

УДК 004.932

Є.В. Мінов, С.Е. Остапов, Ю.Б. Халавка, Г.М. Окрепка, П.М. Фочук

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці

ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ НАНОЧАСТИНОК ШЛЯХОМ АНАЛІЗУ ТРАЕКТОРІЙ ЇХ РУХУ

У статті описано програмне забезпечення для визначення параметрів колоїдних наночастинок металів, зокрема, їх діаметру та розподілу за розмірами. В основі алгоритму лежить аналіз траєкторій броунівського руху наночастинок. Для візуалізації частинок використано устаткування для нанотрекінгу із підсвіткою білим світлом.

Ключові слова: програмне забезпечення, розпізнавання образів, хімія, трекінг наночастинок.

Вступ

Постановка проблеми. Розвиток нанотехнологій ставить перед дослідниками багато завдань, серед яких розробка методів експрес-оцінки розмірів та форми наночастинок синтезованих засобами колоїдної хімії. Існує декілька способів дослідження розмірів наночастинок: скануюча та просвічуюча електронні і скануюча зондова мікроскопія. Проте, усі ці методики є коштовними та вимагають складної попередньої підготовки зразків. Перспективною альтернативою їм є метод аналізу траєкторій частинок (нанотрекінгу, НТА) який використовується в багатьох галузях фундаментальної науки, причому його адекватність та достатню точність доведено досить давно [1]. Основною проблемою, яка сьогодні стримує широке розповсюдження цього методу, є складність ручного обчислення кількості наночастинок, відстеження їх траєкторій та зміщень. Одним із варіантів автоматизації цих процесів може бути програмно-апаратне устаткування, яке використовує властивість наночастинок розсіювати світло залежно від їх природи, розмірів та форми.

Метод нанотрекінгу зараз активно використовується в наукових дослідженнях не лише для визначення основних параметрів колоїдів наночастинок, зокрема, розміру та розподілу за розмірами, але також і для встановлення відносного показника заломлення, дослідження флуоресцентних частинок, визначення дзета-потенціалу. Великою перевагою методу нанотрекінгу, у порівнянні з іншими методами визначення розміру наночастинок, є простота та коротка тривалість аналізу. Крім того, параметри частинок, визначених методом НТА, є співмірними з даними, отриманими вищевказаними методами.

Аналіз досліджень. За останні роки кількість публікацій, де використовується метод нанотрекінгу, значно зросла, що пояснюється простою методикою та використанням дешевого апаратного забезпечення.

Найчастіше нанотрекінг використовують для дослідження сферичних частинок у колоїдних (маточних) розчинах, а також у складних біоматрицях.

Проте, використовуючи метод НТА можна також визначати в'язкість та температуру дисперсних систем з точністю не меншою за 2,5%. Додаткова модифікація конструкції установки НТА дозволяє визначати дзета-потенціал та досліджувати флуоресцентні частинки.

Більше того, зараз доведено, що до того ж він забезпечує достатню точність вимірювання. Зокрема, у роботі [2] проведено порівняння результатів дослідження сферичних латексних наночастинок методами просвічуючої електронної, атомно-силової мікроскопії, динамічного розсіювання світла і нанотрекінгу (НТА). Вимірювання проводили на монодисперсних розчинах із розміром частинок 100 і 200 нм. Показано, що в усіх випадках стандартне відхилення має значення менше 1 нм, отже даним методом аналізу можна отримувати достовірні результати.

Дослідження методом НТА моно- і полідисперсних сумішей полістеренових наночастинок з розмірами від 60 до 1000 нм показали, що наявність у розчині невеликих кількостей великих частинок (1000 нм) суттєво не впливає на точність НТА і ним можна легко визначити широкий діапазон частинок з різними розмірами. [3].

Фізичну сторону моделювання розподілу середньої довжини треку при НТА як функції розміру частинок описано у роботах [4]. Доведено, що для одержання коректних результатів дослідження критично важливим є правильний вибір параметрів програмного аналізу, таких, як максимальний стрибок частинки чи мінімальна довжина треку.

У [5] методом нанотрекінгу досліджували хімічно функціоналізовані наночастинки золота у нематичних рідких кристалах. Встановлено, що їх коефіцієнт дифузії сильно залежить від хімічної функціоналізації.

Сфера використання методу нанотрекінгу є багатогранною. Зокрема у роботі [3] даним методом досліджено субмікронні агрегати протеїнів в людській сироватці крові і плазмі, а у [6] вивчалися біосистеми екзосоми – клітинні пухирці розміром 30 – 100 нм, які є перспективними як засоби доставки

ліків при терапії білками і РНК.

У [7] наведено рекомендації проведення аналізу суспензій полістиренових частинок у воді. Оптимальною є концентрація наночастинок 10^7 - 10^{10} частинок/мл. Ступінь розведення підбирають такий, щоб у полі зору було приблизно 100 частинок. Тривалість відео файлу залежить від дисперсності системи і концентрації частинок. Похибка температури в 1 градус вносить похибку в обчислення розміру 2,4%.

Основний матеріал

Перший етап дослідження являє собою зйомку відео-анімації броунівського руху наночастинок за допомогою мікроскопа з конденсором темного поля і цифрової відеокамери. Дослідним шляхом визначено, що для отримання достатньої вибірки (близько 1000 частинок) вистачає тривалості відео записаного протягом 30-секунд. Вхідними даними програми являється відеофайл (як правило, формату *avi*) або окреме зображення. В останньому випадку ми можемо отримати інформацію про кількість наночастинок у полі зору мікроскопа і визначити їх концентрацію в досліджуваній системі.

Процес аналізу НТА складається з трьох етапів: розпізнавання частинок; трекінг; розрахунок і відображення статистичних даних по кожній наночастиці.

На етапі розпізнавання формуються зображення частинок по кожному кадру. Оскільки, різні за природою, розміром та формою наночастинок по-різному розсіюють світло, то їх зображення відрізняються кольором розсіяного світла, тому на даному етапі закладена можливість вибору кольорового фі-

льтру для різних типів наночастинок. Зважаючи на це, отримані методом НТА дані можуть використовуватися для ідентифікації природи наночастинок, а також для встановлення присутності їх сильно анізотропних форм (стержнів, трубок, пластин).

На етапі трекінгу формуються траєкторії руху наночастинок, обчислюються значення їх швидкості й середнього квадрату зміщення. Середній квадрат зміщення визначається як середнє арифметичне квадратів зміщень усіх кроків треку за весь час життя частинки на відео.

На фінальному етапі дослідження, знаючи температуру та в'язкість розчину за рівнянням Енштейна-Стокса, програмне забезпечення розраховує розподіл частинок за розмірами, за довжиною треку, за кольору спектру тощо. Дані подаються у вигляді 2- або 3-вимірних гістограм та таблиць значень.

Для дослідження макроскопічних характеристик розчину із використанням частинок як зондів, наприклад, його температури та в'язкості передбачено додаткові "реверсні" режими роботи програми: мікровіскозіметрії та мікротермометрії.

Можна також переглянути графік треку обраної наночастинок, щоб переконатися, чи характер її руху є броунівським, або таким що викликаний іншими факторами.

Програмне забезпечення створене в середовищі MatLab (R2010b) з використанням додаткових бібліотек скомпільованих за допомогою C++ компілятора MinGW-5.1.4.

Основні компоненти програмного забезпечення зображено на блок-схемі (рис. 1).

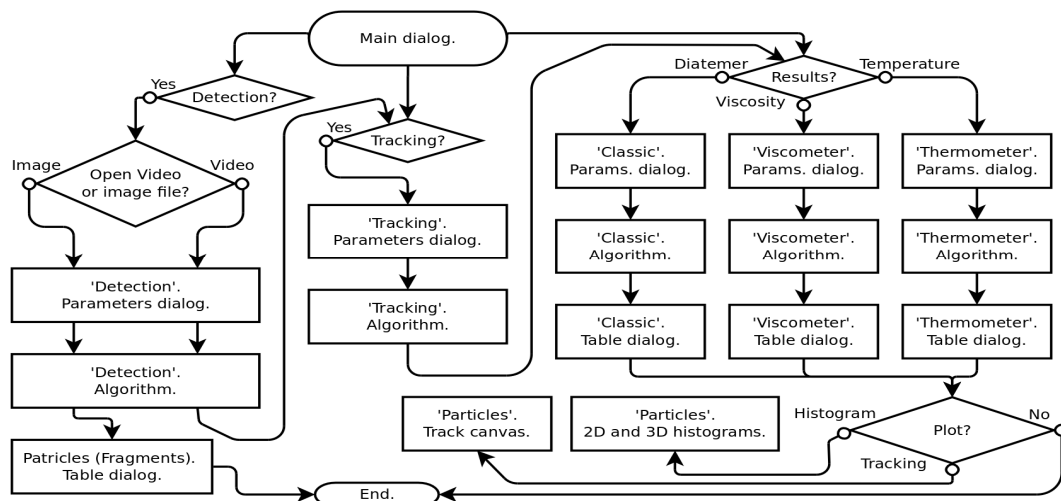


Рис. 1. Основні компоненти розробленого програмного забезпечення

Етап детектування. Перед запуском процесу детектування оператор має можливість задати або змінити параметри розпізнавання фрагментів наночастинок в діалозі (рис. 2), де можна налаштувати радіус і поріг розпізнавання, а також вибрати колір фільтрування початкового зображення.

При роботі алгоритму детектування для кожного кадру відео-фрагмента або для завантаженого зображення розраховується проміжне зображення за алгоритмом «нечіткої маски», на основі якого створюється двовимірне бітове поле, кожен елемент якого задається наступною формулою:

$$Bfield_{x,y} = \begin{cases} 1, & Rmask_{x,y} \geq Rtr, \\ 0, & Rmask_{x,y} < Rtr, \end{cases} \quad (1)$$

де Rtr – поріг розпізнавання; $Bfield$ – бітове поле, матриця (проміжне представлення зображення); $Rmask$ – матриця різниці між матрицями поточного зображення $in_{x,y}$ і його нечіткою версією $Rblur_{x,y}$:

$$Rmask_{x,y} = in_{x,y} - Rblur_{x,y}; \quad (2)$$

$$Rblur_{x,y} = \frac{1}{(2Rrad)^2} \sum_{u=0}^{2Rrad} \sum_{v=0}^{2Rrad} in_{(x+u)-Rrad, (y+v)-Rrad}, \quad (3)$$

де $Rrad$ – радіус розпізнавання. Метод нечіткої маски дозволяє ефективно відділити височастотну складову, тобто власне наночастинки, від низькочастотної складової, якою є фон зображення.

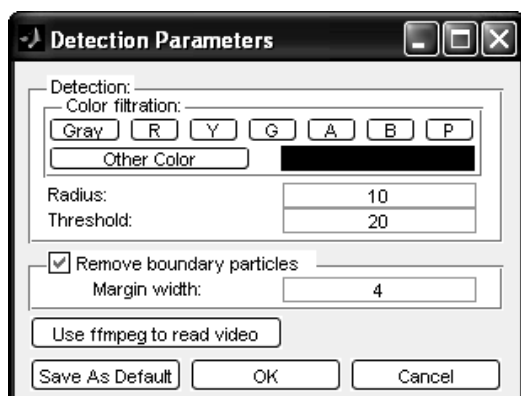


Рис. 2. Діалог налаштування режиму детектування

Після отримання розпізнаного бітового поля зображення, здійснюється сегментація. Для цього виконується попіксельний обхід бітового поля і порівнювання кожного пікселя з чотирма вже обробленими сусідніми пікселями, розміщеними навколо даного (рис. 3).

Інформація про зв'язані у групи фрагменти зберігається в окремій індексній масці, кожен елемент якої посилається на об'єкт, що зберігає інформацію про сумарну площу фрагменту (сума пікселів, що належать цій групі). Це дозволяє суттєво підвищити точність розпізнавання.

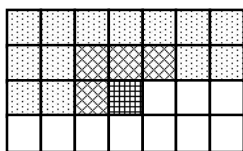


Рис. 3. Маска попіксельного групування фрагментів.
 ■ – поточний піксель; □ – оброблений піксель;
 ⊗ – один із чотирьох оброблених сусідніх пікселів з якими відбувається порівняння

Етап трекінгу. Перед запуском трекінгу частинок є можливість задати, або змінити параметри відслідковування руху частинок (рис. 4). Можна налаштувати радіус пошуку частинки на наступному кадрі анімації, радіус пошуку ланок треку однієї наночас-

тинки, мінімальний час тривалості треку, а також часовий і дистанційний пороги треків, за якими фільтруватимуться одержані параметри.

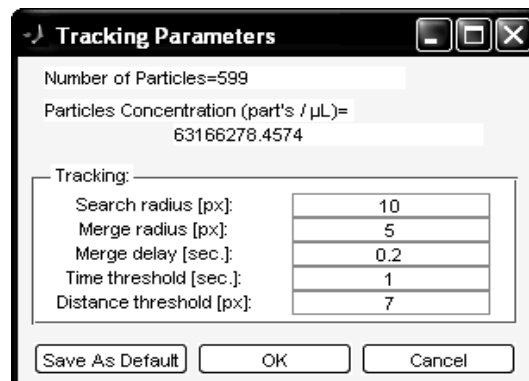


Рис. 4. Діалог задання параметрів алгоритму трекінгу

У вікні діалогу (рис. 4) також виводяться результати розрахунку кількості наночастинок у полі зору мікроскопа і концентрації наночастинок на мікроскопі розчину.

Іноді частинка може зникати з поля зору мікроскопа, з'являючись у ньому пізніше. В цьому випадку можуть утворитися короткі треки тієї ж наночастинки. Програма аналізує параметри початку і кінця кожного підтреку та з'єднує ті з них, кінець та початок яких задовольняє уведений при налаштуванні значення дистанційного та часового порогів.

Оскільки розрахунки за методом НТА ґрунтуються на реальному розмірі пікселя на одержаному кадрі, то перед виконанням обчислень програма надає користувачеві можливість налаштувати оптичні параметри устаткування: тип мікроскопа та камери, оптичне та цифрове збільшення (рис. 5).

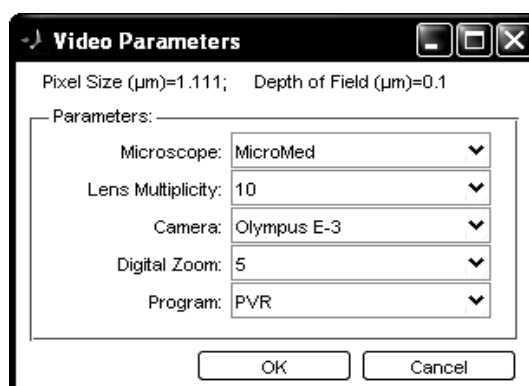


Рис. 5. Діалог вибору параметрів запису відео

Опис моделей мікроскопів та камер та відповідні значення розмірів пікселя зчитуються з окремого файлу («DataTable.xls»), який знаходиться у папці з програмою. Таким чином можна легко додавати підтримку нового обладнання без запуску програми.

Етап розрахунку результатів. Для розрахунку діаметрів наночастинок необхідно задати значення

температури та в'язкості розчину. Також вказуються очікувані межі діапазону значень діаметрів частинок. Останнє запобігає спотворенню статистики, яке може статися, якщо на відео з'явиться шум або сторонні об'єкти. Такий самий принцип використовується при роботі програми в режимах мікрівіскозиметра та мікротермометра.

При «класичному» алгоритмі розрахунку діаметр наночастинки знаходиться за формулою Стокса-Ейнштейна:

$$d = \frac{TK_B t}{3\pi \frac{\eta}{1000} MSD}; \quad (4)$$

звідки в'язкість і температура виражаються як:

$$\eta = \frac{TK_B t}{3\pi d MSD} \times 1000; \quad (5)$$

$$T = \frac{3\pi d \frac{\eta}{1000} MSD}{K_B t}, \quad (6)$$

де T – температура розчину в кельвінах; K_B – стала Больцмана; t – час одного відеокадру в секундах; d – значення середнього діаметру синтезованої наночастинки; η – коефіцієнт в'язкості розчину; MSD – середній квадрат зміщення наночастинки.

В режимах мікрівіскозиметра та мікротермометра в'язкість розчину розраховується за формулою (5), а температура – за формулою (6). На стартових формах цих режимів також наявні можливості гнучкого налаштування параметрів використаних алгоритмів.

Середній квадрат зміщення (MSD) наночастинки на треку визначається як середнє арифметичне квадратів зміщень наночастинки з усього часу аналізу треку за наступною формулою:

$$MSD = \frac{1}{4N} \sum_{n=1}^N \sqrt{((p_{x_n} - p_{x_{n-1}})P_s)^2 + ((p_{y_n} - p_{y_{n-1}})P_s)^2};$$

де N – кількість кадрів руху наночастинки; n – індекс поточного кадру треку; p_x – позиція наночастинки на треку по вісі x ; p_y – позиція наночастинки на треку по вісі y ; P_s – розмір пікселя в міліметрах.

Результати проведених розрахунків виводяться в діалогове вікно результатів дослідження розпізнаних наночастинок і їхніх параметрів, таких як час життя, пройдений ними за час існування шлях, середній колір наночастинок тощо у вигляді таблиці (рис. 6).

Для більш зручного аналізу результатів дослідження передбачено можливість створювати 2-та 3-вимірні гістограми обираючи дані будь-якого стовпчика таблиці як осі абсцис (рис. 7 – 8). Окрім того користувач має можливість здійснити сортування даних в таблиці за будь-яким розрахованим параметром.

#	YR	YG	YB	EY	<x,y>^2/4	d [classic] (m.)	Life Time (sec.)	
1	0.4189	0.9961	0.0405	0.2304	1.8078e-13	8.9480e-08	1.5667	
2	0.6050	0.9961	0.0017	0.2604	1.1048e-13	1.4642e-07	1.0667	
3	0.8007	0.9961	0	0.4233	1.1386e-13	1.4207e-07	1.3000	
4	0.8705	0.9938	0	0.2224	6.5979e-13	2.4517e-08	2.1000	
5	0.7166	0.9866	0	0.2491	2.6222e-13	6.1690e-08	1.1667	
6	0.8102	0.9961	0	0.2361	1.2139e-12	1.3332e-08	1.1333	
7	0.7588	0.9961	0	0.3941	1.2898e-13	1.2581e-07	1.1000	
8	0.2035	0.9961	0.0526	0.2302	2.2310e-13	7.2507e-08	1.2000	
9	0.5084	0.9961	0.0025	0.2578	2.5562e-13	6.2239e-08	1.6000	
10	0.1376	0.9961	0.0757	0.2429	2.3021e-13	7.0269e-08	2.1667	
11	0.5712	0.9961	0	0.3058	1.1815e-13	1.3691e-07	1.9000	
12	0.5776	0.9961	0	0.2314	1.7598e-13	9.1924e-08	1.3333	
13	0.2865	0.9961	0.0152	0.2969	1.7473e-13	9.2582e-08	2.1333	
14	0.2247	0.9961	0.0701	0.2345	1.3045e-13	1.2400e-07	1.0667	
15	0.2728	0.9961	0.0143	0.2182	3.3537e-13	4.8235e-08	1.0667	
Sum.	YR Avr.	YG Avr.	YB Avr.	EY Avr.	<x,y> Avr.	d (m.) Avr.	Life Time Avr.	
	279	0.4918	0.9950	0.0221	0.2811	2.4302e-13	8.8025e-08	1.5173

Рис. 6. Діалог виводу таблиці результатів дослідження

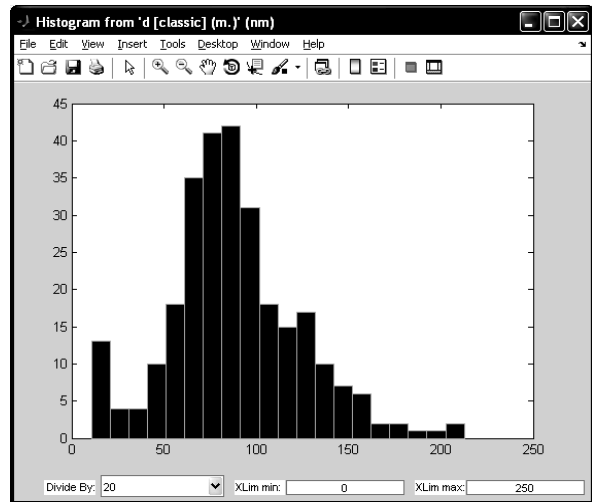


Рис. 7. Діалог виводу 2-вимірної гістограми. Діаметри по осі 'X'

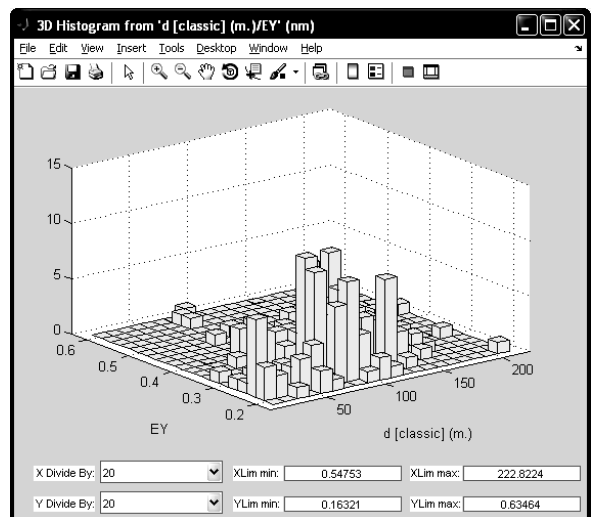


Рис. 8. Діалог виводу 3-вимірної гістограми. Інтенсивності по осі 'X', діаметри – по 'Y'

Передбачено також можливість вибору граничних значень діапазону відображення результатів по обох осях.

Для оцінювання характеру руху наночастинок програмне забезпечення може відображати їх треки,

як це показано на рис. 9. Відображення відбувається безпосередньо з таблиці результатів. Крім того, можна продивитися трек частинки на тлі кольорового кадру анімації, на якому частинка вперше появилась.

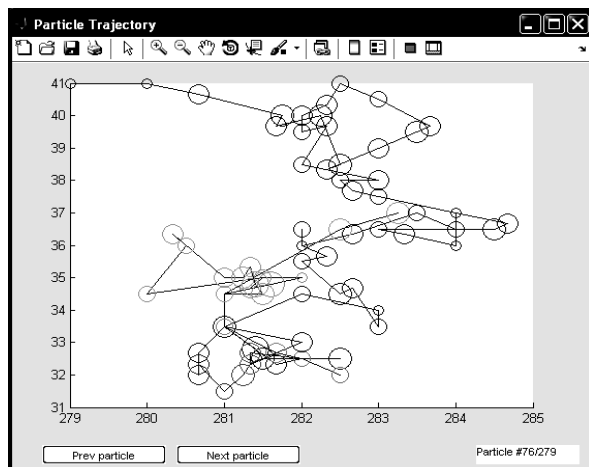


Рис. 9. Діалог виводу треку наночастинки

ВИСНОВКИ

Нами розроблено програмне забезпечення для автоматизації процесу нанотрекінгу, яке може використовуватися як інструмент дослідження поведінки наночастинок у розчинах, а також для визначення основних їх параметрів: розміру та розподілу за розмірами. Розроблене програмне забезпечення містить надійні засоби розпізнавання частинок у полі зору мікроскопа, зручні засоби відображення та статистичного аналізу результатів.

Передбачене також застосування системи в режимах мікрівіскозіметрії та мікротермометрії для вимірювання параметрів розчину.

Програма має гнучкий механізм підтримки апаратної частини: нових моделей мікроскопів, камер та режимів їхньої роботи.

Дослідження, результати яких викладено в цій публікації, підтримано U.S. Civilian Research & Development Foundation (CRDF Global) (Grant

agreement UKC2-7071-CN-12), Державним агентством України з питань науки, інновацій та інформатизації (Grant agreement M/148-2013), Державним фондом фундаментальних досліджень і Міністерством освіти та науки України.

Список літератури

1. Hong Qian. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems / Hong Qian, M.P. Sheetz, E.L. Elson // *Biophysical Journal*. – 1991. – 60. – P. 910-921.
2. Thu T.L. Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis, *International / T.L. Thu, P. Saveyn, H.D. Hoa and Van der P. Meeren // Dairy Journal*. – 2008. – 18, Issue 12. – PP. 1090-1096.
3. Filipe V. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates / V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot // *Pharmaceutical Research*. – 2011. – 28. – Pp. 1112-1120.
4. Saveyn H. Accurate particle size distribution determination by Nanoparticle Tracking Analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation / H. Saveyn, De Baets B., P. Hole, J. Smith and Van der P. Meeren // *PSA2008, Stratford on Avon, UK, September, 2008*.
5. Koenig G.M. Single Nanoparticle Tracking Reveals Influence of Chemical Functionality of Nanoparticles on Local Ordering of Liquid Crystals and Nanoparticle Diffusion Coefficients / G.M. Koenig, Jr., R. Ong, A.D. Cortes, J.A. Moreno-Razo, J.J. de Pablo, and N. L. Abbott // *Nano Letters*. – 2009. – V. 9, No. 7. – Pp. 2794-2801.
6. Sokolova V. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy / V. Sokolova, A.-K. Ludwig, S. Hornung, O. Rotan, P. A. Horn, M. Epple, B. Giebel // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – 87. – Pp. 146-150.
7. Wright M. Nanoparticle Tracking Analysis for the Multiparameter Characterization and Counting of Nanoparticle Suspensions / M. Wright // *Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. – 2012. – V. 906. – Pp. 511-524.

Надійшла до редакції 14.11.2013

Рецензент: д-р техн. наук, проф. О.М. Фоменко, Харківський університет Повітряних Сил ім. І. Кожедуба, Харків.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРА НАНОЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ТРАЕКТОРИЙ ИХ ДВИЖЕНИЯ

Е.В. Минов, С.Э. Остапов, Ю.Б. Халавка, Г.Н. Окрепка, П.М. Фочук

В статье описано программное обеспечение для определения параметров коллоидных наночастиц металлов, например, их диаметра и распределения размеров. В основе алгоритма лежит анализ траекторий броуновского движения наночастиц. Для визуализации частиц используется установка нанотрекинга с подсветкой белым светом.

Ключевые слова: программное обеспечение, распознавание образов, химия, трекинг наночастиц.

SOFTWARE FOR THE NANOPARTICLES PARAMETERS DETERMINATION ON THE BASE OF ITS MOTION TRACKS ANALYSIS

E.V. Minov, S.E. Ostapov, Yu.B. Khalavka, G.M. Okrepka, P.M. Fochuk

The paper deals with the development of software for the nanoparticle's parameters determination on the base of analysis of its tracks. The algorithm is based on the analysis of Brownian motion trajectories and velocities of nanoparticles. We've used the laboratory equipment with the white light illumination.

Keywords: software, pattern recognition, chemistry, nanoparticle's tracking.