

## Лазерный корреляционный спектрометр для оценки размеров и динамики изменения размеров структур в биологических жидкостях

© Е.Н. Величко<sup>1</sup>, Э.К. Непомнящая<sup>1</sup>, А.В. Соколов<sup>2</sup>, Т.Ю. Кудряшова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> АО „Концерн „ЦНИИ „Электроприбор“, 197046 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: elina.nep@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.

В окончательной редакции 03.02.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Для оценки размеров наноструктур в биологических жидкостях и исследования динамики их изменения в работе предложен модифицированный метод лазерной корреляционной спектроскопии. Описаны схема аппаратно-программного комплекса и алгоритм метода, позволяющий добиться высокой точности определения размеров наночастиц, а также исследовать процесс изменения размеров наночастиц в динамике.

Предложенный аппаратно-программный комплекс позволил провести исследования динамики образования агрегатов в сыворотке крови человека в процессе иммунного ответа. Полученные результаты свидетельствуют о наличии процессов быстрой агрегации белков в результате активации иммунного ответа, кроме того размер образующихся агрегатов зависит от состояния иммунной системы и наличия заболеваний.

**Ключевые слова:** лазерная корреляционная спектроскопия, динамическое рассеяние света, размеры частиц, наночастицы, биологическая жидкость, молекулярная агрегация.

DOI: 10.21883/OS.2020.07.49567.63-20

### Введение

В настоящее время основные диагностические данные о состоянии организма человека получают с помощью исследования крови и других биологических жидкостей [1]. При этом немаловажно не только определение общих концентраций веществ в крови, но и анализ функциональности тех или иных биологических систем, в том числе молекулярных комплексов. Прямых методов для подобного анализа в современной диагностической медицине не внедрено.

В данной работе в качестве диагностического параметра для определения функциональности молекулярных комплексов предлагается использование размера частиц в сыворотке крови. Известно, что различные типы структур в крови отличаются не только биохимическими свойствами, но и размерами [2]. При этом ряд процессов, происходящих в организме человека, сопровождается агрегацией молекулярных структур и, соответственно, изменением их размеров [3,4].

Таким образом, анализируя размер структур в жидкости можно определить ее состав и проанализировать динамику происходящих в ней биологических процессов. Существующие в настоящее время методы для определения размеров структур имеют ряд недостатков, ограничивающих их применение в медицинской диагностике. В табл. 1 приведен краткий обзор существующих методов оценки размеров наночастиц.

Как уже было отмечено, важна возможность оценки изменения размеров структур в биологических жидкостях в динамике. Из таблицы видно, что большинство существующих методов не позволяют проводить исследование частиц с размерами менее 100 nm в динамике. Перспективным представляется развитие методов лазерной корреляционной спектроскопии [5]. Ограниченное применение лазерной корреляционной спектроскопии в медицине в настоящее время связано с недостаточной точностью и совершенством существующих приборов и алгоритмов обработки данных. В данной работе предлагается схема аппаратно-программного комплекса (АПК) и алгоритм проведения измерений, разработанные для реализации возможности оценки динамики агрегации молекулярных структур в биологических жидкостях [6].

### Схема и алгоритм проведения измерений

Метод лазерной корреляционной спектроскопии основан на измерении временной зависимости интенсивности рассеянного излучения на частицах, совершающих броуновское движение в жидкости [7]. Спектр такого рассеяния будет иметь доплеровское уширение  $\Delta f$ , зависящее от коэффициента диффузии частиц, который в свою очередь зависит от их размеров согласно формуле

$$\Delta f = q^2 D_T / 2\pi = q^2 k_b T / 6\pi^2 \eta d. \quad (1)$$

Таблица 1. Основные методы оценки размеров наночастиц

Методы анализа	Определяемые размеры частиц, nm	Недостатки
Сканирующая электронная микроскопия	5–5000	Невозможность оценки динамики
Просвечивающая электронная микроскопия	5–5000	Невозможность оценки динамики
Рентгенография	0.5–1000	Сложность подготовки проб, невозможность оценки динамики
Седиментационный анализ	100–10000	Низкая точность при исследовании молекулярных комплексов
Оптическая микроскопия	1000–100000	Неподходящий диапазон размеров
Статическое светорассеяние	500–8000	Неподходящий диапазон размеров
Лазерная корреляционная спектроскопия	0.5–2000	Несовершенство существующих приборов и алгоритмов

Здесь  $\Delta f$  — доплеровское уширение,  $D_T$  — коэффициент диффузии,  $\eta$  — вязкость жидкости,  $k_b$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $d$  — гидродинамический диаметр частиц,  $q$  — модуль вектора рассеяния

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2)$$

где  $n_0$  — показатель преломления среды,  $\lambda_0$  — длина волны излучения источника,  $\theta$  — угол регистрации рассеяния.

В данной работе регистрация рассеянного излучения производится с использованием аппаратного комплекса, схема которого приведена на рис. 1. Принципы построения схемы и выбора элементов обсуждались нами в предыдущих работах [8,9].

Для создания когерентного монохроматического излучения в работе используется полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны 650 nm [10]. Для стабилизации флуктуаций интенсивности излучения питание модуля осуществляется с использованием аккумуляторной батареи, не подключенной к сети. Контроль мощности излучения в работе осуществляется перед проведением измерений с использованием измерителя мощности [11].

Задание линейной поляризации излучения происходит с использованием поляризационного фильтра, а фокусировка в объеме исследуемого раствора осуществляется системой линз. Исследуемый раствор помещается в ячейку из кварцевого стекла, прозрачного в видимом диапазоне длин волн. Рассеянное излучение детектируется при помощи фотоэлектронного умножителя, сбор и передача рассеянного излучения на входную апертуру умножителя осуществляется с использованием системы линз и оптоволоконного световода [12,13].

Затем сигнал оцифровывается и передается на систему обработки [14,15] и анализа данных, в роли которой выступает компьютер с установленной программой записи и обработки данных [16].

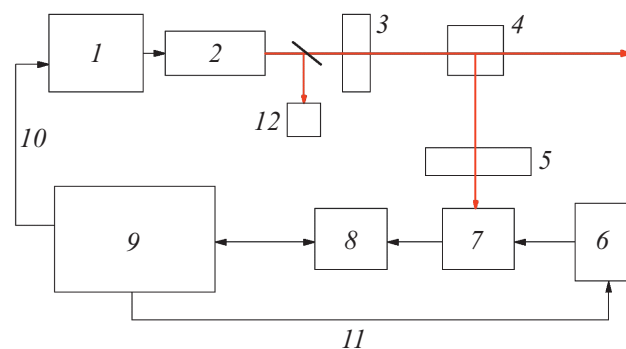


Рис. 1. Блок-схема лазерного корреляционного спектрометра. 1 — стабилизированный источник тока для питания лазерного модуля, 2 — лазерный модуль с выбранной длиной волны излучения, 3 — система фокусировки, 4 — ячейка с исследуемым образцом, 5 — система сбора излучения, 6 — стабилизированный источник питания с регулировкой усиления приемника, 7 — фотоприемник, 8 — модуль оцифровки данных, 9 — система обработки и анализа данных, 10 — линия обратной связи для регулировки мощности излучения, 11 — линия обратной связи для регулировки усиления сигнала, 12 — контроль мощности зондирующего излучения.

Измерения для вычисления размеров исследуемых структур проводятся согласно приведенному ниже протоколу:

- 1) приготовить исследуемый раствор;
- 2) разместить образец в измерительной ячейке и стабилизировать тепловое равновесие между образцом и измерительной ячейкой. Колебания равновесной температуры должны быть в пределах  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Необходимость поддержания постоянной температуры и контроля ее значения обусловлена температурной зависимостью вязкости раствора, входящей в расчетную формулу для размера;

3) подключить прибор к компьютеру и запустить программу для записи и обработки данных рассеяния света;

4) ввести в компьютерную программу данные, необходимые для проведения измерений: длительность измерения, температуру, показатель преломления и коэффициент динамической вязкости испытуемого образца, длину волны лазерного излучения и значение угла рассеяния, если эти параметры выбираются, наименование эксперимента;

5) запустить калибровочное измерение, в рамках которого на ячейку с исследуемым образцом подается короткий световой импульс длительностью 10 ns и происходит настройка мощности лазерного излучения [17] исходя из регистрируемой интенсивности рассеяния, определяется уровень темнового тока фотоприемника;

6) запустить запись динамического сигнала рассеяния лазерного излучения на исследуемом образце;

7) обработать полученные данные (вычислить среднее значение размера, стандартное отклонение и распределение частиц по значениям размера). При исследованиях динамических параметров требуется задать временной шаг, с которым будут вычисляться размеры.

Для обработки данных в работе используется специализированный алгоритм численного решения обратной некорректной задачи, возникающий при анализе динамического рассеяния в лазерной корреляционной спектроскопии. В основе данного алгоритма лежит модифицированный метод регуляризации Тихонова, подробное описание алгоритма можно найти в предыдущих работах [16,18]. Алгоритм позволяет вычислять средние размеры частиц в растворах, содержащих частицы различных размеров.

## Апробация аппаратно-программного комплекса

Апробация предложенного АПК в работе производилась на модельных растворах стеклянных микросфер с заранее известными размерами. Концентрация частиц в растворах составляла 0.05 g/l. Результаты вычисления и сравнение их с результатами, полученными при помощи других методов, представлены в табл. 2.

Погрешность определения размеров, представленная в таблице, вычислялась в относительных величинах исходя из измеренного значения СКО и доверительной вероятности 95%.

Погрешность измерения размеров частиц в полидисперсных растворах оценивалась аналогичным образом для смеси стеклянных микросфер с диаметрами 60, 90 и 150 nm. В табл. 3 представлены результаты проведенного анализа.

Полученные результаты позволяют оценить погрешность определения размеров частиц в моно- и полидисперсных растворах. Помимо модельных растворов в данной работе проводилось исследование размеров

**Таблица 2.** Расчет размеров наночастиц различных размеров и оценка погрешности

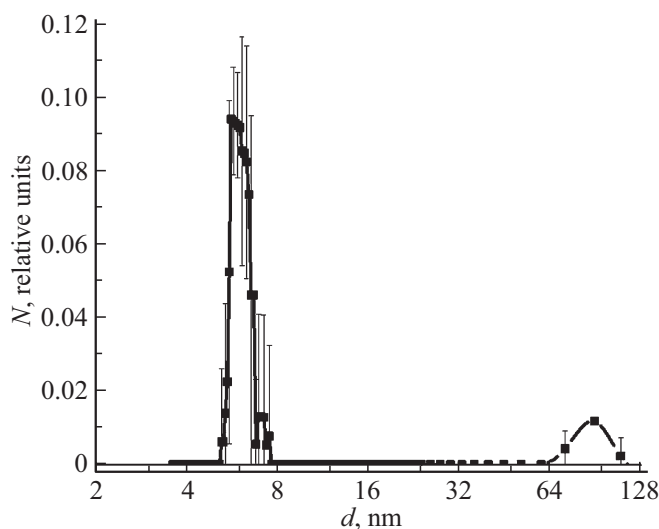
Номинальный размер, nm	20	60	90	150	320	540
Рассчитанный размер, nm	20.6	61.5	92.3	147.9	325.3	547.1
Погрешность, %	3.2	3.2	3.7	3.9	3.7	6.1

**Таблица 3.** Расчет размеров наночастиц в полидисперсной смеси и оценка погрешности

Номинальный размер, nm	60	90	150
Рассчитанный размер, nm	60.6	92.3	147.9
Погрешность, %	5.5	5.9	9.9

частиц в растворе белка альбумина. Данный белок составляет до 60% всех белков сыворотки крови и несет исключительно важную функцию для организма [19–21]. Результаты определения размеров структур в водном растворе альбумина с концентрацией 1 g/l представлены на рис. 2. Здесь  $d$  — диаметр частиц в растворе,  $N$  — относительная концентрация частиц.

Согласно литературным данным, средний размер белка альбумина составляет порядка 6 nm, что согласуется с результатами нашего исследования. При этом следует отметить, что в исследуемых растворах также обнаружено присутствие более крупных структур с размерами порядка 70–100 nm, которые можно ассоциировать с агрегатами белков. Существуют свидетельства, доказывающие наличие тенденции белка альбумина в неравновесных условиях образовывать агрегаты различной формы и размеров [22]. Аналогичные исследования проводились



**Рис. 2.** Результат измерения диаметра молекулы альбумина в воде на разработанном АПК.

другими авторами и результаты их работ согласуются с полученными нами данными [19–22].

## Исследование динамики агрегации

Наибольший интерес с точки зрения развития научных исследований представляет возможность исследования динамики изменения размеров структур в биологических жидкостях в процессе их агрегации. Подобные процессы регулярно наблюдаются в организме человека в результате протекания различных реакций. Одним из примеров является агрегация белков сыворотки крови, вызванная активацией иммунного ответа организма и образованием иммунных комплексов [23]. Данные комплексы состоят из большого числа единичных белков и предназначены для идентификации чужеродных патогенов [24]. Длительность реакции активации иммунной системы, образованной системой белков комплемента [25], составляет порядка 30 s, что создает значительные трудности при исследовании данного процесса биохимическими методами.

При помощи описанного в данной работе АПК и алгоритма проведения измерений был проведен анализ динамики активации иммунной системы в сыворотке крови здоровых доноров. Исследование проводилось до и в течение 210 s после активации иммунной системы при помощи антигена, в роли которого выступала вакцина „Гриппол“. В исследовании использовалась кровь 10 условно-здоровых доноров и 8 доноров с патологиями иммунного ответа.

Сыворотку, используемую для исследований, получали из цельной крови доноров в день забора материала. Для запуска процесса естественного свертывания образцы крови в стерильных пробирках 3 h выдерживались в термостате при температуре 37°C, а затем для лучшего отделения сыворотки центрифугировались в течение 3 min.

На рис. 3 представлены результаты исследования активации иммунитета в сыворотках крови здоровых доноров. На данном графике  $d$  — диаметр частиц,  $t$  — время, прошедшее после активации иммунной системы. В момент  $t = 0$  исследуются размеры структур в сыворотке до активации иммунной системы. Сразу после этого в сыворотку добавляется антиген и регистрируется начало реакции агрегации. Наблюдается постепенное увеличение размеров структур от 8 до 40 nm в процессе протекания иммунной реакции. Начиная примерно со 175-й s после добавления в сыворотку антигена динамических процессов не наблюдается, и можно заключить, что процесс сборки иммунных комплексов на антигене завершился.

На рис. 4 представлены усредненные результаты исследования активации иммунитета в сыворотках крови 8 доноров с нарушениями иммунного ответа, спровоцированными различными заболеваниями. В момент  $t = 20$  s и далее наблюдается увеличение размеров

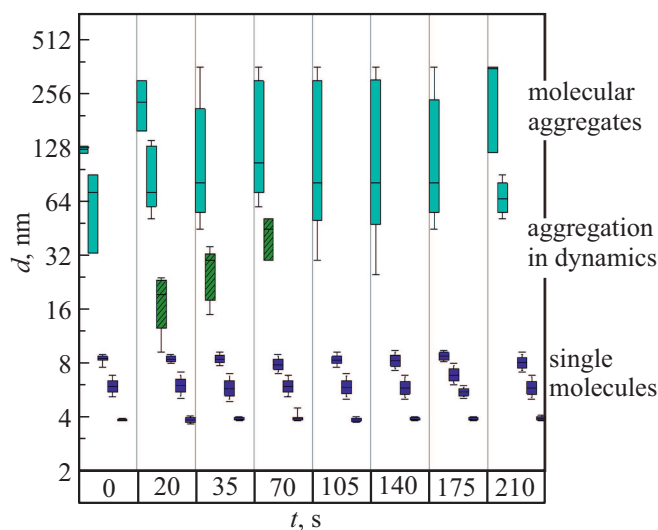


Рис. 3. Размеры структур в сыворотке крови здоровых доноров до (0 s) и после (20–210 s) добавления в сыворотку крови антигена.

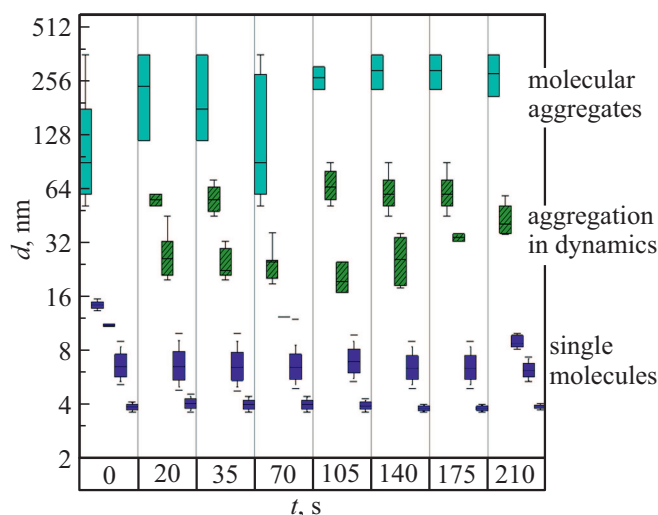


Рис. 4. Размеры структур в сыворотке крови доноров с нарушениями иммунного ответа до (0 s) и после (20–210 s) добавления в сыворотку крови антигена.

структур относительно момента времени  $t = 0$ . Однако общая динамика активации иммунной системы отличается по сравнению с аналогичной картиной, полученной для здоровых доноров.

Наблюдается иной характер активации иммунитета и образования иммунных комплексов, нежели при исследовании сыворотки крови здоровых доноров. При нарушениях иммунного ответа видно, что в исследуемой сыворотке крови не образуется крупных структур с размерами 80–100 nm, как в случае наблюдения иммунной реакции у здоровых доноров. После добавления в исследуемую сыворотку антигена в размерном распределении формируются структуры с размерами 18–60 nm, постепенно увеличивающие свои размеры в ходе протекания

иммунной реакции. Отличающаяся динамика протекания реакции по сравнению со здоровыми донорами может быть ассоциирована с нарушениями иммунного ответа.

Различия в распределении белков по размерам при активации иммунной системы с использованием антигена позволяют сделать выводы о наиболее важных свойствах биологических макромолекул, а именно об их способности образовывать высокоупорядоченные структуры и комплексы в соответствии с их конечным функциональным назначением. Исследования, проведенные с помощью разработанного аппаратно-программного комплекса, позволили наблюдать в динамике за реакцией образования молекулярных комплексов в сыворотке крови, а также обнаружить различия в протекающих иммунных реакциях у здоровых доноров и доноров с нарушениями работы иммунной системы. Такая информация поможет определить функциональные возможности иммунной системы пациента и провести диагностические тесты на наличие определенных иммунных заболеваний.

## Выводы

В данной работе предложены структура и алгоритм работы аппаратно-программного комплекса для оценки размеров структур в биологических жидкостях. Проведенные расчеты элементов схемы аппаратно-программного комплекса и анализ требований, предъявляемых к ним, позволили достичь высокого SNR и реализовать аппаратную часть разрабатываемого комплекса в малогабаритном корпусе.

Апробация разработанного аппаратно-программного комплекса проводилась при исследовании суспензий стеклянных микросфер с известными размерами и растворов белка альбумина. Погрешность определения размеров структур при исследовании полидисперсных растворов с частицами, размеры которых не превышают 500 nm, составила менее 10%.

В работе демонстрируются возможности применения разработанного АПК для исследования динамики изменения размеров структур в биологических жидкостях, в частности исследуется динамика активации иммунной системы в сыворотке крови здоровых доноров и доноров с нарушением работы иммунной системы. Активация иммунитета проводилась путем внесения в сыворотку крови антигенов, в роли которых выступала вакцина гриппа. Реакция активации иммунной системы наблюдалась в течение 4 мин после ее инициации. Результаты показывают, что разработанный аппаратно-программный комплекс позволяет наблюдать процесс активации иммунной системы и формирование иммунных комплексов в сыворотке крови.

Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в медицине для исследования биологических жидкостей позволяет получить уникальные диагностические сведения о состоянии организма, а именно, измерить размеры структур и динамику их изменения

в биологических жидкостях и сделать выводы о функциональных особенностях молекул, в том числе белков организма человека.

## Благодарности

Авторы благодарят Т.А. Богомаз за всестороннюю помощь и ценные научные консультации.

## Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Zapryanova D., Mircheva T., Denev S.A. // *Revue Med Vet.* 2013. V. 164. P. 150–155.
- [2] Petrova G.P. et al. // *Laser Phys.* 2009. V. 19. N 6. P. 1303–1307.
- [3] Kirichenko M.N. et al. // XIII International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers. International Society for Optics and Photonics. 2018. V. 10614. P. 106142C.
- [4] Савченко Е.А., Величко Е.Н., Аксенов Е.Т. // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ.-матем. науки.* 2018. Т. 160 / Кн. 1. С. 108–115.
- [5] Lawrie A.S. et al. // *Vox Sang.* 2009. V. 96. N 3. P. 206–212.
- [6] Chaikov L. et al. // *J. Biomed. Optics.* 2015. V. 20. N. 5. P. 057003.
- [7] Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. // *Biophysical Rev.* 2016. V. 8. N. 4. P. 409–427.
- [8] Nepomnyashchaya E., Velichko E., Kotov O. // 2019 IEEE International Conference on Electrical Engineering and Photonics (EExPolytech). IEEE, 2019. P. 321–324.
- [9] Nepomnyashchaya E., Aksenov E., Velichko E. // 2017 Progress in Electromagnetics Research Symposium-Spring (PIERS). IEEE. 2017. P. 3556–3562.
- [10] Привалов В.Е., Шеманин В.Г. // *Опт. и спектр.* 1997. Т. 82. № 4. С. 700–702; *Privalov V.E., Shemanin V.G.* // *Opt. and Spectrosc.* 1997. V. 82. N 4. P. 650–652.
- [11] Ivanov S.I., Lavrov A.P. // *Int. Symp. Consum. Technol. ISCT.* 2018. P. 51–53.
- [12] Kotov O., Chapalo I., Petrov A. // *IEEE Int. Conf. Electr. Eng. Photonics, EExPolytech.* 2018. P. 257–620.
- [13] Kotov O.I., Bisyarin M.A., Chapalo I.E., Petrov A.V. // *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* 2018. V. 35. P. 1990–1999.
- [14] Liokumovich L., Muravyov K., Skliarov P., Ushakov N. // *Appl. Opt.* 2018. V. 57. P. 7127–7134.
- [15] Ivanov S.I., Liokumovich L.B., Medvedev A.V. // *Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics).* 2018. V. 11118 LNCS. P. 666–674.

- [16] *Nepomnyashchaya E.K.* // J. Phys.: Conference Ser. IOP Publishing. 2019. V. 1236. N. 1. P. 012041.
- [17] *Привалов В.Е., Шеманин В.Г.* // Опт. и спектр. 1997. Т. 82. № 5. С. 873–875; *Privalov V.E., Shemanin V.G.* // Opt. Spectrosc. 1997. V. 82. N 5. P. 809–811.
- [18] *Nepomnyashchaya E., Antonova E.* // 2018 IEEE International Conference on Electrical Engineering and Photonics (EExPolytech). IEEE, 2018. P. 136–140.
- [19] *Rosenoer V.M., Oratz M., Rothschild M.A.* Albumin: Structure, Function and Uses. Elsevier, 2014.
- [20] *Vontii A.O., Il'inskiy A.V., Kapralova V.M., Shadrin E.B.* // Tech. Phys. 2018. V. 63. P. 908–915.
- [21] *Sleep D.* // Expert Opinion on Drug Delivery. 2015. V. 12. N 5. P. 793–812.
- [22] *Баранов А.Н., Власова И.М., Салецкий А.М.* // Журн. прикл. спектроск. 2004. Т. 71. № 2. С. 204–207; *Baranov A.N., Vlasova I.M., Saletskii A.M.* // J. Appl. Spectr. 2004. V. 71. N 2. P. 222–226.
- [23] *Noris M., Remuzzi G.* // Seminars in Nephrology. WB Saunders. 2013. V. 33. N 6. P. 479–492.
- [24] *Chester K.A., Begent R.H.* // Clinical and Experimental Immunology. 1984. V. 58. N 3. P. 685.
- [25] *Esmail H., Lai R.P., Lesosky M., Wilkinson K.A., Graham C.M., Horswell S., Wilkinson R.J.* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. V. 115. N 5. P. E964–E973.