

А.А. Миронов (мл.), Г.В. Безнусенко, И.С. Сесорова* и В.В. Банин

КАК ИЗМЕРЯТЬ СТРУКТУРЫ ИЛИ НОВАЯ СТЕРЕОЛОГИЯ: III. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ СТЕРЕОЛОГИЯ

Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. Е.А. Конкина) Ивановской государственной медицинской академии, отдел морфологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. В.В. Банин) Российского государственного медицинского университета, Москва; кафедра биологии и экологии (зав. — проф. В.Г. Шевчук) Шуйского государственного педагогического университета

В статье описаны современные стереологические подходы и методы для измерения субклеточных структур. Эти инструменты позволяют определять средние и объем-пропорциональные параметры ультраструктур и зачастую не требуют предварительного применения диссектора для отбора изображений. Продемонстрирован пример модификации ротатора для точечного подсчета, который значительно ускоряет морфометрическую процедуру.

Ключевые слова: стереология, морфология, электронная микроскопия.

В первой и второй частях нашего обзора были рассмотрены подходы к отбору и ориентации образцов [1], а также приведены основные стереологические методы определения абсолютных размеров объектов для практических целей световой микроскопии [2]. Третья, заключительная, часть обзора посвящена применению методов новой стереологии в электронной микроскопии. Так же, как и предыдущие, эта часть вряд ли может служить детальным методическим руководством, однако, по нашему мнению, она дает достаточное представление о современных стереологических подходах.

Применение стандартных морфометрических сеток в электронной микроскопии позволяет устанавливать такие параметры, как объемная, поверхностная (рис. 1) и линейная плотности. Однако в этом случае для определения абсолютных размеров необходимо дополнительно измерять объем референтной структуры, по отношению к которой были определены плотности [9]. Например, для определения объема ядра необходимо знать абсолютный средний объем клетки (см. рис. 1). Кроме того, определенные таким образом плотности будут отражать параметры больших частиц в ущерб меньшим, так как первые имеют большую вероятность попасть в срез, чем вторые. Для нейтрализации этого эффекта требуется применение диссектора [2]. Диссектор же, в случае работы с электронно-микроскопическими фотографиями, требует скрупулезного сравнения двух серийных срезов. Такие дополнительные подсчеты и процедуры зачастую значительно увеличивают трудоемкость морфометрического исследования.

Достаточно простое определение площади поверхности на единичных срезах было предложено L.M.Karlsson и L.M.Cruz-Orive [7]. В этом случае используются последовательно две простые процедуры: сначала классический метод определения поверхностной плотности S/V (см. рис. 1), а затем метод определения поверхностно-пропорционального объема V_s , использующего гранично-ассоциированные от-

резки (boundary-sampled intercepts) [4]. Затем площадь поверхности определяется по формуле:

$$S_v = S/V \times V_s, \quad (1)$$

где S_v — объемно-пропорциональная площадь, S/V — поверхностная плотность, V_s — поверхностно-пропорциональный объем.

Практически это выглядит так. На изотропном однородном случайном (ИОС) срезе [1] определяется поверхностная плотность с помощью сетки с точками и линиями, где подсчитываются количество точек на структурах и количество пересечений тестовых линий с границами структур. Отношение этих параметров (см. подпись к рис.1) дает поверхностную плотность структур. Следующим этапом является определение поверхностно-пропорционального объема. Для этого используется циклоидная сетка (сохраняющая изотропность измерения в случае гранично-ассоциированных отрезков) с обозначением малой оси циклоид (рис. 2). Сетка накладывается на срез, отмечаются точки пересечения циклоид с границами структур. Затем из этих точек проводятся хорды, параллельные малой оси циклоид, до пересечения с противоположной границей структуры. Такие граничные отрезки измеряются и подставляются в формулу:

$$V_s = \frac{2\pi}{3} \times \bar{l}^3, \quad (2)$$

где V_s — поверхностно-пропорциональный объем, $\bar{l}^3$ — среднее кубов длин гранично-ассоциированных отрезков.

Характерно, что площадь поверхности, определенная таким образом, является объемно-пропорциональным параметром [7], т. е. большие частицы вносят больший вклад соответственно своему объему по причине большей вероятности попадания в единичный срез. Поэтому для подсчета количественно-пропорциональной площади (средней абсолютной площади частиц) необходимо применение диссектора на 1-м этапе отбора структур.

Одним из решений подобного рода проблем явилась разработка так называемых локальных стереоло-

*E-mail: irina-s@yandex.ru

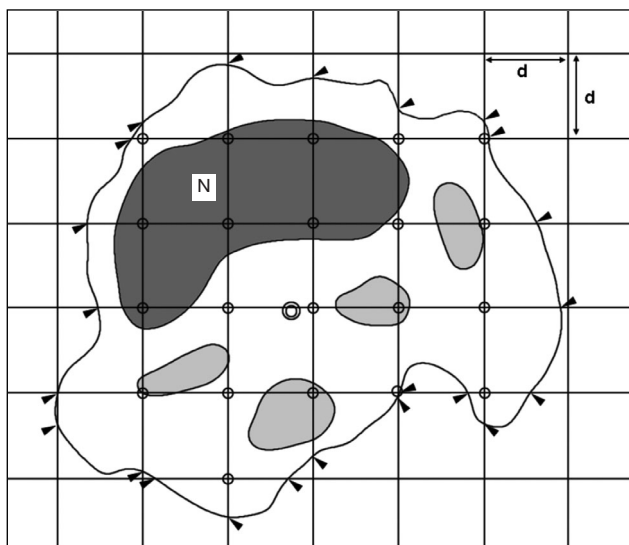


Рис. 1. Определение объемной и поверхностной плотностей структур.

Морфометрическая сетка накладывается на изотропный однородный случайный (ИОС) срез [1]. N — ядро. Кругами отмечены тест-точки, попавшие на срез клетки; стрелки — места пересечения тест-линий с плазмолеммой; d — расстояние между двумя тест-точками сетки. Если пересечение с границами структуры определяется и по вертикали, и по горизонтали, то каждой тест-точке будут соответствовать 2 длины (d) тест-линий. Объемная плотность равна отношению количества точек на интересующей структуре к количеству точек на референтной структуре. В данном случае на клетку в целом приходится 21 точка, на ядро — 6 точек. Следовательно, объемная плотность ядра по отношению ко всей клетке будет 0,286, это означает, что ядро занимает 28,6% объема всей клетки. Поверхностная плотность определяется отношением количества пересечений тест-линий с границей структуры к количеству точек на референтной структуре. Поверхностная плотность рассчитывается по формуле:

$$S/v = \frac{2l}{L} = \frac{2l}{P \times l(p)},$$

где S/v — общая длина тест-линий в референтном объеме, P — количество точек, попадающих на структуру, l(p) — длина тест-линии, приходящаяся на одну тест-точку. В данном случае тест-линии пересекают плазмолемму 23 раза, на клетку приходится 21 тест-точка. Так как мы считали в вертикальном и горизонтальном направлении, то $l(p) = 2d$. Если мы примем l(p), равной 1 мкм, то S/v плазмолеммы будет равна:

$$\frac{2 \times 23}{21 \times 2d} = 1,095d = 1,095 \text{ мкм}^{-1}.$$

Поверхностная плотность $1,095 \text{ мкм}^{-1}$ означает, что на 1 мкм^3 объема клетки приходится $1,095 \text{ мкм}^2$ поверхности.

гических методов, использующих уникальные, а не случайные точки, которые постоянно связаны с измеряемыми структурами и могут находиться как внутри, так и вне структур. Например, точкой могут служить клеточные органеллы, такие как ядрышко. В идеальном случае желательно, чтобы размеры «точечной» структуры не коррелировали с подсчитываемыми параметрами. Примерами локальных процедур являются нуклеатор, ротатор и сурфактор, позволяющие использовать для определения объема единичные (не серийные) срезы неизвестной толщины [2]. В случае световой микроскопии можно пренебречь вариабельностью размеров ядрышка, которое используется как уникальная ассоциированная точка внутри клеток. Однако в электронной микроскопии при морфометрической обработке ультраструктур ва-

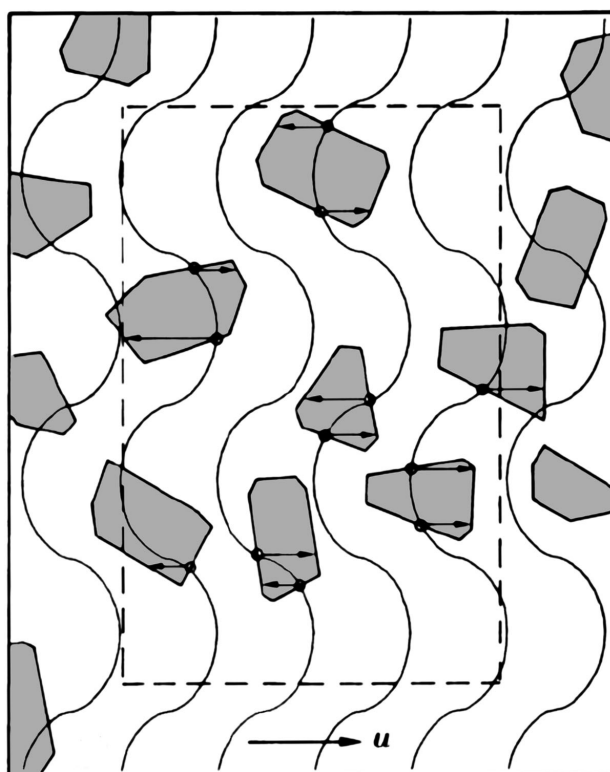


Рис. 2. Метод определения поверхностно-пропорционального объема с помощью гранично-ассоциированных отрезков.

Тест-система из циклоидных тест-линий накладывается на срез. Из мест пересечения тест-линий с границами структур проводятся хорды, параллельные короткой оси циклоид (u). Объем высчитывается с помощью формулы (2) в тексте. Подсчет структур только внутри рамки, очерченной штриховой линией, позволяет избежать краевых искажений.

риабельность размеров ядрышка может повлиять на результаты подсчетов непредвиденным образом, так как неизвестна степень корреляции между размерами ядрышка и органелл при различных функциональных состояниях клеток.

Для решения «проблемы ядрышка» было предложено использовать центриоли в качестве уникальной ассоциированной точки для локальных стереологических процедур в животных клетках [8]. Срезы, проходящие через центриоли, позволяют отобрать клетки независимо от их объема, так как центриоли имеют одинаковые размеры в животных клетках. Таким образом, срезы, проходящие через центриоли, являются, по сути, дисектором с использованием лишь одного среза для определения размеров локальными методами. При этом, использоваться могут как вертикальные однородные случайные срезы, так и ИОС-срезы [1], причем наиболее легким решением является произвольный выбор вертикальной оси среза и дальнейшее применение вертикального ротатора [6]. Авторами также была предложена дискретная модификация вертикального ротатора, где вместо измерения длин и возведения их в квадрат используется подсчет точек в разных классах (рис. 3), что значительно ускоряет процедуру подсчета. В этом случае используются две сетки: первая — для определения классов дистанции от центральной оси, проходящей через центриоль, вторая — стандартная сетка с точ-

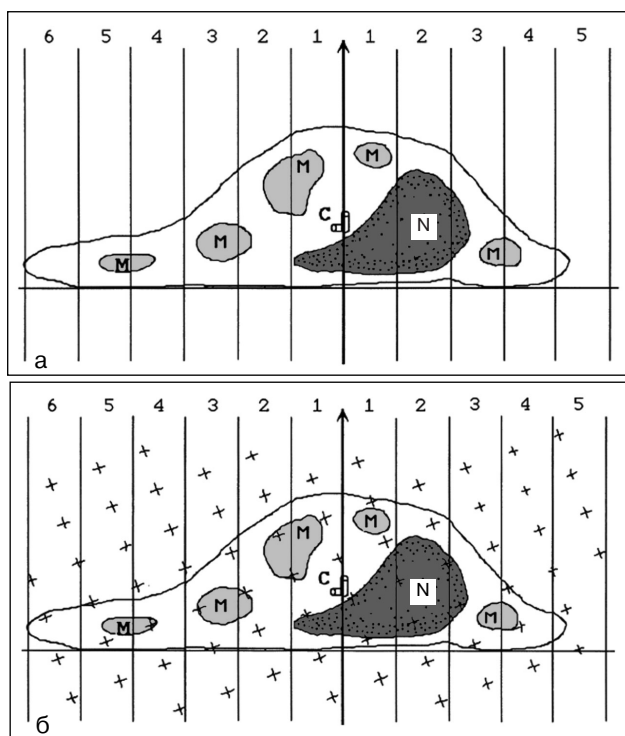


Рис. 3. Дискретный вертикальный ротатор.

Используются вертикальные однородные случайные срезы, проходящие через центриоль (С).

а — накладывается первая сетка с центральной осью (стрелка), которая должна проходить через центриоль, и классами расстояний от оси (1–6); б — при наложении второй сетки тест-точки, попавшие на интересующие структуры (М), распределяются соответственно классам расстояний. Подсчет объема ведется по формуле (3) в тексте. N — ядро клетки.

ками для подсчета объемной плотности. Объем структур подсчитывается по формуле:

$$V = \frac{\pi}{n} \times a_p \times \sum_{i=1}^n P_i \cdot D_i, \quad (3)$$

где a_p — площадь, приходящаяся на точку, P_i — сумма точек, попавших на структуру в определенном классе, D_i — расстояние от середины класса до вертикальной оси, n — количество измерений.

Для подсчета площади поверхности ультраструктур на ИОС-срезах вполне можно применять сурфактор [5], который является генерализацией частного случая для сферы, площадь поверхности которой, как известно, равна $S = 4\pi r^2$, где r — радиус сферы. Дополнительным требованием для подсчета площади поверхности на двухмерных срезах является определение функции $c(\beta)$, где β является острым углом между лучом из уникальной ассоциированной точки и касательной к поверхности структуры в месте ее пересечения с этим лучом. Площадь в общем случае высчитывается по следующим формулам:

$$S = 4\pi \times \bar{l}^2 \times \bar{c}(\beta), \quad c(\beta) = 1 + \left(\frac{\pi}{2} - \beta\right) \times \operatorname{ctg} \beta, \quad (4)$$

где S — площадь поверхности, l — длина луча от уникальной ассоциированной со структурой точки до границы структуры, β — острый угол между лучом и касательной к границе структуры в точке пересечения с лучом.

Очевидно, что при угле $\beta = \pi/2$ функция $c(\beta)$ будет равна единице и формула приобретает вид для сферы. Непосредственное измерение углов для функции $c(\beta)$,

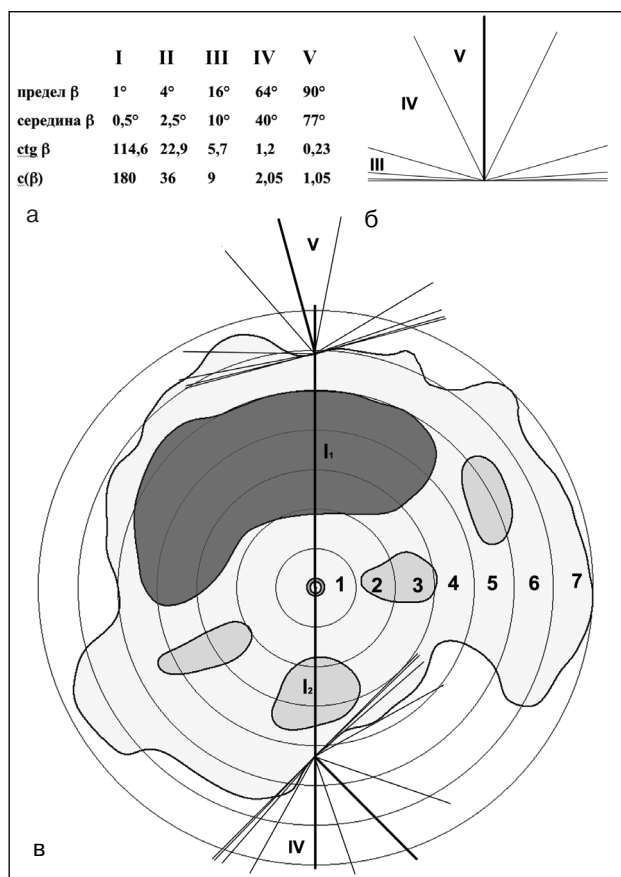


Рис. 4. Практическое применение сурфактора.

Измерение углов в процедуре сурфактора эффективнее осуществлять при помощи транспортира с котангенс-пропорциональными классами, к которым уже рассчитана функция $c(\beta)$. В таблице (а) представлен расчет такого транспортира с пятью классами (б). Римскими цифрами обозначены лишь три последние класса (III, IV и V), так как первые 2 слишком малы. Процедура сурфактора заключается в следующем. Сетка с круговыми классами используется для более быстрого определения квадратов расстояния от центральной точки до пересечения с границей структуры. Квадраты расстояний подсчитываются заранее и заносятся в таблицу, подобно расчетам для транспортира. Далее в местах пересечения при помощи транспортира определяется угол β . Данные заносятся в таблицу и ведется расчет по формуле (4) в тексте. В данном случае, если мы примем ширину класса в 2 мкм и используем два луча (l_1 и l_2), то пересечения лучей с плазмолеммой попадают в 6-й и 5-й класс длины и V и IV классы углов, соответственно. Площадь поверхности будет равна: $4\pi \times (11^2 \times 1,05 + 9^2 \times 2,05) / 2 = 12,57 \times 146,56 = 1842,26$ мкм².

измерение длин и возведение их в квадрат может потребовать значительного времени, поэтому разумнее разбить пространство измерения на кольцевые дистанционные классы и использовать для измерения углов транспортир с классами, пропорциональными котангенсу угла β (рис. 4). Подсчитанные значения заносятся в таблицу, отражающую средние квадраты длин, функцию $c(\beta)$ и частоту попадания структур в классы и довольно легко подсчитываются по приведенной выше формуле. Очевидно, что при значениях угла β , близких к 0, варибельность метода резко увеличивается, что снижает эффективность исследования.

Сравнительно недавним развитием метода селектора и точно-ассоциированных отрезков является метод определения площади поверхности и объема, предложенный известным стереологом L.M.Cruz-Orive [3]. Проце-

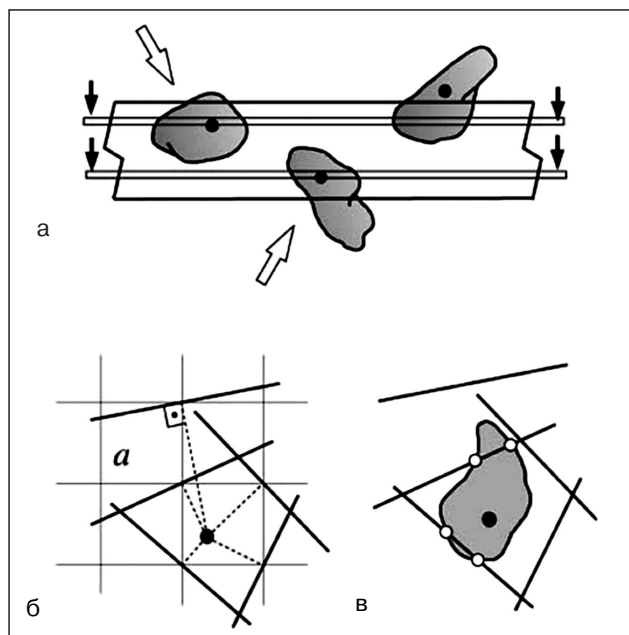


Рис. 5. Метод определения площади и объема точно-ассоциированными отрезками.

а — после изготовления изотропных однородных случайных срезов (стрелки) отбираются частицы (клетки), у которых уникальная ассоциированная точка (ядрышко, центриоль) присутствует на срезе (светлые стрелки); б — далее накладывается вторая сетка и строятся тест-линии, перпендикулярные лучам, проходящим от уникальной точки до тест-точек второй сетки; в — подсчитывается число пересечений тест-линий с границами структур для определения площади поверхности или измеряется длина отрезков тест-линий, находящихся внутри изучаемых структур, для определения объема. Расчеты ведутся по формуле (5) в тексте.

дура предполагает использование исключительно ИОС-срезов и два этапа измерения. Сначала на ИОС-срезах отбираются частицы, ассоциированные с уникальной фиксированной точкой (при определении количественно-пропорциональных параметров), или же точки, расположенные в частицах случайно-систематическим образом (при определении объемно-пропорциональных параметров). Затем накладывается вторая сетка с однородными точками, и из точек первого этапа, расположенных на структурах, проводятся отрезки к ближайшим точкам второго этапа. К этим отрезкам строятся перпендикулярные линии и отмечаются места пересечения этих линий с границами измеряемых структур (рис. 5). Далее площадь поверхности структур определяется, исходя из количества пересечений перпендикулярных линий с границами, а объем — исходя из длины отрезков перпендикулярных линий, попавших внутрь структур:

$$S = 2a \times I, V = a \times L, (5)$$

где S — площадь поверхности, V — объем, a — площадь, приходящаяся на одну тест-точку, L — длина отрезков внутри структур, I — количество пересечений с границей структуры.

Этот метод не требует непосредственного измерения углов и возведения дистанций в квадрат (как в сурфакторе) или в куб (как в нуклеаторе). Он позволяет в отличие от нуклеатора, ротатора и сурфактора непосредственное определение сразу двух параметров: площади и объема. Также он позволяет определять на одном срезе как количественно-пропорциональные, так и объемно-пропорциональные параметры, для чего необходимо изменить лишь первый этап метода.

Таким образом, мы рассмотрели несколько наиболее интересных методов подсчета площади поверхности и объема структур, которые имеют хорошие перспективы для применения в сфере электронной микроскопии. Они позволяют определять как количественно-, так и объемно-пропорциональные параметры, и в большинстве своем основаны на подсчете точек или пересечений, и, следовательно, значительно ускоряют не очень увлекательную и монотонную работу по морфометрической оценке. Стереологические методы в настоящее время активно развиваются и приобретают все большую популярность. Можно не сомневаться, что мы будем свидетелями еще множества новых эффективных разработок в этой сфере знания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безнусенко Г.В., Сесорова И.С. и Миронов А.А. (мл.). Как измерять структуры или новая стереология: I. Способы отбора и ориентации образцов. *Морфология*, 2005, т. 128, вып. 5, с. 72–75.
2. Безнусенко Г.В., Сесорова И.С., Миронов А.А. (мл.) и Банин В.В. Как измерять структуры или новая стереология: II. Методы определения абсолютных размеров клеточных структур при световой микроскопии. *Морфология*, 2005, т. 128, вып. 6, с. 63–66.
3. Cruz-Orive L.M. A new stereological principle for test lines in three-dimensional space. *J. Microsc.*, 2005, v. 219, p. 18–28.
4. Gittes F. Estimating mean particle volume and number from random sections by sampling profile boundaries. *J. Microsc.*, 1990, v. 158, p. 1–18.
5. Jensen E.B. and Gundersen H.J. Stereological estimation of surface area of arbitrary particles. *Acta Stereol.*, 1987, v. 137, p. 25–30.
6. Jensen E.B. and Gundersen H.J. The rotator. *J. Microsc.*, 1993, v. 170, p. 35–44.
7. Karlsson L.M. and Cruz-Orive L.M. Estimation of mean particle size from single sections. *J. Microsc.*, 1997, v. 186, p. 121–132.
8. Mironov A.A. Jr. and Mironov A.A. Estimation of subcellular organelle volume from ultrathin sections through centrioles with a discretized version of the vertical rotator. *J. Microsc.*, 1998, v. 192, p. 29–36.
9. Weibel E.R. Stereological methods. Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry. London, Academic Press, 1979.

Поступила в редакцию 22.12.2005 г.

HOW TO MEASURE STRUCTURES, OR NEW STEREOLOGY: III. STEREOLOGY IN ELECTRON MICROSCOPY

A.A. Mironov Jr., G.V. Beznusenko, I.S. Sesorova and V.V. Banin

This review describes modern stereological approaches and methods for estimation of subcellular structures dimensions. These estimators could be used for determination of number- and volume-weighted parameters of particle size. Very often they do not require the application of the disector at the first stage of sampling of images. Additionally, the modified version of the rotator for point counting is demonstrated, which significantly accelerates the morphometric procedure.

Key words: stereology, morphology, electron microscopy.

Department of Pathology, Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Department of Morphology, Russian State Medical University, Moscow,

Department of Biology and Ecology, Shuya State Pedagogical University.