

Yeni Stereolojik Yöntemlerin Olası Hata Kaynakları ve Çözüm Yolları

THE POSSIBLE ERROR SOURCES OF NEW STEREOLOGICAL METHODS AND THEIR SOLUTIONS

Dr.Ersan ODACI^a, Dr.Şiir YILDIRIM^a, Dr.Ayşe BAHADIR^a, Sinan CANAN^b, Dr.Bünyamin ŞAHİN^c, Dr.Orhan BAŞ^c, Dr.Sait BİLGİÇ^c, Dr.Süleyman KAPLAN^a

^aHistoloji-Embriyoloji AD, ^bFizyoloji AD, ^cAnatomi AD, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, SAMSUN

Özet

Modern plan-tabanlı stereolojik yöntemler günümüzde birçok bilim dalında yaygın olarak uygulanmaktadır. Herhangi bir varsayıma dayanmaması, uygulanabilirliğinin kolay, etkin ve tarafsız olması bu yöntemlerin tercih edilme sebepleridir. Ancak son zamanlarda, daha önceleri tarafsız oldukları tartışmasız olarak kabul edilen bu metotların, ne derecede tarafsız oldukları sorusu gündeme gelmiştir. Son yıllardaki çalışmalar, çeşitli faktörler sonucu stereolojik metotlarda da bir miktar taraflılık olabileceğini göstermiştir. Kullanılan yöntemler, kesitlerin hazırlanması sırasında takip edilen işlemler ve gömme ortamları bu faktörlerin başta gelenleridir. Tamamen tarafsız ve hatasız bir yöntem henüz mevcut olmamasına karşın, bu hataları en aza indirmekle araştırmacıların elindedir.

Anahtar Kelimeler: Stereoloji, gömme ortamları, sayım yöntemleri, hata kaynakları

T Klin Tıp Bilimleri 2004, 24:78-87

Abstract

Modern design-based stereological methods are widely used in most of the scientific branches. They are generally methods of choice because of their purported freedom from assumption and bias as well as their efficiency and feasibility. Although these methods were initially introduced as unbiased with regard to any possible error source, there has been a growing concern. Recent studies suggest that some amount of bias could be introduced due to a range of factors. These factors, including the method of choice and sectioning-embedding procedures, are briefly reviewed in the present study. Although these methods are not completely unbiased and error-free, researchers can minimize these errors with a minimum of additional effort.

Key Words: Stereology, embedding media, counting methods, error sources

T Klin J Med Sci 2004, 24:78-87

Stereoloji, histolojik kesitlerin mikroskop altında izlenebilen ya da bu kesitlerden değişik şekillerde elde edilen görüntülerinden o yapılar hakkında güvenilir üç boyutlu veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemi içerir. Bu yöntemlerle iki boyutlu görüntülerden yola çıkılarak hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi bir çok önemli sayısal değere ulaşılabilmektedir.¹⁻⁶ Tarafsızlık, plan-tabanlı stereolojik yöntemlerin doğru bir şekilde uygulanması ile ortaya çıkan

önemli bir kavramdır. Yapıların geometrik özellikleri hakkında önceden herhangi bir varsayım yapılmaması ve yapının her noktasına eşit örneklenme şansının tanınması, tarafsızlık kavramının özünü oluşturmaktadır.

Modern stereolojik yöntemlerle ilgili kavramlar tanımlanmadan önce uygulanmakta olan ve model-tabanlı stereoloji olarak da bilinen yöntemlerin bir kısmında, ilgilenilen yapılarla ilgili değişik ön kabuller yapılarak çalışmalar yapılmaktaydı.⁴⁻⁷ Yöntemlerin bir kısmında ise çalışmanın sonuçlarına değişik düzeltme faktörleri uygulanarak gerçeğe yakın sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktaydı.⁸ Ancak modern stereolojik yöntemlerin tanımlanmasıyla birlikte, bu eski yöntemlerin yerini almış olan plan-tabanlı stereolojik yöntemlerde herhangi bir ön kabul yapılmadan ve düzeltme

Geliş Tarihi/Received: 06.01.2003

Kabul Tarihi/Accepted: 26.08.2003

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Süleyman KAPLAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji AD, 55139 SAMSUN
skaplan@omu.edu.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

faktörlerine gerek kalmadan güvenilir veriler elde edilebilmektedir. Bu nedenden dolayı modern plan-tabanlı yeni stereolojik yöntemler için “tahminden-bağımsız” terimi de kullanılmaktadır.⁹

Ancak son zamanlarda, taraflılıktan uzak gözüken bu yöntemlerin gerçekte ne derece tarafsız olduğu sorusu gündeme gelmiştir. Son yıllardaki çalışmalar, örnekleme stratejisi, kullanılan yöntem ve kişiden kaynaklanan faktörler sonucu farklı oranlarda taraflılıkların olabileceğini göstermiştir. Özellikle aynı yapılar üzerinde farklı araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar arasındaki belirgin farklılıklar, bu tartışmaların başlamasında önemli bir neden olmuştur.¹⁰⁻¹⁹

Yeni araştırmalar, stereolojik yöntemlerin uygulanmasından doğan hata kaynaklarının, stereolojik yöntemlerle ilgili olabileceğini göstermektedir.²⁰ Ancak çalışmaların bir kısmı da bir çok hatanın stereolojik yöntemin uygulanmaya başlanmadan önce yapılan tespit, doku takipleri, kesit alma işlemleri ya da boyama yöntemlerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu sebepten dolayı stereolojik uygulamalarda hata kaynaklarının yöntemden kaynaklanan hata kaynakları (Tablo 1) ve yöntem dışı hata kaynakları (Tablo 2) olarak ele alınması gereklidir.²¹

Stereolojik Yöntemlerden Kaynaklanan Hata Kaynakları **Disektör Uygulamaları İle İlgili Hata Kaynakları**

Optik disektör ve fiziksel disektör gibi modern plan-tabanlı yöntemlerin ilk başlarda, yöntemlerin

kurallarına uyulduğu taktirde tarafsız ve doğru sonuçlar vereceği ileri sürülmüştü. Ancak daha sonra bir çok araştırıcının dikkatini çeken ve yapılan kalibrasyon analizleri, bu yöntemler doğru uygulansa bile çoğu araştırıcının dikkatini çekmeyen belirli, fakat kontrol edilebilir bir taraflılığa neden olabileceğini göstermiştir.²¹

Fiziksel Disektör

Fiziksel disektör uygulamasında, bilinen bir mesafeyle ayrılmış birbirine paralel kesit çiftlerinde tanecik sayımı yapılır.⁵ Bu kesitlerden birisi gözlem (look-up), diğeri de sayım kesiti (örnek kesit, reference section) olarak adlandırılır ve sayım kesitinde olup, gözlem kesitinde olmayan tanecikler sayılır (Şekil 1).²² Kesitlerde gözlenen tanecik izdüşümlerinin aynı taneciğe ait olduğunun tanımlanabilmesi gereklidir. Ayrıca, kesitler arasındaki mesafe tanecik boyutunun yaklaşık üçte biri kadar olmalıdır.⁷ Burada amaç, taneciklerin atlanmadan sayılabilmesini sağlamaktır. Bu yöntemin elektron mikroskopunda elde edilen mikrograflarında uygulanması oldukça kolaydır. Ancak benzer alanların tespit edilmesindeki zorluklar, uygulama için özel ekipman gerektirmesi ve zaman alıcı olması gibi etkenler, yöntemin ilk akla gelen bazı olumsuz özellikleridir.^{4,21}

Yöntemlerin uygulanması sonucu elde edilen değerlerin doğrulunun onanması için ilk defa fiziksel disektör için kalibrasyon analizleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışmaların sonuçları değerlendirildikten sonra izdüşümü sayımı ve optik disektör uygulamaları için de kalibrasyon yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.²¹

Tablo 1. Tanecik sayım yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Sayım metodu	Avantajları	Dezavantajları
Profil sayımı	Az, mevcut ekipman, ince kesitler için uygun, nispeten etkin ve hızlı, önceki çalışmalardan fazla veri tabanı	Partikül boyutu ve şekline dayalı tahminlere bağlı taraflılık
Optik disektör	Nispeten etkili, heterojen partiküllerden etkilenmeme, daha fazla ekipman gerektirme	Kalın kesit gerekliliği, antikorlar tüm kesite nüfuz etmeyebilir, farklı z-ekseni büzüşmeleri taraflılığa neden olabilir
Fiziksel disektör	Genellikle tarafsız, ince kesitlere uygulanabilirlik	İki kesitin hizalanmasında zorluk, özel ekipman gerekliliği, zaman alıcı
Seri kesitlerden 3-boyutlu yeniden yapılandırma	Tarafsız	Zaman alıcı, çok sayıda veya yoğun yerleşimli partiküllere uygulanması imkansız

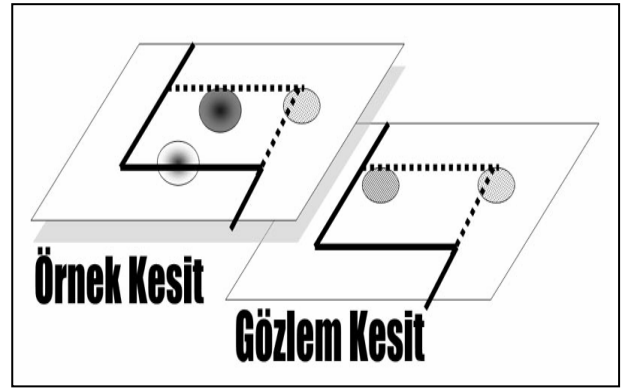
Tablo 2. Tanecik sayım metotlarında kullanılan gömme ortamları ve kesit alma tekniklerinin avantaj ve dezavantajları

Histolojik teknik	Avantajları	Dezavantajları
Parafin	Kolay, tehlikesiz, ucuz, iyi boyanma ve morfoloji, düzgün yüzeyler, şerit oluşturma, seri kesitlerin birleştirilmesi kolay	İmmun işaretleme için doku antijenitesinin korunmasında uygunsuzluk, z-ekseninde farklı distorsiyon
Frozen	İmmun işaretleme için uygun	Vasat boyanma ve morfoloji, seri kesit alma zorluğu
Vibratom	İmmun işaretleme için uygun, elde edilebilir ekipman	Düzgün olmayan yüzeyler, seri kesitlerin birleştirilmesinde zorluk, z-ekseninde farklı distorsiyon
Metakrilat	Doku büzüşmesi az	Kötü boyanma ve morfoloji, gömme ve kesit almada zorluk, z-ekseninde farklı distorsiyon, kalın kesitler için ıslatılma gerekliliği
Selloidin	Kalın kesitlerin elde edilme kolaylığı, iyi morfoloji	Dokunun boyanma ve işlenmesinde zorluk, seri kesit almada zorluk

Optik Disektör

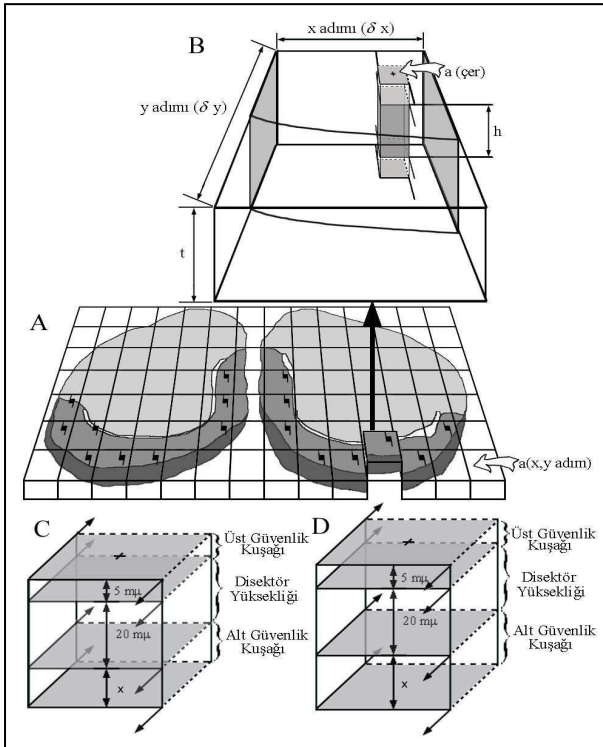
Optik disektör, kalın bir doku kesiti içerisinde z eksenini boyunca optik olarak ilerlerken oluşturulan sanal bir küp olarak da düşünülebilir. Tarafsız sayım çerçevesi kurallarına göre oluşan bu sanal küpün ön, üst ve sol yanı serbest kenarlar olarak nitelendirilir. Optik disektör uygulamalarında küpün iç kısmına ve serbest kenarlara isabet eden ve tanecik olarak nitelendirilen yapılar sayılmaktadır. Bu kenarlar, optik disektörün etrafındaki alanı, tüm objelerin ebat, şekil ve yönelimlerinden bağımsız olarak aynı olasılıkla sayılabilmelerine izin verir.^{4,23,24} Fiziksel disektördeki karşılıklı iki kesitin eşleştirilmesi zorluğunu ve zaman kaybını önlemesi açısından da önemli bir avantaja sahiptir.⁴ Klasik optik disektör uygulamalarında kesitin alt ve üst kısımlarında, kesit alınması sırasında oluşan yüzey düzensizliklerinden sakınmak için, belli bir güvenlik kuşağı bırakılmaktadır. Dolayısıyla sayım işlemi üst ve alt güvenlik kuşaklarının haricinde yani kesitin orta kısımlarında gerçekleştirilir. Taneciklerin şekil, boyut ve yönelimleri hakkında herhangi bir ön varsayım yapılmaması, etkili ve kullanımının kısmen kolay oluşu, bu yöntemi bir çok yöntemle kıyaslandığında daha avantajlı hale getirmektedir (Şekil 2).^{7,25}

Optik disektör uygulamasında bazı faktörlerin sonucun doğruluğunu etkileyebileceği gözlenmiştir. Bir kısım çalışmada doku takibi sırasında do-



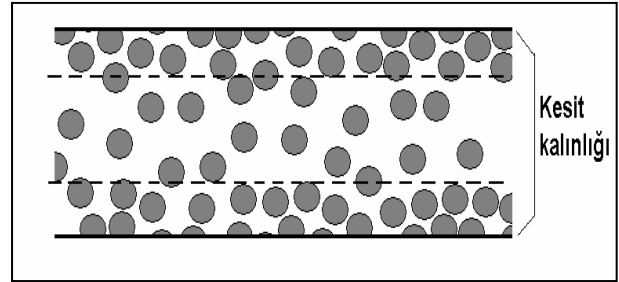
Şekil 1. Ardişık iki düzlem (sayım-örnek ve gözlem kesiti) ile oluşturulan üç boyutlu bir hacimde disektör taneciklerinin sayılması. Doku bloğu içerisinden birisi sayım, diğeri gözlem kesiti olmak üzere kesit çiftleri alınmıştır. Bu kesit çiftleri birbirinin ardışığı olabileceği gibi belirli bir mesafe ile birbirinden ayrılmış kesitler de olabilir. Burada göz önünde bulundurulması gereken husus, sayım ve gözlem kesitleri tarafından oluşturulan disektör hacmi içinde değerlendirmeye alınmayan tanecik olmaması yani hiçbir tanecik atlanılmamalıdır. Bunlardan, sayım kesitinde gözlenip, gözlem kesitte gözlenmeyen, yani ardışık kesitlerden birinde gözlenip, diğesinde gözlenmeyen tanecik izdüşümleri disektör kuralına göre sayıma dahil edilecektir. Buna göre, koyu renkteki tanecik sayım kesitinde gözlendiğinden gözlem kesitinde gözlenmediğinden dolayı disektör taneciği olarak sayıma dahil edilir.

kuda meydana gelen farklı orandaki büzüşme ve deformasyonların elde edilen sonucun doğruluğunu etkileyebileceği saptanmıştır. Dokuda z eksenini boyunca meydana gelen deformasyon, yöntemin uygulanması sırasında önemli sapmalara neden



Şekil 2. Optik parçalamada kullanılan optik disektörün uygulaması. (A) Adımlama esnasında tarafsız sayım çerçevesi ortasında bulunan (+) işaretinin incelenen doku üzerine isabet eden yerlerinde optik disektör yapılmaktadır. Bu şekilde adımlardan biri (B) daha büyük bir büyütmede şematize edilmiştir. Adımın bir bölümünde doku bulunmamasına rağmen tarafsız sayım çerçevesinin ortasına yerleştirilen (+) işaretinin incelenen doku üzerine isabet etmesinden dolayı bu adımda optik disektör yapılmaktadır. Kesitin üst yüzeyinden alt yüzeyine kadar olan mesafede üst (5 μm) ve alt (x μm) yüzeylerde güvenlik kuşakları bırakılarak, (h) kadar bir derinlikte optik disektörler yapılmaktadır. h'nin alt ve üst tarafındaki mesafeler güvenlik için bırakılan doku kısımlarıdır. (C) ve (D) Optik disektör uygulaması, kesit yüzeylerinde meydana gelen kayıp veya yarı kesilmiş partiküllerden sakınmak için, kesitin her iki yüzeyinden de belirli bir mesafe uzaklaşarak kesitin merkezinde sayım yapılmasını önermektedir. Optik disektörde sayıma başlanacak yüzeydeki güvenlik kuşağının mesafesi daima sabit kalırken (örneğimizde üst yüzeydeki güvenlik kuşağı daima 5 μm), alt güvenlik kuşağı ise kesitin kalınlığına göre değişebilmektedir. (C) ve (D)'de çizilen şematik doku dilimlerinin (x) ile işaretlenen alt güvenlik kuşaklarının mesafeleri kesit kalınlıklarının birbirinden farklı olmasından dolayı değişik olduğunu göstermektedir.

olabilmektedir (Şekil 3). Çünkü optik disektör uygulaması sırasında nispeten daha az büzüşen tanecikler görüntü alanında rahatlıkla görülür ve sayıma dahil edilir. Bununla birlikte, üst ve alt güvenlik kuşaklarında daha fazla büzüşen tanecik-



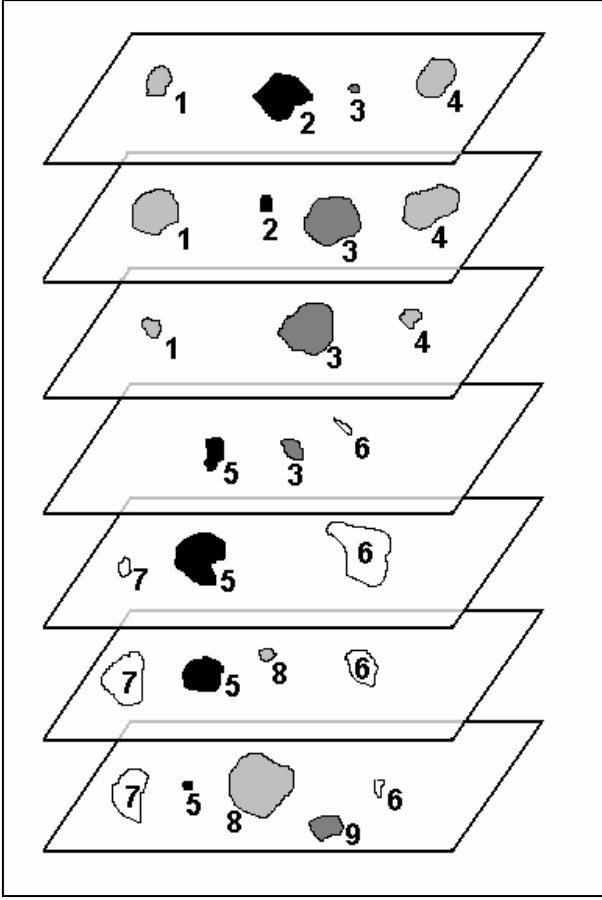
Şekil 3. Kesit alma esnasında mikrotom bıçağının darbesi sonucunda kesitin alt ve üst yüzeyinde meydana gelen tanecik sıkışmasına ilişkin şematik bir görünüm. Bilinen optik parçalama yönteminde kesitin orta kısmında tanecik sayımı yapılmakta buradan çıkan sayım sonucu kesitin diğer kısımları ile aynı yoğunlukta tanecik bulundurduğu varsayımı ile tüm diğer basamaklarda hesaplamalar yapılmaktadır. Teorik olarak tarafsız olduğu savunulan optik parçalama yönteminin uygulamada tarafsız olmadığı kesit deformasyonundan kaynaklanan sapmalara sahip olduğu gözlenmiştir.

ler ise uygulama sırasında gözden kaçarak sayım dışı bırakılabilir. Bu durum bazen elde edilecek verilerin gerçek değerden uzaklaşmasına neden olarak sistematik bir hataya sebep olabilir.^{21,26-28}

Morfometrik çalışmaların bir kısmında ise immün-ışaretleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu gibi çalışmalarda stereolojik yöntemler kullanılmak istenildiğinde işaretlenmiş antikorların kalın kesitin tümüne nüfuz etmemesi gibi bir problemle karşılaşılır. Bu durumun çalışmalarda sistematik bir hataya sebep olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.²¹

Disektör Uygulamalarında Kalibrasyon Yöntemi

Disektör uygulamaları esnasındaki hata kaynaklarının sonuçları etkileyip etkilemediğini doğrulamak ve çalışmalar sonunda elde edilen farklı sonuçlardan doğan problemlere karşı kalibrasyon bir çözüm olarak gösterilmektedir. Bazı araştırmacılar tüm yeni ölçüm yöntemlerinin kalibre edilmesi gerektiğini savunmaktadırlar. Kalibrasyonun temelini elde edilen kesitlerin tekrar bir araya getirilip hesaplanması oluşturmaktadır. Bu yöntem "3-boyutlu yeniden yapılandırma" (3D reconstruction) olarak adlandırılır. İlk bakışta oldukça fazla bir iş yükü gerektirir gibi gözükse de, aslında basit ve uygulaması kolaydır (Şekil 4).²⁰



Şekil 4. Kesitlerdeki taneciklerin izdüşümleri takip edilerek birleştirilmesiyle tanecikler tekrar elde edilir. Hiçbir tanecik atlanmadığı ya da yanlış tanımlanmadığı sürece bir örnekleme alanındaki tanecik sayısı o dokudaki gerçek tanecik sayısını verecektir. Numaralandırılmış taneciklerin kesitlerdeki izdüşümleri takip edilir ve en son görüldüğü kesitte bir tanecik olarak sayılırsa alınan kesit serisindeki toplam gerçek tanecik sayısı elde edilir.

Disektör uygulamalarında ilgilenilen yapı tanecik olarak adlandırıldığına göre, kalibrasyon uygulamasında yine taneciklerin yeniden değerlendirilmesi yapılır. Yöntemin esasını her bir tanecik için en az bir kesitte gözlenmesi ve izdüşümlerinin bir kesitten diğerine doğru takip edilmesi oluşturur. Kalibrasyon için ölçümler doğrudan üç boyutlu bir uzayda yapıldığı için bu yöntem bazı araştırmacılar için çalışmanın doğruluğunu gösteren “*altın standard*” olarak da tanımlanır.^{1,29}

Kalibrasyon uygulaması yaklaşık 5-10 seri kesit kullanılarak yapılabilir (Şekil 4). Bir kesitte seçilen alandaki tanecikler belirlendikten sonra, ardışık kesitte aynı alan bulunarak işleme devam

edilir. Bir kesitte kan damarı ya da belirgin diğer yapıların saptanması, bir sonraki kesitte aynı alanın ve dolayısıyla taneciklerin yerini belirlemede kolaylık sağlar. Eldeki tüm kesitlerde, belirlenen alandaki taneciklerin hepsinin tanımlanması gerekmektedir. Taneciklerin izdüşümlerinin takip edilerek birleştirilmesi ile tanecikler tekrar elde edilir. Hiçbir tanecik atlanmadığı ya da yanlış tanımlanmadığı sürece bu örnekleme alanındaki sayı gerçek sayıyı verecektir. Bu tür uygulama için en az 100 partikülün yeniden yapılandırılması gerektiği belirtilmektedir (Şekil 4).²¹

Teorik olarak tamamen tarafsız gözükten optik disektör yöntemi ile elde edilen değerler ile yukarıda tarif edilen kalibrasyon yöntemi ile elde edilen gerçek değerler karşılaştırıldığında, kalibrasyon sonuçlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Başka bir ifadeyle, optik disektör yöntemi kullanılarak elde edilen sayım sonuçlarının, gerçek değerden daha az çıkması söz konusu olabilmektedir. Daha önce de değinildiği gibi optik disektörde, kesitin alt ve üst yüzünde güvenlik kuşağı bırakılarak kesitin orta kısmında sayım yapılmaktadır (Şekil 2). Araştırmacılar klasik optik disektör uygulamaları ile elde edilen sonuçların gerçek değerden daha az çıkmasının, kesitin alt ve üst yüzeylerinde bırakılan güvenlik kuşaklarında sayım yapılmamasına bağlı olabileceğini belirtmektedirler (Şekil 3). Bu durumun gerçek nedeni, optik disektör uygulamalarında sıklıkla kullanılan parafin ve plastik gömme ortamlarının özelliğinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar parafin kesitler kullanıldığında, kesitin alt ve üst güvenlik kuşağının dışında sayım yapılan bölgelerdeki (5-15µm aralığındaki mesafede) hücre yoğunluğunun güvenlik kuşağındaki hücre yoğunluğuna göre %25 kadar daha az olduğunu göstermektedir.³⁰

Farklı Optik Disektör Uygulamaları

Bir kısım araştırmacılar tarafından klasik optik disektör uygulamasından elde edilen sonuçların gerçek değerden daha az çıkabileceği ve bunun muhtemel sebepleri ortaya konduktan sonra, bazı araştırmacılar da klasik optik disektör yöntemini değiştirerek değişik bir uygulamaya başlamışlardır.³⁰ *Değiştirilmiş optik disektör yöntemi* olarak da adlandırılacak olan bu yöntemin esasını kesit-

lerde alt ve üst güvenlik kuşakları bırakılmadan tamamının örneklenmesi oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu teknikle, kesitin sadece orta kısmının değerlendirildiği optik disektör uygulamalarından gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilebilmesi amaçlanmaktadır.

Değiştirilmiş optik disektör uygulaması, klasik uygulamanın meydana getirebileceği taraflılığı en aza indirmek için gerekli bir dizi farklı uygulamayı içermektedir. Uygulamanın temel mantığı, klasik optik disektör uygulamasında kesitin kalınlığı boyunca örnekleme (sayımın) yapıldığı kısımların (genellikle kesitin 5-15 µm'lik kısımları) dışında kalan ve güvenlik kuşağı diye adlandırılan bölgelerin de örnekleme dahil edilmesi gerekliliği üzerine kurulmuştur. Klasik optik disektör uygulamasında kesitin alt ve üst yüzeylerinde güvenlik kuşağı bırakılır (Şekil 2). Buradaki amaç taraflılığı ortadan kaldırmak için yarım-kesilmiş hücre çekirdeklerinin sayım dışı bırakılmasıdır.²⁵ Klasik optik disektör yönteminde güvenlik kuşağı uygulaması tüm kesitler için standart bir uygulama olduğu için taraflılığa sebep olmayacağı belirtilmektedir.⁴ Ancak sıklıkla parafin ve plastik (glycolmethacrylate) kesitlerde uygulanan klasik optik disektörde, gömme ortamlarından kaynaklanan nedenlerden dolayı kesitin ortasındaki hücre yoğunluğu yüzey bölgeye göre daha düşüktür. Gerçekte bu gömme ortamları ile hazırlanan kesitlerde optik disektör uygulaması için alt ve üst yüzeylerinde güvenlik kuşakları bırakılması gerekebilir. Çünkü gömme ortamlarından kaynaklanan sebeplerden dolayı kesitin üst ve alt yüzeylerinde sayılabilecek nitelikteki taneciklerin yüzeylerden düşmesi mümkündür.^{26,31-34}

Değiştirilmiş optik disektör uygulamasını tanımlayan ve uygulayan araştırmacılar ise parafin ve plastik gömme ortamlarının yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı optik disektör uygulamaları için uygun olmadığını, bu yöntem için en iyi kesitlerin dondurulmuş (frozen) kesitler olduğunu belirtmektedirler.^{26,30} Bu tür uygulamalarda frozen ile hazırlanmış her bir kesitin üst ve alt yüzeylerinde güvenlik kuşağı bırakmadan, kesit derinliğinin tamamında optik disektör yöntemi uygulanmaktadır. Değiştirilmiş optik disektör uygulaması, yüze-

ye yakın kısımların örnekleme dışı tutulduğu orijinal sayım kutusunun ya da optik disektörün yeniden tanımlanması anlamına gelir. Uygulamada tarafsız sayım çerçevesi kurallarında herhangi bir değişiklik yoktur ve bu çerçeve kurallarına göre sayım yapılır. Ancak esas farklılık, kesitlerin değerlendirmeleri yapılacak olan 3-boyutlu ortamda yeniden yapılandırılması ve optik disektör kavramının yeniden tanımlanmasında yatmaktadır.^{21,26,30}

Yapılan bir çalışmada, değiştirilmiş optik disektör ile 3-boyutlu yeniden yapılandırma işleminden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada Trochlear çekirdeğe ait, 25 µm'lik parafin kesitlerden dördü bir araya getirilmiş ve sonuçta 207 nöron elde edilmiştir. Değiştirilmiş optik disektör uygulaması sonucunda ise 201.4 nöron hesaplanmıştır. Her iki sonuç karşılaştırıldığında sonuçların %97.3 doğrulukta bir yakınlık gösterdiği gözlenmektedir. Kısaca 3-boyutlu yeniden yapılandırma işlemi ile elde edilen sonuçların gerçek değerlere ne derece yakın olduğu belirlenebilir.³⁰

Yöntemlerden Kaynaklanan Hatalara Yaklaşım

Son 20 yılda tanımlanan modern stereolojik yöntemler, çalışma sonuçlarının bir çok etkenden ve ön kabulden bağımsız olması sebebiyle kısa sürede çok geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Modern stereolojik yöntemler daha önceden tartışmasız kabul edilen bir çok doğru kabullerin değişmesine neden olmuştur. Son yıllarda bir kısım araştırmacı, stereolojik çalışmaların sonuçlarının da stereolojik yöntemlerden kaynaklanan bazı hatalardan dolayı taraflı olabileceğini ileri sürmektedir. Başka bir ifadeyle bilimin her alanında olduğu gibi stereolojinin uygulama alanları genişledikçe yöntemleri de tartışılmaktadır. Burada akla gelen en önemli soru "acaba stereolojik yöntemlerle elde edilen sonuçlar bilimsel gerçekten uzak mı?" sorusudur. Stereolojik yöntemlerin tartışıldığı çalışmalar incelendiğinde bu sorunun sorulmadığı, stereolojik yöntemlerin temelini oluşturan geometrik ispatların tartışmasız kabullenildiği görülmektedir. Bu çalışmalarda yöntemlerin uygulanması sırasında karşılaşılan bazı problemleri çözmeye yönelik tartışmalar yapılmakta olup, bir kısmında

da mevcut yöntemlerin modifikasyonları yapılmaktadır. Bu nedenle stereolojik uygulamalar geçerliliğini gittikçe artan bir oranda devam ettirmektedir.^{10-19,21}

Stereolojik Yöntemlerin Dışındaki Muhtemel Hata Kaynakları **Kesitlerin Hazırlanmasında Kullanılan Değişik Gömme Ortamları ile İlgili Hata Kaynakları**

Stereolojik çalışmalarda kesitlerin hazırlandığı gömme ortamları, yöntemlerin uygulanması sırasında meydana gelebilecek hata kaynaklarının bir kısmını oluşturur. Bir kısım araştırmacı stereolojik çalışmalar için sadece plastik gömme ortamlarını kullanırken bir kısmı ise hem parafin, hem de plastik gömme ortamlarını kullanmaktadır. Son yıllarda ise parafin ve plastik gömme ortamlarından kaynaklanan hata kaynaklarının fazla olduğu ve bu hataların çalışmaların sonuçlarını belirgin bir şekilde etkilediği saptandığından,^{21,26} araştırmacılar değişik alternatiflere yönelmişlerdir. Bir kısım araştırmacı değişik gömme ortamlarının stereolojik çalışmalar için uygun olabileceğini belirtirken, bir kısmı ise gömme ortamlarının yerine gömme ortamı kullanmadan frozen kesitler almayı tercih ederek, gömme ortamlarından kaynaklanan hatalardan kurtulma yolunu seçmektedir.^{21,26}

Parafin Gömme Ortamı

Doku büzüşmesinin, stereolojide önemli bir faktör olduğu ve verilerin yanlış yorumlanmasına yol açabildiği belirtilmektedir. Doku büzüşmesinin derecesi dokunun sertliğine bağlıdır. Bu da yine kollagen gibi hücre dışı matris bileşenlerinin içeriğine bağlı olabilir.^{3,35,36}

Parafin, araştırma laboratuvarlarında preparat hazırlanması için özel amaçların dışında en çok tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir gömme maddesidir. Dokuların iyi bir şekilde boyanması ve morfolojik özelliklerinin kolayca ortaya çıkmasını sağlaması, kesitlerinde düzgün yüzey elde edilmesi, ucuz oluşu ve seri kesit alınmasının kolaylığı gibi özellikler kullanımını arttıran sebeplerdir (21). Ancak yüksek ısının kullanıldığı çalışmalarda doku büzüşmesini arttırması ve artefaktların oluşması parafinin kullanım alanını sınırlandırmak-

tadır.³⁷

Plastik Gömme Ortamı

Metakrilat gibi plastik gömme maddeleri ise, parafin kullanımında karşılaşılan problemlerin bazılarını ortadan kaldıran gömme ortamlarıdır. Plastik gömme ortamı parafine göre dokularda daha az büzüşmeye sebep olur ve bu gömme ortamlarında daha az artefakt görülür.³⁷ Buna karşın, immunositokimyasal tekniklerin ve fluoresan işaretleyicilerin kullanıldığı çalışmalarda, plastik maddenin alınan kesitlerden tam olarak uzaklaştırılmaması nedeniyle, tanecik olarak nitelendirilen işaretlendirilmiş yapıların tam olarak ortaya çıkmamasına ve sayım dışı kalmasına neden olur. Bu durum stereolojik çalışmalar için araştırmacının farkına varamadığı ancak çalışmanın gerçek sonucundan sistematik bir sapmaya neden olacak bir hata kaynağıdır. Bununla birlikte, plastik gömme ortamı kullanılan dokulardan kesitlerin hazırlanması her laboratuvarında bulunmayan özel ekipmanlar gerektirir.³⁸

Yapılan çalışmalar parafin ve plastik kesitlerde, kesitin alt ve üst yüzeylerinde tanecik yoğunluğunun hemen hemen aynı olduğunu göstermektedir. Ancak disektör uygulamasının yapıldığı alt ve üst güvenlik kuşakları arasında kalan kesitin orta kısmında ise tanecik yoğunluğunun kenarlara göre %50 kadar daha az olabildiği de gösterilmiştir.³⁰ Çalışmalar kesitin kenarlarındaki yoğunluğun orta kısma göre daha fazla olmasının nedenini, kesit alma işlemi sırasında kullanılan bıçağın dokuya baskı yapması sonucu kenarlarda meydana gelen yoğunluk artışından kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu durum hem metal, hem de cam bıçakların kullanımında görülebilmektedir. Bu sıkıştırma etkisi, bıçağın keskinliğine, kesitin bloktan alınış açısına veya bloğun mikrotoma tutturulması sırasındaki basınçtan da kaynaklanabilir. Bu tür parametreler tanecik sayısı hesaplamalarını doğrudan etkilemekte ve örneklenen alanlardaki yoğunluk tüm kesiti temsil etmediği için çalışma sonuçlarının taraflı olmasına yol açmaktadır.³⁰

Selloidin

Özellikle merkezi sinir sistemi dokularında yapılacak olan çalışmalar için uygun olan selloidin kullanımı giderek metakrilatın yerini almaya başla-

mıştır.³⁹ Bu madde daha çok kalın kesitler ile çalışılması planlanan çalışmalarda tercih edilmektedir. Kalın kesitlerin kolay elde edilmesi ve doku morfolojisini daha iyi koruması selloidinin avantajlı yönlerindedir. Parafinde olduğu gibi yüksek ısı gerektirmez. Ancak boyama sırasında karşılaşılan güçlükler ve kesit alırken karşılaşılan bazı sorunlar selloidin kullanımının bazı olumsuz yanlarıdır.²¹ Ayrıca bir kısım araştırmacı selloidin kullanımında %40-70'e varan bir doku büzüşmesi olabileceğini de belirtilmektedir. Selloidine gömülü doku kesitleri immun boyama için uygun değildir.^{13,20}

Vibratom

Vibratom, dokuların gömülmesine ya da dondurulmasına gerek olmadan, özel bir jilet vasıtasıyla kesitler alınmasını sağlayan bir sistemdir. Dokular taze veya tespit edilmiş olarak kesilebilirler. Vibratomda kesit alma işlemi başladıktan sonra, tüm doku kesilene kadar kesme işlemi durdurulamaz.³¹ Kesit alma sırasında dokular, içinde serum fizyolojik bulunan bir banyo içerisinde tutulurlar. Bu işlem sırasında dokuların serum fizyolojik içerisinde tutulması dokular için bir çeşit fizyolojik ortam sağlar. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, kullanılan doku ne kadar yumuşak ise, kullanılan serum fizyolojik ısısının da o derece düşük olması gerektiğidir. Başka bir ifadeyle dokunun yumuşaklığı ile, serum fizyolojik ısısı arasında ters bir orantı vardır. Örneğin kas ve kalp gibi sert dokular oda ısısına sahip serum fizyolojik içerisinde, sinir dokusu gibi yumuşak dokular da soğuk serum fizyolojik içerisinde tutulurlar. Burada ısının düşük tutulmasının nedeni yumuşak dokuların sertleşmesinin sağlanması ve kesit alırken karşılaşılabilecek sorunların en aza indirilmesidir. Ayrıca kesit alma işlemi sırasında eğer doku yumuşak ise genlik artırılmalı ve jiletin açısı da dikleştirilmelidir.^{16,32,40-42}

Vibratom kullanılması ile kesilecek dokuların serum fizyolojik içerisinde tutulması dokunun enzim aktivitesinin bozulmamasını da sağlar. Dokuların enzim aktivitesinin bozulmaması nedeniyle, bu yöntem özellikle enzim çalışmalarında bir alternatiftir.³⁹ Vibratom kesitler immun işaretlemede de kullanılabilir. Ancak elde edilen kesitlerde düzensiz yüzeyler oluşması ve kesitlerin

doku morfolojisinin çok iyi bir şekilde ortaya çıkacağı kesitler olmaması nedeniyle, optik disektör uygulamaları için uygun değildir. Ayrıca kesitlerde meydana gelen düzensiz yüzeyler, 3-boyutlu yeniden yapılandırma için gerekli olan seri kesitlerin bir araya getirilmesinde problemler ortaya çıkarabilmektedir.^{21,40}

Dondurma

Optik disektör uygulamaları, boyama ve kapatma işlemlerinden sonra en az 20-30 µm kalınlığında olan kesitler kullanılarak gerçekleştirilir. Toplam nöron sayısının hesaplanmasında kalın frozen kesitlerin kullanımı bir çok araştırmacı tarafından rutin hale gelmiştir. Hatta ani-dondurma (snap-frozen) kesitler kullanılarak yapılan çalışmalardan bile daha güvenilir sonuçlar elde edildiği de ileri sürülmektedir.²⁶ Çalışmalarda frozen kesitlerde tanecik yoğunluğu açısından bakıldığında kesitin kenarları ve orta kısmı arasında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüş ve çalışmalardan beklenen sonuçlar elde edilebilmiştir.³⁰

Frozen kesitlerin elde edilmesi sırasında çalışma süresinin oldukça kısılması, doku takibi sırasında kullanılan maddelerin her laboratuarda kolaylıkla bulunabilecek olması ve elde edilen kesitlerde artefaktların büyük oranda görülmemesi, bu yöntemi diğer takip yöntemlerine ve gömme ortamlarına göre daha uygun hale getirmektedir. Bu olumlu özelliklerin yanı sıra yaklaşık 100 µm kalınlığa kadar kesitlerin bu yöntemle elde edilebilmesi, bu yöntemi kullanmayı düşünen araştırmacıya planlayacağı çalışmalar için de büyük bir avantaj sağlamaktadır. Çünkü frozen kesitler, uygun bir boyama yöntemi kullanıldığında 100µm'lik bir kesitin tüm katmanlarının morfolojik özelliklerini aynı netlikte inceleyebilme, büyük hücrelerin çoğunun tamamını kesilmeden değerlendirebilme ya da damarları 100 µm'lik bir kalınlıkta değerlendirebilme şansını araştırmacıya vermektedir.^{18,26,28,34} Ancak bazı çalışmalarda, frozen kesitlerde yapıların %80'e kadar varan bir büzüşme gösterdikleri de bildirilmektedir. Ancak özellikle MSS dokuları üzerinde planlanan optik disektör uygulamalarında, genellikle hücre çekirdeği sayılabilir nitelikte tanecik olarak belirlendiğinden, bu büzüşme çalışmalar

için bir sorun oluşturmamaktadır. Dondurulmuş kesitlerin elde edilmesinde bir diğer dezavantaj ise kesitlerin alınacağı cihazın her laboratuarda bulunurulamayacak kadar pahalı olmasıdır.^{18,26}

Kesitlerdeki Farklı Tanecik Yoğunluğunun Nedenleri

Daha önce de değinildiği gibi, kesit alma işlemi sırasında kullanılan bıçağın dokuya doğru bası yapması ve taneciklerin dokunun içine doğru itmesi söz konusudur. Bu işlem kesit kenarlarını orta kısma göre daha çok etkilemektedir. Doku büzülmesinin tanecikleri ve hücre dışı alanı farklı derecede etkileyebilmesi ve bunun kesitin kenarları ve orta kısmı arasında bir yoğunluk farkına yol açabilmesi de söz konusudur. Örneğin, parafin kesitlerdeki büzülme çekirdekleri diğer doku bileşenlerinden daha az etkilemektedir. Parafin kesitlerin lam üzerine alınmadan önce su üzerinde yüzdürülmesi işlemi de bu dağılım farklılığına yol açabilmektedir. Frozen kesitlerde ise taneciklerin farklı dağılım yoğunluğu göstermemesinin nedeni tanecikler ile hücre dışı alan içeriğinin benzerliğidir. Aynı şekilde, parafin ve plastik kesitlerdeki tanecik ve hücre dışı alan içeriğinin farklılığı bu kesitlerdeki farklı tanecik yoğunluğunun nedeni olarak gösterilebilir.^{26,30}

Yöntem Dışı Olası Hata Kaynaklarına Yaklaşım

Tarafılık, ne kadar örnekleme yapılırsa yapılınsın gerçek değerden sistematik bir sapmanın önüne geçilemeyeceğini ifade eden bir kavramdır. Aslında her çalışmada olduğu gibi stereolojik çalışmalarda da farklı etkenlerden kaynaklanan tarafılıklar mevcuttur.^{1,12-19,29} Bunlardan bir kısmı, örneğin araştırmacının kendi özellikleri gibi etkenler her çalışma için doğal olan tarafılıklardır. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi kesitlerin farklı oranda büzülmesi, gömme ortamları ya da doku takip işlemleri gibi etkenler ise her çalışmaya göre değişiklik gösterebilecek tarafılıklardır. Bu nedenle yapılması gereken, her bir çalışmada tarafılığın boyutunun değerlendirilerek, planlanan çalışmanın özelliğine göre tarafılığı en aza indirecek uygun laboratuvar şartlarında kesitlerin elde edilmesidir.

Böyle bir yaklaşım stereolojik sayım yöntemleri ile daha doğru ve daha tarafsız bir sonuç elde edilmesini sağlayacaktır.²¹

Bilimsel hiç bir yöntemin kusursuz olmadığı ve zamanla daha doğru sonuçlar elde etme yönünde büyük-küçük bir takım uyarlamalara maruz kalması gerektiği de unutulmamalıdır. Önemli olan, yeni gelişmeleri takip ederek, morfolometrik verileri en doğru biçimde elde etmeyi sağlayacak yöntemlerin belirlenmesidir. Günümüzde bu iş için en uygun araç, halen yaygın olarak kullanılmakta ve kabul görmekte olan modern stereolojik yöntemlerdir. belirgin tarafılıkların önüne geçmek üzere gereken önemlerin alınması halinde, bu yöntemlerin doğasında bulunan temel matematiksel ve istatistiksel kurallar, “doğru” veriler elde etmeyi mümkün kılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Coggeshall RE. Assaying structural changes after nerve damage, an essay on quantitative morphology. Pain (Supplement) 1999; 6: 21-5.
2. Sterio DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. J Microsc 1984; 134: 127-36.
3. 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.
4. West MJ. New stereological methods for counting neurons. Neurobiol Aging 1993; 14: 275-78.
5. Mayhew TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. J Neurocytol 1992; 21: 313-28.
6. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int Rev Cytol 1969; 26: 235-302.
7. Mayhew TM, Gundersen HJ. 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. J Anat 1996; 188: 1-15.
8. Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. Anat Rec 1946; 94: 239-47.
9. Glaser JR, Glaser EM. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. J Chem Neuroanat 2000; 20: 115-26.
10. Schmitz C, Korr H, Heinsen H. Design-based counting techniques: the real problems. TINS 1999; 22: 345.
11. Hedreen JC. Unbiased stereology? TINS 1999; 22: 346.
12. Kordower JH. Making the counts count: the stereology revolution. J Chem Neuroanat 2000; 20: 1-2.
13. Benes FM, Lange N. Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. TINS 2001; 24: 11-7.

14. West MJ, Slomanka L. 2-D versus 3-D cell counting-a debate. *TINS* 2001; 24: 374.
15. Geuna S. Cost effectiveness of 3-D cell counting. *TINS* 2001; 24:374-75.
16. Baddeley A. Is stereology 'unbiased'? *TINS* 2001; 24: 375-76.
17. Coggeshall RE. Commentary on the paper by Benes and Lange. *TINS* 2001; 24: 376-77.
18. Schmitz C, Korr H, Perl DP. Advanced use of 3-D methods for counting neurons. *TINS* 2001; 24: 377-78.
19. Benes FM, Lange N. Benes and Lange respond: reconciling theory and practice in cell counting. *TINS* 2001; 24: 378-80.
20. Bartheld CS. Comparison of 2-D and 3-D counting: the need for calibration and common sense. *TINS* 2001; 24:504-6.
21. Bartheld CS. Counting particles in tissue sections: Choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol Histopathol* 2002; 17: 639-48.
22. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. Guildford: Bios Scientific Publishers; 1998. p.69-106.
23. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111: 219-23.
24. Keuer JIH, Vollman-Honsdorf GK, Fuchs E. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Protocols* 2001; 7: 211-21.
25. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.
26. Schmitz C, Dafotakis M, Heinsen H, et al. Use of cryostat sections from snap-frozen nervous tissue for combining stereological estimates with histological, cellular, or molecular analyses on adjacent sections. *J Chem Neuroanat* 2000; 20: 21-9.
27. Hof PR, Schmitz C. Current trends in neurostereology-introduction to the special issue "recent advances in neurostereology". *J Chem Neuroanat* 2000; 20: 3-5.
28. 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.
29. West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *TINS* 1999; 22: 51-61.
30. Hatton WJ, Bartheld CS. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: Calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 1999; 409: 169-86.
31. Andersen BB, Gundersen HJG. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc* 1999; 196: 69-73.
32. Perl DP, Good PF, Bussiere T, Morrison JH, Erwin JM, Hof PR. Practical approaches to stereology in the setting of aging and disease related brain banks. *J Chem Neuroanat* 2000; 20: 7-19.
33. Heinsen H, Rüb U, Bauer M, et al. Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 613-22.
34. Heinsen H, Arzberger t, Schmitz C. Celloidin embedding of human brains-a new, simple and reliable method for producing serial sections of high section thickness. *J Chem. Neuroanat* 2000; 20: 49-59.
35. Nielsen BS, Lund LR, Christensen IJ, et al. A precise and efficient stereological method for determining murine lung metastasis volumes. *Am J Pathol* 2001; 158: 1997-2003.
36. Hanstede JG, Gerrits PO. The effects of embedding in water-soluble plastics on the final dimension of liver sections. *J Microsc* 1983; 131: 79-86.
37. Quester R, Knifka J, Schröder R. Optimization of glycol methacrylate embedding of large specimens in neurological research. Study of rat skull-brain specimens after implantation of polyester meshes. *J Neurosci Methods* 2002; 113: 15-26.
38. Messina A, Sangster CLC, Morrison WA, Galea MP. Requirements for obtaining unbiased estimates of neuronal numbers in frozen sections. *J Neurosci Methods* 2000; 97: 133-37.
39. Benes FM, Lange N. Two dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *TINS* 2001; 24: 15.
40. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone Publishing; 1996. p.59.
41. Skoglund TS, Pascher R, Berthold CH. Aspects of the quantitative analysis of neurons in the cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 1996; 70: 201-10.
42. Bjarkam CR, Pedersen M, Sorensen JC. New strategies for embedding, orientation and sectioning of small brain specimens enable direct correlation to MR-images, brain atlases, or use of unbiased stereology. *J Neurosci Methods*. 2001; 108: 153-59.