

Stereologi

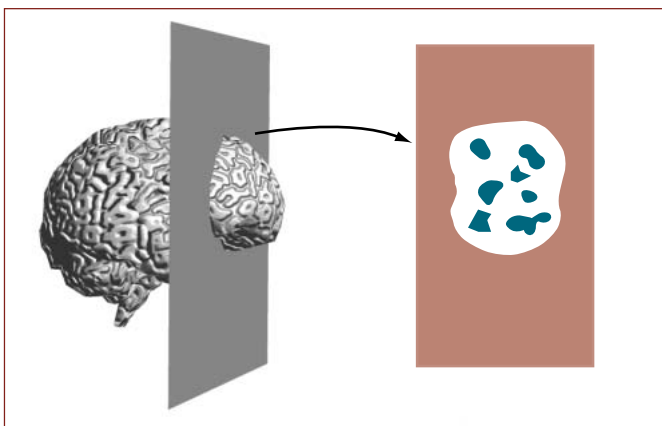
- matematik, statistik og hjerneforskning

Når man undersøger biologisk væv foregår dette typisk ved hjælp af mikroskopet, hvor man studerer mikroskopiske snit. Men, hvad kan et sådant snit sige om det rumlige væv? En hel del, hvis man bruger de rette statistiske metoder. Faget kaldes stereologi.

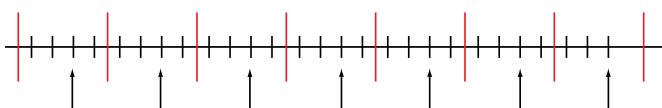
Af Eva B. Vedel Jensen

■ Stereologi handler om metoder til at beskrive tre-dimensionale mikroskopiske strukturer som f.eks. celler i biologisk væv. Metoderne er baseret på avanceret matematik og stati-

stik. Stereologien har derfor mange facetter: matematisk grundforskning inden for *integral geometri* og *geometrisk målteori*, matematisk og statistisk udviklingsarbejde, tillem্পning



Figur 2. Stereologien anvender observationer på mikroskopiske snit.



Figur 1. Illustration af systematisk udvalg.



Figur 3.
Dalton brødrene.
©MORRIS

af metoderne, så de fører til praktisk gennemførlige målinger i mikroskopet, og anvendelse af de stereologiske metoder.

Personnumre og cellepopulationer

Vi er alle bekendt med politiske opinionsundersøgelser, telefoninterviews og andre stikprøveundersøgelser. Det centrale ved undersøgelsen er udvælgelsen af en repræsentativ stikprøve af populationen, lad os sige den danske befolkning. Det, der gør situationen forholdsvis simpel, er, at hver person har et nummer i et register.

Man benytter sig af veletablerede teknikker til udvælgelse af numre i registret, eksempelvis simpelt tilfældigt udvalg, klyngeudvalg og systematisk udvalg. Figur 1 illustrerer systematisk udvalg, som kan anvendes ved telefoninterviews. Hver fjerde abonnent udvælges i eksemplet. Man starter med at vælge et tilfældigt tal mellem 1 og 4 og

derefter vælges hver fjerde.

Anderledes forholder det sig, hvis man vil have noget at vide om cellepopulationer. Det kan for eksempel dreje sig om bestemmelse af antallet af en bestemt type neuroner i hjernen. Der er oftest milliarder af celler af en given type, så tælling af dem allesammen er normalt ikke inden for rækkevidde. Hvordan tager man så en repræsentativ stikprøve, cellerne er jo ikke udstyret med et nummer fra naturens hånd.

Som stikprøve har det tidligere været forsøgt at anvende de celler, som ses i et vævsnit gennem cellepopulationen, som skitseret på figur 2. Dette er imidlertid problematisk, fordi store celler har en større sandsynlighed for at blive udvalgt. Det antal, vi ser i et snit, afhænger således ikke kun af det antal, der faktisk findes i populationen, men også af cellernes størrelse. Alle snit giver dermed et fordrejet billede af den 3-di-

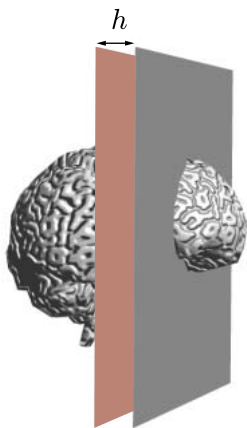
mensionale virkelighed!

I figur 3 er cellerne skiftet ud med Dalton brødrene. Lad os sige, at vi gerne vil bestemme hvor mange brødre, der findes, udfra hvad vi kan se på et snit (de vandrette linier i figur 3). Hvis vi ser bort fra hattene, vil vi på snittene se 0, 1, 2, 3, 4 og 4 brødre. Hvis vi derimod gør alle brødrene lige så korte som den korteste bror (Joe), vil vi se 0, 0, 0, 0, 4 og 4 brødre. Dvs. antallet vi ser på et snit afhænger ikke kun af, hvor mange der faktisk er, men også af, hvor store de er.

Tælling i 3D

Løsningen på dette problem er at se på ændringer fra et snit til det næste i stedet for at nøjes med at se på et enkelt snit ad gangen. Man tæller antallet af celler, der rammes af et snit (det såkaldte reference plan), men ikke af det næste (look-up planen), se figur 4. I en serie af parallelle snit tælles en celle i det første snit, hvor cellen ses. Eksempelvis, hvis snittene i figur 3 ordnes oppe fra og ned, vil Joe blive talt i præcis et snit – det næstsidste. Disse overvejelser, der efterhånden er 15 år gamle, har banet vej for 3-dimensionale tælle teknikker i mikroskoper, som bygger på optisk snitning, og som er simple end tidligere teknikker, der bygger på fysisk snitning.

I figur 5 er vist, hvordan tælling kan foregå. Figuren viser en model af mikroskopopstillingen. Nedenfor til ven-



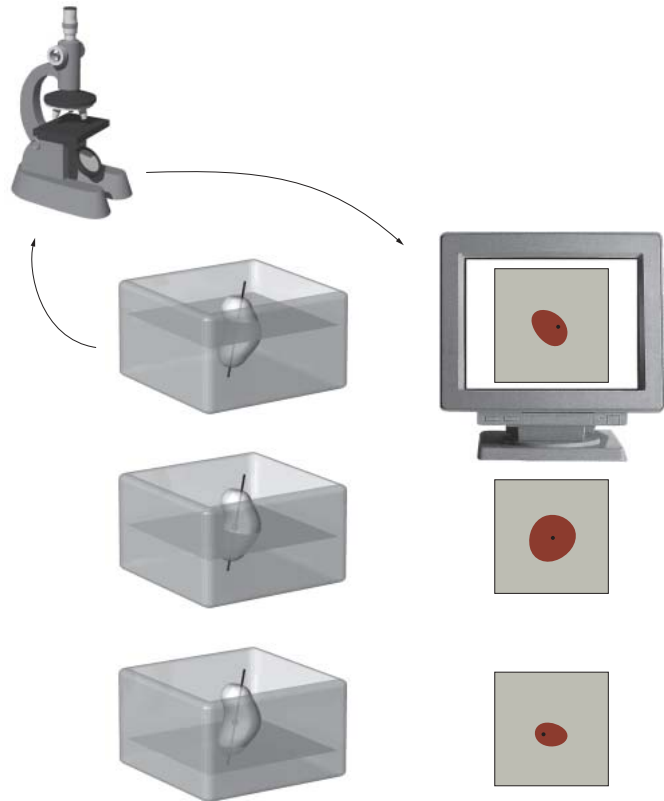
Figur 4. En disector består af et reference plan (gråt) og et look-up plan (rodbrun).

stre er vævsblokken vist forstøret, den indeholder kun en enkelt celle for at gøre det simpelt. På computerskærmen vises det aktuelle fokallplan. Ved at bevæge fokallplanet op og ned ændres billedet på computerskærmen, og vi genererer i virkeligheden et helt kontinuum af snit. Vi rejser faktisk igennem vævet. Tælling af celler foregår ved at anvende en tælleramme og starte i en eller anden dybde. Man tæller de celler, der derefter dukker op inden for tællerammen, når man fokuserer ned gennem vævet; celler, der skærer to fuldt optrukne linier i tællerammen, tælles dog ikke med. Denne måde at tælle på bygger på den såkaldte *leksikografiske* ordning i rummet.

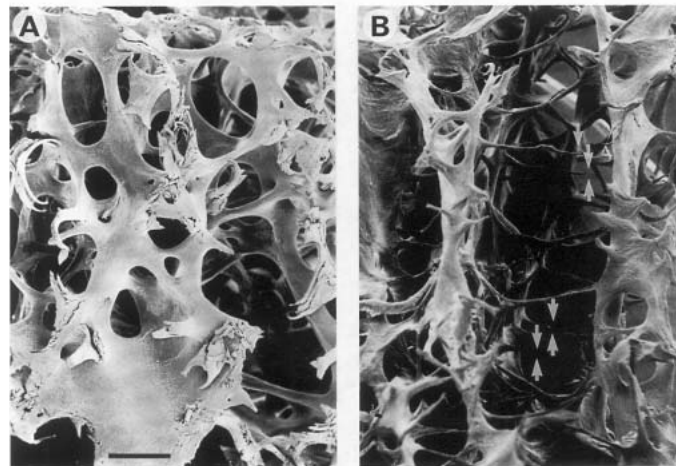
Metoderne kan også anvendes til at tælle cellekerner, synapsers og mange andre størrelser fra mikroskopens verden. Man har brugt tælle metoderne til at studere ændringer i hjernen i forbindelse med en række vigtige hjernelidelser så som Alzheimers og Parkinsons syge, for blot at nævne nogle eksempler.

I tabellen nedenfor er vist et andet eksempel på resultater, der kan opnås ved denne tælle teknik. Det drejer sig om en undersøgelse, som er offentliggjort i 1993 i tidsskriftet *The Lancet* af Grete Badsberg Jensen og Bente Pakkenberg fra Neurologisk Forskningslaboratorium, København. Titlen på deres artikel er: *Do alcoholics drink their neurons away?* eller på dansk: *Drikker alkoholikere deres neuroner væk?*

Det skønnede antal neuroner i milliarder kan ses i tabellen i forskellige områder af hjernebarken hos alkoholikere sammenlignet med en kontrolgruppe. Antallet i parentes angiver den relative usikkerhed på tallene. Totalt skønnes kontrolkerne har 23,2 milliarder i hjernebarken, mens alkoholikere har 23,4 milliarder. Taget usikkerheden i betragtning (vi har jo ikke talt dem allesammen), kan man således ikke påvise, at kroniske alkoholikere har færre neuroner end andre. Senere undersøgelser har vist, →



Figur 5. Illustration af optisk snitning af en celle. En linie gennem et reference punkt i cellen er også vist.



Figur 6. Et scanning-elektron-mikroskopisk-billede af en ryghvirvel fra en ung person (A) og en gammel person (B)

Kilde: Lis Mosekilde, J. of Bone and Mineral Research.

Middel antal neuroner (milliarder) i fire regioner af neocortex

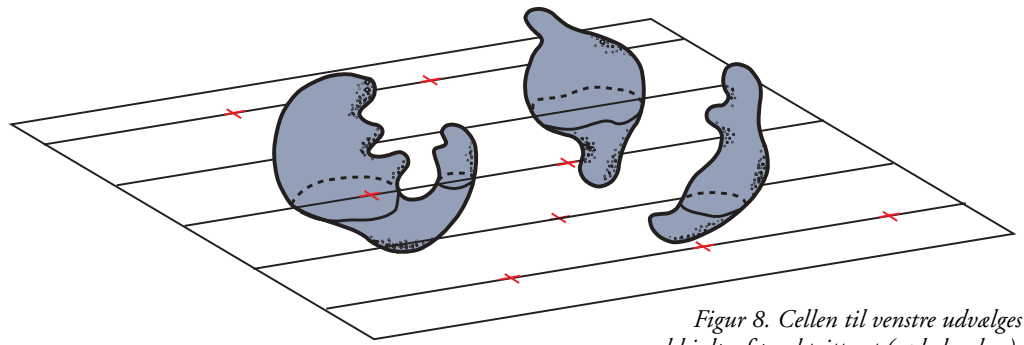
Region	Kontrol	Alkoholikere	P
Frontal	8,22 (0,18)	8,05 (0,23)	0,82
Temporal	5,34 (0,075)	4,93 (0,23)	0,27
Parietal	5,25 (0,22)	5,64 (0,095)	0,33
Occipital	4,42 (0,19)	4,83 (0,18)	0,28
Total neocortex	23,2 (0,12)	23,4 (0,12)	0,86

at antallet af støtteceller er noget nedsat, men de kan gendannes.

En videreudvikling af tælle- teknikkerne har ført til en stereologisk metode til bestemmelse af Euler tal. Dette kan bruges til at bestemme aldersforandringer af knoglevæv, som illustreret i figur 6. På figuren er vist scanning elektron mikroskopiske billeder af knoglevæv fra en ryghvirvel fra en ung person (A) og en ældre person (B). Billederne viser tydeligt aldersforandringerne af knoglevæv. Det er åbenbart, at der er sket en udtynding af de vandrette forbindelseslinier ved aldring, pilene viser steder, hvor forbindelseslinierne er helt afbrudt. Euler tal beskriver antal forbindelseslinier i et netværk.

Cellestørrelser

Det er også af interesse at finde størrelsen af cellerne. Tidligere teknikker har været baseret på antagelser om cellernes form, men alternative teknikker er blevet udviklet, som ikke afhænger af specifikke formantagelser. En klasse af sådanne teknikker er de såkaldte *lokale metoder*, som anvender information i et centralt snit gennem cellen, f.eks. gennem kernen eller en identificerbar delmængde af kernen, se figur 7. Boksen nederst giver et simpelt



Figur 8. Cellen til venstre udvælges ved hjælp af punktgitteret (røde krydser).

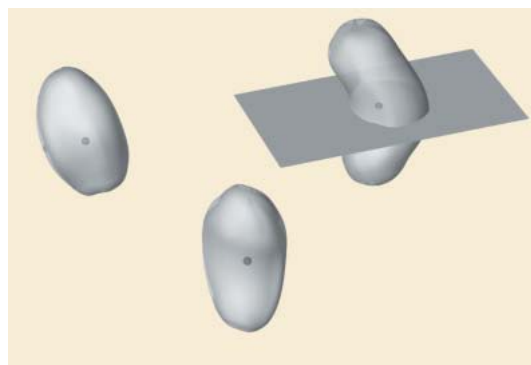
eksempel på en lokal metode til at skønne over arealet af en plan figur.

Vi har ovenfor understreget vigtigheden af at udvælge celler, så hver celle har den samme sandsynlighed for at blive udvalgt. Men i nogle situationer ønsker man at få fat i en speciel gruppe af celler, f.eks. de unor-

malt store, hvis man er igang med at undersøge, om der er cancer i en vævsprøve. Her kan det være en god ide at udvælge celler ved hjælp af et punktgitter, idet denne metode til udvælgelse vil favorisere de store celler, se figur 8. Disse teknikker kan anvendes ved vurderingen af "ondartetheden"

(*maligniteten*) af for eksempel brystcancer.

En rig samling af lokale stereologiske metoder er blevet udviklet til at skønne over cellestørrelser. For tiden er der 14 metoder af denne type, som bruges i forskningslaboratorier og hospitalslaboratorier, her i Danmark og i udlandet. Mere komplicerede typer af parametre kan også studeres. For eksempel er det muligt med lokale teknikker at studere interaktionen mellem cellepopulationer. Sådanne teknikker har været anvendt i hjerneforskning til at kvantificere fænomenet satellitosis, hvor støtteceller ligger samlet i en sky omkring neuroner.



Figur 7. Illustration af lokal snitning af celler.

Matematisk udviklingsarbejde

Bag de praktiske metoder til at bestemme cellestørrelser ved lokale stereologiske teknikker lig-

Udgangspunktet er Areal og Volumen

Vi har alle lært i skolen, at arealet af en cirkel er

$$a = \pi r^2$$

hvor r er cirkelns radius. I en vis forstand, nemlig statistisk, gælder dette resultat for mere generelle figurer i planen, for eksempel konvekse figurer. Lad os se på hvordan det kan gå til. Simple geometriske overvejelser giver at arealet af det skraverede område af den konvekse figur nedenfor kan beregnes som

$$d(a) = \frac{1}{2} r^2 d$$

hvor "radius" (afstanden) r og vinkelrummet $d\theta$ er vist på figuren. Arealet af hele figuren kan nu fås ved at integrere bidragene, og vi får

$$a = \int_0^{2\pi} \frac{1}{2} r^2 d = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} r^2 d = \pi \bar{r}^2$$

Ved andet lighedstegn har vi ganget og divideret med π , så integralet kan fortolkes som \bar{r}^2 , den gennemsnitlige radius i anden, når vi ser ud i en tilfældig retning. Man kan endda sige, at formelen gælder for ikke-konvekse figurer som vist, men da skal man selvfølgelig være omhyggelig med at specificere, hvad man forstår ved radius. Dette resultat kan benyttes til at at skønne over arealet ud fra en serie målinger af radier r_1, \dots, r_n udvalgt i n tilfældige retninger.

Arealskønnet bliver

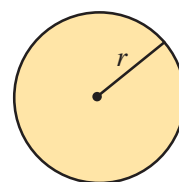
$$\hat{a} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i^2$$

altså π gange den observerede middelværdi af radius i anden.

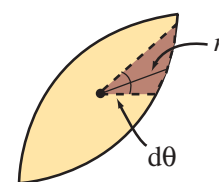
Tilsvarende kan man skønne over volumen af en celle ved at udnytte, at volumen kan beregnes som,

$$v = \frac{4}{3} \bar{r}^3$$

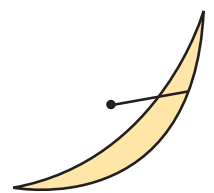
hvor \bar{r}^3 er den gennemsnitlige radius i tredje, når man kigger ud i en tilfældig retning i rummet. Hvor mange retninger, der skal til for at få et præcist skøn, afhænger af cellens form.



cirkel



konvex figur



ikke-konvex figur

ger et matematisk og statistisk forskningsarbejde. Det, der konkret skal bestemmes, er såkaldte "hitting probabilities"; eksempelvis skal man beregne, hvad sandsynligheden er for, at en tilfældig linie i rummet rammer et givet volumen element. Derefter er der standard teknikker inden for stikprøveteorien til at udlede skøn over celledørrelsen.

For at kunne udlede lokale stereologiske skøn over længde og overfladeareal viste det sig sidst i 1980'erne, at de eksisterende integralgeometriske formler ikke var tilstrækkelige. Det var nødvendigt at generalisere en gammel formel fra 1930'erne, som normalt tilskrives den tyske matematiker Blaschke og russeren Petkantschin. Det lykkedes omkring 1990, efter et par års forskningsarbejde, at udlede den nødvendige formel i samarbejde med matematikeren Kiên Kiêu fra Paris. Formlen kaldes den generelle Blaschke-Petkantschin formel. Det første bevis for denne formel var ret uigennemskueligt og langt; det byggede på kompliceret geometrisk målteori. Senere er det lykkedes at udlede et simpelt induktionsbevis.

Stereologiens rødder

Stereologiens begyndelse går tilbage til 1700-tallet, nærmere til en fransk greve, Georges-Louis Leclerc Buffon. Buffon er ikke gået over i historien som matematiker eller statistiker, for hans hovedindsats var som naturhistoriker. Her var han vel den dominerende person i sidste halvdel af 1700-tallet. Men i 1733 skrev han en afhandling, som kan siges at være startskuddet til stereologien. Forenklet kan man sige, at Buffon arbejdede med problemet om, hvad der sker, når man kaster en nål op i luften, og lader den falde ned på et bræddegulv. Hvor ofte falder den sådan, at den kommer til at krydse en revne mellem to gulvbrædder? Det kommer naturligvis an på, hvor lang nålen er, og på hvor brede gulvbrædderne er. Buffon fandt frem til sandsynligheden for, at en nål krydser en revne. Meto-

Den generelle Blaschke-Petkantschin-formel

$$c(n-q-r, p-q-r) \int_{\mathcal{X}_1} \cdots \int_{\mathcal{X}_q} g(x_1, \dots, x_q) \prod_{i=1}^q dx_i^{d_i} \\ = \int_{\mathcal{L}_{p(r)}^n} \int_{\mathcal{X}_1 \cap L} \cdots \int_{\mathcal{X}_q \cap L} g(x_1, \dots, x_q) \\ \times \nabla_{r+q}(e_1, \dots, e_r, x_1, \dots, x_q)^{n-p} \\ \times \prod_{i=1}^q G(\tan[\mathcal{X}_i, x_i], L_p)^{-1} \prod_{i=1}^q dx_i^{d_i-n+p} dL_p^n(r)$$

Denne lidt komplicerede formel anvendes ved bestemmelse af lokale stereologiske skøn over længde og overfladeareal. Udtrykt i fagsprog drejer formelen sig om "en geometrisk dekomposition af Hausdorff mål."

den kan i princippet bruges til at måle, hvor lang nålen er, hvis man ved, hvor brede gulvbrædderne er, eller hvor brede gulvbrædderne er, hvis man ved hvor lang nålen er. En videreudvikling af Buffon's resultat har ført til en stereologisk metode til bestemmelse af længden af rumlige kurver.

Interdisciplinær videnskab

Anvendelsesmulighederne for stereologien er ikke begrænset til biologien eller lægevidenskaberne. Stereologi anvendes eksempelvis også inden for geologi, landbrugsvidenskab og materialeteknologi. Ikke sjældent er væsentlige stereologiske teknikker opfundet

uafhængigt af hinanden i forskellige discipliner. For at koncentrere indsatsen blev i 1962 *International Society for Stereology* dannet.

Nye udfordringer

Man forsøger til stadighed at besvare nye spørgsmål i stereologien. Nye, mere komplicerede parametre, studeres såsom gradienter i cellepopulationer og cellernes formændringer. Det sidste kan være interessant i forbindelse med cancerdiagnostik. Desuden åbner den konfokale mikroskopi nye muligheder for observation. Der arbejdes også på at kombinere semiautomatiske metoder med automatisk billedanalyse. ©



Om forfatteren

Eva B. Vedel Jensen er forskningsprofessor ved StocLab (Laboratoriet for Computer Stokastik) Institut for Matematiske Fag Aarhus Universitet Ny Munkegade, Bygn. 530 8000 Århus
E-mail: eva@imf.au.dk
<http://www.imf.au.dk/stoclab>

Eva B. Vedel Jensen modtog direktør Ib Henriksens Forskerpris på 200.000 kr. i 1999 for sit arbejde med teoretisk stereologi. Afsnittet om stereologiens rødder er baseret på det materiale, der i samarbejde med professor Peder Olesen Larsen blev udarbejdet i forbindelse med prisoverrækkelsen. Vedel Jensen er desuden forfatter til bogen "Local Stereology", som udkom i 1998.

Forskergruppen

Gruppen af stereologer er centreret omkring forskningsprofessor Eva B. Vedel Jensen, Institut for Matematiske Fag, Aarhus Universitet, professor Hans Jørgen G. Gundersen, Stereologisk Forskningslaboratorium, Aarhus Universitet, og laboratorieleder Bente Pakkenberg, Neurologisk Forskningslaboratorium, Københavns Universitet.

Gruppen er interdisciplinær og omfatter: matematikere, statistikere, neurologer og cancerlæger. De udviklede stereologiske metoder bliver kendt blandt brugere via kurser verden over. Der samarbejdes med Olympus Danmark, specielt udviklingschef Morten Bech, om implementationen af metoderne i mikroskopierne.

De tællemetoder, der er udviklet af gruppen, opfattes i videnskabelige kredse som meget væsentlige. Således stiller en række førende lægevidenskabelige tidsskrifter (f.eks. *Jour. of Comparative Neurology*, *Neurobiology of Aging*, *Jour. of the American Society of Nephrology*) som krav, at netop disse tællemetoder bliver anvendt i artikler, som vedrører tællinger. En del af udviklingsarbejdet er i de senere år foregået i Laboratoriet for Computer Stokastik, Institut for Matematiske Fag, Aarhus Universitet.

Red.

Yderligere læsning:

G. Badsberg Jensen, B. Pakkenberg: Do alcoholics drink their neurons away? *The Lancet* 342: 1201-1204 (1993).

L. Mosekilde: Consequences of the remodelling process for vertebral trabecular bone structure: a scanning electron microscopy study (uncoupling of unloads structures). *Bone Miner.* 10: 13-35 (1990)