

УДК 535.41+576.5

СРАВНЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПО ДИНАМИКЕ СПЕКЛОВ

А. П. Владимиров^{1,2}, *А. С. Малыгин*¹, *Ю. А. Михайлова*^{1,2 *}, *Е. М. Бородин*¹,
*А. А. Бахарев*², *А. П. Порываева*²

¹ Уральский федеральный университет;

² Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Проведена регистрация динамики спеклов в плоскости изображения монослоя клеток, культивированных на стеклянной подложке. В качестве объектов исследования выбраны культуры клеток ЛЭЧ-3, Л-41 и Vero. В течение суток регистрировались оцифрованное значение интенсивности излучения I в одном пикселе и параметр η , характеризующий изменение в распределении интенсивности на участке 10×10 пикселей. Коэффициент множественной детерминированности, рассчитанный по зависимостям η от времени, для трёх клеточных культур равен 0,94.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным инструментом для изучения микроскопических процессов, происходящих в биологических средах, является метод регистрации динамики лазерных спеклов или биоспеклов. Спеклы (от англ. speckle — крапинка, пятнышко) — случайная интерференционная картина, которая образуется при взаимной интерференции многих когерентных волн, имеющих случайные сдвиги фаз.

При освещении лазерным излучением живых объектов вследствие изменения во времени амплитуд и фаз рассеянных ими волн картина спеклов меняется. В литературе часто само это явление обозначается как биоспеклы [1]. Динамика спеклов изучалась в плоскости изображения семян [2], фруктов [3], кожи человека [4] и других объектов. Ссылки на многочисленные работы в данной области можно найти в книге [1]. С научной и практической точек зрения представляет интерес выявление связи между параметрами, характеризующими процессы в объектах, вызывающие случайные изменения амплитуд и фаз волн, с характеристиками динамики спеклов. В общем случае установление такой связи является сложной задачей. Примером её успешного решения является разработка метода, предложенного впервые в работах [5, 6] и доведённого до практического применения в клиниках. В настоящее время этот метод достаточно проработан теоретически и экспериментально [7]. Он позволяет по контрасту спеклов оценивать скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента.

В работе [8] для тонкого прозрачного объекта теоретически была установлена связь между временным спектром разности фаз пар волн, проходящих через объект, и спектром флуктуаций интенсивности излучения в плоскости изображения объекта. В этой же работе корректность теории была успешно проверена в эксперименте. На основе полученных результатов авторами [9] была предложена спекл-интерферометрическая установка, позволяющая оценивать метаболическую активность клеток, культивированных на стеклянной подложке. В качестве параметра, характеризующего активность клеток, была выбрана вариация оптической разности хода σ_u пар волн, зондирующих объект.

* julia_mikhailova2104@mail.ru

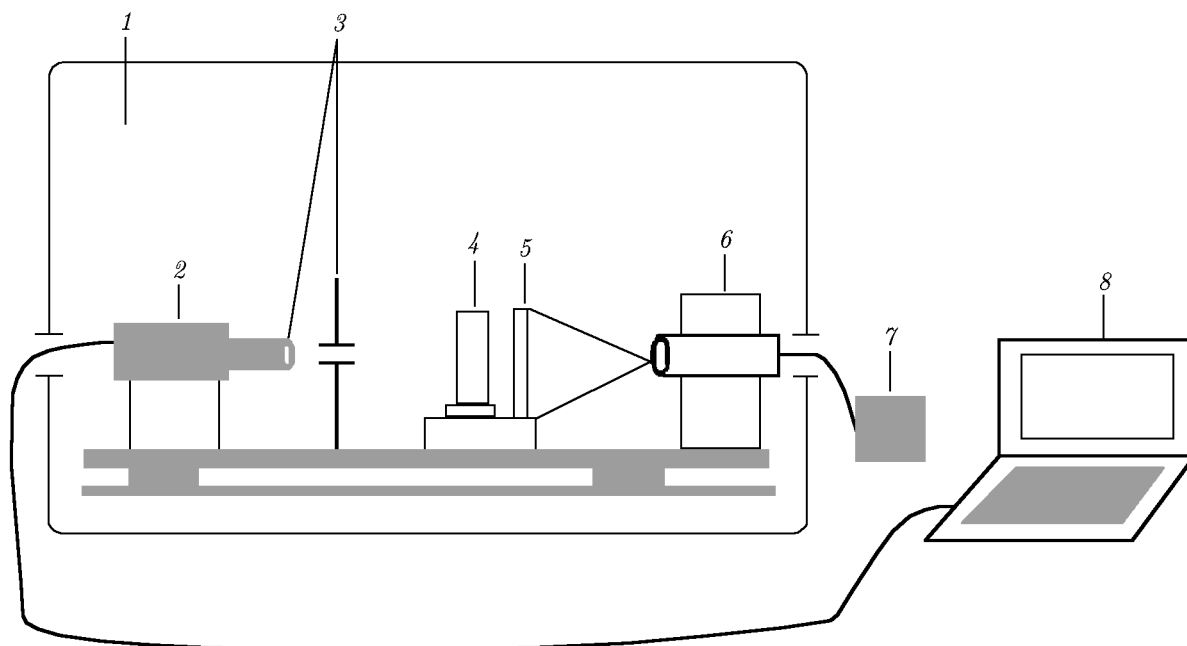


Рис. 1. Схема оптической установки: 1 — термостат, 2 — телекамера, 3 — линза с диафрагмой, 4 — кювета, 5 — матовое стекло, 6 — лазерный модуль, 7 — блок питания (5 В), 8 — персональный компьютер

Недостатком этой методики являлась трудоёмкость, не позволяющая проводить измерения в реальном времени. Анализ причин, влияющих на изменение оптических путей, показал, что важным фактором может быть эндоцитоз, т. е. захват крупных частиц мембранами клеток.

Целью настоящей работы являлось устранение недостатков этой методики и её использование для сравнения метаболической активности трёх клеточных культур. Устранение недостатков включало разработку способа измерений в реальном времени и исключение влияния на динамику спеклов процессов питания клеток и выведения продуктов их жизнедеятельности.

1. ТЕХНИКА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследований были выбраны культуры перевиваемых клеток Л-41, ЛЭЧ-3 и Vero из коллекции низкотемпературного банка-музея клеточных культур ЕНИИВИ [10]. Эксперименты проводились на установке, показанной на рис. 1.

В качестве источника света 6 использовался полупроводниковый лазерный модуль с рабочей длиной волны $\lambda = 0,65$ мкм и мощностью 20 мВт. Излучение от модуля попадало на матовый рассеиватель 5. На расстоянии порядка 10 см от рассеивателя располагалась стеклянная кювета 4 с размерами $9 \times 25 \times 40$ мм и толщиной внутренней полости 3 мм. В кювету вводилась стеклянная подложка с толщиной 1,5 мм со слоем клеток. Рядом располагалась подложка без клеток и стеклянный фиксатор. Далее излучение попадало на объектив 3 с диафрагмой, формирующей картину спеклов. Типичное увеличение оптической системы равнялось 0,3, линейное разрешение линзы на объекте составляло 60 мкм. В опытах использовалась монохромная телекамера 2 типа Видеоскан-415/П/К-USB. Она имела матрицу фотоприёмников с размерами $6,5 \times 4,8$ мм, содержащую 780×582 ячеек с размерами $8,3 \times 8,3$ мкм. Частота ввода кадров была не более 25 Гц. Время экспонирования телекамеры составляло 9 с.

Как известно, оптимальная температура роста клеточных культур равняется $36,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Снижение температуры приводит к быстрому уменьшению физиологической активности клеток, поэтому система устройств находилась в термостате 1. Сигналы с телекамеры через USB-порт поступали на ноутбук 8 типа Aspire 3692 WLMi фирмы Acer.

Программное обеспечение в режиме реального времени в течение $1 \div 2$ суток регистрировало два параметра динамики спеклов — цифровое значение интенсивности излучения I и параметр η , характеризующий изменение в распределении интенсивности на участке 10×10 пикселей. Величина η определялась по формуле

$$\eta = \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} (A_{i,j} - \bar{A})(B_{i,j} - \bar{B}) / \sqrt{\left[\sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} (A_{i,j} - \bar{A})^2 \right] \left[\sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} (B_{i,j} - \bar{B})^2 \right]}, \quad (1)$$

где A_{ij} — интенсивность I на участке с размерами $m \times n$ пикселей в начальный момент времени; $B_{i,j}$ — интенсивность I на этом же участке через время τ ; i и j — номера пикселей участков по осям x и y соответственно, $\bar{A}$ — средняя интенсивность I на участке в начальный момент времени, $\bar{B}$ — средняя интенсивность I на участке через время τ .

Зависимость $\eta(t)$ является нормированной временной автокорреляционной функцией, характеризующей процесс случайного изменения интенсивности излучения в плоскости изображения тонкого прозрачного объекта. Согласно теории [8], если средние разности оптических путей пар волн не меняются, то

$$\eta(t) = \exp[-k_{11}/2 - k_{22}/2 + k_{12}(\tau)], \quad (2)$$

где k_{11} и k_{22} — дисперсии разностей фаз волн в моменты времени t_1 и $t_1 + \tau$ соответственно, k_{12} — смешанный корреляционный момент разностей фаз волн в моменты времени t_1 и $t_1 + \tau$.

Анализ формулы (2) показывает, что если процесс изменения разностей фаз во времени является стационарным (т. е. величины k_{11} и k_{22} равны), то функция $\eta(\tau)$ выходит на постоянный уровень за время, превышающее время корреляции разностей фаз. По значению этого уровня можно определить величину k_{11} . Если процесс изменения разности фаз является нестационарным, но время усреднения величины I превышает указанное время корреляции, то по мере роста k_{22} величина η уменьшается. Отметим, что для фиксированных значений t_1 и t_2 величина η является коэффициентом корреляции интенсивностей в моменты времени t_1 и t_2 , а формула (1) соответствует усреднению по ансамблю объектов (реализаций). В качестве реализаций нами были взяты различные области покрытой клетками подложки, размер которых равен линейному разрешению линзы.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлена картина спеклов, наблюдаемая в фиксированный момент времени на экране компьютера. Белыми квадратиками отмечены пиксели, вблизи которых определяли величины I и η . Цифрой 1 отмечена стенка кюветы, 2 — подложка с клетками, помещённая в среду роста, 3 — подложка без клеток в среде роста. Для исключения колебаний подложек был установлен фиксатор 4.

На рис. 3 представлены типичные зависимости оцифрованных значений интенсивности I от времени для питательной среды (кривая 1) и клеток (кривая 2).

На рис. 4 показаны типичные зависимости параметра η от времени для питательного раствора (кривая 1) и клеток (кривая 2).

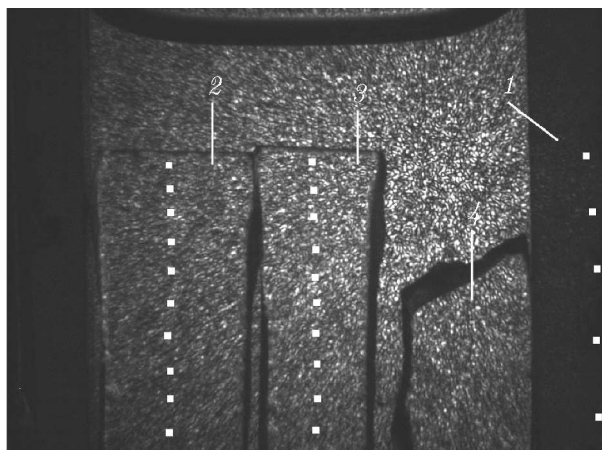


Рис. 2. Типичная картина спеклов с выделенными участками: 1 — стенка кюветы, 2 — стекло с клетками, 3 — стекло без клеток, 4 — фиксатор

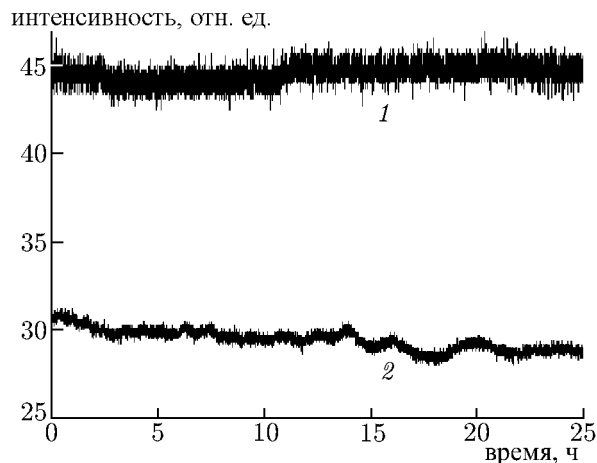


Рис. 3. Зависимость оцифрованных значений интенсивности от времени: кривая 1 — для питательной среды, кривая 2 — для клеток

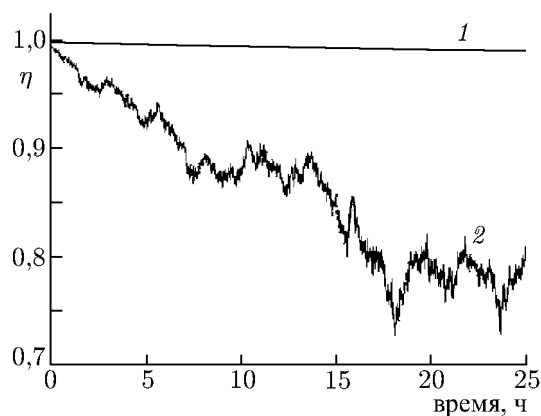


Рис. 4. Зависимость параметра η от времени: кривая 1 — для питательной среды, кривая 2 — для клеток

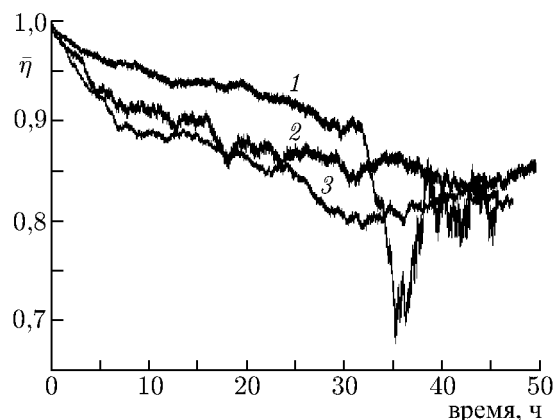


Рис. 5. Зависимость $\bar{\eta}$ от времени для различных клеточных культур: кривая 1 — ЛЭЧ-3, кривая 2 — Vero, кривая 3 — Л-41

Из рис. 4 видно, что значение η для питательного раствора уменьшается до 0,97, а для клеток — до 0,72.

Для оценки воспроизводимости результатов нами сравнивались зависимости $\eta(\tau)$, соответствующие разным участкам объекта в одном опыте, а также зависимости, взятые из двух опытов. Сравнение зависимостей $\eta(\tau)$ показало, что они имеют одинаковый вид. Для клеточных культур типа Vero и ЛЭЧ-3 по четырём зависимостям, взятым из одного опыта, находили коэффициенты множественной детерминированности величины η . Для культуры Vero коэффициент множественной детерминированности был равен 0,88, а для ЛЭЧ-3 он составил 0,83. Коэффициент детерминированности для клеток типа Л-41, найденный по двум массивам, взятым из разных опытов, равнялся 0,78. Для культуры ЛЭЧ-3 этот коэффициент был равен 0,75.

На рис. 5 представлены зависимости среднего значения $\bar{\eta}$ параметра η от времени для трёх клеточных культур. Для усреднения были взяты данные с пяти участков. Видно, что величина $\bar{\eta}$ имеет тенденцию к постепенному уменьшению для всех культур. Коэффициент множественной детерминированности был равен 0,939. Его близость к единице свидетельствует о том, что типы процессов в клетках, изменяющих пути рассеянных волн, подобны. После 30 ч регистрации для

культур типа ЛЭЧ-3 и Л-41 наблюдаются резкие отклонения временной зависимости $\bar{\eta}$ от основной тенденции, что, скорее всего, связано со снижением активности клеточного метаболизма. Для клеток ЛЭЧ-3 наблюдаются более резкие изменения в связи с повышенными требованиями культуры к питательному раствору.

В настоящей работе время экспонирования T телекамеры было выбрано равным 9 с, что превышало время корреляции интенсивности излучения (равное $5 \div 8$ с), найденное ранее в работе [9]. При малых по сравнению с единицей значениях k_{11} и k_{22} время корреляции интенсивности равно времени корреляции τ_0 разности фаз волн [8]. Тогда в формуле (2) величину k_{12} можно положить равной нулю и, следовательно, $\eta(\tau) = \exp[-k_{11}/2 - k_{22}(\tau)/2]$. Согласно этой формуле и рис. 5 следует, что уменьшение величины η соответствует увеличению дисперсии разности фаз k_{22} . Пока не ясно, чем вызвано это увеличение. Возможно, по мере уменьшения содержания питательных веществ в растворе рельеф поверхности клеток, а также структура самих клеток становятся более неоднородными. Для внесения ясности в данный вопрос нужны дальнейшие исследования.

Как было отмечено выше, в работе [9] в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, была выбрана величина $\sqrt{k_{22}}$. Поскольку при $T > \tau_0$ имеется однозначное соответствие между величинами η и k_{22} , то в подобных случаях для оценки метаболической активности можно использовать величину η . Проведённое нами исследование показало, что для разных клеточных культур зависимости η от времени имеют одинаковый качественный вид: величина η немонотонно уменьшается со временем по мере увеличения τ .

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее на культуре Л-41 [9] было показано, что время корреляции интенсивности рассеянного излучения составляет $5 \div 8$ с. Отмечено, что это характерное время определяется процессами, связанными с эндоцитозом. Наличие эндоцитоза приводило к сильному разбросу данных, полученных на различных стадиях жизни клеток. Для устранения влияния данного процесса на результаты экспериментов время экспонирования телекамеры (9 с) было выбрано превосходящим время корреляции интенсивности излучения. Усовершенствование методики позволило получить хорошую воспроизводимость результатов как для клеток одного типа, так и разных клеточных культур.

Подытожим полученные нами результаты.

1) Усовершенствована методика, предназначенная для оценки метаболической активности клеток, культивируемых на подложке. Модернизация включала регистрацию в реальном времени параметров, характеризующих динамику спеклов, и увеличение времени экспонирования на 4 порядка.

2) В качестве параметра, характеризующего метаболическую активность в клетках, рекомендовано использовать величину η , определяющую степень корреляции изображений на участке с размерами 10×10 пикселей, взятых в начальный момент и через время τ .

3) Показано, что зависимости η от τ для трёх клеточных культур имеют схожий вид. Коэффициент множественной детерминированности, найденный по зависимостям $\eta(\tau)$, составляет 0,94.

Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования динамической спекл-интерферометрии в биологических исследованиях клеток.

Авторы благодарят профессора Н. П. Глинских за поддержку данной работы и обсуждение её результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dynamic laser speckle and applications / Ed. by H. J. Rabal, R. A. Braga. CRC Press, 2008.
2. Cardoso R. R., Costa A. G., Nobre C. M. B., Braga R. A. Jr. // Opt. Commun. 2011. V. 284. P. 2131.
3. Oulamara A., Tribillon G., Duvernoy J. // J. Modern Opt. 1989. V. 36, No. 2. P. 165.
4. Владимиров А. П., Лисин А. Л., Микушин В. И. и др. // Письма в Журн. Техн. Физ. 2000. Т. 26. С. 20.
5. Fercher A. F., Briers J. D. // Opt. Commun. 1981. V. 37, No. 5. P. 326.
6. Briers J. D., Webster S. // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, No. 2. P. 174.
7. Briers J. D. // Applicata. 2007. V. 37, No. 1–2. P. 139.
8. Vladimirov A. P., Druzhinin A. V., Malygin A. S., Mikitas K. N. // Proc. SPIE. 2012. V. 8337. Art. no. 83370C-1.
9. Малыгин А. С., Бебенина Н. В., Владимиров А. П. и др. // Приборы и техника эксперимента. 2012. № 3. С. 124.
10. Каталог Российской коллекции клеточных культур. Омск: ОмГПУ, 1999.

Поступила в редакцию 11 ноября 2013 г.; принята в печать 31 марта 2014 г.

USING SPECKLE DYNAMICS FOR COMPARISON OF THE METABOLIC ACTIVITY OF DIFFERENT CELL CULTURES

*A. P. Vladimirov, A. S. Malygin, Yu. A. Mikhailova, E. M. Borodin, A. A. Bakharev, and
A. P. Poryvaeva*

The dynamics of speckles in the image plane of a monolayer of cells cultivated on a glass substrate has been recorded. Cell cultures LECH-3, L-41, and Vero were selected as the objects of research. The digital value of the radiation intensity I in one pixel and the parameter η characterizing the change in the intensity distribution on an 10×10 pixel area was recorded for 24 hours. The multiple determinacy coefficient of three cell cultures, which was obtained from the time dependences of η , was equal to 0.94.