Применение новой системы автоматизированного цитологического анализа при исследовании клеточного состава перитонеальной жидкости в динамике операционной травмы.

Воробьев А.А., Поройский С.В., Привалов О.О, Засыпкина О.А.
Лаборатория моделирования патологии ВНЦ РАМН, кафедра АСОиУ Камышенского технологического института (филиал ВолГТУ).

Перитонеальная жидкость является неотъемлемой частью внутрибрюшной среды, количество и качество которой находится в прямой зависимости от функционального состояния брюшины. Динамика цитологической картины перитонеальной жидкости является зеркалом протекающих процессов воспаления, регенерации, отражает механизмы клеточной кооперации в процессе послеоперационного адгезиогенеза. Использование современных систем микроскопии позволяет визуализировать и хранить информацию объекта исследования в цифровом формате. В связи с этим актуальным вопросом становится оптимизация интерпретации данных цитологического исследования используя новые компьютерные технологии.

Целью: разработать систему программного автоматизированного цитологического анализа и применить ее для определение клеточных взаимоотношений перитонеальной жидкости в динамике операционной травмы.

Материалы и методы. Эксперимент был выполнен на 20 половозрелых самках крыс линии Wistar, массой 250-300 гр. У животных осуществлялся забор перитонеальной жидкости до и после нанесения стандартной операционной травмы по стандартизированной методике, включающей: лапаролифтинг передней брюшной стенки, введение в брюшную полость в проекции белой линии живота разработанного нами одноразового перфорированного катетера; введение в брюшную полость физиологического раствора в стандартном объеме (2 мл.), обратный забор жидкости, приготовление и окраска мазка по стандартной методики для проведения цитологического исследования. До операционной травмы (контрольный забор) забор перитонеальной жидкости осуществлялся в течении 5 дней. На 5 день, после контрольного забора перитонеальной жидкости, выполнялась ранее предложенная нами и модифицированная применительно к мелким экспериментальным животным методика нанесения стандартной операционной травмы, включающая: выполнение срединной лапаротомии (длина разреза 2 см.), идентификацию илеоцекального угла, нанесение дефектов висцеральной брюшины купола слепой кишки, дистального отдела подвздошной кишки и двух дефектов париетальной брюшины правой боковой стенки живота размером 0,5 на 0,5 см, ушивание лапаротомной раны 5 капроновыми узловыми швами. Последующий забор перитонеальной жидкости осуществлялся сразу после нанесения операционной травмы, а также в ее динамике через день в течении 30 дней. Длительность эксперимента определялась временем окончательного формирования сращений и заживления дефектов брюшины (Воробьев А.А.,

Бебуришвили А.Г., 2001; Поройский С.В., 2004. Воробьев А.А. и соавт., 2005). Исследование, описание и фотоархивирование цитологических препаратов проведено с использованием микроскопа “Axiostar plus” (Karl Zeiss), цифровой камеры“Canon”.

Для оптимизации процесса исследования нами разработано специализированное программное обеспечение «Система автоматизированного цитологического анализа», основанная на реализации функции автоматического анализа растрового изображения медико-биологического препарата, полученного в результате «оцифровки» наблюдаемой при микроскопии картины. Под анализом в данном случае понимается методика определения процентного отношения количества объектов, принадлежащих разным классам клеточных популяций. При этом считается, что предварительно исследуемый препарат проходит стадию окраски, обеспечивающую разделение разнотипных объектов по цвето - яркостным характеристикам. В качестве основного алгоритма поиска и выделения на изображении интересующих объектов, был использован алгоритм сегментации цветных растровых изображений, ориентированный на специфику микроскопии, как предметной области медико-биологических исследований. В данном случае подразумевается отсутствие стабильности по цвето - яркостным характеристикам наблюдаемых изображений. В основе алгоритма лежит метод формирования устойчивой картины сегментации, что позволяет использовать его для обработки совокупности изображений и обобщения результата. Разработанный программный продукт позволил: цитотипировать клетки перитонеальной жидкости, определить соотношение клеток и ядерно-цитоплазматическое соотношение отдельных их представителей, получить графическое изображение цифровых результатов, провести архивирование данных.

В приготовленных мазках обнаруживались следующее клеточные элементы: эритроциты, лимфоциты, лейкоциты, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, моноциты, мезотелий, реже встречались макрофаги и фибробластоподобные клетки. Цитологическая картина перитонеальной жидкости имела четкую взаимосвязь с операционной травмой. При этом эритроциты в перитонеальной жидкости в большей степени обнаруживались в первый день после нанесения стандартной операционной травмой, что естественно связано с выполненным оперативным вмешательством. В дальнейшем их число снижалось, и к 10 суткам перитонеальный мазок содержал единично встречающиеся эритроцитарные клетки. Максимальное количество лейкоцитов отмечено после нанесения стандартной операционной травмы, что свидетельствовало о закономерном ответе на операционную травму воспалительным процессом. Дальнейшая динамика характеризовалась снижением цитоза в течении 3-4 суток с установлением средне нормального уровня содержания лейкоцитов перитонеальной жидкости. Аналогичную динамику имели сегментоядерные лейкоциты, отражающие остроту воспалительного процесса. При этом наибольший цитоз определялся в течение 3 дней. Относительное увеличение

количества в перитонеальной жидкости клеток моноцитарно-макрофагального ряда обнаруживалось только на 8-10 сутки после нанесения операционной травмы с последующим восстановлением их контрольного количества. Реакция лимфоцитов на операционную травму была менее выраженной. Относительно небольшое повышение их числа обнаруживалось в первые 5-7 суток, в дальнейшем их уровень соответствовал контрольному значению. Операционная травма стала причиной кратковременного повышения количества эозинофилов в перитонеальной жидкости, наблюдавшегося на 2 -3 сутки. При этом уже с 4 суток их количество соответствовало таковому в контрольной группе. Изменение количества мезотелиальных клеток в перитонеальной жидкости может быть интерпретировано как показатель репаративного процесса, запускаемого операционной травмой и протекающего на фоне посттравматического асептического воспаления. При этом увеличение количества мезотелиальных клеток обнаруживалось с 3 по 15 день после операционной травмы.

Таким образом:

- разработана и применена в исследовательском процессе новая программная система автоматизированного цитологического анализа;
- система автоматизированного цитологического анализа позволяет осуществить цитотипирование объектов, определение их групповой локализации, автоматизированное получение числовых значений соотношений объектов исследрования;
- погрешность цитологического исследования с использованием системы автоматизированного цитологического анализа составляет около 4%, что определяет преимущества ее применения перед классическими методами визуального анализа с применением планиметрических сеток;
- применение система автоматизированного цитологического анализа при исследовании клеточного состава перитонеальной жидкости позволило выявить особенности клеточных кооперацiй в динамике операционной травмы;
- система автоматизированного цитологического анализа может быть применена при цитотипировании различных биологических жидкостей.