

УДК 620.3

## ДИАГНОСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ОПТИЧЕСКИМИ МАТРИЦАМИ РЕЗОНАНСНОГО ТИПА

А.В. САЕЧНИКОВ<sup>1,2</sup>, Э.А. ЧЕРНЯВСКАЯ<sup>1</sup>, В.А. САЕЧНИКОВ<sup>1</sup>, А. ОСТЕНДОРФ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Республика Беларусь.

<sup>2</sup>Ruhr Universität Bochum, Germany

Поступила в редакцию 9 ноября 2018

**Аннотация.** В работе рассматривается механизм диагностики биохимических соединений с помощью матриц, основанных на принципе оптического резонанса в замкнутых диэлектрических резонаторах. Приводятся методика формирования матриц, опроса оптических резонаторов, а также подход по обработке спектральных данных чувствительных элементов. Проведен эксперимент по детектированию осаждения молекул белка с помощью матричного сенсора в фотонной и фотонно-плазмонной конфигурациях.

*Ключевые слова:* оптический резонанс, биосенсор, матрица, обработка данных.

**Abstract.** The mechanism of biochemical compounds diagnostics using matrices based on optical resonance in closed dielectric microcavities is discussed in this paper. A method for sensor fabrication, interrogation of the optical elements as well as approach for spectral data processing are represented. Experimental data of the protein molecules detection using a matrix sensor in the photonic and photonic-plasmonic configurations is realized.

*Keywords:* optical resonance, biosensor, matrix, data processing.

**Doklady BGUIR. 2018, Vol. 117, No. 7, pp. 47-51**

**Diagnostics of biological compounds by optical resonator matrices**

**A.V. Saetchnikov, E.A. Tcherniavskaia, V.A. Saetchnikov, A. Ostendorf**

### Введение

Интерес к использованию оптических методов для изучения свойств биологических соединений на микро- и наноуровнях экспоненциально рос в течение последнего десятилетия. Среди основных причин популярности оптических схем: компактность, дешевизна и чувствительность. Метод детектирования, основанный на оптическом резонансе мод шепчущих галерей (МШГ), является одним из перспективных безмаркерных схем идентификации (когда рецептор напрямую взаимодействует с измерительным элементом). МШГ формируются в кольцевом резонаторе (обычно сделанного из диэлектрика), где электромагнитная волна распространяется вдоль его периферии благодаря множеству полных внутренних отражений и возвращающаяся волна начинает интерферировать сама с собой.

Среди форм резонаторов, в которых могут формироваться МШГ можно выделить следующие: сферы, диски, тороиды и т. д. [1]. Эффективным способом заведения излучения в резонатор является метод переноса энергии посредством эванесцентного поля. Стандартным подходом для реализации данного метода является размещение стравленного оптического волновода на расстоянии меньше длины волны от поверхности резонатора. Однако метод производства и способ заведения излучения ограничивают возможности масштабирования (формирования матриц резонаторов) и адаптации к применению в практических условиях.

Авторами была предложена матрица, состоящая из коммерческих сферических микрорезонаторов, иммобилизованных на стеклянной подложке, где излучение заводится через призму [2–5]. Данное решение делает систему детектирования более простой, надежной, позволяет легко мультиплексировать матрицы и поддерживает параллельное заведение излучения. Однако естественный разброс характеристик единичных сенсоров, их количество и случайное распределение по поверхности предъявляют дополнительные требования к использованию такой матрицы для обеспечения повторяемости результатов.

В данной работе рассматривается практическое применение соответствующих резонансных матриц для исследования биохимических соединений, в частности, мониторинг осаждения молекул белка.

## Материалы и методы

В качестве единичных чувствительных элементов выступают стеклянные микросферы диаметром около 100 мкм от компании Cospheric LLC. Для удаления загрязнений с поверхности резонатора производится ультразвуковая очистка в метаноле в течение 10 мин с последующей промывкой ацетоном и высушиванием в печи при 95 °С при нормальных условиях окружающей среды. Для фиксации микрорезонаторов применяется тонкий слой клея, который наносится методом центрифугирования на покровное стекло. Показатель преломления клея (MyPolymer MY-133MC) соответствует воде. Резонаторы размещаются по поверхности покровного стекла случайным образом, после чего следует процедура испарения растворителя клея в течение 12 ч (рис. 1, *a*). Для анализа биологических соединений матрица помещается в флюидную ячейку, которая обеспечивает контролируемую доставку соединений к единичным резонаторам и временное разрешение сигнала. Детали конструкции флюидной ячейки рассмотрены в работе [4].

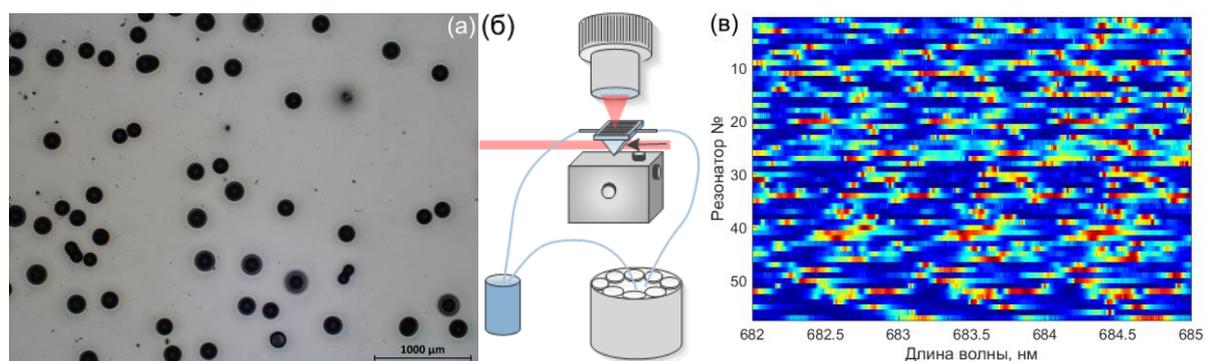


Рис. 1. Материалы и методы: *a* – Оптический резонансный сенсор; *б* – схема опроса оптического сенсора; *в* – спектральная карта сенсора.

Экспериментальная установка включает в себя перестраиваемый диодный лазер (New Focus, 680 нм) с узкой шириной линии генерации 200 кГц. Для заведения лазерного излучения в резонаторы используется стандартная прямоугольная стеклянная призма с показателем преломления 1,52 (рис. 1, *б*). Матрица приводится в контакт с призмой с помощью иммерсионного масла Zeiss 518N. Движение исследуемого вещества обеспечивается перистальтическим насосом, подключенным к флюидной ячейке. Рассеиваемое резонаторами излучение собирается объективом и записывается монохромной ПЗС-камерой. Выбранная конфигурация метода детектирования сигнала МШГ обеспечивает параллельный опрос всех сенсоров матрицы.

Флюидная ячейка заполняется базовым биохимическим раствором, обычно деионизированной водой или фосфатно-буферным раствором. Далее производится съем изображения матрицы при отсутствии лазерного излучения для регистрации расположения резонаторов. Измерение сопровождается перестройкой длины волны лазера со скоростью 0,1 нм/с в определенной спектральной области, близкой к резонансному пику МШГ, и синхронизированным съемом камерой интенсивности рассеянного света. Если длина волны перестраиваемого лазера соответствует резонансу МШГ резонатора, мощность света,

рассеянного резонатором, возрастает. Для характеристики всего набора резонаторов на матрице диапазон перестройки устанавливается равным в несколько свободных спектральных интервалов. Таким образом, необходимо сопоставить регистрируемое рассеянное излучение определенному единичному сенсору, расположенному на матрице. Детектирование биохимических соединений производится путем заполнения флюидной ячейки соответствующим веществом и регистрацией спектральных ответов всех резонаторов матрицы. Прочистка флюидной ячейки позволяет производить серию экспериментов по детектированию биохимических соединений с использованием одной матрицы.

### Механизм анализа данных

В рамках предлагаемого механизма анализа данных первоначальным этапом выступает алгоритм локализации единичных чувствительных элементов для составления карты резонаторов матрицы. Предлагаемый способ определения границ единичных резонаторов включает следующие этапы: очистка изображения от шума, увеличение контраста вдоль границ, исключение неоднородной фоновой засветки, выравнивание гистограммы, а также детектирование границ с помощью преобразования Хафа. Некоторые детали используемых методов рассмотрены в работе [5]. Подход успешно ( $> 95\%$ ) идентифицирует сферические резонаторы, позволяет исключить частицы пыли (обычно обладающие несферической формой), а также идентифицировать сенсоры, находящиеся в контакте друг с другом. Кроме этого, среди сенсорных единиц встречается до  $10\%$  поврежденных в процессе производства микросфер, которые исключаются из последующего анализа.

Процедура измерения сигнала производится при отсутствии внешнего освещения и при малой экспозиции ( $< 1$  мс). Высокий контраст между рассеянным микросферой лазерным излучением и фоновым сигналом обусловлен низкими потерями из-за высоких показателей добротности резонаторов МШГ. Таким образом, производится прямое сопоставлением зарегистрированного рассеянного излучения с картой сенсорных единиц для построения спектров МШГ матрицы в режиме реального времени. Как результат формируется спектральная карта матрицы для каждой временной точки эксперимента (рис. 1, в).

Чтобы выделить значимую информацию из спектральной карты, каждый спектр МШГ, связанный с отдельным резонатором, может быть обработан с помощью процедуры автоматического спектрального разложения [3]. Данная процедура позволяет уменьшить количество физически значимых параметров спектров в среднем на два порядка. Было показано, что ошибка (MSE) восстановления спектра для моделированных данных не превышает  $10^{-5}$ , чувствительность – выше  $95\%$ , а значение FDR – менее  $4\%$ . Экспериментальные данные описываются вычисленными параметрами с корреляцией с исходными данными  $R = 0,996$  и значением MSE ниже  $5 \times 10^{-5}$ . Процедура состоит из следующих основных этапов обработки: очистка спектров МШГ от шумов, идентификация спектральных пиков и регрессионный анализ.

Метод шумоподавления основывается на дискретном вейвлет-преобразовании, выбор которого обусловлен нестационарностью спектра МШГ, наличием в сигнале острых пиков (моды с высокой или сверхвысокой добротностью) и необходимостью инвариантности относительно спектрального сдвига спектров МШГ. Методика автоматического отбора материнской вейвлет функции из списка Добеши, симлет, койфлет, биортогональных и обратных биортогональных функций разных порядков, а также автоматического выбора необходимого уровня разложения рассмотрена в работе [3].

Идентификация спектральных пиков основана на анализе производных сигнала первого и второго порядков, который позволяет дополнительно идентифицировать скрытые (возникают при перекрытии двух спектральных пиков), но спектрально-разрешимые моды. На данном этапе производится определение количества мод и инициализация следующих параметров: центральная длина волны, интенсивность пика и значимость, в смысле абсолютного значения производной второго порядка. Данное правило отбора не исключает наличия «искусственных» пиков, связанных с шумом производной второго порядка, что может привести к переобучению на следующем этапе регрессионного анализа.

В качестве регрессионной модели выступает функция суммы псевдо-Войт функций, которые представляют собой линейную комбинацию Лоренцевых и Гауссовых функций. Чтобы избежать проблему переобучения был разработан автоматизированный алгоритм для исключения «искусственных» пиков. Метод основан на применении критерия Фишера (F-критерий). Полученное количество пиков можно интерпретировать как количество частот оптического резонанса МППГ в микросфере.

### Мониторинг осаждения биохимических молекул

В рамках данной работы был проведен эксперимент по детектированию осаждения молекул альбумина бычьей сыворотки (BSA) (Sigma Aldrich A7906) концентрации 0,1 мг/мл. Данный эксперимент также включает предложенную ранее методику усиления спектрального отклика микрорезонаторов посредством предварительного осаждения на поверхность сенсора слоя золотых наночастиц [2].

Результаты эксперимента представляют собой набор зависимых от времени вариаций спектральных карт и, таким образом, представляет собой трехмерный блок данных. Различие в характеристиках/свойствах отдельных резонаторов, расположенных на матрице, приводит к отличию в динамике и величине спектрального отклика (сдвига) среди исследуемых чувствительных единиц при одинаковой концентрации исследуемого биохимического вещества. Для определения обобщенной динамики осаждения для всей матрицы был применен метод главных компонент для данных спектрального сдвига среди всех микрорезонаторов. Предварительно была произведена нормализация исходных величин. В качестве объектов метода главных компонент выступают временные точки, а значения сдвига для каждого измерительного элемента – как параметры объекта. Метод позволяет преобразовать исходный набор переменных в новый набор независимых скрытых переменных, называемых главными компонентами, при этом каждая из них представляет собой линейную комбинацию исходных признаков. На первую главную компоненту приходится более 95 % дисперсии признаков в исходном наборе данных. Временная динамика эксперимента для биосенсора в смысле первой главной компоненты представлена на рис. 2.

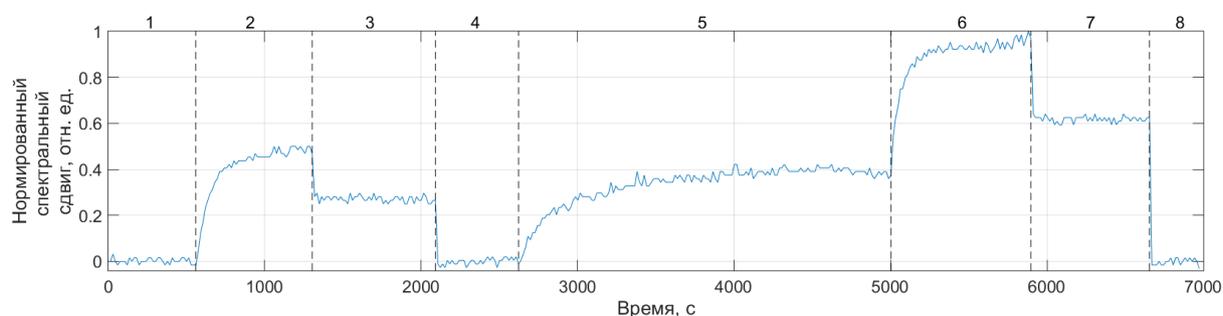


Рис. 2. Временная динамика отклика биосенсора на изменения внешней среды: вода (1), раствор альбумина (2), чистящий раствор (3), вода (4), золотые наночастицы (5), раствор альбумина (6), чистящий раствор (7), вода (8)

Для фаз эксперимента, когда исследуется гомогенная среда (вода, чистящий раствор), иными словами, сенсор чувствителен к изменениям объемного показателя преломления относительный спектральный сдвиг инвариантен по времени. Однако, осаждение компонент на поверхности чувствительных элементов (фазы 2, 5, 6) сопровождается наличием временной динамики. Возврат спектральных характеристик матрицы для водной среды (фазы эксперимента 4, 8) к исходному состоянию (фаза 1) подтверждает успешность производимой процедуры очистки (фазы 3 и 7) поверхностей резонаторов от биохимических соединений, осажденных до этого в фазах 2 и 6. Результаты демонстрируют успешность формирования слоя золотых наночастиц (фаза 5) на поверхностях резонаторов, величина насыщения спектрального сдвига при этом достигает 0,4 отн. единиц. Наличие золотого слоя приводит к двукратному усилению спектрального ответа матрицы для идентичной концентрации исследуемого вещества, что хорошо коррелирует с предыдущими результатами исследований, проведенных авторами на примере единичного микрорезонатора [2].

## Заклучение

В работе рассмотрен механизм диагностики биохимических соединений с помощью матриц, основанных на принципе оптического резонанса в замкнутых диэлектрических резонаторах. Предложена методика формирования матриц, экспериментальный подход для опроса оптических резонаторов, а также набор методов для обработки спектральных данных чувствительных элементов. Проведен эксперимент по детектированию осаждения молекул белка с помощью матричного сенсора в фотонной и фотонно-плазмонной конфигурациях.

## Список литературы

1. Su J. Label-free biological and chemical sensing using whispering gallery mode optical resonators: Past, present, and future // *Sensors*. 2017. № 17 (3).
2. Plasmon-enhanced WGM-based biosensors for molecule detection / V.A. Saetchnikov [et al.] // *Nonlinear Phenomena in Complex Systems*. 2015. № 18 (4). P. 443–455.
3. Quantification of whispering gallery mode spectrum variability in application to sensing nanobiophotonics / A. Saetchnikov [et al.] // *J. of Nanophotonics*. 2017. № 11 (04).
4. Микрофлюидная ячейка для матриц оптических резонаторных сенсорных систем / А.В. Саечников [и др.] // Докл. БГУИР. 2016. № 7. С. 34–38.
5. Mapping of the detecting units of the resonator-based multiplexed sensor / A.V. Saetchnikov [et al.] // *SPIE Proceedings*. 2018. Vol. 10678.

## References

1. Su J. Label-free biological and chemical sensing using whispering gallery mode optical resonators: Past, present, and future // *Sensors*. 2017. № 17 (3).
2. Plasmon-enhanced WGM-based biosensors for molecule detection / V.A. Saetchnikov [et al.] // *Nonlinear Phenomena in Complex Systems*. 2015. № 18 (4). P. 443–455.
3. Quantification of whispering gallery mode spectrum variability in application to sensing nanobiophotonics / A. Saetchnikov [et al.] // *J. of Nanophotonics*. 2017. № 11 (04).
4. Mikrofljuidnaja jachejka dlja matric opticheskikh rezonatornyh sensoryh sistem / A.V. Saetchnikov [i dr.] // *Dokl. BGUIR*. 2016. № 7. S. 34–38. (in Russ.)
5. Mapping of the detecting units of the resonator-based multiplexed sensor / A.V. Saetchnikov [et al.] // *SPIE Proceedings*. 2018. Vol. 10678.

### Сведения об авторах

Саечников А.В., ассистент Белорусского государственного университета.

Чернявская Э.А., д.ф.-м.н., профессор Белорусского государственного университета.

Саечников В.А., д.ф.-м.н., профессор Белорусского государственного университета.

Остендорф А., профессор Рурского университета Бохум.

### Адрес для корреспонденции

220064, Республика Беларусь,  
г. Минск, ул. Курчатова, 5,  
Белорусский государственный университет  
тел. +375-29-913-94-38;  
anton.saetchnikov@gmail.com  
Саечников Антон Владимирович

### Information about the authors

Saetchnikov A.V., assistant of Belarusian state university.

Tcherniavskaia E.A., D.Sci, professor of Belarusian state university.

Saetchnikov V.A., D.Sci, professor of Belarusian state university.

Ostendorf A., professor of Ruhr university Bochum.

### Address for correspondence

220064, Rpublic of Belarus,  
Minsk, Kurchatov st., 5  
Belarusian state university  
tel. +375-29-913-94-38;  
anton.saetchnikov@gmail.com  
Saetchnikov Anton Vladimirovich