

Miroslav Kališnik

TEMELJI STEREOLOGIJE

Prevela sa slovenskog

Bosiljka Durst-Živković

Ljubljana 1985

Prijevod djela: M.Kališnik: TEMELJI STEREOLOGIJE
2. predelana in razširjena izdaja, Ljubljana 1982

Prvo izdanje na hrvatskom ili srpskom jeziku

Dr.sc. Miroslav Kališnik, dr.med., redovni profesor
histologije i embriologije na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta Edvard Kardelj u Ljubljani

Dr. sc. Bosiljka Durst-Živković, dr.med., redovni
profesor histologije i embriologije Medicinskog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Izdavač: Stereološka sekcija Zveze društev anato-
mov Jugoslavije, Institut za histologijo in embri-
ologijo MF, 61105 Ljubljana, p.p. 10

Tisak: Janez Pleško, Rožna dolina, c. IV 36,
Ljubljana

Naklada: 600 primeraka

SADRŽAJ

Strana

0. PREDGOVORI	
0.1. Predgovor prijevodu	5
0.2. Predgovor prvom izdanju	7
0.3. Predgovor drugom izdanju	8
1. Uvod u stereologiju	10
1.1. Definicija stereologije	10
1.2. Osnovni stereološki pojmovi i simboli	11
1.3. Značenje stereologije	15
1.4. Razvoj stereologije u svijetu i u Jugoslaviji	16
2. Testni sistemi	20
2.1. Tipovi testnih sistema	20
2.2. Upotreba testnih sistema	33
3. Stereološke metode	37
3.1. Određivanje volumena	38
3.1.1. Volumenska gustoća	38
3.1.2. Apsolutni volumen	40
3.2. Određivanje površina	44
3.2.1. Površinska gustoća	44
3.2.2. Apsolutna površina	46
3.3. Volumensko-površinski omjeri	49
3.4. Određivanje duljina	56
3.4.1. Duljinska gustoća	56
3.4.2. Apsolutna duljina	57
3.5. Određivanje broja čestica	59
3.5.1. Numerička gustoća	59
3.5.1.1. Metode za tanke rezove	61
3.5.1.2. Metode za debele rezove	65
3.5.2. Apsolutni broj čestica	68
3.5.2.1. Indirektna metoda	68
3.5.2.2. Direktna metoda	68
3.5.3. Numerička gustoća i dubinska oštrina	70
3.6. Razdioba (distribucija) čestica po veličini	73
3.7. Određivanje zakrivljenosti	81
3.7.1. Specifična gustoća zakrivljenosti	81
3.7.2. Druge mjere zakrivljenosti ploha	83

3.8. Koherentni sistem stereoloških formula	84
3.9. Astereologija	86
4. Upute za stereološko istraživanje	91
4.1. Planiranje stereološkog istraživanja	91
4.1.1. Kvalitativna analiza i klasifikacija objekata	91
4.1.2. Odabiranje uzorka	96
4.1.2.1. Uzimanje uzorka na nepravilno raspoređenim (izotropnim) strukturama	98
4.1.2.2. Uzimanje uzorka na pravilno raspoređenim strukturama	101
4.1.2.3. Određivanje veličine uzorka	104
4.1.3. Izbor stereoloških testova	107
4.1.4. Statistička obrada	109
4.2. Oprema i automatizacija	111
4.3. Izvori pogrešaka	117
5. Dodaci	127
5.1. Simboli	127
5.1.1. Geometrijska tijela	127
5.1.2. Mikroskopska tehnika	127
5.1.3. Testni sistemi	127
5.1.4. Određivanje volumena	128
5.1.5. Određivanje površina	128
5.1.6. Određivanje duljina	128
5.1.7. Određivanje broja čestica	129
5.1.8. Određivanje zakrivljenosti	129
5.1.9. Korekturni faktori	129
5.1.10. Statistika	129
5.2. Trojezični stereološki rječnik	131
5.3. Literatura i bibliografija monografija	136
5.3.1. Literatura	136
5.3.2. Bibliografija monografija i monotematskih metodoloških brojeva revija	142
5.4. Statističke tablice	145
5.4.1. Normalna raspodjela	145
5.4.2. Studentova raspodjela t	146
5.4.3. Raspodjela χ^2	147
5.4.4. Raspodjela F	148

O. PREGOVORI

O.1. Predgovor prijevodu

Pružila nam se prilika da metodološkim priručnikom M.Kališnika "Temelji stereologije" na slovenskom jeziku sažeto dobijemo osnovne informacije o suvremenoj metodologiji, koja nam omogućava količinski izraziti morfološka zapažanja najrazličitije prirode. Drugo izdanje ovog priručnika izraz je zanimanja za primjenu postupaka ove znanstvene discipline u nas. Zbog toga sam smatrala neophodnim da ovo djelo prevedem na hrvatski jezik i učinim dostupnijim većem broju znanstvenih radnika.

Drugo izdanje je plod višegodišnjeg rada u pravcu istraživanja i pronalaženja novih postupaka, kao i nastavno pedagoških iskustava u Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Ljubljani, koji predstavlja vodeći centar teorijskog proučavanja i praktične primjene stereologije u nas. Novi originalni doprinosi naših i inozemnih autora, te za korisnike početnike prikladnije raspoređeno gradivo doprinos su kvaliteti drugog izdanja. Ovo je razlog da smo odustali od objavljivanja već učinjenog prijevoda prvog izdanja.

Na pomoći u izradi prijevoda zahvaljujem na prvom mjestu Miroslavu Kališniku koji mi je dao brojne korisne savjete. On je za prijevod učinio manje izmjene i dopune drugog slovenskog izdanja. Tako je uvrstio u poglavlje 3.5.1.1. Metode za određivanje numeričke gustoće za tanke rezove metodu po DeHoffu i Weibelu; u poglavlje 3.5. Određivanje broja čestica pod poglavlje 3.5.3. Z.Pajer: Numerička gustoća i dubinska oštrina te dopunu Ide Eržen u potpoglavlju 4.1.1. Kvantitativna analiza i klasifikacija objekata. Autorima dugujem zahvalnost na suradnji. Za tehničko uredništvo zahvaljujem Zdenki Pajer.

Zavod za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pružio mi je

podršku u pripremanju ovog prijevoda. Asistentica mr Đurđica Grbeša učinila je korekturu teksta, a tajnica Marija Crneković primjeran strojopis. Svima njima izražavam na ovom mjestu svoju zahvalnost.

U prevođenju sam naročitu pažnju poklonila odabiranju izraza stereološke metodologije. Većinom sam zadržala internacionalnu terminologiju smatrajući da će korisnik tako imati neposredniju vezu s inozemnom stereološkom literaturom. Pozivu autora na suradnju pri izradi stereološke terminologije na našem jeziku rado sam se odazvala, te sam tako dala svoj prilog za trojezični rječnik drugog slovenskog izdanja.

Zagreb, prosinca 1984.

Prevodilac

Bosiljka Durst-Živković

0.2. Predgovor prvom izdanju

Ovu publikaciju objelodanjuje Zavod za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani (ZHE), koji u našoj državi ima najdulju tradiciju u upotrebi i razvijanju stereoloških metoda. U nakladi sudjeluje Prirodoslovno društvo Slovenije (PDS) kao izdavač. PDS je naime tradicionalni organizator brojnih postdiplomskih tečajeva. U skladu sa svojom multidisciplinarnom namjenom predstavlja most među raznim znanstvenim granama, što je također značajno za stereologiju.

Djelo izlazi prigodom 1. jugoslavenskog stereološkog seminara, kojeg uz ZHE i PDS organizira također Stereološka sekcija Udruženja anatoma Jugoslavije (UAJ). Upravo je iz UAJ potekla pobuda za organiziranje tog seminara, koji treba označiti početak uvođenja organiziranog poticaja, unapređivanja i usklađivanja stereoloških istraživanja među jugoslavenskim biološkim morfolozima. Kao simbol tih djelatnosti služi znak Međunarodnog društva za stereologiju na koricama; slova JUST na lijevo neka označavaju jugoslavensku stereologiju, a godina 1976. početak njezinog organiziranja.

Dokument je uglavnom plod proučavanja literature, a djelomično i vlastitih iskustava i istraživanja. Određivanje apsolutnog volumena iz serije rezova [sl. 8, formula (9)]⁷, a također i izračunavanje prosječnog polumjera solidnih valjkastih organa [sl. 15, formula (17)]⁷ originalni su doprinosi stereološkoj metodologiji.

U našoj sredini nemamo stereološke terminologije. Trojezični rječnik je prijedlog. Nadam se, da ću nadležne potaknuti na razmišljanje te da će se javiti s boljim prijedlozima. Namjerno sam izbjegavao prenaplo i pretjerano prevođenje međunarodnih stručnih izraza na naš jezik. Jezik neka i u stereologiji

bude sredstvo sporazumijevanja.

Još nešto o skriptama. Zbog nedostatka vremena tekst nije bilo moguće stilski i jezično pročistiti. Zbog toga nisu isključeni nedostaci ili pogreške. Korisnike molim da me na njih dobronamjerno upozore. Unatoč tome mislim, da će ovaj svezak koristiti brojnim slušateljima postdiplomskog studija, a također i istraživačima, koji u svom radu naiđu na probleme ovakve vrste, a nisu upoznati sa stereološkom metodologijom.

Zahvaljujem suradnicima ZHE, koji su pomagali kod uvođenja stereoloških metoda u istraživački rad i kod oblikovanja ovog djela. Također zahvaljujem izdavaču PDS.

Ljubljana, siječnja 1976.

Autor

0.3. Predgovor drugom izdanju

Prvo izdanje ovog priručnika je prije dužeg vremena rasprodano. Sudionici osnovnih stereoloških seminara iz cijele Jugoslavije te brojni drugi postdiplomci crpili su iz njega osnovne informacije o stereologiji. Mnogi od njih nisu samo uzimali već su također i davali, te time podizali razinu ukupnog stereološkog znanja, ne samo u domaćim već i u svjetskim razmjerima. Drugo izdanje je zato plod tih iskustava. Za mnoge korisne savjete zahvaljujem najprije Mariji Bogataj, Idi Eržen, Zdenki Pajer, Majdi Pšeničnik, Olgi Vraspir-Porenta; Bosiljka Durst-Živković će prijevodom na hrvatski ili srpski jezik olakšati upotrebu ovog drugog izdanja u našoj državi.

Materijal drugog izdanja je tako raspoređen da samoukima, u prvom redu učesnicima osnovnih stereoloških seminara omogućava sintetsku izgradnju teorijskog znanja. K većini poglavlja dodane vježbe neka olakšaju praktično usvajanje znanja. Sva su poglavlja nanovo napisana. Potpuno nova su poglavlja o određivanju zakrivljenosti, astereologiji, opremi i automatizaciji, dodani su pregledi simbola i statističke tablice. Broj slika je udvostručen. Za pomoć kod toga zahvaljujem Vladimiru Drnovšku i Milanu Mikcu.

Neke manje značajne pojedinosti iz prvog izdanja su izostavljene. Unatoč težnji za jezgrovitošću, opseg drugog izdanja je gotovo udvostručen. Zdenka Pajer je pomagala kod tehničkog oblikovanja. Strojopis je djelo Marinke Šešet.

Svima spomenutim, a isto tako i nespomenutim, koji su mi na neki način pomagali iskreno zahvaljujem. Vjerujem, da će i drugo izdanje biti jednako tako dobro primljeno kao što je bilo prvo.

Ljubljana, svibnja 1982.

M.Kališnik

1. UVOD U STEREOLOGIJU

1.1. Definicija stereologije

Stereologija je multidisciplinarna metodologija, čijim se postupcima iz dvodimenzionalnih presjeka nekog tijela kvantitativno procjenjuje njegova tro-dimenzionalna unutarnja građa.

Objekti stereološkog proučavanja mogu biti matematski apstraktni ili su to stvarni predmeti iz neživog ili živog svijeta. Ukoliko različiti objekti imaju sličnu strukturu, metode primijenjene u njihovom istraživanju mogu biti slične ili potpuno jednake. Često je potrebno metodu, koja će biti upotrijebljena za analizu strukture nekog materijala ili tkiva, najprije postaviti i razraditi na odgovarajućem matematskom modelu. Zbog toga je neophodno da u početku, pri postavljanju stereoloških metoda sudjeluju matematičari, a korisnici su predstavnici najrazličitijih struka. Struke se dijele u dvije velike skupine: znanosti o materijalima te biološke znanosti.

Tijelo ćemo, u svrhu istraživanja njegove strukture presjecati s jednom ili više ravnina. Na ravnini presjeka dobijemo sliku, koju najprije analiziramo kvalitativno, da bismo upoznali sastavne dijelove proučavanog presjeka. To je najčešće povećana slika dobivena svjetlosnim ili elektronskim mikroskopom, a možemo također proučavati objekte u makroskopskom području. Budući da je struktura proučavanog tijela pod različitim povećanjima različita, potrebno je navesti povećanje, pod kojim je izvršeno stereološko istraživanje.

Komponente proučavanog presjeka možemo, tek nakon što smo ih kvalitativno upoznali, kvantitativno vrednovati kvantitativnom analizom slike. Za provođenje tog postupka osnovni je uvjet, da su na presjeku sastavni dijelovi tijela međusobno jasno razgraničeni. Stereologija u užem značenju riječi ne obrađuje područja, u kojima se pojedine komponente prelijevaju jedna u drugu.

Na koji način možemo, na temelju dvodimenzionalne slike presjeka kroz objekt, izvoditi zaključke o njegovoj unutarnjoj strukturi? Stereološka teorija nas uči da možemo, poštivajući zakone geometrijske vjerojatnosti, iz jednog ili više reprezentativnih presjeka kroz objekt, ocijeniti neke parametre i s njima u trodimenzionalnom prostoru kvantitativno prikazati svojstva za nas zanimljivih sastavnih dijelova objekta. Upotrebom statističkih zakona možemo se opredijeliti za stupanj točnosti na kojem ćemo određivati pojedine parametre.

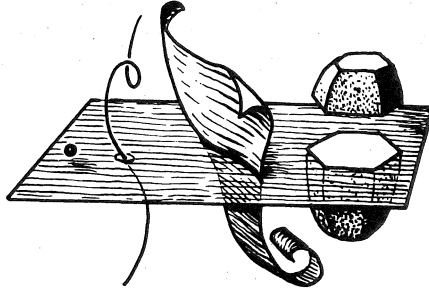
Riječ stereologija skovana je godine 1961, s namjerom da označuje znanstvenu granu definiranu na početku ovog poglavlja. Sastoji se iz grčkih riječi "stereos" što znači tvrd, solidan, trodimenzionalan i "logos" što znači znanost. Mnoge druge nazive upotrebljavamo kao sinonime, npr. kvantitativna stereologija, stereometrija (već uveden naziv za geometriju krutih tijela), morfometrija, histometrija, kvantitativna histologija, kvantitativna analiza slike. Stereologija nema ništa zajedničko s mnogim strukama ili tehnikama, čije ime počinje također sa "stereo-", a možemo ih naći u rječnicima i leksikonima.

1.2. Osnovni stereološki pojmovi i simboli

Za unutarnju građu (strukturiranost) svakog tijela karakterističan je njegov sastav od međusobno ovisnih dijelova (sastojaka, komponenata, struktura) u određenom organizacijskom uzorku. Sve istovrsne sastavne dijelove ukupno nazivamo faza. Dijelovi faze mogu biti povezani ili nepovezani. Ukoliko nisu povezani govorimo o česticama. Osobito su zanimljive konveksne čestice. Za njih je karakteristično da se svaki pravac, koji povezuje bilo koje dvije točke u čestici, nalazi unutar čestice. Svaki sastavni dio nekog tijela ima određen volumen, površinu, duljinu, broj (karakteristike sastavnog dijela).

Za stereološku analizu tijelo presječemo s ravninom i tako dobijemo presjek tijela. Sliku pojedinog sastavnog dijela u presjeku zovemo trag ili profil. Trag trodimenzionalnog sastavnog dijela je dvodimenzionalna ploha, dvodimenzionalne plohe je jednodimenzionalna crta, jednodimenzionalne crte je točka bez

dimenzija, a točka bez dimenzija nema trag u ravnini presjeka. Općenito možemo ustanoviti da je u ravnini presjeka, dimenzija karakteristična za pojedini sastavni dio tijela umanjena za 1 (sl. 1.1.).



Sl. 1.1. Presječemo li n -dimenzijski objekt ravninom dobijemo općenito $(n-1)$ -dimenzijski trag (Elias, Hennig, Schwartz 1971)

Kod proučavanja bioloških objekata radimo s rezovima (odrescima) određene debljine umjesto s beskonačno tankim presjecima!

Sa stereološkom analizom tijela želimo ustanoviti karakteristike njegovih sastavnih dijelova. Pri tome moramo najprije odrediti obuhvatni prostor (referentni prostor) unutar kojeg ćemo utvrditi strukturalna i morfolometrijska svojstva (karakteristike) sastavnih dijelova. Pri utvrđivanju svakog pojedinog svojstva sastavnog dijela ustanovljujemo količinu tog svojstva na prostornoj, površinskoj, duljinskoj ili brojčanoj jedinici; određujemo gustoću svojstva. Konačni cilj je, u pravilu, odrediti gustoću na volumensku jedinicu. Tako volumenska gustoća nekog sastavnog dijela znači njegov volumenski udio u jedinici volumena, površinska gustoća površinu sastavnog dijela u jedinici volumena, duljinska gustoća duljinu sastavnog dijela u jedinici volumena, a numerička gustoća broj čestica u jedinici volumena. Ovu zadnju ima naravno smisla određivati samo za nepovezane faze ili čestice. Često nas, uz relativna svojstva, zanimaju i apsolutna svojstva određenih sastavnih dijelova u čitavom volumenu proučavanog tijela. Tako apsolutni volumen nekog sastavnog dijela znači cjelokupni volumen faze u čitavom volumenu tog tijela, apsolutna površina cjelokupnu površinu te faze, apsolutna duljina cjelokupnu duljinu te faze, te

apsolutni broj broj svih čestica te faze u čitavom volumenu proučavanog tijela.

Ravninu kojom presjecamo proučavano tijelo zovemo testna ravnina. Kod stereološkog mjerenja sliku presjeka tijela pokrijemo testnim sistemom. Testni sistem je naziv za skup geometrijskih elemenata (točke, crte i plohe), koji su svi zajedno raspoređeni u neki određen pravilan sistem. Testni sistem moramo za svako povećanje posebno baždariti (kalibrirati). Obuhvatni (referentni) prostor, koji smo izmjerili s testnim sistemom zovemo referentni sistem.

Opisana načela stereološkog rada odrazuju se također i u stereološkim simbolima. Na žalost, do sada nije, usprkos nastojanja Međunarodnog društva za stereologiju (International Society for Stereology), uspjelo potpuno izjednačiti neke simbole. Većina simbola je izvedena iz prvih slova odgovarajućih latinskih riječi. Tako označujemo simbole za gustoću sa dva velika slova od kojih prvo označuje morfometrijsko svojstvo sastavnog dijela, a drugo referentni prostor, u pravilu kao supskript. Želimo li još označiti, o kojoj se komponenti radi, dodajemo još malo slovo za označivanje komponente. Kada je potrebno točno definirati referentni prostor, dodajemo iza zareza još malo slovo za referentni prostor. U računarskim ispisivanjima, gdje su sva slova u jednom redu i velika znači prvo slovo morfometrijsko svojstvo komponente, drugo referentni prostor, a slova koja određuju komponentu i referentni prostor slijede u zagradi, odvojena su zarezom. Tako bi npr. napisali simbole za numeričku gustoću \underline{b} u cjelokupnom volumenu \underline{c} na slijedeće načine:

$$N(b)/V(c) = N_V = N_{Vb} = N_{Vb,c} = NV(B,C) \quad (1.1)$$

klasični stereološki računarski

Vidi tablicu 1.1.!

Tablica 1.1. Odnos između morfolometrijskih svojstava sastavnih dijelova, referentnih prostora i gustoća tragova s odgovarajućim simbolima (lijevo ispod naziva) i eksponentima koji određuju dimenzije (desno u zagradi) (modificirano po Weibelu 1971)

		REFERENTNI PROSTOR			
		VOLUMEN	AREAL	LINIJA	TOČKA
		V (3)	A (2)	L (1)	P (0)
MORFOMETRIJSKA SVOJSTVA SASTAVNIH DIJELOVA	VOLUMEN V (3)	VOLUMENSKA V_V (0)	AREALNA A_A (0)	INTERCEPTNA L_L (0)	TOČKA P_P (0)
	POVRŠINA S (2)	POVRŠINSKA S_V (-1)	OBRISNA B_A (-1)	PRESJECIŠNA I_L (-1)	
	DUŽINA L (1)	DUŽINSKA L_V (-2)	PROBODIŠNA Q_A (-2)		
	BROJ N (0)	NUMERIČKA N_V (-3)			

GUSTOĆE TRAGOVA

1.3. Značenje stereologije

U povijesti znanosti poznati su primjeri koji pokazuju, da se je neko znanstveno područje razvilo tek nakon što su pojave počeli mjeriti, tj. upotrebom kvantitativnih metoda (npr. alkemija - kemija, astrologija - astronomija). Epistemologija je dijelila znanosti na tvrde ili egzaktne, ako su primjenjivale matematske metode i mekane, ako još nisu dosegle taj stupanj razvitka. Danas se znanosti sve više matematiziraju, ne samo prirodne, već i humanističke i društvene.

Biološke morfološke znanstvene grane su donedavno bile pretežno kvalitativne. Pojedine polukvantitativne ocjene i rijetki kvantitativni podaci nisu zadovoljavali ni same morfologe, a ni korisnike njihovih podataka drugih struka. Morfolozima tek suvremena stereologija omogućava kvantitativno opisati unutar-nju strukturu tijela, pri čemu je također moguće odrediti točnost tih informacija.

Razlike unutarnje strukture između dva razvojna stadija nekog organizma ili između eksperimentalne i kontrolne skupine ili između normalnog i patološki promijenjenog tkiva su često veoma male, a zbog varijabilnosti i nejasne. U takvim slučajevima je pouzdano utvrđivanje razlika samo na osnovu kvalitativnih metoda vrlo teško, nesigurno ili uopće nemoguće. Sa stereološkim metodama je moguće s poznatom točnošću kvantitativno opisati dinamiku promjena strukture, bilo u strukturi nekog organa tijekom ontogenetskog razvoja, bilo odrediti razinu rizika u odbacivanju nul-hipoteze u nekom pokusu ili diferencijalno dijagnosticirati patološki promijenjeno tkivo.

Predstavnici takozvanih funkcionalnih bioloških znanosti, npr. biokemičari, fiziolozi ili patofiziolozi, već dulje vrijeme upotrebljavaju različite kvantitativne metode. Za njih su ipak organizam i njegovi dijelovi "crna kutija", u kojoj ne znaju što se događa, jer ne poznaju strukturnu dinamiku. - Stereološka analiza cijelog organa ili sistema omogućava uvid u povezanost strukture i funkcije; definiranje odgovarajućih strukturnih modela omogućava zatim izračunavanje korelacija među strukturnim i funkcij-

skim parametrima. Stereologiju su više puta slikovito uspoređivali s mostom između strukture i funkcije, koje su samo dva aspekta istog životnog zbiivanja (Weibel 1982).

Značenje stereologije za znanosti o materijalima je slično kao i za biološke znanosti. Unutarnja građa i svojstva materijala međusobno su ovisni. Zbog toga je moguće stereološkom analizom materijala predskazati i njegova fizikalna svojstva (Ondracek 1982).

1.4. Razvoj stereologije u svijetu i u Jugoslaviji

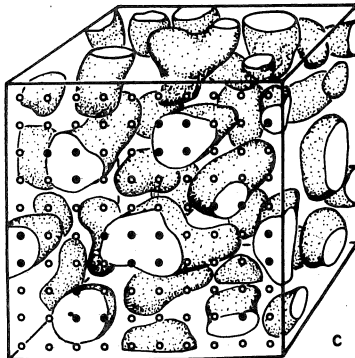
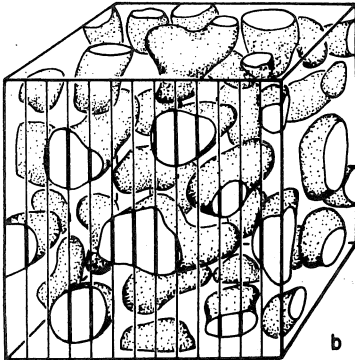
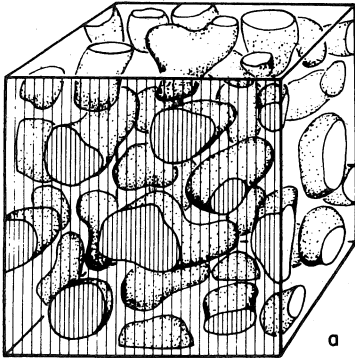
Iako je stereologija, kao smišljeno organizirano znanstveno područje razmjerno mlada znanost, moramo godinu 1777. označiti kao značajni međaš; tada je francuski matematičar i prirodoslovac Georges Louis Leclerk de Buffon objavio rješenje matematskog problema, koji je u povijest stereologije ušao pod imenom "problem igle". Problem je slijedeći: koja je vjerojatnost P , da će igla određene duljine l , slučajno položena u ravninu presjecati jedan od usporrednih pravaca, koji leže u ravnini međusobno udaljeni jednakim razdaljinama H ? Odgovor je:

$$P = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{l}{H} \quad (1.2)$$

To je rješenje kasnije omogućilo procjenu slijedećih stereoloških strukturnih karakteristika: obrisne gustoće, površinske gustoće i apsolutne površine, duljinske gustoće i apsolutne duljine krivulje u nekom tijelu.

Razvitak metoda za određivanje volumenske gustoće bio je razmjerno spor. Francuski geolog Delesse je 1847. uveo procjenjivanje volumenske gustoće iz površinske (arealne) gustoće, tj. udjela profila proučavanih sastavnih dijelova na testnim površinama. Morfolozi su niz godina, na temelju tog načela proučavali volumensku gustoću pomoću planimetrije ili na još skuplji i sporiji način, koji oduzima mnogo vremena: izrezivanjem i vaganjem papira na kojem su nacrtani ili fotografirani obrisi sastavnih dijelova. Daljnjoj ekonomizaciji metoda pridonijele su spoznaje austrougarskog geologa Rosivala (1898) koji je pri-

određivanju volumenske gustoće površinsku gustoću nadomjestio interceptnom gustoćom, tj. relativnom duljinom testnih linija, koje leže unutar profila proučavanih sastavnih dijelova, u odnosu na ukupnu duljinu svih testnih linija. Ta mogućnost se danas iskorištava kod automatskih mjernih aparata, koji "opipaju" (skaniraju) preparate u smjeru pravaca,



koji se usporedno pomiču po čitavom preparatu. Dva autora, vjerojatno neovisno jedan od drugoga su konačno volumetriju još više pojednostavili; bili su to američki geolog Thomson (1930) i sovjetski mineralog Glagolev (1932, 1934). Učinili su to tako da su za procjenjivanje volumenske gustoće jednostavno uzeli gustoću točaka, tj. dio, broj testnih točaka, koje padaju na profile proučavanog sastavnog dijela, u odnosu na broj svih testnih točaka. Mjerenje volumena je tako svedeno na jednostavno brojenje točaka (sl. 1.2.). Američki histolog Chalkley (1943) bio je prvi biolog koji je upotrijebio "metodu pogodaka" u biologiji. Sažetak kongresnog referata (Kališnik 1959) je vjerojatno najstariji jugoslavenski stereoološki dokument, u kojem je

Sl. 1.2. Razvoj volumetrijskih metoda: a planimetrijski, b s linearnom integracijom, c s diferencijalnim brojenjem točaka (Weibel, Kistler, Scherle 1966)

opisano određivanje volumenske gustoće. Kratko zatim slijedila je doktorska disertacija istog (Kališnik 1960) i još jednog autora (Ries 1965).

Međunarodno društvo za stereologiju (International Society for Stereology, ISS) osnovano je 1961. godine s namjerom da podstiče i usklađuje napore svih prirodoslovaca, koji kvantitativno proučavaju unutarnju građu tijela. To društvo priređuje svake četvrte godine međunarodne kongrese (1. Beč 1963, 2. Chicago 1967, 3. Bern 1971, 4. Washington 1975, 5. Salzburg 1979, 6. Gainesville 1983). Budući da su četirigodišnji razmaci među međunarodnim kongresima predugi, priređivani su između još i evropski simpoziji (1. Leoben 1973, 2. Caen 1977, 3. Ljubljana 1981).

ISS izdaje od 1962 do 1966 svoj časopis *Stereologia*. Godine 1969. je *Journal of Microscopy* postao redovito glasilo ISS-a. Od 1971 do 1980 izlazio je časopis *Newsletter in Stereology*.

Jugoslavenski stereolozi su se organizirali 1976. godine, kada su osnovali Stereološku sekciju Udruženja anatoma Jugoslavije (UAJ). Izvanredni članovi te Sekcije mogu biti svi jugoslavenski državljani, koji u svom radu upotrebljavaju pored ostalih i stereološke metode a nisu redovni članovi Saveza društava anatoma Jugoslavije (SDAJ). Stereološka sekcija UAJ ili SDAJ je do 1984. priredila 10 osnovnih seminara, sa 141 slušatelja i 3 napredna seminara sa 49 učesnika. Priredila je također 9 kolokvija, sa 93 aktivnih učesnika koji su prikazali svoja stereološka istraživanja (Durst-Zivković 1980).

Stereološka sekcija SDAJ izdaje od 1977. do 1981. godine svoj časopis *Stereologia Jugoslavica*, na jezicima jugoslavenskih naroda i na engleskom. Supplement I 3. volumena (1981) bio je zbornik evropskog stereološkog simpozija, održanog u Ljubljani. Na tom simpoziju bilo je zaključeno, da se časopis "Newsletter in Stereology" i "Stereologia Jugoslavica" udruže u nov međunarodni časopis "Acta Stereologica", koji je počeo izlaziti 1982. godine. Vlasnik časopisa ostaje Stereološka sekcija SDAJ. Časopis je izdavan pod pokroviteljstvom ISS, sjedište lokalnog uredničkog

odbora je u Ljubljani, a u uredničkom savjetu su vodeći stereolozi iz cijelog svijeta. Na skupštini ISS 1983. godine u Gainesvilleu odlučeno je, da je pretplata na taj časopis uključena u članarinu.

2. TESTNI SISTEMI

2.1. Tipovi testnih sistema

Testni sistemi su mjerni instrumenti za stereološko mjerenje. Za različite namjene imamo na raspolaganju različite testne sisteme. Zajedničko svojstvo većine testnih sistema su njihovi geometrijski elementi (točke, dužine, plohe) raspoređeni u pravilan sistem, tako da su odnosi među tim elementima definirani; za takve testne sisteme govorimo da su koherentni.

Za svaki testni sistem je značajno da ima definiran broj testnih točaka (P_t), definiranu duljinu testnih dužina (L_t) i -- -- definiranu površinu testne plohe -- (A_t). Međusobni odnosi između te tri vrste -- -- elemenata definirani su slijedećim dvim jednadžbama:

$$L_t = P_t \cdot k_1 \cdot d \quad in \quad (2.1)$$

$$A_t = P_t \cdot k_2 \cdot d^2 \quad , \quad (2.2)$$

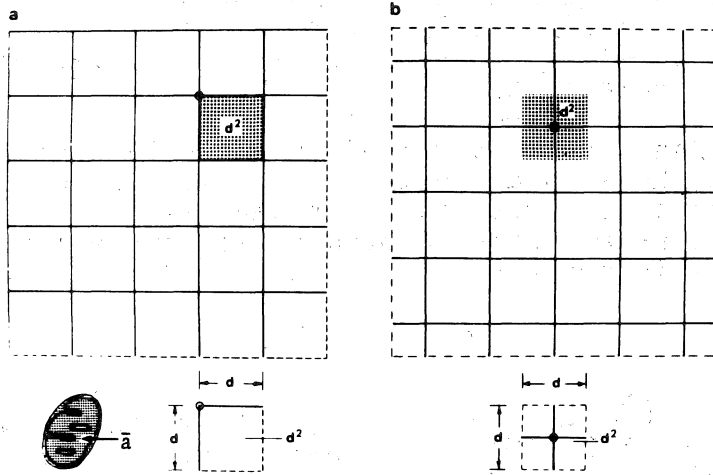
gdje su k_1 i k_2 konstante karakteristične za pojedini testni sistem, a d udaljenost između dvije testne točke. Za obični mrežasti sistem (sl.2.1.) vrijedi slijedeće:

$$\text{broj testnih točaka: } P_t \quad (2.3)$$

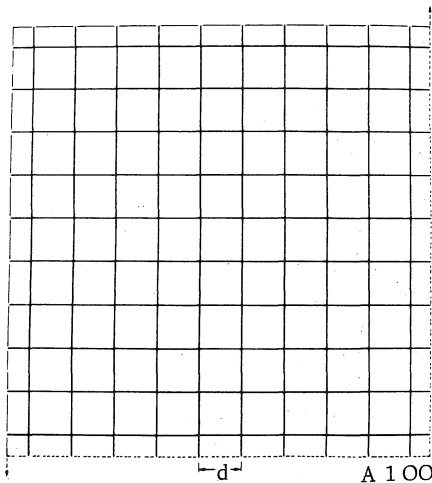
$$\text{duljina testne linije: } L_t = P_t \cdot 2 \cdot d; \quad k_1 = 2 \quad (2.4)$$

$$\text{površina testne plohe: } A_t = P_t \cdot d^2; \quad k_2 = 1 \quad (2.5)$$

Broj testnih točaka može biti različit, npr. 4, 16, 25, 81, 100 (sl. 2.2.). Obični mrežasti sistem označujemo sa slovom A i brojem, koji označuje broj testnih točaka. Tako je npr. na slici 2.2. nacrtan sistem A 100.



Sl. 2.1. Obični mrežasti sistem: a u prvotnom, b u današnjem obliku. Lijevo dolje profil čestice s prosječnom površinom \bar{a} u usporedbi s d^2 (Weibel i Bolender 1973)

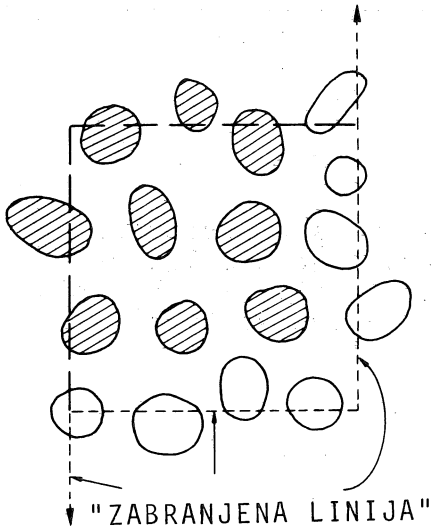


Sl. 2.2. Obični mrežasti sistem A 100 (Weibel 1979)

$$\begin{aligned}
 P_t &= 100 \\
 L_t &= P_t \cdot 2 \cdot d = 200 \cdot d \\
 A_t &= P_t \cdot d^2 = 100 \cdot d^2
 \end{aligned}$$

Iz slika 2.1. i 2.2. je vidljivo da križanja dužina predstavljaju testne točke, njihov broj je P_t . Dužina svih dužina je L_t . Površina testne plohe, omeđena na slici 2.1. i na slici 2.2. isprekidanom crtom jednaka je A_t .

Pri brojenju čestica vrijedi pravilo da brojimo sve čestice, koje padaju bilo potpuno ili djelomično na plohu omeđenu isprekidanim crtama, ali ne brojimo one koje presijecaju takozvane zabranjene linije sastavljene iz kratkih crtica (sl. 2.3.)

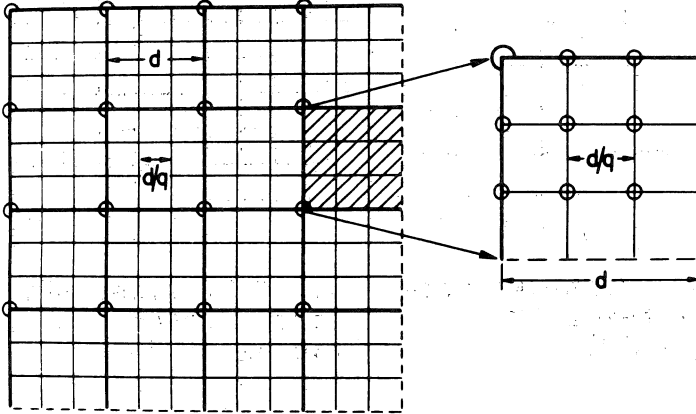


Sl. 2.3. Testno polje omeđeno lijevo i gore dugim crticama, desno i dolje kratkim; okomite linije su produžene u beskonačnost u "zabranjenoj liniji" (Gundersen 1977)

Tako izbjegavamo da bi jednu česticu brojili dva puta. Ukoliko su profili čestica, koje stereološki analiziramo, približno jednako veliki, prilagodit ćemo gustoću mrežastog sistema prosječnoj površini profila čestice. Testni sistem ćemo izabrati kod određenog povećanja tako, da na jedan profil pada jedna testna točka. Nije rijetkost da u istom objektu želimo analizirati profile različitih veličina. Upotrijebimo li obični mrežasti sistem prilagođen malom profilu, padat će na velike profile previše testnih točaka. U takvom slučaju je preporučljivo upotrijebiti dvostruki mrežasti sistem (sl. 2.4.). Za dvostruki mrežasti sistem je karakteristično, da je svaka druga, treća ili četvrta testna linija deblja od ostalih linija. Tako dobijemo dvije vrste testnih točaka; one koje odgovaraju križanju debelih linija (njihov broj je P_t) i one koje odgovaraju križanju

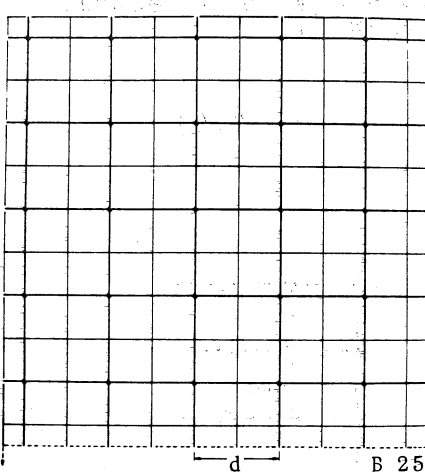
svih linija (njihov broj je P_t'). Odnos između broja debelih testnih točaka P_t i $\frac{P_t'}{q}$ broja svih testnih točaka P_t' određen je $\frac{P_t'}{q}$ jednadžbom

$$P_t' = P_t \cdot q^2 \quad (2.6)$$



Sl. 2.4. Dvostruki mrežasti sistem, u kojem je svaka treća linija debela (Weibel 1979)

Faktor q ima vrijednost 2, ukoliko je svaka druga linija debela, 3 ako je svaka treća, a 4 ako je svaka četvrta linija debela (sl. 2.5. - 2.11.).



Sl. 2.5. Dvostruki mre-
žasti sistem B 25
(Weibel 1979)

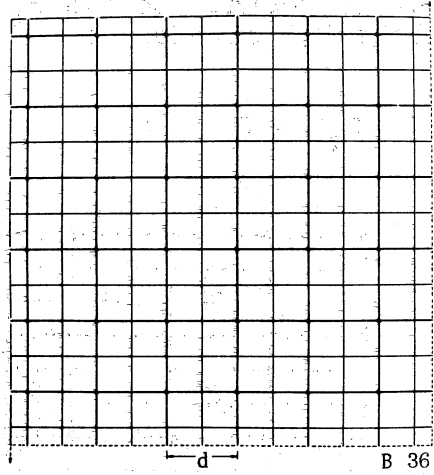
$$P_t = P_t' / q^2 = 25$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 100$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 50 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 100 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 25 \cdot d^2$$



Sl. 2.6. Dvostruki mre-
žasti sistem B 36
(Weibel 1979)

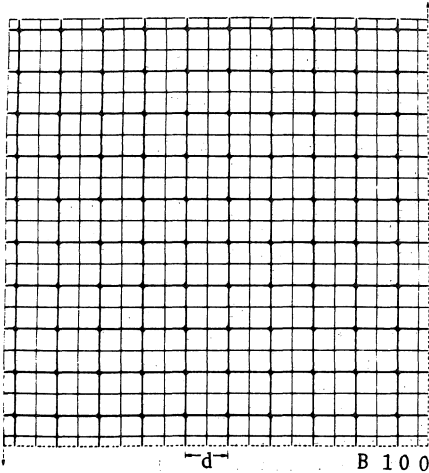
$$P_t = P_t' / q^2 = 36$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 144$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 72 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 144 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 36 \cdot d^2$$



Sl. 2.7. Dvostruki mre-
žasti sistem B 100
(Weibel 1979)

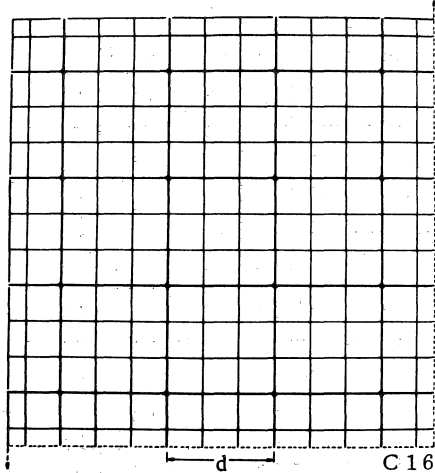
$$P_t = P_t' / q^2 = 100$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 400$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 200 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 400 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 100 \cdot d^2$$



Sl. 2.8. Dvostruki mre-
žasti sistem C 16
(Weibel 1979)

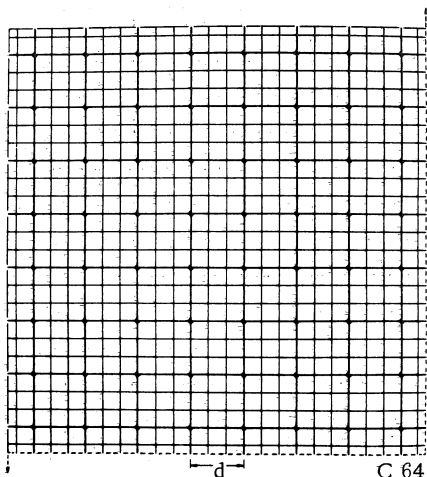
$$P_t = P_t' / q^2 = 16$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 144$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 32 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 96 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 16 \cdot d^2$$



Sl. 2.9. Dvostruki mre-
žasti sistem C 64
(Weibel 1979)

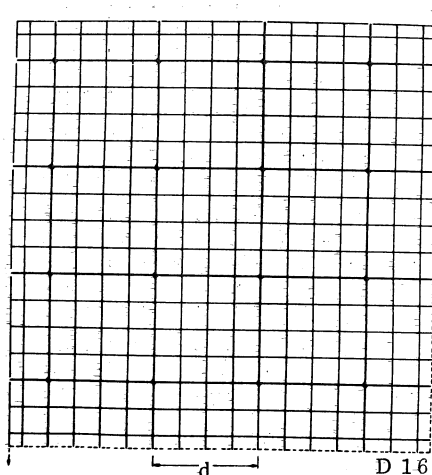
$$P_t = P_t' / q^2 = 64$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 576$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 128 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 384 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 64 \cdot d^2$$



Sl. 2.10. Dvostruki mre-
žasti sistem D 16
(Weibel 1979)

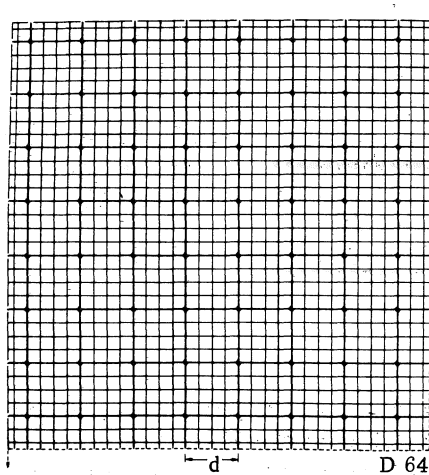
$$P_t = P_t' / q^2 = 16$$

$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 256$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 32 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 128 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 16 \cdot d^2$$



Sl. 2.11. Dvostruki mrežasti sistem D 64
(Weibel 1979)

$$P_t = P_t' / q^2 = 64$$

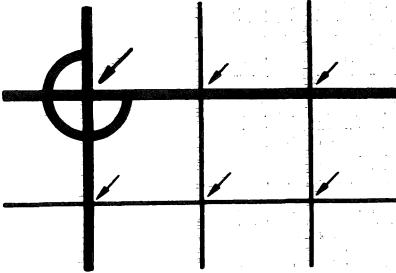
$$P_t' = P_t \cdot q^2 = 1024$$

$$L_t = P_t \cdot 2 \cdot d = 128 \cdot d$$

$$L_t' = P_t \cdot 2 \cdot q \cdot d = 512 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 64 \cdot d^2$$

Budući da su debele linije široke dogovoreno je, da testnoj točki odgovara kut u gornjem desnom kvadrantu, kojeg ne zatvara krug (sl. 2.12). Pravilo je u svakom pogledu korisno, jer bi u slučaju manjih struktura, zbog debelih linija bili u nedoumici kamo pada testna točka.

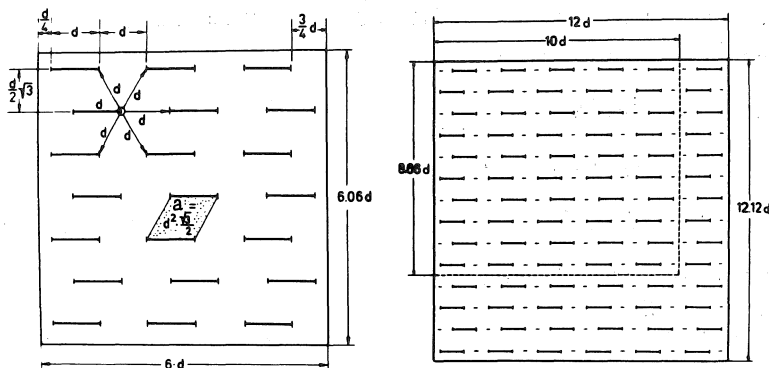


Sl. 2.12. Određivanje prave testne točke (Weibel 1979)

Dvostruki mrežasti sistem označujemo obzirom na faktor q uzastopnim slovima abecede B, C, D, a obzirom na broj grubih testnih točaka s odgovarajućim brojem, npr. B 25.

Vrijednost konstanta je i kod dvostrukih mrežastih testnih sistema jednaka kao i kod običnih mrežastih sistema, tj. $k_1 = 2$ i $k_2 = 1$. Tako se kod običnih kao i dvostrukih mrežastih testnih sistema možemo odlučiti, da umjesto vodoravnih i okomitih testnih linija uzimamo npr. samo vodoravne linije; u tom slučaju je, razumljivo ukupna duljina svih testnih linija u jednom testnom sistemu za polovinu manja od označene u formuli 2.4, pa koeficijent k_1 dobije vrijednost 1.

Kod mrežastog sistema jednom pogotku testne točke na profil čestice pripadaju četiri presjecišta testnih dužina s obrisom (konturom) čestice. Mnogonamjenske testne sisteme (sl. 2.13.) upotrebljavamo, da kod istovremenog brojenja pogodaka i presjecišta izbjegnemo nepotrebno gomilanje presjecišta obrisa pojedinog profila s testnim dužinama. Takvi sistemi imaju unutar testne plohe A_t određen broj dužina duljine d . Krajevi svih d dužina su testne točke, sve dužine zajedno sastavljaju testnu liniju ukupne duljine L_t . Svaka točka (izuzev rubnih) je u sre-



Sl. 2.13. Kratke linije mnogonamjenskog testnog sistema (Weibel i sur. 1965)

dištu šesterokuta, kojeg tvore susjedne točke koje su od središnje točke udaljene za dužinu d . Svakoj točki pripada romb površine a , određene jednadžbom

$$a = d^2 \cdot \frac{3^{1/2}}{2} \quad (2.7)$$

Za mnogonamjenski testni sistem vrijedi slijedeći sistem jednadžbi:

$$\text{broj testnih točaka: } P_t \quad (2.8)$$

$$\text{duljina testne linije: } L_t = P_t \cdot 1/2 \cdot d \quad (2.9)$$

$$k_1 = 1/2$$

$$\text{površina testne plohe: } A_t = P_t \cdot \frac{3^{1/2}}{2} \cdot d^2 \quad (2.10)$$

$$k_2 = 3^{1/2}/2$$

Upotrebljavaju se mnogonamjenski testni sistemi s 21, 50 i 84 testne dužine odnosno s 42 (M 42), 100 (M 100) i 168 (M 168) testne točke (sl. 2.14. i 2.15.).

Polukružni (Merzov) testni sistem upotrebljavamo za analizu anizotropnih struktura (sl. 2.16.). Testne se

dužine sastoje iz povezanih polukružnica otvorenih na alternativnu stranu. Za taj sistem vrijedi slijedeći sistem jednažbi:

$$\text{broj testnih točaka: } P_t \quad (2.11)$$

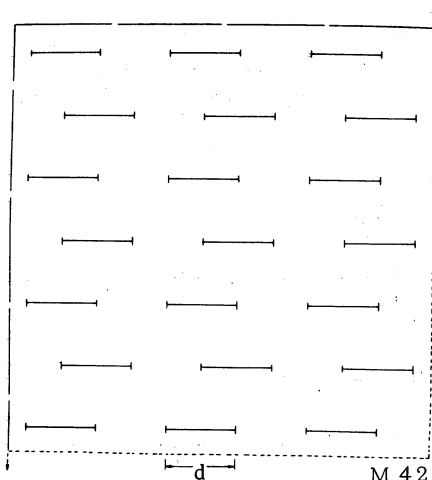
duljina testne linije:

$$L_t = P_t \cdot (\pi/2) \cdot d \quad k_1 = \pi/2 \quad (2.12)$$

površina testne plohe:

$$A_t = P_t \cdot d^2 \quad k_2 = 1 \quad (2.13)$$

Upotrebljavaju se polukružni testni sistemi s 36 (L 36) i 100 testnih točaka (L 100) (sl. 2.17., 2.18.).

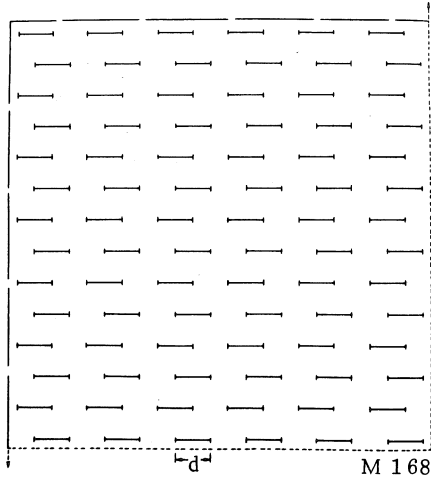


Sl. 2.14. Mnogonamjenski testni sistem M 42
(Weibel 1979)

$$P_t = 42$$

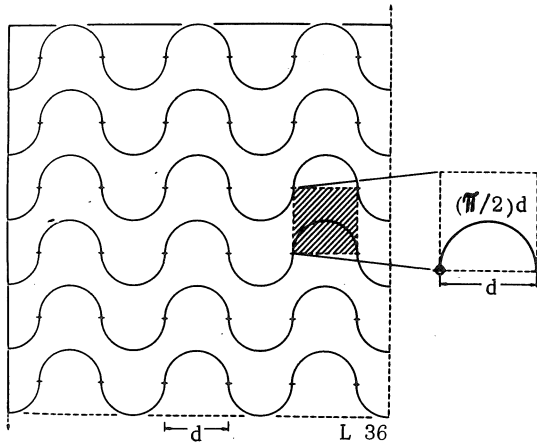
$$L_t = P_t \cdot d/2 = 21 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot (3^{1/2}/2) \cdot d^2 = 36,37 \cdot d^2$$

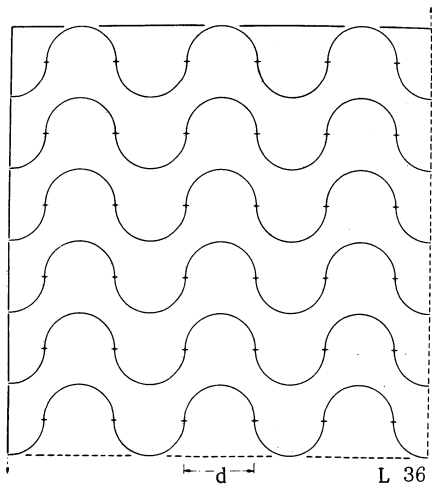


Sl. 2.15. Mnogonamjenski testni sistem M 168 (Weibel 1979)

$$\begin{aligned}
 P_t &= 168 \\
 L_t &= 84 \cdot d \\
 A_t &= P_t \cdot (3^{1/2}/2) = 145,5 \cdot d^2
 \end{aligned}$$



Sl. 2.16. Izotropni polukružni (Merzov) testni sistem (Merz 1967)

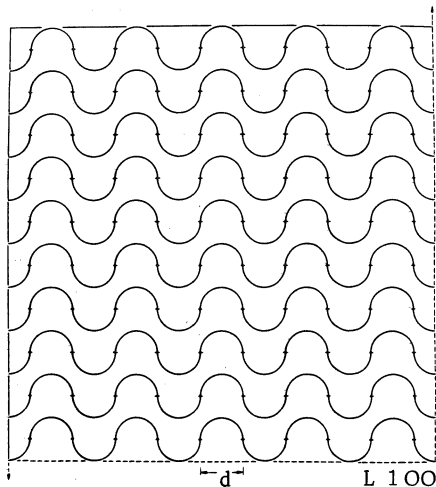


Sl. 2.17. Polukružni
testni sistem L 36
(Weibel 1979)

$$P_t = 36$$

$$L_t = P_t \cdot (\pi/2) \cdot d = 56,55 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 36 \cdot d^2$$



Sl. 2.18. Polukružni
testni sistem L 100
(Weibel 1979)

$$P_t = 100$$

$$L_t = P_t \cdot (\pi/2) \cdot d = 157 \cdot d$$

$$A_t = P_t \cdot d^2 = 100 \cdot d^2$$

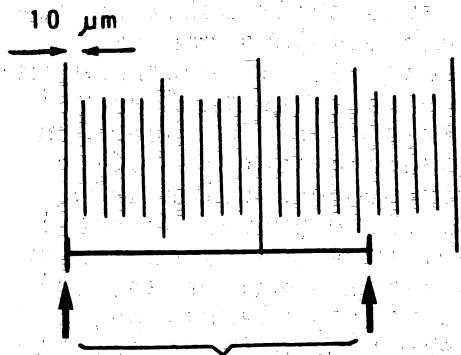
2.2. Upotreba testnih sistema

Način, na koji pokrивamo sliku presjeka proučavanog tijela s testnim sistemom, ovisi ponajprije o stupnju povećanja. Kod makroskopske analize uzoraka položimo na prerezani objekt prozirnu ploču (npr. od plastike ili pleksi stakla), na kojoj je nacrtan testni sistem.

Za rad na razini svjetlosne mikroskopije imamo na raspolaganju više mogućnosti. Staklenu pločicu s ucrtanim testnim sistemom možemo pričvrstiti na dijafragmu okulara (gdje nastane povećana realna slika objekta, koju daje objektiv), ili upotrijebimo integracijski okular, u kojem je takva pločica već ugrađena (prednost takvog okulara je, da pokretnom čeonom lećom okulara sliku testnog sistema možemo izoštriti prema refrakcijskim sposobnostima našeg oka). Druga je mogućnost, da sliku preparata projiciramo na projekcijski ekran, stavljen na mikroskop umjesto okulara ili na bilo kakav drugi ekran, obično na papir položen na stol pokraj mikroskopa; projekcijski ekran na mikroskopu mora imati nacrtan testni sistem; kod projiciranja slike na stol možemo željeni testni sistem nacrtati na papir. Treća je mogućnost, da upotrijebimo okular za crtanje, pomoću kojeg istovremeno u oko projiciramo na papiru nacrtan testni sistem i sliku iz mikroskopa. Kada upotrebljavamo okular s ugrađenim testnim sistemom radimo u normalno osvijetljenom prostoru. Projiciramo li sliku preparata ili testnog sistema, prostor mora biti zamračen. Projiciranje slike na stol ili upotreba okulara za crtanje ima tu prednost, da si na testnom sistemu uvijek možemo označiti mjesto do kojeg smo preparat analizirali (npr. tako da tamo položimo šiljak olovke).

Kod analize elektronskomikroskopskih preparata možemo negative ili dijapozitive projicirati na ekran s testnim sistemom, ili mikrofotografije pokrивamo prozirnom folijom s ucrtanim testnim sistemom, a možemo fotografski kopirati slike preparata zajedno s testnim sistemom. Kod polaganja folija s testnim sistemom na mikrofotografije postoji opasnost, da se fotografski papir u toku izrade fotografije u raznim smjerovima neravnomjerno skvrči.

Kada radimo s povećanom slikom presjeka objekta, moramo svakako testni sistem baždariti (kalibrirati) i to posebno za svako odabrano povećanje M . Za rad na razini svjetlosne mikroskopije upotrebljavamo za to objektni mikrometar, na kojem je obično 1 mm razdijeljen na 100 dijelova (stoga odgovara 1 najmanji dio na objektnom mikrometru $10 \mu\text{m}$). Objektni mikrometar stavimo na stolić mikroskopa i odredimo vrijednost d izabranog testnog sistema, stavljenog u okular (sl. 2.19.).



Sl. 2.19. Baždarenje mnogonamjenskog testnog sistema uz povećanje objektiva $10\times$

$$d = 15,5 \cdot 10 \mu\text{m} = 155 \mu\text{m}$$

Ako je povećanje objektiva veliko, crte su dosta debele, pa se moramo odlučiti da uzmemo u obzir uvijek samo lijevi ili desni rub crta. Na sličan način možemo također baždariti okularni mikrometar (sl. 2.20.), kojeg upotrebljavamo za mjerenje linearnih dimenzija.

Za rad na razini elektronske mikroskopije možemo približno odrediti stvarnu vrijednost d testnog sistema iz prividne vrijednosti d' (npr. na foliji) i povećanja M po formuli

$$d = d' / M \quad (2.14)$$

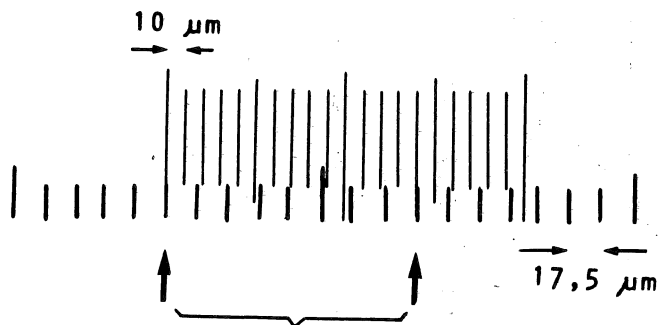
Povećanje M možemo točno odrediti upotrebom ugljikove mrežaste replike, koja ima 21600 razmaka/cm po formuli

$$M = p' / p \quad (2.15)$$

gdje p' znači prividan razmak u repliki u povećanoj slici, a za p smo mogli izračunati da iznosi $4,63 \cdot 10^{-5}$ cm. Iz toga možemo izračunati vrijednost d testnog sistema pri određenom povećanju

$$d = d' / M = d' \cdot 4,63 \cdot 10^{-5} \text{ cm/p}' \quad (2.16)$$

(Vidi Pšeničnik 1981!)



$$MV = \frac{14 \cdot 10}{8} \mu\text{m} = 17,5 \mu\text{m}$$

Sl. 2.20. Baždarenje okularnog mikrometra pri povećanju objektiva 10x

Vježba

Baždari mnogonamjenski testni sistem M 42 kod povećanja objektiva 10x i 60x. Odredi P_t , L_t i A_t upotrebom objektnog mikrometra, koji između dvije crtice ima najmanji razmak $10\mu\text{m}$!

Primjer:

	objektiv 10x	objektiv 60x
P_t	42	42
d	$15,5 \cdot 10 \mu m = 155 \mu m$ =====	$2,6 \cdot 10 \mu m = 26 \mu m$ =====
L_t	$21 \cdot 155 \mu m = 3255 \mu m$ =====	$21 \cdot 26 \mu m = 546 \mu m$ =====
A_t	$21 \cdot 3^{1/2} \cdot 155^2 \mu m^2 = 874,10^3 \mu m^2$ =====	$21 \cdot 3^{1/2} \cdot 26^2 \mu m^2 = 24 \cdot 10^3 \mu m^2$ =====

3. STEREOLOŠKE METODE

U ovom dijelu upoznat ćemo neke najčešće upotrebljavane stereološke metode. Kod toga ćemo navoditi konačne matematske formule, koje upotrebljavamo u praktičnom stereološkom radu, čitaoca nećemo opterećivati s njihovim dokazivanjem. Zainteresirani se o tome mogu informirati u odgovarajućim domaćim ili inozemnim radovima (Underwood 1970, Bogataj, Kališnik 1978, Weibel 1979).

Prva četiri poglavlja ovog dijela namijenjena su klasičnim stereološkim metodama s kojima određujemo volumen, površinu ili duljinu proučavane faze bez obzira na njezinu povezanost ili nepovezanost; dobiveni rezultati su ovisno o uloženom vremenu i trudu proizvoljno točni, a ne govore nam ništa o obliku faze. Poznajemo li kvalitet oblika proučavane faze, možemo iz stereoloških podataka za volumen i površinu izvoditi nove, korisne podatke, npr. o prosječnoj debljini slojeva ili membrana, o prosječnom promjeru čestica, ukoliko proučavana faza ima oblik kuglica ili o prosječnoj debljini ljuske, ako istraživana faza ima oblik šuplje kugle.

Slijedeća dva poglavlja namijenjena su kvantitativnoj analizi čestica, tj. njihovom broju i raspodjeli po veličini. Iako za ocjenjivanje broja čestica imamo na raspolaganju više stereoloških metoda, dobiveni rezultati odgovaraju više manje samo približno traženim vrijednostima.

Sedmo poglavlje nas uči, kako možemo količinski izraziti zakrivljenost proučavanih površina.

U predzadnjem poglavlju izložen je koherentni sistem stereoloških formula. S njim ćemo ne samo povezati do tada upoznate stereološke metode, nego će nam on omogućiti uvid u neka opća pravila.

U uvodu smo saznali da stereološki možemo proučavati unutarnju građu tijela, ako ih presijecamo ravninama. Katkad to nije moguće, npr. kod pregledavanja citoloških preparata u svjetlosnom mikroskopu ili kod primjene postupka zaleđivanja i lomljenja u elektronskoj mikroskopiji. U tim slučajevima radimo s neravnim površinama, pa je zbog toga stereološka analiza izvodiva samo u izuzetnim slučajevima, ili nije uopće moguća. Možemo upotrijebiti modificirane metode, izvedene iz stereoloških, kod čega se svjesno odričemo trodimenzionalne interpretacije podataka. Te metode priređene za kvantitativnu analizu neravnih površina nazivamo astereološke; posvećeno im je zadnje poglavlje trećeg dijela ovog priručnika.

3.1. Određivanje volumena

3.1.1. Volumenska gustoća

Volumenska gustoća (V_V) je relativna stereološka varijabla, koja -- pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza; ili na drugi način rečeno, koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena. Volumenska gustoća je bez dimenzije, npr.

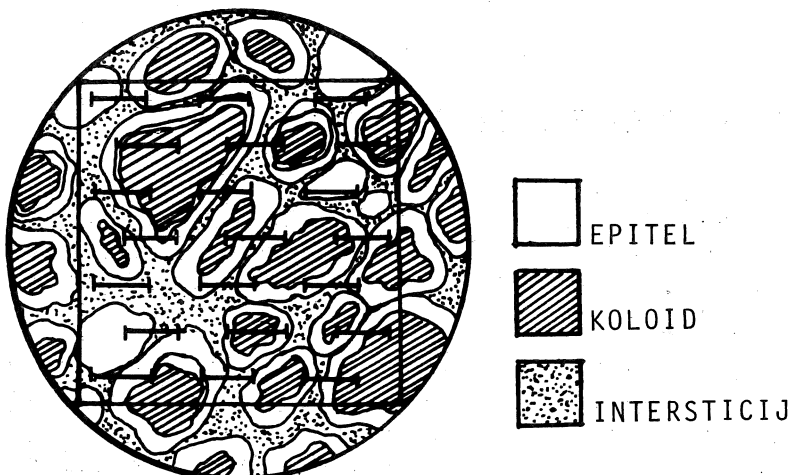
$$[\text{cm}^3/\text{cm}^3] = \text{cm}^0.$$

U skladu s načelom, kojeg su uveli Thomson i Glagolev, možemo volumensku gustoću određene faze unutar nekog tijela ocijeniti iz gustoće točaka (P_p) u ravnini presjeka

$$V_V = P_p \quad (3.1)$$

Praktični postupak je slijedeći: Sliku presjeka proučavanog tijela prekrijemo nekim testnim sistemom, odredimo broj pogodaka testnih točaka na odabranoj fazi (P_f) i podijelimo taj broj s brojem svih testnih -- točaka unutar referentnog (testnog) polja (P_t) (Sl. 3.1.).

$$\boxed{V_V = P_f / P_t} \quad (3.2)$$



Sl. 3.1. Shematski prikaz slike štitne žlijezde kod umjerenog povećanja u svjetlosnom mikroskopu, pokrivena testnim sistemom M 42. Testne točke su 42 krajnje točke 21 testne dužine

Zatim pomičemo testni sistem s polja na polje na unaprijed određen način uzimanja uzorka i svaki put pobrojimo pogotke. To ponavljamo toliko puta da naša ocjena volumenske gustoće bude dovoljno točna. Kasnije ćemo doznati kako možemo izračunati potreban broj mjerenja.

Još dva upozorenja! Ukoliko testno polje pada na rub proučavanog tijela, tako da su neke točke unutar a neke izvan referentnog prostora, brojimo samo one testne točke, koje padaju unutar referentnog prostora. Provedimo li naša stereološka mjerenja u mikroskopu, izoštrimo najprije mikrometerskim vijkom određenu ravninu reza, a nakon toga vijak više ne pomičemo, budući da bi ravnina presjeka trebala u idealnom slučaju biti beskonačno tanka!

Volumenska gustoća je neovisna od moguće anizotropnosti. Daje nam korisne osnovne informacije o unutarnjoj građi tijela. To je po svojoj prilici, uz jednostavnost određivanja, glavni razlog da

je među stereološkim varijablama najčešće određivana.

3.1.2. Apsolutni volumen

Apsolutni volumen (V_0) proučavanog tijela, organa ili faze je u stereološkom istraživanju često nepogrešiv podatak. Možemo ga izračunati direktno ili indirektno. Dimenzija ima eksponent 3, npr. $[cm^3]$.

Volumen tijela ili organa možemo izmjeriti mjerenjem istisnute tekućine. Ukoliko je tijelo ili organ veći, napunit ćemo najprije odgovarajuću posudu vodom do vrha, zatim u nju potopimo ispitivano tijelo ili organ. Tekućinu, koju smo istisnuli iz posude, sakupimo i izmjerimo njezin volumen. Alternativno možemo volumen organa (V_0) izmjeriti tako, da menzuru do neke visine (V_1) napunimo tekućinom, zatim u nju uronimo na niti obješen organ, zbog čega će se razina tekućine dignuti do V_2 . Razlika među obim vrijednostima je traženi apsolutni volumen (sl. 3.2.).

$$V_0 = V_2 - V_1 \quad (3.3)$$

Ukoliko je organ razmjerno malen (npr. štitna žlijezda miša), gore opisani način određivanja apsolutnog volumena ne dolazi u obzir. Tada upotrijebimo piknometar. Metoda je detaljno opisana drugdje (Poredoš, Zalar, Kališnik 1978).

Tako određen apsolutni volumen tijela ili organa omogućava nam indirektno izračunati apsolutni volumen proučavane faze (V_f), kojoj smo prije odredili relativni volumen ili volumensku gustoću (V_{vf}) po jednadžbi

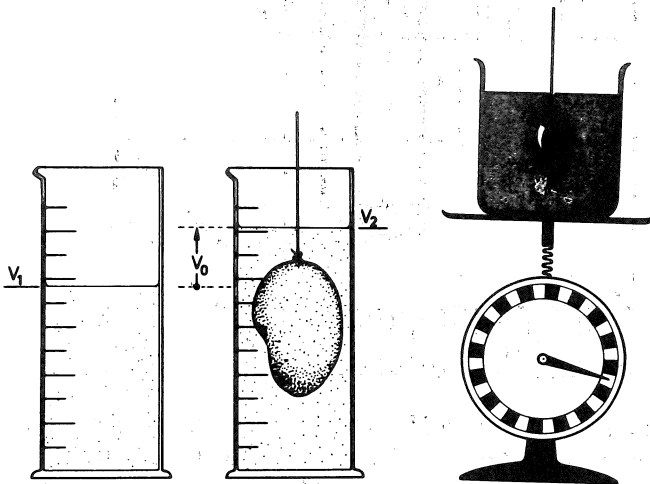
$$V_f = V_{vf} \cdot V_0 \quad (3.4)$$

Direktno možemo apsolutni volumen tijela, organa ili određene faze izračunati, ako imamo na raspo-

laganju potpunu ili stupnjevitu seriju rezova tijela ili organa. U tom slučaju izračunamo apsolutni volumen npr. cijelog organa po formuli

$$V_o' = P_o \cdot a \cdot t \quad , \quad (3.5)$$

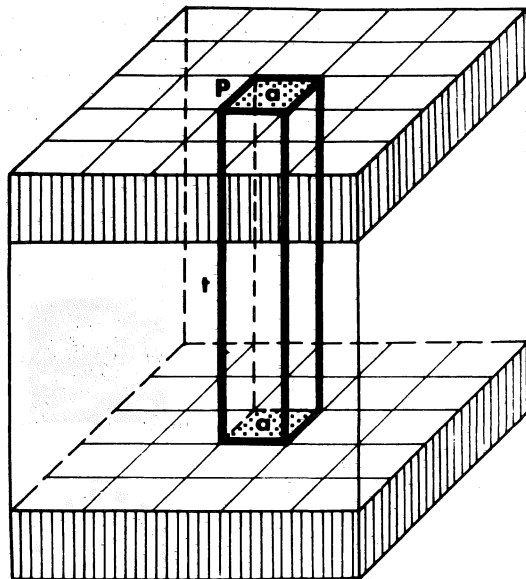
u kojoj je P_o broj svih pogodaka na organu, a je testna površina, koja pripada jednoj testnoj točki i t debljina reza u potpunoj seriji ili debljina stupnja u stupnjevitoj seriji rezova (sl. 3.3.).



Sl. 3.2. Lijevo: Određivanje apsolutnog volumena organa pomoću mjerenja volumena istisnute tekućine u menzuri (Weibel 1979). Desno: Vagati možemo također uzastopce: (a) posudu napunjenu vodom, (b) u istu posudu uronjen, na nit obješen organ i (c) posudu s vodom i s organom spuštenim na dno. (c) - (a) = težina organa, (c) - (b) = volumen organa; težina organa / volumen organa = specifična težina organa (Elias, Pauly, Burns 1978)

Zanima li nas apsolutni volumen proučavane faze u nekom tijelu ili organu, izračunamo ga tako

$$V_f^s = P_f \cdot a \cdot t \quad (3.6)$$



Sl. 3.3. Direktno određivanje apsolutnog volumena organa ili proučavane faze iz serije rezova. P testna točka, a njoj odgovarajuća površina testnog areala, t debljina reza u potpunoj seriji ili debljina stupnja u stupnjevitom seriji rezova.

Kod toga nismo uzeli u obzir skvrčavanje tkiva u toku izrade preparata, koje može biti dosta veliko. Ono znatno ovisi o sadržaju vode u svježem tkivu, o primijenjenoj histološkoj tehnici, naročito o višoj temperaturi u toku prepajanja parafinom kao i o višoj temperaturi vodene kupelji pri ispružanju rezova (Poredoš, Zalar, Kališnik 1978). Zbog toga već na ovom mjestu upozoravamo na neophodno standardiziranje histološke tehnike, ako bismo kasnije namjeravali provesti stereološku analizu.

U svrhu kompenziranja skvrčavanja tkiva u toku prepariranja moramo odrediti korekturni koeficijent

skvrčavanja C kao koeficijent apsolutnog volumena svježeg organa V_o i apsolutnog volumena organa određenog direktno $\underline{\underline{V_o}}$ po formuli 3.5 ($\underline{\underline{V_o}}$)

$$C = V_o / V_o' \quad (3.7)$$

Korekturni koeficijent skvrčavanja je bez dimenzije. Njegovom upotrebom dobijemo pravilniju ocjenu apsolutnog volumena proučavane faze iz serije rezova po formuli

$$\boxed{V_f = P_f \cdot a \cdot t \cdot C} \quad (3.8)$$

Vježba

Orijentacijski odredi volumensku gustoću epitela (e), koloida (k) i intersticija (i) u preparatu štitne žlijezde miša u pet testnih polja testnog sistema M 42 kod povećanja objektiva 60x! Usporedi svoje rezultate s drugima! Protokol pospremi za kasniju statističku obradu!

Primjer:

P_f	1	2	3	4	5	Σ	%
P_e	12	6	11	14	9	52	24,7
P_k	22	35	27	21	22	127	60,5
P_i	8	1	4	7	11	31	14,8
P_t	42	42	42	42	42	210	100,0

$$V_{Ve} = 52/210 = 0,247 \text{ mm}^0 \quad V_{Vk} = 127/210 = 0,605 \text{ mm}^0$$

=====

$$V_{Vi} = 31/210 = 0,148 \text{ mm}^0$$

=====

3.2. Određivanje površina

3.2.1. Površinska gustoća

Površinska gustoća (S_V) je relativna stereološka varijabla, koja -- govori kolika je površina neke određene unutarnje ili vanjske plohe u jedinici volumena. Dimenzija površinske gustoće ima eksponent -1, npr. $[\text{cm}^2/\text{cm}^3 = \text{cm}^{-1}]$.

Pod plohom podrazumijevamo površinu, koja je obično nepravilnog oblika, s kojom je tijelo omeđeno prema vanjskoj i nutarnjoj okolini, a također i sve one površine, koje razgraničuju pojedine dijelove tijela međusobno.

Trag dvodimenzionalne plohe je u ravnini presjeka jednodimenzionalna crta, obično neravna, a nazivamo je obris (kontura) (B). Njezina gustoća u ravnini presjeka zove se gustoća obrisa (konture) (B_A), a dimenzija ima također eksponent -1, npr. $[\text{cm}^1/\text{cm}^2 = \text{cm}^{-1}]$, kao i površinska gustoća.

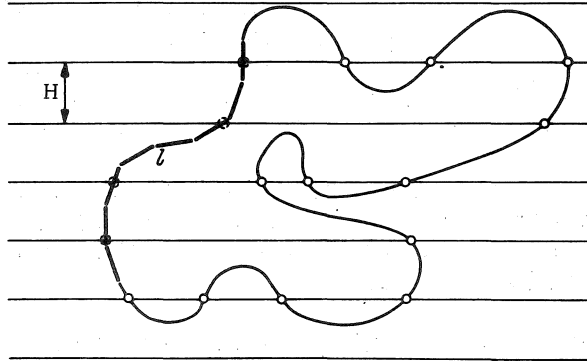
Polazeći od Buffonovog rješenja "problema igle" izraženog u formuli 1.2. više puta je neovisno ustanovljeno, da su međusobno ovisni gustoća obrisa (konture), kao mjera za duljinu krivulje u ravnini, te ukupna duljina (L_t) testne linije položene u tu ravninu i broj -- presjecišta (intersekcija, I) između te krivulje i testne linije

$$\frac{B}{A} = \frac{\pi \cdot I}{2 \cdot L_t} \quad \text{ili} \quad \boxed{B_A = \frac{\pi}{2} I L} \quad (3.9)$$

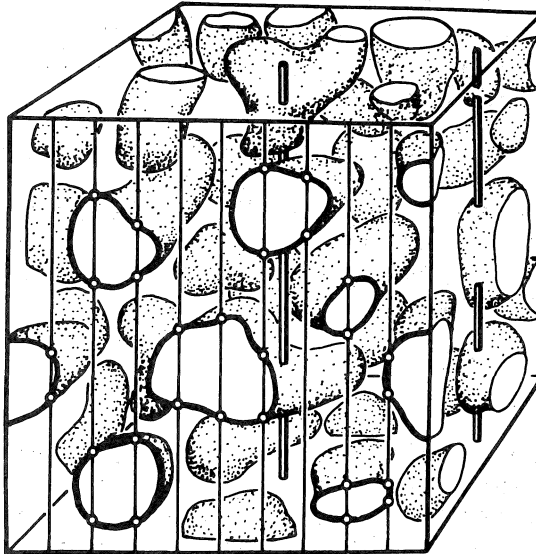
Testna linija se obično sastoji od više međusobno paralelnih dužina (sl. 3.4.). Kasnije ćemo vidjeti, da one ne moraju biti uvijek tako raspoređene.

Iz jednadžbe 3.9 izvedena je također formula, koja pokazuje jednostavnu povezanost između površinske gustoće (S_V), ukupne duljine testne linije (L_t) i broja -- presjecišta obrisa (konture) -- (I), kao traga plohe u testnoj ravnini, s testnom linijom (sl. 3.5.):

$$S_{Vf} = 2 \cdot I_f / L_t \quad (3.10)$$



Sl. 3.4. Mjerenje duljine krivulje (n.l.) u ravni na osnovu broja njezinih intersekcija s usporednim testnim dužinama, koje su za H udaljene jedna od druge (Weibel, Elias 1967)



Sl. 3.5. Određivanje površine neke faze u jedinici volumena iz omjera broja intersekcija njezinih obrisa (kontura) u testnoj ravni s usporednim testnim dužinama i ukupne duljine tih svih testnih dužina (Weibel 1966, cit. Weibel, Elias 1967)

Na zadnjoj formuli (3.10) temelji se praktična stereološka metoda određivanja površinske gustoće. Za to je uvjet, da upotrebljavamo baždaren (kalibriran) testni sistem, tj. da znamo duljinu testne dužine ili svih testnih dužina (L_t) upotrebljavanog testnog sistema kod određenog -- povećanja mikroskopa.

Budući da je površinska gustoća kod anizotropnih struktura znatno ovisna o smjeru rezanja, potrebno je u takvim slučajevima posvetiti dovoljno pažnje načinu uzimanja uzorka.

Podaci o površinama funkcionalno su vrlo značajni, tako je npr. izmjena tvari između organizma i okoline ili između dijelova tijela ovisna o tim površinama.

3.2.2. Apsolutna površina

Apsolutnu površinu neke faze (S_f) možemo slično kao apsolutni volumen, odrediti indirektno ili direktno. Ima dimenziju 2, [npr. cm^2].

Za indirektno određivanje apsolutne površine treba nam, osim površinske gustoće i podatak o apsolutnom volumenu proučavanog tijela (V_0); cjelokupni postupak upoznali smo u podpoglavlju 3.12. Obje vrijednosti jednostavno pomnožimo i dobijemo vrijednost apsolutne površine.

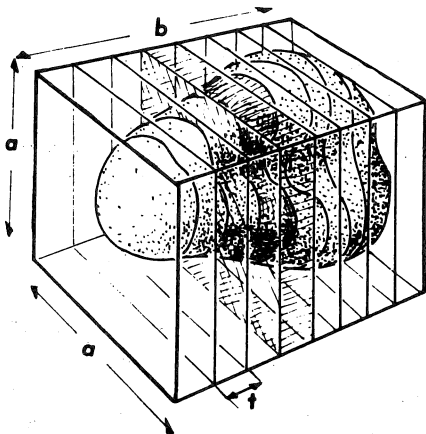
$$\boxed{S_f = S_{Vf} \cdot V_0} \quad (3.11)$$

Direktno možemo površinu neke faze u nekom tijelu odrediti ako imamo na raspolaganju potpunu ili stupnjevitu seriju rezova kroz to tijelo. Na ravnine presjeka položimo paralelne testne dužine, koje su međusobno udaljene za H i pobrojimo presjecišta obrisa (kontura) s testnim dužinama (I_f). Apsolutnu površinu odredimo zatim po formuli --

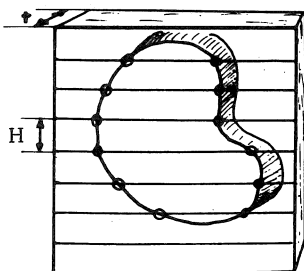
$$\boxed{S_f' = 2 \cdot I_f \cdot H \cdot t} \quad (3.12)$$

gdje je t (kao i pri određivanju apsolutnog volumena) bilo debljina reza u potpunoj seriji ili

debljina stupnja u stupnjevitom seriji (sl. 3.6.).



Sl. 3.6. Određivanje apsolutne površine iz potpune ili stupnjevite serije rezova učinjene kroz cijelo tijelo (debljina rezova ili stupnjeva t); pojedine ravnine presjeka pokrijemo paralelnim testnim dužinama, međusobno udaljenim za H i pobrojimo presjecišta (Elias, Hennig, Schwartz 1971)



Gornja formula (3.12) vrijedi samo u slučaju da upotrebljavamo testni sistem s usporednim dužinama. Ako takav testni sistem ne možemo nabaviti, moramo ga sami nacrtati. Upotrijebimo li za određivanje apsolutne površine testne sisteme, koje kupujemo gotove, već izrađene, moramo gornju formulu (3.12) odgovarajuće prepraviti.

Kod upotrebe mrežastih sistema, gdje $H=d$, koji se sastoje iz vodoravnih i okomitih dužina, dobivamo na istom testnom arealu (zanemarujući možebitnu anizotropiju) dva puta toliko intersekcija kao kod upotrebe paralelnih dužina; zbog toga u takvom slučaju formula glasi ovako

$$S_f' = I_f \cdot H \cdot t \quad (3.13)$$

Upotrebljavamo li mnogonamjenski testni sistem, koji se sastoji iz jednako dugih dužina, koje se izmjenjuju s jednako dugim razmacima, gdje $H = d\sqrt{3}/2$, broj presjecišta je dva puta manji nego kod upotrebe paralelnih linija; zbog toga formulu prepravimo ovako

$$S_f' = 4 \cdot I_f \cdot H \cdot t \quad (3.14)$$

Mi smo međutim u tom slučaju svjesni da smo površinu odredili direktno u tkivima, koja su se u toku izrade preparata skvrčila. Ukoliko smo već prije odredili korekturni koeficijent skvrčavanja (C) prema uputama u poglavlju 3.1.2., možemo ga također upotrijebiti kod određivanja apsolutne površine, ispravljen na vrijednost u svježem tkivu; njegovu vrijednost moramo uskladiti s dimenzijom površine:

$$S_f = 2 \cdot I_f \cdot H \cdot t \cdot C^{2/3} \quad ; \quad (3.15)$$

Formula vrijedi za testni sistem s paralelnim, jednako udaljenim dužinama.

Vježba

Orjentacijski odredi vanjsku površinsku gustoću folikularnog epitela (S_{ve} , prema konturama između epitela i $--e$ intersticija) i unutarnju površinsku gustoću folikularnog epitela (S_{vi} , prema konturama između epitela i koloida) na 5 $--i$ polja testnog sistema M 42 u štitnoj žlijezdi miša kod povećanja objektiva 60x! Pospremi protokol!

Primjer:

	1	2	3	4	5	Σ
I_e	8	6	4	11	10	39
I_i	10	6	7	11	13	47

L_t smo za testni sistem M 42 već prije odredili, kod povećanja mikroskopa 60x iznosi za 1 testno polje $546 \mu\text{m} = 0,546 \text{ mm}$. Nakon što smo u našem primjeru prebrojili presjecišta između kontura i testnih dužina u 5 testnih polja, iznosi $L_t = 5 \times 546 \mu\text{m} = 2730 \mu\text{m} = 2,73 \text{ mm}$.

$$S_{Ve} = 2 \times 39 / 2730 \mu\text{m}^{-1} = 0,028 \mu\text{m}^{-1} = 28 \text{ mm}^{-1}$$

=====

$$S_{Vi} = 2 \times 47 / 2730 \mu\text{m}^{-1} = 0,034 \mu\text{m}^{-1} = 34 \text{ mm}^{-1}$$

=====

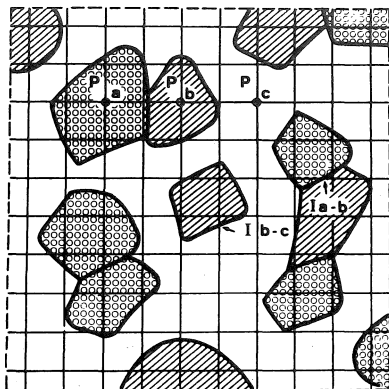
Kod pretvaranja jedinice za duljinu iz μm u mm brojčana vrijednost površinske gustoće se 1000 puta poveća. Objasni taj prividni paradoks!

3.3. Volumensko-površinski omjeri

Preporuča se u istom testnom polju, bez pomicanja, prebrojiti pogotke na testnoj fazi (ili fazama) kao i presjecišta između kontura svih faza i testnih dužina. To nam omogućava istodobno određivanje volumenske i površinske gustoće proučavane faze (ili faza) (sl. 3.7.). Iz omjera između volumenske i površinske gustoće možemo izvesti niz novih vrijednosti, koje nam daju dodatne informacije o strukturi proučavanog tijela.

Specifična površinska gustoća je kvocijent površinske i volumenske gustoće,

$$\boxed{S_{Vf} / V_{Vf} = (2 \cdot I_f \cdot P_t) / (L_t \cdot P_f)} \quad , \quad (3.16)$$



Sl. 3.7. Istovremeno određivanje volumenske gustoće s brojenjem pogodaka (\underline{P}) i površinske gustoće s brojenjem intersekcija (\underline{I}) na rezu kroz disperzni sistem, u kojem su dispergirane dvije faze (a, b) u zajedničkom disperznom mediju (c) (Weibel 1969)

koja uostalom ima istu dimenziju kao sama površinska gustoća, s eksponentom -1 , npr. cm^{-1} , ali ima ipak drugo značenje. Specifična površinska gustoća nas tek informira imaju li sastavni dijelovi nekog tijela više ili manje pravilan oblik nekih geometrijskih tijela, ili je njihova površina nepravilna, povećana u odnosu na volumensku gustoću.

Kod folikula štitne žlijezde, npr., koji imaju oblik šupljih kugla, možemo izračunati različite specifične površinske gustoće (Kališnik 1981), kao npr. (sl. 3.8.)

površine folikula

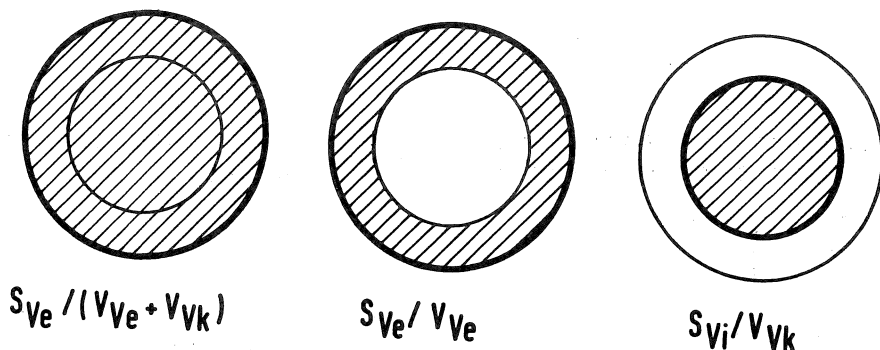
$$S_{Ve}/(V_{Ve} + V_{Vk}) \quad (3.17)$$

površine epitela

$$S_{Ve}/V_{Ve} \quad (3.18)$$

ili površine koloida (sl. 3.8.)

$$S_{Vk}/V_{Vk} \quad (3.19)$$



Sl. 3.8. Shematski prikaz specifičnih površinskih gustoća: površine folikula [$S_{Ve}/(V_{Ve}+V_{Vk})$], površine epitela (S_{Ve}/V_{Ve}) i površine koloida (S_{Vk}/V_{Vk}) (modif. iz Kališnik 1981)

Kod običnog mrežastog testnog sistema (sl. 3.7.), gdje je duljina svih testnih dužina (L_t) u jednom testnom polju ovisna o broju testnih --- točaka (P_t) i udaljenostima između njih (d) u smislu --- jednadžbe

$$L_t = 2 \cdot P_t \cdot d \quad , \quad (3.20)$$

možemo napisati pojednostavljenu formulu za specifičnu površinsku gustoću

$$S_{Vf}/V_{Vf} = I_f/(d \cdot P_f) \quad . \quad (3.21)$$

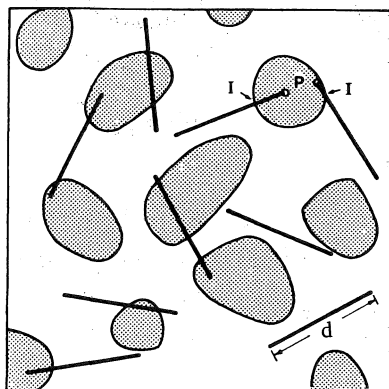
Ukoliko upotrebljavamo testni sistem s kratkim testnim dužinama duljine d , čiji krajevi nam ujedno znače testne točke (sl. 3.9.), omjer između duljine svih testnih linija (L_t) i broja testnih točaka (P_t) je određen sa ---

$$L_t = (P_t \cdot d)/2 \quad , \quad (3.22)$$

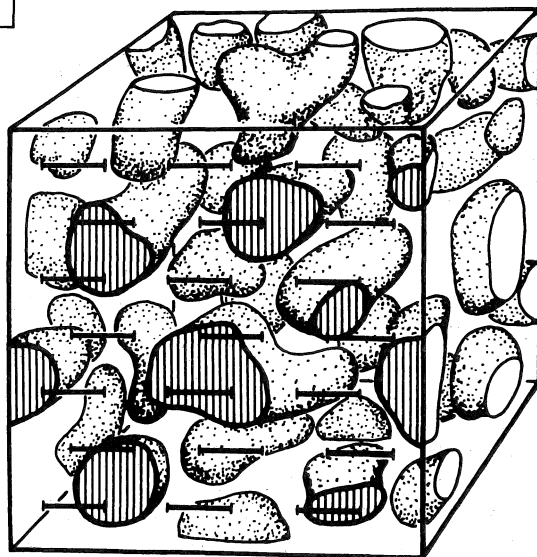
što nam omogućava pisanje pojednostavnjene formule za specifičnu površinsku gustoću u tom primjeru:

$$S_{Vf}/V_{Vf} = \frac{4}{d} \cdot \frac{I_f}{P_f} \quad (3.23)$$

Takve kratke testne dužine su obično raspoređene u pravilan mnogonamjenski testni sistem (sl. 3.10.).



Sl. 3.9. Određivanje volumenske i površinske gustoće čestica pomoću nasumce raspoređenih kratkih testnih dužina duljine \underline{d} (Weibel 1969)



Sl. 3.10. Određivanje volumenske i površinske gustoće čestica pomoću kratkih testnih dužina duljine \underline{d} , raspoređenih u pravilan testni sistem (Weibel 1966, cit. Weibel, Elias 1967)

U slučaju da možemo proučavanu fazu usporediti s

određenim geometrijskim tijelom, dobijemo iz kvocijenta između volumenske i površinske gustoće, odnosno iz modifikacije toga kvocijenta dodatne podatke o proučavanoj fazi. Obično je proučavana faza sastavljena od mnoštva odvojenih čestica. U biologiji su te čestice često oblikovane kao valjci ili cijevi, elipsoidi, kugle ili ljuske šupljih kugla.

Prosječnu debljinu stijenke cijevi (\bar{t}), koja može u prostoru biti i zavijena, određujemo po formuli:

$$\bar{t}' = 2 \cdot V_V / (S_{Ve} + S_{Vi}) \quad (3.24)$$

gdje smo uzeli u obzir vanjsku (S_{Ve}) i unutarnju površinsku gustoću (S_{Vi}) (sl. 3.11.). Polumjer solidnog valjka, koji može biti i zavijen, određujemo po istoj formuli, samo u njoj postane $S_{Vi} = 0$. To je značajno u slučajevima, u kojima u istom preparatu imamo istovrsne strukture u punom, solidnom i šupljem, luminiziranom obliku, npr. sjemenske tračke i sjemenske kanale u testisu u perinatalnom razdoblju (Kališnik 1977, Vraspir-Porenta 1979).

Budući da je naše određivanje debljine stijenke cijevi ili valjka učinjeno na preparatu, tj. na skvrčenom tkivu, moramo vrijednost ispraviti korekturnim faktorom za skvrčavanje (C), kojem vrijednost prilagodimo dimenziji za dužinu.

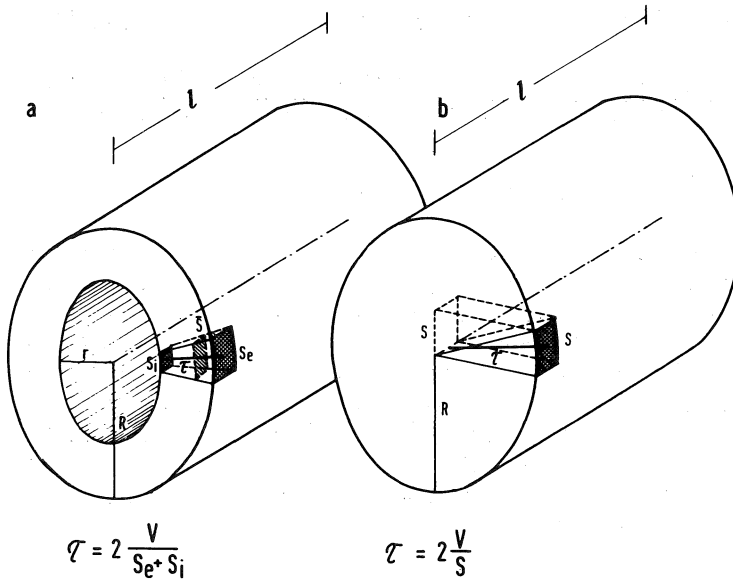
$$\bar{t} = \bar{t}' \cdot C^{1/3} \quad (3.25)$$

Prosječnu debljinu ljuske šuplje kugle (\bar{t}) određujemo po slijedećoj formuli (Bogataj, Kališnik, Poredoš 1977):

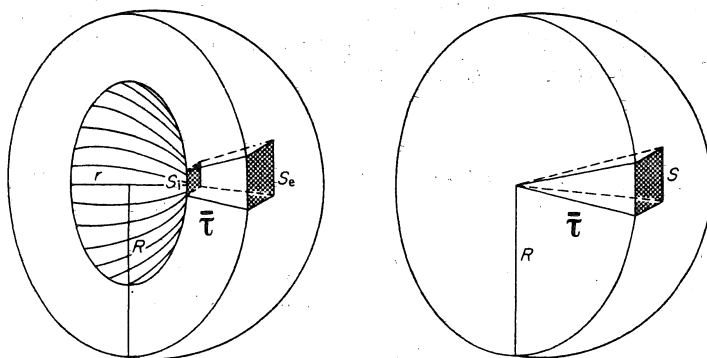
$$\bar{t}' = (3 \cdot P_f \cdot L_t) / \{2 \cdot P_t [I_e + I_i + (I_e \cdot I_i)^{1/2}]\} \quad (3.26)$$

kod čega znači I_e intersekcije s vanjskom površinom, a I_i s unutarnjom (sl. 3.12.). Za određivanje debljine ljuske u svježem tkivu (\bar{t}) upotrijebimo korekturni faktor ($C^{1/3}$) tako, da dobijemo

$$\bar{t} = \bar{t}' \cdot C^{1/3} \quad (3.27)$$



- Sl. 3.11. Izračunavanje debljine stijenke šupljeg valjka (τ) iz njezinog volumena V te vanjske (S_e) i unutarnje (S_i) površine (a); kod τ solidnog τ valjka (b) se radi o posebnom primjeru u kojem $S_i = 0$ (Kališnik 1977 b)



$$\bar{t} = K \frac{V}{S_e + S_i}$$

$$2 < K < 3$$

$$\bar{t} = 3 \frac{V}{S}$$

S1. 3.12. Izračunavanje debljine stijenke šuplje kugle (lijevo) ili polujera solidne kugle (desno) iz omjera volumena (V) i površine (nutarnje S_i , vanjske S_e ili S) (Kališnik, Jakopin, Šuštaršič 1977)

Formulu 3.26 možemo napisati u pojednostavnjenom obliku, koji svaki puta moramo prilagoditi upotrijebljenom testnom sistemu, analogno formulama 3.21 i 3.23 (Švab 1979).

Za prosječni promjer okruglih čestica ($2\bar{R}_s$) vrijedi jednostavan odnos

$$2\bar{R}_s = 6 \frac{V_V}{S_V} c^{1/3} \quad (3.28)$$

Vježba

1. Pokaži računski da specifična površinska gustoća kugle iznosi $3/R$!
2. Pretpostavimo li da su dosadašnje ocjene za V_{Ve} , V_{Vk} , S_{Ve} i S_{Vi} dobivene na istim testnim

poljima, izračunaj iz dosadašnjih podataka specifičnu površinsku gustoću površine folikula (\underline{f}), epitela (\underline{e}) i koloida (\underline{k}) te prosječnu visinu epitela (\bar{t}) štitne žlijezde miša!

Primjer:

$$S_{Vf}/V_{Vf} = 28/(0,247+0,605) \text{ mm}^{-1} = 32,864 \text{ mm}^{-1}$$

$$S_{Ve}/V_{Ve} = 28/0,247 \text{ mm}^{-1} = 113,36 \text{ mm}^{-1}$$

$$S_{Vk}/V_{Vk} = 34/0,605 \text{ mm}^{-1} = 56,198 \text{ mm}^{-1}$$

$$\bar{t}' = (3.52.2730) / \{2.210. [39+47+(39.47)^{1/2}]\} \mu\text{m} =$$

$$= 7,872 \mu\text{m}$$

3.4. Određivanje duljina

3.4.1. Duljinska gustoća

Duljinska gustoća (L_V) je relativna stereološka varijabla, koja kaže kolika je duljina određene krivulje u jedinici volumena. Dimenzija duljinske gustoće ima eksponent -2, [npr. $\text{cm}^1/\text{cm}^3 = \text{cm}^{-2}$]. Kao krivulju smatramo os neke zavijene cjevaste ili valjkaste strukture.

Trag jednodimenzionalne krivulje u ravnini je točka bez dimenzija, koju zovemo probodište (transekcija) i označujemo sa simbolom \underline{Q}_t , njezinu gustoću u testnoj ravnini zovemo probodišna gustoća (\underline{Q}_A).

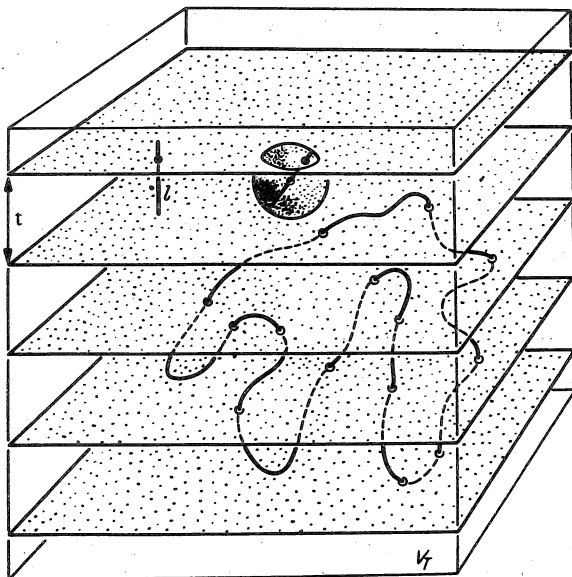
Iz Buffonovog rješenja "problema igle" možemo također izvesti formulu za određivanje duljinske gustoće

$$L_{Vf} = 2 \cdot Q_f / A_t$$

(3.29)

To određivanje izvodimo praktički tako, da pobrojimo probodišta (transekcije) na testnom arealu poznate površine (sl. 3.13.) i uvrstimo podatke u gornju formulu (3.29).

Određivanje duljinske gustoće je također ovisno o možebitnoj anizotropiji.



Sl. 3.13. Upotreba Buffonovog rješenja problema igle za određivanje duljine krivulje u trodimenzionalnom prostoru. Određivanje se temelji na broju probodišta te krivulje s ekvidistantnim testnim ravninama (Weibel, Elias 1967)

3.4.2. Apsolutna duljina

Apsolutnu duljinu neke crte (L) mogli bi izmjeriti, ukoliko bi ona bila ravna i prolazila u ravnini reza; jednostavno bi upotrijebili okularni mikrometar. Budući da ta dva uvjeta nisu obično ispunjena, služimo se metodama, koje nam daje stereologija. Apsolutna duljina ima dimenziju s eksponentom 1, [npr. cm^1].

Indirektno određujemo duljinu krivulje jednako kao pri određivanju površine tako, da duljinsku gustoću (L_{Vf}) pomnožimo s apsolutnim volumenom tijela (V_o)

$$L_f = L_{Vf} \cdot V_o \quad (3.30)$$

Direktno možemo duljinu neke krivulje unutar nekog tijela odrediti iz potpune ili stupnjevite serije rezova (debljina reza ili stupnja t) po jednadžbi

$$L_f' = 2 \cdot Q_f \cdot t \quad (3.31)$$

Gornje određivanje vrijedi za skvrčeno tkivo u preparatu. Uz uvažavanje korekture za skvrčavanje konačna formula glasi

$$L_f = 2 \cdot Q_f \cdot t \cdot c^{1/3} \quad (3.32)$$

Vježba

Odredi duljinsku gustoću krvnih žila u intersticiju u pet polja preparata štitne žlijezde miša kod povećanja objektiva 60x!

Primjer:

	1	2	3	4	5	Σ
Q	0	1	6	4	0	11

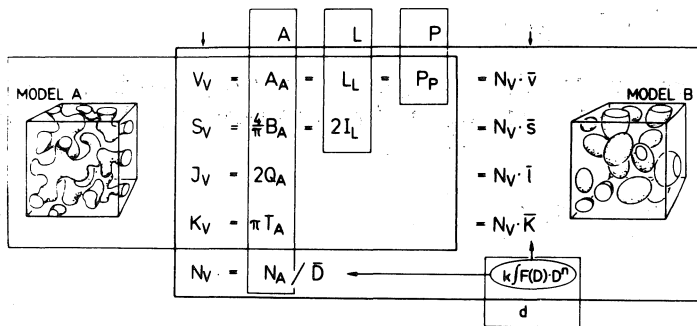
A_t smo za upotrebljavani testni sistem M 42 odredili već prije; kod jednakog povećanja objektiva 60x iznosi za 1 testno polje $24 \cdot 10^3 \mu m^2$; za 5 testnih polja je prema tome testni areal $120 \cdot 10^3 \mu m^2$.

$$L_V = (2 \cdot 11) / (12 \cdot 10^4) \mu m^{-2} = 0,000183 \mu m^{-2} = 183 \cdot 10^{-6} \mu m^{-2}$$

=====

3.5. Određivanje broja čestica

Unutarnja građa tijela može biti takva da se u njima međusobno isprepliću dvije ili više faza. Svaka od tih faza može biti kontinuirana, što po Weibelu (1974) nazivamo model A. Modelom B nazivamo takvu strukturu, u kojoj je barem jedna faza diskontinuirana, te se prema tome sastoji iz čestica uključenih u matriks (sl. 3.14.). U takvim slučajevima zanimljiv je podatak o broju tih čestica.



Sl. 3.14. Pregled stereoloških metoda, koje se mogu primjeniti na dva stereološka modela, isprepletenom (A) odnosno korpuskularnom (B). U oba modela možemo odrediti volumensku, površinsku i duljinsku gustoću čestica, a u modelu B također i numeričku gustoću čestica kao i prosječnu dimenziju pojedine čestice (Weibel 1974)

3.5.1. Numerička gustoća

Numerička (brojčana) gustoća (N_V) je relativna stereološka varijabla, koja kaže, -- koliko ima čestica u jedinici prostora. Dimenzija numeričke gustoće ima eksponent -3 , [npr. $\text{cm}^0/\text{cm}^3 = \text{cm}^{-3}$]. Suprotno metodama za određivanje volumenske, površinske i duljinske gustoće, kod kojih možemo točnost rezultata po želji odrediti prema obradi dovoljno velikog uzorka, imamo za određivanje numeričke gustoće na raspolaganju više metoda, kod kojih dobiveni rezultati predstavljaju uistinu samo aproksimativne vrijednosti.

Osnovno stereološko načelo, koje je već izrazio Wicksell (1925, 1926), kaže da je broj profila čestica u ravni presjeka (N_A) razmjernan produktu njihove numeričke gustoće (N_V) i njihovog prosječnog tangentsnog promjera (\bar{D}) -- (sl. 3.15.), što možemo označiti jednadžbom

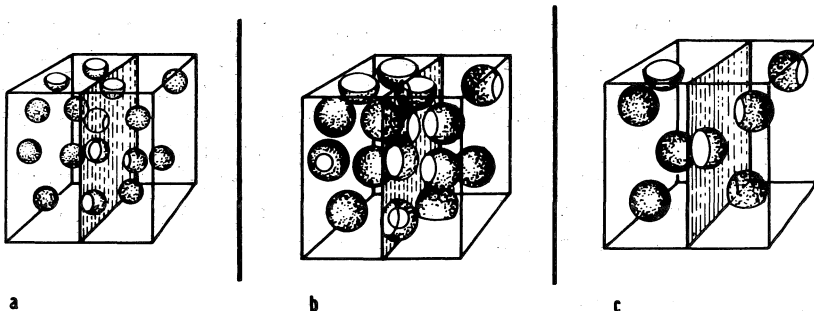
$$N_A = N_V \cdot \bar{D} \quad (3.33)$$

iz koje možemo izračunati numeričku gustoću

$$N_V = N_A / \bar{D} \quad (3.34)$$

Ova formula traži, da prebrojimo profile čestica N na testnom arealu A_t i izračunamo njihov kvocijent.

$$N_A = N / A_t \quad (3.35)$$



Sl. 3.15. Tri kocke sadrže kugle. Kod a i b broj kugla je jednak, njihova veličina je različita, kod b i c kugle su jednako velike, razlika je u broju. Broj profila tih kugla u slučajnom presjeku je $N_{Ac} < N_{Aa} < N_{Ab}$ (Weibel 1979)

Koliko je prvi zadatak razmjerno lako izvodiv, kod drugog međutim često nailazimo na znatne poteškoće.

Dodajmo još, da formula 3.34 vrijedi u slučaju kad profile brojimo na idealno tankom presjeku, npr. na izbrusku kroz neprozirno tijelo. U biologiji u pravilu radimo s krajnje tankim rezovima, koji imaju neku debljinu.

3.5.1.1. Metode za tanke rezove

Zbog poteškoća u pokušajima da se \bar{D} točno odredi tražena su alternativna rješenja. Sva u biti predpostavljaju određen oblik čestica, a istovremeno pokušavaju odrediti veličinu čestica iz nekih stereoloških vrijednosti kao što su volumenska ili površinska gustoća ili obje zajedno. Kod pravilnih geometrijskih tijela postoje naime odnosi između prosječnog promjera čestica s jedne strane i omjera između njihovog volumena i površine s druge strane (usporedi formulu 3.28!). Tako su se razvile tri metode za određivanje numeričke gustoće čestica u tankim rezovima. U slučaju kad upotrijebimo koju od ovih metoda na debelim rezovima, mikrometarski vijak ne smijemo nakon izoštravanja slike više pomicati.

DeHoffova metoda

DeHoff (1964) je predložio formulu, koja omogućava određivanje N_V osim iz N_A i iz samog broja presjecišta obrisa --(kontura)-- profila s testnim dužinama (I_L):

$$N_V = \frac{(N_A)^2}{2I_L} \cdot \frac{\gamma_2}{\gamma_1^2} \quad (3.36)$$

Formula zahtijeva poznavanje oblika čestica, koji odgovara određenom pravilnom geometrijskom tijelu, kojem pripadaju oblikovni koeficijenti γ_1 i γ_2 . Ti koeficijenti su za neka geometrijska γ₁ i γ₂ tijela navedeni u tablici 3.1.

Metoda po DeHoffu i Weibelu

Weibel (1979) je modificirao izvornu DeHoffovu metodu (1964) ovako (vidi Kališnik, Pajer 1983):

$$N_V = N_A \cdot \frac{2I_L}{V_V} \cdot \frac{\gamma_3}{\gamma_1 \cdot \gamma_2} \quad (3.37)$$

kod koje je uveo još treći oblikovni koeficijent γ_3 (tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Oblikovni koeficijenti za brojenje čestica po metodama DeHoffa, DeHoffa i Weibela, te Weibela i Gomeza (po Weibelu 1979)

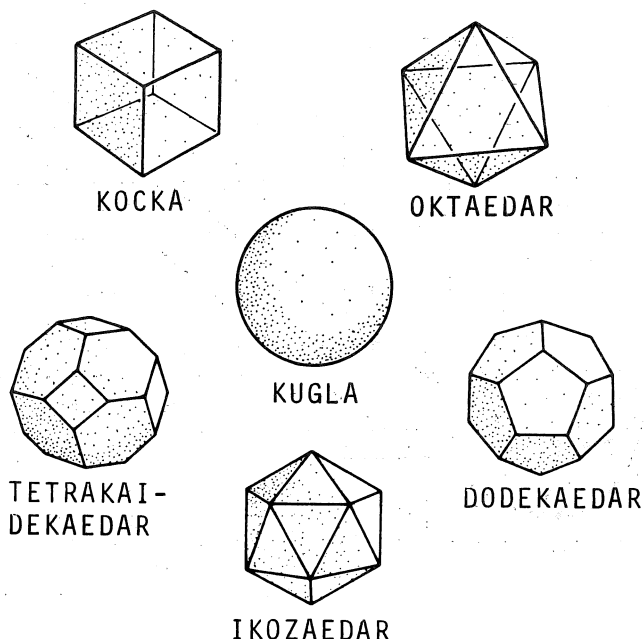
Formula	3.36	3.37		3.38
Oblik čestice	γ_1	γ_2	γ_3	β
kugla	2	12,57	4,19	1,38
jajasti (prolatni) sferoid (2:1:1)	2,76	21,4	8,38	1,58
lečasti (oblatni) sferoid (2:2:1)	1,71	8,67	2,09	1,55
kocka	1,5	6	1	1,84
oktaedar	1,17	3,46	0,47	1,86
ikozaedar	1,74	8,66	2,18	1,55
dodekaedar	2,64	18,05	7,66	1,55
tetrakaidekaedar	3	26,8	11,3	1,55

Vidi sl. 3.16.!

Metoda po Weibelu i Gomezu (1962)

U biologiji često upotrebljavamo ovu metodu, kod koje uzimamo u obzir uz N_A i V_V :

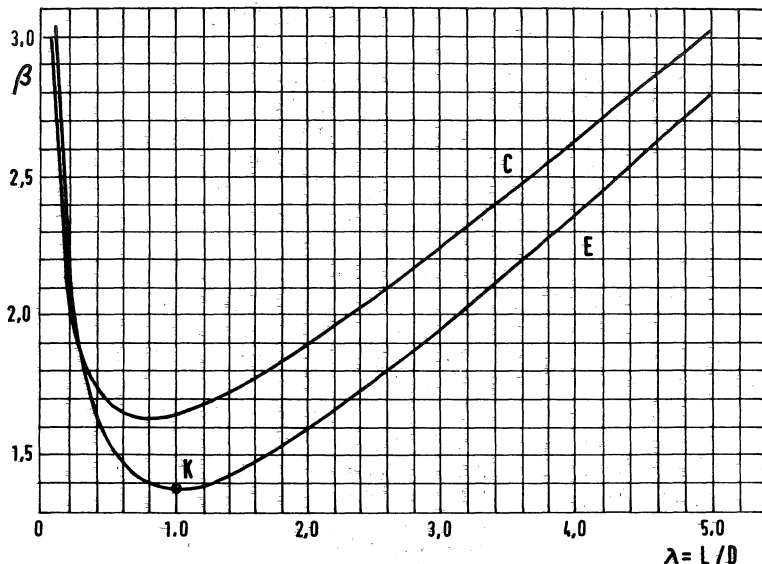
$$N_V = \frac{K}{\beta} \left[\frac{(N_A)^3}{V_V} \right]^{1/2} \quad (3.38)$$



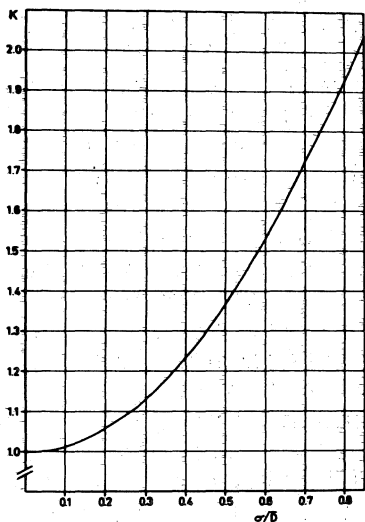
Sl. 3.16. Neki poliedri s jednakim volumenom kao kugla (Weibel 1979)

U formuli su dva korekturna faktora, oblikovni β i onaj od raspodjele po veličini \underline{K} . Prvog očitamo iz tablice 3.1. za razna geometrijska tijela, a za elipsoide i cilindre i iz slike 3.17. Vrijednost oblikovnog koeficijenta β za kuglu je 1,382. Odlika je ovog koeficijenta da vrlo malo varira kod elipsoida s kratkom osi; to znači da je metoda vrlo upotrebljiva za brojenje čestica, koje su približno sferne (kuglaste), a što vrijedi za mnoge biološke objekte.

Varijabilnost veličine čestica može uzrokovati određenu sistematsku pogrešku. To izbjegavamo upotrebom korekturnog koeficijenta \underline{K} , a njegovu vrijednost očitamo iz slike 3.18. Iz nje vidimo da pri raspodjeli čestica po veličini sa standardnom devijacijom manjom od 20% prosjeka, koeficijent \underline{K} varira od 1,00 do 1,05; to znači da bi zanemarivanje tog koeficijenta pri određivanju N_V uzrokovalo pogrešku, koja ne bi prelazila 5%. -- U biologiji možemo zbog toga u mnogim slučajevima koeficijent \underline{K} zanemariti ili grubo procijeniti.



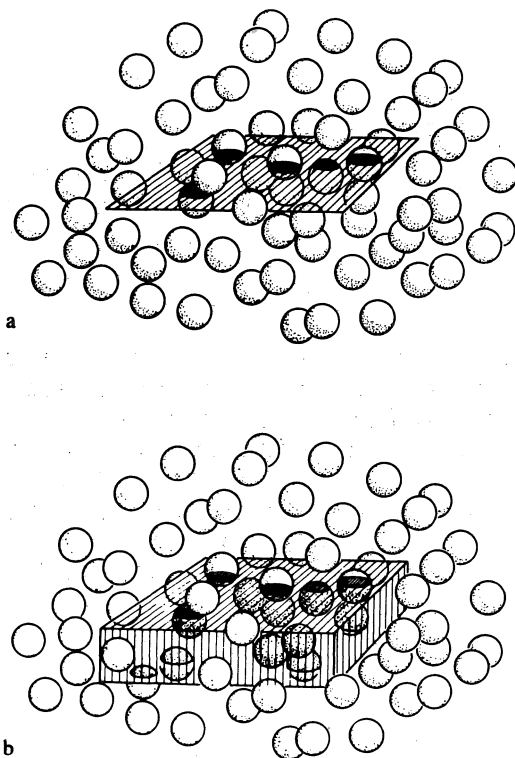
Sl. 3.17. Oblikovni koeficijent $\underline{\beta}$ kao funkcija omjera $\underline{\lambda} = L/D$ cilindara i elipsoida (Weibel 1969)
 \underline{C} za cilindre, \underline{E} za elipse, \underline{K} za kugle



Sl. 3.18. Korekcijski faktor \underline{K} za raspodjelu čestica po veličini kao funkcija koeficijenta varijacije $\underline{\sigma/D}$ (Weibel 1979)

3.5.1.2. Metode za debele reze
z o v e

Do sada opisane metode predpostavljaju brojenje profila čestica u ravnini presjeka bez debljine. Ta je pretpostavka prihvatljiva samo u slučaju da su čestice obzirom na debljinu reza dosta velike. Ako je debljina reza t razmjerno velika obzirom na promjer čestica, obuhvatit ćemo kod brojenja čestice u čitavoj debljini reza (sl. 3.19.).



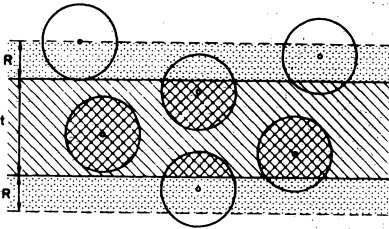
Sl. 3.19. Uzorak kugla, presječenih ravninom (gore) i u rezu određene debljine (dolje) (Weibel 1977)

Gledajući na rez sa strane (sl. 3.20.) vidimo da brojimo ne samo čestice, koje imaju središte u rezu, već i one koje imaju središte u sloju debljine R iznad gornje i ispod donje površine reza, tj. u

nekom "nadrezu". To je Abercrombie (1946) kompenziraó slijedećom formulom

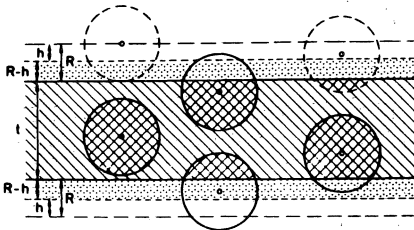
$$N_V = N_A / (t + \bar{D}) \quad (3.39)$$

Lako uočavamo, da je gornja formula identična formuli 3.34, ako ide $t \rightarrow 0$.



Sl. 3.20. Kugle sa središtima u nadrezu debljine $(t + 2R)$ (Weibel 1977)

Kod brojenja čestica u debelim rezovima susrećemo se s još jednim problemom: ukoliko čestice nisu potpuno crne, a okolni matriks nije potpuno proziran, brojenjem ne obuhvatimo određen broj kalota, jer ih jednostavno ne vidimo. Floderus (1944) je zbog toga uveo ispravljenu formulu, u kojoj je nadrez sa svake strane stanjio za visinu kalote h , koja je premala da bismo je mogli vidjeti u mikroskopu (sl. 3.21.)



Sl. 3.21. Gubitak kalota visine h stanjuje nadrez za $2h$ (Weibel 1977)

$$N_V = N_A / (t + \bar{D} - 2h) \quad (3.40)$$

Visinu kalote h možemo odrediti iz najvećeg (R) i najmanjeg vidljivog radiusa (r) profila:

$$h = R - (R^2 - r^2)^{1/2} \quad (3.41)$$

Haug (1977) je za orijentaciju za veličinu h naveo: 10-20% R za male, guste jezgre (možda limfocite) i 20-25% za velike, rahle jezgre (možda fibroblaste).

Haug (1967) u svojem pregledu metoda za određivanje numeričke gustoće čestica u debelim rezovima preporuča, da što više povećamo razliku između razmjerno malih čestica i razmjerno debelog reza, npr. da umjesto stanica brojimo njihove dobro vidljive oznake: uzimamo jezgre, ako stanice imaju jednu jezgru ili njihove jezgrice, ako svaka jezgra ima samo jednu jezgricu.

Ebbesson i Tang (1965) predložili su zanimljivu metodu. Uzmemo dva reza različite debljine, $t_1 > t_2$, pobrojimo u svakom profile na testnoj površini, N_{A1} i N_{A2} , pa izračunamo N_V po formuli

$$N_V = (N_{A1} - N_{A2}) / (t_1 - t_2) \quad (3.42)$$

Poznavanje veličine čestica očito nije potrebno, ali razlika između t_1 i t_2 mora biti dovoljno velika.

Za pregled metoda za određivanje debljine reza vidi članak Williamsa (1981)!

3.5.2. Apsolutni broj čestica

3.5.2.1. I n d i r e k t n a m e t o d a

Apsolutni broj čestica u nekom tijelu (organu, stanici) (N) možemo indirektno odrediti tako, da pomnožimo numeričku gustoću čestica (N_V) s apsolutnim volumenom tijela (organa, -- stanice) (V_0)

$$N = N_V \cdot V_0 \quad (3.43)$$

3.5.2.2. D i r e k t n a m e t o d a

Elias i sur. (1971) su razvili metodu direktnog određivanja apsolutne površine ploha i apsolutne duljine krivulja, kojoj smo dodali formulu za direktno određivanje apsolutnog volumena tijela (Kališnik 1977 b). U sklopu tih metoda, koje dopunjavaju indirektno metode za izračunavanje apsolutnih stereoloških varijabli, manjkala je do sada metoda za direktno određivanje apsolutnog broja čestica (Kališnik, Pajer 1982).

Kod toga moramo voditi računa da postupamo s nadrezovima debljine t_s , koja je u Floderusovoj formuli definirana kao

$$t_s = t' + 2R - 2h \quad (3.44)$$

gdje t' znači debljinu reza, $2R$ promjer čestice i h debljinu najviše kalote, koju kod brojenja previdimo zbog optičkih zakona (sl. 3.22.). Dodajmo da se gornju formulu (3.44) može upotrijebiti samo kada su čestice jednako velike, ili ako je njihova varijabilnost zanemarljiva (npr. uz koeficijent varijacije manji od 0,20).

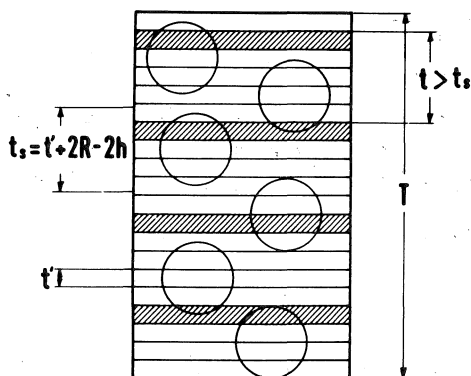
Ako je objekt dovoljno malen (npr. embrionalni organ ili organ vrlo male životinje), izrežemo ga najprije potpuno na serijske rezove. Ukoliko želimo,

možemo izračunati i cjelokupnu debljinu organa \underline{T} iz broja svih rezova \underline{n} i debljine pojedinog reza \underline{t}'

$$T = n \cdot t' \quad (3.45)$$

Radi li se o većem objektu, presječemo ga približno kroz sredinu i odrežemo jedan rez. Zatim na jednom rezu odredimo debljinu nadreza \underline{t} i odredimo najmanji dopušten stupanj \underline{s} stupnjevite serije \underline{t}

$$t \geq (t' + 2R - 2h) \quad (3.46)$$



$$N = N' \cdot (t/t_s)$$

Sl. 3.22. Direktno određivanje apsolutnog broja čestica u tijelu debljine \underline{T} , izrezanom u potpunu seriju rezova debljine \underline{t}' , s promjerom čestica $\underline{2R}$, visinom izgubljene kolute \underline{h} , nadrezom debljine \underline{t} , u stupnjevitostoj seriji rezova s \underline{s} debljinom stupnja \underline{t} (Kališnik, Pajer 1982)

U interesu je točnosti određivanja apsolutnog broja čestica, da je stupanj to manji, uz uvjet određen u formuli (3.46). Kod većih objekata moramo se ipak odreći veće točnosti te zbog ekonomiziranja s vremenom za obradu, izaberemo tako rijetku stupnjevitu

seriju, koju još možemo u odgovarajućem vremenu obraditi. Sada izrežemo obje polovice većeg tijela na stupnjevitu seriju s prikladnom debljinom stupnja t .

U koliko je broj čestica, koje smo pobrojili u svim rezovima stupnjevite serije s debljinom stupnja t i debljinom nadreza t_s jednak N' možemo zatim iz toga odrediti apsolutni broj čestica u cijelom tijelu (organu, stanici) N po formuli

$$N = N' \cdot t / (t' + 2R - 2) \quad , \quad (3.47)$$

koji možemo također napisati

$$N = N' (t/t_s) \quad . \quad (3.48)$$

Korektura zbog skvrčenja tijela nastalog u vrijeme izrade preparata nije potrebna, jer u tom slučaju korekturni koeficijent dobije vrijednost

$$c^{0/3} = 1 \quad . \quad (3.49)$$

3.5.3. Numerička gustoća i dubinska oštrina

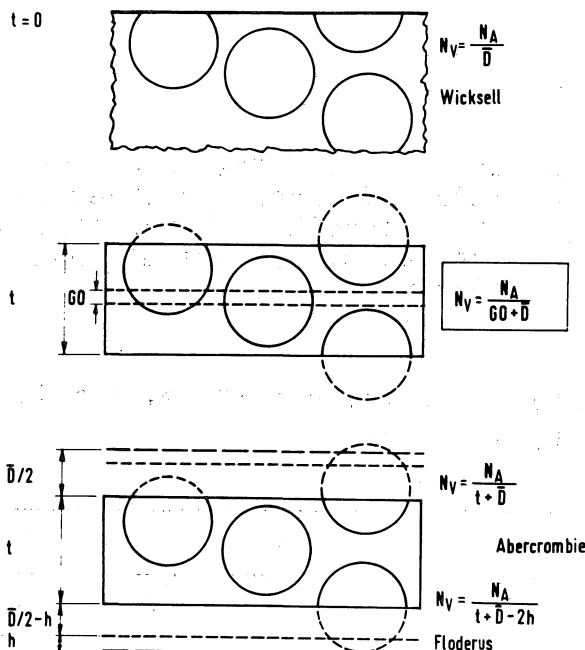
Kada u svjetlosnom mikroskopu brojimo čestice u jednoj razini debelog reza, a ne kroz čitavu debljinu reza, te nakon izoštravanja slike ne pomičemo više mikrometarski vijak, približavamo se brojenju čestica u tankom rezu. Zbog toga u formulama za određivanje numeričke gustoće (3.39, 3.40) i/ili apsolutnog broja čestica (3.47) gdje je potrebno uvažavati debljinu reza t odnosno t' , nadomještavamo to dubinskom oštrinom \overline{GO} odgovarajućeg povećanja objektiva. Tako numeričku gustoću čestica izračunamo po formuli

$$N_V = N_A / (GO + \overline{D}) \quad (3.50)$$

a apsolutni broj čestica po formuli

$$N = (N' \cdot t) / (GO + \overline{D}) \quad (3.51)$$

U formulama ne uzimamo u obzir korekture nadrezova za visinu granične kalote \underline{h} , jer se približavamo uvjetima, u kojima vrijedi formula po Wicksellu (3.34) (sl. 3.23).



Sl. 3.23. Shematski prikaz određivanja numeričke gustoće čestica N_V s prosječnim promjerom \bar{D} po raznim metodama: GO dubinska oštrina, h visina izgubljene kalote, N_A numerička arealna gustoća čestica, t debljina reza

Dubinsku oštrinu objektiva izračunamo po formuli

$$GO = \lambda / (n \cdot NA^2) \quad (3.52)$$

gdje je λ valna dužina svjetlosti (550 nm), n lomni koeficijent umetnutog sredstva (zrak 1, imerzijsko ulje 1,516), NA numerička apertura objektiva odgovarajućeg povećanja. Ta metoda se pokazala osobito prikladnom za brojenje jezgara s imerzijskim objektivom.

Vježba

Odredi numeričku gustoću folikula u pet polja štitne žlijezde miša kod povećanja objektiva 60x! Izračunaj N_V po Wicksellu, Abercrombieju, Floderusu, DeHoffu, -- te Weibelu i Gomezu! Vodi računa o slijedećim podacima:

$$\bar{D} = 102 \mu\text{m}, \quad t = 7 \mu\text{m}, \quad h = 10 \mu\text{m}, \quad K = 1,2, \quad \beta = 1,38, \\ k_1 = 2, \quad k_2 = 12,57!$$

	1	2	3	4	5	Σ
N_f	2	2	5	5	2	16

A_t smo odredili već prije te iznosi $0,12 \text{ mm}^2$,

$V_{Ve} + V_{Vk} = 0,852$ smo odredili kod vježbe volumenske gustoće.

$$N_A = 16/0,12 = 133,333 \text{ mm}^{-2}$$

$$\text{Wicksell } N_V = 133,333/0,102 = 1307,186 \text{ mm}^{-3}$$

=====

$$\text{Abercrombie } N_V = 133,333/(0,102 + 0,007) =$$

$$= 1223,238 \text{ mm}^{-3}$$

=====

$$\text{Floderus } N_V = 133,333/(0,102+0,007-0,02) =$$

$$= 1498,123 \text{ mm}^{-3}$$

=====

$$\text{DeHoff } N_V = (133,333^2/28,571)(12,57/2^2) =$$

$$= 1955,052 \text{ mm}^{-3}$$

=====

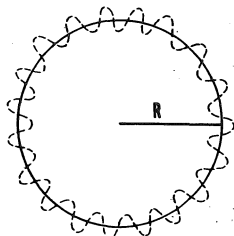
$$\text{Weibel-Gomez } N_V = (1,2/1,38)(133,333^3/0,852)^{1/2} =$$

$$= 1449,461 \text{ mm}^{-3}$$

=====

3.6. Razdioba (distribucija) čestica po veličini

U prethodnom poglavlju, kod nekih metoda za određivanje numeričke gustoće čestica, pretpostavljali smo, da poznajemo prosječni promjer čestica, koje smo brojali. Čestice u naravi obično nisu jednako velike nego su one na neki način raspodijeljene po veličini. Katkad nam distribucija čestica po veličini daje zanimljivu informaciju. Pri tome moramo biti svjesni da u rezovima čestice mogu biti prerezane u različitim visinama, pa zbog toga imamo posla s profilima čestica a ne sa samim česticama. Osim toga čestice su u naravi vrlo različitog oblika. Istovrsne čestice imaju obično jednak ili sličan oblik, kojeg smijemo u svrhu analize usporediti s određenim pravilnim geometrijskim tijelom (usporedi sl. 3.16!). U praksi možemo dosta često uspoređivati sferoide (elipsoide), a također i poliedre s kuglama jednakog volumena. Specifična površinska gustoća čestica nas uči, koliko smo se u aproksimaciji oblika čestica kugli udaljili od stvarnog oblika, jer znamo da kugla ima, među svim tijelima, najmanju specifičnu gustoću (sl. 3.24.).



$$S = 4 \pi R^2$$

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3$$

$$\frac{S}{V} = \frac{3 \cdot 4 \pi R^2}{4 \pi R^3} = \frac{3}{R}$$

$$\frac{S}{V} > \frac{3}{R}$$

Sl. 3.24. Specifična površinska gustoća kugle je najmanja od svih tijela te iznosi $\underline{3/R}$

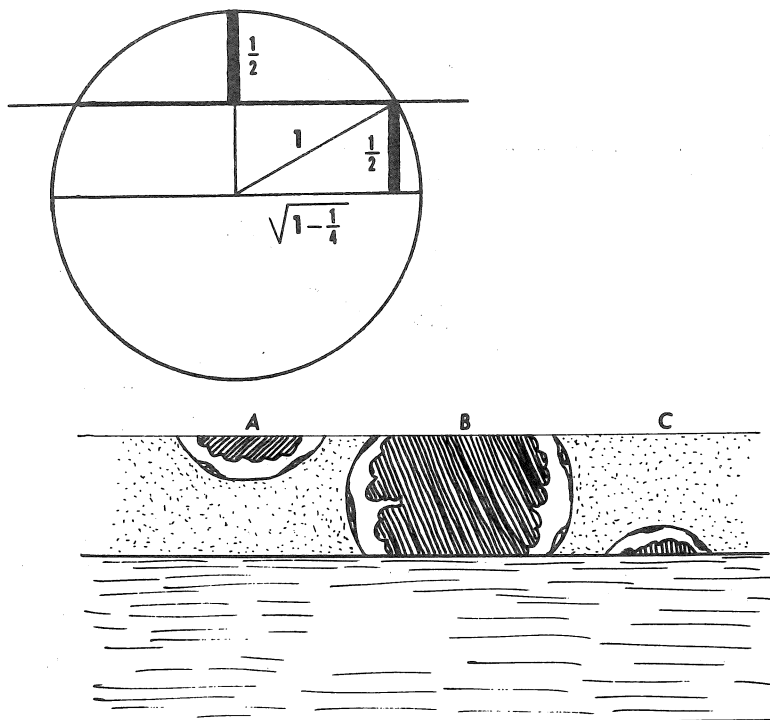
$$S_V/V_V = 3/R$$

(3.53)

Razlog više, zašto čestice identificiramo s kuglama, leži u tome što nam to omogućava jednostavno riješiti distribuciju čestica prema veličini, na temelju distribucije njihovih profila u rezovima. Rješenje ovog problema obrazložiti ćemo u nastavku ovog poglavlja.

Uzmimo najprije najjednostavniji primjer da su sve kugle jednako velike s polumjerom R i promjerom $2R = D$. U tom slučaju imaju njihovi profili na rezovima oblik kružnica, s promjerom, koji varira od 0 do $2R$. Veličina promjera profila ovisi o udaljenosti rezne plohe od središta prerezane kugle (sl. 3.25.). Uzmemo li da je $R = 1$, možemo po Pitagorinom poučku izračunati vjerojatnost za bilo koji razred veličine profila. Histogram ili poligon razreda, u kojem su profili raspoređeni prema veličini, možemo također grafički konstruirati (sl. 3.26.).

Iz slike 3.25. razabiremo da 50% profila ima polumjer \underline{r} (a također i promjer $\underline{d} = 2r$) jednak ili veći od 0,866 polumjera R kugle (odnosno promjera kugle $D = 2R$). To također znači, da 86,6% profila ima polumjer (promjer), koji je jednak ili veći od polovice polumjera (promjera) kugle. Ako u nekom rezu ustanovimo, da 13,4% ili manje profila oblika kružnice ima promjer, koji je jednak ili kraći od promjera polovice najvećeg profila oblika kružnice, možemo zaključiti, da u rezu imamo kugle jednake veličine. Napisali smo "13,4 ili manje", jer zbog

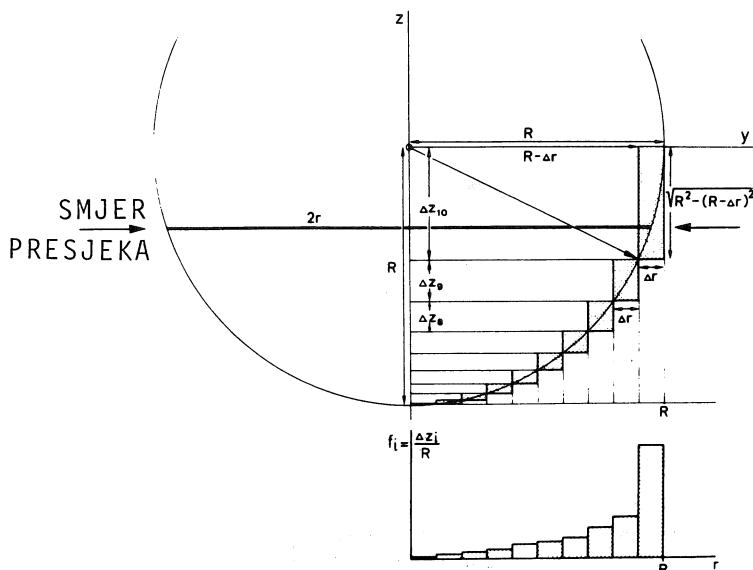


Sl. 3.25. Debele okomice naznačuju vjerojatnost, da ćemo u rezu kroz jednako velike kugle s promjerom D naći polovicu profila s $d \geq 0,866 D$. Dio tih kalota možemo izgubiti, jer ispadaju iz reza (A), ili su i odviše male da bismo ih mogli vidjeti (C) (Elias, Hennig, Schwartz 1971)

optičkih ili mehaničkih razloga može dio kalota izbjeći našem opažanju u toku brojenja (sl. 3.25.).

Bez proučavanja veličinske distribucije profila čestica za koje pretpostavljamo, da su oblika kugle približno jednake veličine, možemo izračunati da je odnos između polumjera kugle R i prosječnog polumjera profila \bar{r} jednak

$$R = \frac{4}{\pi} \bar{r} \quad , \quad (3.54)$$



Sl. 3.26. Grafička konstrukcija raspodjele frekvencija u razredima različite veličine r (Weibel 1979)

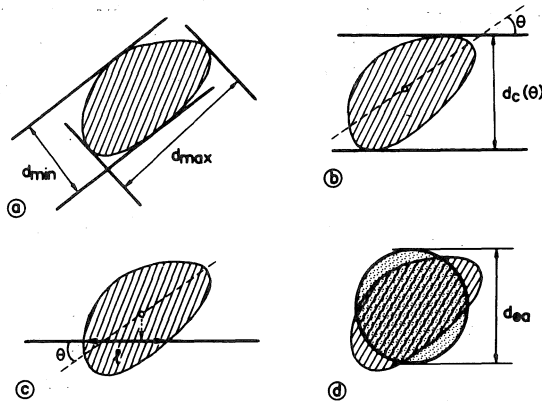
što se također odnosi na odnos odgovarajućih promjera

$$D = \frac{4}{\pi} \bar{d} \quad (3.55)$$

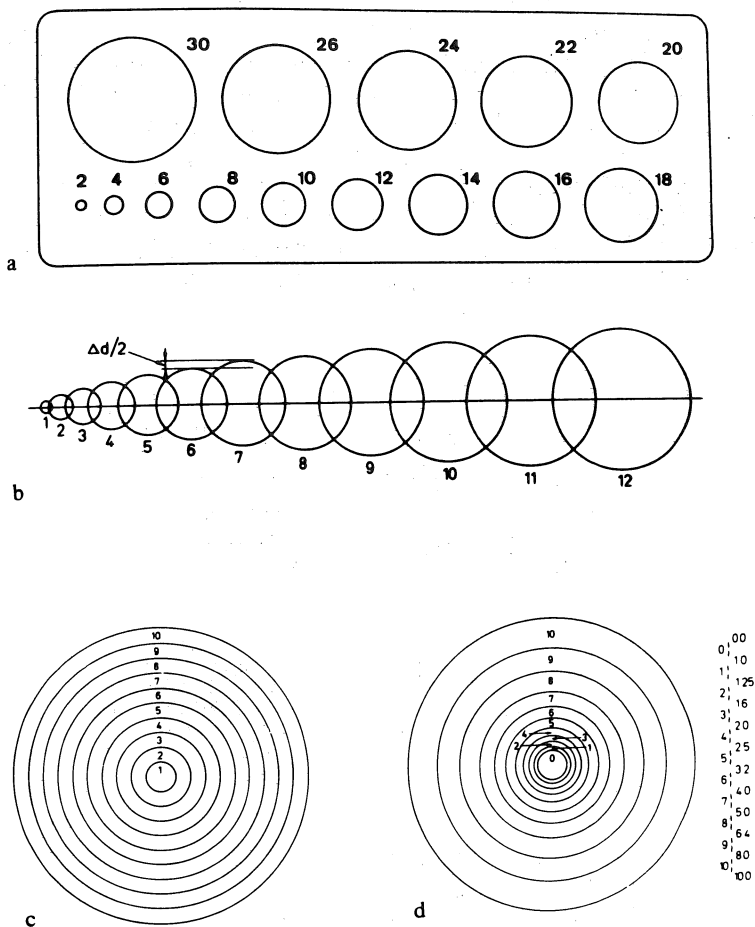
U praksi možemo proučavati distribuciju profila čestica po veličini pomoću mjerenja Feretovog ili slučajnog, tangentnog, kalipernog promjera (sl. 3.27.) bilo upotrebom mikrometarskog okulara ili križa, koji se sastoji iz dvije međusobno okomite niti; možemo također upotrijebiti matrice, koje sadrže oblike kružnica različitih veličina nacrtane na prozirnoj pločici, koju stavljamo na dijafragmu okulara (sl. 3.28.).

Češći su slučajevi da populacija kugla u rezu pripada većem broju veličinskih razreda, koji imaju različite promjere. Tada je frekvencija distribucije svakog dijela populacije sakrivena u zajedničkoj frekvenciji distribucije (sl. 3.29.). Jednostavan način proučavanja distribucije prema veličini tako nehomogene populacije kugla jest, da najprije

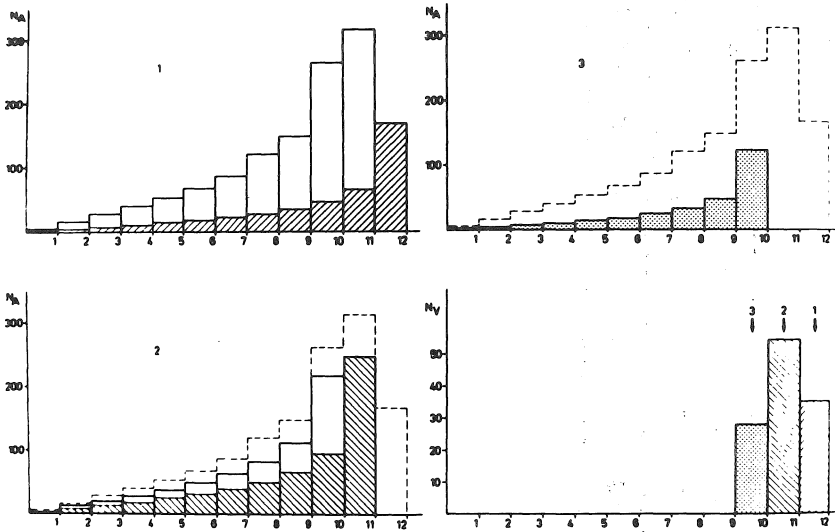
oduzmemo relativne frekvencije, koje pripadaju kuglama najvećeg razreda, zatim one relativne frekvencije, koje pripadaju drugom razredu po veličini, i tako dalje dok ne "iskoristimo" cijelu populaciju. Na tom principu temelji se većina matematičkih metoda, za koje stoje na raspolaganju već izračunati koeficijenti, koji olakšavaju računanje (usporedi Poredoš i sur. 1977, Bogataj 1978). Postoje također metode određivanja distribucije čestica po veličini iz distribucije dužine intercepata (= horda). Budući da na rezultate utječe i konačna debljina reza, treba još uzimati u obzir odgovarajuće ispravke.



Sl. 3.27. Linearne mjere veličine profila: (a) minimalni i maksimalni kaliperni promjer; (b) Feretov kaliperni promjer; (c) slučajni intercept ili duljina horde; (d) promjer kruga s jednakom površinom (Weibel 1979)



Sl. 3.28. Testni krugovi za mjerenje veličine profila. (a) grafička šablona; (b) linearni niz; (c) koncentrični krugovi u linearnoj skali; (d) koncentrični krugovi u logaritmičkoj skali (Weibel 1979)



Sl. 3.29. Grafički prikaz pravila za rasčlanjivanje distribucija frekvencija djelomičnih populacija čestica iz zajedničke distribucije frekvencija nehomogene populacije kugla (Weibel 1979)

Vježba

1. Jedan kvadrant kugle s polumjerom $R = 1$ razrežemo od baze do vrha na 8 jednako širokih segmenata. Izračunajmo vjerojatnost, da ćemo slučajno pasti u određen razred. Nacrtaj grafikon! Upotrijebi Pitagorin poučak! Odgovor:

$$0,008+0,024+0,041+0,061+0,085+0,120+0,177+0,484 = 1,000$$

2. Objektom mikrometrom baždari okularni mikrometar kod povećanja objektiva 10x, izmjeri 100 Feretovih promjera profila folikula u preparatu štitne žlijezde miša, izračunaj njihov prosječan promjer \bar{D} , rezultat prikaži grafički!

Primjer:

<i>d</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Σ
<i>f</i>	8	14	10	8	14	14	9	3	5	6	0	2	1	0	1	2	2	1	100
<i>d.f</i>	16	42	40	40	84	98	72	27	50	66	0	26	14	0	16	34	36	19	680

Mikrometerska vrijednost 15 μm

$$\bar{D} = (680/100)15 = \underline{\underline{\underline{102 \mu\text{m}}}}$$

3.7. Određivanje zakrivljenosti

Klasične stereološke metode omogućavaju upoznavanje relativnih i apsolutnih volumena, površina, duljina i broja čestica, ne govore ali ništa o oblicima. Za upoznavanje oblika pojedinih faza potrebne su posebne metode; među ove spadaju također metode za određivanje zakrivljenosti ploha. U tom dijelu upoznat ćemo neke mjere zakrivljenosti. Podrobnije podatke može čitalac dobiti iz inozemne (Cahn 1967, DeHoff 1967, 1968, Gil i Weibel 1972) i domaće literature (Kališnik, Vraspir-Porenta, Bogataj 1978).

3.7.1. Specifična gustoća zakrivljenosti

Specifičnu gustoću zakrivljenosti ili prosječnu zakrivljenost (proizvoljno oblikovane ali kontinuirane) plohe na jedinicu površine (K_s) dobijemo tako, da integriramo srednju zakrivljenost (\bar{K}) po cijeloj plohi. Srednja zakrivljenost za svaku točku plohe određena je formulom

$$K = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{r_1 + r_2}, \quad (3.56)$$

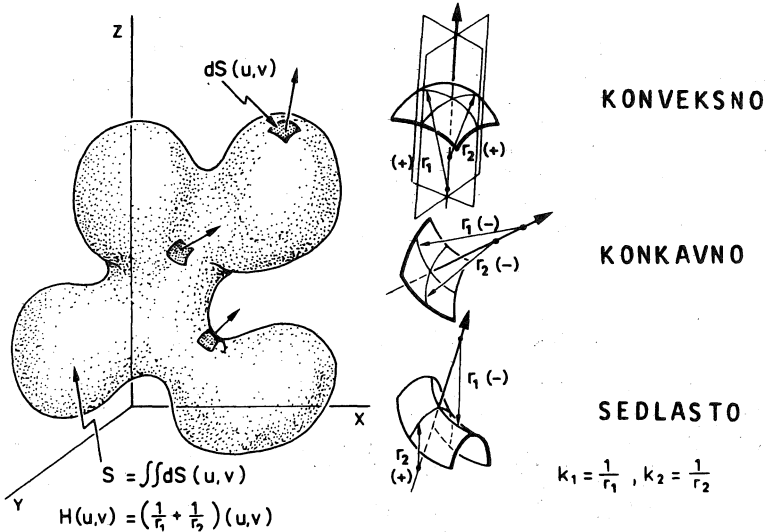
u kojoj znače r_1 i r_2 polumjere (radiuse) najvećeg i najmanjeg $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ kruga, koji prileže na plohu u određenoj točki; ako naime plohu u određenoj točki presječemo s dvije normalne, međusobno okomite ravnine, dobijemo kao trag dvije krivulje, kojima možemo ucrtati dva kruga. Taj koncept vrijedi za konveksne, konkavne i sedlaste plohe (sl. 3.30.).

Prosječnu zakrivljenost za jedinicu površine možemo odrediti na reprezentativnim presjecima kroz plohu tako, da odredimo neto tangentnu gustoću T_A po formuli

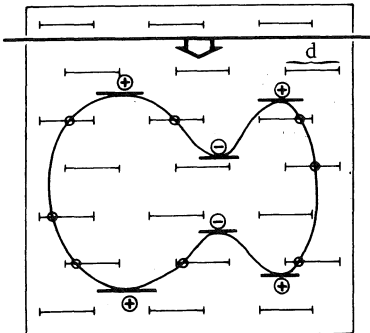
$$T_A = (T_{\oplus} - T_{\ominus}) / A_t, \quad (3.57)$$

u kojoj T_{\oplus} znači broj tangenta na konveksnom dijelu

traga (gledano iz unutrašnjosti proučavane faze), a T_e broj tangenta na konkavnom dijelu traga (sl. 3.31.).



Sl. 3.30. Srednja zakrivljenost u točki na konveksnoj (A), konkavnoj (B) i sedlastoj plohi (C). Cjelokupna ploha je razdijeljena na infinitezimalno male čestice dS , a srednja zakrivljenost je definirana kao suma dviju glavnih zakrivljenosti k_1 i k_2 u svakoj točki (Gil, Weibel 1972)



Sl. 3.31. Praktičan postupak određivanja neto tangentne gustoće T_A i intersekcijske gustoće (I_L) na istom testnom polju mnogonamjenskog testnog sistema. Pri brojenju tangenata na tragovima konveksnih dijelova T_+ i na tragovima konkavnih dijelova T_- zamišljamo da vodoravna testna linija klizi od gornjeg do donjeg ruba testnog polja. Zatim prebrojimo i sva presjecišta s fiksnim testnim linijama (Gil, Weibel 1972)

Prosječnu zakrivljenost ploha na jedinicu površine možemo izračunati po jednadžbi

$$K_S = \frac{\pi}{2} \cdot \frac{T_A}{I_L} \quad (3.58)$$

kod čega dimenzija dobivene vrijednosti ima eksponent -1 , [npr. $\text{cm}^{-2}/\text{cm}^{-1} = \text{cm}^{-1}$]. Vidimo, da je u nazivniku razlomka u jednadžbi (3.58) površinska gustoća, naime $S_V = 2 \cdot I_L$.

3.7.2. Druge mjere zakrivljenosti ploha

Budući da je prosječna zakrivljenost plohe na jedinicu površine (K_S) u stvari mjera specifične zakrivljenosti na $\frac{1}{S_V}$ jedinicu površine, možemo iz nje dobiti gustoću zakrivljenosti na jedinicu volumena ili relativnu zakrivljenost K_V tako da prvu vrijednost pomnožimo s površinskom gustoćom (S_V):

$$K_S \cdot S_V = K_V = \frac{\pi}{2} \cdot \frac{T_A}{I_L} \cdot 2I_L \quad (3.59)$$

ili kraće

$$K_V = \pi \cdot T_A \quad (3.60)$$

koja ima dimenziju s eksponentom -2 , [npr. $\text{cm}^0/\text{cm}^2 = \text{cm}^{-2}$]. Gustoća zakrivljenosti je neovisna od površine, njen referentni sistem je volumen.

Ako znamo apsolutni volumen organa V_o , možemo s njim pomnožiti relativnu K_V zakrivljenost i dobijemo apsolutnu zakrivljenost K

$$K_V \cdot V_o = K = \pi \cdot T_A \cdot V_o \quad (3.61)$$

koja ima dimenziju s eksponentom 1 , [npr. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{cm}^3 = \text{cm}^1$].

O svrsi istraživanja ovisi, koju ćemo mjeru zakrivljenosti uzeti u obzir, možda sve tri navedene (Vraspir-Porenta 1979).

Vježba

Orijentacijski odredi specifičnu gustoću zakrivljenosti (K_S), gustoću zakrivljenosti (K_V) i apsolutnu -- gustoću zakrivljenosti (K) -- površine sjemenskih kanalića u testisu 15 dana starog fetusa miša u pet testnih polja uz povećanje objektiva 60x!

Primjer:

$$T_{\oplus} = 14, T_{\ominus} = 2, I = 38$$

$$z = 0,026 \text{ mm}, V_o = 0,120 \text{ mm}^3$$

$$K_S = \underline{\underline{20,668 \text{ mm}^{-1}}}, K_V = \underline{\underline{1570,796 \text{ mm}^{-2}}},$$

$$K = \underline{\underline{188,495 \text{ mm}^1}}$$

3.8. Koherentni sistem stereoloških formula

Tablica 3.2. omogućava uspoređivanje formula u pojedinim stupcima, a na taj način i uvid u neke opće zakonitosti. Implicitne formule pokazuju težnju prema redukciji stereoloških mjerenja na brojenje točaka (pogodaka, presjecišta, probodišta, dodirnih točaka tangenti, čestica). Iz relativnih formula je vidljiv porast dimenzije referentnih prostora (testne točke, crte, polja). Sve indirektno formule sadrže produkte odgovarajućih gustoća i apsolutnog volumena tijela. Kod direktnih formula ispoljava se redukcija dimenzije prostora i u odgovarajućem smanjivanju vrijednosti koeficijenta C za korekciju skvrčavanja volumena tijela tijekom izrade preparata.

Navedene formule omogućavaju određivanje karakteristika unutarnje građe u trodimenzionalnom prostoru iz dvodimenzionalnih presjeka.

Tablica 3.2. Pregled glavnih stereoloških formula, raspoređenih u koherentni sistem

IMPLICITNO	EKSPLICITNO		
	RELATIVNO	ABSOLUTNO	
		INDIREKTNO	DIREKTNO
$V_V = A_A = L_L = P_P$ $S_V = (4/\pi) B_A = 2 \cdot I_L$ $L_V = 2 \cdot Q_A$ $K_S = (\pi/2)(T_A/I_L) \text{ (c)}$ $N_V = (K/\beta)(N_A^3/V_V)^{1/2} \text{ (d)}$	$V_{Vf} = P_f/P_t$ $S_{Vf} = 2 \cdot I_f/L_t$ $L_{Vf} = 2 \cdot Q_f/A_t$ $K_V = \pi \cdot T/A_t$ $N_V = (N/A_t)/(t_s + D - 2h) \text{ (e)}$	$V_{f,o} = V_{Vf} \cdot V_o$ $S_{f,o} = S_{Vf} \cdot V_o$ $L_{f,o} = L_{Vf} \cdot V_o$ $K_{f,o} = \pi (T/A_t) V_o$ $N_{f,o} = N_{Vf} \cdot V_o$	$V_{f,o} = P_f \cdot a \cdot t \cdot C^{3/3} \text{ (a)}$ $S_{f,o} = 2 \cdot I_f \cdot H \cdot t \cdot C^{2/3} \text{ (b)}$ $L_{f,o} = 2 \cdot Q_f \cdot t \cdot C^{1/3}$ <p style="text-align: center;">—</p> $N_{f,o} = N^3 (t/t_s) C^{0/3} \text{ (f)}$

(a) $C^{3/3} = C^1$

(b) za testni sistem iz paralelnih linija

(c) specifična gustoća zakrivljenosti (na jedinicu površine)

(d) za rezove zanemarljive debljine

(e) za debele rezove

(f) $C^{0/3} = C^0 = 1$, t debljina stupnja, t_s debljina nadreza

3.9. Astereologija

Morfolozi nailaze povremeno na objekte s neravnom površinom, npr. krvne stanice u razmazima (sl. 3. 32.) i druge stanice u brisevima, ili detalje u preparatima za elektronsku mikroskopiju napravljenim po metodi smrznutog lomljenja ili nagrizanja. Pokatkad nas zanima samo dvodimenzionalna slika ili projekcija nekog objekta, npr. rentgenogrami, scintigrami, fotografije kožnih eflorescencija itd. Predstavnik znanosti o materijalima zanimaju neravne lomne površine.

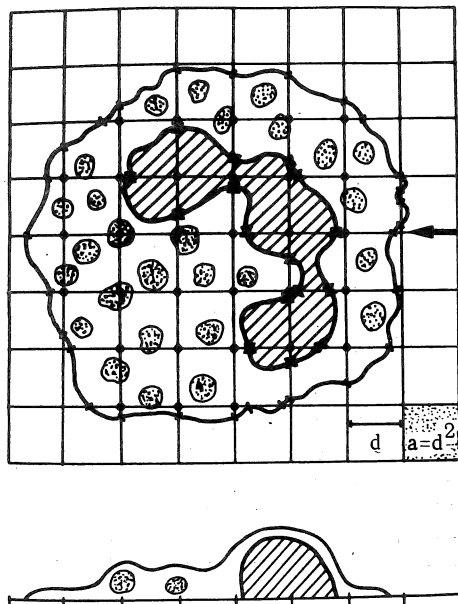
U takvim je slučajevima klasična stereološka analiza, koja predpostavlja ravnu plohu presjeka kroz tijelo, nemoguća. Samo je u nekim određenim slučajevima moguće iz neravnih površina zaključivati o kvantitativnim pokazateljima trodimenzionalnih struktura. Odreknemo li se interpretacije rezultata kvantitativne analize slike u trodimenzionalnom prostoru, možemo upotrijebiti standardne stereološke metode, koje nam daju korisne kvantitativne (ili u najmanju ruku semikvantitativne) podatke o slici ili projekciji promatranog objekta. Budući da nam u tom slučaju nedostaje bitna karakteristika stereološkog proučavanja, tj. trodimenzionalna interpretacija, predložili smo kao naziv ovih metoda izraz "astereologija" (Kališnik 1977, Kališnik i sur. 1980 a,b).

Astereologija je našla već put i u kliničke discipline, npr. kardiologiju (Robida i sur. 1981).

Astereološki prostor je u usporedbi sa stereološkim prostorom reduciran najviše na dvije dimenzije (tablica 3.3.). Da bi to naglasili govorimo o arealnoj, obrisnoj i arealnoj numeričkoj gustoći.

Astereološke formule se također prilagođavaju toj redukciji prostora (tablica 3.4.). Kod toga se u nekim slučajevima ne radi o jednostavnoj redukciji; Buffonovo se načelo naime drugačije izražava pri određivanju površinske gustoće, nego kod određivanja obrisne gustoće. Kod direktnog određivanja apsolutnih karakteristika treba također uzeti u obzir odnos između izabranog testnog sistema i gustoće vjerojat-

nosti intersekcija, što ima za posljedicu upotrebu različitih formula.



Sl. 3.32. Shema eozinofilnog leukocita u krvnom razmazu u projekciji na testnu ravninu s običnim mrežastim sistemom (gore) i u profilu (dolje) (Kališnik 1977 a)

Tablica 3.3. Odnos između karakteristika sastavnih dijelova, referentnih prostora i tragova s odgovarajućim simbolima (lijevo ispod imena) te eksponentima koji određuju dimenzije (desno u zagradi) za astereologiju

		REFERENTNI PROSTOR		
		AREAL	LINIJA	TOČKA
		A (2)	L (1)	P (0)
KARAKTERISTIKE SASTAVNIH DIJELOVA	PLOHA	AREALNA	INTERCEPTNA	TOČKA
	A (2)	A_A (0)	L_L (0)	P_P (0)
	LINIJA	OBRISNA	INTERSEKCIJSKA	
B (1)	B_A (-1)	I_L (-1)		
BROJ	NUMERIČKA AREALNA			
N (0)	N_A (-2)			
				GUSTOĆE TRAGOVA

Tablica 3.4. Pregled glavnih astereoloških formula raspoređenih u koherentni sistem

IMPLICITNO		EKSPLICITNO	
RELATIVNO		ABSOLUTNO	
		INDIREKTNO	DIREKTNO
$A_A = L_L = P_P$	$A_{Af} = P_f/P_t$	$A_{f,o} = A_{Af} \cdot A_o$	$A_{f,o} = P_f \cdot a$
$B_A = (\pi/2) I_L$ (a)	$B_{Af} = (\pi/2) (I_f/L_t)$	$B_{f,o} = B_{Af} \cdot A_o$	$B_{f,o} = (\pi/2) I_f \cdot H$ (b)
N_A	$N_{Af} = N_f/A_t$	$N_{f,o} = N_{Af} \cdot A_o$	$N_{f,o}$

(a) formula (3.9)

(b) vrijedi samo za testni sistem s usporednim dužinama; za obični mrežni sistem vrijedi $B_{f,o} = (\pi/4) I_f \cdot H$, za mnogonamjenski $B_{f,o} = \pi \cdot I_f \cdot H$, gdje važi $H = d \sqrt{3}/2$.

Vježba

Baždari obični mrežasti sistem A 100 na foliji i s njim odredi površinu apsolutnog areala A_f i duljinu obrisa B_f scintigrama štitne žlijezde $-f$ čovjeka! S $-f$ oblikovnim faktorom B/A odredi specifičnu gustoću obrisa (konture) kao mjerila rasčlanjenosti obrisa!

Primjer:

$$P_f = 31, I_f = 30$$

$$a = 2,89 \text{ cm}^2, H = 1,7 \text{ cm}$$

$$A_f = \underline{\underline{89,59 \text{ cm}^2}}, B_f = \underline{\underline{40,05 \text{ cm}}}, B/A = \underline{\underline{0,45 \text{ cm}^{-1}}}$$

4. UPUTE ZA STEREOLOŠKO ISTRAŽIVANJE

Do sada smo upoznali osnovne stereološke metode. Kod toga smo ostavili po strani važne vidove planiranja, koji se odnose na kvalitativnu klasifikaciju objekata, metode uzimanja uzorka, izbor odgovarajućih stereoloških testova i statističku analizu. To ćemo obraditi u slijedećem poglavlju. Zatim slijede poglavlja o stereološkoj opremi te o opasnosti pogrešaka u stereološkom istraživanju.

4.1. Planiranje stereološkog istraživanja

Prije svakog stereološkog istraživanja moramo najprije odgovoriti na pitanje, je li u tom slučaju stereološko istraživanje svrsishodno ili ne. Nadalje je potrebno znati, što očekujemo od stereološke analize, te koju cijenu smo pripravi za to platiti. Kod toga je gotovo najznačajnije vrijeme, koje na taj rad utrošimo. Cilj istraživanja ili bolje radna hipoteza, koju želimo provjeriti treba biti precizno formulirana.

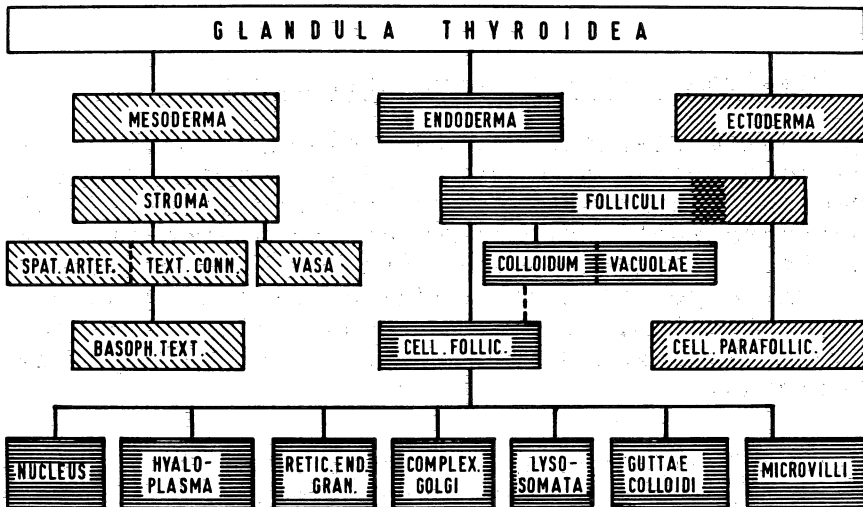
U ovom poglavlju prikazat ćemo pojedine faze planiranja stereološkog istraživanja: kvalitativnu analizu i klasifikaciju objekata, metode uzimanja uzorka, određivanje veličine uzorka i napokon planiranje uzimanja uzorka (Kališnik 1978); izbor stereoloških testova obzirom na njihove mjerne karakteristike, a naročito na njihovu ekonomičnost i konačno planiranje odgovarajućih statističkih metoda.

4.1.1. Kvalitativna analiza i klasifikacija objekata

Nužno je potrebno, da istraživač prije bilo koje stereološke analize potpuno poznaje objekt svog istraživanja, kao i sve njegove sastavne dijelove. U većini slučajeva će za to biti dovoljno prije

početka stereoloških mjerenja pomno pregledati i proučiti sve raspoložive rezove. Katkad će biti potrebno izraditi nešto novih preparata s posebnim tehnikama na rezervnim rezovima ili ćemo morati u potpuno novom, usmjerenom pokusu paziti na dotada nerazjašnjene pojedinosti.

Preporuča se izraditi hijerarhijski model sastavnih dijelova (npr. tkiva, stanica, subcelularnih elemenata, sl. 4.1.). Takav model nam omogućava popisivanje svih vidljivih sastavnih dijelova našeg



Sl. 4.1. Hijerarhijski model štitne žlijezde, koji uvažava ontogenetske i histološke aspekte (modificirano po Kališniku 1981)

objekta, koje **primijećujemo** u njihovoj međusobnoj nadređenosti, usporednosti ili podređenosti, izbor za naše istraživanje zanimljivih sastavnih dijelova te odrediti za njih odgovarajuće referentne prostore.

Daljnji korak u planiranju stereološkog istraživanja je definiranje našeg objekta u odgovarajući stereološki model. O tom definiranju ovisit će ne samo izbor odgovarajuće metode uzimanja uzorka, nego **da- paće** izbor odgovarajućih stereoloških testova.

Prema prvom kriteriju razlikujemo neomeđene i omeđene objekte. Ukoliko je objekt, kojeg želimo proučiti prevelik, da bismo ga u cijelosti obuhvatili i analizirali pod izabranim povećanjem, ograničit ćemo se na nekoliko uzoraka koje ćemo uzeti iz njega, govorimo o neomeđenom objektu. Primjer za to je npr. komadić čovječje jetre, koju gledamo u elektronskom mikroskopu. Sličnu unutarnju građu (strukturu) očekujemo izvan i unutar granice naših uzoraka. Ukoliko je objekt tako malen da ga možemo u cijelosti izrezati u potpunu ili stupnjevitu seriju rezova, kažemo da je omeđen. Primjer za takav objekt je npr. štitna žlijezda miša u svjetlosnom mikroskopu. U našim preparatima također postupamo s prirodnom površinom objekta, što moramo uzeti u obzir pri analizi i interpretaciji rezultata.

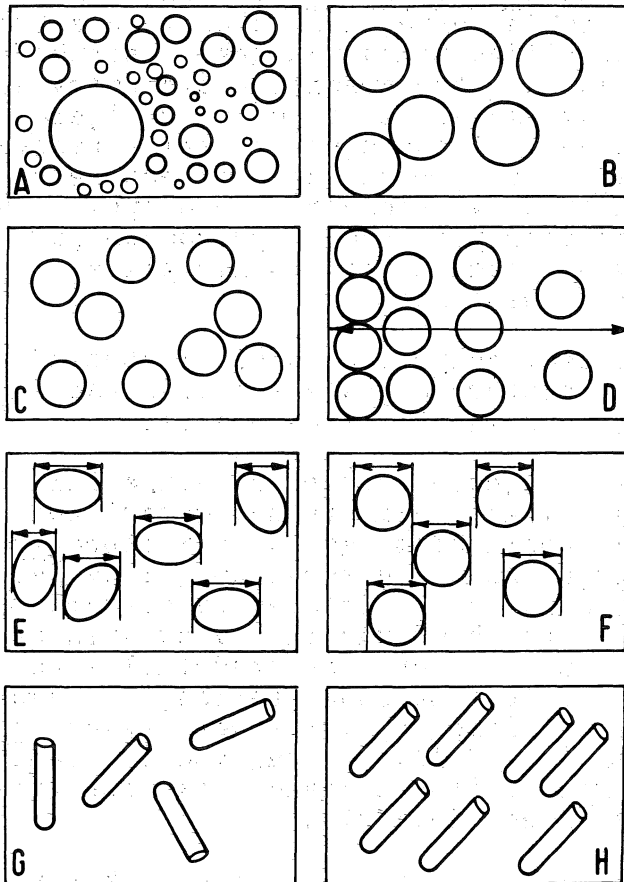
Objekte možemo, obzirom na način i stupanj uređenosti njihove unutarnje građe klasificirati u razne, dijelom hijerarhijski ovisne modele.

Ukoliko se u objektu isprepliću dvije ili više faza, od kojih je svaka kontinuirana, govori Weibel (1974) o modelu A; mogli bismo ga nazvati isprepleteni model. Primjer za to je muralium (zidovlje) jetrenog parenhima, koji je isprepleten sa sistemom jetrenih sinusoida i drugih cjevastih i vlaknatih struktura. Ukoliko jednu povezanu fazu predstavlja kontinuirani matriks, a drugu diskretne čestice, to odgovara modelu B, kojeg bismo mogli također nazvati korpuskularni model (sl. 3.14.). U taj model možemo uvrstiti normalnu zrelu štitnu žlijezdu, ako apstrahiramo komunikacije između folikula.

Svi slijedeći modeli vrijede samo za korpuskularnu građu objekata. Definiramo ih obzirom na veličinu, oblik i raspoređenost čestica (sl. 4.2.).

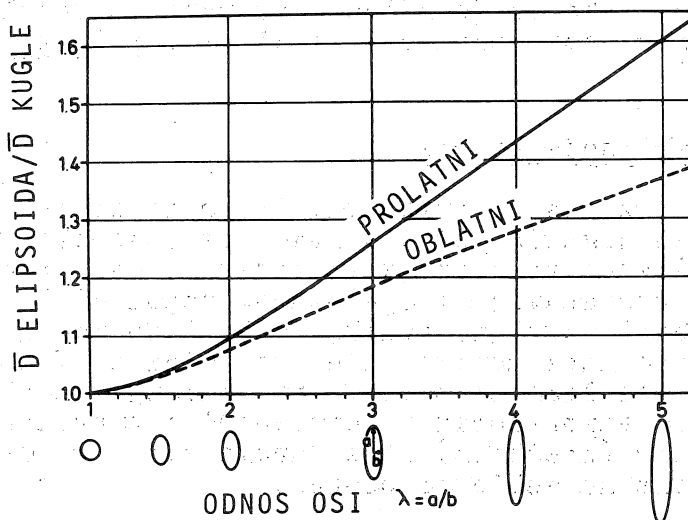
Čestice mogu biti nejednako velike, što iziskuje određivanje njihove raspodjele po veličini. Mogu biti jednako velike, u biologiji je to izuzetno rijedak primjer, a znatno olakšava neke stereološke analize, kao npr. određivanje broja čestica. Primjer za različito velike čestice su opet folikuli štitne žlijezde. Primjer za jednako velike čestice teško bismo našli u biologiji. U koliko je koeficijent varijacije ($KV = s/\bar{x}$) manji od 20%, smijemo varijabilnost

veličine čestica u nekim stereološkim istraživanjima zanemariti (npr. pri određivanju numeričke gustoće staničnih jezgara u nekim tkivima po Weibelu i Gomezu).



Sl. 4.2. Pregled nekih stereoloških modela obzirom na pravilnost i uređenost unutarnje građe: A nejednako i B jednako velike čestice; C nehomogeno raspoređene čestice i D struktura s koncentracijskim gradijentom čestica; E anizodiametrijske i F izodiametrijske čestice; G izotropno i H anizotropno tijelo (Kališnik 1978)

Oblik čestice može biti vrlo različit, ipak se srećom u mnogim slučajevima oblik čestice može u proučavanom tijelu usporediti s određenim geometrijskim tijelom. U histologiji su to često kugle ili rotacijski elipsoidi; ako predočimo da su rotacijski elipsoidi nastali vrtnjom elipse oko kraće osi, govorimo o oblatnim (lećastim) elipsoidima; ukoliko su nastali vrtnjom oko dulje osi nazivamo ih proladni (jajasti) sferoidi. Triakksialni elipsoidi imaju sve tri osi različite. Proladni elipsoid možemo predstaviti kao rastegnutu kuglu, a oblatni elipsoid kao spljoštenu kuglu. Pošto je prosječni promjer rotacijskih elipsoida s omjerom osi 1.5 : 1 samo za 3% veći od promjera kugle odgovarajućeg volumena, pri omjeru osi 2 : 1 kod oblatnih za 8%, a kod proladnih za 10% veći, smijemo kod stereoloških analiza s takvim elipsoidima postupati kao s kuglama, a nazivamo ih "sferoidi". Kod većih omjera osi elipsoida pogreška bi se povećala (sl. 4.3.).



Sl. 4.3. Omjer prosječnih tangentialnih promjera elipsoida raznih osnih omjera i promjera kugla jednakog volumena (Weibel 1979)

Kod većine poliedara nacrtanih na slici 3.16. prosječni promjer je samo za 8% veći od promjera kugle

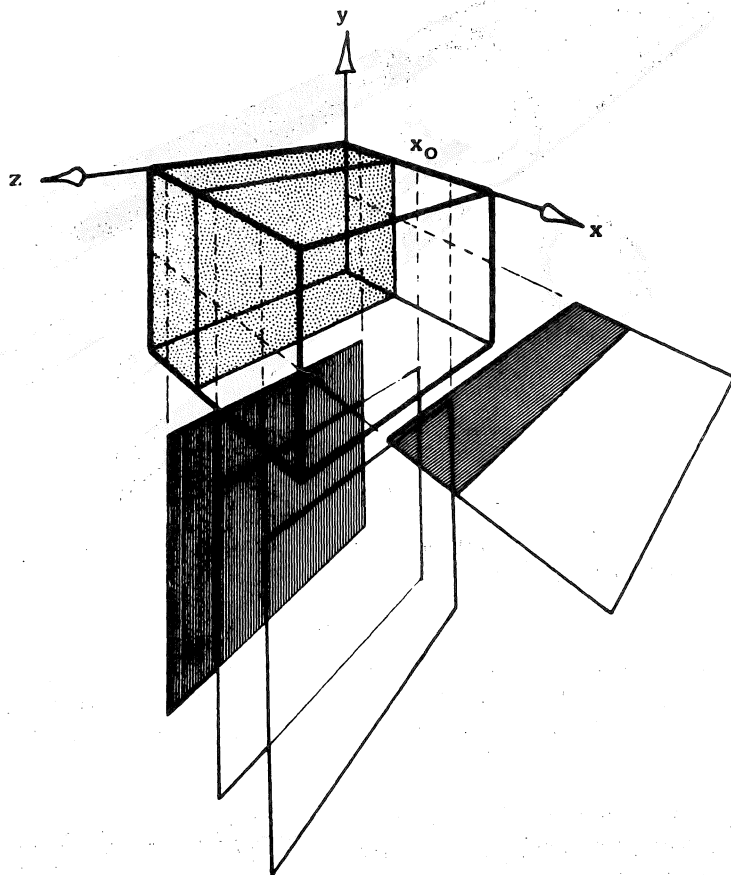
jednakog volumena; izuzeci su samo kocka s 21% i oktaedar s 22%. Čestice su katkad slične valjcima ili šupljim valjcima. Prosječni promjer valjka jednake dužine i promjera je za 12% veći od promjera kugle jednakog volumena.

Čestice u tijelima mogu biti raspoređene nehomogeno ili homogeno u pravilnoj prostornoj mreži ili pokazuju koncentracijske gradijente. Ti gradijenti mogu biti jednodimenzionalni (linearni, sl. 4.4., npr. žlijezde u koži) ili su dvodimenzionalni (planarni, sl. 4.5., npr. žlijezde u sluznici probavne cijevi) ili trodimenzionalni (npr. glomeruli u bubregu).

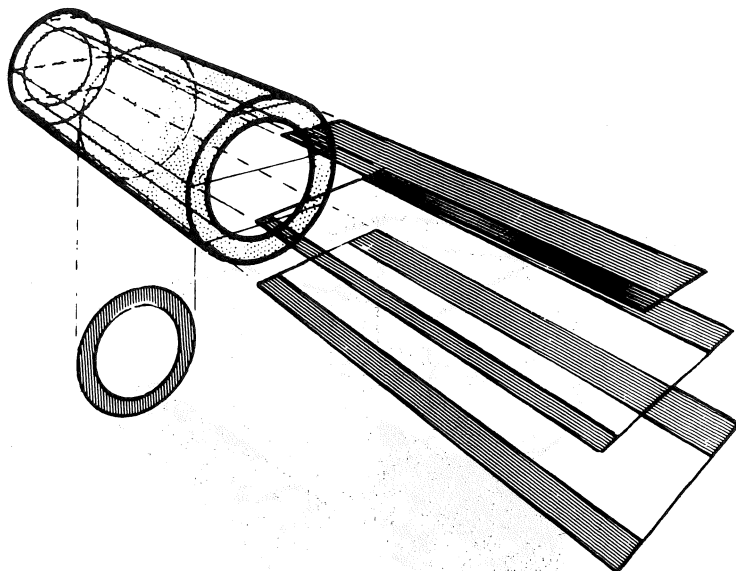
Čestice mogu biti izodiametrijske (npr. kugle) ili anizodiametrijske (npr. elipsoidi). Ukoliko anizodiametrijske čestice nisu pravilno, organizirano raspoređene u prostoru govorimo (oslanjajući se na polarizacijsko optičku nomenklaturu, ali s drugim značenjem!) o izotropnim tijelima. Ukoliko su anizodiametrijske čestice pravilno, organizirano raspoređene tako da je njihova uzdužna os paralelna s nekom prevladavajućom osi, radi se o anizotropiji (sl. 4.6.).

4.1.2. Odabiranje uzorka

Odabiranje uzorka je postupak, kojim iz čitave populacije svih mogućih polja uzimamo za stereološku analizu određen broj polja (=uzorak), koja trebaju što bolje predstavljati cjelokupnu populaciju. Uzorak mora biti dovoljno velik, da bi informacije dobivene analizom uzorka bile što točnije. U nastavku upoznat ćemo se s metodama uzimanja uzorka na nepravilno raspoređenim (neuređenim) i pravilno raspoređenim (uređenim) strukturama kao i s određivanjem potrebne veličine uzorka.



Sl. 4.4. Tijelo s jednodimenzijskim strukturnim gradijentom (DeHoff 1967)



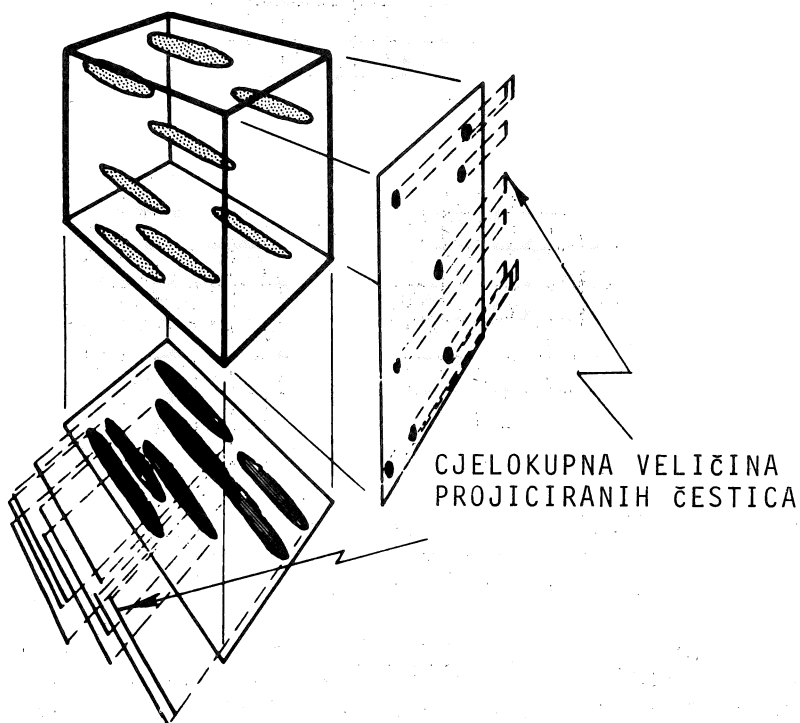
Sl. 4.5. Tijelo s planarnim strukturnim gradijentom
(DeHoff 1967)

4.1.2.1. Uzimanje uzorka na
nepravilno raspoređe-
nim (izotropnim) struk-
turama

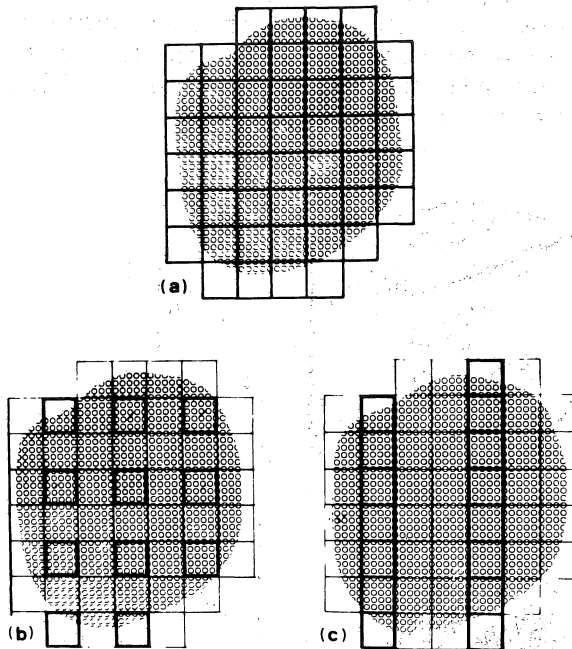
Uzimanje uzorka može biti jednostavno slučajno. Kod toga odaberemo polja u uzorku bilo tako da određujemo koordinate upotrebom slučajnih brojeva, bilo da npr. u elektronskomikroskopskom rezu raspršimo čestice lateksa, koje nam označe nasumce odabrana polja.

Uzimanje uzorka može biti sistematsko (sl. 4.7.). Empirijski je dokazano da se relativna standardna pogreška kod te metode uzimanja uzorka s povećavanjem uzorka smanjuje brže, nego pri jednostavnom slučajnom uzimanju uzorka. Sistematsko uzimanje uzorka može biti potpuno, kada testnim poljima pokrijemo cijeli rez (prikladno za male omeđene objekte). Može biti i intermitentno, kod čega odabiremo polja u određenim pravilnim razmacima, a može biti i pojasasto (zonalno), kada izabrana polja slijede u neprekinutim pojasima (zonama), koji leže među-

sobno paralelno, udaljene pravilnim razmacima. Kod intermitentnog, a naročito kod pojasastog (zonalnog) uzimanja uzorka moramo paziti, da se interval ne podudara s eventualnom unutarnjom periodičnošću struktura proučavanog objekta.

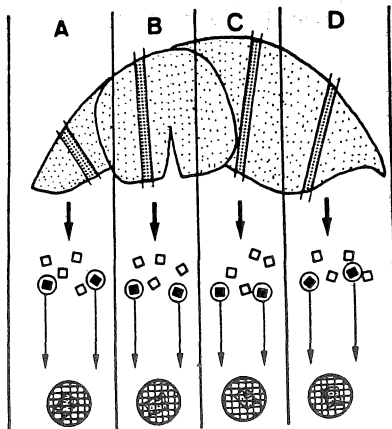


Sl. 4.6. Anizotropno tijelo zbog prevladavajuće uređenosti anizodiametrijskih čestica (DeHoff 1967)



Sl. 4.7. Načini sistematskog uzimanja uzorka polja u rezu: potpuno (a), intermitentno (b) i pojasasto (zonalno) (c) (Weibel 1969)

Uzimanje uzorka je stratificirano ukoliko objekt najprije razdijelimo na slojeve (stratume), a nakon toga kao uzorak izaberemo manje jedinice tih slojeva; to se može ponoviti na više razina. Kao primjer pogledaj sliku 4.8.!



Sl. 4.8. Stratificirano uzimanje uzorka na jetri štakora; odvojene uzorke izabiremo nasumce iz regija (stratuma) A, B, C i D (Weibel 1969)

Izbor odgovarajućeg povećanja ubraja se također u postupke uzimanja uzorka. Povećanje mora biti toliko da proučavanu strukturu možemo nedvojbeno identificirati. Ipak treba biti svijestan da se slika i kvantitativne karakteristike nekog objekta kod različitih povećanja u pravilu mijenjaju. Kod kompleksnih istraživanja uzorak se uzima često stupnjevito tj. kod različitih povećanja, od makroskopske preko svjetlosnomikroskopske do elektronskomikroskopske razine, a kod dvije potonje obično kod različitih povećanja.

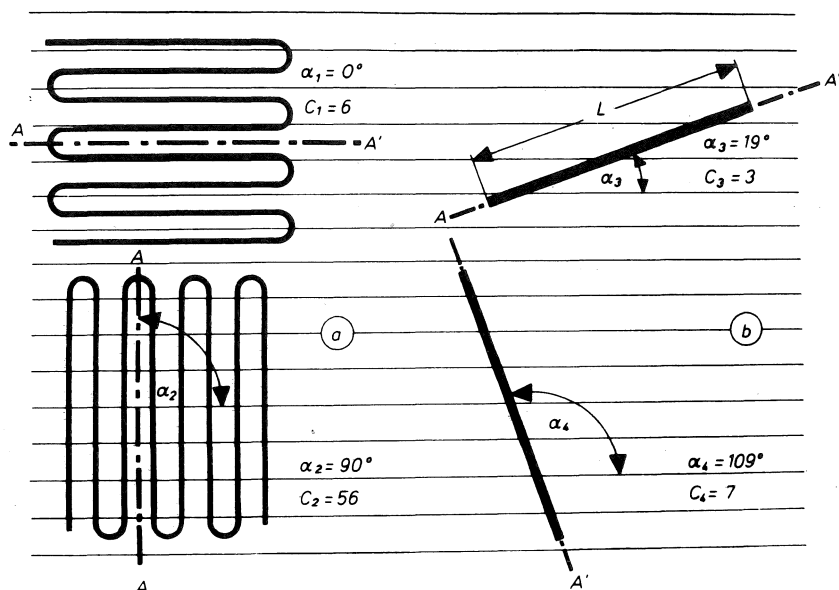
Među postupke uzimanja uzorka spada konačno izbor odgovarajućeg testnog sistema. U pravilu testni sistem izabiremo tako, da je prosječna površina profila tipične čestice malo manja ili najviše jednako velika kao d_c^2 testnog sistema. S druge strane, preporuča se da profil tipične čestice bude pogođen s testnom linijom jedanput ili najviše dvaput.

4.1.2.2. U z i m a n j e u z o r k a n a p r a v i l n o r a s p o r e đ e n i m s t r u k t u r a m a

Ukoliko su objekti heterogene strukture, bilo zbog strukturnih gradijenata bilo zbog anizotropije, moramo primijeniti posebne metode uzimanja uzoraka.

Radi li se o jedno- ili dvodimenzionalnom struktur-
nom gradijentu režemo objekt tako, da os ili ravninu gradijenta uključimo u reznju plohu (sl. 4.4. i 4.5.). Kod trodimenzionalnog gradijenta preporučamo da reznja ploha prolazi kroz središte gradijenta. Na taj način ćemo najbrže dobiti reprezentativan uzorak.

Kod anizotropije imamo na raspolaganju više metoda uzimanja uzorka pomoću kojih razbijemo anizotropiju u ravnini. Preporuča se upotreba Merzovog polukružnog testnog sistema (sistema L). Sitte (1967) navodi da će se statistička pogreška nastala zbog uzimanja uzorka smanjiti na minimum, ako brojimo intersekcije anizotropne površine s testnim linijama, koje s prevladavajućim smjerom strukture čine kut od 19° i 109° (sl. 4.9.); potonje vrijedi samo za potpuno anizotropne strukture npr. za mišićna vlakna i miofibrile. Kod struktura, koje su samo djelomično anizotropne,

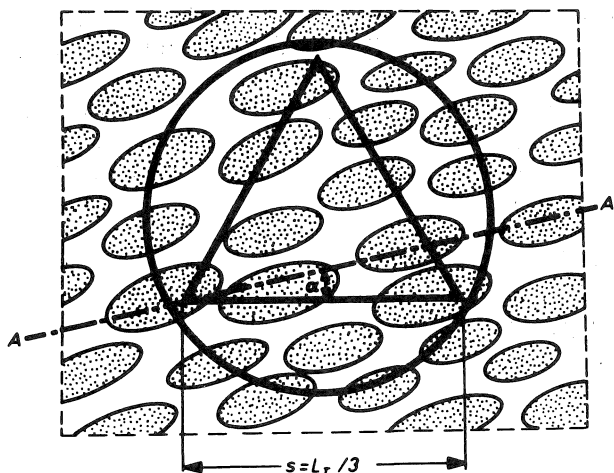


Sl. 4.9. Broj intersekcija između obrisa (kontura) površine na testnoj ravni ovisan je o kutu između prevladavajućeg smjera i smjera testnih linija. Upotrebive rezultate kod takvih slučajeva anizotropije dobijemo, ukoliko kut između prevladavajućeg smjera i testnih linija iznosi 19° odnosno 109° , a uzimamo u obzir aritmetičku sredinu intersekcija (Sitte 1967)

više se preporuča nasumce polagati testni sistem. U oba primjera posebno brojimo intersekcije s okomitim testnim linijama i posebno intersekcije s vodoravnim testnim linijama. Za daljnju stereološku analizu upotrebljavamo prosjek tako dobivenih intersekcija.

$$B_A = (\pi / 2) / ((I_{L1} + I_{L2}) / 2) \quad (4.1)$$

Navodno je još pogodnije, ako prebrojimo intersekcije s trokutastim sistemom, kod čega bi kutovi između prevladavajućeg smjera i stranica istostraničnog testnog trokuta iznosili 12° , 72° odnosno 132° (sl. 4.10.) ili sa sistemom usporednih testnih linija kojeg nekoliko puta (n -puta) zavrtno. Prosječna srednja vrijednost trebala bi dati upotrebljive podatke.



Sl. 4.10. Kod uzimanja uzorka na anizotropnim strukturama upotrebive podatke ćemo dobiti još brže, nego po metodi u slici 4.9., ako upotrijebimo trokutni testni sistem pri čemu treba kut između prevladavajućeg smjera i jedne od stranica trokuta iznositi 120° (Sitte 1967)

Volumenska (V_V) i numerička gustoća (N_V) neovisne su od moguće anizotropije, ali anizotropiju treba uvažavati kod površinske (S_V) i duljinske gustoće (L_V). U tim slučajevima treba formule sa S_V i L_V , koje vrijede za izotropne objekte, prilagoditi anizotropiji. Da bismo dobili informaciju o stupnju anizotropije i na temelju toga pouzdane rezultate za S_V i L_V , moramo anizotropni objekt rezati s dvije ili tri međusobno okomite ravnine. Što je kvocijent tako dobivenih rezultata veći, to je i stupanj anizotropije veći. Ocjenjivanje djelomično anizotropnih struktura iziskuje mnogo truda, zahtjeva ocjenjivanje čitavog objekta u dvije ili tri ravnine. Kako bismo postigli što veću ekonomičnost stereološke analize, preporučamo, da na temelju rezultata dobivenih na nekoliko poprečnih i uzdužnih rezova, odredimo stupanj anizotropije na temelju tog faktora, koji rezultate dobivene u ravnini (B_A ili Q_A) povezuje s traženom stereološkom varijablom (S_V ili L_V). Nakon što znamo faktor, možemo sve ostale stereološke analize izvesti samo na jednoj ravnini presjeka. Podrobnije upute korisnik može dobiti

iz literature (Underwood 1970, Weibel, 1979, Eržen 1982, Mathieu i sur. 1983, Eržen, Kališnik 1984).

Ograničimo se samo na ocjenjivanje potpuno anizotropnih struktura npr. skeletnih mišićnih vlakana. Veza među obrisnom gustoćom (B_A) i površinskom gustoćom (S_V) je slijedeća:

$$S_V = B_A \quad (4.2)$$

vrijedi za poprečne presjeke,

$$S_V = \sqrt{2} \cdot B_A \quad (4.3)$$

vrijedi za uzdužne presjeke.

Ocjenjivanje duljinske gustoće potpuno anizotropne strukture je svrsishodno samo na poprečnom presjeku, u tom slučaju vrijedi

$$L_V = Q_A \quad (4.4)$$

Za uzimanje uzoraka periodičnih struktura (npr. sarkoplazmatskog retikuluma u mišićnom vlaknu) Weibel (1972) preporuča analiziranje kosih presjeka, jer je time zajamčena veća vjerojatnost, da će u rezu biti zastupljene sve odgovarajuće strukture.

4.1.2.3. O d r e đ i v a n j e v e l i č i n e u z o r k a

Veličina uzorka, tj. broj polja, koji trebamo analizirati u nekom stereološkom istraživanju ovisi s jedne strane o stupnju nehomogenosti proučavanog objekta, a s druge strane o željenoj ili potrebnoj točnosti ocjene. U praksi postupamo ovako.

Najprije stereološki analiziramo orijentacijski uzorak tj. manji broj (5 - 10) što različitijih polja, pa izračunamo tražene stereološke varijable za svako od tih polja. Zatim za svaku varijablu izračunamo aritmetičku sredinu (\bar{x}), standardnu devijaciju (\bar{s}) i standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SE) za taj orijentacijski uzorak, u kojem je broj polja n . Kod toga upotrijebimo poznate statističke

formule, npr. za aritmetičku sredinu (prosjeak) orijentacijskog uzorka \bar{x}

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) / n, \quad (4.5)$$

gdje x_i znači individualne vrijednosti određene i -varijable u različitim poljima orijentacijskog uzorka.

Standardnu devijaciju iz orijentacijskog uzorka (s) izračunamo tako:

$$s = \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1) \right]^{1/2}. \quad (4.6)$$

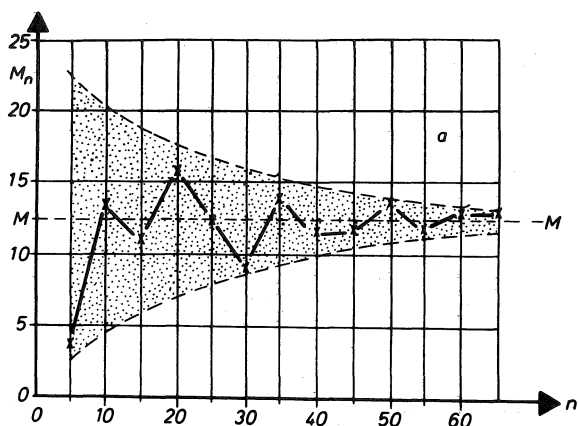
Iz standardne devijacije izračunamo standardnu pogrešku prosjeka (aritmetičke sredine) orijentacijskog uzorka (SE):

$$SE = s / (n)^{1/2}. \quad (4.7)$$

Relativna standardna pogreška orijentacijskog uzorka (RSE) je zatim određena s

$$RSE = SE / \bar{x}. \quad (4.8)$$

Ukoliko bismo uzeli drugi uzorak veličine n , dobili bi drugu aritmetičku sredinu. Prosjeci svih orijentacijskih dovoljno velikih uzoraka biti će normalno raspršeni oko nekog zajedničkog prosjeka, koji u stvari jest aritmetička sredina populacije (M), uostalom sa standardnom devijacijom koja bi bila jednaka standardnoj pogreški aritmetičke sredine uzorka sa zajedničkim n . Ukoliko veličinu cjelokupnog uzorka povećamo preko svih granica možemo aritmetičku sredinu populacije odrediti s bilo kojom željenom točnošću (sl. 4.11.); točnost određivanja bi se povećala s drugim korijenom iz n .



Sl. 4.11. Stalno pratimo kako se prosjek uzorka približuje aritmetičkoj sredini populacije \bar{M} u skladu s povećanjem veličine (numerausa n) uzorka (Sitte 1967)

Budući da su aritmetičke sredine uzoraka normalno raspoređene oko aritmetičke sredine populacije, leži 95% aritmetičkih sredina uzoraka u granicama $M \pm 2SE$. Taj interval nazivamo 95% konfidentni interval ili 95% interval povjerenja, a gornju ili donju granicu tog intervala označujemo kao 95% granicom povjerenja.

Zadovoljimo li se s 95% intervalom povjerenja znači, da postoji 2,5% vjerojatnosti da će stvarna vrijednost populacijskog prosjeka biti veća od gornje granice povjerenja i 2,5% vjerojatnost da će biti manja od donje granice povjerenja.

U planiranju stereoloških istraživanja obično postotak prosjeka postavimo kao relativnu razinu točnosti; to je korisno, jer u početku još ne poznajemo stvaran prosjek. Odlučimo li se za najviše dopušteno odstupanje od prosjeka $\pm y\%$ možemo ga matematički izraziti ovako:

$$2RSE = \frac{2 \cdot s}{\bar{x} \cdot n^{1/2}} = \frac{y}{100} \quad , \quad (4.9)$$

iz čega možemo dobiti traženi numerus (veličinu uzorka) n:

$$n = \left(\frac{200}{y} \cdot \frac{s}{\bar{x}} \right)^2 \quad . \quad (4.10)$$

Odlučimo li se sada npr. da uz 95% interval povjerenja dopuštamo 10% odstupanja naše ocjene od stvarne vrijednosti prosjeka populacije, dakle $y=10$, dobijemo tako formulu:

$$"n" = \left(20 \frac{s}{\bar{x}} \right)^2 \quad . \quad (4.11)$$

To znači određeni uzorak mora obuhvatiti "n" polja kako bismo dobili ocjenu aritmetičke sredine tražene stereološke varijable, koja bi kod 100 ponovljenih promatranja u 95 primjera uključila stvarni prosjek populacije u intervalu $\bar{x} \pm 2SE$ te očekujemo da će samo u 5 primjera stvarna vrijednost tražene varijable ležati izvan tih granica.

U praksi se obično pokaže da za različite stereološke varijable uz jednaku željenu točnost ocjene trebamo različiti broj polja "n". Obzirom na važnost pojedinih stereoloških varijabli za naše istraživanje moramo u svjetlu podataka orijentacijskog uzorka ponovno preispitati naše ambicije u pogledu točnosti ocjene te ih u većini slučajeva kompromisno prilagoditi našim objektivnim mogućnostima i potrebama istraživanja.

Nakon što smo tako odredili prihvatljivu veličinu definitivnog uzorka "n", provedemo uzimanje uzorka prema najboljem odgovarajućem, unaprijed određenom planu.

4.1.3. Izbor stereoloških testova

Kod planiranja stereološkog istraživanja preporučljivo je upotrijebiti stereološke testove za koje

znamo mjerne karakteristike, prije svega njihovu valjanost, točnost i ekonomičnost (Kališnik, Pajer 1981).

Valjanost (validnost) testa nam govori što s njim mjerimo. Neposredna (direktna) valjanost različitih testova obično je očita ali posrednu (indirektnu) valjanost moramo međutim tek otkriti. U proučavanju histofizioloških korelacija na štitnoj žlijezdi štorkora pokazalo se, da je među različitim stereološkim varijablama volumenska gustoća epitela u najvišoj korelaciji s razinom TSH u krvi (Kosin i sur. 1978). Ta funkcionalna validnost u tom slučaju nam govori, kojem stereološkom testu moramo kod planiranja posvetiti najviše pozornosti, ako nas zanima ocjena djelovanja osi hipofiza-štitna žlijezda.

Točnost (preciznost, moć razdvajanja, diskriminativnost) testa - informira nas koliko male razlike proučavane varijable možemo još s testom razlučiti kod određenog povećanja, vodeći računa o određenoj veličini uzorka i određenom intervalu povjerenja. Mjerilo točnosti je inverzna vrijednost relativne standardne pogreške (RSE). U prijašnjem poglavlju upoznali smo se s preporukom da uzorak bude tako velik da relativna standardna pogreška ne bude veća od 5%. Za različite testove i različite materijale potrebno je različito dugo vrijeme za postizanje takve točnosti. S druge strane možemo točnost određenog testa na određenom materijalu teorijski proizvoljno povećavati, ukoliko povećavamo uzorak. Budući da je veličina uzorka direktno ovisna o vremenu T , utrošenom na mjerenje, a točnost testa raste s drugim korjenom veličine uzorka n , možemo indeks ekonomičnosti testa (IE) definirati kao kvocijent mjerila točnosti testa (\bar{l}/RSE) i drugog korijena vremena T utrošenog na određeno mjerenje,

$$IE = 1/(RSE \cdot T^{1/2}) \quad (4.12)$$

Indeks ekonomičnosti nas s jedne strane uči kolika je točnost pojedinog testa kod određene upotrebe vremena, s druge strane omogućava nam da test s nižim indeksom ekonomičnosti eventualno zamijenimo

drugim, koji ima viši indeks ekonomičnosti ukoliko oba imaju jednaku ili sličnu indirektnu validnost; s treće strane možemo planirati vrijeme, koje će biti potrebno za izvođenje određenog istraživanja.

4.1.4. Statistička obrada

U nacrt stereološkog istraživanja spada također shema za organiziranje rezultata i tome odgovarajući izbor statističkih metoda.

Kod eksperimentalnih istraživanja potrebno je u pravilu uzimanje uzorka provesti na više razina. Radi li se o pokusima na životinjama, treba imati na umu da će u početku pokusa u pojedinoj skupini biti dovoljne samo 2 životinje, za koje možemo izračunati prosjek, standardnu devijaciju i standardnu pogrešku. Ako će razlika između pokusne i kontrolne skupine biti dovoljno velika uz razmjerno malo raspršivanja rezultata, možemo nul-hipotezu odbaciti primijenivši Studentov test t:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{(SE_1^2 + SE_2^2)^{1/2}} \quad (4.13)$$

Izračunatu vrijednost t usporedimo s tabeliranom kod određenog stupnja slobode ($m = n_1 + n_2 - 2$). Ukoliko je izračunata vrijednost viša od tabelirane, možemo nul-hipotezu odbaciti uz označenu razinu rizika P i zapišemo da je razlika signifikantna na razini rizika, npr. $P < 0,01$, $0,001$ ili manje. U biologiji dopuštamo još riziko $P < 0,05$. Ukoliko razlika između pokusne i kontrolne skupine ne bi bila signifikantna, možemo odrediti potrebnu veličinu uzorka tj. broja životinja te pokus ponoviti na dovoljno velikom broju životinja.

Slijedeća značajna razina, do koje udružujemo rezultate stereoloških mjerenja svih intermedijarnih razina (organ, blok, rez, polje), je pojedina

životinja. Kod tog udruživanja treba paziti na potrebno ponderiranje intermedijarnih rezultata. Intermedijarni rezultati moraju kod zbrajanja imati takvu težinu, koja odgovara njihovom udjelu na odgovarajućoj razini odnosno u cijelom organizmu.

Od drugih statističkih metoda u stereološkom istraživanju često upotrebljavamo analizu varijance, a među neparametričnim osobito χ^2 test.

Daljnje upute u pogledu statističke obrade rezultata treba potražiti u standardnim udžbenicima statistike.

Vježba

Izračunaj \bar{x} , s , SE , RSE , i odredi veličinu uzorka "n" uz 95% interval vjerojatnosti i 10% dopušten otklon za slijedeće varijable štitne žlijezde, koje si do sada odredio: V_{Ve} , V_{Vk} , V_{Vi} , S_{Ve} , S_{Vi} , $L_{V\check{z}}$ i N_{Vf} po Floderusu!

Primjer:

	V_{Ve}	V_{Vk}	V_{Vi}	S_{Ve}	S_{Vi}	L_V	N_V
\bar{x}	0,248	0,605	0,148	28,571	34,430	183,330	1498,122
s	0,072	0,139	0,091	10,487	10,553	223,583	769,273
SE	0,032	0,062	0,041	4,690	4,719	99,992	344,040
RSE	0,129	0,102	0,277	0,164	0,137	0,545	0,230
"n"	35	21	153	54	37	595	105

Pamti: Umjesto da računaš sa stereološkim varijablama za svako testno polje, možeš računati direktno s pogocima, presjecištima, probodištima i brojevima profila na testno polje. Ako kalkulator nema program za računanje standardne devijacije možeš upo-

trije biti slijedeću praktičnu formulu:

$$s = \left[\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 / n}{n - 1} \right]^{1/2}, \quad (4.14)$$

kod čega x_i znači individualnu vrijednost varijabli.

4.2. Oprema i automatizacija

Stereološko proučavanje možemo razdijeliti na više faza: priprema objekta za stereološku analizu (izrada preparata za makroskopsku, svjetlosnomikroskopsku ili elektronskomikroskopsku analizu, odnosno njihovo fotografiranje), sama stereološka analiza (uzimanje uzorka, raspoznavanje sastavnih dijelova, brojenje i/ili mjerenje i bilježenje rezultata) te matematsko-statistička analiza. Za izvođenje svake od tih faza potrebna je neka osnovna oprema, koja omogućava da potrebne postupke izvedemo bilo neautomatizirano bilo više ili manje automatizirano.

Priprema objekta za stereološku analizu ima za konačan cilj objekt presjeći ravninom. Za stereološku analizu na mikroskopskoj razini tehnika pripreme se ne razlikuje od obične histološke tehnike, koja nam omogućava izradu rezova ili izbrusaka. Za stereološku analizu osobito je važno da nutarnja građa ostane što više nepromijenjena. U većini slučajeva ne možemo potpuno izbjeći arteficialne promjene strukture, npr. skvrčavanje tkiva. Važno je da što više poistovjetimo uvjete histološke tehnike (npr. veličina blokova tkiva, trajanje fiksacije, temperatura vodene kupelji u kojoj raširujemo rezove itd.) da bi možebitna arteficialna promjena bila što manje ovisna o slučajnim utjecajima, koji bi mogli izbrisati ili izopačiti promjene uzrokovane proučavanim faktorima (npr. utjecaj eksperimentalnog postupka). Zbog toga je dobro došla upotreba

automata za izradu histoloških preparata ili termostatirane vodene kupelji.

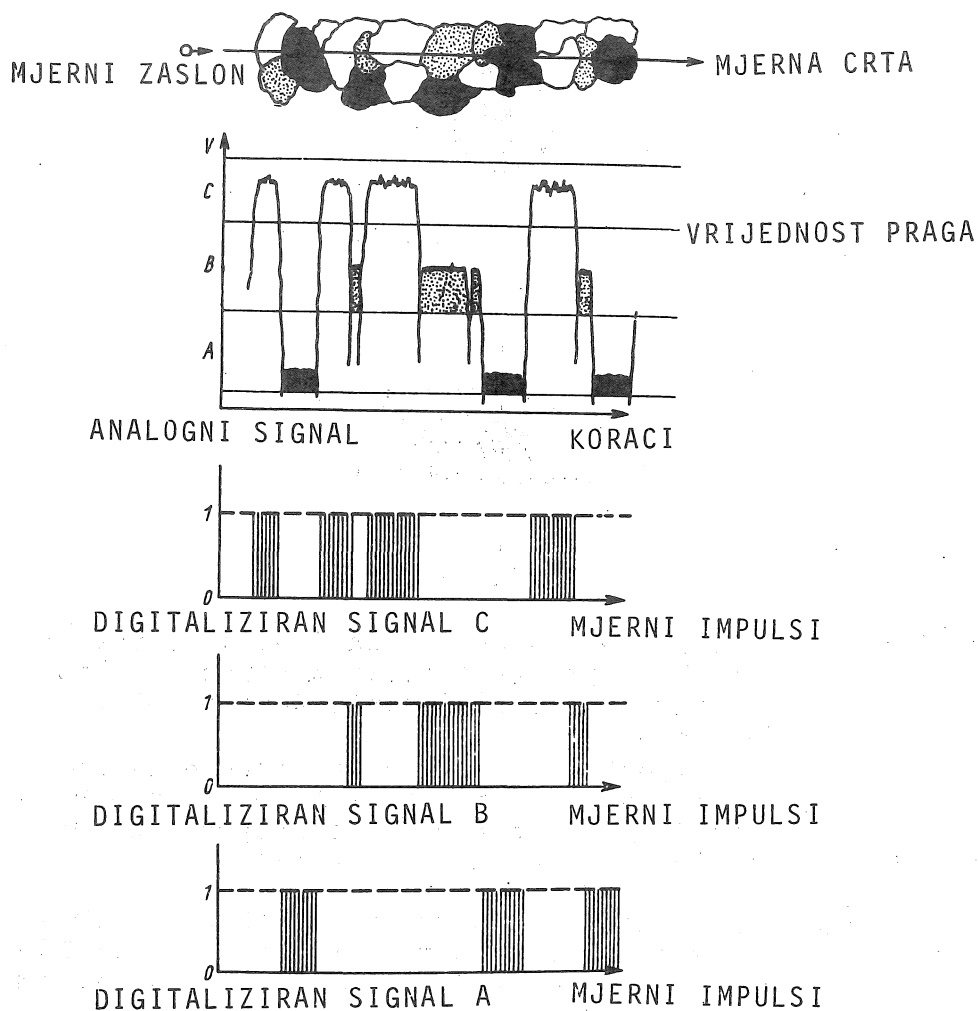
Sama stereološka analiza je u pravilu faza postupka, koja uzima najviše vremena ako je izvodimo samo s osnovnom opremom, ali je od ključnog značenja za validitet i točnost rezultata. U osnovnu opremu ubrajamo folije s različitim sistemima kao i staklene pločice s ugraviranim testnim sistemima položene na dijafragmu okulara (vidi 2.2.!). Objektni i okularni mikrometar ubrajamo također u neophodnu opremu.

Rad na odabiranju uzorka na svjetlosnomikroskopskoj razini možemo si olakšati mikroskopom za odabiranje uzorka, koji preparat pomiče na unaprijed određene udaljenosti u željenim vremenskim razmacima.

Bilježenje rezultata stereoloških brojenja možemo si olakšati upotrebom mehaničkih ili električnih brojača, kakvi se upotrebljavaju u hematološkim laboratorijima za brojenje krvnih stanica.

Daljnji korak u smjeru poboljšanja su instrumenti, kojima se može upravljati. Najstariji je planimetar. Planimetrom možemo izmjeriti površinu plohe ako po njezinom obrisu vodimo vrh pisaljke. Slično upotrebljavamo i optomanuelne sisteme, koje ubrajamo u poluautomatske aparature, kojima možemo odrediti gotovo sve osnovne stereološke varijable (vidi Haug 1976!).

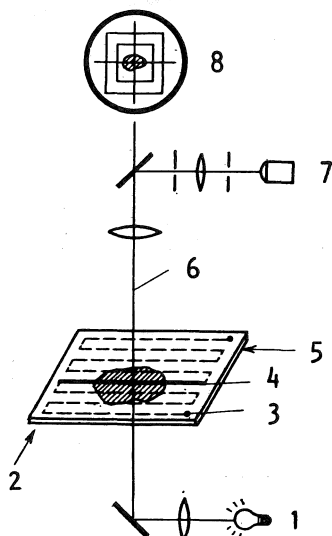
Kod automatskih aparatura ljudsko oko je nadomješteno nekom na svijetlost osjetljivom spravom, koja svijetlost mijenja u električne impulse (npr. fotočelijska, fotomultiplikator ili televizijska kamera). Za automatsku je analizu slike uvjet, da se sastavni dijelovi mogu razlikovati na osnovu intenziteta sive boje (sl. 4.12.). Slika objekta se rastavlja u mnoštvo vrlo malih polja, koja aparatura analizira redom, jedno za drugim u uzastopnim nizovima (sl. 4.13.), što bismo mogli nazvati opipavanjem (scanning). To opipavanje je moguće u ravnini svjetiljke (npr. mikroskop s letećom pjegom = flying-spot-microscope), u ravnini objekta koji se mehanički pomiče ili u



Sl. 4.12. Ovisnost digitaliziranih signala o namještanju vrijednosti praga (Fröhlich, cit. Saltykov 1974)

ravnini slike (po principu televizijskog mikroskopa). S namještanjem različitih pragova osjetljivosti za svjetlost ove aparature mogu mjeriti dužine intercepata, brojiti intersekcije, raspoređivati inter-

cepte po dužini, brojiti čestice i raspoređivati ih po veličini (sl. 4.14.).

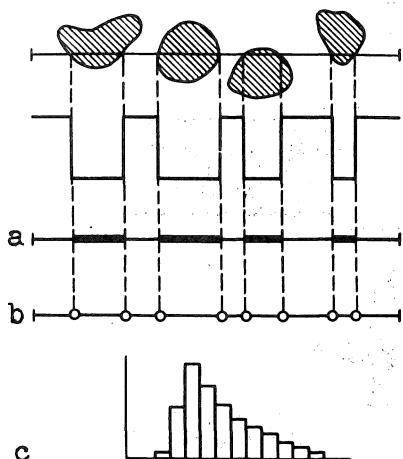


Sl. 4.13. Princip opipavanja (skaniranja) u ravnini objekta (prospekt firme Kontron za "Phasenintegrator Digiscan", Kontron GmbH München)

1 svijetlo, 2 os Y, 3 opipavanje plohe, 4 opipavanje crte, 5 os X (pomicanje stolica), 6 optička os, 7 polusprovodni detektor, 8 projekcijski ekran

Suvremene automatske aparature mogu također popraviti sliku pomoću postupaka nazvanih erozija (pomicanjem obrisa prema unutra), dilatacija (pomicanjem obrisa prema van), otvaranje (ako iza erozije slijedi dilatacija, u slici se manje čestice povežu s većima), zatvaranje (obratni redosljed, ima suprotan učinak na sliku) (sl. 4.15.). Korisna je također mogućnost upotrebe svjetlosne pisaljke, koja omogućava, da na ekranu dodirnom neku pojedinost uključimo ili isključimo iz automatske obrade. Razvoj automatskih aparatura ide u pravcu razvijanja sposobnosti za prepoznavanje uzoraka (vidi Grum 1978), tj. sposobnosti da bi aparatura sama mogla razvrstavati čestice prema njihovom obliku. Konstruirani su već aparati za automatsku analizu npr. krvnih stanica

ili kromosoma. Neke automatske stereološke aparature omogućavaju također kombinaciju stereološke i mikrodensitometrijske analize, koja je također sama za sebe korisna morfometrijska metoda (vidi Špiler, Šuštaršič 1978).

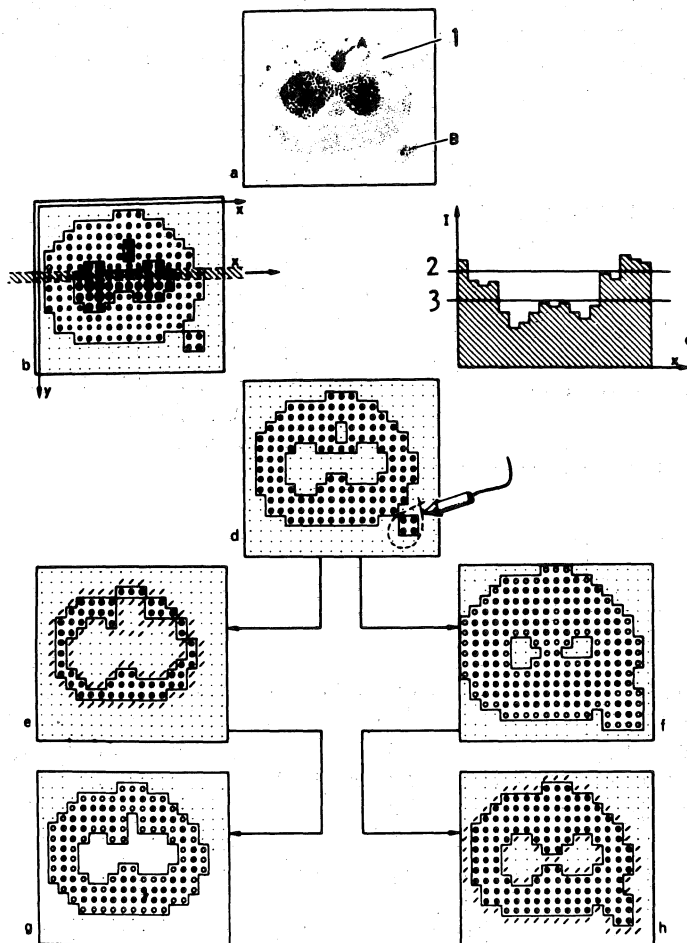


Sl. 4.14. Neke vrijednosti, koje možemo dobiti automatskom analizom slike (Saltykov 1974)

a) dužine intercepata,
b) broj intersekcija,
c) raspodjela duljine intercepata

Bitan sastavni dio automatskih aparatura je računar, koji nadomještava ljudski mozak kod uzimanja uzorka, analize slike, brojenja i/ili mjerenja, bilježenja rezultata te njihove matematsko-statističke analize. Računar je također vrlo koristan, ako ga upotrijebimo samo u zadnjoj fazi, tj. za matematsko-statističku analizu (vidi Čepar 1978).

Možemo očekivati da će se ubuduće automatski aparati, naročito zbog naglog razvitka računarske tehnologije naglo razvijati te postati produktivniji i jeftiniji. Oni su već i na današnjem stupnju razvitka korisni, iako je njihova upotrebljivost u biologiji, naročito pak u istraživačkom radu, ograničena. Naglasiti treba, da omogućavaju samo kvantitativnu analizu dvodimenzionalne slike, trodimenzionalna interpretacija tih rezultata još je uvijek u nadležnosti stereologa.



Sl. 4.15. Osnovne operacije suvremenih automatskih analizatora slike (Weibel 1979)
a izvorna slika l zanimljiva faza,
b digitalizirana slika, c denzitometrijsko bilježenje sivih tonova 2 gornjeg i 3 donjeg praga za diskriminaciju točkaka, d diskriminirana slika s istaknutim točkama na zanimljivoj fazi i oslabljenim drugim točkama, e erozija, f dilatacija, g otvaranje, h zatvaranje

4.3. Izvori pogrešaka

Pogreške mogu u stereološkom ocjenjivanju nastati zbog izopačenja proučavanog objekta tijekom izrade preparata ili zbog neuvažavanja nekih zakonitosti ili pravila. Pogrešne ocjene su naročito opasne kada želimo ustanoviti apsolutne dimenzije. Kada uspoređujemo podatke dobivene na materijalu pokusne (ili promatrane) i kontrolne skupine, važno je da primjenjena preparacijska tehnika bude uvijek jednaka te da su stereološki postupci isti; tako će ustanovljene vrijednosti vjerojatno odstupati od stvarnih vrijednosti u pokusnoj (promatranoj) i kontrolnoj skupini u istom pravcu te će najvjerojatnije biti istog veličinskog razreda.

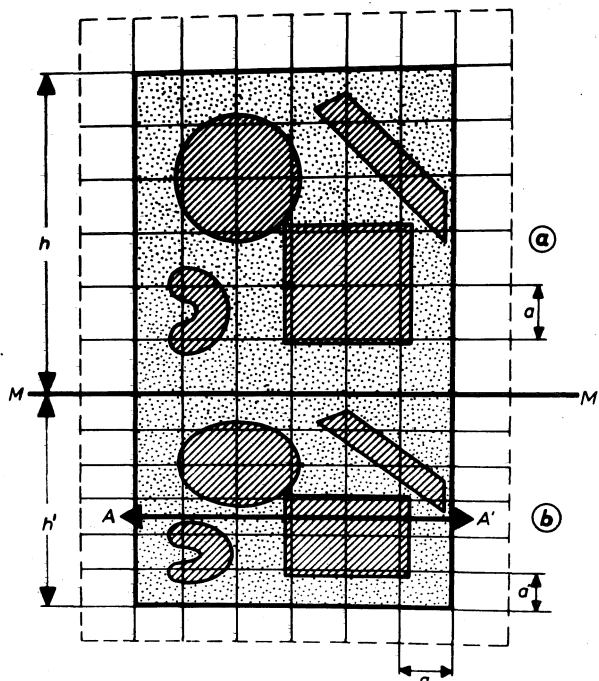
Promjene u unutarnjoj građi objekata mogu nastati već pri uzimanju materijala (npr. nefiksirana pluća kolabiraju nakon otvaranja prsnog koša).

Fiksiranje, prepajanje i uklapanje mijenjaju obično volumen objekta; u pravilu konačni učinak je skvrčavanje, koje je to veće što je svježije tkivo sadržavalo više vode (Poredoš i sur. 1978). Želimo li dobiti podatke o apsolutnoj vrijednosti volumena, površine i duljine određenog sastavnog dijela moramo uzeti u obzir bezdimenzijski korekturni koeficijent skvrčavanja C (formula 3.7), koji ima različite vrijednosti obzirom na dimenziju proučavane varijable (tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Prilagođavanje vrijednosti korekturnog koeficijenta skvrčavanja C dimenzijama proučavanih apsolutnih varijabli

varijabla	simbol	vrijednost C
volumen	V	$C^{3/3} = C$
površina	S	$C^{2/3}$
dužina	L	$C^{1/3}$
broj	N	$C^{0/3} = 1$ /korektura nije potrebna/
zakrivljenost	K	C

Tkivo se može kod rezanja stisnuti u smjeru pritiska noža, čak na polovicu (sl. 4.16.). Protiv toga se možemo boriti npr. upotrebom oštrog noževa, polaganim rezanjem, manjim nagibom noža i manjim reznim plohamama.



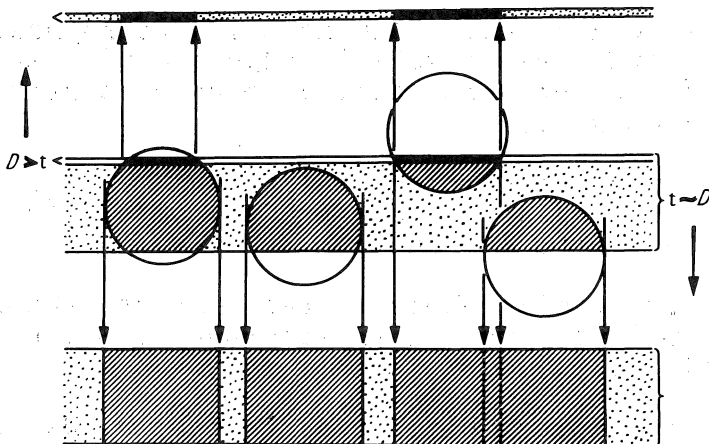
Sl. 4.16. Stiskanje reza u smjeru pritiska noža i njegove posljedice za stereološku analizu (Sitte 1967)

Upotreba rezova određene debljine u biologiji jedan je od glavnih uzroka pogrešaka kod upotrebe stereoloških metoda. Osnovne stereološke metode temelje se na pretpostavci da brojimo točke na stvarnim ravninama presjeka bez debljine. To je slučaj u metalurgiji, gdje istražuju polirane izbruske metalnih slitina kod upadnog osvjetljenja. U biologiji postupamo većinom s rezovima određene debljine, koje promatramo prosvjetljavane. Zbog toga preporučaju

da kod određivanja volumenske, površinske, duljinske gustoće i gustoće zakrivljenosti namjestimo optiku oštro na određenu razinu preparata, a mikrometarski vijak zatim više ne mičemo. Od tog pravila iznimno odstupimo kod određivanja numeričke gustoće čestica na debelim rezovima, ako želimo brojenjem obuhvatiti sve profile u čitavoj debljini reza, pa metode uzimaju u obzir odgovarajući ispravak za tu debljinu.

Holmes (1927) je upozorio da u rezovima određene debljine precijenjujemo volumensku i površinsku gustoću neprozirnih sastavnih dijelova na štetu prozirnih (sl. 4.17.), što nazivamo Holmesov efekt. Pogreška je tim veća, što je veći kvocijent g debljine reza t i karakterističnog promjera čestice d .

$$g = t/d \quad (4.15)$$



Sl. 4.17. Holmesov efekt, zbog kojeg precijenimo volumensku gustoću neprozirnih struktura u predebelim rezovima (Weibel, Elias 1967)

Izračunali su da je korekturni kvocijent K_t , s kojim moramo množiti prividnu volumensku $-t$ gustoću neprozirnih sastavnih dijelova V_V , koji imaju oblik kugla promjera d u rezovima $--$ debljine t

$$K_t(V_V) = \frac{1}{1 + (3/2)g} \quad (4.16)$$

Za površinsku gustoću neprozirnih kugla taj koeficijent je

$$K_t(S_V) = \frac{\pi}{\pi + 4g} \quad (4.17)$$

Iz grafikona na slici 4.18. možemo vidjeti, da se kreće vrijednost $K_t \rightarrow 1$, ako ide $g = t/d \rightarrow 0$. Ako je $g = 1/10$, K_t koeficijent K_t 1,15, što znači da bi volumensku gustoću neprozirnih kugla precijenili za 15%, ukoliko nebismo uzeli u obzir korekturu za Holmesov efekt. Greška pada na 5%, ako je $g = 1/30$.

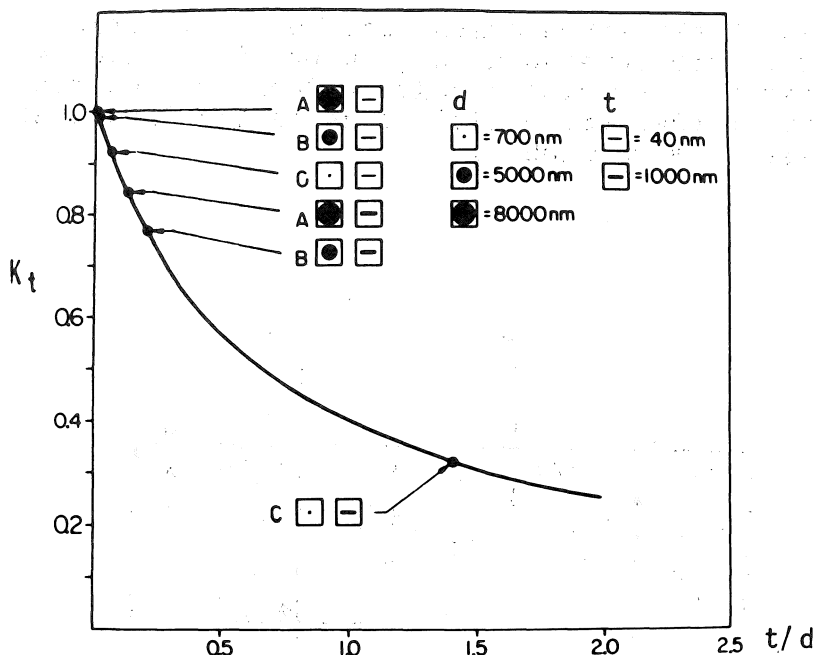
Razumije se da treba volumensku ili površinsku gustoću prozirne faze povećati, odgovarajući umanjivanju neprozirne faze tako, da suma obih gustoća ostaje jednaka 1.

Izračunali su korekturane koeficijente za Holmesov efekt i za neka druga geometrijska tijela (vidi Weibel 1979 str. 139-146).

Na elektronskomikroskopskim rezovima bez kontrastiranja možemo previdjeti membrane, ako one teku koso (sl. 4.19.).

Testne crte moraju biti dovoljno debele, da ih jasno vidimo. Ipak moraju biti proporcionalne s mjerenim strukturama. Ako su testne linije deblje od $d/10$, može to biti izvor ozbiljnih pogrešaka (sl. 4.20.).

Raspraviti moramo još utjecaj mikroskopskog povećanja ili bolje moći razdvajanja na stereološke ocjene. Keller i sur. (1967) opisali su tzv. "učinak obale Engleske" na rezultate određivanja površine plućnih alveola (sl. 4.21.). Ustanovili su da se porastom povećanja odnosno moći razdvajanja povećava površinska gustoća plućnih alveola, a volumenska gustoća

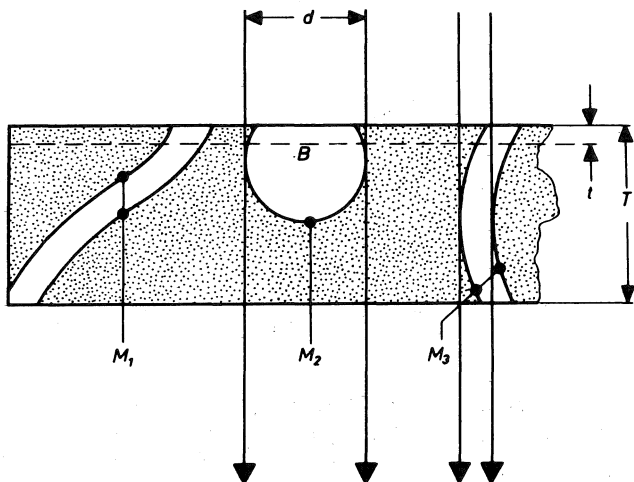


Sl. 4.18. Ovisnost korekturnog koeficijenta K_t za Holmesov efekt za neprozirne kugle— t promjera d u rezu debljine t od omjera $g = t/d$. Ucertani primjeri za A jezgru promjera 8000 nm, B jezgru promjera 5000 nm i C zrno promjera 700 nm u 40 nm odnosno 1000 nm debelim rezovima

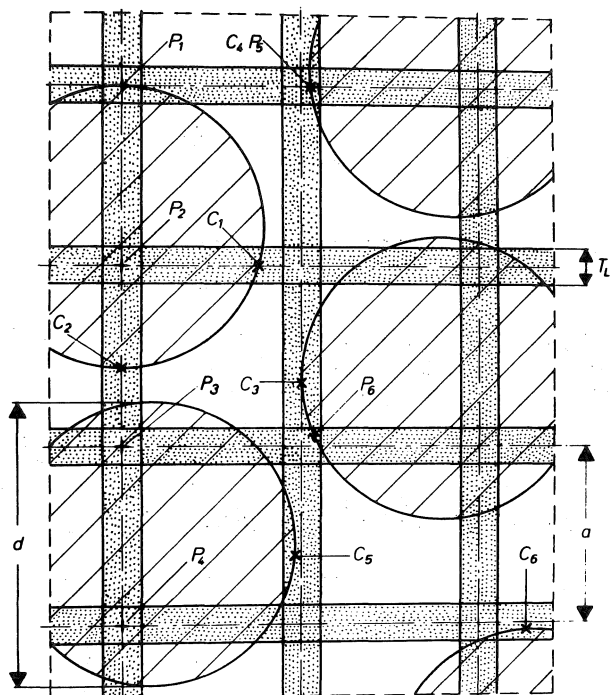
plućnog tkiva pada. Taj prividni paradoks je već dugo vremena poznat kartografima (Mandelbrot 1967, sl. 4.22.). Mandelbrot (1977) je tu zakonitost protumačio geometrijskim modelom (sl. 4.23.).

Nepoštivanje te zakonitosti uzrokovalo je već više puta nesklad stereoloških podataka o istom objektu, ako je taj bio analiziran pod različitim povećanjima. U svakom slučaju je nužno, da uz stereološki rezultat navedemo povećanje objektiva, što je bitno za moć razdvajanja mikroskopa. Za svaki pojedini objekt treba dalje ustanoviti, koje je povećanje potrebno da bi upoznali, za konkretan problem bitne osobine objekta. Analiziramo li

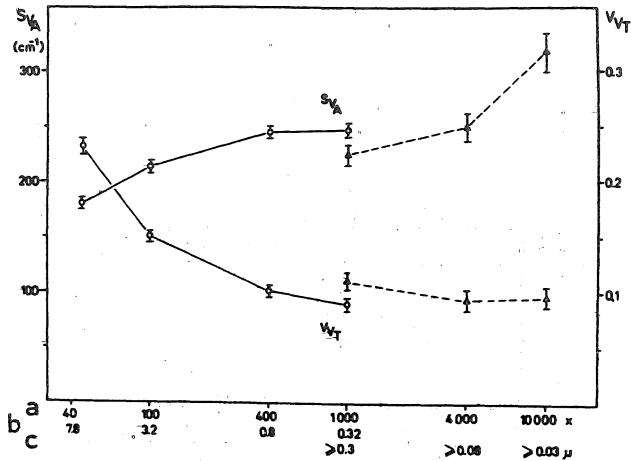
određen objekt stupnjevito, tj. kod različitih mikroskopskih povećanja, nije u pravilu dozvoljeno kombinirati stereološke podatke dobivene pod različitim povećanjem, u slučaju da želimo izračunati neke izvedene varijable.



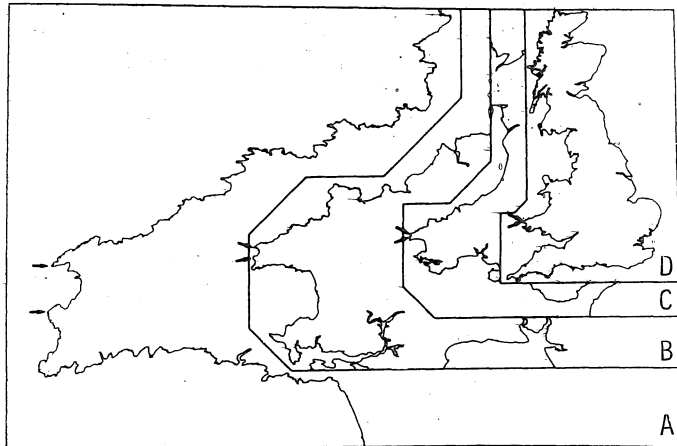
Sl. 4.19. U debelim nekontrastiranim elektronsko-mikroskopskim rezovima vide se samo membrane, koje elektronski snop pogodi tangencijalno (M_2 , M_3), ali ne membrane kosog toka (M_1) (Sitte 1967)



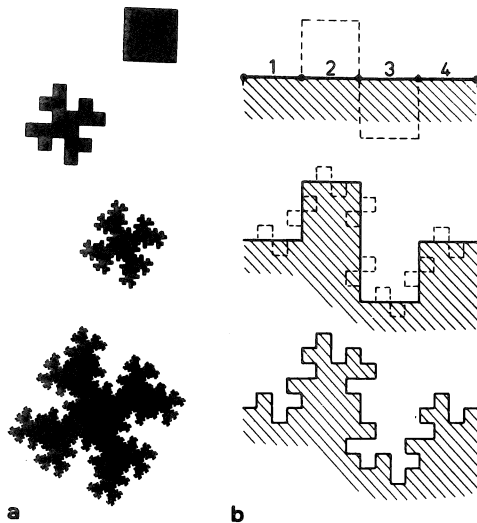
Sl. 4.20. Predebele testne crte prividno povećavaju broj pogodaka i intersekcija (Sitte 1967)



Sl. 4.21. Utjecaj povećanja (a) obzirom na moć razdvajanja u svjetlosnomikroskopskom (b) ili elektronskomikroskopskom području (c) na površinsku gustoću plućnih alveola (S_v) i volumensku gustoću plućnog tkiva (V_v) u smislu "efekta obale Engleske" (V_T) (Keller i sur. 1976)



Sl. 4.22. Obrisi britanske obale na geografskim kartama različitih mjerila (A 1:50.000, B 1:250.000, C 1:1.000.000, D 1:4.000.000) pokazuju različite detalje uz sličnu grubu konturu (Weibel 1979)



Sl. 4.23. Kvadratnom Kochovom otoku postepeno povećavamo dužinu obrisa uz nepromijenjenu ploštinu (a) . (b) Upotreba standardnog poligona za progresivno modificiranje Kochovog otoka (Mandelbrot 1977)

Konačno treba istaknuti, da je najveća opasnost od krivih ocjena, ako se netko neorganizirano lati stereoloških mjerenja, bez jasnog plana, ne poznavajući mogućnosti primjene i ograničenja pojedinih stereoloških metoda, a da se dovoljno ne udubi u stereološku teoriju. Tako se čovjek izlaže opasnosti da potroši vrijeme i novce, da rezultati budu sumnjivi ili čak neuporabljivi. Istovremeno može, u očima neinformiranih, diskreditirati samu stereologiju.

5. DODACI

5.1. Simboli5.1.1. Geometrijska tijela

R, r	polumjer (najveći, najmanji)
D, d	promjer (najveći, najmanji)
l	dužina
h	visina kalote
τ	debljina ljuske šuplje kugle ili stijenke šupljeg cilindra

5.1.2. Mikroskopska tehnika

t	debljina reza ili stupnja
t'	debljina reza u seriji
t _s	debljina nadreza
M	povećanje
$g=t/d$	omjer debljine reza i promjera čestica

5.1.3. Testni sistemi

P _t	broj testnih točaka
L _t	duljina testne linije
A _t	površina testne plohe
k ₁ , k ₂ , q	konstante testnih sistema
d	udaljenost dviju točaka
a	testna površina koja pripada pojedinoj testnoj točki
H	udaljenost dviju testnih dužina

5.1.4. Određivanje volumena

- P broj pogodaka
 P_f broj pogodaka na fazi
 $P_P = P_f/P_t$ gustoća pogodaka
 $L_L = L_f/L_t$ interceptna gustoća
 $A_A = A_f/A_t$ arealna gustoća
 $V_V = V_f/V_t$ volumenska gustoća
 V volumen tijela
 V' volumen skvrčenog tijela

5.1.5. Određivanje površina

- I broj presjecišta
 I_f broj presjecišta obrisa na fazi
 $I_L = I_f/L_t$ gustoća presjecišta
 B_f duljina obrisa faze
 $B_A = B_f/A_t$ gustoća obrisa
 S_f površina plohe na fazi
 $S_V = S_f/V_t$ površinska gustoća
 S površina plohe (savijene)
 S' površina plohe u skvrčenom tijelu

5.1.6. Određivanje duljina

- Q broj probodišta
 Q_f broj probodišta na fazi
 $Q_A = Q_f/A_t$ gustoća probodišta
 L_f duljina krivulje u fazi
 $L_V = L_f/V_t$ duljinska gustoća
 L duljina krivulje
 L' duljina krivulje u skvrčenom tijelu

5.1.7. Određivanje broja čestica

- N broj čestica (profila)
 N_f broj čestica (profila) faze
 $N_A = N_f/A_t$ numerička arealna gustoća
 $N_V = N_f/V_t$ numerička (volumenska) gustoća

5.1.8. Određivanje zakrivljenosti

- T broj tangenta
 T_{\oplus} broj pozitivnih tangenta
 T_{\ominus} broj negativnih tangenta
 $T_A = (T_{\oplus} - T_{\ominus})/A_t$ tangentna gustoća
 K_S specifična gustoća zakrivljenosti
 K_V gustoća (volumenska) zakrivljenosti
K apsolutna zakrivljenost

5.1.9. Korekturni faktori

- $C = V/V'$ za skvrčavanje tijela
 $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ za oblik (N_V po DeHoffu te DeHoffu i Weibelu)
 β za oblik (N_V po Weibelu i Gomezu)
K za raspodjelu po veličini (N_V po Weibelu i Gomezu)
 K_t za Holmesov efekt

5.1.10. Statistika

- n veličina uzorka
m stupanj slobode
 x, x_i individualna vrijednost varijable
 \bar{x} aritmetička sredina uzorka
M aritmetička sredina populacije

s	standardna devijacija uzorka
σ	standardna devijacija populacije
SE	standardna pogreška (aritmetičke sredine)
RSE	relativna standardna pogreška
r	korelacijski koeficijent po Pearsonu
ρ	korelacijski koeficijent po Spearmanu
t	vrijednost t u Studentovoj raspodjeli
χ^2	vrijednost χ^2
F	vrijednost F u Snedecorovoj raspodjeli
P	razina rizika

5.2. Trojezični stereološki rječnikhrvatski ili srpski

anizodimetrija
 - jska čestica
 anizotropija
 areal, površina
 - lna gustoća
 aritmetičan
 - čka sredina, prosjek
 astereologija
 automatizacija
 baždarenje
 broj
 - jčana gustoća
 brojač
 crta
 čestica, djelić
 - , konveksna
 debljina
 - reza
 devijacija, standardna
 diameter, promjer
 dilatacija
 dimenzija
 distribucija, raspodjela
 - , normalna
 dodekaedar
 duljina
 - nska gustoća
 dužina
 elipsoid
 - , rotacijski
 - , lečasti, (oblatni)
 - , jajasti, (prolatni)
 - , troosovinski
 erozija
 faktor
 - , korekcijski
 faza
 - , disperzna
 formula, obrazac
 gradijent
 - , strukturni
 granice povjerenja

slovenski

anizometrija
 - ičen delec
 anizotropija
 areal, ploščina
 - lna gostota
 aritmetičen
 - čna sredina, poprečje
 astereologija
 avtomatizacija
 umerjanje
 število
 - lčna gostota
 števec
 črta
 delec
 - , konveksni
 debelina
 rezine
 deviacija, standardna
 diameter, premer
 dilatacija
 dimenzija
 distribucija, porazdelitev
 - , normalna
 dodekaeder
 dolžina
 - nska gostota
 daljica
 elipsoid
 - , rotacijski
 --, oblatni, lečasti
 --, prolatni, jajčasti
 - , triaksialni
 erozija
 faktor
 - , korekturni
 faza
 - , disperzna
 formula, obrazac
 gradient
 - , strukturni
 meje zaupanja

English

anisodiametry
 - ric particle
 anisotropy
 area
 - al density
 arithmetical
 - mean, average
 astereology
 automation
 calibration
 number
 numerical density
 counter
 line
 particle
 convex -
 thickness
 slice -
 standard deviation
 diameter
 dilatation
 dimension
 distribution
 normal -
 dodecahedron
 lenght
 - density
 line
 ellipsoid
 rotational -
 --, oblate
 --, prolate
 - , triaxial
 erosion
 factor
 correction -
 phase
 disperse -
 formula
 gradient
 structural -
 confidence limits

<u>hrvatski ili srpski</u>	<u>slovenski</u>	<u>English</u>
gustoća	gostota	density
- tragova	- sledov	trace -
heterogenost	heterogenost	heterogeneity
hipoteza	hipoteza	hypothesis
- , nul	- , ničelna	zero -
histometrija	histometrija	histometry
Holmesov efekt	Holmesov efekt	Holmes effect
homogenost	homogenost	homogeneity
ikozaeder	ikozaeder	icosahedron
intercept, horda	intercept, horda	intercept, chord
- tna gustoća	- tna gostota	- density
interval povjerenja	interval zaupanja	confidence interval
izotropija	izotropija	isotropy
jednadžba	enačba	equation
kalota	kalota	cap
kocka	kocka	cube
koeficijent korelacije	koeficijent korelacije	correlation coefficient
- varijacije	- varijacije	variation -
konstanta	konstanta	constant
krivulja	krivulja	curve
kugla	krogla	sphere
- , šuplja	- , votla	hollow -
kurvimetrija	kurvimetrija	curvimetry
medij, disperzni	medij, disperzni	dispersion medium
mikrometar	mikrometer	micrometer
- , objektni	- , objektni	object -
- , okularni	- , okularni	eye piece -
mikroskop	mikroskop	microscope
- s letećom mrljom	- z letećo pego	flying spot -
- , televizijski	- , televizijski	television -
moć razdvajanja	ločljivost	resolution
morfometrija	morfometrija	morfometry
mrežica	mrežica	grid
nadrez	nadrezina	superslice
nepristranost	nepristranost	bias free(dom)
numeričan	numeričan	numerical
- čka (brojčana) gustoća	- čna gostota	- density
numerus (broj jedinica u uzorku)	numerus (število enot v vzorcu)	numerus (number of sample entities)
obris, kontura, perimetar;	obris, perimeter	boundary, perimeter
- sna gustoća	- sna gostota	- density
obujam, volumen	prostornina, volumen	volume
- nska gustoća	- nska gostota	- density

<u>hrvatski ili srpski</u>	<u>slovenski</u>	<u>English</u>
odabiranje uzorka	vzorčenje	sampling
--, jednostavno, slučajno	-, enostavno, naključno	simple random -
--, sistematsko	-, sistematično	systemic -
--, stupnjevito	-, stepenjsko	multiple stage -
--, stratificirano, slojevito	-, stratificirano	stratified -
mikroskop za --	- čni mikroskop	sampling microscope
oktaedar	oktaeder	octahedron
omjer, obujmopovršinski,	razmjerje, prostorninsko-	volume-to-surface ratio
volumenskopovršinski	-površinsko	
opipavanje, skaniranje	otipavanje, skaniranje	scanning
optomanualan	optomanualen	optomanual
- lni sistem	- lni sistem	- system
orijentacija, raspored	orientacija, ureditev	orientation
- , prevladavajuća,	- , prednostna, preferenčna	preferential -
preferentna		
otvaranje	odpiranje	opening
parametar	parameter	parameter
pisaljka, svjetlosna	pisalo, svetlobno	light pen
planimetrija	planimetrija	planimetry
ploha	ploskev	surface
ploština	ploščina	area
pogodak	zadetek	hit
gustoća -daka	- tkovna gostota	- density
pogreška	napaka	error
- , standardna	- , standardna	standard -
--, relativna	--, relativna	relative --
polumjer, radijus	polmer, radij	radius
polje	polje	field
populacija	populacija	population
povećanje	povećava	magnification
-, mikroskopsko	-, mikroskopska	microscope -
površina (kategorija)	površje (kategorija)	surface (category)
površina (kvantiteta)	površina (količina)	surface (quantity)
- nska gustoća	- naka gostota	- density
presjecište, intersekcija	presečišče, intersekcija	intersection
- šna gustoća	- čna gostota	- density
presjek, prerez	presek	section
pristranost	pristranost	bias
problem igle	problem igle	needle problem
prebodište, transekcija	prebodišče, transekcija	transection
- šna gustoća	- čna gostota	- density
profil, trag	profil, sled	profile, trace
promjer	premer	diameter
- poprečni tangenti,	- poprečni tangenti,	average tangent, caliper
kaliperni	kaliperni	

<u>hrvatski ili srpski</u>	<u>slovenski</u>	<u>English</u>
prostor	prostor	space
- , referentni, obuhvatni	- , referenčni, vsebujoči	reference -, containing-
- , trodimenzionalni	- , trodimenzionalni	three-dimensional -
računar, kompjuter	računalnik, kompjuter	computer
radijus, polumjer	radij, polmer	radius
raspodjela	porazdelitev	distribution
- , po veličini	- , velikostna	size -
razpoznavanje uzoraka	razpoznavanje vzorcev	pattern recognition
ravnina	ravnina	plane
razmak, interval	stopnica, interval	interval
rekonstrukcija	rekonstrukcija	reconstruction
- , grafička	- , grafična	graphic -
- , plastična	- , plastična	plastic -
reprezentativnost	reprezentativnost	representativity
- uzorka	- vzorca	sample -
rez	rezina	slice
rezanje	rez	section(ing)
rizik	tveganje	risk
razina -ka	nivo -ja	- level
sastavni dijelovi, komponente	sestavine, komponente	components
serija	serija	series
- rezova	- rezin	section -
--, stupnjevita	--, stopničasta	step serial sections
sferoid	sferoid	spheroid
- , lečasti (oblasti)	- , oblatni, lečasti	oblate -
- , jajast (prolatni)	- , prolatni, jajčasti	prolate -
simbol	simbol	symbol
sistem	sistem	system
- , disperzni	- , disperzni	disperse -
- , koherentni	- , koherentni	coherent -
- , tekstni	- , tekstni	test -
skaniranje, opipavanje	skaniranje, otipavanje	scanning
skvrčavanje	skrčenje	shrinkage
statistika (znanost)	statistika (veda)	statistics
- (uzorka)	- (vzorca)	statistic
stereologija	stereologija	stereology
- , kvalitativna	- , kvalitativna	qualitative -
- , kvantitativna	- , kvantitativna	quantitative -
struktura, unutrašnja građa	struktura, notarnja zgradba	structure
stupanj slobode	stopnja prostosti	degree of freedom
tangenta	tangenta	tangent
- tna gustoća	- tna gostota	- density

<u>hrvatski ili srpski</u>	<u>slovenski</u>	<u>English</u>
test	test	test
-tna crta, dužina, linija	- tna črta	- line
- tna točka	- tna točka	- point
- tni areal,	- tni areal,	- area
- tni sistem	- tni sistem	- system
--, dvostruki mrežni	--, dvojni mrežni	double square lattice --
--, obični mrežni	--, navadni mrežni	simple square lattice --
--, polukružni	--, polkrožni	curvilinear --
- tni volumen	- tni volumen	- volume
tetrakaidekaedar	tetrakaidekaeder	tetrakaidecahedron
točka	točka	point
gustoća točaka	- kovna gostota	- density
trag	sled	trace
trend, tijek	trend	trend
uzorak	vzorec	sample
-, slučajni, nepristrani	-, naključni, nepristranski	unbiased -
-, pristrani	-, pristranski	biased -
-, reprezentativni	-, reprezentativni	representative -
valjak, cilindar	valj, cylinder	cylinder
varijabla, promijenljiva vrijednost	variabla, spremenljivka	variable
varijanica	varianca	variance
visina	višina	height
- stanica	- celic	cell -
vjerojatnost	verjetnost	probability
-, geometrijska	-, geometrična	geometric -
papir -ti	- tni papir	- paper
volumen	volumen	volume
-nska gustoća	-nska gostota	- density
volumetrija	volumetrija	volumetry
zakrivljenost	ukrivljenost	curvature
-, apsolutna	-, apsolutna	absolute -
obujmna, volumenska gustoća -ti	prostorninska -tna gostota	volume - density
specifična gustoća -ti	specifična -tna gostota	specific - density
zatvaranje	zapiranje	closing

5.3. Literatura i bibliografija monografija

5.3.1. Literatura

Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. Anat Rec 1946; 94: 239-247.

Bogataj M. Velikostna porazdelitev delcev. Stereol Jugosl 1978; 1: 181 - 190.

Bogataj M, Kališnik M. Matematične osnove stereologije. Stereol Jugosl 1978; 1: 157 - 168.

Bogataj M, Kališnik M, Poredoš P. Pojednostavljeni indirektni metod određivanja prosečne debljine ljuske šupljih kugala iz uzorka u kriškama. Folia Anat Jugosl 1977; 6: 45 - 49.

Buffon GL Leclerc de. Essai d'arithmétique morale. Suppl. a Histoire naturelle, générale et particulière. Paris: L'imprimerie royale. 1777, 46 - 148.

Cahn JW. The significance of average mean curvature and its determination by quantitative metallography. Trans Met Soc AIME 1967; 239: 610 - 616.

Čepar D. Statistično izvrednotenje stereoloških meritev z računalnikom. Stereol Jugosl 1978; 1: 207 - 230.

DeHoff RT. The determination of the geometric properties of aggregates of constant-size particles from counting measurement made on random plane sections. Trans AIME 1964; 230: 764 - 769.

DeHoff RT. The quantitative estimation of mean surface curvature. Trans Met Soc AIME 1967; 239: 617 -

DeHoff RT, Rhines FH, eds. Quantitative microscopy. New York: McGraw Hill, 1968.

DeHoff. Curvature and the topological properties of interconnected phases. In: DeHoff RT, Rhines FN, eds. Quantitative microscopy. New York: McGraw Hill Book Co, 1972: 291 - 325.

Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. CR Acad Sci (Paris) 1847; 25: 544 - 545.

Durst-Živković B. Stereologija u Jugoslaviji. Stereol Jugosl 1980; 2: 117 - 127.

Ebbesson SOE, Tang D. A method for estimating the number of cells in histological sections. J R Microsc Soc 1965; 84: 449 - 464.

Elias H, Hennig A, Schwartz DE. Stereology: applications to biomedical research. Physiol Rev 1971; 51: 158 - 200.

Eržen I. Stereologija skeletnega mišičnega tkiva. JUST 82, 36 - 41.

Eržen I, Kališnik M. Stereološka analiza skeletnog mišičnog tkiva. Zbornik II memorijalnog sastanka Teodor Varićak, 1984 / u tisku /.

Fischmeister HF. Apparative Hilfsmittel der Stereologie. In: Weibel ER, Elias H, eds. Quantitative Methoden in der Morphologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1967: 219 - 250.

Floderus S. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. Acta Path Microbiol Scand 1944; Suppl. 53, 1 -

Fröhlich L. Mitteilungen aus dem Entwicklungslabor des VEB Carl Zeiss Jena (In litteris).

Gil M, Weibel ER. Morphological study of pressure-volume hysteresis in rat lungs fixed by vascular perfusion. Resp Physiol 1972; 15: 190 - 213.

Glagolev AA. Sposob i pribor dlja mikroskopičeskoga analiza gornych porod. Pat. Nr. 38066, prijavljen 19.7.1932, objavljen 31.8.1934.

Grum J. Razpoznavanje vzorcev. Stereol Jugosl 1978; 1: 235 - 255.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microscop 1977; 11: 219 -

Haug H. Probleme und Methoden der Strukturzählung im Schnittpräparat. In: Weibel ER, Elias H, eds. Quantitative methods in morphology. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967: 58 - 78.

Haug H. Die verschiedenen Verfahren zur Werteerfassung in der biologischen Morphometrie und Stereologie. *Microscopica Acta* 1976; 78: 197 - 220.

Hilliard JE. Determination of structural anisotropy. In: Elias H, eds. *Stereology. Proceedings 2nd international congress for stereology.* Berlin-Heidelberg-New York 1967: 219 - 230.

Holmes A. *Petrographic methods and calculations.* London: Murby, 1927.

Kališnik M. A contribution to morphology of the thyroid in euthermic rat. *Acta Anat* 1959; 38: 166 - 166.

Kališnik M. *Histološke spremembe v umetni hipotermiji.* Thesis. Univ. Ljubljana, 1960.

Kališnik M. Astereološki pristop h kvantitativni morfološki analizi površin. *Stereol Jugosl* 1977 a; 1: 23 - 29.

Kališnik M. Die Bestimmung des Absolutvolumens der Gewebekomponenten. Errechnung der Wanddicke der hohlzylindrischen sowie der Radien der massiven zylindrischen Strukturen in einem Schnitt. *Verh Anat Ges* 1977 b; 71: 297 - 302.

Kališnik M. Načrtovanje stereološkega raziskovanja. *Stereol Jugosl* 1978; 1: 143 - 156.

Kališnik M. Morphometry of the thyroid gland. *Stereol Jugosl* 1981; 3/Suppl 1: 547 - 569.

Kališnik M, Pajer Z. O merskih značilnostih stereoloških testov, zlasti o gospodarnosti. *Stereol Jugosl* 1981; 3: 21 - 30.

Kališnik M, Pajer Z. Direktno ocenjevanje absolutnega števila delcev. *JUST* 82, 12 - 13.

Kališnik M, Pajer Z. The validity and economy of the direct method for the estimation of the absolute number of particles. *Acta Stereol* 1983; 2/Suppl I: 139 - 144.

Kališnik M, Vraspir-Porenta O, Bogataj M. Ukrivljenost ploskev. *Stereol Jugosl* 1978; 1: 191 - 200.

Kališnik M, Vraspir-Porenta O, Šuštaršič J, Jezernik K, Pipan N, Us-Krašovec M. Astereological analysis of unflat surfaces. *Newsletter in stereology* 1980 a: 59 - 75.

Kališnik M, Vraspir-Porenta O, Šuštaršič J, Jezernik K, Pipan N, Us-Krašovec M. Astereological analysis of unflat surfaces. *Microskopie (Wien)* 1980 b; 37: 209 - 210.

Keller HJ, Friedli HP, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. The effects of resolution on estimating stereological parameters. In: Underwood ER, de Wit R, Moore GA, eds. *Proceedings fourth international congress for stereology*. Washington: National Bureau of Standards, Special Publication 431, U.S. Government Printing office, 1976: 409 - 410.

Kosin M, Šuštaršič J, Kališnik M, Herzog B, Pavlin-Rozman K. Korelacija između strukture i funkcije štitnjače pacova (Predhodni izveštaj). *Endocrinol Jugosl* 1978; 1: 3 - 13.

Mandelbrot BB. How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension. *Science* 1967; 155: 636 -

Mandelbrot BB. *Fractals. Form, chance, and dimension*. San Francisco: Freeman and Company, 1977.

Matieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Estimating length density and quantifying anisotropy in skeletal muscle capillaries. *J Microsc* 1983; 131: 131 - 146.

Merz WA. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe. *Microscopie* 1967; 22: 132 - 142.

Ondracek G. The key position of stereology in quantitative microstructure-correlations of multiphase materials. *Acta Stereol* 1982; 1: 5 - 21.

Pajer Z, Kališnik M. The particle number estimation and the depth of focus. *Acta Stereol* 1984; 3: 19 - 22.

Poredoš P, Bogataj M, Kališnik M. Raspodela folikla po veličini u štitnjači pacova. *Folia Anat Iugosl* 1977; 6: 69 - 72.

Poredoš P, Zalar M, Kališnik M. Vpliv histološke tehnike na absolutni volumen vzorca organa. *Stereol Iugosl* 1978; 1: 131 - 142.

Pšeničnik M. Stereologija v elektronski mikroskopiji. *Stereol Iugosl* 1981; 3: 87 - 92.

Ries N. Funkcionalno stanje štitne žlijezde u odnosu na metabolična opterećenja. Thesis. Univ. Zagreb, 1965.

Robida A, Fettich D, Bartenjev D. Astereološko merjenje površine levega preddvora iz kinoangiokardiografskih posnetkov. *Zdrav Vestn* 1981; 50: 415 - 416.

Rosiwal A. Ueber geometrische Gesteinanalysen. *Verh KK Geol Reichsans. Wien*: 1898: 143 -

Saltykov SA. *Stereometrische Metallographie*. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1974: 265 - 391.

Sitte H. Morphometrische Untersuchungen an Zellen. In: Weibel ER, Elias H, eds. *Quantitative methods in morphology*. New York: Springer Verlag, 1967: 167 - 198.

Špiler F, Šuštaršič J. Mikrodenzitometrija. *Stereol Iugosl* 1978; 1: 201 - 206.

Švab I. Poenostavljena metoda za računanje poprečne debeline votlih krogel iz vzorca v rezinah. *Stereol Iugosl* 1979; 2: 53 - 55.

Thomson E. *Quantitative microscopic analysis*. J. Geol 1930; 38: 193 - 222.

Ullmann JE. *Schaum's outline of theory and problems of quantitative methods in management*. New York etc: McGraw-Hill Book Company, 1976: 333, 344, 345, 346.

Underwood EE. Quantitative stereology. Reading-Menlo Park-London-Don Mills: Addison-Wesley Publishing Company, 1970.

Vraspir-Porenta O. Testis v fetalnem in prenatalnem obdobju. Thesis, Univ. Ljubljana 1979.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int Rev Cytol 1969; 26: 235 - 302.

Weibel ER. A stereological method for estimating volume and surface of sarcoplasmic reticulum. J Microsc 1972; 95: 229 - 242.

Weibel ER. Stereological methods for biological morphometry. Course held at the institute of anatomy, Bern 1977, W41 - W53.

Weibel ER. Stereological methods, Vol. 1, Practical methods for biological morphometry. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1979.

Weibel ER. Stereology - a bridge between morphology and physiology. Acta Stereol 1982; 1: 23 - 33.

Weibel ER, Bolender RP. Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Hayat MA, ed. Principles and techniques of electron microscopy, vol. 3. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1973: 237 -

Weibel ER, Elias H. Introduction to stereologic principles. In: Quantitative methods in morphology. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1967: 89 - 98.

Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. J Appl Physiol 1962; 17: 343 - 348.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol 1966; 30: 23 - 38.

Wicksell SD. The corpuscle problem I. Biometrika 1925; 17: 84 - 99.

Wicksell SD. The corpuscle problem II. Biometrika 1926; 18: 152 - 172.

Williams MA. Sections of determined thickness for use in stereological estimation on cells. *Stereol Jugosl* (Proc 3rd Eur Symp Stereol) 1981; 3/Suppl 1: 369 - 374.

5.3.2. Bibliografija monografija i monotematskih metodoloških brojeva revija

Adam H, Bernroider G, Haug H, eds. *Mikroskopie* 1980; 37: 1 - 495. (Proc 5th Internat Cong Stereol).

Chermant JL, ed. *Analyse quantitative des microstructures en sciences des matériaux, biologie et médecine. Quantitative analysis of microstructures in materials science, biology and medicine.* (Second symposium europeen d'analyse quantitative des microstructures en sciences des matériaux, biologie et médecine). *Praktische Metallographie, Sonderband 8.* Stuttgart: Dr Riederer-Verlag GmbH, 1978: 1 - 452.

DeHoff RT, Rhines FH, eds. *Quantitative microscopy.* New York: McGraw-Hill, 1967:

Elias H, ed. *Stereology* (Proceedings of the second international congress for stereology. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1967: 1 - 337.

Elias H, Hyde DM. *A guide to practical stereology.* Basel-Basel-München-Paris- London-Tokyo-Sydney: Karger, 1983 1 - 305.

Elias H, Pauly JE, Burns ER. *Histology and human microanatomy. Appendix II Quantitative microscopy (Stereology and morphometry).* Padova: Piccin medical books, 4th ed., 1978: 547 - 576.

Exner HE, ed. *Quantitative Analyse von Gefügen in Medizin, Biologie und Materialentwicklung. Quantitative analysis of microstructures in medicine, biology and materials development.* (Berichte vom Symposium "Quantitative Gefügeanalyse"). *Praktische Metallographie, Sonderband 5.* Stuttgart: Dr. Riederer-Verlag GmbH, 1975: 1 - 322.

Eränkő O. *Quantitative methods in histology and microscopic histochemistry.* Basel: Karger, 1955: 1 - 160.

Gundersen HJG, ed. J Microsc 1981; 121: 1 - 132.
(Stereology 5).

Haug H. Quantitative Untersuchungen an der Sehrinde.
Stuttgart: Thieme, 1958.

Haug H, ed. First international congress for stereology. Erster Internationaler Kongress für Stereologie. Premier congres international de stereologie. Wien: International Society for Stereology, 1963: 1/1 - 44/8.

Jenny L, ed. et al. Microsc Acta 1979; 82: 101 - 191.

Kališnik M, ed. Stereol Jugosl 1978; 1: 143 - 255.

Kališnik M, ed. Stereol Jugosl 1981; 3/Suppl 1: 1 - 734 (Proc 3rd Eur Symp Stereol).

Kališnik M, ed. Acta Stereol 1983; 2/Suppl 1: 1 - 322 (Proc 6th Intern Congr Stereol).

Riede UN, Reith A, eds. Morphometry in pathology. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag, 1980: 143 - 399.

Saltykov SA. Stereometrische Metallographie. Leipzig; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1974: 1 - 397.

Serra J. Image analysis and mathematical morphology. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1982.

Underwood EE. Quantitative stereology. Cambridge: Addison-Wesley, 1970, 1 - 274.

Underwood EE, de Wit R, Moore GA, eds. Fourth international congress for stereology. Washington: U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standards, 1976: 1 - 540.

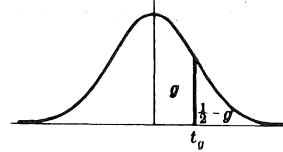
Weibel ER. Morphometry of the human lung. Berlin: Springer, 1963.

Weibel ER. Stereological methods. Volume 1. Practical methods for biological morphometry. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1979: 1 - 415.

Weibel ER. Stereological methods. Volume 2. Theoretical foundations. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1980: 1 - 340.

Weibel ER, Elias H, eds. Quantitative methods in morphology. Quantitative Methoden in der Morphologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1967: 1 - 278.

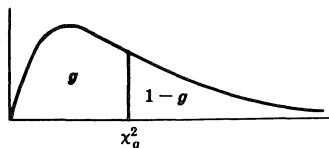
Yamada E, ed. Proceedings. Tenth international congress of anatomists and eithieth annual meeting of japanese association of anatomists. Symposium for stereology. Tokyo: Science council of Japan, 1975: 16 - 23, 490.

5.4.2. Studentova raspodjela tVrijednosti t uz stupnjeve slobode m

m	$t_{0.05}$	$t_{0.10}$	$t_{0.20}$	$t_{0.25}$	$t_{0.30}$	$t_{0.40}$	$t_{0.45}$	$t_{0.475}$	$t_{0.49}$	$t_{0.495}$
1	.158	.325	.727	1.000	1.376	3.08	6.31	12.71	31.82	63.66
2	.142	.289	.617	.816	1.061	1.89	2.92	4.30	6.96	9.92
3	.137	.277	.584	.765	.978	1.64	2.35	3.18	4.54	5.84
4	.134	.271	.569	.741	.941	1.53	2.13	2.78	3.75	4.60
5	.132	.267	.559	.727	.920	1.48	2.02	2.57	3.36	4.03
6	.131	.265	.553	.718	.906	1.44	1.94	2.45	3.14	3.71
7	.130	.263	.549	.711	.896	1.42	1.90	2.36	3.00	3.50
8	.130	.262	.546	.706	.889	1.40	1.86	2.31	2.90	3.36
9	.129	.261	.543	.703	.883	1.38	1.83	2.26	2.82	3.25
10	.129	.260	.542	.700	.879	1.37	1.81	2.23	2.76	3.17
11	.129	.260	.540	.697	.876	1.36	1.80	2.20	2.72	3.11
12	.128	.259	.539	.695	.873	1.36	1.78	2.18	2.68	3.06
13	.128	.259	.538	.694	.870	1.35	1.77	2.16	2.65	3.01
14	.128	.258	.537	.692	.868	1.34	1.76	2.14	2.62	2.98
15	.128	.258	.536	.691	.866	1.34	1.75	2.13	2.60	2.95
16	.128	.258	.535	.690	.865	1.34	1.75	2.12	2.58	2.92
17	.128	.257	.534	.689	.863	1.33	1.74	2.11	2.57	2.90
18	.127	.257	.534	.688	.862	1.33	1.73	2.10	2.55	2.88
19	.127	.257	.533	.688	.861	1.33	1.73	2.09	2.54	2.86
20	.127	.257	.533	.687	.860	1.32	1.72	2.09	2.53	2.84
21	.127	.257	.532	.686	.859	1.32	1.72	2.08	2.52	2.83
22	.127	.256	.532	.686	.858	1.32	1.72	2.07	2.51	2.82
23	.127	.256	.532	.685	.858	1.32	1.71	2.07	2.50	2.81
24	.127	.256	.531	.685	.857	1.32	1.71	2.06	2.49	2.80
25	.127	.256	.531	.684	.856	1.32	1.71	2.06	2.48	2.79
26	.127	.256	.531	.684	.856	1.32	1.71	2.06	2.48	2.78
27	.127	.256	.531	.684	.855	1.31	1.70	2.05	2.47	2.77
28	.127	.256	.530	.683	.855	1.31	1.70	2.05	2.47	2.76
29	.127	.256	.530	.683	.854	1.31	1.70	2.04	2.46	2.76
30	.127	.256	.530	.683	.854	1.31	1.70	2.04	2.46	2.75
40	.126	.255	.529	.681	.851	1.30	1.68	2.02	2.42	2.70
60	.126	.254	.527	.679	.848	1.30	1.67	2.00	2.39	2.66
120	.126	.254	.526	.677	.845	1.29	1.66	1.98	2.36	2.62
∞	.126	.253	.524	.674	.842	1.28	1.645	1.96	2.33	2.58

5.4.3. Raspodjela χ^2

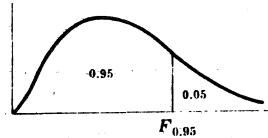
Vrijednosti hi-kvadrat uz stupnjeve slobode m



m	$\chi^2_{.005}$	$\chi^2_{.01}$	$\chi^2_{.025}$	$\chi^2_{.05}$	$\chi^2_{.10}$	$\chi^2_{.25}$	$\chi^2_{.50}$	$\chi^2_{.75}$	$\chi^2_{.90}$	$\chi^2_{.95}$	$\chi^2_{.975}$	$\chi^2_{.99}$	$\chi^2_{.995}$	$\chi^2_{.999}$
1	.0000	.0002	.0010	.0039	.0158	.102	.455	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88	10.8
2	.0100	.0201	.0506	.103	.211	.575	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21	10.6	13.8
3	.0717	.115	.216	.352	.584	1.21	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.3	12.8	16.3
4	.207	.297	.484	.711	1.06	1.92	3.36	5.39	7.78	9.49	11.1	13.3	14.9	18.5
5	.412	.554	.831	1.15	1.61	2.67	4.35	6.63	9.24	11.1	12.8	15.1	16.7	20.5
6	.676	.872	1.24	1.64	2.20	3.45	5.35	7.84	10.6	12.6	14.4	16.8	18.5	22.5
7	.989	1.24	1.69	2.17	2.83	4.25	6.35	9.04	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3	24.3
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	5.07	7.34	10.2	13.4	15.5	17.5	20.1	22.0	26.1
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	5.90	8.34	11.4	14.7	16.9	19.0	21.7	23.6	27.9
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	6.74	9.34	12.5	16.0	18.3	20.5	23.2	25.2	29.6
11	2.60	3.05	3.82	4.57	5.58	7.58	10.3	13.7	17.3	19.7	21.9	24.7	26.8	31.3
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	8.44	11.3	14.8	18.5	21.0	23.3	26.2	28.3	32.9
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	9.30	12.3	16.0	19.8	22.4	24.7	27.7	29.8	34.5
14	4.07	4.66	5.63	6.57	7.79	10.2	13.3	17.1	21.1	23.7	26.1	29.1	31.3	36.1
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	11.0	14.3	18.2	22.3	25.0	27.5	30.6	32.8	37.7
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	11.9	15.3	19.4	23.5	26.3	28.8	32.0	34.3	39.3
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.1	12.8	16.3	20.5	24.8	27.6	30.2	33.4	35.7	40.8
18	6.26	7.01	8.23	9.39	10.9	13.7	17.3	21.6	26.0	28.9	31.5	34.8	37.2	42.3
19	6.84	7.63	8.91	10.1	11.7	14.6	18.3	22.7	27.2	30.1	32.9	36.2	38.6	43.8
20	7.43	8.26	9.59	10.9	12.4	15.5	19.3	23.8	28.4	31.4	34.2	37.6	40.0	45.3
21	8.03	8.90	10.3	11.6	13.2	16.3	20.3	24.9	29.6	32.7	35.5	38.9	41.4	46.8
22	8.64	9.54	11.0	12.3	14.0	17.2	21.3	26.0	30.8	33.9	36.8	40.3	42.8	48.3
23	9.26	10.2	11.7	13.1	14.8	18.1	22.3	27.1	32.0	35.2	38.1	41.6	44.2	49.7
24	9.89	10.9	12.4	13.8	15.7	19.0	23.3	28.2	33.2	36.4	39.4	43.0	45.6	51.2
25	10.5	11.5	13.1	14.6	16.5	19.9	24.3	29.3	34.4	37.7	40.6	44.3	46.9	52.6
26	11.2	12.2	13.8	15.4	17.3	20.8	25.3	30.4	35.6	38.9	41.9	45.6	48.3	54.1
27	11.8	12.9	14.6	16.2	18.1	21.7	26.3	31.5	36.7	40.1	43.2	47.0	49.6	55.5
28	12.5	13.6	15.3	16.9	18.9	22.7	27.3	32.6	37.9	41.3	44.5	48.3	51.0	56.9
29	13.1	14.3	16.0	17.7	19.8	23.6	28.3	33.7	39.1	42.6	45.7	49.6	52.3	58.3
30	13.8	15.0	16.8	18.5	20.6	24.5	29.3	34.8	40.3	43.8	47.0	50.9	53.7	59.7
40	20.7	22.2	24.4	26.5	29.1	33.7	39.3	45.6	51.8	55.8	59.3	63.7	66.8	73.4
50	28.0	29.7	32.4	34.8	37.7	42.9	49.3	56.3	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5	86.7
60	35.5	37.5	40.5	43.2	46.5	52.3	59.3	67.0	74.4	79.1	83.3	88.4	92.0	99.6
70	43.3	45.4	48.8	51.7	55.3	61.7	69.3	77.6	85.5	90.5	96.0	100	104	112
80	51.2	53.5	57.2	60.4	64.3	71.1	79.3	88.1	96.6	102	107	112	116	125
90	59.2	61.8	65.6	69.1	73.3	80.6	89.3	98.6	108	113	118	124	128	137
100	67.3	70.1	74.2	77.9	82.4	90.1	99.3	109	118	124	130	136	140	149

5.4.4. Raspodjela F

Vrijednosti F uz $P = 0,05$ i stupnjeve slobode u brojniku (m_1) i nazivniku (m_2)



m_1	m_2																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞	
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254	
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65	
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00	