

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ ВРОЖДЕННЫХ МИКРОСФЕРОЦИТОЗОВ

М.Н. Зенина¹, А.В.Козлов², С.С. Бессмельцев¹, Т.Н.Котова³

Тел.: (812) 717-58-57

¹*РосНИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург*

bsshem@hotmail.com

²*Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования*

³*Санкт-Петербургский Консультативно-диагностический центр для детей*

Резюме. Определены показатели толщины эритроцитов (Тэр), индекса сферичности эритроцитов (Рэр) и среднего диаметр эритроцитов (Дэр) у здоровых людей и при врожденном микросфероцитозе. Выявлено несоответствие между величиной среднего диаметра эритроцитов (Д_{эр}) и величиной среднего корпускулярного объема эритроцитов (MCV) пациентов с врожденным микросфероцитозом.

Ключевые слова: анемия, врожденный микросфероцитоз, аппаратно-программные комплексы анализа изображений, толщина эритроцитов, средний диаметр эритроцитов, индекс сферичности эритроцитов, средний корпускулярный объем эритроцитов.

MORPHOMETRIC ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS OF CONGENITAL MICROSPHEROCYTOSIS

M.N. Zenina¹, A.V. Kozlov², S.S. Bessmeltsev¹, T.N. Kotova³

¹*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology*

²*St.-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies*

³*St.-Petersburg Consultation and Diagnostic Centre for Children*

Summary. Defined indicators of the thickness of erythrocytes (Ter), sphericity index of red blood cells (Rer) and the average diameter of erythrocytes (Der) in healthy people and in congenital microspherocytosis. Revealed the discrepancy between the magnitude of the average diameter of erythrocytes (Der) and the mean corpuscular volume of erythrocytes (MCV) in patients with congenital microspherocytosis.

Keywords: Anemia, congenital microspherocytosis, hardware and software systems analysis of the images, the thickness of the red blood cells, the average diameter of red blood cells, red blood cell sphericity index, mean corpuscular volume of erythrocytes.

Впервые клиническая картина микросфероцитоза была описана бельгийскими врачами С. Vanlair и J. Masius в 1871 [1]. Наследственный характер этого заболевания доказали немецкий физиолог и клиницист О. Minkowsky в 1900 г. и французский врач А. Chauffard в 1907 г. Врожденный микросфероцитоз широко распространен в различных странах Европы (частота 1: 5000), значительно реже болезнь встречается в Японии, странах Африки [2].

Врожденный микросфероцитоз представляет собой заболевание, обусловленное дефектами в мембране эритроцитов, что приводит к нарушению их способности менять форму при прохождении через мелкие сосуды, укорочению продолжительности жизни, разрушению и развитию анемии [3].

Основная роль в выявлении врожденного микросфероцитоза отводится микроскопической оценке выраженности изменения формы и размеров эритроцитов. Решающими признаками служат следующие показатели: средний диаметр эритроцитов (СДЭ или $D_{эр}$), толщина эритроцитов ($T_{эр}$) и индекс сферичности ($R_{сф}$). Оценка этих параметров в условиях обычной лаборатории практически не проводится из-за отсутствия окуляр-микрометров в основной комплектации современных микроскопов и высокой трудоемкостью методики. В большинстве лабораторий, после определения количественных показателей крови с помощью гематологического анализатора проводят микроскопию мазка крови. Для описания степени анизоцитоза и пойкилоцитоза используют полуколичественную форму оценки в балльной или описательной форме. Выраженность отклонений от нормы зависят от опыта врача клинической лабораторной диагностики и качества мазка крови.

Все это приводит к тому, что для части пациентов, особенно без выраженных нарушений структуры эритроцитов при аутосомно-рецессивном наследовании, или спонтанных мутациях без отчетливой симптоматики [4], распознавание наследственного сфероцитоза может оказаться трудной дифференциально-диагностической задачей.

Для объективизации характера нарушений формы эритроцитов используют системы анализа изображений (САИ), позволяющие в автоматическом режиме оценивать

те морфометрические параметры клеток крови, которые невозможно определять с помощью гематологических анализаторов. Отечественные САИ представлены аппаратно-программными комплексами ВидеоТесТ, МЕКОС, ДИАМОПФ, DiViSy. За рубежом получили распространение САИ Roche Image, SIRES, Autocyte и другие. В состав САИ входят микроскоп, система ввода изображения (цифровая камера), компьютер и программное обеспечение.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке возможности использования САИ для распознавания нарушения формы эритроцитов при врожденных микросфероцитозах.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили мазки капиллярной крови 12 пациентов с установленным диагнозом врожденной микросфероцитарной анемии, которые находились на амбулаторном наблюдении в поликлиническом отделении Российского НИИ гематологии и трансфузиологии. В контрольную группу были включены 42 практически здоровых пациента, проходивших диспансерное обследование в Консультативно-диагностическом центре для детей и консультативно-поликлиническом отделении Российского НИИ гематологии и трансфузиологии. Характеристика обследованных групп представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика обследованных пациентов.

Группы		Контрольная Группа	Больные с врожденной микросфероцитарной анемией
Характеристика признака			
Возраст		18,5±5,5 (12 - 24)	19,5±4,5 (14 - 24)
Пол	Мужчины	19	8
	Женщины	23	4
Количество в группе		42	12

Фиксацию мазков крови проводили красителем-фиксатором Май-Грюнвальд (2-3 мин) с дальнейшей окраской (10-12 мин) 10% раствором красителя Романовского – Гимзы. Концентрацию гемоглобина (Hb), эритроцитов (Rbc), средний корпускулярный объем эритроцитов (MCV) и величину гематокрита (Ht) в капиллярной крови определяли с помощью гематологического анализатора Sysmex KX-21N.

Анализ изображений с помощью системы анализа изображений представляет в целом несложную лабораторную процедуру, включающую выделение, измерение и распределение эритроцитов на классы по заданным параметрам в автоматическом режиме. Для каждого эритроцита рассчитывается: средняя площадь эритроцитов; средний диаметр; содержание микроцитов, нормоцитов и макроцитов; толщина и индекс сферичности эритроцитов; толщина и индекс сферичности микроцитов и нормоцитов (Таблица 2). В зависимости от показателя среднего диаметра клетки, САИ делит эритроциты на 4 класса:

- микроциты (4,0 – 6,8 мкм),
- нормоциты (6,9 – 8,0 мкм),
- макроциты (8,1 – 9,5 мкм),
- мегалоциты (9,6 – 11,0 мкм).

Процесс обработки изображения контролируется оператором визуально на экране монитора.

Таблица 2.

Эритроцитарные параметры, рассчитываемые аппаратно-программным комплексом

Показатель	Формулы для расчета	Размерность	Референтные значения [6]
Измеряемые параметры			
Средняя площадь эритроцитов	$S_{эр.} = \pi \tau^2$	мкм ²	-
Средний диаметр эритроцитов	$D_{эр.} = 2\tau$	Мкм	7,2 – 7,5
Расчетные параметры			
Толщина эритроцитов	$T_{эр.} = \frac{MCV}{S}$	Мкм	1,7 - 2,3
Индекс сферичности	$R_{сф} = \frac{D}{T}$	-	3,4 ÷ 3,9 (<3,4–сфероциты; >3,9–платоциты)

Для расчета показателя «Толщина эритроцитов» (Тэр) в программу был введен

дополнительный параметр - значение MCV, величину которого определяли с помощью гематологического анализатора Sysmex KX-21N. Пример проведения анализа эритроцитов с использованием компьютерной программы показан на рисунке 1.

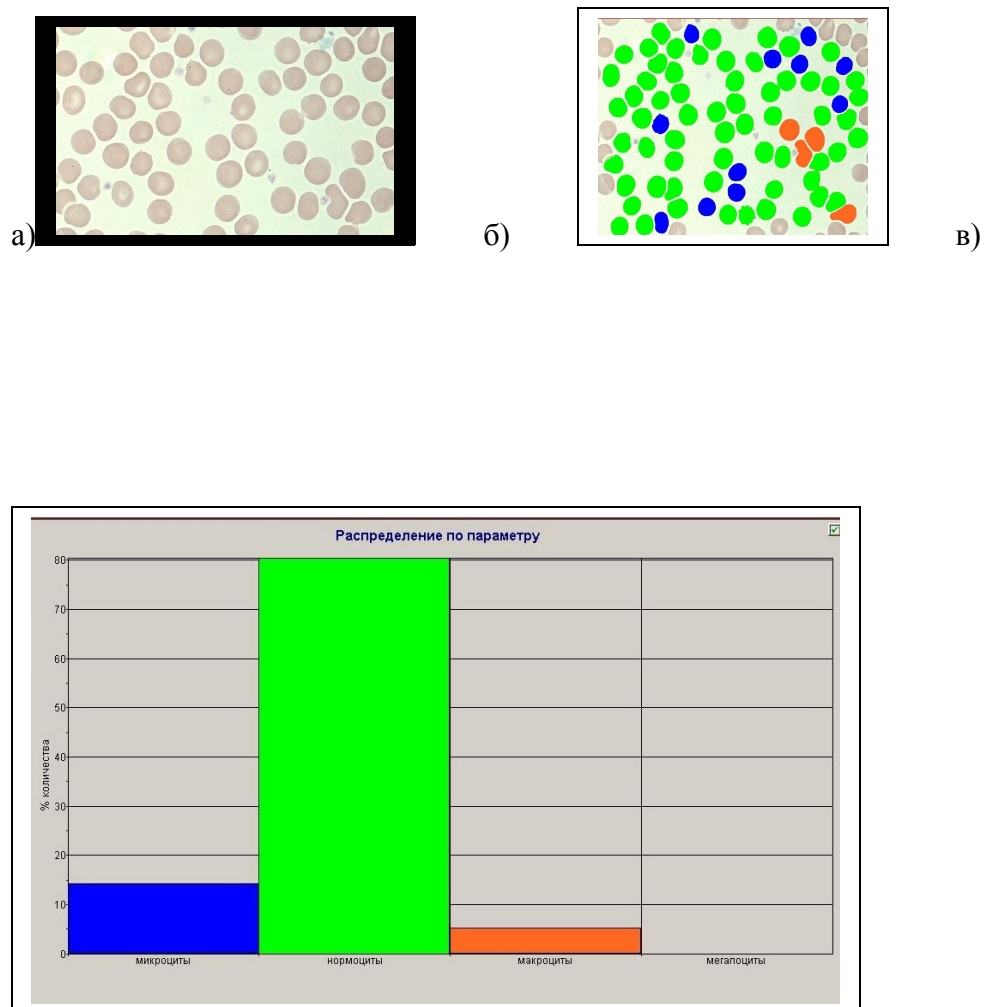


Рис. 1. Пример проведения анализа эритроцитов с использованием компьютерной программы. Примечание. а) изображение окрашенных эритроцитов на мониторе; б) разделение эритроцитов на группы в зависимости от диаметра (зеленым цветом выделены нормоциты, синим – микроциты, красным - макроциты); в) результаты анализа в виде диаграммы с процентным разделением клеток по диаметру.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Microsoft-Excel 2003» и «STATISTICA 6». Критерием статистической достоверности получаемых выводов считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты представлены в таблицах № 3 и 4. Как следует из представленных в таблице 3 данных, полученных с помощью гематологического анализатора Sysmex KX-21N, достоверных различий по большинству приведенных в таблице параметров между двумя группами, за исключением показателя средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) и показателя анизоцитоза эритроцитов (RDW), выявить не удалось. Эти два параметра, свидетельствующие о наличии анизоцитоза и повышении содержания гемоглобина в эритроците, свидетельствуют о наличии изменений в эритроидном ростке, но не характеризуют его. Изменения этих показателей обычно обнаруживают при различных типах анемий (апластических анемиях, мегалобластоидном типе кроветворения и др.) [5].

Несмотря на более низкие средние значения концентрации гемоглобина в группе пациентов с врожденным микросфероцитозом ($118,8 \pm 32,8$) по сравнению с контрольной группой ($137,6 \pm 9,3$), средний объем эритроцита (MCV) в обеих группах не отличался: $81,7 \pm 14,6$ в группе с врожденным микросфероцитозом и $83,1 \pm 1,7$ в контрольной группе.

Таблица 3

Эритроцитарные показатели у больных с врожденной микросфероцитарной анемией, полученные с использованием анализатора Sysmex KX-21N

Исследуемый Параметр	Контрольная группа	Врожденная микросфероцитарная анемия	Значения р
Концентрация гемоглобина (Hb) г/л	$137,6 \pm 9,3$	$118,8 \pm 32,8$	0,07
Гематокрит (Ht) л/л	$0,4 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,1$	0,06
Количество эритроцитов (Rbc) $\times 10^{12}/л$	$4,7 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,9$	0,09
Среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH), пг	$28,6 \pm 1,3$	$27,6 \pm 2,2$	0,05
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (МСНС), г/дл	$34,7 \pm 0,9$	$36,7 \pm 1,0$	0,01
Средний объем эритроцита (MCV), фл	$83,1 \pm 1,7$	$81,7 \pm 14,6$	0,71
Показатель анизоцитоза эритроцитов (RDW), %	$13,6 \pm 0,5$	$17,6 \pm 3,9$	0,0001

Диаметрально иной характер изменений формы эритроцитов был получен с помощью системы анализа изображений: средний диаметр эритроцитов у пациентов с

врожденным микросфероцитозом составил 6,6 мкм (7,5 мкм в контрольной группе). Содержание микроцитов, с толщиной 2,9 мкм и индексом сферичности 2,2 в этой группе обследуемых, составило $68,7 \pm 16,9\%$. При этом в контрольной группе содержание микроцитов $12,6 \pm 6,7\%$ и толщина их составляет 2,3 мкм, с индексом сферичности 2,8 (табл. 4), что согласуется с литературными данными. На долю микроцитов у здоровых людей приходится 12-15% от всех эритроцитов.

Как следует из таблицы 4, использование САИ позволило четко разделить пациентов обеих групп по диаметру эритроцитов, эритроцитарным индексам, характеризующим форму эритроцитов, по количеству микросфероцитов.

Таблица 4

Значения эритроцитарных показателей, полученных с помощью аппаратно-программного комплекса

Исследуемые параметры	Контрольная группа	Врожденная микросфероцитарная анемия	Значения р
Толщина эритроцитов микроцитов (Т _{мэр}), мкм	2,3±0,2	2,9±0,2	0,001
Толщина эритроцитов (Т _{эр})	2,1± 0,2	2,6 ± 0,3	0,005
Индекс сферичности эритроцитов микроцитов (R мэр)	2,8± 0,2	2,2± 0,2	0,003
Индекс сферичности эритроцитов (R _{эр})	3,7±0,3	2,3 ± 0,1	0,005
Средний диаметр эритроцитов (D _{эр}), мкм	7,5±0,2	6,6 ± 0,2	0,005
Содержание микроцитов (% микр)	12,6± 6,7	68,7 ± 16,9	0,005
Содержание нормоцитов (% норм)	72,9± 7,3	30,4 ± 16,5	0,005
Содержание макроцитов (% макр)	14,5± 11,8	1,9± 1,2	0,005

В качестве иллюстрации успешного использования САИ в диагностике микросфероцитозов приводим два случая, доказывающих необходимость количественной оценки морфометрических параметров эритроцитов.

Пациент Н., 23 лет. При анализе крови, выполненном на анализаторе Sysmex KX-21N, основные эритроцитарные параметры укладывались в пределы нормальных значений: концентрация гемоглобина - 128 г/л (нормальные значения для мужчин в РФ 130,0-160,0 г/л), содержание эритроцитов - $4,69 \times 10^{12}/л$ ($4,0-5,0 \times 10^{12}/л$), средний объем

эритроцита (MCV) - 85,3 фл (80,0-100,0 фл) [7]. В то же время при изучении окрашенных препаратов крови с использованием САИ (Рис. 2), было выявлено снижение среднего диаметра эритроцита до 6,48 мкм, повышение толщины эритроцитов ($T_{эр}$) 2,45 и снижение индекса сферичности эритроцитов ($R_{эр}$) 2,63. Содержание микроцитов, с толщиной 2,65 и индексом сферичности 2,33, составило 77,8%. Данное наблюдение представляет собой удачный пример использования морфометрических характеристик эритроцитов для постановки диагноза микросфероцитоза на фоне малоизмененных показателей красной

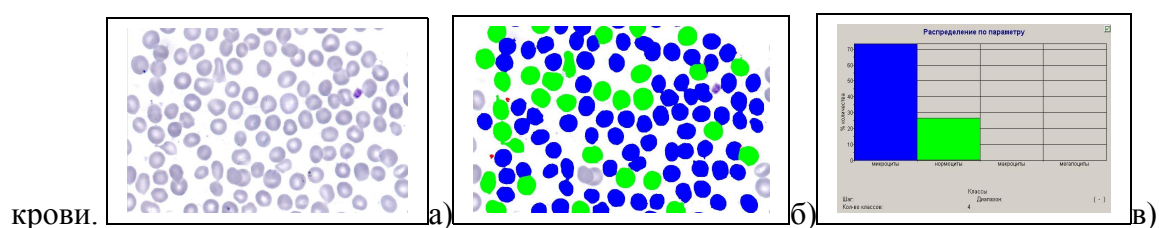


Рис. 2. Исследование параметров эритроцитов с использованием САИ: а) исходное изображение, б) расклассифицированные эритроциты, в) распределение эритроцитов по диаметру.

Больная Н, 12 лет. При анализе крови на анализаторе КХ 21N, концентрация гемоглобина составила 97 г/л (нормальные значения для девочек 12 лет 112-146 г/л), содержание эритроцитов $3,27 \times 10^{12}/л$ ($3,5-5,0 \times 10^{12}/л$), средний объем эритроцита (MCV) составил 82,0 фл (76-91 фл). [8]. Данные количественные показатели без учета морфометрии трактовались как нормохромная анемия. При изучении окрашенных препаратов крови с использованием САИ (Рис. 3) средний диаметр эритроцитов составил 6,4 мкм, толщина эритроцитов ($T_{эр}$) 2,37, индекс сферичности эритроцитов ($R_{эр}$) 2,82. Содержание микроцитов, с толщиной 2,47 и индексом сферичности 2,48 составило 77,0%. Результаты анализа эритроцитов с помощью САИ позволили выявить гемолитический характер анемии и наличие врожденного микросфероцитоза.

В обоих приведенных примерах диагноз врожденного микросфероцитоза был подтвержден результатами дополнительных исследований.

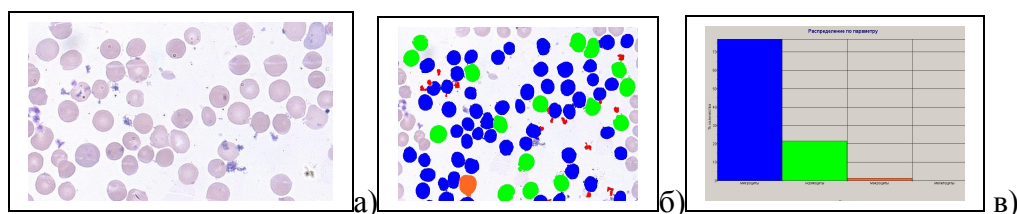


Рис. 3. Исследование параметров эритроцитов пациентки Н.: а) исходное изображение, б) расклассифицированные эритроциты, в) распределение эритроцитов по диаметру.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что в ряде случаев имеется несоответствие между величиной среднего диаметра эритроцитов и величиной среднего объема эритроцитов (MCV), что не отображается в показателях проточных гематологических анализаторов. Для дифференциальной диагностики анемий необходима комплексная оценка параметров эритроцитов с помощью гематологических анализаторов и систем анализа изображений.

Литературы.

1. Vanlair CF, Masius JB: De la microcythémie// Bull Acad R Méd Belg. – 1871. – Vol. 5, 3rd series. – P. 515–613.
2. Lukens J.N. Hereditary spherocytosis and other hemolytic anomies associated with abnormalities of the red cell membrane and cytoskeleton/ In Lee B.R., Bithell TC, Foerster J. et al (eds)// Wintrob's Clinical Hematology. – 1993. - 9th ed. – P. 965-970.
3. Lux S.E., Becker P.S. Disorders of the red cell membrane skeleton: hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis/ In Scriver CR, Baudet AB, Sly US et al (eds)// The metabolic Basis of Inherited Disease. – 1989. - 6th ed. – P. 2367- 2370.
4. Гусева С.А., Гончарова Я.П. Анемии, Киев «Издательство Логос», 2004. – 259 с.
5. Lux S.E., Wolfe L.C. Inherited disorders of the red cell membrane skeleton// Pediatr Clin North Am. – 1980. - Vol. 27. – P. 463 – 467.
6. Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д. Справочник по гематологии. - Томск, «Издательство Томского университета», 1975. - С 46 - 66.
7. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови// Методические рекомендации, 2007. – 35 с.

8. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей в гематологии академик// Методические рекомендации под ред. А.И. Воробьев, 2001. – 50 с.