

СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Методические приемы стереометрии можно использовать на разных уровнях исследования морфологических структур. Одни и те же методы пригодны для изучения структур как на органном, тканевом, клеточном, так и ультраструктурном уровнях. Выбор уровня изучения зависит от цели и планирования исследования. При постановке задач полной реконструкции количественно-пространственной организации объекта и ее изменения в ходе патологического процесса стереометрический анализ проводят последовательно на всех возможных уровнях от более высоких к более глубоким. Этот подход позволяет получить достоверную информацию о количественных свойствах строения объекта в целом и количественных свойствах структурных элементов, выявляемых при максимальных увеличениях электронного микроскопа. В случае, когда исследователя интересуют принципы организации и перестройки структурных составляющих анализируемого объекта в норме и в условиях патологии на одном выбранном уровне иерархической организации, стереометрию ограничивают рамками данного уровня морфологической интеграции. На каждом иерархическом уровне строения для изучения можно избрать свойства только одного структурного компонента либо одно из свойств последнего. Однако анализ всегда нужно проводить в таком объеме, который оказывается вполне достаточным для изучения математического описания и моделирования наблюдаемого явления.

Объект исследования можно представить в виде множества, состоящего из объединения попарно непересекающихся подмножеств структурно-функциональных элементов, как

$$M \subset \bigcup_{i=1}^n a_i, \quad (45)$$

где M — объект исследования; a_i — его структурные составляющие. Каждый элемент a_i описывается набором свойств согласно

$$P = f(m, s, c, h, o, p, n, k), \quad (46)$$

где m — его форма; s — кривизна поверхности (окатанность и сферичность); c — величина; h — размерное распределение; o — количество; p — плотность упаковки; n — тип расположения в пространстве; k — все другие свойства.

Одна и та же информация о принципах количественно-пространственной организации изучаемой структурной составляющей получена разными методами, которые обычно приводят к одинаковому результату. Поэтому перед проведением стереометрического эксперимента возникают задачи выбора наиболее оптимального метода. Эта проблема решается при предварительном стереометрическом исследовании, в процессе которого устанавливаются общие принципы организации данной структурной составляющей. В зависимости от этих принципов рекомендуется использовать соответствующие методы, зная пределы его разрешающей способности и пригодность для изучения структур с данным принципом организации. Эти вопросы детально рассматриваются ниже при описании каждого способа. Кроме того, в ряде наблюдений для проверки объективности получаемых результатов рекомендуется одни и те же показатели количественной организации структуры находить методами, имеющими разные теоретические основы.

Поскольку объект наблюдения морфолога является системой, в которой между разными типами элементов имеются строгие функциональные взаимоотношения, придающие им целостный характер, в процессе количественного анализа оказывается возможным установить величину или, например, описать форму одного класса структурных элементов через другие. Например, если известен абсолютный объем препарата, удельный объем его струк-

турной составляющей, а также ее величина, то количество элементов структурной составляющей данного типа можно установить без использования специального метода. Для этого достаточно найти произведения абсолютного объема препарата и удельного объема изучаемой составляющей, а полученный результат разделить на средний объем элементов изучаемой структуры. Из приведенного примера следует, что стереометрический эксперимент может и должен быть спланирован таким образом, чтобы минимальное число исходной информации позволяло увеличить информацию о структурной организации объекта в целом. В процессе работы всегда следует избегать получения избыточных данных.

В настоящем разделе книги описываются основные стереометрические методы, которые позволяют описать все основные свойства структурно-функциональных элементов объекта изучения, такие, как форма, ориентировка, плотность упаковки, величина, размерное распределение величины, количество. В Приложении I приводятся наиболее распространенные обозначения и соотношения, используемые в стереометрии (Василев Г. и др., 1977; Weibel E., 1970; David H., 1977). Производные свойства, как, например, объем и поверхность, общее количество и другие признаки, легко устанавливаются при имеющихся данных и могут быть легко найдены с использованием простых соотношений.

Этот раздел книги следовало бы начать с характеристики методов изучения ориентировки структурных элементов объекта, так как от получения таких сведений зависит выбор того или иного способа стереометрического описания их свойств. Однако ориентировка элементов не может быть установлена без определения формы элементов объекта, поэтому целесообразно изложение стереометрических методов связать с описанием способов определения формы изучаемых структур.

Описание формы структурных составляющих объекта изучения

Форма микрообъектов является одним из их наиболее важных свойств. Она представляет собой результирующую переменную большого числа взаимодействующих параметров, таких, как плотность упаковки, величина, принципы пространственной организации других структурных составляющих препарата, их пространственная ориентировка и т.д. Вследствие этого она отражает процессы формирования данной микроструктуры, ее входа в целостную систему. В работах описательного характера значимость изменений формы объекта иногда преувеличивается и всякие искривления (вздутия и т.д.) подчас принимают за ведущий признак в идентификации морфологических проявлений заболевания; Нельзя отвергать уже разработанные и вошедшие в практику патологоанатома приемы качественного описания формы объекта. Но их недостаток, состоящий в относительной надежности сопоставления результатов наблюдений разных авторов, настолько существенен, что заставляет с осторожностью проводить обобщения по данным литературы.

Проблему формы морфологических объектов в патолого-анатомических исследованиях можно сформулировать в виде двух задач: а) определение формы (шар, сигарообразный эллипсоид и т.д.); б) определение степени изменения формы, степени различий в индивидуальной форме некоторых объектов.

Задачи первого типа ставят тогда, когда a р наблюдателя имеется только срез или шлиф трехмерного образца, а сам объект по техническим причинам выделить не удастся, как, например, не удастся выделить отдельные клетки из органа с полным сохранением их формы. Эта задача решается при использовании растровых микроскопов, но основе серийной реконструкции срезов и стереометрических методов. Трудоемкость способа реконструкций особенно ощутима в ситуациях, когда к изучению привлекают большие совокупности объектов. Учитывая, что стереологические методы позволяют лишь примерно определить форму микрообъекта, прибегают к приближению ее к одним из трех геометрических тел: сфере, эллипсоиду или цилиндру. Часто проводят комбинированное исследование, сочетая разные группы перечисленных выше методов.

Констатация формы без оценки ее параметров не сложна и ей посвящено большое число публикаций (Туркевич Н.Г., 1967; Салтыков С.А., 1970; Chaves F., 1954; Negre E., 1967; Aherne W., 1970; Underwood E., 1970; Philp J., Buchan T.). Задача второго типа — описание степени различий в форме и ее изменений гораздо сложнее. Имеющиеся методы балльной оценки слишком приблизительны. Методы, основанные на измерении ряда характерных размеров, очень трудоемки (Салтыков С.А., 1970; Яблчанский Н.И., 1974; Chalkley H., 1943; Hennig A., 1957; De Hoff, 1968). Дополнительные трудности связаны с необходимостью выбора совокупности характерных размеров, которые никак нельзя стандартизировать ввиду изменяющейся формы объекта. Примером является форма плазматической клетки, изменения которой могут быть настолько существенны, что нельзя вообще выбрать для оценки какой-либо один, а тем более совокупность характерных линейных размеров. Следует учитывать, что форма объекта топологически инвариантна к преобразованиям и очень часто структуры с внешне различной формой могут быть отнесены к одному классу структур. Следовательно, оценку формы морфологических объектов по характерным размерам нельзя использовать в качестве основного инструмента идентификации разных структур и их подразделения на классы. В этом отношении показательны структуры, скорость изменения формы которых настолько большая, что определяется при простом визуальном исследовании без использования специальных технических средств (изменения формы сердца, кардиомиоцита в систоле и диастоле, лейкоцита при миграции в очаг воспаления и т.д.). Однако как бы не изменялась форма этих объектов, они сохраняют свою принадлежность к определенному виду. Происходящие закономерные изменения формы могут быть классифицированы и идентифицированы. Именно поэтому использование только метрических методов иногда не дает эффекта. Способы описания формы микрообъекта включают в себя методы качественной и количественной оценки. Количественные методы являются более надежными. Но так как оценка формы данной структурной составляющей этими методами оказывается неодинаковой, рекомендуется одновременное использование двух подходов.

При описании формы структурных составляющих препарата используется минимально возможное число количественных и качественных данных, устанавливающих различия в форме разных элементов. Перенос результатов на другой класс структурных элементов объекта возможен только при введении соответствующих ограничений, которые должны быть специально оговорены.

Методы качественной оценки формы элементов объекта исследования основаны на визуальном сравнении наблюдаемых образцов со специальными стандартами. По этим стандартам описывают сферичность и кривизну поверхности (окатанности) изучаемых микрообъектов, которые считают показателями их формы. По шкале сферичности устанавливают, насколько близок данный микрообъект по своей форме к сфере. Если он имеет сферическую форму, то коэффициент сферичности (ϵ) равен 1, чем больше объект отличается от сферы, тем меньше коэффициент сферичности. Например, для цилиндрических структур коэффициент сферичности принимается равным 0,45. По шкале окатанности определяют округленность контуров микрообъекта. Чем больше округленность его контуров, тем больше коэффициент окатанности (σ), и наоборот. Например, для микрообъектов с угловатой формой коэффициент окатанности принимается равным 0,1, а для гистоструктур с плавными контурами 1,0. При использовании методов качественной оценки формы микрообъектов следует иметь в виду, что они являются психофизиологическими и один и тот же экспериментатор при отсутствии навыка в различное время может дать разную оценку одному и тому же микрообъекту.

На рис. 25 приведены шаблоны для оценки сферичности и окатанности микрообъектов, в которых для надежности уменьшено число классов. При постановке задач определения средних показателей сферичности и окатанности для микрообъектов результаты оценки разных микрообъектов формируют в вариационные ряды и обрабатывают статистически. По величине их средних показателей, а также по дисперсии или среднему квадра-

тичному отклонению судят о форме данного класса микрообъектов. Существенность различий в форме микрообъектов одного класса для разных препаратов (например, контроль и опыт) может быть установлена с использованием критерия Стьюдента.

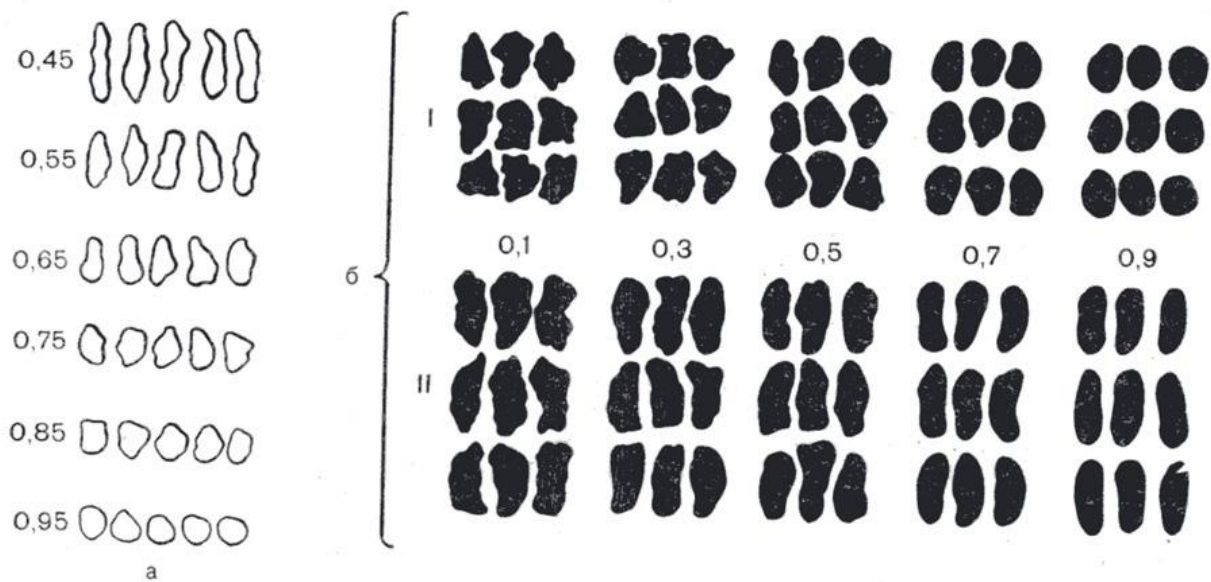


Рис. 25. Стандарты для качественной оценки формы структурных составляющих объекта изучения. а — стандарты для оценки сферичности; б — стандарты для оценки окатанности шаровидных (I) и эллипсоидных (II) микрообъектов (Griffiths G., 1970).

Количественные способы оценки формы микрообъектов основаны на измерении их осей на срезах и выведении коэффициента конфигурации β . Количество осей, выбираемых для измерений, зависит от степени сложности формы. Например, форму сферы можно описать только одной осью (диаметр), а форму микрообъекта, напоминающего амебу, — большим числом осей. Если оценка формы используется для сравнения микрообъектов одного класса, то обычно считают достаточным определение величины двух осей. Измеряют наибольшую и наименьшую оси микрообъекта.

Форму конфигурации конкретного микрообъекта можно описать отношением:

$$b = \frac{a}{b}, \quad (47)$$

где a — большая ось, b — малая ось. Форму совокупности микрообъектов одного класса можно описать, найдя статистики для a и b либо же определив зависимость между a и b . Для этих целей оси абсцисс приписывают значения размеров большей оси a , а оси ординат — соответственно размеры меньшей оси микрообъектов b (рис. 26). Такую эмпирическую зависимость в последующем можно аппроксимировать (приблизить) специально подобранной функцией и установить соответствующие коэффициенты методом наименьших квадратов.

Существуют также способы оценки формы объектов при помощи ее сравнения с формой эталонных объектов. По одному из таких способов вокруг контуров структуры описывают и вписывают в них два подобных друг другу правильных геометрических тела и определяют их однотипные размеры (длину, диаметр, радиус, периметр, площадь, объем и т.д.). По отношению размеров вписанной фигуры к размерам описанной фигуры судят о степени фактора формы (рис. 27), чем ближе величина фактора к единице, тем больше степень соответствия формы объекта к эталонной форме.

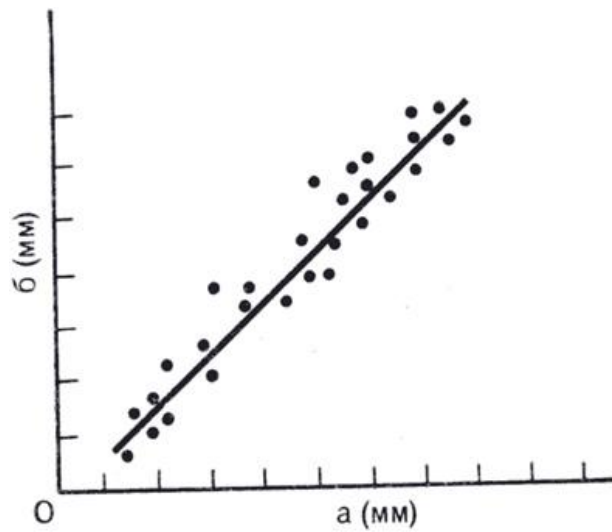


Рис. 26. Графическое изображение зависимости между короткой и длинной осями микрообъектов ткани. Точками даны экспериментальные значения.

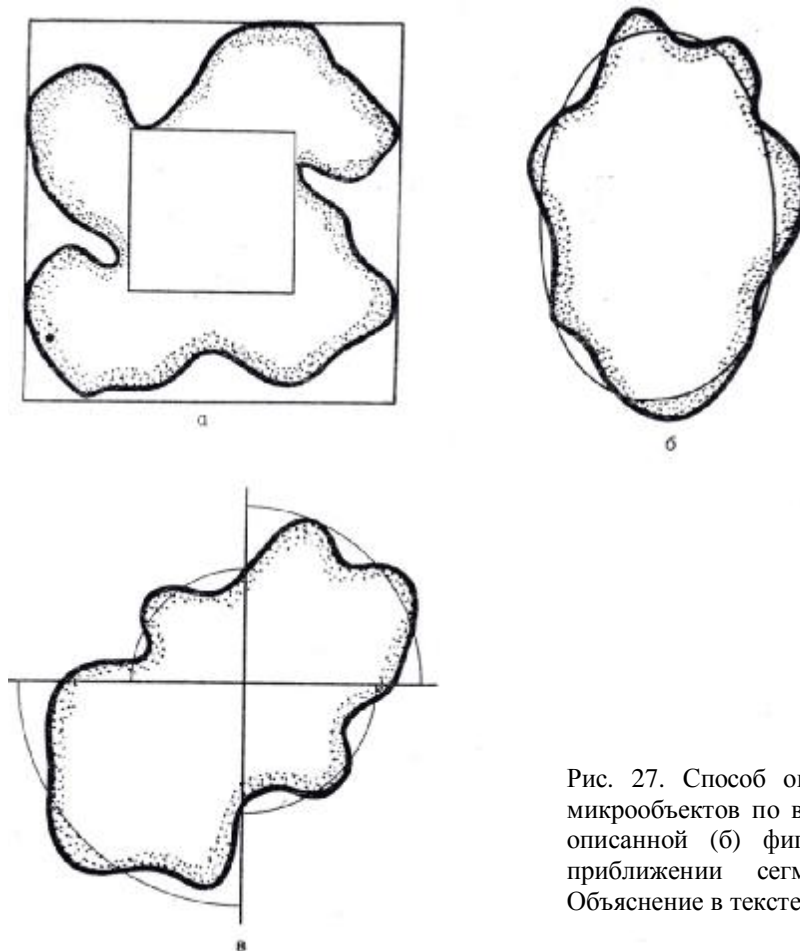


Рис. 27. Способ оценки формы микрообъектов по вписанной (а), описанной (б) фигурам и при приближении сегментами (в).
Объяснение в тексте.

Поскольку оценка фактора формы по разным характерным размерам не одинакова, в опыте всегда следует брать одни и те же размеры. Заметим, что более надежные результаты получаются в случае выбора периметра, площади поверхности или объема, которые по содержанию более стабильны, всегда могут быть идентифицированы и правильно измерены при любых изменениях формы объекта. Результаты оценки показателя фактора формы, получаемые на основе разных характерных размеров, всегда можно свести к одним значениям,

что можно показать на примере соотношений кругов:

$$\frac{r}{R} = \frac{2pr}{2pR} = \sqrt{\frac{pr^2}{pR^2}}, \quad (48)$$

где r — радиус вписанного и R — радиус описанного вокруг объекта кругов.

По второму способу производят измерение площади изучаемого объекта (S) и накладывают на него правильное геометрическое тело такой же площади. Оценивают физический фактор формы по показателю окатанности двумя методами. В первом случае подсчитывают число пересечений контуров изучаемого объекта с контурами описанной через него фигуры и окатанность определяют как $O = n/S$ (n — число пересечений контура изучаемого объекта с контуром описанного через него выпуклого геометрического тела).

По другому способу определяют периметры объекта и наложенного на него геометрического тела (соответственно P_B и P_H), окатанность находят из соотношения $O = P_B/P_H$. Эти способы требуют четкой стандартизации в построении приближенных геометрических тел.

Оценку окатанности можно дать и по числу пересечений сторон квадратно-сетчатой решетки с контурами изучаемого объекта и числу ее точек, пришедшихся на площадь изучаемого объекта, используя формулу С.А. Салтыкова (1970):

$$\Phi_\phi = 4,51 \sqrt{\frac{P}{N}}, \quad (49)$$

где N — число пересечений линий сетки с контурами объекта; P — число точек сетки, расположенных в пределах контура изучаемого объекта (рис. 28).

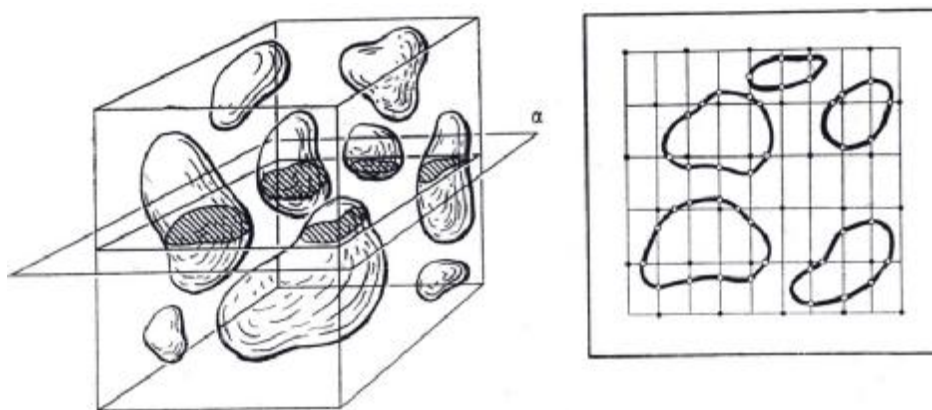


Рис. 28. Определение формы по окатанности методом Салтыкова (1970). Объяснение в тексте.

Кроме описанных способов, существует так называемый стандартный способ оценки фактора формы, основанный на определении значений поверхности (S) и объема (V) объекта с учетом отношения, предложенного Е. Weibel (1963):

$$\Phi_\phi = \frac{S}{V^{2/3}} \quad (50)$$

Однако К.С. Чернявский (1977) считает, что его нельзя просто определить путем измерения на индивидуальных частицах. В связи с этим предлагается заменить формулу Вейбеля однотипной:

$$\Phi_\phi = \frac{S^3}{V^2} \quad (51)$$

с переходом от S и V к S_v и V_v :

$$\Phi_\phi = K \cdot \frac{S_u^3}{V_u^2}, \quad (52)$$

где S_u — удельная площадь поверхности; V_u — удельный объем изучаемого объекта; $K = V_A/N$ (V_A — объем структуры A , содержащей N изучаемых объектов).

Для оценки S_v , V_v , N и V_A используются известные стереометрические методы (Автандилов Г.Г., 1973; Яблчанский Н.И., 1974; Weibel E., 1970).

В более ответственных случаях рекомендуется использовать следующий способ. Исследуемый объект (см. рис. 27, в) разбивают на пропорциональное число сегментов и производят приближение его контуров посегментно к заранее выбранными функциями. Причем приближение можно проводить самыми разнообразными способами, например по минимизации сумм площадей, заключенных между контурами сегмента изучаемого объекта и приближающей функции, по минимальному значению самого большого отклонения контура изучаемого объекта от приближающей функции и т.п. Этот метод особенно перспективен при автоматизации исследований на основе ЭВМ, так как очевидно, что геометрию контуров объекта можно описать многочленом любой степени, получая всегда очень высокое приближение и, следовательно, большую точность фактора формы объекта.

Один из возможных методов оценки формы плоской фигуры состоит в сопоставлении ряда ее параметров с соответствующими параметрами некоторой другой (базовой) фигуры Φ , обладающей какими-либо характеристиками, общими с соответствующими характеристиками рассматриваемой фигуры. Необходимо, чтобы для исследуемой фигуры Φ_1 базовая фигура Φ определялась однозначно и обладала некоторыми общими свойствами. Эти условия выполняются, если, в частности, выбирать в качестве фигуры Φ выпуклую оболочку фигуры Φ_1 . Для ограниченной плоской фигуры границу ее выпуклой оболочки Φ можно представлять как положение упругой резиновой нити, плотно охватывающей исследуемую фигуру. Выпуклая оболочка обладает рядом экстремальных свойств, которые позволяют производить приближение фигур неправильной формы.

Определение показателей формы проводят для совокупности объектов с использованием аппарата математической статистики. В этой связи весь эксперимент по оценке формы должен соответствовать требованиям статистического анализа. Он включает выбор репрезентативных совокупностей исследуемых объектов на основе системного метода или метода случайного отбора проб, проведения необходимого числа измерений для получения достоверных данных в принятом доверительном интервале. Проверка выборочных совокупностей на принадлежность к одной генеральной совокупности в последующем сопровождается расчетом межгрупповых статистик и описанием изменения формы как вероятностного процесса на основе многомерного машинного анализа по специальным статистическим программам (Автандилов Г.Г., Яблчанский Н.И., 1976; Кондратенко П.Г., 1977, Яблчанский Н.И. и др., 1978).

Для примера приведем данные о форме лимфатических капилляров эпикарда желудочков сердца (Мумров Е.А., 1974). Сравнивая показатель окатанности капилляров для разных сердец со стандартами, найдем, что в среднем он равен 0,70 (при постоянной сферичности порядка 0,45). Анализ зависимости между длиной и диаметром капилляров показал, что отношение между ними для разных сердец также одинаково в рамках погрешностей измерений и вычислений (рис. 29).

Изменение величины капилляров по длине и диаметру для разных сердец пропорционально. Во всех случаях длина в среднем в 2,057 раз превышала диаметр капиллярных сегментов. Так как для разных сердец оба метода дали одинаковые результаты, следует прийти к выводу, что в нормальном сердце форма капилляров не зависит от величины органа. Это видно из того факта, что несмотря на то что в большем сердце диаметр и длина капилляров больше, степень окатанности и сферичности, а также отношение их постоянно.

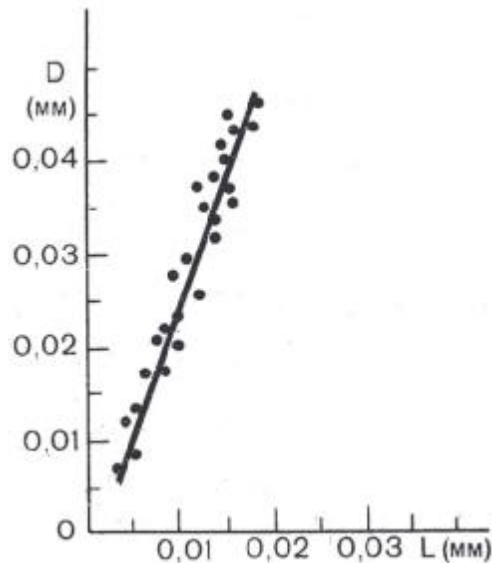


Рис. 29. Линейная зависимость между диаметром (D) и длиной (L) лимфатических капилляров левого желудочка.

Здесь же заметим, что при определении формы структурных составляющих одного класса в образце количественным методом оценка β должна быть проведена на истинных значениях длинной и короткой осей, а не на результатах измерения их сечений. В противном случае результаты окажутся неправильными. Наибольшие погрешности в оценке формы качественным и количественным методами могут возникнуть при изучении структур в форме сигарообразного эллипсоида вращения или в виде цилиндра. Например, в сечениях цилиндрических гистоструктур будут получаться прямоугольники, квадраты, круги и эллипсы разного размера.

Поэтому прежде чем определять форму того или иного структурного элемента ткани, необходимо результатам сечений его длинной и короткой осей найти истинные размеры этих осей. Истинные размеры объектов могут быть определены с помощью специальных методов, изложенных в руководствах по рии (Автандилов Г.Г., 1973).

Оценка ориентировки структурных компонентов тканей

Оценка ориентировки микрообъектов в изучаемой ткани имеет большое значение. В зависимости от степени ориентировки для определения таких свойств, как плотность упаковки, удельные длина, поверхность и объем, количество элементов, используются разные методы приготовления гистологических препаратов. Изучение ориентировки микрообъектов может также представить интерес еще и потому, что патологические процессы сопровождаются структурной перестройкой органов, тканей, клеток, ультраструктур.

Степень ориентировки обычно определяют для совокупности микрообъектов данного типа структурной составляющей макрообъекта. Ориентированность структур можно установить лишь для таких микрообъектов, у которых определяется достоверная разница между длинной и короткой осями. Если микрообъект по форме близок к сферическому аналогу, то можно считать, что он не имеет никакой пространственной ориентировки, поскольку для него нельзя выделить какое-нибудь предпочтительное направление. Поэтому обычно перед установлением степени ориентировки микрообъектов в срезе оценивают их форму. Если коэффициент сферичности близок к единице либо если отношение длинной оси к короткой также близко к единице, то такой анализ не проводят, а полагают, что структура неориентирована в пространстве. Если же структура по форме отличается от сферы, то перед стереометрическим анализом производится определение степени пространственной ориентировки совокупности образующих ее микрообъектов.

Необходимость проведения анализа по определению степени ориентировки можно ус-

тановить еще и таким образом. Измеряют отдельно длинные и короткие оси микрообъектов и результаты подвергают статистическому анализу с использованием аппарата вариационно-статистического анализа. Находят средний размер, его дисперсию, среднее квадратическое отклонение и ошибку среднего размера. Полученные данные для длинного и короткого диаметров сравнивают друг с другом по методу Стьюдента. Если при этом $t_{эсп} > t_{табл}$ то, приняв гипотезу о существенной разнице в величине длинной и короткой осей, проводят исследование микрообъектов на степень их пространственной ориентировки.

Для определения ориентировки микрообъектов в гистологических срезах наиболее принятым является метод, при котором устанавливают углы отклонений каждого микрообъекта по отношению к одной выбранной направляющей линии, положение которой на плоскости можно взять произвольным. Результаты измерений подвергают обработке методами вариационной статистики и находят дисперсию. По величине дисперсии судят о степени пространственной ориентировки объектов. Если дисперсия равна нулю, то, очевидно, все микрообъекты строго параллельны и жестко ориентированы в пространстве.

Поскольку спектр изменения дисперсий для разного по ориентировке класса структур оказывается непрерывным, то трудно определить, в каком случае имеет место тот или иной тип ориентировки. Поэтому по степени ориентировки условно выделяют три класса микрообъектов:

- микрообъекты, имеющие строгую ориентировку (дисперсия равна нулю);
- микрообъекты с предпочтительной ориентировкой (дисперсия меньше 900 или среднее квадратическое отклонение меньше 30);
- микрообъекты, случайно ориентированные, т.е. практически не имеющие какой-либо предпочтительной ориентировки (дисперсия равна или больше 900, а среднее квадратическое отклонение равно или больше 30).

В том случае, когда определение степени ориентировки используется для выбора тех или иных стереометрических методов изучения количественно-пространственной организации структурных компонентов изучаемого образца, его проводят для определения предпочтительной ориентировки. В случае строгой ориентировки такой анализ обычно не проводится, поскольку жесткое расположение микрообъектов в одном направлении устанавливается при изучении препарата.

Для проведения исследования микрообъектов на степень ориентировки срезы обычно следует готовить в плоскости, параллельной длинной оси последних. При выборе другой плоскости сечения такой анализ, оказывается по крайней мере затруднительным. Например, на электронных микрофотографиях срезы прошли в перпендикулярной плоскости по отношению к длинной оси митохондрии и на сечениях получились круглые образования. Равенство коротких и длинных осей не дает возможности определить степень ориентировки митохондрий в сердечной мышечной клетке (кардиомиоците). В случаях, когда срезы идут в плоскости, близкой к длинной оси митохондрий, исследование на ориентировку ультроструктур можно провести.

Методы определения ориентировки довольно просты. На препарате выбирают какое-либо стандартное направление с помощью линии известной длины. Длинные оси сечений микрообъектов проецируют на такую выбранную направляющую линию. Замеряют углы, образованные между этой линией и проекциями микрообъектов. Замеры можно производить с помощью угломера. Результаты подвергают статистической обработке и по дисперсии, как отмечалось выше, судят о степени ориентировки структур. Число размеров должно быть таким, при котором ошибка ка среднего угла отклонений микрообъектов от направляющей линии не превышает 5% от среднего значения. Это достигается при проведении статистического эксперимента с использованием: формулы для расчета объема выборки после предварительного замера углов отклонений не более чем 30 микрообъектов.

Для примера определим степень ориентировки двух типов структур. Первоначально изучим степень ориентировки альвеолярных капилляров в межальвеолярных перегородках легкого. Допустим, что были произведены замеры углов отклонений альвеолярных капилля-

ров по отношению к выбранной направляющей линии в объеме, достаточном для получения репрезентативных статистик. Результаты замеров были сгруппированы по классам, что позволило составить вариационный ряд (табл. 6).

Таблица 6

Распределение величин углов ветвления капилляров альвеол легких по отношению к направляющей

Угол отклонения (в градусах)	0	10	20	60	70	80	120	130	140	180
Частота наблюдений	7	6	8	7	3	6	6	5	7	9

Уже по форме вариационного ряда видно, что гистограмма распределения частот встречаемости выделенных классов углов отхождений капиллярных ветвей по отношению к выбранной направляющей линии напоминает прямоугольник (рис. 30).

Вследствие этого даже без проведения вычислений можно считать, что какой-либо предпочтительной ориентировки альвеолярные капилляры не имеют. Проведенные вычисления показали, что средний угол между капиллярами и направляющей линией составил $93,31^\circ$ (при среднем квадратическом отклонении в $55,55^\circ$). Полученное значение среднего квадратического отклонения превышает значения, характерные для преимущественной ориентировки и соответствует классу микрообъектов с преимущественно случайной ориентацией. Исходя из изложенного, приходим к выводу что при изучении формы альвеолярных капилляров могут быть использованы адаптированные к неориентированным структурам стереометрические методы.

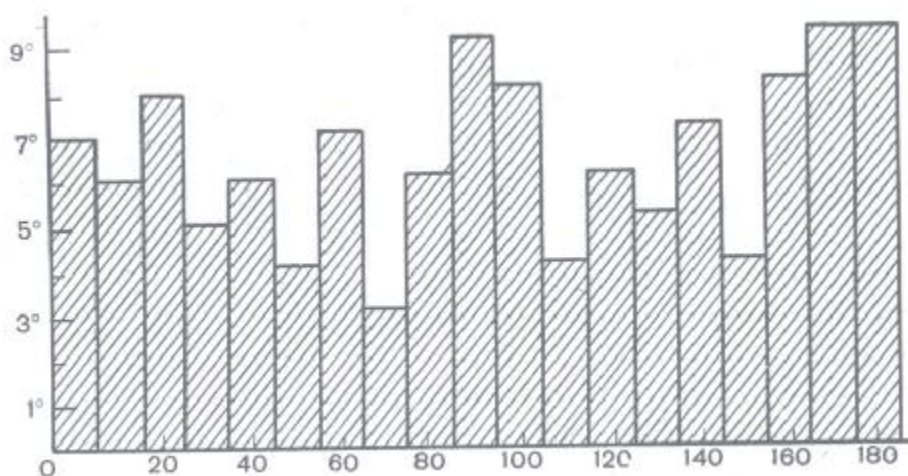


Рис. 30. Гистограмма частот отклонений хода капилляров альвеол легких от выбранной направляющей. По оси абсцисс отложена частота, по оси ординат — углы отклонений длинника капилляра от направляющей.

Если, например, рассмотреть степень пространственной ориентировки интрамуральных кишечных артерий, то придем к противоположному выводу. Проведем замеры углов, образованных между длинниками кишечных артерий и направляющей линией, проведенной в плоскости, перпендикулярной по отношению к длине главного артериального ствола (рис. 31). Результаты замеров дали вариационный ряд, который представлен в табл. 7.

Проведя статистическую обработку материала, найдем, что средний угол отклонения стволов кишечных артерий по отношению к направляющей линии составит $94,95^\circ$ (при среднем квадратическом отклонении в $20,98^\circ$). Полученные значения для среднего квадратического отклонения, меньшие 30° , позволяют прийти к выводу о преимущественной ориентировке

артерий в стенке тонкой кишки. Если, как и в первом примере, результаты измерений представить графически, то полученная гистограмма приближается к кривой нормального распределения (рис. 32). Заметим, что если бы направляющая была взята по отношению к длиннику главного артериального ствола в другом направлении, то в итоге был бы получен аналогичный результат.

Таблица 7

Распределение величин углов ветвления интрамуральных артерий тонкой кишки относительно направляющей

Угол отклонения (в градусах)	30	40	60	70	80	90	100	110	120	130	140	160
Частота наблюдений	1	2	3	5	12	26	18	13	14	12	5	2

Это связано с тем, что степень ориентировки структур оценивается не по самому среднему углу отклонений, а по его дисперсии или среднему квадратическому отклонению.

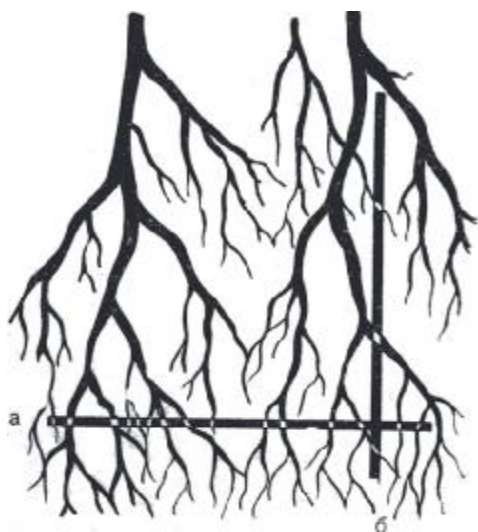


Рис. 31. Два возможных типа наложения направляющей линии на плоскостную ангиограмму (а, б) при определении степени ориентировки сосудов.

Примером жесткой ориентировки структурных составляющих в препарате могут служить капилляры миокарда. Если их подразделить на два непересекающихся подмножества — на капилляры, идущие параллельно кардиомиоцитам и лежащие перпендикулярно (соединительные ветви), то для каждого подмножества получим дисперсии, по величине близкие к нулю.

Формы приведенных гистограмм (см. рис. 30, 32) показывают, что при оценке степени ориентировки структур с целью выбора способов стереометрического исследования по существу нет необходимости проводить статистический анализ. Если вариационный ряд по форме дает фигуру, близкую к прямоугольнику, можно считать, что анализу подвергаются преимущественно неориентированные микрообъекты. Если же кривая вариационного ряда имеет вид нормальной кривой, то полагают, что изучаемые микрообъекты имеют предпочтительную ориентировку в пространстве.

Полный статистический анализ результатов измерений необходим тогда, когда оценка степени ориентировки используется для изучения особенностей изменения в органах при том или ином патологическом процессе. Однако такой анализ целесообразен в тех случаях, когда процесс изменяет пространственную ориентировку микрообъектов, которая может служить показателем выраженности патологической перестройки органа.

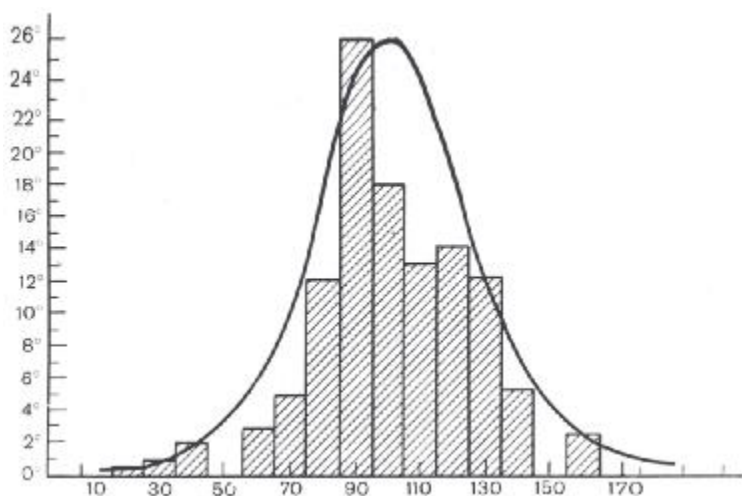


Рис. 32. Гистограмма частот отклонений длиннок кишечных артерий от выбранной направляющей (те же обозначения, что на рис. 30).

Приведенные примеры показывают, что даже близкие по строению ткани могут иметь разную пространственную ориентировку своих структур и поэтому результаты изучения одного типа микрообъектов, полученные на одном органе, нельзя переносить на другие.

Определение удельного, абсолютного объема и площади структурных компонентов биологических объектов

Излагаемые в настоящем разделе методы используются при любом типе ориентировки микрообъектов обычных срезов. Если объекты не имеют предпочтительной или жесткой ориентировки, срезы можно готовить в любой плоскости по отношению к одной из поверхностей кусочка. Если же в препарате имеются микрообъекты с предпочтительной или жесткой ориентировкой, срезы рекомендуется готовить в плоскости, перпендикулярной по отношению к оси ориентации таких микрообъектов. Если в объекте имеется несколько осей ориентации элементов, например в двух плоскостях, то срезы для анализа также изготавливают в двух плоскостях, перпендикулярных к двум установленным осям ориентации. Затем проводят стереометрический анализ отдельно на каждом из двух выделенных подмножеств срезов тех структур, которые лежат перпендикулярно по отношению к плоскости среза. Результатом измерений в таком случае будет являться сумма результатов замеров на первом и втором подмножествах (Авгандилов Г.Г., Гевондян Т.А., 1977).

Для определения удельных площадей и объемов структурных компонентов тканей при светооптическом и электронно-микроскопическом исследовании (рис. 33) используются те же методы, что и на органомерическом уровне исследования, т.е. методы взвешивания, зарисовок, метод «полей» и метод линейного интегрирования. Как и при органомерическом исследовании, предпочтение следует отдать методу «полей». Только в том случае, когда плотность упаковки (удельная площадь, удельный объем) данного класса микрообъектов очень мала, например меньше 5%, следует отдать предпочтение методу линейного интегрирования. Это связано с тем, что с уменьшением плотности упаковки совокупности микрообъектов число необходимых подсчетов точек для получения репрезентативных (в 95% доверительном интервале) данных значительно возрастает; Например, при объемной плотности в 5% для получения достоверного результата нужно подсчитать в общей сложности не меньше 3500 точек. Если доля данного компонента еще ниже, то число подсчетов точек возрастает до десятков и сотен тысяч. При этом на обработку только одного препарата затраты времени резко возрастают. Следует иметь в виду, что метод линейного интегрирования можно использовать при наличии специального интеграционного столика. В других случаях его

следует объединить с каким-либо другим структурным компонентом, также занимающим по объему малую часть величины препарата. Суть метода линейного интегрирования состоит в том, что по какой-нибудь одной линии известной длины определяют ту ее часть, которая приходится на микрообъекты данного класса. После этого, как и при методе «полей», для оценки плотности упаковки данного класса микрообъектов часть длины линии, приходящейся на микрообъект, делят на общую длину линии. Измерения проводят неоднократно, затем составляют вариационный ряд, и данные обрабатывают методами вариационной статистики.

Технически этот метод реализуют следующим образом. На предметном столике микроскопа устанавливают препаратодитель (см. рис. 23), движения которого в одной плоскости могут осуществляться рядом, винтов, отградуированных в линейной шкале. В окуляр микроскопа помещают вставку с перекрестом. Гистопрепарат фиксируют в препаратодителе, все его винты устанавливают в нулевое положение. Набор винтов 1—2—3—4 служит для линейного интегрирования. Винт 5 используют для стандартного перемещения препарата после одной проведенной процедуры интегрирования в плоскости, перпендикулярной к плоскости интегрирования. Каждому винту 1—2—3—4 приписывают разные структурные компоненты ткани. Каждый из винтов 1—4 вращается до тех пор, пока перекрест окуляра микроскопа находится в пределах соответствующего ему тканевого компонента. Как только перекрест окулярной вставки выходит за пределы данного объекта, препарат передвигают другим винтом, соответствующим другому приписанному ему структурному компоненту. После завершения интегрирования по одной линии препарат с помощью винта 5 препаратодителя переводят в другое положение, после чего линейное интегрирование продолжают. Калибровка линейного интегратора необязательна, так как плотность каждого класса структурных составляющих препарата находится в относительных единицах. Следует указать, что такой столик удобен и при проведении измерений, когда в одном поле зрения микроскопа надо измерить до 4 структурных компонентов. Необходимую для этих целей калибровку проводят с помощью объект-микрометра, который вставляют в гнездо препаратодителя на место гистологического среза.

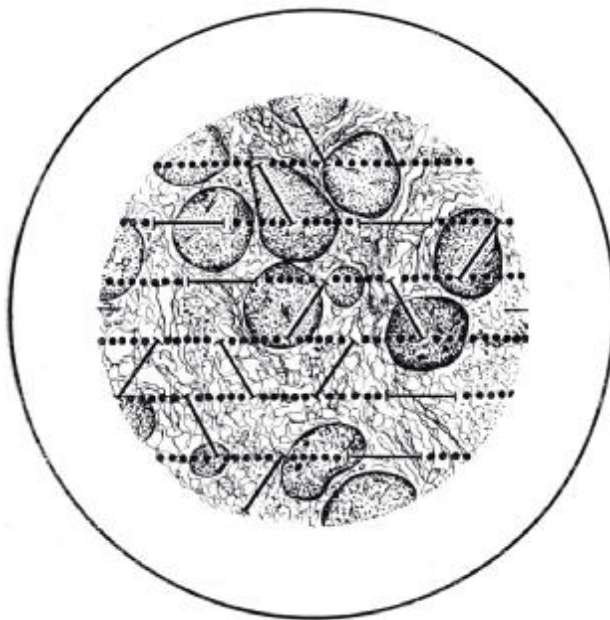


Рис. 33. Для проведения точечного счета сетка наложена электронограмму гепатоцита (X 30 000). За точки принимают концевые участки линий. Линии и расстояния между ними можно откалибровать и использовать в качестве измерительной линейки.

В случаях, когда плотность тканевых компонентов объекта наблюдения можно изучить с помощью метода «полей», этому способу всегда отдают предпочтение. Отметим, что в морфологических исследованиях редко встречаются такие структуры, для изучения которых метод «полей» бывает неприменим (Глаголев А.А, 1941; Agduhr E., 1941; Weibel E., 1963; Elias H., 1967; Orthner H., Sandler W., 1975).

Как отмечалось выше, анализ методом взвешивания зарисовок, методом «полей» и методом линейного интегрирования можно проводить на всех уровнях выявления структурных составляющих в системе иерархически организованной биологической морфоструктуры. При этом рекомендуется выбирать такое увеличение, чтобы величина изучаемой совокупности микрообъектов превышала толщину перекреста линий окулярных вставок при использовании метода линейного интегрирования) или толщину точек (при использовании метода «полей») не менее чем в 50 раз. В противном случае обработка материала затруднительна вследствие высокой нагрузки на глаз, что сказывается на результатах. Кроме того, при сопоставимых размерах изучаемых структур и величины точек решетки трудно отнести точку к той или иной структурной составляющей объекта. В то же время всегда может быть получено такое соотношение, при котором величина микрообъекта не менее чем в 50 раз превышает толщину точки.

Метод «полей» в практическом отношении на любом уровне исследования не имеет принципиальных отличий от особенностей его использования на органном уровне. Методика подсчетов точек и способ статистической обработки результатов однотипны. Для статистической обработки получаемых данных используется метод альтернативной статистики. Следует только учитывать, что при определении абсолютного объема данного класса микрообъектов в органе их объемную плотность следует умножать не на абсолютный объем того типа тканей, для которых он был определен на макроскопическом уровне изучения. Например, при определении суммарного абсолютного объема клеток печени (гепатоцитов) их удельный объем умножают не на абсолютный объем органа, а на объем, найденный на органном уровне и состоящий только из гепатоцитов. Для оценки общего объема нервных клеток одного типа в коре головного мозга значение их удельного объема нужно умножить не на абсолютный объем головного мозга в целом, а только на объем коры мозга, который устанавливают на органомерическом уровне исследования.

Все статистики распределения абсолютных объемов структурных элементов тканей, полученные на гисто-, цито-, ультраструктурно-метрических уровнях получают аналогично оценке их абсолютных объемов. Другими словами, объем ткани, в которой устанавливают содержание данного класса микрообъектов в виде их абсолютного объема, следует умножить на статистику удельных объемов данного типа микрообъектов.

Для этих исследований пригодны все типы квадратно-сетчатых окулярных вставок. В тех случаях, когда данный класс микрообъектов занимает малый удельный вес в данном типе ткани органа и характеризуется малыми размерами, следует применять решетки с точками. В особо ответственных случаях используют сетки, в которых точки имеют нулевую толщину (рис. 34).

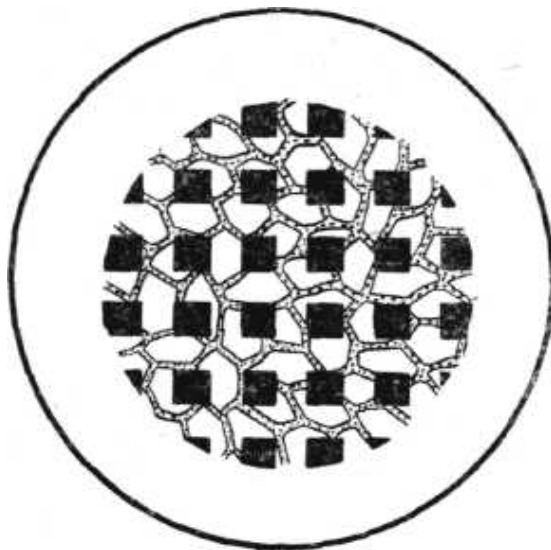


Рис. 34. Наложение окулярной вставки, заменяющей квадратно-сетчатый окуляр, на гистологический срез легкого. Точки вставки имеют нулевую толщину.

Как и при методе линейного интегрирования, так и при методе «полей» схема проведения стереометрического исследования одинакова.

Вся структура, анализируемая под микроскопом, рассматривается в виде объединения попарно непересекающихся подмножеств структурно-функциональных элементов данного уровня исследования как

$$A \subset a \cup b \cup c, \quad (53)$$

где типы классов структурно-функциональных элементов

$$a \subset \bigcup_{i=1}^n a_i; b \subset \bigcup_{j=1}^m b_j; c \subset \bigcup_{k=1}^p c_k,$$

количество типов — A . Точки сетки (или фрагменты линий), накладываемые на структуру для проведения анализа, представляются в виде объединения попарно непересекающихся подмножеств точек, приходящихся соответственно на изучаемые классы элементов данного уровня исследования, что можно записать в виде

$$P_A \subset r_a \cup r_b \cup r_c, \quad (54)$$

где для $a \subset \bigcup_{i=1}^n a_i$ соответствует r_a , для $b \subset \bigcup_{j=1}^m b_j$ — r_b , для $c \subset \bigcup_{k=1}^p c_k$ — r_c .

Зависимость между величиной структурно-функциональных элементов объекта исследований и числом точек (фрагментов линии), приходящихся на них, а также между общей величиной препарата всем числом приходящихся на него точек может быть записана рядом зависимостей по числу выделенных классов элементов данного уровня исследования в виде следующих соотношений:

$$\frac{u_a}{V_A} = \frac{r_a}{P_A} \quad (55); \quad \frac{u_b}{V_A} = \frac{r_b}{P_A} \quad (56); \quad \frac{u_c}{V_A} = \frac{r_c}{P_A} \quad (57)$$

что позволяет объемную плотность данного структурного компонента ткани в объеме органа определить из зависимости:

$$u_i = \frac{V_A P_i}{P_A}, \quad (58)$$

где u_i — объем (площадь) данной тканевой составляющей при нулевой толщине среза. Схема, иллюстрирующая зависимость между величиной объекта исследования и величиной его структурно-функциональных элементов, а также между общим числом точек, взвешенных в объеме ткани, и числом точек, приходящихся на выделенные классы элементов, представлена на рис. 35.

Для получения представительных сведений по плотности упаковки исследуемых классов структурных компонентов образца при проведении анализа методом «полей» необходимо число точек и число измерений линий (при использовании метода линейного интегрирования) набирать не в одном поле зрения микроскопа и не на одном срезе. Например, при использовании метода «полей» теоретически наиболее удачным является такой подход, при котором на одно поле зрения микроскопа приходится всегда одна точка. Поскольку при этом анализ затрудняется, то в одном поле зрения используют большее число точек. Наиболее оптимальным вариантом исследования является такой способ, когда окулярная сетка-вставка содержит не более 25 точек. При этом малая плотность точек в окуляре облегчает подсчеты одного поля, а малое число точек, расположенных в поле зрения, приводит к необходимости

измерения большого числа полей, что объективизирует исследование. Если с помощью сетки с 25 точками изучать на одном препарате не более чем по 5 полей, то всего будет подсчитано 125 точек. Тогда необходимое число подсчетов точек получают посредством увеличения числа изучаемых гистологических препаратов. Необходимое число точек делят на число точек, подсчитываемых на одном срезе, и определяют нужное число срезов. Затем найденное число срезов делят на число участков органа, из которых готовились данные срезы, частное дает количество срезов для каждого участка, которые должны подвергаться обработке. Если из каждого участка было приготовлено больше срезов, чем требуется для проведения объемного анализа, то в каждой совокупности срезов нужные данные получают с использованием таблиц случайных чисел (Автандилов Г.Г. и др., 1978).

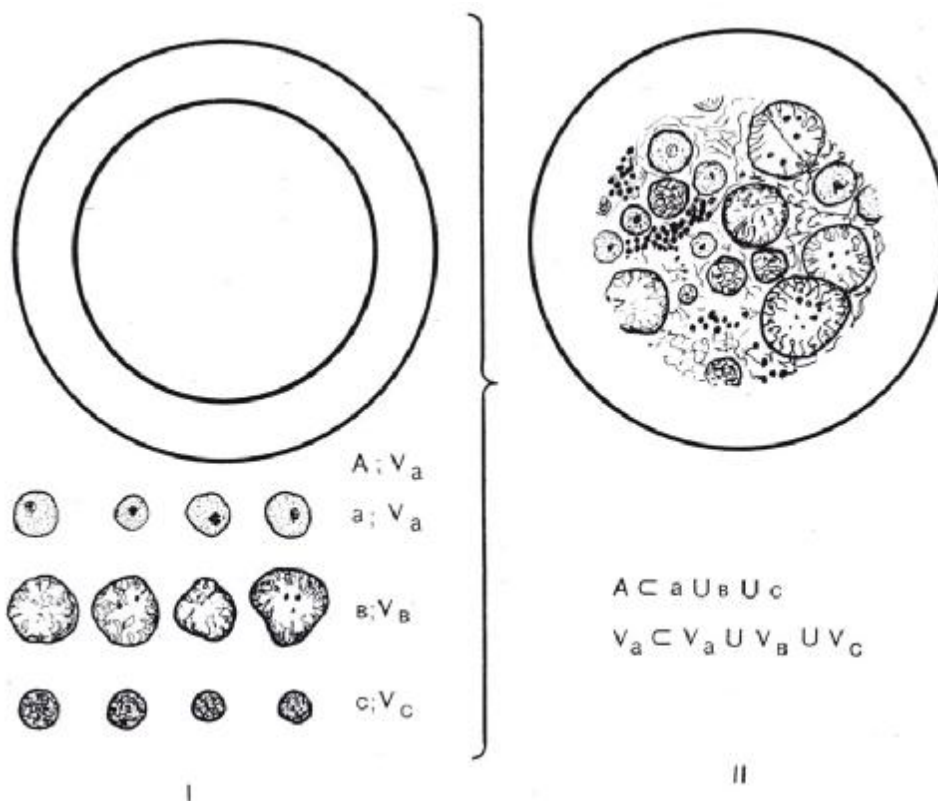


Рис. 35. Схема проведения анализа методом «полей» на гисто-, цито-, кардио- и ультраструктурно-метрических уровнях (I, II). Объяснение в тексте.

В качестве примера проведем объемный анализ легкого и определим общий объем капилляров альвеол. Для этих целей методом «полей» проведем измерения на нескольких стереометрических уровнях исследования и определим удельный и абсолютный объем паренхимы легкого, через него установим удельный и абсолютный объем межальвеолярных перегородок, а затем, используя эти данные, определим удельный и абсолютный объем альвеолярных капилляров. Пусть объем легкого составляет 3500 мл. Разрежем его на ряд пластин толщиной в 1 см, параллельных друг другу и перпендикулярных по отношению к корню органа. Проведя планиметрический анализ методом «полей» на данном уровне, а также выполнив статистический анализ методами альтернативной статистики, установим, что на паренхиму приходится 0,9045 объема легкого при абсолютном объеме в 3500-0,9045 = 3165,74 мл. Отобрав из блоков легкого участки для приготовления гистологических препаратов, согласно методу случайного бесповторного отбора проб (с помощью наложения нумерованной сетки), изготовим из этих блоков гистологические препараты, из которых случайно отберем достаточное число срезов для стереометрического исследования. При увеличении в 100 раз тем же методом «полей» на препаратах определим плотность упаковки межальвеолярных

перегородок в паренхиме легкого. Пусть она составила 0,1012, тогда абсолютный объем межальвеолярных перегородок будет равен $3165,74 \cdot 0,1012 = 320,37$ мл. Далее при увеличении микроскопа в 950 раз оценим тем же методом объемную плотность альвеолярных капилляров, которая составила 0,7659 объема межальвеолярных перегородок. Произведение $320,37 \cdot 0,7659 = 245,37$ мл является абсолютным объемом альвеолярных капилляров.

В данном примере для упрощения не определялись статистики для паренхимы легкого, межальвеолярных перегородок и альвеолярных капилляров, которые можно найти по соответствующим формулам (см. раздел органометрического исследования).

Метод планиметрии распространяется на все уровни исследования, в том числе и на ультраструктурный. Для этих целей на электронную микрофотографию клетки или ее отдела накладывают или сетку с квадратами или, лучше, сетку с равноудаленными друг от друга точками (см. рис. 12) и производят дифференцированный подсчет точек, приходящихся на изучаемые классы структурных компонентов.

Методы определения размеров микрообъектов по измерениям их сечений на срезах

Морфологический объект можно рассматривать в виде сложной системы, которая образована находящимися в тесных анатомических и функциональных взаимоотношениях подмножествами большого числа структурных элементов. Тесные пространственные взаимоотношения между этими элементами не дают возможности для проведения их непосредственных замеров, и морфологу приходится довольствоваться информацией, получаемой при изучении срезов этих объектов. Но так как гистологический срез имеет на одну размерность меньше по сравнению с размерностью самого объемного объекта, эта информация отражает только величину сечений входящих в него подмножеств структурных элементов.

Размеры сечений микрообъектов не относятся к точному классу сведений, так как распределения размеров объектов существенно отличаются друг от друга. Разработанные способы стереометрического анализа имеют много недочетов, однако позволяют установить по сечениям пространственные размеры таких геометрических фигур, как сфера, эллипсоид и цилиндр.

Истинные размеры по сечениям можно восстановить, например, способами графических реконструкций (Туркевич Н.Г., 1967).

Однако они мало пригодны для решения запросов системного метода в количественной морфологии, что связано с их большой трудоемкостью и очень низкой производительностью. Количественный метод требует производства огромного числа измерений, поэтому метод графических реконструкций для этих целей малоприменим. Морфологи обычно отдают предпочтение стереологическим методам, приближая изучаемые структуры к одной из трех возможных моделей: цилиндр, эллипсоид, сфера (Яблчанский Н.И. и др. 1976; Abercrombie N., 1946; Henning; A., Elias H., 1963, и др.).

В настоящем разделе излагаются стереологические методы определения размеров микрообъектов, которые можно представить в виде сферы, эллипсоида и цилиндра. Выбор приближенной модели очень часто представляет собой довольно трудную задачу. Ниже описывается, как можно на срезе отличить сечение сферического аналога от сечения эллипсоида особенно данной модели эллипсоида отношение между короткой и длинной осью близко к единице. В особо ответственных случаях, когда по имеющейся на срезе информации не удастся классифицировать представляющие интерес микрообъекты, можно прибегнуть к методу графических реконструкций. После того как форма микрообъекта установлена, находят его размеры с использованием стереологического аппарата. Для повышения точности результатов реконструкции на построенных методом графической реконструкции моделях размеры можно найти прямым измерением и с использованием специальных стереометрических формул. Затем устанавливают поправочные коэффициенты, которые используют в дальнейшей работе.

Все методы по определению истинных размеров микрообъектов на срезах как составной этап включают статистический анализ. В связи с этим планирование и проведение эксперимента по определению истинных размеров микрообъектов должны соответствовать также требованиям статистического анализа, как и весь стереометрический анализ вообще. Число замеров в одном препарате должно быть достаточным для получения репрезентативной ему информации. Результаты замеров на разных срезах должны проверяться на принадлежность к одной генеральной совокупности и только после этого объединяться согласно важнейшим математическим свойствам дисперсий и средних. Невыполнение этого основного требования может привести к ошибочным результатам.

Определение неистинных размеров сферических структур. В случае, когда толщина гистологического препарата превышает диаметр изучаемой совокупности микрообъектов, идеализированных аналогом сферической формы, представляется возможность прямого замера их величины. С ситуацией такого рода наиболее часто встречаются при измерениях клеток и их ядер на гистологическом срезе. Технические затруднения связаны только с необходимостью дифференцировки неповрежденных микротомным ножом клеток, которые выявляются при просмотре среза на разных уровнях фокусировки микроскопа (Иваницкий Г.Р.; Шмаков А.К., 1972; Elias H., 1954; Bach G., 1963; Underwood E., 1970).

Между тем эти Методы не совсем совершенны и в особо ответственных случаях ими пользоваться не рекомендуется. Толщина гистологического препарата, особенности пространственной организации препарата, его плотность, вид и степень окраски, вызывают ряд оптических феноменов; искажающих величину измеряемых микрообъектов. Одновременный анализ клеток или их ядер не только в глубине среза, но и на верхней и нижних плоскостях его является затруднительным, так как в этих условиях возникает задача разграничения комбинации двух наложенных друг на друга распределений: распределения истинного диаметра и распределения сечений в переменном смещающейся плоскости сечения (от экватора изучаемой шарообразной структуры к ее полюсу). Поэтому для стереометрического метода лучше использовать срезы нулевой толщины, т.е. такие срезы, толщина которых значительно меньше диаметра сечения изучаемого микрообъекта. Эти срезы легко получить, изучая препарат в интервале от разных степеней увеличения светового микроскопа до максимальных увеличений растрового электронного микроскопа.

Установлено, что между диаметрами сечений и истинными диаметрами шарообразных микрообъектов существует статистическая зависимость, т.е.

$$f(V_{iu}) = S_{iu}, \quad (59)$$

где V_{iu} — распределение размеров сферических микрообъектов; S_{iu} — распределение диаметров их сечений.

Одним из наиболее простых методов в этой группе является метод (Брюханов В.М. и др., 1974), используемый в металлографических лабораториях. В его основу положен анализ статистик распределений сечений и истинных распределений диаметров микрообъектов, имеющих форму сферического аналога. Этот метод пригоден для использования в морфологических исследованиях и особенно при проведении микроспектрофотометрического анализа на гистологических срезах, когда, например, необходимо производить пересчет количества вещества на объем ядер. Главное требование этого метода относится к технике получения и изучения срезов, и оно может быть легко выполнено. Для получения достоверных результатов при использовании метода следует замеры проводить на срезах «нулевой» толщины с использованием линейки также нулевой толщины. На срезе производят измерение диаметров сечений микрообъектов. По результатам замеров, сгруппированным в вариационный ряд, находят статистики распределения диаметров их сечений (среднее арифметическое, дисперсия, среднее квадратическое отклонение и ошибка среднего арифметического). Истинный диаметр совокупности микрообъектов формы сферического анализа определяется из зависимости:

$$D = \frac{4d}{p(1+c^2)}, \quad (60)$$

где d — средний диаметр его сечения; $\pi = 3,14$; c — коэффициент вариации. Для определения дисперсии, среднего квадратического отклонения и ошибки распределения истинного диаметра совокупности сферических микрообъектов используются соответственно следующие формулы:

$$s_D = \frac{4sd}{p(1+c^2)} \quad (61); \quad D_D = s_D^2 \quad (62); \quad m_D = \frac{4md}{p(1+c^2)} \quad (63)$$

По другому методу (Г.Р. Иваницкий и А.К. Шмаков, 1972) на гистологических срезах, электронных фотографиях находят минимальный и максимальный диаметры сечений срезов микрообъектов, которые задают в интервале d_{min} — d_{max} . Полученный интервал разбивают на j классов шириной u каждый. В таком интервале будут сгруппированы диаметры от истинного диаметра сферического микрообъекта до диаметра сечения около полюса, равного нулю (рис. 36).

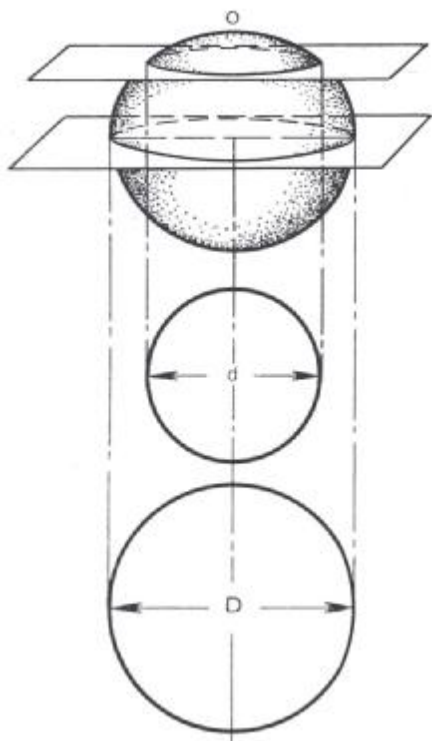


Рис. 36. Круги, получаемые в сечении сферы плоскостью, проведенной на разных уровнях по отношению к экватору. Диаметры кругов сечений шаров могут изменяться от максимального диаметра сечения (D — диаметр сферы) через другие сечения (d) до диаметра сечения, равного по величине нулю (0), полученного на полюсе сферы.

Полученные вариационные ряды используют для установления истинного диаметра микрообъектов, который находят по формуле:

$$D = p \left[\frac{P_0 \left(\frac{d_0 - u}{2} \right)^2}{ud_0} + \sum_{i=0}^{\infty} p_i \right] \left/ \left[\frac{P_0 \left(\frac{d_0 - u}{2} \right)}{u \cdot \frac{d_0}{2}} + 2 \sum_{i=1}^{\infty} \frac{p_i}{d_i} \right], \quad (64)$$

и его дисперсии:

$$s_D^2 = 4 \left[\frac{P_0 \left(\frac{d_0 - u}{2} \right)^3}{1,5ud_0} + \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{\infty} d_i p_i \right] \Bigg/ \left[\frac{P_0 \left(\frac{d_0 - u}{2} \right)}{u \cdot \frac{d_0}{2}} + 2 \sum_{i=1}^{\infty} \frac{p_i}{d_i} \right] - \frac{D^2}{4} \quad (65)$$

где P_i — частота встречаемости каждого класса сечений; d_0 — величина диаметра сечения в наименьшем классе размеров.

Покажем способы определения истинных размеров сферических микрообъектов по измерениям их сечений на основе обоих методов. Пусть были проведены измерения диаметров сечений шаров (ядер в печеночных клетках) на плоскостных срезах в объеме, достаточном для получения достоверных статистик в 95% доверительном интервале. Найденные размеры сгруппировали в вариационный ряд и подвергли вариационно-статистической обработке. Было установлено, что средний диаметр сечений ядра составляет 10 мкм при среднем квадратическом отклонении в 1,5 мкм, ошибке 0,12 мкм и коэффициенте вариации 0,15. Подставляя полученные данные в формулы (60—63), находим соответственно истинные параметры среднего диаметра ядра, его среднего квадратического отклонения и ошибки, т.е.

$$D = \frac{40}{3,14(1 + 0,15^2)} = 11,07 \text{ мкм};$$

$$s_D = \frac{1,5 \cdot 4}{3,14(1 + 0,15^2)} = 1,66 \text{ мкм};$$

$$m_D = \frac{0,12 \cdot 4}{3,14(1 + 0,15^2)} = 0,13 \text{ мкм}$$

Для определения истинных размеров шаров по их сечениям по второму методу дадим пример, приводимый Г.Р. Иваницким и А.К. Шмаковым (1972). Пусть были проведены измерения диаметров сечений шарообразных структур на их срезах. В результате замеров установлено, что величина сечений диаметров шарообразных микрообъектов варьирует в пределах 0,010 — 0,036 мкм. Разобьем полученный интервал на 12 классов шириной в 0,005 мкм каждый, результаты измерений сведем в таблицу с одновременной заменой диаметров сечений на их радиусы. Применение формул (64,65) дает следующие результаты:

$$D = p \left[\frac{17(0,0025)^2}{2 \cdot 0,005 \cdot 0,005} + 277,3 \right] \Bigg/ \left[\frac{17 \cdot (0,0025)}{(0,005)^2 + 17569,5} \right] = 0,0456 \text{ мкм}$$

$$s_D^2 = 4 \left[\frac{17(0,0025)^3}{3(0,0025)^2} + 6,123 \right] \Bigg/ \left[\frac{17 \cdot 0,0025}{(0,005)^2 + 17569,5} \right] = 0,0228^2 = 0,000232 \text{ мкм}$$

Как видно из примеров, оба способа дают статистики истинного размера сферических микрообъектов, взвешенных в объеме органа. Поэтому определение их объема и поверхности можно провести с использованием формул для поверхности и объема шара:

$$V = \frac{1}{6} p D^3 \quad (66); \quad S = p D^2 \quad (67)$$

Для оценки дисперсии и среднего квадратического отклонения объема и поверхности микрообъектов формы шара в формулы нужно вместо диаметра подставить их дисперсию или среднее квадратическое отклонение:

$$s_v = \frac{1}{6} p s_D^3 \quad (68)$$

Так же можно найти ошибку показателей абсолютной поверхности и объема сферических микрообъектов:

$$s_s = p s_D^2 \quad (69)$$

Оба метода дают почти одинаковые результаты. Поэтому в практической Работе следует отдавать предпочтение как более простому, первому способу.

Определение истинных размеров микрообъектов формы эллипсоида. Прежде чем определять истинные размеры микрообъектов формы эллипсоида, следует установить, действительно ли на срезе имеются сечения эллипсоидных микрообъектов, а если это так, то к какому классу эллипсоидов они относятся, т.е. к двухосному или к трехосному. Эта задача решается следующим способом. В срезе исследуемой ткани находят диаметр наибольшего сечения эллипсоида, имеющего форму круга, и измеряют наибольшую и наименьшую оси сечений: эллипсоидов с наибольшей эллиптичностью. При наибольшем диаметре кругового сечения, приблизительно равном меньшей полуоси вытянутого сечения эллипсоида, полагают, что в срезе расположены эллипсоиды с двумя осями вращения. В противном случае, когда имеется примерное равенство между диаметром кругового сечения и значением величины длинной оси вытянутого сечения, полагают, что в изучаемом тканевом объеме имеется совокупность трехосных эллипсоидов вращения. Для случая, когда изучают одновременно двухосные и трехосные эллипсоиды вращения, задача не может быть решена. В этом случае следует принять, что в срезе есть совокупность либо только двухосных эллипсоидов, либо только трехосных (Автандилов Г.Г. и др., 1979).

Реконструкция истинных размеров микрообъектов формы цилиндра. Микрообъекты в форме цилиндра часто встречаются в практике морфологических исследований. К ним с известной долей приближения можно отнести сосуды и микроциркуляторное русло, ядра мышечных клеток, протоки желез и другие гистологические структуры. При пересечении ткани, имеющей цилиндрические образования, рядом произвольных плоскостей на секущих плоскостях будут получены их отображения в виде разнообразных геометрических тел от круга через эллипс до прямоугольника.

За истинный диаметр цилиндрических микрообъектов следует принимать диаметры сечений в виде кругов и короткие диаметры сечений, имеющих форму эллипса. Неполные круги и эллипсы измерять нельзя, так как результаты могут оказаться заниженными. Длину цилиндрических микрообъектов прямыми измерениями можно установить только тогда, когда они имеют преимущественную или жесткую ориентировку в трехмерном объекте, или же в том случае, когда они представляют собой плоскостные образования. В частности, прямыми замерам можно подвергнуть элементы поперечнополосатых мышц, миоциты гладкой мускулатуры, кровеносные и лимфатические капилляры и сосуды. В том случае, когда цилиндрические микрообъекты имеют случайную пространственную ориентировку, их длину прямыми замерами трудно установить, так как для этого потребуются большое число срезов, выполненных в разнообразных плоскостях сечений. В таком случае обычно используются методы непрямого определения длины микрообъектов. Они основаны на использовании информации о суммарной длине данного класса микрообъектов L_{AT} и их общем числе в изучаемом объекте N_{AT} , которые устанавливаются на основе специальных стереометрических методов. Получив нужную информацию, абсолютную длину микрообъекта устанавливают из зависимости:

$$L = L_{AT}/N_{AT} \quad (70)$$

Для определения поверхности и объема микрообъектов, имеющих цилиндрическую форму, используют геометрические формулы:

$$S = 2pRL \quad (71); \quad V = pR^2L \quad (72)$$

В том случае, когда $R \approx L \approx \bar{D}$, рекомендуется применять формулы

$$V = (p - \frac{4}{3})LR^2 \quad (73); \quad S = 2(\pi - 2)LR, \quad (74)$$

где $2R$ — диаметр и L — длина микрообъектов в форме цилиндров.

Общие замечания по реконструкции пространственных размеров микрообъектов на основе использования информации о величине их сечений. Реконструкция пространственных размеров микрообъектов по измерениям их сечений на гистологических препаратах проводится с использованием методов вариационной статистики. Поэтому при планировании и проведении этого эксперимента необходимо выполнять основные требования статистического метода.

Схема проведения исследований по восстановлению пространственных размеров микрообъектов по их сечениям в общем виде имеет следующие этапы: 1) полученные случайным методом из объекта кусочки (блоков) для приготовления срезов; 2) приготовление гистопрепаратов с соблюдением принципа случайного отбора проб; 3) проведение замеров сечений микрообъектов в случайно отобранных полях зрения микроскопа в объеме, достаточном для получения репрезентативных статистик (в 95% доверительном интервале) для среза, согласно принятой приближенной модели в виде сферы, эллипсоида или цилиндра; 4) статистическая обработка результатов замеров на срезе с определением соответствующих статистик: средней, арифметической, ее дисперсии, среднего квадратического отклонения и ошибки средней; 5) сравнительный анализ статистик размеров сечений микрообъектов разных срезов на принадлежность к одной генеральной совокупности микрообъектов по данному типу измерений; 6) замена срезов на новые в том случае, если статистические параметры размеров данной совокупности микрообъектов не относятся к одной генеральной совокупности с соответствующими статистиками для микрообъектов остальных срезов, и проведение их обработки (согласно пунктам 3—5); 7) расчет межгрупповых статистик для всех срезов, микрообъекты которых относятся к одной генеральной совокупности микрообъектов; 8) определение объема и поверхности микрообъектов на основе применения соответствующих моделям геометрических формул. Данные об объеме и поверхности микрообъектов используют, кроме того, для проверки полученных результатов. Обычно отношение между поверхностью и объемом микрообъектов одной формы всегда стабильно и не зависят от их величины, что можно показать на примере сферы:

$$S^3/V^2 = (4pR^2)^3 / (\frac{4}{3}pR^3)^2 = 36p. \quad (75)$$

Поэтому если в опыте получается другая оценка такого отношения, то в вычислениях объема и поверхности микрообъектов следует искать ошибку.

Стабильность отношения между величиной поверхности и объема микрообъектов приводит к выводу, что такой показатель не может быть рекомендован для изучения изменений в органе при различных патологических состояниях, как это делают иногда некоторые авторы. Сравнительный анализ таких коэффициентов имеет значение только тогда, когда при изменении формы в процессе изучения какого-либо явления на разных этапах эксперимента подбираются соответствующие новые приближенные модели. Данные по реконструкции истинных размеров микрообъектов по их сечениям могут быть использованы для дальнейших исследований, так как на их основе может быть получена новая информация (удельное и абсолютное число микрообъектов и т.д.). Кроме того, этот анализ может преследовать узкую цель, состоящую в использовании этих данных для сравнительного анализа в процессе проведения эксперимента на основе использования формулы (75). Более информативным является исследование, которое завершается установлением корреляционных взаимоотношений

между величиной разного класса микрообъектов одного образца или микрообъектов одного класса разных образцов, когда собственно устанавливаются связи между величиной разного класса микрообъектов, находящихся в системных отношениях друг с другом.

В заключение заметим, что все приведенные методы, кроме способа определения размеров конкретного эллипсоида по двум плоскостям его сечения, дают объективную оценку размеров микрообъектов только при исследовании срезов «нулевой» толщины. Для этого достаточно, чтобы толщина среза была в 50 раз меньше величины измеряемых микрообъектов. Другие систематические погрешности, которые могут возникать при проведении настоящего исследования, связаны с оптическими закономерностями. Однако, если используется срез нулевой толщины; оптическими погрешностями практически можно пренебречь.

Способы определения количества микрообъектов

Количество микрообъектов в срезе, их число в единице объема органа и общее количество могут быть установлены на основе большого числа методов, которые можно условно разделить на две группы: методы прямого определения количества микрообъектов и методы, основанные на информации о других, уже установленных количественных свойствах микрообъектов.

Выбор метода зависит от задач эксперимента и часто определяется уже имеющимися сведениями о принципах количественной организации структурно-функциональных компонентов объекта исследования. Если полученные результаты о других свойствах данной совокупности микрообъектов позволяют определить их число, то обычно прибегают к другим способам. Если эти свойства не установлены, то используют методы, относящиеся к первой группе. Это связано с тем, что при проведении эксперимента только с целью вычисления количества микрообъектов первая группа способов оказывается более экономичной. В ряде опытов рекомендуется число микрообъектов в органе находить двумя методами, что позволяет контролировать полученные результаты.

При установлении количества микрообъектов в изучаемом образце используется также информация, полученная ранее описанными способами. Поэтому, прежде чем приступить к технической реализации задачи, нужно оценить все необходимые вспомогательные способы. Методы определения числа микрообъектов в срезах широко используют аппарат математической статистики, поэтому к ним приложимы все требования статистического анализа.

Среди способов определения удельного и общего количества микрообъектов в органах наибольшее распространение получил прямой метод их оценки (Weibel E., 1963). Существенными преимуществами этого метода перед другими является то, что он применим для изучения структур с различной геометрической формой — от сферы до нитевидных образований и у разных исследователей дает одинаковые результаты. Для определения числа микрообъектов данной формы в формулу вносится специальная поправка которая при первом приближении устанавливается из номограммы (рис. 37).

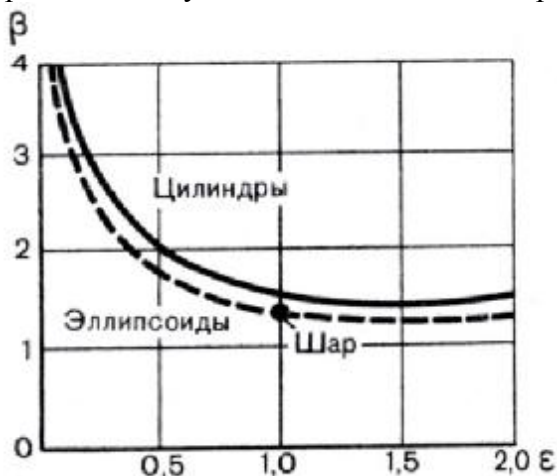


Рис. 37. Номограмма для определения коэффициента конфигурации геометрических тел, которыми идеализируются реальные микрообъекты. По оси абсцисс — отношение между короткой и длинной осями микрообъекта (ϵ), по оси ординат — соответствующие значения коэффициента конфигурации (β) (Weibel E., 1970).

Методика определения количества микроорганизмов сводится к следующим операциям: 1) получают участки органа для срезов случайным образом; 2) готовят гистологические препараты на основе метода случайного отбора проб; 3) осуществляют анализ на гистопрепаратах: каждый гистопрепарат рассматривают как отдельную «генеральную» совокупность данного класса микроорганизмов и в каждом гистопреparate отбирают для исследования поля зрения микроскопа случайным методом; 4) в одних и тех же полях зрения определяют число микроорганизмов с одновременным планиметрическим изучением, на основе метода «полей», плотности упаковки этого класса микроорганизмов; 5) находят статистики числа и плотности упаковки микроорганизмов для каждого среза; 6) проверяют статистики числа и плотности упаковки микроорганизмов для разных срезов на принадлежность их к одной генеральной совокупности («выскакивающие» наблюдения заменяют на новый срез); 7) находят межгрупповые статистики числа и плотности упаковки микроорганизмов на срезах; 8) межгрупповые статистики количества микроорганизмов в поле зрения микроскопа переводят в показатели на единицу площади поверхности среза, согласно формуле:

$$n_s = n/s \quad (76)$$

где n_s — число микроорганизмов на единице площади поверхности среза; n — число микроорганизмов в поле зрения; s — величина площади поля зрения микроскопа; 9) устанавливают коэффициент конфигурации данного класса микроорганизмов, для чего измеряют их минимальный и максимальный размеры и находят отношение $\beta = a/b$, a — больший и b — меньший размеры; используются статистически установленные величины минимального и максимального размеров микроорганизмов, и по нему с использованием номограммы (см. рис. 37) определяют величину коэффициента. Для определения b от оси абсцисс восстанавливают перпендикуляр к кривой, от точки пересечения кривой с перпендикуляром оси абсцисс восстанавливают перпендикуляр к оси ординат, где и получают оценку коэффициента конфигурации микроорганизмов; 10) полученные результаты подставляют в формулу для определения величины числа микроорганизмов в единице объема препарата:

$$n_v = \frac{n_s^{3/2}}{b(V_v + 0,66)}, \quad (77)$$

где n_v — количество микроорганизмов в единице объема препарата; 11) определяют общее число микроорганизмов в препарате, для чего их число в единице объема препарата n_v умножают на общий объем три структурной составляющей, V , кОТ, орой эти микро-объекты содержатся, — V_p .

$$N_{AT} = V^p \times n_v \quad (78)$$

В ряде случаев представляет интерес определение «смеси шаров», например при изучении одноядерных и двуядерных клеток (Иваницкий Г.Р., Шмаков А.К., 1972).

Наиболее простой метод подсчета микроорганизмов в единице объема объекта и определения их общего числа основан на использовании данных об общем объеме всей совокупности этих микроорганизмов и статистических оценок «среднего микроорганизма». Его используют в тех случаях, когда такая информация известна. Схема проведения исследования может быть описана следующим образом:

1) получение участков случайным способом, приготовление гистологических препаратов методом случайного отбора проб и микроскопические исследования случайных полей гистологических препаратов;

2) проведение объемного планиметрического анализа на всех уровнях исследования, получаемом согласно пункту 1. Для этого устанавливают плотность упаковки:

- дифференцируемых на органомерическом уровне исследования тканевых структур, в которых заключены данные микрообъекты;
- микрообъектов данной тканевой составляющей органа;
- 3) определение общего объема микрообъектов в органе на основе использования формулы (37) через формулы (33—35);
- 4) оценка объема среднего микрообъекта согласно методам определения истинных размеров микрообъектов по результатам измерений их сечений на срезах;
- 5) определение общего количества микрообъектов; в органе по формуле:

$$N_{AT} = \frac{V \cdot V_s^p V_s^c}{V^p} \quad (79)$$

где N_{AT} — общее число микрообъектов; V — объем органа; V_v^c — объемная плотность ткани в органе, в которой заключены данные микрообъекты; V_v^p — объемная плотность микрообъектов в данной тканевой составляющей органа; V^p — средний объем микрообъекта.

Покажем примеры использования как наиболее употребительных первого и третьего способа. Пусть поставлена задача оценить количество альвеол в 1 см^3 объема паренхимы легкого. Согласно формулам (77) и (79), для расчета количества альвеол необходимо получить следующую информацию: число альвеол на 1 см^2 площади гистологического среза, d — среднестатистический диаметр сечения альвеол, по которому из формулы (60) находится его истинный диаметр, а по формуле (37) — объем, а также удельный объем альвеол в паренхиме легкого и удельный объем паренхимы легкого. Пусть такая информация получена. В 1 см^2 содержится 360 альвеол, их объем, найденный из указанных формул, составляет $1,037 \times 10^{-5} \text{ см}^3$, плотность упаковки альвеол составляет 0,6603. Тогда, подставляя полученные данные в формулу (77) и принимая во внимание коэффициент конфигурации (Weibel E., 1963), найдем их число в единице объема легкого по первому

$$N_u = \frac{360^{3/2}}{1 \cdot (0,6603 + 0,066)} = 63,674$$

и по второму методу

$$\bar{N}_u = \frac{0,6603}{1 \cdot 037 \cdot 10^{-5}} = 63,680$$

Для второго случая удельное число альвеол определяли из формулы

$$\bar{N}_u = \frac{V_u^p}{V^p}, \quad (80)$$

так как плотность упаковки данного компонента показывает, какой объем занимает он в единице объема органа.

Проведенные вычисления показали, что оба метода дали одинаковый результат с различиями в пределах погрешностей измерений и вычислений. Исходя из этого, можно считать, что количество альвеол определено правильно.

В заключение остановимся на значении определения количества микрообъектов для проведения стереометрических исследований. Эти результаты представляют большой интерес для построения количественно-пространственных моделей органов, тканей, клеток. С использованием информации об изменении количества микрообъектов можно решать задачи онтогенеза, морфогенеза и регенерации, определять степень атрофии, гипертрофии и гиперплазии, особенности злокачественного роста и т.д. (Шмалыаузен И.И., 1968; Автандилов Г.Г., 1973, 1978; Эмануэль Н. М., 1977).

Методы измерения удельной и общей площади поверхности микрообъектов

На основе применения методов измерения удельной и общей площади поверхности микрообъектов определяют площадь поверхности микрообъектов любой геометрической формы в единице объема органа, а также устанавливают суммарную площадь поверхности таких микрообъектов для всего объекта в целом. Сведения об удельной и общей площади поверхности микрообъектов можно получить и другими методами, например по площади поверхности среднестатистического микрообъекта и числу микрообъектов в единице объема и в объекте исследования в целом. Удельная площадь поверхности на основе такой информации находится как произведение средней площади поверхности микрообъектов на их число в единице объема препарата, а общая площадь поверхности, соответственно, является произведением площади поверхности среднего микрообъекта на общее число микрообъектов.

Приводимые ниже методы являются более точными и позволяют получить более представительную информацию. Показанные примеры определения данных показателей на основе среднестатистических оценок площади поверхности микрообъектов и их числа дают ошибки, связанные главным образом с определением средней площади поверхности микрообъектов. В разделе об оценке истинных размеров микрообъектов по их срезам указывалось, что задача такого рода решена только для трех типов геометрических фигур (сфера, эллипсоид и цилиндр) и поэтому в реальной обстановке для определения размеров микрообъекта его нужно описать соответствующей моделью. Различия в истинной форме микрообъекта и форме приближенного аналога иногда существенны и дают систематические погрешности, которые обычно трудно оценить. Излагаемые здесь способы, давая интегральные характеристики площади поверхности совокупности микрообъектов, позволяют точнее оценить плоскостные параметры микрообъектов независимо от степени сложности их формы. Эти способы могут быть использованы при любом типе ориентировки гистоструктур в пространстве. Получаемая на их основе информация, кроме того, может применяться и для оценки площади поверхности среднего микрообъекта, так как между удельной и абсолютной площадью поверхности и количеством микрообъектов устанавливаются взаимоднозначные соответствия, как

$$S^P = S_u^P / n_u^P = S_{AT}^P / N_{AT}, \quad (81)$$

где n_u^P — удельное и N_{AT} — общее количество микрообъектов; S_u^P — удельная и S_{AT}^P — общая площадь поверхности микрообъектов; S^P — площадь поверхности среднего отдельного микрообъекта.

Полученная таким методом площадь поверхности среднего микрообъекта в связи с вышеуказанным будет более правильной, чем определенная на основе прямых замеров, так как данный способ учитывает особенности формы совокупности изучаемых микрообъектов. Поэтому результаты определения площади поверхности средних микрообъектов таким способом могут использоваться для проверки их величины, установленной другими способами, либо специально для установления данного стереометрического параметра. Изложенные примеры, кроме того, показывают тесную взаимосвязь между существующими стереометрическими способами определения параметров количественно-пространственной организации микрообъектов, а также между самими параметрами и подтверждают положение о том, что перед проведением стереометрического исследования он должен быть спланирован так, чтобы максимально большое число информации было получено при минимальном числе замеров, а использованные методы дали бы наиболее правильный результат.

Все методы оценки удельной и общей площади поверхности микрообъектов, несмотря на многочисленные заявки на приоритет принадлежат отечественному металлостроителю Салтыкову С.А. (1950), что было справедливо отмечено Е. Underwood (1970).

В основу указанного метода положена известная задача Бюффона об игле, решение которой приводит к уравнению:

$$P = \frac{2l}{pp} \quad (82)$$

Задача гласит, что если линию известной длины l провести в случайном направлении по плоскостному срезу изучаемой трехмерной структуры, то эта линия пересечет анализируемые элементы образца p - раз. Если проводится достаточное число испытаний объекта, где на единицу площади поверхности среза приходится одна и та же суммарная длина линий, то средняя площадь поверхности структуры в единице объема препарата будет равна числу пересечений линии с изучаемой структурной составляющей, которая отнесена к длине этой линии, умноженному на коэффициент пропорциональности.

Использование метода состоит в следующем. 1) Проводят случайный отбор участков органа для приготовления гистологических препаратов. 2) Получают гистологические срезы случайным образом. 3) Гистологический срез считается генеральной совокупностью полей зрения микроскопа, из которой формируется выборка из нужного числа полей зрения микроскопа также случайным методом отбора проб. 4) Для данного гистологического среза определяется площадь поверхности микрообъектов в единице объема ткани изучаемого образца, что имеет технические особенности в зависимости от пространственной интеграции тканевых компонентов. С этой целью в окуляр микроскопа вставляют линейку «нулевой толщины» (рис. 38) и определяют число ее пересечений с данной совокупностью микрообъектов.

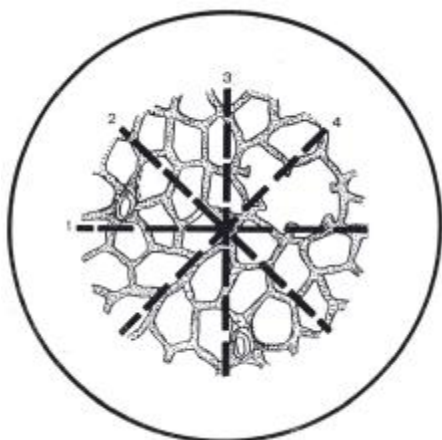


Рис. 38. Схема этапов последовательного наложения (1—4) линейки нулевой толщины на гистологический срез при определении удельной площади поверхности микрообъектов.

В каждом поле зрения микроскопа делают не менее четырех таких замеров, поворачивая после каждого замера окуляр микроскопа с линейкой, например на 45° . При работе с позитивами, например с электронными фотографиями, измерения проводят на отпечатке, где можно взять точку в центре, вокруг которой следует вращать линейку для проведения подсчетов числа ее пересечений с интересующими исследователя структурами (см. также рис. 41).

Если используется другая линейка, то в одном поле зрения выполняют только один замер.

Для изученной совокупности измерений в данном срезе (совокупность срезов для данного участка препарата) находят статистики среднего числа пересечений линейки с данными микрообъектами, т.е. определяют среднее, его дисперсию, среднее квадратическое отклонение и ошибку средней арифметической. Если изучаемые структурные компоненты плотно упакованы по отношению друг к другу (печеночные клетки и др.), то удельную площадь поверхности их со статистиками распределения находят из следующих выражений:

$$S_u = 2 \frac{M}{l} \quad (83)$$

$${}^s S_u = 2 \frac{{}^s M}{l} \quad (84)$$

$$D_{S_u} = S_{S_u}^2 \quad (85)$$

$$m_{S_u} = 2 \frac{{}^m M}{l}, \quad (86)$$

где l — длина измерительной линейки; M — среднее число пересечений микрообъектов с линейкой; D_M — его дисперсия; σ_M — среднее квадратическое отклонение; m_M — ошибка.

Очевидно, что число замеров должно быть таким, при котором в 95% доверительного интервала ошибка не будет превышать 5% от среднего числа пересечений. Это достигается соответствующим планированием статистического эксперимента на основе использования формул (6—14). В случае, когда микрообъекты расположены в изучаемом срезе дискретно, т.е. на известном расстоянии друг от друга, и отделены тканевыми структурами, использование метода имеет некоторые методические особенности. Эти особенности состоят в том, что, как и прежде, устанавливает число пересечений линейки с данной совокупностью микрообъектов, но при этом каждый раз за линейку принимают не всю реальную линейку, а только ту ее часть, которая приходится на совокупность изучаемых микрообъектов. В том случае когда стенка микрообъектов является общей для двух соседних микрообъектов, то реальная поверхность и ее статистики будут соответственно равны найденным из формул (83—86) умноженным на два. В качестве примера можно привести альвеолы легкого, где одна межальвеолярная перегородка служит одновременно стенкой двум соседним альвеолам.

Найденные статистические характеристики площади поверхности микрообъектов в единице объема органа для разных совокупностей срезов (срезы из разных участков органа) сравниваются друг с другом на принадлежность к одной генеральной совокупности, например с использованием формулы (15). Если все они относятся к одной генеральной совокупности, то для них рассчитывают межгрупповые статистики, которые и будут характеризовать удельную площадь поверхности данного класса микрообъектов органа.

Общая площадь поверхности микрообъектов находится из формул:

$$S_{AT} = S_u \cdot V \cdot V_u \quad (87)$$

$${}^s S_{AT} = {}^s S_u \cdot V \cdot V_u \quad (88)$$

$${}^m S_{AT} = {}^m S_u \cdot V \cdot V_u \quad (89)$$

где S_{AT} ; ${}^s S_{AT}$; ${}^m S_{AT}$ — статистики удельной площади поверхности; V — объем органа; V_u — плотность упаковки структурной составляющей органа, в которой расположен данный класс изучаемых микрообъектов.

Покажем применение методов для определения удельных площадей поверхности микрообъектов с разными принципами упаковки в органе. Пусть перед нами поставлена задача определить удельную площадь поверхности извитых канальцев в корковом веществе почки. Для этих целей при увеличении в 100 раз определяют число пересечений линейки с канальцами (рис. 39). В каждом поле зрения проводят по четыре замера, в каждом срезе — изучают по пять полей зрения, из каждого блока анализируют по пять срезов. Всего исследуют пять блоков, полученных случайным образом, т.е. $5 \times 5 = 25$ срезов или $5 \times 5 \times 5 = 125$ полей зрения микроскопа, выполнив всего $5 \times 5 \times 5 \times 4 = 500$ измерений. Пусть во всех случаях длина линейки будет стандартной и составит 1,2 мм. Результаты подсчетов числа пересечений линейки с канальцами отдельно для пяти блоков обрабатываем методами вариационной статисти-

ки. Проверим на принадлежность к одной совокупности результаты замеров всех пяти блоков и определим для них межгрупповые статистики. Пусть статистики числа пересечений окажутся следующими: $M = 16$; $D = 4$; $\sigma = 2$; $m = 0,21$. Тогда, подставляя данные в формулы (83—86), находим статистики удельной площади поверхности почечных канальцев: $S_v = 26,6 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$; $s_{S_v} = 3,3 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$ и $ms_v = 0,36 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$.

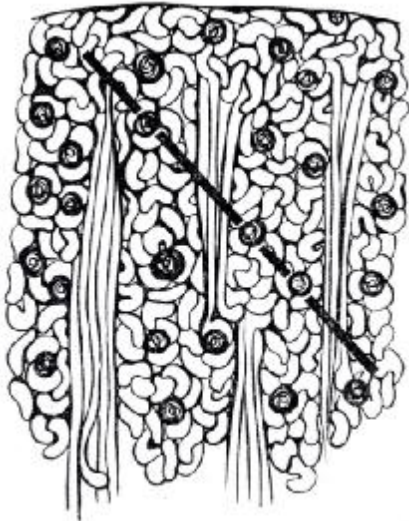


Рис. 39. В поле зрения микроскопа с корковым веществом почки совмещена окулярная линейка. Для оценки удельной площади поверхности извитых канальцев подсчитывают число пересечений линейки с контурами канальцев. Объяснение в тексте.

В качестве второго примера определим удельную площадь поверхности панкреатических островков в поджелудочной железе собаки (рис. 40). Пусть после наложения линейки длиной L и нулевой толщины на гистологический срез удалось установить, что в среднем (методы получения информации аналогичны для методов первого примера) она пересекает с панкреатическими островками следующим образом: $M = 16$; $\sigma = 2$; $m = 0,18$. При этом длина линейки, расположенная в пределах контуров панкреатических островков будет равной 1,2 мм, которую принимают за истинную полную длину линейки при проведении расчетов по упомянутым формулам. Проведенные расчеты показывают, что удельная площадь поверхности панкреатических островков в поджелудочной железе собаки $S_v = 26,6 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$ при $s_{S_v} = 3,3 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$ и $ms_v = 0,36 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$.

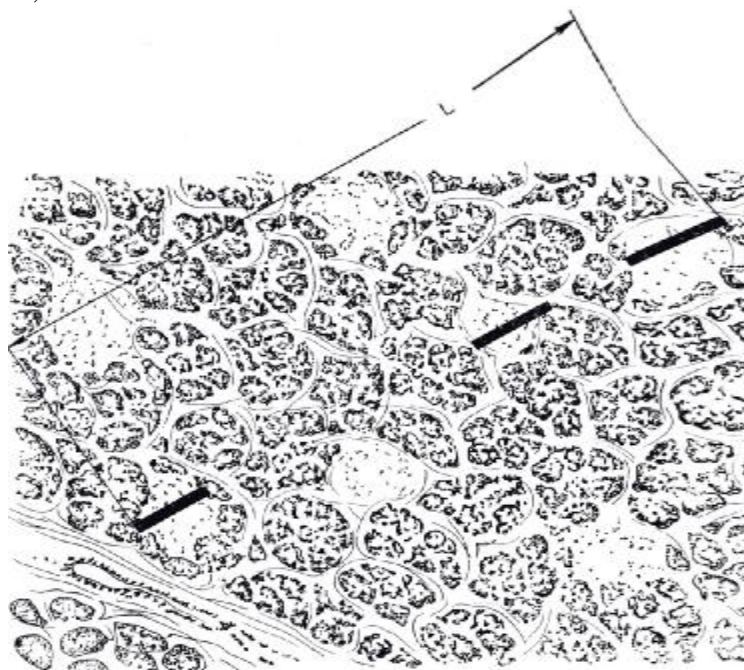


Рис. 40. С гистологическим срезом поджелудочной железы совмещена окулярная линейка (L) для определения удельной площади поверхности островков Лангерганса. При регистрации за общую длину линейки следует принимать только те ее части, которые расположены в пределах контуров островков. Объяснение в тексте.

В качестве третьего примера рассмотрим определение удельной поверхности альвеол легких собаки. Пусть при длине линейки в 1,2 мм среднее число ее пересечений с межальвеолярными перегородками составило 8 при среднем квадратическом отклонении, равном 3 и ошибке средней — 0,28. Проведя расчеты по тем же формулам и удвоив полученный результат, найдем, что удельная альвеолярная поверхность легкого собаки $S_v = 30 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$ при $as_v = 11,7 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$ и $ms_v = 0,93 \text{ мм}^2/\text{мм}^3$.

Как следует из примеров, размерность в этих формулах получают из следующих действий:

$$\frac{1}{\text{ед.измерения}} \cdot \frac{\text{ед.измерения}^2}{\text{ед.измерения}^2} = \frac{\text{ед.измерения}^2}{\text{ед.измерения}^3};$$

т.е. $\text{мм}^2/\text{мм}^3$, $\text{см}^2/\text{см}^3$ и т.д.

Способы определения удельной и общей длины микрообъектов

Методы определения удельной и абсолютной длины микрообъектов на срезах в стереометрическом отношении, т.е. в плане только получения цифровых показателей для разного рода тканевых структур, представляют интерес потому, что при случайной ориентировке микрообъектов в срезах их абсолютную длину прямыми за мерами получить не удастся. Кроме того, эти методы рекомендуется использовать и для случая плоскостной формы расположения микрообъектов или жесткой и преимущественной ориентировки в трехмерных образцах, особенно тогда, когда они имеют извитую форму. Это связано с тем, что методы определения удельной длины, как и методы оценки удельной площади, применяют независимо от характера поверхности микрообъектов.

Методы определения удельной длины микрообъектов на срезах также предложены С.А. Салтыковым (1970). Способы получения информации и статистической обработки результатов соответствуют таковым требованиям при решении задач по определению удельной площади поверхности, вследствие чего схема настоящего эксперимента соответствует изложенной в предыдущей части настоящего раздела и здесь описана не будет. Дополнительно приводим необходимые формулы и отметим особенности работы с ними.

В зависимости от способа ориентировки микрообъектов в изучаемых препаратах существующие способы определения удельной длины микрообъектов можно классифицировать на три непересекающиеся друг с другом подмножества, как

$$A \subset B \cup C \cup D, \quad (90)$$

где B — способы определения удельной длины микрообъектов (дисперсия углов отклонений микрообъектов от выбранной направляющей линии больше 900); C — способы определения удельной длины микрообъектов с жесткой ориентировкой (дисперсия средних углов отклонений для микрообъектов по отношению к выбранной линии составляет 0); D — способы определения удельной длины микрообъектов с преимущественной ориентировкой, когда дисперсия среднего угла их отклонений от выбранной направляющей заключена в интервале до 900.

Если микрообъекты имеют случайную ориентировку в образце для исследований, срезы можно готовить в любой плоскости сечения. Удельная длина микрообъектов с ее статистиками находится из формул:

$$L_s = \frac{p}{2} \cdot \frac{M}{l} \quad (91); \quad {}^s L_s = \frac{p}{2} \cdot \frac{S}{l} \quad (92)$$

$$D_{L_s} = S_{L_s}^2 \quad (93); \quad m_{L_s} = \frac{p}{2} \cdot \frac{m}{l} \quad (94)$$

где l — длина линейки нулевой толщины; M — среднестатистическое число пересечений линейки с микрообъектами; D — его дисперсия; s — среднее квадратическое отклонение, m — ошибка.

При жесткой ориентировке микрообъектов в образце срезы готовят либо в плоскости, перпендикулярной к оси ориентации, либо параллельной ей. Линейку всегда накладывают перпендикулярно по отношению к длиннику микрообъектов. Удельная длина жестко ориентированных микрообъектов (с ее статистиками) будет равна статистикам числа пересечений линейки с микрообъектами:

$$L_S = M \quad (95), \quad D_{L_S} = D \quad (96)$$

$${}^s L_S = s \quad (97), \quad m_{L_S} = m \quad (98)$$

где M, D, s, m — статистики числа пересечений микрообъектов с линейкой единичной длины; $L_S, D_{L_S}, {}^s L_S, m_{L_S}$ — статистики удельной длины микрообъектов.

При преимущественной ориентировке микрообъектов в срезе их множество B можно рассматривать в виде объединения двух попарно непересекающихся подмножеств микрообъектов со случайной E и жесткой ориентировкой H , что можно записать:

$$B \subset E \cup H \quad (99)$$

Тогда, очевидно, для определения удельной длины микрообъектов с преимущественной ориентировкой в срезах нужно определить удельную длину случайно ориентированного подмножества элементов и отдельно удельную длину жестко ориентированного подмножества элементов. Истинной удельной длиной микрообъектов с преимущественной ориентировкой будет сумма двух полученных удельных длин объектов:

$$L_S = \frac{p}{2} \cdot \frac{M_1}{l} + M_2, \quad (100)$$

где M_1 и M_2 находятся соответственно по формулам (91—94) и (95—98).

Для исследований удельной длины микрообъектов с преимущественной ориентировкой срезы готовят в одной из двух типов плоскостей сечений как и для случая жесткой ориентировки микрообъектов. Анализ можно вести как на перпендикулярных, так и на параллельных сечениях по отношению к ориентированному подмножеству микрообъектов и» всего множества микрообъектов данного класса.

Описанные методы дают удельную длину микрообъектов на единице площади гистологического среза, имеющую следующую размерность:

$$\frac{1}{\text{ед.измерения}} \times \frac{\text{ед.измерения}}{\text{ед.измерения}} = \frac{\text{ед.измерения}}{\text{ед.измерения}^2},$$

т.е. мм/мм², см/см², м/м² и т.д.

В том случае, когда поставлена задача определить удельную длину микрообъектов в единичном объеме образца, используется формула (Блинков С.М., Моисеев Ф.Д., 1961):

$$L_v = 2n_s \frac{n_z}{n_b} \left(2 + \frac{4}{3} \frac{n_b - n_r}{n_r} \right), \quad (101)$$

где L_v — удельная длина структурных компонентов образца в единице его объема; n_s — число фрагментов структурных компонентов образца, расположенных на площади S среза; n_r — число пересечений фрагментов образца с линией длиной \sqrt{S} , расположенной произвольно в плоскости гистологического среза; n_b — число пересечений фрагментов структурных компонентов образца с линией такой же длины \sqrt{S} , расположенной перпендикулярно к первой.

Обычно при применении этого метода используют окулярные вставки, имеющие вид квадратной решетки. Тогда площадь такой решетки есть площадь S , вертикальные линии — первая группа линий и горизонтальные линии — вторая. Метод применим при любом виде пространственной организации микрообъектов. В частном случае, когда ориентировка микрообъектов случайная, формула (101) принимает вид:

$$L_u = 4 \frac{n}{S} \quad (102)$$

и становится аналогичной формуле, предложенной С.А. Салтыковым (1970). При данном способе размерность будет следующей: ед. измерения / ед. измерения.

Непрямые методы определения абсолютного объема поверхности и длины микрообъектов

Непрямые методы определения абсолютных размеров микрообъектов, их объемных, плоскостных и линейных характеристик основаны на использовании стереометрической информации. Эти методы используются, с одной стороны, для контроля полученных результатов при использовании других методов, а с другой, применяются в том случае, когда форма микрообъектов настолько сложна, что не может быть приближена к сферическим, эллипсоидным или цилиндрическим аналогам.

Объем и поверхность среднего микрообъекта можно получить на основе данных об их общих удельных и абсолютных объемах и поверхностях, соответственно V^p и S^p , V_{ν}^p и S_{ν}^p , а также общего и удельного количества n_{ν}^p и N_{AT}^p , используя соотношения:

$$V_p = \frac{V^p}{N_{AT}^p} = \frac{V_u^p}{n_u^p}; \quad (103)$$

$$S_p = \frac{S^p}{N_{AT}^p} = \frac{S_u^p}{n_u^p}; \quad (104)$$

Если известны абсолютная и удельная длина микрообъектов L^p и L_{ν}^p при установленном удельном или общем количестве n_{ν}^p и N_{AT}^p , то средняя длина микрообъектов может быть определена аналогичным способом:

$$L_p = \frac{L_s^p}{n_s^p} = \frac{L^p}{N_{AT}^p}; \quad (105)$$

В тех случаях когда для определения средних размеров микро-объектов используются непрямые методы, а общие сведения даны только об одном из их свойств, например об объеме, то другие свойства (поверхность) можно установить через первые, так как между разными размерными свойствами существуют строгие зависимости. Например, поверхность микрообъекта, имеющего форму сферического аналога, можно найти через его объем согласно уравнению:

$$S = \frac{3}{4} V p D^{-1}. \quad (106)$$

Точно так же можно вывести формулу для определения объема, когда имеются сведения о поверхности объекта, и т.д.

Методы стереометрического изучения зон перикапиллярной диффузии

В работах патологоанатомического плана возникают задачи сравнительной оценки изменений кровоснабжения клеточных элементов, тканей и структур в динамике патологического процесса. Представляет интерес выяснить состояние микроциркуляторного русла не только в норме (В.В. Куприянов, 1972), но и в патологических состояниях (Автандилов Г.Г., 1953, 1962; Струков А.И., 1975), обращая внимание на соотношения между «обменными» сосудами — капиллярами и соответствующими им зонами метаболического обеспечения тканей (Автандилов Г.Г., 1953, 1963; Автандилов Г.Г., Гевондян Т.А., 1978). Естественно, морфолог не может по данным гистологического исследования определить действительно

имевшиеся при жизни функциональные взаимоотношения, однако данные стереометрического исследования позволяют получить теоретическую модель взаимосвязи в системе «капилляр — окружающие ткани» по их объемным соотношениям для каждого органа и его патологии.

Рассмотрим образец ткани с расположенным в ней микро-циркуляторным руслом в виде объединения попарно непересекающихся подмножеств элементарных объемов, находящихся в тесном анатомическом и функциональном отношении с отдельными капиллярами. Каждое подмножество можно назвать зоной перикапиллярной диффузии или ультрациркуляции метаболитов (Г.Г. Автандилов, 1972) для соответствующего сосуда. Другими словами, под зоной перикапиллярной ультрациркуляции будем понимать часть тканевых структур органа, находящихся в системном отношении с данным капиллярным сегментом (Автандилов Г.Г., 1953, 1962, 1972; Яблучанский Н.И. и др., 1976). Так как зона ультрациркуляции в таком случае теоретически может быть представлена в виде геометрического тела, то оказывается возможной оценка ее величины. Если в простейшем случае зону перикапиллярной диффузии представить в виде цилиндра, то его размерные свойства можно описать диаметром, длиной, поверхностью и объемом. Длина зоны перикапиллярной ультрациркуляции, согласно допущениям, должна соответствовать длине самого капилляра. Исходя из этого, для оценки других свойств зон перикапиллярной ультрациркуляции достаточно разработать метод определения ее диаметра, так как поверхность и объем однозначно устанавливаются через длину и диаметр.

Прямыми замерами диаметра (или радиуса) зону перикапиллярной ультрациркуляции установить нельзя, поскольку из-за неодинаковой величины зон и их сложной формы трудно провести соответствующие построения. Для определения диаметра зон перикапиллярной ультрациркуляции можно использовать формулу:

$$D_y = D_k / V_V^k, \quad (107)$$

где D_k — диаметр капиллярных сегментов; V_V^k — плотность их! «упаковки».

Объем и поверхность перикапиллярных зон ультрациркуляции при $R < L$ можно найти из формул (71) и (72), а при $R \geq L$ — из формул (73) и (74).

Для оценки среднего диаметра капилляров в органе используют планирование и проведение эксперимента согласно требованиям статистического подхода. Аналогичные требования выполняются и при определении плотности «упаковки» капилляров в органе. Тогда полученная информация оказывается репрезентативной для расчета среднего диаметра зоны перикапиллярной диффузии.

В качестве примера рассмотрим определение диаметра, объема и поверхности зоны перикапиллярной ультрациркуляции для лимфатических сосудов эпикарда сердца собаки. Пусть в результате измерений было установлено, что средние диаметр и длина капилляров составляют соответственно 125 и 250 мкм при плотности упаковки в 0,438. Тогда, подставляя полученные данные в формулу (107), находим величину диаметра зоны перикапиллярной ультрациркуляции лимфатических сосудов в эпикарде:

$$D_y = \frac{125 \text{ мкм}}{0,438} \approx 300 \text{ мкм}.$$

Поскольку $L > R$, объем и поверхность зон перикапиллярной ультрациркуляции находят по формулам (71) и (72).

Определение поправок на усадку тканей

Приготовление гистологических препаратов изменяет истинные размеры микрообъектов. Степень усадки тканей зависит от выбранных способов фиксации, дегидратации, заливки, окраски. На степень усадки оказывают влияние также способ получения препаратов для

исследования, выраженность постмортальных изменений, срок между наступлением смерти и забором материала для анализа, изменения в зависимости от характера патологоанатомического процесса. При проведении количественных исследований стандартизации приготовления препаратов должно быть уделено особое внимание. В ряде случаев в один блок монтируют сравниваемые объекты (контроль, опыт), окрашивают срезы сериями и т.д.

Введение поправок на усадку тканей при проведении стереометрического эксперимента особенно необходимо в тех случаях, когда получаемые результаты используют для проведения корреляционного анализа. В тех же случаях когда получают только количественную характеристику изучаемого патологического процесса, введение поправок на приготовление препаратов не всегда обязательно. Однако даже в таких случаях оно оказывается целесообразным, поскольку позволяет сопоставлять количественные данные разных авторов.

В процессе приготовления препаратов изменения величины и формы различных гистологических элементов неодинаковы, что связано с их физико-химическими свойствами. Учесть степень изменений разнообразных классов микрообъектов очень трудно, и поэтому довольствуются сведениями об усадке образца.

Поправки определяют для каждого этапа обработки материала. По последним этапам высчитывают поправочные коэффициенты для каждого уровня стереометрических исследований. Результаты обработки материала с оценкой поправочных коэффициентов подвергаются статистической обработке и получаемые статистики используют для всей совокупности препаратов, если они готовились в стандартных условиях.

Для определения истинных размеров микрообъектов (K) его размеры, полученные при измерениях, умножают на поправку, характеризующую его усадку.

Коэффициенты усадки тканей на фиксацию можно найти по их объему до (V) и после (V_f) фиксации, как

$$f^3 = V/V_f \quad (108)$$

Причем коэффициент f^3 будет объемным коэффициентом усадки, который вводится как поправка для объемных характеристик: структур. Линейный и поверхностный коэффициенты усадки на фиксацию тканей можно легко установить по объемному коэффициенту:

$$f = \sqrt[3]{f^3} \quad (109)$$

$$f^2 = (\sqrt[3]{f^3})^2, \quad (110)$$

где f и f^2 — соответственно линейный и поверхностный усадочные коэффициенты.

Например, при объеме органа до фиксации 112 мл и после фиксации — 104 мл его объемный, поверхностный и линейный коэффициенты усадки будут следующими:

$$f^3 = \frac{112}{104} = 1,07; \quad f = \sqrt[3]{1,07} = 1,023;$$

$$f^2 = (\sqrt[3]{1,07})^2 = 1,046$$

Коэффициенты на усадку тканей при дегидратации, заливке и других способах обработки можно найти таким же способом. Однако если объем обрабатываемого кусочка определить нельзя, то для расчета всех (линейного, плоскостного и объемного) коэффициентов используют результаты линейных измерений до и после данного этапа обработки. Тогда отношение линейного размера до фиксации l к линейному размеру после фиксации l_f даст линейный коэффициент усадки:

$$f = l/l_f \quad (111)$$

Поверхностный и объемный коэффициенты усадки легко устанавливают по линейному коэффициенту:

$$f^2 = (f)^2 \quad (112); \quad f^3 = (f)^3 \quad (113)$$

В заключение, раздела, посвященного описанию техники стереометрического исследования гистологических препаратов, приводим в качестве примера (табл. 9) основные данные, характеризующие миокард человека (Т.А. Гевондян, 1978).

Таблица 9

Стереометрические характеристики кардиомиоцитов и капиллярного русла миокарда интрамуральной зоны различных отделов стенки левого желудочка сердца молодого мужчины

		Параметр	Стенки левого желудочка		
			передняя	боковая	задняя
Отделы стенки левого желудочка	верхний	N _М	5063±210	2370±93	2727±102
		N _К	3770±128	2551±103	2302±96
		L _х	11,3±0,15	14,4±0,16	11,7±0,15
		D _М	10,5±0,09	14,6±0,11	13,7±0,11
		D _К	3,1±0,02	3,6±0,03	3,5±0,03
		V _{VM}	88,9±0,8	80,2±0,7	79,3±0,7
		V _{VК}	5,2±0,3	4,6±0,3	3,9±0,2
		ΣS _М	55,5±0,8	33,3±0,6	34,3±0,8
		ΣS _К	10,1±0,2	8,7±0,2	7,1±0,2
		S _М	62,4±0,7	41,5±0,5	43,3±0,5
	S _К	194,2±1,6	189,1±1,9	182,1±1,8	
	нижний	N _М	2905±107	2863±110	3929±118
		N _К	2675±104	2664±104	2857±111
		L _х	13,7±0,16	15,5±0,17	11,7±0,15
		D _М	12,2±0,10	11,8±0,09	11,4±0,09
		D _К	3,8±0,03	3,5±0,02	3,6±0,02
		V _{VM}	67,9±0,6	75,2±0,7	80,0±0,7
		V _{VК}	6,1±0,4	6,0±0,4	4,7±0,3
		ΣS _М	32,7±0,7	84,1±0,7	39,7±0,9
		ΣS _К	8,8±0,2	8,2±0,3	7,7±0,2
S _М		48,2±0,5	45,3±0,5	49,6±0,5	
S _К	144,3±2,1	136,7±1,8	163,8±1,6		

* Показатели приведены в процентах (М — миоцит сердца, К — капилляр).

Методические особенности стереометрического анализа ультраструктур биологических объектов

Изучению особенностей организации и перестройки ультраструктур биологических объектов придается большое значение. Это связано прежде всего с тем, что первоначально морфологические проявления структурных изменений объектов реализуются на субклеточном уровне. Малая разрешающая способность оптического микроскопа не позволяет выявить тонкие изменения в организации клеточных органелл, и поэтому в этом случае применяют электронный микроскоп.

Для электронной микроскопии используют малые доли изучаемого объекта, которые в зависимости от величины увеличения могут составлять 1×10^{20} — 1×10^{220} часть его объема. В связи с этим исследуемый участок объекта меньше гистологических препаратов, используемых для светооптической микроскопии. Так, в среднем площадь электронно-микроскопического среза в 1×10^2 — 1×10^3 раза меньше площади среза, предназначенного для изучения светооптическим методом.

Следовательно, основные ограничения, которые накладываются на количественные исследования ультраструктур клеток, идентифицируемых на разных уровнях увеличения электронного микроскопа, будут связаны с малой величиной анализируемого образца. Поэтому при применении электронной микроскопии требования к отбору репрезентативных образцов должны соблюдаться особенно строго, что не всегда учитывается исследователями. Методи-

ка отбора репрезентативных образцов описана в предыдущих главах и является стандартной для любого этапа стереометрического исследования.

В зависимости от особенностей пространственной организации объектов могут быть использованы методы систематического случайного отбора образцов для электронно-микроскопического исследования. Во всех случаях, когда имеются соответствующие условия, предпочтение следует отдавать методу случайного отбора, который более надежно гарантирует получение репрезентативных образцов.

Техническое оснащение количественных стереометрических исследований ультраструктур должно включать все средства, которые позволяют проводить измерения, тестовый счет, подсчет числа точек на ограниченной площади среза и линейное интегрирование (см. главу I). Эти средства могут быть изготовлены исследователем самостоятельно в разных модификациях. Если для изучения используют электронные микрофотографии, то такие тест-системы можно изготовить на пленке. Необходимо, чтобы площадь такой пленки соответствовала площади электронной микрофотографии. Это позволяет максимально использовать количественные данные об изучаемых ультраструктурах, срезы которых представлены на изучаемых снимках.

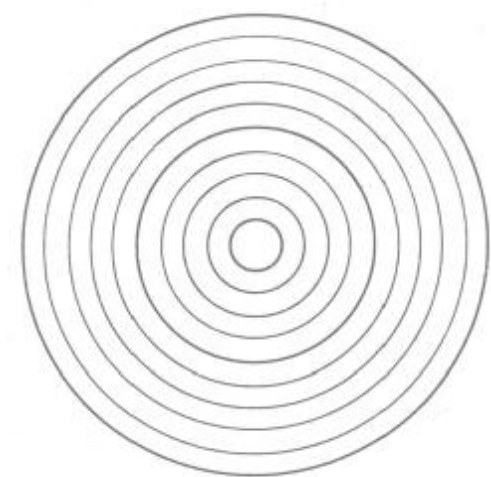


Рис. 41. Окулярная вставка для анализа класса микроструктур, обладающих анизотропией (В.П. Невзоров, 1978).

Анализ внутриклеточных структур непосредственно под электронным микроскопом можно проводить с помощью любой из описанных выше тест-систем, которую наносят с помощью тонкой иглы на люминисцентный экран. Кроме приведенных в главе I тест-систем, используют вставку (рис. 41), предназначенную для объектов, имеющих анизотропию, т.е. при ориентированных ультраструктурах. Однако такой способ нельзя считать лучшим по следующим соображениям: во-первых, нельзя быстро сменить тест-системы, так как это связано с заменой экрана; во-вторых, визуальные наблюдения за качественными изменениями биологических объектов будут затруднены в условиях постоянного присутствия сетки на экране, что быстро утомляет зрение исследователя. Целесообразнее вставлять различные окулярные вставки с тест-системами в бинокулярный микроскоп, служащий для детального изучения изображения на люминисцентном экране. В этом случае следует вводить поправку на увеличение бинокулярного микроскопа. Недостатком процесса морфометрии непосредственно с экрана электронного микроскопа является также сравнительно быстрое «выгорание» среза ткани под пучком электронов, что ведет к потере контраста и разрешения. Из-за этих ограничений предпочтение отдают морфометрическим приемам, выполняемым по электронным микрофотографиям. Заметим, что некоторые задачи морфологии можно решать методом стереологии непосредственно и с фотопластинок (негативов) описанными ранее способами или непосредственным наложением на фотопластинки прозрачных тест-систем с последующим анализом с просветкой, либо с помощью проекционных аппаратов. Единственное, что создает некоторые затруднения при таком анализе — это негативное изображение изучаемых структур, однако при достаточном навыке работы этот недостаток не ощущается.

Количественные свойства ультраструктурных объектов изучают с помощью всех известных стереометрических методов. Так как на электронной микрофотографии получают

изображения не ультраструктурных объектов, а их сечений, т.е. двухмерные отображения, то эти условия полностью удовлетворяют требованиям стереометрического анализа. Важная задача, которую необходимо решить в каждом конкретном случае, состоит в отборе необходимой совокупности стереометрических методов, позволяющих с минимальными затратами труда получить максимально возможное количество метрических параметров ультраструктурных объектов с учетом их сечений. Эти задачи решают на основе изучения принципов пространственной ориентировки, особенностей «упаковки» и формы ультраструктурных объектов. Как и при гистометрическом анализе, каждый объект электронно-микроскопического исследования представляют в виде одного из правильных геометрических тел (цилиндр, эллипсоид, шар).

При определении количественных свойств ультра структурных объектов исходная информация о каждом классе таких объектов может включать сведения о числе их на контрольной площади среза, характерных линейных размерах, длине хорды, числе хорд на контрольной линии и т.д. Эти исходные данные позволяют затем определить важнейшие стереометрические параметры ультраструктур клеток, причем анализ свойств ультраструктур может быть проведен посредством изучения разных совокупностей исходных данных. Например, плотность «упаковки» ультраструктур можно оценить как по удельной длине хорды, так и методом тестового точечного счета. Поэтому в отдельных случаях для контроля получаемых результатов рекомендуется использовать широкий набор исходных данных. На остальных этапах стереометрических исследований необходимо выбирать минимальное, но достаточное для получения полных количественных сведений об ультраструктурном объекте число исходных данных. Эта задача решается посредством выбора таких методов, в которых используются однотипные исходные данные. Например, на основе информации, получаемой методом линейного интегрирования и подсчета ультраструктурных объектов на контрольной площади, можно определить все без исключения стереометрические свойства ультраструктурных объектов клетки (плотность «упаковки», истинные линейные размеры, индивидуальные поверхность и объем, удельную длину или поверхность в зависимости от формы, удельное число, средние свободное и межцентровое расстояния и др.).

Принципиальная схема исследования количественных свойств субклеточных структур на электронно-микроскопическом уровне представляет собой частный случай полного стереометрического анализа и ничем не отличается от описанных выше способов количественного анализа микроструктур.

Обычно замеры изучаемых параметров сечений ультраструктурных объектов производят на электронных микрофотографиях срезов, изготовленных с разных блоков органа. Вначале для оценки значений каждого исходного параметра делают небольшое число замеров, по которому затем рассчитывают число измерений (необходимое для получения достоверных в 95% доверительном интервале данных) и продолжают стереометрическое исследование до достижения необходимого уровня достоверности. Заметим, что для разных параметров (длина сечения, диаметр сечения, число сечения на контрольной площади и т.д.) число замеров будет неодинаковым, так как они описываются неодинаковыми распределениями. Поэтому следует по результатам замеров на каждой электронной микрофотографии рассчитать статистику распределения каждого параметра сечения ультраструктурного объекта. Можно также результаты замеров, полученные на разных снимках из одного блока, суммировать и по ним находить статистики распределения для совокупности параметров сечений ультраструктурных компонентов. Далее, используя метод Стьюдента, проверяют результаты, полученные на микрофотографиях срезов, изготовленных из разных блоков одного органа, на принадлежность полученных данных к одной генеральной совокупности. Если такая гипотеза подтверждается, то с использованием методов статистического эксперимента далее определяют межгрупповые статистики. Такой метод позволяет получать устойчивые данные, гарантирующие репрезентативность и воспроизводимость параметров ультраструктурных объектов, изучаемой клетки и гистологического элемента.

С учетом изложенного приводим некоторые характерные примеры определения коли-

чественных параметров ультраструктур клеток. Ограниченный объем книги не позволяет дать полное описание примеров, поэтому приводим только заключительные этапы стереометрического анализа органа — методы получения исходных замеров на отдельных снимках с расчетом их статистик, а также определение соответствующих стереометрических параметров для приводимых в тексте ограниченного числа электронных микрофотографий. Мы полагали, что для каждого примера выполнение рекомендуемой в предыдущих главах книги всей принципиальной схемы стереометрического анализа не вызывает затруднений у исследователя.

Пример 1. Необходимо определить площадь сечения ядра ретикулоэндотелиоцита (купферовской клетки) на электронно-микроскопическом срезе ткани печени собаки (рис. 42). С этой целью на приводимой электронной микрофотографии определим степень увеличения микроскопа и на нее нанесем сетку с величиной каждой из сторон ее квадратов, равной степени увеличения микроскопа. Величина каждой из сторон квадратов сетки на данной электронной микрофотографии составляет 0,3 мкм.

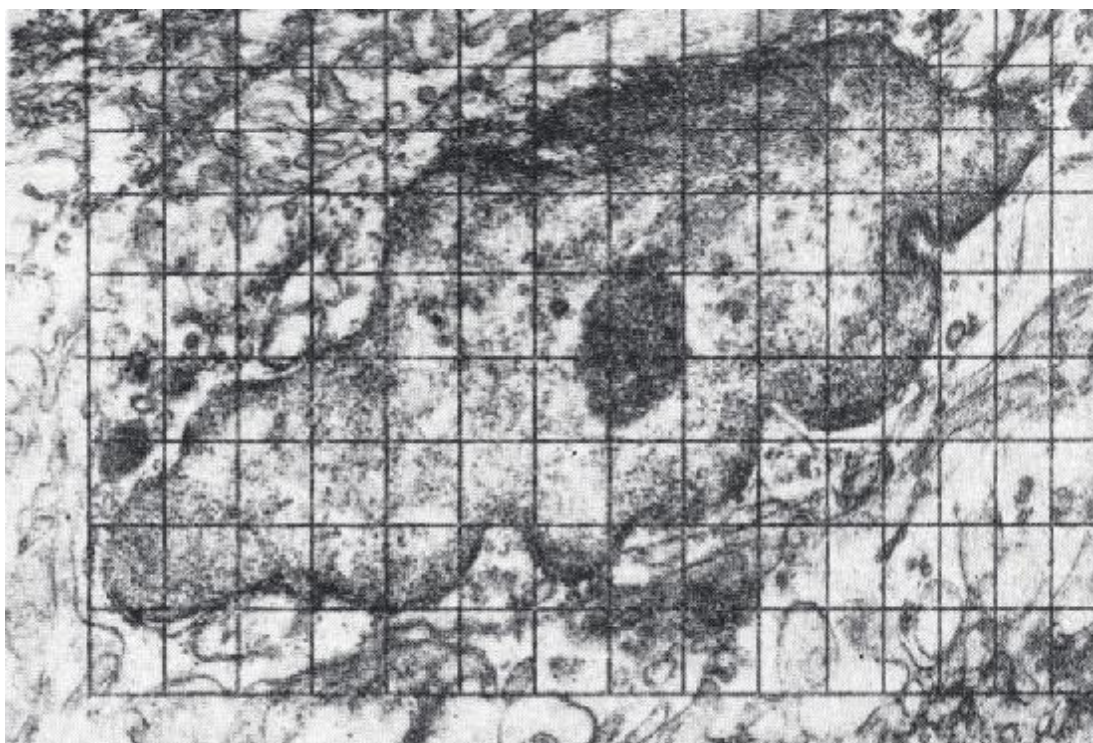


Рис. 42. Электронная микрофотография ядра купферовской клетки печени собаки на 3-й сутки после периаартериальной неврэктомии общей печеночной артерии. Планиметрический анализ с помощью решетки со стороной квадрата, равной 3 мкм (выделена область решетки, лежащая внутри контура ядра).

В пределах площади представленного на снимке среза сетка со 135 квадратами имеет площадь $12,15 \text{ мкм}^2$. Произведем подсчет числа квадратов сетки, размещенных внутри контура сечения ядра ретикулоэндотелиоцита. Неполные квадраты, которые пересекают контур сечения ядер клетки учитываются только в том случае, когда они размещены по верхней и левой сторонам контура (их оказалось 58). Тогда площадь сечения ядра ретикулоэндотелиоцита составит: $58 \text{ (квадратов)} \times 0,3 \text{ мкм} \times 0,3 \text{ мкм} = 5,22 \text{ мкм}^2$.

Пример 2. Поставлена задача установить плотность «упаковки» митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума гепатоцита крысы. Используем метод линейного интегрирования, согласно требованиям которого, на электронную микрофотографию среза гепатоцита наложим четыре линейки равной длины таким образом, чтобы они оказались параллельными друг другу (рис. 43). Суммарная длина линеек (L) с учетом электронно-микроскопического и фотографического увеличения составляет 25 мкм, а цена одного деления $n = 0,06 \text{ мкм}$. Произведем подсчет числа делений линеек, отсекаемых профилями сече-

ний митохондрий (М), которое оказалось равным 128, и приходящихся на контуры цистерн эндоплазматического ретикулума (Э)—56. Суммарная длина отрезков линий, соответствующих сечениям контуров митохондрий гепатоцита (L_M): $128 \times 0,06 \text{ мкм} = 7,68 \text{ мкм}$, а суммарная длина отрезков измерительных линеек, приходящихся на цистерны (L_s): $56 \times 0,06 \text{ мкм} = 3,36 \text{ мкм}$.

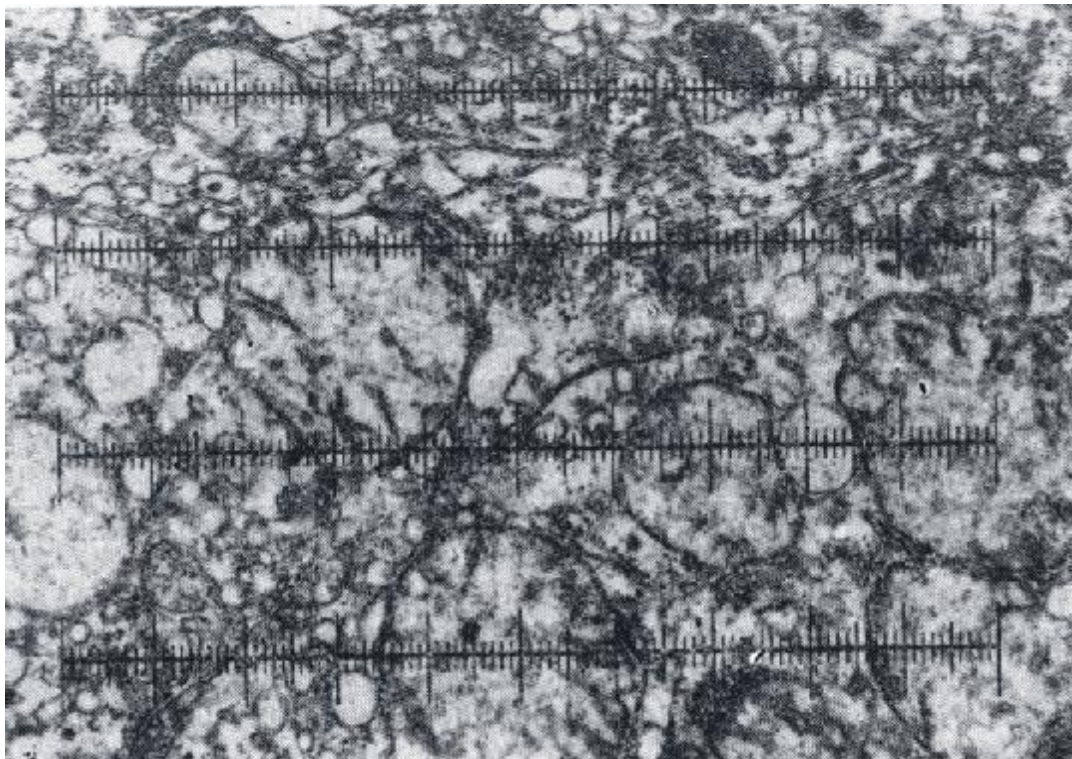


Рис. 43. Участок цитоплазмы гепатоцита печени крысы спустя 1 ч после массивной кровопотери. Для стереологического анализа методом линейного интегрирования на микрофотографию нанесены четыре линейки с ценой деления 0.06 мкм. Общая площадь микрофотографии 39,7 мкм².

Используя полученные данные и формулы линейного интегрирования, найдем, что плотность упаковки (величина долевого вклада) митохондрий гепатоцита (M_v^v) равна $7,68 : 25 = 0,307$, а объемная доля цистерн эндоплазматического ретикулума в исследованном гепатоците (\mathcal{E}_{Vv}) составляет $3,36:25 = 0,134$. По существу четыре наложенные параллельно друг другу на участок среза гепатоцита линейки представляют собой не что иное, как четырехкратное наложение одной линейки. Эту же линейку можно было наложить на срез и другими способами, например путем вращения ее вокруг произвольной оси, не исключено также использование линеек другого типа, в том числе и имеющих вид спирали, концентрических окружностей и т.д.

При достижении необходимого для получения достоверных результатов числа наложений любой линейки на контуры митохондрий и цистерн цитоплазматического ретикулума получаемые данные при повторных испытаниях будут повторяться.

Для определения плотности «упаковки» митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума гепатоцита можно использовать и ряд других методов: планиметрический, взвешивания зарисовок, тестового точечного счета и др. Однако, учитывая, что плотность «упаковки» эндоплазматического ретикулума небольшая, следует всегда отдавать предпочтение методу линейного интегрирования. Этот метод позволяет получить достоверные данные при анализе наименьшей площади среза объекта. Преимущество этого подхода вытекает из следующего примера.

Пример 3. Необходимо установить плотность «упаковки» митохондрий, цистерн эндоплазматического ретикулума, лизосомо-подобных телец, цистерн пластического цитоплазма-

тического комплекса и других структур цитоплазмы клетки. Попытаемся для этих целей использовать метод тестового точечного счета (метод «полей»). Исследование проведем на срезе гепатоцита крысы (рис. 44). Используем две электронные микрофотографии, полученные из одного блока; что позволяет затем объединить результаты подсчета. Методические особенности исследования могут быть представлены двумя вариантами. Сетка для тестового счета по величине может быть равна одной микрофотографии. Тогда ее следует наложить на один снимок и произвести необходимые подсчеты, после этого наложить ее на вторую микрофотографию и произвести такие же подсчеты с последующим суммированием результатов. При одинаковом увеличении электронного микроскопа, как в нашем примере, снимки можно плотно приложить друг к другу и на них наложить сетку, площадь которой соответствует суммарной площади двух микрофотографий. Такая методика более проста, в связи с чем мы используем ее в этом примере. Таким образом, на две плотно уложенные электронограммы наложим сетку для тестового счета, число точек (z), которой составляет 252. Произведем дифференцированный подсчет числа точек тестовой сетки, попадающих на митохондрии (М), цистерны эндоплазматического ретикулула (Э), лизосомоподобные тельца (Л), цистерны пластинчатого цитоплазматического комплекса (Ц).

Число точек, приходящихся на остальные структуры среза цитоплазмы (К), можно определить как разность между общим числом точек тестовой сетки и суммарным числом точек, приходящихся на указанные ультраструктурные составляющие гепатоцита.

Произведя такой дифференцированный подсчет и используя методы альтернативной статистики в приложении к методу «полей», определим плотность упаковки ультраструктур гепатоцита митохондрий — $M_{Vv} = 67 : 252 = 0,266$; цистерн эндоплазматического ретикулула — $\mathcal{E}_{Vv} = 27 : 252 = 0,107$; лизосомоподобных телец — $L_{Vv} = 3 : 252 = 0,0119$; цистерн пластинчатого цитоплазматического комплекса — $\mathcal{C}_{Vv} = 4 : 252 = 0,0158$ и других структур — $K_{Vv} = 1 - 0,266 - 0,107 - 0,0119 - 0,0158 = 0,5993$.

Из этого примера следует, что результаты определения плотности «упаковки» митохондрий и цистерн пластинчатого цитоплазматического комплекса гепатоцитов отличаются от установленных параметров в предыдущем примере. Это связано с малой плотностью «упаковки» цистерн пластинчатого цитоплазматического комплекса, в связи с чем метод «полей» здесь мало приемлем. Особенно большая погрешность возникает при определении этим методом плотности упаковки лизосомоподобных телец и цистерн пластинчатого цитоплазматического комплекса, доля которых в объеме гепатоцита очень мала. В таком случае следует либо отказаться от определения плотности «упаковки» указанных структурно-функциональных элементов гепатоцита, либо использовать метод линейного интегрирования.

Согласно методическим особенностям альтернативной статистики по полученным результатам можно было бы определить и ошибки найденных значений плотности «упаковки» митохондрий, цистерн эндоплазматического ретикулула, лизосомоподобных телец, цистерн пластинчатого цитоплазматического комплекса и других структур цитоплазмы. Однако в данном случае это представляется нецелесообразным, так как общее число подсчитанных точек, равное 252, значительно меньше того, которое следовало бы получить для получения репрезентативных данных. Методические приемы определения необходимого числа подсчетов точек описаны ранее. Это достигается увеличением плотности точек в тестовой сетке с помощью неоднократного наложения тестовой сетки на одну и ту же электронную микрофотографию, а также использованием нескольких снимков срезов, изготовленных с одного блока и т.д.

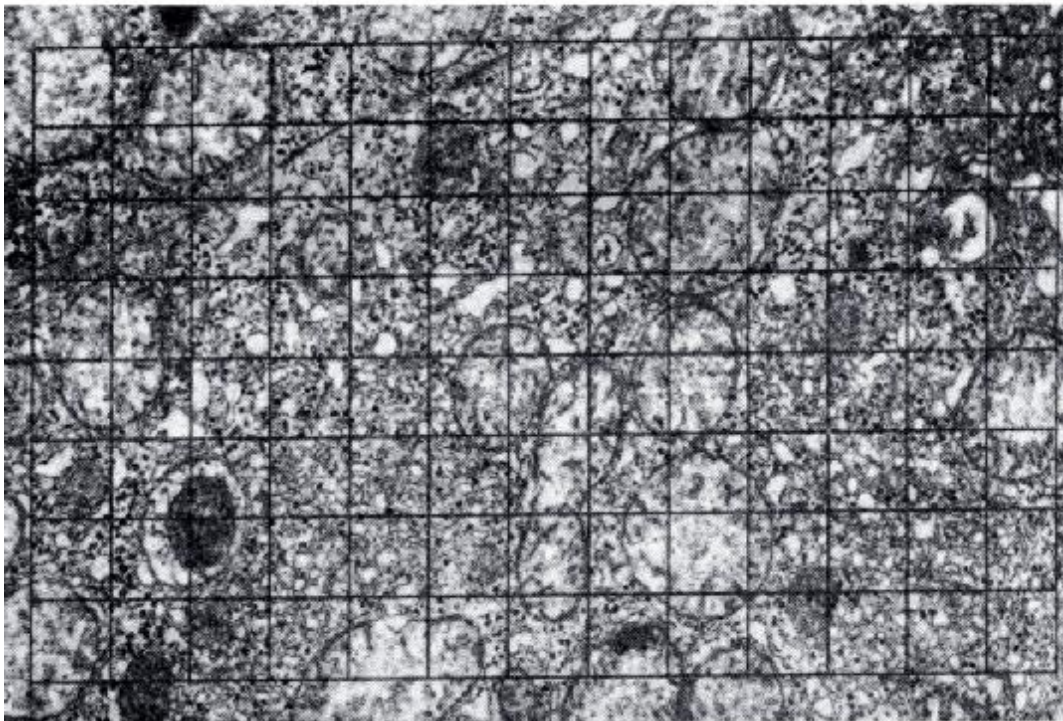
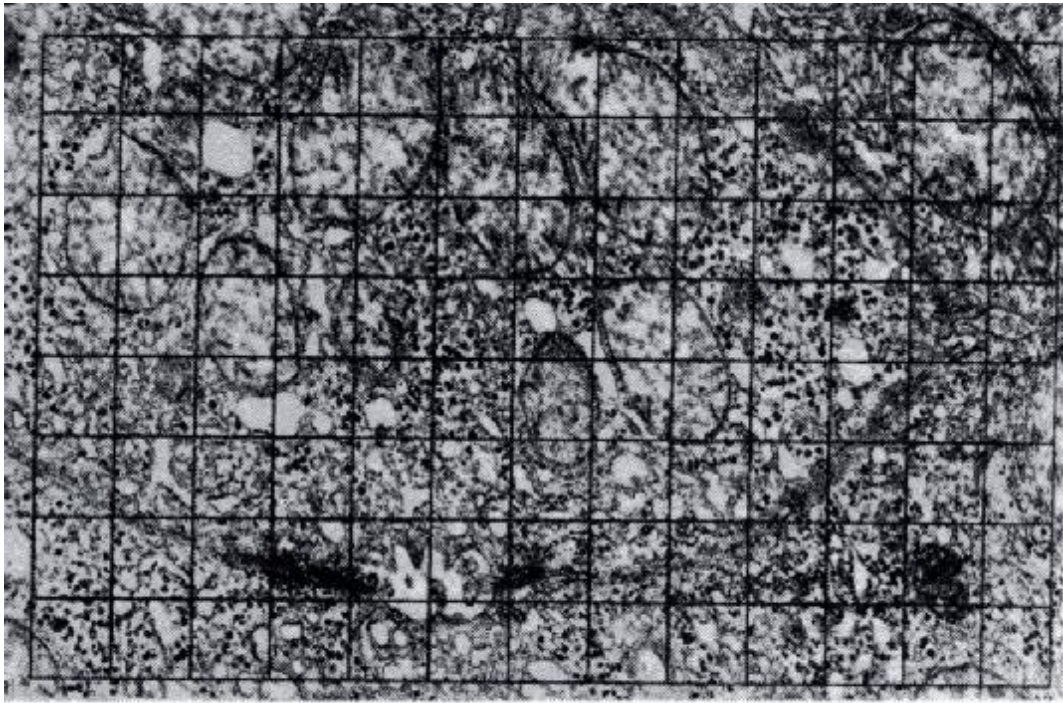


Рис. 44. Электронные микрофотографии участков гепатоцитов печени крыс на 21-е сутки после периартериальной неврэктомии общей почечной артерии. Контрастировано цитратом свинца.

Пример 4. Необходимо определить удельную внутреннюю поверхность эндотелиоцитов капилляра (рис. 45). С этой целью на срезах, выполненных через капилляр, будем накладывать многократно (например, 5 раз) линейку, ориентированную перпендикулярно к его осевой длине. Длина линейки с учетом увеличения 1 мкм. При пяти наложениях (общая длина 5 мкм) линейки на срез капилляра число пересечений внутренних контуров эндотелиальных клеток с линейкой равно 26. Тогда, используя метод направленных секущих (Салтыков С.А., 1970), найдем, что удельная площадь поверхности эндотелия капилляров составляет $5,2 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ ($26:5 = 5,2$).

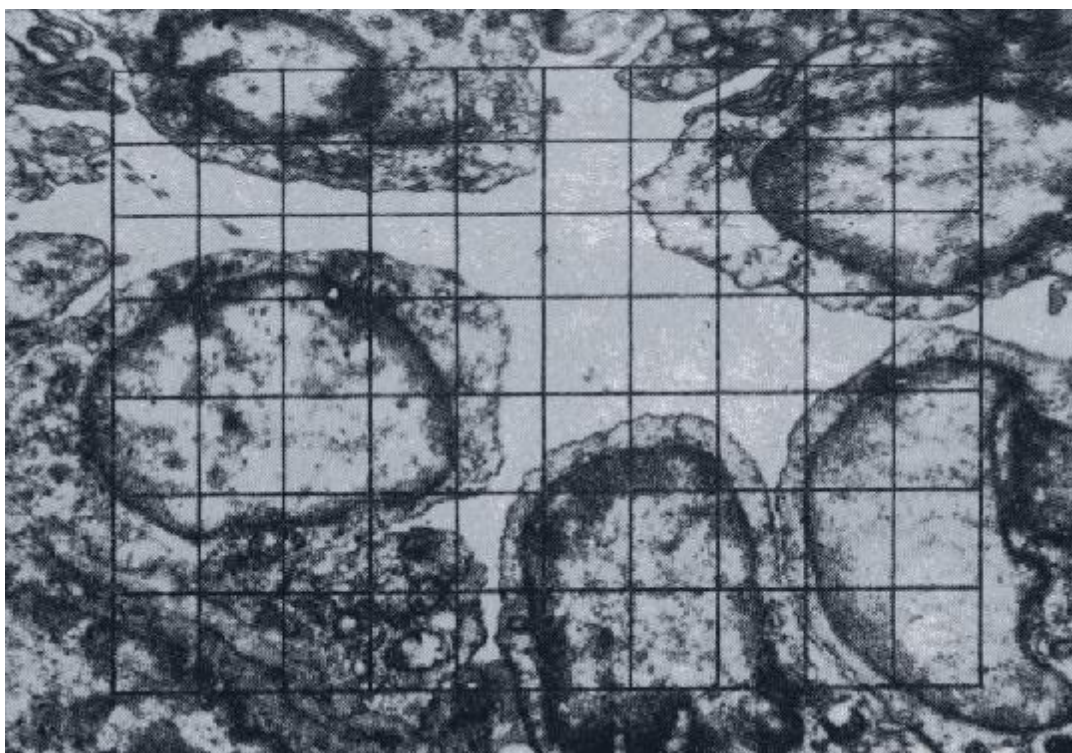


Рис. 45. Поперечный срез капилляра печени крысы, погибшей от геморрагического шока. Контрастировано цитратом свинца.



Рис. 46. Мембраны гранулярной эндоплазматической сети гепатоцита печени крыс после длительной массивной кровопотери. Контрастировано цитратом свинца.

Пример 5. Требуется определить длину мембран эндоплазматической сети цитоплазмы гепатоцита (рис. 46). Предварительно определим степень ее пространственной ориентировки. Для этого на электронную микрофотографию среза гепатоцита наложим в произвольном направлении линейку и определим углы наклона к ней сечений контуров цитоплазматической сети с оценкой параметров распределения, т.е. среднего угла наклона и его дисперсии. Пусть в результате таких процедур удалось установить, что дисперсия среднего угла наклона

тестовой линейки к элементам эндоплазматической сети цитоплазмы гепатоцита составила 386. Тогда можно предположить, что эндоплазматическая сеть цитоплазмы гепатоцита представляет собой частично ориентированную систему.

Это позволяет для решения поставленной задачи, кроме известных тестовых систем, использовать систему, представленную в виде концентрических окружностей, которая устраняет анизотропию в распределении контуров мембран (см. рис. 41).

Известно, что среднее число пересечений, приходящихся на один микрометр тест-линии (m), равно частному от деления суммарного числа пересечений этих линий с ультраструктурами (z) на суммарную длину тест-линий (l):

$$m = z/l \quad (114)$$

Общая поверхность ультраструктур, как было показано выше (С.А. Салтыков, 1970), будет равна:

$$L_u = 0,5p\pi m \quad (115)$$

или

$$L_u = 1,57lm \quad (116)$$

Абсолютную ошибку при подсчете числа точек пересечений для $P = 0,95$ ($t = 2,0$) определяют по формуле:

$$e = kt\sqrt{z} \quad (117)$$

Коэффициент k принимают равным 0,45, так как изучаемая система является изометрической, не зависящей от ориентации ультраструктур. Относительную ошибку определяют по формуле:

$$e_{\text{отн}} = e/z \cdot 100\% \quad (118)$$

Следовательно, в заданных условиях стереометрического исследования электронных микрофотографий для принятого уровня безошибочного суждения необходимое число пересечений линий тест-системы с ультраструктурами должно быть не менее \bar{z} :

$$\bar{z} = 10000 \cdot R^2 t^2 / e_{\text{отн}}^2 \quad (119)$$

Наложим на микрофотографию, состоящую из концентрических окружностей, тест-систему. Исходя из показателей увеличений электронного микроскопа и фотографии, вычислим суммарную протяженность линий концентрических окружностей l : $l = l_1 + l_2 + l_3 + l_4$, где l_1, l_2, l_3, l_4 — длины соответствующих окружностей: $\bar{l}_1 = 1,9$ мкм, $\bar{l}_2 = 3,9$ мкм, $\bar{l}_3 = 3,8$ мкм; $\bar{l}_4 = 7,8$ мкм. Таким образом, суммарная протяженность всех линий тест-системы равна

$$\bar{l} = 1,9 + 3,9 + 5,8 + 7,8 = 19,4 \text{ мкм.}$$

Общее число пересечений (z) тест-системы с мембранами эндоплазматического ретикула на данной микрофотографии оказалось равным 80.

Подставляя в формулу (114) значения $z = 80$ и $l = 19,4$ мкм, получим среднее число пересечений (m), приходящихся на 1 мкм длины тест-линии: $m = z/l$, т.е. $m = 80 : 19,4 = 4,1$ (мкм⁻¹).

Протяженность мембран эндоплазматической сети, изображенной на микрофотографии, определим из формулы (116):

$$S_V = 1,571m = 1,57 \cdot 4,1 = 6,4 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

Найдем абсолютную ошибку (ϵ) числа пересечений, подставив значение коэффициента $k = 0,45$ (система мембран хотя и имеет ориентацию, но тест-система приводит ее к изометрической) при $t = 2,0$ и $z = 80$, в формулу (117);

$$e = kt\sqrt{z} = 0,45 \cdot 2,0 \cdot \sqrt{80} = 8,1$$

Относительная ошибка, исходя из формулы (118), равна:

$$e_{\text{отн}} = e/z \cdot 100\% = (8,1:80) \cdot 100\% = 10\%.$$

Для выполнения стереометрического анализа (с достоверностью $P = 0,95$; $t = 2,0$ и при относительной ошибке $\epsilon_{\text{отн}}$ менее 5%) по формуле (119) подсчитаем необходимое число пересечений z :

$$z = (10000 \cdot k^2 \cdot t^2) : e_{\text{отн}}^2 = (10000 \cdot 0,45^2 \cdot 2,0^2) : 5^2 = 3240.$$

На одной микрофотографии при данном увеличении и избранной тест-системе число пересечений с мембранами около 80. Следовательно, необходимое для стереометрического анализа число микрофотографий (n) должно быть не менее 40, так как

$$n = \bar{z} / z \quad (120)$$

и в данном случае $z = 3240 : 80 \approx 40$.

Площадь среза, перекрываемая большей окружностью тест-системы, равна 249 мкм^2 , следовательно, для выполнения заданных условий точности анализу необходимо подвергнуть срез площадью $249 \cdot 40 = 9967 \text{ мкм}^2$.

Пример 6. Проведем определение абсолютной поверхности мембран эндоплазматического ретикулума панкреоцита.

На микрофотографию (рис. 47) наложена тест-система в виде прямоугольной решетки, параметры которой вычислены с учетом электронно-оптического и фотографического увеличений:

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. Постоянная решетки | — 0,58 мкм |
| 2. Длина горизонтальной линии | — 6,96 » |
| 3. Длина вертикальной линии | — 4,64 » |
| 4. Площадь решетки | — 32,29 мкм ² |
| 5. Суммарная длина горизонтальных линий | — 62,64 мкм |
| 6. Суммарная длина вертикальных линий | — 60,32 » |
| 7. Общая длина (l) всех линий тест-системы | — 122,96 » |

Абсолютную удельную поверхность мембран эндоплазматического ретикулума определим методом секущих. Для этого подсчитаем общее число пересечений горизонтальных и вертикальных линий тест-системы с мембранами эндоплазматической сети. Получены следующие данные:

- | | |
|--|-------|
| 1. Число пересечений с вертикальными линиями | — 224 |
| 2. Число пересечений с горизонтальными линиями | — 162 |
| 3. Общее число пересечений | — 386 |

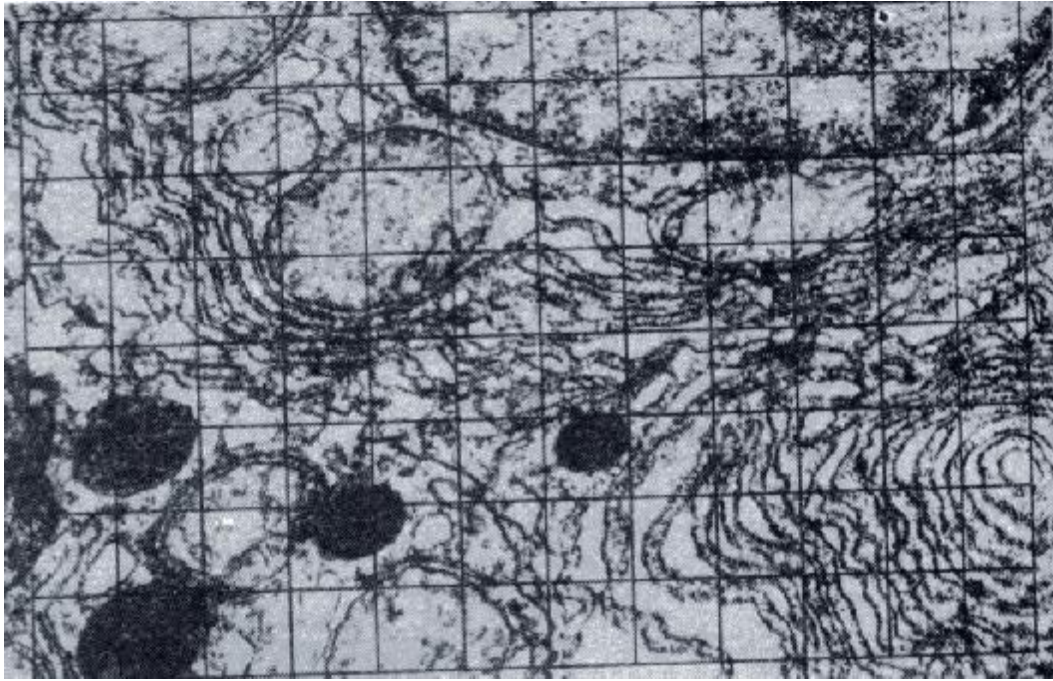


Рис. 47. Участок ацинарной клетки поджелудочной железы человека (биопсия во время операции по поводу острого панкреатита). Контрастировано цитратом свинца.

Зная общую длину тест-линий l и число пересечений z по формуле (114) определим среднее число пересечений, приходящихся на единицу длины секущей (m):

$$m = z/l = 386 : 122,96 = 3,13 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

Подставляя значение m в формулу:

$$S_V = 2m. \quad (121)$$

определим абсолютную удельную поверхность (Салтыков С.А., 1970) мембран эндоплазматической сети:

$$S_V = 2 \cdot 3,13 = 6,26 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$$

Эта величина означает, что в одном кубическом микрометре цитоплазмы ацинарной клетки поджелудочной железы человека в условиях острого панкреатита содержится эндоплазматическая сеть, имеющая поверхность 6,26 квадратных микрометров.

По формуле вычисляем абсолютную ошибку методики подсчета числа пересечений:

$$e = kt\sqrt{z} = 0,45 \cdot 2,0 \cdot \sqrt{386} = 17,68.$$

Коэффициент k выбираем равным 0,45, считая систему мембран изометрической. Нормированное отклонение для достоверности в 0,95 равно 2,0.

Относительную ошибку определяем из формулы:

$$e_{\text{отн}} = e/z \cdot 100\% = (17,68 : 386) \cdot 100\% = 4,58\%.$$

Необходимое число пересечений для обеспечения заданной достоверности анализа ($P = 0,95$; $t = 2,0$) и относительной ошибки менее 5% вычислим по формуле (119):

$$z = (10000 \cdot 0,45^2 \cdot 2,0^2) : 5^2 = 3240$$

Учитывая, что на площади одной микрофотографии в среднем содержится около 380 пересечений, стереометрическому анализу необходимо подвергнуть не менее 10 микрофотографий, т.е. площадь среза поджелудочной железы при этом должна составить $32,29 \cdot 10 = 322,3 \text{ мкм}^2$.

Пример 7. Необходимо определить абсолютную удельную поверхность мембран эндоплазматической сети гепатоцита (рис. 48).

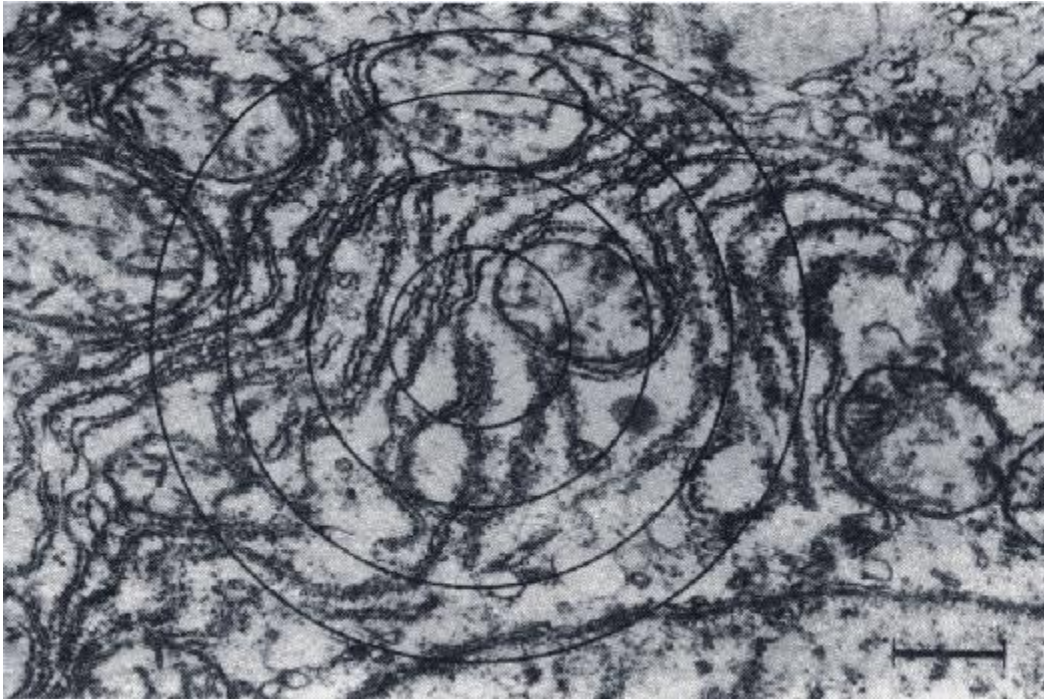


Рис. 48. Участок цитоплазмы гепатоцита печени крысы, погибшей от длительной кровопотери. Кусочек печени контрастирован цитратом свинца.

Во избежание ошибки, связанной с возможной анизотропией в расположении мембранных поверхностей в цитоплазме гепатоцита, используем тест-систему, состоящую из концентрически расположенных окружностей.

Определим общую длину тест-системы l , равную сумме длин всех окружностей (с учетом увеличения):

$$l = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 = 3,8 + 7,7 + 11,5 + 15,3 = 38,3 \text{ мкм.}$$

Подсчитаем число пересечений z тест-линий с контурами мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцита; оно оказалось равным 106.

По формуле (114) среднее число пересечений m , приходящихся на единицу длины l тест-системы, равно:

$$m = z/l = 106 : 38,3 = 2,8 (\text{мкм}^{-1}).$$

Абсолютную удельную поверхность S_V мембран эндоплазматической сети, т.е. количество квадратных микрометров поверхности, содержащихся в одном кубическом микрометре объема цитоплазмы гепатоцита, определяем по формуле (121):

$$S_V = 2m = 2 \cdot 2,8 = 5,6 (\text{мкм}^{-1}),$$

затем вычисляем ошибку по формуле:

$$e = kt\sqrt{z} = 0,45 \cdot 2,0 \cdot \sqrt{106} = 9,3$$

Коэффициент k принимаем равным 0,45, так как взаимное расположение мембран эндоплазматической сети и тест-линий является изометрическим. Относительная ошибка равна:

$$e_{\text{отн}} = \frac{e}{z} \cdot 100\% = \frac{9,3}{106} \cdot 100\% = 8,8\%.$$

Для обеспечения достоверности $P = 0,95$ ($t = 2,0$) и относительной ошибки менее 5% необходимо подсчитать число пересечений z :

$$\bar{z} = (10000 \cdot k^2 \cdot t^2) : e_{\text{отн}}^2 = (10000 \cdot 0,45^2 \cdot 2,0^2) : 5^2 = 3240.$$

На одной микрофотографии точек пересечения 106, следовательно, анализу надо подвергнуть около 30 микрофотографий ($3240 : 106 \approx 30$) при избранном увеличении. Учитывая, что площадь, покрываемая одной тест-системой, равна $18,7 \text{ мкм}^2$, то площадь среза печени, которую следует проанализировать, составит:

$$18,7 \text{ мкм}^2 \cdot 30 = 560 \text{ мкм}^2.$$

Пример 8. Необходимо установить зависимость показателей абсолютной удельной поверхности ультраструктуры от направления плоскости среза по отношению к ориентированным структурам. В качестве полностью ориентированной системы будем рассматривать внутриклеточные компоненты миоцита, за ось ориентации примем параллельное направление миофибрилл.

Рассмотрим электронные микрофотографии срезов миоцита, параллельных оси ориентации (рис. 49), перпендикулярных (рис. 50) и тангенциальных, направленных под углом 45° (рис. 51).

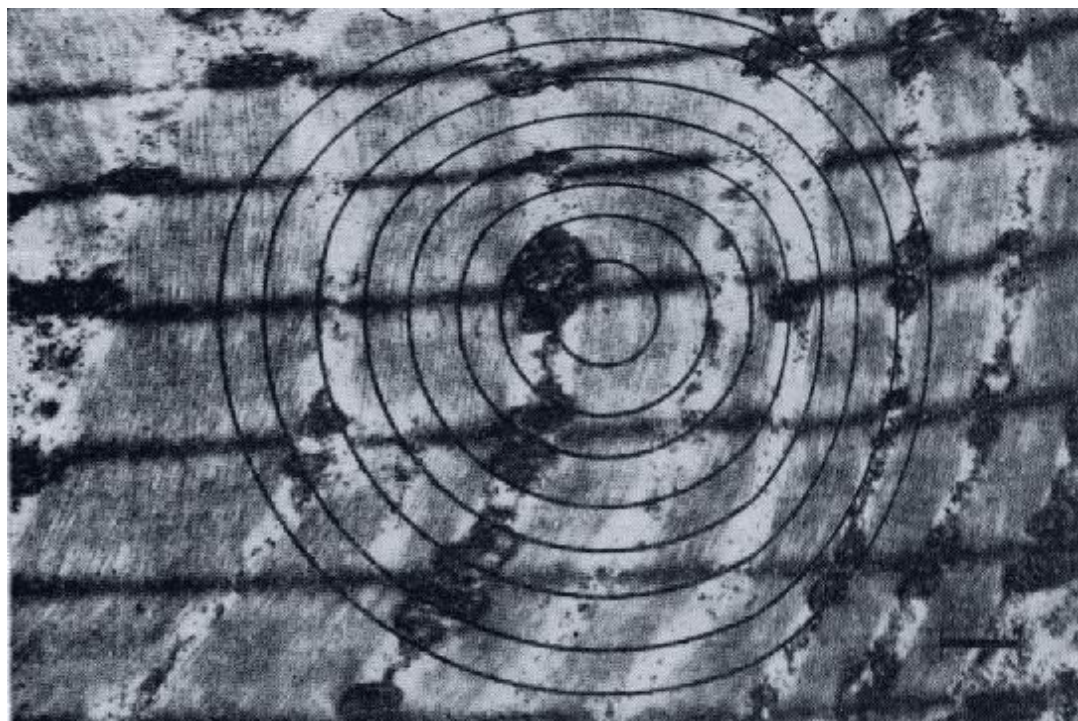


Рис. 49. Продольный срез миоцита скелетной мышцы крысы, погибшей от геморрагического шока. Ув. 11 000. Объект контрастирован цитратом свинца. На плоскость микрофотографии нанесена тест-система, устраняющая влияние анизотропии распределения ультраструктур.



Рис. 50. Поперечный срез миоцита скелетной мышцы крысы, погибшей от массивной кровопотери. Ув. 15 200. Объект контрастирован цитратом свинца. На микрофотографию нанесена тест-система.

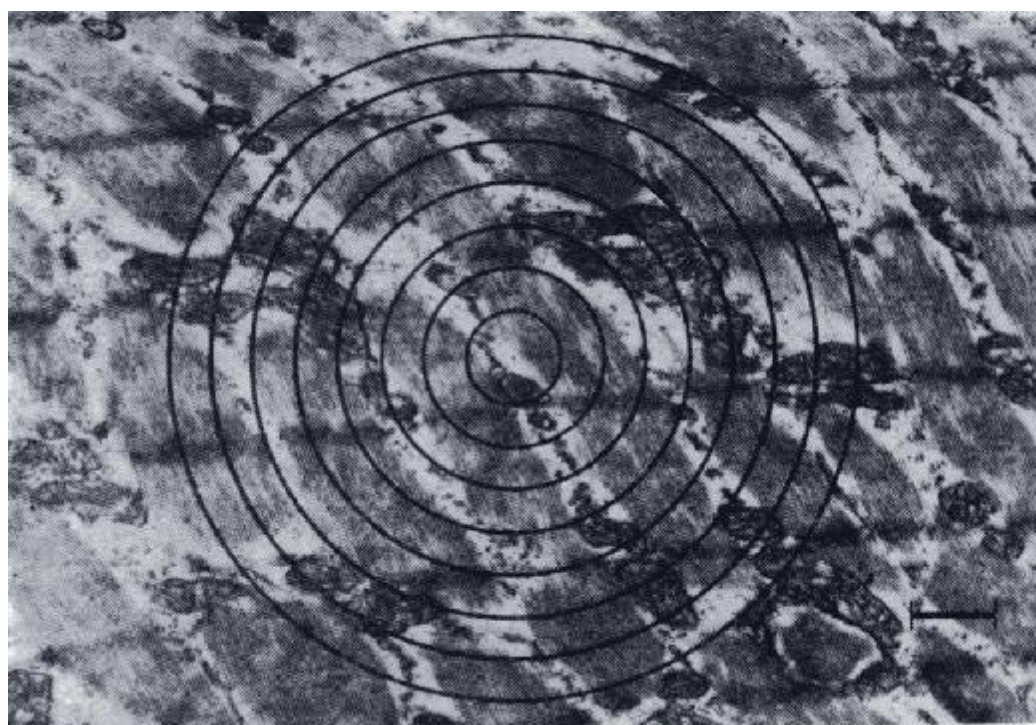


Рис. 51. Тангенциальный срез миоцита скелетной мышцы крысы, погибшей от кровопотери. На плоскость микрофотографии нанесена тест-система. Ув. 11 000. Объект контрастирован цитратом свинца.

Для каждого из трех случаев определим абсолютную удельную поверхность миофибрилл, для чего, учитывая их ориентацию, применим тест-систему, устраняющую анизотропию в распределении миофибрилл, т. е. набор концентрических окружностей.

Для определения абсолютной удельной поверхности миофибрилл необходимо произвести подсчет числа пересечений поверхности пучка миофибрилл с линиями тест-системы.

мы, а затем определить среднее число пересечений, приходящихся на один микрометр длины тест-линий.

Определим общую длину восьми окружностей тест-системы с учетом электронно-оптического и фотографического увеличения:

$$l = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5 + l_6 + l_7 = l_8 = \frac{2P(l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5 + l_6 + l_7 = l_8)}{1,1} = 10268_{\text{мкм}},$$

где l_1, l_2, \dots, l_8 измерены в сантиметрах из микрофотографии и учтено, что 1,1 см на микрофотографии соответствует 1 мкм в объекте.

Подсчитаем число пересечений пучков миофибрилл с линиями тест-системы z ; как видно на рис. 49, это число равно 90.

Подставим значение l и z в формулу (114), получим среднее число пересечений миофибрилл t , приходящееся на один микрометр длины тест-системы: $m_{\parallel} = z/l = 90 : 102,8 \approx 0,9$ (мкм^{-1}).

По формуле (121) определим абсолютную удельную поверхность миофибрилл в миоците:

$$S_{\parallel} = 2m_{\parallel} = 2 \cdot 0,88 = 1,8 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$$

Абсолютную ошибку определения числа пересечений найдем по формуле (118) с учетом, что $k = 0,45$, (так как используется тест-система, устраняющая анизотропию в распределении миофибрилл) и $t = 2,0$ (для $P = 0,95$): $\varepsilon = 9,5$. Определим относительную ошибку:

$$e_{\text{отн}} = e/z \cdot 100\% = (8,5 \cdot 100) : 90 = 9,4\%.$$

Отсюда следует, что абсолютная удельная поверхность миофибрилл, определенная фибрилл, по продольным срезам, составляет:

$$S_{\parallel} = 1,8 \pm 0,17 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$$

Произведем расчет абсолютной удельной поверхности пучка миофибрилл миоцита по микрофотографиям, изготовленным со срезов, направленных перпендикулярно плоскости ориентации миофибрилл, т.е. по поперечным срезам миоцита (см, рис. 50).

Как и в предыдущем случае, определим истинную суммарную длину всех концентрических окружностей:

$$l = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5 + l_6 + l_7 = l_8 = (2,0 \cdot 2,14 \cdot 18) : 1,5 = 75,4 \text{ мкм.}$$

Число пересечений, подсчитанное по рис. 50, составляет: $z = 8,3$. Подставив значения z и l в формулу (114), получим величину m_{\perp} .

$$m_{\perp} = z/l = 8,3/75,4 \approx 1,1 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

По формуле (121) определим абсолютную удельную поверхность пучков миофибрилл при перпендикулярной ориентации среза относительно направления миофибрилл:

$$S_{\perp} = 2m_{\perp} = 2 \cdot 1,1 = 2,2 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

Абсолютную ошибку определяем по формуле (117) при $k = 0,45$, $t = 2,0$ ($P = 0,95$):

$$e = kt\sqrt{z} = 0,45 \cdot 2,0 \cdot \sqrt{83} = 8,2\%.$$

Относительная ошибка согласно выражения (118) составляет:

$$e_{\text{отн}} = (e \cdot 100) : z = 9,9\%.$$

Следовательно, абсолютная удельная поверхность пучков миофибрилл равна:

$$S_{\perp} = 2,2 \pm 0,24 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

Определим абсолютную удельную поверхность пучков миофибрилл по срезу, проходящему под углом к оси ориентации (см. рис. 51). Ввиду того что электронно-оптическое и фотографическое увеличение на исследуемых фотографиях и масштаб тест-системы одинаковы, принимаем за общую длину тест-линий 1, равную $102,8 \text{ мкм}^{-1}$. На указанном снимке число пересечений z равно 100.

С учетом величин z и l получим:

$$m_t = z/l = 100 : 102,8 \approx 0,97.$$

Рис. 52. Участок цитоплазмы кардиомиоцита крысы после длительной кровяной потери. На плоскость микрофотографии наложена тест-система, состоящая из параллельных и перпендикулярных линий. Ув. 16 000. Объект контрастирован цитратом свинца.

Находим абсолютную удельную поверхность:-

$$S_t = 2m_t = 1,9 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$$

Абсолютная ошибка (при $k = 0,45$, $t = 2,0$; $P = 0,95$) равна:

$$e = kt\sqrt{z} = 0,45 \cdot 2,0 \cdot \sqrt{100} = 9,0.$$

Относительная ошибка составляет:

$$e_{\text{отн}} = \frac{e}{z} \cdot 100\% = \frac{9,0 \cdot 100}{100} = 9,0\%.$$

Следовательно:

$$S_t = 1,9 \pm 0,14 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}.$$

Таким образом, получены значения абсолютной удельной! поверхности пучков миофибрилл миоцита, вычисленные по данным стереометрии срезов, ориентированных по различным направлениям относительно оси ориентации: параллельно оси ориентации — $S_{\parallel} = 1,8 \pm 0,17 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$, перпендикулярно оси — $S_{\perp} = 2,2 \pm 0,24 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$ и под углом коси — $S_t = 1,9 \pm 0,17 \text{ (мкм}^{-1}\text{)}$.

Из сравнения этих величин следует, что статистической разницы между ними нет. Данный пример не может претендовать на достаточную степень точности так как подсчет производили лишь по одной микрофотографии. Однако достаточно большое количество стереометрических измерений, выполненных нами, позволяет утверждать, что при использовании предлагаемой тест-системы результаты замеров не зависят от направления, под которым сделан срез.

Пример 9. Необходимо определить степень ориентации поверхностей ультраструктур на плоскости и в пространстве.

Построим «розу пересечений» для оценки степени ориентации крист митохондрий в миоците. Для этого используем систему отрезков, направленных параллельно оси ориентации миофибрилл, перпендикулярно к ней (рис. 52), а также направленных под углом 45° и 135° (рис. 53).

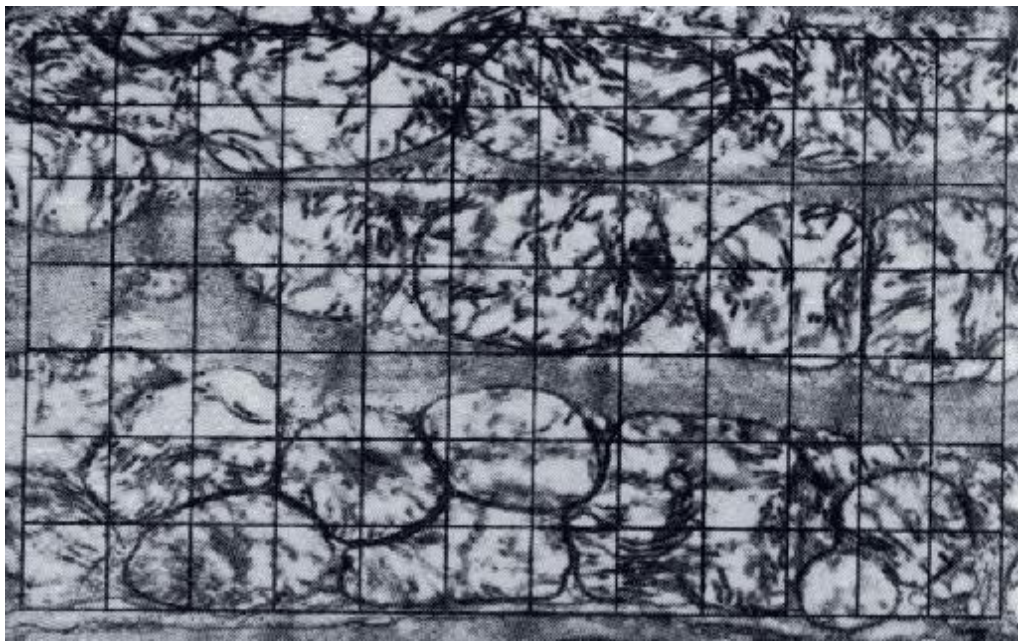


Рис. 52. Участок цитоплазмы кардиомиоцита крысы после длительной кровопотери. На плоскость микрофотографии наложена тест-система, состоящая из параллельных и перпендикулярных линий. Ув. 16 000. Объект контрастирован цитратом свинца.

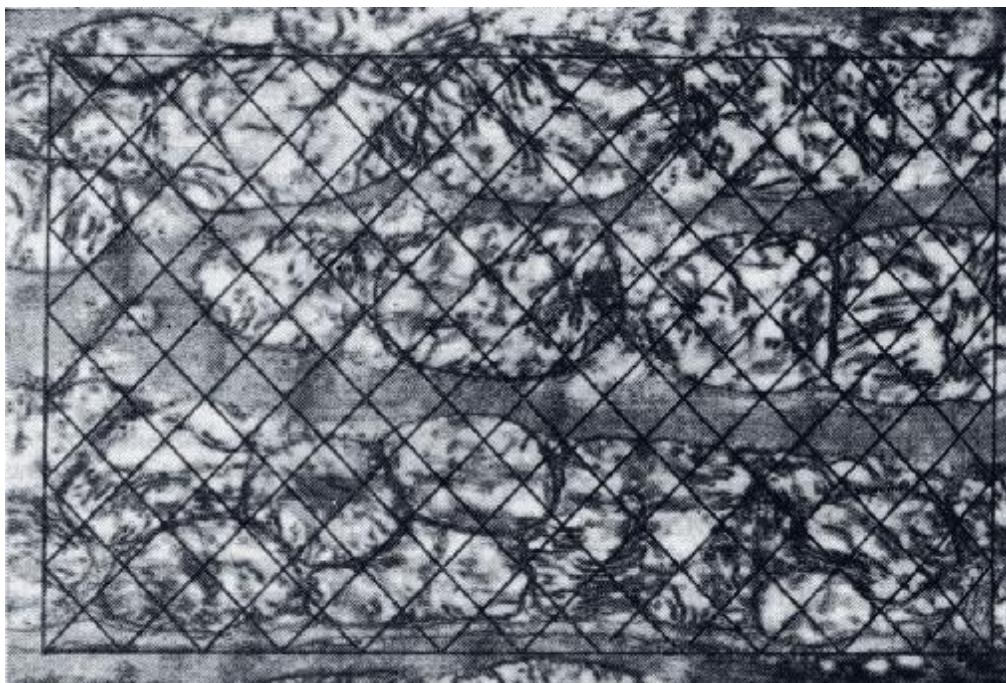


Рис. 53. Тот же снимок (см. рис. 52). На снимок наложена система линий, направленных под углом 45° и 135° относительно оси ориентации. Ув. 16000. Объект контрастирован цитратом свинца.

Определим истинную суммарную длину линий, параллельных оси ориентации: $l_{\parallel} = 60,0$ мкм.

Суммарная длина линий, перпендикулярных оси ориентации:

$$l_{\perp} = 5,69 \text{ мкм.}$$

Общее число пересечений крист митохондрий с тест-линиями, направленными параллельно оси ориентации: $z_{\parallel} = 66$.

Таким же способом определяем число пересечений крист митохондрий с тест-линиями, направленными перпендикулярно оси ориентации $z_{\perp} = 122$. Среднее число пересечений, приходящихся на единицу длины тест-линии, определим по формуле:

$$m_{\parallel} = z_{\parallel}/l_{\parallel} = 66,0 : 60,0 = 1,1.$$

$$m_{\perp} = z_{\perp}/l_{\perp} = 122 : 56,9 = 2,1.$$

Далее производим подсчет среднего числа пересечений тест-линий с кристами митохондрий кардиомиоцита, где тест-линии направлены под углом 45° и 135° относительно выбранной оси ориентации, т.е. определим m_{45} и m_{135} .

Учитывая электронно-оптическое и фотографическое увеличение, определим длину тест-линий l_{45} и l_{135} . Так как анализируемый участок имеет форму квадрата и линии расположены регуляторно, то $l_{45} = l_{135} = 76,0$ мкм.

Число пересечений тест-линий с кристами митохондрий равно:

$$z_{45} = 120; \quad z_{135} = 94.$$

Среднее число пересечений, приходящихся на единицу длины тест-линий определим по формуле:

$$m_{45} = \frac{z_{45}}{l_{45}} = \frac{120}{76} = 1,6;$$

$$m_{135} = \frac{z_{135}}{l_{135}} = \frac{94}{76} = 1,2.$$

Для построения «розы пересечения» получены следующие значения: $m_{\parallel} = 1,1$; $m_{\perp} = 2,1$; $m_{45} = 1,6$; $m_{135} = 1,2$:

Очевидно, что рассматривается зависимость среднего числа пересечений от угла наклона секущих относительно избранной оси, следовательно, и «роза пересечений» будет симметрична относительно оси ориентации, т.е. $m_{145} = m_{225}$ и $m_{135} = m_{270}$. Отсюда следует, что достаточно построить «розу пересечений» только в верхней полуплоскости.

Откладывая значения m_{\perp} по соответствующим радиусам-векторам и соединив концы векторов плавной кривой, получим «розу пересечения» (рис. 54).

Анализ графика показывает, что кристы митохондрий кардиомиоцитов имеют преимущественную ориентацию, перпендикулярную к ориентации миофибрилл. Поскольку в направлении, параллельном ориентации миофибрилл, $m_{\parallel} \neq 0$, систему крист следует считать частично ориентированной.

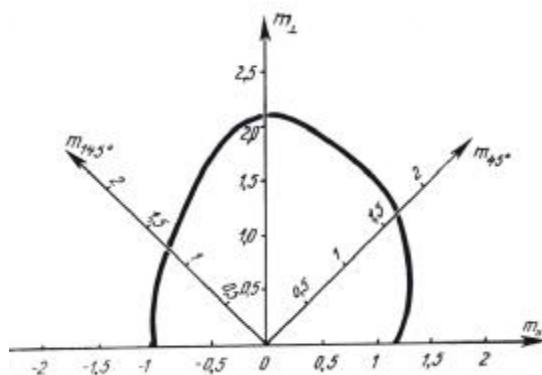


Рис. 54. «Роза пересечений» тест-линий, имеющих различные направления относительно оси ориентации m_{\parallel} с кристами митохондрий кардиомиоцитов крысы (по рис. 52).

Степень ориентации a определяем как отношение ориентированной доли поверхности к полной удельной поверхности, выраженной в процентах:

$$a = \frac{100(m_{\perp} - m_{\parallel})}{m_{\perp} + m_{\parallel}}. \quad (122)$$

Подставляя значения $m_{\perp} + m_{\parallel}$ получим:

$$a = \frac{100(21,4 - 11)}{21,4 + 11} = 32,1\%.$$

Полностью изометрическая система будет иметь $\alpha = 0\%$, при этом «роза пересечений» имеет вид окружности с центром в начале координат.

Полностью ориентированная система даст $\alpha = 100\%$ и «роза, пересечений» изобразится двумя окружностями, соприкасающимися в начале координат (рис. 55). Форма «розы пересечений» зависит от степени ориентации ультраструктур. Описанными методами можно оценивать степень изменения ориентации внутриклеточных структур в условиях патологии.

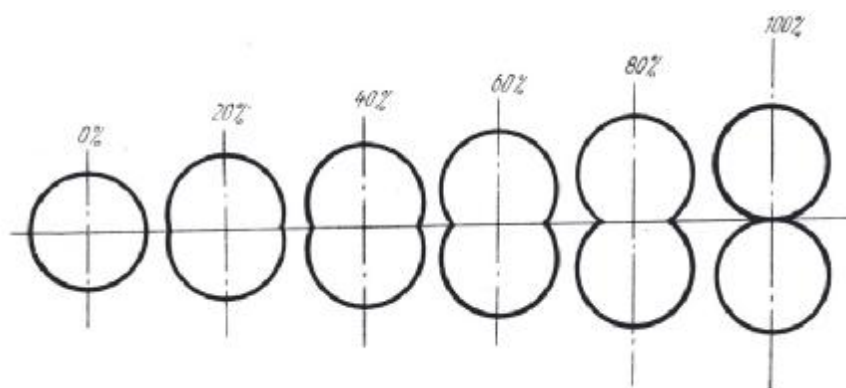


Рис. 55. Зависимость формы «розы пересечений» от различной степени ориентации. С. А. Салтыков (1970).

Для построения «розы пересечений» пространственно анизотропных систем необходимо изготовить срезы в двух взаимно перпендикулярных направлениях и построить плоскостные «розы пересечения» описанным выше способом. По полученным двум «розам пересечений» производят построение «розы пространства». Однако этот прием дает сравнительно мало дополнительной информации о состоянии биологического объекта и поэтому имеет ограниченное применение.