Archive of SID

مقاله تحقیقی

# مقایسه سه روش رنگ آمیزی مقاطع ویبرتومی و پارافینی درحفظ ضخامت بافت هیپوکامپوس رت

**فاطمه حاجی مقصودی.M.Sc*، محمد حسینی شریف آباد.Ph.D*، علی کریم زاده .M.D****

* گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی

** دستیار بیماریهای داخلی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ ارسال: اسفند ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۸۷

## چکیده

**هدف:** تعیین روش مطلوب برای حفظ ضخامت برشهای ویبرتومی هیپوکامپوس

**مواد و روشها:** این مطالعه تجربی روی هیپوکامپوس سه رت انجام گرفت. یک هیپوکامپوس به روش پارافینی قالب گیری و با میکرتوم چرخان ٤٠ برش با ضخامت ١٠٠ میکرون تهیه و به روش معمولی رنگ آمیزی شد. از دو هیپوکامپوس دیگر ٨٠ برش به ضخامت ١٠٠ میکرون با دستگاه ویبرتوم بریده شد که در دو گروه ٤٠ تایی به روش معمولی و روش رنگ آمیزی شناور و قالب گیری در رزین با تیونین رنگ آمیزی شدند. سپس به کمک دستگاه میکروکاتور که به میکروسکوپ متصل است ضخامت برشها را اندازه گیری نموده و توزیع نورونها در ضخامت برش ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میانگین و انحراف معیار به ترتیب در مقاطع ویبرتومی رنگ شده به روش شناور و به روش معمول ٦/١٨ ± ٧٤/٥ و ٤/٣٣ ± ٤١/٢ میکرون و مقاطع پارافینی ٥/٩٥ ± ٤٦/٣ است. همچنین یافته ها نشانگر آن است که در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای ویبرتومی که به طور شناور رنگ آمیزی شده بودند تراکم سلولی کمتر است اما در ٧٠ درصد میانی ضخامت برش تراکم تقریباً یکنواخت است و در برشها با رنگ آمیزی معمولی سطوح فوقانی و تحتانی تراکم سلولی بیشتری دارند. اما در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای پارافینی تراکم نورونی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم نورونی کمتر و غیر یکنواخت است.

**نتیجه‌گیری:** حساس ترین مرحله رنگ آمیزی معمولی برشهای ویبرتومی زمانی است که برای خشک شدن در معرض هوا و روی لام قرار می گیرند که این عمل منجر به کاهش غیر قابل بازگشت ضخامت برش می شود اما در روشی که برش در رزین قرار داده می شود، چون در هیچ یک از مراحل مختلف رنگ آمیزی، برشها در معرض هوا قرار نمی گیرند کاهش ضخامت برش به حداقل می‌رسد. از طرفی توزیع یکنواخت نورونها در بخش اعظم ضخامت برش، محاسبه استریولوژیک تعداد نورون را در هیپوکامپوس با استفاده از برشهای ویبرتومی میسر می‌سازد.

**کلیدواژه‌ها:** برشهای ویبرتومی، ضخامت، فشردگی

آدرس مکاتبه: یزد بلوار دانشجو دانشگاه علو م پزشکی شهید صدوقی، صندوق پستی ٦٣٨

E-mail: mhosseini81@yahoo.com

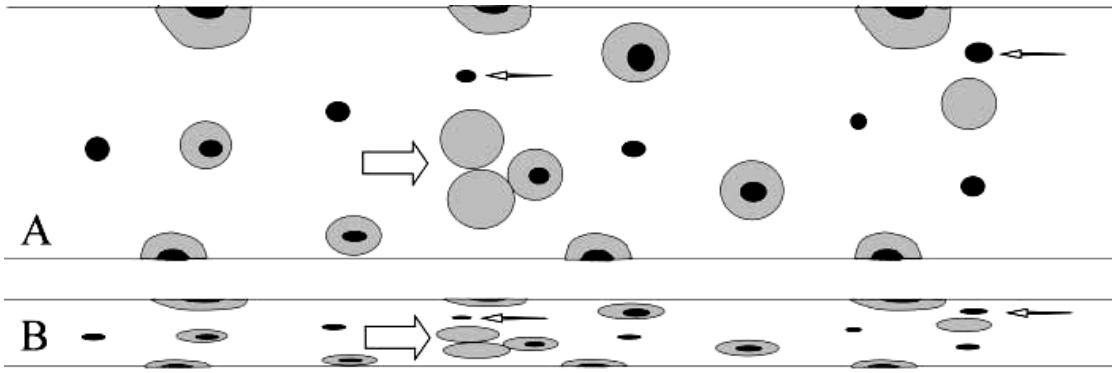


www.SID.ir

Archive of SID


## مقدمه

امروزه روشهای استریولوژی (مطالعه سه بعدی بافت) برای کسب اطلاعات کمی بدون تورش(Unbiased) از سلولها، بافتها، ارگانها وارگانیزمها کاربرد فراوانی دارد [۱]. این گونه اطلاعات دقیق برای ارزیابی پیشرفت بیماریهای دژنراتیو، یا ارزیابی مداخلات مکانیکی و فارماکولوژیکی در مطالعات بیولوژیک اهمیت زیادی دارند. برای بررسی تغییرات کمی پارامترهای مختلف باید از ساختمانهای مورد نظر برشهای بافتی تهیه شده و به کمک میکروسکوپ مطالعه شود. به کارگیری برخی روشهای استریولوژی که بر نمونه گیری یکنواخت اجزا در ضخامت بافت (که اصطلاحاً دایسکتور اپتیکال (Optical Disector) نامیده می شود) مستلزم تهیه برشهای ضخیم بافتی (با ضخامت ۲۵ میکرون و بالاتر) هستند [۲] امکان تهیه چنین برشهایی به وسیله اغلب روشهای متداول تهیه برش بافتی وجود دارد. امروزه در آزمایشگاههای نوروساینس بوفور از دستگاه ویبرتوم (Vibratome) برای تهیه مقاطع بافتی ضخیم مغز استفاده می شود. برای تهیه مقاطع ویبرتومی، نیازی به طی مراحل آماده سازی بافت نیست بنابراین نسبت به سایر روشهای تهیه مقطع بافت شناسی روشی آسان، سریع و ارزان است. و به علاوه، در روشهای ایمونوهیستو شیمیایی، اغلب آنتی بادیها در این مقاطع نفوذ می کنند [۳] . علیرغم این مزایا عیب این روش ان است که مقاطع ویبرتومی در روند رنگ آمیزی، دچار تغییر شکل و کلاپس می شود که تفکیک و باز شناسی سلولها و به تبع آن نمونه گیری یکنواخت اجزاء را مخصوصاً در مناطق پر سلول مغز مانند هیپوکامپوس با مشکل مواجه می کند (شکل ۱). هیپوکامپوس بخشی از مغز است که در فرایند یادگیری و حافظه نقش اساسی دارد و مورد آزمایشهای فراوان تجربی است [٤]. اما با توجه به نقیصه ذکر شده، در مطالعات مورفومتریک هیپوکامپوس از برشهای ویبرتومی کمتر استفاده می شود و در صورت استفاده به دلیل تغییر شکل بافت، داده های حاصل دارای تورش بوده و قابل استناد نیست. بنابراین به کارگیری روشی در رنگ آمیزی برشهای ویبرتومی که به حفظ ضخامت بیانجامد یا لااقل کاهش ضخامت بافت به صورت یکسان و یکنواخت باشد کمک شایانی به مطالعات مربوطه می کند. بنابراین، این مطالعه با هدف جستجوی روشی ایده ال در رنگ آمیزی برشهای ویبرتومی برای حفظ ضخامت بافت و مقایسه آن با برشهای معمول پارافینی صورت گرفت.




**شکل ۱.** شکل عدم تفکیک و شناسایی سلولها در برشهای کلاپس (فشرده) شده

**A-** برشی را نشان می دهد که پیش از انجام رنگ آمیزی قرار داشته و ضخامت اصلی خود را دارد. سلولها ( فلش) به راحتی شناسایی و شمرده می شوند.

**B-** برش مذکور را پس از خشک شدن در معرض هوا نشان می دهد که دچار کاهش ضخامت شده و سلولها به راحتی قابل تفکیک و شمارش نیستند


www.SID.ir

Archive of SID


## .مواد و روشها

یک رت نر دو ماهه از نژاد ویستار را با تزریق داخل صفاقی اورتان بیهوش نموده و با پرفیوژن داخل قلبی محلول فرمالدئید ٤ درصد، گلوتارالدئید ۱ درصد در بافر فسفات، مغز تثبیت و از جمجمه بیرون آورده و در ظرفهای محتوی ماده تثبیت کننده نگهداری شد تا کاملا تثبیت شود. مغز را با یک برش میانی به دو نیمه تقسیم کرده و یکی از نیمکره های مغز برای تهیه مقاطع ویبرتومی و دیگری برای تهیه مقاطع پارافینی استفاده شد.

برای تهیه مقاطع ویبرتومی از بخش خلفی مغز که حاوی هیپوکامپوس است برشها یی با ضخامت ۱۰۰ میکرون با دستگاه ویبرتوم کالیبره شده تهیه و در ظرف محتوی تثبیت کننده جمع آوری و مقاطع ویبرتومی به دو روش به شرح زیر رنگ آمیزی شد.

**روش اول**: مقطع روی لام ژلاتینه چسبانده شد و پس از خشک شدن. ا با تیونین ۰/۱ درصد رنگ نموده سپس با الکلهای درجه بندی شده آبگیری و در گزیلل شفاف شده و در نهایت لامل با انتلان چسبانده شد.

**روش دوم**: مقطع ویبرتومی در سبد مخصوص قرار داده شد و پس از رنگ نمودن و شستشوی رنگ اضافی، در الکلهای درجه بندی آبگیری و پس از شفاف نمودن در گزیلل به مدت سه ساعت در ظرف محتوی اپوکسی رزین قرار داده شد و سپس روی لام منتقل و به مدت ۱۲ ساعت در درجه حرارت ٦۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا رزین پلیمریزه شود.

برای تهیه مقاطع پارافینی، پس از طی مراحل آماده سازی بافتی روی هیپو کامپ، مقاطع در پارافین قالب گیری و با میکرتوم روتاری از آن برشهایی به ضخامت ۱۰۰ میکرون تهیه و روی لام ژلاتینه منتقل شد. برای رنگ آمیزی، پس از حل نمودن پارافین موجود در بافت با گزیلل، در تیونین ۰/۱درصد قرار داده شدند، پس از شستشوی رنگ اضافی،با آب، با الکلهای درجه بندی شده آبگیری شده، در گزیلل شفاف شده و با چسب انتلان لامل روی آن چسبانده شد.

در نهایت برشهای رنگ شده به کمک میکروسکوپی که به ضخامت سنج با دقت ۰/۵ میکرون مجهز بود بررسی شده و ضخامت هر برش اندازه گیری و ثبت شد. برای بررسی چگونگی توزیع نورون در ضخامت برشها، با لنز روغنی میکروسکوپ، برشها از سطح به عمق سیر شده و تعداد هسته های نورونی که به دید می آمدند با یادداشت ضخامت ناحیه شمارش، ثبت شد. ضخامت نهایی هر برش به ده دهک (۰ تا ۱۰۰ درصد) تقسیم نموده و تعداد نورون در هر دهک محاسبه شد. ابعاد نمونه برداری به گونه ای انتخاب شد که در هر روش بیش از ٤۰۰ نورون شمرده شود.

داده ها به وسیله نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و از آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه میانگین استفاده شد.

## یافته ها

اطلاعات نشان داد که حداقل و حداکثر ضخامت نهایی برشهای ویبرتومی که به روش شناور رنگ آمیزی شده اند به ترتیب ٦۲/۳ و ۸٦/۹ میکرون است، در حالی که این میزان در برشهای ویبرتومی رنگ آمیزی شده به روش معمولی ۳۳/۹ و ۳/ ٤۹ میکرون است. حداقل و حداکثر ضخامت نهایی برشهای پارافینی نیز ۳٦/۰ و ۵۸/۵ میکرون بود.

مقادیر میانگین ضخامت، انحراف معیار، ضریب تغییرات و خطای معیار میانگین در جدول یک آورده شده است. میانگین و انحراف معیار به ترتیب در مقاطع ویبرتومی رنگ شده به روش شناور و به روش معمول ٦/۱۸ ± ۷٤/۵ و ٤/۳۳ ± ٤۱/۲ میکرون و در مقاطع پارافینی ۵/۹۵ ± ٤٦/۳ است.


www.SID.ir

Archive of SID


جدول ۱. نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین میانگین ضخامت نهایی برشها در دو روش مورد مطالعه وجود دارد (p=0.000).

نمودار ۱ نشان می دهد که در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای ویبرتومی که به طور شناور رنگ آمیزی و در داخل رزین قالب گیری شده بودند تراکم سلولی کمتر است اما در ۷۰ درصد میانی ضخامت برش تراکم تقریباً یکنواخت است و نمودار ۲ چگونگی توزیع نورونها در ضخامت برشهای ویبرتومی که به روش معمول تهیه شده اند را نشان می دهد.

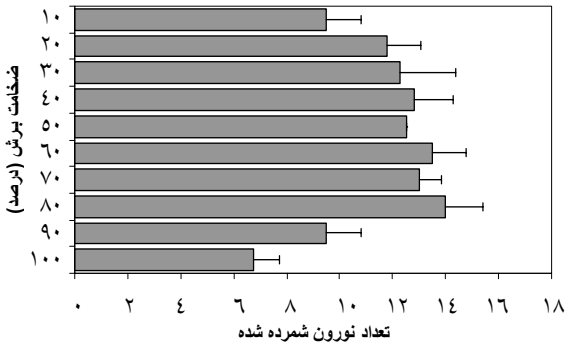
بر اساس آن در سطوح فوقانی و تحتانی برش تراکم سلولی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم تقریباً یکنواختی وجود داشته است. و نمودار ۳ نشان می دهد که در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای پارافینی تراکم نورونی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم نورونی کمتر و غیر یکنواخت است.

شکل ۲ نیز تراکم هسته نورونهای CA3 هیپوکامپوس را در سه روش رنگ آمیزی در سطوح فوقانی و تحتانی و مرکز برش نشان می دهد.

**جدول ۱.** مقادیر میانگین ضخامت، انحراف معیار، ضریب تغییرات و خطای معیار میانگین برشهای مورد مطالعه

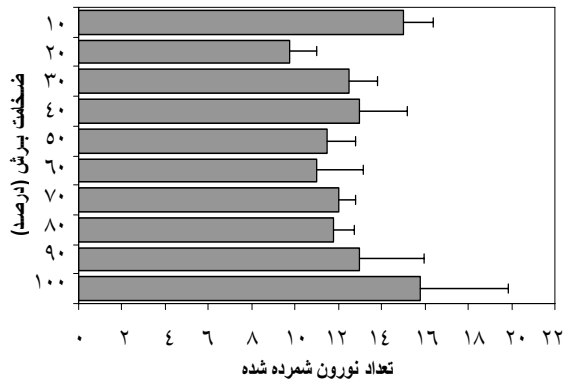
| | **برشهای ویبرتومی (رنگ آمیزی شناور و قالب گیری در رزین)** | **برشهای ویبرتومی (رنگ آمیزی معمول)** | **برشهای پارافینی (رنگ آمیزی معمول)** |
|---|---|---|---|
| میانگین و انحراف معیار | ۷٤/۵±٦/۱۸ | ٤۱/۲±٤/۳۳ | ٤٦/۳±۵/۹۵ |
| ضریب تغییرات | ۰/۰۸ | ۰/۱۰ | ۰/۳ |
| خطای معیار میانگین | ۰/۹۸ | ۰/٦۹ | ۰/۹٤ |

p=۰/۰۰۰




**نمودار۱.** توزیع نورونها در ضخامت برشهای ویبروتومی هیپوکامپوس رت (رنگ آمیزی به روش شناور وقالب گیری در رزین)

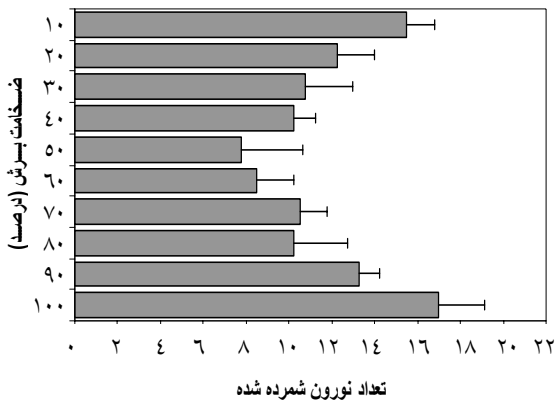
تعداد کل نورون شمرده شده ٤٦۲ عدد است. سطح فوقانی برش (که مجاور لامل است) ۱۰ درصد است و سطح پایینی برش (که مجاور لام است) ۱۰۰ درصد است. در سطوح فوقانی و تحتانی این برشها تراکم نورونی کمتر و در نواحی مرکزی، تراکم نورونی بیشتر و تقریباً یکنواخت است.




**نمودار ۲.** توزیع نورونها در ضخامت برشهای ویبروتومی هیپوکامپوس رت (رنگ شده به روش معمولی)


www.SID.ir

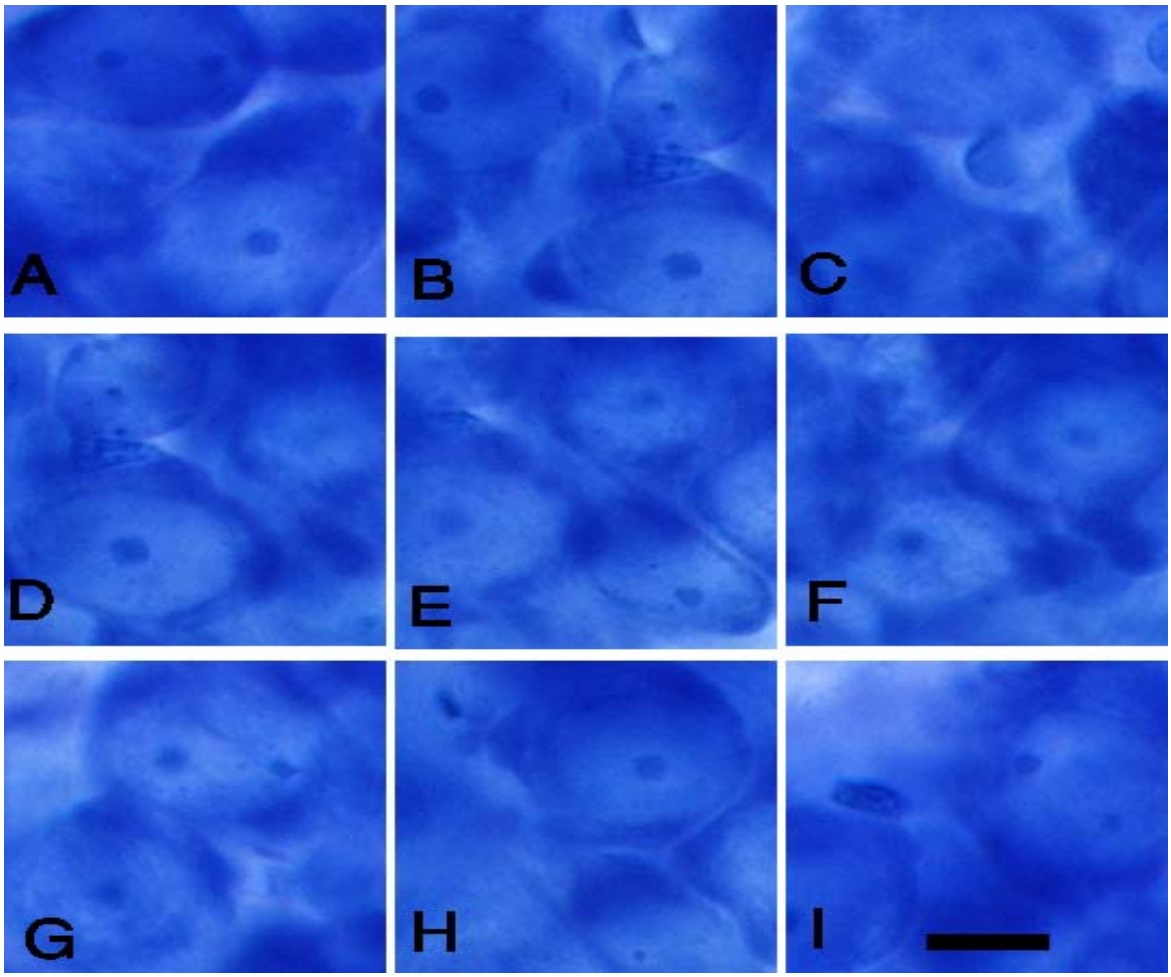
Archive of SID


**نمودار ۳.** توزیع نورونها درضخامت برشهای پارافینی از هیپوکامپوس رت

تعداد کل نورون شمرده شده ۵۰۱ عدد است. سطح فوقانی برش (که مجاور لامل است) ۱۰درصد است و سطح پایینی برش (که مجاور لام است) ۱۰۰درصد است. در سطوح فوقانی و تحتانی این برشها تراکم نورونی بیشتر و در نواحی مرکزی، تراکم نورونی کمتر و تقریباً یکنواخت است.

تعداد کل نورون شمرده شده ٤۷٤ عدد است. سطح فوقانی برش (که مجاور لامل است) ۱۰درصد است و سطح پایینی برش (که مجاور لام است) ۱۰۰درصد است. در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای پارافینی تراکم نورونی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم نورونی کمتر و غیر یکنواخت است.




**شکل ۲.** تصویر نورون CA3 هیپوکامپوس رت بالغ.

برشهای پارافینی با رنگ آمیزی معمولی (A-C)، برشهای ویبرتومی با رنگ آمیزی معمولی (D-F)، برشهای ویبرتومی با رنگ آمیزی شناور (G-I)

موقعیت هسته‌ها درضخامت برشها: سطح بالایی برش (A,D,G)، بخش مرکزی برش(B,E,H) و سطح پایینی برش(C,F,I)، مقیاس ۱۰ میکرون


www.SID.ir

Archive of SID


## بحث

یافته‌ها نشانگر آن است که در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای ویبرتومی که به طور شناور رنگ آمیزی و در داخل رزین قالب گیری شده بودند تراکم سلولی کمتر است اما در بخشهای میانی ضخامت برش تراکم نورونی تقریباً یکنواخت است؛ در توجیه تراکم کمتر سلولها در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای ویبرتومی که به روش شناور رنگ شده اند می توان گفت در دو سطح برش به وسیله تیغ برش سلولهای زیادی پاره شده و در مراحل رنگ آمیزی، هسته های آنها از سلول خارج شده اند؛ بنابراین تراکم سلولی در سطوح کمتر است [۵-۱۱].

در ضخامت برشهای ویبرتومی که به روش معمول تهیه شده اند در سطوح فوقانی و تحتانی برش تراکم سلولی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم تقریباً یکنواختی وجود داشته است. درتوضیح علت افزایش تراکم سلولی در سطوح بالایی و پایینی این برشها می توان به عامل فشردگی بافت اشاره نمود که انقباض و فشرده شدن سطوح باعث افزایش تراکم سلولی در این نواحی می شود. واضح است که در مطالعات مورفومتریک اگر نمونه گیری از سطوح مورد اشاره در هر دو روش مذکور انجام گیرد، به دلیل آنکه این تراکم سلولی (کم یا زیاد) بیانگر توزیع نرمال نورونی در ضخامت بافت نیست، نتایج unbiased نیست.

اندرسون (Andersen) وگاندرسون (Gundersen)در سال ۱۹۹۹ برشهای ویبرتومی به ضخامت ۱۰۰ میکرون را از هسته دندانه ای مخچه انسان تهیه و به روش معمول رنگ آمیزی نمودند. ضخامت نهایی این برشها حدود ٤٤ میکرون بود و در سطوح فوقانی و تحتانی آن تراکم سلولی کمتر از مرکز بود [۵] .

در سال ۲۰۰۱ در مطالعه ای دورف پیترسون (Dorph-Petersen) برشهای ویبرتومی از هسته رافه ساقه مغز انسان به ضخامت ۱۰۰ میکرون تهیه و به روش معمولی رنگ آمیزی نمود. پس از رنگ آمیزی معلوم شد که ضخامت نهایی برشها به حدود ۱٦ تا ۳۹ میکرون کاهش یافته است [٦].

اما در بررسی دیده شد که در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای پارافینی تراکم نورونی بیشتر و در نواحی مرکزی تراکم نورونی کمتر و غیر یکنواخت است. هاتن(Hatton) و همکارانش در همین سال گزارشی منتشر نمودند که نشان می داد رنگ آمیزی برشهای پارافینی منجر به توزیع نامتقارن نورونها در ضخامت برشهای مذکور شده است به نحوی که در دو سطح بالایی و پایینی این برشها در مقایسه با ناحیه مرکزی تعداد بیشتری نورون قرار گرفته اند [۷].

نتایج این مطالعه از آن نظر اهمیت دارد که برای اولین بار برشهای ویبرتومی ضخیم از هیپوکامپوس تهیه و چنان مراحل رنگ آمیزی اصلاح شده است که پس از رنگ آمیزی کمترین کاهش ضخامت را داشته است، علاوه بر این توزیع نورونها در بخش بزرگی از ضخامت بافت یکنواخت بوده است که در مجموع، این دو خصوصیت باعث می شود که این برشها برای مطالعات مورفومتریک کاملاً مناسب باشند چرا که با حفظ ضخامت بافت به راحتی سلولها از یکدیگر قابل تشخیص بوده و می توان آنها را شمارش نمود. از طرفی توزیع یکنواخت نورونها در بخشهای مرکزی بافت که در روش دایسکتور اپتیکال برای نمونه برداری مورد استفاده قرار می گیرد موجب می شود که محاسبه تعداد نورونها بدون تورش باشد.

این روش بر برشهای پلاستیک که به خاطر تغییر شکل ناچیز اغلب برای تهیه برشهای ضخیم مورد استفاده قرار می گیرد این مزایا را دارد که علاوه بر سریع، آسان و ارزان بودن به راحتی می‌تواند در رنگ آمیزیهای ایمونوهیستوشیمیایی به کار رود چون که آنتی بادی ها به آسانی در برشهای


www.SID.ir

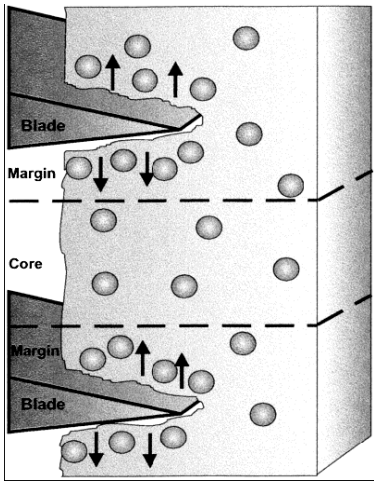
Archive of SID


پلاستیک نفوذ نمی کنند. اما در این برشهای ویبرتومی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی قبل از قرار دادن برش در رزین انجام می شود و بنابراین آنتی بادی به راحتی در بافت نفوذ می کند. همچنین وقتی که آنتی ژنهای مورد نظر به دهیدراتاسیون (به منظور قالب گیری بافت) حساسند روشهایی که مستلزم قالب گیری هستند (مثل پارافینی و پلاستیک) مناسب نیستند ودر این موارد می توان از روش ویبرتومی استفاده نمود [۸].

در برشهای ویبرتومی که به روش معمول رنگ شده اند، با آنکه تراکم در بخش مرکزی بافت تاحدودی یکسان است اما کاهش زیاد ضخامت بافت باعث می شود که تفکیک سلولها و شمارش نورونها در لایه های سلولی هیپوکامپوس فوق العاده مشکل باشد. بنابراین استفاده از این روش رنگ آمیزی در برشهای ضخیم هیپوکامپوس پیشنهاد نمی شود گرچه برای مطالعات مورفومتریک نواحی کم سلول مغز می تواند مفید و ارزشمند باشد. نقطه قوت این روش در مقایسه با روش شناور، سریع، راحت و ارزان بودن آن است. گاردلا (Gardella) و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان فشردگی در ضخامت مقاطع ویبرتومی، پلاستیک و انجمادی از هسته های زوج سوم مغزی جنین جوجه را با هم مقایسه کردند. آنها در مطالعه اشان نشان دادند که ضخامت نهایی برشهای ویبرتومی که به روش معمول رنگ شده بودند از ۱۰۰ به حدود ٤٧ میکرون کاهش یافته است و توزیع نورون در ضخامت برشهای ویبرتومی غیر یکسان است و این مقدار در سطوح بیش از مرکز است. علاوه بر این توزیع نورونی در بخشهای مرکزی برش هم غیر یکنواخت است. آنها در همین مطالعه توزیع نورونی را در برشهای پارافینی بررسی نمودند و توزیع غیر یکنواخت و نوسانی نورونها را در بخشهای مرکزی برش گزارش نمودند. یافته ای که نتایج مطالعه ما هم آن را تایید می کند [۹].

در برشهای پارافینی تراکم نورونی در نواحی مرکزی بافت، غیر یکنواخت و نوسانی و کمتر از سطوح فوقانی و تحتانی است. بنابراین برای محاسبه استریولوژیک تعداد ذرات خیلی مناسب نیست. کاهش و افزایش نوسانی تراکم سلولی در مرکز بافت ممکن است در ارتباط با کاهش یا افزایش فشردگی در این نواحی باشد [۹].

اخیراً هم در مطالعه ای که توسط باریشین کوا (Baryshinikova) و همکارانش (۲۰۰٦) انجام شده، معلوم شده است که اندازه ضخامت برشهای ویبرتومی بعد از رنگ آمیزی معمولی از ۱۰۰ میکرون به ٥٦/۲ میکرون و ضخامت برشهای پارافینی از ٤٠ میکرون به ۳۰/۳ میکرون کاهش یافته است [۱۰]. در این مطالعه در سطوح فوقانی و تحتانی برشهای ویبروتومی کاهش تراکم نورونی و نیز در نواحی مرکزی برشهای پارافینی توزیع نوسانی نورونها گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.




**شکل۳.** اثر تیغ برش بر توزیع ذرات در ضخامت برش بافتی
تیغ هنگام برش باعث فشردگی لبه های بالایی و پایینی برش می شود. بنابراین تراکم ذرات در سطوح فوقانی و تحتانی برش نسبت به مرکز بیشتر می شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که روشهای رنگ آمیزی بر میانگین ضخامت نهایی برشهای ویبرتومی و پارافینی تاثیر معنی داری


www.SID.ir

Archive of SID


دارد به طوری که برشهای ویبرتومی که به روش شناور رنگ شده و در رزین قرار گرفته اند در مقایسه با برشهای پارافینی و نیز برشهای ویبرتومی که با روش معمول رنگ شده اند ضخامت بیشتری دارند.

۱- حساس ترین مرحله رنگ آمیزی معمولی برشهای ویبرتومی زمانی است که برای خشک شدن در معرض هوا و روی لام قرار می گیرند که این عمل منجر به کاهش غیر قابل بازگشت ضخامت برش می شود. اما در روشی که برش در رزین قرار داده می شود، چون در هیچ یک از مراحل مختلف رنگ آمیزی، برشها در معرض هوا قرار نگرفته و به صورت شناور در محلولها قرار دارند. کاهش ضخامت برش به حداقل می رسد و این روش برای رنگ آمیزی برشهای ویبرتومی پیشنهاد می شود.

۲- در محاسبات استریولوژیک برای تخمین تعداد ذرات قبل از انجام مورفومتری، یک آنالیز از نحوه توزیع ذرات در ضخامت برشهای تهیه شده (با هر روش تهیه برش) ضرورت دارد.

## References


1. **Larsen JO. Gundersen HJG.** Global spatial sampling with virtual plane. J microsc 1998; 191: 238-48.
2. **Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen, N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ.** The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96: 857-81
3. **Dorph-Petersen KA, Rosenberg R, Nyengaard JR.** Estimation of number and volume of immunohistochemically stained neurons in complex brain regions. In: Evans SM, Janson AM, Nyengaard JR, editors. Quantitative methods in neuroscience. A neuroanatomical approach. Oxford, Oxford University Press 2004, pp 231–2.
4. **Eichenbaum H. The hippocampus and mechanism of declarative memory.** Behav Brainres 1999; 103: 123-33.
5. **Andersen BB, Gundersen HJG.** Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. J Microsc 1999; 196: 69-73.
6. **Dorph–Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG.** Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc 2001; 204: 232–46.
7. **Hatton WJ, von Bartheld CS.** Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. J. Comp. Neurol 1999; 409: 169-86.
8. **Stuart DA, Oorschot DE.** Embedding, sectioning, immunocytochemical and stereological methods that optimise research on the lesioned adult rat spinal cord. J Neurosci Methods 1995; 61: 5-14.
9. **Gardella D, Hatton WJ, Rind HB, Rosen GD, Batheld CHS.** Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis implications for optical dissector counting in vibratome, plastic and cryosections. J Neurosci Method 2003; 124: 45-59.
10. **Baryshnikova LM, Von Bohlen Und Halbach O, Kaplan S, Von Bartheld CS.** Two distinct events, section compression and loss of particles ("lost caps"), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting. Microsc Res Tech 2006; 69: 738-56.
11. **Dorph-Petersen KA, Rosenberg R, Nyengaard JR.** Estimation of number and volume of immunohistochemically stained neurons in complex brain regions. In: Evans SM, Janson AM, Nyengaard JR, editors. Quantitative Methods in Neuroscience. A Neuroanatomical Approach. Oxford: Oxford University Press 2004, pp 231–2.



www.SID.ir