

## Оценка информативности морфологических изменений эритроцитов при гипервитаминозе А и выбор прогностических признаков его возникновения

Т.А. Ломановская, Т.В. Боронихина, А.Н. Яцковский

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* При анализе результатов экспериментальных исследований часто используются морфометрические методы, позволяющие количественно оценить изменения множества параметров изучаемых гистологических объектов. Отбор более ограниченного числа параметров, характеризующихся диагностически значимыми признаками этих изменений, возможен с помощью анализа их информативности. Цели исследования – оценка информативности изменений морфоденситометрических параметров эритроцитов при гипервитаминозе А и выбор признаков, позволяющих прогнозировать его возникновение.

*Материалы и методы.* В исследовании использованы крысы – самцы линии Вистар, рандомизированные на две группы по девять животных в каждой. Гипервитаминоз А вызывали путем ежедневного введения масляного раствора ретинола пальмитата перорально. В контрольной группе животные получали масляную основу. В мазках крови измеряли морфоденситометрические параметры эритроцитов. Оценивали и сравнивали информативность различий средних значений параметров и информативность различий их частотных характеристик в выборках.

*Результаты.* При введении ретинола пальмитата морфоденситометрические параметры эритроцитов изменялись. Значения ряда параметров достоверно отличались от показателей в контроле еще до возникновения признаков гипервитаминоза А. Из числа таких параметров выделен перечень информативных и отобраны прогностические критерии передозировки ретинола пальмитата: снижение площади поверхности и увеличение кривизны нисходящей части тора – периферического выпуклого участка – эритроцитов. При оценке информативности различий частотных распределений морфоденситометрических параметров получено более ограниченное число диагностически значимых признаков.

*Заключение.* В морфометрических исследованиях наряду с оценкой информативности различий усредненных показателей можно использовать оценку информативности различий их частотных характеристик, что позволяет уменьшить количество параметров, измеряемых в аналогичных условиях эксперимента.

**Ключевые слова:** гипервитаминоз А, эритроциты, морфоденситометрия, оценка информативности

**Для корреспонденции:** Александр Никодимович Яцковский. E-mail: alnik45@mail.ru

**Для цитирования:** Ломановская Т.А., Боронихина Т.В., Яцковский А.Н. Оценка информативности морфологических изменений эритроцитов при гипервитаминозе А и выбор прогностических признаков его возникновения. Клини. эксп. морфология. 2022;11(1):73–78. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.73-78.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования и при поддержке АО «Ретиноиды».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 24.01.2022. Получена после рецензирования 10.02.2022. Принята в печать 28.02.2022.

## Assessment of the informative value of erythrocyte morphological changes in hypervitaminosis A and choice of prognostic signs of its onset

T.A. Lomanovskaya, T.V. Boronikhina, A.N. Yatskovskiy

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Morphometric methods allowing quantitative estimation of changes in a variety of parameters of studied histological objects are often used to evaluate the results of experimental research. The selection of a more limited number of parameters characterized by diagnostically significant evidence of these changes is based on their informative value. The aims of the study were to evaluate the informative

value of changes in morpho-densitometric parameters of erythrocytes under hypervitaminosis A and select signs to predict its clinical occurrence.

**Materials and methods.** We used male Wistar rats randomized into two groups of 9 animals each. Hypervitaminosis A was induced by oral daily administration of an oily solution of retinol palmitate. The animals of the control group received an oil base. The morphodensitometric parameters of erythrocytes were measured in blood smears. We compared and evaluated the informativeness of differences in both mean values and t frequency distributions of the parameters in the samples.

**Results.** Erythrocyte morphodensitometric parameters altered with retinol palmitate administration. The values of a number of measured parameters differed significantly from those in the control even before the onset of signs of hypervitaminosis A. We identified a list of informative parameters and selected prognostic criteria for retinol palmitate overdose, namely reduced erythrocyte surface area and increased curvature of the descending torus. A more limited number of diagnostically significant signs were obtained when assessing the informative value of differences in the frequency distributions of morphodensitometric parameters.

**Conclusion.** In morphometric studies, in addition to estimating the informativeness of differences in averaged values, that of differences in their frequency distribution can be used, thus limiting the number of parameters measured under similar experimental conditions.

**Keywords:** hypervitaminosis A, erythrocytes, morphodensitometry, assessment of informativeness

**Corresponding author:** Alexander N. Yatskovskiy. E-mail: alnik45@mail.ru

**For citation:** Lomanovskaya T.A., Boronikhina T.V., Yatskovskiy A.N. Assessment of the informative value of erythrocyte morphological changes in hypervitaminosis A and choice of prognostic signs of its onset. Clin. exp. morphology. 2022;11(1):73–78 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.73-78.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding and supported by JSC “Retinoids”.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 24.01.2022. **Received in revised form** 10.02.2022. **Accepted** 28.02.2022.

## Введение

Использование в научных исследованиях морфометрических методов предполагает оценку значимости различий между количественными характеристиками изучаемых объектов, что позволяет объективизировать выводы об их структурных перестройках. Нередко число измеряемых морфометрических (МДМ) и денситометрических параметров достаточно велико [1–3], а их изменения при различных состояниях организма зачастую однотипны и неспецифичны [4]. В таких случаях возникает необходимость выбрать из множества параметров, имеющих статистически значимые расхождения в сравниваемых группах, ограниченное число наиболее значимых и информативных признаков этих различий. Помимо надежной диагностической оценки это дает возможность в последующем уменьшить объем измерений в аналогичных экспериментальных и клинических исследованиях.

Как критерий информативности признаков используется информационная мера Кульбака, свидетельствующая не о статистической значимости различий между распределениями, а о степени этих различий [5]. Обоснование и примеры использования критерия Кульбака для оценки информативности различий усредненных абсолютных показателей и диагностической информативности признаков, измеряемых относительными величинами, изложены в публикациях Л.В. Кактурского и соавт. [4, 6]. Информативность различий частотных характеристик признака оценивается чаще в клинических исследованиях. При экспериментальных исследованиях с использованием морфометрических методов,

как правило, оценивается информативность различных средних величин. Целями работы являлись оценка информативности изменений МДМ параметров эритроцитов при гипervитаминозе А и выбор признаков, позволяющих прогнозировать его развитие.

## Материалы и методы

Эксперимент проведен на 18 крысах – самцах линии Вистар массой тела 120,9±2,6 грамма, полученных из филиала «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Работу с животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и на основании заключения локального этического комитета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол № 02-20 от 05.02.2020). Животных рандомизировали на две группы по девять крыс в каждой. Для моделирования гипervитаминоза А использовали масляный раствор ретинола пальмитата (РП). Препарат в дозе 150 000 МЕ, содержащихся в 0,3 мл раствора, вводили крысам экспериментальной группы с помощью мягкого зонда *per os* в течение 6 дней. Учитывая воздействие на эритроциты масляной основы раствора РП [7], в контрольную группу включили крыс, получавших ее в том же объеме. Оба препарата предоставлены АО «Ретиноиды». До начала использования препаратов и в последующие дни перед их очередным введением приготавливали мазки крови, в которых измеряли МДМ параметры эритроцитов (дискоцитов). Приготовление мазков крови и процедуру измерения МДМ параметров проводили по ранее описанным методам [7]. Перечень параметров приведен в таблице 1.

Таблица 1 | Table 1

**Названия и символы измеренных морфоденситометрических параметров эритроцитов |  
Names and symbols of measured erythrocyte morphodensitometric parameters**

Название параметра   Parameter definition*	Символ   Symbol
Площадь проекции на плоскость   Area of projection onto a plane	Area
Средняя оптическая плотность   Average optical density	Od
Интегральная оптическая плотность   Integrated optical density	Iod
Градиент оптической плотности восходящей части тора   Optical density gradient of the ascending torus <sup>#</sup>	Grad1
Кривизна восходящей части тора   Curvature of the ascending torus	Cur1
Градиент оптической плотности нисходящей части тора   Optical density gradient of the descending torus	Grad2
Кривизна нисходящей части тора   Curvature of the descending torus	Cur2
Градиент оптической плотности пэллаора   Pallor optical density gradient <sup>†</sup>	Grad3
Кривизна пэллаора   Pallor curvature	Cur3
Показатель контрастности   Contrast index	Dy
Показатель формы (асимметрии)   Form factor (asymmetry)	Dx
Длина профиля   Profile length	L_er
Площадь поверхности   Surface area	Surface
Объем   Volume	Volume

\* – единицы измерения: значения Area – в  $\mu\text{м}^2$ , остальных параметров – в условных единицах

# тор – периферический выпуклый участок эритроцита

† пэллаор – центральный вогнутый участок эритроцита

\* – measurement units: Area values – in  $\mu\text{m}^2$ , other parameters – in conventional units

# torus – peripheral convexity of an erythrocyte

† pallor – central concave portion of an erythrocyte

Проверяли характер распределения переменных (тест Колмогорова–Смирнова) и равенство дисперсий (тест Левена) в выборках. Центральные тенденции и распределение количественных признаков описывали средним арифметическим ( $\bar{X}_0$ ), средним квадратическим отклонением ( $\sigma$ ) и стандартной ошибкой среднего ( $SD$ ). Статистическую значимость различий в выборках оценивали по критерию Манна–Уитни. Доверительная вероятность различий была принята на уровне  $p \leq 0,05$ .

Для оценки информативности признака использовали меру Кульбака. Признаком считали статистически значимое увеличение или уменьшение среднего значения МДМ параметра эритроцитов у крыс, получавших РП, в сравнении с животными контрольной группы.

Информативность разницы между средними значениями параметров рассчитывали по формуле:

$$I = 1,0857 \times [(\sigma_1/\sigma_2)^2 + (\sigma_2/\sigma_1)^2 - 2 + (1/\sigma_1^2 + 1/\sigma_2^2) \times (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2] \quad (1),$$

где  $I$  – информативность (в битах),  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  – средние квадратические отклонения,  $\bar{X}_1$  и  $\bar{X}_2$  – средние арифметические в выборках.

Для определения информативности различий частотных характеристик параметров использовали формулу Кульбака, видоизмененную Гублером [5]:

$$I = 10 \log P_1 / P_2 \times 0,5(P_1 - P_2) \quad (2),$$

где  $P_1$  – относительная частота признака в экспериментальной группе,  $P_2$  – относительная частота признака в контрольной группе.

Частотной характеристикой признака служила доля эритроцитов со значениями МДМ параметра, распределенными выше или ниже доверительных интервалов ( $tm$ ) среднего арифметического, рассчитанного до начала эксперимента для выборки, включавшей всех использованных в работе животных. Если значение МДМ параметра в экспериментальной группе снижалось в сравнении с контролем, в обеих группах учитывали долю эритроцитов с распределением ниже  $\bar{X}_0 - tm$ . При увеличении значения МДМ параметра находили долю дискоцитов с распределением выше  $\bar{X}_0 + tm$ . При расчете  $I$  попарно сравнивали доли дискоцитов с изменившимися значениями МДМ параметров. Информативным считали признак с величиной  $I \geq 0,5$ .

## Результаты и обсуждение

У животных, получавших РП, на 5-й и 6-й день введения препарата наряду со сниженной двигательной активностью и учащенным дыханием масса тела уменьшилась и составила, соответственно, 87% и 80% от уровня в контрольной группе. Это является одним из первых неспецифических признаков развивающегося гипервитаминоза А [8, 9]. Следовательно, использованная доза РП была достаточной для моделирования у крыс данного состояния за относительно короткий период времени.

Анализ МДМ параметров эритроцитов позволил оценить динамику их изменений, возникающих на фоне введения РП. К концу опыта средние значения большинства измеренных МДМ параметров эритроцитов существенно отличались от показателей в контроле ( $p=0,001-0,002$ ). Значения восьми из 14 анализируемых параметров (Grad1, Grad2, Grad3, Cur2, Dy, L\_er, Surface, Volume) статистически значимо изменились в сравнении с контролем уже на 3–4-й день эксперимента, то есть до возникновения начальных симптомов передозировки РП. Это подтверждает данные о воздействии ретинола на клетки на доклинической стадии гипервитаминоза А [10].

Использование информационного анализа позволило отобрать признаки, являющиеся в условиях нашего эксперимента диагностически значимыми для прогноза развития моделируемого состояния (табл. 2).

Информативность различий средних значений перечисленных выше восьми параметров, за исключением Grad2, рассчитанная на 4-й день опыта (до появления

признаков передозировки РП), превышала допустимый уровень  $I \geq 0,5$ . Следовательно, изменения этих МДМ параметров на доклинической стадии гипервитаминоза А могут быть прогностическими.

Вместе с тем при оценке информативности различных частотных характеристик тех же МДМ параметров более высокие, чем в первом случае, коэффициенты Кульбака имело лишь ограниченное число признаков: снижение Surface, увеличение Cur2 и снижение Dy. Информативность остальных признаков оказалась ниже допустимого уровня. При диагностической оценке различий усредненных значений МДМ параметров третьим по величине  $I$  оказался признак «снижение Volume», который при оценке информативности различий относительных величин параметров не имел диагностической значимости. Признак «снижение Dy» с высоким коэффициентом информативности, оцененной по различиям частотных характеристик, имел наименьший коэффициент, рассчитанный по формуле для абсолютных показателей.

Таким образом, оба варианта информационного анализа позволили выделить одинаковые наиболее информативные прогностические критерии передозировки РП, а именно – снижение Surface и увеличение Cur2 эритроцитов. Следовательно, при проведении морфометрических исследований оценка информативности различия показателей, выраженных в усредненной форме, равно как и информативности различия показателей, выраженных в относительных величинах, позволяет выбрать из массива данных наиболее диагностически значимые признаки структурных изменений.

Таблица 2 | Table 2

**Прогностические признаки, средние значения  $\bar{X}$  (SD) морфоденситометрических параметров эритроцитов в контрольной (К) и экспериментальной (Э) группах, значимость и информативность различий на 4-й день введения ретинола пальмитата |**

**Prognostic signs, mean values  $\bar{X}$  (SD) of erythrocyte morphodensitometric parameters in control (C) and experimental (E) groups, significance and informativeness of differences on day 4 of retinol palmitate administration**

Признак   Sign	К   C $\bar{X}$ (SD)	Э   E $\bar{X}$ (SD)	p = *	I (1) <sup>#</sup>	I (2) <sup>#</sup>
Снижение Surface   Surface decrease	3112,1±52,2	2788,8±46,7	0,02	1,01	4,61
Увеличение Cur2   Cur2 increase	-106,4±2,2	-122,0±2,9	0,001	0,98	4,14
Снижение Volume   Volume decrease	1495,5±26,9	1312,5±22,4	0,01	0,92	0,32
Снижение L_er   L_er decrease	125,9±1,6	114,4±1,6	0,01	0,89	0,04
Снижение Grad3   Grad3 decrease	-24,3±0,5	-20,3±0,6	0,001	0,77	0,00
Снижение Dy   Dy decrease	0,156±0,006	0,119±0,006	0,001	0,71	4,13
Увеличение Grad1   Grad1 increase	45,3±0,9	53,6±1,1	0,02	0,63	0,32
Снижение Grad2   Grad2 decrease	-36,5±0,7	-30,8±0,6	0,001	0,00	0,00

\* – значимость различий между группами, критерий Манна–Уитни

# – коэффициенты информативности, рассчитанные по формулам (1) и (2)

\* – significance of differences between groups, Mann–Whitney U-test

# – coefficients of informativeness computed by formulas (1) and (2)

Тем не менее при оценке информативности различных частотных характеристик МДМ параметров число диагностически значимых признаков оказалось более ограниченным, поэтому данный способ информационного анализа представляется более надежным и предпочтительным и позволяет при необходимости сократить количество параметров, измеряемых в повторяющихся условиях эксперимента.

### Заключение

На фоне развивающегося гипervитаминоза А, вызванного у крыс введением ретинола пальмитата, морфоденситометрические параметры эритроцитов изменяются. Наиболее информативными признаками передозировки ретинола пальмитата являются изменения, возникающие до появления симптомов гипervитаминоза А, – снижение площади поверхности и увеличение кривизны нисходящей части тора эритроцитов. В морфометрических исследованиях наряду с оценкой информативности различий усредненных показателей можно использовать оценку информативности различий их частотных характеристик.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Н. Яцковский, Т.В. Боронихина.

Сбор и обработка материала – Т.А. Ломановская.

Написание текста – Т.А. Ломановская, А.Н. Яцковский.

Редактирование – Т.В. Боронихина, А.Н. Яцковский.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.N. Yatskovskiy, T.V. Boronikhina.

Collected the data and performed the analysis – T.A. Lomanovskaya.

Wrote the paper – T.A. Lomanovskaya, A.N. Yatskovskiy.

Edited the manuscript – T.V. Boronikhina, A.N. Yatskovskiy.

### Литература/References

1. Цибулевский А.Ю., Дубовая Т.К., Соколинский Б.З. Сравнительное исследование реакции эритроцитов крови молодых и старых крыс на интоксикацию четыреххлористым углеродом при ваготомии. Успехи современного естествознания. 2015;(3):151–155.  
*Tsibulevskiy AY, Dubovaya TK, Sokolinskiy BZ. A comparative investigation of the response of blood erythrocytes of young and old vagotomized rats to tetrachloromethane intoxication. Advances in Current Natural Sciences. 2015;(3):151–155 (In Russ.).*
2. Щербakov И.Т., Леонтьева Н.И., Грачева Н.М., Соловьева А.И., Виноградов Н.А., Бабаева Р.Э. Морфология и морфометрические показатели слизистой оболочки различных отделов кишечника пациентов с постхолецистэктомическим синдромом. Морфологические ведомости. 2020;28(3):58–64. DOI: 10.20340/mv-mn.2020.28(3):58-64.  
*Shcherbakov IT, Leontieva NI, Grachiova NM, Soloviova AI, Vinogradov NA, Babaeva RE. Morphology and morphometric*
3. Гундарова О.П., Федоров В.П., Кварацхелия А.Г., Маслов Н.В. Сравнительная характеристика изменений нейронов головного мозга при однократном и пролонгированном радиационном воздействии. Журнал анатомии и гистопатологии. 2021;10(3):35–46. DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-35-46.  
*Gundarova OP, Fedorov VP, Kvaratskheliya AG, Maslov NV. Comparative characteristics of cerebral neuronal patterns after single and prolonged radiation exposure. Journal of Anatomy and Histopathology. 2021;10(3):35–46 (In Russ.). DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-35-46.*
4. Копьева Т.Н., Кактурский Л.В. Определение диагностической информативности неспецифических морфологических признаков. Архив патологии. 1976;38(12):60–63.  
*Kop'eva TN, Kakturskiy LV. Determination of the diagnostic informativeness of non-specific morphological signs. Arkhiv Patologii = Archive of Pathology. 1976;38(12):60–63 (In Russ.).*
5. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Ленинград: Медицина, 1973. 144 с.  
*Gubler EV, Genkin AA. Application of non-parametric statistical criteria in biomedical research. Leningrad: Medicina, 1973. 144 p. (In Russ.).*
6. Кактурский Л.В., Свищев А.В. Определение информативности различия средних показателей в морфометрических исследованиях. Архив патологии. 1982;44(7):78–79.  
*Kakturskiy LV, Svishchev AV. Determination of the informativeness of differences in mean values in morphometric studies. Arkhiv Patologii = Archive of Pathology. 1982;44(7):78–79 (In Russ.).*
7. Ломановская Т.А., Боронихина Т.В., Пьявченко Г.А., Яцковский А.Н. Влияние масляной основы ретинола пальмитата на морфологию эритроцитов. Морфологические ведомости. 2021;29(3):48–54. DOI: 10.20340/mv-mn.2021.29(3).610.  
*Lomanovskaya TA, Boronikhina TV, Pyavchenko GA, Yatskovskiy AN. The effect of the oil base of retinol palmitate solution on red blood cells morphology. Morphological newsletter. 2021;29(3):48–54 (In Russ.). DOI: 10.20340/mv-mn.2021.29(3).610.*
8. Raoofi A, Asadi A, Mardjanmehr SH, Kazempoor R. The effects of hypervitaminosis A in sheep following intramuscular administrations of vitamin A. Food Chem Toxicol. 2010;48(1):193–5. DOI:10.1016/j.fct.2009.09.038.
9. Lionikaite V, Gustafsson KL, Westerlund A, Windahl SH, Koskela A, Tuukkanen J et al. Clinically relevant doses of vitamin A decrease cortical bone mass in mice. J Endocrinol. 2018;239(3):389–402. DOI: 10.1530/JOE-18-0316.
10. Lind PM, Johansson S, Rönn M, Melhus H. Subclinical hypervitaminosis A in rat: Measurements of bone mineral density (BMD) do not reveal adverse skeletal changes. Chem Biol Interact. 2006;159(1):73–80. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.104.

**Информация об авторах**

Татьяна Александровна Ломановская – старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Татьяна Владимировна Боронихина – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Александр Никодимович Яцковский – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

**Author information**

Tatiana A. Lomanovskaya – Senior Lecturer, Histology, Cytology and Embryology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-7604-9415>

Tatiana V. Boronikhina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Histology, Cytology and Embryology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-9532-7898>

Alexander N. Yatskovskiy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Histology, Cytology and Embryology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0003-4387-7307>