

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ

Зенина М.Н.¹, Бессмельцев С.С.¹, Козлов А.В.², Черныш Н.Ю.².

¹ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», г. Санкт-Петербург; 191024, 2-я Советская ул., д. 16,
тел. (812) 274-56-50, email: bloodscience@mail.ru

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова

Резюме: Аппаратно-программные комплексы используются в лабораторной практике при измерении параметров эритроцитов. Компьютерный метод является универсальным для определения величин, недоступных при использовании проточных гематологических анализаторов. В статье анализируются морфометрические параметры эритроцитов (диаметр [D], сферичность [I_{sf}], толщина [T]), полученные с помощью аппаратно-программного комплекса. Определены границы основных классов эритроцитов.

Ключевые слова. Эритроциты, диаметр эритроцитов, толщина эритроцитов, индекс сферичности эритроцитов, компьютерная морфометрия эритроцитов.

MORPHOMETRIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES

Zenina M.N.¹, Bessmeltsev S.S.¹, Kozlov A.V.², Chernysh N.Y.²

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russia, St.-Petersburg, 191024, 2nd
Sovietskaya str., 16;

²North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Russia, St.-Petersburg

Abstract: Medical systems of image analysis are used in the laboratory for measuring red blood cells. Computer methods is used to determine the parameters that are not available when using blood hematology analyzers. The morphometric parameters of red blood cells (diameter [D], the sphericity [I_{sf}], thickness [T]) are obtained with of software and analyzed in this paper. The boundaries of main classes of red blood cells are installed.

Keywords. Erythrocytes, erythrocyte diameter, thickness erythrocytes, sphericity index erythrocytes, computer morphometry of red blood cells.

Введение.

Кроветворная система отличается относительным постоянством состава у здорового человека и реагирует на любые изменения, происходящие в организме. Морфологический анализ окрашенных мазков крови с использованием прямого светового микроскопа остается ключевым исследованием в оценке состояния кроветворения [1]. Одним из наиболее часто встречающихся в клинической практике синдромов является анемия. Существенную роль в распознавании патогенетического варианта и дифференциальной диагностике анемии играет оценка, в том числе и морфологическая, показателей эритроцитов. При некоторых формах анемий наблюдается несоответствие между параметрами, получаемыми с использованием гематологических анализаторов с кондуктометрическим методом исследования и морфологической картиной заболевания, так как имеется несоответствие между величиной диаметра эритроцита [D] и показателем среднего объема эритроцита [MCV].

Распределение эритроцитов по величине их диаметра (анизоцитоз) на микроциты, нормоциты и макроциты было предложено Наяет G. еще в 1889 г. [1]. В последующем наибольшее распространение получили показатели эритроцитов, предложенные Prices Jones и отображенные в гистограмме распределения эритроцитов по диаметру, носящее его имя. Технически измерение эритроцитов Prices Jones производил так, что проецировал поле зрения микроскопа с изучаемой кровью на экран, измеряя проекцию шариков линейкой в двух диаметрах при постоянном масштабе увеличения. Другие исследователи производили измерения эритроцитов под микроскопом Лейцевским окулярным микрометром. При этом одни авторы предпочитали пользоваться влажным препаратом, считая, что на фиксированном препарате эритроциты съеживаются. Другие авторы полагали, что фиксация и окрашивание не изменяют величины эритроцитов. Kammererund Wack, а также Löwy предлагали делать на окрашенном мазке нормальной крови другой мазок крови больного и докрашивать его, или просто сравнивать под микроскопом величину клеток той и другой крови, резко различимых под микроскопом [1].

Таким образом, при всей популярности трактовки измерений диаметра эритроцитов, единого подхода к этому вопросу не выработано [1]. Получивший в последние годы компьютерный анализ изображений может рассматриваться как универсальный метод измерения биологических объектов, позволяющий получить данные, недоступные при применении проточных гематологических анализаторов. К таким параметрам относятся диаметр [D], толщина [T], индекс сферичности [I_{sf}] эритроцитов [1]. Однако, для внедрения в лабораторную практику компьютерного анализа изображений необходимо определение

референтных значений биологических объектов. В связи с возможностью получения параметров измерений эритроцитов с помощью аппаратно-программных комплексов при диагностике различных патологических состояний возникла необходимость выработки комплексного методологического подхода к пробоподготовке и проведению измерительных процедур.

Цель работы.

Определить морфометрические параметры эритроцитов (диаметр, толщину, индекс сферичности и процентное содержание эритроцитов каждого класса) в мазках периферической крови, окрашенных по референсному методу Романовского, предложенному Международным Комитетом по стандартизации в гематологии ICSH [1].

Материалы и методы.

Материалом для исследования служили мазки периферической крови пациентов, не предъявляющих жалоб анемического характера, имеющих эритроцитарные параметры, полученные с использованием гематологического анализатора, в пределах референтных значений. Было обследовано 50 пациентов (мужчин – 22, женщин – 30) в возрасте 17 – 33 лет. Измерено в окрашенных мазках крови 20370 эритроцитов (12922 у мужчин и 7448 эритроцитов у женщин). Капиллярную кровь для анализа забирали системой Microvette компании Sarstedt (Германия), содержащей К2-ЭДТА и использовали для определения эритроцитарных параметров на гематологическом анализаторе Sismex КХ 21. Мазки готовили ручным способом.

Высушенные препараты фиксировали красителем-фиксатором по Май-Грюнвальду в течение 2 мин. Затем окрашивали раствором красителя Романовского-Гимзы в течение 11 мин (разведение 1 к 10 буферным раствором с рН 6,8-7,2).

Работа проводилась на аппаратно-программном комплексе ВидеоТест–Морфология, в состав которой входит микроскоп, система ввода изображений, компьютер и одноименное программное обеспечение. Использовался иммерсионный объектив х 100, масляная иммерсия. Учитывая, что проводились измерения объектов, аппаратно-программный комплекс был откалиброван с использованием объект-микрометра ОМО (выпущенного по ТУ3-3.2038-87 и прошедшего поверку по методике Государственной системы обеспечения единства измерений ГСИ).

Анализ изображений с помощью аппаратно-программного комплекса включал

выделение, измерение и распределение эритроцитов в автоматическом режиме на классы по заданным параметрам (Рис 1). Для каждого эритроцита определялся средний диаметр $[D]$, толщину $[T]$ и индекс сферичности эритроцитов $[I_{sf}]$ или $[I_{cf}]$. Для правильной оценки размеров эритроцитов учитывались только одиночно лежащие целые клетки или клетки, контактирующие незначительно и откорректированные (разделенные в ручном режиме).

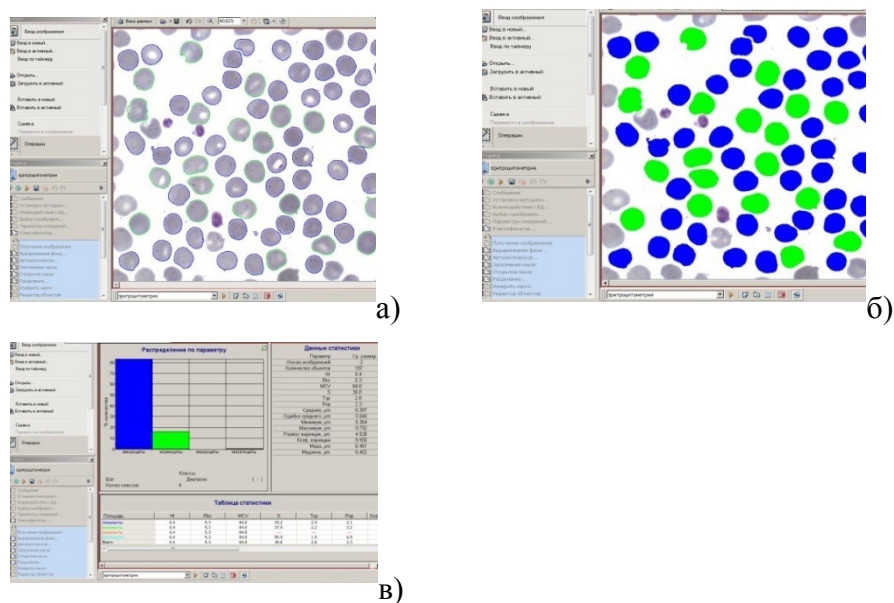


Рисунок 1. Последовательность проведения анализа эритроцитов с использованием компьютерной программы.

а) окно программы с изображением окрашенных эритроцитов, б) маркировка эритроцитов в зависимости от диаметра, в) результаты анализа в виде диаграммы и количественных данных

Объем эритроцитов $[MCV]$ и количество эритроцитов $[Rbc]$ измеряли с использованием гематологического анализатора Sismex KX 21 (таблица 1). Диаметр эритроцитов (D) определяли как полусумму измеренных с помощью аппаратно-программного комплекса величин – максимальной длины и ширины эритроцитов. Этот показатель соответствует по смыслу среднему диаметру при неавтоматизированном микроскопическом измерении [9]. Толщину эритроцита $[T]$ определяли, деля объем его на площадь основания эритроцитов $[S]$, измеренных с использованием аппаратно-программного комплекса $[T=MCV/S]$. Индекс сферичности эритроцитов $[I_{sf}]$ определяли как

соотношение среднего диаметра и толщины эритроцитов [$I_{st}=D/T$]. По данным всех измерений была построена гистограмма распределения эритроцитов по 10 классам. На гистограмме по оси Y откладывается % .

Статистическую обработку проводили с использованием программы STATISTICA [Stat Soft Russia] и MedCalc [Med Calc Software, Belgium]. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки референтных значений классов эритроцитов использовали ГОСТ Р 53022.3-2008.

Таблица 1.

Эритроцитарные показатели, полученные с использованием гематологического анализатора Sismex KX 21

Показатели	Женщины (n=30)	Мужчины (n=22)
Концентрация гемоглобина (НЬ) г/л	137,6± 9,3	140,8±8,3
Количество эритроцитов (Rbc – red blood cells) $\times 10^{12}/л$	4,7± 0,2	4,8±0,3
Гематокрит (Hct – hematocrit) л/л	0,39± 0,02	0,4±0,01
Средний объем эритроцита (MCV – mean corpus cular volume) пг	83,1± 1,7	87,3±4,0
Среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH – mean corpus cular hemoglobin) г/дл	28,6± 1,3	29,5±1,1
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC – mean corpus cular hemoglobin concentration) фл	34,65± 0,95	32,9±2,2
Ширина распределения эритроцитов по объему (RDW – red cell distribution width)	13,6± 0,5	14,0±0,9

Результаты.

Как видно из таблицы 2, средний диаметр эритроцитов мужчин составил 7,4 мкм, у женщин – 7,6 мкм. При измерении объема эритроцитов, к классу нормоцитов относят те клетки, которые лежат в пределах 10-90 перцентилей на гистограмме распределения эритроцитов по объему [1].

Таблица 2.

Параметры измерений эритроцитов

Статистические параметры	Результаты измерений эритроцитов мужчин	Результаты измерений эритроцитов женщин
Σ (Количество измеренных объектов)	12922	7448
MinD (Минимальное значение диаметра эритроцитов)	5,0	5,7
MaxD (Максимальное значение диаметра эритроцитов)	9,1	9,2
D(Среднее значение диаметра эритроцитов)	7,4 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1

Руководствуясь этим же принципом, чтобы отобразить распределение диаметра эритроцитов в таких же пределах, мы отнесли к классу нормоцитов эритроциты, лежащие в пределах 10-90% (90% референтный интервал) всех измеренных эритроцитов по диаметру [рис.2].

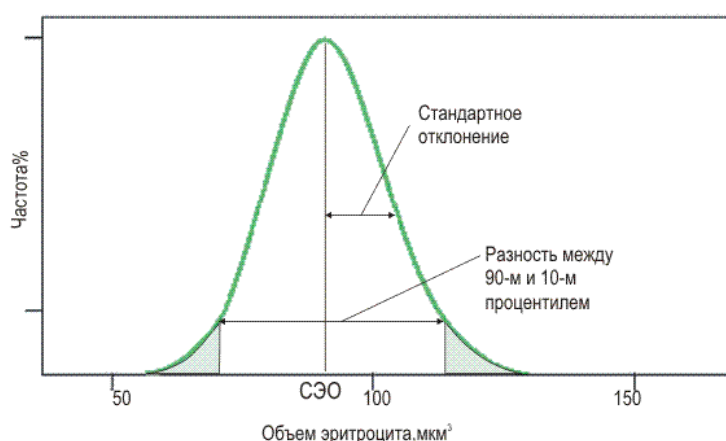
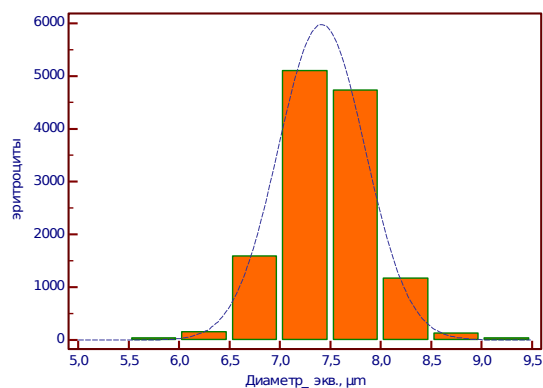
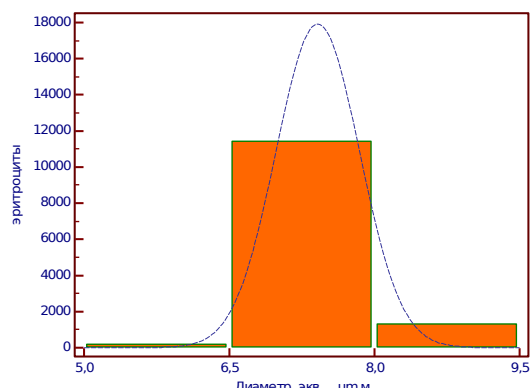


Рисунок 2. (Harrison). Эритроцитометрическая кривая

Эритроциты, имеющие диаметр менее этого предела, отнесли к микроцитам, более – макроцитам [1]. При этом нижний референтный предел значений у мужчин соответствовал диаметру эритроцитов равному 6,7 мкм, верхний предел – 8,1 мкм [рис 3_{а), б)}].



a)



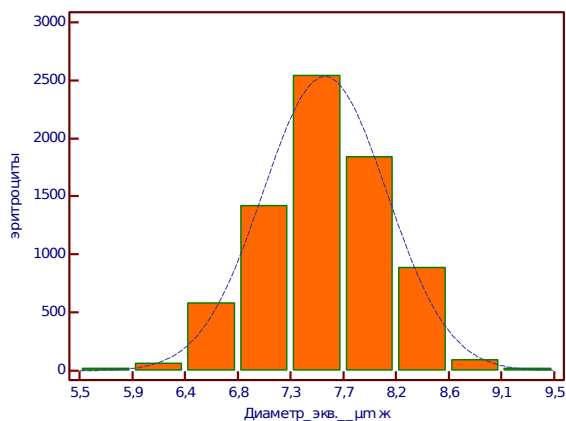
b)

Разделение эритроцитов на классы по диаметру (10-90 процентиля)

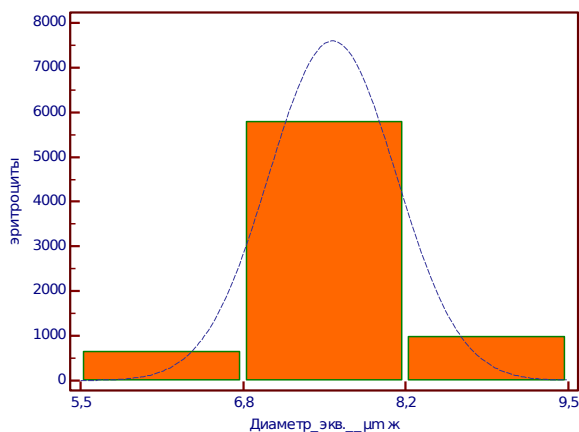
Разделение эритроцитов на классы (микро-, нормо- и макроциты)

Рисунок 3. Гистограмма распределения эритроцитов по диаметру у мужчин

Таким образом, к классу эритроцитов-микроцитов мужчин относятся эритроциты с диаметром от 5,0 – 6,7 мкм, нормоцитам – 6,7 – 8,1 мкм, макроцитам – 8,1 – 9,1 мкм. У женщин нижний референтный предел соответствовал 6,7 мкм, верхний предел – 8,4 мкм [рис 4 а),б)].



a)



b)

Разделение эритроцитов на классы по диаметру (10-90 процентиля)

Разделение эритроцитов на классы (микро-, нормо- и макроциты)

Рисунок 4. Гистограмма распределения эритроцитов по диаметру у женщин

При этом у женщин микроциты с диаметром 5,0 – 6,7 мкм составили 8, 8% и 8,4% у

мужчин, нормоциты с диаметром 6,7 – 8,1 мкм – 72,3 и 78,1% соответственно и макроциты с диаметром 8,1 – 9,1 мкм – 18,9 и 13,5% (таблица 4).

Таблица 3.

Параметры эритроцитов женщин						
Класс эритроцитов	Абсолютное количество	%	Диаметр эритроцитов D мкм	Минимальное значение	Максимальное значение	P.
микроциты	653	8,8	6,6 ±0,04	5,7	6,8	<0,0001
нормоциты	5388	72,3	7,5 ±0,10	6,9	8,0	<0,0001
макроциты	1407	18,9	8,3 ±0,04	8,1	9,2	<0,0001
Параметры эритроцитов мужчин						
Класс эритроцитов	Абсолютное количество	%	Диаметр эритроцитов D мкм	Минимальное значение	Максимальное значение	P.
микроциты	1080	8,4	6,6 ±0,2	5,7	6,8	<0,0001
нормоциты	10098	78,1	7,4 ±0,1	6,9	8,1	<0,0001
макроциты	1744	13,5	8,4 ±0,2	8,2	9,1	<0,0001

Индекс сферичности микроцитов у женщин составил 2,7, у мужчин 2,8. У нормоцитов этот показатель 4,1 и 3,9 соответственно и макроцитов 5,5 и 5,4 (таблица 4). Толщина микроцитов у женщин и у мужчин составляет 2,4 мкм, нормоцитов 1,9 и макроцитов у женщин 1,5, у мужчин 1,6 мкм соответственно (таблица 4).

Таблица 4.

Индекс сферичности и толщина эритроцитов

Класс эритроцитов	I _{sf} (индекс сферичности эритроцитов) мужчин		P	I _{sf} (индекс сферичности эритроцитов) женщин		P
микроциты	2,8	±0,2	<0,0001	2,7	±0,2	<0,0001
нормоциты	3,9	±0,5	<0,0001	4,1	±0,6	<0,0001
макроциты	5,4	±0,5	<0,0001	5,5	±0,3	<0,0001
Класс эритроцитов	Т(Толщина эритроцитов) мужчин		P	Т(Толщина эритроцитов) женщин		P
микроциты	2,4	±0,2	<0,0001	2,4	±0,2	<0,0001
нормоциты	1,9	±0,2	<0,0001	1,9	±0,2	<0,0001
макроциты	1,6	±1,5	<0,0001	1,5	±0,1	<0,0001

Обсуждение.

Полученные референтные параметры эритроцитов и пределы распределения эритроцитов на основные классы могут быть использованы для сравнения аналогичных показателей при анемических состояниях и позволяют использовать пределы значений для сравнения и последующей классификации анемии.

Использование аппаратно-программных комплексов для морфометрического анализа эритроидных клеток позволяет перевести традиционный описательный и полуколичественный метод оценки клеток в количественный.

По данным литературы при врожденной гемолитической анемии диаметр эритроцитов уменьшен и на этом основании ее относят к микроцитарным анемиям. Однако MCV соответствует референтным значениям, или увеличен (до 128 мк³), что связано с явлением сфероцитоза [1]. Другой, не менее наглядный пример касается несфероцитарной формы врожденной гемолитической анемии. При этом заболевании D может быть нормальным или довольно значительно повышенным, а сфероцитоз отсутствует, может иметь место уплощение эритроцитов – макроплания [1]. Наконец, третьим примером могут служить гепатиты и циррозы печени, при которых также можно обнаружить макроцитоз, не связанный с увеличением MCV.

Таким образом, существуют формы заболевания системы крови, при которых отсутствуют соответствие между средним диаметром эритроцитов и их объемом, а также между средним диаметром эритроцитов и их толщиной, о чем можно получить представление при определении сферического индекса. С помощью аппаратно-программного комплекса были определены референтные показатели эритроцитов, недоступные при использовании проточных гематологических анализаторов и необходимые при диагностике анемий с несоответствием показателей MCV и D.

Изменение формы эритроцитов, так же как изменения их размеров, имеют значение для суждения о характере костномозгового кроветворения и о патогенезе анемий [10,11].

На основании указанного можно считать обоснованным утверждение, что измерение объема эритроцитов не должно и не может заменить собой полностью исследования их диаметра и толщины. Если исходить из фактов, свидетельствующих о том, что развитие анемии чаще всего сопровождается изменением эритроцитов – диаметра, толщины и объема [12, то следует признать целесообразным изучение всех трех показателей, особенно первого, так как на основании определения D, процента макро- и микроцитов, наконец, амплитуды

анизоцитоза, можно судить о форме анемии (макро-, микро-, нормоцитарной), о некоторых ее патогенетических механизмах, а в ряде случаев использовать эти данные для диагностики.

Литература.

1. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition / H.K. Walker, W.D. Hall, J.W. Hurst// Boston: Butterworths. – 1990. – P. 695-696.
2. Hayem G. Note sur le caracteres et l'evolution des haematoblates chez les ovipares/ G. Hayem//Mem. Soc. Biol. (Paris). – 1877. – Vol. 29. – P. 97-110.
3. Löwy Z. Beurteilung der Erythrocyte Grosse/ Löwy Z. // Wien. Kl. Woch. – 1925. — №22. — P. 5-9.
4. Albertini M.C. Automated analysis of morphometric parameters for accurate definition of erythrocyte cell shape/ M.C. Albertini// Cytometry. – 2003. — № A 52 (1). – P. 12-18.
5. Bacus J.W. Image processing for automated erythrocyte classification/ J.W. Bacus// Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 1976. — №24 (1). – P. 195-201.
6. Bentley S.A. The morphological classification of red cells using an image analyzing computer/ S.A. Bentley, S.M. Lewis// British Journal of Haematology. – 1976. — №32 (2). – P. 205- 214.
7. Hillman R.S. Hematology in Clinical Practice / R.S. Hillman, K.A. Ault, H.M. Rinder.— McGrawHill. – 2005. – P. 25-38.
8. CLSI C28—A3: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory — Third Edition; Approved Guideline. CLSI: Wayne P.A. – 2008. — P. 1-2.
9. Кассирский И.А. Клиническая гематология/ И.А.Кассирский, Г.А. Алексеев. — Москва: МЕДГИЗ. – 1970. – 800с.
10. Руководство по гематологии. Под ред. А.И.Воробьева, Ю.И. Лорие. – М.: Медицина. — 1979. — 584 с.
11. Бессмельцев С.С. Диагностика и дифференциальная диагностика апластической анемии //Клин мед. – 1997. – №9. – С. 20-25.
12. Багдасаров А.А. Руководство по внутренним болезням /А.А. Багдасаров, М.С. Дульцин. – Москва: МЕДГИЗ. – 1962. – 700 с.