

МАТЕМАТИЧНЕ І ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЛАЗЕРНОГО КРОС-КОРЕЛЯЦІЙНОГО СПЕКТРОМЕТРА ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ НЕСФЕРИЧНИХ НАНООБ'ЄКТІВ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

Р. Яремик, О. Бордун, В. Гетьман

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Драгоманова, 50, 79005, Львів, Україна
roman.yaremyk@lnu.edu.ua*

Для модифікованої схеми лазерного кореляційного спектрометра розроблено метод математичного аналізу поляризаційних компонент динамічного світлорозсіювання нанорозмірними об'єктами несферичної форми у суспензіях. Пропонований метод регуляризації оберненої спектральної задачі дозволяє отримати стійкі розв'язки для оцінки форми та аспектичних співвідношень досліджуваних наноб'єктів. Розроблено спеціалізований вимірювально-обчислювальний пристрій та програмне забезпечення для практичної реалізації цих інструментальних методів. Система вимірювання апробована для досліджень процесів активації імунних реакцій типу антиген-антитіло з утворенням агрегатних комплексів реагуючих компонентів. Отримані модельні характеристики розмірного розподілу та аспектичних відношень тестових наноб'єктів добре корелюють з даними експериментальних вимірів.

Ключові слова: лазерна кореляційна спектроскопія, динамічне світлорозсіювання, обернена задача, методи регуляризації, наноб'єкт, цифровий сигнальний процесор.

Вступ

Метод лазерної кореляційної спектроскопії відноситься до високоточних експресних оптико-електронних методів визначення розмірів нанорозмірних об'єктів у рідинних і газових середовищах. Для побудови розмірного розподілу реєструються флуктуації інтенсивності лазерного світла, розсіяного дисперсною системою. Автокореляційна і крос-кореляційна функції флуктуацій світлового розсіювання пов'язані експоненційною залежністю з коефіцієнтом дифузії наночастинок, що здійснюють броунівський рух в досліджуваній системі. Коефіцієнт дифузії залежить від гідродинамічного радіусу наночастинок і чисельно описується відомою формулою Енштейна-Смолуховського [1]. Таким чином, шуканий гідродинамічний радіус наночастинок може бути отриманий методом розв'язання оберненої задачі на основі вимірних значень кореляційних функцій флуктуацій інтенсивності розсіяного лазерного опромінення. Ця обернена задача відноситься до класу погано обумовлених некоректно поставлених задач, яким властива нестійкість розв'язків. Нестійкість полягає в сильній залежності вихідних результатів від невеликих змін вхідних даних. Для рішення нестійких обернених задач використовують методи регуляризації, що враховують апріорну інформацію в умовах неповноти експериментальних вимірювань [2-4].

Міжнародною організацією стандартизації розроблено і введено в дію стандарти для вимірювання розмірів наночастинок в дисперсних системах ISO22412:2017 (Particle size analysis - Dynamic light scattering DLS), ISO13321 (Particle Size Distribution - Photon Correlation Spectroscopy PCS) [5]. На основі стандартизованих методів лазерної кореляційної спектроскопії створені прилади для вимірювання розмірного розподілу частинок мікронного та нано-діапазонів. Добре відомі комерційні моделі таких приладів серійно виробляються фірмами: Zetasizer (Malvern Inc., Великобританія), Nanophox (Sympatec GmbH, Німеччина), Delsa Nano (Beckman, США), NanoBrook (Brookhaven Instruments, Великобританія), BT-90 NANO (Bettersize Instruments) [6-9]. Прилади представляють собою високотехнологічні оптико-електронні системи з вбудованим пропрієтарним програмним забезпеченням для керування процесами вимірювання та аналізу отриманих даних динамічного світлорозсіювання. В програмному забезпеченні реалізовані ефективні математичні методи регуляризації обернених спектральних задач (NNLS – Non-Negative Least Squares Fitting, Methods of Cumulants, CONTIN). В даний час лазерні кореляційні спектрометри набули широкого поширення і зарекомендували себе як надійні і точні засоби вимірювання і контролю розмірів нанооб'єктів в багатьох галузях нашої індустрії.

Методи лазерної кореляційної спектроскопії мають великі перспективи застосування для біомедичних досліджень. В біомедичній сфері багато задач залишаються недостатньо вивченими з причин відсутності інструментальних засобів та методик дослідження об'єктів в нанорозмірному діапазоні:

- молекулярно-динамічні процеси, що відбуваються в розчинах біологічних макромолекул та при взаємодії складових біологічних рідин з лікарськими препаратами;
- зміни відносно норми концентраційних співвідношень складових біологічних рідин;
- поява в рідинах агрегатів білків певних розмірів;
- зміни понад норму коефіцієнтів міжмолекулярної взаємодії білків;
- оцінка динаміки активації імунних реакцій.

Однак спроби використання комерційних моделей приладів DLS для біомедичних досліджень наштовхуються на ряд проблемних моментів. Одна з принципових причин труднощів використання серійних приладів полягає в тому, що їхні методи вимірювання та аналізу даних основані на теорії світлорозсіювання нанооб'єктами сферичної форми. Біологічні нанооб'єкти характеризуються формами далекими від сферичних: стовпчикоподібні, еліпсоподібні, дископодібні та ін. Для таких об'єктів застосування поняття гідродинамічного радіуса не є коректним. Тому моделі класичних обчислень реалізовані в пропрієтарному програмному забезпеченні серійних приладів в загальному випадку не можуть бути використані для вимірювання розмірів біологічних нанооб'єктів несферичної форми. Вимірювання геометричних параметрів несферичних наночастинок є більш складною задачею і на даний час має характер дослідницьких робіт, які виконуються науковими лабораторіями і групами. В експериментальних варіантах приладів пропонуються модифікації оптико-електронних схем реєстрації динамічного світлорозсіювання і нові математичні методи аналізу результатів вимірювань. В роботі розглядається реалізація розробленого лазерного кореляційного аналізатора динамічного світлорозсіювання спеціалізованого для досліджень несферичних біологічних нанооб'єктів в суспензіях.

Розроблений метод і результати моделювання

Пропонований метод реєстрації та опрацювання даних розроблений для обчислення геометричних параметрів несферичних наночастинок в полідисперсних суспензіях. Метод базується на модифікованій оптичній схемі реєстрації флуктуацій світлорозсіювання броунівськими частинками та розширеній інтерпретації класичної теорії фотонної кореляційної спектроскопії.

У класичному представленні наночастинок у суспензіях здійснюють броунівський рух, який розглядається як дифузійний процес, що чисельно характеризується коефіцієнтом дифузії:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (1)$$

де k – стала Больцмана, T – абсолютна температура, η – динамічна в'язкість середовища, r – радіус частинки.

При лазерному опроміненні досліджуваних об'єктів флуктуації інтенсивності світла, розсіяного рухомими броунівськими частинками, функціонально зв'язані з коефіцієнтом дифузії, тобто з радіусами частинок. Розподіл частинок за розмірами на основі методу динамічного розсіювання може бути визначений з інтегрального рівняння:

$$g(\tau) = \int_0^{\infty} F(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma, \quad (2)$$

де τ – час кореляції, $g(\tau)$ – нормована автокореляційна функція поля розсіяного світла, $F(\Gamma)$ – функція розподілу частинок за величиною коефіцієнта Γ .

Коефіцієнт дифузного розширення Γ визначають із співвідношення:

$$\Gamma = Dq^2. \quad (3)$$

Хвильовий вектор розсіяного випромінювання обчислюється за формулою:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (4)$$

де λ – довжина хвилі лазерного променя, n – коефіцієнт заломлення середовища, θ – кут реєстрації розсіювання.

В серійних моделях лазерних кореляційних аналізаторів розмірного розподілу наночастинок реєструються флуктуації інтенсивності світлорозсіювання на досліджуваних частинках, будується автокореляційна функція поля розсіяного світла $g(\tau)$, і на основі розв'язання інтегрального рівняння (2) знаходиться шукана функція розмірного розподілу гідродинамічних радіусів наночастинок.

Вищеописані методи вимірювання і обчислення працюють коректно і точно при роботі з наночастинок сферичної форми. Спроби застосувати існуючі прилади фотонної кореляційної спектроскопії для дослідження наночастинок біологічної природи дають негативні результати. Основна причина отримання некоректних результатів полягає в тому, що більшість біологічних наночастинок характеризується несферичною формою поверхні. Для таких об'єктів формула Енштейна-Смолуховського (1) не може бути застосована у класичному представленні. Розміри несферичних форм неможливо описати одним параметром – гідродинамічним радіусом.

Ще одна причина додаткових похибок – складний і нерівномірний розподіл множинних максимумів і мінімумів діаграми світлорозсіювання несферичних біологічних нанооб'єктів в стані броунівського руху. На відміну від сферичних частинок інтенсивність світлорозсіювання складніших геометричних форм залежить від орієнтації елементів поверхні відносно кута падіння зондуючого опромінення та кута реєстрації розсіяного світла. В процесі броунівського руху орієнтація несферичних частинок набуває довільних значень, тому флуктуації розсіяного світла промодульовані цими випадковими процесами не можуть розглядатись як інформативні сигнали і не придатні для побудови автокореляційної функції поля розсіяного світла $g(\tau)$.

Певні труднощі, які виникають при застосуванні серійних моделей приладів DLS для аналізу нанооб'єктів складних геометричних форм, активують наукові дослідження і пошуки рішень цих актуальних задач. Дослідницькі групи пропонують різні варіанти модифікації оптико-електронних систем реєстрації динамічного світлорозсіювання для збільшення інформативності вимірюваних параметрів. Для таких систем розвиваються нові математичні методи багатовимірного аналізу даних [10,11,13]. В цій роботі розглядаються особливості побудови і результати апробації розробленого експериментального лазерного кореляційного аналізатора DLS з розширеними можливостями для характеристики несферичних біологічних нанооб'єктів в суспензіях. При його розробці були враховані нові тренди наукових досліджень в сфері лазерної кореляційної спектроскопії, досягнення сучасної елементної бази електроніки та інформаційних технологій.

В розширеній інтерпретації коефіцієнт дифузії броунівської частинки (1) розглядається як сума двох складових: коефіцієнта дифузії поступального руху D_t (трансляційна дифузія), і коефіцієнта дифузії обертального руху D_r (ротаційна дифузія). Для чисельного аналізу коефіцієнти дифузії записуються у вигляді [14]:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (5)$$

$$D_r = \frac{kT}{8\pi\eta r^3}. \quad (6)$$

Трансляційна та ротаційна дифузії несферичних об'єктів відрізняються поляризаційними характеристиками розсіяного світла. Фотодетекторами реєструються дві компоненти розсіяного світла: ко-поляризаційна компонента UV , яка співпадає з поляризацією зондуючого опромінення, та крос-поляризаційна компонента UH , для якої напрям поляризації перпендикулярний до поляризації падаючого випромінювання. Обидві компоненти реєструють при двох ортогональних положеннях поляризатора-аналізатора призми Глана-Томпсона. Автокореляційна функція ко-поляризованої компоненти розсіяного світла несе інформацію про трансляційний коефіцієнт дифузії. Автокореляційна функція крос-поляризованої компоненти розсіяного світла дозволяє знайти коефіцієнт ротаційної дифузії для випадку несферичних частинок, з якого можна визначити аспектне співвідношення. Швидкості релаксації флуктуацій розсіяного світла для трансляційної і ротаційної складових зв'язані з коефіцієнтами дифузії [15]:

$$\Gamma_{UV} = D_t q^2, \quad (7)$$

$$\Gamma_{UH} = D_t q^2 + 6D_r. \quad (8)$$

Термін «розмір несферичної частинки» також потребує уточнення. Класичне поняття гідродинамічного радіусу у даному випадку некоректне - тільки об'єкти сферичної форми можуть характеризуватись одним числовим значенням. Для модельних представлень розмірів несферичних форм вводиться поняття аспектного співвідношення:

$$A=L/d, \quad (9)$$

де L – поздовжній розмір, d – поперечний розмір.

Перехід до опису геометричних розмірів наночастинок з допомогою аспектного співвідношення (9) викликає необхідність зміни модельних представлень коефіцієнтів дифузії D_t та D_r у формулах (5), (6). За основу використано моделі об'єктів з обертальною симетрією, для яких формули коефіцієнтів дифузії можна записати у вигляді [16]:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta L} [\ln A + C_t(A)], \quad (10)$$

$$D_r = \frac{kT}{\pi\eta L^3} [\ln A + C_r(A)], \quad (11)$$

де $A=L/d$ - аспектне співвідношення, $C_t(A)$, $C_r(A)$ – функції корекції для трансляційної і ротаційної дифузії, що враховують особливості геометрії частинок.

Існує багато методів обчислення коефіцієнтів $C_t(A)$, $C_r(A)$ для частинок різної форми. При апробації методу значення $C_t(A)$, $C_r(A)$ приймалися рівними нулю, що допустимо для частинок з обертальною симетрією [16].

З рівнянь (10), (11) легко отримати формулу знаходження поздовжнього розміру наночастинки:

$$L = \sqrt{6 \frac{D_t \ln A + C_t(A)}{D_r \ln A + C_r(A)}}. \quad (12)$$

Отримані математичні моделі дозволяють розв'язати основну задачу знаходження розмірного розподілу нанооб'єктів несферичних форм. Для визначення розмірів наночастинок необхідно побудувати автокореляційну функцію сигналів світлорозсіювання, розв'язати обернену некоректну задачу для визначення коефіцієнтів дифузії і за допомогою формул (10) - (12) знайти розміри частинок та аспектне відношення (9). Автокореляційна функція $g(\tau)$ будується на основі експериментальних даних реєстрованих флуктуацій інтенсивності розсіяного лазерного опромінення. На рис. 1 показаний вигляд експериментально знятих автокореляційних функцій для частинок трьох розмірів: 20 нм, 150 нм, 400 нм.

Розв'язання рівняння (2) зводиться до системи лінійних рівнянь, які в матричному вигляді можуть бути записані:

$$\mathbf{Ax} = \mathbf{b} \quad (13)$$

де \mathbf{A} – матриця $m \times n$, що складається із значень теоретичних функцій автокореляцій $g(\tau)$ для частинок радіусом r_n в моменти часу τ_m , \mathbf{b} – вектор-стовбець $m \times 1$ значень експериментально отриманої функції автокореляції в моменти τ_m , \mathbf{x} – шуканий вектор-стовбець $n \times 1$ внеску кожної теоретичної автокореляційної функції.

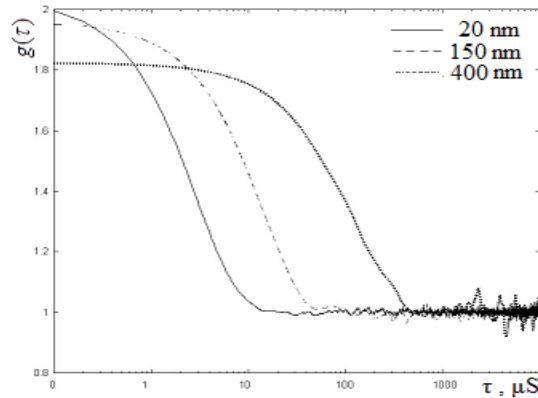


Рис.1. Вигляд експериментально знятих автокореляційних функцій для частинок з розмірами 20 нм, 150 нм, 400 нм.

Система рівнянь (13) відноситься до класу погано зумовлених. Для її розв'язування розроблено новий регуляризуючий алгоритм. Суть методу регуляризації полягає в побудові ітераційного процесу, в якому першим наближенням є результат, отриманий методом регуляризації Тихонова, а у наступних наближеннях використовуються вектори попередніх наближень, перетворені у діагональну матрицю. Початкове наближення визначається по регуляризуючій формулі Тихонова:

$$\mathbf{x}_1 = (\mathbf{A}'\mathbf{A} + \alpha\mathbf{\Omega})^{-1} \mathbf{A}'\mathbf{B}, \quad (14)$$

де \mathbf{A}' - транспонована матриця \mathbf{A} , $\alpha > 0$ – параметр регуляризації для якого початкове наближення x_1 невід'ємне, $\mathbf{\Omega} \in R^{n \times n}$ - матриця, компоненти якої рівні:

$$\omega_{ij} = \begin{cases} n-1, & i = j \\ -1, & i \neq j \end{cases}.$$

Наступні наближення обчислюються через попередні:

$$\mathbf{x}_{k+1} = \mathbf{D}_k (\mathbf{A}'\mathbf{A}\mathbf{D}_k + \alpha\mathbf{\Omega})^{-1} \mathbf{A}'\mathbf{B}, \quad k = 1, 2, \dots \quad (15)$$

де $\mathbf{D}_k = \text{diag}(x_{k_1}, x_{k_2}, \dots, x_{k_n})$, (16)

де x_{k_i} , $i = 1, 2, \dots, n$ - компоненти вектора \mathbf{x}_k .

Ітераційний процес (14) – (16) є регуляризуючою процедурою для задачі (13), за умови невід'ємності компонентів векторів розв'язку та початкового наближення, причому параметром регуляризації є номер ітерації [17].

Розроблено алгоритм пошуку розв'язку лінійної оберненої задачі, який полягає у виборі оптимального параметра α та критерію зупинки ітераційного процесу. Значенням параметра α вибирають найменше з тих, для яких початкове наближення є додатним. Для визначення числа ітерацій для одержання результату з мінімальною похибкою, будують залежність нев'язки послідовних наближень $\|\mathbf{A}\mathbf{x}_k - \mathbf{b}\|$ від числа ітерацій. Число ітерацій вибирають в зоні переходу від ділянки в якій відбувається зменшення нев'язки при збільшенні k , до області, в якій значення нев'язки практично не змінюється [18].

Очевидно, що при застосуванні описаного методу для розв'язання рівняння (2) враховується представлення коефіцієнта дифузного розширення Γ у вигляді двох складових: ко-поляризаційної компоненти Γ_{UV} (7), і крос-поляризаційної компоненти Γ_{UH} (8). У формулах (7) та (8) використовуються модельні представлення коефіцієнтів дифузії D_t , D_r згідно з формулами (10), (11), які дозволяють знайти геометричні розміри та аспектне відношення несферичних нанооб'єктів.

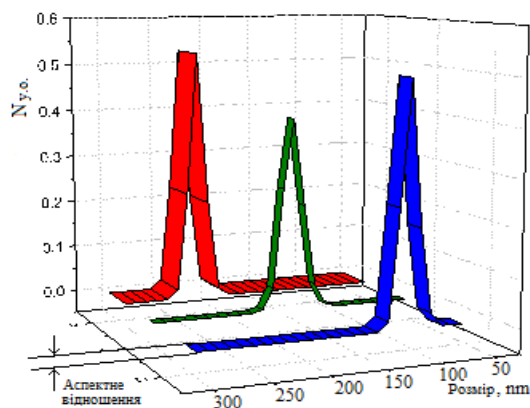


Рис. 2. Графічна візуалізація модельних представлень розмірних і аспектних параметрів еталонних нанооб'єктів з розмірами 80 нм, 150 нм, 230 нм.

Імітаційне і структурне моделювання досліджуваних процесів виконувалось в програмному пакеті комп'ютерної алгебри MATLAB-Simulink. На рис. 2 показані графічні представлення отриманих розв'язків інтегрального рівняння (2). Отримані модельні характеристики розмірного розподілу і аспектних відношень тестових нанооб'єктів добре корелюють з даними експериментальних вимірів. Розроблені програмні моделі m-формату системи MATLAB з допомогою пакету розширення MATLAB Compiler конвертовані в автономні C/C++ програмні модулі для апаратної платформи кореляційного аналізатора.

Програмно-апаратна реалізація крос-кореляційного аналізатора

Крос-кореляційний аналізатор представляє собою оптико-електронну систему, яка на програмній основі реалізує наступні операції:

- реєстрацію флуктуацій інтенсивності лазерного світла, розсіяного досліджуваною дисперсною системою;
- побудову автокореляційних та крос-кореляційних функцій для реєстрованих сигналів динамічного світлорозсіювання біологічними нанооб'єктами;
- розв'язання оберненої задачі для знаходження розмірних та аспектних характеристик нанооб'єктів на основі вимірних значень кореляційних функцій;
- графічну візуалізацію в реальному масштабі часу процесу вимірювання та побудови розв'язку.

Функціональна блок-схема кореляційного аналізатора приведена на рис. 3. Схема містить два ідентичні вимірювальні канали для реєстрації інформаційних сигналів

фотодетекторів 1 і 2 відповідно. Фотодетектори від'юстовані для реєстрації динамічного світлорозсіювання зондуючого лазерного опромінення (промені А,В) досліджуваними нанооб'єктами в зоні вимірювання кювети. Аналогові сигнали фотодетекторів обох каналів з допомогою аналого-цифрових перетворювачів (АЦП) сигнальних процесорів DSP1, DSP2 перетворюються в 10-розрядний код і в подальшому опрацьовуються цифровими методами. Керування виконавчими елементами схеми (оптичний затвор 1-2, поляризатор, лазер), синхронізація роботи основних вузлів, програмний аналіз результатів, комунікаційний інтерфейс з ПК, забезпечуються процесорним модулем ARM Cortex-A7 (A20 All Winner).

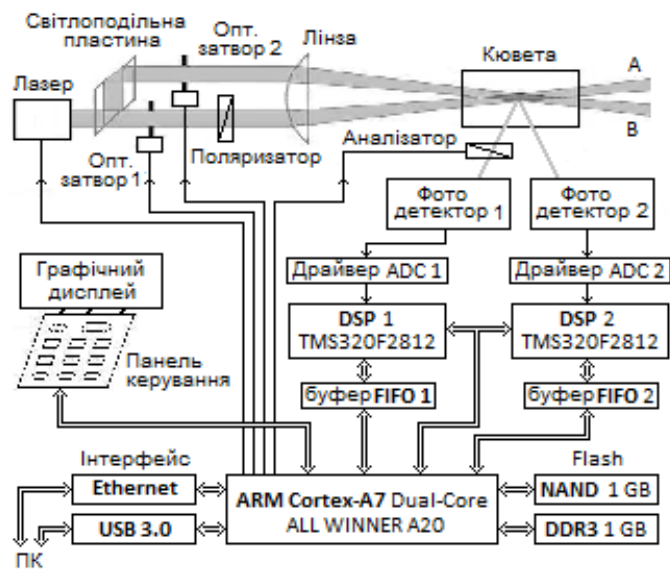


Рис. 3. Функціональна схема крос-кореляційного аналізатора динамічного світлорозсіювання.

Вимірювальний канал 1 (вимірювальний канал 2, ідентичний першому) реалізований на базі цифрового сигнального процесора DSP1. Особливістю запропонованої схеми є метод аналогової фотореєстрації сигналів фотодетектора. В порівнянні з альтернативним методом прямого підрахунку фотонів аналоговий метод має переваги при великих швидкостях підрахунку з частим перекриванням фронтів фотоімпульсів. При використанні аналого-цифрового перетворення на основі аналізу форм огинаючих сигналів простіше виконати їх ідентифікацію на фоні завад. Використаний метод також дозволяє неперервно коректувати параметри часової і температурної нестабільності темних шумів фотоелектронних помножувачів (ФЕП). Для реалізації аналогового способу реєстрації і фільтрації високодинамічних сигналів фотодетекторів необхідне використання швидкодіючих і високопродуктивних аналого-цифрових програмованих компонентів. Таким вимогам відповідає цифровий сигнальний процесор DSP1 (TMS320F2812, Texas Instruments). Інтегрований в DSP 10-розрядний АЦП з періодом дискретизації сигналів 100 нс, апаратна і програмна підтримка команд для обчислення інтегральної згортки сигналів дозволяють реалізувати вимірювання і

кореляційний аналіз сигналів флуктуацій інтенсивності світлорозсіювання в реальному масштабі часу. Програмно-апаратне реконфігурування схеми вимірювання дозволяє реалізувати три спеціалізовані режими роботи корелятора, діагностику працездатності вузлів та калібрування системи.

Режим роботи 1. При включенні оптичного затвора 2 в зону реєстрації кювети подається тільки промінь В зондуючого лазерного опромінення (див. рис. 3). В цьому режимі флуктуації інтенсивності світла, розсіяного досліджуваними нанооб'єктами, реєструються тільки фотодетектором 2. Режим роботи з одним фотодетектором дозволяє реалізувати метод автокореляційного аналізу флуктуацій інтенсивності розсіяного світла. Автокореляційна функція для цього випадку може бути записана у вигляді:

$$g(\tau) = \langle I(t)I(t-\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t-\tau) dt, \quad (17)$$

де $g(t)$ – автокореляційна функція, $I(t)$ – інтенсивність розсіяного світла в зоні реєстрації, τ – час кореляції, $I(t-\tau)$ – інтенсивність розсіяного світла за час $(t-\tau)$, T – час усереднення.

Аналогові сигнали флуктуацій інтенсивності розсіяного світла $I(t)$ реєструються фотодетектором 2 з наступним перетворенням в цифровий формат з допомогою АЦП інтегрованого в DSP2. При цьому інформаційний сигнал представляється дискретними відліками $u_i(t_i)$ в моменти часу t_i . Відліки сигналу записуються в буфер пам'яті FIFO2 (First In First Out) з періодом дискретизації АЦП рівним 100 нС. Для цього випадку автокореляційна функція змін інтенсивності світлорозсіювання має вигляд:

$$g(\tau_j) = \langle u_i(t)u_i(t-\tau) \rangle = \frac{1}{J} \sum_{i=0}^{J-1} u_i(t_i)u_i(t_i - \tau_j), \quad (18)$$

де $u_i(t_i)$ – значення відліків сигналу в моменти часу t_i , J – кількість точок, що визначають шукану автокореляційну функцію.

Значення автокореляційної функції флуктуацій розсіяного світла $g(\tau)$, отримані на основі формули (18), можуть бути використані для розв'язання інтегрального рівняння (2) відносно коефіцієнта дифузного розширення (3). Результатом розв'язку лінійної системи рівнянь (13) буде функція розмірного розподілу гідродинамічних радіусів наночастинок. Розглянутий режим роботи і метод кореляційного аналізу може бути використаний для досліджень об'єктів тільки сферичної форми.

Режим роботи 2. Для досліджень несферичних нанооб'єктів використовуються поляризаційні характеристики розсіяного світла. У цьому випадку вимірвальна схема корелятора реконфігурується. Виключення оптичного затвора 2 перекриває поширення лазерного променя В. Одночасно включається оптичний затвор 1, який дозволяє поступлення в зону реєстрації кювети поляризованого лазерного опромінення А (див. рис.3). В цьому режимі флуктуації інтенсивності поляризованого світла, розсіяного досліджуваними нанооб'єктами, реєструються тільки фотодетектором 1. Відмінною особливістю даного режиму роботи є можливість програмно встановлювати два ортогональні положення поляризатора-аналізатора. Це дозволяє реєстрацію фотодетектором 1 двох компонент розсіяного світла: ко-поляризаційної компоненти UV, яка співпадає з поляризацією зондуючого опромінення, та крос-поляризаційної компоненти УН, для якої напрям поляризації перпендикулярний до поляризації падаючого випромінювання. Для кожної компоненти по формулі (18) обчислюються автокореляційні функції флуктуацій поляризованого розсіяного світла, які відображають трансляційну і ротаційну складові дифузійного розширення (див. формули (7), (8)).

Розв'язання оберненої задачі (2) з новими значеннями автокореляційних функцій з врахуванням формул (10)-(12) дозволяє отримати розміри несферичних наноб'єктів та їх аспектне відношення (9).

Розроблене програмне забезпечення дозволяє графічно візуалізувати процес побудови розв'язку оберненої задачі та в динаміці відобразити еволюцію розмірних та аспектних характеристик взаємодіючих досліджуваних біологічних наноб'єктів.

На рис. 4 показано приклад роботи програми візуалізації в процесі реєстрації імунної реакції антиген-антитіло з утворенням імунних агрегатних комплексів розміром 400-500 нм. Візуалізація змін аспектного співвідношення досліджуваних об'єктів в процесі експерименту має особливо важливе значення при дослідженні молекулярно-динамічних процесів в розчинах біологічних макромолекул, взаємодії складових біологічних рідин з лікарськими препаратами, оцінки динаміки активації імунних реакцій.

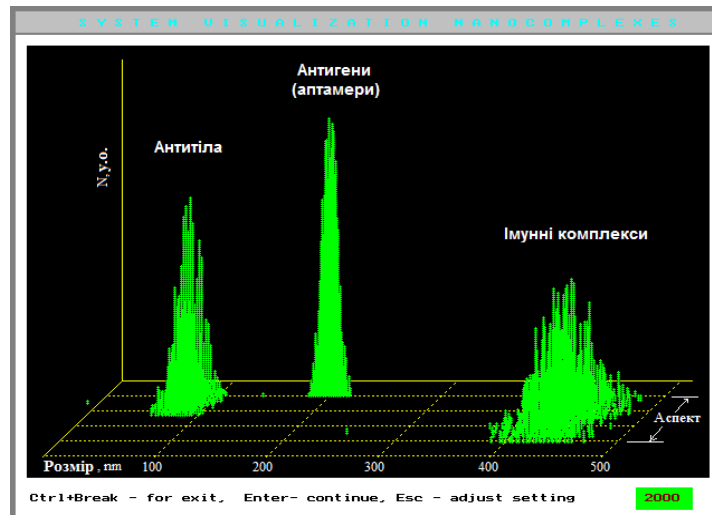


Рис.4. Графічна візуалізація зміни розмірного розподілу та аспектного співвідношення компонентів імунної реакції антиген-антитіло.

Режим роботи 3. Крос-кореляційний аналіз флуктуацій розсіяного світла використовується при роботі з непрозорими рідинними суспензіями. У цьому режимі поляризатор виключається з оптичної схеми вимірювання. Одночасне включення оптичних затворів 1,2 дозволяє подачу в зону реєстрації кювети обох променів (А і В) зондуєного лазерного опромінення (див. рис. 3). Інтенсивності флуктуацій розсіяного світла реєструються фотодетекторами обох вимірювальних каналів. Крос-кореляційна функція для цього випадку може бути записана у вигляді:

$$g_{12}(\tau) = \langle I_1(t)I_2(t-\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I_1(t)I_2(t-\tau)dt, \quad (19)$$

де $g_{12}(\tau)$ – крос-кореляційна функція двох сигналів, $I_1(t)$ – сигнал інтенсивності розсіяного світла фотодетектора 1, τ – час кореляції, $I_2(t-\tau)$ – сигнал інтенсивності розсіяного світла фотодетектора 2 за час $(t-\tau)$, T – час усереднення.

Аналогічно до попередніх режимів роботи, аналогові сигнали флуктуацій інтенсивності розсіяного світла $I_1(t)$, $I_2(t)$ реєструються фотодетектором 1 та фотодетектором 2 з наступним перетворенням в цифровий формат з допомогою аналого-цифрових перетворювачів інтегрованих в DSP1 та DSP2 відповідно. При цьому інформаційні сигнали представляються своїми дискретними відліками $u_1(t_i)$ та $u_2(t_i)$ в моменти часу t_i . Відліки сигналу $u_1(t_i)$ записуються в буфер пам'яті FIFO1, відліки сигналу $u_2(t_i)$ записуються в буфер пам'яті FIFO2. Для випадку цифрового формату вхідних даних крос-кореляційна функція змін інтенсивності світлорозсіювання має вигляд:

$$g_{12}(\tau_j) = \frac{1}{J} \sum_{i=0}^{J-1} u_1(t_i) u_2(t_i + \tau_j) = g_{12}(-\tau_j) = \frac{1}{J} \sum_{i=0}^{J-1} u_2(t_i) u_1(t_i - \tau_j), \quad (20)$$

де $u_1(t_i)$ – значення відліків сигналу фотодетектора 1 в моменти часу t_i , $u_2(t_i)$ – значення відліків сигналу фотодетектора 2 в моменти часу t_i , τ – час кореляції, $g_{12}(\tau)$ – крос-кореляційна функція, J – кількість точок, що визначають шукану крос-кореляційну функцію.

Метод крос-кореляційної обробки має переваги при реєстрації сигналів з високим рівнем шумів. Такі випадки мають місце при роботі з непрозорими суспензіями з великою концентрацією об'єктів та багатократним відбиванням розсіяного світла. Шумові завади маскують корисні сигнали і зменшують достовірність вимірів. При реєстрації крос-кореляційної функції вимірювання відбувається по двох незалежних каналах. Шляхи проходження зондуючих лазерних променів та розсіяного світла для кожного каналу різні. Множинні перевипроміювання, які виникають на цих траєкторіях також мають індивідуальну природу і можуть розглядатись як незалежні випадкові процеси. Такі шумові сигнали представляють собою некорельовані випадкові процеси з швидкоспадною кореляційною функцією. Цей факт дозволяє виділити корисні інформаційні сигнали на фоні сильних шумових завад в обох каналах вимірювання.

Схематично це можна представити у вигляді:

$$g_{12}(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T [I_1(t) + I_n(t)][I_2(t+\tau) + I_n(t+\tau)] dt = K i_1 i_2(\tau) + K i_n i_n(\tau) + K i_1 i_n(\tau) + K i_n i_2(\tau), \quad (21)$$

де $I_1(t)$ – сигнал фотодетектора 1, $I_2(t)$ – сигнал фотодетектора 2, $I_n(t)$ – сигнал шумової завади (noise), $K(\tau)$ – крос-кореляційні функції.

Оскільки сигнал і шуми некорельовані, $K i_1 i_n(\tau) = 0$ та $K i_n i_2(\tau) = 0$. Кореляційна функція шумів $K i_n i_n(\tau)$ також з ростом τ швидко згасає, так як шум представляє собою класичний дельта-корельований процес. Це означає, що при крос-кореляційній обробці з ростом τ шумові завади обох каналів вимірювання ефективно нейтралізуються.

Висновки

Отримані модельні представлення для аналізу несферичних нанорозмірних об'єктів у суспензіях розширюють інструментальні можливості методу класичної фотонної кореляційної спектроскопії. У порівнянні з вбудованим пропріетарним програмним забезпеченням серійних приладів, запропонована програмна реалізація базується на

Список використаних джерел

- [1] R. Xu. Particle Characterization: Light Scattering Methods. Beckman Coulter Inc., Miami, U.S.A., Kluwer Academic Publishers, 2002. Print ISBN:0-792-36300-0. –397 p.
- [2] X. Zhu, J. Shen, and L. Song. Accurate retrieval of bimodal particle size distribution in dynamic light scattering // IEEE Photonics Technol. Lett. 2016. **28**(3) – P. 311–314.
- [3] A. G. Mailer, P. S. Clegg, and P. N. Pusey. Particle sizing by dynamic light scattering: non-linear cumulant analysis // J. Phys. Condens. Matter. 2015. Vol.**27**. No 14. – P.145102.
- [4] L. Li, L. Yu, K. Yang, W. Li, K. Li, M. Xia. Angular dependence of multiangle dynamic light scattering for particle size distribution inversion using a self-adapting regularization algorithm // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer. 209 (2018). – P. 91–102.
- [5] ISO 22412:2017 Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS). Updates and extends ISO 13321:1996. Particle size analysis - Photon Correlation Spectroscopy (PCS). International Organisation for Standardisation (ISO).
- [6] Zetasizer Range [Electronic source]. – Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/>
- [7] Dynamic Light Scattering [Electronic source]. – Available from: <https://www.sympatec.com/en/particle-measurement/sensors/dynamic-light-scattering/>
- [8] Home/Particle Characterization/NanoBrook Series/ [Electronic source]. – Available from: <https://www.brookhaveninstruments.com/product/nanobrook-series/>
- [9] Delsa Nano [Electronic source]. – Available from: <https://www.beckman.com/particle-size-analyzers/>
- [10] Alexander V. Malm & Jason C. W. Corbett. Improved Dynamic Light Scattering using an adaptive and statistically driven time resolved treatment of correlation data. 2019. 9:13519. [Electronic source]. – Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-50077-4>
- [11] S. Schintke, E. Frau. Modulated 3D Cross-Correlation Dynamic Light Scattering Applications for Optical Biosensing and Time-Dependent Monitoring of Nanoparticle-Biofluid Interactions // Appl. Sci. **2020**, 10(24), 8969. [Electronic source]. – Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/24/8969>
- [12] O. Bilyy, R. Yaremyk, S. Kostyukevych, K. Kostyukevych. Adaptive cross-correlation detector for signals of optoelectronic reflective sensors // Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics, 2009. V. 12, N 2. – P. 170-172. PACS 42.79.
- [13] Nepomnyashchaya E., Zabalueva Z., Velichko E., Aksenov E. Modifications of laser correlation spectrometer for investigation of bio-logical fluids // EPJ Web of Conferences. 2017. Vol. 161. – P. 02017.
- [14] Zakharov P., Scheffold F. Light Scattering Reviews 4. Springer Praxis Books, 2009. – P.433–467.
- [15] Matsuoka H. // Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 1996. Vol. 109. – P. 137-145.
- [16] Ortega A., Garcia de la Torre J. Hydrodynamic properties of rodlike and Disklike particles in dilute solutions // J. Chem. Phys. 2003. V.119. – P.9914-9919.

- [17] Гетьман В.Б. Обчислювальний метод оптичного визначення розмірів мікрочастинок // Вісн. НУ “Львівська політехніка”. 2001. № 428. – С. 173-179.
- [18] Гетьман В.Б. Моделювання та регуляризація задачі визначення розподілу частинок за розмірами в дисперсних середовищах оптичним методом: дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук по спеціальності 01.05.02 - математичне моделювання та обчислювальні методи. - Національний університет “Львівська політехніка”, Львів, 2003. – С.71-85.

MATHEMATICAL AND SOFTWARE OF LASER CROSS-CORRELATION SPECTROMETER FOR RESEARCH OF NON-SPHERICAL NANO OBJECTS IN BIOLOGICAL LIQUIDS

R. Yaremyk, O. Bordun, V. Getman

*Ivan Franko National University of Lviv,
50, Dragomanov St., UA-79005 Lviv, Ukraine
roman.yaremyk@lnu.edu.ua*

The method of laser correlation spectroscopy is an accurate optoelectronic method for determining the size of nano objects in liquid and gaseous media. Fluctuations in the intensity of laser light scattered by a dispersed system are recorded to construct the size distribution. The International Organization for Standardization has developed standards for measuring the size of nanoparticles in dispersed systems: ISO22412:2017 (Particle size analysis - Dynamic light scattering DLS), ISO13321 (Particle Size Distribution - Photon Correlation Spectroscopy PCS). On the basis of these standardized methods of laser correlation spectroscopy, devices for measuring the size distribution of particles in the nanometer range have been created and produced.

However, attempts to use commercial models of DLS devices for biomedical research encounter a number of problematic moments. The problem with using commercial devices is that their methods of measuring and analyzing data are based on the theory of light scattering by nanoobjects of spherical shape. Biological nanoobjects are characterized by non-spherical shapes: columnar, elliptical, disc-shaped, etc. Measuring the geometric parameters of nonspherical nanoparticles is a more complex task and currently has the nature of research work.

A method of mathematical analysis of polarization components of dynamic light scattering by nanoscale objects of non-spherical shape in suspensions has been developed for a modified scheme of a laser correlation spectrometer. The proposed method of regularization of the inverse spectral problem allows to obtain stable solutions for estimating the shape and aspect ratios of the studied nanoobjects. A specialized measuring and computing device and software for the practical implementation of these instrumental methods have been developed. The measurement system has been tested to study the processes of activation of immune reactions such as antigen-antibody with the formation of aggregate complexes of reactive components. The obtained model characteristics of the size distribution and aspect ratios of the test nanoobjects correlate well with the data of experimental measurements.

Key words: photon correlation spectroscopy, dynamic light scattering, inverse problem, regularization method, nano object, digital signal processor.

*Стаття: надійшла до редакції 17.06.2021,
доопрацьована 25.06.2021,
прийнята до друку 25.06.2021*