

Определение индивидуальных и средних характеристик эритроцитов нативной крови методом статической спектральной цифровой микроскопии

© В.А. Дубровский¹, С.О. Торбин¹, И.В. Забенков²

¹ Саратовский государственный медицинский университет (СГМУ),
410000 Саратов, Россия

² Московский автомобильно-дорожный государственный технический университет (МАДИ),
125319 Москва, Россия

e-mail: doubrovski43@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.12.2021 г.

В окончательной редакции 25.01.2022 г.

Принята к публикации 21.03.2022 г.

Предложен метод статической (не проточной) спектральной цифровой микроскопии (ССЦМ) для идентификации, счета и определения стандартных и индивидуальных характеристик эритроцитов нативной крови. Объектом исследования являлась цельная донорская кровь, разбавленная физиологическим раствором и размещенная в камере Горяева. Среди стандартных характеристик эритроцитов определялись: концентрация эритроцитов в пробе крови RBC (red blood cells concentration), разброс эритроцитов по объему RDW (red cells distribution width), в том числе RDW-SD и RDW-CV, гематокрит HCT, средний объем эритроцита MCV (mean cell volume). Кроме того, исследована возможность предложенным методом измерения среднего содержания гемоглобина в эритроците MCH (mean cell hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), а также общее содержание гемоглобина HGB в пробе крови (hemoglobin). Особенность предложенного метода ССЦМ заключается в том, что он принципиально позволяет определять не только общие гематологические характеристики образцов крови (RBC, RDW-SD и RDW-CV, HGB), но и средние величины характеристик эритроцитов нативной крови (MCV, MCH, MCHC), а также, и это главное, индивидуальные характеристики каждого эритроцита. Последнее позволило авторам ввести новый тип характеристик эритроцитов ICV, ICH, ICHC (individual cell volume, individual cell hemoglobin, individual corpuscular hemoglobin concentration). В свою очередь это дает возможность получать гистограммы распределения гемоглобина в эритроцитах пробы крови наряду с традиционным распределением их объемов, что может послужить дополнительным средством в области гемодиагностики. Таким образом, в работе показано, что метод ССЦМ позволяет составить индивидуальный метрологический „паспорт“ на каждый эритроцит исследуемой пробы крови — это основная особенность настоящей работы.

Ключевые слова: идентификация эритроцитов, счет эритроцитов, индивидуальные характеристики эритроцитов, статическая спектральная цифровая микроскопия.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52632.29-22

Введение

Общий анализ крови является одним из наиболее частых лабораторных медицинских тестов. Неотъемлемой его частью является определение концентрации эритроцитов RBC, гематокрита (HCT), а также индексов эритроцитов, которые содержат информацию о размерах эритроцитов и содержании в них гемоглобина.

К первым индексам относятся: средний объем эритроцита MCV (mean cell volume — измеряется в фемтолитрах, 10^{-15} л), разброс эритроцитов по их объему (RDW — red cells distribution width). Существуют два варианта подсчета показателя RDW: 1) RDW-SD измеряется в фемтолитрах, показывает разницу между самым маленьким эритроцитом пробы и самым большим, 2) RDW-CV измеряется в процентах, показывает, насколько объем эритроцитов отклоняется от среднего.

Индексами, характеризующими содержание гемоглобина в эритроцитах, являются: 1) среднее содержание гемоглобина в эритроците MCH (mean corpuscular hemoglobin — измеряется в пикограммах, 10^{-12} г), 2) средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) — измеряется в граммах на литр.

Анализ нативной крови с помощью статической оптической микроскопии при непосредственном визуальном наблюдении препарата в окуляре или на экране монитора позволяет осуществить подсчет эритроцитов, выявить некоторые морфологические особенности препарата, однако такой подход довольно трудоемкий и времязатратный. Кроме того, он не позволяет в полной мере проводить соответствующую метрологию с образцом исследуемой крови.

Проточная цитометрия позволила наряду с обычными гематологическими показателями — концентраци-

ей эритроцитов, гематокритом и общим содержанием гемоглобина в крови — определять и другие важные индексы эритроцитов, такие как вышеупомянутые MCV, MCH, MCHC, RDW и другие [1–4]. К недостаткам таких анализаторов можно отнести сложность их технического обслуживания и высокие стоимостные характеристики.

Развитие компьютерной техники стимулировало интерес к статическим микроскопическим методам анализа крови и к созданию гематологических анализаторов нового типа, работающих на базе цифровых оптических микроскопов [5–7]. Однако в анализаторах подобного рода изучается, как правило, не раствор крови, а мазок, что не позволяет определять концентрацию форменных элементов крови и иные их параметры. Отметим, что при использовании метода статической цифровой микроскопии доля идентифицированных эритроцитов может достигать 97% [8]. Представляется важным отметить, что количество статей, посвященных подсчету эритроцитов в нативной крови статическим (не проточным) методом невелико, помимо [9] нам удалось познакомиться лишь с [10,11].

Анализ показывает, что большинство работ, посвященных автоматизированной идентификации, подсчету и анализу формы клеток крови на микрофотографиях, используют их морфологические признаки [6,7]. При этом в отличие от проточных гематологических анализаторов в этих работах не используются спектральные свойства форменных элементов. Именно такая попытка идентификации эритроцитов и их подсчет была предпринята в [12]. В этой работе показано, что статическая спектральная цифровая микроскопия позволяет идентифицировать красные клетки на уровне 97–98%, что не уступает лучшим результатам аналогичных работ других авторов. Более того, такая точность соответствует степени надёжности современных серийно выпускаемых проточных гемоанализаторов.

Настоящая работа может рассматриваться как развитие публикации [12]. Ее целью является исследование возможности применения предложенного в [12] метода статической спектральной цифровой микроскопии (ССЦМ) не только для идентификации и автоматизированного счета эритроцитов в образцах раствора нативной донорской крови, но и для определения таких общепринятых метрологических индексов эритроцитов, как MCV, MCH, MCHC, RDW и других. Более того, представляется, что метод ССЦМ позволит:

- определять индивидуальные характеристики каждого эритроцита, такие как ICV, ICH, ICHC (individual cell volume, individual cell hemoglobin, individual corpuscular hemoglobin concentration);
- получать гистограммы распределения гемоглобина в эритроцитах пробы крови, что может послужить дополнительным инструментом в гемодиагностике;
- составлять индивидуальный метрологический „паспорт“ на каждый эритроцит исследуемой пробы крови.

Таблица 1. Метрологические характеристики объектов исследования

№	Параметр	Размерность	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
А	RBC	$10^{12}/l$	4.56	4.47	5.25	4.85
	HGB	g/l	126	120	170	177
	HCT	%	36.9	34.9	45.8	45
Б	MCV	fl	80.9	78.1	87.2	90
	RDW-CV	%	14.1	13.6	11.9	12.0
	RDW-SD	fl	41	37.5	37.9	39.5
В	MCH	10^{-12} g	27.6	26.8	32.4	35.8
	CHC	g/l	341	344	371	395

1. Экспериментальная установка и пробоподготовка

1.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступали четыре образца цельной донорской крови, разбавленные физиологическим раствором в соотношении 1 : 100. Предварительно с помощью гемоанализатора Sysmex XS 1000i были определены следующие параметры эритроцитов и проб крови в целом (табл. 1).

1.2. Экспериментальная установка

Исследуемые образцы крови изучались в проходящем свете с помощью цифрового оптического микроскопа Люмам Р-8 (рис. 1).

Световой поток от лампы микроскопа 5 проходил сквозь систему светофильтров 6, 7, раствор исследуемого образца крови, помещенного в камеру Горяева 8, и поступал непосредственно в оптическую систему микроскопа. Разрешение камеры составляло 1920×1200 пикселей, а глубина цвета 12 бит. Важной особенностью этой камеры является линейность зависимости регистрируемого сигнала (выраженного в цифровых единицах) от интенсивности света, падающего на фотоматрицу. Для получения микрофотографий использовался объектив с коэффициентом увеличения $40\times$ и числовой апертурой 0.65. Разрешающая способность фотографий при этом составила 6900 pix/mm. При микроскопическом изучении образцов крови для каждой области микропрепарата снималось по две фотографии: одно фото — с использованием интерференционного светофильтра на длине волны 416 nm с шириной полосы 10 nm (обозначим его IF416). Другое фото изготавливалось с интерференционным светофильтром IF620 на длине волны 620 nm с той же полосой пропускания. В обоих случаях помимо интерференционных светофильтров использовался широкополосный светофильтр типа СЗС23. Спектры фильтров, как и спектр гемоглобина, приведены на рис. 2, а. Кроме того, на рис. 2, b приведены спек-

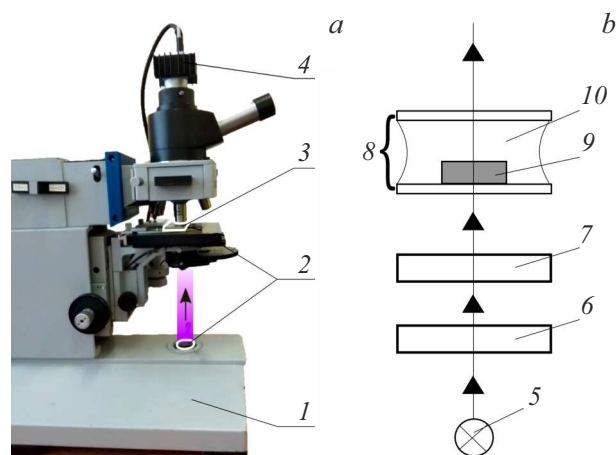


Рис. 1. Экспериментальная установка. Общий вид (а): 1 — микроскоп Люмам Р-8, 2 — система оптических фильтров, 3 — камера Горяева, 4 — цифровая монохромная камера Basler acA1920-40um. Фрагмент оптической системы (b): 5 — галогеновая лампа микроскопа КГМ9-70КГМ9-70, 6 — широкополосный сине-зеленый стеклянный (СЗС) светофильтр, 7 — интерференционный светофильтр IF416 или IF620, 8 — камера Горяева с раствором нативной донорской крови, 9 — модель эритроцита, 10 — раствор плазмы.

тральные характеристики источника света микроскопа и чувствительности цифровой камеры.

В отличие от иных форменных элементов крови эритроциты обладают естественным сенсibilизатором — гемоглобином, который наиболее интенсивно поглощает свет в области 415 nm (полоса Сорэ — оксигемоглобин). Именно поэтому в установке использовался интерференционный светофильтр с близкой длиной волны $\lambda = 416$ nm. Фильтр типа СЗС23 предназначен для исключения негативного влияния побочной полосы пропускания светофильтра IF416 и, как результат, усиления избирательности регистрируемого камерой оптического сигнала к содержанию гемоглобина в эритроците. Заметим, что спектр галогеновой лампы $I(\lambda)$, как и чувствительности камеры $R(\lambda)$ на рис. 2, b представлены в относительных единицах.

2. Принципы идентификации эритроцитов

Первой проблемой в ряду задач по определению характеристик эритроцитов является их идентификация и выделение среди форменных элементов анализируемой пробы крови. Принцип идентификации эритроцитов, предложенный в [12], основан на сравнении яркости пикселей, принадлежащих эритроцитам, и пикселей, соответствующих фону фотоизображения. Причем такое сравнение проводится на двух длинах волн: 416 и 620 nm. Применение светофильтра IF416 обосновано ниже в разд. 4.3.1, использование интерференционного

светофильтра IF620 носит вспомогательный характер — он служит для усиления отличия яркости фона от яркости фотоизображения эритроцита, т.е. для улучшения достоверности идентификации эритроцита. Подробно алгоритм идентификации и счета эритроцитов изложен в [12]. Достигнутая в [12] достоверность распознавания эритроцитов по сравнению с методом проточной цитометрии (гемоанализатор Sysmex XS 1000i) не менее 97%.

В настоящей работе для идентификации и счета эритроцитов использованы те же принципы и программные продукты, что и в [12], однако исследуются иные образцы крови, и главное, цель работы шире, нежели в [12] — определение метрологических характеристик эритроцитов и образцов крови в целом. В этой связи некоторые специфические особенности техники проведения экспериментов и методики компьютерной обработки фотоизображений объектов, связанные с поставленной в настоящей работе задачей, будут описаны ниже.

3. Счет эритроцитов и определение их геометрических характеристик

3.1. Счет эритроцитов

Пространственное сканирование фотоизображения пробы крови позволяло по яркости отличить пиксели, которые принадлежат эритроцитам, от пикселей фона. Компьютерная программа [12] позволяла:

- отличить регистрируемые эритроциты от иных форменных элементов крови или артефактов и как результат просуммировать эритроциты;
- в случае образования эритроцитарных агрегатов выявить, сколько эритроцитов входит в состав данного агрегата, и просуммировать их;
- определить площадь, занимаемую каждым регистрируемым эритроцитом;
- определить размер регистрируемого эритроцита, однако с целью недопущения ошибки в определении его размера из рассмотрения исключались те клетки, которые отстоят от края поля зрения ближе $5.5 \mu\text{m}$;
- нумеровать и записывать „адрес“ каждого эритроцита на фотоизображении (в пикселях по осям системы координат) (рис. 3, а).

Следует отметить, что в настоящей работе запись „адресов“ эритроцитов проводилась не только для уточнения концентрации эритроцитов в исследуемой пробе, но и для того, чтобы для каждого эритроцита организовать „паспорт“ с его метрологическими характеристиками.

После распознавания эритроцитов на 10 микрофотографиях раствора крови для каждой из исследуемых проб подсчитывалось их количество на каждом из фотокладов. Расчет концентрации эритроцитов в камере Горяева для каждого фотоизображения производился по

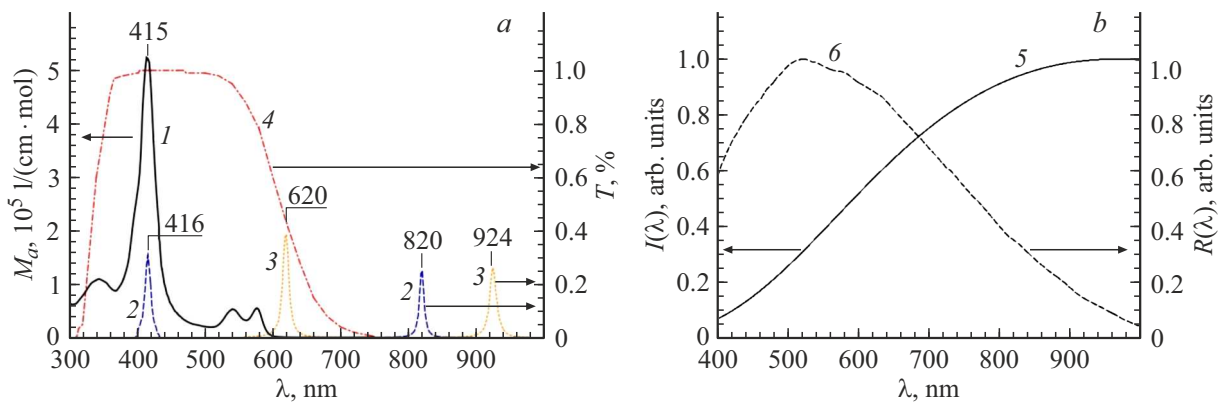


Рис. 2. Спектральные характеристики гемоглобина и светофильтров (а): 1 — молярный коэффициент поглощения оксигемоглобина, 2, 3 — коэффициенты пропускания интерференционных IF416 и IF620 и широкополосного СЗС23 светофильтров соответственно. Спектральные характеристики (b): галогеновой лампы КГМ9-70 (рассчитано по формуле Планка при цветовой температуре 3000 К) (5) и спектральная характеристика чувствительности камеры Basler acA1920-40um (6) (документация камеры).

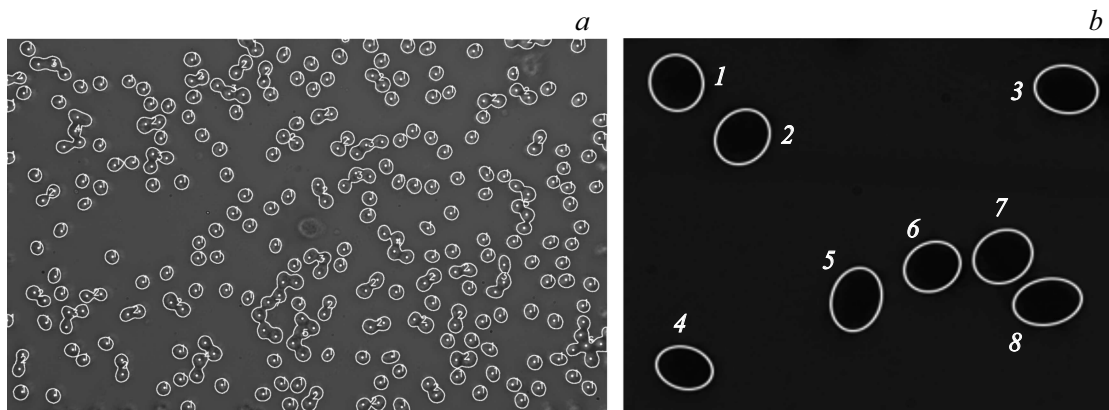


Рис. 3. (а) Оригинальная фотография микропрепарата раствора нативной донорской крови в физиологическом растворе (1 : 100) с нарисованными программным способом контурами распознанных эритроцитов. Точками программным образом указаны найденные центры эритроцитов, а цифрами обозначено количество эритроцитов в каждом из контуров (агрегатов). (b) Фрагмент фотоизображения эритроцитов пробы крови № 2. Для более контрастного восприятия эритроцитов на общем фоне: избранные эритроциты искусственно „оконтурены“ (рисунок соответствует длине волны $\lambda = 416 \text{ nm}$).

формуле

$$RBC = \frac{NR(\Gamma_{об} - \Gamma_{ад})^2}{wzL}, \quad (1)$$

где RBC — концентрация эритроцитов, N — число сосчитанных эритроцитов в поле зрения для определенного фотокадра, R — степень разведения крови физраствором ($R = 0.01$), $\Gamma_{об}$ — увеличение объектива (40), $\Gamma_{ад}$ — увеличение адаптера (1), w — ширина сенсора камеры (0.113 dm), z — высота сенсора камеры (0.071 dm), L — толщина слоя раствора крови в камере Горяева (0.001 dm).

Далее результаты счета величин RBC по формуле (1) усреднялись по 10 фотокадрам данной пробы крови. Для примера результаты счета концентрации эритроцитов RBC для пробы крови № 2 приведены ниже в разд. 5 и сопоставлены с результатами счета для этой же пробы проточным методом.

Рисунок 3, b предназначен для обсуждения возможности составления индивидуального „паспорта“ каждого из эритроцитов пробы крови (разд. 5).

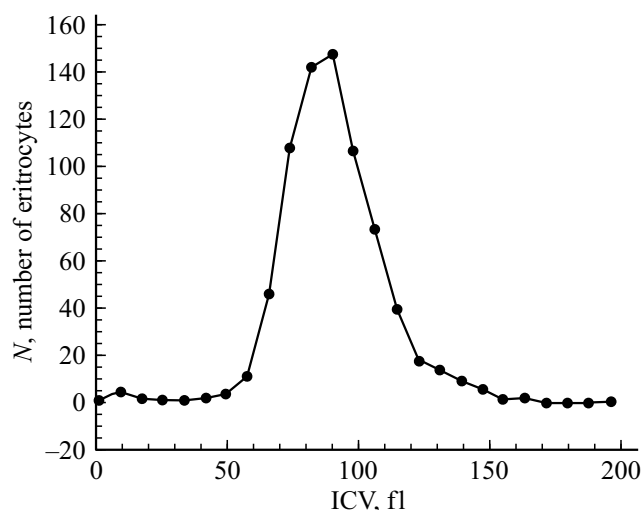
3.2. Определение геометрических характеристик эритроцитов

К стандартным геометрическим характеристикам эритроцитов следует отнести средний объем одного эритроцита MCV, распределение эритроцитов по объему RDW, в том числе RDW-CS и RDW-SD (разд. 1), гематокрит HCT.

Распознавание пикселей, относящихся к эритроцитам (не к фону), позволило определить площадь (pix), занимаемую каждым эритроцитом на поверхности фотоизображения данного раствора крови. Естественно, при известном масштабе эта площадь может быть пересчита-

Таблица 2. Числовые данные, необходимые для проведения количественных оценок

$I_0(620)$	0.57 arb. units
$I_0(416)$	0.094 arb. units
$I_0(620)/I_0(416)$	6.0
$T_{IF416}(416)$	31%
$T_{IF620}(620)$	38.4%
$T_{IF}(620)/T_{IF416}(416)$	1.24
$T_{ISZS23}(416)$	100%
$T_{C3C23}(620)$	43%
$T_{C3C23}(620)/T_{ISZS23}(416)$	0.43
$R(620)$	0.89
$R(416)$	0.68
$R(620)/R(416)$	1.3
α	5.36

**Рис. 4.** Распределение эритроцитов по объемам для пробы крови № 1 (табл. 1). Общий объем выборки эритроцитов данной пробы крови на 10 фотокадрах — 744.

на в единицах μm^2 . Аппроксимируя найденную площадь эритроцита площадью круга, легко найти эффективный диаметр каждого эритроцита d .

Для расчета индивидуального объема эритроцита (ICV — individual corpuscular volume) можно воспользоваться формулой [13]

$$\text{ICV} = 0.16d^3. \quad (2)$$

Как отмечено выше, каждый эритроцит пронумерован, известны его координаты в пикселях, в его „паспортные“ данные могут быть внесены размер и индивидуальный объем клетки ICV. Для примера на рис. 4 приведено распределение эритроцитов по объемам для одного из фотоизображений пробы крови.

Суммируя величины ICV эритроцитов анализируемого фотоизображения и разделив сумму на число эритроцитов, можно найти стандартную характеристику пробы

крови MCV. Однако стоит отметить, что предлагаемый подход позволяет определить не только усредненный параметр крови MCV, но и индивидуальный ICV.

На основе результатов, подобных рис. 4, для исследуемых проб крови можно определить такие параметры, как RDW-SD и RDW-CV [13] (табл. 6 в разд. 5). Кроме того, суммируя найденные объемы эритроцитов ICV данного фотоизображения при известном соответствующем объеме раствора крови, а также степени ее разведения, нетрудно подсчитать гематокрит НСТ (результаты — ниже в табл. 6, разд. 5 в сравнении с результатами проточной цитометрии из табл. 1).

Таким образом, показано, что метод статической спектральной цифровой микроскопии позволяет не только осуществлять подсчет количества эритроцитов RBC в пробе крови, но и определять индивидуальные параметры эритроцитов ICV, а также (как результат) общепринятые средние метрологические величины красных клеток MCV, RDW и НСТ.

4. Принципы определения характеристик эритроцитов, связанных с содержанием гемоглобина

К стандартным характеристикам эритроцитов, несущих информацию о содержании гемоглобина, относятся HGB, MCH и MCHC. Традиционно эти параметры определяются в следующей последовательности: 1) определение содержания гемоглобина в единице объема пробы крови HGB [g/l]; 2) при известной концентрации эритроцитов RBC [l^{-1}], используя HGB, нетрудно определить среднее количество гемоглобина в клетке MCH [g], 3) определив параметр MCH, при известном среднем объеме эритроцитов MCV можно найти среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците $\text{MCHC} = \text{MCH}/\text{MCV}$ [g/l]. Стоит отметить, что все эритроциты при этом полагаются одинаковыми, содержащими равные массы гемоглобина, что весьма сомнительно.

Одна из задач настоящей работы — изучение возможности определения индивидуальных характеристик каждого эритроцита (ICH — individual cell hemoglobin, ICHC — individual corpuscular hemoglobin concentration) на основе статической спектральной цифровой микроскопии. Естественно, при нахождении ICH и ICHC будут использованы индивидуальные геометрические характеристики эритроцитов, описанные в разд. 3.2. Алгоритм нашего анализа будет обратным по отношению к традиционному: 1) нахождение ICHC, 2) определение $\text{ICH} = \text{ICHC} \times \text{ICV}$ и, наконец, 3) $\text{HGB} = \text{ICH} \times \text{RBC}$. Но при этом важно отметить, что все эритроциты полагаются индивидуальными, появляется возможность завести „паспорт“ на каждый из них с перечнем их собственных метрологических характеристик. Подчеркнем, что такой

Таблица 3. Сравнение теоретических и экспериментальных соотношений яркостей $\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}$ для четырех исследуемых проб нативной крови

№	Из табл. 1		$D, \mu\text{m}$	$H, \mu\text{m}$	$B_{\text{rbc}}(620)/B_{\text{rbc}}(416)$		$K (12)$
	MCHC, g/l	MCV, fl			Теория (11)	Эксперимент	
	1	2					
1	341	80.9	7.97	1.63	15.15	1.39	0.092
2	344	78.1	7.87	1.60	14.93	1.41	0.094
3	371	87.2	8.17	1.67	16.98	1.47	0.087
4	393	90.9	8.28	1.69	18.95	1.49	0.079

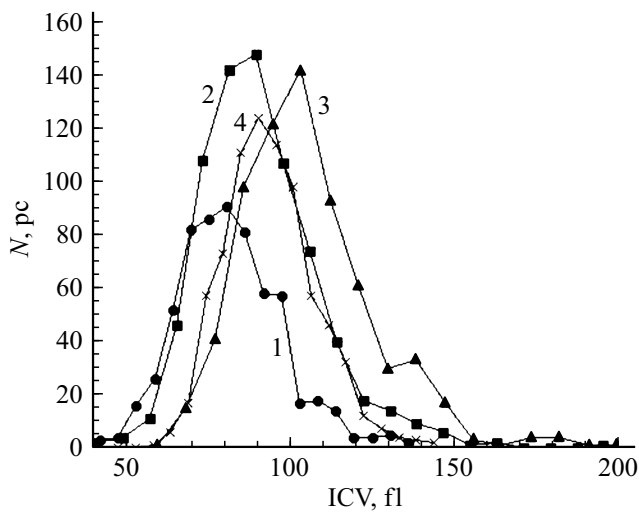


Рис. 5. Распределение эритроцитов четырех проб крови по объему. Номер кривой совпадает с номером пробы крови (табл. 1).

подход не исключает определение традиционных средних параметров HGB, MCH и MCHC.

4.1. Определение соотношения яркостей фотоизображения эритроцита на двух длинах волн

В разд. 2 отмечено, что при микроскопическом исследовании образцов крови изготавливались два типа фотографий: 1) с использованием светового потока лампы микроскопа, пропущенного через последовательность двух светофильтров — широкополосного СЗС23 и интерференционного IF416 с максимумом пропускания на длине волны 416 nm (рис. 1, b); 2) с использованием светофильтров СЗС23 + IF620 ($\lambda = 620$ nm). Назначение этих элементов и их характеристики приведены в разд. 1.2 и на рис. 2. Здесь же подчеркнем, что такие важные для проведения количественных оценок характеристики элементов экспериментальной установки (рис. 1), как спектральная характеристика чувствительности камеры Basler acA1920-40um, а также спектр

галогеновой лампы КГМ9-70, известны нам и представлены на рис. 2, b в относительных единицах.

Поэтому с учетом линейности световой характеристики фотокамеры Basler acA1920-40um для определения ИСНС в качестве измеряемого параметра было выбрано отношение яркостей фотоизображения эритроцита на вышеуказанных длинах волн $[B(620)/B(416)]$.

В общем виде яркость пикселя фотоизображения определяется как

$$B = \int_{400}^{1000} I(\lambda)R(\lambda) \exp(-\mu_a(\lambda)h)d\lambda, \quad (3)$$

где $I(\lambda)$ — спектральная интенсивность света, прошедшего сквозь эритроцит и падающая на матрицу фотокамеры, $R(\lambda)$ — спектральная чувствительность камеры, μ_a — спектральный коэффициент поглощения света гемоглобином, h — высота слоя, соответствующего толщине анализируемого эритроцита.

Для простоты запишем отношение яркостей $B_{\text{rbc}}(620)/B_{\text{rbc}}(416)$ в виде их пиковых значений на указанных длинах волн при прохождении света через эритроцит (поправка на интегрирование по спектру будет сделана ниже):

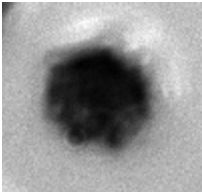
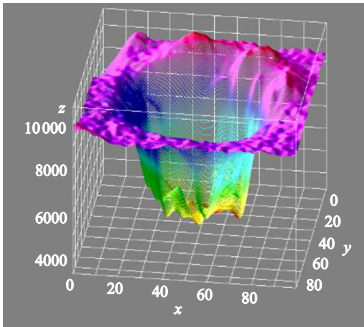
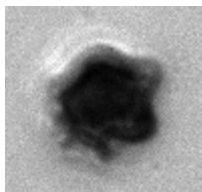
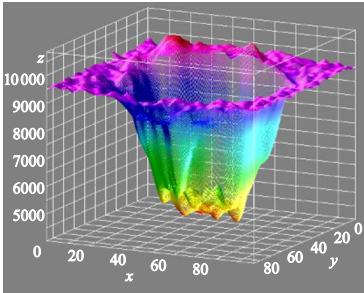
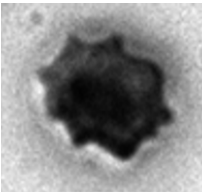
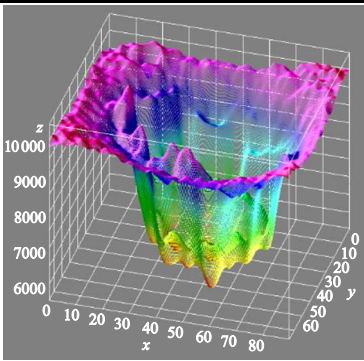
$$\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right) = \frac{B_0(620)}{B_0(416)} \exp(-(\mu_a(620) - \mu_a(416))h), \quad (4)$$

где $\frac{B_0(620)}{B_0(416)}$ — отношение яркостей фотоизображения в отсутствие эритроцита (фон), индекс „rbc“ в выражении $\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}$ показывает, что (4) записана для любого одиночного эритроцита. Величины $\mu_a(620)$ и $\mu_a(416)$ — коэффициенты поглощения света гемоглобином на длинах волн 620 и 416 nm. Величину $\frac{B_0(620)}{B_0(416)}$ можно найти, анализируя на фотоизображении межэритроцитарное пространство:

$$\alpha = \frac{B_0(620)}{B_0(416)} = \frac{I_0(620) T_{\text{IF620}}(620) T_{\text{СЗС23}}(620) R(620)}{I_0(416) T_{\text{IF416}}(416) T_{\text{ISZS23}}(416) R(416)}, \quad (5)$$

где в (5) приведены отношения следующих величин на длинах волн 416 и 620 nm: интенсивностей излучения

Таблица 4. Характеристики избранных эритроцитов, их фото и распределение яркости фотоизображений от координат

№	Параметры эритроцита и фотоизображения	Фото эритроцита	Зависимость яркости пикселей фотоизображения эритроцита от координат $B(x, y)$
	1	2	3
1	Диаметр $8.2 \mu\text{m}$ ICN 11.11 pg $100 \times 96 \text{ pixels}$; 16 bit		
2	Диаметр $8.2 \mu\text{m}$ ICN 14.65 pg $98 \times 96 \text{ pixels}$; 16 bit		
3	Диаметр $6.1 \mu\text{m}$ ICN 5.45 pg $90 \times 76 \text{ pixels}$; 16 bit		

лампы микроскопа $\frac{I_0(620)}{I_0(416)}$, коэффициентов пропускания широкополосного сине-зеленого $\frac{T_{\text{СЗСЗ}}(620)}{T_{\text{СЗСЗ}}(416)}$ и интерференционных $\frac{T_{\text{Ф620}}(620)}{T_{\text{Ф416}}(416)}$ светофильтров, а также спектральных значений чувствительности фотокамеры $\frac{R(620)}{R(416)}$. Здесь следует отметить, что величина $\frac{B_0(620)}{B_0(416)}$ записана в (5) без

учета ахроматизма объектива микроскопа, просветления оптики, а также без учета дисперсионной зависимости коэффициента пропускания света раствором плазмы (эти факторы будут рассмотрены в разд. 4.3.1). При расчете величины α (5) исходим из параметров оптической части установки, приведенных в табл. 2.

Числовые данные табл. 2: а) основаны на графиках рис. 2, б) при расчете величины α проведено численное интегрирование (3) по длинам волн, причем пределы интегрирования соответствовали спектрам рис. 2.

Увяжем $\mu_a(620)$ и $\mu_a(416)$ [см⁻¹] с молярным коэффициентом поглощения света $M_a(\lambda)$, зависящим от длины световой волны:

$$\mu_a = 2.303 \frac{M_a(\lambda) \text{ICHC}}{64500}, \quad (6)$$

где число 64500 — молярная масса гемоглобина [g/mol]. Тогда (4) можно переписать:

$$\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)} = \frac{B_0(620)}{B_0(416)} \exp\left(\frac{-2.303(M_a(416) - M_a(620)) \text{ICHC}}{64500}\right) h, \quad (7)$$

где величины $M_a(416) = 521880$ и $M_a(620) = 942[(1/\text{cm})/(\text{l/mol})]$ [14]. Обозначим

$$\beta(h) = \left(\frac{2.303(M_a(416) - M_a(620))}{64500}\right) h = \beta_0 h, \quad (8)$$

где $\beta(h)$ — функция высоты слоя гемоглобина h . Подстановка вышеуказанных величин в (8) дает $\beta_0 = 18.6[(\text{cm}^{-1})(\text{l/g})]$. С учетом (8) выражение (7) можно переписать как

$$\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right)_{\text{теор}} = \alpha \exp(\beta_0 h \text{ICHC}). \quad (9)$$

Заметим, что в левой части (9) дописан индекс „теор“. Он означает, что, согласно (9), для определенных величин α , β_0 , h и ИСНС отношение яркостей $\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}$ должно принимать вполне конкретное значение. Однако в эксперименте некоторые неучтенные факторы (будут рассмотрены в разд. 4.3.1 и 4.3.2) могут привести к корректировке (9). Поэтому предусмотрительно введем в (9) некий безразмерный постоянный коэффициент K для согласования теоретических результатов с экспериментальными. Тогда в эксперименте должны получить

$$\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right)_{\text{эксп}} = K 5.36 \exp(18.6 h \text{ICHC}). \quad (10)$$

В соотношении (10) ИСНС — искомая величина для каждого эритроцита на фотоизображении образца исследуемой крови, $\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right)_{\text{эксп}}$ — измеряемая величина. Величина h — высота эффективного слоя, содержащего гемоглобин и пропорциональная толщине эритроцита, для разных анализируемых эритроцитов значения h различны. Значения h рассчитывались по формуле $h = \frac{0.64d}{\pi}$, полученной путем приравнивания объема анализируемого эритроцита ICV (2) объему его цилиндрической модели $V = \frac{\pi d^2 h}{4}$. При этом диаметр d определялся исходя из площади фотоизображения эритроцита при

Таблица 5. Пример индивидуальных, „паспортных“ данных нескольких эритроцитов образца нативной крови № 2

Номер эритроцита	ICV, fl	ICHC, gl	ICH, pg	H, μm
1	77	345	26.5	1.59
2	77	348	26.7	1.59
3	75	365	27.3	1.58
4	75	368	27.6	1.58
5	83	362	30	1.63
6	74	358	26.4	1.57
7	78	355	27.7	1.60
8	80	359	28.7	1.61

аппроксимации в виде круга. Результаты счета h для избранных эритроцитов (рис. 3, б) будут приведены ниже в табл. 5.

Очевидно, что измеряя $\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}$, можно было бы определить концентрацию гемоглобина в эритроците ИСНС (10), однако остается неизвестным коэффициент K . С целью его нахождения обратимся к эксперименту.

4.2. Калибровка макета гемоанализатора, основанного на методе спектральной цифровой статической микроскопии

Как и в серийном проточном гемоанализаторе, например Sysmex XS 1000i, воспользуемся образцами крови с ранее установленными средними параметрами эритроцитов (табл. 1), в частности, параметром МСНС. По аналогии с Sysmex XS 1000i будем называть их контроллерами. Запишем для них соотношения (9) и (10) в виде

$$\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right)_{\text{теор}} = 5.36 \exp(18.6 H \times \text{МСНС}), \quad (11)$$

$$\left(\frac{B_{\text{rbc}}(620)}{B_{\text{rbc}}(416)}\right)_{\text{эксп}} = K 5.36 \exp(18.6 H \times \text{МСНС}). \quad (12)$$

Здесь в отличие от (9), (10) H — среднее значение h для эритроцитов данного фотоизображения, а индекс „rbc“ показывает, что величины $B_{\text{rbc}}(620)$ и $B_{\text{rbc}}(416)$ являются средними яркостями фотоизображений эритроцитов по всему множеству этих клеток данного фотокадра на соответствующих длинах волн.

Заметим, что для применения (11) и (12) величину K следует вычислять независимо от этих формул, ориентируясь на средние характеристики эритроцитов контроллера. Для этого преобразуем формулу (2) к виду

$$\text{MCV} = 0.16 D^3. \quad (13)$$

Подстановка в (13) MCV из табл. 1 позволяет определить средний диаметр эритроцита D для любого контроллера. Приравняем средний объем эритроцита MCV

объему эквивалентного плоскопараллельного цилиндра („таблетки“) диаметром D и высотой H (рис. 1, b): $MCV = \left(\frac{\pi D^2}{4}\right)H$. Результаты оценок величин D и H , впрочем, как и параметров МСНС и МСV, приведены в табл. 3.

Из табл. 3 видно:

1) экспериментальные значения $\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}$ возрастают с ростом параметра МСНС;

2) теоретические значения $\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}$ (формула (11)) более, чем на порядок, отличаются от экспериментальных величин (возможные причины будут рассмотрены в разд. 4.3);

3) коэффициент K не постоянен, зависит от свойств эритроцитов пробы крови; поэтому в дальнейшем при расчетах индивидуальных параметров исследуемых проб крови будем использовать среднее значение полученных величин $K_{\text{ср}} = \frac{1}{n} \sum K_i = 0.088$, где $i = 1, 2, 3, 4$, а $n = 4$.

Будем полагать, что значение коэффициента $K_{\text{ср}}$, установленное на основе анализа фотоизображения эритроцитов контролера с использованием параметров образцов крови (табл. 1 и 2), измеренных методом проточной цитометрии, применимо и для случая, когда характеристика ИНС определяется исключительно методом ССЦМ. Тогда преобразуем формулу (10) для получения этого параметра для одного, но любого из эритроцитов:

$$I_{\text{НС}} = \frac{\ln\left(\frac{\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{эксп}}}{K_{\text{ср}} 5.36}\right)}{18.6h}, \quad (14)$$

Легко видеть, что определение ИНС (14) дает возможность нахождения двух других параметров, связанных с содержанием гемоглобина в пробе крови — МСН и НGB.

4.3. Физические явления, обуславливающие коэффициент K , введенный для согласования теоретических результатов с экспериментальными

Коэффициенты K (табл. 3) и, следовательно, $K_{\text{ср}}$ были подсчитаны в результате сопоставления экспериментальных значений $\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}$ с теоретически рассчитанными для проб крови с известных параметрами, например для контроллера № 2 (МСНС = 344 г/л и $H = 1.60$). С целью анализа трансформации интенсивности (яркости) зондирующего светового луча при прохождении оптических элементов установки (рис. 1, b), а также биообъекта проведем анализ численных значений отношения яркостей $\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}$ на этом примере. Из табл. 3 видно, что теоретически отношение яркостей $\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{теор}}$ должно составлять 14.93 (формула (11)), т. е. яркость $B_{\text{rbc}(620)}$ должна превышать $B_{\text{rbc}(416)}$ более, чем на порядок. Это связано с тремя факторами: 1) изначально интенсивность лампы микроскопа $I_0(620) > I_0(416)$ (рис. 2), 2) соотношения

коэффициентов пропускания светофильтров, а также чувствительности камеры на используемых длинах волн (табл. 2); 3) значительно более сильное поглощение света гемоглобином на $\lambda = 416 \text{ nm}$ по сравнению с $\lambda = 620 \text{ nm}$ (рис. 2).

Однако в эксперименте это отношение составило лишь $\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{эксп}} = 1.41$. Это означает, что при прохождении света через оптическую систему установки и биообъект возникают некие явления, приводящие к ослаблению отношения яркостей на избранных длинах волн в $14.93/1.41 = 10.59$ раза и не учтенные нашей моделью (заметим, что $K = 1/(10.59) = 0.094$, табл. 3). Прежде всего к таким факторам можно отнести: 1) дисперсионную зависимость коэффициента пропускания света слоем раствора плазмы, находящимся поверх осевшего эритроцита в камере Горяева (рис. 1, b), 2) ахроматизм микроскопа и просветление его оптики.

4.3.1. Влияние дисперсии раствора плазмы крови и оптических элементов микроскопа на отношение яркостей $(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}})_{\text{эксп}}$

Собственные специальные фотометрические измерения показали, что для цельной плазмы крови отношение $T(620)/T(416) = 1.97$, однако при разведении плазмы 1 : 16 это соотношение уже равно 1.05, а для принятого в статье разведения крови (плазмы) 1 : 100 коэффициенты пропускания практически равны $T(620) \approx T(416)$ — дисперсия отсутствует.

Для выявления влияния ахроматизма, просветления оптики микроскопа на отношение яркостей $\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{эксп}}$ следует исключить из рассмотрения прохождение светового потока через эритроцит. Это означает, что необходимо проанализировать значения яркостей на длинах волн 416 и 620 nm для „межэритроцитарных“ пространств (фон) для разных проб крови. Эти участки соответствуют раствору плазмы, для которой при данных разведениях крови, как показано выше, дисперсия практически отсутствует. Обработка участков фона на фотоизображениях (рис. 3) показала, что в пределах фотокадра значения яркости варьируют, поэтому на кадре среднее значение яркости фона определялось по 10 выбранным „межэритроцитарным“ зонам. Кроме того, среднее значение фона было различным для разных проб крови. Однако в целом результат таков: при прохождении световых потоков, сформированных лампой микроскопа и системой светофильтров, сквозь раствор плазмы и оптическую систему микроскопа отношение яркостей $\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{эксп}}$ в среднем по рассмотренным четырем пробам крови ослаблялось в 6.12 ± 0.22 раза (отклонение по пробам от среднего $\pm 3.6\%$). То есть дисперсия оптической системы микроскопа изменяет величину отношения $\left(\frac{B_{\text{rbc}(620)}}{B_{\text{rbc}(416)}}\right)_{\text{эксп}}$ на обратную. Поясним: если отношение яркостей зондирующих биообъект потоков составляло $\alpha = \frac{B_0(620)}{B_0(416)} = 5.36$ (формула (5) и

Таблица 6. Сравнение характеристик эритроцитов образца крови № 2, полученных методами ССЦМ и проточной гемоцитометрии

Параметры эритроцитов	Метод статической спектральной цифровой микроскопии	Метод проточной гемоцитометрии
RBC	4.03E + 12	4.47E + 12
CV	78.5	78.1
CH	27.4	26.8
CHC	355	344
HGB	112	120
HCT	31.7	34.9
RDW SD	31	37.5
RDW CV	1.24	13.6

табл. 2), т.е. $B_0(620) > B_0(416)$, то после ослабления отношения яркостей $\left(\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}\right)_{эксп}$ микроскопом в 6.12 раза становится справедливым обратное неравенство $B_0(620) < B_0(416)$. Эти оценки справедливы для случая прохождения световых потоков сквозь раствор плазмы и здесь, действительно, $B_0(620) < B_0(416)$.

Однако для световых зондирующих лучей, проходящих сквозь эритроцит, ситуация меняется: в связи с сильным поглощением света на длине волны 416 nm доля излучения фиолетового спектра снижается, а тогда отношение $\left(\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}\right)_{эксп}$ возрастает. Об этом свидетельствует табл. 3: из нее видно, что для рассматриваемой в качестве примера пробы крови № 2 в отсутствие дисперсии оптики микроскопа отношение $\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}$ должно составлять 14.93 (формула (10)). Но с учетом ослабления микроскопом этого отношения его значение составит $14.93/6.12 = 2.44$, т.е. $B_{rbc}(620)$ по-прежнему превышает $B_{rbc}(416)$, но всего лишь в 2.44 раза. В то же время из табл. 3 видно, что реально в эксперименте $\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)} = 1.41$. Это означает, что помимо дисперсии оптической системы микроскопа существует еще одна причина реального снижения отношения яркостей в $2.44/1.41 = 1.73$ раза. Какова она? Таким образом, при определении ИСНС эритроцита (14) коэффициент ослабления $(1/K_{cp})$ измеряемой величины отношения $\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}$ может рассматриваться как произведение двух ослаблений:

$$\frac{1}{K_{cp}} = \left(\frac{1}{K_1}\right) \left(\frac{1}{K_2}\right), \quad (15)$$

где в данной работе $K_{cp} = (1/10.59)$ (формула (11) — интегральное ослабление), $(1/K_1) = 6.12$ — ослабление микроскопом за счет дисперсионных свойств его оптических элементов, $(1/K_2) = 1.73$ — ослабление измеряемой величины, природу которого следует изучить.

4.3.2. Оптические явления на эритроците как причина снижения отношения яркостей $\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}$

Рассмотрим для примера фотографии трех эритроцитов (табл. 4) при большем увеличении, чем на рис. 3.

На всех изображениях в табл. 4 эритроциты по краям имели светлый отблеск (область с яркостью выше яркости фона). Заметим, что „горы“ отблеска на краю распределений $B(x, y)$ (колонка 3) коррелируют с местом положения отблесков на фото эритроцитов (колонка 2). Складывается впечатление, что причиной отблеска в основном является дифракция света на краю эритроцитов. Тогда логично предположить, что при уменьшении размеров эритроцитов относительный вклад дифракционного отблеска будет выше. То есть площадь повышенной яркости относительно всей площади эритроцита возрастает с уменьшением размеров эритроцитов. При этом вычисляемое содержание гемоглобина МСН должно уменьшаться. Действительно, площадь третьего эритроцита с минимальным диаметром меньше площадей предыдущих двух эритроцитов в 1.8 раза для каждого, однако содержание гемоглобина в нем оказывается в 2–2.7 раз меньше. Следует обратить внимание на то, что у последнего, третьего эритроцита темная область в его центральной части минимальна, что соответствует минимуму МСН.

Возможно, помимо дифракции света на эритроците определенную роль играет „линзовый эффект“: эритроцит в силу своей формы и отличия его показателя преломления от того же параметра для физиологического раствора может рассматриваться как сложное сочетание собирающей и рассеивающей линз. Ранее на это обстоятельство мы обращали внимание при экспериментальном изучении прохождения светового луча через структуру эритроцита [15], а также при обнаружении явления „высвечивания“ лейкоцитов в задаче счета форменных элементов крови методом статической микроскопии [9].

В целом такие оптические явления как дифракция на эритроците и „линзовый эффект“ могут являться причиной, приводящей к вышеупомянутому коэффициенту ослабления отношения яркостей $\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}$, технически равному $(1/K_2) = 1.73$.

5. Экспериментальные результаты

В разд. 4 показано, что метод статической цифровой спектральной микроскопии позволяет не только определять индивидуальные геометрические параметры эритроцитов (ICV), но и индивидуальные характеристики эритроцитов, связанные с содержанием в них гемоглобина (ИСНС, ИСН и, как результат, МСНС, МСН, HGB). Параметр ИСНС рассчитывался по формуле (14) с учетом экспериментальных значений h и отношений $\left(\frac{B_{rbc}(620)}{B_{rbc}(416)}\right)_{эксп}$ для каждого исследуемого эритроцита (коэффициент K_{cp} определен в разд. 4.3.1). Кроме того, напомним, что $ИСН = ИСНС \times ICV$. Для примера на

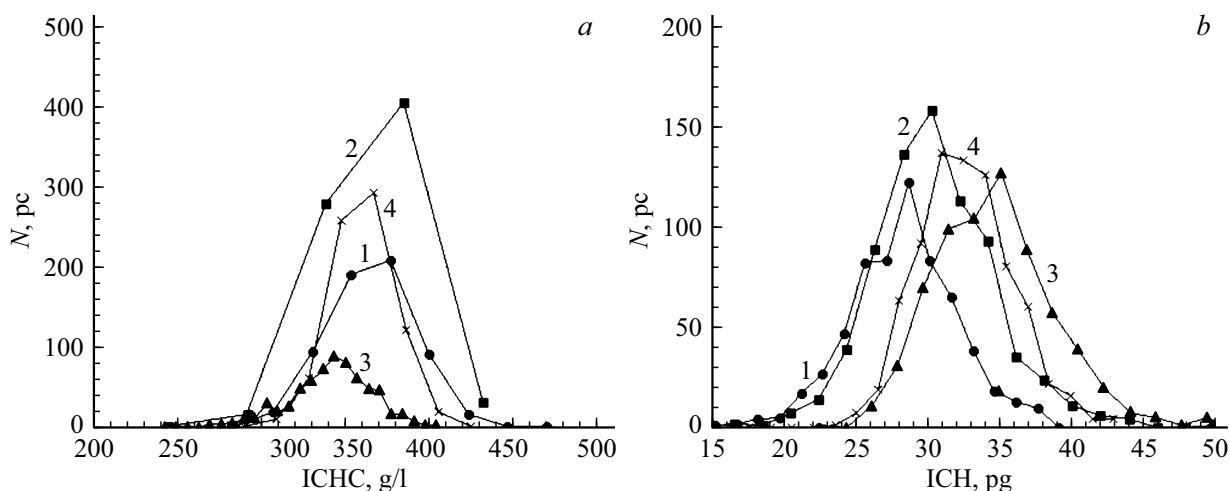


Рис. 6. Распределение гемоглобина по эритроцитам пробы крови № 2: (а) и (b) — зависимости количества эритроцитов N от величины ICHС и ICH соответственно. Номер кривой совпадает с номером пробы крови (табл. 1).

рис. 3, b приведен фрагмент фотоизображения нескольких произвольных эритроцитов, их „паспортные“ данные приведены в табл. 5.

Как отмечалось в разд. 3.2, суммирование индивидуальных параметров эритроцитов позволяет определить их средние стандартно определяемые величины. Выполненные измерения и соответствующие расчеты сведены в табл. 6; они сравниваются с теми же параметрами, но найденными методом проточной цитометрии. Для сокращения объема статьи в табл. 6 приведены лишь результаты для пробы крови № 2, аналогичные результаты получены и для других трех рассмотренных проб.

Из табл. 6 видно, что метод статической спектральной цифровой микроскопии (ССЦМ) дает результаты, близкие результатам проточной гемоцитометрии. В то же время следует отметить, что ССЦМ позволяет получать не только распределение эритроцитов по объему (рис. 5), но и распределение гемоглобина по эритроцитам пробы крови (рис. 6).

Заключение

Предложен метод статической спектральной цифровой микроскопии (ССЦМ) для идентификации и автоматического счета эритроцитов в образцах раствора нативной крови. Главной особенностью метода ССЦМ является принципиальная возможность определять индивидуальные характеристики эритроцитов. В этой связи введены следующие новые параметры эритроцита: ICV (индивидуальный объем клетки), ICH (индивидуальное содержание гемоглобина в клетке), ICHС (индивидуальная концентрация гемоглобина в клетке). При этом эритроциты рассматриваются как отличные друг от друга, без какого-либо усреднения их параметров. Такой подход позволяет создать „паспорт“ на каждый эритроцит с перечнем его метрологических параметров.

Экспериментально показано, что обобщение индивидуальных характеристик эритроцитов данной пробы крови позволяет определять и общепринятые метрологические индексы эритроцитов этой пробы, таких как MCV, MCH, MCHС и RDW. Сравнение этих и других параметров эритроцитов крови, полученных методами ССЦМ и проточной цитометрии, указывает на их удовлетворительное согласие. В то же время метод ССЦМ обладает неким преимуществом: он позволяет получать гистограммы распределения ICH и ICHС по эритроцитам. Это свойство метода может послужить дополнительным инструментом исследований как в гемодиагностике, так и в области фундаментальной гематологии.

Список литературы

- [1] А.Н. Шибанов, Д.Р. Дылдин. Выбираем гематологический анализатор [Электронный ресурс]. URL: <http://unimeda.ru/articles/6826/9671/item/88>
- [2] L. Samsel, J.P. McCoy. *J. Immunol. Meth.*, **423**, 52 (2015). DOI:10.1016/j.jim.2015.03.019
- [3] A. Kihm, L. Kaestner, C. Wagner, S. Quint. *PLOS Computational Biology*, **14** (6), 1 (2018).
- [4] Г.И. Козинец, В.М. Погорелов. *Клетки крови и современные технологии их анализа* (Триана-Фарм, Москва, 2002).
- [5] *Комбайны микроскопии Мекос* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.mecos.ru/products>
- [6] V. Pratihthan. *Int. J. Adv. Res. Electrical, Electronics and Instrum. Engineer.*, **4** (1), 128 (2015).
- [7] A.P. Sahastrabudde. *Int. J. Res. Engineer. Technol.*, **5** (5), 356 (2016).
- [8] A. Hamouda, A.Y. Khedr, R.A. Ramadan. *Int. J. Comput. Sci.*, **1** (2), 13(2012).
- [9] В.А. Дубровский, С.О. Торбин. *Известия Саратовского университета, серия Физика*, **17** (3), 191 (2017).
- [10] S.S. Jacob, K. Prasad, P. Rao. *Frontiers in Physiology*, **10** (1230), 1 (2019).

- [11] М.М. Кугейко, Д.А. Смунев. В сб: *Доклады БГУИР*, под ред. М.П. Батура (Минск, 2016), Т. 101. С. 248.
- [12] В.А. Дубровский, И.В. Забенков, Е.П. Карпочева, С.О. Торбин. *Опт. и спектр.*, **129** (3), 327-341 (2021).
- [13] В.В. Зуб, В.Х. Кириллов, В.М. Кузаконь. *Scientific Works*, **48**, 182–186 (2015).
- [14] *Optical absorption of hemoglobin*. [Электронный ресурс]. URL: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>
- [15] Ю.А. Ганилова, А.А. Долмашкин, В.А. Дубровский, И.Ю. Янина, В.В. Тучин. *Опт. и спектр.*, **115** (2), 68–74 (2013).