

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СЧЕТ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ В ЕЕ НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ НА ОСНОВЕ ЦИФРОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В. А. Дубровский — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой медбиофизики им. проф. В. Д. Зернова, кандидат физико-математических наук; **И. В. Забенков** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры медбиофизики им. проф. В. Д. Зернова, кандидат физико-математических наук; **С. О. Торбин** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, ассистент кафедры медбиофизики им. проф. В. Д. Зернова; **О. Е. Царева** — ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующая КДЛ клиники профпатологии и гематологии им. В. Я. Шустова, кандидат медицинских наук.

CELLS IDENTIFICATION AND COUNTING IN BLOOD NATIVE STATE ON THE BASIS OF DIGITAL MICROSCOPY

V. A. Doubrovski — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Medical Biophysics n.a. Prof. V. D. Zernov, Assistant Professor, Candidate of Physical and Mathematical Science; **I. V. Zabenkov**, — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Medical Biophysics n.a. Prof. V. D. Zernov, Assistant Professor, Candidate of Physical and Mathematical Science; **S. O. Torbin** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Medical Biophysics n.a. Prof. V. D. Zernov, Assistant; **O. E. Tsareva** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Laboratory of Hematology n.a. V. Ya. Shustov, Candidate of Medical Science.

Дата поступления — 18.11.2016 г.

Дата принятия в печать — 30.11.2016 г.

Дубровский В. А., Забенков И. В., Торбин С. О., Царева О. Е. Идентификация и счет форменных элементов крови в ее нативном состоянии на основе цифровой микроскопии. Саратовский научно-медицинский журнал 2016; 12 (4): 549–555.

Цель: разработать алгоритм обработки фотоизображений проб крови в нативном ее состоянии с целью определения концентраций эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов без индивидуальной, отдельной пробоподготовки клеток. **Материал и методы.** Объектом исследования являлась цельная донорская кровь, которая разбавлялась в 400 раз физиологическим раствором. Для идентификации форменных элементов крови предложено использовать специальные «фотошаблоны» эритроцитов, обнаруженный авторами эффект «высвечивания» лейкоцитов, а также разрешение тромбоцитов от лейкоцитов по площади их фотоизображений. **Результаты.** 80 фотоизображений раствора нативной крови отобраны для компьютерной их обработки, при этом общее количество подсчитанных клеток составило: эритроцитов 4184, тромбоцитов 292 и лейкоцитов 84; итогом 4560 форменных элементов. Сопоставление полученных результатов с «ручным» счетом и прибором для счета форменных элементов Sysmex XT-400i дает удовлетворительные результаты. **Заключение.** Показано, что точность счета клеток нативной крови может быть соизмеримой с точностью аналогичных исследований в мазке. В то же время предложенный анализ нативной крови значительно упрощает пробоподготовку по сравнению с мазком, принципиально позволяет перейти от выявления соотношения количеств форменных элементов разного типа к определению их концентраций в образце.

Ключевые слова: форменные элементы крови, счет клеток, цифровая микроскопия, компьютерная обработка фотоизображений.

Doubrovski VA, Zabenkov IV, Torbin SO, Tsareva OE. Cells identification and counting in blood native state on the basis of digital microscopy. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2016; 12 (4): 549–555.

The research goal is to develop an algorithm for the processing of photo images of native blood samples to determine the concentration of erythrocytes, leukocytes and platelets without individual separate preparation of cell samples. **Materials and Methods.** The objects of investigation were the samples of the whole donated blood, diluted 400 times by saline. Special “photo templates”, the effect of “highlighting” of leukocytes, which was detect by authors, and the resolution of platelets from leukocytes by the areas of their photo images were suggested for identification of the cells. **Results.** 80 photo images of native blood solutions were selected for computer processing, while the total number of cells counted was: erythrocytes — 4184, platelets — 292 and leukocytes — 84, total — 4560 blood cells. Comparison of the results achieved with ones obtained by “manual” account or by the device for formed elements counting Sysmex XT-400i gives satisfactory results. **Conclusion.** It is shown that the accuracy of counting of the native blood cells may be comparable with the accuracy of similar studies by means of smears. At the same time the proposed analysis of native blood simplifies greatly the samples preparation in comparison to smears, permits to move from the detection of blood cells ratios to the determination of their concentrations in the sample.

Key words: blood cells, cell counting, digital microscopy, computer processing of photo images.

Введение. Определение количества форменных элементов крови разного типа, их соотношения является важным и наиболее частотным тестом клинической лабораторной диагностики. Исторически идентификация и счет клеток крови производились с использованием микроскопа в «ручном» режиме, при этом исследуемый образец крови находился в статическом состоянии. Развитие оптической проточной цитометрии привело к появлению автоматов для счета форменных элементов крови [1–4]. Проточные гемоцитометры нашли применение и для решения иных диагностических задач, в частности для определения групповой принадлежности крови [5–8].

В последние годы интенсивно развивается иной подход к идентификации и счету форменных элементов крови — метод цифровой микроскопии. На наш взгляд, в настоящее время это перспективное направление находится в стадии проработки, поиска соответствующих оптимальных алгоритмов и программ для минимизации ошибок при счете форменных элементов крови. В работах А. В. Дырнаева рассмотрена задача подсчета эритроцитов на изображениях препаратов крови, полученных с помощью цифрового микроскопа [9–11]. Достигнутая точность счета эритроцитов по отношению к «ручному» способу составляет 96–98% [9].

Автоматическая сегментация и счет эритроцитов на основе анализа микроизображений клеток крови выполнены в работах М. Maitra, R. K. Gupta, M. Muk-

herjee [12], N. H. Mahmood, M. A. Mansor [13], S. M. Mazalan, N. H. Mahmood, M. A. Razak [14]. Результаты, полученные предложенным методом, сравниваются с «ручным»: точность счета эритроцитов в работах N. H. Mahmood и M. A. Mansor [13], S. M. Mazalan, N. H. Mahmood, M. A. Razak [14] составила 96 и 92% соответственно. Изучение возможных методик идентификации и счета эритроцитов в пробе крови проведено в работе A. Pandit, S. Kolhar с соавт. [15]. Интерес представляет работа M. Taherisadr, M. Nasirzouzi с соавт. [16], где не только проведены регистрация и счет эритроцитов на основе микрофотографий, но и анализируются морфологические изменения эритроцитов при различных заболеваниях.

Более сложной по сравнению с идентификацией и счетом эритроцитов является задача распознавания лейкоцитов. M. Alilou и V. Kovalev [17] разработали алгоритм, позволяющий вести счет клеток крови с учетом сложности и произвольности их формы. Авторами экспериментально были использованы публично доступные микроизображения, содержащие 510 вручную отобранных клеток. Результаты показали удовлетворительный уровень детектирования и сегментации клеток предложенным методом: точность счета 94%, повторяемость результатов 88%. Цель: анализ (счет) лимфоцитов для диагностики лейкемии.

Подобная задача для лейкоцитов решалась E. Cuevas, M. Diaz, M. Manzanares с соавт. [18] в условиях аппроксимации лейкоцитов неким эллипсоидом вращения. В отличие от их публикации, где рассматривалась регистрация лейкоцитов в целом, в работе Higemath PS и соавт. [19] предпринята попытка получения лейкоцитарной формулы пробы крови на основе цифровой микроскопии — идентификации лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов. Идентификации некоторых типов клеток лейкоцитов и проверка ее достоверности посвящено исследование Д. Ю. Соснина, Б. Ф. Фалкова, О. Ю. Ненашева [20], ими установлена высокая эффективность распознавания клеток крови здорового человека системой Vision Nema.

Представляется важным заметить, что объектом исследования во всех упомянутых работах [9–20] и многих других, посвященных идентификации и счету форменных элементов крови на основе цифровой микроскопии, являлся окрашенный мазок крови. Окраска образца создает дополнительную контрастность объекта, выделяет особенности морфологии клеток, дает возможность разрешить клетки крови разного типа. В то же время такая предварительная подготовка объекта исследования требует строгого соблюдения определенной технологии, времени подготовки, опыта врача-лаборанта. К сожалению, на практике не всегда можно получить удовлетворительную повторяемость в прокраске объектов, как по всей поверхности мазка, так и от объекта к объекту исследования. Это затруднение особенно принципиально при цифровой обработке фотоизображений, когда при сегментации клеток, как правило, используются определенные пороговые условия, связанные с яркостью пиксель-изображения. Кроме того, анализ мазков позволяет определить соотношение количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, что важно для некоторых задач диагностики, однако он не дает абсолютные величины концентраций этих клеток в пробе крови.

В связи с этим представляет интерес изучение возможности идентификации и счета форменных элементов крови в ее нативном состоянии (без окраски красителем). Отметим, что количество исследований в этом

направлении значительно меньше, нежели с окрашенными мазками крови, хотя для многих диагностических задач такой подход был бы вполне приемлемым. Нам известна лишь работа G. S. Sable с соавт., где делается попытка определения концентрации эритроцитов и лейкоцитов в пробе нативной крови с использованием принципов цифровой микроскопии [21].

Цель: разработка принципов идентификации и счета эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в единой пробе крови в нативном ее состоянии на основе цифровой микроскопии; сравнение результатов компьютерного счета форменных элементов крови с «ручным» подсчетом этих клеток, а также с помощью прибора Sysmex XT-400i (Япония).

Материал и методы. Объектом исследования являлась цельная донорская кровь, которая разбавлялась в 400 раз физиологическим раствором. Капля раствора нативной крови объемом 20 мкл размещалась в камере Горяева. Цифровые фотоизображения объекта изготавливались с помощью микроскопа (ЛОМО БИОМЕД, увеличения объектива 40 \times , окуляра 10 \times , поле зрения 0,2 мм) и фотокамеры (Logitect-Quick Cam — 2 Мегапикселя). При этом разрешение фотоизображений данной оптической системой составляло 8 пкс/мкм. В больших квадратах камеры Горяева (общее число таких квадратов в камере 100) изготавливались фотоизображения пробы крови в различных областях анализируемой капли; 80 из них, в которых помимо эритроцитов и тромбоцитов присутствовали лейкоциты, были отобраны для компьютерной обработки фотографий. Это проводилось в связи с малым стандартным количеством лейкоцитов по сравнению с количеством эритроцитов, а также значительным разведением пробы крови. Такой отбор фотоизображений позволял получить репрезентативную выборку в отношении лейкоцитов (тем более для эритроцитов и тромбоцитов), достаточную для статистической ее обработки.

Оптическая система микроскопа фокусировалась на дно капли, что, казалось бы, требовало перед фотографированием объекта некоторого времени для инкубации клеток с целью их седиментации. Однако, в силу того что высота затора между площадкой камеры, на которую нанесена счетная сетка, и покровным стеклом составляет всего лишь 100 мкм, не было необходимости в большом времени инкубации клеток. Поэтому фотографирование объекта производилось примерно после первой минуты расположения камеры под объективом микроскопа. Типичное фотоизображение образца представлено на рис. 1.

Наиболее важный процесс при обработке фотоизображений — идентификация форменных элементов крови. С этой целью использовался следующий алгоритм действий:

- 1) создание характерных специальных «шаблонов» для эритроцитов на основании идентификации анализируемых эритроцитов путем сравнения их характеристик с аналогичными для избранных «фотошаблонов»;
- 2) анализ большого количества их цифровых фотографий;
- 3) сегментация найденных эритроцитов — выделение зон, в которых располагаются эритроциты, определение координат этих зон;
- 4) подсчет количества эритроцитов на фотоизображении;
- 5) распознавание тромбоцитов и лейкоцитов на основании градиентного подхода при условии исключения зон фотоизображения, занятых эритроцитами;

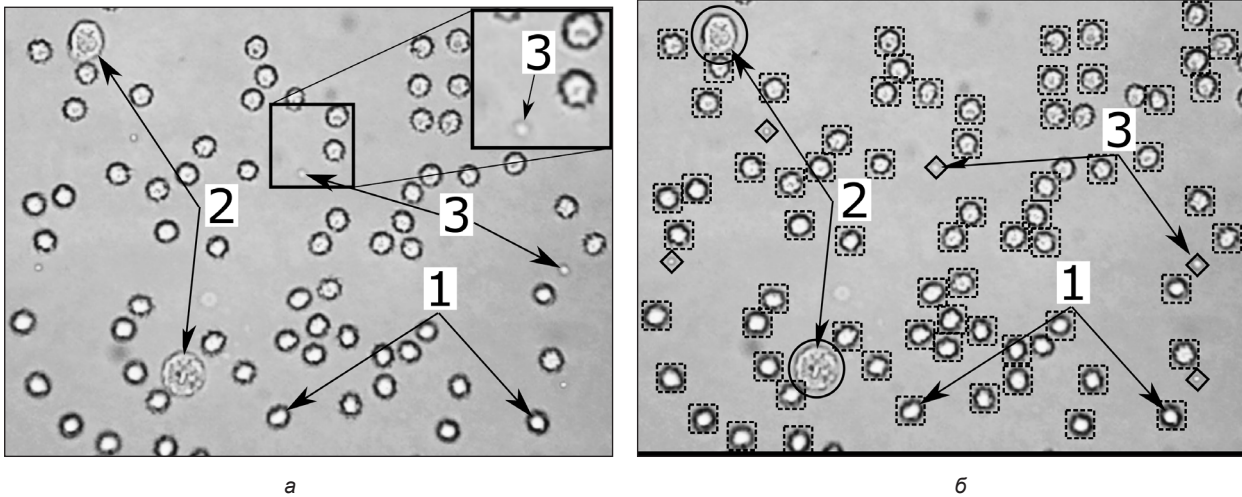


Рис. 1 Фотоизображение форменных элементов крови: а — экспериментально полученное фотоизображение объекта (вставка демонстрирует тромбоцит, который слабо различим на основном изображении в связи с малым размером клетки PLT); б — то же изображение после сегментации эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Обозначения: 1 — эритроциты; 2 — лейкоциты; 3 — тромбоциты; клетки размещены в квадраты, овалы и ромбы соответственно

6) бинаризация изображения (тромбоцитов, лейкоцитов и артефактов);

7) разрешение тромбоцита от лейкоцита и артефакторов по величине площади, занимаемой клеткой на изображении; подсчет тромбоцитов;

8) уточнение присутствия лейкоцита (является ли обнаруженное образование лейкоцитом или артефактом) на основании дополнительного оптического анализа; подсчет лейкоцитов.

Результаты компьютерного счета форменных элементов крови сопоставлялись с результатами «ручного» счета тех же клеток анализируемого изображения, а также счета этих клеток с помощью прибора Sysmex XT-400i. Заметим, что перед компьютерной обработкой фотоизображений разрешение (1600x1200) каждой микрофотографии было

уменьшено в 3 раза (до 532x400) с целью повышения скорости обработки фотоизображений.

Принципы цифровой идентификации эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Большая часть публикаций, посвященных вопросам идентификации форменных элементов крови, связана с использованием геометрических размеров клеток, их форм, морфологии [9–11, 13, 14, 16–18]. Особенностью настоящей работы является использование не только геометрических параметров клеток, но и их оптических свойств.

Идентификация эритроцитов. Избранные типичные, но отличные друг от друга фотоизображения эритроцитов приведены на рис. 2. Здесь же под каждым из фотоизображений эритроцитов показаны

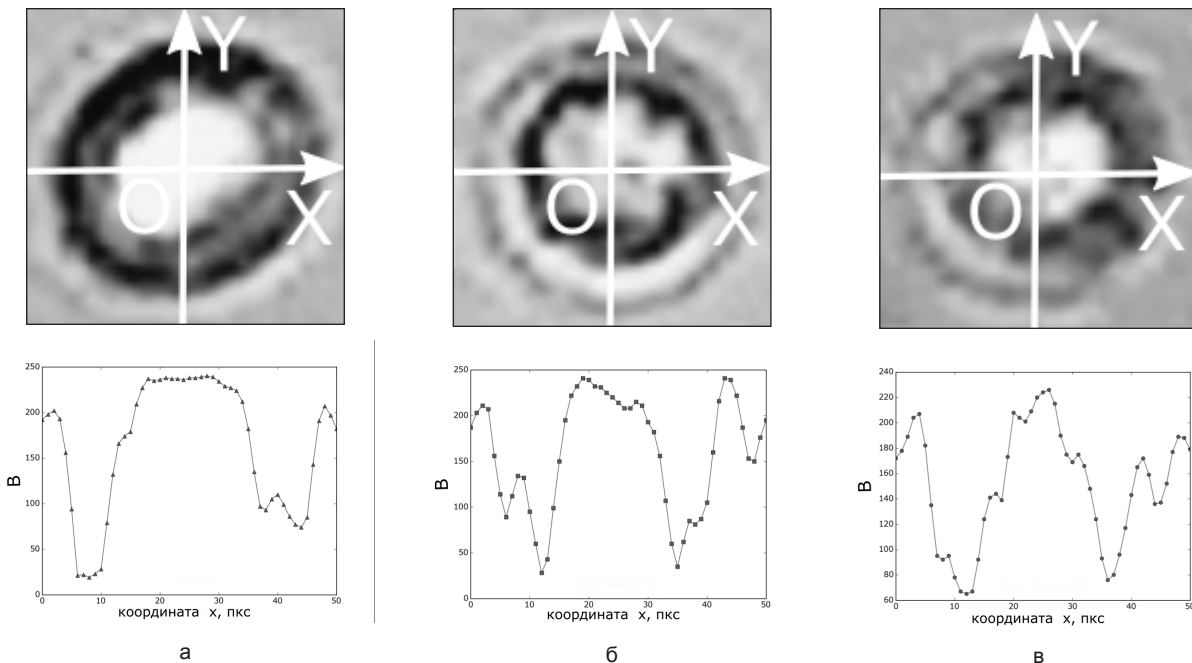


Рис. 2. Изображения эритроцитов и соответствующие распределения яркости изображения $V(x)$ по пикселям вдоль диаметров эритроцитов в горизонтальном направлении

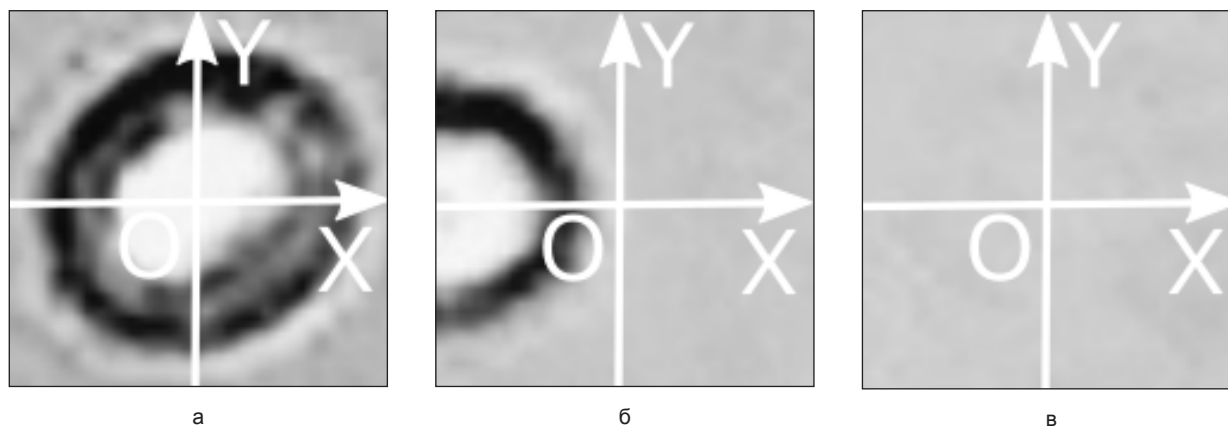


Рис. 3. Возможные варианты изображений объекта в зондируемом «окне»

соответствующие распределения яркости $V(x)$ вдоль диаметра клетки в горизонтальном направлении.

В качестве эталонных объектов (фотошаблонов), с которыми сопоставлялись идентифицируемые эритроциты, выбирались распределения яркости (V — brightness, яркость) вдоль горизонтальной ($V_i(x)$ — шаблон, рис. 2) и вертикальной ($V_i(y)$ — шаблон) осей эритроцитов. Здесь i — номер используемого фотошаблона: из множества десятков предварительно проанализированных эритроцитов (фотошаблонов) выбирались наиболее разноплановые, с тем чтобы, по возможности, обеспечить учет большего количества индивидуальных особенностей эритроцитов (фотошаблонов). Число отобранных фотошаблонов оказалось равным 12, три из них представлены на рис. 2. Заметим, что яркость изображения эритроцита на различных его участках (см. рис. 2) изменялась до 10 и более раз. При обработке фотоизображения в его левом верхнем углу задавалось квадратное зондируемое «окно» размером, несколько превышающим размеры эритроцита. При компьютерном сканировании этого «окна» в него случайным образом мог попасть идентифицируемый эритроцит (рис. 3а), либо его фрагмент (рис. 3б), либо фон (рис. 3в).

Примеры изображений в зондируемом «окне».

Распределения яркостей по центральным осям такого «окна» $V(x)$ и $V(y)$ (см. рис. 3) последовательно сопоставлялись с соответствующими распределениями $V_i(x)$ и $V_i(y)$ двенадцати фотошаблонов (см. рис. 2). Функции распределения яркости как для $V_i(x)$ и $V_i(y)$ фотошаблонов, так и для анализируемого «окна» $V(x)$ и $V(y)$ следует рассматривать как соответствующие статистические выборки. Далее рассчитывались коэффициенты корреляции выборки $V(x)$ с каждой из $V_i(x)$, а $V(y)$ с каждой из выборок $V_i(y)$. Для избранного «окна» таких коэффициентов корреляции было 24 шт., так как число шаблонов составляло 12 по каждой из осей x и y . Объем выборки для каждой из функций $V(x)$, $V(y)$ в пределах одного зондируемого «окна», а также $V_i(x)$ и $V_i(y)$ для каждого из «фотошаблонов» составлял $n=17$ элементов. Для такого объема выборки значение коэффициента корреляции 0,7 является вполне достоверным с уровнем значимости 0,01. Заметим, что достоверность значения коэффициента корреляции 0,7 при уровне значимости 0,001 может быть достигнута при $n=17,3 \approx 17$.

Из множества коэффициентов корреляции $R(x)$ избирался тот, который имеет максимальное числовое значение $R_{\max}(x)$; аналогично находился $R_{\max}(y)$. Из полученных величин $R_{\max}(x)$ и $R_{\max}(y)$ выбирался

максимальный R_{\max} ; его значение сопоставлялось с пороговым $R_{\text{пор}}$ (величина $R_{\text{пор}}$ была принята равной 0,7). Если R_{\max} превышал $R_{\text{пор}}$, то его значение присваивалось точке O (см. рис. 3), в противном случае значение R_{\max} обнулялось. Далее «окно» перемещалось по горизонтали на 1 пиксель и проводились подобные процедуры для нового положения «окна». И наконец, аналогичные действия проводились по всем строкам фотоизображения с межстрочный шагом в 1 пиксель.

В результате полученный статистический массив коэффициентов корреляции R , соответствующий анализируемому изображению, представлял собой набор нулей с отдельными областями, отличными от нуля, эти области воспринимались как распознанные эритроциты. Их координаты устанавливались, осуществлялся подсчет количества эритроцитов, сегментированные эритроциты представлены на рис. 1б. Отметим, что некоторые эритроциты могут оказаться нераспознанными, в основном это близко расположенные клетки или очень специфические по форме эритроциты, к которым трудно применить отобранные эритроцитарные «фотошаблоны».

Идентификация тромбоцитов и лейкоцитов.

Процедура распознавания тромбоцитов и лейкоцитов начиналась с фильтрации тех сегментов изображения, в которых на предыдущем этапе были обнаружены эритроциты. Лейкоциты и тромбоциты в нативном образце крови являются практически прозрачными клетками, что затрудняет использование фотометрического подхода, примененного в предыдущем разделе. Поэтому для этих клеток был использован градиентный подход обработки фотоизображения, включающий в себя распознавание границ клеток, определение их координат, сегментацию клеток. Вслед за сегментацией клеток осуществлялась процедура бинаризации изображения. Эти действия описаны в [22] для регистрации тромбоцитов и их агрегатов. Пример фотоизображений нераспознанных эритроцитов, бинаризованных и сегментированных изображений тромбоцитов и лейкоцитов представлен на рис. 4.

Представленное на рис. 4 изображение соответствует рис. 1б, за исключением одного — в отличие от рис. 1б здесь эритроциты (1) не являются распознанными. Использование размера клетки в качестве параметра для разрешения лейкоцита от тромбоцита затруднительно в связи со сложной формой лейкоцита. Кроме того, количественное отличие лейкоцита от тромбоцита более явственно, если в качестве такого параметра использовать не размер клетки, а площадь

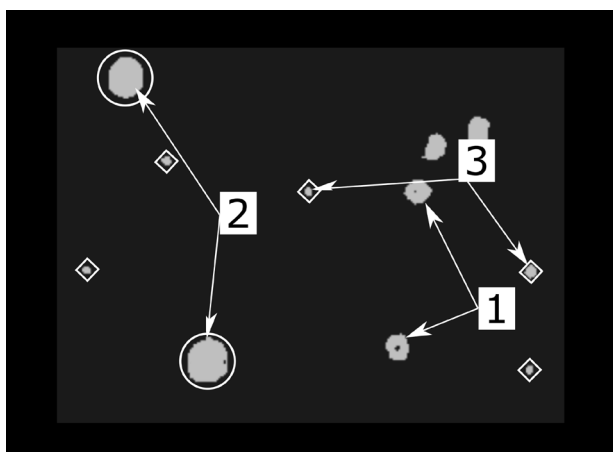
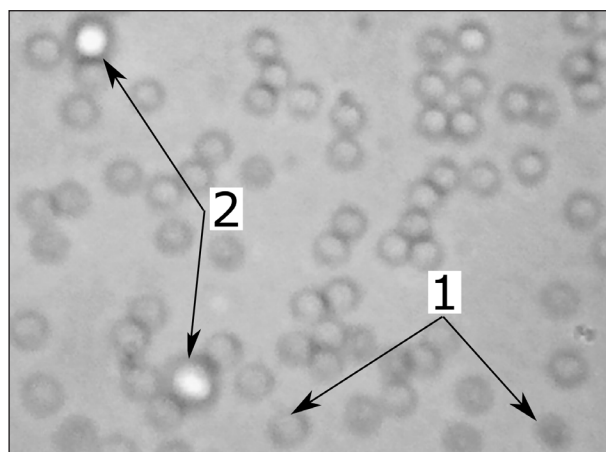
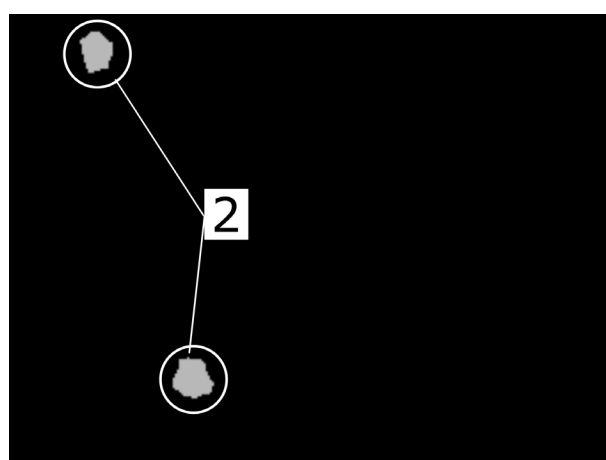


Рис. 4. Фотоизображение нераспознанных эритроцитов (1), сегментированных и бинаризованных лейкоцитов (2) и тромбоцитов (3)



a



б

Рис. 5. Иллюстрация эффекта «высвечивания» лейкоцитов пробы нативной крови при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа (а) и бинаризованное изображение «высвеченных» лейкоцитов (б): 1 — эритроциты; 2 — «высвеченные» лейкоциты

S , занимаемую клеткой на фотоизображении. Кроме того, попиксельный подсчет площади бинаризованного изображения клетки не представляет трудности.

После сегментации лейкоцитов и тромбоцитов, бинаризации изображения и определения величины S производилась фильтрация клеток по размерам площадей: клетки, площадь которых оказывалась ниже порогового значения $S_{пор}$ ($S \leq S_{пор}$), были отнесены к тромбоцитам, производился их подсчет. За пороговую величину принималась $S_{пор}$, соответствующая 15 пикселям для фотоизображений с разрешением 532x400 пиксель, что было адекватно размеру тромбоцита. Клетки с $S > S_{пор}$ можно отнести к лейкоцитам. Для более точного выявления и подсчета лейкоцитов использовалась экспериментально обнаруженное явление.

Идентификация лейкоцитов при дефокусировке цифрового микроскопа. Многократные эксперименты по получению микрофотографий образцов раствора нативной крови выявили интересный эффект: при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа яркость изображений лейкоцитов увеличивается в 2 и более раз («высвечивание» лейкоцитов), в то время как яркость фотоизображений других форменных элементов снижается и, кроме того, происходит размытие границ фотоизображений эритроцитов и тромбоцитов. Под дефокусировкой оптической системы микроскопа понимаем увеличение расстояния между объективом и объектом на несколько микрометров (соизмеримо с размерами самого лейкоцита) относительно первоначального положения микроскопа, настроенного на визуализацию объекта. Этот эффект очевиден, если сопоставить рис. 1а и рис. 5а.

Предполагаемой причиной обнаруженного эффекта является существенное отличие формы и размера лейкоцитов от тех же параметров для тромбоцитов и эритроцитов. Возможно, в этом случае лейкоцит в сочетании с микроскопом работает как дополнительная микролинза. Стоит отметить следующее: 1) обнаруженный эффект наблюдался уверенно во всех случаях присутствия лейкоцитов в растворе нативной крови; 2) эффект «высвечивания» лейкоцитов отсутствовал при наблюдении лейкоцитов в мазке крови. Представляется естественным использование обнаруженного эффекта для распознавания лейкоцитов. Изображение вида рис. 5а обрабатывалось стандартно: сегментация лейкоцитов осуществлялась градиентным образом, полученное

изображение бинаризовалось (см. рис. 5б), осуществлялась процедура заполнения пустот [22] и, наконец, подсчет числа лейкоцитов.

Результаты. 80 фотоизображений раствора нативной крови были отобраны для компьютерной их обработки, при этом общее количество подсчитанных клеток составило: эритроцитов 4184, тромбоцитов 292 и лейкоцитов 84; итого 4560 форменных элементов. Результаты компьютерного счета клеток сопоставлялись с результатами: 1) «ручного» счета форменных элементов той же пробы непосредственно с экрана монитора ПК, 2) счета тех же клеток с помощью прибора Sysmex XT-400i. Сравнение результатов представлено в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация форменных элементов крови

Тип клеток	Компьютерный счет	«Ручной» счет	Sysmex XT-400i
RBC (г/л)	4991	5102	4700
PLT (г/л)	340	356	399
WBC (г/л)	100	102	91

Обсуждение. Известно, что стандартное соотношение количества форменных элементов разного типа RBC/PLT/WBC имеет следующий порядок 720:44:1. Отсюда легко видеть, что количество лейкоцитов значительно меньше числа эритроцитов. Поэтому с целью регистрации большего числа лейкоцитов, достаточного для статистической обработки выборки WBC, выбирались лишь те фотокадры, на которых имелись изображения лейкоцитов. Этим объясняется факт, что в табл. 1 соотношения RBC/WBC и PLT/WBC не соответствуют стандарту, поскольку нами искусственно завышалось число лейкоцитов. В то же время, как это видно из табл. 1, соотношение RBC/PLT вполне адекватно стандарту практически независимо от способа счета клеток.

На практике компьютерный счет форменных элементов крови всегда давал величины более низкие по сравнению с «ручным» счетом, результаты приведены в табл. 2. В то же время из этой таблицы видно, что достигнутые результаты для образцов нативной крови не уступают аналогам для окрашенных форменных элементов — мазкам крови.

Таблица 2

Способ счета форменных элементов крови	Совпадение компьютерного счета концентрации форменных элементов по отношению к «ручному» способу (%)			Отличие компьютерного счета концентрации форменных элементов от счета прибором Sysmex XT-400i (%)		
	RBC	PLT	WBC	RBC	PLT	WBC
Ручной счет	97,8	95,6	97,3	-	-	-
Sysmex XT-400i	-	-	-	+6,2	-14,6	-

Примечание: знак «+» означает, что компьютер подсчитал больше клеток, чем счетчик, знак «-» — наоборот. Совпадение компьютерного счета концентрации WBC по отношению к «ручному» способу проведено с использованием «высвечивания» лейкоцитов.

Таблица 2 демонстрирует удовлетворительное совпадение результатов компьютерного определения концентрации форменных элементов крови с результатами «ручного» счета. В то же время содержание эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в растворе пробы крови, найденное методом цифровой микроскопии, отличается от результатов аналогичных измерений прибором Sysmex XT-400i. Заметим, что в табл. 2 отсутствует сравнение концентраций WBC при компьютерном измерении и прибором Sysmex XT-400i. Такое сравнение не имеет смысла, так как в первом подходе число лейкоцитов искусственно методологически завышалось по отношению к реальной пробе крови, анализируемой прибором Sysmex XT-400i.

Интересно, что использование обнаруженного эффекта «высвечивания» лейкоцитов позволило существенно понизить ошибку в определении их концентрации в рамках цифровой микроскопии. Действительно, применение эффекта «высвечивания» лейкоцитов понизило величину отличия компьютерного счета WBCs по сравнению с «ручным» с 27,1 до 2,7%. Последнее, вероятно, связано с тем, что некоторые достаточно крупные или близко расположенные друг к другу эритроциты, не распознанные на первом этапе (идентификация эритроцитов), а также «артефакты» распознавались по площадям как лейкоциты. Обработка дефокусированного изображения позволяет снизить такую ошибку. Заметим, что повышение точности распознавания лейкоцитов можно использовать для последующего уточнения числа эритроцитов.

Заключение. Разработанный алгоритм обработки фотоизображений проб крови в нативном ее состоянии позволил реализовать счет эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в образце без индивидуальной пробоподготовки клеток, по единой их фотографии. Использование предложенных специальных «фотошаблонов» эритроцитов и обнаруженного эффекта «высвечивания» лейкоцитов, а также разрешение тромбоцитов от лейкоцитов по площади их фотоизображений продемонстрировали возможность идентификации и счета форменных элементов нативной крови. Показано, что точность счета клеток крови в ее нативной форме может быть соизмеримой и даже превосходить точность аналогичных исследований в мазке. В то же время предложенный анализ нативной крови значительно упрощает пробоподготовку по сравнению с мазком и, кроме того, принципиально позволяет перейти от выявления соотношения форменных элементов крови к определению их содержания в образце.

Конфликт интересов не заявляется.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования — В. А. Дубровский; И. В. Забенков, С. О. Торбин; получение и обработка данных — С. О. Торбин, И. В. Забенков, О. Е. Царева; анализ и интерпретация результатов — В. А. Дубровский, И. В. Забенков, С. О. Торбин; написание статьи В. А. Дубровский, С. О. Торбин; утверждение рукописи для публикации — В. А. Дубровский.

References (Литература)

- Steinkamp JA. Flow cytometry. Rev Sci Instrum 55 (1984); 9: 1375–1400.
- Tuchin VV, ed. Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011; 701 p.
- Orfao A, Lacombe F, Ault K, et al. Flow cytometry: its applications in hematology. Haematologica 1995; 80: 69–81.
- Canellini G, Rubin O, Delobel J, et al. Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry. Blood Transfus 2012; 10 Suppl 2: 39–45.
- Vyas GN, et al. Simultaneous human ABO and Rh (D) blood typing or antibody screening by flow cytometry: United States Patent 5,776,711 July 7, 1998.
- Tatsumi N, Tsuda I, Inoue K. Trial ABO and Rh blood typing with an automated blood cell counter. Clin Lab Haematol 1989; 11 (2): 123–30.
- Doubrovski VA, Dvoretzki KN, Shcherbakova IV, et al. Laser space scanning in flow cytometry. Tsitologiya 1999; 41 (1): 104–108. Russian (Дубровский В. А., Дворецкий К. Н., Щербак И. В. Лазерное пространственное сканирование в проточной цитометрии. Цитология 1999; 41 (1): 104–108).
- Doubrovski VA, Ganiilova YuA, Zabenkov IV. R and G color components competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC agglutinates for blood group typing. J Biomed Opt 2014; 19 (3): doi 10.1117/1. JBO.19.3.036012. [Дубровский В. А., Ганилова Ю. А., Забенков И. В. Конкуренция цветовых R и G компонент RGB разложения изображения микрофотографий как критерий для регистрации агглютинатов эритроцитов при определении групп крови].
- Dyrnaev AV. The process of erythrocytes' counting in the images of blood smears (options): Patent RU 2488821 C1. Published 27.07.2013. Bull. 21 Russian (Дырняев А. В. Способ подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови (варианты): Патент RU 2488821 C1. Опубл. 27.07.2013. Бюл. 21).
- Dyrnaev AV. The method of erythrocytes' counting for the blood smear images. Scientific and Technical Bulletin of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics 2011; 76 (6): 18–23. Russian (Дырняев А. В. Метод подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови. Научно-технический вестник Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики 2011; 76 (6): 18–23).
- Dyrnaev AV, Potapov AS. The combined red blood cells' counting in the images of blood smears. Scientific

- and Technical Bulletin of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics 2012; 77 (1): 20–24. Russian (Дырняев А. В., Потапов А. С. Комбинированный подсчет эритроцитов на изображениях мазков крови. Научно-технический вестник Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики 2012; 77 (1): 20–24).
12. Maitra M, Gupta RK, Mukherjee M. Detection and Counting of Red Blood Cells in Blood Cell Images using Hough Transform. *International Journal of Computer Applications* 2012; 53 (16): 18–22.
13. Mahmood NH, Mansor MA. Red blood cells estimation using Hough transform technique. *Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)* 2012; 3 (2): 53–64.
14. Mazalan SM, Mahmood NH, Razak MA. Automated Red Blood Cells Counting in Peripheral Blood Smear Image Using Circular Hough Transform. In: *First International Conference on Artificial Intelligence, Modelling & Simulation, IEEE978-1-4799-3251-1/13*, IEEE DOI 10.1109/AIMS.2013.59; p 285–289.
15. Pandit A, Kolhar S, et al. Survey on Automatic RBC Detection and Counting. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering* 2015; 4 (1): 128–131.
16. Taherisadr M, Nasirzonouzi M, et al. New Approach to Red Blood Cell Classification Using Morphological Image Processing. *Shiraz E-Medical Journal* 2013; 14 (1): 44–53.
17. Alilou M, Kovalev V. Automatic object detection and segmentation of the histocytology images using reshapable agents, *International Journal of Research in Engineering and Technology* 2014; 3 (4): 2321–7308.
18. Cuevas E, Diaz M, Manzanares M, et al. An improved computer vision method for detecting white blood cells. In: *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013; art. no. 137392; p. 1–19.
19. Hiremath PS, et al. Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images. In: *Special Issue on "Recent Trends in Image Processing and Pattern Recognition" RTIPPER*, 2010; p. 59–63.
20. Sosnin DY, Falkov BF, Nenashev OY. Evaluation of cells' recognition accuracy for automated analysis system *Vision He Blood. Urals Medical Journal* 2012; (13): 1–7. Russian (Соснин Д. Ю., Фалков Б. Ф., Ненашева О. Ю. Оценка правильности распознавания клеток системой автоматизированного анализа крови *Vision He. Уральский медицинский журнал*, 2012; (13): 1–7).
21. Sable GS, et al. Counting of WBCs and RBCs from blood images using gray thresholding. *International Journal of Research in Engineering and Technology* 2014; 3 (4): 2321–7308.
22. Doubrovski VA, Zabenkov IV, Torbin SO, et al. Determination of Platelet Aggregate Size in vitro Using Digital Microscopy. *Biomedical Engineering* 2013; 47 (3): 121–125 Russian (Дубровский В. А., Забенков И. В., Торбин С. О. Определение геометрических размеров тромбоцитарных агрегатов in vitro методом цифровой микроскопии, *Медицинская техника* 2013; 47 (3): 10–13).