

QUANTITATÍV HISZTOLÓGIAI MÓDSZEREK NEUROANATÓMIAI FELHASZNÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

PALKOVITS MIKLÓS

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Anatómiai Intézete, Budapest

A quantitív szövettani módszerek mindjobban elterjedtek a központi idegrendszer vizsgálatában és ez a tendencia várhatóan tovább folytatódik. A quantitív hisztológia mai elméleti és technikai fejlettsége mellett nehéz lenne olyan területet találni a központi idegrendszerben, ahol a hisztológia ezen ágának ne lennének meg a további lehetőségei; ugyanakkor az agy egyetlen területéről sem mondhatjuk el, hogy ott ezt a lehetőséget maximálisan kihasználtuk volna. A vizsgálatokat az alábbiak szerint csoportosíthatjuk:

I. Alapműveletek: 1. geometriai mérések, 2. numerikus vizsgálatok, 3. denzitás (fotometriás) mérések.

II. Számítások alapműveleti adatok felhasználásával: 1. mérendő test szabad felszínének (palástjának) meghatározása, 2. volumenszámítások.

III. Összetett quantitív analízisek, melyek egy konkrét kérdést több művelettel tudnak megoldani.

Valamennyi quantitív műveletre egységesen érvényes kautélák vonatkoznak:

a) A hisztotechnika okozta *zsugorodás* meghatározása. Ez még lineáris méréseknél is jelentős (10–30%), de felszínmérésnél, vagy volumenszámításnál ez négyzetesen vagy köbösen jelentkezik és alapvetően befolyásolja az eredményeket [31]. A rutinszerűen alkalmazott paraffinbeágyazás, az egyszerű festések (haematoxin-eozin, luxol fast blue-krezilbolya) lineáris zsugorítása 20–25%-os, de pontos méréseknél, különösen összehasonlításoknál, minden agynál ajánlatos a zsugorodást ismételten mérni.

Az altatott állat fejét sztereotaktikus készülékbe fogjuk be. Túvel, vagy finom késsel két vagy több helyen, ismert távolságban behatolunk az agyba. A hisztotechnikai feldolgozás végén a metszeten visszamerjük a két behatolás közötti távolságot. Az eredeti és a mért érték aránya megadja a lineáris zsugorodást.

b) *Térbeli orientáció.* Quantitív hisztológiai analízisnél szükséges az agyak metszési síkjának ismerete. Rendszerint a frontális síkban metszünk, ilyenkor szükséges egy tetszés szerinti 0 pont felvétele (rendszerint a bregma-

vonaltól való távolsággal adhatjuk meg. E két koordináta ismerete megfelelő térbeli orientációt biztosít.

A frontális síknál egységesen meg kell adni, hogy az milyen pozícióban levő anyagra vonatkozik, különben használata illuzórikus. Ha nagyagy-köztigagy területen kívánunk mérni, a fej előre döntése a sztereotaktikus készülékben („nose-down” positio) relatíve kicsi, általában 5° , ami azonban speciestől függően változik. Az agytörzsben végzett méréseknél a frontális sík az agytörzs hossz tengelyére kell, hogy merőleges legyen, a fej dőlési szöge ebben az esetben nagyobb, általában $15-45^\circ$.

c) *Metszetvastagság.* A metszetvastagság szintén figyelemre méltó tényező. Szerepét az idegsejtek számának meghatározásánál részletesen vizsgálták és alkalmazandó korrekciós faktorokat dolgoztak ki [43]. A metszetvastagságok azonosságára összehasonlító vizsgálatoknál kell törekedni. Sok esetben sorozatmetszetekkel dolgozunk, ezek komplett volta a rekonstrukció alapkövetelménye.

Abban az esetben, ha a sejt-neuropil arányt kívánjuk meghatározni, rendszerint CHALKLEY-módszerrel [1], a metszetvastagság nem haladhatja meg a neuronok átlagos átmérőjét, mert ilyen esetben eleve nem mérhető a metszetben a sejt „alatt” és „felett” levő neuropil [5]. A metszetvastagság a számolásnál gyakran, mint önálló paraméter szerepel, ezért a hibahatárt itt is 5%-ban kell megállapítani. Vastag metszeteknél a technikai (metszési) hiba nem játszik számottevő szerepet, de 10μ alatt már lényeges lehet. Ez esetben szükségessé válhat a vastagság ellenőrzése. Erre a hisztotechnika több lehetőséget ismer, ezek részletezése nem feladatunk.

A metszetvastagság szerepet visz abban a gyakori esetben, ha a metszeten belüli testek intenzitásában eltérnek egymástól. A sötétebb testek a projiciált képen nagyobb területet látszanak elfoglalni, mint tényleges méretük, míg a világosabbak kisebbet (HOLMES-effektus [22]). E hatás néha jelentős torzítást (különösen a különböző frakciók térbeli megoszlásának vizsgálatakor) korrekciós faktorokkal küszöbölhetjük ki [47].

I. Alapműveletek

Ide soroljuk a konkrét méréssel vagy számolással nyerhető paraméterek meghatározását. Ezek a vizsgálatok történhetnek kizárólag ebből a célból, de rendszerint további számításokhoz szolgálnak numerikus értékkel.

A geometriai mérések (lineáris és felszínmérések), numerikus vizsgálatok (leszámolás, numerikus denzitás, illetve parciális megoszlások meghatározására) történhetnek mind fény-, mind elektronmikroszkópos anyagon. A denzitásmérések fő területe a hisztokémia, de alkalmazhatjuk fény- és elektronmikroszkópnál, továbbá fluorescens mikroszkópos vizsgálatoknál is.

1. Geometriai mérések a központi idegrendszer kvantitatív hisztológiai analízisében

A mikroszkópos képen végzett egyszerű mérések számos fontos meghatározás alapját képezhetik. A mérések lehetnek mechanikusak (kézzel végzett mérés mikrofotón, kivetített képen, visopanon, vagy akár rajzolómikroszkóp felhasználásával), vagy automatikusak (mikroszkóp pantográf használatával). Mindegyiknek a lényege távolságmérés, kerületmérés vagy felszínmeghatározás.

a) *Lineáris mérések*: lehetnek egyszerű távolságmérések, átmérők (axonok, sejtmagok, nucleolusok) mérése vagy kerületmérések. A szabályos vonalak mérése nem okoz problémát, a szabálytalan alakú idom kerületét kurviméterrel határozhatjuk meg. A fél- és teljes automatizált méréseknél (computer mikroszkópp, [54, 12], mikroszkóp pantográf [42, 13, 21] egy mérőpont mozog koordinátarendszerben automatikusan és a kiindulóponttól méri a megtett út távolságát, és kívánatra a kiindulópontra visszatér és új irányban mér ismét. Klasszikus alkalmazási területe a központi idegrendszer vizsgálatában a dendritfa összhosszúságának meghatározása, de rekonstrukciós modell készítésére is jól használható.

Egyszerű lineáris mérések (sejtmag átmérőinek mérése) szolgálnak a karyometriai vizsgálatok alapjául.

A lineáris mérések eredménye függ a mérőeszköz finomságától és pontosságától, a pontosan bemért nagyítástól, a mikroszkóp feloldóképességétől és a mérés számától. Projekció esetén általában $3000\times$ nagyítás a legjobb, még éles képet adó maximális nagyítás. Tekintettel arra, hogy a lineáris mérések nagy része további számítások alapjait képezik, melyek során az értékek néha hatványozottan kerülnek felhasználásra, maximális pontosságra kell törekedni. Az 5%-os hibahatár olyan követelmény, melyet nem lehet túllépni, ennek elérését a mérési feltételekkel kell biztosítani.

A lineáris méréseknél gyakran előforduló hiba, a vetített képek széli torzítása — mely elérheti a 15%-ot is —, erre ügyelni kell.

b) *Felszínmérések*. Legegyszerűbb és leggyakoribb formája a planiméter alkalmazása [39]. E módszernek van gépi kifejlesztése is (computer mikroszkóp), ahol egy jelzőpont járja körül a mérendő testet automatikusan és regisztrálja az értéket — szükségszerűen még koordinátarendszerben is [17]. Ezzel szemben még használatosak régi módszerek is: papírsúly meghatározás a vizsgálandó test kivágását követően [14, 41], vagy akár a mérendő testnek különböző méretű kör- vagy ellipszissablonokkal történő meghatározása [7, 8, 9], mely elven a részecske nagyság analízáló (Teichengrössen-analizátor, Opton) is alapszik [6]. Használhatnak különböző finomságú grideket is és leszámolják, hogy a vizsgált test hány ismert méretű kockát fed. Ugyanígy a mikroszkópos képet milliméterpapírra is vetíthetjük és a testeket arra kirajzolva kiszámolhatjuk azok metszési felszínének területét (square-counting method).

Felszínméréseknél a zsugorodás négyzetes tényező, elhanyagolása műhibának számít. A másik igen fontos faktor a metszés, illetve a metszési sík. Általában szükséges meghatározni, hogy a mérendő testek random (diffúz) eloszlásúak-e a térben, vagy irányított elrendezésűek. Ez befolyásolja a kapott értékek eloszlási görbáját, mert míg a random eloszlásúnak a Gauss-eloszlást kell hogy megközelítse, addig a rendezett idomok görbéje attól függ, hogy a metszések síkja a testek (hacsak nem gömb alakúak) mely tengelyével párhuzamos.

2. Numerikus vizsgálatok

Alapja a vizsgált testek egyszerű leszámolása. Kérdéses, annak a területnek a meghatározása, melyben a számolt képletek találhatóak. Ez megadja a vizsgált idom sűrűségét egy adott metszési felszínen. A végleges cél, a darabszám ismerete egy meghatározott volumenben; így a területet a metszetvastagsággal szorozni kell. A metszetvastagság meghatározásánál korrekciós faktorok (FLODERUS-korrekció [10]) használata szükséges, melyek a vizsgált testek méretének függvényei. A darabszám egységnyi tömegről vonatkoztatva a numerikus sűrűséget (denzitást) adja meg.

A numerikus vizsgálatoknál lényeges a helyes mintavétel. Tetszés szerinti számú (matematikailag természetesen elegendő számú) minta vehető a térben diffúzan elhelyezkedő testekből. Ha ez nem áll fenn, akkor a méréseket a vizsgált terület sorozatmetszetein kell elvégezni, ahol a mintavétel egymástól egyenlő távolságú metszeten történik.

A gyakorlatban igen elterjedt az idegsejtek számának meghatározása, illetve egyes magok, areák sejtsűrűségének mérése. A sejtek helyett azok sejt-magjait, vagy nucleolusait számoljuk le. Ez utóbbi adja a valósághoz legközelebb álló értéket. Mind elméletileg, mind gyakorlatilag igazolódott [16], hogy helyes korrekciós faktorok alkalmazásával (ezek közül legegyszerűbb és legalkalmasabbnak a FLODERUS-korrekció [10] tűnik) a számolási hiba $\pm 4\%$ alá szorítható. Az idegsejtek számának meghatározásánál figyelembe veendő kautélákat HAUG [16] és TREFF [43] a gyakorlati kívánalmak szellemében jól csoportosították.

A numerikus vizsgálatok nemcsak abszolút, de relatív, adott területen belüli testek egymáshoz való számarányának meghatározására is szolgálnak. Ez esetben végezhetjük a méréseket szeparáltan és a végeredményeket hasonlítjuk össze; de történhet a számolás párhuzamos is. Ilyenkor azonban nem szabad elfelejteni, hogy a különböző méretű testekhez különböző nagyságú terület tartozik, függetlenül attól, hogy azonos képen számolunk, hiszen a nagyobb testek metszési valószínűsége azonos távolságban készített metszeten nagyobb, mint a kisebb idomoké. (A metszetvastagságot valamennyi mért idomnak megfelelően különböző nagyságú korrekciós faktorokkal kell szo-

rozni.) Ez esetben természetesen a felszínen mért partikuláris denzitás nem egyezik a területi partikuláris denzitással. Ez nagy diszkrepanciát eredményez a szubjektív megítélés és a valódi numerikus értékek között, ezért ilyen esetben találkozunk számos hibás eredménnyel, téves impresszióból adódó feltételezésekkel.

A részecskék számának automatikus meghatározására is számos fél- és teljesen automatizált műszert készítettek [24, 17, 3, 34]. Működésük két lépésből áll: a vizsgálandó terület letapogatása (scanning módszer) és látóterenkenti leszámolás, az értékek összegezése. Komputerek felhasználása mind a mérés, mind a számolás területén az egész numerikus meghatározást rutinműveletté egyszerűsítette.

A mikroszkópos kép numerikus kiértékelésének egyik alkalmazási területe az autoradiográfia. A leszámolt szemcseszámot vonatkoztathatjuk területre vagy sejtre, melyen a szemcsék elhelyezkednek. A számolást ezen a területen is automatizálták [44].

3. Sűrűségmeghatározások

A denzitóméterek és spektrofotométerek által meghatározható denzitás nem numerikus denzitás, hanem anyagdenzitás, ahol a vizsgálandó test anyagának valamely jellemzőjét szeparáltan tudjuk megjelentetni (hisztokémiai reakciók, fluorescens aktivitás, fényvisszaverés, fényelnyelés stb.) és mérni. A mérések alapelve: intenzitáskülönbségek összehasonlítása meghatározott spektrumon belül. A kapott érték vonatkoztatása különböző lehet. Mérhetjük a metszési felszín teljes területét; ilyenkor a spektrumot a kívánt méretre szűkítjük. Mérhetünk egy olyan meghatározott területen sűrűséget, mely a vizsgált területnél kisebb. Ez a forma a mintavétel esete. Ilyenkor a vizsgált terület lépésről lépésre letapogatjuk (scanning módszer). Az ilyen mérések műszerezettsége rendkívül fejlett [35] és mindegyike külön stúdiumot kíván, viszont alkalmazásukkor kiegészítő mérések szükségesek. A sűrűséget vonatkoztathatjuk darabra (sejtre); ez esetben szükséges a darabszám ismerete; vonatkoztathatjuk egységnyi tömegre (sejt $1 \mu^3$ -jára, adott areák $1000 \mu^3$ -jára, stb.), ezt fajlagos denzitásnak nevezzük és ilyenkor a vizsgált test tömegének ismerete szükséges.

II. Számítások alpműveleti adatok felhasználásával

Lineáris vagy felszínmérésekből a vizsgált idom további paramétereit számíthatjuk ki. A harmadik dimenzióknak illetően való meghatározásával foglalkozik a stereológia.

A központi idegrendszer struktúráinak nagy része a térben rendezett, ezért méréseinknél előnyös, ha legalább két síkban metszett anyaggal rendel-

kezünk (leggyakrabban használatos a frontális és sagittalis sík), melyek a harmadik dimenzióba való kiterjedés kiszámítását lehetővé teszik. Ajánlatos, hogy a még randomnak tűnő megoszlásoknál is több dimenziós kontrollméréseket végezzünk és csak akkor fogadjuk el a diffúz eloszlás tényét, ha a bármely síkban végzett mérések eredményei egymástól nem térnek el szignifikánsan.

A leggyakrabban alkalmazott számítások a mérendő test felszínének (palástjának) és volumenének meghatározására irányul.

1. *A mérendő test szabad felszínének (palástjának) meghatározása.* A központi idegrendszeren végzett mérések feladatai között gyakran szerepel. Kivitelezése egyszerű: sorozatmetszeteken kerületmérést végzünk kurviméterrel és az így kapott értéket a metszetvastagsággal, illetve a két szomszédos metszet közötti távolsággal besorozzuk. (Ügyelni kell a négyzetes zsugorodásra.) Pontos méréshez legalább két, különböző síkban metszett sorozatot kell lemérni, mert bonyolultabb idomnál a test felszíne helyenként a metszési síkkal paralel lehet és a két szomszédos metszet között „elveszhet”, vagy a metszési síkkal „szembefordul”, és ilyenkor a mérés torzít [31].

A palást igen fontos adatokat szolgálhat érintkező felületek meghatározásánál, egyes elemek térfoglalása egy adott test felszínén ezáltal numerikusan is kifejezhetővé válik. Így kaphatjuk meg a rétegesen, vagy a felszínen egy rétegben elhelyezkedő sejtek denzitását is, ami pl. a Purkinje sejtek esetén alapvető paraméternek bizonyult [31].

Kurviméter nélkül egy egyszerű és szellemes módszerrel is megállapíthatjuk a metszetben levő idom palástját [18]. A metszési felszínt ismert és azonos távolságú párhuzamos vonalakkal osztjuk fel. Leszámoljuk, hogy a vonalak hány helyen metszik a mérendő test kerületét. A SMITH—GUTTMAN [40] képlet alapján a palást (S) egyenlő a metszési pontok száma (P) kétszeresének, a vonalak közötti távolságnak (h) és a metszetvastagságnak (t) a szorzatával ($S = 2P \cdot h \cdot t$). (A h értéket a nagyítás ismeretében μ -ra kell vissza számolni, hogy az S érték μ^2 legyen.)

További lehetőség a palást kiszámítására a vizsgált idom átmérőinek mérése, ha az idom többé-kevésbé szabályos térbeli test. Általában forgási ellipszoid felszínképletével dolgozhatunk ($F = 4r_1 \cdot r_2 \cdot \pi$). Ilyen módon határoztuk meg pl. a kisgyei glomerulusok felszínét [34], de alkalmas sejtmagok felszínének megállapítására is.

2. *A volumenmeghatározás* történhet citológiai méretekben (nucleolus, nucleus, sejt) vagy agyi területek, akár az egész agy volumenének meghatározására. A kisebb méreteknél a volument főleg számításokból (számos metszés felszínnel vagy átmérőkkel dolgozó volumenképletet ismerünk [23]) kaphatjuk meg. Nagyobb testek esetében, melyből sok szövettani metszet készíthető, a számítás mellett szerepet kap a rekonstrukció is [5]. Ez utóbbi munkaigényessége miatt nem válhat rutinmódszerré, de az általa nyújtott háromdimenziós impresszió értékes lehet.

A sorozatmetszeteken történő planimetrizálás bizonyult eddig legalkalmasabbnak az agy egyes részei tömegének méréséhez. A mért felszínnek és a metszestvastagság szorzatának összege adja meg a mért idom volumenét.

Ilyen módszerrel kaptuk meg a kisagy tömegét is [31]. Kétségtelen, hogy az agy fajsúlyának ismeretében annak tömege a folyadékkiszorítás módszerrel [35] is meghatározható, de a sorozatmetszetek további részinformációk nyerésére is alkalmasak, és ez esetben a teljes tömeg ismerete ugyanazon agyon úgy is elkerülhetetlen. A módszer bármilyen idom volumenének mérésére alkalmas, ennek jó példája volt a kisagykéreg és a velő tömegének izolált meghatározása [31]. A metszés vastagsága és síkja olykor lényegesen befolyásolja a kapott értéket [31]; ezek meghatározása a mindenkori mérés előtt ajánlatos.

Forgási testek metszetén mért felszínből, vagy átmérőkből számított volumen abszolút értékben a valódi tömegnél kisebb. Ez abból adódik, hogy a forgási testek kis metszési síkjaiból is volument számolunk, ami az átlagot lefelé torzítja. Ennek kiküszöbölésére algebrai [38] és grafikai [4] módszereket dolgoztak ki. Összehasonlító (karyometriai) vizsgálatoknál ezek alkalmazásának nincs különösebb jelentősége, ha viszont egy test valódi tömege további számításokhoz szükséges, bármelyik korrekciót használhatjuk.

III. Összetett kvantitatív analízisek

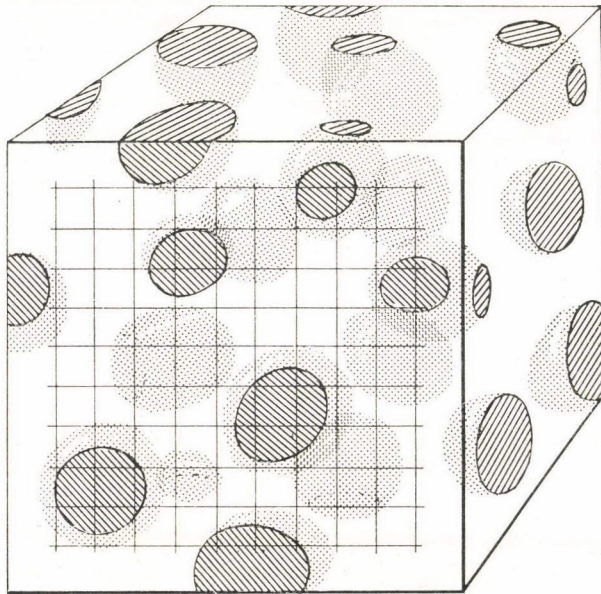
Számos lehetőség van a központi idegrendszer vizsgálatában a kvantitatív hisztológia tágas repertóriumjának használatára. Amíg az alapműveletek és az azok által nyert adatokkal történő számítások révén az esetek többségében a vizsgálandó test vagy agyterület egy-egy paraméterét kaphatjuk meg, addig a kvantitatív hisztológia fontosabb területe az egyes agyi struktúrák összefüggéseinek morfológiai megközelítése konkrét, számszerű adatok segítségével. Saját gyakorlatunkból az összetett vizsgálatok 3 fő alkalmazási területét ismertetjük, nem zárva ki más módszerek lehetőségét és nem kívánva a teljesség látszatát. Ezek: 1. vegyes populációk százalékos részarányának meghatározása a térben; 2. karyometria alkalmazása heterogenitás bizonyítására; 3. sejtcsoportok és szubdivízióinak topográfiai lokalizációja kvantitatív hisztológiai módszer alkalmazásával.

1. Vegyes populációk térbeli százalékos megoszlásának meghatározása

Az idegrendszer szövettani vizsgálatánál — mind fény, mind elektronmikroszkópos vizsgálatoknál — gyakori igény annak meghatározása, hogy a vizsgált képen, vagy a látótérben előforduló képletek a terület hány százalékát foglalják el. Ez a mérés azáltal kapja meg jelentőségét, hogy a térben random eloszlású testek a tér bármely síkjában készített metszet felszínén a térbeli

eloszlásuk arányában jelennek meg (DELESSE-elv [2]). Így elegendő mintavétel esetén megtudhatjuk az egyes struktúrák százalékos megoszlását az agy adott területén. Ha ismerjük a tér és a vizsgált idomok méreteinek numerikus értékeit, akkor abszolút számuk is megkapható.

A százalékos részarány mérésére több, de lényegében azonos elven alapuló módszert dolgoztak ki. Mérhetjük, hogy a vizsgált területre projiciált pont, vonal, hálórendszer hány százaléka vetül a mérendő testre, de planimetrizálhatjuk az idomok átmetszeti felszínét és a terület ismeretében a felszínnek részarányával dolgozunk [7, 21, 36]. Leggyakrabban a pontkivetítéses módszer (CHALKLEY-módszer [6]) a használatos. A módszer elvét GLAGOLEV [11] fogalmazta meg, mely szerint, ha egy képre számos pontot projiciálunk a metszési felszínnek által a projiciált képben fedett pontok száma jellemző a felszín és a tömeg méretére. Ezt alkalmazta CHALKLEY [1] először a biológiában és erre készültek a különböző integrációs okulárok [19]. Kidolgozták azt a pontsémát, mely leginkább megfelel a random eloszlásnak [20], de ennek csupán elméleti jelentősége van, mert a biológiai minta szórása a matematikai érzékenységet nagyságrendileg haladja meg. A módszer egyszerűbb változata különböző fonálkeresztek használata [15]. Legalkalmasabb a száz keresztződésű pontból álló fonálkereszt alkalmazása [26] (1. ábra). A hálót a vizsgált területre 30–50 különböző pozícióban helyezzük vagy vetítjük, és leszámoljuk, hogy a vizsgált test metszési felszíne hány keresztződési pont alá vetül



I. ábra. Séma a 100-as fonálkereszt használatára különböző idomok felszíni, illetve térfeltöltési arányuk meghatározására

Száz kereszteződési pont lévén, a kapott szám rögtön a százalékot jelenti. Ez esetben a terület (látótér, fotókópia) mérése sem szükséges.

A metszési felszínek részarányát megkaphatjuk úgy is, hogy mérjük adott területen belül az ismert hosszúságú vonalnak a felszínre vetülő hosszát [36]. Ezen az elven (ROSIWAL-féle lineáris integráció [36]) alapszanak az ún. tűmódszer (Nadelmethode [39]); integrális okulárok [37, 19]; továbbá valamennyi automata scanning apparátus is.

Hasonló elven számos más felszínmintavételi lehetőségből lehet a tömegek részarányát meghatározni [46, 47].

Ha abszolút, numerikus értékre van szükségünk, vagyis a vizsgált testből összesen mennyi van, akkor meg kell határozni a vizsgált idom volumenét, valamint annak az agyi területnek a volumenét, melyben a vizsgált test helyet foglal. A vizsgált idom volumenét metszetei felszínéből, vagy átmérőiből (vagy mindkettőből) kaphatjuk meg. (Az átmérők átlagára a metszetvastagság korrekciójánál is szükség lesz.) A terület a planiméterrel mért metszési felszínek és a metszetvastagság (a vizsgált idom méretének megfelelően korrigált metszetvastagság) szorzatainak összege. A vizsgált test százalékos részarányából megtudjuk, hogy ezen területről mekkora volumen jut a vizsgált test összegére, melyet az egyedi volumenértékekkel osztva a vizsgált test abszolút számát kapjuk meg.

Ilyen módon sikerült meghatározni a kisagyi glomerulusok számát [33]; a szemcses sejtek számát a sejtmagjaik volumene és a térbeli százalékos megoszlásuk alapján [32]. Felhasználható a módszer az agyi erek sűrűségének és hosszának meghatározására is.

2. Karyometria alkalmazása a központi idegrendszer quantitatív hisztológiai analízisében

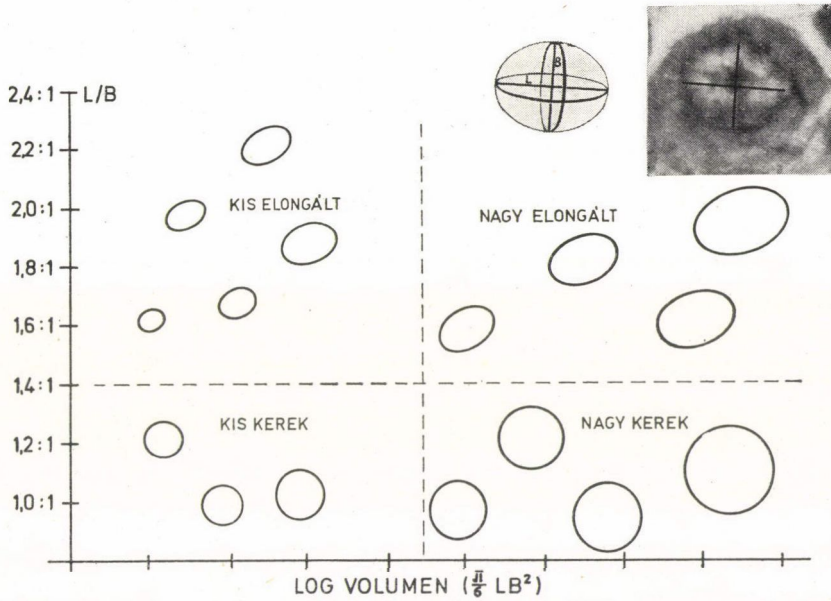
A karyometria — sejtmagok mérése — az általános gyakorlatban a sejtmagok átmetszeti felszínén történt átmérő vagy felületmérést jelent. Az így kapott értékeket vagy közvetlenül értékeljük, vagy belőlük a sejtmag volumenét számítjuk ki [29]. Az utóbbi időben, mivel bizonyítottan előnyösebb, a magvolumen-számítás terjedt el. A mérés technikája fejlődött, félautomata [28] és automata berendezések révén rutinszerűen alkalmazható [29]. Ennek ellenére felhasználási területe kétségtelenül leszűkült. Az egyszerű felmérések gyakorlatilag befejeződtek, ugyanakkor az experimentális (funkcionális jellegű) vizsgálatoknál az indirekt adatokat szolgáló magvolumenváltozás kimutatását direkt mérési módszerek váltották fel. Ennek ellenére a karyometria a központi idegrendszer morfológiai vizsgálatában még mindig hasznos módszernek számít. A magvolumengörbék analízise felvilágosítást nyújthat arra, hogy a vizsgált area, nucleus sejtszelei — magjuk mérete szerint — homogének-e, vagy több sejttípushoz tartoznak-e. Az azonosság egyik morfológiai jele és

kritériuma a magvolumenek Gauss-típusú eloszlása. Ennek ismerete ma még a központi idegrendszer területei többségénél reális igény. A módszer illetén alkalmazásánál további fejlődést jelent a magvolumengörbék értékelésénél a számítógépes szimulálás lehetősége.

A magvolumengörbék felvétele sorozatmetszeteknél igen alkalmas területileg összefüggő, de különböző sejtcsoportok szétválasztásához. Ugyanazon sejtek az egymást követő metszeteken azonos jellegű és a koordinátán azonos helyen megjelenő görbéket eredményez. Ha új, más típusú sejtekből álló területekhez érkezünk, a görbék alak és elhelyezkedés szerint megváltozhatnak. Ha a változás fokozatos, azt jelenti, hogy a két sejtcsoport fokozatosan megy át egymásba és a határzóna kevert populációt mutat; ha hirtelen új görbetípus jelenik meg, akkor a két sejtpopuláció éles elkülönüléséről van szó. Ez utóbbi főleg szubdivíziók esetén jellemző.

A karyometria ilyen felhasználása adott lehetőséget számos hypothalamus mag szubdivízióinak felismerésére. Ugyanígy sikerült több eddigi azonosnak vélt amygdala magot elkülöníteni. Hosszan elnyúlt sejtcsoportok — főleg agytörzs és gerincvelő esetén — az ilyen vizsgálat számos új adat nyerésével kecsegtet.

A karyometriának egy új területét sikerült kidolgozni, a pontdiagram módszert [30], mely a központi idegrendszer vizsgálatánál a klasszikus karyometriánál lényegesen több új információt adhat a neuronok térbeli rendezettségével, illetve heterogenitásukkal kapcsolatban. A pontdiagram módszer elve: minden egyes sejtmagnak egy pont felel meg egy koordinátarendszerben (2. ábra). A koordinátarendszer megválasztása a vizsgált anyagtól függ. A legegyszerűbb formája, ha a két koordinátára a két (hosszú és felező merőleges) átmérő értékei kerülnek. Ha gyanú van arra, hogy a sejtmagok alakjuk szerint különülnek el, akkor az egyik koordinátára a mag elongáltságát (nagy- és kisátmérő hányadosa), a másikra a hosszú átmérőt visszük fel. Ha várható, hogy a sejtmagok méretük alapján különülnek el jobban, akkor az elongáltság és a magvolumen, vagy hosszú átmérő és magvolumen kerül a két koordinátára. A 300—500 sejtmagot reprezentáló pontok elrendeződése vagy diffúz, homogén eloszlást mutat, vagy több sűrűbb foltot eredményez; attól függően, hogy hány különböző típusú sejt van a vizsgált területen. A pontdiagram kiértékelésére több lehetőség van: *a)* szubjektív megítélés, ami kvantitatív analízis esetén anakronisztikusnak hat, de a gyakorlatban jól használható. A jól látható sűrűbb mezők körülhatárolásával (10%-os hibaengedmény) még az egyes típusok numerikus részarányát is megadhatjuk. *b)* Átfedési módszer [33] lényege, hogy több metszethől kapott pontdiagramokat hasonlítunk össze úgy, hogy a sűrűbb területeknek csak a határvonalait rajzoljuk egy koordinátán, mely által azok fedése ugyanazon, eltérése különböző sejttípusok megjelenését mutatja. Több típusú vizsgálatnál használható: α) sorozatmetszetekkel egyes régiók heterogenitása analizálható, β) experimentális vizsgálatoknál



2. ábra. A „pontdiagram” sémája és koordinátái. L = hosszú átmérő; B = felező merőleges átmérő

megállapíthatjuk, hogy a beavatkozást követően a sejtmagok alak- és méretváltozást szenvednek-e, γ) egyes ismert sejttípusok magja által elfoglalt területet egy ismeretlen terület pontdiagramjára vetítve megállapíthatjuk, hogy ott az ismert sejtből mennyi lehet. c) homogenitás vagy heterogenitás matematikailag is bizonyítható a pontdiagrammal; erre szolgál a korrekciós együttható meghatározása és a lineáris regresszió felvétele. Ez azonban csak „igen-nem” vizsgálat, több sejttípus szétválasztására más megoldás szükséges. d) a pontdiagram felvétele és analizálása számítógépes szimulációs módszer alkalmazásával történik, mely a módszert rutinszerűvé és fokozatosabban exakttá teszi. Segítségével gyakorlatilag a legkevertebb populációk is felbonthatóak. A módszer — a gépnyelv kialakítása — kidolgozás alatt áll és kétségtelenül a pontdiagram-módszer jövőjét jelenti.

3. Sejtcsoportok és szubdivízióinak topográfiai meghatározása [27]

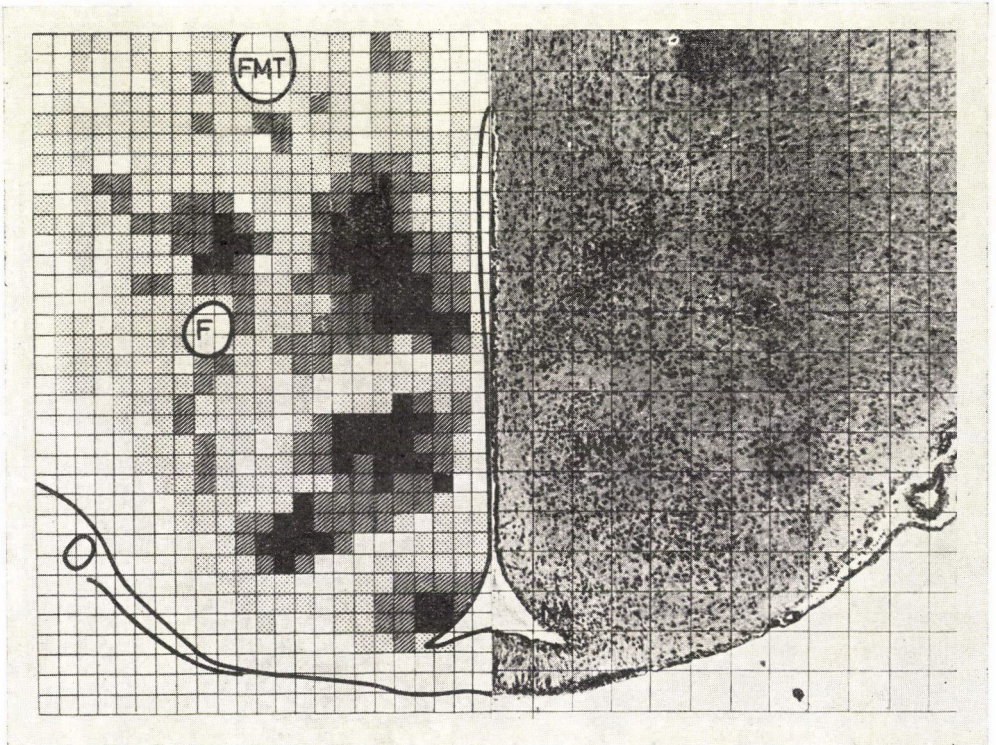
A sejtcsoportok (magok) elkülönítése a szomszédos agyterületektől (areák) csupán sejtsűrűségük (denzitásuk) alapján történik. Ez kvantitatíve is kifejezhető. A magok lehetnek: a) egységes, b) összetett, c) kevert. Az egységes mag szubdivíziókra nem osztható, sejtjei a mag teljes területén homogén populációként helyezkednek el. Az összetett magon belül szubdivíziókat találunk, ami azt jelenti, hogy a különböző sejttípusok a magon belül lokalizáltan helyezkednek el, alegységeket alkotnak, melyek önmagukon belül homogének. A ke-

vert mag heterogén, több sejttípus keveredik benne anélkül, hogy bármelyik is szubdivíziót alkotna.

Tekintettel arra, hogy különböző típusú sejtek még azonos magon belül is különböző funkcionális szereppel rendelkeznek; felismerésük, topográfiai lokalizálásuk jelentősnek mondható. Kimutatásukhoz, lokalizálásukhoz és numerikus paramétereik megismeréséhez több kvantitatív hisztológiai módszer kombinált alkalmazásával juthatunk.

A metszetek síkját sztereotaxikus készülékben állítjuk be. Hypothalamus esetén a bregmán átmenő síkot, az agytörzs esetében az interaurikuláris vonalat vesszük nullának. Patkány esetében az állat feje 5° -ban előredől (agytörzsön végzett meréseknél 15° -ot). A hisztotechnikai zsugorodás mérésére az általunk nem használt területen finom késsel két egymástól pontosan bemért távolságú metszést ejtünk, és ezt a metszetek elkészültével visszamérjük.

Sorozatmetszeteken minden $100\ \mu$ -nak megfelelően (előre számított $100\ \mu$) veszünk mintát. A vizsgálandó területet tartalmazó metszeteket Visopan mikroszkóp segítségével kivetítjük és a főbb támpontokat (nagyobb kötegek,



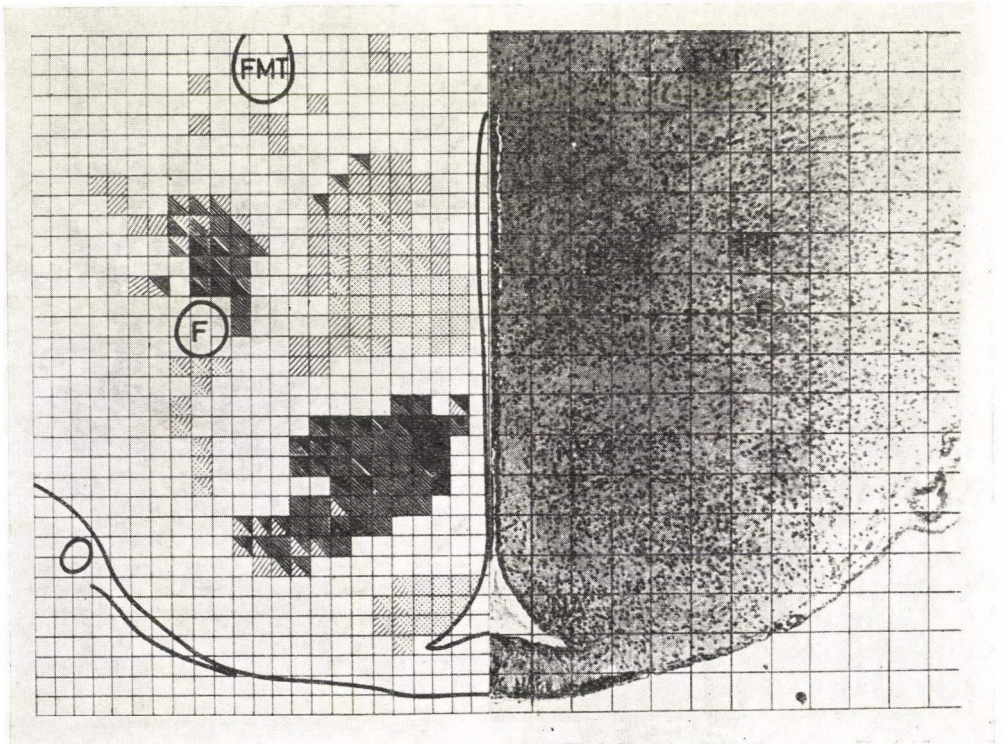
3. ábra. Séma patkány hypothalamus középső részéről a sejtsűrűsége. □ = kevesebb, mint 4 sejt/négyzet; ▤ = 5–8 sejt/négyzet; ▥ = 9–12 sejt/négyzet; ■ = több mint 12 sejt/négyzet. NA = nucleus arcuatus; NVM = nucleus ventromedialis; DNM = nucleus dorsomedialis; NPF = nucleus perifornicalis; FMT = fasciculus mamillothalamicus; F = fornix





kamra) és a felszínt kirajzoljuk. Készíthetünk e helyett fotókópiát is, és arról sémát. A kapott képeken felvesszünk egy biztosan meghatározott és megtalálható vonalat (rendszerint a középvonal) és a képet ezzel párhuzamosan és merőlegesen egymástól $100\ \mu$ -nak megfelelő (élőre számított $100\ \mu$) vonalakkal kockákra osztjuk (3. ábra). A projekciós mikroszkóp homályos üveglapján, vagy kivetítés esetén a vetített felszínre ugyancsak $100 \times 100\ \mu$ -os hálózatot rajzolunk. Kiindulva a középvonal alsó kockájától kockáról kockára (scanning módszer) leszámoljuk azokat a neuronokat, melyek magjában a nucleolus látható, vagy az a mikrométer mozgásával fókuszba hozható. (A kocka két élére eső sejteket is beszámítjuk.) Ha vizsgálatunk célja nemcsak a sejtszám, hanem a heterogenitás megállapítása is, akkor már ebben az első lépésben is lemérjük a nucleolussal rendelkező sejtek hosszú és arra felező merőleges átmérőjének a hosszát. $3000 \times$ projekciós nagyítás a legmegfelelőbb a méréshez.

Végighaladva a kívánt területen, megkapjuk a vizsgált mező $100 \times 100\ \mu$ -os kockáiban levő sejtek számát. (A $100 \times 100\ \mu$ -os háló esetén a sejtszám $10\ 000\ \mu^2$ -ra vonatkozik. Alkalmazhatunk $70 \times 70\ \mu$ -os hálót is, ha a vizsgált terület eléggé sejtsűrű (elérheti a 20 sejtet kockánként — $5000\ \mu^2$ -onként). Ennek előnye, hogy a kapott rajzolat finomabb, a mag jobban körülhatárolható. (Ez esetben a metszetsorban a két egymást követő metszet közötti távolság is $70\ \mu$ legyen.) Az egy négyzetbe jutó sejtek számát, a legalacsonyabbtól (valószínűleg 0) és a legmagasabb értékig négy vagy öt egyenlő osztályra osztjuk, és ezeket az értékeket különböző színnel vagy intenzitással jelöljük. Sémánkban az egyes kockákat ezekkel a különböző színekkel vagy intenzitással töltjük ki (3. ábra). Az így kapott ábrán ezáltal kirajzolódnak az adott területen a sűrűbb denzitású nucleusok [27].

A számadatokból egy adott nucleus abszolút sejtszáma is meghatározható. Ehhez szükséges, hogy a mag átmetszeti felszíneit planiméterrel meghatározzuk (négyzetes zsugorodást figyelembe véve) és a metszési felszínnek és a metszetek közötti távolságok szorzatainak összege megadja a nucleus köbtartalmát. Ismeretes, hogy a mért felszínen hány darab sejtet számoltunk. Ezek a számok egy olyan tömegben helyet foglaló sejtszámot jelentenek, melynek alapja a mért felszín, vastagsága a metszet vastagsága. Ezen tömeg kiszámítása előtt a metszetvastagságnál korrekciót kell használni, mely megadja azt a teoretikus vastagságot, melyen belül ugyanazon sejt megegyeszen nem metszhető. Erre a FLODERUS-korrekció [10] látszik legalkalmasabbnak. Ehhez viszont szükséges a nucleolusok átlagos átmérőjének (rendszerint 100 mérés elegendő) és a legkisebb, még nucleolusnak ítéltető átmetszet átmérőjének ismerete. A felszínnek és a korrigált metszetvastagságból kiszámítjuk a tömeget, amelyben a sejtszámolás történt és a nucleus volumenének ismeretében hármasszabály alkalmazásával a magban levő sejtek számát kapjuk meg. Az abszolút sejtszám és a volumen hányadosa megadja a mag átlagos sejt-denitását.

A sejtmag átmérőiből és a belőlük számított elongáltságból (nagy-átmérő/kisátmérő) pontdiagram segítségével a különböző alakú és nagyságú sejtmaggal rendelkező sejtek egymástól elkülöníthetők. Minden kockában külön-külön lemérjük a nucleolussal rendelkező sejtmagok hosszú és felező merőleges átmérőit, és ezeket pontdiagramon ábrázoljuk. Egyes esetekben elegendő, ha a pontdiagram koordinátáira a hosszú átmérőt és az elongáltságot vesszük fel, más esetekben szükséges lehet a magvolumen és az elongáltság használata. Ilyenkor a magvolumen a $vol = \frac{\pi}{6} \cdot LB^2$ képletből készített táblázatból [29] számítható ki. A pontdiagrammal kis és a nagy, valamint a kerek és elnyúlt sejtmagok négy csoportja egymástól elkülöníthető (2. ábra). E négy csoportot négy különböző színnel vagy intenzitáskülönbséggel ábrázolhatjuk a metszetséma azon kockáiban, ahol a mérés történt. Homogén előfordulásnak (egyféle jelölés a kockában) azt tekintjük, ha a sejtmagok legalább 85%-a azonos csoportba esik. Ha ennél kevesebb, akkor a kockát megosztjuk a két, vagy akár több csoport színével. A kockák összessége szín vagy intenzitás szerint kirajzolja, hogy a mag homogén-e, vagy heterogenitás esetén a több sejt



4. ábra. Séma a különböző típusú sejtek eloszlására a hypothalamus középső részén ejtett frontális metszeten.  = kis, kerekmagvú sejtek;  = kis, elongált magvú sejtek;  = nagy, kerekmagvú sejtek;  = nagy, elongált magvú sejtek, Rövidítések: lásd 3. ábra

diffúzan található-e a magon belül, vagy szubdivíziókban rendeződnek (4. ábra). Heterogenitás esetén szükséges összesített pontdiagramot készíteni 300–500 sejtmag adataiból. Ez esetben az egyes sejtféleségek részaránya százalékban is megadható, illetve az össze-sejtszám ismeretében azok abszolút számát is kiszámíthatjuk.

Az adott terület feltérképezéséhez természetesen nem egyetlen metszet, hanem a sorozat értékelése szükséges. A mérésnél egymást követő metszetek közötti távolság ($100\ \mu$ vagy $70\ \mu$) megegyezik a kockák méretével, így információs mintánk térben arányos. A sorozatmetszetekből mért adatokat háromdimenziós modellen vagy kétdimenziós modell esetén egymásra vetítve, a nucleus térbeli helyzetéből, szubdivízióik méretéről is információt nyerhetünk. Ellenőrző mérések végezhetők az első metszetsorozatra merőleges síkú metszeten. Mindenképpen fontos a mag végleges definíciójánál a mag és szubdivíziók kiterjedését a tér három síkjának koordinátaiban megadni. Ezt szolgálta az induláskor felvett sík nullpontja, illetve a középvonal által megadott második sík, melynek segítségével a harmadik sík adatait bemérhetjük.

E módszer segítségével sikerült topográfiailag lokalizálni a nucleus perforatist a lateralis hypothalamusban [27] feltérképezni az amygdala magjait és ugyanígy értékes új megfigyelések nyerhetők a hypothalamus szisztematikusan analízise révén.

Quantitatív mérések lehetőségei elektronmikroszkópos vizsgálatokban

A mérések elvileg megegyeznek a fénymikroszkópos mérésekkel, viszont lehetőségei és alkalmazásuk kautélái különböznek. Az orientáció biztosítása és a zsugorodás ismerete ez esetben is alapkövetelmény. Mindkettőnek az ellenőrzése félvékony metszeten történik. Az itt mért zsugorodás gyakorlatilag megfelel a végleges zsugorodásnak. Lineáris zsugorodást tudunk mérni ismert távolságú szűrőszatornák kontrollálásával, ugyanúgy mint ahogy azt fénymikroszkópos vizsgálatoknál leírtuk. Valamennyi értéket ez esetben is élő állatra számítjuk át. Ez adja meg annak lehetőségét, hogy a fénymikroszkópos vizsgálatok során nyert kvantitatív adatainkat az EM vizsgálaton nyert adatokkal együtt használhatjuk.

További alapkövetelmény az aktuális EM nagyítás és fotónagyítás pontos ismerete, mivel ezek a számítás folyamán két vagy több nagyságrendű szorzóként jönnek számításba és a kapott értéket alapvetően befolyásolhatják.

Méréseket végezhetünk a térben random eloszlású, vagy a tér valamelyik síkjában rendezetten helyet foglaló testeken. Az előbbinél megszorítás nincs, az utóbbinál a metszés térbeli helyzetét ellenőrizni kell. A félvékony beállítás irányt adó lehet, de egymagában nem elégíti ki a követelményeket. Ez esetben olyan elemeket kell keresnünk, melynek térbeli rendezettsége ismeretes. (Pl. paralel rostok a kisagy molekuláris rétegében, nagyobb pályák lefutási irá-

nya — fornix a hypothalamusban, pyramispálya az agytörzsben stb.). Ismeretes, hogy az axonátmetszetek felszíne átlagosan körnek tekinthető. Nagyszámú, 300 vagy több átmérőmérés esetén (az axonátmetszet hosszú (L) és arra felelő merőleges átmérőjének (B) mérése) kiszámíthatjuk az átmetszeti felszínnek elongáltságát (L/B). Az elongáltság nagysága a merőleges síktól való eltérés szögével arányosan összefügg ($L/B = \text{cosec } \alpha$). Optimális esetben az elongáltságnak meg kell közelíteni az 1 : 1 értéket. Az 1 : 1 elongáltság felett vagy korrigáljuk a metszet síkját, vagy a mért elongáltságot mint korrekciós faktort alkalmazzuk.

Méréseket — leszámítva a nem igényes lineáris méréseket — papírképen, számolásokat pedig mind papírképen, mind közvetlenül az elektronmikroszkópos képen eszközölhetünk. Ez utóbbinál az alkalmazott gridek mérete adja meg azt a területet, melyben a mérés történik. A gridek méreteinek és formájának helyes megválasztása a számolást egyszerűsítheti. Lehetőleg az egy gridbe jutó részecskék száma ne haladja meg a húszat és használjunk olyan téglalakú gridet, ahol a rövid él mentén 2—5-nél több számolt részecske nem fordulhat elő. Számolásnál a Bürker-kamrával való számolási elv érvényesül; a grid két éle által metszett részecskéket beleszámítjuk a négyzetbe.

A papírképen végezhetünk számolást és méréseket. A mérések lehetnek lineárisak és négyzetesek. Ezekből háromdimenzióra számolhatunk.

a) Lineáris mérések. A mérés lehet egyenes vonalú (távolságmérés, átmérőmérés), vagy szabálytalan vonalú (valamely részecske kerülete vagy vonalas idom metszete). Ez utóbbiakra a kurviméter használata a legalkalmasabb.

Ezek a mérések igen elterjedtek. Ilyen a különböző rostok vastagságának mérése; különböző részecskék, vezikulumok átmérőinek meghatározása, szinaptikus végződéses érintkezési felszínének mérése.

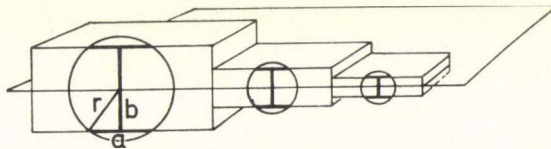
b) Felszínmérések. Átmetszeti felszínnek mérésére planimétert vagy részecske nagyság analizátort alkalmazhatunk. Ez utóbbi a körre való szimulálás elvén alapszik, ezért erősen elongált idomok mérésénél csak nagy eset-szám ad megfelelő értéket.

Metszési felszín természetesen lineáris mérésekből nyert adatokból is meghatározhatunk. Ezt szabályos testek (EM anyag esetén meglehetősen ritka) esetén alkalmazhatjuk.

c) Térfogatszámítás lineáris felszínmérés adataiból történhet. Az adatok szórása meghaladja a fénymikroszkópos anyagon kapott eredmények szórását. Ennek okai: a metszetnek nincs mélysége, így nem korrigálható; kevesebb idom szabályos térbeli test ugyanakkor a térfogatszámítás többé-kevésbé erre korrigál; sok esetben egy test felszíne folyamatosan megy át egy másikba (pl. spine-ok esetén), a határ megvonása szubjektív s mint ilyen, ez is a bizonytalanságot és ezáltal a szórást növelheti.

Denzitás meghatározása elektronmikroszkópos anyagon

Igen fontos információhoz juthatunk a denzitás meghatározásával és az így nyert eredmények fénymikroszkópos anyagon nyert eredményekkel is összevethetők. A denzitás (sűrűség) vonatkozhat felszínre vagy tömegre. (Homogén eloszlás esetén a DELESSE-elv [2] szerint a felszínen mért sűrűség az adott tömeg denzitására is jellemző.) A denzitás két értékből, a felszínből, illetve tömegeből és a benne levő darabszámból adódik. Az utóbbi egyszerű leszámolás, hasonlóan a felszínre számított denzitás is, viszont a tömeget több mérésből kaphatjuk meg. A konkrétan mért terület (szabályos négyszögnek $t = a \cdot m$; szabálytalannál planiméterrel határozzuk meg) és a metszet „vastagsága” adja meg a tömeget. Ezzel kapcsolatban új fogalom: a teoretikus metszetvastagság jelentkezik. Bár az EM képeknek mélysége (vastagsága) jellegükénél fogva nincs, az átmetszett elemekhez mégis egy elméleti vastagság tartozik, ami azt fejezi ki, hogy egy adott távolságon belül ugyanezen elem ismételten már nem kerülhet metszésre, ha az eredetivel párhuzamos síkban metszünk. (Ezt fontos kizárni, mert számításakor a denzitást torzítaná.) Ezt hívjuk teoretikus metszetvastagságnak (T). A vizsgált elem térbeli denzitásának kiszámításánál a mért felszínt ezzel a metszetvastagsággal szorozzuk. A teoretikus metszetvastagság a vizsgált test méretétől függ és nagyságát a FLODERUS-korrekciónak [10] elvéből számíthatjuk ki: $T = t + 2 \sqrt{r^2 - \left(\frac{a}{2}\right)^2}$ (A t — a valódi metszetvastagság — ebben az esetben nulla, az r a mért idom átlagos átmérőjének fele, a pedig az idomnak a még felismerhető legkisebb metszetének átmérője. — 5. ábra.)



$$T = 2r = 2\sqrt{r^2 - \left(\frac{a}{2}\right)^2}$$

5. ábra. Séma különböző nagyságú idomok egy síkkal történő metszésére az idomok teoretikus metszetvastagságának (további párhuzamos síkokkal metszhető területének nagysága) demonstrálására. T = teoretikus metszetvastagság; r = az idom sugara; a = a még felismerhető metszet átmérője

Gondolatok és általános megjegyzések a kvantitatív hisztológia alkalmazása kapcsán

Mérni nehezebb, mint nézni; de könnyebb, mint látni. Semmilyen kvantitatív mérés nem lehet öncélú, összefüggés nélküli számok, adatok nyerése. Mindig egy konkrét kérdésre kell választ adnia; minőségi helyett numerikusat. Az adatok rendszerint további mérésekkel, vagy más jellegű eredményekkel

összevetve nyerik el értéküket. Az adatok alkalmazhatósága a kvantitatív vizsgálatok igazi kontrollja.

A hisztológiában nyert számadatokra csak műveletileg érvényesek a matematikai szabályok, igazi értéküket és súlyukat biológiai értelmük adja meg. Ez a tény limitálja nemcsak értékelhetőségüket, hanem a módszerek kiválasztásától a szignifikancia próbák alkalmazásáig valamennyi lépést is. A kvantitatív hisztológia kölcsönvett szabályokkal (matematikai és geometriai) és módszerekkel dolgozik. Azok alkalmazhatóságát és értékelhetőségét azonban a vizsgált anyag paraméterei befolyásolják, ezért a tiszta matematikai adatok nem mindig csupán numerikus értékűek.

A kvantitatív hisztológiának vannak áthághatatlan és ajánlott szabályai. Obligát törvények a következők: az anyag zsugorodásának mérése és mint korrekciós faktor alkalmazása, a használt nagyítás pontos ismerete és helyes megválasztása, a szükséges mérésszám. Ezek nélkül értékelhető eredmény nem nyerhető. Ajánlott, hogy igyekezzünk minden szubjektív tényezőt kikapcsolni („vak-kísérletek”); keresni a lehetőséget — különösen kombinált, bonyolult mérési sorozatoknál —, hogy ugyanazon eredményt különböző módszerekkel, különböző paraméterekből is megkaphassunk.

A kvantitatív hisztológiában is egyre inkább teret hódítanak a modern mérőműszerek és a számítógép alkalmazása. Általuk a mérések egyszerűbbek, rutinszerűen alkalmazhatók és pontosabbak lesznek, de nem adnak több, csak jobb információt. Felhasználásuknál főleg a gyorsaságukat és az adatszám megnövelhetőségét használhatjuk ki, de mivel elvük a legegyszerűbb mérési módszerek elvével egyezik meg, az általuk nyert értékek is azok információs szintjén állnak.

A kvantitatív hisztológiában a szövettani kép minőségi paraméterei gyakorlatilag csak diszkriminációs értékűek, mérést nem helyettesíthetnek. A hihető vagy hihetetlen, mint fogalom nem tartozik a kvantitatív hisztológia jelzőrendszerébe, csupán a meghatározható vagy a meghatározhatatlan.

Nincs olyan reláció a központi idegrendszerben, mely a kvantitatív hisztológia módszereivel ne lenne megközelíthető. A különbség az, hogy a tisztán matematikai vagy geometriai műveleteknél a biológia megkívánta redukció lehet vagy olyan kicsi vagy olyan nagy, hogy az alkalmazott matematika helyett a matematikai logika kerül előtérbe. Ez utóbbi azt jelenti, hogy határterületek meghatározásával (minimum-maximum), vagy „igen-nem” analízissel dolgozunk. Sok esetben a kizárhatóság elvének gyakorlati alkalmazhatósága is értékes információt adhat.

Minden mérés önkontrollos, más anyag numerikus értékével, illetve más szerzők adataival csak akkor hasonlíthatók, ha abszolút számról van szó (vagyis a számítások végén a mérési szituációtól elvonatkoztatott értékről), vagy bizonyítható, hogy a hisztotechnika és mérési feldolgozás körülményei azonosak voltak. (Ebben nagyon szkeptikusnak kell lennünk.)

A központi idegrendszer kvantitatív analízisének perspektíváját a harmadik dimenzió megnyitása, továbbá neuronmodellek építésének lehetősége adja. E két lehetőség és egyben feladat adja meg a kvantitatív analízis rangját ezen kutatási területen.

Nagy előny, hogy még nincsenek; vagy kis számban fordulnak elő tévesen, vagy rosszul megrögzött numerikus adatok és relációk. Ez előny, de ennek megtartása követelmény is a központi idegrendszer területén végzett kvantitatív hisztológiai vizsgálatoknál.

IRODALOM

1. CHALKLEY, H. W.: *J. nat. Cancer Inst.* **4**, 47 (1943).
2. DELESSE, M. A.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **25**, 544 (1847).
3. DELL, H. A.: *Philips Tech. Rev.* **21**, 253 (1960).
4. ELIAS, H., HENNING, A.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, pp. 130—166 (1967).
5. ELIAS, H., HENNING, A., SCHWARTZ, D. E.: *Physiol. Rev.* **51**, 158 (1971).
6. ENDTER, F., GEBAUER, H.: *Optik* **13**, 97 (1956).
7. FAIRS, G. L.: *Chem. Ind.* **62**, 374 (1943).
8. FISCHMEISTER, H. F.: *Powder Metallurgy* **7**, 82 (1961).
9. FISCHMEISTER, H. F.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 221—249 (1967).
10. FLODERUS, S.: *Acta path. microbiol. Scand.* **53** (Suppl.) 276 (1944).
11. GLAGOLEV, A. A.: *Trans. Inst. Econ. Mineral.* **135**, 399 (1934).
12. GLASER, E. M., VAN DER LOOS, H.: *IEEE Trans. Biomed. Eng. BME* **12**, 22 (1965).
13. GRANT, G., BOIVIE, J.: *Brain Res.* **21**, 439 (1970).
14. HAMMAR, F. A.: *Z. mikr.-Anat. Forsch.* **6**, 399 (1926).
15. HAUG, H.: *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **118**, 302 (1955).
16. HAUG, H.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.) *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 58—78 (1967).
17. HAWKSLEY, P. G. W., BLACKETT, J. H., MEYER, E. W., FITZSIMMONDS, A. E.: *Brit. J. Appl. Physiol.* **3** (Suppl.) 165 (1954).
18. HENNIG, A.: *Z. wiss. Mikr.* **63**, 67 (1957).
19. HENNIG, A.: *Zeiss-Werk-Z.* **6**, 78 (1958).
20. HENNIG, A.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 99—129 (1967).
21. HOLLÄNDER, H.: *Exp. Brain Res.* **10**, 219 (1970).
22. HOLMES, A. H.: *Petrographic methods and calculation*. Murby and Co, London (1927).
23. INKE, G., PALKOVITS, M., GYÁRFÁS, I., BAJTAL, A.: *Acta morph. Sci. hung.* **8**, 253 (1958).
24. LAGERCRANTZ, G.: *Acta physiol. Scand.* **26** (Suppl.) 1 (1952).
25. MORTON, A.: *Stain Technol.* **44**, 39 (1969).
26. PALKOVITS, M.: *Mikroszkopie* **17**, 300 (1962).
27. PALKOVITS, M.: *Exp. Brain Res.*, in press.
28. PALKOVITS, M., CSAPÓ, I.: *Z. mikr.-anat. Forsch.* **67**, 339 (1961).
29. PALKOVITS, M., FISCHER, J.: *Karyometric Investigations*, Akadémiai Kiadó, Budapest (1968).
30. PALKOVITS, M., HAJTMAN, B.: *Z. mikr.-anat. Forsch.* **73**, 324 (1965).
31. PALKOVITS, M., MAGYAR, P., SZENTÁGOTHAJ, J.: *Brain Res.* **32**, 1 (1971).
32. PALKOVITS, M., MAGYAR, P., SZENTÁGOTHAJ, J.: *Brain Res.* **32**, 15 (1971).
33. PALKOVITS, M., MAGYAR, P., SZENTÁGOTHAJ, J.: *Brain Res.* **34**, 1 (1971).
34. PALKOVITS, M., MAGYAR, P., SZENTÁGOTHAJ, J.: *Brain Res.* **45**, 15 (1972).
35. ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. Oldenburg, München (1958).
36. ROSI WAL, A.: *Verh. K. K. Geol. Reichsamts Wien* **5**, 143 (1898).
37. SCHUCHARDT, E.: *Z. wiss. Mikr.* **62**, 9 (1954).
38. SCHWARTZ, H. A.: *Metals and Alloys* **5**, 139 (1934).
39. SITTE, H.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 167—198 (1967).

40. SMITH, C. S., GUTTMAN, L.: *Trans. Amer. Inst. Minig., Met. Petrol. Engrs.* **197**, 81 (1953).
41. STEPHAN, H.: In HASSLER, I., SEPHAN, H.: (Eds.) *Evolution of the Forebrain*. Plenum, New York pp. 377—388 (1967).
42. STERLING, P., KUYPERS, H. G. J. M.: *Brain Res.* **4**, 1 (1967).
43. TREFF, W. M.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*. Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 79—86 (1967).
44. TOLLES, W. E.: *Lab. Invest.* **8**, 99 (1959).
45. VAN DER LOOS, H., GLASER, E. M.: *Anat. Rec.* **145**, 295 (1963).
46. WEIBEL, E. R., KISTLER, G. S., SCHERLE, W. R.: *J. Cell Biol.* **30**, 23 (1966).
47. WEIBEL, E. R., ELIAS, H.: In WEIBEL, E. R., ELIAS, H. (Eds.), *Quantitative Methods in Morphology*. Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York pp. 89—98 (1967).