

# ÜBER METHODISCHE FRAGEN DER KERNVARIATIONS- STATISTIK V. BEWERTUNG DER VERSCHIEDENEN FORMELN BEI VARIIERENDEN EXZENTRIZITÄTEN UND BESTIMMUNG DES DURCHSCHNITTLICHEN BETRACHTUNGSWINKELS IM VERHÄLTNIS ZUR HAUPTACHSE

G. INKE, M. PALKOVITS, I. GYÁRFÁS und A. BAJTAI

(Eingegangen am 19. November 1957)

Wie in der einleitenden Mitteilung unserer Untersuchungsserie (FISCHER—INKE [2]) erwähnt, haben wir die Nomogramme für die in der Literatur verwendeten und möglichen Formeln zwecks Untersuchung ihrer praktischen Brauchbarkeit zusammengestellt. Um Wiederholungen zu vermeiden, verweisen wir bezüglich der für die Formeln verwendeten Bezeichnungen auf diese Mitteilung. Es wurden folgende Formeln untersucht:

I. Auf die Kugelform bezogene Formeln:

1. Lineare Formeln: a)  $V = \frac{\pi}{48} (L + B)^3$  1. Jacobj [4]

b)  $V = \frac{\pi}{6} (LB)^{3/2}$  3. Fischer—Inke [2]

2. Planimetrische Formel:  $V = \frac{4\pi}{3} (F)^{3/2}$  4. Voss [8]

II. Auf Rotationsellipsoid bezogene Formeln:

1. Lineare Formel:  $V = \frac{\pi}{6} AP^2$  2.

2. Kombinierte Formel:  $V = \frac{8}{3\pi} \frac{F^2}{A}$  5. PUFF [7]

Die in der Praxis schwer durchführbare Formel  $V = 2/3 CF$  (MICKLEWRIGHT, KURNICK, HODES [5]) haben wir in Ermangelung einer entsprechend genauen Messvorrichtung nicht angewandt.

## Material und Methoden

800 Leberzellkerne (Ratte), 270 Aszitestumorzellkerne und 289 glatte Muskelzellkerne (aus der Longitudinalschicht des Dünndarms) wurden mit 90fachem H. I.-Objektiv und Periplan-Okular 15 gemessen; die Projektionsentfernung stellten wir so ein, dass die Endvergrößerung 3000fach sei. Die Kernkonturen wurden nachgezeichnet, die Durchmesser in mm, die Oberflächen in  $\text{cm}^2$  gemessen, die log V-Werte von den entsprechenden Nomogrammen

abgelesen und in die von 2,15 log ausgehenden Klassen mit der Ausdehnung  $\pm \frac{\log 2}{6} \approx \pm 0.05$  gruppiert (INKE, PALKOVITS, GYÁRFÁS, [3]).

Weiterhin bestimmten wir die anscheinende Exzentrizität der Zellkerne und gruppierten die erhaltenen Werte in Klassen von 0,1 Ausdehnung.

### Ergebnisse

Die mit den verschiedenen Formeln gewonnenen Resultate bei Leberzellen sind im ersten Drittel der Abb. 1 und 2, die mit Aszitestumorzellen festgestellten im zweiten, die die glatten Muskelzellen betreffenden im dritten Drittel derselben Abbildungen ersichtlich. Die Verteilung der Exzentrizitäten zeigen die Teile *a*, *b*, *c* der Abb. 3.

Die Kurven, welche die Verteilung der Leberzellkernvolumen darstellen, verlaufen ziemlich nahe nebeneinander, unter den Durchschnittswerten (Abb. 2) stimmen die Resultate der 1. und 3. Formel sowie der 2. und 4. Formel überein, während das Durchschnittsergebnis der 5. signifikant kleiner ist als das der anderen. Die durchschnittliche scheinbare Exzentrizität macht 0,8647 aus.

Die Kurven der Aszitestumorzellen sind bereits erheblich verstreuter, unter den Durchschnittswerten (Abb. 2) stimmen lediglich die Resultate der 3. und 5. Formel überein, die übrigen unterscheiden sich voneinander und von diesen signifikant. Die durchschnittliche virtuelle Exzentrizität beträgt 0,7392.

Die das Volumen der glatten Muskelzellkerne darstellenden Kurven laufen derart verschieden, als ob sie sich gar nicht auf dasselbe Material beziehen würden. Unter den Durchschnittswerten (Abb. 2) ergeben die 2. und 5. Formel ein annähernd gleiches Resultat, sämtliche anderen Werte unterscheiden sich von diesen und voneinander stark signifikant. Unter den absoluten Werten finden wir 230-, 300- bzw. mehr als 600%ige Abweichungen. Die durchschnittliche virtuelle Exzentrizität ist 0,2075.

### Besprechung

Das reale Ergebnis der Formeln ist vom Verhältnis (der Exzentrizität) der Durchmesser, der Lage des Kernes im Raum und von den Messungsfehlern abhängig. Die Lage des Kernes im Raum lässt sich durch den Winkel kennzeichnen, den die (mit der optischen Achse des Mikroskopes übereinstimmende) Betrachtungsachse mit der Rotationsachse des Kernes bildet (*a*).

MÖRIKE [6] hatte auf mathematischer Grundlage nach den Formeln 1, 4 und 5 die zu erwartenden Abweichungen vom wirklichen Wert als Funktion der Veränderung der Exzentrizität und des *a*-Winkels in Prozent abgeleitet. Unsere vorliegenden Untersuchungen haben wir zur experimentellen Kontrolle dieser theoretischen Feststellungen und zu ihrer Weiterentwicklung durchgeführt.



Da wir das Volumen derselben Kerne von gleicher Exzentrizität und sterischer Lage nach mehreren Formeln bestimmten, können die Differenzen zwischen den gewonnenen Werten durch die Zusammenwirkung von drei Faktoren verursacht sein, nämlich durch die systematischen Abweichungen der Formeln, die Ungenauigkeiten der Messung und durch die Abweichung der Kernformen von der idealen Bestaltung.

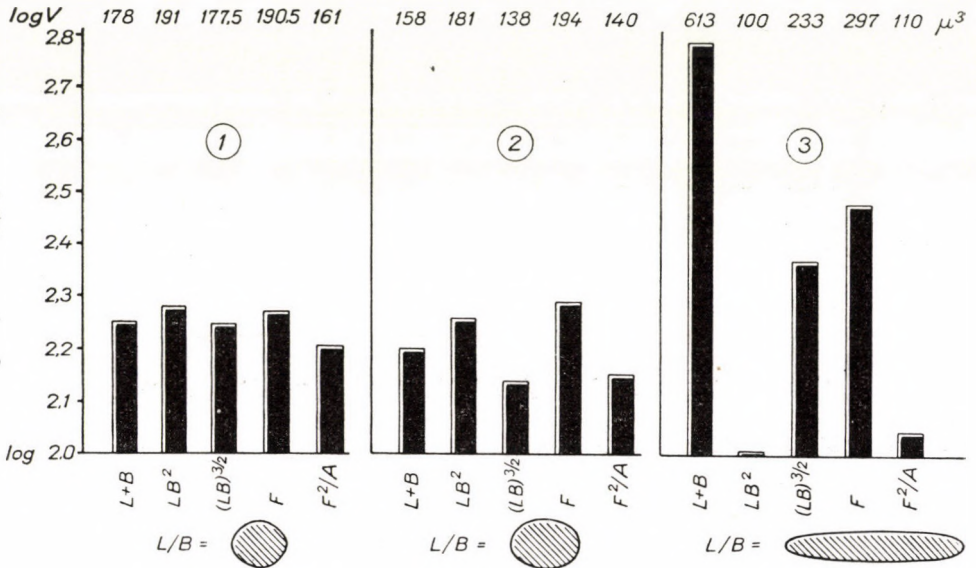


Abb. 2. Graphische Darstellung der log V-Durchschnittswerte der Leber-, Aszites- und glatten Muskelzellkerne unter Angabe der log V- und Exzentrizitätswerte (B/L). Die Konstanten sind bei den Formeln nicht bezeichnet. Log V-Werte :

	Leberzellen	Asziteszellen	Glatte Muskelzellen
1. ....	2,2503	2,1989	2,7875
2. ....	2,2812	2,2574	2,0010
3. ....	2,2497	2,1392	2,3662
4. ....	2,2799	2,2880	2,4726
5. ....	2,2061	2,1477	2,0420

Wir gingen folgendermassen vor: Nach der Formel  $\lambda = \sqrt{1 - (1 - \varepsilon^2) \cos^2 \alpha}$  des Faktors der Grossachsendistorsion konstruierten wir die zu erwartenden log V-Abweichungen bei den  $\alpha$ -Winkeln 0—90°. Die gewonnene Kurve zeigt Abb. 4. Da die Resultate der 2. und 5. sowie 3. und 4. Formel theoretisch übereinstimmen, sind auf Abb. 4 für jede Exzentrizität nur je 3 Kurven zu sehen. Auf Grund dieser Abbildung dürfen wir folgendes feststellen: A) Die Ergebnisse der 2. und 5. Formel können bei keiner Exzentrizität und keinem  $\alpha$ -Winkel höhere Werte ergeben als die Resultate der anderen Formeln. B) Die 1., 3. und 4. Formel können auch niedrigere und höhere als die realen Resultate zeitigen, doch geben die Resultate der 1. Formel meistens höhere Werte als die der 3. und 4. Formel, ausgenommen die Fälle unter

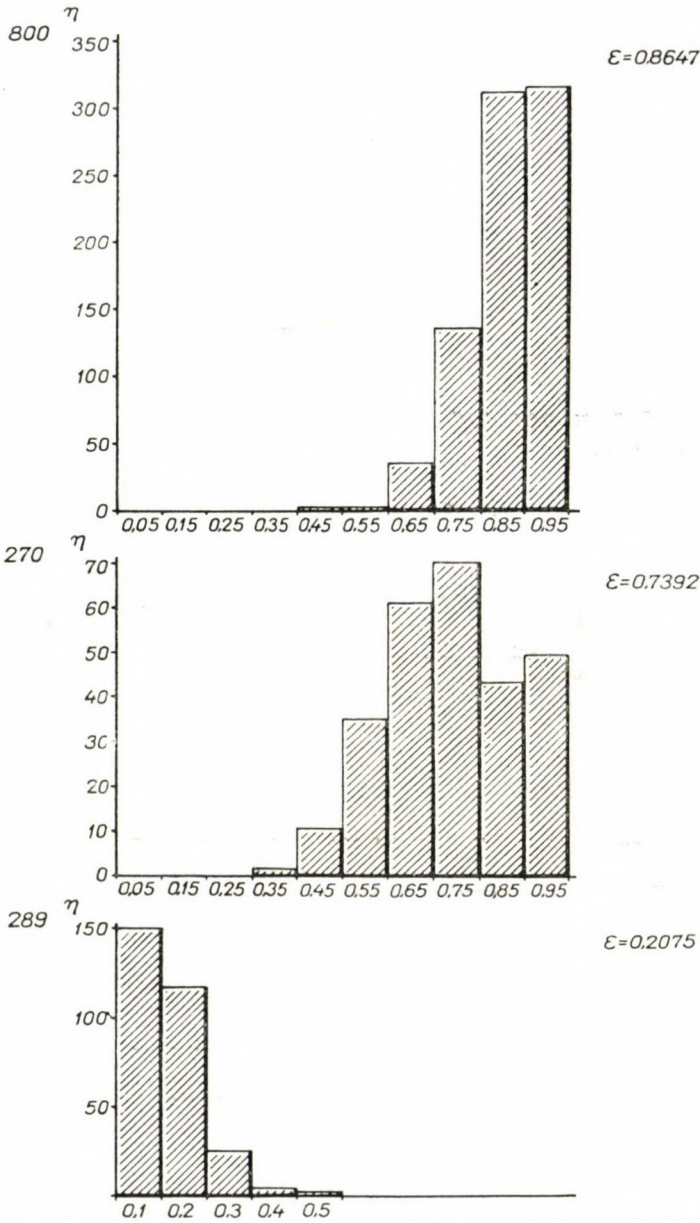


Abb. 3. Verteilung der Exzentrizitäten bei a) 800 Leberzellkernen, b) 270 Aszitestumorzellkernen, c) 289 glatten Muskelzellkernen

einem Winkel von etwa  $40^\circ$ . Diese braucht man jedoch nach der mathematischen Analyse FISCHERS [1] nicht zu berücksichtigen, weil dieser Betrachtungs- (Schnitt-) Winkel bei völlig ungeordneter Verteilung nicht vorkommen kann.

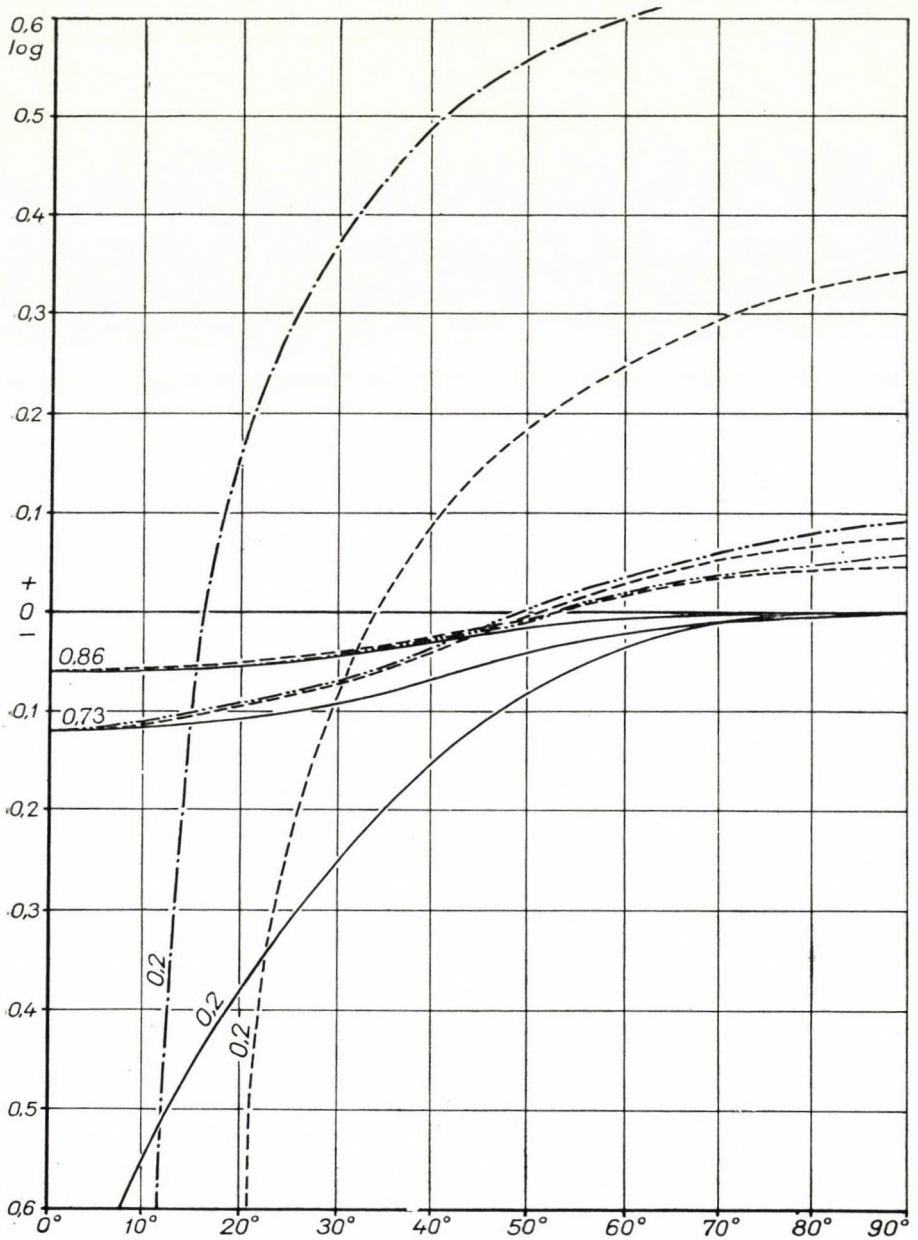


Abb. 4. Zu erwartende Abweichung des log V-Wertes bei den auf Abb. 3 dargestellten virtuellen Exzentrizitäten auf Grund der Formeln

- 1. (3-4), (2-5)
- 1 . . . . .
- (3-4) - - - - -
- (2-5) —————

Vor allem untersuchten wir, wie sich die gewonnenen log V-Durchschnittswerte zueinander verhalten. Als real kann man das Ergebnis betrachten, das den oben erwähnten Zusammenhängen *A*) und *B*) Genüge tut. Auf dieser Grundlage sehen wir in bezug auf die Leberzellkerne, dass die 2. Formel dem Zusammenhang *A*) und die 4. Formel dem Zusammenhang *B*) nicht entspricht. Bezüglich der Aszitestumorzellkerne verhält es sich ebenso. In bezug auf die glatten Muskelzellkerne befinden sich die log V-Durchschnittswerte in einer diesen Zusammenhängen entsprechenden Anordnung. Bei der weiteren Bewertung der Leberzell- und Aszitestumorzellkerne haben wir die Ergebnisse der 2. und 4. Formel unberücksichtigt gelassen.

Mit Hilfe der nach den verschiedenen Formeln gewonnenen Differenzen der log V-Durchschnittswerte bestimmten wir den gegebenen  $\alpha$ -Winkel auf folgende Weise. Wir zeichneten die Differenzen der nach den einzelnen Formeln errechneten log V-Durchschnittswerte im Verhältnis zur 5. Formel (bei den glatten Muskelkernen auch im Verhältnis zur 2. Formel) im Massstab der Abb. 4 auf ein durchsichtiges Lineal. Dieses Lineal bewegten wir parallel zur Achse *y* mit dem auf die Kurven der 5. Formel gelegten Nullpunkt solange von links nach rechts, bis wir die Lage fanden, in der die Differenzen zwischen den gemessenen Durchschnittswerten mit den theoretisch zu erwartenden annähernd übereinstimmten. An der Achse *x* lässt sich nunmehr der Wert des zugehörigen  $\alpha$ -Winkels ablesen. Auf diese Weise fanden wir, dass der Winkel bei Leberzellkernen etwa  $70^\circ$ , bei Aszitestumorzellkernen etwa  $60\text{—}65^\circ$ , — es sei bemerkt, dass in diesem Fall auch das Resultat der 3. Formel nicht dem theoretisch zu erwartenden entspricht und wir den Winkel aus der Differenz zwischen der 1. und 5. Formel bestimmten —, bei glatten Muskelzellkernen hingegen  $90^\circ$  ausmacht. Im letzteren Fall weicht das Ergebnis der 4. Formel von dem theoretisch zu erwartenden Resultat ab. Die beste Anpassung erhielten wir, wenn wir die Differenzen der log V-Durchschnittswerte nicht zum Resultat der 2., sondern zu dem der 5. Formel ins Verhältnis setzten.

Unser Verfahren kann nur annähernde Resultate ergeben, weil es sich bei der gemessenen Exzentrizität nur um eine virtuelle handelt. Von der Bestimmung des Korrektionsfaktors (die leicht erfolgen kann) konnten wir daher absehen. (Eine genauere, mathematisch besser begründete Methode werden wir, gestützt auf die Untersuchungen von FISCHER [1], später mitteilen (FISCHER—INKE).

Es scheint nicht erforderlich, die Grösse des  $\alpha$ -Winkels in der täglichen Praxis zu bestimmen. Bei der wiederholten Untersuchung der Kerne, die räumlich bestimmt geordnete Achsen, mit grosser Exzentrizität haben, kann es jedoch notwendig werden — unter experimentellen Bedingungen, zur Vermeidung der sich aus dem unrichtigen Schnittwinkel ergebenden Messfehler — den annähernden Wert des  $\alpha$ -Winkels auf obige Weise zu bestimmen.

Nach unseren Ergebnissen sind die bei Kernvariationsuntersuchungen gebräuchlichen Formeln folgendermassen zu bewerten: In bezug auf unsere drei Untersuchungsmaterialien stimmte das Ergebnis der PUFFSchen Formel  $\left(\frac{8}{3\pi} \frac{F^2}{A}\right)$  mit dem theoretisch zu erwartenden am besten überein, und auch im absoluten Wert wich es und zwar bei sämtlichen Exzentrizitäten am wenigsten von dem mit Hilfe sämtlicher Formeln bestimmbareren »rechten« Wert ab. Die Formeln nach JACOB  $\left(\frac{\pi}{48} (L+B)^3\right)$  und FISCHER—INKE  $\left(\frac{\pi}{6} (LB)^{3/2}\right)$  gaben die theoretisch zu erwartenden Abweichungen (letztere nur in zwei Fällen), man kann sie daher im Bedarfsfall zur Kontrolle der Werte der PUFFSchen Formel bzw. zur Bestimmung des  $\alpha$ -Winkels verwenden. Die VOSSsche Formel  $\left(\frac{4\pi}{3} (F)^{3/2}\right)$  und die Formel  $\frac{\pi}{6} AP^2$  ergaben meistens von den theoretisch zu erwartenden abweichende Resultate, weshalb wir sie für weniger geeignet halten als die PUFFSche Formel. Die letzte, die in der Literatur am meisten benutzt wird, liefert nur relativ bewertbare Ergebnisse. Die bei Anwendung dieser Formel zweimal beobachteten wesentlich höheren und einmal gewonnenen unwesentlich niedrigeren Werte führen wir darauf zurück, dass die Form der Kerne von der idealen Kugel- bzw. Ellipsoidform zumeist abweicht. Die die Durchschnitts-Oberfläche und den grössten Durchmesser (d. h. drei Parameter) berücksichtigende PUFFSche Formel arbeitet auch bei Kernen, deren Form von der idealen abweicht, mit kleineren Fehlerquellen als die zwei Parameter berücksichtigende Rotationsellipsoidformel. Der Wert der PUFFSchen Formel wird ferner noch dadurch erheblich erhöht, dass die Abweichung vom wirklichen Wert *immer* (nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch) in einer Richtung verläuft, d. h. nur nach unten verzerren kann.

Auf Grund dieser Ergebnisse empfehlen wir die PUFFSche Formel nicht nur — wie in der vorigen Mitteilung (FISCHER—INKE [2]) — für Kerne mit grosser Exzentrizität, sondern für jede Art von Kernvariationsuntersuchungen. Ihre Vorteile bieten für die durch sie bedingte Mehrarbeit reichlichen Ersatz. In gewissen Fällen kann die gleichzeitige Anwendung mehrerer Formeln nötig werden. Um die Arbeit mit diesen zu erleichtern, ferner um gewisse Nachteile unserer bisherigen Nomogramme auszumerzen (die bei anderen als 2—3000fachen Vergrösserungen Umrechnungen erforderten), haben wir unsere Nomogramme auf eine zusammengezogene und vereinfachte Form modifiziert (INKE—FISCHER [3a]), die wir demnächst veröffentlichen werden.



**Zusammenfassung**

Die in der Literatur beschriebenen linearen, planimetrischen und kombinierten Kugel- bzw. Rotationsellipsoidformeln wurden bei verschiedenen Exzentrizitäten durch Auswertung der gleichen Materialien nach sämtlichen Formeln und durch Gegenüberstellung mit ihren Ergebnissen bzw. mit den theoretisch zu erwartenden Resultaten verglichen. Die Untersuchungen ergaben, dass das Ergebnis der PUFFSchen Formel  $\left(\frac{8}{3\pi} \frac{F^2}{A}\right)$  bei allen Exzentrizitäten mit dem theoretisch zu erwartenden am besten übereinstimmte und die Abweichung auch absolut am geringsten war. Die Formeln nach JACOB  $\left(\frac{\pi}{48} (L+B)^3\right)$  und FISCHER-INKE  $\left(\frac{\pi}{6} (LB)^{3/4}\right)$  ergaben die theoretisch zu erwartenden Abweichungen und können nötigenfalls zur Kontrolle der Werte der PUFFSchen Formel benutzt werden. Die VOSSsche Formel  $\left(\frac{4\pi}{3} (F)^{3/2}\right)$  und die Formel  $\frac{\pi}{6} AP^3$  führten meistens zu Resultaten, die von den theoretisch zu erwartenden abwichen, weshalb ihre Anwendung in Fällen, in denen die Genauigkeit des absoluten Wertes wesentlich ist, nicht empfohlen werden kann.

Durch gleichzeitige Anwendung mehrerer Formeln besteht die Möglichkeit zur Bestimmung des durchschnittlichen Betrachtungswinkels ( $\alpha$ ). Die Notwendigkeit zur Bestimmung dieses Winkels kann sich unter experimentellen Bedingungen dann ergeben — zur Vermeidung der durch den unrichtigen Schnittwinkel bedingten Messfehler —, wenn solche Kerne wiederholt untersucht werden sollen, deren Achsen bestimmt geordnet und zugleich grosse Exzentrizität haben.

**LITERATUR**

1. FISCHER, J.: (1958) Über die Korrekturen der aus dem Schnitt errechneten Angaben von kugel- und rotationsellipsoidförmigen Körpern. MTA Mat. Kut. Int. Közleményei (erscheint demnächst). — 2. FISCHER, J., INKE, G.: (1956) Nomogramme zur Berechnung des Kernvolumens. Acta morph. Acad. Sci. Hung., 7, 141—165. — 3. INKE, G., PALKOVITS, M., GYÁRFÁS, I. (1958): Über methodische Fragen der Kernvariationsstatistik. VI. Die Bewertung der Gruppierungsmethoden. Acta morph. Acad. Sci. Hung. 8, 263—271. — 3a. INKE, G., FISCHER, J.: (1958) Ein Rechenschieber-Nomogramm für Kernvariationsuntersuchungen (erscheint demnächst). — 4. JAKOVJ, W.: (1925) Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Arch. Entw. Mech., 106, 124—192. — 5. MICKLEWRIGHT H. L., KURNICK, A. B., HODES, R. H.: (1953) The Determination of Cell Volume. Exp. Cell. Res., 4, 151—154. — 6. MÖRKE, K. D.: (1953) Mathematische Erörterungen zur Messmethodik von nicht runden Zellkernen. Anat. Anz., 100, 87—95. — 7. PUFF, A.: (1953) Methode zur planimetrischen Kernvolumenbestimmung an uneinheitlichem Kernmaterial. Z. wiss. Mikr., 61, 210—212. — 8. VOSS, H.: (1951) Die Volumenbestimmung kugelförmiger Kerne mit der indirekten oder Planimetermethode. Anat. Anz., 98, 41—46.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ЯДЕРНО-ВАРИАЦИОННОГО СТАТИСТИЧЕСКОГО СПОСОБА V. ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ ФОРМУЛ ПРИМЕНЯЮЩИХСЯ ЭКСЦЕНТРИЧНОСТЯХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕГО УГЛА ЗРЕНИЯ, ОТНЕСЕННОГО К ГЛАВНОЙ ОСИ**

Г. ИНКЕ, М. ПАЛКОВИЧ, И. ДЪАРФАШ И А. БАЙТАИ

Авторы проводили сравнение описанных в литературе линейных, планиметрических и комбинированных шаровых или же ротационных эллипсоидных формул в случае различных эксцентриситетов, таким образом, что они оценивали тот же самый материал при помощи всех формул и сравнивали полученные результаты друг с другом или же с теоретически ожидаемыми результатами. Они установили, что результаты формулы Пuffа при всех эксцентриситетах соответствовали лучше всего теоретически ожидаемым результатам, и в абсолютной величине отклонение также было меньше всего. Формулы Якоби и Фишер—Инке дали теоретически ожидаемые отклонения, и их в случае

надобности можно использовать для проверки величин формулы Пуффа. Формула Фосса и формула  $\frac{\pi}{6} AP^2$  в большинстве случаев привели к результатам, отклоняющимся от теоретически ожидаемого результата, и поэтому не рекомендуется применять этих формул в таких случаях, когда существенным является точное определение абсолютной величины.

При одновременном применении нескольких формул возможно определить средний угол зрения. В случае повторного исследования ядер большой эксцентricности при экспериментальных условиях может оказаться необходимым определение среднего угла зрения, для устранения ошибок при измерении, возникших вследствие неправильного угла сечения.

METHODICAL PROBLEMS OF KARYOMETRY. V. APPRECIATION OF THE DIFFERENT FORMULAE IN CASE OF VARIABLE ECCENTRICITIES AND DETERMINATION OF THE MEAN VISUAL ANGLE FORMED WITH THE MAIN AXIS

G. INKE, M. PALKOVITS, I. GYÁRFÁS and A. BAJTAI

The linear, planimetric and combined spherical and rotatory ellipsoid formulae have been compared in the case of different eccentricities. The same material was subjected to evaluation with every formula and the results were compared with one another, and with the theoretically probable result. *Puff's* formula was found best to agree in the case of possible eccentricities with the theoretically probable result: the divergence was, even in absolute terms, the slightest. The *Jacobj* and the *Fischer-Inke* formulae gave the theoretically probable divergences. These formulae may be used for controlling the values of *Puff's* formula. The *Voss* and the  $\frac{\pi}{6} AP^2$  formulae mostly yielded results different from the theoretically probable value so that it is not advisable to use them in cases when the correctness of the absolute value is essential.

The simultaneous use of several formulae makes it possible to determine the mean visual angle. This may be necessary in case of repeated experimental examinations, of spatially oriented nuclei, of great eccentricity, in order to eliminate errors which may arise from an incorrect angle of intersection.

Dr. Gábor INKE	} Budapest, IX., Tűzoltó u. 58. Ungarn
Dr. Miklós PALKOVITS	
Dr. Iván GYÁRFÁS	
Dr. Attila BAJTAI	