

# Stereolojik Uygulamalarda Kullanılan Pratik Gereçler ve Bilgisayar Destekli Stereolojik Analiz Cihazları

## SOME PRACTICAL GADGETS USED IN STEREOLOGICAL APPLICATIONS AND COMPUTER ASSISTED STEREOLOGICAL RESEARCH SYSTEMS: A REVIEW

Dr. Sinan CANAN,<sup>a</sup> Dr. Ayşe BAHADIR,<sup>b</sup> Dr. Şiir YILDIRIM,<sup>b</sup> Dr. Ersan ODACI,<sup>b</sup> Dr. Bünyamin ŞAHİN,<sup>c</sup> Dr. Orhan BAŞ,<sup>c</sup> Serdar ÇOLAKOĞLU,<sup>c</sup> Dr. Sait BİLGİÇ,<sup>c</sup> Dr. Süleyman KAPLAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fizyoloji AD, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA

<sup>b</sup>Histoloji-Embriyoloji AD, <sup>c</sup>Anatomi AD, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, SAMSUN

### Özet

Son yıllarda stereolojik metotların yaygın bir biçimde kullanılır duruma gelmeleri, laboratuvar uygulamalarında karşılaşılan sorunlar bu sorunları çözmeye yarayan bir dizi pratik çözümü de beraberinde getirmiştir. Bu çalışmada, stereolojik araştırmalarda kullanılan basit araç ve gereçlere örnekler vererek, stereoloji alanında önemli bir yere sahip olan bilgisayar destekli stereolojik analiz sistemlerinin genel özellikleri tanımlandı. Kaynaklar incelendiğinde, stereolojik uygulamalardaki değişik sorunların üstesinden gelmek amacıyla geliştirilmiş araç ve gereçlerle, bu çalışmada belirtilenden daha fazla sayıda karşılaşmak mümkündür. Her ülkenin ekonomik şartları ve her laboratuvarın da imkanları farklı olduğundan doğal olarak stereolojik uygulamalar sırasında karşılaşılan problemler de ülkelere ve laboratuvarlara göre farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle çalışmanın bir kısmı, grubumuz araştırmacıları ve ülkemizdeki diğer araştırmacıların stereolojik çalışmalarını esnasında karşılaştıkları sorunlara çözüm üretmek amacıyla geliştirdikleri araç ve gereçlerle ilgilidir. Ayrıca ülkemizde stereoloji konusunda çalışan araştırmacıların sıklıkla karşılaşabilecekleri problemlere basit çözüm önerileri sunmak, bu tip pratik çözümlere ulaşmak isteyen araştırmacıları üretebilecekleri kendi çözümleri için bir fikir vermek, ülkemiz şartlarında çok fazla maddi kaynak gerektirmeyen basit araç ve gereçlerle uluslararası nitelikte stereolojik çalışmaların yapılabilirliğini vurgulamak bu çalışmanın bir diğer amacıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroskopi, fotomikrografi, laboratuvar teknikleri ve prosedürleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:672-680

### Abstract

Since the recently developed design-based stereological methods have begun to be widely used in various areas during the past few years, there are a large number of practical solutions currently finding applicability to many of the specific problems encountered during the laboratory application of said methods. In the present study we provide some examples of practical gadgets used in various stereological studies and present an introduction to the general features of some commonly used computerized stereological research systems. A brief glance at the references of the present study will show that there is an extensive range of tools beyond those mentioned in this study that have been developed to manage specific problems encountered during stereological investigations. Since the prevailing economical support mechanisms and available laboratory tools are different, it is natural that the problems encountered in individual laboratories and countries are different. Therefore, the present study comprises some of the tools that have been developed by our group and other scientists in our country. The purpose of this review is to suggest some simple and practical solutions to the problems encountered in different types of stereological studies, to give inspiration to researchers who desire to solve their own particular problems in their stereological research, and to emphasize that international studies may be done using cheap and simple tools and gadgets, usually without the need for extra financial support.

**Key Words:** Analysis, photomicrography, laboratory techniques and procedures

**B**ir yapının veya organın hacim, yüzey alanı gibi değerlerinin hesaplanması, yapı içerisinde bulunan farklı bileşenlerin

birbirlerine göre hacim, uzunluk, alan vb. yoğunluklarının bulunması, bir yapıdaki toplam tanecik (hücre vb.) sayısının ortaya çıkarılması gibi çalışmalar, morfometrinin önemli konularını oluşturur.<sup>1</sup> Biyolojik yapılara ilişkin bu tip sayısal verilerin elde edilmesinde kullanılabilecek birçok yöntemin var olması, bu yöntemler arasından en uygun ve güvenilir olanının seçilmesi sorunu da beraberinde getirmektedir. Önemli olan, herhangi

Geliş Tarihi/Received: 22.09.2003

Kabul Tarihi/Accepted: 01.07.2004

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Süleyman KAPLAN  
PK: 124, 55030  
SAMSUN  
skaplan@omu.edu.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

bir niceliği hesaplar veya ölçerken, yapıdan mümkün olduğunca tarafsız (yani gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen) sonuçların elde edilmesini sağlayabilecek bir yöntemin tercih edilmesidir.<sup>2-6</sup> Bu nedenle tasarım-tabanlı (design-based) stereolojik yöntemler, bu gerekliliği hem teorik olarak sağlam temellere dayandırması, hem de pratik olarak basit olan uygulamaları ile yaygın biçimde tercih edilmelerine neden olmaktadır.<sup>5,7-11</sup>

Stereolojik yöntemlerin birçoğu, uygulamada, ilgilenilen yapının sistematik-tekdüze-rastgele olarak elde edilmiş örnekleri üzerinde ölçümler yaparak, o yapıdaki söz konusu sayısal niceliğin belli ve istatistiksel olarak kabul edilebilir bir hata payı dahilinde hesaplanmasına dayanır. Çoğu zaman, çalışılan yapılarda ilgilenilen nicelik (örneğin bir organdaki hücre sayısı) büyük olduğundan, belli oranda bir örnekleme yapmak kaçınılmazdır.<sup>2,9,12</sup> Bu örneklemler sonucunda elde edilecek verilerin güvenilirliği ise, pratikte geçilen uygulama aşamalarında gösterilecek özenle doğrudan ilişkilidir. Birçok durumda, makroskobik bir yapının paralel dilim veya kesitlere ayrılması, bu kesitlerin mikroskopta incelenmesi, bu inceleme sırasında belli büyüklükte adımlamalarla ilgilenilen doku bileşenlerinin taranması ve mikroskop görüntü alanlarında, büyüklüğü belli olan örnekleme alanlarını belirlenmesi, bu alanların ardışık görüntü alanları boyunca karşılaştırılması, kesit kalınlığının ölçülmesi vb. gibi, dikkat gerektiren basamaklar karşımıza çıkar. Bu basamakları dikkatli ve kurallara uygun bir biçimde gerçekleştirdiğimiz takdirde, güvenilir sonuçlara ulaşmamamız için herhangi bir neden kalmaz.<sup>2,12-15</sup>

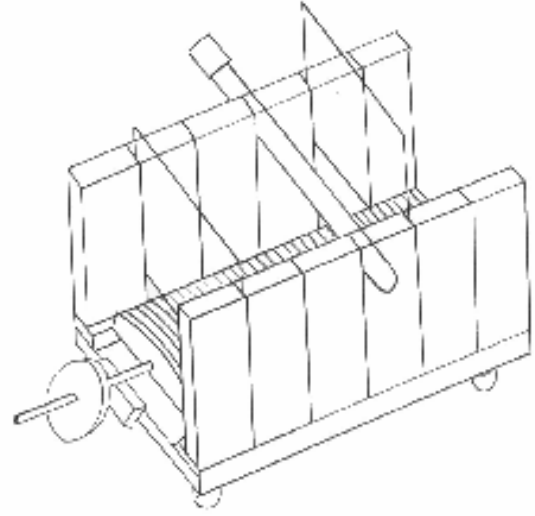
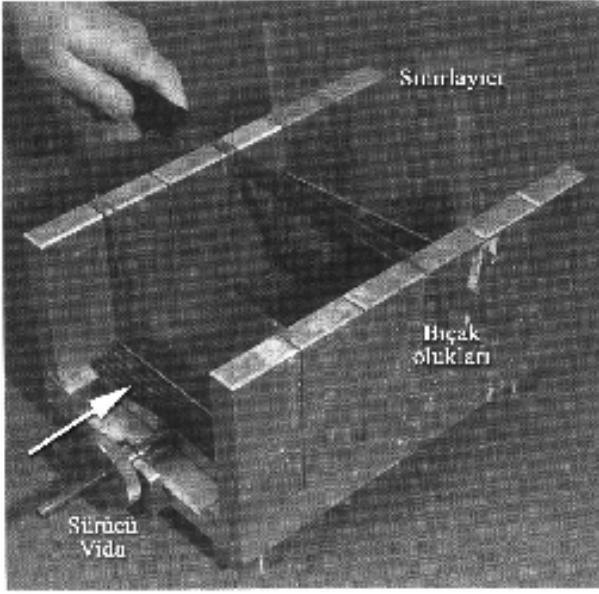
Stereolojik yöntemlerin kuramsal ve pratik sadeliği, birçok yeni yöntemin hızla literatüre katılmasını ve bu yöntemlerin morfometrik çalışmalarda bir "altın standart" olmasını sağlamaktadır.<sup>6,7</sup> Ayrıca, bu yöntemleri laboratuvarlarında uygulayan araştırmacılar çok farklı çeşitlilikte ortaya çıkan ve pratik çözüm isteyen sorunlara buldukları değişik çözümlerle, yaptıkları çalışmaları daha kolay, tekrar edilebilir ve güvenilir bir hale getirmeye çalışmaktadırlar.<sup>12,16</sup>

Biz de bu çalışmada, ülkemizde ve dünyada, düzenli olarak stereolojik çalışmaların yapıldığı değişik laboratuvarlarda kullanılan bazı pratik stereoloji araç-gereçleri hakkında kısa bir özet vermeye çalışacağız. Buradaki esas amaç, basit stereolojik yöntemlerin uygulanması sırasında, kimi basit araç ve gereçlerin, işleri nasıl kolaylaştırabileceğine ilişkin bazı örnekler vermek ve bu tip araçlardan faydalanmak veya bunlara benzer bazı pratik çözümler üretmek isteyen araştırmacılara yardımcı olabilmektir. Bunun yanında, çalışmanın son bölümünde, parasal yükü biraz daha fazla olan bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazlarına da kısa bir giriş yaparak, bunların avantajları ve dez-avantajları üzerinde tartışılacaktır.

### **Makroskobik Örneklerin Alınması Sırasında Kullanılan Bazı Araç-Gereçler**

Makroskobik örnekleri mikroskop altında inceleyebilmek için çoğunlukla bu parçalardan küçük örnekler almak gerekir. Örnekler, inceleme amacına uygun büyüklüklerde alındıklarında, tüm yapının ancak çok küçük bir miktarını temsil edebilirler. Stereolojik yöntemlerin birçoğunda, eğer alınan örnekler sistematik rastgele örnekleme kurallarına göre elde edilmişse, ana yapının bu şekilde seçilmiş çok küçük parçalarından, istenilen niceliğin güvenilir bir hesaplamasını elde etmek mümkün olabilmektedir.<sup>2,9,17</sup>

Hacim hesaplaması için kullanılan Cavalieri yöntemi ve fiziksel parçalama gibi bazı hesaplama yöntemleri için, makroskobik bir organı çoğu kez paralel dilimlere ayırmamız gerekmektedir.<sup>18-20</sup> Bu gibi işlemler "tahmini" ya da "göz kararı" yapıldığında meydana çıkabilecek bazı olumsuzlukların giderilebilmesi için, çeşitli laboratuvarlarda farklı çözümler üretilmiştir.<sup>12,21,22</sup> Bunlardan biri Danimarka'daki stereolojik araştırma laboratuvarında geliştirilen ve slabber (kalın dilimleyici) adı verilen araçtır. Genellikle insan beyni gibi büyük hacimli yapıların sistematik tekdüze rastgele paralel dilimlere ayrılması için kullanılmaktadır. Bu araç, aralarında belli aralıklarla bıçak olukları bulunan destek bloklarından oluşur (Şekil 1). İlgilenilen organ, bu



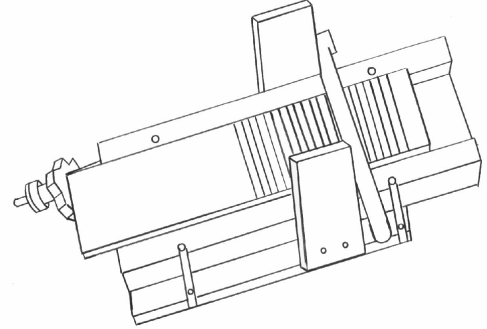
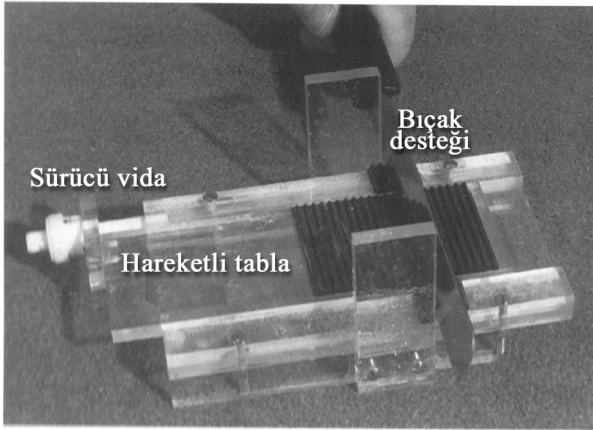
**Şekil 1.** Büyük nesneleri paralel olarak dilimlemek amacıyla kullanılan bir kalın dilimleyici (slabber). Dilimlenmek istenen nesne veya organ, sınırlayıcı plaklar arasına yerleştirilip agar içerisine gömülür. Agar sertleştikten sonra plakalar çıkarılır ve sürücü vida yardımıyla hareketli taban istenilen miktarda ilerletilerek, bıçak oluklarından herhangi birinin yardımıyla, istenilen aralıklarda kesimler elde edilebilir (12 nolu kaynaktan alınmıştır).

aletin içine konduktan sonra, uygun derişimde bir agar veya jelatin çözeltilisine gömülür. Bu gömme, yapıya kesme esnasında destek sağlayarak, istenmeyen kıvrılmaları önleme amacına yöneliktir. Kesilmek istenen ve agara gömülen doku veya organ bloğu bir vida yardımıyla istenilen miktarda ileri-geri hareket ettirilebilen bir tabla üzerinde oturmaktadır. Bu tabla, vidayla istenilen miktarda ilerletilerek, arzu edilen herhangi bir bıçak oluşu aracılığıyla objenin istenen kalınlıkta dilimlere ayrılmasını sağlar. Bu gibi bir düzenekle, değişik amaçlar için farklı kalınlıklarda dilimler elde edilebilir. Şekilde görülen araç, makroskobik bir örnekten, 5 mm'ye kadar ince dilimler alınabilmesini sağlamaktadır.<sup>12,23</sup>

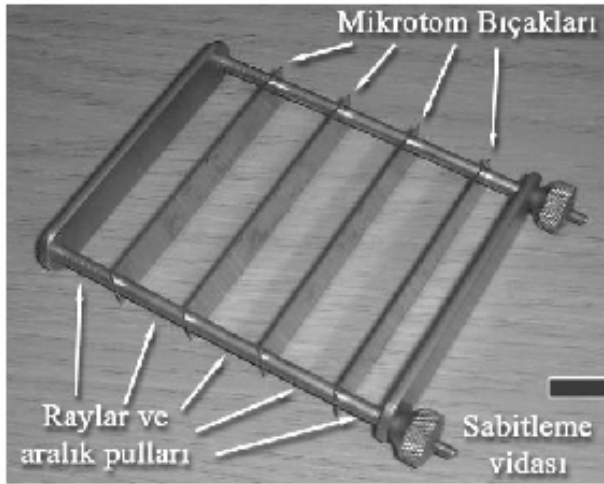
Daha küçük yapılar için kullanılan bir başka basit araç, "tissue slicer" (doku dilimleyicisi) olarak adlandırılır. Bu araç da genellikle daha küçük organlar (örneğin, sıçan böbreği veya karaciğeri vb.) için bir makroskobik dilimleme aracı olarak kullanılır. Bu basit araç, yine bir vida yardımıyla hareket eden bir tabla ve bu tablanın üzerinde sabit bir destekten oluşur (Şekil 2). Bu destek, bıçakla kesim yapılan doğrultuyu belirler

ve vidalı uçta bulunan çizelge aracılığıyla, doku istenildiği kadar ilerletilerek, bu destek yardımıyla kesilir. Böylece küçük bir yapıdan istenilen sayıda ve kalınlıkta seri dilimler elde edilmiş olur. Böyle bir araçta kesilecek yapılar da yine sıklıkla, agar gibi bir ortama gömüldükten sonra kesilirler.<sup>12</sup>

Laboratuvarlarda kullanılan basit araçlardan birisi "parçalama bıçağı" olarak adlandırılan bir araçtır. Bu araç, isteğe göre ayarlanabilir aralıklarla birbirlerinden ayrıldıktan sonra sabitleştirilen bıçaklardan oluşur (Şekil 3). Bıçaklar, mikrotomda kullanılan enli bıçaklardandır ve aralarındaki mesafe ise tutturulduğu raylar üzerinde aralarına konan çelik pullar ile belirlenebilmektedir. Böyle bir araç yardımıyla, değişen kalınlıkta pullar ve değişik büyüklükte bıçaklar kullanılmak yoluyla, bir çok organın paralel ve sistematik rastgele dilimlere ayrılması kolayca gerçekleştirilebilir. Bu bıçak kalıbı, organ üzerine rastgele bir yönelimle yerleştirilip bastırıldığında, organın birbirine paralel ve sistematik tekdüze rastgele dilim örnekleri elde edilebilir (Şekil 3).<sup>22</sup>



**Şekil 2.** Küçük makroskobik nesnelere paralel dilimlere ayırmada kullanılan bir başka dilimleyici (tissue slicer). Burada yine bir vida yardımıyla ileri-geri istenen mesafelerde hareket ettirebilen bir hareketli tabla ve bir bıçak desteği bulunmaktadır. Hareketli tabla üzerinde bulunan tırtıklı zemin üzerine agar içinde yerleştirilen yapı, tablanın istenen oranda ilerletilmesi ve bıçak desteği yardımıyla sabitlenen bir bıçakla kesme yoluyla paralel ve eşit aralıklı dilimlere ayrılabilir. Bu cihaz, Danimarka'da HJG Gundersen tarafından tasarlanmış olup, nesneden 0.5 mm aralıklı dilimler elde etmeyi sağlar. Bu amaç için bir başka tasarım Michel ve Cruz-Orive tarafından yapılmıştır.<sup>31</sup>



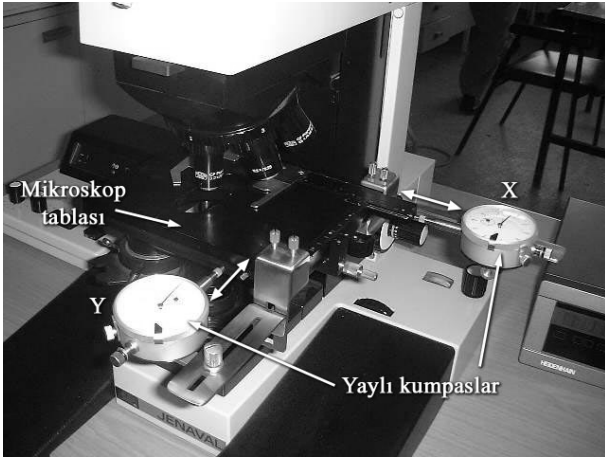
**Şekil 3.** Paralel dilimleme işlemleri için kendi laboratuvarlarımızda kullandığımız dilimleme aleti. Bu basit araç, mikrotom bıçaklarının takılabileceği iki adet ray ve mikrotom bıçaklarını belli aralıklarla birbirlerinden ayırmak üzere kullanılan değişik kalınlıklarda çelik pullardan oluşmaktadır. Bu araç yardımıyla uygun büyüklükte objeler paralel ve eşit aralıklı dilimlere ayrılabilir. Şeklin sağ tarafında, bu araçla dilimlenmiş bir koyun beyni görülmektedir.<sup>22</sup>

### Mikroskobik Düzeyde Kullanılan Bazı Araç ve Gereçler

Stereolojik sayım ve ölçüm yöntemlerinin birçoğunda, yapıdan alınan sistematik rastgele örneklerin, mikroskopta incelenmeye uygun bir biçimde kesitlere ayrılması ve daha sonra bunların, yine sistematik rastgele örnekleme mantığına uygun olarak mikroskop altında incelenmeleri

gerekir. Bu aşamada çoğu kez, ilgilenilen yapının kesit görüntüleri üzerinde belli adım alanlarıyla taramalar yaparak, bunların içinde örneklenen alanlar üzerinde, ilgilendiğimiz niceliği ölçmek gerekmektedir. Bunun için ise, mikroskoptaki görüntü alanlarının, verimli, kolay ve tekrarlanabilir bir tarzda adımlanabilmesini sağlamak esastır. Bu amaçla en güvenilir olanı, motorlu bir mikroskop

tablası kullanılmaktadır. Bu tablaların değişik biçimleri piyasada bulunmakla beraber, bazıları bilgisayar destekli, bazıları da analog birimlerce kontrol edilebilecek şekilde tasarlanmıştır. Tümünün temel işlevi, istenilen aralıklarla, incelenecek örneği taşıyan mikroskop tablasını, sabit objektif altında hareket ettirerek, görüntü alanlarının belli bir sıra içinde incelenmesini sağlamaktır. Bu tablalar yüksek hassaslıkta bir hareket yeteneğine sahip olduklarından, bunlarla yapılan taramaların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek olmakla beraber fiyatı pahalı cihazlar olduklarından, her laboratuvarında bulunmaları kolay değildir. Bunun için alternatif bir cihaz olarak Kaplan ve ark. tarafından geliştirilen sistem kullanılabilir.<sup>24</sup> Adım-ölçer (stepmeter) olarak adlandırılan bu cihaz, normal bir araştırma mikroskobunun tablasına monte edilen iki adet sanayi tipi yaylı kumpastan oluşmaktadır (Şekil 4). Bu kumpasların hareket duyarlı uçları, mikroskop tablasının hareketli kısımlarına temas edecek şekilde yerleştirilip



**Şekil 4.** Kesit görüntüleri üzerinde sistematik rastgele örnekleme alanlarının belirlenmesi amacıyla Kaplan ve ark. tarafından geliştirilen “adım-ölçer” düzeneği. Bu düzeneğe, iki adet sanayi tipi yaylı kumpasın mikroskop tablasının x ve y (sağa-sola ve ön-arkaya) eksenlerindeki hareketlerini ölçebilecek biçimde, tablanın uygun (hareketli) yerlerine temas edecek şekilde monte edilmeleriyle elde edilmiştir. Böylece, mikroskop tablası x ve y doğrultularında istenen miktarda hareket ettirilerek, kesit görüntüleri üzerindeki alan örneklerinin koordinatlarına rahat ve kesin bir biçimde ulaşılabilir. Buradaki kumpasların hareket duyarlılığı 10 mikrometre olup, birçok stereolojik ölçüm için uygun bir duyarlılıktadır.<sup>24</sup>

sabitlenerek, tablanın hareketleri, kumpasların göstergelerinden okunabilmektedir. Bu sayede mikroskop tablasının x ve y (ileri-geri ve sağa-sola) eksenlerinde istenilen aralıkta ilerlemeler ve adımlamalar yapmak mümkün olmaktadır. Bu gereç için kullanılan kumpasların 10, 5 ve 1 mikrometre duyarlılığa sahip olanları piyasada bulunmaktaysa da, 10 mikrometrelilik duyarlılığa sahip olan tipleri birçok stereolojik ölçüm için yeterli olabilmektedir.<sup>24,25</sup>

Kesit görüntüleri üzerinde adımlama yaparken kullanılan bazı başka alternatif yöntemler de mevcuttur. Bunlardan biri de, küçük büyütmede, kesit görüntüsü üzerindeki belli doğal başvuru noktalarından faydalanılarak, istenilen alanların taranması ve büyük büyütme ölçümlerinin yapılmasıdır. Fakat bu tip göz kararıyla dayalı yöntemler, kullanıcı hatasına çok açık ve uygulanması nispeten zor olduğundan, çok dikkatli bir şekilde uygulanmalıdırlar.

### **Kesit Kalınlığı Hesaplamalarında Kullanılabilecek Bazı Pratik Çözümler**

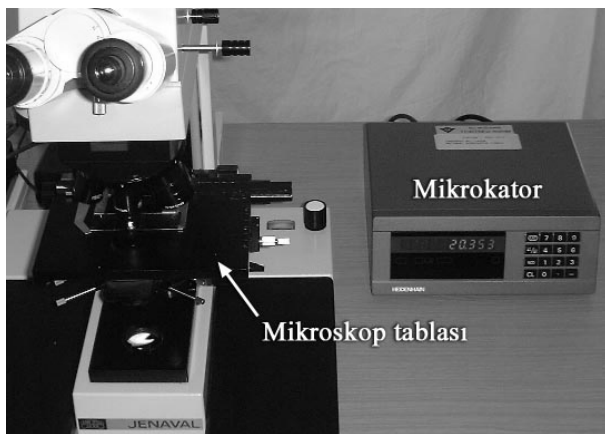
Stereolojik yöntemlerin çoğunda, kesit kalınlığı veya ölçüm yapılan kesit yüksekliğinin ortalama kesit kalınlığına oranı bilinmelidir. Özellikle optik disektör ve optik parçalama (fractionator) gibi optik sayım ve hesaplama yöntemlerinde kesit kalınlığının hassas bir biçimde ölçülmesi önemlidir.<sup>16,26</sup>

Kesit kalınlığı, çoğunlukla, kalın bir kesit içerisinde, gözlenen odak noktasının kesit içinde ilerlemesi şeklinde gözlemlenebilen, mikroskop tablasının sabit objektif altında dikey doğrultu boyunca yaptığı hareketlerin ölçülmesi ile elde edilebilir. Bu yöntem, “odak değişimi ile kalınlık ölçümü” olarak bilinir.<sup>27</sup> Bu yöntemde, kesitin alt ve üst yüzeyleri odaklama yapılarak göz kararıyla tespit edildikten sonra, bu iki yüzey arasında, mikroskop tablasının kat ettiği mesafenin uygun bir araçla ölçülmesi esastır. Dolayısıyla kesit kalınlığı ölçümü için, mikroskop tablasının dikey (z) eksenindeki hareketlerinin okunabileceği bir gerece gereksinim bulunmaktadır.<sup>16,27</sup>

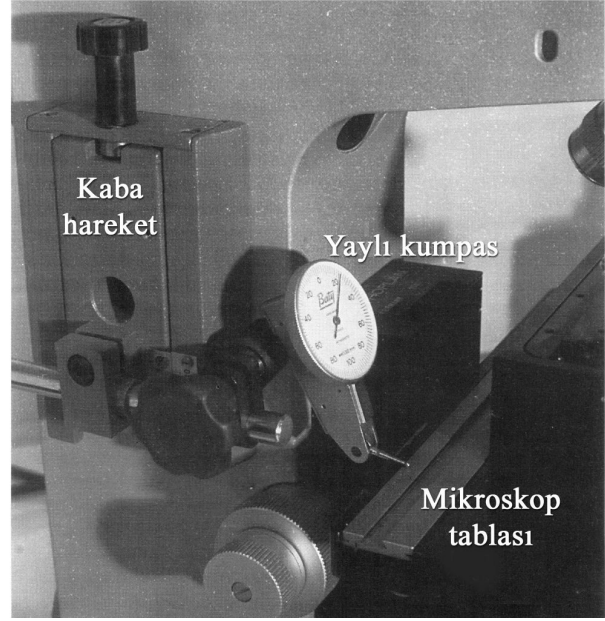
Standart araştırma mikroskoplarında bulunan

mikro vidalar üzerinde, mikroskop tablasının bu hareketlerini ölçebileceğimiz bir derecelendirme genellikle mevcuttur. Fakat bu mikro vidalarla yapılan ölçümlerde, mikro vidaların zıt dönme yönleri arasındaki hareket boşluklarından (backlash) dolayı, ölçümlerde bazı hatalar meydana gelebilmektedir.<sup>28</sup> Ayrıca, bu derecelendirmelerin duyarlılığı da çoğu zaman ya yetersizdir veya fazla güvenilir değildir. Bunlardan sakınmak için kalınlık ölçümünde bir başka araç kullanmak genelde başvurulmuş bir seçenektir. Mikroskop tablasının dikey eksenindeki hareketlerini saptamak için en güvenilir olanı, dijital mikrokator adı verilen araçlardır. Bu araç, mikroskop tablasına monte edilen optik veya benzeri bir hareket ölçücü ile, bu ölçücünün yaptığı ölçümleri dijital olarak gösteren bir ekrandan ve çeşitli kontrollerden (sıfırlama, ayarlama vb.) oluşur (Şekil 5). Bu tip araçlarla kesit kalınlığını, daha doğrusu, mikroskop tablasının hareketlerini oldukça yüksek (0.1 mikrometre kadar) duyarlılıkta ölçmek olasıdır. Fakat bu araçların yüksek maliyetleri, her laboratuvarında rahatça kullanılmalarını engellemektedir.

Kesit kalınlığı ölçmek için bir başka seçenек, mekanik bir mikrokator kullanmaktır (Şekil 6).<sup>12</sup> Mekanik mikrokatorlar hazır olarak satın alınabileceği gibi, yukarıda belirtilen adım-ölçer



**Şekil 5.** Dijital mikrokator. Bu araç tablanın dikey eksenindeki hareketlerini ölçmeye yarar. Şekildeki mikrokator 0.5 mikrometre duyarlılıkta ölçüm yapmayı mümkün kılmaktadır. Bu tip dijital mikrokatorlar özellikle optik stereolojik sayım ve ölçüm yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar.



**Şekil 6.** Mekanik bir mikrokator (12 nolu kaynaktan alınmıştır).

aygıtı için kullanılan kumpaslara benzer araçlar yardımıyla da elde edilebilirler. Burada yapılması gereken, uygun bir ölçüm aracını, mikroskop tablasının z (dikey) eksenindeki hareketlerini ölçecek şekilde, bu yönde hareketli bir tabla bölgesine uygun şekilde tutturarak, tablanın hareketlerini ölçmektir. Bu tip bir araçla da güvenilir kalınlık ölçümleri yapılabilir (Şekil 6).

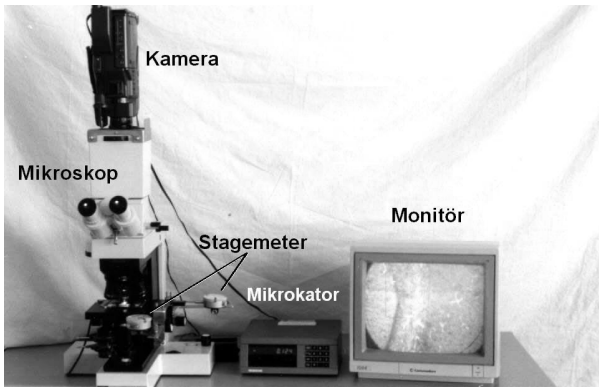
Mikroskop üzerindeki mikro vidaların “boşluk” probleminin giderilmesinin yollarından birisi de, mikro vida üzerindeki derecelendirmenin “genişletilerek” daha duyarlı hale getirilmesidir.<sup>27</sup> Bu genişletme işlemi, mikro vida hareketlerini gösteren bir ibre ve bu ibrenin hareketi gösterebileceği genişletilmiş bir skaladan oluşabilir. Böyle bir skala, mikroskobun makro vidası üzerine monte edilebilecek bir yarım halka biçimindeki levha üzerine işaretlenerek elde edilebilir. Bu şekilde, mikro vidanın hareketi daha duyarlı olan büyük bir skalaya aktararak, ölçümlerin doğruluğu artırılabilir. Aslında bu düzenek de mekanik bir mikrokator olarak düşünülebilir fakat, ölçümleri kesin olmaktan daha çok bağıl özellik taşır. Bu yöntem, kesit kalınlığının kesin olarak ölçümünü gerektiren optik

disektör ve yapı hacim hesaplamalarından çok, sadece kesit kalınlığı ile ölçüm yapılan sondanın yükseklikleri arasındaki oranın bilinmesinin yeterli olduğu optik parçalama yöntemi için kullanılabilir.<sup>16,29,30</sup> Kalınlık ölçümünde belli bir hata olsa da, iki kalınlık değeri (yani, ortalama kesit kalınlığı ile, kesit içinde ölçümün yapıldığı “disektör yüksekliği”) arasındaki oran, yeterli bir doğrulukta saptanabilmektedir.

Yukarıda bazı örneklerini verdiğimiz basit araç gereçlerin bir kısmı ile Şekil 7’de görülen toplu düzeneğe elde edilebilir. Bu düzenekte optik parçalama yöntemi kullanılarak toplam sayı hesaplamaları yapılmaktadır. Farklı ihtiyaçlara uyarlanabilen bu tip bir sistem, oldukça düşük maliyetlerde kolayca kurulabilmektedir (Şekil 7).

### Bilgisayar Destekli Stereolojik Analiz Sistemleri

Yeni stereolojik yöntemlerin ortaya çıkışından kısa bir süre sonra, bu yöntemlerin sağladığı



Şekil 7. Optik parçalama ile toplam hücre sayısının hesaplanmasına ilişkin çalışmalarda kullanılan düzeneğin genel görünümü. Mikroskop görüntü alanları üzerindeki adım örneklemeleri adım-ölçerler (stagemeter) aracılığıyla gerçekleştirilirken, kesit kalınlığı ve disektör sondası yüksekliği ölçümleri, dijital bir mikrokator aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bir bilgisayar monitörü, kamera aracılığıyla alınan mikroskop görüntüsünün izlenmesi ve görüntü üzerine çeşitli ölçüm cetvelleri (tarafsız sayım çerçevesi, noktalı alan ölçüm cetveli vb.) yerleştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Düzenekteki mikroskop ise standart bir araştırma mikroskobu olup, optik sayım tekniklerinin güvenli bir biçimde uygulanabilmesi için yüksek sayısal açıklığa (ortalama olarak NA= 1.35) sahip immersiyon



Şekil 8. Bir bilgisayar destekli stereolojik analiz sistemi (CAST Olympus-Danimarka; A: Araştırma mikroskobu, B: Bilgisayar kontrollü mikroskop tablası, C: CCD kamera, D: Mikrokator, E: Mikroskop tabla motoru, F: Pentium PC, G: Bilgisayar ekranı, H: Tabla kontrol çubuğu).

kesinlik ve güvenilirlikten, kavranmalarındaki ve uygulanmalarındaki sadelikten ve sürekli gelişip değişen yeni ölçüm araçlarından dolayı, stereolojik yöntemlere olan ilgide önemli bir artış gerçekleşmiştir.<sup>1-4,17,24,31</sup> Bunun doğal bir sonucu olarak, bu yöntemleri hızlı bir biçimde uygulayabilecek bazı çözüm arayışları da gündeme gelmiştir. Bilgisayar teknolojisi, yaşamın birçok alanında olduğu gibi, kısa bir süre sonra bu konuda da önemli gelişimlere neden olacak şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Çeşitli firmalar tarafından pazarlanan farklı özelliklere sahip bilgisayar destekli stereolojik analiz (BDSA) cihazları da hızlı bir biçimde piyasada gözlenmeye ve çok miktarda talep bulmaya başlamışlardır.

İlk gelişmiş BDSA sistemi, Danimarka’da bulunan Olympus firması tarafından, modern stereolojik yöntemlerin birçoğunun babası sayılan HJG Gundersen ile yapılan işbirliği sonucunda geliştirilmiştir (Computer Assisted Stereological Toolbox [CAST Grid], Olympus-Danimarka) (Şekil 8). Bu sistem, daha sonra piyasaya çıkacak olan sistemler için de bir model oluşturmuş ve bundan sonra, çok farklı özelliklere sahip BDSA sistemleri, farklı firmalarca geliştirilerek piyasaya sürülmüştür. Günümüzde piyasada bulunan BDSA sistemlerinin bazıları şunlardır:

1. Stereo Investigator-MicroBrightField ([http://www.microbrightfield.com/prod\\_si.htm](http://www.microbrightfield.com/prod_si.htm))
2. CAST Grid-Olympus ([http://www.olympus-europa.com/mikro-countries/mikro1\\_n.htm](http://www.olympus-europa.com/mikro-countries/mikro1_n.htm))

3. Stereologer (<http://www.stereologer.com>)

4. Digital Stereology Software-Kinetic Imaging (<http://www.kineticimaging.com/Stereology.html>)

5. Q-Prodit-Leica (<http://www.leica-microsystems.com/website/lms.nsf>; özellikle patoloji laboratuvarları için geliştirilmiş stereolojik uygulamaları sınırlı bir sistem)

Bu sistemler birbirinden farklı bir takım özelliklere sahip olsalar da, genel donanım itibariyle şu bileşenleri içerirler:

- Bir araştırma mikroskobu,
- Mikroskop üzerinde bilgisayar kontrollü bir motorlu tabla,
- Uygun bir mikroskop kamerası,
- Pentium işlemcili ve yüksek işlem güçlü bir bilgisayar,
- Bilgisayarda yüksek kapasiteli bir canlı görüntü yakalama kartı,
- Stereolojik analizler için uygun bir bilgisayar yazılımı,
- Mikrokator (yazılım veya diğer donanım elemanlarında da bulunabilmektedir).

Bu tip sistemler, stereolojik yöntemlerin uygulanmalarını son derece hızlı ve güvenilir bir hale getirmektedirler. Kullanılan yazılımlar, birçok stereolojik yöntemde kullanılan ve isteğe göre uyarlanabilen, farklı tiplerde ölçüm araçlarını (gridler, çerçeveler vb.) içermektedirler. Bu araçlar canlı veya önceden yakalanmış ve disklere kaydedilmiş görüntüler üzerine uygulanabilmekte ve ilgili ölçümler, bilgisayar teknolojilerinden yararlanılarak çok hızlı bir biçimde gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 8). Bu tip sistemlerin kullanılmasının en çekici yanlarından birisi de mikroskoplarda bulunan tabla motorlarının artık çoğunlukla bilgisayardaki yazılımlar aracılığıyla kontrol edilebilmeleridir. Stereolojik ölçümlerde en fazla zaman harcanan bölüm kesit görüntülerinin alan örneklemeleri ve bu alanlar üzerinde rastgele belirlenen adımlarda ilgili ölçümlerin yapılmasının tamamen otomatize edilerek, zamandan ve iş gücünden önemli oranda tasarruf sağlamasıdır. Ayrıca, bilgisayar destekli

sistemle yapılan çalışmalarda, kullanıcı hatasına önemli derecede sınırlama getirilmekte ve yapılan çalışmanın güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği de büyük oranda artmaktadır.<sup>12</sup>

Bir BDSA sisteminin maliyeti, özellikle ülkemizdeki birçok laboratuvar için oldukça fazladır. Sistemin maliyeti, özelliklerine bağlı olarak 75.000 ila 150.000 € arasında değişmektedir. Sistemin her zaman kolaylıkla satın alınmayacağı açıktır. Böyle bir sistemin satın alınmasında maliyet/yararlılık oranı iyi hesaplanmalıdır. Rutin olarak stereolojik çalışmalar yapılan bir merkez için böyle bir cihaz paha biçilmez değerde iken, stereolojiyi bir yan yöntem olarak kullanan laboratuvarlar için bu tip bir sistem "lüks" olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda, ülkemizin içinde bulunduğu zor koşullar da göz önüne alındığında, böyle bir sisteme sahip herhangi bir kuruluşun, bu sistemi ülkedeki tüm araştırmacıların uygun şartlarda faydalanabileceği bir şekilde işletmesi akla yatkın olacaktır. Böylece, bu yüksek maliyetli cihazların tam randımanlı olarak kullanılmaları sağlanabilir ve ülkemizdeki bilimsel gelişmeye de önemli katkılar da bulunabilir.

#### KAYNAKLAR

- Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. *J Microsc* 1986;143:3-45.
- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147:229-63.
- Schmitz C. Variation of fractinator estimates and its prediction. *Anat Embryol* 1998;198:371-97.
- Schmitz C, Hof PR. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat* 2000; 20:93-114.
- Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc* 1999;193:199-211.
- West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 1999;22:51-61.
- Coggeshall RE. Assaying structural changes after nerve damage, an essay on quantitative morphology. *Pain* 1999; (Suppl 6):21-5.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134:127-36.



9. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993;14:275-8.
10. Mayhew TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol* 1992; 21:313-28.
11. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26:235-302.
12. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. Guilford: Bios Scientific Publishers; 1998. p.187-95.
13. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: A brief survey. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1990;258:L148-L156.
14. Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of you and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 1996;188:1-15.
15. Russ JC, Dehoff RT. *Practical Stereology*. New York: Plenum Press; 1999. p.192-8.
16. Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: Parçalama. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(S):30-46.
17. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1100-23.
18. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.
19. Royet JP. Stereology: A method for analysing images. *Progress Neurobiol* 1991;37:433-74.
20. Canan S, Şahin B, Odacı E ve ark. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri prensibi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(S):7-14.
21. Haug H. History of neuromorphometry. *J Neurosci Methods* 1986;18:1-17.
22. Sahin B, Aslan H, Ünal B, et al. Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Anal Stereol* 2001;20:9-13.
23. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc* 1988;150:1-20.
24. Kaplan S, Canan S, Aslan H, Ünal B, Şahin B. The measurement of microscope stage movements within the x and y axes for stereological methods. *J Microsc* 2001;203:1-6.
25. Gökçe F, Bağırıcı F, Kaplan S, Demir S, Ayyıldız M, Marangoz C. A NOS inhibitor aminoguanidine reduces zinc-induced neuron loss in rat hippocampus. *Neurosci Res Commun* 2003;33:53-62.
26. Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S. Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metodlar: Fiziksel disektör. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(S):15-24.
27. Heinsen H, Henn R, Eisenmenger W, et al. Quantitative investigations on the human entorhinal area: Left-right asymmetry and age-related changes. *Anat Embryol* 1994;190:181-94.
28. Laroye GJ, Taylor WB. An acoustic depth alarm device to monitor vertical translation of the microscope stage: A practical optical disector, selector and unbiased brick for routine light microscopy. *J Microsc* 1992;167:279-86.
29. Sahin B, Aslan H, Canan S, Kaplan S, Unal B, Odaci E. A stereological estimation of total neuron number and volume of the hippocampus at one and seven day-old chicks. *Neurosci Res Commun* 2002;31:29-38.
30. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:857-81.
31. Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of Cavalieri principle and vertical sections method to the lung: Estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 1988; 150:117-36.