



Проблем осветљења препарата при светлосном микроскопирању у медицинској хистологији

¹Илић Д Вељко,² Радослава Савић Радовановић,³ Павле Д Илић,⁴ Драган В Илић

¹Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, orcid: 0000-0001-8110-148

²Факултет ветеринарске медицине, orcid:0000-0002-2419-5936

³Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду,

E mail dr.ilicb@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.46793/Osvetljenje25.69I>

Кратак садржај

Проблем адекватног осветљења хистолошког препарата при микроскопирању може се посматрати из два угла, у односу на сам објекат посматрања и према самој апаратури за микроскопирање. Основни циљ микроскопије је да се претходно адекватно припремљен препарат може посматрати уз примену одговарајућих светлосних параметара. Уколико ови услови нису задовољени само уочавање детаља посматраног објекта биће немогуће или непрецизно тј. нетачно интерпретирано.

Без обзира на комодитет микроскопирајуће опреме односно ниво искуства и вештина корисника, грешке при читавању треба тражити у лошем припремању препарата или у техничким ставкама. Ове друге подразумевају неадекватно осветљење, примену неадекватних филтера као и у самој микроскопској оптици микроскопа.

Најчешће се примењују видљива светлост, УВ светлост и ЛЕД осветљење. „MUSE“ микроскопија (Microscopy Ultra high Speed and Efficiency) је данас најприхватљивије решење јер користи камеру у боји уз опаску да је још увек тешко добити квалитетну слику са таласном дужином испод 270 nm (Pathology News, „MUSE microscopy using UV light to make histology rapid and slide-free“). ЛЕД систем такође има ограничење у смислу позиционирања и доступности погодне таласне дужине што остаје отворен задатак пред стручњацима оптичке физике.

Проблем осветљења препарата при светлосном микроскопирању у медицинској хистологији

Основни циљ микроскопије је да се претходно адекватно припремљен препарат може посматрати уз примену одговарајућих светлосних параметара. Уколико ови услови нису задовољени само уочавање детаља посматраног објекта биће немогуће или непрецизно тј. нетачно интерпретирано.

Проблем адекватног осветљења хистолошког препарата при микроскопирању може се посматрати из два угла, у односу на сам *објекат посматрања* и према самој *апаратури* за микроскопирање.



Анализујући *објекат посматрања* тј. микроскопирања, његова дебљина односно молекулска густина у директној је сразмери са јасноћом слике која се види у микроскопском пољу, односно дигитално, на екрану. Софтверске алатке могу донекле помоћи у резолуцији добијене слике мада је ипак густина препарата пресудна за добијању жељене, високо резолутне слике. При том, откривање ситних детаља на микроскопској слици, нарочито где објекат није хомоген. Такви су углавном хумани препарати који се обрађују у дијагностичкој медицини, нарочито онколошкој, где непримећени детаљи битно могу утицати на доношење исправне дијагнозе од чега зависи следствена терапија и исход лечења.

Анализујући *апаратуру* за микроскопирање примећује се да без обзира на комодитет микроскопирајуће опреме односно ниво искуства и вештину корисника, грешке при читавању треба такође тражити у лошем припремању препарата или у техничким ставкама. Примењене хистолошке течне боје за бојење микроскопских препарата различитих су физикохемијских карактеристика (транслуценција, рефлексја, рефракција итд.) што може дати различит утисак о посматраном препарату нарочито ако се упоређују они од истог супстрата али различите дебљине. Улагање објекта посматрања је најчешће у парафински медијум специфичног индекса преламања који је најчешће константан па код посматрања већег броја истог супстрата (ткива) не утиче битно на добијену микроскопску слику - микрофотографију. Други параметри који могу да ометају квалитет осветљеног објекта би били неадекватно осветљење, примена неадекватних филтера а такође и сама оптичка конструкција микроскопа ¹ („A Lavanya et al.“).

Код микроскопирања се најчешће примењују: 1. *Видљива светлост*, 2. *УВ светлост* и 3. *ЛЕД осветљење*.

1. МУСЕ микроскопија са коришћењем видљивог спектра („Microscopy Ultra high Speed and Efficiency“) је данас најприхватљивије решење јер користи камеру у боји уз опаску да је још увек тешко добити квалитетну слику са таласном дужином испод 270 nm ².
2. МУСЕ техника која користи УВ спектар чини микроскопирање хистолошког препарата брзим и без потребе прављења адекватног исечка (слајда). Ограничење такође настаје због немогућности добијених пресека са прецизно стандардизованим процесом припреме и позиционирања објекта на постољу за микроскопирање. Покровно стакалце не утиче на светлосне параметре при микроскопирању јер је стандардне дебљине и увек истоветног хомогеног стакластог састава. За ову технику микроскопије, првоописану од стране Ферудинија и Ставроса 2015 године ², није потребно правити класичан препарат, а слика се формира релативно брзо. Предност МУСЕ микроскопије над светлосном потврђују и аутори из Калифорније ³
3. ЛЕД техника микроскопирања користи светлосно емитујуће диоде за просветљавање нудећи дуготрајни, енергоефикасни и стабилни извор светлости како за стандардне тако и за напредне технике као што је флуоресцентна микроскопија и



компјутеризовано фазно приказивање ⁴. Питање просветљавања остаје отворено јер се још увек не може обезбедити оптимум контраста, а истовремено висока резолуција слике са равномерно осветљеним објектом посматрања ⁵. ЛЕД систем микроскопирања такође има ограничење у смислу позиционирања и доступности погодне таласне дужине што остаје отворен задатак пред стручњацима оптичке физике.

Литература

1. Lavanya A. et al. Troubleshooters in light microscopy. World Journ of Dentistry. November– Decem 2017,8,6, 511 – 8.
2. Fereidouni F, Datta Mitra A, Demos S, Levenson R. Microscopy with UV surface excitation MUSE for slide-free histology and pathology imaging . Pathology News, Opt Biopsy XIII Towar Real Time Spetrosc Imaging Diagnosis. 2015.
3. Univ of California - Davis Health system. Microscope using UV instead of visible light emerging as diagnostic tool. [www.sciencedaily.com/ releases/2017/1712041](http://www.sciencedaily.com/releases/2017/1712041) Accessed February 17, 2021.
4. World Health Organization, Fluorescence light emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis Policy Statement. Geneva, 2011.
5. Yu C. et al. Rapid autofocus method based on LED oblique illumination for metaphase chromosome microscopy imaging system. Photonics 2024, 11, 11, 1091.

