

Използване на морфометрични методи при изследване на проблеми от клиничната практика

Димитър Ставрев

Using Morphometric Methods to Study Problems of Clinical Practice: Medical technologies are those of the most intensively developing in modern times. The treatment approach is complex, multidisciplinary and requires very precise diagnosis. The objective evaluation of the morphological sciences about their subject is indispensable criterion for the analysis of both the patient and the effect of the administered treatment, short and long term perspective of the disease. In the present work is presented micromorphological integration methods in the study of problems of clinical practice.

Key words: Morphometric Methods, System of Computer Analysis

ВЪВЕДЕНИЕ

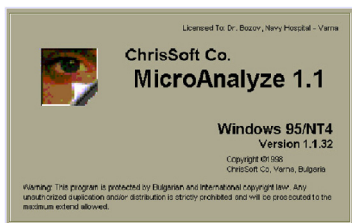
Медицинските технологии са едни от най-интензивно развиващите се в съвременното. Лечебният подход е комплексен, мултидисциплинарен и изисква изключително прецизна диагностика. В настоящата работа е представено интегрирането на микроморфологични методи при изследване на проблеми от клиничната практика.

ИЗЛОЖЕНИЕ

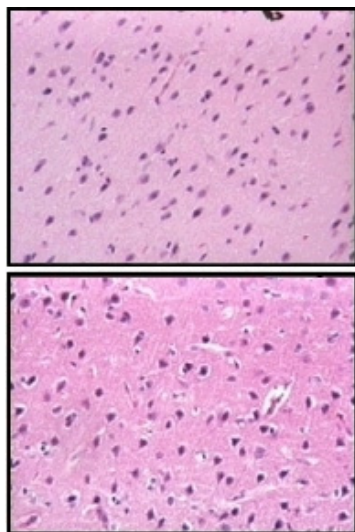
Морфометричното проучване има за цел да опише изследвания материал по най-простия възможен начин и по този начин улесни сравнението между различните обекти. Това се реализира основно чрез поредица от измервания. Традиционният и най-елементарен, метод на морфометрия включва измерване на разстояния, ъгли и площи. Всеки един от тях акцентира върху определен аспект на обекта. Във всички случаи подходът трябва да отговаря на заложената цел и да обслужва поставения клиничен проблем.

Поради това, че се работи с биологичен материал методът има недостатък, че много възрастови, расови и/или индивидуални особености могат да компрометират статистически анализ. За да се подобри достоверността, е необходимо да се намери достатъчно достоверен показател, корелиращ пряко с изследвания проблем и същевременно опростен и лесен за обработка и анализ. Същевременно трябва да се отстранят възможните смущаващи фактори предизвикващи грешки, изкривявания и усложняващи анализа. Такива в морфометричните анализ са размер, завъртане, местоположение и т.н.

В представените изследвания бе поставена задачата, да се избере обективен показател, подходящ за решаване на конкретен клиничен проблем. Използвани бяха възможностите на лабораторната база и изследователската апаратура на Катедрата по Анатомия, хистология и ембриология на Медицински Университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“- Варна и тези на МБАЛ-ВМА(ВМБ)-Варна. Хистологични препарати се изследваха с помощта на микроскоп OLYMPUS BX50 снабден с видеокамера. Всеки обект бяха първоначално оценени с директно наблюдение с последователно използване на възходяща поредица от увеличения. Успоредно с това с използване на видеосистемата, образи от хистологичния материал се възпроизвеждаха на живо върху монитора на компютърната система. Заснемаха се множество образи от 10 – 50 от всеки обект на различни увеличения, които след това се запазяха в дигитален вид в архивиращата система на компютъра. Последва многократно преглеждане и анализ на съхранената образна информация. За морфометричното изследване се използваша образи от архивиращата система измервани с подходящ програмен продукт.



Фигура 1. Компютърна програма за анализ на микроскопски изображения „Micro Analyze-1,1” на „Chris Soft”-България



Фигура 2. Прецентрална извивка на мозък на плъх-контрола и такъв с мозъчен оток предизвикан от СО интоксикация

Използването на тази програма позволи да се отчете % на площта на перичелуларния и периваскуларен мозъчен оток към общата площ на избрания светлинномикроскопски образ. По този начин обективно се отчете действието на различните режими ХБО за намаляване на мозъчния оток. Получените резултати за отделните режими се сравниха помежду им, с тези при контролните групи и с резултатите от биохимичния и клиничния анализ.

Окончателните резултати от компютърната обработка на светлинномикроскопските изображения, отразяващи процентното съотношение на площта на мозъчния оток към общата площ бяха представени в таблици съответно за лека, умерена и тежка степен на интоксикация.

Таблица 1. Резултати от измерването на % морфологична изява на мозъчния оток при тежка степен на СО интоксикация

Режим	гр.	% на мозъчния оток
Въздух	I	6.59 ± 1.30
НБО	II	5.41 ± 1.34
ХБО (ВМБ - 3)	III	3.82 ± 0.40
ХБО (USN-6)	IV	4.14 ± 0.47
ХБО (ПВС-90)	V	4.48 ± 1.33
ХБО (ВМБ-16)	VI	5.01 ± 0.75

При първото от изследванията, целта бе да се оцени ефекта на режими хипербарна оксигенация(ХБО) върху мозъчния оток на лабораторни плъхове, предизвикан от интоксикация с СО. Животните бяха интоксикирани в различни степени с СО и лекувани с избрания режим. По предварително прецизиран протокол, материал от главния мозък бе взет и обработен в хистологична лаборатория.

Мозъчния оток представлява патологично натрупване на прекомерно количество течност в тъканите на мозъка. Морфологично той се изявява, като неочветена зона перичелуларно и периваскуларно в изследваното поле, поради разлюбяването на материите в областите на най-малко сцепление от неочветяващата се при хистологичното оцветяване течност. Лечението води до извличане на вода от интерстициалното мозъчно пространство и от там намаляване на неочветената зона. Ефективността му може да се прецени по количествената оценка на тази морфологична проява.

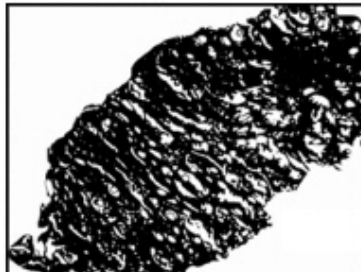
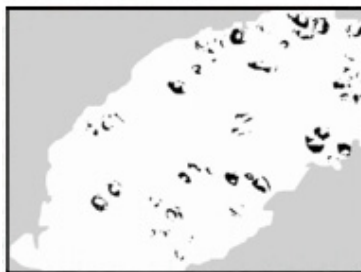
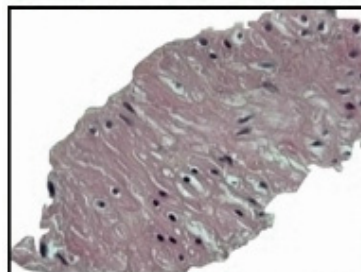
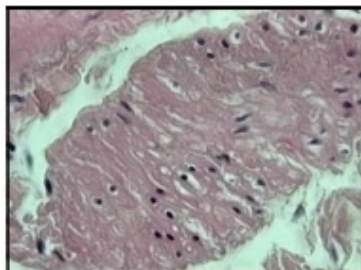
Морфометрията бе фокусирана върху оценката на процента неочветена площ от цялото изследвано поле. Компютърната обработка се извърши със софтуерна програма за анализ на микроскопски изображения „Micro Analyze-1,1” на „Chris Soft”-България, специално изработена за целта. Анализната част на пакета включваше алгоритми за изчисление на площи и

Обект на анализ на другото изследване беше феноменът на вакуолизация в гладкомускулни клетки (ГМК) на стената на магистралните вени на долния крайник. Броят, размерите, формата и локализацията на вакуолиите в ГМК показват значително разнообразие. Те се разполагат предимно в богатите на клетъчни органили области около ядрото в надлъжно ориентирани ГМК. Количеството им има корелация със стадия на периферната артериална недостатъчност. Метричната оценка на този феномен може да се използва, като критерий с висока достоверност за перспективността на изследвания венозен съд, като материал за байпас при реконструктивно възстановяване на артериалната магистрала на крайника.

При това изследване подходът от по-горе представения метричен анализ е неподходящ. Оценяваните обекти/вакуоли/ по същия начин са оптически празни – не са оцветени при хистологичната обработка. Те обаче са разположени в много разнообразно, многокомпонентно работно поле и количественото им оценяване спрямо цялата изследвана площ би било неточно. Това наложи да се потърси друг, по значим елемент за сравнение при морфометричен анализ. Достоверността на измерването на неочетените вакуоли изисква те да бъдат отнесени към обект съответстващ максимално по брой, форма и разположение в хистологичните срези на венозната стена.

За количествен анализ на вакуоли в ГМК бе използван софтуерния продукт ImageJ, разработван от *The National Institutes of Health, USA*. Софтуерът е създаден с цел обработка и статистически анализ на цифрови изображения. Базиран е на отворената архитектура на Java и работи на всички популярни потребителски операционни системи. Поддържа разнообразие от формати, които могат да се разширяват, както и възможностите за обработка чрез допълнителни модули (plugins). ImageJ е свободен софтуер с отворен код и не изисква лиценз за ползване.

Фигура 3. Последователни етапи на количествен анализ на светли вакуоли в ГМК със софтуерен продукт ImageJ



Резултатите бяха отчетени в пиксели. С оглед избягване на много последователни операции с голяма вероятност за грешка или неточности свързани с конкретното място (сечение) на изследваната стена на съда, се предприе изчисление на относителния дял на вакуолите в съдовата стена. Този подход предполага поне три направления и възможни отчитания. На следващ етап направихме анализ на възможните варианти и оценихме тяхната обективност и значимост. Последователно се проведеха следните стъпки:

- Селектира се изображението на изследваните области. От изследването се отстраняват части от изображението, които не представляват интерес или влияят негативно на точността на резултатите.
- В зависимост от оцветяването на материала, от изображението се извлича графичното разпределение на оценяваната площ под формата на маска. Извлечения, под формата на маска компонент – вакуоли, ядра и еозинофилно оцветени структури е оцветен монохроматично в черно, което дава възможност да бъде изчислен в пиксели.
- Използвайки функцията за анализ от маската се изчисляват изследваните площи. Резултатите се отчитаха в пиксели отразени в таблица.

обект съд	вакуоли	ядра	еозинофилно оцветени структури	селекция на изследвания обект
1367-2	9936 px	8087 px	352329 px	396373 px
съотношение на вакуоли		1.229	0.028	0.025
1367-4	10332 px	8222 px	235870 px	304447 px
съотношение на вакуоли		1.257	0.044	0.034

Таблица 2. Резултати от „анализ на маската“ в пиксели[px] и изчислени съотношения

За оценка на относителния дял на вакуолите. Относителния размер на повърхността на неоцветените хематоксилин-еозин, светли вакуоли може да бъде изчислена един от следните методи:

1. Изчисляване на съотношението на неоцветените вакуоли към цялото изследвано поле.
2. Изчисляване на съотношението на неоцветените вакуоли към ядрата на клетките оцветени в синьо.
3. Изчисляване на площта на неоцветените вакуоли към оцветената в червено площ (еозин).

Поради пространствената близост в ГМК, сходната форма и добрия контраст, най-достоверно се оказва отношението светлите вакуоли към клетъчните ядра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечебният подход в съвременната медицина е комплексен, мултидисциплинарен и изисква изключителна прецизност. Технологичният напредък в лабораторната и образната диагностика позволява неинвазивно диагностициране и ефективен контрол по време на лечението. От друга страна обективната оценка, която дават фундаменталните медикобиологични изследвания за изследвания обект ги прави незаменим критерий за анализ. Той има отношение към конкретните резултати от лечението и към близката и далечната прогноза за развитието на заболяването.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Chung-Ping Lo, Shao-Yuan Chen, Kwo-Whei Lee, Wei-Liang Chen, Cheng-Yu Chen, Chun-Jen Hsueh and Guo-Shu Huang Brain Injury After Acute Carbon Monoxide Poisoning: Early and Late Complications American // Journal of Neuroradiology, 24, 2003, 1592-1597

[2] Marinov, G.R. Lipid droplets in the myocytes of the venous vessel wall in arterial occlusive lower limb disease. // Anat Anz (Jena). Verh Anat Ges, 80, 1986, 605-606.

[3] Nylander G, Lewis D, Nordstrom H, Larsson J (1985) Reduction of post-ischemic edema with hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg 76, 1985, 596-603

[4] Norkool D, M Kirkpatrick J N Treatment of acute carbon monoxide poisoning with hyperbaric oxygen: A review of 115 cases // Annals of Emergency Medicine, 14, 1985, 12, 1168-1171

[5] Stavrev D, H. Bozov System of computer analysis and valuation of morphological changes in the cerebrum after treatment with hyperbaric oxygenation of experimental carbon monoxide intoxication of rats // Scripta Scientifica Medica 36, 2004, 7-10

[6] Stavrev D., M. Ianeva, H. Bozov Experimental model for gradual intoxication with CO of rats for optimizing treatment regimes of hyperbaric oxygenation // Bulletin of the medical institute after Mehrabyan I, 2006, 60-67

[7] Бозов Х. Оптимизиране на лечението с хипербарна оксигенация на острите интоксикации с въглероден окис- експериментални и клинични проучвания. Дисертационен труд Варна, 1999

[8] Ставрев Д., Г. Чучуганов Количествена оценка на степента на липидна дегенерация на миоцитите в съдовите стени при Хронична Артериална Недостатъчност на Долните Крайници (ХАНДК) // Русенски Университет "Ангел Кънчев" Научни Трудове 45, 2006, 5/4, 128-131

За контакти:

Димитър Ставрев ДМ, Катедра по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна
тел.0884331858; e-mail: dgstavrev@abv.bg

Докладът е рецензиран.