



УДК 004.932

ЭФФЕКТ «ВЫСВЕЧИВАНИЯ» ЛЕЙКОЦИТОВ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В. А. Дубровский, С. О. Торбин



Дубровский Валерий Александрович, кандидат физико-математических наук, доцент, заведующий кафедрой медбиофизики имени В. Д. Зёрнова, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, dubrovski43@yandex.ru

Торбин Станислав Олегович, ассистент кафедры медбиофизики имени В. Д. Зёрнова, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, stanislav.torbin@yandex.ru

Цель работы. Поиск способа идентификации и счета лейкоцитов в пробе нативной крови. **Материалы и оборудование.** Цельная донорская кровь, цифровой микроскоп. **Методы и подходы.** Разработка способа идентификации и счета лейкоцитов нативной крови проведено на основе метода цифровой микроскопии. **Основные результаты.** Экспериментально обнаружен эффект «высвечивания» лейкоцитов в пробе нативной крови при ее наблюдении с помощью цифрового микроскопа. Эффект заключается в том, что при удалении объектива микроскопа, изначально сфокусированного на объекте, от лейкоцита происходит трансформация его изображения, причем яркость изображения клетки повышается. В то же время подобное явление не наблюдается для эритроцитов и тромбоцитов, что позволяет отличить лейкоцит от иных форменных элементов крови при их подсчете. Обнаруженный эффект не наблюдается ни на одном типе форменных элементов крови в случае мазков. Экспериментально показано, что в основе обнаруженного эффекта лежит «линзовый» механизм. Проведены статистические исследования на множестве клеток нативной крови. Показано, что применение эффекта «высвечивания» лейкоцитов дает значительное увеличение точности счета клеток этого типа при анализе формулы нативной крови методом цифровой микроскопии.

Ключевые слова: форменные элементы крови, лейкоцит, счет клеток, цифровая микроскопия.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200

Введение

Определение количества форменных элементов крови разного типа является важной задачей лабораторной диагностики. Исторически идентификация и счет клеток крови производились с использованием микроскопа в «ручном» режиме. Развитие оптической проточной цитометрии привело к появлению автоматов для идентификации и счета форменных элементов крови, например, [1–4]. Проточные гемоцитометры позволяют производить подсчет клеток крови в потоке поштучно, они 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. Этот метод основан на компьютерной обработке фотоизображений образцов крови. Отметим, что в качестве анализируемых объектов исследователи в основном используют не растворы нативной крови, а фотоизображения мазков крови. Это связано с тем, что окраска образца создает дополнительную контрастность объекта, выделяет особенности морфологии клеток, дает возможность разрешить клетки крови разного типа. Так, задача подсчета эритроцитов с помощью фотоизображений препаратов крови рассматривалась в [9–16]. Достигнутая точность счета эритроцитов (RBC) программным образом по отношению к «ручному» составила 96–98% в [9], 96% в [13], 92% в [14], и, заметим, что в [9, 13, 14] использовались разные подходы, алгоритмы обработки фотоизображений.

Более сложной по сравнению с идентификацией и счетом эритроцитов является задача распознавания лейкоцитов (WBC). Это обусловлено тем, что размер и форма лейкоцитов значительно более переменчивы по сравнению с эритроцитами, кроме того, лейкоциты могут оказаться соизмеримыми с эритроцитами. В этом случае прибор может воспринять эритроцит за лейкоцит – возникает ошибка в определении содержания лейкоцитов в пробе крови. Попытки идентификации и счета лейкоцитов предпринимались в [17–20]. Заметим, что точность счета клеток (лимфоцитов) в мазке в [17] составила 94% в сравнении с «ручным» методом.

Представляется принципиальным отметить два обстоятельства, возникающих при анализе мазков крови с помощью цифровой микроскопии.

1. Анализ мазков позволяет определить соотношение количеств эритроцитов, лейкоцитов



и тромбоцитов, что важно для некоторых задач лабораторной диагностики. Однако он принципиально не дает абсолютные величины концентраций этих клеток в пробе крови, так как при таком анализе препарат оказывается высушенным, отсутствует объем, в котором расположены анализируемые клетки крови.

2. Подготовка мазков 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 фотоизображения.

В этой связи представляет интерес изучение возможности идентификации и счета форменных элементов крови в ее нативном состоянии (в растворе без окраски красителем). Отметим, что количество исследований в этом направлении значительно меньше, нежели с окрашенными мазками крови. Нам известна лишь работа [21], где предпринята попытка определения концентрации эритроцитов и лейкоцитов в пробе нативной крови с использованием принципов цифровой микроскопии.

Вполне очевидно, что исследование раствора нативной крови принципиально дает возможность не только определить соотношение количеств форменных элементов разного типа, но и измерить абсолютные величины их концентраций. Этого можно достичь, если цифровое фотоизображение объекта получено в условиях, когда исследуемая проба крови помещена в счетную камеру, объем которой известен.

Проведенные нами эксперименты показывают, что такой счет эритроцитов и тромбоцитов в растворе нативной крови методом цифровой микроскопии не представляет особых трудностей [22], однако идентификация и счет лейкоцитов весьма затруднены по нескольким причинам:

- 1) отмеченная выше вариабельность размера и формы лейкоцита; соизмеримость в некоторых случаях лейкоцита с эритроцитом;
- 2) прозрачность лейкоцита без специальной его окраски, как это имеет место в мазках.

Цель настоящего исследования – поиск способа идентификации лейкоцитов в образце

раствора нативной крови, сравнение результатов компьютерного счета лейкоцитов с «ручным» подсчетом этих клеток.

1. Объект исследования, техника эксперимента

Объектом исследования являлась цельная донорская кровь, которая разбавлялась в 400 раз физраствором. Капля раствора нативной крови, объемом 20 мкл, размещалась в камере Горяева. Цифровые фотоизображения объекта получались с помощью микроскопа БИОМЕД («ЛОМО», Россия), (увеличения объектива и окуляра $40\times$ и $10\times$ соответственно, поле зрения 0.2 мм) и фотокамеры Logitech-Quick Cam (Logitech, Швейцария). При этом разрешение (масштаб) 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 делалось 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, 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 зазора 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. Результаты компьютерного счета форменных элементов крови сопоставлялись с результатами «ручного» счета тех же клеток анализируемого изображения. Заметим, что перед компьютерной обработкой фотоизображений разрешение (1600×1200) каждой микрофотографии было уменьшено в 3 раза (до 532×400) с целью сокращения времени компьютерной обработки фотоизображений.



2. Идентификация лейкоцитов в растворе нативной крови

Для идентификации лейкоцитов в растворе нативной крови апробированы два подхода: градиентный метод идентификации клеток; оригинальный метод «высвечивания» лейкоцитов. Последовательно рассмотрим оба метода анализа клеток.

2.1. Градиентный метод идентификации лейкоцитов

Известно, что стандартное соотношение количеств форменных элементов разного типа RBC/ PLT/ WBC имеет следующий порядок – 720 : 44 : 1 (PLT-тромбоцит). Значительное превышение количества RBC, а также PLT, над содержанием WBC (рис. 1, *a*) приводит к трудностям при компьютерной идентификации лейкоцитов. С целью устранения этой трудности использовался принцип программной фильтрации эритроцитов и тромбоцитов на фотоизобра-

жении пробы раствора нативной крови. Первым этапом этой процедуры являлось распознавание эритроцитов. Для этого использовались две их особенности: стандартная в определенной мере форма клеток и способность эритроцитов поглощать световой поток. В совокупности это позволило на основании анализа большого количества фотоизображений выработать RBC фотошаблоны, с которыми в дальнейшем сравнивались идентифицируемые эритроциты. Если анализируемая клетка с высокой степенью корреляции совпадала хотя бы с одним из выбранных RBC фотошаблонов, то данная клетка воспринималась как эритроцит, она сегментировалась (рис. 1, *б*), а найденный сегмент, содержащий эритроцит, исключался из дальнейшего рассмотрения при поиске и идентификации других клеток. Естественно, увеличение количества отобранных RBC фотошаблонов приводит к снижению числа нераспознанных эритроцитов.

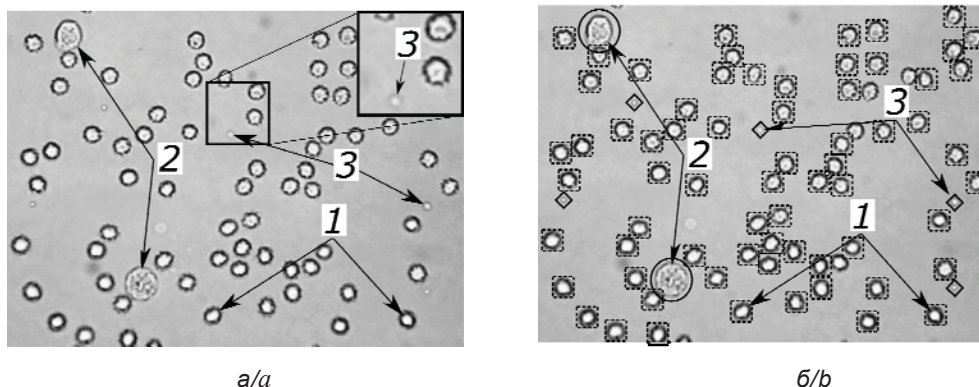


Рис. 1. Фотоизображение форменных элементов крови: *a* – экспериментально полученное фотоизображение объекта; *б* – то же изображение после сегментации эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Обозначения: 1 – эритроциты; 2 – лейкоциты; 3 – тромбоциты (клетки размещены в квадраты, овалы и ромбы соответственно)

Fig. 1. Photoimage of blood elements: *a* – experimentally obtained photoimage of the object; *b* – the same image after segmentation of erythrocytes, white blood cells and platelets. Notations: 1 – erythrocytes; 2 – leukocytes; 3 – platelets (Cells are placed in squares, ovals and rhombs, respectively)

Процедура распознавания тромбоцитов и лейкоцитов начиналась с фильтрации тех сегментов фотоизображения, в которых на предварительном этапе были обнаружены эритроциты. Лейкоциты и тромбоциты в нативном образце крови являются практически прозрачными клетками, что затрудняет использование фотометрического подхода. Поэтому для этих клеток был использован градиентный подход обработки фотоизображения, включающий в себя распознавание границ клеток, определение их координат, сегментацию клеток

(рис. 1, *б*). Вслед за сегментацией клеток осуществлялась процедура бинаризации изображения, т.е. представление каждого пикселя изображения одним из двух цветов. Эти действия описаны в [23] для регистрации тромбоцитов и их агрегатов. Пример бинаризованных и сегментированных фотоизображений тромбоцитов и лейкоцитов после предварительной фильтрации изображений эритроцитов, а также некоторое количество нераспознанных и, следовательно, не отфильтрованных эритроцитов представлен на рис. 2.

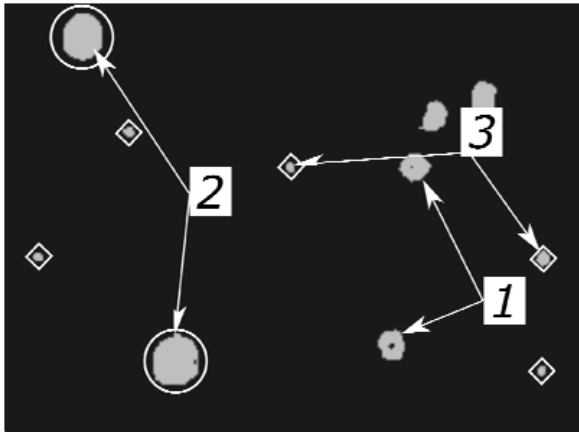


Рис. 2. Фотоизображение нераспознанных эритроцитов (1), сегментированных и бинаризованных лейкоцитов (2) и тромбоцитов (3)

Fig.2. Photograph of unrecognized erythrocytes (1), segmented and binarized leukocytes (2) and platelets (3)

Изображение на рис. 2 соответствует представленному на рис. 1, б. Использование размера клетки в качестве параметра для разрешения лейкоцита от тромбоцита затруднительно в связи со сложной формой лейкоцита. Поэтому в качестве параметра использовался не размер клетки, а площадь S , занимаемая 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 $S_{\text{пор}}$ ($S \leq S_{\text{пор}}$), были отнесены к тромбоцитам.

Соответствующие сегменты фотоизображения, содержащие распознанные тромбоциты, исключались из дальнейшего анализа. За пороговую величину принималась $S_{\text{пор}}$ соответствующая 15 пикселям для фотоизображения с разрешением 532×400 пиксель, что было адекватно размеру тромбоцита. Клетки с $S > S_{\text{пор}}$ относились к лейкоцитам, производился их подсчет. Подобный подход использовался и для снижения количества нераспознанных на первом этапе обработки фотоизображений эритроцитов. В результате бинаризованное фотоизображение в значительной мере содержало лишь лейкоциты, фото образца исследуемой крови оказывалось готовым к счету WBC.

2.2. Идентификация лейкоцитов методом их «высвечивания»

Многочисленные эксперименты по получению микрофотографий образцов раствора нативной крови позволили выявить интересный эффект: при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа яркость изображений лейкоцитов значительно увеличивается («высвечивание» лейкоцитов), в то время как яркость фотоизображений других форменных элементов снижается и, кроме того, происходит размытие границ фотоизображений эритроцитов и тромбоцитов (рис. 3). 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,

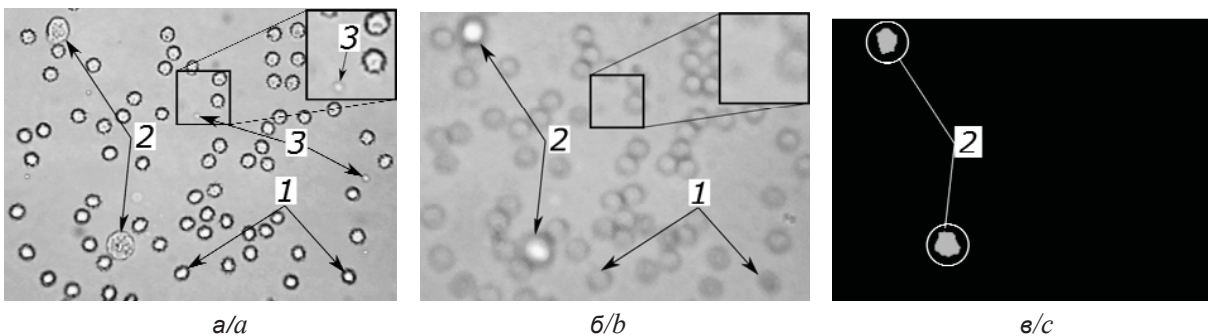


Рис. 3. Иллюстрация эффекта «высвечивания» лейкоцитов раствора нативной крови при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа: а – сфокусированное изображение форменных элементов крови; б – то же изображение, что и на рис. 3, а, но в случае дефокусировки цифрового микроскопа; в – бинаризованное изображение «высвеченных» лейкоцитов (обозначения см. рис.1, а)

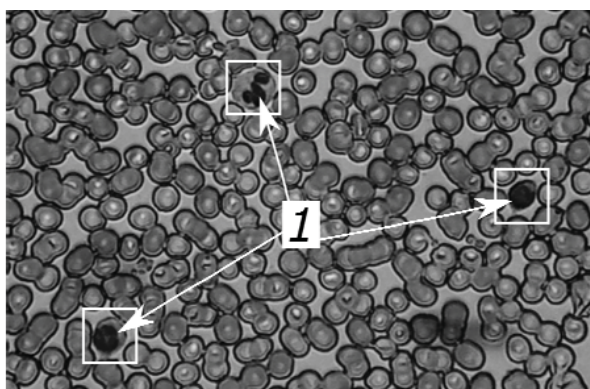
Fig. 3. The demonstration of the effect of «highlighting» of leukocytes in native blood solution when optical system of digital microscope was defocused: а – focused image of blood elements; б – the same image as in Fig. 3,а, but in the case when digital microscope was defocused; в – a binarized image of the «highlighted» leukocytes (Notations are as in Fig.1, а)



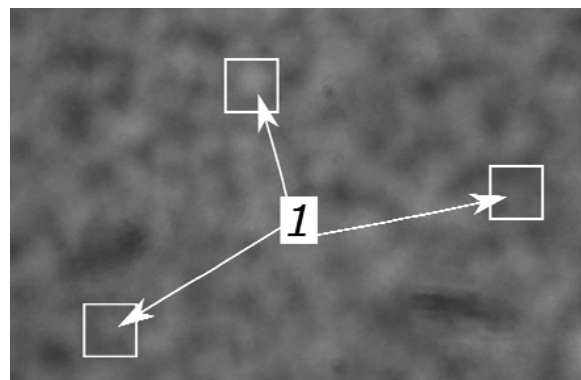
если сопоставить рис. 3, а и 3, б. Заметим, что в силу дефокусировки цифрового микроскопа на рис. 3, в в отличие от рис. 2 отсутствуют тромбоциты и нераспознанные эритроциты, в то время как изображение лейкоцитов усилено («высвечено»). Это дает основание к упрощению алгоритма обработки фотоизображений объекта – отпадает необходимость последовательной идентификации и сегментации RBC и PLT, бинаризации фотоизображения и последующей фильтрации изображений эритроцитов и тромбоцитов. Последнее легко видеть на рис. 3, в – отсутствует сегментация эритроцитов и тромбоцитов в отличие от фотоизображения на рис. 1, б. Обработка фотоизображения образца сводится к выделению «высвеченных» лейкоцитов и подсчету их числа. Кроме того, в силу WBC «высвечивания» повышается градиент яркости пиксель вблизи границы лейкоцита, что увеличивает точность распознавания лейкоцита на фоне «размытых» изображений других форменных элементов крови.

2.3. Механизм высвечивания лейкоцитов в растворе нативной крови

Возможной причиной обнаруженного эффекта является существенное отличие формы и размера лейкоцитов от тех же параметров для тромбоцитов и эритроцитов. Можно предположить, что лейкоцит в сочетании с микроскопом работает как дополнительная микролинза. Следует отметить, что: 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. Последнее демонстрируется на рис. 4, где зоны, содержащие лейкоциты, выделены квадратами. Однако эти клетки, отчетливо видимые на рис. 4, а, не только не «высвечиваются», но и становятся невидимыми при дефокусировке микроскопа (рис. 4, б). Объяснение: в мазке форменные элементы находятся в высушенном состоянии, поэтому лейкоцит не может рассматриваться как объемное тело – микролинза.



а/а



б/б

Рис. 4. Изображение форменных элементов пробы крови в мазке: 1 – лейкоциты; а – сфокусированное изображение; б – дефокусированное изображение

Fig. 4. Image of formed elements of the blood sample in the smear: 1 – white blood cells; а – the focused image; б – the defocused one

На рис. 5 приведены зависимости яркости B пикселей фотоизображений эритроцитов и лейкоцитов в растворе нативной крови, а также лейкоцитов в мазке крови от величины смещения объектива L относительно его исходного положения. Заметим, что яркость B для лейкоцита определялась путем усреднения величин яркости пикселей, расположенных в центре клетки в заданной зоне, – квадрат со стороной 20 пикселей. Аналогично рассчитывалась яркость для эритроцитов с той лишь разницей, что в этом случае проводилось дополнительное усреднение

по множеству эритроцитов. Из рис. 5 видно, что

1) в случае раствора нативной крови (кривая 1) имеется пик яркости B для лейкоцитов в точке $L=30$ мкм; однако подобный пик для эритроцитов (кривая 2) не наблюдается, практически для RBC зависимость $B(L)$ отсутствует;

2) зависимость $B(L)$ отсутствует и для лейкоцитов в мазке крови (кривая 3);

3) яркость B в максимуме (кривая 1) превышает уровень яркости для RBC (кривая 2) примерно в 2 раза, что можно использовать для распознавания лейкоцитов в растворе нативной крови.

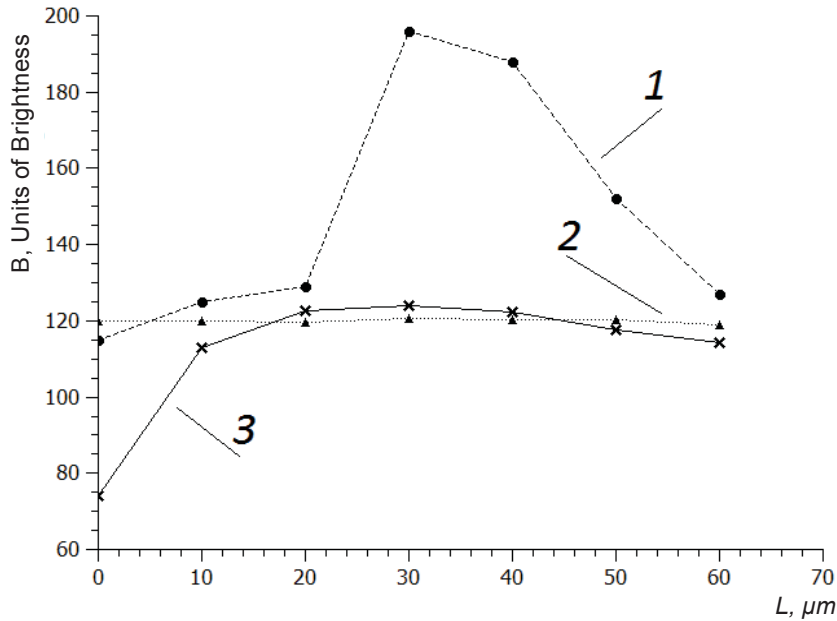


Рис. 5. Зависимости яркости пикселей фотоизображений B от величины смещения объектива микроскопа L относительно его исходного положения: 1, 2 – лейкоцит и эритроцит раствора нативной крови соответственно; 3 – лейкоцит в мазке крови
Fig. 5. The dependence of brightness B of pixels of the photo image on the amount of microscope lens shift L with the respect to its initial position: 1, 2 – leukocyte and erythrocyte of native blood solution; 3 – white blood cell in a blood smear

Заметим, что измерения, подобные приведенным на рис. 5, проводились многократно (30 различных лейкоцитов). Во всех случаях устойчиво наблюдался эффект их «высвечивания»: среднее значение яркости B по всем анализируемым лейкоцитам составило ~ 197 ед. при стандартном отклонении $\sigma B \sim \pm 12$ ед.

С целью подтверждения линзового эффекта, лежащего в основе наблюдаемого явления

«высвечивания» лейкоцитов, был предпринят модельный опыт. На стеклянную подложку наносилась капля глицерина диаметром менее миллиметра (ее можно трактовать как микролинзу) и изготавливались ее фотоизображения при разных смещениях L (рис. 6).

Для изготовления фото с каплей глицерина использовались окуляр $10\times$ и объектив $10\times$. При этом величина поля зрения и пространственное

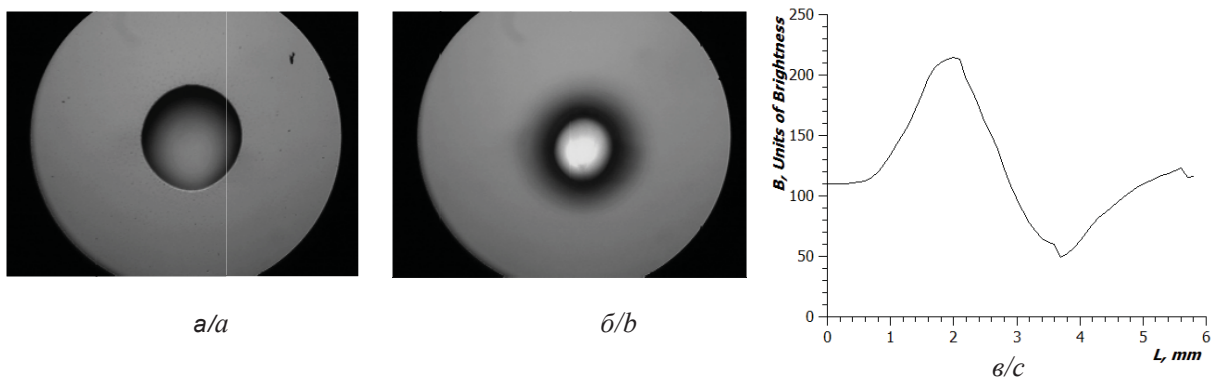


Рис. 6. Фотоизображение микролинзы (капли глицерина) и зависимость яркости B ее свечения от величины смещения объектива микроскопа L : а – сфокусированное изображение, б – дефокусированное изображение; в – зависимость яркости B свечения микро линзы от смещения объектива микроскопа L

Fig. 6. Photo image of the microlens (drop of glycerin) and the dependence of its brightness B on the value of microscope lens shift L : a – the focused image, b – the defocused image; c – the dependence of microlens brightness B on the value of microscope lens shift L



разрешение (масштаб) составляли 0.8 мм и 1.7 пкс/мкм соответственно, а диаметр капли – 260 мкм. Фотоизображение микролинзы на рис. 6, б подобно изображению «высвеченного» лейкоцита на рис. 3, б. Для микролинзы по аналогии с лейкоцитом снималась зависимость $B(L)$ (рис. 6, в). Полученный график I напоминает кривую I на рис. 5, отличие можно объяснить тем, что экспериментально доступный шаг при получении последней был лишь 10 мкм – недостаточно полное число экспериментальных точек. В целом результаты, проиллюстрированные на рис. 4, 5, 6, свидетельствуют о том, что в основе обнаруженного явления – «высвечивания» лейкоцитов лежит линзовый эффект, когда исследуемый лейкоцит можно рассматривать как оптическую линзу.

3. Результаты счета лейкоцитов и их обсуждение

Как отмечалось выше, 80 фотоизображений раствора нативной крови были отобраны для их компьютерной обработки, при этом общее количество подсчитанных клеток составило 4560. При этом количество эритроцитов – 4184, тромбоцитов – 292. После их сегментации и фильтрации число лейкоцитов, подсчитанных «ручным» образом, составило 84, т.е. практически по одному лейкоциту на изображении. Результаты компьютерного счета клеток сопоставлялись с результатами «ручного» счета той же пробы непосредственно с экрана монитора ПК. Так как фотоизображения пробы крови изготавливались в условиях, когда исследуемая кровь располагалась в камере Горяева, то оказывалось возможным определить концентрацию лейкоцитов в пробе. Она оказалась равной: $C_{\text{ручн}} = 102 \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$ для ручного счета и $C_{\text{комп}} = 100 \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$ для компьютерного. Заметим, что в норме для взрослых людей концентрация лейкоцитов составляет величину порядка $C_{\text{норма}} = (4 - 10) \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$ с небольшим отклонением для мужчин и женщин. Сравнение результатов счета лейкоцитов со стандартным значением концентрации лейкоцитов $C_{\text{норма}}$ показывает, что полученные результаты завышены примерно в 14 раз, что объяснимо специальным отбором именно тех фотоизображений, на которых непременно имелись изображения лейкоцитов. Стоит отметить, что совпадение компьютерного счета лейкоцитов с «ручным» составляет $(C_{\text{комп}}/C_{\text{ручн}}) \cdot 100\% = 98\%$, что не уступает и даже превосходит результаты иных подобных работ

[17–20]. Следует отметить, что полученные результаты компьютерного счета лейкоцитов были достигнуты путем применения эффекта их «высвечивания». Дело в том, что использование обнаруженного эффекта «высвечивания» лейкоцитов позволило существенно понизить ошибку в определении их концентрации в рамках цифровой микроскопии. Действительно, применение «высвечивания» лейкоцитов понизило величину отличия компьютерного счета WBCs по сравнению с «ручным» с 27 до 2.0%. Последнее, вероятно, связано с тем, что некоторые достаточно крупные или близко расположенные друг к другу эритроциты, нераспознанные на этапе их идентификации, воспринимались 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

Предложены два алгоритма обработки фотоизображений раствора проб крови в нативном ее состоянии с целью идентификации и счета лейкоцитов. Обнаружено явление «высвечивания» лейкоцитов при дефокусировке цифрового микроскопа; показано, что это явление отсутствует при наблюдении эритроцитов и тромбоцитов. Экспериментальное моделирование этого явления показало, что в его основе лежит «линзовый» эффект – лейкоцит нативной крови подобен микролинзе. Предложено использовать обнаруженный эффект для распознавания лейкоцитов на фоне множества эритроцитов и тромбоцитов. Применение эффекта «высвечивания» лейкоцитов значительно повысило процент совпадения результатов компьютерного счета лейкоцитов в пробе по отношению к «ручному». Показано, что точность счета лейкоцитов крови в ее нативной форме может быть соизмеримой или превосходить точность аналогичных исследований в мазке. 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 концентраций в образце.

Авторы поздравляют Приезжеву Александра Васильевича с юбилеем, выражают признательность за более чем 30-летние научные контакты, полезные советы и интерес к проводимым ими исследованиям.



Список литературы

1. *Steinkamp J. A.* Flow cytometry // *Rev. Sci. Instrum.* 1984. Vol. 55, № 9. P. 1375–1400.
2. *Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P.* *In vivo* Image Flow Cytometry // *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, First Edition. Ed. by Valery V. Tuchin. 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 387–431. DOI: 10.1002/9783527634286.ch14.
3. *Orfao A., Ruiz-Arguelles A., Lacombe F., Ault K., Basso G., Danova M.* Flow cytometry : its applications in hematology // *Haematologica*. 1995. Vol. 80, iss. 2. P. 69–81.
4. *Canellini G., Rubin O., Delobel J., Cretaz D., Lion N., Tissot J.* Red blood cell microparticles and blood group antigens : an analysis by flow cytometry // *Blood Transfus.* 2012. Vol. 10. P. 39–45.
5. *Uyas G. N.* Simultaneous human AB0 and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry. US Patent № 5776711, published on July 7, 1998.
6. *Tatsumi N., Tsuda I., Inoue K.* Trial AB0 and Rh blood typing with an automated blood cell counter // *Clin. Lab. Haematol.* 1989. Vol. 11, iss. 2. P. 123–130.
7. *Дубровский В. А., Дворецкий К. Н., Щербакowa И. В., Балаев А. Э., Киричук В. Ф.* Лазерное пространственное сканирование в проточной цитометрии // *Цитология*. 1999. Т. 41, № 1. С. 104–108.
8. *Doubrovski V. A., Gnilova Yu. A., Zabenkov I. V.* 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, Vol. 19, iss. 3. DOI: 10.1117/1.JBO.19.3.036012.
9. *Дырнаев А. В.* Способ подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови: пат. 2488821 МПК G01N 33.48 / заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «С.-Петербург. гос. нац. исслед. ун-т информационных технологий, механики и оптики» – 201152334/15; заявл. 21.12.2011; опубл. 27.07.2013, Бюл. № 21.
10. *Дырнаев А. В.* Метод подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови // *Науч.-техн. вестн. С.-Петерб. гос. ун-та информационных технологий, механики и оптики*. 2011. Т. 76, № 6. С. 18–23.
11. *Дырнаев А. В., Попанов А. С.* Комбинированный подсчет эритроцитов на изображениях мазков крови // *Науч.-техн. вестн. С.-Петерб. гос. ун-та информационных технологий, механики и оптики*. 2012. Т. 77, № 1. С. 20–24.
12. *Maitra M., Gupta R.K., Mukherjee M.* Detection and Counting of Red Blood Cells in blood cell Images using hough transform // *Intern. J. of Computer Applications*. 2012. Vol. 53, iss. 16. P. 18–22.
13. *Nasrul Humaimi Mahmood, Muhammad Asraf Mansor.* Red blood cells estimation using Hough transform technique // *Signal & Image Processing : An International Journal (SIPIJ)*, 2012. Vol. 3, iss. 2. P. 53–62.
14. *Siti Madidah Mazalan, Nasrul Humaimi Mahmood, Mohd Azhar Abdul Razak.* Automated Red Blood Cells Counting in Peripheral Blood Smear Image Using Circular Hough Transform // *First International Conference on Artificial Intelligence, Modelling & Simulation*. Biosciences and Medical Engineering Universiti Teknologi Malaysia Johor, Malaysia, 2013. P. 320–324. DOI: 10.1109/AIMS.2013.59.
15. *Mahmood N. H., Mansor M. A.* Red blood cells estimation using Hough transform technique // *Signal & Image Processing : An International Journal (SIPIJ)*. 2012. Vol. 3, iss. 2. P. 53–64. DOI: 10.5121/sipij.2012.3204.
16. *Pandit A., Kolhar S., Patil P.* Survey on Automatic RBC Detection and Counting // *Intern. J. of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*. 2015. Vol. 4, iss. 1. P. 128–131. DOI: 10.15662/ijareeie.2015.0401012.
17. *Alilou M., Kovalev V.* Automatic object detection and segmentation of the histocytology images using reshaping agents // *Image Anal Stereol.* 2013. Vol. 32. P. 89–99. DOI: 10.5566/ias.V32.
18. *Cuevas E., Diaz M., Manzanares M., Zaldivar D., Perez M.* An improved computer vision method for detecting white blood cells // *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2013. art. № 137392. P. 1–19. DOI: 10.1155/2013/137392.
19. *Hiremath P. S., Bannigidad P., Geeta S.* Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images // *IJCA Special Issue on “Recent Trends in Image Processing and Pattern Recognition” RTIPPER*, 2010. P. 59–63.
20. *Соснин Д. Ю., Фалков Б. Ф., Ненашева О. Ю.* Оценка правильности распознавания клеток системой автоматизированного анализа крови Vision He // *Уральск. мед. журн.* 2012. № 13. С. 1–7.
21. *Patil P. R., Sable G. S., Anandgaonkar G.* Counting of WBCs and RBCs from blood images using gray thresholding // *Intern. J. of Research in Engineering and Technology*. 2014. Vol. 3, iss. 4. P. 391–395.
22. *Torbin S. O., Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Tsareva O. E.* The counting of native blood cells by digital microscopy // *Saratov Fall Meeting 2016 : Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII* / ed. by Elina A. Genina, Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE Vol. 10336, 103360A (9 p.). DOI: 10.1117/12.2268575.
23. *Дубровский В. А., Зabenkov И. В., Торбин С. О., Еремин В. И., Царева О. Е.* Определение геометрических размеров тромбоцитарных агрегатов *in vitro* методом цифровой микроскопии // *Мед. техника*. 2013. № 3. С. 10–13.

Образец для цитирования:

Дубровский В. А., Торбин С. О. Эффект «высвечивания» лейкоцитов и его применение для идентификации клеток крови методом цифровой микроскопии // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 191–200. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200.



Leukocytes' «Highlighting» Effect and its Application to Identify Blood Cells by Digital Microscopy Method

V. A. Doubrovski, S. O. Torbin

Valeri A. Doubrovski, ORCID 0000-0003-2423-6504, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112, B. Kazach'ya Str., Saratov, 410012, Russia, doubrovski43@yandex.ru

Stanislav O. Torbin, ORCID 0000-0003-2645-306X, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112, B. Kazach'ya Str., Saratov, 410012, Russia, stanislav.torbin@yandex.ru

Objective: To find a way of identifying and counting of leukocytes in a native blood sample. **Materials and equipments:** Whole donor blood sample, digital microscope. **Methods and approaches:** The development of a method of leukocytes' identification and counting for native blood samples was carried out on the basis of digital microscopy method. **Main results:** Leukocytes' "highlighting" effect in a native blood sample was revealed experimentally by digital microscope examining. The effect is that when a microscope lens, initially focused on the object, is removed away from the leukocyte, its image becomes transformed and cell's image brightness increases. At the same time, this phenomenon is not observed in respect to erythrocytes and platelets, what makes it possible to distinguish leukocyte from other types of blood cells during their counting. The effect revealed experimentally is not observed on any type of blood cells including leucocytes for the case of smears. It has been shown experimentally that the effect observed is based on the "lens" mechanism. Statistical studies were carried out on a variety of native blood cells. It is shown that the application of leukocytes' "highlighting" effect gives a significant increase in the accuracy of counting of these type of cells when native blood formula is under analysis by digital microscopy method.

Key words: blood cells, leukocytes, cell counting, digital microscopy.

References

1. Steinkamp J. A. Flow cytometry. *Rev. Sci. Instrum.*, 1984, vol. 55, no. 9, pp. 1375–1400.
2. Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P. *In vivo* Image Flow Cytometry. In: *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, First Edition. Ed. by Valery V. Tuchin. 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 387-431. DOI: 10.1002/9783527634286.ch14
3. Orfao A., Ruiz-Arguelles A., Lacombe F., Ault K., Basso G., Danova M. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*, 1995, vol. 80, iss. 2, pp. 69–81.
4. Canellini G., Rubin O., Delobel J., Crettaz D., Lion N., Tissot J. Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry. *Blood Transfus.*, 2012, vol. 10, pp. 39–45.
5. Vyas G. N. *Simultaneous human AB0 and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry*. US Patent, no. 5776711, published on July 7, 1998.
6. Tatsumi N., Tsuda I., Inoue K. Trial AB0 and Rh blood typing with an automated blood cell counter. *Clin. Lab. Haematol.*, 1989, vol. 11, iss. 2, pp. 123–130.
7. Doubrovski V. A., Dvoretzki K. N., Shchebakova I. V., Balaev A. E., Kirichuk V. F. Lazernoe prostranstvennoe skanirovanie v protochnoj citometrii [Laser space scanning in flow cytometry]. *Cytology*, 1999, vol. 41, iss. 1, pp. 104–108 (in Russian).
8. Doubrovski V. A., Ganilova Yu. A., Zabenkov I. V. 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, vol. 19, iss. 3. DOI: 10.1117/1.JBO.19.3.036012.
9. Dyrnaev A. V. *Sposob podscheta ehritroцитов na izobrazheniyah mazkov krovi* [Method of counting red blood cells on images of blood smears] *Pat. 2488821 MPK G01N 33.48; zayavitel' i patentoobladatel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij nacional'nyj issledovatel'skij universitet informacionnyh tekhnologij, mekhaniki i optiki"* – 2011152334/15, zayavl. 21.12.2011, opubl. 27.07.2013, Byul. № 21.
10. Dyrnaev A. V. Metod podscheta ehritroцитов na izobrazheniyah mazkov krovi [The method of erythrocytes counting for the blood smear images]. *Scientific and Technical Herald of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2011, vol. 76, iss. 6, pp. 18–23 (in Russian).
11. Dyrnaev A. V., Potapov A. S. The combined red blood cells' counting in the images of blood smears. *Scientific and Technical Herald of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2012, vol. 77, iss. 1, pp. 20–24.
12. Maitra M., Gupta R. K., Mukherjee M. Detection and Counting of Red Blood Cells in blood cell Images using hough transform. *International Journal of Computer Applications*, 2012, vol. 53, iss. 16, pp. 18–22.
13. Nasrul Humaimi Mahmood, Muhammad Asraf Mansor. Red blood cells estimation using Hough transform technique, *Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)*, 2012, vol. 3, iss. 2, pp. 53–62.
14. Siti Madihah Mazalan, Nasrul Humaimi Mahmood. Mohd Azhar Abdul Razak. Automated Red Blood Cells Counting in Peripheral Blood Smear Image Using Circular Hough Transform. In: *First International Conference on Artificial Intelligence, Modelling & Simulation*. Biosciences and Medical Engineering Universiti Teknologi Malaysia Johor, Malaysia, 2013, pp. 320–324. DOI: 10.1109/AIMS.2013.59.
15. Mahmood N. H., Mansor M. A. Red blood cells estimation using Hough transform technique. *Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)*, 2012, vol. 3, iss. 2, pp. 53–64. DOI: 10.5121/sipij.2012.3204.
16. Pandit A., Kolhar S., Patil P., Survey on Automatic RBC Detection and Counting. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 2015, vol. 4, iss. 1, pp. 128–131. DOI: 10.15662/ijareeie.2015.0401012.



17. Alilou M., Kovalev V. Automatic object detection and segmentation of the histocytology images using reshaping agents. *Image Anal Stereol*, 2013. Vol. 32, pp. 89–99. DOI: 10.5566/ias.V.32.
18. Cuevas E., Diaz M., Manzanares M., Zaldivar D., Perez M. An improved computer vision method for detecting white blood cells. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013, art. no. 137392, pp. 1–19. DOI: 10.1155/2013/137392.
19. Hiremath P. S., Bannigidad P., Geeta S. Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images. *IJCA Special Issue on "Recent Trends in Image Processing and Pattern Recognition" RTIPPER*, 2010, pp. 59–63.
20. Sosnin D. Yu., Falkov B. F., Nenasheva O. Yu. Ocenka pravil'nosti raspoznavaniya kletok sistemoj avtomatizirovannogo analiza krovi [The estimation of the correctness of cells identification by the automated blood cells counting system Vision He]. *Ural Med. J.*, 2012, no. 13, pp. 1–7 (in Russian).
21. Patil P. R., Sable G. S., Anandgaonkar G. Counting of WBCs and RBCs from blood images using gray thresholding. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2014, vol. 3, iss. 4, pp. 391–395.
22. Torbin S. O., Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Tsareva O. E. The counting of native blood cells by digital microscopy. *Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII*. Ed. by Elina A. Genina, Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE Vol. 10336, 103360A (9 pp.). DOI: 10.1117/12.2268575.
23. Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Torbin S. O., Eremin V. I., Tsareva O. E. Determination of Platelet Aggregate Size *in vitro* Using Digital Microscopy. *Bio-medical Engineering*, 2013, vol. 3, pp. 10–13.

Cite this article as:

Doubrovski V. A., Torbin S. O. Leukocytes' «Highlighting» Effect and its Application to Identify Blood Cells by Digital Microscopy Method. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 191–200 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200.
