

## ГЛАВА 5

### СПОСОБЫ СЛУЧАЙНОГО ОТБОРА УЧАСТКОВ ИЗ ОРГАНОВ ДЛЯ СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Сведения об общих принципах структурной организации органа по данным исследования его тканевых составляющих, имеющих разную величину, устанавливаемую в различных интервалах — от анализа с помощью лупы до изучения в электронном микроскопе, обычно получают на отдельных его участках, которые в десятки, сотни, тысячи и более раз меньше самого органа. Эти сведения обычно принимают репрезентативными всему препарату и используют для обобщающих выводов. Между тем в литературе накоплено много данных об ошибочности таких выводов, полученных при изучении только «типичных участков (Griffiths G., 1971). Поэтому возникла необходимость разработки объективного способа получения участков органов для исследований, который позволил бы выбрать наиболее представительный отдел. Эта проблема оказалась еще более актуальной в связи с внедрением в практику морфологических исследований количественных подходов, при которых дистанция между стройной теорией метода и традиционным способом получения образцов из органов для изучения остается большой. В связи с этим необходимо строго соблюдать принцип сохранения представительности патологического процесса на всех уровнях морфологического исследования (Автандилов Г.Г., 1978).

Допустим, что, структурная организация органа объемом  $V$  изучается на тканевых блоках, общий объем которых равен  $V_{\text{об}}$ . Эти блоки могли быть отобраны как по желанию исследователя, так и на основе вероятностного подхода. В обоих случаях на блоках, полученных как первым, так и вторым способом, результаты опыта будут распространяться на весь объект. Чем меньше отношение  $v_1/V$ , тем больше вероятность получения ошибочных представлений.

Наиболее верен подход, при котором каждому блоку, отсекаемому из органа предоставлены одинаковые шансы быть выбранным для дальнейшего гистологического исследования.

Насколько величина органа больше исследуемого участка, можно показать на следующем примере. Пусть оценка морфологической перестройки какого-либо органа при определенном заболевании (для простоты будем считать изменения в органе диффузными), объем которого составляет  $50 \text{ см}^3$ , проведена при изучении 100 серийных гистологических срезов, полученных из пяти его блоков. Толщина каждого гистопрепарата стандартизирована и составляет  $10 \text{ мкм}$  при одной площади среза в  $1 \text{ см}^2$ . В этом случае выводы о морфологических изменениях в органе будут сделаны по доле, общая величина которой от объема всего органа составляет только две десятитысячные. Заметим также, что один гистологический срез такой же величины, изготовленный из кусочка печени человека, составляет только одну пятнадцатимиллионную часть. Нетрудно представить, насколько уменьшается изучаемая доля органа при электронно-микроскопическом исследовании.

Проблема выбора репрезентативных тканевых блоков из органа, способов получения гистопрепаратов, выбора среза, а затем и поля зрения, отбор электронно-микроскопических срезов с определением нужных участков для просмотра и анализа имеет большое значение в планировании и проведении количественного морфологического исследования. Выбор имеет некоторые особенности при анализе органов с дискретными объемами структурных составляющих и с относительно равномерным распределением таких структур, а также для случаев с диффузными или очаговыми патоморфологическими изменениями. Описанные здесь методы получения репрезентативного материала не ограничиваются рамками морфологии и могут быть использованы в других разделах биологической науки.

С целью формирования способа случайного отбора блоков органа для исследований в норме или при диффузном характере патологических изменений, когда на всем его протяжении патоморфологические изменения почти однотипны, его объем  $V$  будем рассматри-

вать в виде объединения попарно непересекающихся подмножеств элементарных объемов, т.е. не имеющих общей части,  $v_i$  как:

$$V \subset \bigcup_{i=1}^n u_i, \quad (38)$$

где  $i$  характеризует положение подмножества элементарных объемов  $V_i$  ткани в общем объеме органа, рассматриваемого в виде трехмерной конструкции (рис. 18).

Это вытекает из того, что положение  $u_i$  можно описать не только координатами трехмерного пространства, но и определенным порядковым номером, поскольку изучаемую морфологом структуру в принципе можно считать статичной или трехмерной.

Сумму элементарных объемов компонентов назовем генеральной совокупностью. В таком случае задача выбора представительных блоков  $u_i$  для исследований может быть сведена к задаче формирования репрезентативной выборочной совокупности по законам статистики. Следовательно, из совокупности (38), в которой каждый участок органа, равный по величине исследуемому для исследований и имеющий свои координаты, выраженный через порядковый номер, следует случайным (бесповторным или повторным) образом отобрать достаточное для микроскопических исследований число блоков. Заметим, что для целей морфологического исследования более приемлем метод, случайного бесповторного отбора, который каждому участку (кусочку) органа предоставляет одинаковые шансы быть взятым для дальнейшего гистологического изучения.

Практическое применение этого метода состоит в следующем. Орган рассекают на пластины заданной толщины (обычно их толщина соответствует высоте кусочков, которые впоследствии будут вырезаны для гистологического исследования). Такое рассечение, как говорилось, следует выполнить в плоскостях, перпендикулярных к сосудам, нервам, протокам. Направление плоскости рассечения органа особенно важно, когда проводят планиметрический анализ методом «полей» пластин органа. Полученные при рассечении органа пластины плотно укладываются на плоскости и на них накладывают решетку с пронумерованными прямоугольными или квадратными клетками, как показано на рис. 19.

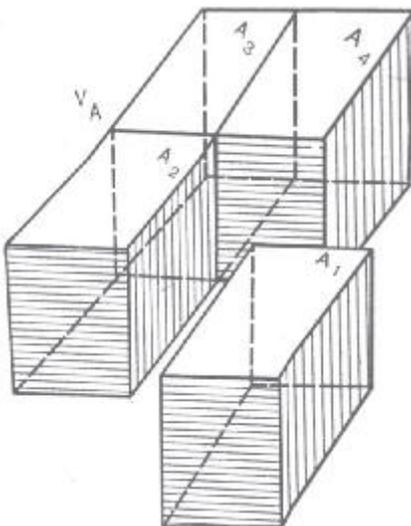


Рис. 18. Схематическое изображение органа в виде призмы объемом  $V_A$ . Общий объем призмы следует рассматривать как объединение попарно непересекающихся подмножеств элементарных объектов  $A_1 \cup A_2 \cup A_3 \cup A_4 \subset V_A$ .

В данном случае  $\bigcup_{i=1}^k A_k \subset V_A = 4$ .

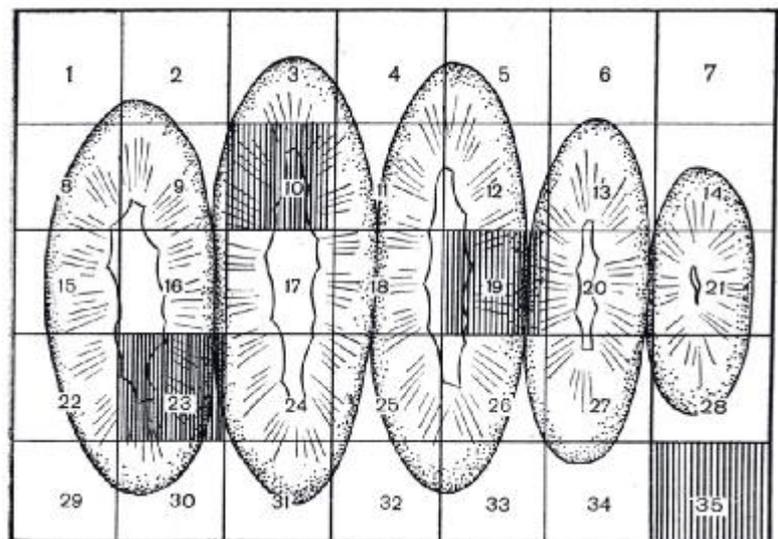


Рис. 19. Наложение сетки с пронумерованными квадратными клетками на соприкасающиеся пластины органа. Заштрихованные квадраты соответствуют отобранным по таблице случайных чисел участкам, которые следует иссечь для приготовления гистологических срезов. Объяснение в тексте.

Затем по таблице случайных чисел (Приложение II, табл. 5) выбирают номера блоков в заранее намеченном количестве. В случае, когда под выбранными по таблице случайных чисел клетками находятся отделы органа, которые не могут быть исследованы (артефакты и др.), эти блоки выбрасываются и заменяются новыми. В этих случаях по числам этой же таблицы проводят дополнительный отбор клеток решетки и соответствующих им участков органа. После того как нужные участки органа отобраны, т.е. определено их положение под соответствующими клетками решетки, они вырезаются бритвой или с помощью специального ножа (рис. 20). Дублирующие участки, как и основные, также получают способом случайного отбора проб. На рис. 19 показан выбор участков из почки собаки для приготовления гистологических препаратов. Почка предварительно рассечена на пластины толщиной в 1 см каждый, которые упакованы на плоскости и на них наложена решетка, имеющая квадраты площадью в  $1\text{ см}^2$ , с нумерацией от 1 до 35. По таблице случайных чисел отбирают номера квадратов, под которыми должны быть вырезаны участки органа для приготовления гистологических блоков, а затем — срезов. Для исследования достаточно было взять три участка. Поскольку из таблицы случайных чисел получены номера 10, 23 и 35, из которых на клетку с номером 35 не приходится ткань почки, этот номер по таблице заменили на новый, соответствующий 19-му квадрату. Таким образом, участки почки, расположенные под клетками решетки с номерами 10, 19 и 23, являются случайной выборкой из органа и должны быть вырезаны для последующего приготовления гистологических препаратов.

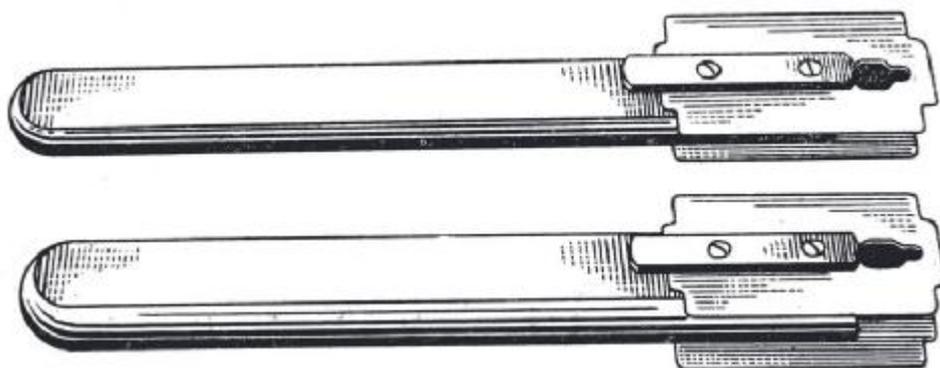


Рис. 20. Ножи Автандилова для иссечения кусочков тканей стандартного объема.

Изложенный принцип отбора применим для органов с однородным морфологическим строением или для тканей с однородными патоморфологическими изменениями. Один и тот же орган, в зависимости от поставленных задач в исследовании, может рассматриваться состоящим из одного рода тканей либо же в нем могут быть выделены все определяемые органомерчески подмножества тканевых составляющих. В приведенном выше примере отбора репрезентативных участков органа почка рассматривалась как орган с одним типом тканевых компонентов и отдельно не выделялось корковое, мозговое вещество, лоханка и жировая ткань. Если такая задача была бы поставлена в исследовании, тогда отбор блоков из разных отделов почки следует проводить согласно приводимому ниже способу.

В случае, когда объем органа может быть разделен на выявляемые на органомерческом уровне исследования отдельные подмножества тканей разного типа или когда в органе патологический процесс носит очаговый характер, принципы отбора препаратов для исследований должны быть изменены.

Если орган состоит из четко дифференцируемых на органомерческом уровне изучения структурных составляющих и перед исследователем поставлена задача выбрать участки для анализа из какой-нибудь определенной его структурной составляющей (например, из коркового вещества почки) или же имеет место очаговый характер поражения, тогда его объем  $V$  рассматривают в виде пересечения подмножеств элементарных объемов  $V_1$  и  $V_2$ :

$$V \subset V_1 \cup V_2, \quad (39)$$

где 
$$V \subset \bigcup_{i=1}^k u_i \quad (40)$$

принимают за множество попарно непересекающихся подмножеств элементарных объемов  $u_i$ , каждому из которых по аналогичной схеме следует предоставить одинаковые шансы быть отобранными.

При изучении морфологических изменений в органе при очаговом характере патолого-анатомических изменений считают, что его объем  $V$  есть пересечение подмножеств элементов с морфологическим строением ( $V_H$ ) и тканей, вовлеченных в патологический процесс ( $V_{II}$ ), что можно записать следующим образом:

$$V \subset V_H \cup V_{II} \quad (41)$$

Объем тканей органа с патологоанатомическими изменениями:

$$V_{II} \subset \bigcup_{i=1}^m V_i \quad (42)$$

принимают за генеральную совокупность подмножеств элементарных объемов, из которой должна быть получена репрезентативная выборочная совокупность. Если возникает задача изучить очаговые патологоанатомические изменения в какой-либо структурной составляющей органа, дифференцируемой на макроскопическом уровне исследования, то ее объем разделяют на два подмножества:  $V_H$  — объем, приходящийся на относительно не измененную часть данного вида ткани органа, и  $V_{II}$  — на патологически измененные отделы.

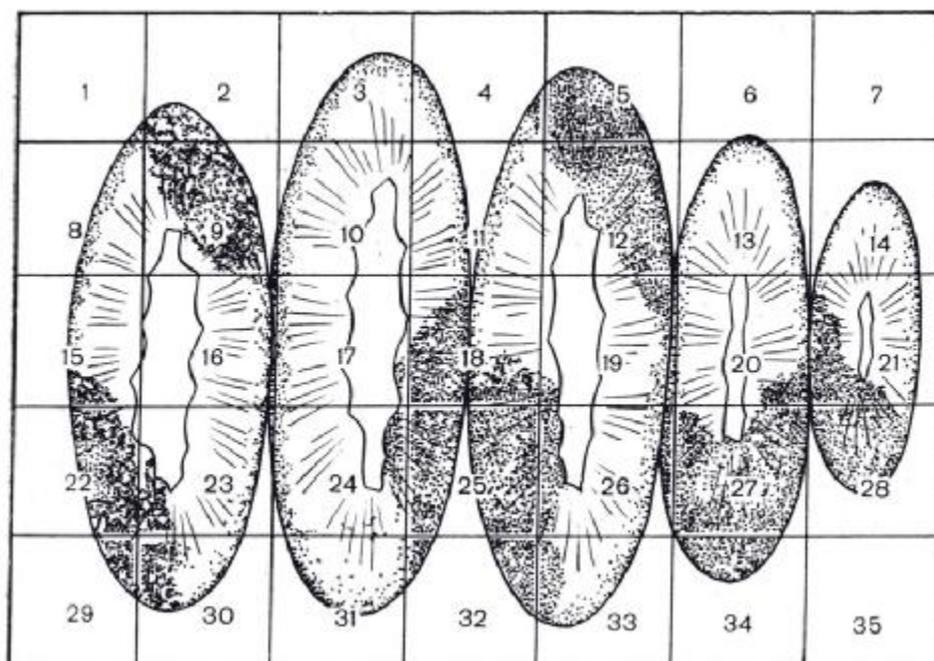


Рис. 21. Наложение решетки с квадратными пронумерованными клетками на блоки органа с очаговыми изменениями (точечная штриховка). Объяснение в тексте.

Принципиальная схема случайного отбора проб, разобранный на примере двух подмножеств тканевых составляющих, аналогична и для случая с разделением объема органа на большее число подмножеств структурных составляющих, дифференцируемых на макроскопическом уровне изучения в виде очаговых поражений (например, метастазов и т.д.) Важное обстоятельство, которое должно быть при этом учтено, состоит в необходимости четкого определения их границ. Другими словами, выделяемые подмножества всегда должны быть непересекающимися, т.е. не иметь общей части. Методика отбора препаратов в этом случае не имеет принципиальных отличий от описанной выше. Всю решетку, наложенную на плотно упакованные на плоскости пластины, условно разделим на две решетки сообразно расчленению объема органа на неизменные и патологически измененные отделы, которые можно назвать как:

а) решетка, приходящаяся на структуры органа с относительно нормальным морфологическим строением;

б) решетка, наложенная на ткань с очаговыми изменениями.

Отбор блоков для исследований будем проводить с использованием таблиц случайных чисел отдельно для первой и второй решеток, т. е. отдельно для нормальных и очаговоизмененных тканей. При этом, как и в первом случае, при отборе чисел, соответствующих клеткам решетки и находящимся под ними участкам из пластин органа, не попадающих в данную решетку, эти числа будем отбрасывать и заменять новыми. Практическое применение метода показано на рис. 21. Почка с очаговыми изменениями (точечная штриховка) рассечена на пластины перпендикулярно к ее воротам. Наложена решетка с клетками, имеющими нумерацию чисел от 1 до 35. Данную решетку условно делим на две. Первая из них состоит из клеток с номерами 1, 3, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 31 и соответствует той части органа, которая не вовлечена в патологический процесс. Другая решетка представлена клетками с порядковыми номерами 2, 4, 5, 9, 12, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34 и соответствует части почки, в которой обнаруживаются очаговые патологоанатомические изменения. По таблице случайных чисел отбираем участки почки из той ее части, в которой имеются очаговые изменения, т. е. на которую наложена вторая решетка. С использованием таблицы случайных чисел установим номера клеток данной решетки, под которыми следует вырезать участки органа для исследований. Пусть это клетки с номерами 12, 29 и 33. Под этими клетками иссекают участки почки для приготовления блоков и гистологических препаратов.

В тех случаях когда изучаемый орган имеет плоскостную форму, то решетка с пронумерованными квадратными клетками накладывается непосредственно на его поверхность. Если отбор участков для приготовления гистологических препаратов производится из полого органа, то его можно вскрыть и развернуть как показано на рис. 22.

Описанные способы отбора участков органов с целью получения блоков для изготовления гистологических препаратов позволяют избежать субъективизма и обеспечивают репрезентативность случайной выборки частей органа и патологических: изменений.

### **Методы случайного отбора гистологических срезов и полей зрения при микроскопическом исследовании**

Принципиальная схема отбора гистологических срезов и полей зрения в них для стереометрического анализа не имеет принципиального отличия от методов выбора участков органа для получения блоков. Участок, из которого изготавливают срезы, следует принять за генеральную совокупность срезов

$$V \subset \bigcup_{i=1}^m u_i, \quad (43)$$

где  $V$  — величина участка органа;  $u_i$  — величина каждого возможного  $i$ -го среза. Тогда репрезентативными срезами из совокупности всех срезов можно считать те, которые получены методом случайного бесповторного отбора.

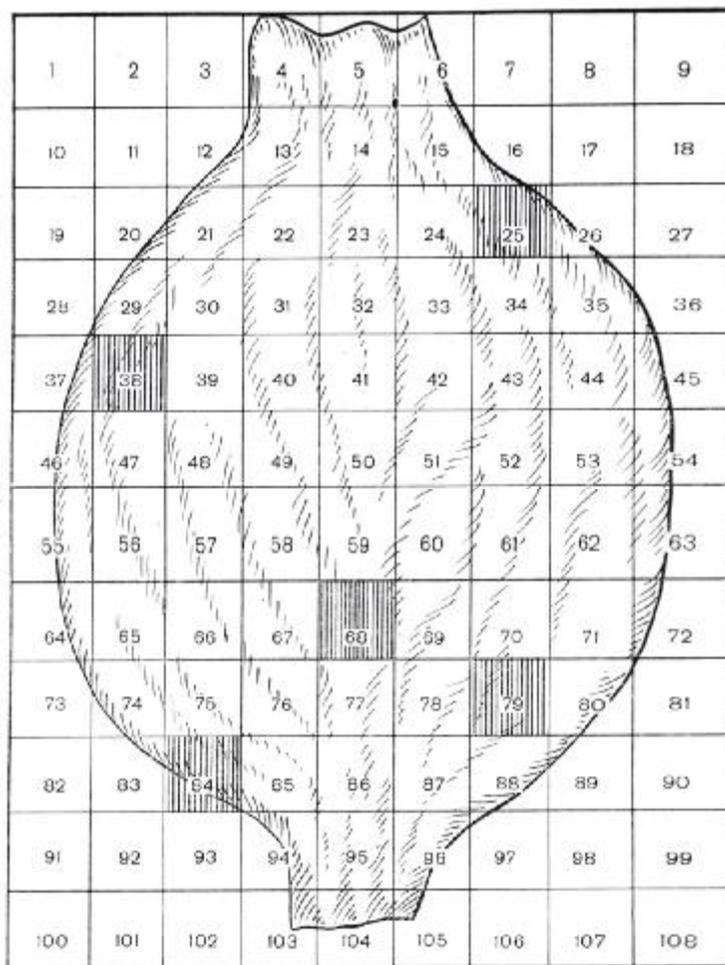


Рис. 22. На вскрытый по большой кривизне желудок собаки наложена сетка с пронумерованными квадратами. Заштрихованные клетки соответствуют участкам, которые необходимо взять для приготовления гистологических срезов.

Методы отбора срезов для приготовления гистологических препаратов, а также для электронно-микроскопических исследований однотипны. Единственным отличием между ними является величина кусочка ткани  $V$ , из которого готовятся срезы, а также величина самих  $v_i$  срезов.

По-видимому, оптимальным вариантом случайного отбора является следующий подход. Из кусочка  $V$  изготавливают серийные срезы. Полученные срезы нумеруют числами натурального ряда как 1, 2, 3 ... $n$ . По таблице случайных чисел выбирают срезы с номерами, которые можно считать репрезентативными генеральной совокупности. Однако трудоемкость такой работы требует другого подхода, который позволил бы получить данные  $v_i$  срезы без рассечения блока  $V$  на возможное число срезов. Этот подход может быть реализован следующим способом. Еще до получения срезов из участка органа объемом  $V$  по таблице случайных чисел находим порядковые номера срезов, которые являются случайной выборкой из  $v_1, v_2, v_3 \dots v_m$ . Пусть под этими номерами будут срезы 48, 23, 03, 76, 06. Упорядочим полученный ряд срезов по возрастанию их порядковых номеров, что будет выглядеть как 03, 06, 23, 48 и 76. После того как номера нужных срезов установлены, производят резку блока и для исследований отбирают только те срезы, которые соответствуют номерам, найденным из таблицы случайных чисел.

Можно избрать и другой способ получения случайной выборки срезов. После того как получен первый срез, производят определенное число срезов, которые не подсчитывают и выбрасывают. После этого забирают второй срез и снова изготавливают определен-

ное число срезов, которые выбрасывают. При другом подходе, после того как выполнен срез нужной толщины, например в 7 мкм, срезают часть участка органа толщиной, в несколько раз превышающей нужную толщину, для получения среза, например в 56 мкм, после чего снова получают срез для исследования. При исследованиях ориентировочного характера патологоанатом, как правило, должен исследовать не менее двух срезов, полученных с разного уровня тканевого блока.

Рассмотрим теперь ход исследования среза под микроскопом. При большой степени увеличения микроскопа площадь среза может в десятки и сотни раз превышать площадь поля зрения микроскопа. Поэтому при стереометрических исследованиях следует изучать либо весь срез, перемещая его на предметном столике микроскопа с помощью препароводителя, либо же изучить небольшую совокупность полей зрения, которые были бы репрезентативными для всего среза. В этих целях всю площадь среза принимают за множество попарно непересекающихся подмножеств небольших площадей  $S_j$ , по величине соответствующих площади поля зрения микроскопа,

т.е. 
$$S \subset \bigcup_{i=1}^k S_j, \quad (44)$$

где  $j$  — номер данной площади  $s_j$ . Для анализа из всей совокупности возможных полей зрения отбирают только те, которые соответствуют случайным числам.

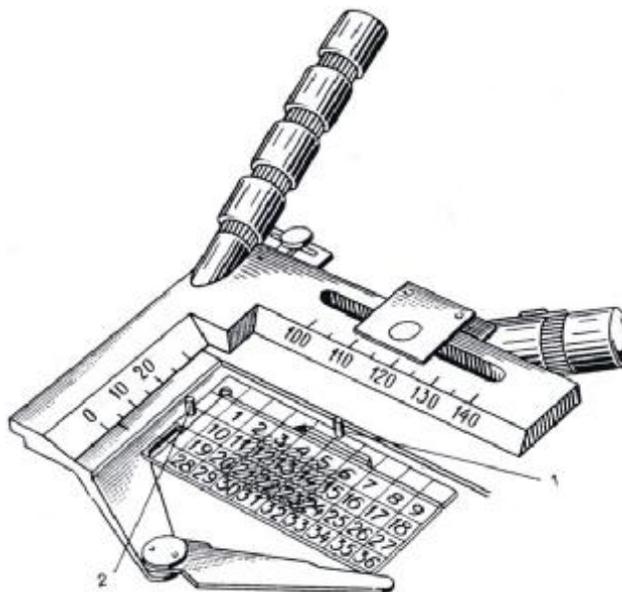


Рис. 23. Сетка для случайного отбора полей зрения микроскопа, смонтированная на препароводителе. а — сетка наложена на гистологический препарат и фиксирована ограничителями 1 и 2 при выборе случайных полей зрения, подвергаемых исследованию.

Техническая реализаций способа, например для светового микроскопа, может быть выполнена следующими способами. Готовят сетку с квадратами, в которой площадь каждого квадрата по величине равна площади-поля зрения микроскопа. Клетки сетки нумеруют числами натурального ряда. Сетку монтируют на препароводителе микроскопа (рис. 23) или же непосредственно накладывают на срез. Согласно полученным номерам квадратов из таблицы случайных чисел, над ними устанавливают объектив микроскопа, после чего сетку снимают и производят анализ изучаемых морфологических структур. Менее правильным, но вполне удовлетворительным является способ, при котором гистопрепарат передвигают по предметному столику без контроля глазом и исследованию подвергают случайно оказавшийся под объективом участок среза.

Отбор случайного поля зрения можно провести и без использования специальных сеток. В последнем случае роль такой сетки выполняют винты-интеграторы препароводителя

предметного столика микроскопа (рис. 24). По предлагаемому способу отбор случайного поля зрения среза может быть проведен следующим образом. На предметном столике микроскопа укрепляют гистопрепарат и фиксируют его в препаратодителе. Фокусируют объектив микроскопа на срез и переводят под него один из углов среза, например нижний левый. Снимают показания винтов-интеграторов, которые вместе принимают за первый квадрат (первое поле зрения среза заштриховано) наложенной на срез умозрительной сетки. В нашем случае такой квадрат будет иметь номер 15—71 (рис. 24). Безразлично, показания какого винта-интегратора будут первыми, а какого последними в образуемом числе номера квадрата сетки. Далее поочередным вращением винтов интеграторов под объектив микроскопа переводят последовательно два других диагональных друг к другу угла гистологического среза и снимают показания винтов-интеграторов. В приводимом примере показания винтов-интеграторов после переведения среза в указанное положение составляют соответственно 18 и 77 (поле зрения заштриховано). Эти показания будут номером последнего квадрата умозрительной сетки (номер квадрата 18-77). Учитывая, что между номером квадрата и номером поля зрения среза есть соответствие, полагают, что в срезе заключены поля зрения от 15-71 по 18-77. После этого по таблице случайных чисел находят любое число в пределах 15-71 — 18-77, которое и будет соответствовать случайному полю зрения среза в микроскопе. Пусть таким числом будет 17-73. Тогда для отбора этого поля зрения необходимо первый винт-интегратор перевести в положение отметки 17, а второй — в положение отметки 73.

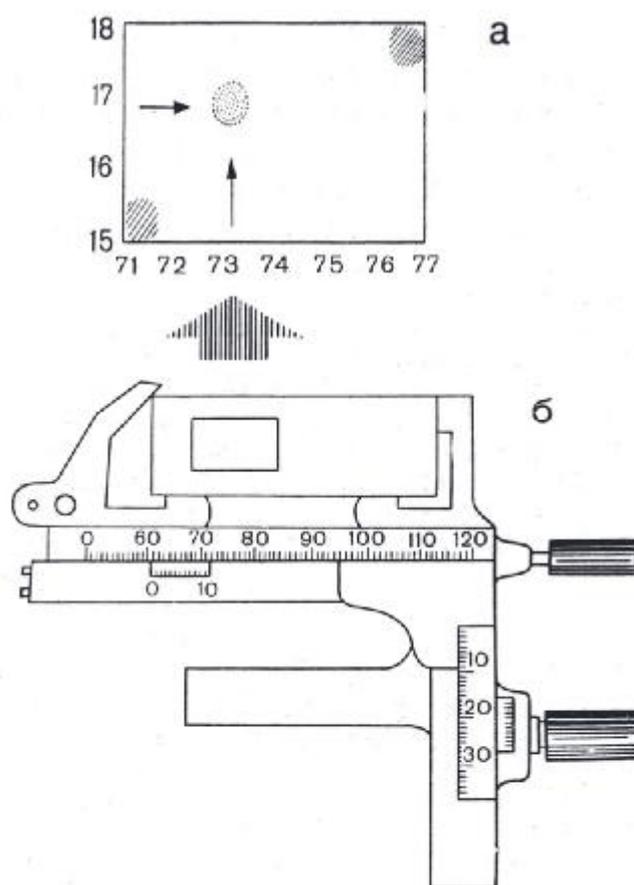


Рис. 24. Способ случайного отбора поля зрения на гистологическом срезе (а) с помощью препаратодителя (б). Объяснение в тексте.

Предлагаемая методика проста, не требует дополнительных технических средств и гарантирует получение с гистологического среза репрезентативной стереологической информации.