

ИЗУЧАЕМ МИКРОСКОП. МОРФОМЕТРИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЕ

HEATHER ALE

<http://ihc.ucoz.ru/>

*«Из вереска напиток
Забыт давным-давно,
А был он слаще меда,
Пьянее, чем вино»
Р. Л. Стивенсон
пер. С.Я. Маршака*

Часть 1.

В практической работе нередко возникает необходимость измерить с помощью микроскопа объекты, размеры которых меньше одного миллиметра. Прежде всего это необходимо для определения стадии некоторых опухолей по системе TNM, для измерения толщины меланом по Breslow (почти всегда в стадиях от pT1 до pT4), для разграничения между микрометастазом pN1mi (от 0,2 до 2 мм) и метастазом pN1(метастаз в 1-3 л/у) в лимфатических узлах при раке молочной железы и по тому же органу между pT1a (фокусы инвазии от 1 до 5мм) и микроинвазией pT1mic (фокусы инвазии до 1 мм) и т.д.

Один из способов измерений - с помощью шкалы предметного столика микроскопа, управляемой препаратоводителем не позволяет оценивать размеры объектов менее одного миллиметра. Точность этого метода - плюс-минус 1 мм. Многие делают подобные измерения с помощью цифровых технологий, но для этого необходимо наличие цифровой камеры приличного качества, компьютера и затраты определенного количества времени, чтобы провести необходимые расчеты с использованием тех или иных вспомогательных программ.

Есть еще один метод, который совершенно незаслуженно забыт. Он производится с помощью достаточно «старого» приспособления, известного под названием «окулярная сетка».



Рис. 1. Окулярная сетка.

Этот метод почему то мало популярен среди патологоанатомов в России, трудно сказать почему. Методика измерений совсем не сложна, нужно только знать несколько базовых

принципов расчетов. Доводилось встречать специалистов, имеющих в наличии окулярную сетку, но не умеющих ею правильно пользоваться. Может быть поэтому, производство этого незамысловатого приспособления в последнее время переживает свой закат и сворачивается, сокращается количество его модификаций, а в продаже еще есть лишь у некоторых брендов. Привожу ссылки, без всякой корысти для себя, просто для информации.

Carl Zeiss называет их **Crossline micrometer**: -

<https://www.micro-shop.zeiss.com/index.php?s=16317bbf524&l=en&p=us&f=a&i=40000001950&o=&h=25&n=0>

POG Präzisionsoptik Gera GmbH продает под названием **Eyepiece Micrometer**: -

http://www.pog.eu/en/products_ms_03.html

Leica именует их **Graticule**:

<http://www.leica-microsystems.ru/website/products.nsf?opendatabase&language=russian>

Важно знать диаметр окуляров своего микроскопа, чтобы подобрать соответствующую по размеру окулярную сетку, которую несложно поставить самому или воспользоваться услугой специалистов сервиса. Самому это делать нужно с большой осторожностью, в перчатках, лучше резиновых, избегая попадания в оптическую систему пыли и др. мелких частиц.



Рис. 2. Установка окулярной сетки в окуляр.

Окуляр, в который вставляется это плоское градуированное стекло должен иметь возможность диоптрийной коррекции. Есть разные виды окулярных сеток, с разным количеством делений шкалы, с перекрещивающимися линиями (это удобно) и без них, с квадратами для измерения площади и т.д. Георгий Герасимович Автандилов в свое время щедро делился своими сетками (отснятыми на фото пленку), правда с их помощью получить подходящий результат мне лично не удалось. Более удобными представляются стеклянные сетки с перекрестьем и с цифровыми обозначениями – можно пометить мелкий объект для показа в окуляры коллегам и проще считать деления. Для сомневающихся в том, что окулярная сетка будет отвлекать и мешать при рутинной работе, не требующей ее использования, поделюсь своим впечатлением – в таких случаях ее просто не замечаешь.

Окулярная сетка это лишь полдела в морфометрии оптической системой микроскопа. Важно рассчитать цену деления шкалы окулярной сетки для каждого объектива.

Для этого необходим эталон длины, которым является так называемый «объект – микрометр». Он нужен только один раз, поэтому его можно взять у кого-нибудь в аренду.



Рис. 3. Объект-микрометр. Стрелкой указана «линейка».

Это приспособление можно найти в продаже, среди них есть и продукция отечественного производства.

http://www.pog.eu/en/products_ms_08.html

<http://www.zaobior.ru/p124.htm>

http://www.omsketalon.ru/?action=om_o_om_p& - нужен ОМ-П (для проходящего света).

Мне удалось купить данное устройство 1954 г. выпуска за 150 руб. на интернет - аукционе.

Во всех случаях на объект-микрометре указана строгая величина, указывающая цену деления шкалы, как правило, это один миллиметр в виде линейки, разделенной на 100 частей (одно деление соответствует 0,01 мм, или 10мк – указывается в сертификате, паспорте и на поверхности изделия).

После того как установлена окулярная сетка с помощью объекта – микрометра рассчитывается цена деления шкалы «m» окулярной сетки для каждого объектива (этот процесс именуется

калибровка) индивидуально по формуле: $m = \frac{a \cdot c}{b}$,

где a - отсчитанное число делений по шкале объект микрометра; b- соответствующее им число делений шкалы окулярной сетки; c- величина одного деления объект микрометра. [2,3].

Для микроскопа Leica DMLS, с окулярами диаметром поля 25 и 10 × кратным увеличением получаем следующую таблицу для каждого штатного (необходимо калибровать индивидуально!) объектива.

Для повышения точности измерений следует использовать только центральный отдел поля зрения и несколько раз перевести взор в направлении, перпендикулярном к черточкам делений.

При этом черточки деления объект-микрометра не должны обнаруживать видимого смещения относительно друг друга

Таблица 1. Цена деления окулярной сетки микроскопа Leica DMLS (после калибровки) с объективами, входящими в комплект и окулярами 10×/25.

Значение одного деления шкалы окулярного микрометра при разных объективах:	
2,5× = 0,04	мм
10 × = 0,01	мм=10мк
20 × = 0,005	мм=5мк
40 × = 0,0025	мм=2,5 мк
100× = 0,001	мм=1мк

Некоторые единицы микроизмерений.

1 микрометр=1микрометр (мк,μ)= 10^{-6} м=0,000001м.

1 миллиметр=1/1000м= 10^{-3} м=0,001м

1 миллимикрон=1 нанометр= 10^{-9} м=0,000000001м

Окуляр легко вращается вокруг оси, что позволяет в совокупности с перемещением микропрепарата при помощи предметного столика точно позиционировать объект для измерения.

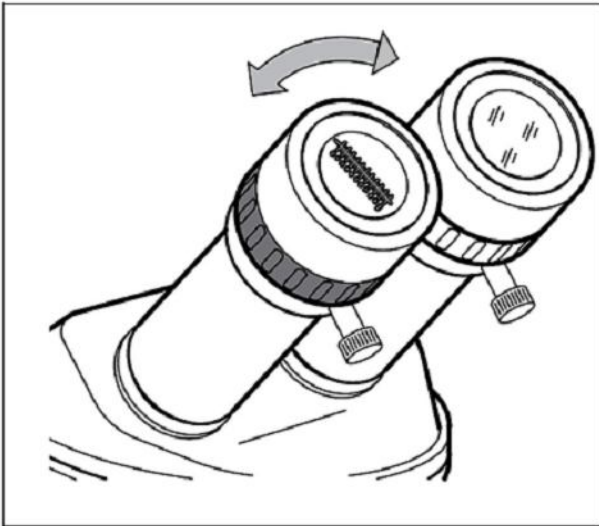


Рис. 4. Измерения с помощью окулярного микрометра

Дальнейшие расчеты проводятся по формуле: $x = a \times b$, где x – длина измеренного объекта, a – количество делений шкалы окулярной сетки, b – цена деления окулярной сетки с объективом, используемым для измерения.

Упомянутый метод измерения позволяет измерять объекты с точностью до 0,5 мк. Собственный опыт показывает, что при помощи окулярной сетки можно решить большинство возникающих в практической работе вопросов по морфометрии. Сейчас мне даже трудно представить, как без нее можно было обходиться раньше. Сферу ее применения можно расширить, используя сетку для оценки степени злокачественности светлоклеточного рака почки по Fuhrman, где необходимо измерение максимального диаметра ядер опухолевых клеток. Кроме измерений длины можно измерять площадь срезов или определенных участков для этого есть соответствующие сетки, подходящие скорее для научного применения.

Пример измерения. Толщина меланомы по Breslow составляет 70 делений шкалы окулярной сетки с объективом «40×»: $70 \times 0,0025 = 0,175$ мм (Рис.5 - мобилография: снято камерой мобильного телефона через окуляр).

По системе TNM это может соответствовать при отсутствии изъязвления стадии pT1a и клинической стадии IA (pT1aN0M0). Толщину опухоли измерить при помощи шкалы предметного столика нельзя, так как величина эта меньше миллиметра.

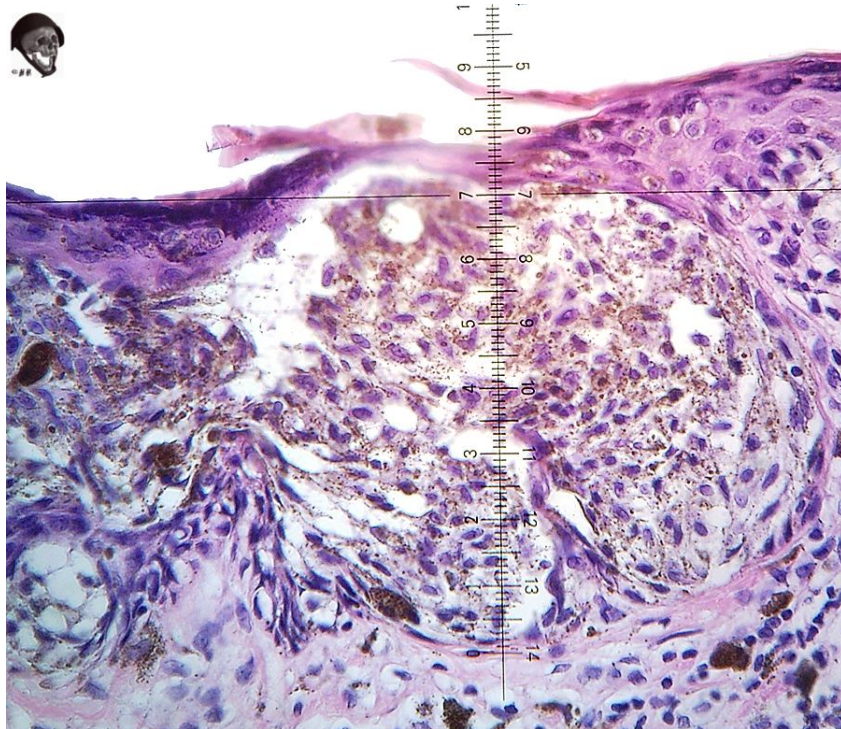


Рис.5. Толщина меланомы. Г/э, об.40×, окуляр 10×

Впрочем, этот случай имеет нюанс – в 5 мм от основного узла был обнаружен сателлит, в наибольшем измерении до 0,26 мм (106 делений шкалы×0,0025 – рис.6).

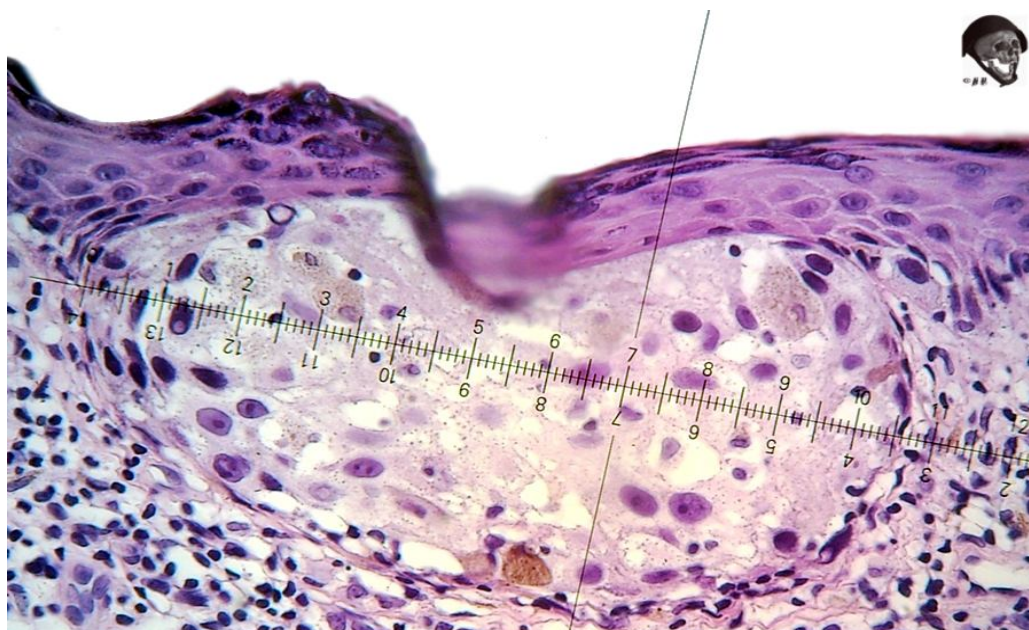


Рис. 6. Сателлит. Г/э, об.40×, окуляр 10×

С учетом обнаружения сателлита этот случай расценивается иначе, он соответствует pT1aN2c и клинической стадии IIIВ.

P.S. Hommage à G.G.Avtandilov et A.I. Khrantsov.

Во французском языке есть такое слово «hommage» - одно из значений которого означает «почтение», «дань уважения». С этой французской ноткой хотел бы завершить первую часть, упомянув имена своих коллег. У первого автора я нашел ответ на многие свои вопросы, второй побудил меня изучить тему на одной из веток форума сайта.

Часть 2.

Еще одним «забытым» параметром в морфометрии является диаметр поля зрения объектива. Эту величину необходимо знать, например, для правильной оценки количества митозов при оценке степени злокачественности рака молочной железы - Elston/Nottingham modification of Bloom-Richardson system [4].

Таблица 2. Определение баллов по количеству митозов с некоторыми объективами.

Количество митозов с различными объективами				
С увеличением 25× и полем зрения Ø 0,59мм Leitz или Ortholux	С увеличением 40× и полем зрения Ø 0,44мм Nikon или Labophot	С увеличением 40× и полем зрения Ø 0,63мм Leitz или Diaplan	С увеличением 40× и полем зрения Ø 0,62мм Leica, Carl Zeiss	Баллы
0-9	0-5	0-11	≥10	1
10-19	6-10	12-22	11-21	2
≥20	≥11	≥23	≥22	3

Для каждого микроскопа это рассчитывается индивидуально [3], на микроскопе и в его паспорте эти данные не указываются. Диаметр поля зрения каждого объектива определяется исходя из следующих параметров: диаметра поля зрения окуляра (рис.7 А), увеличения объектива (рис.7В) и коэффициента увеличения тубуса (рис.7С). Увеличение тубуса, окуляра и объектива указывается на микроскопе и в паспортных данных.

Значение (диаметр) окулярного поля зрения в миллиметрах делится на увеличение объектива, в результате получается действительный диаметр наблюдаемого объектного поля зрения. При коэффициенте увеличения тубуса «1×», окулярах «25» и объективе «40×», например, поле зрения объектива будет составлять $25:40:1=0,625$ мм (диаметр). Если тубусный фактор отличен от единицы, например «1,5×» - поле зрения объектива должно быть рассчитано следующим образом $25:40:1,5=0,41$ (диаметр поля зрения объектива).

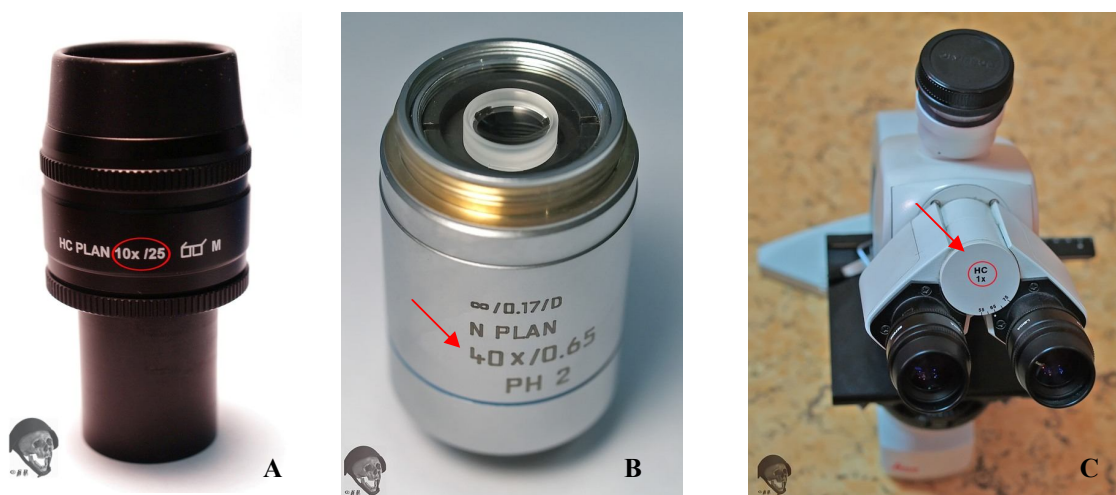


Рис.7. А. На окуляре указано увеличение «10×» и диаметр его поля зрения – «25», «М» - возможность диоптрийной коррекции.

В. Обозначения на объективе: «∞» - объектив для длины тубуса «бесконечность»; «0,17» - объектив можно использовать только с покровным стеклом толщиной 0,17; «N PLAN»- планохромат; «40×»-увеличение объектива, «0,65» - апертура. «PH»- фазово-контрастный объектив.

С. Тубус с обозначением коэффициента увеличения

Приведенные данные являются прописными истинами, которые не должны находиться в забвении, как это часто случается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leica. Measuring – User Manual. - [http://www.leica-microsystems.ru/pdfs.nsf/\(ALLIDs\)/2D48969499921699C12570B3004F0D84/\\$FILE/Leica_Measuring_Manual_EN.pdf](http://www.leica-microsystems.ru/pdfs.nsf/(ALLIDs)/2D48969499921699C12570B3004F0D84/$FILE/Leica_Measuring_Manual_EN.pdf)
2. Автандилов Г.Г. Компьютерная микрофотометрия в диагностической гистоцитопатологии. - М., 1996. - С.44.
3. Руководство пользователя для микроскопов серии Leica DML. -1996.- Such.-Nr.501-091.- Germany.- С. 22-27.
4. Breast cancer - Histologic grading - Breast malignant chapter. - <http://pathologyoutlines.com/breastmalignant.html#histologic>