

ГЛАВА 1

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для использования большинства стереометрических методов не требуется специального оснащения. В простейшем случае исследователь должен иметь секционный нож, планиметрические и стереометрические линейки, микроскоп, окулярные линейки- вставки и сетки-вставки. Эти несложные приспособления достаточны для получения исходной информации в процессе проведения количественного морфологического анализа.

Для разных видов количественных исследований на органном уровне необходимы сетка с узловыми точками квадратно-сетчатая или прямоугольно-сетчатая решетка, клетки которой имеют последовательную нумерацию числами натурального ряда (1, 2, 3... и т.п.). Эти сетки можно расчертить тушью на прозрачных целлоидиновых пленках или получить на фотопластинке или фотопленке путем фотокопирования соответствующего рисунка. В последнем случае они будут более надежными в работе, так как тушь со временем стирается с пластинки. Некоторые авторы рекомендуют точки в сетках располагать в узлах квадратов (Салтыков С.А., 1950). Однако такие сетки дают систематические погрешности, связанные с неравномерными расстояниями между точками. Для стереометрии более приемлемы сетки и решетки, в которых все расстояния между ними одинаковы (рис. 1). Это достигается расположением точек решетки в углах равностороннего треугольника (Автандилов Г.Г., 1977). Величина треугольников (расстояний между точками) может быть выбрана любой. Однако при слишком большой плотности точек в решетке планиметрический анализ затруднителен, а при слишком малой плотности сетку приходится накладывать на орган неоднократно. Опыт показывает, что наиболее оптимальное расстояние между точками решетки для проведения макроскопических исследований колеблется в пределах от 5 до 10 мм. Чем больше величина изучаемого органа, тем большее расстояние может быть на сетке между точками. При малой величине органа необходимо использовать сетки с большей плотностью точек.

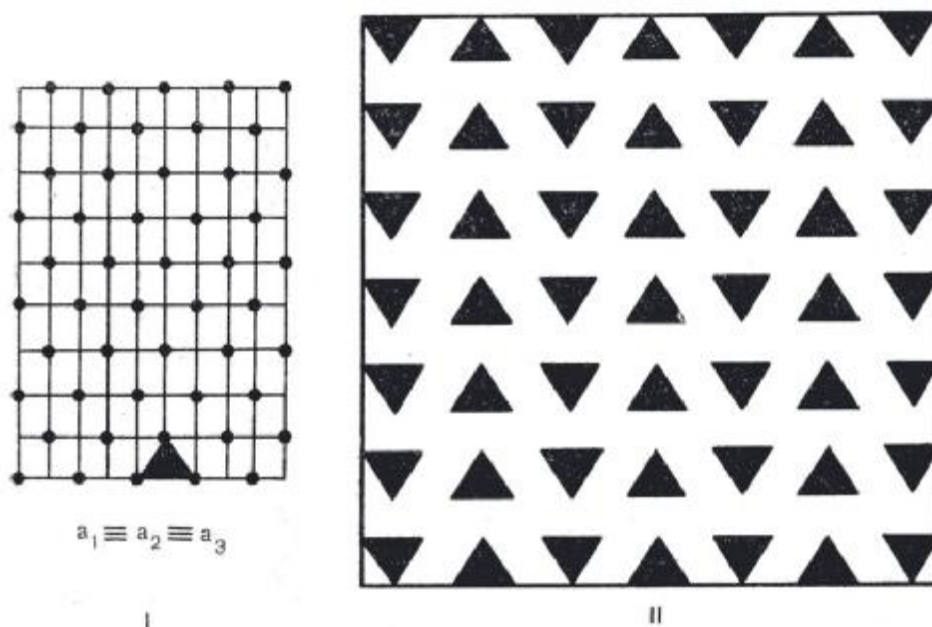


Рис. 1. Сетки с равномерно удаленными друг от друга точками для макро- и микроскопического стереометрического анализа.

I — вариант с равноудаленными точками (стороны равностороннего треугольника (а) по величине тождественно равны друг другу); II — вариант: где точки нулевой толщины расположены в углах равносторонних треугольников.

В квадратной или прямоугольной решетке, которые обычно используют для случайного отбора участков органа для дальнейшего анализа с учетом равномерно распределенных случайных чисел (подробнее см. в гл. 5), размеры клеток сетки должны соответствовать по величине размерам участка органа, который отбирают для приготовления гистологиче-

ских препаратов. Если для опыта берут участки с линейным размером в 10 мм, квадратные клетки решетки должны иметь площадь в 100 мм^2 . Общая величина решетки должна быть такой, чтобы она полностью покрывала орган или его срезы. Более целесообразно использовать решетки большой величины, так как они могут быть использованы при изучении органов разного размера. Нумерацию клеток решетки следует вести последовательно по колонкам или по строкам, как показана на рис. 2.

В некоторых случаях возникают задачи, связанные с оценкой абсолютных площадей структурных составляющих плоскостного препарата, регистрируемых на органном уровне. Тогда могут быть использованы планиметрические линейки с площадью каждого гнездового квадрата в 1 мм^2 (Автандилов Г. Г., 1961; Автандилов Г.Г. и Гевондян Т.А., 1979). Они изготавливаются таким же способом, как решетки с узловыми точками или сетки с квадратными либо прямоугольными квадратами (рис. 3).

Количественный микроскопический анализ проводят на разных уровнях увеличения светового и электронного микроскопов. В качестве технического оснащения могут быть использованы различные промышленные образцы, как квадратно-сетчатая вставка, винтовой окуляр-микрометр и объект-микрометр (рис. 4), с помощью которого калибруют различные окулярные вставки для планиметрии и стереометрии, измерительные окулярные линейки (рис. 5). Калибровку вставок проводят следующим образом. На предметный столик микроскопа устанавливают объект микрометра. Обычно цена деления объект-микрометра составляет 10 мкм. Под микроскопом определяют число делений (a) объект-микрометра, соответствующих числу делений окулярной измерительной линейки (l), либо числу сторон квадратно-сетчатого окуляра (b), либо числу делений винтового окуляр-микрометра (R).

1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56
57	58	59	60	61	62	63	64

Рис. 2. Сетка с пронумерованными квадратными гнездами, используемая в стереометрическом анализе для случайного отбора участков органа.

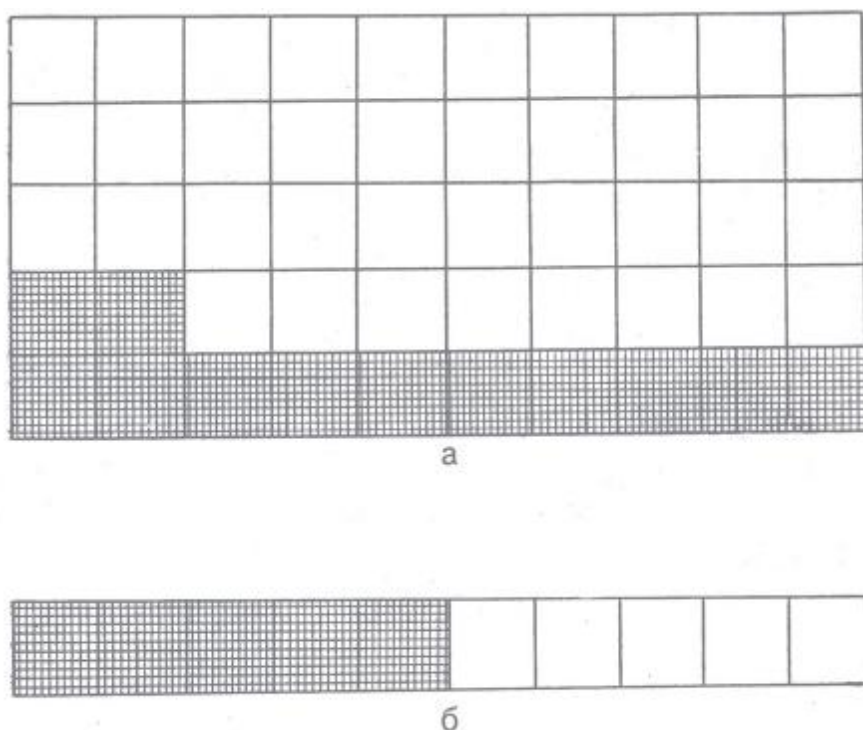


Рис. 3. Планиметрические линейки Автандилова (а, б) для измерения площади структурных составляющих органов и патологических очагов и их срезов (в натуральную величину). Площадь малого квадрата составляет 1 мм^2 , большого — 1 см^2

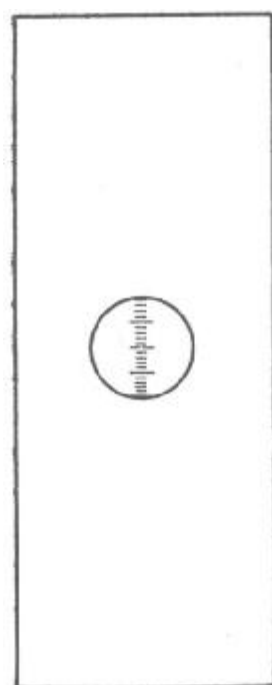


Рис. 4. Объект-микрометр.

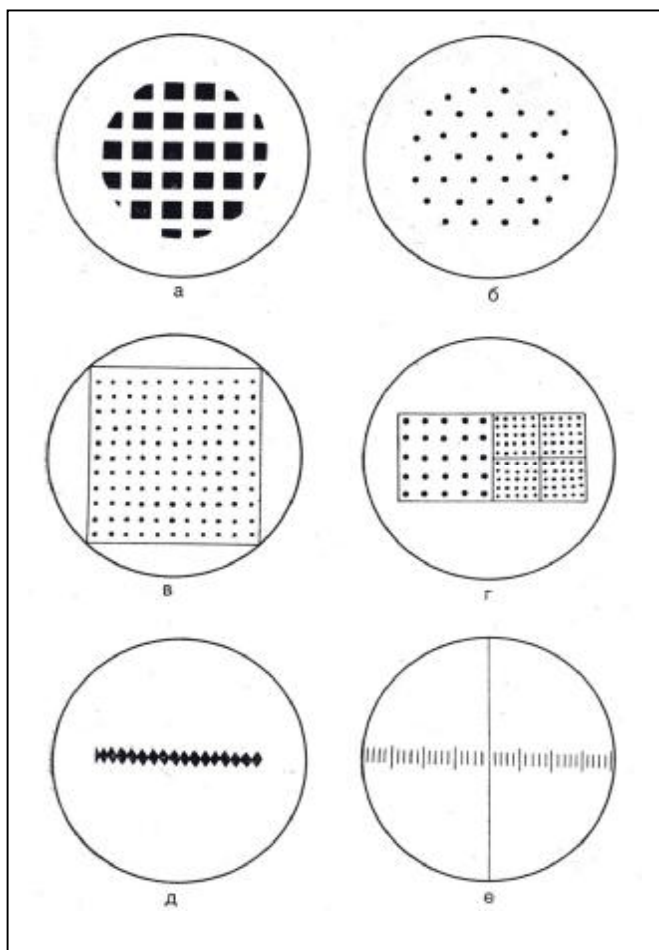


Рис. 5. Варианты окулярных вставок для измерений и планиметрий

альных средств технического обеспечения количественного морфометрического анализа. Для этих целей могут быть изготовлены линейки и сетки по типу используемых в количественной металлографии (Салтыков С. А., 1976). К ним относятся окулярная измерительная линейка, квадратно-сетчатые окулярные вставки, линии известной длины и вставки, ограничивающие поле зрения микроскопа, имеющие нулевую толщину (рис. 6). В таких вставках линией является граница раздела светлого и темного полей зрения микроскопа, а точкой — граница раздела светлого и темного полей зрения микроскопа. Эти разделы практически не имеют никакой толщины. Однако квадратно-сетчатая окулярная вставка нулевой толщины, хотя и снимает погрешность, связанную с конечной толщиной гистологического препарата, но не устраняет погрешностей, связанных с разными расстояниями между прямыми и диагональными расстояниями между узловыми точками. Поэтому следует отдать предпочтение предлагаемой сетке (Автандилов Г.Г. и др., 1977), узловые точки которой имеют не только нулевую толщину, но и находятся на одинаковом расстоянии друг от друга, что создает одинаковую плотность точек для разных участков решетки (рис. 7, а). Окулярные вставки с равноудаленными точками (рис. 7, б; 8), как и все остальные приводимые в книге образцы, могут быть изготовлены в любой лаборатории. Для этих целей рисунок соответствующей вставки переснимается на фототехническую пленку (Микрат-200, Микрат-300, КН-1 и др.) на таком расстоянии, чтобы его величина на негативе по диаметру составляла 80% от диаметра окуляра микроскопа. Из негативов контактным методом получают позитивные отпечатки на такой же пленке, вырезают кружок с сеткой в центре и вставляют в окуляр микроскопа (Автандилов Г.Г., 1972). Рекомендуется также изготовление комбинированных окулярных вставок, которые одновременно выполняют роль и сетки для планиметрического анализа, и линейки, с помощью которой можно проводить замеры величины интересующих структурных составляющих гистологического препарата (Яблучанский Н.И. и др., 1976).

После этого находят цену деления применяемых вставок по формуле:

$$p = \frac{a \cdot c}{b}, \quad (6)$$

где c — цена деления объект-микрометра.

Выпускаемые промышленные образцы, к сожалению, пригодны для количественного микроскопического анализа не всех структурных компонентов изучаемого препарата. Например, квадратно-сетчатый окуляр можно использовать при подсчете количества клеток и других объектов, попадающих на его площадь. Однако он не может быть использован для определения плоскостной или объемной плотности элементов гистоструктур. Промышленные окулярные измерительные линейки и объект-микрометры также пригодны для стереометрии, но не всех типов гистоструктур, так как дают систематическую погрешность, связанную с конечной толщиной их линий, которая не может быть учтена. Такую же погрешность дает и большинство сеток с узловыми точками для планиметрических исследований.

В связи с изложенным представляет несомненный интерес изготовление специ-

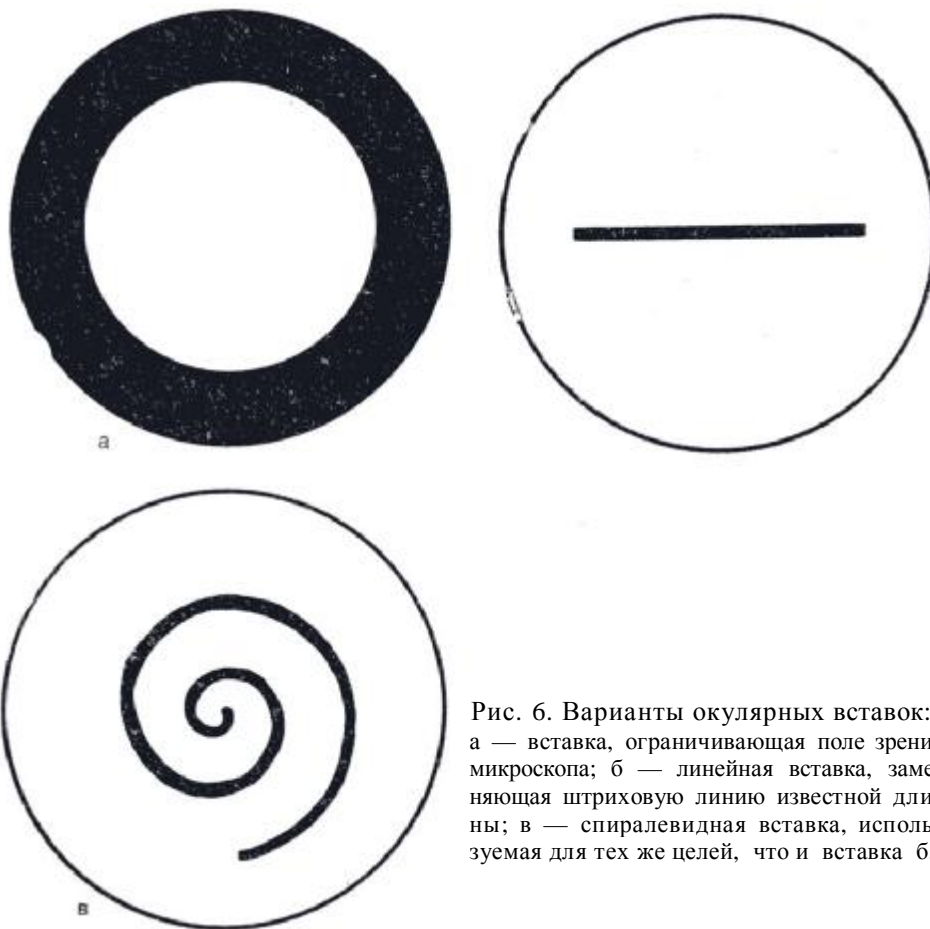


Рис. 6. Варианты окулярных вставок: а — вставка, ограничивающая поле зрения микроскопа; б — линейная вставка, заменяющая штриховую линию известной длины; в — спиралевидная вставка, используемая для тех же целей, что и вставка б.

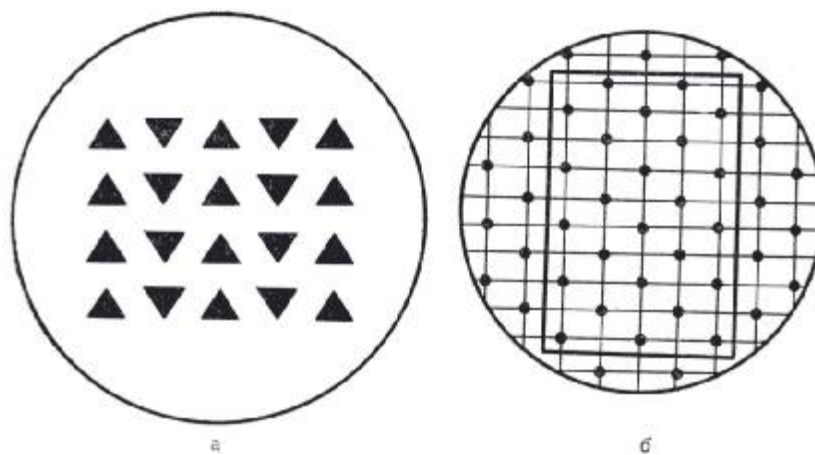


Рис. 7. Окулярные вставки
а — сетка с 60 точками нулевой толщины; б — сетка с 25 точками.

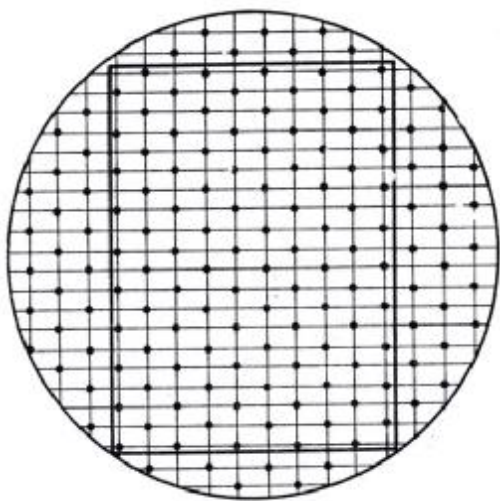


Рис. 8. Окулярная сетка с 100 равноудаленными точками (в прямоугольнике).

При получении исходной информации для стереометрического анализа обычно проводят большое число замеров или подсчетов изучаемых структурных компонентов тканей. Регистрация результатов замеров бывает непродуктивна и требует много времени. Процесс можно упростить применением специальных полуавтоматических регистрирующих устройств, роль которых в простейшем случае может выполнить интегратор, используемый для подсчета лейкоцитарной формулы крови.

В этом случае каждой клавише интегратора приписывают в заданной последовательности значения классов размеров, числа анализируемых структур. При проведении замеров результаты обычно не записывают, а регистрируют нажатием клавиши счетчика. Это позволяет параллельно с замерами сразу получать сведения о частоте встречаемости каждого признака

анализируемой структуры, составляя одновременно и вариационный ряд.

В случае, когда на одном уровне иерархической организации гистоструктуры определяют величину большого числа ее структурных составляющих либо находят ряд стереометрических характеристик одной структурной составляющей, работа с микроскопом оказывается непродуктивной. В этом случае рекомендуется исследования проводить на микрофотографиях (позитивах и негативах). Микрофотографии для исследований проецируются на предметный столик фотоувеличителя (рис. 9), на экран аппарата для чтения микрофильмов, на обычный экран при использовании проектора. При проведении анализа перед съемкой препарата рекомендуется провести первоначальное копирование объект-микрометра. Перед анализом, вставив в магазин фотоувеличителя фотопленку, на его предметный столик проецируют используемую линейку объект-микрометра, которую перерисовывают на белый лист бумаги. При этом цену деления объект-микрометра можно увеличить, дополнительно разбив каждый его интервал рядом параллельных линий с равным расстоянием между ними. В последующем на полученную таким образом измерительную линейку проецируют последующие кадры фотопленки с заснятыми гистоструктурами и проводят необходимые замеры. Процесс замеров значительно упрощается, так как такая линейка (лист бумаги) легко перемещается по предметному столику фотоувеличителя. На фотопленках можно проводить и планиметрический анализ, используя при этом в качестве тестовых решеток различные сетки, изображенные на белом листе бумаги. Расстояние между узловыми точками таких решеток и степень увеличения микроскопа не имеют существенного значения. Наиболее пригодны сетки с диагонально расположенными точками, расстояние между которыми не менее 5 мм.

Таким же способом производят стереометрическое исследование электронных микрофотографий, о чем будет сказано подробнее в главе 6.

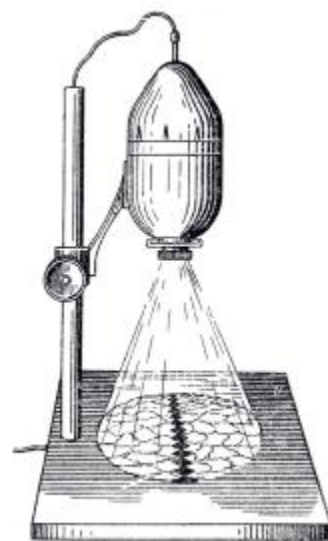


Рис. 9. Техника проведения замеров параметров, характеризующих метрические свойства микрообъектов, на негативной или позитивной пленке с использованием лителятора.