УДК 535.417+57.086.8

# ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ МОНИТОРИНГ ЖИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПОМОЩИ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова \*, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

Для выявления тонких морфологических изменений живых клеток предложен метод голографической микроскопии. Выполнена модификация лазерного конфокального сканирующего микроскопа «LSM 510», позволяющая регистрировать цифровые микроголограммы, из которых восстанавливается амплитуда и фаза проходящего через образец излучения. Измерение фазового набега объектного пучка в клетках и межклеточном пространстве даёт информацию об оптической длине пути лучей в них (пространственных размерах и показателе преломления), что в свою очередь содержит информацию об изменениях морфологии и внутриклеточного состава. Кальциевая активность исследовалась с помощью флуоресцентной микроскопии, позволяющей выявлять малые изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция. При исследовании динамики кальциевых осцилляций и изменений оптической толщины сделаны выводы о взаимосвязи функциональных и морфологических изменений, выполнен их сравнительный анализ.

#### ВВЕДЕНИЕ

В современном мире при изучении различных биологических объектов уделяется большое внимание неинвазивности метода исследования. С этой точки зрения одним из наиболее успешных методов является оптическая микроскопия. С развитием микроскопов появились различные методы исследований, однако в основном они сводились к улучшению разрешения и контраста полученных изображений объекта. Разрешение чисто оптических схем ограничено дифракционным пределом, однако существуют методики, которые позволяют обойти это ограничение (структурированное освещение [1], апертурный синтез [2], интерполяция множества сдвинутых голографических изображений [3]). Для контрастного отображения глубоких слоёв ткани исследуемого образца применяются конфокальная микроскопия и оптическая когерентная томография.

Большинство биологических объектов, исследуемых с помощью оптической микроскопии, представляют собой тонкие прозрачные образцы (например, клеточные культуры или срезы тканей), которые слабо модулируют поток проходящего или отражённого от них света, но заметно изменяют его фазу. В работе [4] описано возникновение изображения такого объекта как интерференционный эффект. В работе [5] развита теория фазово-контрастной микроскопии (PCM), в которой контраст изображения, полученного в результате интерференции рассеянного и нерассеянного света, увеличивается за счёт сдвига разности их фаз на четверть длины волны и дальнейшего согласования их мощностей.

При помощи РСМ-микроскопии возможно наблюдение структуры прозрачных малоконтрастных объектов без использования каких-либо маркеров или красителей. Однако из полученного фазово-контрастного изображения фаза не может быть восстановлена количественно [6], хотя из формы фазового фронта или распределения фазы в сечении, перпендикулярном оптической оси, — фазового портрета — можно извлечь больше информации. Таким образом, при изучении жи-

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

<sup>\*</sup> orannge@mail.ru

вых объектов фазовая информация важна, особенно если её получать в режиме реального времени. Для этого можно воспользоваться методом цифровой голографической микроскопии [7].

Главный принцип цифровой голографии идентичен традиционной голографии. Регистрируется картина интерференции опорного и предметного пучков, однако, в отличие от традиционной голографии, для записи используется цифровая фото- или телекамера, и голограмма представляет собой массив чисел в памяти камеры или связанного с ней компьютера. Реконструкция изображений также становится более удобной. Если в традиционной голографии фотографическую пластинку необходимо подвергать химической фотообработке в проявителе и закрепителе, и только после этого возможно наблюдение восстановленного изображения, то в цифровой голографии этот процесс заметно упрощается и сводится к программной обработке записанных голограмм. В результате с одной голограммы восстанавливается как амплитуда, так и фаза объектной волны в виде численных массивов (в традиционной оптической голографии для количественного определения амплитуды необходимы дополнительные измерения, а визуализа-



Рис. 1. Принципиальная схема микроскопа «LSM 510» с дополнительным каналом для опорного пучка: 1 — гелий-неоновый лазер, 2 — светоделитель, 3 — исследуемый образец, 4 — блок микроскопа, 5 — зеркало, 6 — телескопическая система, 7 — оптический клин для совмещения опорного и предметного пучков, 8 — цифровая телекамера

ция и вычисление фазы возможно только дополнительными интерферометрическими методами). Кроме того, использование телезаписи существенно упрощает регистрацию ряда последовательных состояний объекта. Цифровая голографическая интерферометрия также становится более удобной и гибкой: легко провести сравнительный анализ изменений между любыми записанными состояниями объекта.

В данной работе для освещения используется когерентное лазерное излучение, хотя во многих экспериментах в силу различных причин применяется низкокогерентный свет [8]. У когерентного света есть неоспоримые преимущества: при таком освещении нет необходимости компенсировать частотную дисперсию, возможна запись голограмм с большой глубиной сцены, имеет место однозначное соответствие фазового набега и оптической длины пути.

Другое направление развития методов и техники исследования биообъектов — флуоресцентная микроскопия, в том числе двухфотонная [9]. Здесь для получения сверхвысокого разрешения применяют методики PALM, STED, STORM и ЗВ-микроскопии [10–13], а для исследования процессов жизнедеятельности и функционирования мозга используют специфические красители [14].

В схеме, приведённой на рис. 1, лазер используется не только для записи голограмм, но и в качестве источника возбуждения флуоресценции кальций-зависимого красителя. При использовании флуоресцентной микроскопии появляется возможность выявлять очень малые изменения либо концентрации химических элементов, к которым данные красители специфичны (например, к кальцию), либо синтез самих геномодифицированных структур (например, белков). Морфологические изменения при этом не могут быть выявлены стандартными методами. Однако детекти-

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

рование изменений структуры объектов, несомненно, важно и может нести новую информацию как о функционировании нейронных культур, так и о взаимосвязи химических реакций, проходящих в клетках, с морфологией клетки.

Совмещение измерений оптической длины пути лучей в живых клетках (методом цифровой голографии) и изменений концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток (кальциевая визуализация [15]) повысит информативность исследований кальциевой активности нейронов, нервной ткани и биологических нейронных сетей.

#### 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Голограмма представляет собой запись интерференции двух когерентных волн — опорной R и предметной O, которая либо проходит через объект, либо отражается от него. В плоскости голограммы формируется двумерное распределение интенсивности

$$I_{\rm H}(x,y) = (R+O)(R+O)^* = |R|^2 + |O|^2 + R^*O + RO^*.$$
(1)

Здесь  $R = r \exp(i\varphi_R)$ ,  $O = o \exp(i\varphi_O)$ , звёздочка означает комплексное сопряжение. Если коэффициент пропускания голограммы пропорционален длительности экспозиции, тогда восстановленное распределение волнового поля W, полученное освещением голограммы волной U, записывается как

$$W(x,y) = UI_{\rm H}(x,y) = UI_{\rm R} + UI_{\rm O} + UR^*O + URO^*,$$
(2)

где  $I_{\rm R} = |R|^2 = r^2$  и  $I_{\rm O} = |O|^2 = |o|^2$  — интенсивности опорной и предметной волн соответственно. В выражении (2) два первых слагаемых в правой части формируют нулевой порядок дифракции, третье и четвёртое слагаемые воспроизводят два сопряжённых изображения объекта. Слагаемое  $UR^*O$  отвечает за мнимое изображение объекта, а слагаемое  $URO^*$  — за действительное изображение. Если восстановление голограммы выполняется волной, идентичной опорной волне (U = R), то волна, формирующая мнимое изображение, является копией объектной волны, с интенсивностью, пропорциональной интенсивности опорной  $(I_{\rm R}O)$ . Более того, если интенсивность опорной волны постоянна  $(I_{\rm R} = {\rm const})$ , то имеет место точная реконструкция волнового фронта объектной волны.

При записи с плоской опорной волной значительно упрощается программная обработка данных.

Для восстановления голограмм сфокусированного изображения [16] в цифровой голографии применяют алгоритмы, основанные на использовании прямого и обратного преобразований Фурье с фильтрацией в частотной плоскости [17, 18]. Для реконструкции изменений фазового набега и оптической длины пути используется цифровая голографическая интерферометрия — вычисление разности фаз комплексных амплитуд волн, прошедших сквозь объект в двух сравниваемых состояниях:

$$\Delta \varphi_{12} = \varphi_1 - \varphi_2. \tag{3}$$

Для вычислений используется тригонометрическое тождество:

$$\Delta \varphi_{12} = \operatorname{arctg}[\operatorname{tg}(\varphi_1 - \varphi_2)] = \operatorname{arctg} \frac{\operatorname{tg}(\varphi_1) - \operatorname{tg}(\varphi_2)}{1 + \operatorname{tg}(\varphi_1) \operatorname{tg}(\varphi_2)}, \tag{4}$$

откуда разность фаз в каждой точке

$$\Delta \varphi_{12} = \operatorname{arctg} \frac{\operatorname{Im}(A_1)\operatorname{Re}(A_2) - \operatorname{Im}(A_2)\operatorname{Re}(A_1)}{\operatorname{Im}(A_1)\operatorname{Im}(A_2) + \operatorname{Re}(A_1)\operatorname{Re}(A_2)}.$$
(5)

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

Здесь  $A_1$  и  $A_2$  — комплексные амплитуды восстановленных объектных волн, Im(x) и Re(x) — мнимая и действительная части комплексного числа x соответственно.

Выражение (7) позволяет вычислять разность фаз непосредственно из данных, полученных восстановлением цифровых голограмм. Для устранения неоднозначности арктангенса проводится разворачивание фазы — добавление или вычитание чисел  $\pi k$ , где k — целое (phase unwrapping [6, 18, 19]). В результате методами цифровой голографической интерферометрии измеряется изменение фазы для объектной волны в случае нестабильного (изменяющегося) объекта, с помощью которого впоследствии может быть рассчитано изменение оптической длины пути:

$$\Delta L_{\rm opt} = \Delta \varphi \,\lambda/(2\pi). \tag{6}$$

Методом исследования клеточной активности является флуоресцентная микроскопия. Информацию об изменении концентрации ионов кальция в клетках даёт характер флуоресценции специфических красителей, вступающих с ионами в реакцию ассоциации. При этом у ионозависимых красителей изменяется либо интенсивность, либо спектр флуоресценции.

В настоящее время существует большой выбор флуоресцентных  $Ca^{2+}$ -зависимых красителей, обладающих различными характеристиками [14]. Синтетические кальциевые красители на основе кальциевых хелаторов (кальций-связывающих веществ) ВАРТА наиболее часто используются в качестве индикаторов ионов  $Ca^{2+}$  ввиду простоты их введения в клетку и высокого квантового выхода. Наиболее удобно использовать мембранно-проницаемые ацетоксиметильные эфиры кальциевых индикаторов. В такой форме краситель-индикатор может пассивно проникать в клетки через плазматическую мембрану. В цитоплазме клетки эфир ферментативно отщепляется от молекулы красителя внутриклеточными эстеразами (расщепителями сложных химических соединений). При этом образуется заряжённая форма красителя, которая не может диффундировать через клеточную мембрану. Таким образом, через некоторое время практически весь краситель оказывается внутри клеток. Если теперь осветить образец излучением с длиной волны, входящей в спектр поглощения красителя, его молекулы переводятся в возбуждённое состояние и способны флуоресцировать.

Флуоресцентное излучение формирует изображение клеток плоскости *xy* объекта, оптически сопряжённой с фотодетектором. Изображения плоскости *xy* регистрируются через определённые промежутки времени. В результате получается временная серия изображений. Здесь изменения в изображении (изменение уровня флуоресценции) дают информацию об изменениях, происходящих в клетке.

Для обработки временны́х серий изображений используют окно выделения (region of interest, ROI). Окно выделения представляет собой набор смежных пикселов на изображении, заключённых в определённый периметр. Этот периметр можно установить вручную, либо с помощью специальных программных фильтров. На одном изображении можно выбрать несколько окон выделения. Анализ динамики флуоресценции проводится следующим образом: программа рассчитывает среднюю интенсивность пикселов в каждом окне выделения отдельно для каждого кадра из серии. После этого строится график, на котором по горизонтальной оси откладывается время измерения (в кадрах или секундах), а по вертикальной — средняя интенсивность флуоресценции в данной области выделения.

Динамика внутриклеточной концентрации ионов кальция (кальциевые осцилляции), определяемая по изменению интенсивности флуоресценции введённых в тела и отростки клеток кальциевых индикаторов, служит надёжным показателем функциональной активности нейронов и нейронных сетей [20].



Рис. 2. Восстановленные фазовые портреты для нейрональной клеточной культуры: a-3-я секунда записи, b-5-я секунда записи, e-9-я секунда записи, z-11-я секунда записи. Здесь x и y-пространственные координаты,  $\varphi$  — набег фазы

### 2. ТЕХНИКА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

На базе лазерного конфокального сканирующего микроскопа «LSM 510» была собрана схема для записи цифровых голограмм (рис. 1). Луч гелий-неонового лазера был разделён светоделителем на опорный и предметный. Предметный луч проходил через микроскоп и, соответственно, через объект. Опорный луч при помощи системы оптических элементов расширялся, коллимировался и направлялся на оптический клин, сквозь который проходил также предметный пучок. В описанной выше схеме такая система совмещения применяется для создания оптимального угла схождения опорного и предметного пучков, который при использовании матрицы с размером пиксела 2,2 мкм составляет около 4°. В результате совмещения пучков на фотоприёмной матрице телекамеры регистрировалась цифровая голограмма. В итоге голограммы были записаны параллельно с флуоресцентной визуализацией кальциевых осцилляций.

Применяемая в работе методика кальциевой визуализации нейронных культур основана на использовании кальций-зависимого красителя «Oregon Green BAPTA 1» и лазерного конфокального сканирующего микроскопа «Zeiss LSM 510» и подробно описана в [20–22]. В качестве примера применения предлагаемой методики были исследованы первичные культуры клеток гиппокампа мозга мышей, высаженные в питательную среду и поддерживаемые в живом состоянии длительное время (порядка месяца). Регистрировалась клеточная активность как протяжённый во

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

времени процесс. Применяемая телекамера VEC-545 записывала серию голограмм в формате видеофайла. Для обработки видеофайл разбивался на отдельные голограммы.

Для восстановления цифровых голограмм была написана программа, основанная на двойном преобразовании Фурье с фильтрацией в частотной плоскости [18]. В результате программной обработки были получены восстановленные фазовые портреты (распределение фазы восстановленной объектной волны в поперечной плоскости). Впоследствии путём сравнения фазовых портретов, записанных в различные моменты времени, была проведена оценка изменений, происходивших в клеточной культуре. Измерение фазового набега объектного пучка (оптической длины пути) в клетках и межклеточном пространстве содержит информацию об размерах и показателе преломления. В свою очередь, из этих данных можно извлечь информацию о морфологических изменениях клеток и внутриклеточного состава. Из временной серии восстановленных фазовых портретов, 4 кадра из которой приведено на рис. 2, видно, что в окрестностях координат x = 5 мкм, y = 5 мкм и x = 15 мкм, y = 5 мкм возникает квазипериодическое изменение формы клеток с периодом порядка десяти секунд и длительностью около двух секунд.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Динамику кальциевых осцилляций принято описывать с помощью относительных изменений интенсивности флуоресценции dF/F кальций-зависимого индикатора — амплитуды таких изменений, их длительности и средней частоты. В ходе экспериментов по параллельному мониторингу спонтанной клеточной активности с голографическими измерениями эти параметры сравнивались с динамикой оптической толщины клеток  $L_{\rm opt}$  по изменениям фазовых портретов. Была достигнута чувствительность измерений оптической длины пути 5 нм с частотой 5 кадров в секунду. Это соответствовало частоте кадров конфокального сканирующего микроскопа.

Серия экспериментов по параллельному мониторингу показала близость параметров временной динамики кальциевых осцилляций (их длительности и средней частоты) со скоростью и периодичностью морфологических изменений, которые оценивались по изменениям оптической длины пути (см. рис. 3a-c, на которых представлены графики dF/F(t) и  $L_{opt}(t)$  для клеток одной и той же культуры; для наглядности на каждом из рисунков графики смещены по вертикали): кальциевые осцилляции являлись одиночными, их длительность составляла в этих экспериментах для разных клеток от 3 до 10 с. При этом клетки, в которых медленнее менялась концентрация кальция, медленнее меняли и свою морфологию. Точное соответствие длительности кальциевых осцилляций и продолжительности локальных морфологических изменений отсутствовало, поскольку изменения оптической длины пути, очевидно, зависят не только от концентрации ионов кальция.

Сравнение временны́х перерывов между отдельными осцилляциями концентрации кальция и оптической длины пути даёт более точное соответствие. Статистический анализ показывает, что среднее время между кальциевыми осцилляциями составляет для различных клеток этой культуры от 10 до 20 с. В этот же интервал укладывается среднее время между повторениями локальных морфологических изменений тех же клеток — от 11 до 17 с. Это свидетельствует о взаимосвязи функциональной активности клеток с их морфологическими изменениями. Об этом говорит и тот факт, что введение блокатора натриевых каналов мембраны клеток практически парализует кальциевую активность. После блокирования натриевых каналов кальциевая активность в описываемой серии экспериментов практически прекратилась. Только у одиночных клеток наблюдались кальциевые осцилляции, причём они становились значительно медленнее (примерно на порядок), и их амплитуда относительных изменений интенсивности флуоресценции падала примерно вдвое — с  $50\div60\%$  до  $25\div30\%$ . При этом также замедлялись изменения



Рис. 3. Динамика флуоресценции кальций-зависимого красителя (a, 6) и изменений оптической длины пути  $\Delta L_{\rm opt}$  (b, 2) в различных клетках нейрональной культуры: a и b — спонтанная активность, b и z — активность после введения блокатора натриевых каналов

оптической длины пути. Квазипериодические изменения оставались у тех же клеток, у которых сохранялась кальциевая активность, а их амплитуда падала гораздо заметнее — с величин порядка 100 нм при нормальной спонтанной активности (до введения блокатора) до 10÷20 нм после введения блокатора.

Таким образом, с использованием данной модернизации микроскопа на основе регистрации, восстановления и измерения амплитуды и фазы проходящего через объект света появилась возможность не только визуализации низкоконтрастных и фазовых объектов, но и измерения оптической длины пути в них с нанометровой точностью. Была проведена параллельная регистрация изменений концентрации ионов кальция, играющих ключевую роль в метаболизме и процессах передачи информации в биологических нейронных клетках и сетях, и тонких морфологических изменений в клеточной культуре.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проекты 13-02-97145, 13-02-01420).

Благодарим за предоставленные биологические материалы, помощь в проведении экспериментов и обсуждение результатов сотрудников Нижегородской государственной медицинской академии И. В. Мухину и Е. В. Митрошину.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Gustafsson M.G.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. 2005. V. 102, No. 37. P. 13 081.
- 2. Sun T., Liu J., Yan H., et al. // Opt. Lett. 2013. V. 38, No. 17. P. 3471.
- Hong J., Kim M. K. // Digital Holography and 3D Imaging. Technical Digest. Opt. Soc. Amer., 2013. Art. no. Dth1A.3.

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров

- 4. Abbe E. // Arch. Mikrosk. Anat. 1873. No. 9. P. 431.
- 5. Zernike F. // Physica. 1942. No. 9. P. 686.
- Popescu G. Quantitative phase imaging of cells and tissues. McGraw-Hill Companies, Inc., 2011. 362 p.
- 7. Дуденкова В. В., Муравьёва М. С., Рыбников А. И., Захаров Ю. Н. // Изв. вузов. Радиофизика. 2014. Т. 57, № 8–9. С. 617.
- 8. Shaked Natan T., Katz B., Rosen J. // J. Appl. Opt. 2009. V. 48, No. 34. Art. no. H120.
- 9. Svoboda K., Yasuda R. // Neuron. 2006. V. 50. P. 823.
- 10. Hess S. T., Girirajan T. P. K., Mason M. D. // Biophys. J. 2006. V. 91. P. 4258.
- 11. Folling J., Bossi M., Bock H., et al. // Nature Methods. 2008. V. 5. P. 943.
- 12. Huang B., Wang W. Q., Bates M., Zhuang X. W. // Science. 2008. V. 319. P. 810.
- 13. Cox S., Rosten E., Monypenny J., et. al. // Nature Methods. 2012. V. 9, No. 2. P. 195.
- 14. Paredes M., Etzler J. C., Watts L. T., et al. // Methods. 2008. V. 46. P. 143.
- Митрошина Е. В. Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга: Электрон. учеб.-метод. пособ. Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2012. 40 с.
- 16. Кольер Р., Беркхарт К., Лин Л. Оптическая голография. М.: Мир, 1973. С. 26.
- 17. Colomb T. Numerical aberrations compensation and polarization imaging in digital holographic microscopy. Lausanne: EPFL, 2006. 133 p.
- Рыбников А.И., Дуденкова В.В., Муравьёва М.С., Захаров Ю. Н. // Опт. журн. 2013. Т. 80, № 7. С. 66.
- 19. Alexeenko I., Gusev M., Gurevich V. // Appl. Opt. 2009. V. 48, No. 18. P. 3 475.
- 20. Захаров Ю. Н., Митрошина Е. В., Ведунова М. В. и др. // Опт. журн. 2012. Т. 79, № 6. С. 47.
- 21. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Широкова О.М. и др. // Вестн. ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2011. № 2 (2). С. 283.
- 22. Zakharov Yu. N., Mitroshina E. V., Shirokova O. M., Mukhina I. V. // Springer Proceedings in Mathematics and Statistics. New York: Springer Science+Business Media, 2013. V. 32. Models, Algorithms, and Technologies for Network Analysis / Ed. by B. Goldengorin. P. 225.

Поступила в редакцию 2 декабря 2013 г.; принята в печать 22 сентября 2014 г.

## PARALLEL MONITORING OF LIVING CELL CULTURES BY MEANS OF DIGITAL-HOLOGRAPHY AND FLUORESCENT MICROSCOPY

M. S. Muravyova, V. V. Dudenkova, A. I. Rybnikov, and Yu. N. Zakharov

We propose using the method of holographic microscopy to detect fine morphologic changes in living cells. A modification of the laser confocal scanning microscope "LSM 510" allows registering digital microholograms which can be used to reconstruct the amplitude and phase of the radiation passing through the specimen. Measuring of the phase incursion of the object beam in cells and the intercellular space yields information about the optical length of the ray path in the cells (spatial dimensions and the refraction ratio), which in its turn contains information about changes in the morphology and intracellular contents. Calcium activity was studied by means of fluorescent microscopy which makes it possible to detect minor variations in the intracellular concentration of calcium ions. On studying the dynamics of calcium oscillations and variations in the optical thickness, conclusions were made about the interconnectedness of functional and morphological variations, and comparative analysis of these variations was performed.

М. С. Муравьёва, В. В. Дуденкова, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров