



Sağlık Alanında Kullanılan Kantitatif Yöntem, Stereoloji

Ayşe İkinci Keleş¹

1 Niğde Ömer Halisdemir Üniv Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Dr. Öğr. Üyesi, Niğde, Türkiye, ORCID: 0000-0003-0716-5695

Geliş: 06.03.2019; Revizyon: 16.05.2019; Kabul Tarihi:30.07.2019

Öz

Stereoloji kantitatif çalışmalarda en çok tercih edilen, kullanıldığında kabul oranı yüksek olan bir yöntemdir. Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan herhangi bir yapının iki boyutlu görüntülerinden yola çıkarak, onların üç boyutlu özellikleri ile ilgili yorumlar yapmayı sağlayan, birçok yöntemi (optik ve fiziksel disektör, optik ve fiziksel parçalama, nucleator ve cavalieri prensibi vb.) içeren bilim dalıdır. Sağlık alanında, bir doku ya da görüntüsü elde edilebiliyorsa, bunların üzerinde stereolojik çalışmalar yapmak mümkündür.

Ancak stereolojik yöntemlerin kullanırken özellikle tarafsızlık, etkinlik, sistematik rastgele örnekleme ve ön çalışma gibi konulara uyulması gerekmektedir. Bu yöntemler ile kurallarına uyularak yapılan çalışmalarda ilgilenilen yapının sayı, hacim, alan ve uzunluk gibi verileri elde edilebilir. Elde edilen sonuçlar gerçek değere en yakın değerlerdir. Günümüzde bu yöntemin uygulanması birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Bu yöntem tarafsız, etkili, güvenilir, düşük maliyetli (az çalışan, az örnek ya da numune ve kısa sürede), tekrarlanabilir ve tekrarlandıkça gerçek değere daha da yaklaşan sonuçlar elde etmemizi sağlar. Bu nedenle, stereolojik çalışmalar sonucunda elde edilen verilerden yola çıkılarak yapılan yorumlar doğru, güvenilir ve kabul edilebilirdir.

Anahtar Kelimeler: Etkinlik, Kantitatif analiz, Stereoloji, Tarafsızlık, Tekrarlanabilir

DOI: 10.5798/dicletip.536434

Yazışma Adresi / Correspondence: Ayşe İkinci Keleş, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Niğde, Türkiye, e-mail: ayse_ikinci@hotmail.com

Quantitative Method Used in Health Field, Stereology

Abstract

Stereology is a method with the highest acceptance rate when used in quantitative studies. Stereology is a branch of science that includes many methods (optical and physical disector, optical and physical fractionator, nucleator and cavalieri principle etc.), which enable them to make interpretations about their three-dimensional properties, based on two-dimensional images of any three-dimensional structure. In the area of health, if a tissue or image can be obtained, it is possible to perform stereological studies on them. However, when using stereological methods, issues such as objectivity, effectiveness, systematic random sampling and preparatory work must be followed. In these studies, data such as number, volume, area and length of the structure can be obtained.

The results obtained are the closest to the real value. Today, the application of this method brings many advantages. This method allows us to achieve results in an unbiased, effective, trusty, low-cost (few people, small samples, or images and short time), repeatable and that are closer to the real value as it is repeated. Therefore, based on the data obtained as a result of stereological studies, the comments are true, reliable and acceptable.

Keywords: Efficiency, Quantitative analysis, Stereology, Unbiased, Reproducible

GİRİŞ

Yapılan birçok bilimsel çalışmada sayı önemli bir veridir. Çalışmalarda sayısal veriler kullanılacaksa, sonuçlarını sayısal olarak vermek ve bu sonuca dayanarak çalışma hipotezlerini ifade etmek gerekir. Böyle bir durumda sayısal verilerin nasıl elde edildiği önemli bir konudur. Kantitatif yöntemler ile ilgili literatür tarandığında birçok yöntemle karşılaşılmaktadır. Taramalar incelendiğinde bu yöntemlerden biri stereoloji'dir. Stereoloji herkes tarafından kabul görmüş, bilimsel değeri yüksek, sonuçları güvenilir ve matematiksel olarak doğruluğu kanıtlanmış bir yöntemdir. Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan herhangi bir yapının iki boyutlu görüntülerinden yola çıkarak, onların üç boyutlu özellikleri ile ilgili veriler elde edilmesine olanak sunan, güvenilirliği yüksek bir yöntemdir¹.İlgilenilen yapının elde edilen iki boyutlu görüntüleriyle hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi önemli sayısal değerleri elde edebiliriz². Stereolojik çalışma yapılırken, ilgilenilen yapının şekli önemli değildir. Biyolojik yapılarda, düzgün şekiller olmasa bile, eğer dokuyu değişik tıbbi aletlerle görüntüleyebiliyorsak (Manyetik Rezonans, Tomografi gibi) ya da histolojik yöntemler

kullanılarak (kesit alma, boyama gibi) üzerinde işlem yapabilecek hale getirebiliyorsak stereolojik çalışma yapabiliriz³⁻⁶.

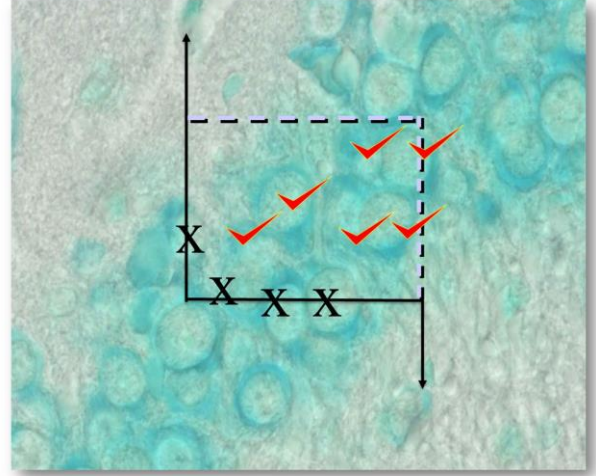
Stereolojik yöntemleri diğer yöntemlerden ayıran en önemli özelliği tarafsız ve etkin olmasıdır^{1,3}. Tarafsızlık, çalışılan yapı hakkında ön kabul yapılmadan, çalışmayı yapan kişi değişse bile sonuçların istatistik olarak değişmediği, hatta tekrarlandığı zaman gerçek değere daha yaklaşıldığı yöntem olarak ifade edilebilir². Etkinlik ise en az sayıda birey veya örnek kullanarak, kısa bir zamanda, doğru sonuçların elde etmektir⁷.

Stereoloji'de sıkça kullanılan izdüşüm ve partikül yada tanecik ifadeleri genelde karıştırılmaktadır. İlgilenilen yapının iki boyutlu düzlemde yaptığı kesişimi ve bu kesişim sonucunda ortaya çıkan iki boyutlu görüntüsü izdüşüm olarak isimlendirilir. Partikülya da tanecik ise ilgilenilen doku bileşenidir³.

Yapılan çalışmalar planlanırken, doğru veri elde etmek temel ve vazgeçilmez şartlardan biridir. Şüphesiz ki bunu sağlamak için ilk olarak örneklemimizin doğru yapılması gerekmektedir. Bazı çalışmalarda, ilgilenilen yapının tamamını değerlendirmek mümkün

olmayabilir. Böyle durumlarda sistematik rasgele örnekleme (SRÖ) yapmak gerekmektedir. Bu yöntem kullanılarak az zamanda, ekonomik, az kişiyle ve etkin çalışmalar elde etmek mümkün olacaktır. Örneğin, beyin dokusunda milyonlarca ifade edilen nöronlar bulunmaktadır. Bu nöronların tamamını saymak zaman, emek, para kaybına neden olabilir. Hatta sayım alanı arttıkça hata sayısı da artacaktır. Bunun yerine SRÖ yaparak beyinden elde edilen kesitler üzerinde sayım yapmak tarafsız ve etkin sonuçları elde etmemizi sağlayacaktır. Böylece tüm beyin dokusunu kullanmak yerine SRÖ ile elde edilen örneklemler üzerinde sayım yapılacaktır⁸. Sonuç olarak tüm yapıya eşit seçilme hakkı verilirken, zaman, emek ve ekonomik kazanç sağlanacaktır^{5, 6, 9}. Yalnız SRÖ çalışmanın her aşamasında uygulanmalıdır. Çalışmaya başlarken denek sayısının belirlenmesinden, elde edilen görüntü ya da numunenin sayısına kadarki her aşamada bu yöntem uygulanması gerekmektedir. Aksi takdirde stereoloji metodunun uygulamasında doğru sonuç elde edilemez. Sistematik rasgele örnekleme kelimeleri "sistematik" sözcüğü ile örnekleminin tekrar edilen periyodu, "rastgele" sözcüğü ile çalışmada belirlenen periyodun tesadüfi bir biçimde seçilmesi^{10, 11} anlamlarına gelmektedir.

Tarafsız Sayım Çerçevesi, stereolojik yöntemleri ile tanecik sayımı yapılmaktadır. Stereoloji her aşamasında kuralları olan ve onları uygulamada tavizi olmayan bir yöntemdir. Bu takdirde güvenilirliği oldukça fazladır. Şüphesiz ki tanecik sayımında da düzenlenen kurallar vardır. Tanecik sayısının tarafsız bir şekilde hesaplanabilmesi için Gundersen tarafından 1977 yılında tanımlanan "tarafsız sayım çerçevesi" kullanılmaktadır. Tarafsız sayım çerçevesi, komşu iki kenarı serbest kenar, diğer komşu iki kenarı yasak kenar olan ve yasak kenarların uzantılarının sonsuza doğru uzandığı bir dörtgen veya kare şeklindedir^{11, 12} (Şekil 1).



Şekil 1. Tarafsız sayım çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesinde bir taneciğin sayım sırasında yalnızca bir defa sayılabilmesi için bazı kurallar uygulanmaktadır. Bu kurallar aşağıdaki gibi özetlenebilir^{11, 12} (Şekil 1).

1. İzdüşümleri tamamen sayım çerçevesi içerisinde kalan tanecikler sayılır.
2. Serbest kenara temas eden tanecik izdüşümleri sayılır (kesikli çizgiler).
3. Çerçevenin yasak kenarları olarak tanımlanan kenarlar ile temas eden izdüşümler sayılmaz (düzenli çizgiler).
4. Çerçevenin yasak kenarının uzantıları (2 adet) ile kesişen izdüşümler sayılmaz.

STEREOLOJİ DE SIK KULLANILAN YÖNTEMLER

Parçalama yöntemi, en pratik ve en basit stereolojik yöntemdir. Parçalama, ilgilenilen yapıdaki sayı, uzunluk, yüzey alanı gibi herhangi bir niceliğin tüm yapıdaki toplam değerini bulmak amacıyla kullanılır. Bu yöntem bir yapıyı parçalara ayırarak, bu parçalarda uygulamayı esas alır. Örneğin, insandaki böbreklerin önce sistematik yöntemle sağ ya da sol olduğuna karar verilir. Sonra karar verilen böbrek parçalara ayrılarak, yapılacak işlemlerin uygulamasının yapılacağı hale

getirilir (böbreğin hacmi, böbrek cisimciği sayısının hesaplanması gibi). Parçalama, stereolojide ilk uygulanan yöntemlerdendir. Çalışılacak dokuya uygulanan işlemler sırasında veya sonrası, dokunun şişmesi, büzüşmesi, zedelenmesi ve hacminde meydana gelen değişikliklerden etkilenmeyen sonuçlar elde edilmesini sağlar^{7, 13}. Parçalama yönteminin, fiziksel parçalama¹³ve optik parçalama¹⁴ olmak üzere iki yönteme ayrılır⁷.

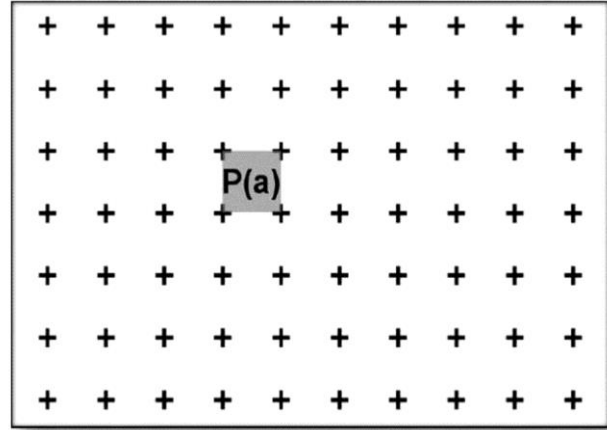
Cavalieri Prensibi: Stereolojide kullanılan yöntemlerden biri Cavalieri'dir. Bu yöntem makroskobik ve mikroskobik tüm yapılarda uygulanabilir. Cavalieri toplam hacim, hacim oranları veya yoğunluğu gibi değerlerin hesaplanabildiği bir yöntemdir. Bu yöntem uygulanmadan önce, SRÖ kullanılarak hesaplama yapılacak yapı eşit aralıklarla birbirine paralel olarak dilimlenir. Elde edilen dilimlerin her biri aynı yönüne bakan kesit yüzeyi alanları önce tek tek hesaplanır. Hesaplanan tümü toplanır. Çıkan sonuç ortalama dilim kalınlığı ile çarpılır ve sonuç elde edilir. Her aşamada titiz çalışılarak, çalışılan yapının hacmi tarafsız olarak hesaplanır. Yapılan hesaplamaların formülü aşağıdaki şekilde ifade edilir^{3, 15, 16}.

$$V_{ref} = \sum a_i \times t$$

Formülde ki V_{ref} : İlgilenilen yapıdaki toplam veya referans hacmi, a_i : i numaralı kesitteki yapı izdüşümü veya izdüşümlerinin toplam yüzey alanı, t : Ortalama dilim veya kesit kalınlığını ifade etmektedir.

Cavalieri prensibinde ilk aşamasında ilgilenilen bölgenin izdüşümlerinin veya kesitlerdeki görüntülerinin alanlarını hesaplamakla başlanır³. İzdüşüm alanları planimetri (bilgisayar destekli cihaz) kullanılarak (bir yapının üç boyutlu ve mekânsal bir gerçeklik olarak değil, iki boyutlu olarak ele alınmasıdır) olarak ölçülür. Bu yöntem için özel bir bilgisayar ve malzemeler gerekir.

Eğer elimizde özel bilgisayarlar ve donanımlar yoksa Noktalı Alan Ölçüm Cetveli kullanılabilir^{10, 13}(Şekil 2). Noktalı alan ölçüm cetveli ile yapılan değerlendirmeler, diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında güvenilir, daha az zamanda ve düşük maliyetle veriler elde etmemizi sağlar¹⁰.



Şekil 2. Noktalı alan ölçüm cetveli. Artı işaretlerinin merkezleri ile simgelenen her bir nokta bir birim alanı $p(a)$ temsil eder⁷.

Noktalı alan ölçüm cetveli aralarında sabit uzaklık bulunan ve sistematik dizilmiş noktalardan oluşan bir şekildir (Şekil 2). Cetvelde bulunan her bir nokta "artı" (+) işaretinin orta noktası, belli bir birim alanı (a/p) ifade eder. İlgilenilen kesit görüntüsüne düşen toplam nokta sayısı ($\sum P_i$) bu birim alan değeriyle çarpıldığında, o kesite ait görüntünün toplam alanının (A_i) tarafsız bir şekilde hesaplanmasını sağlar^{3, 7, 10, 13}.

$$A_i = \sum P_i \cdot a / p$$

Nucleator Yöntemi: Stereolojide hacim hesaplamak için kullanılır¹⁷. Özellikle küçük yapıların hacimlerini ölçmek için tercih edilen, pratik kullanımı olan stereolojik bir yöntemdir¹⁸.

Disektör Yöntemi: Bu yöntemle tanecik sayısı hesaplanabilmektedir. Disektör yöntemi, dokuya uygulanan histolojik yöntemler sırasında oluşabilecek büzüşme, genişleme,

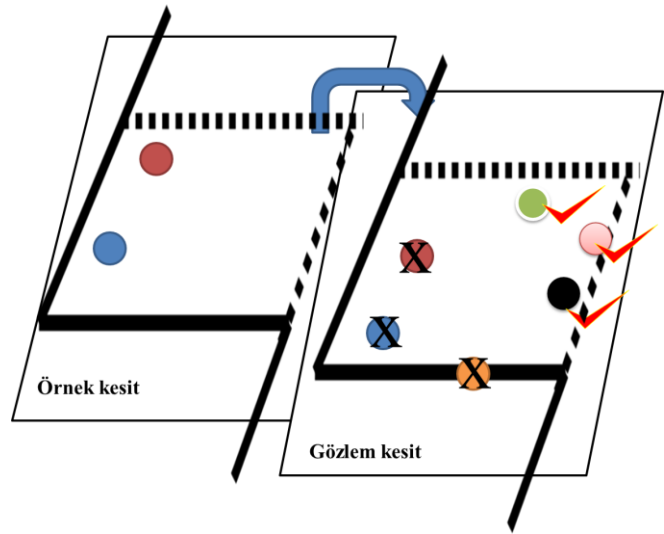
kesitlerin alınma yönü, yönelimi ve sayım yapılacak taneciğin büyüklüğü gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olarak, tarafsız bir biçimde uygulanabilmektedir¹⁹. Bu yöntem bilinen bir t mesafesi ile birbirinden ayrılmış iki kesit düzleminde oluşan ve üç boyutlu bir hacimde sayı parametresinin hesaplanmasına imkân veren bir yöntemdir¹¹. Bu metodun temelini iki boyutlu, iki ardışık kesit düzleminin birlikte değerlendirilmesiyle oluşturulan üç boyutlu bir sorgulama aracı diye de tanımlanan üç boyutlu sonda oluşturmaktadır¹¹. Sonda, çalışılacak yapıya, elde edilmek istenen veriye bağlı olarak sorulan 'geometrik sorular' olarak tanımlanır. Stereoloji'de 1, 2 ve 3 boyutlu sondalar vardır. İncelenecek yapının boyutu ve sonda boyutunun toplamının üç etmesi gerekmektedir (yapının boyutu + sondanın boyutu = 3 boyut)^{3,11}. Disektör yöntemi optik ve fiziksel disektör olmak üzere ikiye ayrılır¹³.

Fiziksel disektör, tanecik sayımı için kullanılan stereolojik bir yöntemdir¹⁹. Fiziksel olarak aralarında mesafe olan iki ardışık kesitin karşılaştırılmasıdır. Bu kesitlerden birisi "örnek" diğeri "gözlem" kesit olarak adlandırılır. Kesitler üzerinde yapılacak sayımlarda dikkat edilmesi gereken önemli noktalar birinde gözükken ancak diğeri gözükmeyen taneciklerin sayılması ve kesitler alınırken "SRÖ" ile kesitlerin alınmasıdır¹¹(Şekil 3).

Optik disektör, sanal olarak mikroskop altında üç boyutlu sayım kutularının oluşturulduğu bir yöntemdir. Ölçüme uygun kalınlıkta alınan bir kesit ya da elde edilen görüntü içerisinde z ekseni boyunca optik olarak ilerlerken sanal bir küpten oluşturulur². Bu küpten, art arda optik kesitlerden alınır ve kesitlere tarafsız sayım çerçevesi uygulanır. Üç boyutlu sanal bir optik disektör sondası oluşturulur ve tanecik sayımı yapılır^{20,21}.

STEREOLOJİNİN KULLANIM ALANLARI

Sayısal verilerin yoğun olarak kullanıldığı alanlarda stereolojik analiz sistemleri tercih edilmektedir. Bunların başında Biyoloji, Tıp, Veterinerlik, Ekoloji, Ormancılık, Matematik ve diğer mühendislik alanlarında kullanılmaktadır²².



Şekil 3. Ardışık iki düzlemde oluşturulan üç boyutlu bir hacimde disektör taneciklerinin sayılması (Örnek ve gözlem kesiti). Çalışılacak yapıdan biri örnek diğeri gözlem olmak üzere iki kesit alınır. Burada örnek kesitte görünmeyen gözlem kesitte görünen izdüşümler sayılmaktadır. Aynı zamanda uygulanan tarafsız sayım çerçevesi kuralına yasak bölgede bulunan izdüşüm örnek kesitte olmamasına rağmen sayılmamaktadır. Serbest bölgeye denk gelen izdüşüm ise sayılmaktadır (X; sayılmayanlar, ✓ sayılanlar)

Literatür taramaları yapıldığında da stereolojik yöntemlerin insan, hayvan ve cansız nesnelere de içine alan kullanım alanları olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde Eriksen ve arkadaşlarının şiddetli kafa travması olan hastaların CT ve MR tarama görüntülerini kullanarak stereolojik değerlendirme yaptıklarını²³. Ayrıca psikiyatri²⁴, Üroloji²⁵, Histoloji ve Embriyoloji²⁶, Anatomi⁹, Diş Hekimliği²⁷, Patoloji¹⁸, Neuroscience^{5, 28, 29}, gibi alanlarda stereolojik çalışmalara rastlanmaktadır. Birçok arama motoruna "stereoloji" yazıldığında sayısının binleri bulan

sonuçların olması şaşırtıcı değildir (*Pubmed*, 2742 01.02.2019). İncelenen çalışmalar doğrultusunda stereolojik yöntemlerin yoğun bir şekilde tercih edildiği ifade edilebilir. Bu yöntemin güvenilirliğini kanıtlarken, aynı zamanda çalışmanın yayınlanma olasılığı artırdığını göstermektedir. Özellikle bir yöntem ile bu kadar çalışma yapılması, stereoloji ile yapılan çalışmaların ne derece önemsendiğinin bir göstergesidir.

SONUÇ

Stereoloji, sayısal veriler içeren her alanda kullanılabilir en iyi yöntemlerden biridir. Ülkemizde birçok bilim insanı bu konu üzerinde çalışmalar yapmaktadır ve gün geçtikçe de çalışmalar artmaktadır. Güvenilirliği, tarafsızlığı, az kişinin çalışması ile kısa sürede büyük alanların değerlendirilmesine olanak sağlaması, tekrarlanabilmesi ve tekrarlandıkça doğru sonuca daha çok yaklaşımları, dokudan izole edilemeyen ya da düzgün şekilleri olmayan yapılarda uygulanabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmesi gerekmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Mayhew TM, Gundersen HJ. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat.* 1996; 188: 1-15.
2. Odacı E, Yıldırım Ş, Bahadır A, et all. Yeni stereolojik yöntemlerin olası hata kaynakları ve çözüm yolları. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2004; 24: 78-87.

3. Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy. BIOS Scientific Publishers. Oxford. 1998.
4. Jelsing J, Rostrup E, Markenroth K, et all. Assessment of in vivo MR imaging compared to physical sections in vitro-a quantitative study of brain volumes using stereology. *Neuroimage.* 2005; 15: 26: 57-65.
5. İkinci A, Odacı E, Baş O. Effects of ethyl pyruvate administration on female rats' pyramidal cells of cornu ammonis after brain ischemia: a stereological and histopathological study. *Turk J Med Sci.* 2013; 43: 354-61.
6. Şahin A, Aslan A, Baş O, et all. Deleterious impacts of a 900MHz electromagnetic field on hippocampal pyramidal neurons of 8-week-old Sprague Dawley male rats. *Brain Res.* 2015; 1624: 232-8.
7. Canan S, Şahin B, Ünal B, et all. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: parçalama. *TKlin Tıp Bilimleri.* 2002; 22: 30-46.
8. Odacı E, Bas O, Kaplan S. Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. *Brain Res.* 1238: 224-9.
9. Baş O, Sönmez FO, Aslan A, et all. 2013. Pyramidal cell loss in the cornu ammonis of 32-day-old female rats following exposure to a 900Megahertz electromagnetic field during prenatal days. *Neuroquantology.* 2008; 4: 591-9.
10. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereoloji and its prediction. *J Microsc.* 1987; 147: 229-63.
11. Ünal B, Aslan H, Canan S, et all. Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafı) metotların önemli hata kaynakları ve çözüm önerileri. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002; 22: 1-6.
12. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. *J Microscopy.* 1977; 111: 219-23.
13. Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles: A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. *J Microsc.* 1986; 143: 3-45. 111.
14. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 1991; 231: 482-97.

15. Gundersen HJG. The nucleator. *Journal of Microscopy*. 1988; 151: 3-21.
16. Royet JP. Stereology: a method for analysing images. *Progress Neurobiol*. 1991; 37: 433-74.
17. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96: 379-94.
18. Keles M, Tozoglu U, Unal D, et al. Exfoliative cytology of oral mucosa in kidney transplant patients: a cytomorphometric study. *Transplant Proc*. 2011; 43: 871-5.
19. Sterio DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1994; 134: 127-36.
20. Mayhew TM. A Review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol*. 1992; 21: 313-328.
21. Coggeshall RE. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci*. 1992; 15: 9-13.
22. Akalan MA, Demirkan Çevik A. Stereoloji ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2013; 24: 95-100.
23. Eriksen N, Rostrup E, Andersen K, et al. Application of stereological estimates head injuries using CT and MR scanning images. *Br J Radiol*. 2010; 83: 307-17.
24. Maćkowiak M, Mordalska P, Dudys D, et al. Cocaine enhances ST8SialII mRNA expression and neural cell adhesion molecule polysialylation in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2011; 186: 21-31.
25. Pazvant G, Sahin B, Kahvecioglu Ko, et al. The volume fraction method for the evaluation of kidney: A stereological study. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2009; 56: 233-9.
26. Aktürk Z, Odacı E, İkinci A, et al. Effect of Ginkgo biloba on brain volume after carotid artery occlusion in rats: a stereological and histopathological study. *Turk J Med Sci*. 2014; 44: 546-53.
27. Gomes FV, Mayer L, Massotti FP, et al. Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015; 44: 245-51
28. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 1993; 14: 275-85.
29. West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*. 1999; 22: 51-61.