu představuje základní průběh pro kolmé nastavení polarizátorů ( $\delta = 0^\circ$ ). Všimněte si, že bude nulová pro  $\alpha_{xx} = \alpha_{yy}$ , což potvrzuje potřebu použití dvojlomných materiálů v těchto experimentech. Druhá část vztahu má periodicitu  $\pi$  a pro vzorky s  $|\alpha_{xx}| \neq |\alpha_{yy}|$  můžeme odlišit dva navzájem kolmé směry vláken.

Rozdíl mezi sousedními lokálními maximy závisí na vlnové délce; na základě měření a simulací byla jako nejlepší kandidát vybrána vlnová délka 550 nm (zelená barva), protože poskytuje největší rozdíl a to více než 50 % mezi  $|\alpha_{xx}|^2$  a  $|\alpha_{yy}|^2$ , jak je ukázáno na obrázku 3.1 c). Abychom zvolili optimální  $\delta$  pro tuto vlnovou délku, byla vypočítána závislost intenzity světla na úhlu natočení vzorku  $\theta$  a úhlu analyzátoru  $\delta$  (v celém jeho rozsahu mezi  $-90^\circ$  a  $+90^\circ$ ). Výsledná mapa intenzity je vynesena na obrázku 4.2 a).

Tato mapa ukazuje, že pro  $\delta \geq 5^\circ$  je každé druhé maximum výrazně sníženo a tím se periodičita mění na  $180^\circ$ . V grafu 4.2 b) jsou zaznamenány řezy mapou intenzit pro úhly analyzátoru  $\delta = 0^\circ, 10^\circ$  a  $45^\circ$ . Algoritmus proto místo toho využívá větší (nesnížené) maximum. Jakmile je nalezeno větší maximum, úhel minimální intenzity odpovídá poloze minima vlevo (vpravo) od tohoto maxima pro kladný (negativní) úhel analyzátoru  $\delta$  (viz obrázek 4.2 a)). Zvolili jsme  $\delta = 10^\circ$ , protože větší odchylka může způsobit přeexponování snímku (viz obrázek 4.2 b)), kde se ukazuje vysoký nárůst intenzity světla pro odchylku  $\delta = 45^\circ$ . Navíc posun mezi maximy  $\pi/2$ -periodických a  $\pi$ -periodických funkcí



**Obrázek 4.2:** a) Intenzity zeleného světla s vlnovou délkou  $\lambda = 550 \text{ nm}$  pro různé úhly analyzátoru  $\delta$  a úhly natočení vzorku  $\theta$  (úhel vlákna  $p$  je implicitně nastaven na  $0^\circ$ ). Černé a bílé tečkované čáry představují maxima a minima intenzity vypočítané pro určitou hodnotu  $\delta$ . b) Horizontální řezy grafem a), představující funkce úhlu natočení vzorku  $\theta$  pro tři různé úhly analyzátoru  $\delta$ . Plná čára ( $\delta = 0^\circ$ ) ukazuje  $90^\circ$  periodicitu, zatímco ostatní úhly ukazují  $180^\circ$  periodicitu, přičemž každé druhé maximum je silně potlačeno. Extrémní rozdíly v intenzitách mezi  $\delta = 0^\circ$  a  $\delta = 45^\circ$  znemožňují praktickou aplikaci této kombinace úhlů, protože křivka intenzity pro  $\delta = 45^\circ$  je nad hodnotou saturace pixelů pro většinu úhlů  $\theta$  (znázorněno oranžovou čarou). Při použití jiné kamery s vyšší úrovní saturace nebo jiným nastavením však lze použít jinou hodnotu  $\delta$  a snadno ji zavést do algoritmu.

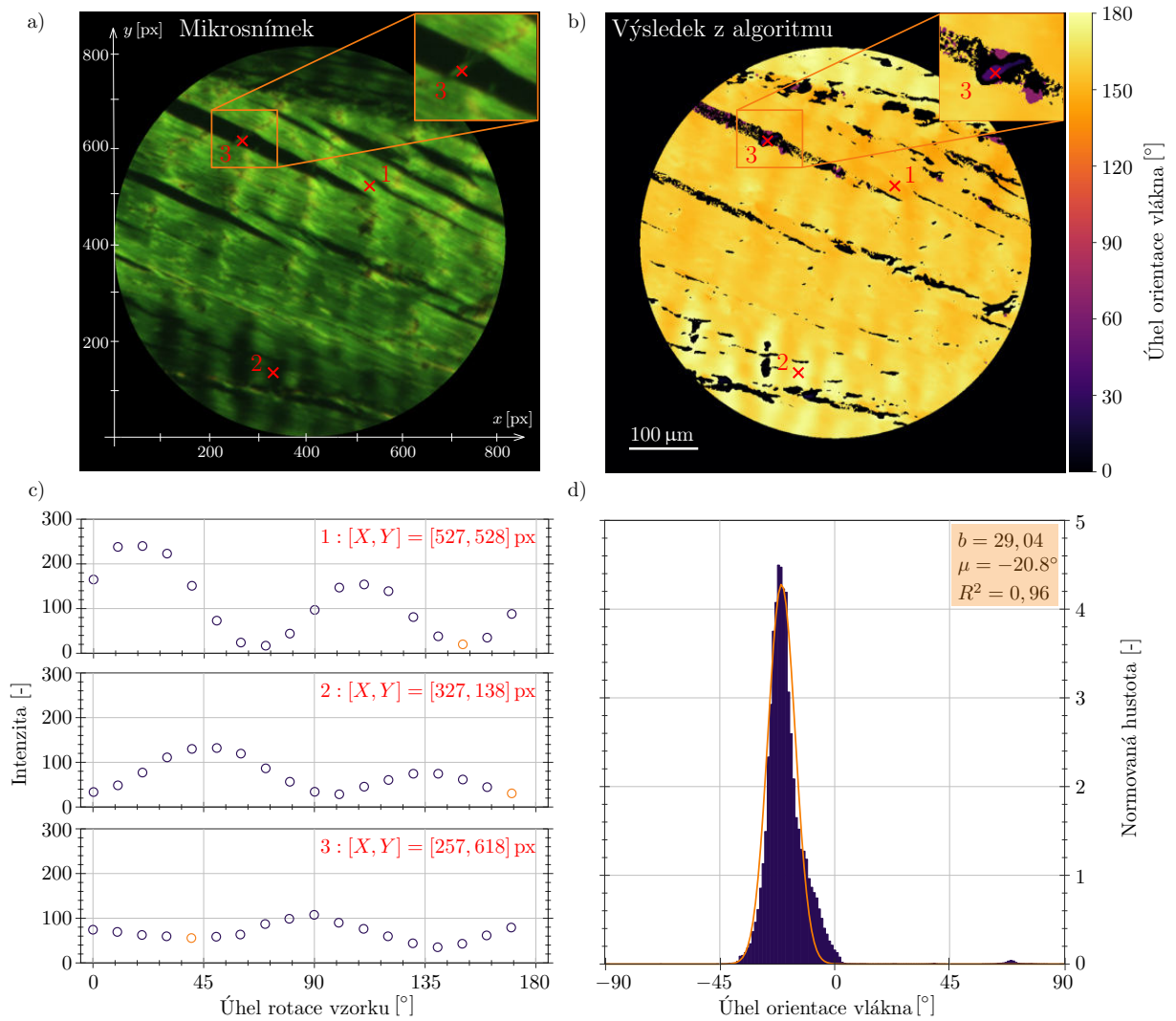
intenzity roste s úhlem  $\delta$  a dosahuje hodnot blízkých  $90^\circ$  pro  $\delta = 45^\circ$ . Všimněte si, že orientaci vlákna lze v zásadě extrahovat pouze ze sady obrázků s otočenými polarizátory, tj. z čárkované nebo tečkované křivky na obrázku 4.2 b). Nepřesnosti ve vyhodnocení relativně plochých minim v nesinové funkci spolu s nepřesnostmi v naměřených parametrech zeslabení vzorku však činí tento přístup spíše nespolehlivým. Tato zjevná náchylnost k chybám byla hlavním důvodem, který stál za rozhodnutím přijmout robustnější dvoufázový postup popsany výše.

Kontrolou rovnice (4.9) je vidět, že pro jednu orientaci kolagenních vláken ( $45^\circ$ ) dojde ke zvýšení intenzity zelené a modré barvy, zatímco pro druhou ( $135^\circ$ ) dojde k poklesu. K ověření této hypotézy byl použit celý výraz pro intenzitu světla danou rovnicí (4.9) a porovnán analytický model s měřeními provedenými pro různé hodnoty  $\delta$ , viz obrázek 4.1. Hodnoty intenzit  $|\alpha_{xx}|^2$  a  $|\alpha_{yy}|^2$  lze měřit přímo pomocí konfigurace se zarovnanými polarizátory ( $\delta = 90^\circ$ ). Hodnotu  $|\alpha_{xx} - \alpha_{yy}|^2$  lze získat úpravou měření pro  $\delta = 0^\circ$ . Poslední neznámá  $|\alpha_{xx} + \alpha_{yy}|^2$  se pak snadno získá z rovnosti:

$$|\alpha_{xx} + \alpha_{yy}|^2 + |\alpha_{xx} - \alpha_{yy}|^2 = 2(|\alpha_{xx}|^2 + |\alpha_{yy}|^2). \quad (4.11)$$

## 4.1. Verifikace algoritmu

Protože funkčnost původního algoritmu s periodicitou  $\pi/2$  byla již ověřena na umělých snímcích i na měkkých tkáních v [46], bylo ověřeno pouze navrhované rozšíření na  $180^\circ$  periodicitu. Za tímto účelem byl vybrán vzorek prasečí Achillovy šlachy, protože orientaci jejích jednosměrných lehce zvlňných vláken lze snadno ručně změřit (viz obr. 4.3). Křivky



**Obrázek 4.3:** Ověření algoritmu na třech různých místech ve vybrané oblasti vzorku prasečí Achillovy šlachy. Obrázek a) ukazuje mikrosnímek (oblast se 3. pixelem je zvětšená v pravém horním rohu) s nastavením pro zelenou barvu a při  $\delta = 0^\circ$ . Mikrosnímek vyhodnocený navrhovaným algoritmem je znázorněn v barevné škále v b). Grafy c) ukazují závislost intenzity světla ve vybraných třech pixelech na úhlu natočení vzorku s vychýlenými polarizátory. Minimum nalevo hlavního maxima (oranžový kroužek) označuje úhel vlákna. Také 3. pixel se zcela odlišnou orientací byl vyhodnocen správně. Histogram získaný pro všechny pixely je zobrazen na grafu d) a interpolován pomocí von Misesovy distribuční funkce, kde jsou uvedeny i její parametry. Vodorovný směr odpovídá  $0^\circ$ .

intenzity světla byly vyhodnoceny jak s kolmými, tak s vychýlenými polarizátory pro tři vybrané pixely, kde vlákno v pixelu 3 je téměř kolmé k orientaci vlákna dominující většině vzorku. Nejprve se z  $\pi/2$ -periodické funkce intenzity (zaznamenané kolmými polarizátory) určí orientace vlákna v každém pixelu (měřeno jako odchylka od vodorovného směru). Poté jsou hlavní maxima, která se zvětšují při záznamu s vychýlenými polarizátory (pro  $\delta = 10^\circ$ ), rozeznatelná v průbězích na obrázku 4.3 c) a úhel vlákna je určen jako úhel minima umístěného hned vlevo od hlavního (většího) maxima v odpovídající  $\pi$ -periodické funkci intenzity.

Druhá sada snímků měřených vychýlenými polarizátory tedy slouží pouze jako pomůcka, která umožňuje volit mezi dvěma vzájemně kolmými orientacemi vláken určenými v prvním kroku. Nakonec, abychom získali strukturální parametry potřebné pro konstitutivní modely, je výsledný histogram (obrázek d) proložen následující von Misesovou distribuční funkcí [6]:

$$\varrho(\varphi) = \frac{e^{(b \cos(2(\varphi-\mu)))}}{\pi I_0(b)}, \quad (4.12)$$

kde  $b$  je parametr koncentrace,  $\mu$  je střední úhel distribuce,  $\varphi$  je úhel vlákna ve vyšetřovaném pixelu a  $I_0(b)$  je Besselova funkce. Kvalita této aproximace je hodnocena koeficientem determinace  $R^2 \in \langle 0,1 \rangle$ . Koeficient determinace  $R^2$  udává jaký podíl rozptylu v pozorování závislé proměnné se podařilo regresí vysvětlit, tedy větší hodnoty znamenají větší úspěšnost regrese. [69] Tato aproximace a její parametry jsou zobrazeny s histogramy na všech příslušných obrázcích.

## 4.2. Validace algoritmu

Obrázek 4.4 ukazuje výsledky validace, tj. srovnání mezi automatizovaným algoritmem a manuálními měřeními. Výsledky ručního měření s přibližně 300 hodnocenými oblastmi čtvercového tvaru (každá o velikosti cca  $39 \times 39$  pixelů) jsou prezentovány v histogramech.

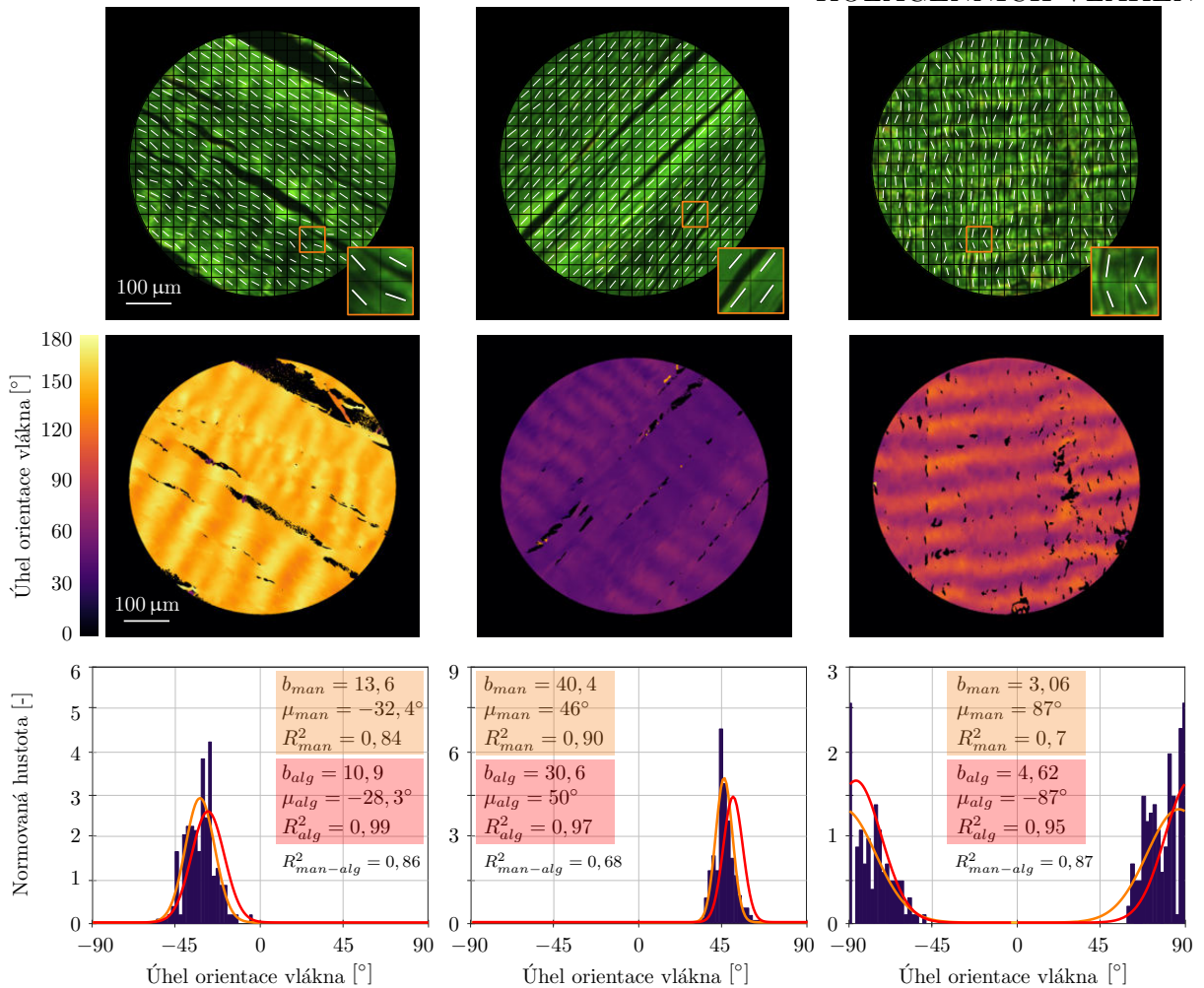
Odchytky mezi parametry ručního a automatizovaného vyhodnocení (mezi  $4^\circ$  a  $6^\circ$  pro střední úhel) lze přičíst (řádově) menšímu počtu ručně vyhodnocovaných ploch. To je indikováno jejich nižšími hodnotami koeficientu determinace  $R_{man}^2$ , zatímco pro automatizovaný algoritmus je aproximace histogramů perfektní ( $R_{alg}^2 > 0,96$ ). Manuální histogramy evidentně trpí nízkým počtem měření a následně vlivem šumu, což potvrzuje lepší shoda dvou méně přesných prokládacích křivek manuálních dat s proložením dat algoritmu (reprezentovaného  $R_{man-alg}^2$ ) na obrázku 4.4 než u samotných ručních měření ( $R_{man}^2$ ).

## 4.3. Počet mikrosnímků potřebných k detekci orientace kolagenních vláken

Dosavadní prezentovaný postup využívá dvě sady 18 snímků s krokem rotace  $10^\circ$ . Aby byla snížena časová náročnost, bylo na algoritmu a na snímcích z jedné měřené oblasti prasečí Achillovy šlachy a aorty testováno, jaký je minimální počet snímků nutných k detekci správné orientace kolagenních vláken bez výrazné ztráty informace nebo přesnosti. Pro Achillovu šlachu je srovnání na obrázku 4.5. Procento udává část ohodnocených pixelů. Nevyhodnocené pixely představují díry nebo tkáně jiné než kolagen, které byly při výpočtu vyřazeny na základě některého z kritérií. Výsledné histogramy v levém dolním rohu mikrosnímků jsou proloženy von Misesovou distribuční funkcí.

Přestože ve všech srovnávaných variantách byl střední úhel správně vyhodnocen, v ostatních parametrech rozdělení jsou značné rozdíly. Achillova šlacha sestává převážně z kolagenních vláken, měly by být vyhodnoceny všechny pixely s výjimkou děr mezi jednotlivými svazky. Zatímco první tři vyhodnocené mikrosnímky jsou ve všech parametrech téměř identické, poslední histogram (pouze na základě 3 snímků) má nižší počet vyhodnocených pixelů, značné množství chybně vyhodnocených úhlů (posunutých o  $90^\circ$ ) a odlišný

### 4.3. POČET MIKROSNÍMKŮ POTŘEBNÝCH K DETEKCI ORIENTACE KOLAGENNÍCH VLÁKEN

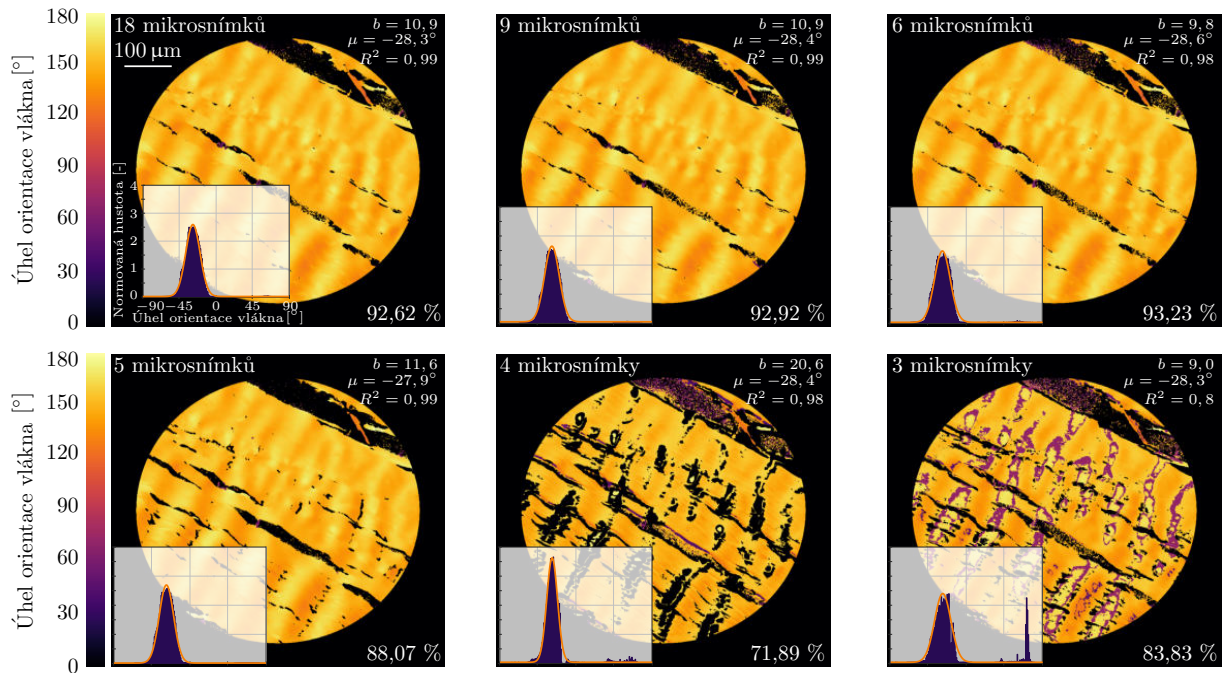


**Obrázek 4.4:** Ověření algoritmu s prasečí Achillovou šlachou pomocí ručního měření úhlů vláken ve vyznačených oblastech. Horní mikrosnímky ukazují cca 300 vyšetřovaných čtvercových oblastí s úhly vláken stanovenými pro jednotlivé oblasti (zvětšené ve výřezech) ručně operátorem. Obrázky v prostředním řádku ukazují (v barevné škále) orientaci vlákna vyhodnocenou algoritmem. Histogramy z ručních měření jsou zobrazeny ve spodním řádku, doplněné v legendách o parametry von Misesova rozdělení přizpůsobené ručním měřením (s indexy *man* a oranžovou křivkou) a výsledkům algoritmu (s indexy *alg* a červenou křivkou).

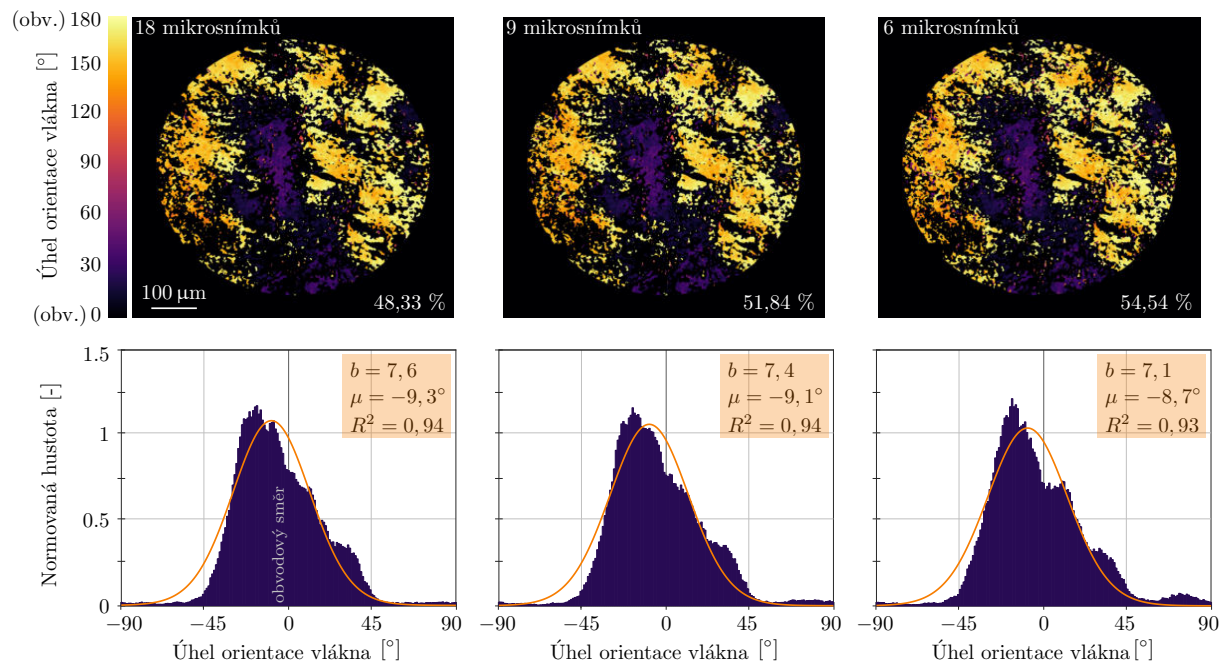
parametr koncentrace  $b$ . Pro histogram založený na 4 snímcích jsou tyto chyby také významné, i když nižší. Naproti tomu 5 snímků dává správné parametry distribuce, ale vyšší procento nevyhodnocených pixelů (tj. pixelů, které vypadly, protože jejich Pearsonův koeficient byl pod stanovenou minimální prahovou hodnotou a orientaci vlákna nebylo možné spolehlivě určit). Je zde tedy riziko větších chyb při hodnocení méně homogenních tkání. Následně bylo rozhodnuto, že 6 snímků (s krokem rotace o  $30^\circ$ ), bude představovat nezbytné minimum, které bude zaznamenáno jak s kolmými, tak s natočenými polarizátory. To se může zdát v rozporu s dřívějším tvrzením, že 3 snímky jsou dostatečné pro správné vyhodnocení minim v rámci  $\pi/2$ -periodicity průběhu intenzity světla zaznamenaného kolmými polarizátory, viz Novák a kol. [46]. Tato nekonzistence je však způsobena naším rozhodnutím zachovat počet snímků v obou sadách (s kolmými i natočenými polarizátory) stejný, abychom předešli chybám obsluhy a zvýšili přesnost.



### 4.3. POČET MIKROSNÍMKŮ POTŘEBNÝCH K DETEKCI ORIENTACE KOLAGENNÍCH VLÁKEN



**Obrázek 4.5:** Porovnání výsledných histogramů a parametrů jejich von Misesových distribucí získaných různými počty vstupních mikrosnímků prasečí Achillovy šlachy. Vzorek byl záměrně orientován v úhlu cca  $152^\circ = -28^\circ$ .



**Obrázek 4.6:** Porovnání výsledných histogramů s různým počtem vstupních mikrosnímků prasečí aorty z obvodově-axiální roviny.

### 4.3. POČET MIKROSNÍMKŮ POTŘEBNÝCH K DETEKCI ORIENTACE KOLAGENNÍCH VLÁKEN

Nakonec, abychom ověřili vhodnost algoritmu pro tkáně se složitějším uspořádáním kolagenu, provedli jsme stejné srovnání pro TM stěny prasečí aorty. Zde byla vyhodnocena přibližně polovina pixelů, což odpovídá procentu kolagenu v této vrstvě (viz podkapitola 2.1). Histogramy na obrázku 4.6 potvrzují, že střední úhel a parametr koncentrace distribuce byly ve všech případech vyhodnoceny správně a přesně. Lze konstatovat, že pro hodnocení srovnatelných tkání stačí 6 otočených mikrosnímků, aby nedošlo ke snížení počtu hodnocených pixelů nebo nesprávnému vyhodnocení jejich směrů. Popis algoritmu, jeho validace i verifikace byly publikovány v časopise *BioMed Research International* v roce 2021 [70].

# 5. Hyperelastické konstitutivní modely materiálu

Konstitutivní modely byly vymyšleny a zavedeny z důvodu potřeby matematického popisu chování materiálu za různých stavů deformace. Vzhledem k velkým u velkých tepen více než 90% vratným deformacím v průběhu zatěžování tkáně používáme modely hyperelastické. Prvním typem jsou modely fenomenologické (Yeoh, Mooney-Rivlin, ortotropní Fung atd.), které nerespektují vnitřní strukturu a vychází pouze z mechanického testování tkání (zkouška jednoosá tahová, ekvibiaxiální, tahem v rovinné deformaci, stlačování aj.), díky kterému můžeme zjistit intramurální (probíhající ve stěně při fyziologických tlacích) a zbytková napětí, elastickou deformační energii při pulzaci aj. Druhým typem jsou strukturně motivované modely, které jsou kromě mechanických parametrů založeny i na analýze intramurálních složek, především kolagenu, ale i elastinu a buněk hladkého svalstva, vstupy jsou hlavní směr vláken, jejich rozptyl a vlnitost. Tyto vstupy jsou už dobře známé u velkých cév některých savčích druhů např. u myši, králíků či prasat. U lidí je získání těchto dat vzácné až ojedinělé.

## 5.1. Izotropní

Model Neo-Hooke sice spadá mezi fenomenologické modely, má i strukturní zdůvodnění založené na veličině  $n$ , která zahrnuje počet molekulárních řetězců v jednotkovém objemu:

$$W = \frac{G}{2} (\bar{I}_1 - 3) + \frac{1}{d} (J - 1)^2, \quad (5.1)$$

kde  $G = 2nkT$  je počáteční modul pružnosti ve smyku,  $\bar{I}_1$  je modifikovaný 1. invariant pravého Cauchy-Greenova tenzoru deformace získaný sečtením druhých mocnin modifikovaných (používané pro popis pouze deviátorové složky deformace) hodnot hlavních poměrných protažení,  $d = 2/K$  je parametr stlačitelnosti materiálu a  $J$  je 3. invariant tenzoru deformačního gradientu daný součinem hlavních poměrných protažení. Dalšími veličinami jsou Boltzmanova konstanta  $k$ , absolutní teplota  $T$  a objemový modul pružnosti  $K$ . [71]

## 5.2. Anizotropní

Pro popis cév, u kterých známe dominantní směrovou orientaci vláken a disperzi kolem ní jsou nejvhodnější anizotropní hyperelastické modely. Energie napjatosti sestává z objemové a deviátorové části, která se dále skládá z izotropního příspěvku  $W_{iso}$  matrice a anizotropního příspěvku vláken  $W_{aniso}$ . U tepen používáme jen nestlačitelné modely, takže energie napjatosti je vyjádřena jako:

$$W = W_{dev}(C, A, B) = W_{iso}(C) + W_{aniso}(C, A, B), \quad (5.2)$$

kde  $A$  a  $B$  představují strukturální tenzory definující směry dvou osnov vláken a  $C$  je pravý Cauchy-Greenův tenzor deformace. [71]

### Holzapfel 2000

Nejcitovanějším a nejpoužívanějším konstitutivním modelem pro cévní stěnu se stal model Holzapfela, Gassera a Ogdena z roku 2000 [72]. Céva je modelována jako dvouvrstvá (TM a TA) tlustostěnná nelineárně elastická nestlačitelná trubice. Každá vrstva obsahuje matici vyztuženou dvěma osnovami vláken uspořádaných symetricky kolem obvodového směru. Model je určen (používán) ke studiu odezvy tepen kombinovaným namáháním (axiální předepnutí, vnitřní tlak, krut). Každou vrstvu vystihují tři materiálové parametry. Energie napjatosti  $W$  je dána izotropní částí (maticí), která je popsána modelem neo-Hook, a anizotropní částí (dvěma osnovami vláken):

$$W = \frac{c}{2} (\bar{I}_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} \left[ e^{k_2(\bar{I}_i - 1)^2} - 1 \right]. \quad (5.3)$$

Pro každou vrstvu získáme tři materiálové parametry:  $c > 0$  a  $k_1 > 0$  jsou napěťové parametry a  $k_2 > 0$  je bezrozměrný parametr.  $\bar{I}_1$  je modifikovaný invariant pravého Cauchy-Greenova tenzoru deformace ( $C$ ),  $\bar{I}_4$  a  $\bar{I}_6$  jsou modifikované pseudoinvarianty  $C$ , které vyjadřují deformaci výtuzných vláken a popisují deviátorovou složku deformace:

$$\bar{I}_4 = \bar{C} : A = a_i \bar{C}_{ij} a_j, \quad (5.4)$$

$$\bar{I}_6 = \bar{C} : B = b_i \bar{C}_{ij} b_j, \quad (5.5)$$

kde  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  a  $\lambda_3$  jsou poměrná protažení.

### Holzapfel 2005

O pět let později Holzapfel a kol. představuje vylepšení modelu z roku 2000 [25]. Energie napjatosti je představena ve tvaru:

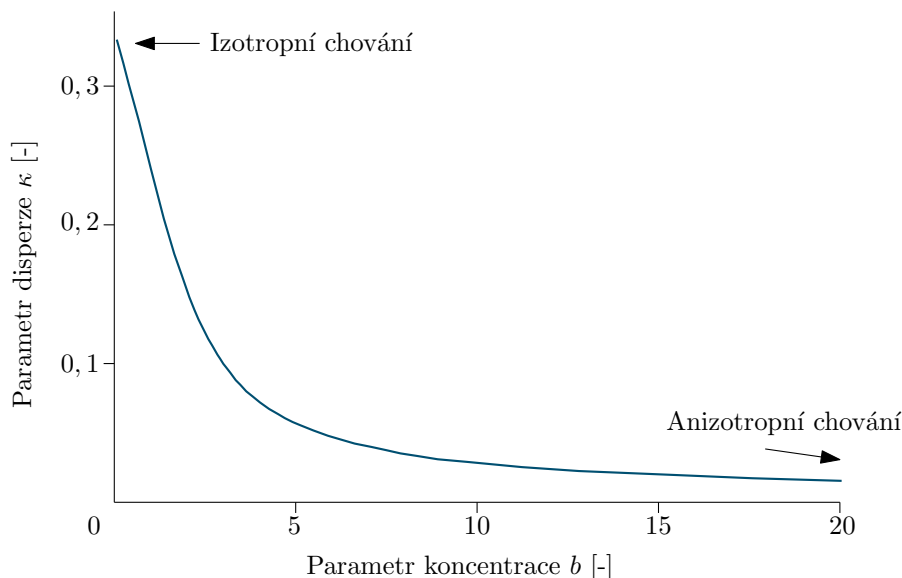
$$W = c (I_1 - 3) + \frac{k_1}{k_2} \sum_{i=4,6} \left( e^{k_2[(1-\varrho)(I_1-3)^2 + \varrho(I_i-1)^2]} - 1 \right), \quad (5.6)$$

kde  $\varrho \in \langle 0; 1 \rangle$  je bezrozměrný parametr, který zde slouží jako váhový faktor. Pro  $\varrho = 1$  dostáváme model Holzapfel2000 [viz rovnice (5.3)] a pro  $\varrho = 0$  dostáváme izotropní odezvu s exponenciálním zpevněním. Díky tomuto parametru dosáhneme nenulového zpevnění i mimo dominantní směry vláken.

### Gasser 2006

Model Gassera a kol. z roku 2006 [6] v sobě jako první zahrnuje disperzi vláken. Zavádí v něm parametr disperze  $\kappa \in \langle 0; 1/3 \rangle$ , který získáme přepočtem parametru koncentrace  $b \in \langle 0; \infty \rangle$  z von Misesovy distribuční funkce. Jejich vztah můžeme vidět na obrázku 5.1. Energie napjatosti je dána tvarem:

$$W = \frac{c}{2} (\bar{I}_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} \left( e^{k_2[\kappa \bar{I}_1 + (1-3\kappa)\bar{I}_i - 1]^2} - 1 \right). \quad (5.7)$$



**Obrázek 5.1:** Znázornění závislosti parametru disperze a koncentrace. Převzato a upraveno z [6].

Oproti předešlým konstitutivním modelům můžeme o tomto říct, že staví na poznacích z mikrostruktury tkáně a její analýzy z histologických řezů. Parametr koncentrace  $b$  jsme schopni získat z našeho algoritmu přímo pro konkrétní oblast vzorku nebo jako průměrnou hodnotu pro více oblastí za účelem pokrytí větší (popř. celé) oblasti vzorku. Parametr  $\kappa$  poté získáme následující integrací:

$$\kappa = \frac{1}{4} \int_0^{\pi} \varrho(\Theta) \sin^3 \Theta d\Theta, \quad (5.8)$$

$$\varrho(\Theta) = 4 \sqrt{\frac{b}{2\pi}} \frac{e^{b(\cos(2\Theta)+1)}}{\operatorname{erfi}(\sqrt{2b})}, \quad (5.9)$$

kde  $\Theta \in \langle 0; 2\pi \rangle$  je směrový úhel a  $\operatorname{erfi}(x)$  je imaginární chybová funkce. Konkrétní význam dalších členů naleznete v [6]. Von Misesova distribuční funkce, se kterou dále budeme pracovat, je definovaná takto:

$$\bar{\varrho}(\Theta) = \frac{e^{b \cos(\Theta-\mu)}}{2\pi I_0(b)}, \quad (5.10)$$

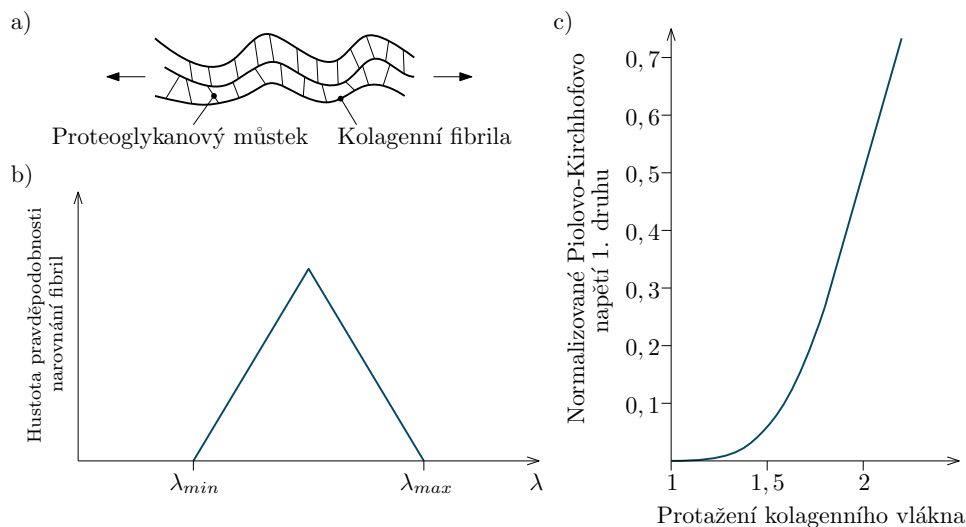
kde  $\mu$  je střední hodnota, kolem které je distribuce symetricky rozložena a  $I_0(b)$  je Besselova funkce:

$$I_0(b) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\pi} e^{b \cos \Theta} d\Theta. \quad (5.11)$$

## Martufi a Gasser 2011

Vychází z představy propojení kolagenních fibril proteoglykanovými můstky [73], viz obrázek 5.2 a). Dále na obrázku 5.2 b) můžete vidět trojúhelníkovitý bilineární průběh hustoty pravděpodobnosti narovnání jednotlivých vláken (v neo-Hookovské matici), kde při  $\lambda_{min}$  dojde k protažení prvního vlákna, které začíná nést zatížení, a při  $\lambda_{max}$  dojde k napřímení nejvíce zvlněných vláken, takže zatížení nesou všechna vlákna. Trojúhelníkovitý průběh

nevychází z experimentu, ale je to autory zvolený nejjednodušší průběh hustoty pravděpodobnosti.



**Obrázek 5.2:** a) Schématické zobrazení propojení kolagenních fibril proteoglykanovými můstky, b) schéma průběhu hustoty pravděpodobnosti napřimování různě zvlněných vláken, c) znázornění velkého deformačního zpevnění v modelu Martufi2011. Překresleno z [73].

Integrací kumulativní distribuční funkce získáme odezvu kolagenních vláken  $\sigma(\lambda)$  (1. Piola-Kirchhoffovo napětí):

$$\sigma(\lambda) = \begin{cases} 0 & 0 < \lambda \leq \lambda_{min} \\ \frac{2k}{3a^2} (\lambda - \lambda_{min})^3 & \lambda_{min} < \lambda \leq b \\ k \left[ \lambda - \frac{2(\lambda - \lambda_{max})^3}{3a^2} - b \right] & b < \lambda \leq \lambda_{max} \\ k(\lambda - b) & \lambda_{max} < \lambda \leq \infty \end{cases} \quad (5.12)$$

kde  $k$  je tuhost vlákna,  $a = \lambda_{max} - \lambda_{min}$  a  $b = (\lambda_{max} + \lambda_{min}) / 2$  je střední hodnota. Celkový příspěvek kolagenních vláken dostaneme integrací přes jednotkovou kouli, v níž je brána v úvahu i jejich distribuce kolem hlavního směru.

## Holzapfel 2015

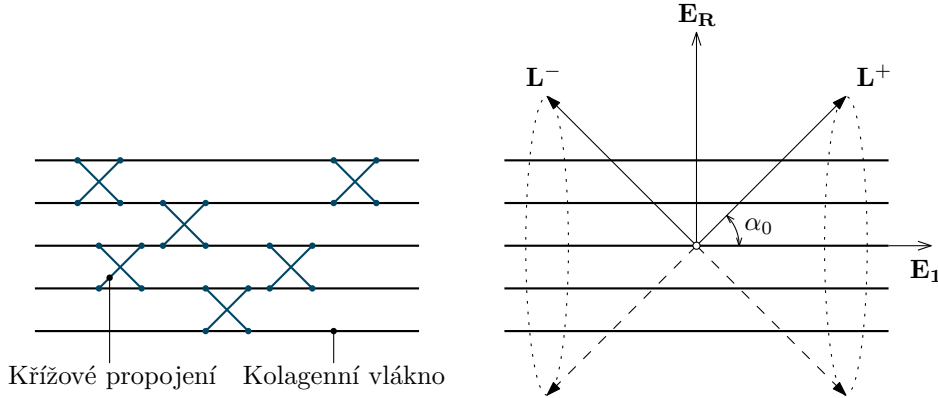
Nesymetrický disperzní model představil Holzapfel a kol. ve své studii v roce 2015 [74]. Využívá konstrukce nového strukturního tenzoru a von Mises distribuční funkce. Studie dále přináší dobře vypracovaný přehled dalších dosavadních konstitutivních modelů uvažujících disperzi kolagenních vláken, které zde nejsou zmíněny (viz tabulka 1 v [74]). Modely jsou zde rozděleny podle jejich přístupu. První přístup je úhlová integrace (*angular integration* – AI) a druhý přístup je za pomoci zobecněného strukturního tenzoru (*generalized structure tensor* - GST).

## Holzapfel a Ogden 2019

Cílem práce Holzapfela a Ogdena z roku 2019 [75] bylo popsat efekt křížového propojení kolagenních vláken v mikrostruktuře cévní tkáně. Tento model je tak považován za první

### 5.3. POUŽITÍ PARAMETRŮ Z HISTOGRAMŮ DO KONSTITUTIVNÍCH MODELŮ

3D model vystihující anizotropní odezvu arteriální stěny s propojením kolagenních vláken. Výzkum nejprve směřoval k popisu různých hustot zesílení a jejich tuhosti na základě jednoosých zkoušek. Dále je zde ilustrováno různé uspořádání zesílení kolagenních vláken a křížových propojení. Výsledný model obsahuje dvě rodiny vláken uspořádaných ve 3D s dvěma sadami křížových vazeb mezi nimi v izotropní neo-Hookovské matici, viz obrázek 5.3.



**Obrázek 5.3:** Schématické zobrazení křížových propojení kolagenních vláken. Vpravo je přibližnění propojení, které je pod úhlem  $\alpha_0$  vzhledem k orientaci vláken  $E_1$ . Překresleno z [75].

Energie napjatosti je zavedena ve tvaru:

$$W = \frac{1}{2}\mu(I_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \left[ e^{k_2(I_4 - 1)^2} - 1 \right] + \frac{1}{2}\nu(I - 1)^2 + \frac{1}{2}\kappa(I_8 - c_0)^2, \quad (5.13)$$

kde první člen zastupuje izotropní matici, druhý člen je exponenciální forma pro popis kolagenních vláken známá z modelu Holzapfel 2000, třetí člen se věnuje křížovým propojením a jejich příspěvku k tuhosti tkáně, kde  $\nu > 0$  je tuhostní parametr zesílení, čtvrtý člen představuje vzájemnou interakci vláken se zesílením, kde  $\kappa > 0$  je napětový parametr, a  $c_0 = \cos \alpha_0$ , kde  $\alpha_0$  je úhel mezi vlákny a křížovým propojením.

Interakci mezi vlákny a zesílením je nutné dále zkoumat a k ověření robustnosti vystavovat model dalším mechanickým zkouškám a experimentům.

### 5.3. Použití parametrů z histogramů do konstitutivních modelů

V roce 2012 Gasser a kol. [2] publikovali studii zaměřenou na 24 vzorků (cca  $1 \times 0,5$  cm) aneurysmat z lidských břišních aort. Použili PLM s univerzálním otočným stolem a vzorky zafixovali, nařezali na cca  $7 \mu\text{m}$  tlusté řezy a obarvili. Vzorky nebyly zatíženy a z každého vzorku byly použity dva histologické řezy z TM a jeden z TA. Data získaná manuální metodou proložili  $\pi$ -periodickým Binghamovým rozdělením:

$$\varrho(\Phi, \Theta) = \frac{1}{c} \exp \left[ \kappa_1 (\cos \Phi \cos \Theta)^2 + \kappa_2 (\cos \Phi \sin \Theta)^2 \right], \quad (5.14)$$

kde  $\Theta$  je azimutální a  $\Phi$  je elevační úhel kolagenních vláken,  $\kappa_1$  a  $\kappa_2$  definují tvar rozdělení (pozice symetrie, počet peaků) a  $c$  je normalizační parametr. Vyhodnocené parametry byly

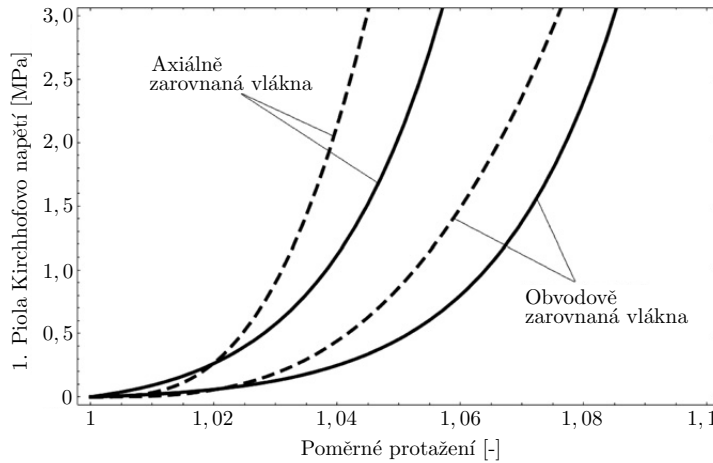
### 5.3. POUŽITÍ PARAMETRŮ Z HISTOGRAMŮ DO KONSTITUTIVNÍCH MODELŮ

použity jako vstupy do dvou různých konstitutivních modelů. Prvním byl fenomenologický model motivovaný prací Funga a kol. [20], kde 1. Piola-Kirchhoffovo napětí je dáno vztahem:

$$\sigma(\lambda) = \begin{cases} 0 & 0 < \lambda \leq \lambda_{min} \\ 2k_1 (1 + k_3 \sin \Theta) (\lambda^2 - 1) \exp [k_2 (\lambda^2 - 1)] & \lambda_{min} < \lambda < \infty \end{cases} \quad (5.15)$$

kde  $k_1$ ,  $k_2$  a  $k_3$  jsou parametry modelu a  $\lambda$  je protažení kolagenních vláken. Parametr  $k_3$  definuje jak se mění vlastnosti kolagenních vláken s ohledem na azimutální úhel. Bezrozměrný parametr  $k_2$  určuje tvar napětově-deformační křivky a  $k_1$  je napětový parametr. Druhý použitý model je podle práce Martufi a Gasser 2011 (více informací o modelu je v kapitole 5.2), kde 1. Piola Kirchhoffovo napětí je v rovnici 5.12.

Na obrázku 5.4 je znázorněná predikce obou konstitutivních modelů na základě vyhodnocených dat z PLM. Neidentifikovali žádný významný rozdíl mezi TA a TM, což může být způsobeno nízkým počtem vyhodnocených směrů a nepřesným manuálním vyhodnocením. Naopak obrázky č. 3 z PLM ve studii ukazují na jednu rodinu vláken zvlhnutou a zarovnanou do obvodového směru u TM a dvě na sebe kolmé rodiny vláken v TA.



**Obrázek 5.4:** Deformačně-napětová odezva axiálně a obvodově zarovnaných kolagenních vláken. Plná čára představuje odezvu Fungova modelu a přerušovaná modelu Martufi a Gasser 2011. Překresleno z [2].

V publikaci Wana a kol. [56] bylo použito a srovnáno několik modelů: model čtyř rodin vláken, model s přímým začleněním histogramů distribuce kolagenu, model distribuce vláken se začleněním Gaussovským rozdělením a součtem tří Gaussovských rozdělení.

**Model čtyř rodin vláken** představený v [76], neboli rozšířený Holzapfel 2000, předpokládá, že se tkáň skládá z izotropní amorfní pevné látky se čtyřmi rodinami vláken orientovanými v axiálním, obvodovém a ve dvou diagonálních směrech se zachováním symetrie s energií napjatosti:

$$W = \frac{b_0}{2} (I_1 - 3) + \sum_{k=1}^4 \frac{b_1^k}{2b_2^k} \left[ e^{b_2^k ((\lambda^k)^2 - 1)^2} - 1 \right], \quad (5.16)$$

kde  $b_0$ ,  $b_1^k$  a  $b_2^k$  jsou materiálové parametry ( $k$  představuje rodinu vláken),  $\lambda^k$  je protažení  $k$ -té rodiny vláken, ve kterém jsou schovány úhly, pod kterými se rodiny vláken nacházejí. Tento model v sobě nezačleňuje rozptyly jednotlivých rodin, aby tato informace nebyla



### 5.3. POUŽITÍ PARAMETRŮ Z HISTOGRAMŮ DO KONSTITUTIVNÍCH MODELŮ

ztracena, jako další byl použit **model s přímým začleněním distribuce kolagenu** představen v [77] s energií napjatosti:

$$W = \frac{b^e}{2} (I_1 - 3) + \frac{b_1^m}{2b_2^m} \left[ e^{b_2^m \left( (\lambda_\theta^m)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] + \frac{b_1^c}{2b_2^c} \sum_{k=1}^{45} \phi^k \left[ e^{b_2^c \left( (\lambda^k)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right], \quad (5.17)$$

kde interval mezi  $-90^\circ$  a  $90^\circ$  byl rozdělen na 45 rodin vláken se stejnými materiálovými parametry  $b^e$ ,  $b_1^m$ ,  $b_2^m$ ,  $b_1^c$  a  $b_2^c$ .  $\phi$  je intenzita sloupce histogramu při  $k$ -tém úhlu vlákna.

**Model distribuce vláken se začleněným Gaussovským rozdělením** má energii napjatosti:

$$W = \frac{b^e}{2} (I_1 - 3) + \frac{b_1^m}{2b_2^m} \left[ e^{b_2^m \left( (\lambda_\theta^m)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] + \frac{b_1^c}{2b_2^c} \int_{-90}^{90} \phi(\alpha) \left[ e^{b_2^c \left( (\lambda^k)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] d\alpha, \quad (5.18)$$

kde  $\phi(\alpha)$  reprezentuje Gaussovu distribuci:

$$\phi(\alpha) = a_p e^{-\left( \frac{\alpha - b_p}{c_p} \right)^2}, \quad (5.19)$$

kde  $a_p$ ,  $b_p$  a  $c_p$  jsou konstanty získané fitováním této distribuční funkce na naměřený histogram úhlů orientací vláken.

Suma **tří Gaussovských rozdělení** detailněji popíše naměřenou distribuci a její energie napjatosti je dána:

$$\begin{aligned} W = & \frac{b^e}{2} (I_1 - 3) + \frac{b_1^m}{2b_2^m} \left[ e^{b_2^m \left( (\lambda_\theta^m)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] \\ & + \frac{b_1^{ca}}{2b_2^{ca}} \int_{-90}^{90} \phi^a(\alpha) \left[ e^{b_2^{ca} \left( (\lambda^k)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] d\alpha \\ & + \frac{b_1^{cb}}{2b_2^{cb}} \int_{-90}^{90} \phi^b(\alpha) \left[ e^{b_2^{cb} \left( (\lambda^k)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] d\alpha \\ & + \frac{b_1^{cc}}{2b_2^{cc}} \int_{-90}^{90} \phi^c(\alpha) \left[ e^{b_2^{cc} \left( (\lambda^k)^2 - 1 \right)^2} - 1 \right] d\alpha. \end{aligned} \quad (5.20)$$

Bylo prokázáno, že model distribuce vláken využívající tři Gaussovské rozdělení je schopen aproximovat data experimentální mechanické odezvy s nejmenším 95% intervalem spolehlivosti, tedy dobré přizpůsobení distribuce vláken *in vivo* v konstitutivním modelu předpovídá mechanickou odezvu konzistentněji a s menšími chybami.

Ve studii Jadidiho a kol. [62] z roku 2021 byl použit model pro dvě a čtyři rodiny vláken s energiemi napjatosti:

$$W_2 = \frac{c_2}{2} (I_1 - 3) + \sum_{i=col_1, col_2} \frac{k_1}{2k_2} \left[ e^{k_2 E_i^2} - 1 \right], \quad (5.21)$$

$$\begin{aligned} W_4 = & \frac{c_4}{2} (I_1 - 3) + \sum_{i=col_1, col_2} \frac{k_1^{col}}{4k_2^{col}} \left[ e^{k_2^{col} E_i^2} - 1 \right] \\ & + \frac{k_1^{el}}{4k_2^{el}} \left[ e^{k_2^{el} E_{el}^2} - 1 \right] + \frac{k_1^{smc}}{4k_2^{smc}} \left[ e^{k_2^{smc} E_{smc}^2} - 1 \right], \end{aligned} \quad (5.22)$$

kde všechna  $k$  jsou příslušné materiálové parametry.

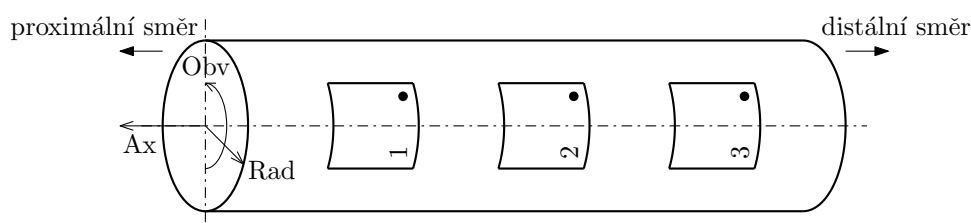
## 6. Experimenty pro zjištění vlivu různé velikosti biaxiální deformace na orientaci a rozptyl vláken

V rámci této kapitoly bylo provedeno několik experimentů pro zjištění vlivu zatížení na změnu orientace a narovnání vláken s vyhodnocením strukturních parametrů potřebných do konstitutivních modelů materiálu. PLM i většina uvedených metod poskytuje informace spíše o lokálních směrech vláken (v každém pixelu, popř. v malé oblasti ROI), než o globálních směrech potřebných pro konstitutivní modely. Některé nedávné studie naznačují, že vztah mezi lokálními a globálními směry by mohl být vyřešen analýzou rozložení směrů vláken pod zatížením, čímž by se eliminovaly účinky vlnitosti [2, 37, 50, 53, 55, 56, 59, 60]. Proto bylo provedeno hodnocení změn v distribuci orientace kolagenních vláken ve stěně prasečí aorty při radiálním stlačení a dvouosém tahu a porovnány různé aproximace získaných histogramů.

K vyhodnocování byl použit univerzální trinokulární polarizační mikroskop s rotačním stolem Padim Drex a 5MPx mikrokamerou Bresser Optik, GmbH. Maximální rozlišení je  $2592 \times 1944$  px se vzorkovací frekvencí 15 snímků za sekundu. Pro snímkování byla v softwaru kamery nastavena hladina složek RGB na 86:150:94 kvůli zvýraznění diatenuace, která je nejvyšší při zelené barvě, viz obrázek 3.1 c).

### 6.1. Příprava histologických řezů

Příprava vzorků prasečích aort pro pozorování pod polarizovaným mikroskopem se provádí ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně (dále FNUSA) podle následujícího zjednodušeného postupu. Z aort byly nejprve vyříznuty čtverce o velikosti  $18 \times 18$  mm s důrazem na zachování a vyznačení obvodového a axiálního směru (viz obrázek 6.1). Vzorky jsou

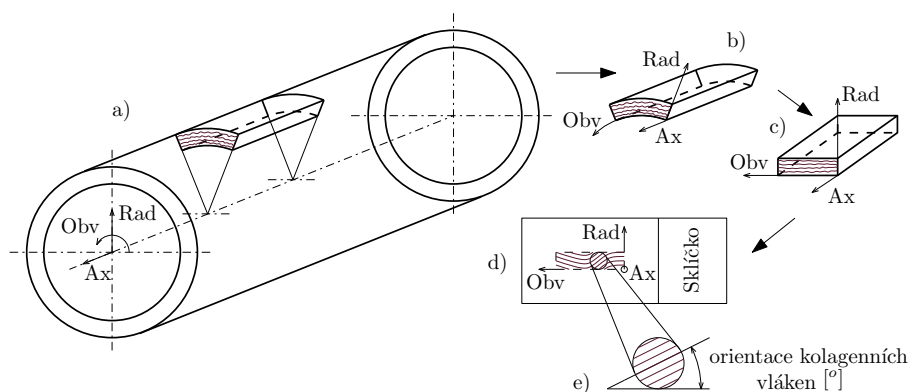


**Obrázek 6.1:** Konvence při vysekování a následném značení obvodového a axiálního směru vzorků prasečí aorty. Proximální směr znamená směrem nahoru neboli k srdci, distální naopak směrem dolů čili od těla.

z aorty vyřezávají těsně vedle sebe a tak, aby neobsahovaly díry od bočních větví tepen.

## 6.2. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI RADIÁLNÍM STLAČENÍ

Po experimentech, kde byly vzorky jednak radiálně stlačeny a nebo dvojose deformovány, byly všechny fixovány v deformovaném stavu v 10% formaldehydu při pokojové teplotě po dobu nejméně 24 hodin. Bylo prokázáno, že formaldehyd má velmi malé účinky na sekundární změny v organizaci kolagenu [78]. Poté byly vzorky převezeny na I. Ústav patologie a anatomie FNUSA. Zde byly podrobeny dalším nutným procesům a to namočením do alkoholu, které způsobí odvodnění vzorku, následně ponořením do xylenu, který vzorek prosytí, a díky kterému se lépe do něj dostane parafín. Po zalití parafínem vždy následuje proces v autotechnikonu (odvodňovací tkáňový automat) a dekalifikace, pokud jsou ve tkáni vápenaté složky, které by bránily nařezání vzorku. Dále byly vzorky z aort nařezány ve všech třech rovinách, pokud to bylo možné, na tenké plátky o tloušťce 5 – 7  $\mu\text{m}$  (viz obrázek 6.2). V poslední fázi byly plátky zbaveny přebytečného vosku, ponořeny do xylenu, poté do alkoholu, následně do destilované vody a nakonec obarveny barvivem PSR (0,1%). Proces histologie je velice náročný a neméně zatížený lidským faktorem.



**Obrázek 6.2:** a) Výsek vzorku na idealizované aortě, b) jeho narovnání na podložce při provedení experimentu, c) provedení řezů v obvodově-radiální rovině, d) umístění na podložní sklíčko, e) znázornění orientace kolagenních vláken. Překresleno z [46].

## 6.2. Hodnocení směrů při radiálním stlačení

V připravené lázni z fyziologického roztoku byla rozmrzána část prasečí aorty. Po ustálení teploty na 36,5°C bylo z aorty vyseknuto devět čtvercových vzorků, které byly očíslovány a označeny dle zavedené konvence. U vzorků byla změřena tloušťka v pěti bodech, poté byly vzorky vloženy do přípravku, viz obrázek 6.3 c). U každého vzorku byla nastaven počáteční referenční stav, kdy šroubovací část s hlavicí se dotýkala horního skla, ale vzorek ještě nestlačovala. Vzorky byly následně stlačeny s různou mírou deformace, např. první vzorek o 1/4 otáčky hlavice, druhý o 1/2, třetí o 3/4 atd. a zafixovány v roztoku 10% formaldehydu.

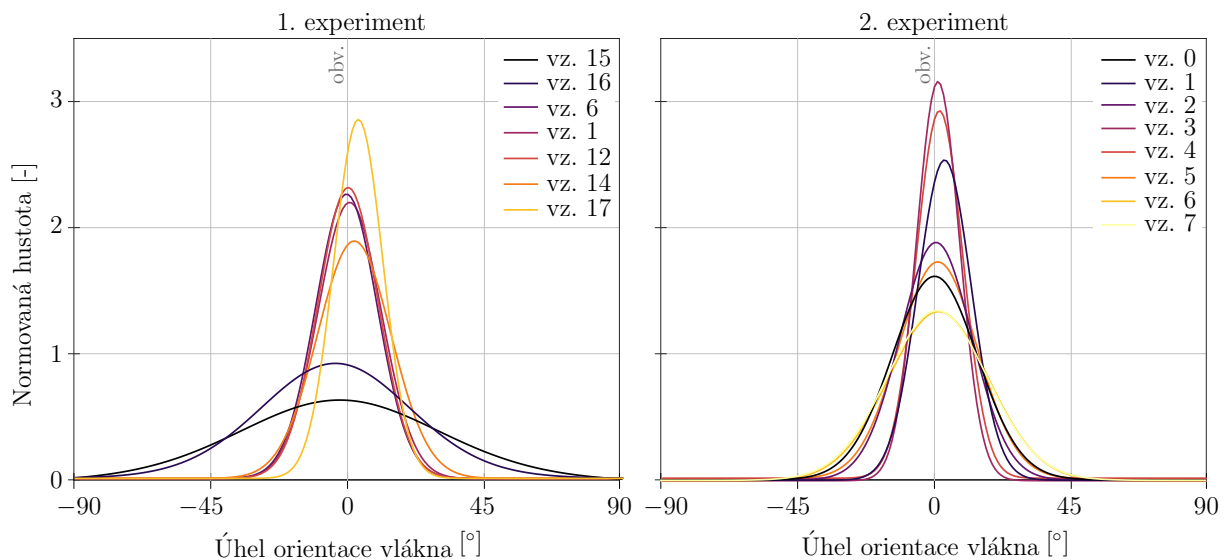
Jeden vzorek byl rovnou přišpendlen k podložce bez zatížení v 10% formaldehydu. Po 24 hodinách stlačení v přípravku v digestoři, byly vzorky vyjmuty, byla změřena tloušťka v pěti bodech u každého vzorku a vypočtena míra deformace, viz tabulka 6.1. Vzorky byly následně převezeny na I. Ústav patologie a anatomie FNUSA, kde z nich byly připraveny histologické řezy v obvodově-radiální rovině. Jelikož byly vzorky umístěny mezi dvěma sklíčky, formaldehyd nezafixoval tkáň dostatečně a vzorky se po vyjmutí zkroutily. Řezy z obvodově-axiální roviny nebylo možné provést. Tento experiment byl proveden pro dvě sady vzorků. Na každém vzorku bylo náhodně vybráno 10 oblastí, které byly nasnímkovány pod polarizačním mikroskopem při zkřížených i vychýlených polarizátorech (10x

## 6.2. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI RADIÁLNÍM STLAČENÍ



**Obrázek 6.3:** a) Rozříznutá část aorty s vyseknutými čtvercovými vzorky, b) lázeň z fyziologického roztoku, c) přípravek se stlačenými vzorky s různou mírou deformace.

objektiv, velikost snímku:  $1280 \times 960$  px, velikost vyhodnocené oblasti na jednom řezu:  $2 \times 2$  mm). Vzorek v mikroskopu byl vždy zorientován tak, aby jeho delší okraj (obvodový směr) byl v horizontálním směru. První zkoušku stlačováním provedl Ing. Vojtěch Man, Ph.D. s Ing. Kamilem Novákem, Ph.D. v roce 2017. Její vyhodnocení bylo spolu s druhým experimentem provedeno v roce 2019 v rámci této disertační práce. Výsledky z prvního a druhého experimentu jsou shrnuty v tabulce 6.1. Dále je ukázáno srovnání experimentů na distribučních von Misesových funkcích 6.4 a v grafu 6.5. Parametr koncentrace  $b$  a hlavní směr vláken  $\mu$  byl získán z von Misesovy distribuční funkce zavedené v rovnici 4.12.



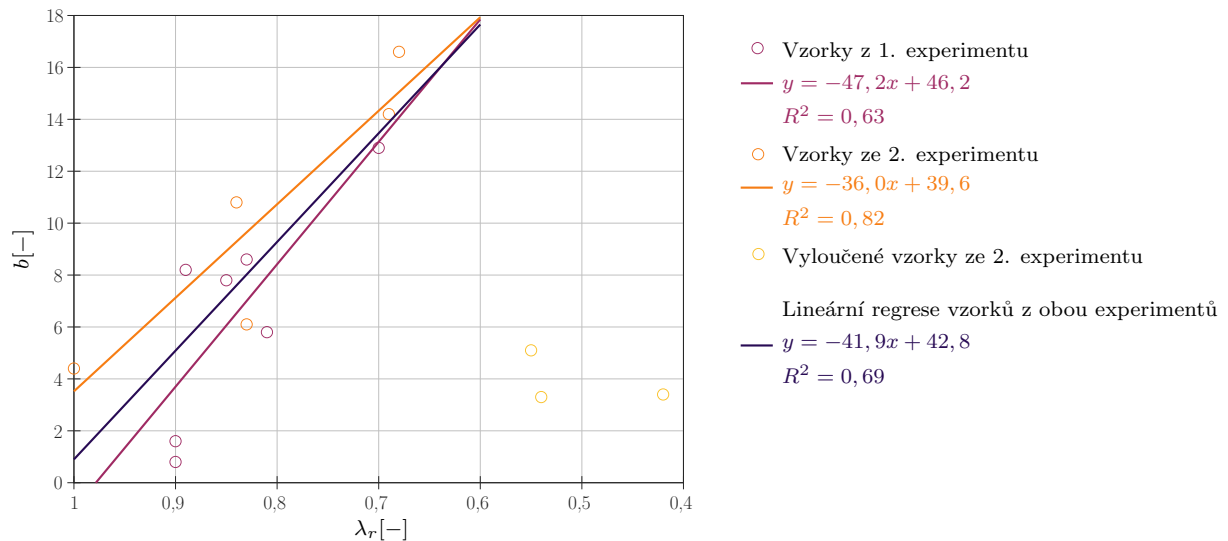
**Obrázek 6.4:** Srovnání trendů rozptylů a orientací vláken u vzorků z prvního a druhého experimentu. Obvodový směr zde značí  $0^\circ$ . Podle výsledků z 1. sady vzorků lze obecně pozorovat snižující se rozptyl s rostoucí deformací. U 2. experimentu trend vzrůstu amplitudy (snížení rozptylu u vzorků 0-3) dokazuje postupné narovnávání vláken při deformaci, následný pokles amplitudy (zvětšení rozptylu u vzorků 4-7) představuje zpevňování tkáně a shlukování vláken do snopců.

## 6.2. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI RADIÁLNÍM STLAČENÍ

Z tabulky 6.1 i distribučních funkcí 6.4 je zřejmé, že se hlavní směr vláken nemění a jeho střední hodnota z obou experimentů je  $0,48^\circ \pm 1,9$ , koncentrace vláken se zvyšuje s deformací a má unimodální charakter, viz graf 6.5.

**Tabulka 6.1:** Srovnání namáhaných vzorků podle poměrného protažení  $\lambda_r$  v radiálním směru u první a druhé sady.

1. experiment	15	16	6	1	12	14	17	
$\lambda_r[-]$	0,9	0,9	0,89	0,85	0,83	0,81	0,7	
$b[-]$	0,8	1,6	8,2	7,8	8,6	5,8	12,9	
$\mu [^\circ]$	-1,7	-4,6	-0,51	0,3	-0,15	1,7	2,9	
$R^2$	0,73	0,89	0,91	0,90	0,94	0,97	0,97	
2. experiment	0	1	2	3	4	5	6	7
$\lambda_r[-]$	1,0	0,84	0,83	0,68	0,69	0,55	0,54	0,42
$b[-]$	4,4	10,8	6,1	16,6	14,2	5,1	3,3	3,4
$\mu [^\circ]$	0,4	3,3	0,5	1,2	1,7	1,1	1,3	-0,3
$R^2$	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,99



**Obrázek 6.5:** Závislost poměrného protažení  $\lambda_r$  v radiálním směru vzorku a parametru koncentrace  $b$  obou experimentů s jejich lineární regresí metodou nejmenších čtverců.

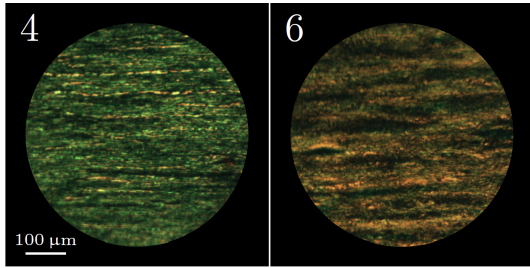
Z výsledků druhé zkoušky stlačování a obrázku 6.4 lze vidět, že jsme u 5., 6. a 7. vzorku překročili maximální míru stlačení, která je do cca 30 % deformace (viz obrázek 2.5 a [25]) a jejím zvyšováním se rozptyl snižuje. Radiálnímu stlačení o 30 % odpovídá (za předpokladu nestlačitelnosti, kde  $\lambda_r \lambda_t \lambda_z = 1$ ) protažení o cca 20 % v axiálním a obvodovém směru (za předpokladu příčné izotropie materiálu, tedy  $\lambda_t = \lambda_z = \sqrt{\frac{1}{\lambda_r}}$ ).

V grafu 6.5 závislosti poměrného protažení  $\lambda_r$  a parametru koncentrace  $b$  z obou sad je vidět trend snižování rozptylu se zvyšující se deformací. Do lineární regrese 2. experimentu (oranžové body a přímka) a obou sad (modrá přímka) nebyly zahrnuty vzorky 5, 6 a 7 (žluté body). 1. experiment je znázorněn fialovými body a jejich aproximací přímkou.

Na obrázku 6.6 je vidět, že u nejméně stlačených vzorků (6. a 7., které jsou v grafu 6.4 takřka identické) se vlákna shlukují do svazků snažících se tkáň co nejvíce zpevnit. Vzhledem k tomu, že nebylo možné provést histologické řezy v obvodově-axiální rovině, budou

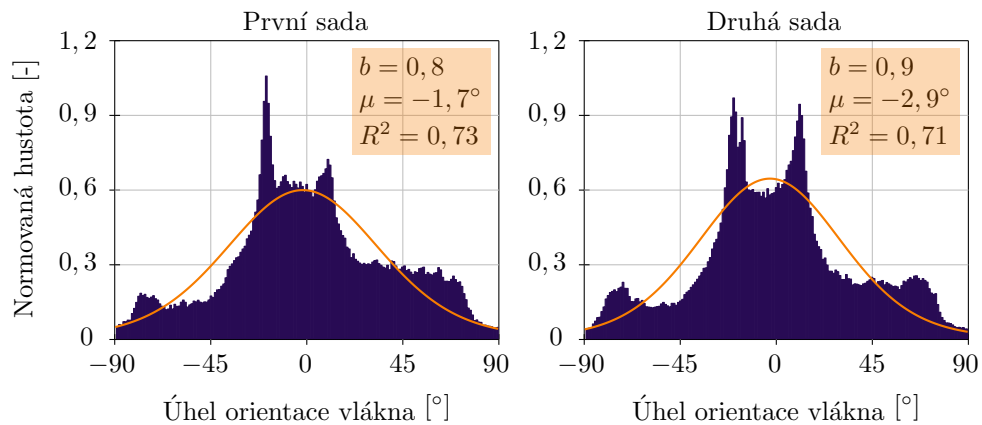
## 6.2. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI RADIÁLNÍM STLAČENÍ

další experimenty prováděny na speciálně vyvinutém přípravku, viz příští podkapitola 6.3.



**Obrázek 6.6:** Snímky z polarizačního mikroskopu ze 4. a 6. vzorku z vybraných oblastí při kolmých filtrech - analyzátoru a polarizátoru. Je zde viditelné shlukování vláken a tedy jejich zpevnování při zatěžování.

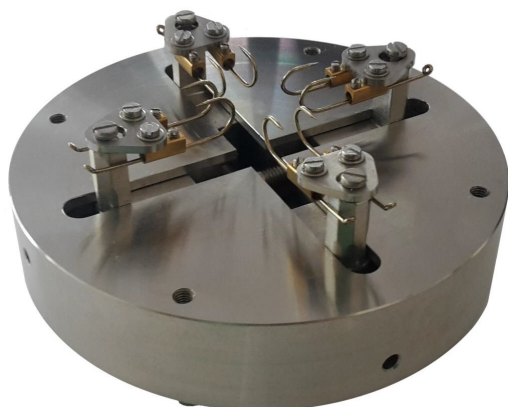
V rámci validace dostatečného počtu vyhodnocených oblastí (10) bylo provedeno srovnání dvou měření na jednom vzorku, viz obrázek 6.7. Rozdíly v úhlu i parametru koncentrace jsou zanedbatelné, takže pro pokrytí vzorku, který nemá výrazně vyšší nehomogenitu, stačí deset náhodně vybraných oblastí.



**Obrázek 6.7:** Srovnání dvou různých sad snímků naměřených a vyhodnocených oblastí na stejném vzorku č. 15.

### 6.3. Hodnocení směrů při dvouosém tahu

Speciální přípravek na dvojosé tahové zatížení (viz obrázek 6.8) byl navržen tak, aby překonal limitaci nedostatečné fixace stlačených vzorků a jejich následného zkroucení vlivem zbytkové napjatosti a strukturního uspořádání buněk a vláken, a také aby mohl být umístěn v digestoři po celou dobu fixace vzorků. Ve standardním dvouosém testovacím stroji, který máme na ÚMTMB, by experiment provést nešel kvůli toxicitě a rychlému odpařování formaldehydu, jelikož stroj by nebylo možné celý přemístit do digestoře. V této podkapitole budou představeny výsledné surové histogramy úhlů z obvodově-axiální roviny v řezech přes tloušťku stěny s jejich distribučními funkcemi a u nezatížených vzorků i surové histogramy úhlů z obvodově-radiální a axiálně-radiální roviny.



**Obrázek 6.8:** Přípravek byl navržen v rámci bakalářské práce [79] tak, aby mohl být přímo se vzorkem překlopen a ponořen do 10% formaldehydu pro dostatečnou fixaci, která zabrání zkroucení vzorků a umožní jejich nařezání na tenké plátky ve všech třech rovinách.

Upevnění vzorku je zde realizováno osmi rybářskými háčky (dvěma na každé straně vzorku), které jsou připevněny k čelistem pomocí vahadel. Vahadla slouží k vyrovnání zatížení vzorku, pokud není napíchnut přesně v bodech rovnoběžných s hranou vzorku, nebo pokud vzorek není přesně čtvercový, případně nehomogenní. Zatížení ve dvou směrech se koriguje zvláště šroubovákem. Na vzorky byly nakresleny markery a pomocí snímků z kamery před a po deformaci byly ve standardním softwaru pro dvojosé testování s přesností cca 0,001 vyhodnoceny velikosti protažení v obvodovém i axiálním směru.

Případy s protažením lišícím se o méně než 0,02 byly považovány za ekvibiaxiální, protože nebylo možné dosáhnout identických poměrů roztážení v důsledku nezávislého ručního prodlužování v obou směrech a interference mezi nimi. Ostatní případy jsou dále označeny jako obvodově dominantní nebo axiálně dominantní zatížení.

Po diskuzi s laborantkou z I. Ústavu patologie a anatomie FNUSA byla pro rozmrazování vzorků použita voda. Fyziologický roztok může negativně ovlivňovat další průběh jejich zpracování a řezání. Pár vzorků z každé aorty bylo připíchnuto bez přidané deformace na polystyren a ponecháno ve formaldehydu pro zafixování v narovnaném stavu. Zbylé byly zafixovány ve formaldehydu přímo na přípravku s přidanou deformací. Vzorky byly následně histologicky zpracovány, nařezány a obarveny ve FNUSA.

Některé vzorky ze tří vyšetřovaných prasečích aort (1AO, 2AO a 3AO) nemohly být vyhodnoceny, jelikož jejich řezy v obvodově-axiální rovině byly dost tenké a vlákna byla poškozená. U ostatních vzorků byly vyhodnoceny směry ve všech rovinách (pokud to bylo možné a nebyla poškozena vlákna). Na každém histologickém řezu bylo nasnímáno a vyhodnoceno 9 oblastí ve středu vzorku (5x objektiv, velikost vyhodnocené oblasti na jednom řezu: 4 × 4 mm), které byly sečteny a normovány. Výsledné histogramy byly

### 6.3. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI DVOUOSÉM TAHU

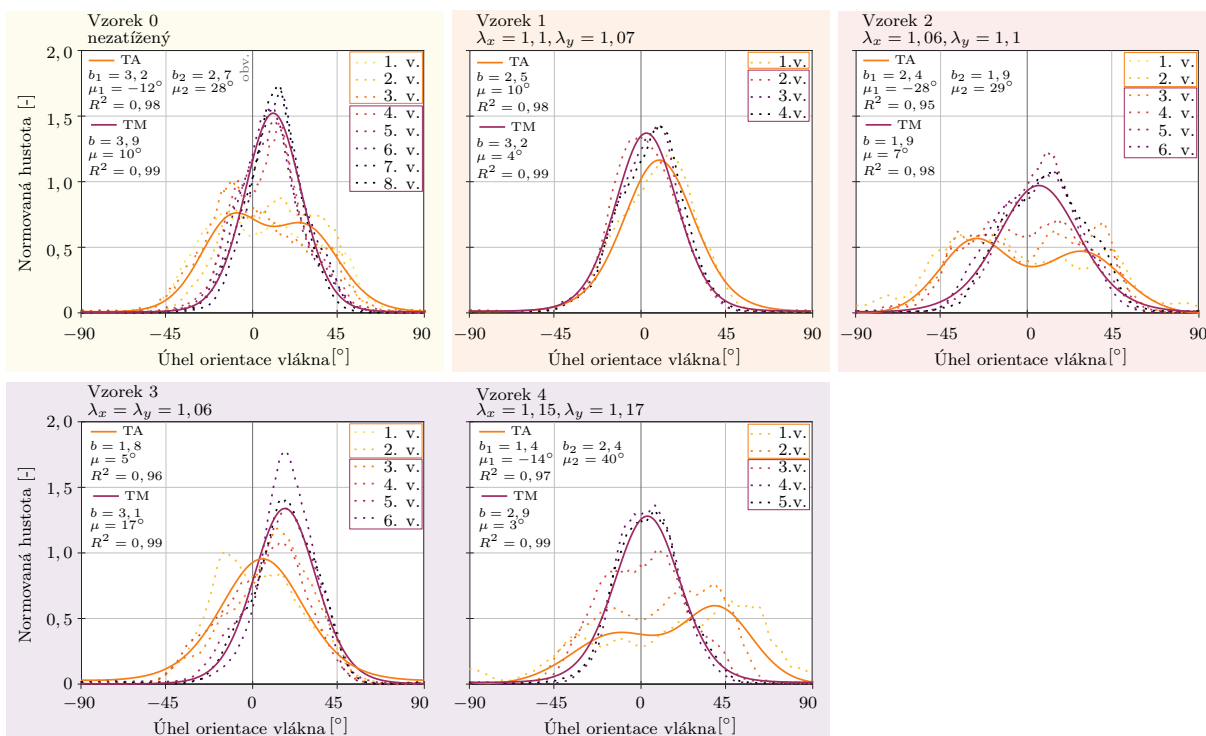
aproximovány unimodální nebo bimodální von Misesovou distribuční funkcí (viz rovnice 4.12 a 6.1), kde  $b$  ( $b_1, b_2$ ) je parametr koncentrace,  $\mu$  ( $\mu_1, \mu_2$ ) je lokální směr vláken:

$$q_{bi}(\varphi) = \exp \frac{(b_1 \cos(2 \cdot (\varphi - \mu_1)))}{2\pi I_0(b_1)} + \exp \frac{(b_2 \cos(2 \cdot (\varphi - \mu_2)))}{2\pi I_0(b_2)}. \quad (6.1)$$

Více jak polovina vrstev u každého vzorku byla považována za vnitřní část aorty TM+TI (dále značeno pouze jako TM) a zbytek za vnější TA. Unimodální nebo bimodální rozdělení bylo určeno vyšším koeficientem determinace  $R^2$ . Pokud u obě distribuce dávaly  $R^2 > 0,9$  a  $R^2$  u unimodální nebylo nižší oproti bimodální o více než 0,05, byla upřednostněna unimodální distribuce. Obecně u TA vyšlo vyšší  $R^2$  pro bimodální rozdělení, u TM pro unimodální.

#### 1AO

Ze sedmi extrahovaných vzorků z části první vyšetřované prasečí aorty 1AO se nepodařilo vyhodnotit jeden nezatížený vzorek a jeden, který byl zatížený rovnoměrně do obou směrů, kvůli jejich nedostatečně tloušťce histologických řezů nebo špatné fixaci na podložce. V obrázku 6.9 je vyhodnocený jeden nezatížený vzorek (žluté pozadí), jeden vzorek s větším zatížením v ose  $x$  (oranžové pozadí) a ose  $y$  (červené pozadí) a dva vzorky, u kterých bylo cílem rovnoměrné zatížení do obou směrů (fialové pozadí).



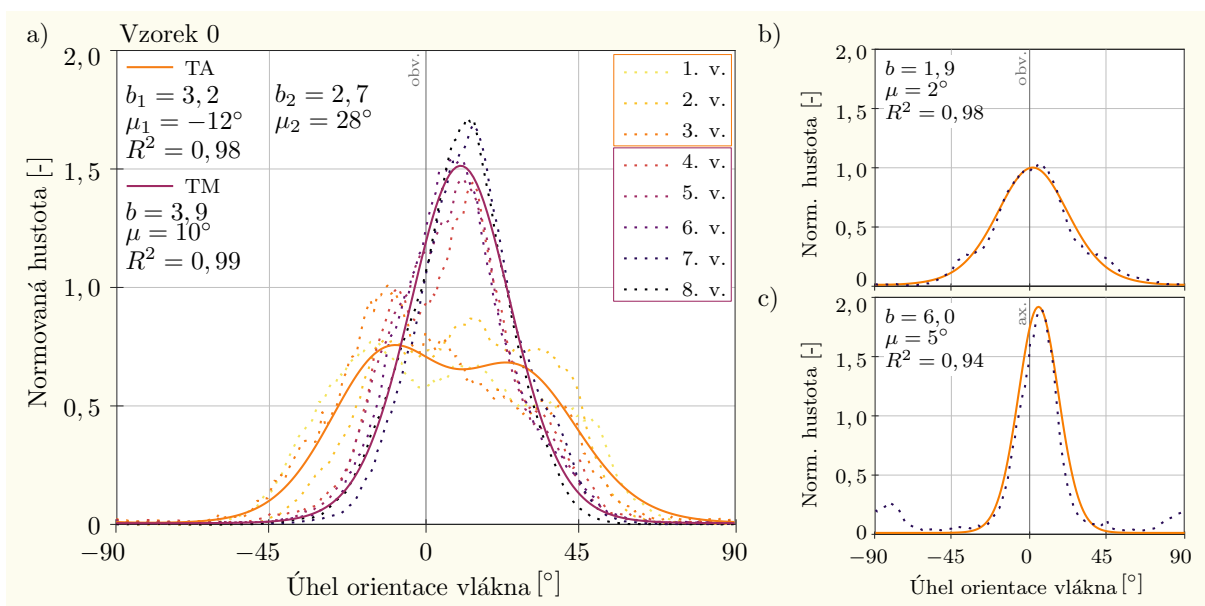
**Obrázek 6.9:** Histogramy (tečkovaně) hlavních směrů kolagenních vláken v pěti vzorcích 1AO namáhaných na speciálním přípravku. 1. vrstva (žlutá) odpovídá řezu na vnější straně stěny tepny, tedy TA, následující vrstvy poté směřují k vnitřní straně stěny tepny, tedy přes TM k TI. Plné čáry představují bimodální nebo unimodální von Misesovu distribuční funkci pro TA (oranžová) a TM (fialová). Obvodový směr značí  $0^\circ$ .

Z nezatíženého vzorku 0 se podařilo získat nejvíce neporušených histologických řezů přes radiální směr, viz obrázek 6.10. Histogram 1. vrstvy jednoznačně reprezentuje vnější



### 6.3. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI DVOUOSÉM TAHU

vrstvu stěny - TA, kde vlákna nejsou tak hustá jako v TI, ale jsou orientovaná s větším rozptylem kolem obvodového směru. Ze snímků ani z histogramů nemůžeme jednoznačně rozlišit vlnitost vláken a jejich rozptyl. Data z histogramu ale naznačují existenci dvou dominantních směrů vláken orientovaných blízko obvodovému směru. Koeficient determinace  $R^2$  je u prvních třech histogramů vyšší pro bimodální rozdělení, směrem k TI je rozdělení jednoznačně unimodální a parametr koncentrace  $b$  roste. Úhlová odchylka v jednotkách stupňů od obvodového směru může být chybou nepřesně určeného počátečního natočení okraje vzorku vzhledem k vodorovné či horizontální ose.



**Obrázek 6.10:** Histogramy úhlů orientací vláken ve všech třech rovinách (a) obvodově-axiální rovina, b) obvodově-radiální rovina, c) axiálně-radiální rovina nezatíženého vzorku 0.

Vzorek 1 byl více zatížen v obvodovém směru, takže data už od 1. vrstvy (TA) naznačují zarovnání vláken do obvodového směru. Směrem k TI se  $b$  zvyšuje a tedy rozptyl vláken snižuje. Bohužel z tohoto vzorku byl získán nízký počet histologických řezů, takže nemůžeme srovnat parametry koncentrace s ostatními vzorky.

Druhý vzorek byl naopak více zatížen v axiálním (o 10 %) než obvodovém (o 6 %) směru. V histogramech úhlů orientací vláken se to projevilo celkovým zploštěním grafů, což odpovídá redistribuci vláken do více zatíženého axiálního směru.

U zatíženého vzorku 3 se povedlo rovnoměrné dvouosé zatížení s deformací o 6 % v obvodovém ( $\lambda_x$ ) i axiálním ( $\lambda_y$ ) směru. Za předpokladu nestlačitelného a příčně izotropního materiálu tahle deformace odpovídá radiální deformaci o 11 %. Oproti histogramu z 1. vrstvy nezatíženého vzorku 0 je vidět, že vlivem deformace došlo k snížení rozptylu (zvýšení parametru koncentrace  $b$ ).

Vzorek 4 byl namáhán nejvíce ze všech vzorků ( $\lambda_x = 1,15$  a  $\lambda_y = 1,17$ ). Histogram z 1. vrstvy ukazuje dominantní orientaci zhruba kolem  $40^\circ$ , což bylo s největší pravděpodobností příčinou špatného zakrojení tkáně, které jde i zřetelně vidět přímo na sklíčku. Histogram ze 2. vrstvy už je typický představitel TA a směrem k TI se opět vlákna přibližují k obvodovému směru.

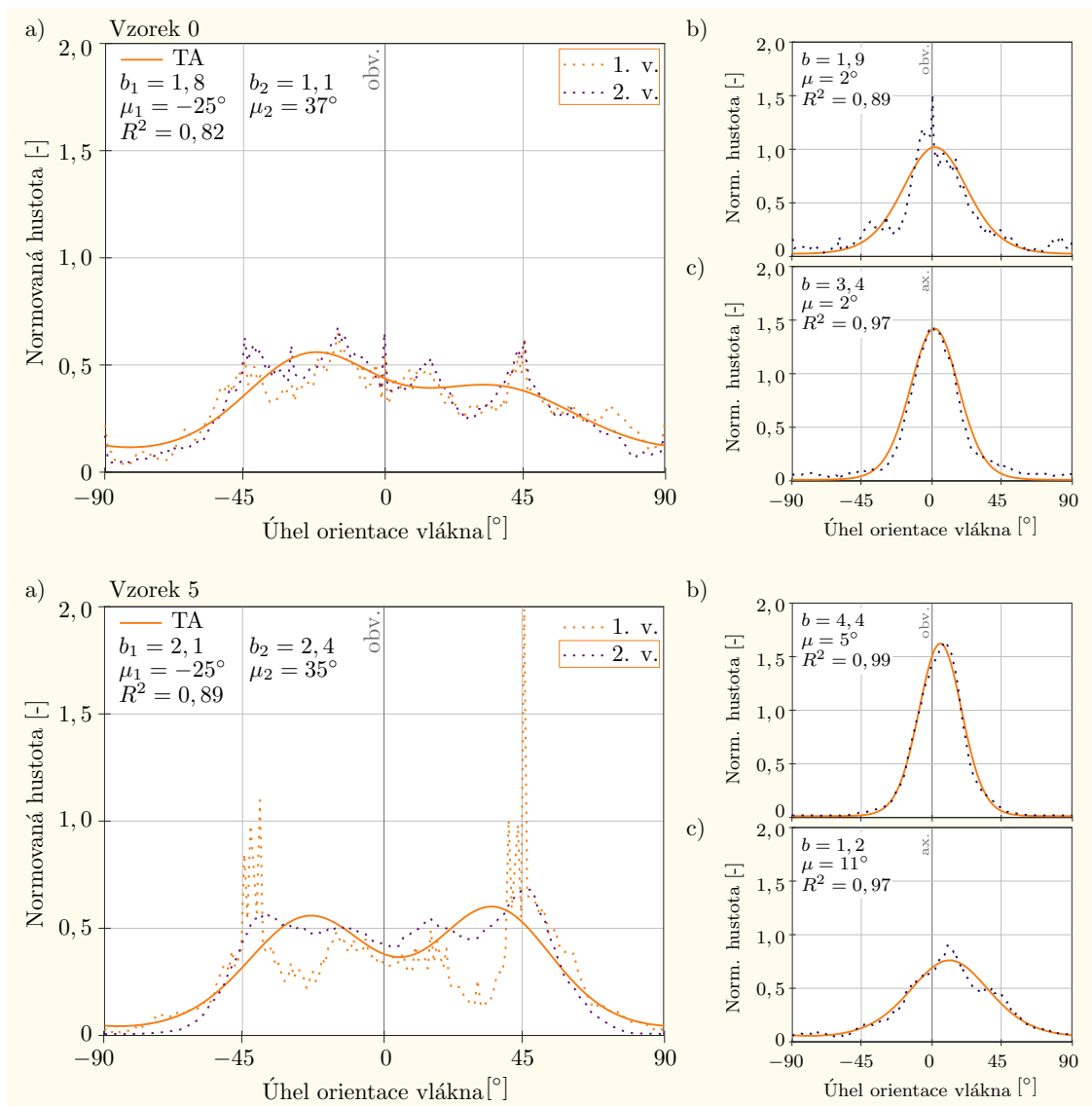
Zatímco ve vnějších vrstvách je zde výraznější trend k bimodálnímu rozdělení, vnitřní vrstvy mají rozdělení unimodální se součinitelem koncentrace srovnatelným s nezatíženým vzorkem, nebo zatíženým několikanásobně menší ekvibiaxiální deformací. Fakt, že oproti

### 6.3. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI DVOUOSÉM TAHU

očekávání nedochází se zvýšením deformace ke zmenšování rozptylu lze vysvětlit faktem, že zatížení je větší v axiálním směru. Může se tedy natáčením vláken do tohoto směru kompenzovat snižování rozptylu vlivem natahování zvlněných obvodově orientovaných vláken.

#### 2AO

Nezatížené vzorky jsou představeny v obrázku 6.11 s jejich obvodově-radiálními a axiálně radiálními distribucemi.

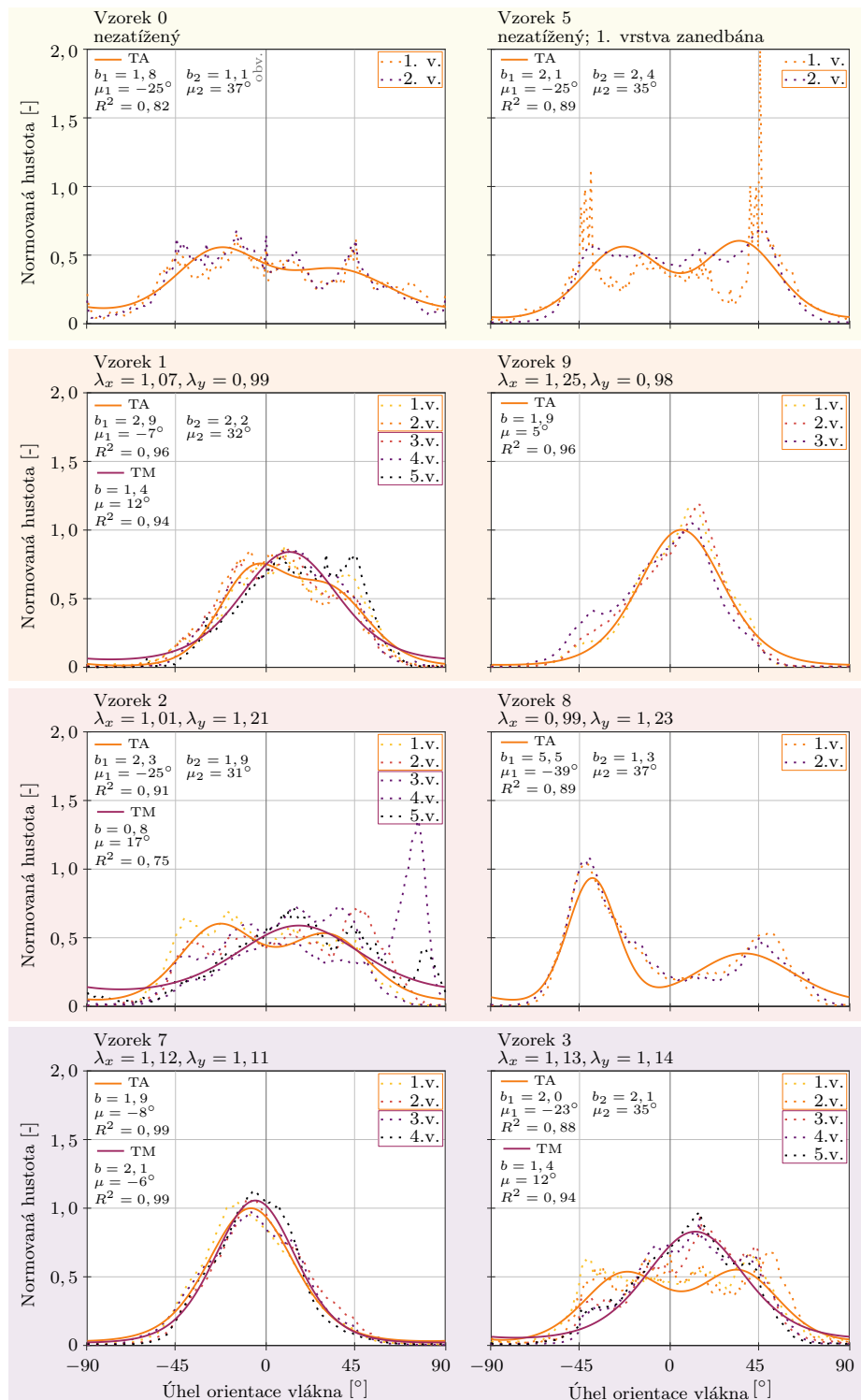


**Obrázek 6.11:** Histogramy úhlů orientací vláken ve všech třech rovinách (a) obvodově-axiální rovina, b) obvodově-radiální rovina, c) axiálně-radiální rovina nezatíženého vzorku 0 a 5.

Ze druhé vyšetřované prasečí aorty 2AO bylo vyseknuto dvanáct vzorků, od každého zvoleného typu zatížení tři, bohužel vždy pouze dva mohly být analyzovány, viz obrázek 6.12.

### 6.3. HODNOCENÍ SMĚRŮ PŘI DVOUOSÉM TAHU

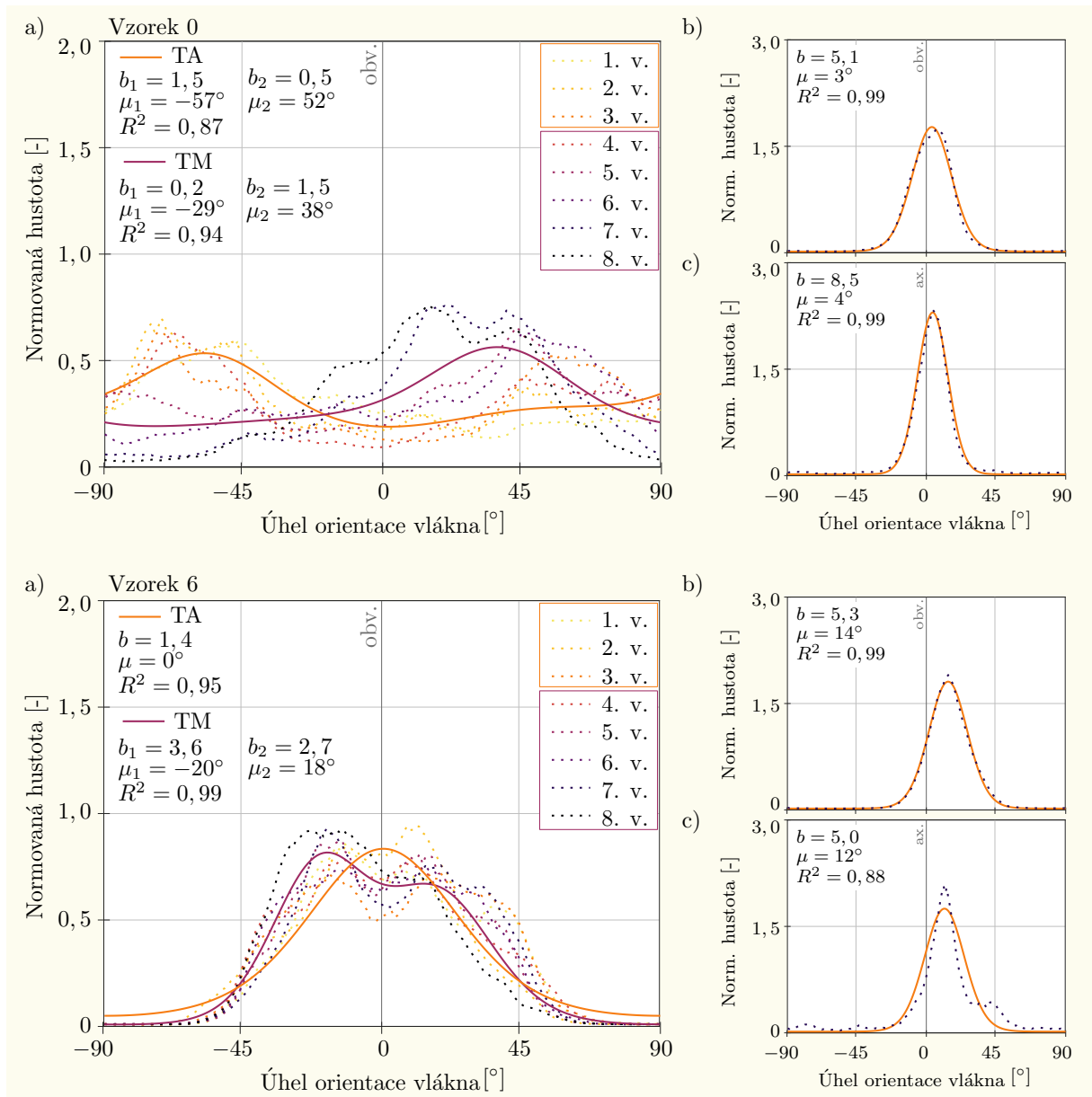
Vyhodnocené trendy odpovídají výsledkům z 1AO. Unimodální distribuce obvodově zatížených vzorků a zvýšení rozptýlení až dokonce bimodální rozdělení u nezatížených a axiálně zatížených vzorků značí zvlněná obvodově postavená vlákna v prasečí zdravé aortě.



**Obrázek 6.12:** Histogramy hlavních směrů kolagenických vláken a jejich distribuce pro dvě hlavní vrstvy stěny v osmi vzorcích 2AO.

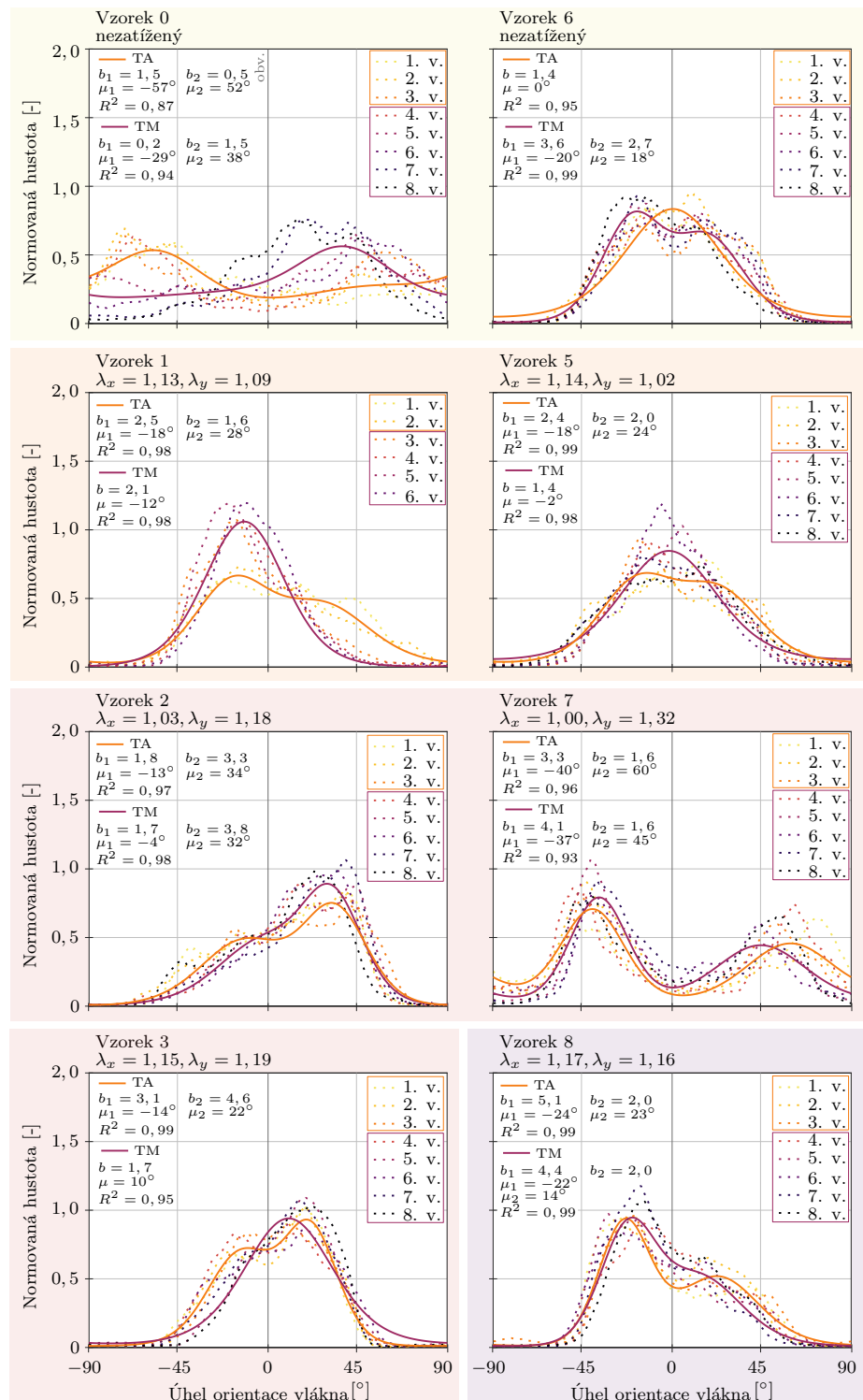
## 3AO

U třetí prasečí aorty byl kladen velký důraz na větší tloušťky histologických řezů (5–7  $\mu\text{m}$ ), takže se nepodařilo vyhodnotit pouze jeden nezatížený vzorek. Z vyhodnocených vzorků bylo získáno velké množství řezů přes tloušťku stěny aorty, viz obrázek 6.14. Pro nezatížené vzorky byly provedeny opět analýzy pro zbývající dvě roviny, viz obrázek 6.13.



**Obrázek 6.13:** Histogramy úhlů orientací vláken ve všech třech rovinách (a) obvodově-axiální rovina, b) obvodově-radiální rovina, c) axiálně-radiální rovina nezatíženého vzorku 0 a 6.

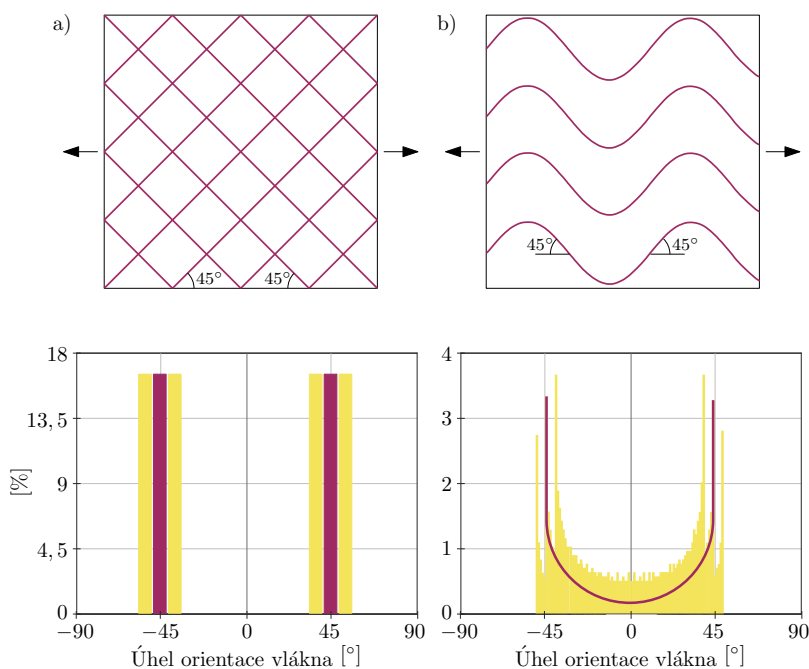
### 6.3. HODNOCENÍ SMĚŘŮ PŘI DVOUOSÉM TAHU



**Obrázek 6.14:** Histogramy hlavních směrů kolagenních vláken a jejich distribuce pro dvě hlavní vrstvy stěny v osmi vzorcích 3AO.

## 6.4. Matematický model jednoosého zatížení

V této podkapitole je uvedeno porovnání změn orientace vláken při jednoosém zatížení dvou idealizovaných modelů uspořádání kolagenu, které bylo předmětem bakalářské práce [80]: a) dvě rodiny spirálových vláken pod úhlem  $\alpha = \pm 40^\circ, \pm 45^\circ$  a  $\pm 50^\circ$ , b) jednou rodinou sinusově zvlněných vláken s maximálním úhlem sklonu  $\alpha = \pm 40^\circ, \pm 45^\circ$  a  $\pm 50^\circ$ , viz horní řada v obrázku 6.15. U modelů předpokládáme dokonale poddajnou matici a nulovou ohybovou tuhost vláken, tedy nenesou žádné zatížení, pokud nejsou přímo a orientovaná ve směru zatížení, jako u modelů Holzapfel 2000 [72] a Gasser 2006 [6].



**Obrázek 6.15:** Horní řada představuje idealizované modely uspořádání kolagenních vláken ve stěně tepny a) se dvěma rodinami spirálových vláken pod  $\pm 45^\circ$  a b) jednou rodinou sinusově zvlněných vláken. Spodní řada ukazuje výsledné histogramy, které jsou doplněny o úhly vláken  $40^\circ$  a  $50^\circ$ , kde je fialovou barvou uveden výsledek bez deformace vzorku. Převzato a upraveno z [80].

Výsledky v tabulce 6.2 ukazují limitní inženýrské přetvoření potřebné pro narovnání vlákna ve směru jednoosého zatížení. Hodnoty pro vlákna uspořádaná ve dvou rodinách spirálových vláken jsou přibližně dvakrát vyšší než u vlnitých vláken se stejným maximálním úhlem. K tomuto rozdílu dochází, protože pouze zhruba polovina délky kontury vlnitých vláken podléhá reorientaci během natahování, na rozdíl od rovných spirálových vláken, která je třeba znovu orientovat v celé své délce.

**Tabulka 6.2:** Limitní hodnoty inženýrské přetvoření pro oba modely s různými úhly vláken.

Model	$\alpha = \pm 40^\circ$	$\alpha = \pm 45^\circ$	$\alpha = \pm 50^\circ$
Dvě rodiny spirálových vláken	0,31	0,41	0,56
Jedna rodina zvlněných vláken	0,16	0,22	0,29

Při ekvibiaxiální deformaci by v modelu a) nedocházelo k reorientaci vláken, ta by nesla od počátku zatížení a prodlužovala by se, naproti tomu u modelu b) by výsledek

#### 6.4. MATEMATICKÝ MODEL JEDNOOSÉHO ZATÍŽENÍ

byl podobný jako u jednoosého tahu a protažení a globální orientace vláken by závisela na vztahu deformace mezi vlákny a maticí.

## 7. Vyhodnocené strukturní parametry pro prasečí aortu

Sofistikované anizotropní konstitutivní modely publikované v posledních desetiletích jsou většinou založeny na některých předpokladech distribuce kolagenních vláken spíše než na experimentálním zkoumání jejich uspořádání. Například v modelu Holzapfel 2000 [72] (viz podkapitola 5.2) se používají dvě symetrické rodiny spirálových vláken nebo v modelu ze studie Ferruzzi a kol. 2011 čtyři rodiny vláken [81]. Pokročilejší model Gasser 2006 [6] uvažuje disperzi vláken  $\kappa$  pro obě rodiny vláken a jejich střední úhly. Pokud jsou takovéto konstitutivní modely vyplněny pouze parametry z mechanických zkoušek arteriální stěny, ztrácejí hodnocené strukturní parametry své strukturální pozadí a jsou často v rozporu s histologickými nálezy [53, 55, 82]. Nedostatek strukturních informací o uspořádání kolagenních vláken v různých tepnách, patologických i zdravých, je stále limitujícím faktorem pro strukturně založené konstitutivní modelování arteriálních tkání.

Řada autorů používá primárně bimodální distribuci k aproximaci experimentálně získaných histogramů směrů kolagenních vláken v arteriální stěně, jak předpokládají i nejčastěji používané konstitutivní modely. Zřídka kdy jsou tyto bimodální distribuce srovnány s unimodálním rozdělením, která mohou poskytnout srovnatelnou nebo dokonce lepší aproximaci [2, 53, 55, 65, 83, 84]. Dále se zdánlivá bimodální distribuce může zaměnit s nehomogenní tkáně [49, 66], nebo např. jedna rodina zvlněných vláken se v histogramu s jednoznačnou bimodální distribucí může zaměnit za dvě rodiny vláken s různými globálními směry [46].

Hodnocení směrů vláken po pixelech nebo malých oblastech nedokáže rozlišit mezi lokálními a globálními směry vláken a následně mezi jejich rozptylem a vlnitostí. Ačkoli jsou údaje o orientaci vláken v nezatíženém stavu tkáně potřebné pro výše uvedené konstitutivní modely, některé nedávné studie naznačují, že by tato otázka mohla být vyřešena analýzou rozložení směrů vláken při zatížení [37, 53, 55]. Proto byly zkoumány i změny v distribuci kolagenních vláken ve stěně prasečí aorty při různých stavech zatížení a byly porovnány různé aproximace získaných histogramů.

Velké množství předešlých studií zpracovala data ze vzorků savčích tepen, např. myší [56, 60, 85], prasečí [38, 46], králičí [11, 59–61]. Ve většině případů se jednalo o zdravé tepny, stejně tak, jako výsledky ze vzorků prasečích aort, které byly představeny v předchozí kapitole 6.3 a budou dále v této kapitole rozebrány.

### 7.1. Metodika

Pro nízký počet vyhodnocených nezatížených vzorků z aort 1AO, 2AO a 3AO, byly histologicky zpracovány a vyhodnoceny ještě vzorky z aort 4AO a 5AO v pouze nezatíženém stavu.

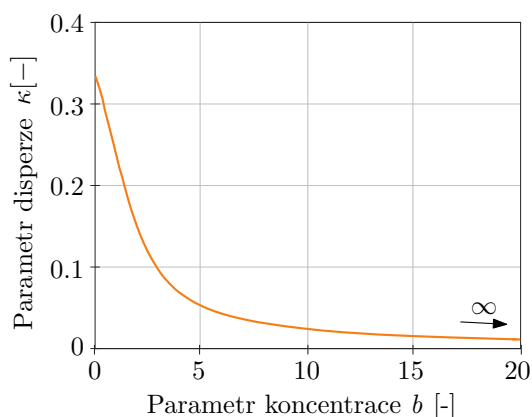


Zatížené vzorky prasečích aort byly seřazeny podle zvoleného zatížení a rozděleny do tří skupin, viz tabulka 7.1.

**Tabulka 7.1:** Zatížené vzorky byly rozděleny do tří skupin: dominantně obvodové zatížení (více do osy  $x$ ), axiální (více do osy  $y$ ) a ekvibiaxiální.

Obvodově dominantní			Axiálně dominantní			Ekvibiaxiální		
Vzorek	$\lambda_x$ [-]	$\lambda_y$ [-]	Vzorek	$\lambda_x$ [-]	$\lambda_y$ [-]	Vzorek	$\lambda_x$ [-]	$\lambda_y$ [-]
1AO 1	1,10	1,07	1AO 2	1,06	1,10	1AO 3	1,06	1,06
2AO 1	1,07	0,99	2AO 2	1,01	1,21	1AO 4	1,15	1,17
2AO 9	1,25	0,98	2AO 8	0,99	1,23	2AO 7	1,12	1,11
3AO 1	1,13	1,09	3AO 2	1,03	1,18	2AO 3	1,13	1,14
3AO 5	1,14	1,02	3AO 3	1,15	1,19	3AO 8	1,17	1,16
			3AO 7	1,00	1,32			

Strukturální parametry byly získány proložení dat unimodální nebo bimodální von Misesovou distribuční funkcí, viz rovnice 4.12 a 6.1, za pomoci *Curve Fitting Toolbox* ze softwaru MATLAB. Parametr disperze  $\kappa$ , používaný ve strukturálních konstitutivních modelech, se dá získat přepočtem z parametru koncentrace  $b$  rovnicí 5.8 a jejich vztah je zachycený na obrázku 7.1. Parametry z obvodově-axiální roviny nezatížených vzorků



**Obrázek 7.1:** Pro přesně narovnaná vlákna platí  $b \rightarrow \infty$  a  $\kappa \rightarrow 0$  a pro izotropní distribuci vláken platí  $b = 0$  a  $\kappa = \frac{1}{3}$ . Překresleno z [86].

jsou pro TA a TM v tabulce 7.2. Výsledné strukturální parametry ze zatížených vzorků z obvodově-axiální roviny jsou pro TA a TM v tabulkách 7.3 a 7.4.

Distribuce, která lépe vyhovovala vzorku, je zvýrazněna tučně. Byla preferována unimodální distribuce nad bimodální, pokud obě poskytly  $R^2 > 0,9$  a pokud zároveň  $R^2$  u unimodální distribuce nebylo nižší než u bimodální o více než 0,05. Pro vzorky 0, 5, 8 a 9 z aorty 2AO nebyly vyhodnoceny parametry pro TM, jelikož nebylo k dispozici více než dva nebo tři histologické řezy (vrstvy). Bimodální distribuce většinou lépe odpovídala TA, zatímco TM často odpovídala unimodální distribuci. Protože unimodální rozdělení vyhovovalo většině vzorků, jeho parametry byly využity při různém zatížení pro srovnání všech výsledků. Orientace vláken byla (až na několik výjimek) blízka obvodovému směru a nebyl zjištěn žádný vliv zatížení na střední orientaci vláken. Byl však viditelný vliv zatížení na koncentrační parametr  $b$ , který se zvýšil pro dominantně obvodové zatížení (ve směru vláken) i pro ekvibiaxiální zatížení. Sklon k více unimodálním distribucím s obvodovým protažením potvrdil i jejich vysoký  $R^2$  nad nebo blízko hodnoty 0,9. Naproti tomu parametr  $b$  klesal se zatížením působícím axiálně, tj. kolmo k dominantnímu směru vláken.

**Tabulka 7.2:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro nezatížené vzorky ( $\lambda_x = \lambda_y = 1,0$ ) prasečích aort v TA a TM s vypočtenými průměrnými hodnotami se směrodatnými odchylkami (SD).

	Vzorek	Unimodální			Bimodální				
		$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
Nezatížené TA	1AO 0	1,3	6	0,90	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>	<b>-12</b>	<b>28</b>	<b>0,98</b>
	2AO 0	0,6	-6	0,64	<b>1,8</b>	<b>1,1</b>	<b>-25</b>	<b>37</b>	<b>0,82</b>
	2AO 5	0,7	7	0,58	<b>2,1</b>	<b>2,4</b>	<b>-25</b>	<b>35</b>	<b>0,89</b>
	3AO 0	0,5	-64	0,73	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	<b>-57</b>	<b>52</b>	<b>0,87</b>
	3AO 6	<b>1,4</b>	<b>0</b>	<b>0,95</b>	2,6	2,5	-17	18	0,99
	4AO 1	0,1	-70	0,01	<b>3,0</b>	<b>2,6</b>	<b>-46</b>	<b>53</b>	<b>0,90</b>
	4AO 2	0,7	-8	0,72	<b>2,1</b>	<b>1,4</b>	<b>-27</b>	<b>32</b>	<b>0,93</b>
	4AO 3	0,8	-16	0,78	<b>2,3</b>	<b>1,4</b>	<b>-35</b>	<b>20</b>	<b>0,97</b>
	4AO 4	0,5	-19	0,27	<b>2,9</b>	<b>1,9</b>	<b>-37</b>	<b>39</b>	<b>0,88</b>
	5AO 1	1,1	-1	0,90	<b>2,5</b>	<b>1,6</b>	<b>-17</b>	<b>27</b>	<b>0,98</b>
	5AO 2	0,8	37	0,59	<b>1,2</b>	<b>3,3</b>	<b>-16</b>	<b>48</b>	<b>0,97</b>
	5AO 3	0,9	-37	0,43	<b>4,2</b>	<b>0,9</b>	<b>-39</b>	<b>50</b>	<b>0,92</b>
	5AO 4	1,2	-14	0,77	<b>3,7</b>	<b>1,2</b>	<b>-25</b>	<b>24</b>	<b>0,95</b>
	<i>Průměr</i>		0,8	-14,1		2,6	1,8	-29,1	35,6
$\pm SD$		$\pm 0,4$	$\pm 29,0$		$\pm 0,9$	$\pm 0,8$	$\pm 13,1$	$\pm 12,2$	
Nezatížené TM	1AO 0	<b>3,9</b>	<b>10</b>	<b>0,99</b>	2,8	5,6	7	12	0,99
	2AO 0		NA				NA		
	2AO 5		NA				NA		
	3AO 0	0,6	35	0,88	<b>0,2</b>	<b>1,5</b>	<b>-29</b>	<b>38</b>	<b>0,94</b>
	3AO 6	1,4	-4	0,91	<b>3,6</b>	<b>2,7</b>	<b>-20</b>	<b>18</b>	<b>0,99</b>
	4AO 1	0,3	-2	0,17	<b>2,8</b>	<b>2,2</b>	<b>-40</b>	<b>39</b>	<b>0,88</b>
	4AO 2	0,7	10	0,85	<b>1,6</b>	<b>1,5</b>	<b>-16</b>	<b>37</b>	<b>0,97</b>
	4AO 3	0,7	-17	0,59	<b>2,7</b>	<b>1,8</b>	<b>-41</b>	<b>20</b>	<b>0,94</b>
	4AO 4	1,0	-31	0,49	<b>4,1</b>	<b>1,0</b>	<b>-38</b>	<b>36</b>	<b>0,90</b>
	5AO 1	1,6	-3	0,87	<b>2,9</b>	<b>1,7</b>	<b>-19</b>	<b>25</b>	<b>0,98</b>
	5AO 2	1,0	34	0,78	<b>1,5</b>	<b>3,3</b>	<b>-1</b>	<b>49</b>	<b>0,98</b>
	5AO 3	1,0	-27	0,59	<b>3,8</b>	<b>0,8</b>	<b>-33</b>	<b>38</b>	<b>0,91</b>
	5AO 4	1,0	-1	0,85	<b>2,8</b>	<b>1,5</b>	<b>-16</b>	<b>30</b>	<b>0,96</b>
	<i>Průměr</i>		1,2	0,4		2,6	2,2	-22,4	31,1
$\pm SD$		$\pm 1,0$	$\pm 21,4$		$\pm 1,1$	$\pm 1,4$	$\pm 15,7$	$\pm 11,1$	

Pro porovnání středních úhlů získaných pomocí různých rozdělení, byl u bimodálního rozdělení zaveden a vypočítán střední úhel mezi dominantními směry  $\omega_{pr}$  následovně:

$$\omega_{pr} = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2}, \quad (7.1)$$

který za předpokladu zvlněných vláken vyjadřuje dominantní globální směr vláken, a dále úhel mezi dominantními směry  $\varphi_{pr}$  vyjadřující míru narovnání vláken při působícím zatížení, tedy alternativu rozptylu u unimodálního rozdělení (viz tabulka 7.5):

$$\varphi_{pr} = |\mu_1 - \mu_2|. \quad (7.2)$$

**Tabulka 7.3:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro zatížené vzorky prasečích aort v TA s vypočtenými průměrnými hodnotami se SD.

		TA							
		Unimodální			Bimodální				
	Vzorek	$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
Obv. dom.	1AO 1	<b>2,5</b>	<b>10</b>	<b>0,98</b>	3,2	5,0	-4	20	0,99
	2AO 1	1,3	9	0,90	<b>2,9</b>	<b>2,2</b>	<b>-7</b>	<b>32</b>	<b>0,96</b>
	2AO 9	<b>1,9</b>	<b>5</b>	<b>0,96</b>	1,8	4,1	-12	14	0,99
	3AO 1	1,0	-1	0,87	<b>2,5</b>	<b>1,6</b>	<b>-18</b>	<b>28</b>	<b>0,98</b>
	3AO 5	1,1	1	0,92	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>	<b>-18</b>	<b>24</b>	<b>0,99</b>
<i>Průměr</i>		1,6	4,8		2,6	3,0	-11,8	23,6	
$\pm SD$		$\pm 0,6$	$\pm 4,7$		$\pm 0,5$	$\pm 1,5$	$\pm 6,3$	$\pm 7,0$	
Ax. dom.	1AO 2	0,7	-6	0,68	<b>2,4</b>	<b>1,9</b>	<b>-28</b>	<b>29</b>	<b>0,95</b>
	2AO 2	0,8	0	0,70	<b>2,3</b>	<b>1,9</b>	<b>-25</b>	<b>31</b>	<b>0,91</b>
	2AO 8	1,1	-33	0,40	<b>5,5</b>	<b>1,3</b>	<b>-39</b>	<b>37</b>	<b>0,89</b>
	3AO 2	1,1	17	0,82	<b>1,8</b>	<b>3,3</b>	<b>-13</b>	<b>34</b>	<b>0,97</b>
	3AO 3	1,6	7	0,91	<b>3,1</b>	<b>4,6</b>	<b>-14</b>	<b>22</b>	<b>0,99</b>
	3AO 7	0,1	86	0,01	<b>3,3</b>	<b>1,6</b>	<b>-40</b>	<b>60</b>	<b>0,96</b>
<i>Průměr</i>		0,9	11,9		3,1	2,4	-26,5	35,5	
$\pm SD$		$\pm 0,5$	$\pm 40,0$		$\pm 1,3$	$\pm 1,3$	$\pm 11,7$	$\pm 13,0$	
Ekvibiaxiální	1AO 3	<b>1,8</b>	<b>5</b>	<b>0,96</b>	3,5	3,6	-11	20	0,99
	1AO 4	0,8	23	0,78	<b>1,4</b>	<b>2,4</b>	<b>-14</b>	<b>40</b>	<b>0,97</b>
	2AO 7	<b>1,9</b>	<b>-8</b>	<b>0,99</b>	3,0	2,1	-18	6	0,99
	2AO 3	0,7	6	0,64	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>-23</b>	<b>35</b>	<b>0,88</b>
	3AO 8	1,2	-11	0,74	<b>5,1</b>	<b>2,0</b>	<b>-24</b>	<b>23</b>	<b>0,99</b>
<i>Průměr</i>		1,3	3,1		3,0	2,4	-18,0	24,8	
$\pm SD$		$\pm 0,6$	$\pm 13,3$		$\pm 1,4$	$\pm 0,7$	$\pm 5,6$	$\pm 13,4$	

## 7.2. Statistická analýza

Byla provedena skupina testů analýzy statistické významnosti na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  v softwaru Minitab 15 pomocí jednosměrné funkce ANOVA pro porovnání parametru koncentrace  $b$  unimodálního von Misesova rozdělení a úhlu mezi rodinami vláken bimodálního von Misesova rozdělení mezi oběma vrstvami TA a TM. Normalita dat byla ověřena Kolmogorov-Smirnov testem ve stejném programu před provedením analýzy ANOVA.

Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi TA a TM pro žádný typ zatížení, proto jsou v tabulce 7.6 uvedeny pouze souhrnné výsledky. Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi všemi skupinami kromě nezatížených vs. více axiálně zatížených vzorků a mezi více obvodově zatíženými a ekvibiaxiálními. Stejně výsledky ukázaly i testy pro porovnání úhlu mezi rodinami vláken  $\varphi_{pr}$  u bimodálních distribucí.

**Tabulka 7.4:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro zatížené vzorky prasečích aort v TM s vypočtenými průměrnými hodnotami se SD. Pro některé vzorky nebylo možné vyhodnotit parametry v TM, kvůli nedostatečnému počtu histologických řezů, ty jsou označeny zkratkou NA.

		TM							
		Unimodální			Bimodální				
	Vzorek	$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
Obv. dom.	1AO 1	<b>3,2</b>	<b>4</b>	<b>0,99</b>	4,9	5,2	-6	13	0,99
	2AO 1	<b>1,4</b>	<b>12</b>	<b>0,94</b>	2,4	2,2	-7	29	0,98
	2AO 9		NA				NA		
	3AO 1	<b>2,1</b>	<b>-12</b>	<b>0,98</b>	4,2	2,4	-22	3	0,99
	3AO 5	<b>1,4</b>	<b>-2</b>	<b>0,98</b>	2,4	2,2	-17	15	0,99
	<i>Průměr</i>	2,0	0,3		3,5	3,1	-13,1	15,1	
	$\pm SD$	$\pm 0,9$	$\pm 10,0$		$\pm 1,3$	$\pm 1,4$	$\pm 7,8$	$\pm 10,7$	
Ax. dom.	1AO 2	<b>1,9</b>	<b>7</b>	<b>0,98</b>	2,7	3,4	-9	19	0,99
	2AO 2	<b>0,8</b>	<b>17</b>	<b>0,75</b>	1,5	1,1	-4	44	0,76
	2AO 8		NA				NA		
	3AO 2	1,5	21	0,91	<b>1,7</b>	<b>3,8</b>	<b>-4</b>	<b>32</b>	<b>0,98</b>
	3AO 3	<b>1,7</b>	<b>10</b>	<b>0,95</b>	2,7	4,4	-9	23	0,99
	3AO 7	0,6	-28	0,24	<b>4,1</b>	<b>1,6</b>	<b>-37</b>	<b>45</b>	<b>0,93</b>
	<i>Průměr</i>	1,3	5,2		2,5	2,9	-12,5	32,6	
	$\pm SD$	$\pm 0,6$	$\pm 19,4$		$\pm 1,0$	$\pm 1,4$	$\pm 13,9$	$\pm 11,8$	
Ekvibiaxiální	1AO 3	<b>3,1</b>	<b>17</b>	<b>0,99</b>	2,2	5,5	8	21	0,99
	1AO 4	<b>2,9</b>	<b>3</b>	<b>0,99</b>	4,2	4,2	-7	13	0,99
	2AO 7	<b>2,1</b>	<b>-6</b>	<b>0,99</b>	2,5	3,2	-18	4	0,99
	2AO 3	<b>1,4</b>	<b>12</b>	<b>0,94</b>	1,9	2,4	-6	27	0,97
	3AO 8	1,6	-11	0,90	<b>4,4</b>	<b>2,0</b>	<b>-22</b>	<b>14</b>	<b>0,99</b>
	<i>Průměr</i>	2,2	3,2		3,0	3,5	-9,0	15,8	
	$\pm SD$	$\pm 0,8$	$\pm 11,6$		$\pm 1,2$	$\pm 1,4$	$\pm 11,7$	$\pm 8,7$	

### 7.3. Výsledky

Experimenty ukázaly dominantně obvodovou orientaci kolagenních vláken i v nezatíženém stavu, potvrzenou pro unimodální i bimodální distribuci. Střední úhel  $\omega_{pr}$  nevykazoval žádné změny a zůstal blízko nule (obvodovému směru) při jakémkoli zatížení. Koncentrace se zvyšovala (snižovala) s dominantně obvodovým (axiálním) zatížením. Ačkoli je tento efekt vysoce očekáván, pro rozptýlená spirálová vlákna není důvod pro jejich reorientaci při ekvibiaxiálním zatížení, zatímco zvlhčená vlákna se musí prodlužovat při ekvibiaxiálním natahování podobně jako u jednoosého. Tyto tendence byly potvrzeny pro unimodální i bimodální rozdělení statisticky významnými rozdíly mezi ekvibiaxiálně zatíženými a nezatíženými vzorky a také nevýznamnými rozdíly mezi ekvibiaxiálním zatížením a jednoosým zatížením (v dominantním směru vlákna, tedy do osy  $x$ ). Úhel  $\varphi_{pr}$  mezi oběma rodinami vláken se neměnil s příčným zatížením a klesal podobně s ekvibiaxiálním a podélným jednoosým zatížením (viz tabulka 7.3 a tabulka 7.4). Tento efekt opět nemohl nastat

**Tabulka 7.5:** Pro obě vrstvy a všechny typy zatížení byly vypočítány průměrné hodnoty úhlů mezi rodinami  $\varphi_{pr}$  se SD a jejich středu  $\omega_{pr}$  se SD. Pro obě vrstvy dohromady byl vypočítán parametr koncentrace  $b_{pr}$  se SD unimodálního von Misesova rozdělení.

	TA		TM		TA+TM
	$\varphi_{pr} \pm SD[^\circ]$	$\omega_{pr} \pm SD[^\circ]$	$\varphi_{pr} \pm SD[^\circ]$	$\omega_{pr} \pm SD[^\circ]$	$b_{pr} \pm SD[-]$
Nezat.	$64,7 \pm 22,7$	$3,3 \pm 5,6$	$53,5 \pm 20,9$	$4,4 \pm 8,7$	$1,0 \pm 0,7$
Obv. d.	$35,4 \pm 9,8$	$5,9 \pm 4,5$	$28,2 \pm 7,6$	$1,0 \pm 8,6$	$1,8 \pm 0,7$
Ax. d.	$62,0 \pm 22,8$	$4,5 \pm 4,8$	$45,1 \pm 21,9$	$10,1 \pm 6,9$	$1,1 \pm 0,6$
Ekv.	$42,8 \pm 14,7$	$3,4 \pm 7,1$	$24,8 \pm 9,5$	$3,4 \pm 9,2$	$1,8 \pm 0,8$

**Tabulka 7.6:** Vypočtená statistická významnost rozdílů mezi skupinami pro parametr koncentrace  $b$  unimodální distribuce a úhlu mezi rodinami  $\varphi_{pr}$  u bimodální distribuce v rámci celé stěny aorty. U statisticky významných rozdílů je  $p$ -hodnota zvýrazněna tučně.

p-hodnota: $b$	Nezatížené	Obvodově dom.	Axiálně dom.	Ekvibiaksiální
Nezatížené	-	<b>0,010</b>	0,726	<b>0,010</b>
Obvodově dom.	<b>0,010</b>	-	<b>0,027</b>	0,963
Axiálně dom.	0,726	<b>0,027</b>	-	<b>0,036</b>
Ekvibiaksiální	<b>0,010</b>	0,963	<b>0,036</b>	-
p-hodnota: $\varphi_{pr}$	Nezatížené	Obvodově dom.	Axiálně dom.	Ekvibiaksiální
Nezatížené	-	<b>0,002</b>	0,527	<b>0,002</b>
Obvodově dom.	<b>0,002</b>	-	<b>0,018</b>	0,894
Axiálně dom.	0,527	<b>0,018</b>	-	<b>0,027</b>
Ekvibiaksiální	<b>0,002</b>	0,894	<b>0,027</b>	-

u dvou rozptýlených rodin vláken, kdy ekvibiaksiální deformace neindukuje žádnou rotaci vlákna, ale podporuje hypotézu o jedné rodině vlnitých vláken, která se při ekvibiaksiálním a jednoosém zatížení podobně narovnávají.

## 7.4. Diskuze

Existuje několik studií aplikujících podobné koncepty hodnocení směrů vláken v arteriální stěně při deformaci. Například v [55] provedli histologické analýzy na různých úrovních vnitřního tlaku v TA a prokázali podobnou tendenci zvyšování koncentračních parametrů pro úhly v rovině i mimo rovinu. Ve studii [53] použili SALS pro detekci směrů vláken ve vzorcích, buď nezatížených nebo pod jednoosým tahem v dominantním směru vlákna. Zjistili vyšší koncentraci vláken pod zátěží, jednu skupinu vláken v TI a TM a dvě skupiny v TA.

Ačkoliv základní charakteristiky (orientace a rozptyl kolagenních vláken) získané z histologií mohou být použity do strukturních konstitutivních modelů, data jsou omezená na 2D rovinu jejich tenkými řezy. Převažující výsledky histologických analýz ukazují dvě nebo více rodin vláken uspořádaných symetricky blízko k obvodovému směru [37, 50, 76]. Výsledky stanovené manuálními metodami však mohou být zkresleny malým množstvím

vyhodnocených dat [2, 8, 37, 87]. Navíc data určená nezatíženými nebo jednoosově nataženými vzorky mohou být chybně interpretována kvůli jejich zvlnění, protože histogramy dvou rodin vláken se jevíly podobné vlnitým vláknům [2, 37]. Ve studii [50] se přiklání ke dvěma rodinám v TA a TI a jedné rodině v TM v obvodovém směru. Jejich data byla získána pomocí SHG z konfokálních mikroskopických snímků vzorků pod stejným osovým předpětím a tlakem. Nebylo tedy také možné vyhodnotit změny orientace vláken nebo rozlišit mezi disperzí a vlnitostí. Na druhé straně naše výsledky o distribuci kolagenních vláken po tloušťce nezatížené stěny aorty souhlasí s [82], kteří našli obvodově uspořádaná vlákna v TI a TM, s postupným přechodem k téměř izotropní distribuci vláken v TA.

Autoři, kteří přizpůsobili všechny parametry modelů Holzapfel 2000 nebo Gasser 2006 pouze mechanickým testovacím datům, tedy bez histologické informace, získali většinou dva směry kolem  $\pm 45^\circ$  v jednotlivých vrstvách, jak je uvedeno v [6, 49, 72, 83]. Tyto výsledky se typicky vyskytují u TA, zatímco u TM jsou vlákna nakloněna k obvodovému směru (viz [72, 83]). Pouze jedna studie podporuje tuto orientaci histologicky: v lidské aortě v TI a TM [49] zjistila dvě rodiny vláken, které jsou navíc vysoce symetrické ( $+39,4^\circ / -39,6^\circ$ ). Naproti tomu stejná skupina [50] potvrdila existenci jedné rodiny vláken v lidské aortě v TM (obvodové) a TI (axiální). Ze stejných experimentů navrhuje dvě rodiny vláken v TA, ale důkazy jsou spíše slabé; vlákna v TA jsou vysoce rozptýlena v různých směrech a lze je nahradit jednou (šroubovicovou) skupinou vláken bez významné ztráty přesnosti.

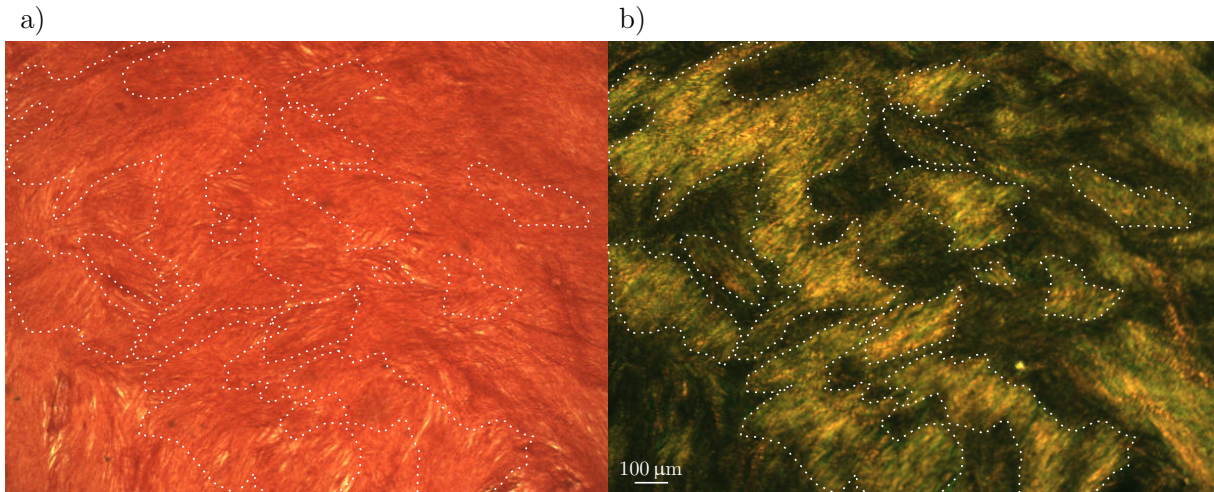
## 7.5. Limitace metody

Abychom zmínili omezení této studie, některá z nich jsou vlastní metodě PLM aplikované v našich histologických analýzách. Vzhledem k potřebě tenkých plátek tkáně se mohou vzorky při umístění na skleněnou desku deformovat. Přestože je jeho základní orientace striktně dodržena, může dojít k několikastupňovým nepřesnostem v důsledku zakřivení řezu, zejména u úzkých řezů. Tyto nepřesnosti mohou způsobit zjištěné odchylky orientace hlavního vlákna od obvodového směru v řádu jednotek stupňů; k vyšším odchýlkám unimodálních distribucí dochází většinou tehdy, je-li kvalita unimodálního fitování nízká. Použití prasečích aort místo lidských nemusí představovat omezení, spíše eliminuje změny v arteriální struktuře související s věkem. Tenké histologické řezy dále znemožňují trasovat vlákno ve 3D prostoru a v obvodově-axiální rovině, takže viditelné jsou pouze části sinusově zvlněných svazků vláken, viz obrázek 7.2.

Na druhou stranu náš automatizovaný algoritmus pro vyhodnocení směrů vláken učinil proces plně operátorově nezávislým [46] a umožnil nám analyzovat velké datové sady. Konkrétně jsme získali hodnoty  $\approx 5 \cdot 10^5$  pro každou z hodnocených 9 oblastí ( $\approx 4 \times 4$  mm) v rámci vzorků velikosti  $18 \times 18$  mm. Porovnáním výstupů pro několik různých výběrů těchto regionů v rámci jednoho histologického řezu bylo potvrzeno, že počet hodnocených regionů byl dostatečný k zajištění výstupů nezávislých na tomto výběru.

## 7.6. Závěr

Není možné dát platnou odpověď, zda existují vrstvy se dvěma rodinami rozptýlených spirálových vláken, protože údaje o orientaci kolagenních vláken v tepnách jsou v literatuře příliš variabilní. Výsledky naší studie však ukazují, že jedna rodina dominantně obvodových vlnitých vláken se mnohem lépe shoduje s experimentálními zjištěními [88,



**Obrázek 7.2:** Snímek TA z 1AO ze vzorku 3 ze sady biaxiálně natahovaných vzorků pod a) nepolarizovaným a b) polarizovaným světlem s úpravou na zelenou barvu. Pod polarizovaným světlem jsou vidět jasné úseky svazků vláken znázorněných bílou tečkovanou čarou. Při tak tenkých řezech není možné jednotlivá vlákna trasovat přes obvodově-axiální rovinu.

100]. Pro vysvětlení všech nesrovnalostí a potvrzení této hypotézy by měla být provedena komplexní analýza explicitně hodnotící vlnitost vláken a jejich globální směry.

## 8. Vyhodnocené strukturní parametry pro lidskou aortu

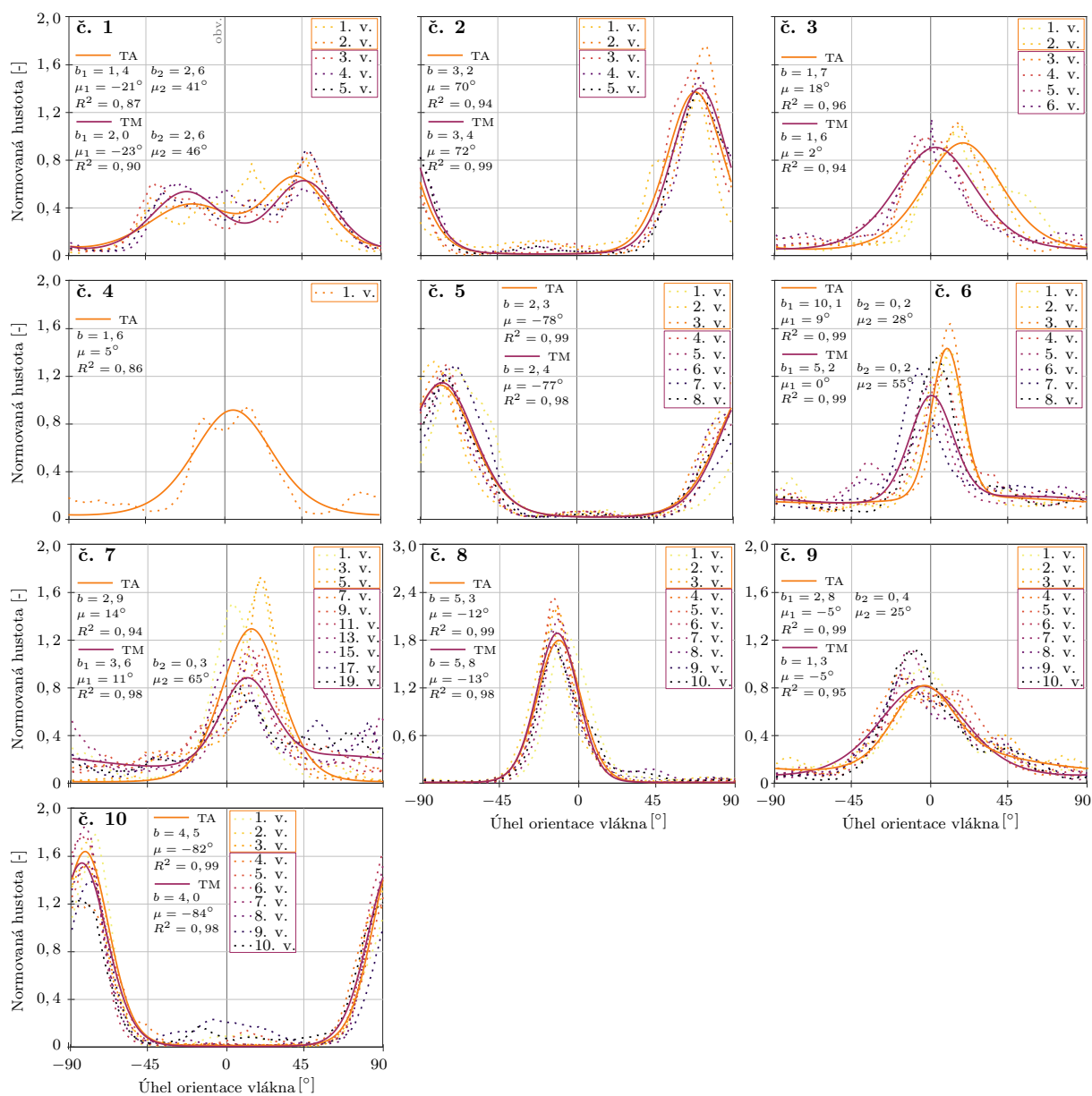
Pro analýzu *in vitro* vzorků z 10 lidských břišních aort z kadaverů (průměrný dosažený věk  $84 \pm 8$  let, 6 žen, 4 muži) byl použit jednak automatický algoritmus pro snímky z PLM a jednak software ImageJ pro snímky z laserového skenovacího konfokálního mikroskopu (CLSM) Leica TCS SP8X, který je k dispozici na Ústavu biomedicínského inženýrství FEKT VUT. Princip CLSM je uveden v podkapitole 3.2 a na obrázku 3.2. Vzorky pro tyto dvě metody byly odebrány vždy v těsné blízkosti vedle sebe v Anatomickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, opatřeny markery pro zachování jejich orientace a zafixovány. Vzorky pro PLM byly zafixovány ve formaldehydu špendlíky v nezatíženém stavu a předány na 1. Ústav patologie a anatomie FNUSA na následné histologické zpracování.

### 8.1. PLM

Pro polarizační mikroskopii byly vzorky nachystány, nasnímkovány a vyhodnoceny stejným způsobem, jako byly připraveny prasečí aorty v kapitole 6.1 (5x objektiv, velikost vyhodnocené oblasti na jednom řezu:  $4 \times 4$  mm, tloušťka řezu:  $5 - 7 \mu\text{m}$ ). Výsledné histogramy s distribučními funkcemi a celkovými daty jsou v grafu 8.1 a v tabulce 8.1.

Histogramy ukazují v 7 případech z 10 (1, 3, 4, 6, 7, 8 a 9) na unimodální nebo bimodální distribuci blízko obvodového směru přes všechny dostupné řezy. Ve třech případech (2, 5 a 10) ukazují unimodální distribuci v blízkosti axiálního směru vláken. To může být způsobeno lokálním uspořádáním kolagenu v důsledku možné aterosklerózy vzhledem k vysokému stáří dárců. Vrstvy zařazené do TM ve všech dostupných případech kopírovaly trend vyhodnocený pro TA. Pro porovnání unimodální a bimodální von Misesovou distribuční funkcí byla použita stejná pravidla jako u prasečích aort v předchozí kapitole. Metoda PLM umožňuje vyhodnotit pouze lokální směry kolagenních vláken a neumožňuje vyhodnotit vlnitost, ta bude vyhodnocena za pomoci snímků z konfokálního mikroskopu v další podkapitole.





**Obrázek 8.1:** Surové histogramy (tečkované) s aproximací von Misesovou distribuční funkcí (plně) pro TA a TM lidských aort vyhodnocené pomocí PLM.

**Tabulka 8.1:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro nezatížené vzorky lidských aort v TA a TM s vypočtenými průměrnými hodnotami se směrodatnými odchylkami (SD).

	Dárce č.	Unimodální			Bimodální				
		$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
TA	1	0,7	22	0,58	<b>1,4</b>	<b>2,6</b>	<b>-21</b>	<b>41</b>	<b>0,87</b>
	2	<b>3,2</b>	<b>70</b>	<b>0,94</b>	1,4	7,5	61	72	0,98
	3	<b>1,7</b>	<b>18</b>	<b>0,96</b>	3,4	1,2	12	35	0,98
	4	<b>1,6</b>	<b>5</b>	<b>0,86</b>	0,5	3,3	5	6	0,89
	5	<b>2,3</b>	<b>-78</b>	<b>0,99</b>	3,0	1,7	-78	12	0,99
	6	2,6	9	0,75	<b>10,1</b>	<b>0,2</b>	<b>9</b>	<b>28</b>	<b>0,99</b>
	7	<b>2,9</b>	<b>14</b>	<b>0,94</b>	1,1	6,7	5	16	0,99
	8	<b>5,3</b>	<b>-12</b>	<b>0,99</b>	9,5	3,0	-14	-8	0,99
	9	1,2	-1	0,93	<b>2,8</b>	<b>0,4</b>	<b>-5</b>	<b>25</b>	<b>0,99</b>
	10	<b>4,5</b>	<b>-82</b>	<b>0,99</b>	8,5	5,3	-76	89	0,99
	<i>Průměr</i>	2,6	-3,5		4,2	3,2	-10,3	31,6	
	$\pm SD$	$\pm 1,5$	$\pm 45,8$		$\pm 3,7$	$\pm 2,6$	$\pm 41,5$	$\pm 29,7$	
TM	1	0,5	16	0,39	<b>2,0</b>	<b>2,6</b>	<b>-23</b>	<b>46</b>	<b>0,90</b>
	2	<b>3,4</b>	<b>72</b>	<b>0,99</b>	5,3	2,5	69	78	0,99
	3	<b>1,6</b>	<b>2</b>	<b>0,94</b>	3,5	0,5	1	9	0,98
	4		NA				NA		
	5	<b>2,4</b>	<b>-77</b>	<b>0,98</b>	2,2	4,0	-89	19	0,99
	6	1,4	1	0,78	<b>5,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0</b>	<b>55</b>	<b>0,99</b>
	7	1,1	13	0,82	<b>3,6</b>	<b>0,3</b>	<b>11</b>	<b>65</b>	<b>0,98</b>
	8	<b>5,8</b>	<b>-13</b>	<b>0,98</b>	12,4	2,8	-15	-7	0,99
	9	<b>1,3</b>	<b>-5</b>	<b>0,95</b>	3,0	1,2	-15	19	0,99
	10	<b>4,0</b>	<b>-84</b>	<b>0,98</b>	2,0	7,1	-86	-84	0,99
	<i>Průměr</i>	2,4	-8,3		4,4	2,4	-16,3	22,2	
	$\pm SD$	$\pm 1,7$	$\pm 47,7$		$\pm 3,3$	$\pm 2,2$	$\pm 48,5$	$\pm 48,6$	

## 8.2. CLSM

Vzorky pro pozorování pod konfokálním mikroskopem byly fixovány Zamboniho fixačním roztokem a nařezány mikrotomem na 25 a 50  $\mu\text{m}$  tlusté řezy v obvodově-axiální rovině na Anatomickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Dále byly vzorky opatřeny primární a sekundární protilátkou pro zvýraznění kolagenu I, jelikož jeho množství se s rostoucím věkem nesnižuje, jako u kolagenu III, a je tudíž i hlavním přítomným typem kolagenu ve všech segmentech aorty [89]. Excitační a emisní maxima byla:  $A_{max} = 651 \text{ nm}$ ,  $E_{max} = 667 \text{ nm}$ , objektiv 20x, velikost snímku:  $581,25 \times 581,25 \mu\text{m}$ , velikost vyhodnocené oblasti na jednom řezu:  $1,7 \times 1,7 \text{ mm}$ .

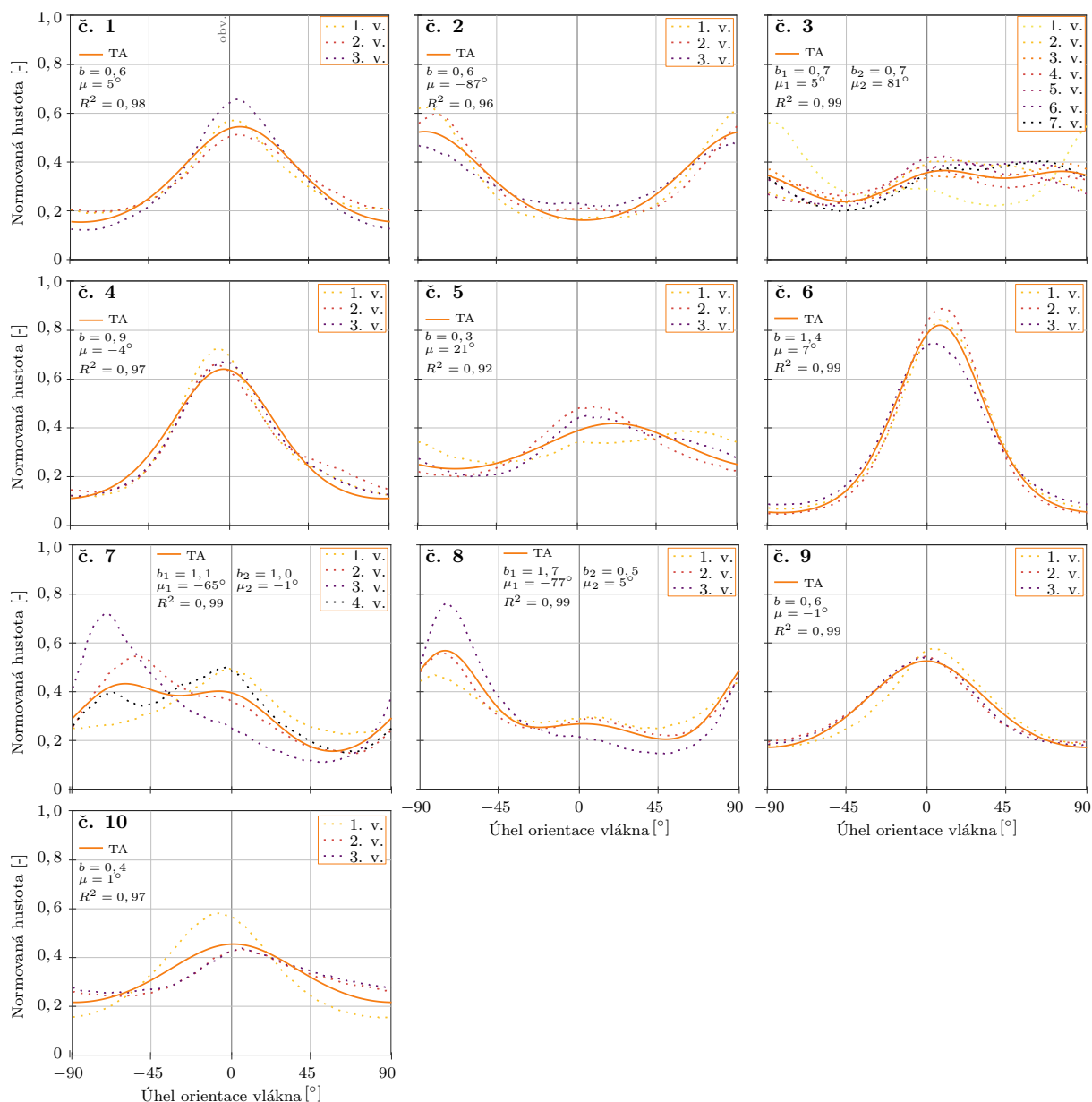
### 8.2.1. Metodika

K provedení analýzy obrazu pomocí metody strukturního tenzoru byl použit program ImageJ, plugin OrientationJ a NeuronJ [54], který byl použit k vyhodnocení směrů vláken a jejich vlnitosti i ve studiích [11, 61, 63]. Software vypočítá strukturní tenzor pro každý pixel výpočtem gradientů intenzity pixelů ve směrech  $x$  a  $y$  v rámci uživatelem zadaného lokálního Gaussova okna (použitá hodnota směrodatné odchylky:  $\vartheta = 3 \text{ px}$ ). Rozložení orientace vlákna je sestaveno z orientací pixelů, které jsou váženy hodnotami koherence, takže jsou zdůrazněny protáhlé struktury. Pokud by byla zvolena vyšší směrodatná odchylka, byla by více eliminována izotropní složka histogramů, zpočátku měření a vyhodnocování nebylo ale jasné, jaká hodnota bude nejvíce vyhovovat pro všechny nasnímkované oblasti, proto byla nastavena hodnota  $\vartheta = 3 \text{ px}$  s tím, že jsme schopni izotropní složku úplně eliminovat následným přepočtem v programu MATLAB. Program generuje pouze histogram lokálních orientací vláken, stejně jako u PLM. Von Misesova distribuční funkce byla nařizována v programu MATLAB.

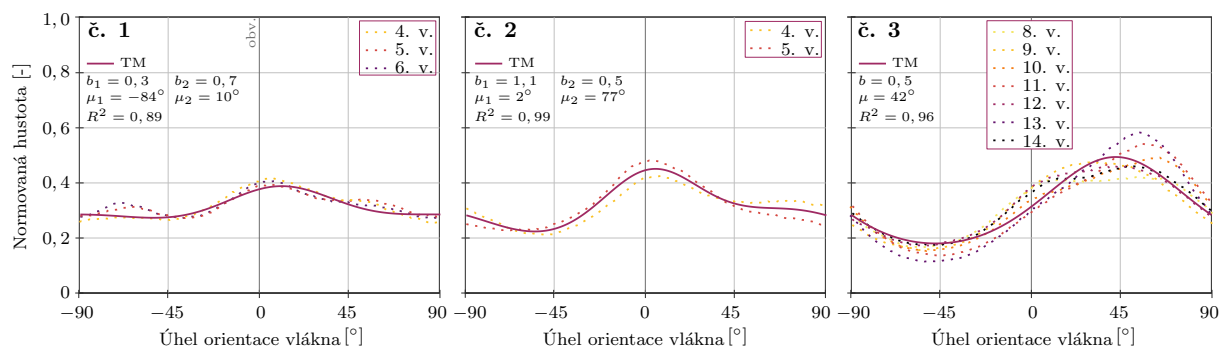
### 8.2.2. Výsledky

Výsledné histogramy s distribučními funkcemi a celkovými daty pro TA jsou v grafu 8.2 a v tabulce 8.2. U prvních třech vzorků se podařilo získat větší počet řezů po tloušťce stěny aorty, tak druhá polovina řezů byla vyhodnocena jako TM, viz obrázek 8.3 a tabulka 8.3. Do tabulek byly doplněny i vyhodnocené strukturní parametry při odebrané izotropní složce (homogenní tkáň, kde ji program vyhodnotil jako náhodně rozložená vlákna), která se v histogramech původně nacházela a mohla nám tak zkreslovat porovnání mezi PLM a CLSM. U PLM tento problém nenastává, jelikož vyvinutý automatický algoritmus vyhodnocuje pouze pixely, ve kterých dokáže rozlišit sinusovou funkci měnící se intenzity světla v závislosti na otočení vzorku vůči polarizátorům. Hodnota parametru koncentrace  $b$  se zvýšila zhruba dvojnásobně, hlavní směry zůstaly takřka stejné, nebo nemění podstatu výsledků.

U 6 z 10 vzorků byl prokázán dominantní obvodový směr (dárce č. 1, 4, 5, 6, 9 a 10) kolagenních vláken, u dvou dominantní axiální směr (dárce č. 2 a 8) a u dvou zbývajících tendence k čistě izotropnímu rozdělení (dárce č. 3 a 7) s tím, že u všech vzorků kromě č. 6. je pozorována jistá míra izotropie. Byl porovnán poměr minima ku maximu von Misesovy křivky pro PLM ( $0,04 \pm 0,05$ ) s CLSM s ( $0,36 \pm 0,17$ ) i bez ( $0,06 \pm 0,03$ ) izotropní složky, kde byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi PLM a CLSM s izotropní složkou ( $p=0$ ) a nevýznamný pro PLM a CLSM již bez izotropní složky ( $p=0,44$ ) pomocí analýzy ANOVA.



**Obrázek 8.2:** Surové histogramy (tečkované) s aproximací von Misesovou distribuční funkcí (plně) pro vnější vrstvy TA lidských aort vyhodnocených pomocí CLSM.



**Obrázek 8.3:** Surové histogramy (tečkované) s aproximací von Misesovou distribuční funkcí (plně) pro další vrstvy TM lidských aort vyhodnocených pomocí CLSM.

**Tabulka 8.2:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro nezatížené vzorky lidských aort v TA s vypočtenými průměrnými hodnotami se SD, kde první polovina tabulky je se zahrnutou izotropní složkou a druhá polovina bez ní.

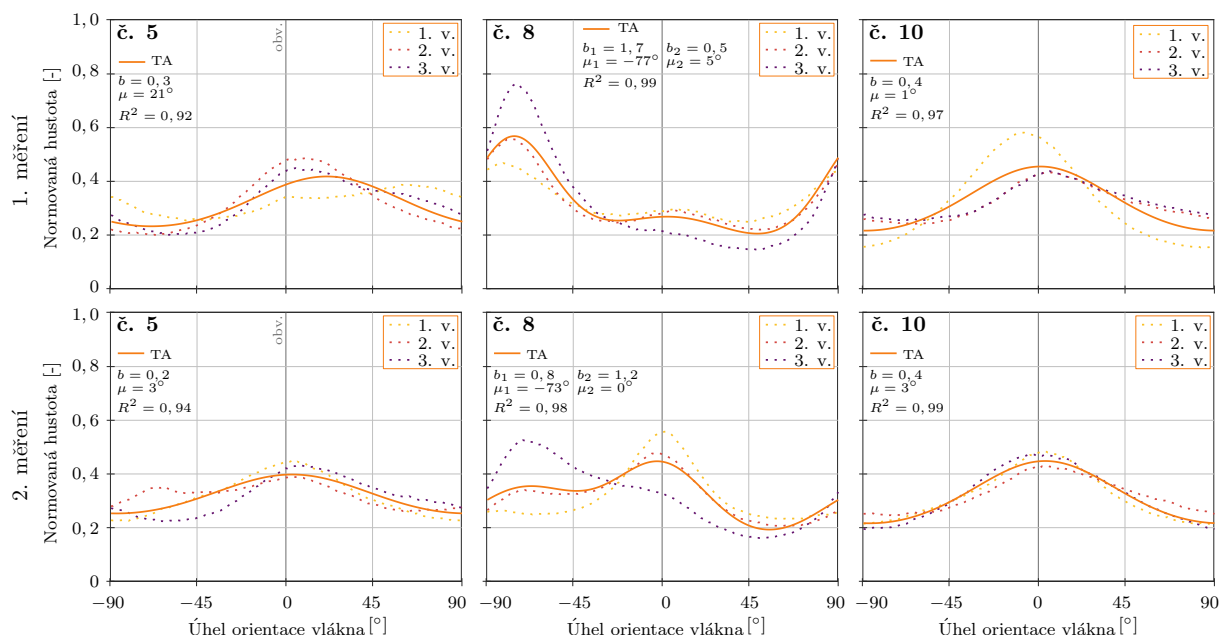
		TA							
		Unimodální			Bimodální				
	Dárce č.	$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
S izotropní složkou	1	<b>0,6</b>	<b>5</b>	<b>0,98</b>	1,3	0,2	2	34	0,99
	2	<b>0,6</b>	<b>-87</b>	<b>0,96</b>	1,4	0,1	-86	90	0,99
	3	0,2	42	0,67	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>5</b>	<b>81</b>	<b>0,99</b>
	4	<b>0,9</b>	<b>-4</b>	<b>0,97</b>	1,9	0,4	-9	26	0,99
	5	<b>0,3</b>	<b>21</b>	<b>0,92</b>	0,9	0,5	4	70	0,99
	6	<b>1,4</b>	<b>7</b>	<b>0,99</b>	2,0	0,9	7	8	0,99
	7	0,4	-37	0,81	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>-65</b>	<b>-1</b>	<b>0,99</b>
	8	0,5	-73	0,78	<b>1,7</b>	<b>0,5</b>	<b>-77</b>	<b>5</b>	<b>0,99</b>
	9	<b>0,6</b>	<b>-1</b>	<b>0,99</b>	0,1	1,1	-21	1	0,99
	10	<b>0,4</b>	<b>1</b>	<b>0,97</b>	0,9	0,1	-2	69	0,99
	<i>Průměr</i>	0,6	-12,6		1,2	0,6	-24,2	38,2	
	$\pm SD$	$\pm 0,3$	$\pm 40,8$		$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 37$	$\pm 36$	
Bez izotropní složky	1	<b>1,5</b>	<b>5</b>	<b>0,99</b>	2,2	1,5	-5	19	0,99
	2	<b>1,7</b>	<b>-90</b>	<b>0,97</b>	1,7	1,7	-89	90	0,97
	3	0,5	42	0,57	<b>1,9</b>	<b>1,8</b>	<b>10</b>	<b>75</b>	<b>0,94</b>
	4	<b>1,6</b>	<b>-5</b>	<b>0,98</b>	2,7	1,3	-12	11	0,99
	5	1,0	18	0,89	<b>2,4</b>	<b>1,3</b>	<b>3</b>	<b>49</b>	<b>0,98</b>
	6	<b>1,8</b>	<b>7</b>	<b>0,99</b>	2,2	2,2	-3	17	0,99
	7	0,7	-37	0,73	<b>2,2</b>	<b>1,9</b>	<b>-63</b>	<b>-7</b>	<b>0,98</b>
	8	<b>2,0</b>	<b>-75</b>	<b>0,94</b>	4,3	0,8	-78	-61	0,98
	9	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>0,99</b>	1,7	2,0	-14	11	0,99
	10	<b>1,4</b>	<b>0</b>	<b>0,99</b>	2,0	1,5	-11	15	0,99
	<i>Průměr</i>	1,4	-13,5		2,3	1,6	-26,2	21,9	
	$\pm SD$	$\pm 0,5$	$\pm 41,4$		$\pm 0,8$	$\pm 0,4$	$\pm 36,1$	$\pm 42,5$	

U vzorků od dárců č. 5, 8 a 10 došlo u TA k největšímu nesouladu výsledků z prezentovaných dvou metod. Pro vzorek od dárce č. 5 u PLM byla vyhodnocena unimodální distribuce se středním úhlem  $-78^\circ$  a u CLSM  $21^\circ$ , u dárce č. 8 u PLM  $-12^\circ$  a u CLSM  $-73^\circ$  a u dárce č. 10 u PLM  $-82^\circ$  a u CLSM  $1^\circ$ . Rozdíl v hlavním směru u vzorku č. 5, 8 a 10 je  $98^\circ$ ,  $61^\circ$  a  $83^\circ$ . Vysvětlením zde může být, buď že v místě vzorku byla lokálně narušená struktura např. aterosklerózou nebo jiným onemocněním, anebo došlo k otočení vzorku a špatnému zaznačení jeho orientace laborantem. U těchto tří vzorků bylo provedeno kontrolní druhé měření v jiných oblastech, než bylo původně snímkováno, jelikož původní osnímovaná oblast měla rozměr cca  $1,7 \times 1,7$  mm (u PLM je oblast cca  $4 \times 4$  mm, viz podkapitola 8.2.3). Srovnání výsledků z obou dvou měření pod CLSM je na obrázku 8.4, kde je patrný nevýznamný rozdíl mezi oběma měřeními u vzorků od dárců č. 5 a 10. U dárce č. 8 je patrný významnější rozdíl, první maximum kleslo, druhé se zvýšilo. Třetí křivka u druhého měření ale vyjadřuje trend z měření prvního, zároveň

**Tabulka 8.3:** Parametry unimodálního a bimodálního von Misesova rozdělení pro nezatížené vzorky lidských aort v TM s jejich průměrnými hodnotami se SD, kde první polovina tabulky je se zahrnutou izotropní složkou a druhá polovina bez ní.

		TM							
		Unimodální			Bimodální				
Dárce č.		$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b_1$ [-]	$b_2$ [-]	$\mu_1$ [°]	$\mu_2$ [°]	$R^2$
S iz. sl.	1	0,2	14	0,79	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>-84</b>	<b>10</b>	<b>0,89</b>
	2	0,3	14	0,83	<b>1,1</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>77</b>	<b>0,99</b>
	3	<b>0,5</b>	<b>42</b>	<b>0,96</b>	0,7	1,0	11	62	0,99
	<i>Průměr</i>	0,3	23,3		0,7	0,7	-23,7	49,7	
	$\pm SD$	$\pm 0,2$	$\pm 16,2$		$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 52,4$	$\pm 35,2$	
Bez iz. sl.	1	1,2	11	0,87	<b>3,2</b>	<b>1,0</b>	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>0,94</b>
	2	1,1	10	0,87	<b>2,9</b>	<b>0,9</b>	<b>1</b>	<b>47</b>	<b>0,98</b>
	3	1,0	43	0,91	<b>1,7</b>	<b>2,1</b>	<b>17</b>	<b>62</b>	<b>0,99</b>
	<i>Průměr</i>	1,1	21,3		2,6	1,3	6,7	49,7	
	$\pm SD$	$\pm 0,1$	$\pm 18,8$		$\pm 0,8$	$\pm 0,7$	$\pm 9$	$\pm 11,2$	

druhé měření se prakticky shoduje s výsledky z PLM, takže rozpor mezi CLSM a PLM se dá vysvětlit nehomogenitou tkáně. Pro další analýzy autorka doporučuje zaměřit se jednak na histologickou přípravu více řezů po tloušťce stěny cévy a jednak na zvětšení snímkané a analyzované oblasti, aby byla srovnatelná s oblastí analyzovanou pod PLM.



**Obrázek 8.4:** Srovnání 1. měření s jeho opakovaným měřením z důvodu nesouladu s výsledky z PLM.

Průměrné hodnoty úhlů mezi rodinami  $\varphi_{pr}$  a jejich středu  $\omega_{pr}$  bimodálního von Misesova rozdělení jsou v tabulce 8.4. Hodnoty získané pomocí PLM jsou takřka shodné s hodnotami pro nezatížené vzorky prasečích aort (viz. tabulka 7.5). V histogramech ale převládá unimodální distribuce u TA vyhodnocené pomocí PLM i CLSM i pro TM pod

PLM. V TM pod CLSM je z histogramů zřejmý jeden vrchol (viz obrázek 8.3), koeficient determinace se ale přiklání spíše k bimodálnímu rozdělení i po eliminaci izotropní složky u všech třech vzorků. Dominantní vrchol u prvních dvou vzorků je v obvodovém směru, druhý vrchol je bokem, pro nás takřka neviditelný, a má i významně nižší parametr koncentrace. Při tak malém počtu vzorků tedy nemůžeme střední úhel  $\omega_{pr}$  pro TM u CLSM dále rozebírat.

**Tabulka 8.4:** Pro obě vrstvy TA i TM u PLM a CLSM (bez izotropní složky) byly vypočítány průměrné hodnoty úhlů mezi rodinami  $\varphi_{pr}$  se SD a jejich středu  $\omega_{pr}$  se SD.

	PLM		CLSM	
	TA	TM	TA	TM
$\varphi_{pr} \pm SD[^\circ]$	$60,1 \pm 53,5$	$56,6 \pm 49,2$	$48,1 \pm 48,9$	$43,0 \pm 4,4$
$\omega_{pr} \pm SD[^\circ]$	$10,7 \pm 25,3$	$2,9 \pm 45,1$	$-2,2 \pm 30,9$	$28,2 \pm 9,9$

### 8.2.3. Limitace metodiky

Zvolená tloušťka řezů (nejprve 25  $\mu\text{m}$  a poté 50  $\mu\text{m}$ ) je stále nízká, jelikož se nepodařilo získat 3D snímek, kde by bylo možné vyhodnocovat vlákna napříč řezem. Barvení primární a sekundární protilátkou nebylo příliš výrazné, kvůli tomu muselo být zvoleno poměrně velké zvětšení objektivu (20x). Snímaná oblast byla několikanásobně menší než u PLM (1,7  $\times$  1,7 mm), což by mohlo vést k nesprávné interpretaci orientace a rozptylu kolagenu, viz studie [90].

Použití fluorescenčního barviva CNA35-OG488 by mohlo přinést lepší kvalitu obrazu (viz. studie [11, 55]), avšak k jeho aplikaci je potřeba přístup do speciální laboratoře s možnostmi práce s geneticky modifikovanými organismy.

## 8.3. Diskuze

Ve většině studií se objevují poznatky o dvou [37, 49, 76], třech [37] nebo dokonce čtyřech rodinách [11, 37, 56] kolagenních vláken v tepnách napříč jejich tloušťkou, která nejsou podložena srovnáním s unimodálním rozdělením [56, 64], nebo uvažována jako jedna rodina zvlněných vláken.

Naše výsledky podporují hypotézu o jedné rodině vláken blízko obvodového směru v TA i TM, což odpovídá i výsledkům ve studiích [7, 8, 34, 35, 53, 55, 57] a v našich předchozích experimentech na prasečích tepnách představených v kapitole 6 a diskutovaných v 7.

Obě metody vyhodnocují pouze lokální směry kolagenních vláken, nikoliv globální, které se mohou od lokálních lišit kvůli zvlnění vláken. Jako vstupy do strukturních konstitutivních modelů by měly sloužit právě globální směry a ty se snažila získat nám známá jedna studie [11], podle jejich postupu byly vyhodnoceny globální směry vytrasovaných vláken u lidských tepen v další kapitole 9. Ve studii bohužel chybí porovnání a diskuze nad vyhodnocenými lokálními a globálními směry v závislosti na vlnitosti vláken.

Autorce práce není známá žádná jiná studie, která by porovnála výsledky strukturních parametrů ze dvou rozdílných metod pro jedny vzorky nebo od stejných dárců. U 3/10 vzorků byl pozorován rozpor mezi výsledky u jednotlivých metod. Jednalo se o vzorky

od dárců č. 5, 8 a 10, kde rozdíl v hlavním směru byl  $98^\circ$ ,  $61^\circ$  a  $83^\circ$ . Vysvětlením zde může být lokálně narušená struktura tkáně vlivem onemocnění, nebo chyba laboranta při odebrání tkáně a jeho následnému označení orientace vzorku. Dále zde může hrát vliv velikost snímkové plochy vzorky u obou metod. U PLM vyhodnocená oblast měří cca  $4 \times 4$  mm, u CLSM cca  $1,7 \times 1,7$  mm, kvůli zvolenému většímu zvětšení vzorku. Proto bylo provedeno druhé snímkování a vyhodnocení dalších oblastí pod CLSM. Výsledky u dvou ukázaly nevýznamný rozdíl mezi oběma měřeními, u jednoho došlo k rozdílu a přiblížení se výsledkům z PLM, takže to lze vysvětlit nehomogenitou tkáně. Do budoucna autorka doporučuje zaměřit se na velikost vyhodnocované plochy pod CLSM a zvětšit ji na podobný rozměr, jako vyhodnocujeme u PLM.

Dále si je autorka vědoma nízkému počtu dárců, do budoucna podporuje další sbírání vzorků a jejich analýzy pro rigoróznější závěry se zaměřením se více na TM, kde bylo vyhodnoceno velmi malé množství vzorků hlavně u metody CLSM. Řezy byly vždy vedeny směrech od TA k TM, v další analýze by se mohlo vyzkoušet provést i řezy od TI směrem k TA, pro vyhodnocení vlivu aterosklerózy v tepnách.

Každá metoda funguje na rozdílném principu analýzy obrazu. U PLM algoritmus vyhodnocuje lokální směr vlákna v každém pixelu na základě průběhu intenzity světla při otáčení vzorku vzhledem ke kolmým a vychýleným polarizátorům. Pokud je v obraze díra mezi vlákny, nebo se zde kolagenní vlákna nevyskytují, algoritmus toto místo nevyhodnocuje a nezobrazí se tak ani ve výsledném histogramu. Výhodou algoritmu je jeho vyhodnocovací rychlost a vysoká přesnost [46, 70]. Nevýhodou celého přístupu je vyšší časová náročnost přípravy histologických řezů, jejich tloušťka, která znemožňuje analýzu vlnitosti vláken, a vyšší časová náročnost při snímkování jednotlivých oblastí. Ke správnému a co nejméně časově náročnému vyhodnocení totiž potřebujeme 6 snímků s kolmými polarizátory a 6 snímků s vychýlenými, viz podkapitola 4.3.

U CLSM naopak vyhodnocujeme v softwaru ImageJ pouze jeden snímek pomocí metody strukturního tenzoru v každém pixelu obrazu. Je zde zapotřebí vhodně zvolit velikost směrodatné odchylky lokálního Gaussova okna, která nám ovlivňuje výslednou velikost vyhodnocené izotropní složky v histogramech a co nejvíce ji omezit nebo eliminovat jejím úplným následným odečtem. Většina strukturních konstitutivních modelů ji do sebe neumí zahrnout, protože mají izotropní složku popsanou modelem neo-Hook, viz kapitola 5. Výhodou tohoto přístupu je rychlost, jelikož pořizujeme na konkrétní oblasti vzorku pouze jeden snímek a software ImageJ ho dokáže vyhodnotit za několik jednotek sekund (podobně jako vyvinutý algoritmus u PLM), přesnost a možnost větší tloušťky řezu a zachycení tak větší délky vlákna pro vyhodnocení jeho vlnitosti [11, 55, 61, 63]. Nevýhodou je náročnější příprava řezů, vyšší cena barviv a protilátek a vyšší pořizovací cena konfokálního mikroskopu.



## 9. Vlnitost

Vlnitost kolagenních vláken  $T \in \langle 1; \infty \rangle$  byla vyhodnocena z CLSM snímků podle postupu popsaného ve studii [63] pomocí rovnice:

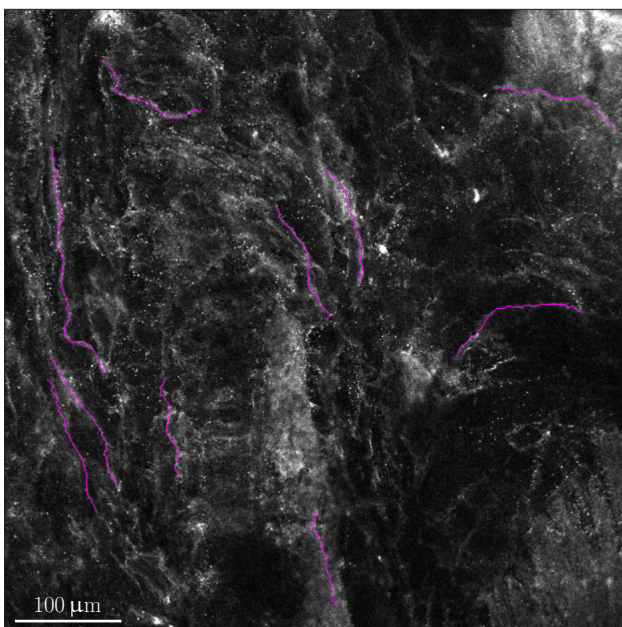
$$T = \frac{L_f}{L_0}, \quad (9.1)$$

kde  $L_f$  je označuje délku vlákna a  $L_0$  vzdálenost mezi jeho koncovými body. Pokud  $T = 1$  jedná se o přímá vlákna a čím je  $T$  větší, tím jsou vlákna nebo svazek více zvlněná.

Druhou možností jak definovat vlnitost je její převrácená hodnota, neboli přímost vláken  $S \in \langle 0; 1 \rangle$ :

$$S = \frac{1}{T}. \quad (9.2)$$

Na každém snímku (oblasti na vzorku) bylo poloautomaticky vytrasováno 10 vláken, viz obrázek 9.1, na každém řezu jich tedy bylo vyhodnoceno 90 (pro TA celkem 900, pro TM 270).



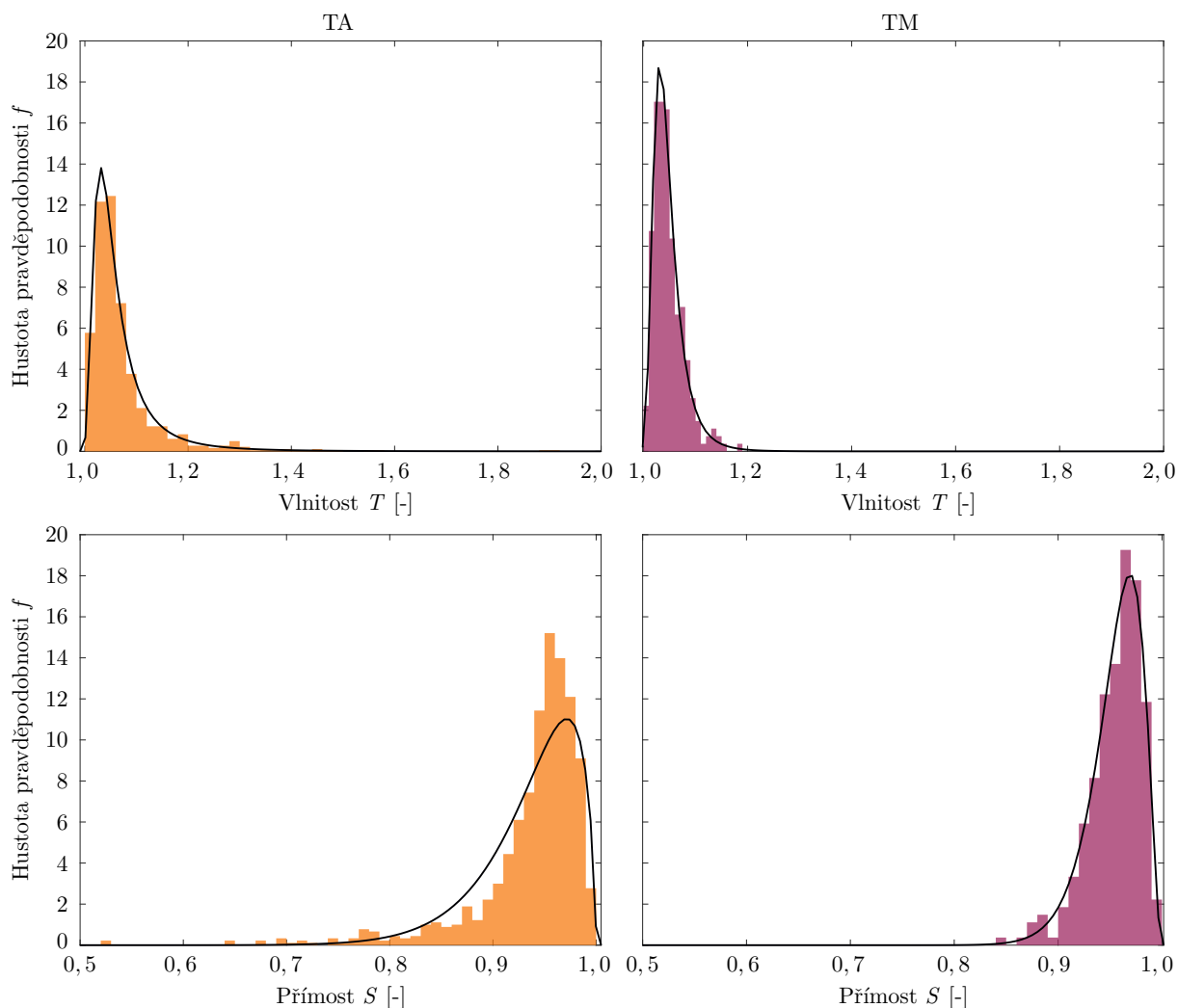
**Obrázek 9.1:** Snímek břišní aorty z CLSM ve stupních šedi pro vytrasování 10 vybraných kolagenních vláken (fialově) od dárce č. 7.

Zobecněné rozdělení extrémních hodnot (*Generalized Extreme Value Distribution*, dále zkratkou GEVD) vlnitosti  $T$  pro všechny vzorky TA a TM jsou v první řadě na obrázku 9.2 a v tabulce 9.1. GEVD se často používá k modelování nejmenší nebo největší hodnoty mezi velkým souborem nezávislých, identicky rozdělených náhodných hodnot představujících měření nebo pozorování. Kombinuje v sobě tři jednodušší rozdělení do jedné formy

a umožňuje tak výběr toho nejvhodnějšího na základě samotného datového souboru. Jeho hustota pravděpodobnosti je:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma} \exp \left[ - \left( 1 + k \frac{(x - \mu)}{\sigma} \right)^{-\frac{1}{k}} \right] \left( 1 + k \frac{(x - \mu)}{\sigma} \right)^{-1 - \frac{1}{k}}, \quad (9.3)$$

kde  $\mu$  je parametr umístění,  $\sigma > 0$  je parametr měřítka (rozsahu) a  $k \neq 0$  je parametr tvaru.



**Obrázek 9.2:** Distribuce parametru vlnitosti  $T$  a přímosti  $S$  pro kolagení vlákna u TA (vlevo) a TM (vpravo) v nezatíženém stavu z celého souboru vyhodnocených vzorků spolu s GEVD (u vlnitosti) a Beta rozdělením (u přímosti).

Rozdělení Beta parametru přímosti  $S$  pro všechny vzorky TA a TM jsou uvedeny ve druhé řadě na obrázku 9.2 a v tabulce 9.2. Beta rozdělení je pravděpodobnostní funkce pro proměnnou omezenou rozsahem v intervalu  $\langle 0; 1 \rangle$  a její hustota pravděpodobnosti je:

$$f(x) = \frac{1}{B(\alpha, \beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}, \quad (9.4)$$

kde  $B$  je Beta funkce, nebo také normalizační konstanta zajišťující, že celková pravděpodobnost je 1,  $\alpha > 0$  je parametr tvaru,  $\beta > 0$  rozsahu. Definice obou použitých rozdělení jsou použita z *MathWorks Help Center*.

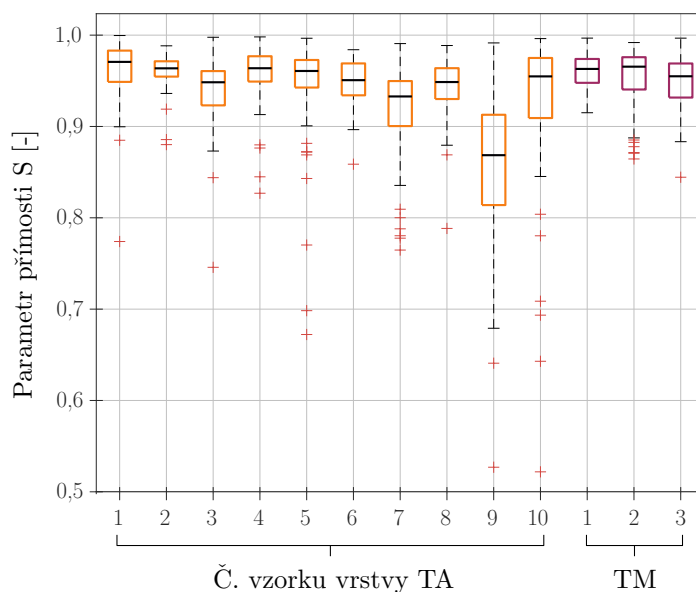
**Tabulka 9.1:** Parametry GEVD na vlnitosti kolagenních vláken v nezatíženém stavu z celého souboru vyhodnocených vzorků.

	TA	TM
Log-pravděpodobnostní hodnota	1589,3	614,7
Střední hodnota	1,07	1,05
Rozptyl	0,0093	0,00096
$k$	0,38	0,13
$\sigma$	0,03	0,02
$\mu$	1,039	1,034

**Tabulka 9.2:** Parametry rozdělení Beta na přímosti kolagenních vláken v nezatíženém stavu z celého souboru vyhodnocených vzorků.

	TA	TM
Log-pravděpodobnostní hodnota	1651,2	639,6
Střední hodnota	0,94	0,96
Rozptyl	0,002	0,0006
$\alpha$	24,76	63,6
$\beta$	1,69	2,99

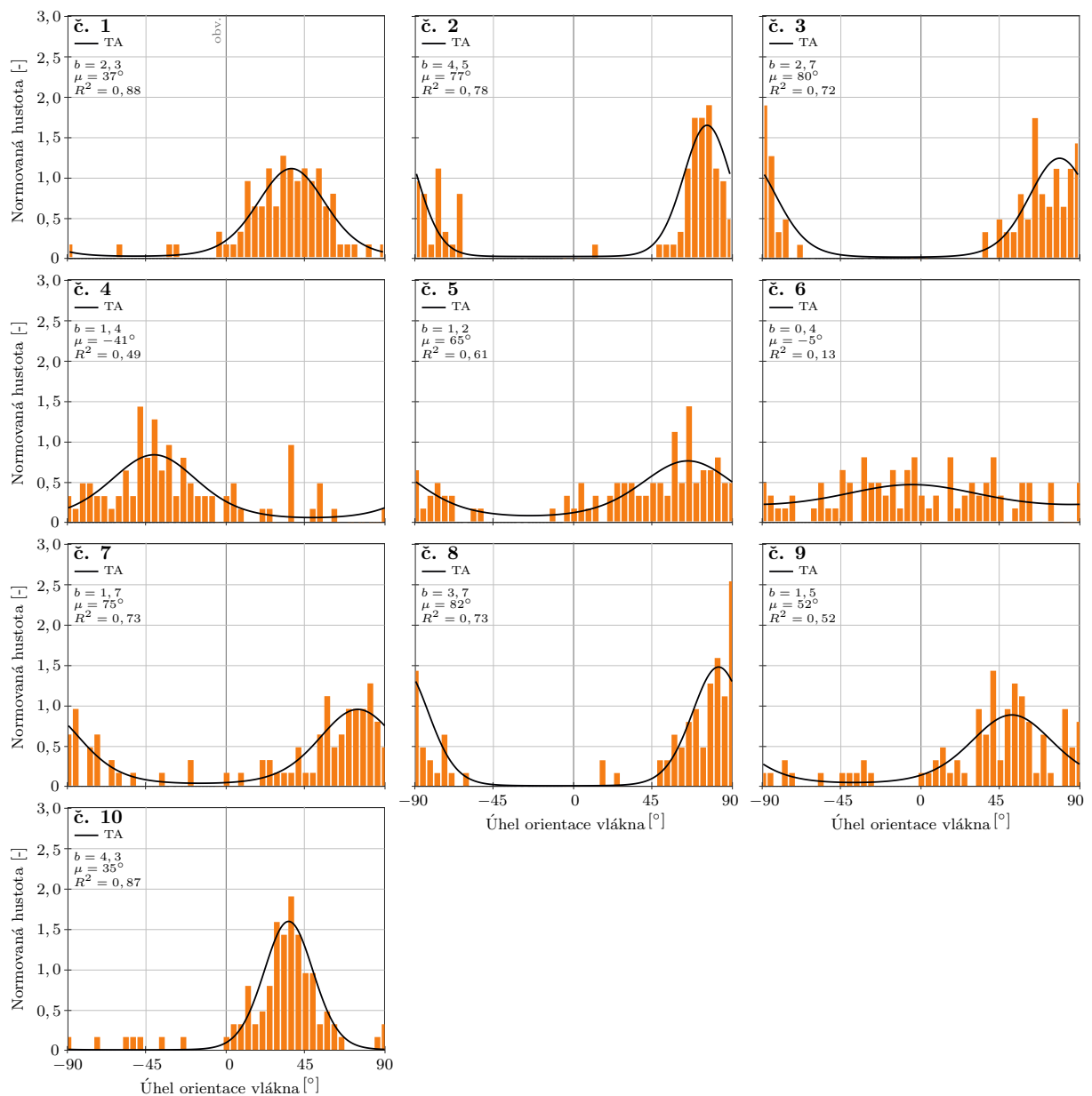
Přímost  $S$  jednotlivých vzorků pro vrstvy TA a TM je znázorněna v krabicovém grafu 9.3. V každém rámečku středová značka označuje medián a spodní a horní okraj rámečku označuje dolní a horní kvartil (25% a 75% kvantil). Vousy označují minimální a maximální hodnotu rozsahu, ze kterého jsou vyloučené odlehlé hodnoty (červené křížky), které jsou dále o více než 1,5 násobku délky horního a spodního kvartilu (délky rámečku). Všechny vzorky kromě č. 9 mají rozptyl mezi hodnotami 0,9 a 1, což značí spíše narovnaná vlákna.



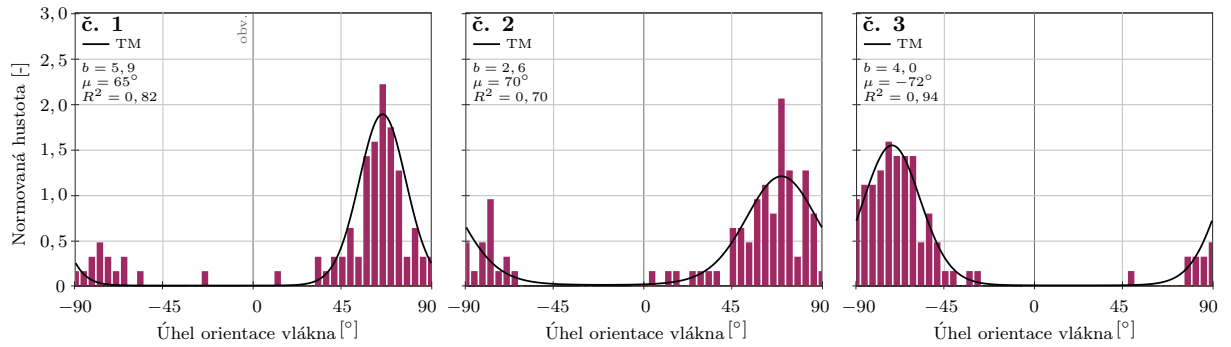
**Obrázek 9.3:** Krabicový graf parametru přímosti  $S$  pro jednotlivé vzorky vrstev TA (oranžově) a TM (fialově).

## 9.1. Globální směry

Z koncových bodů vytrasovaných vláken byl určen vektor a poté globální směry pro TA a TM aproximované unimodální von Misesovou distribuční funkcí, viz obrázky 9.4 a 9.5. Průměrný globální směr pro TA vyšel  $51,3 \pm 39^\circ$  (vyloučen vzorek od dárce č. 6, který vykazuje izotropní rozdělení s velmi nízkým  $R^2$  von Misesovy distribuční funkce). Vzhledem k velkému rozptylu nám průměrný směr téměř nic neříká a je potřeba do budoucna vyhodnotit větší počet vzorků. Průměrný parametr koncentrace  $b$  pro TA vyšel  $2,6 \pm 1,3$ . Nižší hodnoty koeficientu determinace jsou způsobené nižším počtem hodnot v histogramech, v každém je zobrazeno zastoupení globálního úhlu pro 90 vytrasovaných vláken, což je ale srovnatelné číslo s publikovanými výsledky ze studií používajících manuální metody [2, 37, 38].



**Obrázek 9.4:** Surové histogramy globálních směrů kolagenických vláken s aproximací von Misesovou distribuční funkcí (černě) pro TA lidských aort vyhodnocených pomocí CLSM.



**Obrázek 9.5:** Surové histogramy globálních směrů kolagenních vláken s aproximací von Misesovou distribuční funkcí (černě) pro TM lidských aort vyhodnocených pomocí CLSM.

V tabulce 9.3 je srovnání parametrů unimodálního von Misesova rozdělení pro TA a TM pro lokální (bez izotropní složky) a globální směry s průměrnou vlnitostí  $T$  a přímostí  $S$  pro každý vzorek. Vlnitost byla u všech vzorků nízká kromě dárců č. 7, 9 a 10.

**Tabulka 9.3:** Srovnání parametrů unimodálního von Misesova rozdělení pro TA a TM pro lokální a globální směry vyhodnocené pomocí CLSM. Lokální směry byly vyhodnoceny automaticky pomocí softwaru ImageJ a globální poloautomaticky pomocí vytrasovaných vláken, ze kterých byla určena vlnitost  $T$  a přímost  $S$ .

	Dárce č.	CLSM lokální směry			CLSM globální směry			$S$ [-]	$T$ [-]
		$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$	$b$ [-]	$\mu$ [°]	$R^2$		
TA	1	<b>1,5</b>	<b>5</b>	<b>0,99</b>	<b>2,3</b>	<b>37</b>	<b>0,88</b>	0,96	1,04
	2	<b>1,7</b>	<b>-90</b>	<b>0,97</b>	<b>4,5</b>	<b>77</b>	<b>0,78</b>	0,96	1,04
	3	0,5	42	0,57	<b>2,7</b>	<b>80</b>	<b>0,72</b>	0,94	1,06
	4	<b>1,6</b>	<b>-5</b>	<b>0,98</b>	<b>1,4</b>	<b>-41</b>	<b>0,49</b>	0,96	1,04
	5	1,0	18	0,89	<b>1,2</b>	<b>65</b>	<b>0,61</b>	0,94	1,06
	6	<b>1,8</b>	<b>7</b>	<b>0,99</b>	<b>0,4</b>	<b>-5</b>	<b>0,13</b>	0,95	1,05
	7	0,7	-37	0,73	<b>1,7</b>	<b>75</b>	<b>0,73</b>	0,91	1,10
	8	<b>2,0</b>	<b>-75</b>	<b>0,94</b>	<b>3,7</b>	<b>82</b>	<b>0,73</b>	0,94	1,06
	9	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>0,99</b>	<b>1,5</b>	<b>52</b>	<b>0,52</b>	0,85	1,18
	10	<b>1,4</b>	<b>0</b>	<b>0,99</b>	<b>4,3</b>	<b>35</b>	<b>0,87</b>	0,92	1,09
	<i>Průměr</i>	1,4	-13,5		2,4	45,7		0,93	1,07
	$\pm SD$	$\pm 0,5$	$\pm 41,4$		$\pm 1,4$	$\pm 40,9$		$\pm 0,03$	$\pm 0,04$
TM	1	1,2	11	0,87	<b>5,9</b>	<b>65</b>	<b>0,82</b>	0,96	1,04
	2	1,1	10	0,87	<b>2,6</b>	<b>70</b>	<b>0,70</b>	0,95	1,05
	3	1,0	43	0,91	<b>4,0</b>	<b>-72</b>	<b>0,94</b>	0,95	1,05
	<i>Průměr</i>	1,1	21,3		4,2	21,0		0,95	1,05
	$\pm SD$	$\pm 0,1$	$\pm 18,8$		$\pm 1,7$	$\pm 80,6$		$\pm 0,01$	$\pm 0,01$

Vizuálním porovnáním grafů 8.2 a 9.4 pro TA a 8.3 a 9.5 pro TM a za pomoci tabulky 9.3 je vidět odklon u TA u vzorků od dárců č. 1, 4, 5, 9 a 10 od obvodového směru lokálních úhlů k jedné globální diagonální spirálovité rodině vláken. V tomto případě si můžeme představit mírně zvlněná sinusová vlákna s lokálními úhly v rozpětí  $-45^\circ$  až  $45^\circ$  pod globálním úhlem cca  $45^\circ$  (jelikož jejich globální úhly  $\mu$  jsou  $37^\circ$ ,  $-41^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $52^\circ$  a  $35^\circ$ ).

U TA u vzorku od dárce č. 2 jsou naopak lokální úhly kolem axiálního směru, což pak odpovídá zjištěnému globálnímu axiálnímu směru s vysokým parametrem koncentrace  $b$ .

Vzorek od dárce č. 3 u TA ukazoval na dva hlavní lokální směry - obvodový ( $10^\circ$ ) a axiální ( $75^\circ$ ) se srovnatelným parametrem koncentrace  $b$ , a směrem k TM se pak koncentrovaly kolem úhlu  $43^\circ$ . Zjištěný globální diagonální až axiální směr tedy také odpovídá sinusovým vláknům pod zmíněnými lokálními směry. U TM nastává ale rozpor, protože pokud si představíme jednu rodinu sinusových vláken, kde lokální úhly jsou mezi  $0^\circ$  až  $90^\circ$ , měl by globální úhel vycházet jako kladný diagonální, podle vytrasovaných vláken ale vychází jako záporný diagonální.

U vzorku od dárce č. 6 globální úhel podle von Misesovy distribuční funkce vychází sice jako obvodový pod  $-5^\circ$ , ale s velmi malou koncentrací, tedy spíše se zde musíme klonit k izotropně rozestaveným vláknům. Graf lokálních směrů má oproti tomu největší koncentraci kolem obvodového směru.

Vzorky od dárců č. 7 a 8 (pokud vezmeme v úvahu i druhé měření) vykazují podobnost se vzorkem od dárce č. 3. Jejich lokální směry se pohybovaly kolem úhlů cca  $-70^\circ$  a  $0^\circ$  a jejich vlnitost je zvláště u vzorku od dárce č. 7 vyšší (1,09). Globální směr tedy opět odpovídá jedné rodině sinusově zvlněných vláken kolem axiálního směru.

Na rozdíl od lokálních směrů jsme nikde nedostali obvodovou orientaci, globální a lokální směry jsou tedy ve vzájemném rozporu, který prozatím neumíme vysvětlit.

## 9.2. Diskuze

Střední hodnota parametru přímosti  $S$  vyšla pro TA 0,94 a pro TM 0,96. O něco více narovnaná vlákna ukazuje rozdělení Beta i GEVD pro TM. Ve studii [63] střední hodnota parametru přímosti  $S$  vyšla pro TA 0,752 a pro TM 0,979. V jejich studii měli vzorky ze zdravých lidských břišních aort bez aterosklerotických změn se stářím dárců  $59 \pm 7$  let (6 žen a 6 mužů).

Nejnovější studie [64] hodnotící změny parametrů v důsledku biaxiálního zatížení ( $\lambda_{x,y} = 1,2$ ) TA v lidských břišních aortách vyhodnotila střední hodnotu  $S$  bez zatížení jako 0,91 a se zatížením 0,96, což podporuje naše výsledky přímosti vláken v TA.

Ve studii [11] vyšla střední hodnota  $S$  0,718 pro soubor vzorků TA králičích společných karotid, kde se jednalo o zdravé tepny. Ve stejném roce byla publikována studie [55], která ale zkoumala změnu vlnitosti, orientace a rozptylu kolagenních vláken při zatížení. Hustotu pravděpodobnosti nemají proloženou žádným rozdělením, ale můžeme z obrázku 5 odhadnout, že i bez zatížení se střední hodnota  $S$  pohybovala kolem 0,9 a při zatížení se přibližovala 1 a tedy plně narovnaným vláknům.

Práce [61] se také zabývá vlnitostí kolagenních vláken v králičích karotidách a pro 6 vzorků jim vyšel parametr přímosti  $0,77 \pm 0,02$ , což odpovídá výsledkům studie [11].

Přínosnější je ale pro nás analýza globálních směrů kolagenních vláken, jelikož do strukturních konstitutivních modelů materiálu se jako vstupy používají právě globální směry vláken a ne lokální. Většina studií a metod uvádí právě pouze lokální směry vláken, které se ale nemusí shodovat s globálními, tak jako tomu je u naší analýzy, kde je rozpor opravdu zřetelný.

# Závěr

Za poslední roky vývoje a výzkumu v oblasti biomechaniky kardiovaskulárního systému se upřednostňují anizotropní, strukturní konstitutivní modely pro popis mechanického chování a se zohledněním mikrostruktury cévní tkáně. Tyto modely popisují cévní stěnu přesněji, než modely izotropní nebo anizotropní fenomenologické, které se navzdory tomu stále používají, protože nám chybí jednoznačný popis její struktury kvantifikovaný do podoby parametrů modelu. Navíc každá céva liší se průměrem a tloušťkou stěny se může lišit i v mikrostruktuře a uspořádání vláken.

Vstupy do strukturních konstitutivních modelů jsou globální směr vláken, rozptyl kolem tohoto směru a vlnitost. Pro jejich detekci existuje řada různých přístupů a metod. Jednou z nejčastěji používaných je polarizovaná mikroskopie vzhledem k její jednoduchosti a přesnosti. V této práci je prezentován, verifikován a validován automatický algoritmus pro vyhodnocování strukturních parametrů měkkých tkání, který je založen na dvou sadách šesti rotovaných mikrosnímků získaných jak s kolmými, tak s vychýlenými polarizátory. Výchylka mezi polarizátory překonává omezení  $90^\circ$  periodicity intenzity polarizovaného světla a přesně a rychle vyhodnocuje orientaci a rozptyl vláken v rovině v celém rozsahu  $180^\circ$  bez nutnosti dalšího přídavného vybavení [70].

Vlnitost vláken ztěžuje automatickou analýzu směrů, ale je velmi důležitá pro jejich správnou funkci. Z dosavadních výsledků ze snímků z polarizačního mikroskopu a automatizovaného algoritmu jsme schopni získat pouze lokální směry vláken. I tato informace je pro získání všech parametrů důležitá, bohužel o vlnitosti nám neposkytne potřebné informace. Tenké histologické řezy nám znemožňují trasovat vlákno ve 3D prostoru a v obvodově-axiální rovině tak vidíme pouze části sinusově zvlňených svazků vláken.

Globální směry vláken můžeme získat např. z analýzy vzorků pod zatížením, kdy eliminujeme vlnitost a dojde k jejich napřímění. Analýzou namáhaných vzorků prasečích břišních aort pomocí PLM a automatického algoritmu byla zjištěna existence jedné rodiny sinusově zvlňených vláken v dominantně obvodovém směru, než dvě spirálovité [88, 100]. Vzorky lidských břišních aort nebylo možné před fixací deformovat, jelikož vzorky byly hned histologicky připravovány pro polarizovanou a laserovou skenovací konfokální mikroskopii, ale za pomoci softwaru ImageJ a pluginu NeuronJ bylo možné vytrasovat na každém snímku 10 vláken a pomocí jejich koncových souřadnic a celkové délky vlákna byla vyhodnocena vlnitost a globální směr. Na výsledcích lze pozorovat rozpor, jelikož lokální směry ukázaly dominantní obvodovou orientaci, globální ukázaly diagonální nebo axiální směr.

V rámci disertační práce byl dále kladen důraz na správné vyhodnocování unimodální nebo bimodální distribuční von Misesovy funkce, jelikož v mnoha studiích je tohle opomíjeno a dochází tak k tomu, že bimodální distribuce nejsou srovnány s unimodálním rozdělením, která mohou poskytnout srovnatelnou aproximaci, nebo jedna rodina zvlňených vláken se v histogramu s jednoznačnou bimodální distribucí může zaměnit za dvě rodiny vláken s různými globálními směry.

U analýzy vzorků z lidských aort si je autorka vědoma, že jejich vyšší počet by vedl k rigoróznějším závěrům, avšak vyhodnocených 10 vzorků bylo sbíráno dva roky. Spolu s prvními experimenty na prasečích aortách a dokončením automatického algoritmu s jeho validací a verifikací by čekání na více vzorků z lidských aort přesahovalo časový rámec doktorského studia.

V rámci sběru vzorků z lidských aort byly zároveň sbírány i vzorky z pravých a levých krčních tepen, které jsou připraveny pro vyhodnocování pod PLM i CLSM, a které jsou klíčové pro další směřování oblasti mikrostruktury tkání a jejich vlivu na mechanické vlastnosti v naší výzkumné skupině na ÚMTMB. Autorka věří, že její závěry a poznatky z analýzy prasečích a lidských břišních aort pomůžou v dalších analýzách uspořádání kolagenních vláken nejen v lidských krčních tepnách.

## Návrh budoucích prací

Podle výsledků a závěrů zveřejněných v této práci autorka navrhuje nadále se věnovat analýze dalších vzorků tepen zároveň pod PLM i pod CLSM, aby byl získán větší soubor dat pro jednotlivé tepny (lidské aorty, pravé a levé krční tepny). U PLM by autorka ponechala stávající nastavení, u CLSM by se zaměřila na lepší odhad směrodatné odchylky lokálního Gaussova okna, aby byla eliminována izotropní složka ve výsledných histogramech, a dále na zvětšení snímkové oblasti (zvolit menší zvětšení objektivu nebo snímkovat větší plochu = více snímků při stávajícím objektivu), aby byla srovnatelná s oblastí snímkovanou pod PLM.

Dále je nutné se zaměřit na vyhodnocování vlnitosti a globálních směrů kolagenních vláken, protože jak je vidět, předchozí studie tohle opomíjejí, nahrazují globální směry lokálními v konstitutivních modelech materiálu, ale jejich rozdíl může být značný, tak jako v našem případě. Řešením by mohla být analýza nezatížených a zatížených vzorků z lidských aort a krčních tepen. Deformace vzorků by ale musela proběhnout přímo na Anatomickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně hned po jejich odběru a zároveň před fixací v Zamboniho fixačním roztoku (CLSM) nebo formaldehydu (PLM).



# Seznam použitých zkratek

2D	Dvojměrný
3D	Trojměrný
AA	Břišní aorta ( <i>Abdominal Aorta</i> )
AAA	Aneurysma břišní aorty ( <i>Abdominal Aortic Aneurysm</i> )
AI	Úhlová integrace ( <i>Angular Integration</i> )
BF	Světlé pole ( <i>Bright-field</i> )
CIA	Kyčelní tepny ( <i>Common iliac arteries</i> )
CLSM	Laserová skenovací konfokální mikroskopie ( <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> )
DAPI	2-(4-amidino-fenyl)-1H-indol-6-carboxamidin
DIC	Diferenciální interferenční kontrast ( <i>Differential Interference Contrast</i> )
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTI	( <i>Diffusion Tensor Imaging</i> )
EVG	Elastice van Gieson
FEKT	Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií
FFT	Rychlá Fourierova transformace ( <i>Fast Fourier Transform</i> )
FNUSA	Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
FSI	Fakulta strojního inženýrství
GEVD	Zobecněné rozdělení extrémních hodnot ( <i>Generalized Extreme Value Distribution</i> )
GST	Zobecněný strukturní tenzor ( <i>Generalized Structure Tensor</i> )
IMC	Hoffmanův modulační kontrast ( <i>Integrated Modulation Contrast</i> )
MLU	Mediální lamelární jednotka ( <i>Medial Lamellar Unit</i> )
MRI	Magnetická rezonance ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )

OG	Oregon Green
PH	Fázový kontrast ( <i>Phase Contrast</i> )
PLM	Polarizační světelná mikroskopie ( <i>Polarized Light Microscopy</i> )
PSR	Picro Sirius Red
ROI	Oblast zájmu ( <i>Region of Interest</i> )
SALS	( <i>Small Angle Light Scattering</i> )
SD	Směrodatná odchylka
SHG	( <i>Second Harmonic Generation</i> )
TA	Tunica adventitia
ThA	Hrudní aorta ( <i>Thoracic Aorta</i> )
TI	Tunica intima
TM	Tunica media
ÚFI	Ústav fyzikálního inženýrství
ÚMTMB	Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky
VUT	Vysoké učení technické

# Literatura

- [1] HOLZAPFEL, Gerhard A, Ray W OGDEN a Selda SHERIFOVA. On fibre dispersion modelling of soft biological tissues: a review. *Proceedings of the Royal Society A*. 2019roč. 475, č. 2224, s. 20180736.
- [2] GASSER, T Christian, Sara GALLINETTI, Xiao XING, Caroline FORSELL, Jesper SWEDENBORG a Joy ROY. Spatial orientation of collagen fibers in the abdominal aortic aneurysm's wall and its relation to wall mechanics. *Acta biomaterialia*. 2012roč. 8, č. 8, s. 3091–3103.
- [3] DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie. Olomouc: Epava, 2000*. ISBN 80-86297-05-5, 2000.
- [4] LÜLLMANN-RAUCH, R. *Histologie. Praha: Grada*. ISBN 978-80-247-3729-4, 2012.
- [5] VALDEZ-JASSO, D, Harvey Thomas BANKS, Mansoor A HAIDER, D BIA, Y ZOCALO, RL ARMENTANO a Mette S OLUFSEN. *Viscoelastic models for passive arterial wall dynamics*. North Carolina State University. Center for Research in Scientific Computation, 2008.
- [6] GASSER, T Christian, Ray W OGDEN a Gerhard A HOLZAPFEL. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *Journal of the royal society interface*. 2006roč. 3, č. 6, s. 15–35.
- [7] CANHAM, PETER B, HELEN M FINLAY, JAN G DIXON, DEREK R BOUGHNER a ANDREW CHEN. Measurements from light and polarised light microscopy of human coronary arteries fixed at distending pressure. *Cardiovascular research*. 1989roč. 23, č. 11, s. 973–982.
- [8] FINLAY, Helen M, Lesley MCCULLOUGH a Peter B CANHAM. Three-dimensional collagen organization of human brain arteries at different transmural pressures. *Journal of vascular research*. 1995roč. 32, č. 5, s. 301–312.
- [9] HOLZAPFEL, Gerhard A, Gerhard SOMMER, Martin AUER, Peter REGITNIG a Ray W OGDEN. Layer-specific 3D residual deformations of human aortas with non-atherosclerotic intimal thickening. *Annals of biomedical engineering*. 2007roč. 35, č. 4, s. 530–545.
- [10] PEÑA, Juan A, Miguel A MARTÍNEZ a Estefanía PEÑA. Layer-specific residual deformations and uniaxial and biaxial mechanical properties of thoracic porcine aorta. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2015roč. 50, s. 55–69.

- [11] REZAKHANIHA, Rana, Aristotelis AGIANNIOTIS, Jelle Tymen Christiaan SCHRAUWEN, Alessandra GRIFFA, Daniel SAGE, CVC vd BOUTEN, FN VAN DE VOSSE, Michaël UNSER a Nikolaos STERGIOPULOS. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2012roč. 11, č. 3-4, s. 461–473.
- [12] LEMAITRE, Jean. *Handbook of Materials Behavior Models, Three-Volume Set: Nonlinear Models and Properties*. Elsevier, 2001.
- [13] MECHAM, Robert P. Overview of extracellular matrix. *Current protocols in cell biology*. 1998č. 1, s. 10–1.
- [14] CLARK, John M a Seymour GLAGOV. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1985roč. 5, č. 1, s. 19–34.
- [15] WAGENSEIL, Jessica E a Robert P MECHAM. Elastin in large artery stiffness and hypertension. *Journal of cardiovascular translational research*. 2012roč. 5, č. 3, s. 264–273.
- [16] GREENWALD, SE. Ageing of the conduit arteries. *The Journal of pathology*. 2007roč. 211, č. 2, s. 157–172.
- [17] LACOLLEY, Patrick, Véronique REGNAULT, Antonino NICOLETTI, Zhenlin LI a Jean-Baptiste MICHEL. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular research*. 2012roč. 95, č. 2, s. 194–204.
- [18] O'CONNELL, Mary K, Sushila MURTHY, Samson PHAN, Chengpei XU, JoAnn BUCHANAN, Ryan SPILKER, Ronald L DALMAN, Christopher K ZARINS, Winfried DENK a Charles A TAYLOR. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biology*. 2008roč. 27, č. 3, s. 171–181.
- [19] HULMES, DJS. Collagen diversity, synthesis and assembly. In: *Collagen*. Springer, 2008s. 15–47.
- [20] FUNG, Yuan-cheng. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [21] ARMENTANO, Ricardo Luis, Jaime LEVENSON, Juan Gabriel BARRA, EI FISCHER, GUSTAVO JAVIER BREITBART, Ricardo Horacio PICHEL a Alain SIMON. Assessment of elastin and collagen contribution to aortic elasticity in conscious dogs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1991roč. 260, č. 6, s. H1870–H1877.
- [22] HUMPHREY, JD a PB CANHAM. Structure, mechanical properties, and mechanics of intracranial saccular aneurysms. *Journal of elasticity and the physical science of solids*. 2000roč. 61, č. 1-3, s. 49–81.
- [23] PIEZ, Karl A a Benes L TRUS. A new model for packing of type-I collagen molecules in the native fibril. *Bioscience reports*. 1981roč. 1, č. 10, s. 801–810.
- [24] SIBILLA, Sara, Martin GODFREY, Sarah BREWER, Anil BUDH-RAJA a Licia GENOVESE. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. *The Open Nutraceuticals Journal*. 2015roč. 8, č. 1.

- [25] HOLZAPFEL, Gerhard A, Gerhard SOMMER, Christian T GASSER a Peter REGITNIG. Determination of layer-specific mechanical properties of human coronary arteries with nonatherosclerotic intimal thickening and related constitutive modeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005roč. 289, č. 5, s. H2048–H2058.
- [26] JUNQUEIRA, L Cx' U, G BIGNOLAS a RR BRENTANI. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*. 1979roč. 11, č. 4, s. 447–455.
- [27] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. John Wiley & Sons, 2002.
- [28] CHENAULT, David B a Russell A CHIPMAN. Measurements of linear diattenuation and linear retardance spectra with a rotating sample spectropolarimeter. *Applied optics*. 1993roč. 32, č. 19, s. 3513–3519.
- [29] DAYAN, D, Y HISS, A HIRSHBERG, JJ BUBIS a M WOLMAN. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989roč. 93, č. 1, s. 27–29.
- [30] *Vesmír*. [online]. 2021 [cit. 2021-1-4]. Dostupné z: [https://vesmir.cz/images/gallery/archiv/2015/3/cesta-opticke-mikroskopie-k-superrozliseni/page/2015\\_168\\_02.gif](https://vesmir.cz/images/gallery/archiv/2015/3/cesta-opticke-mikroskopie-k-superrozliseni/page/2015_168_02.gif).
- [31] *Abcam: Direct vs indirect immunofluorescence*. [online]. 2021 [cit. 2021-10-15]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>.
- [32] KRAHN, Katy Nash, Carlijn VC BOUTEN, Sjoerd van TUIJL, Marc AMJ van ZANDVOORT a Maarten MERKX. Fluorescently labeled collagen binding proteins allow specific visualization of collagen in tissues and live cell culture. *Analytical biochemistry*. 2006roč. 350, č. 2, s. 177–185.
- [33] BAKIR, Gorkem, Benoit E GIROUARD, Richard WIENS, Stefan MASTEL, Eoghan DILLON, Mustafa KANSIZ a Kathleen M GOUGH. Orientation matters: Polarization dependent IR spectroscopy of collagen from intact tendon down to the single fibril level. *Molecules*. 2020roč. 25, č. 18, s. 4295.
- [34] SMITH, JF Harold, Peter B CANHAM a John STARKEY. Orientation of collagen in the tunica adventitia of the human cerebral artery measured with polarized light and the universal stage. *Journal of ultrastructure research*. 1981roč. 77, č. 2, s. 133–145.
- [35] CANHAM, Peter B, Helen M FINLAY, Jan G DIXON a Sarah E FERGUSON. Layered collagen fabric of cerebral aneurysms quantitatively assessed by the universal stage and polarized light microscopy. *The Anatomical Record*. 1991roč. 231, č. 4, s. 579–592.
- [36] CANHAM, PB, HM FINLAY a SY TONG. Stereological analysis of the layered collagen of human intracranial aneurysms. *Journal of microscopy*. 1996roč. 183, č. 2, s. 170–180.
- [37] SCHRIEFL, Andreas J, Georg ZEINDLINGER, David M PIERCE, Peter REGITNIG a Gerhard A HOLZAPFEL. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries. *Journal of the Royal Society Interface*. 2011roč. 9, s. 1275–1286.

- [38] SÁEZ, P, A GARCÍA, Estefanía PEÑA, Thomas Christian GASSER a MA MARTÍNEZ. Microstructural quantification of collagen fiber orientations and its integration in constitutive modeling of the porcine carotid artery. *Acta biomaterialia*. 2016roč. 33, s. 183–193.
- [39] OLDENBOURG, R a G MEI. New polarized light microscope with precision universal compensator. *Journal of microscopy*. 1995roč. 180, č. 2, s. 140–147.
- [40] SHRIBAK, Michael a Rudolf OLDENBOURG. Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions. *Applied Optics*. 2003roč. 42, č. 16, s. 3009–3017.
- [41] OLDENBOURG, Rudolf. Polarized light microscopy: principles and practice. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2013roč. 2013, č. 11, s. pdb–top078600.
- [42] TANI, Tomomi, Maki KOIKE-TANI, Mai Thi TRAN, Michael SHRIBAK a Snezana LEVIC. Postnatal structural development of mammalian Basilar Membrane provides anatomical basis for the maturation of tonotopic maps and frequency tuning. *Scientific reports*. 2021roč. 11, č. 1, s. 1–12.
- [43] AXER, Markus, David GRÄSSEL, Melanie KLEINER, Jürgen DAMMERS, Timo DICKSCHEID, Julia RECKFORT, Tim HÜTZ, Björn EIBEN, Uwe PIETRZYK, Karl ZILLES et al. High-resolution fiber tract reconstruction in the human brain by means of three-dimensional polarized light imaging. *Frontiers in neuroinformatics*. 2011roč. 5, s. 34.
- [44] SCHMITZ, Daniel, Thomas LIPPERT, Katrin AMUNTS a Markus AXER. Quantification of fiber orientation uncertainty in polarized light imaging of the human brain. In: *Medical Imaging 2020: Physics of Medical Imaging*. 2020s. 1131239.
- [45] POLZER, Stanislav, T Christian GASSER, Caroline FORSELL, Hana DRUCKMÜLLEROVA, Michal TICHY, Robert STAFFA, Robert VLACHOVSKY a Jiri BURSA. Automatic identification and validation of planar collagen organization in the aorta wall with application to abdominal aortic aneurysm. *Microscopy and Microanalysis*. 2013roč. 19, č. 6, s. 1395–1404.
- [46] NOVAK, Kamil, Stanislav POLZER, Michal TICHY a Jiri BURSA. Automatic evaluation of collagen fiber directions from polarized light microscopy images. *Microscopy and Microanalysis*. 2015roč. 21, č. 4, s. 863–875.
- [47] CHEN, Xiyi, Oleg NADIARYNKH, Sergey PLOTNIKOV a Paul J CAMPAGNOLA. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature protocols*. 2012roč. 7, č. 4, s. 654–669.
- [48] GEORGIU, E, T THEODOSSIOU, V HOVHANNISYAN, K POLITOPOULOS, GS RAPTI a D YOVA. Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. *Optics Communications*. 2000roč. 176, č. 1-3, s. 253–260.
- [49] SCHRIEFL, Andreas J, Andreas J REINISCH, Sethuraman SANKARAN, David M PIERCE a Gerhard A HOLZAPFEL. Quantitative assessment of collagen fibre orientations from two-dimensional images of soft biological tissues. *Journal of The Royal Society Interface*. 2012roč. 9, č. 76, s. 3081–3093.

- [50] SCHRIEFL, Andreas J, Heimo WOLINSKI, Peter REGITNIG, Sepp D KOHLWEIN a Gerhard A HOLZAPFEL. An automated approach for three-dimensional quantification of fibrillar structures in optically cleared soft biological tissues. *Journal of The Royal Society Interface*. 2013roč. 10, č. 80.
- [51] TANAKA, Yuji, Eiji HASE, Shuichiro FUKUSHIMA, Yuki OGURA, Toyonobu YAMASHITA, Tetsuji HIRAO, Tsutomu ARAKI a Takeshi YASUI. Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching with electro-optic Pockells cell and its application to in vivo visualization of collagen fiber orientation in human facial skin. *Biomedical optics express*. 2014roč. 5, č. 4, s. 1099–1113.
- [52] ELBISCHGER, PJ, Horst BISCHOF, Peter REGITNIG a GA HOLZAPFEL. Automatic analysis of collagen fiber orientation in the outermost layer of human arteries. *Pattern analysis and applications*. 2004roč. 7, č. 3, s. 269–284.
- [53] GAUL, RT et al. Collagen fibre characterisation in arterial tissue under load using SALS. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2017roč. 75, s. 359–368.
- [54] MEIJERING, Erik, M JACOB, J-CF SARRIA, PI STEINER, H HIRLING a M UNSER. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004roč. 58, č. 2, s. 167–176.
- [55] SCHRAUWEN, JTC, A VILANOVA, R REZAKHANIHA, N STERGIOPULOS, FN VAN DE VOSSE a PHM BOVENDEERD. A method for the quantification of the pressure dependent 3D collagen configuration in the arterial adventitia. *Journal of structural biology*. 2012roč. 180, č. 2, s. 335–342.
- [56] WAN, William, J Brandon DIXON a Rudolph L GLEASON JR. Constitutive modeling of mouse carotid arteries using experimentally measured microstructural parameters. *Biophysical journal*. 2012roč. 102, č. 12, s. 2916–2925.
- [57] KOCH, Ryan G, Alkiviadis TSAMIS, Antonio D'AMORE, William R WAGNER, Simon C WATKINS, Thomas G GLEASON a David A VORP. A custom image-based analysis tool for quantifying elastin and collagen micro-architecture in the wall of the human aorta from multi-photon microscopy. *Journal of biomechanics*. 2014roč. 47, č. 5, s. 935–943.
- [58] MORRILL, Erica E, Azamat N TULEPBERGENOV, Christina J STENDER, Roshani LAMICHHANE, Raquel J BROWN a Trevor J LUJAN. A validated software application to measure fiber organization in soft tissue. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2016roč. 15, č. 6, s. 1467–1478.
- [59] KRASNY, Witold, Claire MORIN, Hélène MAGOARIEC a Stéphane AVRIL. A comprehensive study of layer-specific morphological changes in the microstructure of carotid arteries under uniaxial load. *Acta biomaterialia*. 2017roč. 57, s. 342–351.
- [60] SUGITA, Shukei a Takeo MATSUMOTO. Multiphoton microscopy observations of 3D elastin and collagen fiber microstructure changes during pressurization in aortic media. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2017roč. 16, č. 3, s. 763–773.

- [61] AYYALASOMAYAJULA, Venkat, Baptiste PIERRAT a Pierre BADEL. A computational model for understanding the micro-mechanics of collagen fiber network in the tunica adventitia. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2019roč. 18, č. 5, s. 1507–1528.
- [62] JADIDI, Majid, Selda SHERIFOVA, Gerhard SOMMER, Alexey KAMENSKIY a Gerhard A HOLZAPFEL. Constitutive modeling using structural information on collagen fiber direction and dispersion in human superficial femoral artery specimens of different ages. *Acta biomaterialia*. 2021roč. 121, s. 461–474.
- [63] NIESTRAWKA, Justyna A, Anna PUKALUK, Anju R BABU a Gerhard A HOLZAPFEL. Differences in Collagen Fiber Diameter and Waviness between Healthy and Aneurysmal Abdominal Aortas. *Microscopy and Microanalysis*. 2022s. 1–15.
- [64] PUKALUK, Anna, Heimo WOLINSKI, Christian VIERTLER, Peter REGITNIG, Gerhard A HOLZAPFEL a Gerhard SOMMER. Changes in the microstructure of the human aortic adventitia under biaxial loading investigated by multi-photon microscopy. *Acta Biomaterialia*. 2023.
- [65] FISCHER, J. a J. BURSA. Comparison of Various Distributions Used for Collagen Fibre Orientations in Arterial Layers. *Engineering Mechanics 2019*. 2019č. May, s. 113–116. Dostupné z: doi:10.21495/71-0-113.
- [66] JETT, Samuel V., Luke T. HUDSON, Ryan BAUMWART, Bradley N. BOHNSTEDT, Arshid MIR, Harold M. BURKHART, Gerhard A. HOLZAPFEL, Yi WU a Chung Hao LEE. Integration of polarized spatial frequency domain imaging (pSFDI) with a biaxial mechanical testing system for quantification of load-dependent collagen architecture in soft collagenous tissues. *Acta Biomaterialia*. 2020roč. 102, s. 149–168. ISSN 18787568. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2019.11.028.
- [67] NOVAK, Kamil. *Analýza vlivu uspořádání kolagenu na mechanické vlastnosti tepen*. 2018. Dis. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky.
- [68] PRATT, William K. *Digital image processing: PIKS Scientific inside*. Wiley Online Library, 2007.
- [69] NAGELKERKE, Nico JD et al. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*. 1991roč. 78, č. 3, s. 691–692.
- [70] TURČANOVÁ, Michaela, Martin HRTOŇ, Petr DVOŘÁK, Kamil NOVÁK, Markéta HERMANOVÁ, Zdeněk BEDNAŘÍK, Stanislav POLZER a Jiří BURŠA. Full-range optical imaging of planar collagen fiber orientation using polarized light microscopy. *BioMed research international*. 2021roč. 2021.
- [71] BURŠA, Jiří. *Studijní opory* [online]. 2019 [cit. 2019-8-21]. Dostupné z: <http://www.old.umt.fme.vutbr.cz/~jbursa/>.
- [72] HOLZAPFEL, Gerhard A, Thomas C GASSER a Ray W OGDEN. A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models. *Journal of elasticity and the physical science of solids*. 2000roč. 61, č. 1-3, s. 1–48.
- [73] MARTUFI, Giampaolo a T Christian GASSER. A constitutive model for vascular tissue that integrates fibril, fiber and continuum levels with application to the isotropic and passive properties of the infrarenal aorta. *Journal of biomechanics*. 2011roč. 44, č. 14, s. 2544–2550.



- [74] HOLZAPFEL, Gerhard A, Justyna A NIESTRAWKA, Ray W OGDEN, Andreas J REINISCH a Andreas J SCHRIEFL. Modelling non-symmetric collagen fibre dispersion in arterial walls. *Journal of the Royal Society Interface*. 2015roč. 12, č. 106, s. 20150188.
- [75] HOLZAPFEL, Gerhard A. a Ray W. OGDEN. An Arterial Constitutive Model Accounting for Collagen Content and Cross-Linking. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2019.
- [76] BAEK, Seungik, Rudolph L. GLEASON, K.R. RAJAGOPAL a J.D. HUMPHREY. Theory of small on large: potential utility in computations of fluid–solid interactions in arteries. *Computer methods in applied mechanics and engineering*. 2007roč. 196, č. 31-32, s. 3070–3078.
- [77] HANSEN, Laura, William WAN a Rudolph L. GLEASON. Microstructurally motivated constitutive modeling of mouse arteries cultured under altered axial stretch. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2009roč. 131, č. 10. ISSN 0148-0731. Dostupné z: doi:10.1115/1.3207013.
- [78] MASON, Jeffery T a Timothy J O'LEARY. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1991roč. 39, č. 2, s. 225–229.
- [79] SODOMKA, T. *Návrh přípravku pro určování směru výztužných vláken v měkkých biologických tkáních v deformovaném stavu*. Brno, 2018. 56 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Jiří Burša.
- [80] KRATOCHVÍL, F. *Vyhodnocení vlivu uspořádání kolagenních vláken ve stěně tepny na její odezvu při zkouškách tahem*. Brno, 2018. 31 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Jiří Burša.
- [81] FERRUZZI, J, David A VORP a JD HUMPHREY. On constitutive descriptors of the biaxial mechanical behaviour of human abdominal aorta and aneurysms. *Journal of the Royal Society Interface*. 2011roč. 8, č. 56, s. 435–450.
- [82] POLZER, Stanislav, T Christian GASSER, Kamil NOVAK, Vojtěch MAN, Michal TICHY, Pavel SKACEL a Jiří BURSA. Structure-based constitutive model can accurately predict planar biaxial properties of aortic wall tissue. *Acta biomaterialia*. 2015roč. 14, s. 133–145.
- [83] HASKETT, Darren, Gregory JOHNSON, Aifang ZHOU, Urs UTZINGER a Jonathan VANDE GEEST. Microstructural and biomechanical alterations of the human aorta as a function of age and location. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2010roč. 9, č. 6, s. 725–736.
- [84] SASSANI, Sophia G, Sokrates TSANGARIS a Dimitrios P SOKOLIS. Layer-and region-specific material characterization of ascending thoracic aortic aneurysms by microstructure-based models. *Journal of biomechanics*. 2015roč. 48, č. 14, s. 3757–3765.
- [85] STRUPLER, Mathias, A-M PENA, Monica HERNEST, P-L THARAUX, J-L MARTIN, Emmanuel BEAUREPAIRE a M-C SCHANNE-KLEIN. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics express*. 2007roč. 15, č. 7, s. 4054–4065.

- [86] SKACEL, Pavel a Jiri BURSA. Comparison of constitutive models of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *Acta of bioengineering and biomechanics*. 2014roč. 16, č. 3.
- [87] WICKER, BK, HP HUTCHENS, Q WU, AT YEH a JD HUMPHREY. Normal basilar artery structure and biaxial mechanical behaviour. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering*. 2008roč. 11, č. 5, s. 539–551.
- [88] FISCHER, Jiří, Michaela TURČANOVÁ, Vojtěch MAN, Markéta HERMANOVÁ, Zdeněk BEDNAŘÍK a Jiří BURŠA. Importance of experimental evaluation of structural parameters for constitutive modelling of aorta. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2023roč. 138, s. 105615.
- [89] MAUREL, E, CA SHUTTLEWORTH a H BOUISSOU. Interstitial collagens and ageing in human aorta. *Virchows Archiv A*. 1987roč. 410, s. 383–390.
- [90] AMABILI, Marco, Meisam ASGARI, Ivan D BRESLAVSKY, Giulio FRANCHINI, Francesco GIOVANNIELLO a Gerhard A HOLZAPFEL. Microstructural and mechanical characterization of the layers of human descending thoracic aortas. *Acta Biomaterialia*. 2021roč. 134, s. 401–421.
- [91] FEIGIN, Valery L a Pavel KALVACH. *Cévní mozková příhoda: prevence a léčba mozkového iktu*. Galén, 2007.
- [92] CHEN, M. A. *Atherosclerosis of internal carotid artery* [online]. 2019 [cit. 2019-1-2]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/18006.htm>.
- [93] CROUSE, John R, James F TOOLE, William M MCKINNEY, Mark B DIGNAN, George HOWARD, Frederic R KAHL, Mary R MCMAHAN a Gary H HARPOLD. Risk factors for extracranial carotid artery atherosclerosis. *Stroke*. 1987roč. 18, č. 6, s. 990–996.
- [94] WIKIPEDIE. *Tunica intima* [online]. 2019 [cit. 2019-1-2]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Tunica\\_intima#/media/File:Blausen\\_0055\\_ArteryWallStructure.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Tunica_intima#/media/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png).
- [95] CASELLA, Ivan Benaduce, Calógero PRESTI, Rina Maria Pereira PORTA, Cláudio Rogério Donmarco SABBAG, Maria Alice BOSCH a Yumiko YAMAZAKI. A practical protocol to measure common carotid artery intima-media thickness. *Clinics*. 2008roč. 63, č. 4, s. 515–520.
- [96] SHEKHONIN, Boris V, Sergey P DOMOGATSKY, Vladimir R MUZYKANTOV, Grigory L IDELSON a Vadim S RUKOSUEV. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Collagen and related research*. 1985roč. 5, č. 4, s. 355–368.
- [97] WOLMAN, M a FH KASTEN. Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin. *Histochemistry*. 1986roč. 85, č. 1, s. 41–49.
- [98] *Example: Polarizing microscope*. [online]. 2019 [cit. 2019-1-7]. Dostupné z: <http://www.texample.net/tikz/examples/polarizing-microscope/>.
- [99] LANIR, YT. Constitutive equations for fibrous connective tissues. *Journal of bio-mechanics*. 1983roč. 16, č. 1, s. 1–12.

- [100] TURČANOVÁ, Michaela, Jiří FISCHER, Markéta HERMANOVÁ, Zdeněk BEDNÁŘÍK, Pavel SKÁCEL a Jiří BURŠA. Biaxial stretch can overcome mismatch between global and local orientations of wavy collagen fibres. *Under Review in Journal of Biomechanics*. 2023.
- [101] CHAI, Chen-Ket, Ali C AKYILDIZ, Lambert SPEELMAN, Frank JH GIJSEN, Cees WJ OOMENS, Marc RHM van SAMBEEK, Aad van der LUGT a Frank PT BAAIJENS. Local anisotropic mechanical properties of human carotid atherosclerotic plaques--Characterisation by micro-indentation and inverse finite element analysis. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015roč. 43, s. 59–68.
- [102] AKYILDIZ, Ali C, Lambert SPEELMAN a Frank JH GIJSEN. Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue. *Journal of biomechanics*. 2014roč. 47, č. 4, s. 773–783.
- [103] AKYILDIZ, Ali C, Chen-Ket CHAI, Cees WJ OOMENS, Aad van der LUGT, Frank PT BAAIJENS, Gustav J STRIJKERS a Frank JH GIJSEN. 3D fiber orientation in atherosclerotic carotid plaques. *Journal of structural biology*. 2017roč. 200, č. 1, s. 28–35.
- [104] AKYILDIZ, Ali C, Lambert SPEELMAN, Bas van VELZEN, Raoul RF STEVENS, Antonius FW VAN DER STEEN, Wouter HUBERTS a Frank JH GIJSEN. Intima heterogeneity in stress assessment of atherosclerotic plaques. *Interface focus*. 2018roč. 8, č. 1.
- [105] XIA, Y a K ELDER. Quantification of the graphical details of collagen fibrils in transmission electron micrographs. *Journal of microscopy*. 2001roč. 204, č. 1, s. 3–16.
- [106] DENK, Winfried, James H STRICKLER a Watt W WEBB. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990roč. 248, č. 4951, s. 73–76.
- [107] SLAAF, Dick W, Geert Jan TANGELDER, Mirjam GA OUDE EGBRINK a RS RENEMAN. Blood cells and rheology. *Clinically applied microcirculation research*. 1995s. 391–405.
- [108] KARLON, William J, James W COVELL, Andrew D MCCULLOCH, John J HUNTER a Jeffrey H OMENS. Automated measurement of myofiber disarray in transgenic mice with ventricular expression of ras. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1998roč. 252, č. 4, s. 612–625.
- [109] HOFFMAN, Allen H, Zhongzhao TENG, Jie ZHENG, Zheyang WU, Pamela K WOODARD, Kristen L BILLIAR, Liang WANG a Dalin TANG. Stiffness properties of adventitia, media, and full thickness human atherosclerotic carotid arteries in the axial and circumferential directions. *Journal of biomechanical engineering*. 2017roč. 139, č. 12, s. 124501.
- [110] STARY, Herbert C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000roč. 20, č. 5, s. 1177–1178.
- [111] TSAMIS, Alkiviadis, Jeffrey T. KRAWIEC a David A. VORP. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: A review. *Journal of the Royal Society Interface*. 2013roč. 10, č. 83. ISSN 17425662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2012.1004.

- [112] STASZYK, Carsten a Hagen GASSE. A simple fluorescence labeling method to visualize the three-dimensional arrangement of collagen fibers in the equine periodontal ligament. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2004roč. 186, č. 2, s. 149–152.
- [113] MOHAMMADKHAH, Melika, Ciaran K SIMMS a Paula MURPHY. Visualisation of Collagen in fixed skeletal muscle tissue using fluorescently tagged Collagen binding protein CNA35. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2017roč. 66, s. 37–44.