

1- استریولوژی (Stereology)

استریو (Stereo) از کلمه یونانی برای یک "شیء هندسی (Geometric object)" مشتق می شود، زیرا آنها صداها یا اشیائی را در فضا دوباره سازی می کنند. استریولوژی که شاخه ای از ریاضی کاربردی است (یک روش نادر علمی کاربردی)، تلاش می کند که خواص اشیاء (از ماهی گرفته تا سلول عصبی) در فضا را دوباره سازی یا برآورد کند. روش های استریولوژیکی در برش بافت یا عضو این امکان را می دهد تا خواص هندسی اشیاء درون برش ها برآورد شود. خواص اشیاء شامل حجم Volume (سه بعد)، سطح Surface (دو بعد)، طول Length (یک بعد)، تعداد Number (بدون بعد) و همچنین شکل و موقعیت فضایی آن می باشند. هر یک از این خواص را می توان توسط روش های استریولوژیکی برآورد کرد. بعلاوه، این علم ارزیابی تغییرات مورفولوژیک در پاتولوژی را نیز ممکن می سازد. این روش ها معمولاً به دو مرحله نمونه گیری (Sampling) و اندازه گیری (Measuring) نیاز دارند که بخش دوم در عمل ساده تر می باشد (Gundersen and Pakkenberg 1997; Royet 1991; Slomianka 2004).

استریولوژی این امکان را فراهم می سازد که از تصاویر دوبعدی یا برش های دوبعدی اطلاعات سه بعدی بدست آورد. به همین دلیل اصول استریولوژی آمارهای احتمالات و هندسی را در نظر می گیرد. (Artacho-Perula and Roldan-Villalobos 1994; Gundersen et al. 1988b; Howard and Reed 1998; Mouton 2002; Rajapkse 2000; Slomianka 2004). باید توجه شود که برآوردهای استریولوژیکی اغلب نسبی (Relative) می باشند. با این وجود، برآوردهای براساس روش های استریولوژیکی که بدون تورش (Unbiased) می باشند همیشه برای برآوردهای مطلق یا تراکمی (Density) ساختمان ها در برش های بافتی ارجح می باشند و با توجه به بدون تورش بودن، دقت سطح بالا، عاری از فرض و کارآیی بالا روش های استریولوژی، دیگر هیچ عذری برای استفاده روش های با تورش قبلی پذیرفته نمی شود (Mayhew and Gundersen 1996; Mouton 2002; Saper 1996).

بیشتر محققین مورفومتری (Morphometry) را روشی کمی دوبعدی در نظر می گیرند که از یک اندازه گیر (Caliper) استفاده می کنند (مثل μm). درمقابل، در استریولوژی از اندازه گیر استفاده نمی شود و در نتیجه برآورد مستقیم انجام نمی دهد، اما از یک سیستم تست مثل نقاط تست یا خطوط تست بر روی یک چارچوب مشخص (یا ناحیه تست) استفاده می شود. مورفومتری طول، محیط، ناحیه را تعیین می کند. استریولوژی تراکم (Density) را برآورد می کند. جالبترین دانسیته ها در حجم می باشند که شامل تراکم یا دانسیته حجمی (V_v)، دانسیته طول (L_v)، دانسیته سطح (S_v) و دانسیته عددی (N_v) می باشند (Mandarim-de-Lacerda 2003). محاسبه مقدار واقعی یک کمیت بطور طبیعی در تحقیق نیاز نیست. یک برآورد (Estimation) و انحراف معیار می تواند نتایج را مقایسه کند (Gundersen and Pakkenberg 1997).

برآوردکننده های استریولوژیکی این امکان را فراهم می کند که میلیونها و حتی تریلیونها شیء را با شمارش تنها کمتر از 200 عدد شیء برآورد کنند. در استریولوژی نیازی به افزایش نمونه نمی باشد (Mouton 2002) (Do more less well).

مطالعات استریولوژیکی نسبت به مطالعات کیفی مزایای علمی بسیار زیادی دارند که عبارتند از: 1) نتایج عددی (Numerical) می باشند (نه subjective)، در نتیجه قابل تولید مجدد و آسانتر در هر زمانی توسط آزمایشگاههای متفاوت می باشند 2) مقایسه بین گروههای مختلف (سنین، گونه ها، اعمال دارو، manipulation و غیره) بسیار آسانتر است، بنابراین، این روش ها مخصوصاً برای تست موقعیتهای مفید می باشند 3) کار خسته کننده همراه با مطالعات کمی در عمل با استراتژی نمونه گیری و با کمک کامپیوتر در استریولوژی کم می شود 4) اساس تئوری اثبات شده استریولوژی روش را قابل پذیرش می کند 5) نیازی به تربیت طولانی مدت محقق وجود ندارد 6) به وسایل گران قیمت نیازی نمی باشد 7) این روش ها بدون تورش (Unbiased) می باشند. 8) کارآ (Efficient) می باشند 9) به هیچ فرضی در مورد شکل، اندازه و موقعیت فضایی شیء در موقع محاسبه پارامترها نیازی ندارد و بعد از برآورد اندازه پارامتر به تصحیح نیازی ندارد (Coggeshall).

and Lekan 1996; Howard and Reed 1998; Mandarim-de-Lacerda 2003; Regeur and Pakkenberg 1989).

مطالعات استریولوژیکی در مقالات بسیار زیاد می باشند. این مقالات در نواحی علوم اعصاب، رشد و تکامل و پاتولوژی فراوانترند (Mandarim-de-Lacerda 2003). یک مطالعه از چهار مجله علوم اعصاب نشان داده که 18٪ همه مقالات و 30٪ که برشهای بافت شناسی بکار برده اند اطلاعات عددی که نشان دهنده تعداد سلول یا سیناپس می باشند را گزارش کرده اند. اگر تمام مجلات بررسی شود و روش های دیگر برآورد پارامترها بررسی شود از این درصد هم بیشتر می شود (Coggeshall and Lekan 1996).

1-2-1 نمونه گیری (Sampling)

از مشخصات بافتها و اعضاء این است که آنها تعداد زیادی ذرات یا اشیاء دارند که اندازه گیری یا شمارش همه آنها وقت گیر یا غیر ممکن می باشد. در بررسی های علمی نمی توان تمام دستگاه، عضو یا ساختمان را بررسی و مطالعه کرد و تنها مطالعه نمونه ای از آن کافی می باشد. این مخصوصاً برای مطالعات میکروسکوپی بسیار صادق می باشد. برای مثال، اگر تمام موادی که تاکنون توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی (Transmission electron microscopy) در جهان بررسی شده اند جمع آوری شود، کمتر از یک سانتی متر مکعب می باشد درحالیکه نتیجه گیری های زیادی از این مطالعات عنوان شده است (Howard and Reed 1998).

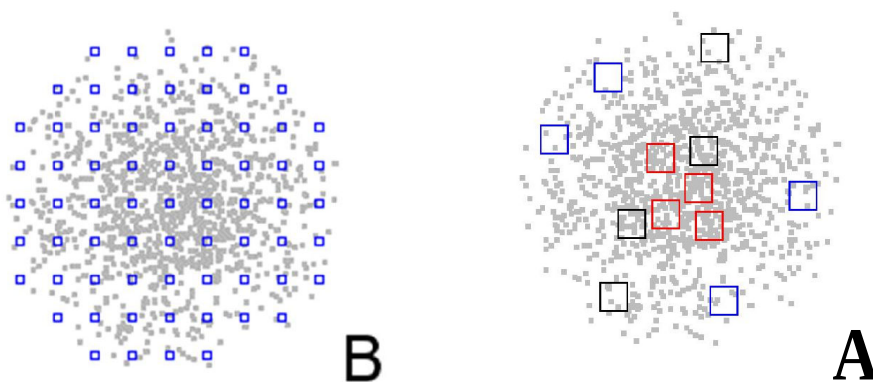
تکنیک های نمونه گیری غیر استریولوژیک ممکن است منجر به تورش (Bias) شود، چون اشیاء بزرگ مثل اجسام نوری ممکن است به چند قسمت در برش ها تقسیم شود و در هر برش به عنوان یک شیء شمارش شود (Tramontin et al. 1998). استریولوژی روش پذیرفته شده بدون تورش

برای جمع آوری اطلاعات در مورد تعداد، طول، ناحیه سطح و حجم نمونه می باشد. این روش بدون تورش می باشد چون هیچ فرضی در مورد ساختمان مورد مطالعه صورت نمی گیرد. تولید نمونه اولین مرحله بیشتر مطالعات با روش های استریولوژیکی می باشد. نمونه گیری یعنی اینکه گرفتن قسمت های کوچکی از کل یا تمامیت یک ساختمان یا عضو بطوری که نتایج بدست آمده از نمونه برای کل عضو معتبر باشد. در این مرحله است که ممکن است خطاهای نمونه گیری رخ دهد و برآورد استریولوژیکی دقیق را غیرممکن می سازد. برای اینکه نمونه نماینده کاملی از ساختمان مورد مطالعه باشد، باید به تمام ساختمان یا جمعیت دسترسی داشت و مرز ساختمان با ساختمان های مجاور مشخص باشد. همچنین تمام قسمت های ساختمان به یک اندازه شانس انتخاب داشته باشد. برای این منظور باید نمونه گیری تصادفی باشد. نمونه گیری تصادفی تضمین می کند که نمونه گیری از نظر تئوری بدون تورش باشد. نمونه گیری تصادفی باید در تمام سطوح نمونه گیری در استریولوژی انجام شود که شامل انتخاب فرد یا حیوان، بلوکها، برش ها، میدانهای دید و اندازه گیری ها می باشند. نمونه گیری تصادفی به دو صورت تصادفی ساده و تصادفی سیستماتیک یکنواخت می باشد (Gundersen 1986; Mouton 2002; Slomianka 2004).

در نمونه گیری تصادفی ساده (Simple random sampling) یا نمونه گیری تصادفی مستقل (Independent random sampling) وضعیت هر جز یا ذره در نمونه یک انتخاب مستقلی می باشد. در این نوع نمونه گیری یک جا در نمونه بطور تصادفی انتخاب می شود. انتخاب دوم بدون توجه به انتخاب اول به صورت تصادفی انتخاب می گردد. این کار ادامه می یابد تا تعداد نمونه کافی بدست آید. در این نوع نمونه گیری، اگر چندبار نمونه گیری در همان برش ها و بافت ها تکرار شود، این احتمال وجود دارد که برآوردهای جداگانه خیلی متفاوت از یکدیگر باشند، اما میانگین برآوردها به اندازه واقعی ساختمان نزدیک می باشد (شکل 1-1A). اگرچه این نوع نمونه گیری از نظر تئوری بدون تورش می باشد ولی دقت بالایی ندارد و کارآ نمی باشد. بعلاوه گاهی چارچوب های مورد

استفاده ممکن است همپوشانی داشته باشند و همچنین ممکن است ناحیه خاصی از ساختمان بیش از نواحی دیگر انتخاب شود. البته برای افزایش دقت باید تعداد نمونه ها را افزایش داد که باعث صرف وقت زیاد می شود (Mayhew 1991; Royet 1991; Slomianka 2004)

در نمونه گیری تصادفی سیستماتیک یکنواخت (Uniform random systematic sampling) (نمونه گیری با یک اولویت از پیش تعیین شده با وضعیت تصادفی در اولین فاصله یا دوره) بعد از انتخاب نقطه شروع بطور تصادفی، نمونه ها در فواصل منظم (سیستماتیک یکنواخت) انتخاب می شوند. نقطه شروع تصادفی به معنی این است که همه نواحی ساختمان شانس مساوی برای نمونه گیری دارند و بدون تورش می باشد (شکل 1-1B). این نوع نمونه گیری برای ساختمانهای نامنظم، مخصوصاً مغز و تقسیمات آن مناسب می باشد. این نوع نمونه گیری ضریب خطای کمتری از نمونه گیری تصادفی مستقل می دهد و بنابراین کارآتر و دقیقتر و اجرای آن آسانتر می باشد. مشخص شده که چهل نقطه تصادفی سیستماتیک که با شیء برخورد می کنند، 25 بار کارآتر از همان تعداد نقاط تصادفی ساده می باشد. در بسیاری از موارد شمارش 100-200 مورد در حیوان بیشتر نیاز نمی باشد. به دلایل آماری تعداد حیوان نیز حداقل 5 مورد در هر گروه نیاز می باشد (Gadeberg et al. 1999; Gundersen and Jensen 1987; Mattefeldt 1989; Mayhew 1991; Slomianka 2004).



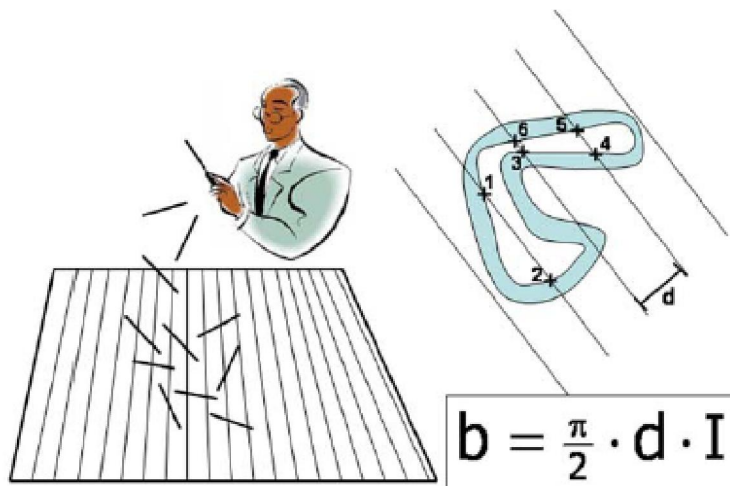
شکل 1-1 (A) نمونه گیری تصادفی ساده (B) نمونه گیری تصادفی سیستماتیک یکنواخت

2-1-2 تاریخچه استریولوژی و برآورد پارامترها

6000 سال پیش در مصر، اولین بار پارامترهای حجم، سطح و تعداد را بکار بردند. 1000 سال قبل از میلاد، مصریان با استفاده از همین قوانین هندسی اهرام مصر را ساختند. در حقیقت مصریها علم هندسه را اختراع و یونانی ها بکار بردند. در 330 تا 275 قبل از میلاد، اقلیدس (Euclid) با روش تعیین حجم کمک زیادی به هندسه کرد. ارشمیدس (287 تا 212 قبل از میلاد) نیز اندازه گیری حجم با استفاده از روش جابجایی مایع (Liquid displacement) را ارائه کرد (Mayhew 1991; Mouton 2002).

از قرن پانزدهم میلادی تا به حال تعدادی از روش های با بنیان نظری ایجاد شده تا برآوردهای بدون تورشی از چهار پارامتر اولیه استریولوژیکی را فراهم کنند. این چهار پارامتر شامل تعداد (Number, N)، حجم (Volume, V)، ناحیه سطح (Surface area, S) و طول (Length, L) می باشند. در سال 1635، Buonaventura Cavalieri ریاضیدان ایتالیایی (1598-1647) نشان داد که حجم متوسط یک جمعیت از اشیاء با شکل غیرکلاسیک را می توان به یک روش از نظرتئوری بدون تورش از مجموعه نواحی بریده شده از شئی بدست آورد. روش کاوالیری برآورد مورفولوژیکی حجم کلی هرگونه جمعیتی از اشیاء را از روی یک نمونه گیری تصادفی سیستماتیک از برشها از یک شئی را امکان پذیر می کند. در سال 1777 میلادی، متخصص علوم طبیعی، George Lecrec Buffon عضو آکادمی سلطنتی علوم در پاریس با مسئله سوزن مطرح شد. او علاقه وافری به قوانین احتمالات

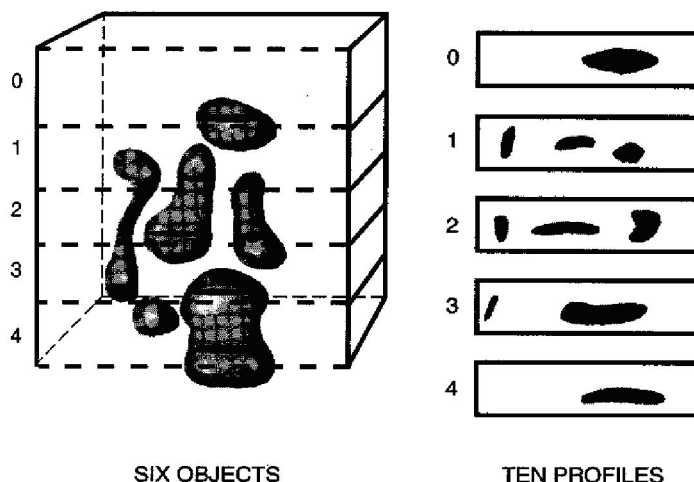
داشت. مسئله سوزن او نشان داد که یک سوزن در موقع پرتاب بطور تصادفی بر روی خطوط گرید برخورد می کنند که احتمال برخورد سوزن با گرید مستقیماً با طول سوزن متناسب می باشد. این نظریه سوزن اساس تئوری برای برآورد طول کل و ناحیه سطح کل اشیاء با شکل غیر کلاسیک را فراهم کرد (شکل 1-2)



شکل 1-2 مسئله سوزن بوفون و تعیین محیط (b) براساس فاصله خط (در یک سیستم تست) و تعداد تقاطع مرز ساختمان با خطوط (I) (Mandarin-de-Lacerada 2003).

در سال 1847، مهندس معدن و زمین شناس فرانسوی Auguste Delesse نشان داد که ناحیه سطح مقطع (Profile area) یک برش تصادفی از جمعیتی از اشیاء متناسب با اندازه مورد انتظار حجم اشیاء می باشد. اصل او اساسی برای برآورد حجم اشیاء با شکل غیر کلاسیک براساس نواحی سطح مقطعشان بود. اولین روش شناخته شده که شمارش را بدون نیاز به تصحیح انجام داد توسط Carlton and Miller (1895) برای شمارش گلومرول های کلیه ارائه گردید که بعداً توسط Sterio در سال 1984 به عنوان روش Disector معرفی شد. در سال 1925، ریاضیدان سوئدی SD Wicksell مسئله جسمک (Corpuscle problem) را مطرح کرد تا توضیح دهد که چرا

برآوردهای صحیح از تعداد اشیاء را نمی توان از شمارش آنها در سطح مقطع روی یک برش نازک بافت شناسی بدست آورد (شکل 3-1).



شکل 3-1 در موقع شمارش سطح مقطع اشیاء سه بعدی در برش ها تعداد شمارش شده (سمت راست) با تعداد واقعی (سمت چپ) تفاوت دارد (Mouton 2002)

Abercrombie در سال 1946 برای شمارش اشیاء روشی را ارائه داد که از روش های قبلی دقیقتر بود و تا مدتها به عنوان روش انتخابی شمارش استفاده می شد. در این روش اشیاء در سطح مقطع برشها شمارش می شد و سپس شمارش بدست آمده با یک فرمول تصحیح می شد. تعداد نهایی اشیاء بعد از محاسبه ضخامت برش و میانگین قطر ذرات مورد شمارش در طول محور عمود بر سطح برش از فرمول زیر محاسبه می گردید:

$$N_{fin} = N_{prof} \times \frac{T}{T + h}$$

که N_{fin} تعداد نهایی اشیاء، N_{prof} تعداد اشیاء شمارش شده در سطح مقطع ها، T ضخامت برش و h میانگین قطر ذرات مورد شمارش بود. در سال 1984، DC Sterio اصل دایسکتور (Disector principle)، اولین روش بدون تورش برای برآورد تعداد واقعی اشیاء در حجم مشخصی از بافت،

تراکم عددی (N_v , Numerical density)، را منتشر کرد. DC Sterio یک استریولوژیست دانمارکی است که تشابه ظاهری بین اسم او و استریولوژی وجود دارد. روش دایسکتور که در اول طراحی شد به دو سطح مجازی، یک جفت دایسکتور ("disector-pair")، یک چارچوب شمارش (Frame) بدون تورش و قوانین بدون تورش شمارش HJG Gundersen برای شمارش تعداد اشیاء در واحد حجم نیاز داشت. این روش به فرض در مورد اندازه، شکل و موقعیت فضایی اشیاء مورد نظر نیاز نداشت. قبل از معرفی دایسکتور توسط Sterio تکنیک های موجود برای شمارش براساس ابزارهای دوبعدی، یعنی برش ها بود (Guilery 1999; Gadeberg et al. 1999; Andersen 1985; Mary 2004; Mayhaw and Gundersen 1996; Kalisnik et al. 2001; 2002).
واژه استریولوژی اولین بار در سال 1961 ارائه گردید. در این سال انجمن بین المللی استریولوژی بنیان نهاده شد. Elias Haug و چند نفر دیگر در نزدیک فرایبورگ آلمان با هم ملاقات کردند و نام استریولوژی را ابداع کردند (Royet 1991).

3-2-1 ابزارهای استریولوژی

ابزارها (Probes) شکلهای هندسی می باشند که در مورد خواص هندسی اشیائی که در میکروسکوپ مشاهده می شوند اطلاعاتی بدست می آورند. این ابزارها در حقیقت سیستم های تست می باشند که بدون بعد تا سه بعد می باشند که شامل نقاط (Points) بدون بعد، خطوط (Lines) با یک بعد، سطوح (Planes) با دو بعد و حجم ها (Volumes) با سه بعد می باشند. برای برآورد پارامترها، این ابزارهای تست به درون شیء مورد نظر پرتاب می شوند. برای برآورد پارامتر خاص از ابزار خاص استریولوژی براساس نیاز استفاده می شود. باید توجه کرد که مجموع ابعاد شیء و ابعاد ابزار باید حداقل سه (ابعاد فضا) باشد (جدول 1-1). ابزار نقاط (بدون بعد) برای اندازه گیری حجم (Volume) (سه بعدی)، خطوط (یک بعدی) برای اندازه گیری ناحیه سطح (Surface) (دوبعدی)، نواحی یا سطوح (دوبعدی) برای اندازه گیری طول (Length) (یک بعدی) و حجم ها (سه بعدی) برای اندازه

گیری تعداد (Number) (بدون بعد) بکار برده می شوند. همه روش های استریولوژی نیاز به درجاتی از تصادفی بودن برخورد ابزارهای استریولوژی و شی دارد. این تصادفی بودن یا باید برای ابزار یا شی یا هر دو باشد. ولی تصادفی بودن یکی کافی می باشد. باید در مورد وضعیت (Position) (برای همه ابزارها) و موقعیت فضایی (Orientation) (برای خطوط و سطوح) باشد. تصادفی کامل به عنوان ایزوتروپی (Isotropy) شناخته می شود (Cruz-Orive 1987; Glaser and Glaser 2000; Guillary and Herrup 1997; Gundersen and Pakkenberg 1997; Slomianka 2004).

جدول 1-1. چهار ابزار استریولوژی و مشخصه های هندسی (پارامتر) که آنها در اشیاء سه بعدی برآورد می کنند

ابزار استریولوژیکی (Probe)			مشخصه های هندسی (پارامتر) برآوردشونده شی		
نام ابزار	اندازه گیری	تعداد بعد	نام	اندازه گیری	تعداد بعد
نقطه (Point)	تعداد	0	حجم	حجم	3
خط (Line)	طول (Length)	1	سطح (Surface)	ناحیه (Area)	2
سطح (Plane)	ناحیه	2	منحنی (Curve)	طول	1
دایسکتور (Disector)	حجم	3	تعداد (Cardinality)	تعداد	0

اصول استریولوژی را از نظر برآوردکننده ها نیز به دو طبقه تقسیم می کنند (1) برآوردکننده های کلاسیک جهانی (Classical global estimators) که براساس نمونه گیری یکنواخت در فضای مرجع (Reference space) و احتمال برخورد ثابت می باشند (مثل برآوردکننده Cavalieri و گرید فضایی) (2) برآوردکننده های موضعی (Local estimators) که براساس نمونه گیری یکنواخت سلول های منفرد و نمونه گیری غیر یکنواخت با احتمال نمونه گیری مشخص در سلول های نمونه گیری شده می باشد (مثل برآوردکننده های Nucleator و Surface rotator) (Tandrup et al. 1997).

4-2-1 انواع روش های استریولوژی

استریولوژی بردونوع می باشد: 1) استریولوژی برپایه فرض یا مدل Assumption-dependent (2 or Model based stereology) استریولوژی برپایه طراحی یا عاری از فرض (Designed-based or Assumption-free stereology)

در استریولوژی برپایه فرض که روش قدیمی می باشد، مدل ساختمان تصادفی و ابزارها ثابت می باشند. این روش ها معمولاً به تصحیح نیاز دارند (مثل روش Abercrombie). دقت روش های براساس فرض به دقت فرضیه درمورد اندازه، شکل و موقعیت بستگی دارد. این روش ها بدون تورش نمی باشند.

در استریولوژی برپایه طراحی بر روی طراحی نمونه گیری تکیه دارد. بطوری که نمونه ها (یعنی برشها) با احتمال تصادفی یکنواخت و موقعیت فضایی ایزوتروپیک گرفته می شوند. در استریولوژی برپایه طراحی، ابزارها یا پروتوکلهای مستقل از شکل، اندازه، موقعیت فضایی و توزیع اشیاء مورد مطالعه می باشد. ذرات مورد نظر مانند سلول ها یا اجزاء سلولی یا ذرات خاص دیگر را که کوچک، بزرگ، نازک، گرد، توده و حتی پراکنده باشند را می توان با استریولوژی برپایه طراحی اندازه گرفت. در این روش کنترل کاملی بر روی کاربر وجود دارد. انتخاب های فردی حذف می شود. اصل زیربنای استریولوژی برپایه طراحی نمونه گیری تصادفی سیستماتیک می باشد. محقق ابزاری متناسب با کمیت مورد اندازه گیری انتخاب می کند. تنها تصمیم برای کاربر این است که آیا ساختمان در تمرکز یا فوکوس (Focus) میکروسکوپ می باشد و یا نقاط، خطوط و غیره با ساختمان برخورد دارند یا خیر. در موقع اجرای آنالیزهای استریولوژیکی همه اطلاعات تحت کنترل مستقیم کاربر می باشد. بررسی نمونه های بافتی بر روی مانیتور کامپیوتر از طریق یک دوربین ویدئویی یا مستقیماً از طریق عدسی های چشمی میکروسکوپ (Eyepieces) انجام می شود. روش مستقیم درجات بالاتری از تفکیک (Resolution) نوری و صحت رنگی در مقایسه با دوربین ویدئویی فراهم می کند (Glaser and Glaser 2000; Guillary and Herrup 1997; Hatton and Von

Bartheld 1999; Lowry et al. 2001; Mayhew and Gundersen 1996; West 1999a).

بیشتر پارامترهای استریولوژی که به صورت میانگین یا کمیت‌های کلی مرتبط می‌باشند (حجم، سطح، تعداد و طول)، به عنوان خواص یا استریولوژی ردیف اول (First-order stereology) شناخته می‌شوند. استریولوژی ردیف دوم (Second-order stereology) به موازات استریولوژی ردیف اول توسعه یافته‌اند که با توصیف‌های آماری توزیع فضایی جنبه‌های هندسی مرتبط می‌باشند. مثلاً دو سیستم دانسیته سطحی مشابهی دارند اما از نظر ترتیب فضایی سطح کاملاً متفاوت می‌باشند. استریولوژی ردیف دوم برای مطالعات هیستوپاتولوژی مواد بیوپسی مفید می‌باشند (Howard and Reed 1998a; Royet 1991).

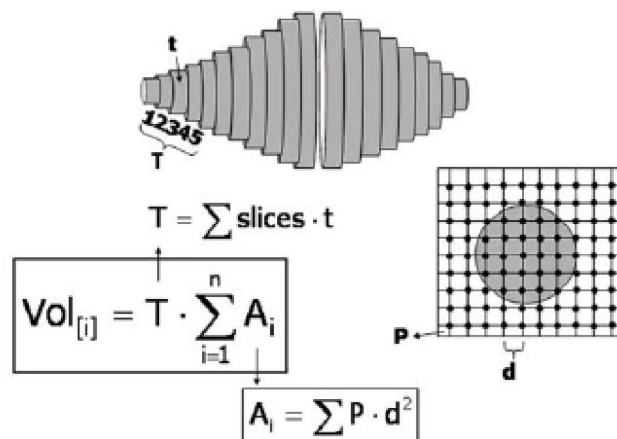
5-2-1 روش‌های برآورد حجم

روش‌های اندازه‌گیری حجم عبارتند از: 1) روش قدیمی جابجایی مایع (Fluid displacement) ارشمیدس 2) با دانستن وزن و سنگینی اختصاصی (Specific gravity) 3) روش بسیار مستقیم، آسان و بدون تورش استریولوژیکی (اصل کاوالیری). با هیچ کدام از دو روش اول نمی‌توان حجم بافت‌های زنده یا حجم بخشی از بافت را برآورد کرد (مثل حجم مخچه در مغز) (Howard and Reed 1998a; Mandarim-de-Lacerda 2003; Mayhw 1991).

1-2-5-1 روش کاوالیری (Cavalieri method)

در این روش یک سری کامل از برش‌های موازی با ضخامت مشخص (t) و با فاصله ثابت (d) از شئی تهیه می‌شود. برای روش کاوالیری اولین برش باید در فاصله صفر و d تصادفی یکنواخت انتخاب شود (شکل 4-1). این باعث می‌شود که بدون تورش بودن (Unbiasedness) تضمین شود. البته جهت برش تورش را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد اما واریانس خطای (Error variance)

آن را تغییر می دهد. درمقابل، نیازی نیست که نواحی برش با دقت بالا اندازه گیری شود. همچنین اگر فاصله برشها مساوی نباشد، برآورد حجم بدون تورش می باشد. ولی باید متوسط ضخامت برشها مشخص باشد (Gundersen and Jensen 1987; Royet 1991).

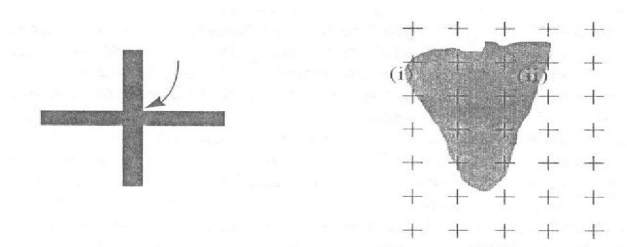


شکل 1-4 اصل کاوالیری و برآورد حجم عضو. عضو بطور متوالی با ضخامت یکنواخت (t) بریده می شود. برای مثال از هر 5 برش یک برش ($T=5t$) برای تعیین ناحیه (A_i) (مثلاً با روش شمارش نقطه ای: در یک سیستم تست چهارگوش ناحیه نقطه به عنوان مربع فاصله بین نقاط، d ، محاسبه می شود) (Mandarim-de-Lacerada 2003).

در تقریباً همه موارد عملی این نواحی با دقت مناسب با استفاده از یک گرید نقطه ای تصادفی با ناحیه همراه معین نقطه (a/p) برآورد می گردد (روش شمارش نقطه ای Point counting method). برای برآورد حجم براساس اصل کاوالیری و روش شمارش نقطه ای یک گرید نقطه ای (ابزار یا سیستم نقطه ای) با فاصله معین و مساوی بطور تصادفی بر روی برش قرار داده می شود و تعداد نقاطی که با ناحیه سطح برش برخورد می کنند شمارش می شوند (شکل 5-1). برای شمارش نقطه سمت راست و بالای + را در نظر می گیرند (شکل 5-1). برای بدست آوردن حجم براساس اصل کاوالیری و روش شمارش نقطه ای از فرمول زیر استفاده می شود:

$$V = \sum P \times a(p) \times d$$

که در آن V حجم (حجم مرجع)، $\sum P$ مجموع نقاطی که با سطح برش برخورد می کنند، $a(p)$ ناحیه همراه هر نقطه در سطح بافت و d فاصله بین برشها می باشند (Gundersen and Pakkenberg 1997; Harasty et al. 1999; Howard and Reed 1998a; Ingham et al. 1998; Leranthe et al. 2000; Wadhwa 2003).



شکل 1-5 برای برآورد ناحیه با استفاده از یک گریدی از علامت مثبت (+) دارای نقطه بدون بعد همراه با علامت استفاده می شود. در این مورد گوشه سمت راست نقطه مثبت به عنوان نقطه مورد شمارش شناخته می شود (سمت چپ). در سمت راست قانون شمارش را نشان می دهد. هر دو مثبتی که در اینجا مشخص شده (i و ii) بطور کامل درون یا بیرون بافت نیستند. مثبت (i) چون نقطه همراه اش درون بافت می باشد در شمارش گنجانده می شود ولی چون نقطه همراه مثبت (ii) درون بافت نمی باشد، شمارش نمی شود (Howard and Reed 1998a).

مشخص شده که هر شیء با هر شکل سه بعدی پیچیده تنها به شمارش 100-200 نقطه در 10-15 برش از کل شیء نیاز دارد تا برآورد ضریب خطا (Coefficient of error, CE) بین 5-10٪ باشد. برای اشیاء بیضی شکل یا تقریباً بیضی این تعداد نقاط و برش حتی کمتر می شود. روش کواگیری از آنچه معمولاً انتظار می رود دقیقتر است. حتی با 5 تا 7 برش سیستماتیک ضریب خطا کمتر از 5٪

برای اشیائی با اشکال مختلف بدست می آید. در عمل برآوردکننده کاوالیری را می توان براساس اشیاء با اندازه متغیر از یک سلول منفرد، اعضاء کوچک مثل کلیه های جنین تا اعضاء بزرگی مثل مغز انسان و حتی کل بدن انسان بالغ بکار برد. برآوردکننده کاوالیری شاید مستقیم ترین و آسان ترین روش برآورد حجم برپایه طراحی می باشد (Blomer et al. 1998; Harasty et al. 1999; Howard and Reed 1998a; Michel and Cruz-Orive 1988; Pakkenberg and Gundersen 1988; Rodrigues et al. 2003; Simic et al. 1997).

برای جلوگیری از اشتباه در شمارش و Overprojection، برش ها باید نازک باشد. ضخامت برش براساس اندازه شیء می باشد. برای برآورد حجم وضعیت نقاط در فضا مهم نمی باشد (Slomianka 2004).

اصل کاوالیری و روش شمارش نقطه ای برای برآورد حجم نسبت به سایر روش ها مزایای بسیار زیادی دارد که چند مورد آن عبارتند از:

- 1) کارآیی آن بالاست و بدون توجه به شکل عضو تورش نیز ندارد. روش آنقدر کارآ می باشد که حتی 3 تا 4 برش که بر روی آنها 20 تا 40 نقطه شمارش شود می تواند برآوردی نزدیک به روش برآورد جابجایی مایع صورت دهد. همچنین در کمتر از 15 دقیقه می توان حجم کل قشر مغز را برآورد کرد
- 2) مثل روش جابجایی مایع نیازی به مراقب پرشدن حفره های توخالی عضوی مثل ریه وجود ندارد
- 3) کاوالیری تنها روش انتخابی برای برآورد حجم اعضاء یا قسمتی از اعضاء می باشد که درون بافتهای دیگر می باشند (مثل برآورد حجم هسته های قاعده ای درون مغز). بطور کلی این روش مستقل از شکل شیء می باشد (4) برشهای کاوالیری براحتی و باسانی بدست می آیند (5) برآوردهای براساس اصل کاوالیری نزدیکترین برآورد به مقدار واقعی و بدون تورش ترین و صحیح ترین برآورد می باشند
- 6) اصل کاوالیری قابل کاربرد برای روش های غیرتخریبی برشهای رادیولوژیکی مانند Computer tomography scan (CT Scan) و Magnetic resonance imaging (MRI) می باشد (Allin et al. 2001; Brown et al. 2002; Espejo et al. 2001; Gonzalez-Lima et al. 2001; Gould et al. 1998; Hartman et al. 2002; Keene et al. 2002; Najafian

et al. 2002; Raballo et al. 2000; Riihioja et al. 1999; Tandrup et al. 1997; Yan et al. 2003).

روش شمارش نقطه ای اندازه گیری حجم بر استفاده از آنالیز اتوماتیک تصویر ترجیح داده می شود. چون دقیق بوده و به آسانی انجام می شود و نیاز فراوانی برای پردازش بافت ندارد (Braendgaard et al. 1990; Regeur and Pakkenberg 1989).

2-5-2-1 حجم مرجع (Reference volume)

فضای مرجع یا حجم رفرنس به منطقه آناتومیکی اشاره می کند که اشیاء بیولوژیکی مورد نظر درون بافت قرار گرفته اند. مثلاً اگر قصد شمارش نوروں های قشر مخ می باشد، قشر مخ فضای رفرنس می باشد. واحد اساسی نمونه گیری در استریولوژی فضای رفرنس می باشد. در مطالعات بیولوژیکی، فضای رفرنس یک بافت از نظر آناتومیکی مشخص می باشد که یک عمل فیزیولوژیکی مهمی را کنترل می کند. مرزهای فضای رفرنس توسط خصوصیات بافت مورد نظر محقق تعیین می گردد. مشخصات فضای رفرنس از نظر تئوری عبارتند از:

1) فضای رفرنس باید به وضوح مشخص و تعریف شده باشد 2) فضای رفرنس باید دارای بافت مورد نظر باشد 3) 100٪ فضای رفرنس باید در دسترس باشد. البته این بدان معنی نیست که تمام فضای رفرنس باید بررسی گردد، بلکه باید همه قسمتها در دسترس باشد تا به برآورد پارامتر کمک کند و همه قسمتها شانس انتخاب یکنواخت داشته باشند (Mouton 2002).

بیشتر روش های مورد استفاده در استریولوژی برآوردهایی از مقدار یک جنبه در واحد حجم رفرنس (Reference volume) یعنی تراکم یا دانسیته (Density) را می سنجند که شامل تراکم حجمی (Volume density, V_v) یا نسبت حجم ماده مورد علاقه در حجم رفرنس، تراکم سطحی (Surface density, S_v) یا ناحیه سطح (Interface) در واحد حجم رفرنس، تراکم طول (Length density, L_v) یا طول جنبه خطی در واحد حجم رفرنس و تراکم عددی (Numerical

(density, N_v) یا تعداد اشیاء ناپیوسته در واحد حجم رفرنس می باشند. باید توجه داشت که همه این تراکم ها کمیت های نسبی (Ratio quantities) می باشند و تنها هنگامی قابل تفسیر می باشند که با برآورد حجم رفرنس ترکیب شوند تا برآوردی از کمیت کل بدست آید (Braendgaard and Gundersen 1986; Gundersen et al. 1988b; Hunziker and Cruz-Orive 1986).

در سیستم های بیولوژیکی تعریف فضای رفرنس (Reference space) مطلقاً قطعی می باشد و باید به موجود مرتبط باشد. در بیولوژی کمیت های کلی باید گزارش شود. اگر نتایج به عنوان کمیت کلی گزارش شود، توسط عامه مردم درک می شود. مثلاً اگر موشهای درمان شده با ماده Z در طی تکامل جنینی شان 12 میلیون سلول عصبی در نئوکورتکس مغزشان دارند درحالیکه موشهای درمان نشده 24 میلیون دارند به آسانی مشاهده می شود که ماده Z اثر منفی معنی داری دارد. توجه شود که آنچه در این مثال گزارش شده، کمیت کلی می باشد. اگر نتایج به صورت تراکم عددی یعنی تعداد سلول عصبی در mm^3 گزارش شده بود، آنگاه سطح بالاتری از دانش تخصصی مورد نیاز است تا اطلاعات را تفسیر کند. بعلاوه، اطلاعات ناقص بوده و می توان چندین تفسیر انجام داد. فرض کنید که دو گروه موش ذکر شده تراکم عددی برابری داشته باشند اما حجم قشر در موشهای درمان شده نصف گروه کنترل بود. از مشاهده تراکم عددی سلول های عصبی به تنهایی، حقیقتی که 50٪ کاهش در تعداد کل سلول عصبی در گروه درمان شده وجود دارد بدست نمی آید. این برای تمام همه برآورد کننده های استریولوژیکی تراکم ها صدق می کند. با دانستن اندازه حجم رفرنس است که طبیعت هر واریاسیون (یا کاهش واریاسیون) را می توان کاملاً درک کرد. این پدیده را دام رفرنس (Reference trap) می نامند (Braendgaard and Gundersen 1986).

6-2-1 روش برآورد تراکم عددی و تعداد کل اشیاء

رایجترین پارامتر مورد علاقه بیولوژیست ها تعداد می باشد (Mouton 2002). تعداد ذرات که بدون بعد می باشد، ساده ترین همه پارامترهای استریولوژیکی می باشد، اما به علت بعضی دلایل برآورد تعداد مشکل ترین مسئله استریولوژی بوده است و فکر اکثر استریولوژیست ها از Wicksell در 1923 به این طرف را مشغول کرده است (Gundersen 1986). برآورد تعداد با حجم ها برعکس برآورد حجم با نقاط می باشد اما کمی پیچیده تر می باشد. برای شمارش باید بعضی چیزها را در شیء مشخص کرد که نسبت عددی ثابتی به شیء دارند و بتوان به راحتی آنها را در شیء مشخص کرد (Slomianka 2004).

در روش های قدیمی شمارش، تعداد ذرات غیرمستقیم از اندازه گیری های شمارش بر روی ابزارهای نمونه گیری یک یا دوبعدی (خطی یا سطحی) برآورد می شد. لیکن، بر روی برشها (یا خطوط یا نقاط نمونه گیری) احتمال برخورد با Intercept متناسب با اندازه اش می باشد. اگر ذرات را در سطح مقطع شمرده شود، ذرات بلندتر با احتمال بیشتر مشاهده و شمرده می شوند (Oversampling) (شکل 1-3). این روش با تورش همراه است. در روش های شمارش دوبعدی، تأثیر پتانسیل اندازه سلول بر روی تراکم سلول ها باید توسط تصحیح ریاضی استاندارد جبران شود (مثل تصحیح (Abercrombie)، اگرچه بعضی محققین معتقدند که این تصحیح ناکافی می باشد (Benes et al. 2001; Royet 1991; Simic et al. 1997; Tomori et al. 2001; West and Gundersen 1990).

برای حل این مسئله و چون تعداد بعد ندارد، از ابزارهای سه بعدی مثل دایسکتور فیزیکی یا اوپتیکال (Physical or Optical disector) و مکعب نمونه گیری بدون تورش استفاده می شود (Mouton 2002; Tomori et al. 2001).

لازم به ذکر است که هیچ روشی وجود ندارد که بهترین روش شمارش ذرات در همه زمان ها و مکانها باشد. بلکه مناسبترین روش برای هر مسئله خاص بستگی به سطح صحت مورد نیاز، طبیعت ماده

مورد مطالعه و نوع شیء مورد شمارش دارد. برای مثال برای شمارش گلومرول های کلیه یا تعداد سیناپس ها نمی توان از روش ساده و کار آمد دایسکتور اوپتیکال استفاده کرد (Guillary 2002).

1-2-6-1 تراکم عددی (Numerical density)

تراکم یا دانسیته عددی (N_V , Numerical density)، تعداد اشیاء در واحد فضای رفرنس (ناحیه یا حجم) می باشد (Mendes-Handagama and Ewin 1990; Mouton 2002). تعداد شیء در واحد حجم، N_V ، یک کمیت مورفولوژیکی خیلی اصولی مرتبط با یک ساختمان سه بعدی می باشد، و آن احتمالاً یکی از مشکل ترین برآوردها نیز می باشد (Gundersen 1977). تراکم عددی یک برآوردکننده نسبی می باشد چون تراکم عددی نسبت صورت (تعداد) و مخرج (ناحیه یا حجم) می باشد. مانند همه نسبت ها، برآورد تراکم تحت تأثیر واریاسیون هردو پارامتر قرار می گیرد. به این دلیل، برآوردهای تراکم، برآوردهای تعداد اشیاء در یک فضای رفرنس معین را به اشتباه می اندازد. واحدهای برآوردکننده تراکم غیر مستقیم تر از تعداد مطلق می باشند. تعداد کل یک پارامتر بدون بعد می باشد و واحدی ندارد. تراکم اطلاعات مبهمی درباره تغییرات در پارامترهای ردیف اول استریولوژی دارند. برآوردهای تراکم ممکن است در نتیجه تغییرات در تعداد اشیاء یا تغییرات در فضای رفرنس یا هردو تغییر کنند. تفسیر برآورد کننده های تراکم به فرض هایی در مورد تغییرات در فضای رفرنس نیاز دارد. یک برآورد تراکمی در صورتی معتبر است که فرض شود تنها پارامتر تحت تأثیر تراکم می باشد و فضای رفرنس تغییر نمی کند. آیا اتومبیلی که با سرعت 75 کیلومتر در ساعت حرکت می کند سریعتر از اتومبیلی که با 50 کیلومتر در ساعت حرکت می کند مسافرت می کند؟ پاسخ بلی است با فرض براین که اتومبیل آهسته تر برای 10 ساعت در مقابل 3 ساعت اتومبیل تند حرکت نکند. برای توضیحات بیشتر به مبحث فضای رفرنس در بالا مراجعه شود (Mouton 2002).

2-6-1 دایسکتور (Disector)

با اینکه تعداد بعد ندارد، برای مشخص کردن تعداد سلول در بافت باید از ابزار سه بعدی استفاده کرد. دایسکتور یک ابزار (Probe) سه بعدی برای شمارش تعداد اشیاء (سلول) می باشد، با این امکان که تحت تأثیر اندازه، شکل یا موقعیت فضایی اشیاء قرار نمی گیرد. استقلال برآورد بدون تورش و مستقیم تعداد، یعنی شمارش، و موقعیت فضایی (Orientation) در نتیجه این حقیقت ساده است که یک اندازه گیری بدون بعد نمی تواند موقعیت فضایی داشته باشد. مانند تعداد، برآورد حجم مستقل از موقعیت فضایی است: حجم سه بعدی، همه سه بعد را بکار می برد و بعدی برای موقعیت فضایی باقی نمی ماند. اصل دایسکتور اولین روش از نظر تئوری بدون تورش برای برآورد تعداد کل اشیاء در واحد حجم بر روی برش های بافتی می باشد که توسط Sterio (1984) ارائه گردید. با رعایت قوانین شمارش، روش دایسکتور برآورد تعداد کل سلول ها را بدون مدل های فرضی یا عوامل تصحیح (Correction factors) امکان پذیر می سازد (Gundersen 1986; Guillary and Herrup 1988; West et al. 1988; Mouton 2002; Korbo et al. 1990; 1997). با روش دایسکتور ذرات تنها یک بار شمارش می شوند. این بدان معنی است که چنان شمارشی یک برآورد نخواهد بود، بلکه از نظر ریاضی آن یک عینیت (Identity) و جواب واقعی می باشد. بنابراین، این روش ذاتاً عاری از تورش سیستماتیک می باشد. درحقیقت دایسکتور یک روش دقیق برای شمارش تعداد دفعات یک اسکن (Scan) پیوسته از برخورد ذرات برای اولین بار می باشد (یعنی آن در اسکن از بالا به پایین دایسکتور بالای ذره را می شمرد) (Howard and Reed 1998a; Mouton 2002).

دایسکتور در فرم ساده اش از یک جفت (Pair) برش متوالی (Serial) با فاصله معین (h) (بطور تیپیک یک سوم یا یک چهارم قطر اشیاء مورد شمارش) تشکیل می شود. به همین دلیل به عنوان Disector (Di sector) به معنی دو برش شناخته می شود که ذرات را به طریق وابسته به تعداد نمونه گیری می کند (West 1999a). در این روش برای اولین بار اثر حاشیه برش (Edge effect) حذف می گردد. همچنین توسط Overprojection و Truncation تحت تأثیر قرار نمی گیرد

(به قسمت Lost caps مراجعه شود). البته چروکیدگی ممکن است منبع تورش باشد. اگر تغییر شکل بافت قابل چشم پوشی یا قابل اندازه گیری باشد، دایسکتور اولین انتخاب برای شمارش می باشد (Bendtsen and Nyengaard 1989; Gundersen 1986; Howard and Reed 1998a; West et al. 1988; West et al. 1991).

3-6-2-1 دایسکتور فیزیکی (Physical disector)

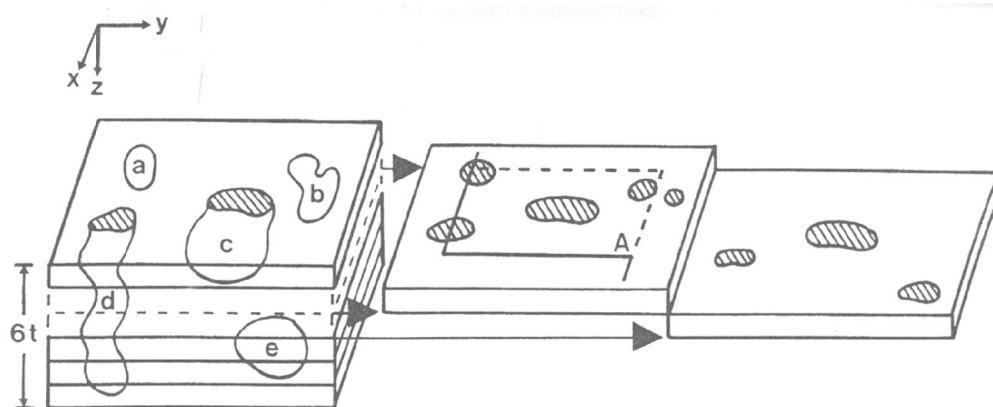
شکل اولیه روش دایسکتور برای اسکن بافت با استفاده از یک جفت برش نازک طراحی شد، فرآیندی که به عنوان دایسکتور فیزیکی (Physical disector, PD) شناخته می شود. روش Physical نامیده شد چون شمارش دایسکتور در برشهای واقعی (Physical) انجام می شود. با توجه به اینکه PD به دو برش و دو میکروسکوپ همزمان نیاز دارد، زمان بر می باشد. امروزه PD به شمارش اشیاء بر روی تصاویر فتوگرافیکی برشهای بسیار نازک برای اسکن اوپتیکال، مثل میکروگرافهای الکترونی یا میکروسکوپ Confocal بکار می رود. همچنین برای ذرات یا اشیاء بزرگ مثل گلومرول کلیه تنها می توان از PD استفاده کرد (Howard and Reed 1998a; Mouton 2002).

در PD یک جفت برش نازک (برشهای دوبعدی) با فاصله یک بعدی (h) مشخص انتخاب می شوند و این فاصله باید به اندازه کافی کوچک باشد که هیچ ذره ای در برشها بدون تشخیص نماند. وقتی که اصل دایسکتور برای برآورد تعداد ذرات بکار نمی رود بلکه برای نمونه گیری استفاده می شود، دانستن فاصله دقیق h بین سطوح برش ضروری نمی باشد. در آن موارد نکته ضروری این است که h کوچکتر از ارتفاع کوچکترین ذره باشد. در بیشتر موارد روش های برآورد کافی است که h در حدود یک سوم تا یک چهارم ارتفاع ذره متوسط باشد. برای ذرات با شکلهای مختلف یا با اندازه های متنوع، بهتر است که h حتی کوچکتر باشد. این دو برش بر روی دو میکروسکوپ (Projecting

(microscope) یا دو سیستم تلویزیونی قرارداد می شوند. بر روی برش ها چارچوب شمارش بطور تصادفی سیستماتیک قرار داده می شود و بر روی هم منطبق می شوند. برش اولی به عنوان برش مرجع (Reference section) یا برش شمارش (Counting section) و برش دومی به عنوان برش مراجعه (Look-up section) شناخته می شوند. شمارش (Q^-) وقتی ثبت می شود که یک ذره در چارچوب بر روی برش رفرنس قرار دارد، اما در برش Look-up وجود ندارد. این با قانون شمارش هر شیء در حجم مشخص یا "برای اولین بار و تنها یک بار" (For the first time only) (once) منطبق می باشد. اگر یک ذره در هر دو برش دیده می شود، آن ذره شمارش نمی شود (شکل 1-6). این فرایند در 100 تا 200 محل بر روی محور X و Y برای تمام فضای رفرنس صورت می گیرد. وقتی که تعداد جفتهای دایسکتور محدود می باشد (مثل، مطالعات میکروگراف الکترونی)، افزایش ΣQ^- در حجم معین فضای رفرنس با افزایش اندازه چارچوب دایسکتور کارآیی فرایند شمارش را افزایش می دهد. روش دیگر کاراً این است که نقشهای برشهای رفرنس و Look-up در همان جفت دایسکتور عوض شود. با این شمارش دوجهته کارآیی دوبرابر می شود. چون حرکت اسکن در جهت مختلفی صورت می گیرد، اشیاء مختلف در بالا و پایین دایسکتور در شمارش گنجانده خواهد شد به سطحی بستگی دارد که برش رفرنس قرار دارد (Gundersen 1986; Howard and Reed 1998a; Mouton 2002; Royet 1991).

چون فاصله برش در PD با میکروتوم محاسبه می گردد، برش های پارافینی یا فریز شده (Frozen section) تورش ایجاد نمی کند. زیرا کلاپس بافت زیاد بر برش نازک تأثیر ندارد (Howard and Reed 1998a).

اصل دایسکتور توسط تغییرات یا اختلالات حجم رفرنس تحت تأثیر قرار نمی گیرد. تنها نیاز برای بدون تورش بودنش این است که برش دوم Look-up به اندازه کافی برای ذرات برش اول بزرگ باشد تا همه آنها اگر هستند مشاهده شوند (Gundersen 1986).



شکل 6-1 اصل دایسکتور. دیاگرام بلوکی از بافت را نشان می دهد که دارای 5 ذره (a-e) می باشد که به صورت متوالی برش داده شده است. یک جفت برش مجاور (Physical disector) از برش ها با فاصله معین (t) بیرون کشیده شده و سطح بالایی شان درست نشان داده شده است. برش اولی در اینجا برش مرجع می باشد که یک چارچوب شمارش با ناحیه A در روی آن قرار داده شده است در حالیکه برش دوم Look-up می باشد. حجم دایسکتور مساوی با ناحیه (A) ضرب در فاصله (t) می باشد. ذره e در این برش ها قرار ندارد. ذرات a و d شمارش نمی شوند چون با اضلاع ممنوعه برخورد می کنند. ذره c نیز چون در برش Look-up دیده می شود شمارش نمی شود. تنها ذره b شمرده می شود ($Q^- = 1$).

4-2-6-1 دایسکتور اوپتیکال (Optical disector)

دایسکتور اوپتیکال (Optical disector, OD)، که اولین بار توسط Gundersen در 1986 پیشنهاد شد، یک تغییر کاملاً کارآ از اصل دایسکتور برای شمارش اشیاء بر روی برشهای نسبتاً ضخیم می باشد (Mouton 2002).

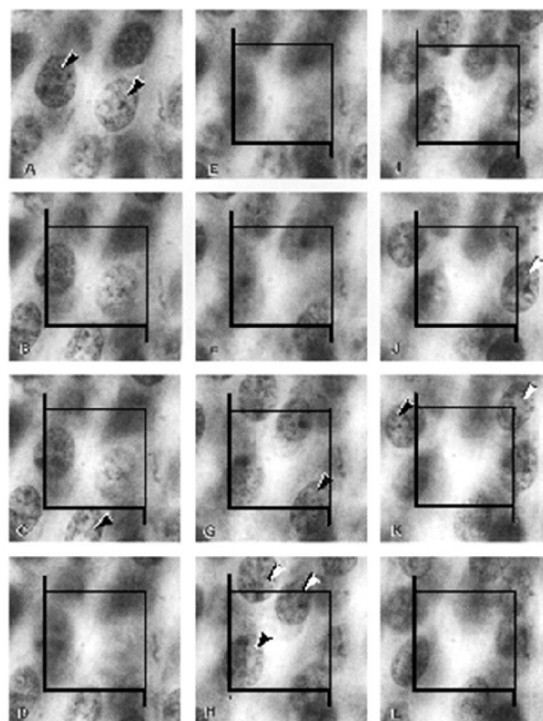
برای بدست آوردن تصویر از CCD camera، کامپیوتر، مانیتور و چارچوب شمارش استفاده می شود. بعلاوه یک وسیله دیگر نیز برای استفاده از OD اجباری است که میکروکیتور (Microcator) برای اندازه گیری عمق در محور Z توسط حرکت پایه میکروسکوپ و صفحه نشان دهنده عمق (Readout) می باشد. معمولاً میکروکیتورهای Optoelectronic با صحت $0.5 \mu\text{m}$ برای این منظور بکار برده می شود (مثل میکروکیتور MT12 از شرکت Heidenhain آلمان که در این مطالعه استفاده شده است). بعلاوه عوامل مهم دیگر ایندکس های انکساری عدسی (Refractive indices)، روغن ایمرسیون (Immersion oil)، لامل (Coverslip) و ماده قالب گیری مؤثر می باشند (Howard and Reed 1998a; West and Gundersen 1990).

ایده OD با تولید تنها یک برش نسبتاً ضخیم تقریباً $20 \mu\text{m}$ یا بیشتر شروع می شود تا این امکان را فراهم کند که درون دایسکتور با ارتفاع کافی اشیاء مورد نظر شمارش شوند. و سپس ایجاد دو یا چند سطح برش موازی برای دایسکتور به عنوان برشهای اوپتیکال (Optical sections) درون برش ضخیم با حرکت دادن سطح فوکوس از بالا به پایین ادامه می یابد. در OD، میکروکیتور برای اندازه گیری حرکات عمودی یا محور Z برش و استفاده از عدسی روغن با منفذ عددی (Numerical aperture, NA) بالا نیاز است. تنها عدسی های روغن ایمرسیون برای برشهای اوپتیکال استفاده شود چون حرکت پایه میکروسکوپ که میکروکیتور اندازه می گیرد با حرکت سطح فوکوس برابر می شود (Gundersen et al. 1988a; Howard and Reed 1998a).

مزایای OD نسبت به PD عبارتند از: 1) کارایی OD بیشتر از PD می باشد. PD زمان بر بوده و منطبق کردن دو برش خسته کننده می باشد 2) PD علاوه بر دو برش نازک به دو میکروسکوپ همزمان نیاز دارد، در صورتیکه در OD فقط یک میکروسکوپ کافی می باشد 3) شمارش ذرات یا سلول ها با OD از شمارش مجدد جلوگیری می کند و هیچ فرضی در مورد شکل، اندازه و موقعیت فضایی ذره مورد شمارش نیازی نیست 4) مزیت مهم برشهای اوپتیکال در مقایسه با برشهای فیزیکی این است که همه وضعیتهای یک اسکن منفرد برش اوپتیکال بطور کامل ثبت می شوند. بنابراین، این

اسکن پیوسته را می توان بکار برد تا یک برآورد بدون تورش تراکم عددی بدست آورد (Howard and Reed 1998a; Jiang et al. 2001; Mufson et al. 2002; Ongur et al. 1998; Sorensen 1991; Tan et al. 1995).

عیب اصلی OD این است که به برش های نسبتاً ضخیم نیاز دارد. این باعث می شود که نتوان از OD در مطالعات میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد. بعلاوه دربرش های ضخیم رنگ بخوبی به مرکز برش نفوذ نمی کند (Coggeshall and Lekan 1996).



شکل 1-7 شمارش سلول در محور عمودی (z axis) سلول های شمارش شده (نوک پیکان سفید) و شمارش نشده (نوک پیکان سیاه) در Optical disector را نشان می دهد. A سطح بالایی ارتفاع دایسکتور و L سطح پایینی آن را نشان می دهد. هر تصویر نشان دهنده اسکن اوپتیکال آن از بالا به پایین برش می باشد (West and Gundersen 1990).

روش دیگر شمارش استفاده از آجر بدون تورش (Unbiased brick) می باشد که دارای سه سطح مجاز و سه سطح ممنوع می باشد. هر ذره که درون آجر باشد یا با اضلاع مجاز برخورد کند شمارش می شود. آجر بدون تورش در واقع همان چارچوب شمارش دوبعدی می باشد که دارای بعد سوم نیز می باشد که برای هر شئی با هر شکل یا اندازه ای بکار می رود. قانون آجر در صورت محدب بودن شئی مثل هسته سلول عصبی قابل اجرا می باشد (Howard and Reed 1998a).

Edge effect و Lost caps 1-2-6-5

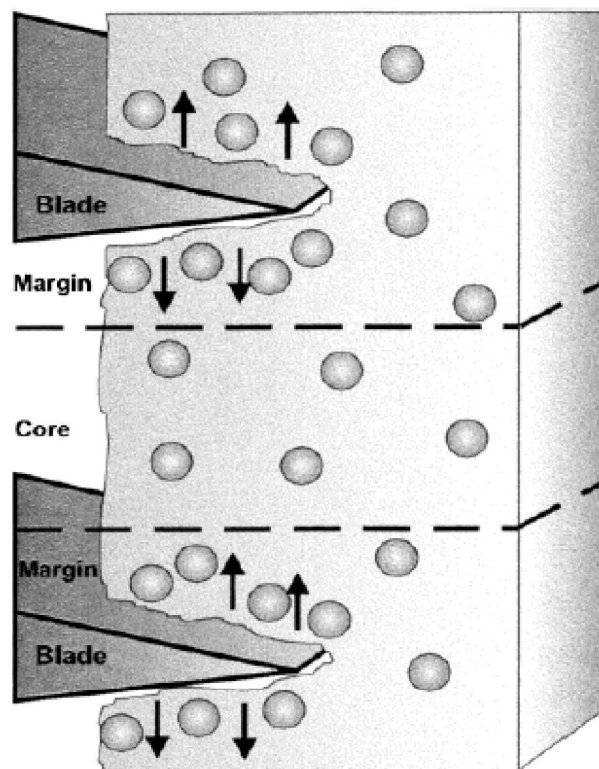
در برش های پارافینی، تراکم هسته های نورونی در سطوح بالا و پایین برش بیشتر (20-0٪) و در قسمت مرکزی (تا 50٪) کمتر می باشد. تیغه چاقو یا میکروتوم می تواند بافت را فشرده و منجر به تراکم هسته های نورونی در برش های بافتی شود (شکل 8-1). درجه فشردگی با تیزی چاقو و زاویه برش بلوک بستگی دارد.

معتقدند که هستک ها، هسته ها یا قسمت محدب ذرات (Caps) در فرایند برش گم می شوند. این حالت می تواند منجر به برآورد کمتر تعداد از 8٪ تا 30٪ شود (Lost caps).

Lost caps بدان معنی است که قطعات اشیاء کوچک مورد توجه قرار نمی گیرند یا در سطوح برش از دست می روند. این قطعات تشخیص داده نشده یا گم شده گاهی به عنوان مشکل قطع شدن (Truncation) شناخته می شود. این مشکلات به عوامل آغشتگی (Embedding)، روش های برش، تیزی چاقو یا میکروتوم، روش رنگ آمیزی و شدت رنگ آمیزی بستگی دارد. این موضوع در مورد روش های شمارش سطح مقطع غیرقابل اجتناب می باشد ولی در OD این مورد حذف می شود (Hedreen 1998a).

فشردگی بافت بوسیله چاقو یا میکروتوم کناره های برش را بیشتر تحت تأثیر قرار می دهد (شکل 8-1). همچنین تغییر شکل بافت به علت شناور کردن برشها بر روی آب نیز ممکن است کناره ها را بیشتر تحت تأثیر قرار دهد. به این عوارض، اثر حاشیه ای (Edge effect) می گویند. البته برشهای

ضخیمتر درجات کمتری از این تغییرات بین کناره ها و مرکز را نشان می دهند. به همین خاطر برش های 20 تا 30 μm ترجیح داده می شود (Hatton and Von Bartheld 1999).



شکل 1-8 این شکل شماتیک نشان می دهد که چگونه تیغه (Blade) چاقو ممکن است کناره های برش های بافتی را فشرده و باعث تراکم بیشتر هسته نوروں ها در کناره ها (Margin) تا مرکز (Core) بافت بشود (Hatton and Von Bartheld 1999).

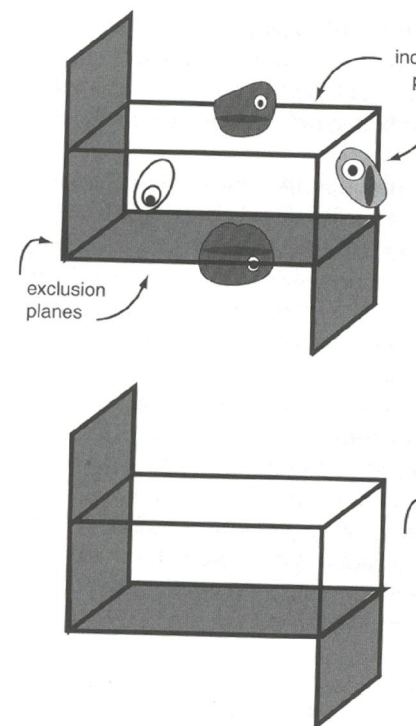
6-6-2-1 ناحیه، حجم یا فضای حفاظتی (Guard area, Volume or Space)

برخلاف PD، OD ممکن است که برآوردهای با تورش تراکم عددی ایجاد کند، اگر ابزار نمونه گیری سه بعدی تا سطح پایین (Bottom surface) یا بالای (Top surface) برش ضخیم گسترش یابد. تورش مرتبط به پدیده Lost cap و اثر کناری (Edge effect) می باشد که ناشی از عبور تیغه چاقو از طریق بافت در طی آماده سازی برشها ایجاد می شود (شکل 1-8). این عبور تیغه چاقو

بطور مصنوعی تعداد اشیاء در سطوح بریده بافت را تغییر می دهد. به همین دلیل حجم نمونه گیری را به قسمت میانی برش باید محدود کرد و در قسمت بالا و پایین برش شمارش صورت نگیرد. میزان چروکیدگی در سطوح برش بیشتر از میانه برش می باشد (شکل 8-1) و این چروکیدگی در سطح بالای برش بیشتر از سطح پایین (سطح نزدیک به لام) می باشد. این قسمت بالا و پایین برش به عنوان ناحیه یا فضای گارد شناخته می شود. بنابراین، به جای شمارش سلول ها در سطوح یک برش که آرتیفکت رخ می دهد، مشاهده گر حجم گارد را بکار می برد تا از این آرتیفکت هایی که در سطوح بالا و پایین برش ایجاد شده اجتناب کند. اندازه حجم گارد کمی با ضخامت برش تغییر می کند. یک حجم گارد مناسب، یک پنجم تا یک چهارم قطر مورد انتظار اشیاء مورد شمارش می باشد، مثلاً $4-5 \mu\text{m}$ در بالا و پایین دایسکتور برای شمارش سلول هایی با قطر متوسط $20 \mu\text{m}$ کافی است. ناحیه گارد بالای برش باید بالاتر از بزرگترین سلول ها قرار گیرد. این مقدار نصف ارتفاع هسته یا سلول مورد شمارش می باشد. ناحیه گارد پایین برش را همیشه می توان کم عمق تر در نظر گرفت (اغلب کمتر از $2 \mu\text{m}$)، چون همه سلول ها یا اشیاء دیگر که با این ناحیه وارد می شوند، شمارش نمی شوند (Boehringer 2002; Gardella et al. 2003; Gundersen et al. 1988b; Howard and Reed 1998a; Mayhew and Gundersen 1996; Mouton 2002; West et al. 1996; West 1999b; Williams and Rakic 1988).

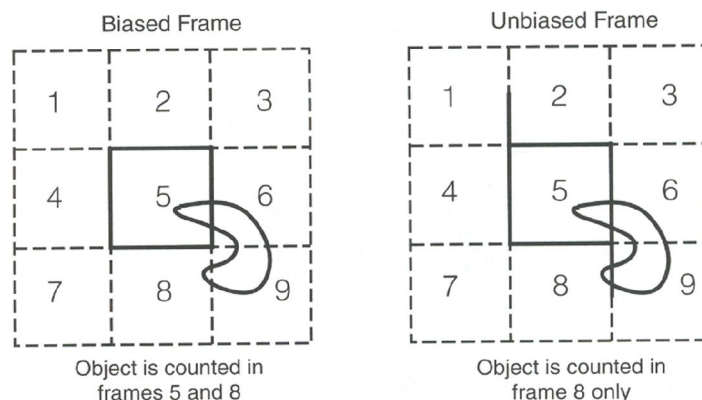
1-2-6-7 چارچوب (Frame)

ابزار شمارش یا دایسکتور از یک چارچوب (Frame) تشکیل می شود که در فرم ساده آن از دو ضلع یا سطح مجاز (Acceptance lines or Inclusion planes) (بالا و راست) و دو ضلع یا سطح غیرمجاز، ممنوعه (Forbidden lines or Exclusion planes) (اضلاع چپ و پایین) تشکیل می شود (شکل 9-1).



شکل 9-1 چارچوب های شمارش دایسکتور بدون تورش که خطوط مجاز و ممنوعه (Inclusion and exclusion lines) دوبعدی (2-D) و سطوح (Planes) مجاز و ممنوعه سه بعدی (3-D) را نشان می دهند (Mouton 2002)

اگر چارچوب ها یکی در میان باشد، شمارش دچار مشکل می شود و اشیاء ممکن است دوبار شمارش شوند. برای جلوگیری از این مشکل، اضلاع ممنوع به طرف بالا و پایین ادامه داده می شود. این امتداد برای اشیاء با شکلهای نامنظم مهم می باشد (شکل 10-1). با چارچوبی به این شکل، هر شیء (بدون توجه به شکل یا اندازه اش) تنها یک بار شانس شمارش دارد. بنابراین، از کل صفحه مانیتور نمی توان به عنوان چارچوب شمارش استفاده کرد. دایسکتور دارای دو سطح بالایی و پایینی نیز می باشد که سطح بالایی همانند سطوح بالا و راست سطح مجاز و سطح پایینی همانند سطوح پایین و چپ سطح ممنوعه می باشند (شکل 9-1). در حقیقت دایسکتور یک مکعب شمارش می باشد.



شکل 10-1 اگر چارچوب ها یکی در میان باشد، شمارش دچار مشکل می شود و اشیاء ممکن است دوبار شمارش شوند. برای جلوگیری از این مشکل، اضلاع ممنوع به طرف بالا و پایین ادامه داده می شود. این امتداد برای اشیاء با شکلهای نامنظم مهم می باشد. در سمت چپ ذره در دایسکتور شماره 5 و 8 شمارش می شود، ولی با امتداد چارچوب (سمت راست) فقط در دایسکتور 8 شمارش می شود (Mouton 2002).

البته شاید در ظاهر کمی مایوس کننده باشد که ممکن است در یک چارچوب 5 شیء یا بیشتر دیده شوند ولی فقط یکی در شمارش گنجانده شود. برای شمارش آسان کارآتر آن است که چارچوب شمارش با اندازه و ارتفاعی انتخاب گردد که منجر به تعداد کمی از شمارش ذرات در چارچوب گردد (دو تا 5 ذره در هر چارچوب). این بدان معنی است که تعداد در چارچوب مهم می باشد. اگر شمارش در OD نیز خیلی پایین باشد، مثلاً صفر تا 1، این ممکن است کارآ نباشد. بنابراین استفاده از یک سیستم تست مرکب از 4 چارچوب کوچک یا بیشتر در تصویر برش آسانتر و کارآتر از یک چارچوب بزرگتر با ناحیه برابر با ناحیه هر 4 چارچوب کوچک باشد. انتخاب چارچوب کوچکتر می تواند واریانس را کاهش دهد. برای اطمینان از اینکه دایسکتور در فضای رفرنس قرار داشته باشد، از نقطه ای در وسط دایسکتور به نام نقطه همراه (Associated point) استفاده می شود. اگر این نقطه درون

بافت بود، حجم آن دایسکتور نیز در اندازه گیری حجم محاسبه می گردد (Benes and Lange 2001; Howard and Reed 1998a; Mouton 2002).

8-6-2-1 ضخامت برش

ضخامت برش باید به اندازه کافی ضخیم باشد تا این امکان را فراهم کند که درون دایسکتور با ارتفاع کافی اشیاء مورد نظر شمارش شوند. بنابراین، اشیاء با قطر تقریباً $10\text{ }\mu\text{m}$ و با حجم گارد $5\text{ }\mu\text{m}$ در بالا و پایین دایسکتور به برشی به ضخامت 20 تا $25\text{ }\mu\text{m}$ نیاز دارند. البته این ضخامت باید بعد از پردازش نهایی بافت شناسی باشد. در بعضی موارد، مثل برش های یخ زده (Freezing sections) برشهای با ضخامت $50\text{ }\mu\text{m}$ تا حد $20\text{ }\mu\text{m}$ یا کمتر نیز دچار کاهش و تغییر می شود (Cruz-Orive 1987; Mouton 2002).

عمق فوکوسی مثلاً یک عدسی روغن ایمرسیون $\times 100$ تقریباً $0/3\text{ }\mu\text{m}$ و بنابراین برشی با ضخامت $10\text{ }\mu\text{m}$ اغلب مناسب می باشد (Gundersen 1986).

در همه روش ها با افزایش ضخامت برش، برآورد به اندازه واقعی نزدیک می شود (Kalisnik et al. 2001).

9-6-2-1 ارتفاع دایسکتور

ارتفاع واقعی دایسکتور توسط اندازه اشیاء مورد شمارش در رابطه با ضخامت برش تعیین می شود. البته این ضخامت باید بعد از پردازش نهایی بافت شناسی باشد. در اندازه گیری عملی، حجم گارد را می توان کاهش داد تا واریاسیون در ضخامت برش تطابق یابد. لیکن، کاربر باید به خاطر بسپارد که تورش ممکن است توسط آرتیفکت های ایجاد شده در سطح برش (مثل، Lost caps) ایجاد شود. اگرچه عدسی های شئی با قدرت کم (5 تا 40) امکان دید سریع مناطق وسیعی را برای مطالعات کیفی می دهد، این عدسی ها با سطوح فوکوسی یا عمق میدان (Depth of field) نسبتاً

ضخیمی همراه است (یعنی برش های اوپتیکال ضخیمی ایجاد می کند). با استفاده از این نوع عدسی خشک بیش از 60٪ خطا وجود دارد (Guillary 2002). در میکروسکوپ نوری (Confocal یا معمولی) عمق میدان (Depth of field) میکروسکوپ، یعنی آن قسمت از نمونه که در فوکوس کامل (Sharp focus) می باشد، با افزایش منفذ عددی عدسی (Numerical aperture, NA) کاهش می یابد. بنابراین به منظور بدست آوردن نازکترین برش اوپتیکال ممکن یک عدسی با منفذ عددی بالا باید استفاده شود. شمارش اشیاء با استفاده از دایسکتور نیاز به سطح فوکوسی نازک برای اسکن ارتفاع دایسکتور در محور عمودی (Z axis) دارد. عمق میدان یک عدسی شئی توانایی یک مشاهده گر را برای تعیین ساختمانها در محل های عمودی مختلف (محور Z) محدود می کند. عمق میدان یک عدسی از فرمول زیر بدست می آید:

$$\frac{L\sqrt{(i_R^2 - NA^2)}}{NA^2} \text{Depth of field} =$$

که L طول موج نور ($0.55 \mu\text{m}$)، i_R اندکس انکساری (در حدود $1/52$ برای روغن ایمرسیون، بافت، اسلاید، لامل و غیره) و NA منفذ عددی (Numerical aperture) می باشد. هر چه NA افزایش یابد، عمق میدان کاهش می یابد (جدول 2-1).

برای عدسی 100 با $NA 1/25$ که در این مطالعه استفاده شد، عمق میدان $0.3 \mu\text{m}$ می باشد.

$$\text{Depth of field} = \frac{L\sqrt{(i_R^2 - NA^2)}}{NA^2} = \frac{0.55 \times \sqrt{(1.52)^2 - (1.25)^2}}{(1.25)^2} = 0.30 \mu\text{m}$$

(Gundersen 1986; Howard and Reed 1998a; Kubinova and Janacek 1998; Mouton 2002; Tomori et al. 2001; Williams and Rakic 1988)

جدول 1-2 رابطه منفذ عددی (NA) عدسی شئی میکروسکوپ به عمق میدان

عمق میدان (μm)	منفذ عددی (NA)	عدسی شئی ($\times$)
1/3	0/75	40
0/3	1/25	63
0/26	1/3	100
0/17	1/4	100

10-6-2-1 قوانین شمارش

برای برآورد تعداد ذرات سه بعدی (مثل سلول ها) ضروری است قانونهای شمارشی بکار برده شود که تضمین کند اشیاء با احتمال یکسان در فضای سه بعدی بدون توجه به اندازه یا شکل شان شمرده شوند. برای شمارش همیشه باید زیرواحد های منحصر به فردی انتخاب شوند که واضح و قابل تشخیص باشند (مثل سر در انسان یا هسته یا هستک در بیشتر نرون ها). این زیرواحد به عنوان نماینده شئی شمارش می شود. این روش به عنوان قانون شمارش "نقطه همراه" (Associated point rule) شناخته می شود. در OD با قانون نقطه همراه، یک ذره وقتی شمرده می شود که بالاترین نقطه اش به فوکوس بیاید. شمارش تا انتهای ارتفاع دایسکتور (مثلاً $10 \mu\text{m}$) با اسکن پیوسته انجام می شود (شکل 1-7). در سطح انتهایی ارتفاع دایسکتور، ذراتی که به فوکوس می آیند شمارش نمی شود. درون چارچوب برای شمارش در موقع حرکت در جهت محور X به طرف راست، یک شئی تنها برای یک بار و برای اولین بار قابل مشاهده خواهد بود. به همین دلیل هر شئی که ضلع یا سطح طرف راست را قطع کند برای اولین بار درون چارچوب دیده شده است. چنین قانونی برای محور Y نیز صادق می باشد. در حرکت از پایین به بالاشی درون چارچوب برای اولین بار مشاهده می شود. در نتیجه چارچوب شمارش دو ضلع ممنوع و دو ضلع مجاز دارد. بدین ترتیب اشیائی که درون چارچوب می افتند یا با سطوح مجاز (Acceptance lines or Inclusion planes) تماس دارند شمارش می شوند و اشیائی که خارج چارچوب قرار دارند یا با سطوح غیر مجاز (Forbidden lines or Exclusion planes) تماس دارند، شمارش نمی شوند. اگر چارچوب ها یکی در میان باشد،

شمارش دچار مشکل می شود و اشیاء ممکن است دوبار شمارش شوند. برای جلوگیری از این مشکل، اضلاع ممنوع به طرف بالا و پایین ادامه داده می شود. این امتداد برای اشیاء با شکلهای نامنظم مهم می باشد (شکل 10-1). با چارچوبی به این شکل، هر شیء (بدون توجه به شکل یا اندازه اش) تنها یک بار شانس شمارش دارد. البته شاید در ظاهر کمی مایوس کننده باشد که ممکن است در یک چارچوب 5 شیء یا بیشتر دیده شوند ولی فقط یکی در شمارش گنجانده شود. البته باید بخاطر داشت که اشیاء در حجم معینی با ابزار شمارش نمی شوند (Not counting) بلکه تعداد برآورد (Estimating) می شوند. بعضی برآوردها بالا و پایین می باشند، ولی میانگین برآوردها به اندازه واقعی نزدیک می باشد (Andersen and Gundersen 1999; Bendtsen and Nyengaard 1989; Ishiyama et al. 2001; Mouton 2002; Slomianka 2004; Tomori et al. 2001).

ارتفاع دایسکتور و ضخامت برش توسط میکروکتور خوانده می شود. OD هرگز به یک جفت برش نیاز ندارد (Bendtsen and Nyengaard 1989; Howard and Reed 1998a; Mouton 2002; Slomianka 2004; West and Gundersen 1990).

برشهای اوپتیکال تقریباً در همه موارد مؤثرتر از برشهای فیزیکی می باشند. تعداد ایده آل دایسکتور مورد استفاده برای شمارش اشیاء همان تعداد ایده ال اشیاء مورد شمارش می باشد. یعنی تعداد دایسکتور بین 100 تا 200 که دارای 100 تا 200 سلول در 8 تا 12 برش با فاصله مساوی از کل ساختمان (مثل مغز) باشند. در نتیجه ابعاد و ارتفاع دایسکتور براین اساس در مطالعه آزمایشی (Pilot study) تعیین می شود. با این روش ضریب خطای برآورد تراکم عددی کمتر از 10٪ خواهد بود. باید یادآوری شد که مثلاً در مغز حتی اگر 2000 نوروں یا بیشتر شمارش شود، ضریب واریانس کمتر از 1٪ کاهش می یابد که با توجه به کار، وقت و هزینه زیاد کارآ نمی باشد (Braendgaard et al. 1990; Gundersen et al. 1988a; Mouton 2002; West et al. 1996).

11-6-2 روش شمارش

برای اعمال قانون شمارش OD برش ضخیم بر روی پایه میکروسکوپ چسبانده می شود. تصویر برش بر روی مانیتور منتقل و میدانهای تصادفی یکنواخت انتخاب می گردد. چارچوب شمارش بطور تصادفی یکنواخت بر روی برش قرار داده می شود. سپس با استفاده از پیچ تنظیم میکروسکوپ (Fine focus knob) بافت مورد نظر به فوکوس می آید. اولین نقطه ای که بافت به فوکوس آمد، نقطه شروع بافت و برش، میکروکتور بر روی صفر قرار داده می شود. سپس به میزان لازم (فضای گارد) از سطح برش پایین آمده (مثلاً 5 μm) و از این سطح به بعد اولین ذره یا سلولی که به فوکوس آمد طبق قوانین شمارش شمرده می شود. اگرچه قضاوت در مورد اینکه آیا ذره یا سلول در فوکوس هست، ضروری است، چنانچه مشاهده کننده معیار یکسانی برای تشخیص ذرات یا سلول ها مستقل از محل در بافت دارد، از تورش اجتناب می شود (Tandrup et al. 2000). این شمارش تا انتهای ارتفاع دایسکتور انجام می شود. طبق قانون بدون تورش، ذراتی که در سطح پایین ارتفاع دایسکتور به فوکوس می آیند شمارش نمی شوند.

12-6-2 فرمول محاسبه

برای محاسبه تراکم عددی از فرمول زیر استفاده می شود:

$$N_V = \frac{\sum Q^-}{V_{dis} \times \sum P} = \frac{\sum Q^-}{a(f) \times h \times \sum P}$$

که N_V برآورد تراکم عددی در واحد حجم، V_{dis} حجم دایسکتور، $a(f)$ ناحیه چارچوب، h ارتفاع دایسکتور، $\sum Q^-$ مجموع ذرات شمارش شده و $\sum P$ مجموع نقاط همراه چارچوب که با فضای رفرنس برخورد می کنند می باشند (Dorph-Petersen 1999; Finkelstein et al. 2000; Howard and Reed 1998a; Mayhew 1991; Mouton 2002; O'Kusky et al. 2000; Riihioja et al. 1999).

البته روش دیگر بدست آوردن تراکم عددی، روش غیر مستقیمی می باشد که در ابتدا تراکم حجمی (N_V) و سپس حجم وابسته به تعداد (Number-weighted mean volume, V_N) بدست آورده و از فرمول زیر تراکم عددی محاسبه می گردد (Cruz-Orive 1987):

$$N_V = \frac{V_V}{V_N}$$

13-6-2-1 تعداد کل (Total number)

برای بدست آوردن تعداد کل اشیاء در فضای رفرنس، تراکم عددی در حجم فضای رفرنس ضرب می شود. باید توجه کرد که واحد تراکم عددی در حجم با معیار حجم رفرنس یکسان باشد. برای بدست آوردن تعداد کل از فرمول زیر استفاده می شود:

$$N = N_V \times V_{ref} = \frac{\sum Q^-}{V_{dis} \times \sum P} \times V_{ref} = \frac{\sum Q^-}{a(f) \times h \times \sum P} \times V_{ref}$$

که N تعداد کل اشیاء، N_V برآورد تراکم عددی در واحد حجم، V_{dis} حجم دایسکتور، $a(f)$ ناحیه چارچوب، h ارتفاع دایسکتور، $\sum Q^-$ مجموع ذرات شمارش شده، $\sum P$ مجموع نقاط همراه چارچوب که با فضای رفرنس برخورد می کنند و V_{ref} حجم فضای رفرنس که توسط اصل کاوالیری به روش شمارش نقطه ای بدست می آید، می باشند (Bendtsen and Nyengaard 1989; Gundersen 1986; Henderson et al. 2000; Korbo et al. 1990; Riihioja et al. 1999; Wadhaw 2003).

14-6-2-1 عوامل مؤثر بر شمارش

عواملی که بر شمارش تأثیر دارند شامل چروکیدگی بافت، کلاپس برش در محور عمودی برش و اندازه پنجره شمارش می باشند. کلاپس می تواند باعث اشکالاتی در تراکم سلولی شود. این تأثیر بر روی سلول های بزرگ بیشتر است (Benes et al. 2001).

استقلال برآورد بدون تورش و مستقیم تعداد - یعنی شمارش- و موقعیت فضایی (Orientation) در نتیجه این حقیقت ساده است که یک اندازه گیری بدون بعد نمی تواند موقعیت فضایی داشته باشد. مانند تعداد، برآورد حجم مستقل از موقعیت فضایی است: حجم سه بعدی همه سه بعد را بکار می برد و بعدی برای موقعیت فضایی باقی نمی ماند. برآورد تعداد با استفاده از دایسکتور توسط Overprojection و Truncation تحت تأثیر قرار نمی گیرد وقتی که در حیطه ای قرار می گیرند که نیاز عمومی برآورده شود (Gundersen 1986).

15-6-2-1 فرکشنیتور (Fractionator)

روش های OD, PD و Unbiased brick تعداد کل را از طریق برآورد تراکم عددی برآورد می کنند. لیکن، اگر تنها تعداد کل ذره مورد نیاز باشد از تکنیک Fractionator استفاده می شود که یک روش ساده، مستقیم و قوی برای برآورد تعداد کل می باشد. اصل فرکشنیتور شامل نمونه گیری ذرات بطور تصادفی یکنواخت با یک احتمال معین و از قبل مشخص می باشد. در این روش هر عضو دارای ذرات به قطعاتی با شکل، اندازه و تعداد نامشخص بریده می شود. یک کسر مشخص (مثلاً یک پانزدهم همه قطعات بطور سیستماتیک با شروع تصادفی) بطور تصادفی نمونه گیری می شود. چون هر ذره در یکی از قطعات می باشد، احتمال مشابهی برای نمونه گیری دارد، یعنی نمونه گیری یکنواخت می باشد. این انتخاب کسر در سطوح مختلف صورت می گیرد. مثلاً ابتدا بافت به قطعات، قطعات به برشها، کسری از برشها و حجم خاصی از دایسکتور انتخاب می شود. مشخص ترین جنبه فرکشنیتور این است که هیچ نیازی به دانستن اطلاعات ابعادی مثل ضخامت برش، موازی بودن برشها یا مساوی بودن برشها و بزرگنمایی وجود ندارد و بنابراین مستقل از تغییر شکل بافتی مثل چروکیدگی یا تورم بافتی می باشد. بعلاوه چون به برآورد حجم کلی فضای رفرنس نیازی نیست، دانستن مرزهای فضای رفرنس ضروری نمی باشد (Geiser et al. 1990; Gundersen 1986; Gundersen et al. 1988a; Mayhew and Gundersen 1996; Royet 1991).

Optical fractionator ترکیبی از OD و روش نمونه گیری Fractionator می باشد که اولین بار توسط West و همکارانش در 1991 پیشنهاد گردید. این برآورد عاری از فرض در باره شکل و اندازه ذرات می باشد و تحت تأثیر تغییرات بافتی قرار نمی گیرد. به همین خاطر می توان برای همه برشهای پلاستیکی، پارافینی، Frozen و Vibratome بکار برد (Bendsen et al. 2003; Merrill et al. 2001; Mouton 2002).

برای بدست آوردن تعداد کل ذرات در فرکشنیتور از فرمول زیر استفاده می شود:

$$N = Q \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf}$$

که N تعداد کل ذرات، Q تعداد کل ذرات که در هر OD شمارش شده اند، ssf کسر نمونه گیری از برشها (Section sampling fraction)، asf کسر نمونه گیری از ناحیه برش (Area sampling fraction) و hsf کسر ارتفاع دایسکتور به ضخامت برش (Height sampling fraction) می باشند (Howard and Reed 1998a; Mouton 2002).

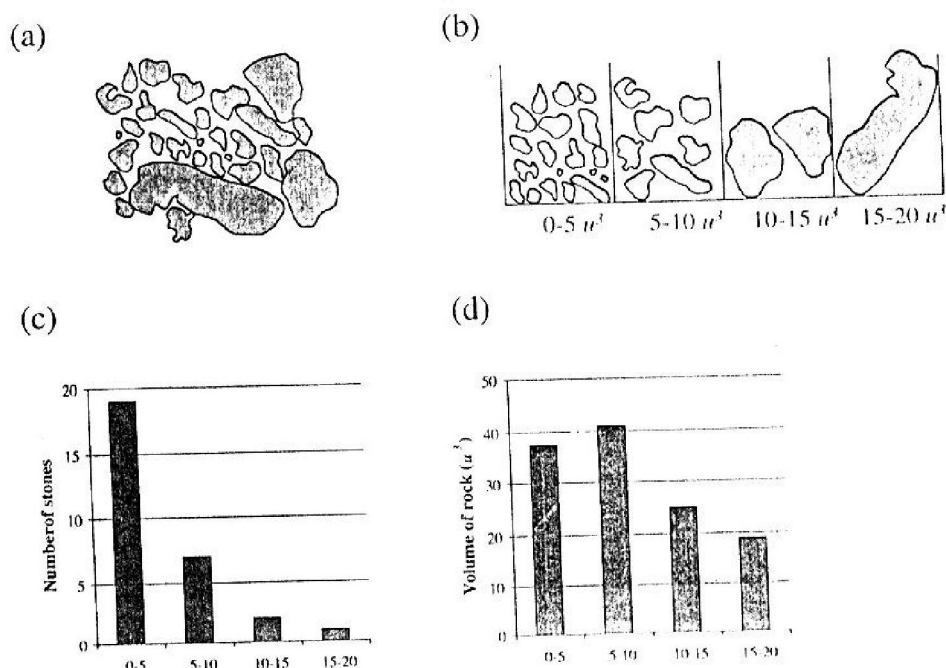
7-2-1 روش های برآورد حجم ذره

میانگین حجم ذره به دو صورت میانگین حجم ذره مرتبط به حجم یا توزیع حجم در حجم (Volume-weighted mean particle volume, V_V) و میانگین حجم مرتبط با تعداد یا توزیع حجم در تعداد (Number-weighted mean particle volume, V_N) بیان می شود. میانگین حجم وابسته به حجم (V_V) توزیع حجمی حجم ذره را تعریف می کند و به عنوان تراکم حجمی یا کسر حجمی (Volume density or fraction) شناخته می شود. این نوع اندازه گیری معیار مؤثرتری از تغییر نسبت به V_N می باشد و تاکنون فراوانترین نوع اندازه گیری ذره در بیولوژی می باشد. درحالیکه میانگین حجم وابسته به تعداد (V_N) از توزیع تعداد محاسبه می گردد (شکل 1-11). معمولاً برای اهداف روتین بافتی آسیب شناسی (Histopathology)، تشخیص سرطان و طبقه بندی بدخیمی که با استفاده از اندازه گیری حجم هسته سلول ها صورت می گیرد

برآورد V_V صورت می گیرد و برآورد V_N که وقت گیر و پیچیده تر می باشد، بندرت ضرورت پیدا می کند. دو کمیت نامبرده به صورت زیر با هم ارتباط دارند:

$$V_V = V_N \times (1 + CV^2)$$

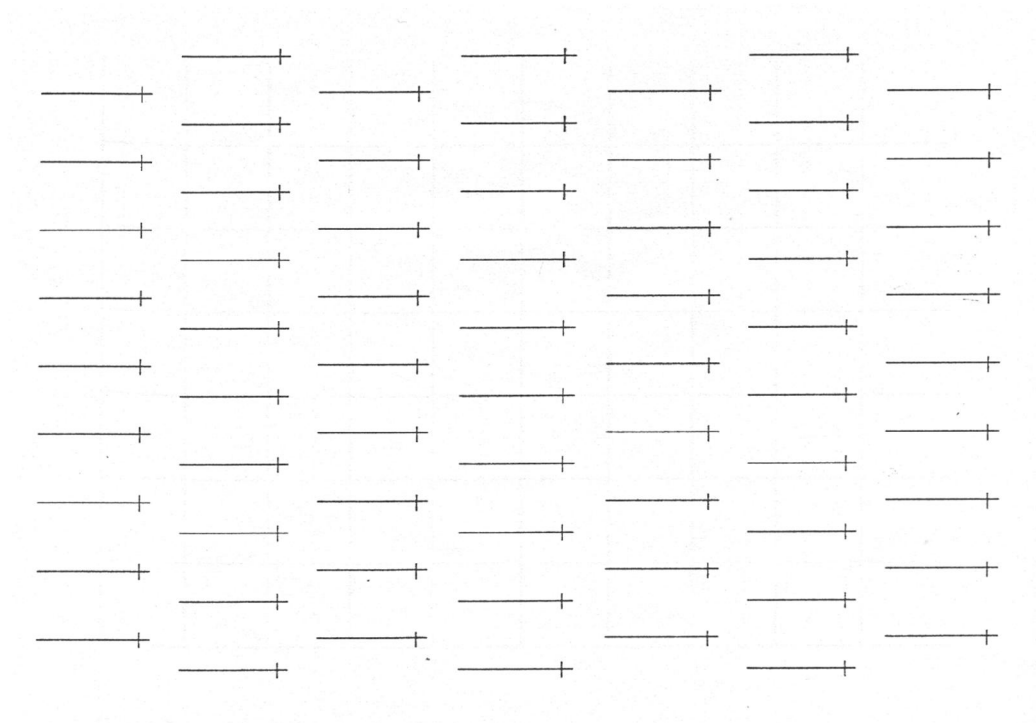
که CV ضریب واریاسیون (Coefficient of variation, CV) توزیع عددی حجم ذره می باشد. وقتی CV صفر شود V_V و V_N با هم برابر می شوند. در بقیه موارد V_V از V_N بزرگتر خواهد بود (Mayhew 1991; Sorensen 1991).



شکل 1-11 تفاوت حجم وابسته به حجم و حجم وابسته به تعداد. (a) مجموع ذرات با حجم متفاوت نشان داده می شود. (b) این ذرات براساس حجم شان در ظرف هایی مرتب شده اند. اطلاعات خام به دو طریق نشان داده شده است. هیستوگرام در (c) تعداد ذرات را در هر ظرف گزارش شده و توزیع وابسته به تعداد (Number-weighted) حجم می باشد. در هیستوگرام (d) حجم کلی عضو در هر ظرف گزارش شده که منجر به توزیع حجم وابسته به حجم (Volume-weighted) می باشد. باید توجه داشت که هر دو توزیع از یک سری یکسان ذرات بدست آمده است (Howard and Reed 1998a).

برآورد حجم به روش های مختلف امکان پذیر می باشد که روش های رایج عبارتند از 1) استفاده از ناحیه سطح مقطع شیء که روشی قدیمی و با تورش می باشد 2) استفاده از یک سری خطوط تست یا روش ترکیبی خطی توسط اندازه گیری طول Intercept (Point-sampled intercept, PSI) 3) استفاده از شبکه ای از نقاط تصادفی یا سیستماتیک.

مطالعات مقایسه ای نشان می دهد که سیستم نقطه ای با توزیع سیستماتیک کارآترین روش برای برآورد حجم از نظر هزینه و کار می باشد. چهل نقطه سیستماتیک، 25 بار کارآتر از چهل نقطه با توزیع تصادفی می باشد. برای صرفه جویی در وقت بهتر است که از سیستم تست چندمنظوره (Multipurpose test system) استفاده شود که از خطوط تست کوتاه منقطع تشکیل می گردد. این سیستم دارای نقاط و خطوط متفاوتی می باشد که می توان همزمان حجم، سطح و تعداد را اندازه گیری کرد (شکل 1-12). سیستم تست را می توان بر روی تصویر، مانیتور کامپیوتر یا قطعه چشمی میکروسکوپ قرار داد 4) روش Nucleator. در این روش ذره یا سلول را به عنوان کره در نظر گرفته می شود و حجم ذره براساس روش محاسبه حجم کره برآورد می شود (Mandarim-de-Lacerda 2003; Royet 1991).



شکل 1-12 گرید تست چند منظوره دارای خطوط با طول معین (l/p) همراه با یک نقطه برای برآورد ناحیه سطح و حجم بطور همزمان (Howard and Reed 1998a)

ساده ترین و رایجترین روش برآورد حجم استفاده از روش کاوالیری می باشد. در این روش از نمونه گیری چندمرحله ای یا چندسطحی (Multilevel sampling) استفاده می شود. مثلاً ابتدا حجم عضو با روش کاوالیری را اندازه گرفته، سپس تراکم یا کسر حجمی (Volume density or fraction) سلول در عضو با استفاده از نمونه گیری تصادفی سیستماتیک با میدان های میکروسکوپی برآورد می شود. این به سادگی با شمارش همه میدانهای مورد نظر و نقاط تستی که با سلول (P_{cell}) و با عضو یا فضای رفرنس برخورد می کنند (P_{ref}) امکان پذیر است. کسر $\frac{P_{cell}}{P_{ref}}$ یک

برآورد کننده بدون تورش $\frac{V_{cell}}{V_{ref}}$ می باشد. با این روش تراکم یا کسر حجمی بدست می آید که

درصد حجم یک ساختمان در حجم رفرنس یا حجم ساختمان دیگر می باشد. برای مثال با شمارش نقاط برخورد کننده با هسته و جسم سلولی می توان تراکم حجمی هسته را به راحتی بدست آورد.

در نمونه گیری چند سطحی مهم است که تعریف یک بخش خاص با حرکت از یک سطح به سطح بعدی سازگار باشد (Henrique et al. 2001; Jensen and Sorensen 1991; Mayhew 1991).

یک روش معتبر برپایه طراحی برای برآورد توزیع کامل حجم ذره استفاده از ترکیب روش های اصل کاوالیری و دایسکتور می باشد. اصل دایسکتور برای انتخاب ذرات بکار برده می شود و برای برآورد حجم هر ذره در برش های سریال از روش کاوالیری استفاده می گردد. در مطالعه حاضر برای برآورد حجم هسته و جسم سلولی نوروها از این روش استفاده شده است (Howard and Reed 1998a).

یکی از روش های دیگر برآورد کننده حجم، برآورد کننده براساس اندازه گیری های با خطوط ایزوتروپیک (Isotropically directed lines) از میان نقاط نمونه گیری تصادفی یکنواخت درون سطح مقطع ذره (مثل هسته یا جسم سلولی) می باشد. با استفاده از خطوط قطع کننده (Point-sampled intercept, PSI) می توان اندازه متوسط ذرات را با شکلهای مختلف بر روی برش تصادفی برآورد کرد. حداقل شرط لازم برای این روش این است که بتوان یک ذره را در سری سطح مقطع آن روی یک یا چند روش تشخیص داد. با استفاده از روش PSI احتمال اینکه یک نقطه تست تصادفی با ذره (هسته یا جسم سلولی) برخورد کند متناسب با حجم ذره می باشد، چون تعداد و ناحیه سطح مقطع ذره ای که در برش ها مشاهده می شود به حجم شان بستگی دارد. سیستم تست از یک سری خطوط موازی همراه با نقاط تست با توزیع یکنواخت (Uniformely distributed points) تشکیل می شوند. جهت خطوط بر روی نمونه بطور تصادفی تعیین می شود. این روش ساده، سریع و قابل تکرار برای برآورد اندازه ذره می باشد. در این روش گرید نقطه ای بطور تصادفی بر روی سطح مقطع برش نازک قرار داده می شود. برای هر شی که با گرید برخورد می کند، خطی از نقطه برخورد تا مرز سلول در یک جهت ایزوتروپیک کشیده می شود. طول این خط اندازه گیری می شود. برای کارایی بیشتر خط دیگری در 180 درجه نسبت به خط

اول کشیده می شود. میانگین طول دو خط نماینده میانگین طول خط شیء می باشد. این فرایند برای سطح کل فضای رفرنس سطح مقطع تکرار می شود. برای بدست آوردن حجم از روش PSI از فرمول زیر استفاده می شود:

$$V_V = \frac{\pi}{3 \times n} \times \sum l_0^3$$

که V_V میانگین حجم، n تعداد کل PSI و l طول خط Intercept می باشد. بهتر است که این خطوط اندازه مساوی داشته باشند (Artacho-Perula and Roldan_Villalobos 1994; Cruz-Orive and Hunziker 1987; Gundersen 1988; Reed and Howard 1998).

این روش با نوکلئاتور دو تفاوت دارد: اول اینکه سلول ها توسط نقاط با توزیع یکنواخت نمونه گیری می شوند. همانطور که اندکس V نشان می دهد نشان دهنده توزیع ذره در حجم می باشد، در حالیکه در نوکلئاتور سلول ها توسط دایسکتور از توزیع عددی ذره نمونه گیری می شوند. دوم اینکه نقطه نمونه گیری در PSI نقطه انتخابی وضعیت تصادفی دارد در حالیکه در نوکلئاتور اینطور نیست. در PSI چون نقطه در درون ذره تصادفی است نیازی به اندازه گیری در جهات مختلف وجود ندارد. چون نقطه خود بعد و جهت ندارد. ولی برای نوکلئاتور اندازه گیری در دو یا چند جهت ضروری می باشد. به همین جهت به جای ضریب $\frac{4\pi}{3}$ که در نوکلئاتور استفاده می شود، در فرمول

برای محاسبه حجم به روش PSI از ضریب $\frac{\pi}{3}$ استفاده می شود. روش PSI بیشتر برای بیوپسی

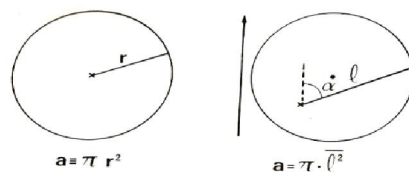
ها استفاده می گردد. تنها یک برش نازک از بیوپسی یا نمونه که ذاتاً ایزوتروپیک می باشد تهیه می گردد. در این روش اشیاء بر اساس بزرگی شان نمونه گیری می شوند و اشیاء بزرگتر شانس بیشتری دارند. این مخصوصاً برای سرطانها و متاستاز اهمیت دارد. این برآورد وابسته به حجم می باشد (Gundersen 1988; Gundersen et al. 1988a; Mouton 2002; Reed and Howard 1998).

چنانچه روش PSI را همراه با دایسکتور استفاده شود به آن Selector می گویند که روش نسبتاً کارآیی می باشد (Mayhew and Gundersen 1986).

Nucleator حجم مطلق و واقعی ذره را برآورد می کند. تمام روش بر روی نمونه گیری بدون تورش دایسکتور و اندازه گیری در جهت های ایزوتروپیک مستقل تکیه دارد. اصل نوکلئاتور براساس این ایده می باشد که میانگین طول خط بدست آمده از خطوطی که بطور تصادفی بر روی سطح مقطع جمعیتی از اشیاء قرار می گیرند از نظر تئوری برآوردکننده بدون تورش میانگین حجم اشیاء می باشد. برآورد کننده نوکلئاتور همراه با یک ابزار خطی یک بعدی بکار می رود. روش نوکلئاتور براساس حجم کره می باشد. برای بدست آوردن حجم کره از فرمول $V = \frac{4\pi}{3} \times r^3$ استفاده می شود که r شعاع کره می باشد. در این روش با استفاده از برش های ایزوتروپیک، سلول یا هسته یا شیء به عنوان کره در نظر گرفته می شود و حجم آن با اندازه گیری شعاع کره که از مرکز یا نقطه فرضی در مرکز سلول یا هسته (مثل هستک) تا مرز سلول و قرار دادن آن در فرمول محاسبه حجم کره محاسبه می گردد. در این محاسبه به جای شعاع میانگین طول خطوط قطع کننده سطح مقطع (l) استفاده می شود (شکل 1-13). به علت اینکه برآورد بدون تورش باشد اول اینکه برش ها باید ایزوتروپیک باشند، دوم اینکه اندازه گیری شعاع در جهات مختلف از نقطه مرکزی به مرز سلول باشد. از نقطه نظر عملی، پیشنهاد شده که در نوکلئاتور برآورد در چهار جهت از نقطه مرکزی، هسته یا هستک صورت گیرد. نقطه انتخابی درون سطح مقطع صحت برآورد را تحت تأثیر قرار نمی دهد. عامل مهم و ضروری این است که جهت خط از نقطه انتخابی به مرز سلول باید تصادفی باشد. منتها نقاط نزدیک مرکز (مثل هسته یا هستک در سلول) واریاسیون کمتری در برآورد ایجاد می کنند. برای محاسبه حجم به طریقه نوکلئاتور از فرمول زیر استفاده می شود:

$$V_N = \frac{4\pi}{3} \times l^3$$

که V_N میانگین حجم وابسته به تعداد و l میانگین طول فاصله نقطه انتخابی تا مرز یا کنار سلول یا ذره می باشد (Gundersen et al. 1988a; Mayhew 1991; Mouton 2002).



شکل 13-1 اصل نوکلئاتور. ناحیه یک دایره از فرمول $a = \pi r^2$ بدست می آید که r شعاع دایره می باشد (سمت چپ). در صورتی که نقطه در مرکز نباشد، به جای شعاع از میانگین فاصله نقطه تا مرز در جهات مختلف می توان استفاده کرد ($a = \pi l^2$). از این روش (Nucleator) می توان جهت

$$V = \frac{4\pi}{3} \times l^3. \text{ (Mouton 2002)}$$
 بدست آوردن حجم ذره استفاده کرد

در استریولوژی می توان میانگین اندازه ذره را بطور غیرمستقیم با استفاده از ترکیبی از برآورد کننده های نسبی استریولوژی بدست آورد. مثلاً میانگین حجم وابسته به تعداد، V_N ، را از برآورد تراکم حجمی (V_V) و تراکم عددی (N_V) را از فرمول زیر محاسبه کرد (Howard and Reed 1998a):

$$V_N = \frac{V_V}{N_V}$$

8-2-1 روش های برآورد ناحیه سطح ذره

تراکم سطحی (Surface density, S_V) ناحیه تماس (Interface) درون یک حجم رفرنس واحد می باشد (مثل ناحیه سطح تبادل گاز در حجم واحد ریه یا ناحیه سطح یک هسته). چنانچه از یک سیستم تست حاوی خطوط تست دوبعدی ایزوتروپیک تصادفی یکنواخت (Isotropic uniform random, IUR) بر روی برش استفاده شود، سطح یک جسم محدب (مثل سلول) متناسب با تعداد تقاطع خطوط با سطح شی (Intersection) و طول خطوط تست می باشد (Baddelly and

Gundersen 1986; Howard and Reed 1998a; Howard and Reed 1998b; Kubinova and Janacek 1998; Regeur 2000)

برای برآورد سطح ضروری است که مجموعه موقعیت برش ها کاملاً تصادفی باشد. در مورد برآورد حجم و تعداد وضعیت برش یا شیء مهم نمی باشد. چون برآورد حجم با نقاط بدست می آید (اصل کوالیری و شمارش نقاط) و نقطه بدون بعد می باشد و از هر طرف یا زاویه ای غیر قابل مشاهده می باشد، تغییر وضعیت یا چرخاندن برش یا بافت تأثیری بر برآورد حجم ندارد. در مورد تعداد نیز چنین وضعیتی صادق می باشد. اما در مورد برآورد طول (Length) و ناحیه سطح (Surface area) چون ابزار دارای بعد می باشند، چگونگی چرخاندن برش ها در ارتباط با ابزار مهم می باشند. طول و سطح در تصاویر دوبعدی که برای اندازه گیری بکار برده می شوند قابل مشاهده می باشند و به وضعیت شیء در فضا بستگی دارد. اندازه گیری در تصاویر دوبعدی وقتی معتبر است که تضمین شود اشیاء مورد تحقیق ایزوتروپیک باشند. این بدان معنی است که وضعیت آنها در فضا باید کاملاً تصادفی باشد. در طبیعت این وضعیت بندرت یافت می شود و اثبات آن نیز مشکل می باشد. به همین خاطر، ایزوتروپی باید توسط روش های بافت شناسی مورد کاربرد (مثل برش بافت) یا بوسیله ایزوتروپی ابزار مورد استفاده فراهم گردد. در نتیجه، برآورد طول و سطح از نظر تکنیکی کمی مشکل تر از برآورد حجم و تعداد می باشند. برای مثال، اگر یک ورقه در یک اتاق در نظر گرفته شود و پیکانهایی به درون اتاق پرتاب گردد، تعداد سوراخ های ایجاد شده بر روی ورقه (Intersections) به ناحیه سطح ورقه و طول پیکان ها بستگی دارد. اگر ورقه عمود بر جهت پیکانها باشد، میزان برخورد بسیار زیادتر از زمانی است که ورقه موازی جهت پیکان ها می باشد. بنابراین وضعیت ایزوتروپی بسیار مهم می باشد. برای این کار می توان بافت را به قطعات کوچک تقسیم کرد و قطعات کوچک بطور تصادفی بریده می شود. البته این روش، شناسایی بعضی ساختمان ها مثل هسته های مغزی را دچار مشکل می کند. برای حل این مشکل برش بافت در جهت دلخواه صورت می گیرد ولی ابزار مورد استفاده وضعیت تصادفی خواهد داشت. بدین منظور، از میکروسکوپ های متصل به کامپیوتر و برش

های نسبتاً ضخیم استفاده می شود. در این مورد زاویه برش ثابت می باشد و می توان سطوح برش معمول (مثل کروئال یا Sagittal) بکار برد تا اشیاء و ساختمان مورد نظر براحتی شناخته شوند. در عوض، کامپیوتر ابزار (Probe) را در جهات تصادفی قرار می دهد (Mayhew 1991; Mouton 2002; Slomianka 2004).

در این روش یک گرید مناسبی از خطوط بر روی نمونه قرار داده و تعداد برخورد خطوط با مرز شیء شمارش می شود. در عمل، استفاده از یک گرید خط تست که در آن یک نقطه (+) همراه با یک خط تست (مثل " + ----") می باشد ساده و راحت می باشد (شکل 1-12). با دانستن طول خط و تعداد برخورد می توان ناحیه سطح در واحد حجم شیء را برآورد کرد. البته گریدهای چهارگوش (Square grids) انتخاب می شوند، چون برای کاربران ساده ترین می باشد (Russ and Dehoff 2001).

برای بدست آوردن تراکم سطحی از فرمول زیر استفاده می شود:

$$S_v = \frac{2 \times \sum I}{l/p \times \sum P}$$

که l/p طول خط تست در نقطه گرید در سطح بافت، I تعداد تقاطع (Intersection) و P تعداد نقاط برخوردکننده با سطح رفرنس می باشد (Howard and Reed 1998a; Howard and Reed 1998b; Mathiasen et al. 1991; Mathieu et al. 1981; Regeur 2000).

روش دیگر برآورد ناحیه سطح استفاده از روش نوکلئاتور می باشد. در این روش شیء به صورت یک دایره یا کره در نظر گرفته می شود. ناحیه سطح کره از فرمول $S = \pi r^2$ محاسبه می گردد که r شعاع دایره یا کره می باشد. ولی چنانچه از نقطه ای درون دایره ناحیه سطح محاسبه شود، فاصله نقطه تا مرزهای دایره در جهات مختلف اندازه گیری شده و میانگین آن به عنوان شعاع در نظر گرفته می شود (شکل 1-13). در مورد اندازه گیری سطح اشیاء مثل سلول ها به روش نوکلئاتور از فرمول زیر استفاده می شود:

$$S = \pi l^2$$

که l میانگین فاصله نقطه درون شیء تا مرز های آن در جهات مختلف می باشد. برای برآورد به روش نوکلئاتور نیز ایزوتروپی ضروری می باشد. همچنین نقطه انتخابی باید منحصر به فرد و قابل تشخیص باشد (مثل هسته یا هستک) و بدون توجه به جهت برش یک نقطه ثابتی باشد (Gundersen et al. 1988a).

با استفاده از تراکم سطحی (S_V) و حجم رفرنس (V_{ref}) می توان ناحیه سطح کل (S) را از فرمول زیر محاسبه کرد:

$$S = S_V \times V_{ref}$$

9-2-1 تورش (Bias)

تورش به معنی اختلاف بین میانگین یک برآورد و مقدار واقعی پارامتر می باشد برآوردی بدون تورش (Unbiased) می باشد که برآورد مورد انتظار با اندازه واقعی برآورد مساوی باشد. این یک مفهوم آماری است که به معنی "بدون انحراف سیستماتیک از اندازه واقعی" می باشد. عدم تورش یک برآورد در استریولوژی به تصادفی بودن و وضعیت های نقاط تست بستگی دارد. این بدان معنی است که امکان یکنواختی در انتخاب داشته باشد. با بکاربردن روش براساس طراحی (Design-based approach) یا نمونه گیری تصادفی سیستماتیک می توان برآورد بدون تورش و کارآمد بدست آورد. این نمونه گیری تصادفی سیستماتیک یکنواخت در تمام سطوح نمونه گیری باید انجام شود. بدون نمونه گیری تصادفی هیچ راهی برای برآورد بدون تورش وجود ندارد. بدون تورش بودن تحت تأثیر تعداد برش، تعداد دایسکتور و اندازه دایسکتور قرار می گیرد. تورش در آزمایش خطرناک می باشد، چون معمولاً نمی توان آن را تشخیص داد (Baddely 2001; Larsen 1998; Mattfeldt 1989; Rajapakse 2000; West 1999a; West and Gundersen 1990).

در استفاده محاوره ای، تورش (Bias) به سوء تعبیر یا بدفهمی عمدی اشاره می کند. تورش در آزمایش خطرناک می باشد چون منجر به نادرستی (Inaccuracy) برآورد می شود و وقتی تورش وجود دارد، نمی توان آن را تشخیص داد یا اندازه گرفت یا حذف کرد. ولی می توان منابع تورشهای استریولوژیکی را تعیین کرد و آنها را به حداقل رساند یا حتی حذف کرد. تورش ها را می توان به دو گروه تورش های استریولوژیکی و تورش های غیراستریولوژیکی تقسیم کرد. تورش های استریولوژیکی مثل عوامل تصحیح غلط، مجموع ابعاد ابزار و پارامتر کمتر از 3 و مدل های غلط فرضی می باشند که از منابع تئوریک ناشی می شوند در حالیکه تورش های غیر استریولوژیکی مثل تورش ناشی از رنگ آمیزی ناقص، کالیبراسیون نامناسب و دیگر تورش های پردازش بافتی و تورش فرد اجراکننده (Operator bias) و محاسبات غلط از کاربرد عملی روش های استریولوژیکی بر روی بافت بیولوژیکی منشاء می گیرند. مراحل ضروری برای اجتناب از تورش عبارتند از: 1) انتخاب تصادفی افراد از جامعه مورد نظر 2) تعیین مرز فضای رفرنس 3) اجرای نمونه گیری سیستماتیک اشیاء در فضای رفرنس 4) شمارش تعداد کل اشیاء (یا اندازه گیری حجم یا سطح اشیاء) در حجم معینی از فضای رفرنس 5) بستن تناسب برای برآورد پارامتر مربوطه در کل فضای رفرنس (Mouton 2002).

10-2-1 کارایی (Efficiency)

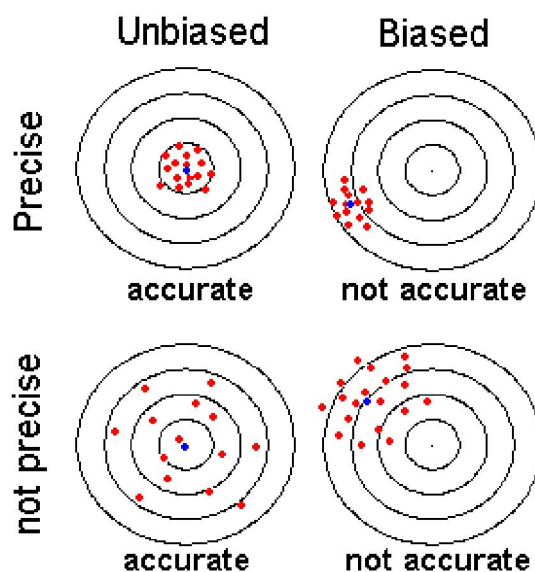
برآورد کننده ای را کارآتر می گویند، اگر اندازه نمونه مورد نیاز برآوردها برای رسیدن به یک ضریب خطای پایین کمتر باشد. یعنی حداقل برش و نمونه گیری (کار کم)، هزینه پایین (آماده کردن برش ها) و زمان کمتری نیاز است ولی ضریب خطای کمتری خواهد داشت. میزان نمونه بیشتر صحت برآوردها را افزایش می دهد. لیکن، شمارش نقاط تست زیاد که با شیء برخورد می کنند، خسته کننده و وقت گیر می شوند. صحت اندازه های استریولوژیکی به تعداد تکرار برآورد و فضای گزید مورد استفاده بستگی دارد. کارایی یک طرح استریولوژیکی مهم می باشد چون آن تعیین می کند

که چند بار تکرار اندازه گیری مورد نیاز می باشد تا بتوان برآورد صحیحی در عمل بدست آورد. کارایی با یک تغییرپذیری (Variability) کم، بعد از صرف مقدار متوسط زمان می باشد (Gundersen et al. 1998b; Mandarin-de-Lacerda 2003; Rajapakse 2000).

شکل 1-14 تفاوت و رابطه بین تورش (Bias)، صحت (Accuracy) و دقت (Precision) را بطور شماتیک نشان می دهد. دقت بیشتر برآورد کننده، باعث واریاسیون کوچکتر و صحت بیشتر باعث تورش کمتر می شود (Schmitz 1998).

11-2-1 صحت (Accuracy)

برآوردی را صحیح (Accurate) می گویند که اندازه متوسط تعدادی محدود از نمونه های برآوردها نزدیک به اندازه واقعی آن باشد. صحت اندازه های استریولوژیکی به تعداد تکرار برآورد و فضای گرید مورد استفاده بستگی دارد. صحت را با کاربیشتر نمی توان افزایش داد. صحت را می توان با استفاده از ابزار (Tools)، یعنی روش ها، که ذاتاً با عدم تورش همراهند ضمانت کرد. این در مورد روش های استریولوژی که با طراحی آزمایش و نمونه گیری تصادفی سیستماتیک یکنواخت شروع می شود و سپس با کاربرد یک سری ابزار (Probe) هندسی سه بعدی پیش می رود صادق می باشد (Artacho-Perula and Roldan-Villalobos 1994; Howard and Reed 1998a; Rajapakse 2000).



شکل 1-14 شرح شماتیک اختلاف بین صحت (Accuracy) و تورش (Bias) در نمونه گیری (مثلاً در پرتاب دارت). ردیف بالا صحت برخورد دارت را نشان می دهد که برخوردها نزدیک یکدیگرند. ردیف پایین صحت را نشان می دهد و برخورد پراکنده را نشان می دهد. در ستون سمت چپ میانگین توده برخوردها به طرف مرکز تمایل دارند که به معنی بدون تورش بودن است. ستون سمت راست با تورش می باشد (Mandarim-de-Lacerda 2003)

12-2-1 ضریب واریانس (Coefficient of variance)

برعکس عدم تورش، واریانس برآورد مرتبط به مقدار نمونه گیری اجرا شده در ذره خاص علاوه بر شکل، همگونی، موقعیت فضایی و چند عامل دیگر ذره می باشد. هر چه مقدار نمونه افزایش یابد، دقت برآورد نیز افزایش می یابد. واریانس (Variance) نسبی مشاهده شده بین افراد یا حیوانات برآوردهای تعداد یعنی ضریب واریاسیون، (Coefficient of variance, CV)، به عنوان انحراف معیار (Standard deviation, SD) برآوردهای تعداد تقسیم بر میانگین گروه محاسبه می

شود (Larsen 1998)، یعنی: $CV = \frac{SD}{mean}$

13-2-1 ضریب خطا (Coefficient of error)

با استفاده مشاهدات بر روی برش ها، امکان برآورد دقت (precision) برآوردها وجود دارد. این دقت بیشتر به عنوان ضریب خطا (Coefficient of error, CE) برآورد بیان می گردد. با روش نمونه گیری تصادفی سیستماتیک و دانستن میانگین برش های متوالی (n) می توان ضریب خطا را به روش ساده $CE = \frac{CV}{\sqrt{n}}$ محاسبه کرد که CV ضریب واریانس می باشد که از فرمول

$$CV = \frac{SD}{mean}$$

باشد. این فرمول وقتی معتبر می باشد که n مشاهدات مستقل باشند که بطور واضح در مورد برش های متوالی صحیح نیست. دقت برآوردها بیشتر توسط تعداد برش های مورد استفاده در آنالیز تحت تأثیر قرار می گیرد تا تعداد نمونه های دایسکتور که در برش استفاده می شود. دانستن ضریب خطا به محققان امکان انتخاب روش مناسبتر برای کارشان را می دهد. به همین منظور خیلی از محققین قبل از شروع ضریب خطا را پیش بینی می کنند. راههای مختلفی برای پیش بینی ضریب خطا وجود دارد که یکی استفاده از فرمول $CE = \frac{1}{\sqrt{\sum Q^-}}$ که Q^- تعداد متوسط سلول شمارش شده

می باشد یا $CE = \frac{1}{\sqrt{n}}$ می باشد (Hedou et al. 2000; Mathiasen et al. 1991; West and Gundersen 1990).

برای محاسبه ضریب خطا از فرمول های مختلفی استفاده می شود. رایجترین آنها استفاده از فرمول Gundersen and Jensen (1987) می باشد که به صورت زیر می باشد:

$$CE = \frac{\sqrt{(3A + C - 4B)/12}}{\sum a_1}$$

که $A = \sum (a_1 \times a_1)$ ، $B = \sum (a_1 \times a_{1+1})$ ، $C = \sum (a_1 + a_{1+2})$ می باشد. a_1 تعداد نقاط شمارش شده (درمورد برآورد حجم یا سطح) یا تعداد نوروں شمارش شده (در برآورد تعداد) در اولین برش

ازبرش های انتخابی ساختمان مورد نظر می باشد. a_{l+1} تعداد نقاط شمارش شده یا تعداد ذره شمارش شده در برش بلافاصله بعد از برش a_l می باشد. a_{l+2} برش انتخابی بلافاصله بعد از برش a_{l+1} می باشد. برای مثال اگر شمارش نقاط یا تعداد بر روی 10 برش از ساختمان که بطور تصادفی سیستماتیک یکنواخت انتخاب شده، صورت گرفته است، a_l تعداد نقاط یا تعداد ذره شمارش شده بر روی برش اول، a_{l+1} تعداد نقاط یا تعداد ذره شمارش شده بر روی برش دوم، a_{l+2} تعداد نقاط یا ذره شمارش شده بر روی برش سوم و به همین ترتیب می باشد (جدول 3-1). Gundersen و همکارانش در 1999 اظهار داشتند که ضریب خطای واقعی در مورد استریولوژی از فرمول بالا هم کمتر می باشد. به همین دلیل در فرمول جدید پیشنهادی آنها به جای عدد 12 در زیر رادیکال از عدد 240 استفاده کرده اند که حتی با تعداد 5 تا 6 برش به روش سیستماتیک و در حدود 100 نمونه برای تعداد، حجم یا طول، ضریب خطای زیر 10٪ بدست می آید. منتها برای اطمینان زیاد همان 10-12 برش انتخاب می شود. فرمول جدید Gundersen و همکارانش که در سال 1999 ارائه گردید به صورت زیر می باشد:

$$CE = \frac{\sqrt{(3A + C - 4B) / 240}}{\sum a_l}$$

ساده ترین روش برای محاسبه ضریب خطا استفاده از فرمول زیر می باشد که از خطای معیار میانگین (Standard error of mean, SEM) استفاده می شود:

$$CE = \frac{SEM}{mean}$$

این فرمول تقریباً معادل فرمول ارائه شده توسط Gundersen and Jensen در 1987 می باشد. این روش محاسبه ضریب خطا برای برآورد اشیاء مثل حجم، تعداد و غیره از برش هایی که به روش تصادفی سیستماتیک انتخاب شده برای سالها رایج بوده است. ضریب خطا به دو عامل طراحی نمونه گیری و اندازه نمونه بستگی دارد که هر دو عامل را می توان کنترل کرد (Andersen and Gundersen 1999; Dorph-Petersen et al. 2001; Gundersen and Jensen

1987; Gundersen et al. 1999; Howard and Reed 1998a; Ishiyama et al. 2001).

جدول 1-3 نقاط شمارش شده در ده برش برای برآورد حجم بخش پشتی و محاسبه ضریب خطا

شماره برش	نقاط شمارش شده (a_1)	$a_1 \times a_1$	$a_1 \times a_{1+1}$	$a_1 \times a_{1+2}$
1	133	17689	13699	11039
2	103	10609	8549	9476
3	83	6889	7636	9047
4	92	8464	10028	8280
5	109	11881	9810	7957
6	90	8100	6570	9450
7	73	5329	7665	11388
8	175	11025	16380	9660
9	156	24336	14352	-
10	92	8464	-	-
	$\Sigma a_1 = 1036$	A = 112786	B = 94689	C = 76297

ضریب خطای برآورد شده برای این برآورد حجم طبق فرمول Gundersen و همکارانش (1999)

به صورت زیر محاسبه می گردد:

$$CE = \frac{\sqrt{[(3 \times 112786) + 76297] - (4 \times 94689) / 240}}{1036} = 0.01$$

۳-۱۲- روش تمایز نورون ها از سلول های گلپال

قبل از شمارش یا اندازه گیری حجم و سطح نورون ها، بایستی معیاری جهت تشخیص نورون-ها از سلول های غیر نورونی شامل سلول گلپال و سلول اندوتلیال تعیین می شد تا در شمارش تعداد نورون یا اندازه گیری پارامترها اشتباهی رخ ندهد. برای این منظور وجود یک یا چند مشخصه زیر در نظر گرفته شد:

(1) سیتوپلاسم واضح و فراوان با اجسام نیسل درون جسم سلولی نورون

(2) وجود زواید سلولی در نورون

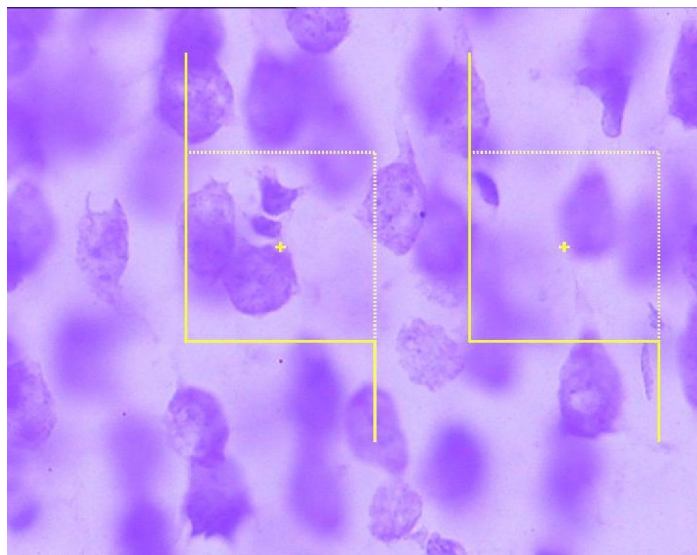
(3) وجود یک هستک واضح در نورون و فقدان آن در غیرنورون

4) ماده یوکروماتین درون هسته‌های بزرگ نورون در مقابل توده‌های هتروکروماتین در هسته-

های کوچک غیرنورون

5) اندازه‌ی بزرگتر نورون‌ها در برابر غیرنورون‌ها (117, 118).

لازم به ذکر است که استفاده از اوپتیکال دایسکتور و عدسی روغن ایمرسیون $\times 60$ قدرت تشخیص خوبی برای غیرنورون‌ها از نورون‌های کوچک فراهم می‌کند.



شکل ۳-۱۲- ابزار اوپتیکال دایسکتور برای برآورد تراکم عددی نورون‌های مغز

۳-۱۳- روش تشخیص و معیارهای سلول مرده و زنده

این معیارها توسط فاربر و همکاران و نیز ترامپ و همکارانش معرفی شدند که ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول‌های برگشت ناپذیر از ایسکمی را این گونه خلاصه کرده‌اند: سلول‌هایی که با هسته‌های پیکنوتیک، متراکم و قطعه قطعه با کروماتین در حال تخریب که به صورت نامنظم در سیتوپلاسم قرار دارند و نیز اتوزینوفیلی سیتوپلاسمی و با از دست دادن میل به همتوکسیلین شناسایی می‌شوند (119-121). در این مطالعه تراکم عددی و تعداد کل سلول‌های مرده در نواحی مختلف مغز نیز با روش دایسکتور اوپتیکال برآورد گردید. لازم به یادآوری است که با رنگ آمیزی معمول کرزیل ویوله نمی‌توان به قطعیت گفت که این نورون مرده دچار نکروز یا آپوپتوز شده است. به همین دلیل در این مطالعه از واژه ی نورون مرده استفاده می‌شود.

The basic morphology of a normal neuron in cresyl violet staining consists of a large cell body or perikaryon with the neurites (dendrites and axon) emerging from the cell body, Nissl substance in perikaryon) and dendrites), and the identifiable nucleus that is invariably pale or euchromatic with discrete nucleolus. Also, the nuclei of the neurons are round or ovoid; the nuclear envelope frequently has indentations and folding, which are not usually visible in the non-neuron cells like astrocytes at the light microscope. Besides, large neurons virtually lack heterochromatin exception for one to four small granules attached to their large and well-defined nucleolus. A narrow rim of the cytoplasm circling the entire nucleus represents a valuable feature to distinguish the small neurons from the astrocytes. Ultimately, we also evaluated the percentage of dead cells in the hypothalamus in different groups. Dead cells (i.e. apoptotic or necrotic cells) display accumulation of dense globular material in the cytoplasm with evidence of nuclear fragmentation, shrunken perikarya, and darkly stained nuclei of reduced.

Reference:

Namavar MR, Ghalavandi M, Bahmanpour S. The effect of glutathione and busserelin on the stereological parameters of the hypothalamus in the cyclophosphamide-treated mice. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 110 (2020) 101871

برای تشخیص انواع سلول گلیا و سلول اندوتلیوم رگ ها در رنگ آمیزی کرزیل ویوله به مقاله زیر مراجعه نمایید:

García-Cabezas MÁ, John YJ, Barbas H and Zikopoulos B (2016) Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front. Neuroanat.* 10:107. doi: 10.3389/fnana.2016.00107

موفق و شاد باشید