

Д. т. н. С. І. СОКОЛ, к. т. н. К. В. КОЛІСНИК, Т. В. БЕРНАДСЬКА

Україна, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»

E-mail: kolesniknet@ukr.net, tatyana.bernadskaya@gmail.com

## ОЦІНКА МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДУ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ЕРИТРОЦИТІВ

*Досліджено метрологічні характеристики запропонованого методу побудови тривимірного зображення еритроцитів, який поєднує методи спектрального аналізу та імітації подвійного відпалу. Результати розрахунку приведених похибок і роздільної здатності вимірювального каналу цифрового інтерференційного мікроскопа вказують на прийнятну точність визначення геометричних параметрів форми еритроцитів, які можуть свідчити про певні діагностичні ознаки та бути використаними для аналізу клінічного стану організму пацієнта.*

*Ключові слова: форма еритроцита, тривимірне зображення, спектральний аналіз, метрологічні характеристики, похибка вимірювання, роздільна здатність.*

Нині для кількісного та якісного аналізу біологічних молекул в медичній біології широко використовується метод спектральної фотометрії. Принцип дії спектрофотометрії заснований на здатності молекул поглинати електромагнітне випромінювання в ультрафіолетовому, видимому та інфрачервоному діапазонах. Характеризуючи спектри поглинання біомолекулою квантів світла, можна кількісно та якісно визначати речовини, що входять до її складу, досліджувати механізми біохімічних реакцій, отримувати інформацію про особливості будови [1, 2].

В сучасній лабораторній клінічній діагностиці широко застосовуються оптичні методи аналізу, які використовують ці фізичні властивості напівпрозорих об'єктів, до яких можна віднести компоненти крові. Вимірювання оптичної щільності мікрооб'єкта на одній довжині хвилі (однохвильовий метод) дозволяє визначити концентрацію тільки одного компонента або показника [3]. Альтернативою цьому є метод багатокомпонентного спектрального аналізу. В його основі лежить закон Бугера — Ламберта — Бера, сутність якого полягає в тому, що спектр поглинання суміші речовин являє собою суму спектрів поглинання її компонентів [4]. Так, знаючи спектр крові та спектри поглинання компонентів її складових, можна дати кількісну оцінку концентрації всіх компонентів, розв'язавши відповідну математичну систему рівнянь для цих спектрів.

Однак існуючі методи оптичного аналізу еритроцитів не дозволяють зробити кількісну оцінку їхніх геометричних параметрів, які теж можуть свідчити про певні діагностичні ознаки та бути використаними для аналізу клінічного стану організму пацієнта.

Метою цієї роботи є оцінка метрологічних характеристик запропонованого авторами методу визначення геометричних параметрів форми еритроцитів.

### Алгоритм визначення морфології еритроцитів

Тривимірна візуалізація зображення еритроцитів з використанням методу спектрального аналізу та наступною обробкою цифрових сигналів передбачає наявність необхідного пристрою — цифрового інтерференційного мікроскопа. Основними складовими елементами цифрового інтерференційного мікроскопа є когерентне джерело світла трьох довжин хвиль, мікроскоп, що забезпечує необхідне збільшення мікрооб'єкта, цифрова камера в ролі фотоприймача цифрових сигналів, програмне забезпечення та комп'ютер. Авторами було вдосконалено пристрій для спектрального аналізу еритроцитів (рис. 1) [5—7], на якому були проведені дослідження зразків еритроцитів крові й отримані цифрові знімки, що використовувались для побудови тривимірного зображення досліджуваних зразків.

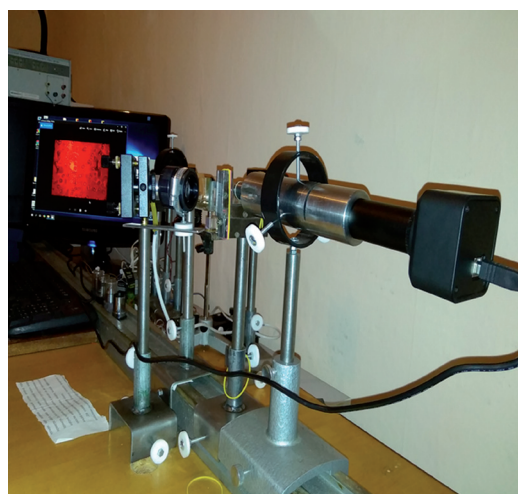


Рис. 1. Ровнішній вигляд удосконаленого пристрою для спектрального аналізу еритроцитів



Рис. 2. Зображення одного еритроцита в зеленому світлі

Вхідними даними для побудови тривимірного зображення еритроцитів крові були знімки зразків, зроблені на просвіт в звичайному світлі, а також при освітленні випромінюванням когерентного джерела світла з довжиною хвилі 405, 560 і 650 нм, що відповідають синьому, зеленому та червоному кольорам. Це дозволило підвищити достовірність отриманої тривимірної форми зображення еритроцита після додаткової кореляції зображення [8].

Алгоритм обробки отриманих зображень еритроцита розглянемо на прикладі знімка еритроцита в зеленому світлі (рис. 2).

Для побудови тривимірної моделі досліджуваного еритроцита в оптичній системі виділяється область, яка відповідає його зображенню (в нашому випадку її розміри склали 47×47 пікселів).

Геометричні параметри поверхні еритроцита, яка будується, визначаються залежністю висоти об'єкта від яскравості кольору випромінювання. При цьому результат спектрального аналізу зображення виходить дещо спотвореними через аберації оптичної системи, які є особливо відчутними при великих збільшеннях. В нашому випадку еритроцит аналізувався за достатньо великого збільшення — 400×. Крім того, на точність обробки зображення впливає й рівномірність освітленості всієї досліджуваної області, якої в реальних умовах експерименту добитися досить складно. В результаті тривимірне зображення еритроцита (рис. 3, а) виходить несиметричним щодо його вертикальної осі й потребує подальшого коригування.

Наведені недоліки можна усунути, використавши метод імітації подвійного відпаду стосовно побудови тривимірного зображення, який являє собою вдосконалений метод для уточнення результату, отриманого за допомогою загального методу імітації відпаду [9].

Наступним етапом аналізу є оцінка геометричних параметрів  $h$ ,  $r$ ,  $R$  поверхні еритроцита (рис. 4) відповідно до моделі, запропонованої в [10]. Приймається, що поверхня еритроцита описується виразом

$$F(x) = \begin{cases} h = 3 \frac{h-r}{R^2} x^2 + 2 \frac{h-r}{R^3} x^3, & t \in [0, R], \\ \sqrt{r^2 - (x-R)^2}, & t \in [R, R+r]. \end{cases} \quad (1)$$

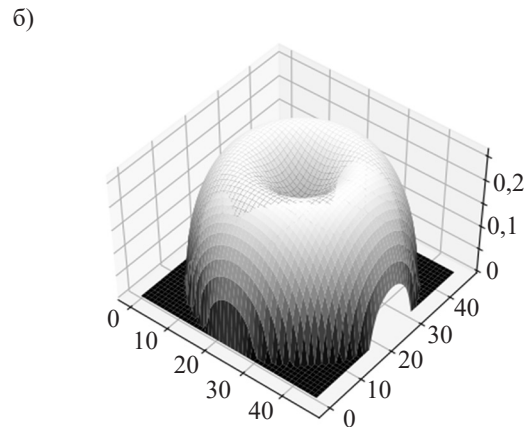
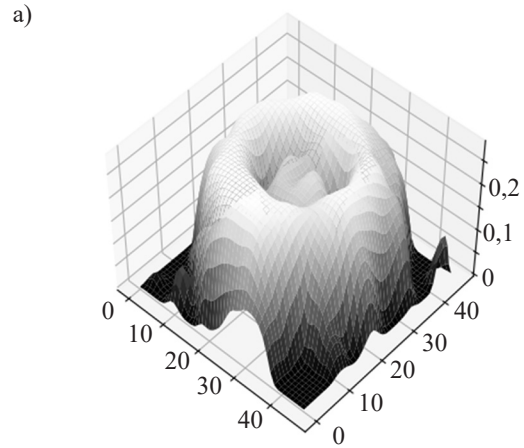


Рис. 3. Поверхня еритроцита, отримана після першої обробки зображення (а) та відновлена (б)

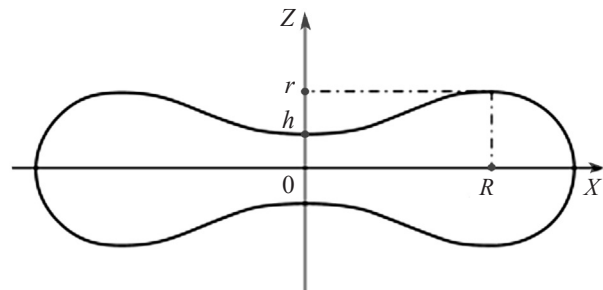


Рис. 4. Геометрична модель еритроцита

Для знаходження параметрів  $r$ ,  $R$ ,  $h$  використовується згаданий метод імітації подвійного відпаду з накладенням вертикальної та горизонтальної сіток.

Для можливості проведення коригування моделі поверхні еритроцита необхідно визначити базові значення його геометричних параметрів. Оскільки предметом дослідження була суспензія еритроцитів в «нормі», то для цього випадку було визначено, що  $r = 0,2611 \cdot 10^{-7}$  м;  $R = 0,2549 \cdot 10^{-7}$  м;  $h = 0,1879 \cdot 10^{-7}$  м.

Відновлену тривимірну форму поверхні еритроцита для розглянутого прикладу представлено на рис. 3, б.

Для можливості застосування отриманих геометричних параметрів з метою діагностики необхідно

провести метрологічну оцінку результатів і оцінити їхні метрологічні характеристики.

### Метрологічні характеристики методу спектрального аналізу морфології еритроцитів

Використання оптичної системи (рис. 1) з подальшою цифровою обробкою результатів й отриманням кількісної інформації щодо морфології еритроцитів дають підстави розглядати процедуру відновлення форми цього органіда крові як вимірювальну.

Метрологічне забезпечення будь-яких вимірювань і контролю передбачає використання еталонів або стандартних зразків вимірюваних величин [11, 14]. Під час проведення досліджень удосконаленого методу спектрального аналізу морфології еритроцитів було розглянуто можливість отримання стандартного зразка для одержання тривимірного зображення, адекватного моделі форми еритроцита на рис. 3, а. Основою стандартного зразка послужили знімки поодиноких еритроцитів, зроблені за допомогою мікроскопа та цифрової камери. Перевагою такої моделі є можливість метрологічного нормування форми тривимірної моделі для всіх поодиноких еритроцитів, отриманих в експерименті. Абсолютна похибка вимірювання геометричних параметрів стандартного зразка форми в цьому випадку не перевищує половини ціни поділки шкали цифрової камери ( $0,875 \cdot 10^{-3}$  мкм). Використовуємо стандартний зразок форми еритроцита для оцінки точності відновлення цієї ж форми за допомогою розробленого комплексного методу спектральної обробки, враховуючи, що максимальна похибка відновлення не перевищує  $50 \cdot 10^{-3}$  мкм. Порівняння абсолютної похибки цифрової камери й абсолютної похибки спектрального відновлення показує, що точність розробленого методу більш ніж в 50 разів перевищує точність відомого методу, а це повністю відповідає вимогам метрологічного забезпечення результатів аналізу вимірювального експерименту [13].

Для підтвердження достовірності значень абсолютних похибок відновлення форми зразка були проведені експерименти для еритроцитів зміненої форми з використанням стандартних методів одноразових і багаторазових вимірювань [12].

Для ілюстрації оцінки метрологічних характеристик пропонованого методу розглянемо приклад розрахунку похибки визначення геометричних параметрів двовимірного перерізу еритроцита (рис. 5). Висота еритроцита визначалась у 46 точках по горизонтальній осі перерізу, що відповідало ціні поділки шкали  $0,01 \text{ м}^{-7}$  та забезпечувало необхідну точність відновлення форми еритроцита.

Для оцінювання метрологічної відповідності пропонованого методу спектрального аналізу еритроцитів були використані такі критерії [13]:

— систематична похибка моделювання (похибка адекватності)  $\Delta_0$ ;

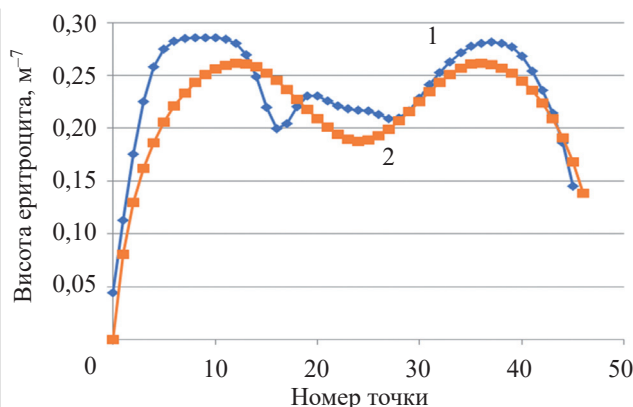


Рис. 5. Переріз поверхні еритроцита, отриманої після першої обробки зображення (1) та відновленої (2)

— середнє квадратичне відхилення (СКВ) випадкової абсолютної похибки  $\sigma_{\Lambda}$ ;  
 — СКВ повної похибки  $\sigma_{\Sigma}$  (з урахуванням не включеної систематичної похибки).

Було отримано:  
 $\Delta_0 = -0,017$  мкм;  
 $\sigma_{\Lambda} = 0,026$  мкм;  
 $\sigma_{\Sigma} = 0,0316$  мкм.

Для зручності використання цих результатів у метрологічних висновках абсолютні величини випадкової та повної похибок були перетворені в приведені (відповідно,  $\gamma_{\text{пр}}$  та  $\gamma_{\text{пр}\Sigma}$ ) [15]. При цьому нормувальною величиною було обрано значення  $0,29$  мкм, що відповідає середньому значенню максимальної висоти еритроцита. Приведені похибки склали:  $\gamma_{\text{пр}} = 9,0\%$ ,  $\gamma_{\text{пр}\Sigma} = 10,896\%$ .

Цікавою у наших дослідженнях є оцінка роздільної здатності  $R_y$  досліджуваних метода та пристрою для спектрального аналізу еритроцитів для двох варіантів процедури моделювання (з урахуванням того, що випадкова похибка вимірювання адитивна) [13]:

— без корекції (з урахуванням систематичної складової);  
 — з програмною корекцією на величину поправки, яка дорівнює систематичній складовій з протилежним знаком.

Сама роздільна здатність розраховується як відношення нормувальної величини  $0,29$  мкм до СКВ абсолютної похибки (в мкм).

Для першого варіанту, тобто без корекції, маємо  $R_y = 9,177$ , для другого —  $R_y = 11,115$ .

Порівняння приведених похибок і роздільної здатності цифрового інтерференційного мікроскопа як установки для непрямого вимірювання геометричних параметрів форми еритроцита вказує на те, що програмна корекція результату вимірювання збільшує точність моделювання. Більше того, значення розрахованих приведених похибок вказують на прийнятну точність моделювання, особливо якщо враховувати,

що досліджувана інформаційно-вимірвальна система спектрального відновлення належить до класу нестандартних засобів вимірювання.

### Висновки

Проведені дослідження з оцінки метрологічних характеристик пропонованого методу спектрального аналізу для визначення морфології еритроцитів показали, що точність отриманого тривимірного зображення в удосконаленому методі підвищується більш ніж на 20% по відношенню до інших відомих. Це дозволяє достовірніше визначати інформативні параметри геометричної структури еритроцитів і використовувати їх для отримання додаткових клінічних діагностичних характеристик стану організму пацієнта.

### ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. *Современные методы биофизических исследований*. Под ред. А.Б. Рубина. Москва, Высшая школа, 1988, 359 с.
2. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. *Физико-химические основы фотобиологических процессов*. Москва, Дрофа, 2006, 285 с.
3. Шмидт В. *Оптическая спектроскопия для химиков и биологов*. Москва, Техносфера, 2007, 368 с.
4. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П. и др. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*, 2008, т. 55, № 3, с. 464–470.
5. Сокол Є.І., Бернадська Т.В., Колесник К.В. та ін. *Мікроскоп для отримання трьохвимірного зображення мікрооб'єктів, що заломлюють світло*. Патент на корисну модель 138635 Україна, опубл. 10.12.19, бюл. №23/2019.
6. Сокол Є.І., Бернадська Т.В., Колесник К.В., Томашевський Р.С. *Інтерференційний голографічний мікроскоп з автоматизованою зміною збільшення та покращеними оптико-технічними*

*характеристиками*. Патент на корисну модель 141606 Україна, опубл. 27.04.2020, бюл. №8/2020.

7. Sokol Ye., Kolisnyk K., Tomashevskiy R., Bernadskaya T. Improving the Method of Interference Holography to Determinethe State of Plasma Membranes. *2019 IEEE 39<sup>th</sup> International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)*. Kyiv, Ukraine, 2019, pp. 157–164. <https://doi.org/10.1109/ELNANO.2019.8783675> (Ukr)

8. Сокол Е.И., Колесник К.В., Панибратцева С.Г., Бернадская Т.В. Методы трехмерной визуализации морфологии микрообъектов. *Материалы III Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні проблеми автоматики та приладобудування»*. Україна, Харків, 2020, с. 82–83.

9. Forman M.C., Aggoun A., McCormick M., Leicester U.K. Simulated annealing for optimisation and characterisation of quantisation parameters in integral 3d image compression. In *Image Processing II: Mathematical Methods, Algorithms and Applications*, 2000, pp. 399–413.

10. Tishko T., Titar V., Tishko D., Nosov K. Digital holographic interference microscopy in the study of the 3D morphology and functionality of human blood erythrocytes. *Laser Physics*, no. 18, pp. 486–490. <https://doi.org/10.1134/s11490-008-4024-0>

11. Володарський Є.Т., Кухарчук В.В., Поджаренко В.О., Сердук Г.Б. *Метрологічне забезпечення вимірювань і контролю*. Навч. посіб. Вінниця, Велес, 2001, 219 с.

12. Чинков В.М. *Основи теорії похибок засобів вимірювальної техніки*. Навч. посіб. Харків НТУ «ХПІ». 2008. 86 с.

13. Павленко Ю.Ф. *Забезпечення єдності електрорадіовимірювань*. Навч. посіб. Харків НТУ «ХПІ». 2011. 230 с.

14. Чинков В.Н. *Динамические фильтры и их применение при спектральном анализе случайных сигналов*. Харків, Вид-во «Підручник» НТУ «ХПІ», 2012, 284 с.

15. Кісіль І.С. *Метрологія, точність і надійність засобів вимірювання*. Івано-Франківськ, Вид-во «Факел», 2002, 400 с.

Дата надходження рукопису до редакції 23.06 2021 р.

DOI: 10.15222/TKEA2021.3-4.45  
UDC 576.3+543.42+519.6+006.9

Ye. I. SOKOL, K. V. KOLESNIK, T. V. BERNADS'KA

Ukraine, National Technical University  
“Kharkiv Polytechnic Institute”

E-mail: kolesniknet@ukr.net,  
tatyana.bernadskaya@gmail.com

## EVALUATION OF METROLOGICAL CHARACTERISTICS OF SPECTRAL ANALYSIS METHOD FOR DETERMINING ERYTHROCYTE MORPHOLOGY

*Spectral photometry is currently widely used for quantitative and qualitative analysis of biological molecules in medical biology. The method is based on the ability of molecules to absorb electromagnetic radiation. Modern clinical laboratory diagnostics extensively uses optical methods of analysis that rely on these physical properties of semitransparent objects, such as blood components. Knowing the absorption spectra of blood and its components, it is possible to quantify the concentration of all the components by solving the mathematical system of equations corresponding to these spectra. However, the existing methods of optical analysis of erythrocytes do not allow quantifying their geometric parameters, which may also indicate certain diagnostic signs and be used to analyze the clinical condition of the patient's body.*

*The aim of this work is to evaluate the metrological characteristics of the newly developed method of determining the geometric parameters of erythrocytes, which combines spectral analysis and double annealing.*

*The input data for the 3D imaging of erythrocytes were taken from the images of the sample both made in natural light and illuminated by a coherent light source with different wavelengths. The latter, after some additional image correlation, increases the reliability of the result. The calculation results on the errors and the measuring channel resolution of the digital interference microscope indicate an acceptable accuracy of the method. The accuracy of the three-dimensional image obtained by the proposed method is more than 20% higher than that of other known methods. This allows determining the informative geometric parameters of the structure of erythrocytes more accurately and using them to obtain additional clinical diagnostic characteristics of the patient's body.*

*Keywords: erythrocyte shape, 3D image, spectral analysis, metrological characteristics, measurement error, resolution.*

REFERENCES

1. Rubin A.B. (Ed.) *Sovremennyye metody biofizicheskikh issledovaniy* [Modern Methods of Biophysical Research]. Moscow, Vysshaya Shkola, 1988, 359 p. (Rus)
2. Vladimirov Yu.A., Potapenko A.Ya. *Fiziko-khimicheskiye osnovy fotobiologicheskikh protsessov* [Physico-chemical foundations of photobiological processes]. Moscow, Drofa, 2006, 285 p. (Rus)
3. Shmidt V. *Opticheskaya spektroskopiya dlya khimikov i biologov* [Optical Spectroscopy for Chemists and Biologists]. Moscow, Technosfera, 2007, 368 p. (Rus)
4. Merzlyak M. N., Chivkunova O. B., Maslova I. P. et al. Light absorption and scattering by cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2008, vol. 55, iss. 3, pp. 420–425.
5. Sokol Ye.I., Bernad'ska T.V., Kolesnyk K.V. et al. [Microscope for Obtaining a Three-Dimensional Image of Micro-Objects that Refract Light]. *Patent 138635 Ukraine*, publ. 10.12.19, bul. №23/2019. (Ukr)
6. Sokol Ye.I., Bernad'ska T.V., Kolesnyk K.V., Tomashevskiy R.S. [Interference Holographic Microscope with Automated Magnification Change and Improved Optical and Technical Characteristics]. *Patent 141606 Ukraine*, publ. 27.04.2019, bul. №8/2020. (Ukr)
7. Sokol Ye., Kolisnyk K., Tomashevskiy R., Bernadskaya T. Improving the Method of Interference Holography to Determinethe State of Plasma Membranes. *2019 IEEE 39<sup>th</sup> International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)*. Kyiv, Ukraine, 2019, pp. 157–164. <https://doi.org/10.1109/ELNANO.2019.8783675> (Ukr)
8. Sokol E.I., Kolesnik K.V., Panibratseva S.G., Bernadska T.V. [Methods of three-dimensional visualization of micro-object morphology]. *Materials of the III International Science and Technology Conference "Actual problems of automation and adjustment"*. Ukraine, Kharkov. 2020, pp. 82–83. (Ukr)
9. Forman M.C., Aggoun A., McCormick M., Leicester U.K. Simulated annealing for opti-misation and characterisation of quantisation parameters in integral 3d image compression. In *Image Processing II: Mathematical Methods, Algorithms and Applications*, 2000, pp. 399–413.
10. Tishko T., Titar V., Tishko D., Nosov K. Digital holographic interference microscopy in the study of the 3D morphology and functionality of human blood erythrocytes. *Laser Physics*, no. 18, pp. 486–490. <https://doi.org/10.1134/s11490-008-4024-0>
11. Volodarsky E.T., Kukharchuk V.V., Podzharenko V.O., Serduk G.B. *Metrolohichne zabezpechennya vymiryuvan' i kontrolyu. Navch. posib.* [Metrological Measurements and Control]. Vinnytsia, Veles, 2001, 219 p. (Ukr)
12. Chinkov V.M. *Osnovy teoriiy pokhybok zasobiv vymiryuval'noyi tekhniki* [Fundamentals of the Theory of Errors of Measuring Instruments]. Kharkiv, NTU "KhPI", 2008, 86 p. (Ukr)
13. Pavlenko Yu.F. *Zabezpechennya yednosti elektroradiovymiryuvan'* [Ensuring the Unity of Electrical and Radio Measurements]. Kharkiv, NTU "KhPI", 2011, 230 p. (Ukr)
14. Chinkov V.M. *Dinamicheskkiye fil'try i ikh primeneniye pri spektral'nom analize sluchaynykh signalov* [Dynamic Filters and their Application in Spectral Analysis of Random Signals]. Kharkiv, "Pidruchnik" NTU "KhPI", 2012, 284 p. (Ukr)
15. Kisil' I.S. *Metrolohiya, tochnist' i nadiynist' zasobiv vymiryuvannya* [Metrology, Accuracy and Reliability in the Measurement]. Ivano-Frankivsk. Publishing house "Fakel". 2002. 400 p. (Ukr)

**Опис статті для цитування:**

Сокол Є. І., Колісник К. В., Бернадська Т. В. Оцінка метрологічних характеристик методу спектрального аналізу для визначення морфології еритроцитів. *Технологія і конструювання в електронній апаратурі*, 2021, № 3–4, с. 45–49. <http://dx.doi.org/10.15222/ТКЕА2021.3-4.45>

**Cite the article as:**

Sokol Ye. I., Kolisnyk K. V., Bernad'ska T. V. Evaluation of metrological characteristics of spectral analysis method for determining erythrocyte morphology. *Tekhnologiya i Konstruirovaniye v Elektronnoi Apparature*, 2021, no. 3–4, pp. 45–49. <http://dx.doi.org/10.15222/ТКЕА2021.3-4.45>