

УДК 535.4+57.08

## ДИНАМИКА СПЕКЛОВ В ПЛОСКОСТИ ИЗОБРАЖЕНИЯ МОНОСЛОЯ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Ю. А. Михайленко<sup>1\*</sup>, А. П. Владимиров<sup>1,2</sup>, А. А. Бахарев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора;

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург, Россия

Объектами представленного исследования являлись клетки Л-41 КД/84 и RD, культивированные в виде монослоя на стеклянной подложке. Цель работы заключалась в изучении закономерностей изменения сигналов динамики спеклов в пространстве и во времени в плоскости изображения монослоя клеток при больших оптических увеличениях, различных скоростях изменения температуры окружающей среды, воздействиях другим типом вируса, а также после разморозки клеток. Показано, что при скорости изменения температуры  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  наблюдается хорошая корреляция между массивами среднеквадратического отклонения разности оптических путей  $\sigma_u$  пар волн, проходящих через объект, и температурой (коэффициент корреляции равен 0,88). Отмечено, что большая часть культивированных клеток наиболее активна в диапазоне температур  $32\div 34^\circ\text{C}$ , что позволяет предлагать именно данный диапазон для исследования процессов в живых клетках. На монослое заражённых вирусом ЕСНО11 культивированных клеток RD впервые получено значение,  $\sigma_u$ , в 4 раза превышающее соответствующее значение для клеток, заражённых вирусом герпеса, что согласуется с данными вирусологии для указанных вирусов. В предположении, что процессы, протекающие в питательном растворе и внутри клеток, контакты клеток и их хаотическое движение независимо изменяют фазы зондирующих волн, в экспериментах с размороженными клетками получено отличное совпадение (коэффициент корреляции равен 0,99) экспериментальной и теоретической временной автокорреляционной функции интенсивности излучения. Сделан вывод о перспективности используемого авторами метода для изучения функционирования клеток в норме, при воздействии инфекций, токсичных веществ и лекарств.

### ВВЕДЕНИЕ

Если шероховатый объект осветить когерентным излучением, то отражённые от его элементарных участков (центров рассеяния) волны со случайными амплитудами и фазами взаимно интерferируют и на некотором расстоянии от объекта можно наблюдать пятнистую структуру рассеянного излучения. Однородная в макроскопическом, но неоднородная в микроскопическом смысле структура рассеянного излучения представляет собой спеклы (от английского speckle — пятно) со случайными размерами и яркостями. В результате перемещения объекта, изменения его формы, протекания микроскопических процессов, локально изменяющих высоту рельефа поверхности или показатель преломления среды вблизи поверхности, спекл-картина будет меняться, т. е. будет наблюдаться динамика спеклов.

Пионерской работой в области динамики спеклов является статья [1], где были изучены флуктуации интенсивности излучения в свободном пространстве, вызванные перемещением диффузора с постоянной скоростью. В [2] дан обзор последующих работ в этой области. В фундаментальной работе [3] теоретически изучены особенности изменения и смещения спеклов в свободном пространстве и в плоскости изображения перемещающегося и деформируемого объекта. Закономерности динамики спеклов, вызванные движением газов и жидкостей, были обобщены в монографии [4].

---

\* julia\_mikhailova2104@mail.ru

Динамика спеклов изучалась в плоскости изображения семян, фруктов, кожи человека и других биологических объектов. Ранее в работах [5–8] для изучения процессов, протекающих в биологических объектах, были использованы методики, основанные на сравнении спекл-полей, зарегистрированных в начальный и текущий моменты времени. С многочисленными примерами использования динамики спеклов в биологии можно ознакомиться в монографии [9]. К сожалению, в большинстве этих работ отсутствуют модели, связывающие коэффициент корреляции спекл-полей с физическими параметрами, характеризующими процессы в клетках. Исключением являются две статьи [10, 11], где такие модели были предложены. В первой статье авторы путём создания теоретической модели попытались связать параметры динамики спеклов со смещениями центров рассеяния в ботанических объектах. Во второй работе была установлена связь между контрастом спеклов и скоростью перемещения центров рассеяния. На основе полученных данных была разработана методика, доведённая до практического применения в клиниках и позволяющая по контрасту спеклов определять скорость кровотока в сетчатке глаза или конечностях пациентов [11]. С модификациями этой методики можно ознакомиться, например, в работах [12, 13].

Актуальность разработки методик, позволяющих изучать протекающие в клетках процессы, обусловлена тем, что многие явления, связанные с функционированием клеток в норме и при различных внешних воздействиях, мало изучены [14]. Преимуществом оптических методов по сравнению с другими физическими методами является их бесконтактность, малоинвазивность и быстродействие. В литературе имеются публикации по использованию цифровой голографической интерферометрии [15, 16], томографии клеток [17] и интерференционной микроскопии [18] для изучения внутриклеточных процессов. Анализ этих статей показывает, что возможности указанных методов для решения подобных задач весьма ограничены. Сложность установления связи между динамикой оптических путей волн, проходящих через клетки, и динамикой интенсивности излучения заключается в том, что внутри клетки изменения фаз в пространстве и во времени случайны, а случайные изменения фаз волн в пространстве могут зависеть от времени, как и временные изменения фаз могут быть различны в разных областях пространства. Поэтому для установления вышеуказанной связи необходимы дисперсионные соотношения, характеризующие изменение фаз волн в пространстве и во времени. В работе [19] данная сложность была преодолена с помощью гипотезы о независимости фаз волн, изменяющихся в пространстве и во времени. Для модели фазового объекта, подробно рассмотренной в [19], были получены формулы, которые связывают параметры, характеризующие случайные изменения разности оптических путей пар волн, проходящих через клетки, с величинами, определяющими случайные изменения интенсивности излучения в плоскости изображения объекта. Регистрация динамики спеклов именно в плоскости изображения объекта позволяет изучать процессы в малых областях клетки с разрешением порядка линейного разрешения линзы.

В [20] на основе указанной теории была начата разработка методики и прибора, что позволило исследовать метаболическую активность культивируемых на подложке клеток методом регистрации динамики спеклов. Было обнаружено, что отклонение экспериментальных данных от теории в опыте с живыми клетками не превышает 11 % [21]; выявлен параметр, характеризующий активность клеток — среднеквадратическое отклонение (СКО)  $\sigma_u$  разности оптических путей пар волн, проходящих через клетки; обнаружена линейная связь между параметром  $\sigma_u$  и температурой, найдено различие этого параметра для клеток, инфицированных вирусом простого герпеса, и интактных клеток; показано, что коэффициент множественной корреляции массивов данных для трёх временных автокорреляционных функций  $\eta(t_1, t_2)$ , соответствующих развитию герпеса в трёх типах клеток, равен 0,94. Отметим, что погрешность метода ранее оценивалась в опыте по перемещению прозрачной шероховатой пластины: отклонение теоретических данных

от экспериментальных не превышало 2,5 % [22].

В работе [23] были оценены предельная чувствительность метода и погрешность определения величины  $\eta$ . Показано, что по последней можно определить параметр  $\sigma_u$  с величиной порядка 1 нм: относительная погрешность определения величины  $\eta$ , найденной по фрагменту изображения  $10 \times 10$  пикселей, в диапазоне от 0,3 до 0,99 не превышает 1 %, а малая погрешность определения  $\eta$  связана с особенностью распределения интенсивности излучения во фрагменте.

Вместе с тем, многие вопросы, связанные с особенностями динамики спеклов и с разработкой метода и прибора, остались нерешёнными. Величина  $\sigma_u$  определялась при малых оптических увеличениях на участках, содержащих несколько клеток, затем дополнительно усреднялась по сотням клеток. Температурные измерения были сделаны достаточно грубым прибором: не было ясно, при каких скоростях изменения температуры существует хорошая корреляция между  $\sigma_u$  и температурой. Не было также понятно, можно ли использовать данную методику при больших оптических увеличениях, а также для определения параметров, характеризующих несколько одновременно протекающих в клетках процессов. Кроме того, была изучена реакция клеток только на один тип вируса.

Целью данной работы является изучение закономерностей изменения обусловленных динамикой спеклов сигналов в пространстве и во времени в плоскости изображения монослоя культивированных клеток Л-41 КД/84 и RD при больших оптических увеличениях, различных скоростях изменения температуры, воздействиях другим типом вируса, а также после разморозки клеток.

## 1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлся монослой клеток культур Л-41 КД/84 (происхождение: человек, из лейкоцитов периферической крови больного моноцитарной лейкемией) и RD (происхождение: человек, злокачественная рабдосаркома таза) из Банка-музея клеточных культур ЕНИИ-ВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки на стеклянной подложке с размером  $7,1 \times 23,0$  мм культивировались по стандартной методике согласно паспортам соответствующих клеточных культур. Стеклянная подложка с толщиной 1,5 мм с монослоем клеток помещалась в вертикальном положении в прозрачную кювету с размером  $9 \times 25 \times 40$  мм (толщина внутренней полости 3 мм) со средой поддержания (питательной средой). Рядом с подложкой с клетками располагали пустую стеклянную подложку. Для предотвращения испарения питательной среды кювету закрывали стеклянной крышкой и герметизировали с помощью лабораторной пленки PARAFILM<sup>®</sup>M или нейтральной силиконовой смазки.

Для заражения клеток применялся адаптированный к клеткам RD клон 431-61 эховируса 11 серотипа (ECHO11). Выращенный на поверхности стекла плотный клеточный монослой троекратно отмывали от ростовой среды с помощью бессывороточной питательной среды 199 (ПанЭко). Далее монослой культуры клеток заражали 3 мл вирусосодержащей жидкости адаптированного клона, из расчёта множественности заражения 10 бляшкообразующих единиц на клетку. Затем подложку с клетками в вирусосодержащей жидкости инкубировали 60 мин при температуре 25 °С. После переноса стеклянной подложки с монослоем клеток в кювету добавляли туда 500 мкл вирусосодержащей жидкости.

Для записи спекловых картин в качестве источника света использовался полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны  $\lambda = 650$  нм или 532 нм и мощностью 20 мВт. Излучение от него через микрообъектив попадало на матовый рассеиватель, далее на кювету с объектом исследования. В опытах использовалась монохромная телекамера «Видеоскан-415/П/К-USB» с матрицей фотоприёмников с размером  $6,5 \times 4,8$  мм, содержащей  $780 \times 582$  ячеек с размером  $8,3 \times 8,3$  мкм. Частота ввода кадров составляла до 25 Гц, время экспонирования телекамеры 9 с. Оптическая

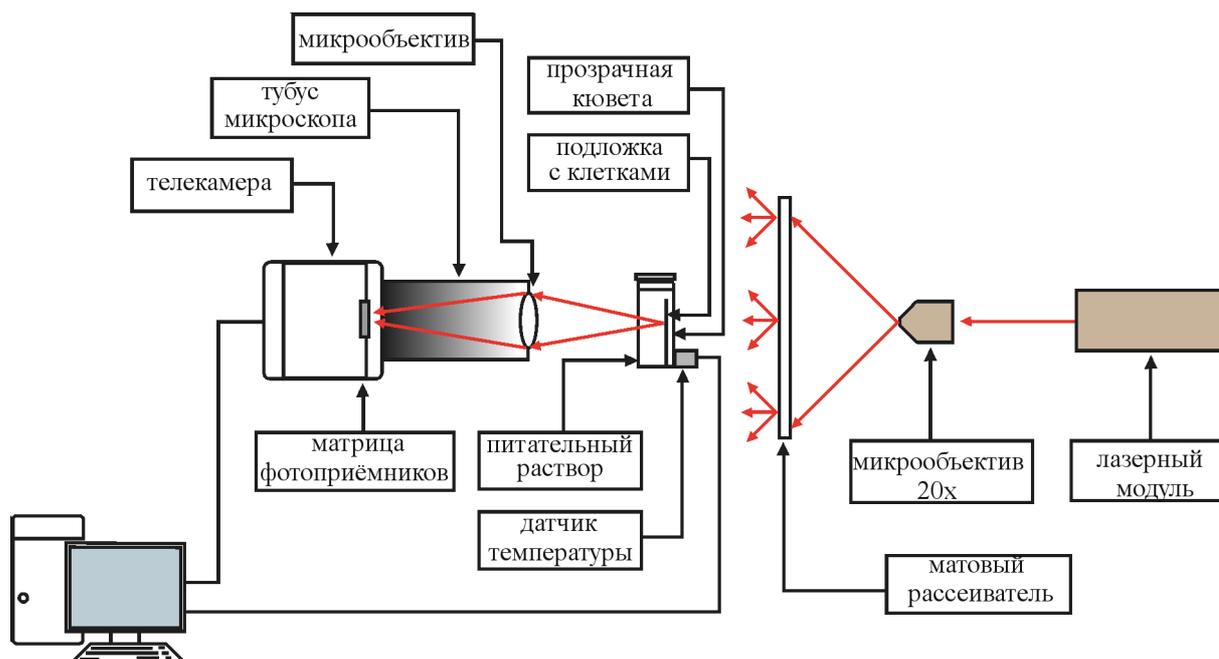


Рис. 1. Блок-схема установки для регистрации динамики спеклов

система установки находилась в термостате. Температура в нём с точностью  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  контролировалась с помощью термодатчика DS1820 (Dallas Semiconductor). Блок-схема установки приведена на рис. 1. Расстояние от микрообъектива с 20-кратным увеличением (20x) до матового рассеивателя составляло 180 мм, размеры матового рассеивателя  $80 \times 80 \times 40$  мм, расстояние от подложки с клетками до матового рассеивателя 60 мм, расстояние от подложки с клетками до объектива телекамеры 12,5 мм.

В исследованиях также использовались размороженные клетки Л-41 КД/84. Культуру, находящуюся при  $-196^\circ\text{C}$ , размораживали по стандартной методике, после чего суспензию размороженных шарообразных клеток шприцом вводили в кювету, где находилась стеклянная подложка. Под действием сил гравитации клетки опускались на стеклянную подложку и распластывались, прикрепляясь к её поверхности. Для визуализации динамики спеклов размороженных клеток использовался оптический материаловедческий микроскоп Axio 40 MAT с монохромной телекамерой «Видеоскан-415/П/К-USB». Вся установка была помещена в термокамеру, температура в которой поддерживалась с помощью жидкостного термостата. Оптическая система установки соответствовала схеме, приведённой на рис. 1, однако оптическая ось была ориентирована вертикально.

Запись кадров фильма динамики спеклов в формате BMP осуществляли с помощью программы Viewer, поставляемой вместе с телекамерой. Сигналы с телекамеры через USB-порт поступали на ноутбук. Запись кадров (картин спеклов) осуществлялась в течение времени до 24 часов. В определённые моменты (через временные интервалы от 30 до 60 минут, в зависимости от хода эксперимента) клетки наблюдали в белом свете для определения места их расположения.

Обработка спекловых изображений (спекл-картин в плоскости изображения изучаемого объекта) проводилась с использованием оригинального программного обеспечения. Исследуемым параметром являлся коэффициент корреляции  $\eta$  одного фрагмента цифрового спеклового изображения, зарегистрированного в начальный и текущий моменты времени:

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

где  $A_{i,j}$  — цифровое значение интенсивности на участке (матрице) с размером  $m \times n$  пикселей в начальный момент времени,  $B_{i,j}$  — цифровое значение интенсивности на этом же участке через время  $\tau$ ,  $i, j$  — номера пикселей участков в направлении осей  $x$  и  $y$  соответственно,  $\bar{A}$  — средняя величина цифрового значения интенсивности  $I$  на участке в начальный момент времени,  $\bar{B}$  — средняя величина цифрового значения интенсивности  $I$  на участке через время  $\tau$ .

Особенность использования формулы (1) заключается в том, что путём изменения диафрагмы линзы минимальный размер спеклов формируется примерно равным пикселу телекамеры. Тогда на изменение интенсивности излучения в ячейке телекамеры влияют волны, проходящие через расположенную в плоскости объекта область, размер которой  $a_s$  равен линейному разрешению линзы. Совокупность этих областей рассматривается как ансамбль статистически подобных объектов, а коэффициент корреляции по формуле (1), по существу, определяется усреднением по ансамблю объектов (по множеству реализаций). Изучаемые клетки имели размеры порядка 10 мкм (типичные размеры 10÷50 мкм), линейное разрешение линзы около 2 мкм. Если используется матрица с размером  $3 \times 3$ , то изучаются участки внутри клеток, если матрица имеет размеры  $10 \times 10$ , то усредняются данные по всей клетке, если используется матрица в  $200 \times 200$ , то анализируются явления, протекающие одновременно во многих клетках.

## 2. ТЕОРИЯ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ В ПЛОСКОСТИ ИЗОБРАЖЕНИЯ ТОНКИХ ПРОЗРАЧНЫХ ОБЪЕКТОВ

В работе [19] на модели прозрачного объекта, освещённого через тонкий прозрачный диффузор, были получены формулы для средней по времени интенсивности излучения  $\tilde{I}$  и нормированной временной автокорреляционной функции интенсивности излучения  $\eta = \eta(t)$  в произвольной точке  $\mathbf{q}$  плоскости наблюдения:

$$\tilde{I}(\mathbf{q}) = \tilde{I}_a + \tilde{I}_b \exp(-k^2 \sigma_u^2 / 2) \cos(k\mu + \alpha), \quad (2)$$

$$\eta(t_1, t_2) = \cos(\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle) \exp\left(-\frac{1}{2} k_{11} - \frac{1}{2} k_{22} + k_{12}\right), \quad (3)$$

где  $\mu$  — средняя по области с диаметром  $a_s$  и по времени разность оптических путей  $\Delta u_\kappa$  пар волн, проходящих через объект,  $\kappa$  — номер пары,  $\sigma_u^2$  — дисперсия  $\Delta u_\kappa$ ,  $x = k\mu$ ,  $k$  — волновое число,  $\tilde{I}_a$ ,  $\tilde{I}_b$ ,  $\alpha$  — константы, угловые скобки означают усреднение по ансамблю статистически подобных объектов,  $x_1, x_2$  — значения  $x$  в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно;  $k_{11}, k_{22}$  — дисперсии величины  $x$  в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно;  $k_{12}$  — временная автокорреляционная функция величины  $x$ . Отметим, что через область с диаметром  $a_s$  проходит множество волн, имеющих разные оптические пути (фазы); следовательно, имеется большое число пар волн со случайными значениями разностей фаз (оптических путей). Значение величины  $\mu$  формируется путём усреднения по множеству указанных пар волн, а также усреднением по времени.

Если процесс изменения фаз волн является стационарным случайным процессом ( $k_{11} = k_{22}$ ,  $x_1 = x_2$ ), а время  $\tau$  превышает время корреляции величины  $x$ , то в формуле (3) косинус равен единице,  $k_{12} = 0$ , величина  $\eta = \exp(-k_{22}) = \exp[-(2\pi/\lambda)^2 (\sigma_u)^2]$ . Таким образом, автокорреляционная функция выходит на постоянный уровень  $\eta^*$ , по которому можно найти СКО  $\sigma_u$  разности

оптических путей пар волн  $\Delta u_k$ :

$$\sigma_u = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{-\ln \eta^*}. \quad (4)$$

Именно величина  $\sigma_u$  используется в качестве параметра, характеризующего активность группы клеток или малого участка в пределах клетки.

На рис. 2 для иллюстрации приведены построенные по результатам [19] типичные зависимости величины  $\eta$  от времени для разных объектов: для участка без клеток (питательной среды), участка с клетками и для участка клеток, заражённых вирусом простого герпеса первого типа, ВПГ-1. В предположении, что случайные значения  $\Delta u_k$  в питательной среде, в клетках без вируса и в клетках с вирусом некоррелированы, по трём графикам можно найти три значения  $\sigma_u$ : для питательного раствора, для клеток без вируса и для клеток с вирусом.

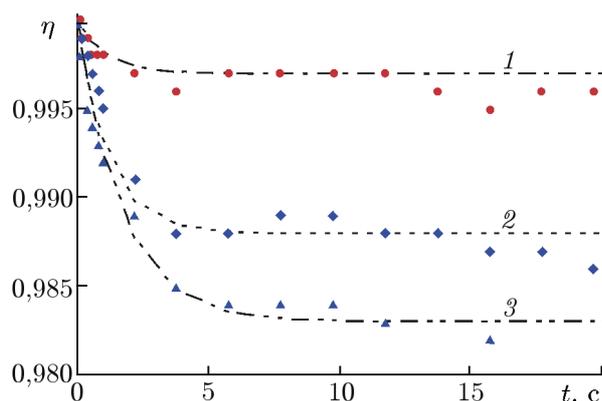


Рис. 2. Типичные зависимости коэффициента корреляции  $\eta$  от времени  $t$  для питательной среды (1), клеток (2) и клеток с вирусом (3)

### 3. ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Динамика спеклов регистрировалась при изменении температуры от  $26^\circ\text{C}$  до  $37^\circ\text{C}$  со скоростью  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  и  $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Эксперименты проводились на клетках линии Л-41 КД/84, культивированных на стеклянной подложке, при больших оптических увеличениях с пространственным разрешением 2 мкм. Блок-схема установки соответствовала рис. 1.

При скорости изменения температуры порядка  $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$  для питательного раствора и для клеток в растворе регистрировались случайные изменения величины  $\eta$  от времени. Наблюдались также пересечения зависимостей  $\eta(t)$  для питательного раствора и клеток в нём, что указывало на наличие корреляции между происходящими в них процессами. С физической точки зрения это означало, что физико-химические процессы в клетках не успевают прийти в равновесный режим: время адаптации клеток к изменению температуры больше времени характерного изменения температуры. Такие особенности изменения коэффициента корреляции  $\eta$  наблюдались как на малых выбранных участках внутри изображения отдельной клетки, так и при усреднении по фрагменту, содержащему большое число клеток. Отсутствие выхода величины  $\eta$  на постоянный уровень при скоростях изменения температуры  $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$  указывает на то, что изменение средней по времени интенсивности излучения  $\bar{I}$ , а также изменение разности фаз во времени являются неоднородными в пространстве и нестационарными во времени процессами.

При скорости изменения температуры  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  во временном интервале до 2 мин зависимости коэффициента корреляции от времени  $\eta(t)$  имели такой же вид, что и на графике на рис. 2. По значениям СКО разности оптических путей пар волн  $\sigma_u$  в клетках были построены совмещённые графики зависимости  $\sigma_u$  и температуры  $T$  от времени для массива из 60 клеток (рис. 3). Имеется хорошая корреляция (коэффициент корреляции равен 0,88) между массивами  $\sigma_u$  и  $T$ , что указывает на стабилизацию внутриклеточных процессов. Можно сделать вывод, что клетки успевают адаптироваться к изменению температуры.

При скоростях изменения температуры  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  была определена доля участков клеток, имеющих различную активность (рис. 4). Для этого запись динамики спеклов была разделена

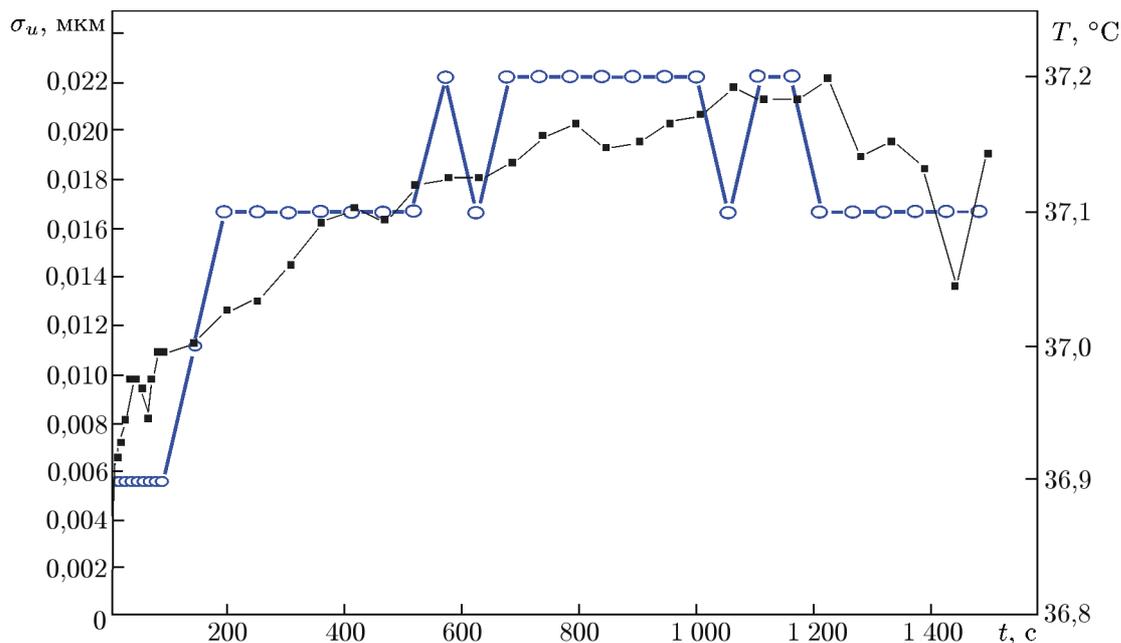


Рис. 3. Зависимости вариации оптических путей (■) и температуры (○) от времени при изменении температуры в пределах одного градуса

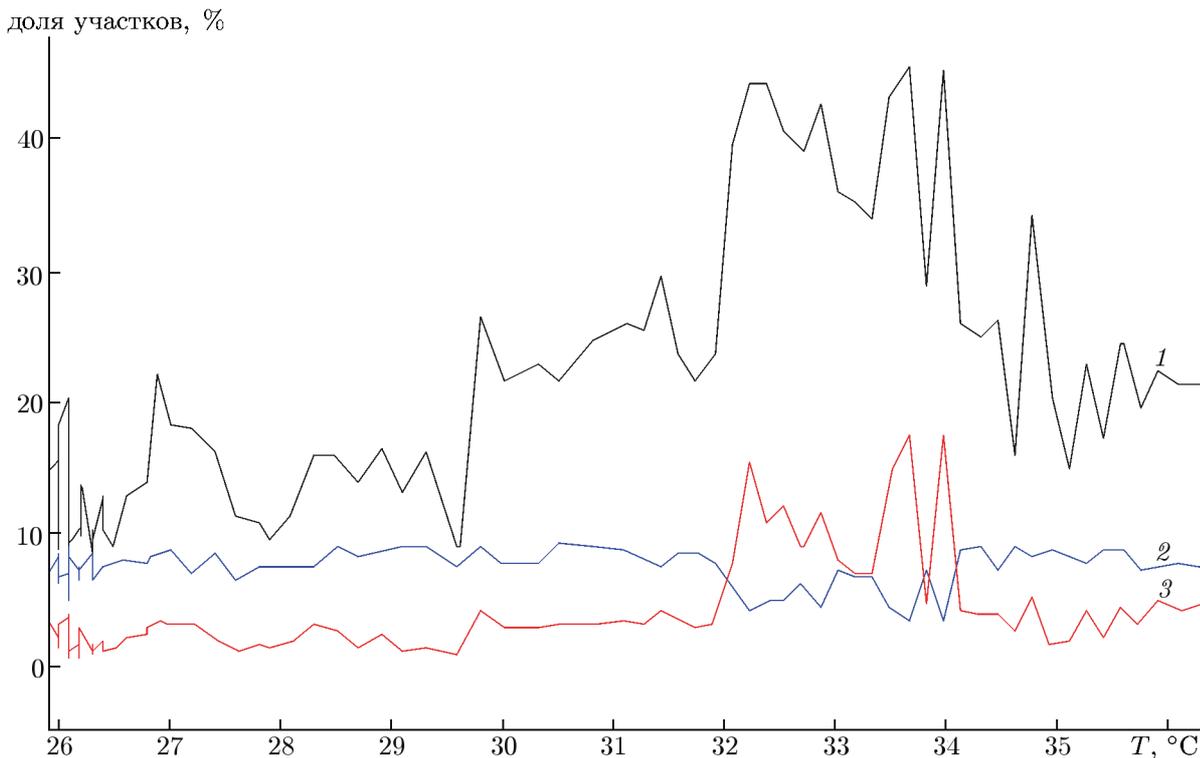


Рис. 4. Изменение относительной доли участков с размером  $10 \times 10$  пикселей с 26 до 36 °C: для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,971 до 0,981 (чёрный цвет, кривая 1); для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,985 до 0,986 (синий цвет, кривая 2); для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,961 до 0,971 (красный цвет, кривая 3)

на временные отрезки с длительностью  $45 \div 56$  с. Для области, содержащей около 300 изображений клеток, на каждом временном отрезке находили распределение коэффициента корреляции. Значения  $\eta$  определяли на фрагментах в  $10 \times 10$  пикселей, примерно равных размеру изображения клетки. Далее определяли относительные доли указанных участков, величина коэффициента корреляции для которых при усреднении по области  $10 \times 10$  пикселей попадает в следующие диапазоны: от 0,9611 до 0,9710 (область наиболее активных клеток), от 0,9711 до 0,9810 и от 0,9851 до 0,9860 (область наименее активных клеток).

Из рис. 4 видно, что доля участков с наиболее активными клетками, т. е. с величиной коэффициента корреляции в диапазоне от 0,9611 до 0,9810 (кривые 1 и 3), составляет 60 %.

На основе проведённого исследования можно сделать следующие выводы.

1) При изменении температуры от 26 до 37 °C со скоростью примерно 0,2 °C/мин флуктуации средней по времени интенсивности излучения  $\tilde{I}$  являются неоднородным в пространстве и нестационарным по времени процессом. Зависимости коэффициента корреляции фрагментов спекловых изображений от времени  $\eta(t)$  также характеризуются значительными флуктуациями в пространстве и во времени.

2) При уменьшении скорости изменения температуры до 0,01 °C/мин на временных отрезках около 2 мин зависимости  $\eta(t)$  характеризуются выходом на постоянный уровень, что, согласно теории, указывает на однородность и стационарность процесса изменения разности фаз зондирующих волн и интенсивности излучения  $\tilde{I}$ . С использованием значений  $\sigma_u$ , зарегистрированных при разных температурах, найдена хорошая корреляция между массивами  $\sigma_u$  и  $T$  (коэффициент корреляции 0,88).

3) По распределению величины  $\eta$  при разных  $T$  (в диапазоне от 26 до 36 °C) изучено распределение активности клеток: показано, что 60 % клеток наиболее активны в температурном диапазоне от 32 до 34 °C. Это позволяет предлагать именно данный диапазон температур для исследования процессов в живых клетках. Для выяснения причины максимума активности клеток в данном диапазоне изменения температуры нужны дальнейшие исследования.

#### 4. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ В ПЛОСКОСТИ ИЗОБРАЖЕНИЯ РАЗМОРОЖЕННЫХ КЛЕТОК

Были изучены особенности динамики спеклов в плоскости изображения размороженных клеток Л-41 КД/84 при большом оптическом увеличении (в 320 раз). Оптическая схема установки соответствовала рис. 1 с вертикальным ориентированием оптической оси и использованием в качестве источника излучения лазерного модуля с длиной волны  $\lambda = 532$  нм.

На рис. 5а приведена типичная картина спеклов размороженных клеток (время усреднения составляло 9 с): как правило, центры клеток более светлые, на периферии клетка выглядит более тёмной. Это согласуется с формулой (2) для средней по времени интенсивности  $\tilde{I}$ : в согласии с ней, более тёмные участки соответствуют относительно большим значениям дисперсии разности оптических путей  $\Delta u$ . Можно предположить, что увеличение указанной дисперсии связано с контактами клеток с расположенными рядом соседними клетками.

Визуальное наблюдение фильма, составленного из кадров — картин спеклов, показало, что клетки находятся в непрерывном хаотическом движении, причём величина их смещения меньше их характерного размера. На рис. 5б приведена типичная экспериментальная зависимость  $\eta(t)$ , найденная по формуле (1) для малого участка клетки.

Аналогичные зависимости регистрировались и для фрагмента спеклового изображения, содержащего 132 клетки. На рис. 6 приведены совмещённые автокорреляционные функции, построенные для указанного фрагмента спеклового изображения по данным, зарегистрированным

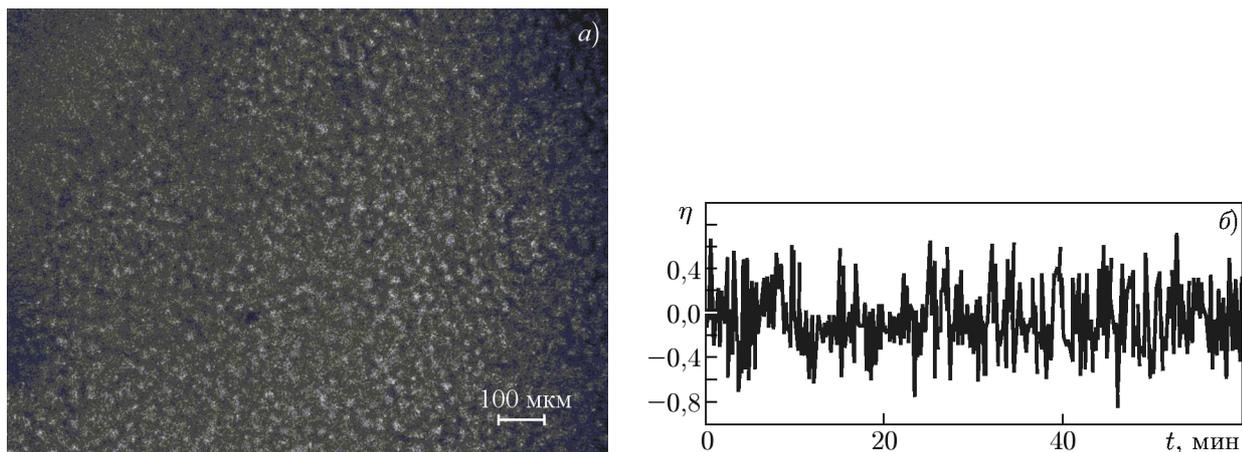


Рис. 5. Типичное спекловое изображение размороженных клеток с размером  $780 \times 582$  пиксела (а) и типичная автокорреляционная функция участка  $3 \times 3$  пиксела в пределах изображения одной клетки (б)

в течение 53 мин. Временные промежутки между начальными точками трёх зависимостей на этом графике равнялись 3 ч. Обнаружено, что автокорреляционные функции  $\eta(t)$ , зарегистрированные в разные моменты времени, близки: коэффициент множественной корреляции для 3 массивов данных равнялся 0,93. Примерно такое же совпадение было найдено и для автокорреляционных функций, зарегистрированных в течение часа на разных участках кадра. Авторами был сделан вывод о том, что процессы флуктуации интенсивности  $\tilde{I}$  в плоскости изображения размороженных клеток, зарегистрированные в течение 1 ч, являются однородными в пространстве и стационарными во времени.

Наличие хаотического движения клеток, их контактов друг с другом, протекание внутриклеточных процессов, а также флуктуаций плотности в питательном растворе позволили нам выдвинуть гипотезу, что показанная на рис. 6 автокорреляционная функция формировалась под действием четырёх независимых факторов.

Ранее в работе [24] была изучена динамика спеклов, обусловленная течением двух процессов, изменяющих фазы зондирующих волн: малые поступательные перемещения объекта и структурные изменения, вызванные многоцикловой усталостью объекта. По аналогии с указанной работой мы предположили, что случайное значение разности оптических путей  $\Delta u$  пар волн, проходящих через объект, является суммой не двух, а четырёх независимых случайных величин. Предполагаем, что в разные моменты времени значения  $\Delta u$  для различных пар волн являются некоррелированными. Однако если мы рассмотрим отдельно одно слагаемое из четырёх, то предположим, что имеется корреляция этой величины в разные моменты времени. Тогда, проведя такие же преобразования, как и в работе [24], для нормированной временной автокорреляционной функции величины  $\tilde{I}$  получаем формулу

$$\eta(t_1, t_2) = \exp \left\{ -k^2 \left[ \sum_{j=1}^4 \frac{1}{2} (k_{1j} + k_{2j}) - k_{1j} \rho_j(t_1, t_2) \right] \right\} \cos \left( \sum_{j=1}^4 \langle x_{1j} \rangle - \langle x_{2j} \rangle \right), \quad (5)$$

где  $k = 2\pi/\lambda$ ,  $j = 1, 2, 3, 4$  — номера случайных независимых величин, нижние индексы 1 и 2 отвечают моментам времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно, угловые скобки означают усреднение по ансамблю объектов,  $x_{1j} = (2\pi/\lambda) \Delta u_{1j}$ ,  $x_{2j} = (2\pi/\lambda) \Delta u_{2j}$  — разности фаз пар волн, зондирующих область с диаметром  $a_s$  в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно,  $\Delta u_j$  —  $j$ -е слагаемое величины  $\Delta u$ ,  $k_{1j}$  и  $k_{2j}$  — дисперсии величин  $x_{1j}$  и  $x_{2j}$  соответственно,  $\rho_j(t_1, t_2)$  — нормированная временная

автокорреляционная функция величины  $\Delta u_j$ . Значения  $x_{1j}$  и  $x_{2j}$  дополнительно усредняются по времени, равному времени экспонирования используемого фотоприёмника.

Как видно из рис. 6, величина  $\eta$  принимает только положительные значения. Отсутствие отрицательных значений  $\eta$  при усреднении по большому числу клеток (объектов) является следствием равенства нулю средних значений  $x_{1j}$  и  $x_{2j}$ : при хаотичном движении клеток, в фиксированный момент времени соответствующее значение  $\Delta u_j$  принимает случайное значение, которое может быть как положительным, так и отрицательным. Также, близость полученных с разницей во времени зависимостей указывает на стационарность изучаемых случайных процессов. В предположении, что все рассматриваемые нами процессы стационарны ( $\langle x_{1j} \rangle = \langle x_{2j} \rangle$ ,  $k_{1j} = k_{2j}$ ), вместо формулы (5) имеем

$$\eta(\tau) = \prod_{j=1}^4 \eta_j(\tau) = \prod_{j=1}^4 \exp\{-k^2[k_{1j} - k_{1j} \exp(-\tau/\tau_{0j})]\}, \quad (6)$$

где нормированная автокорреляционная функция  $\rho_j(\tau)$  величин  $\Delta u_j$  взята в виде функции Лоренца,  $\tau_{0j}$  — время корреляции величины  $\Delta u_j$ ,  $\tau = t_2 - t_1$ .

Как было сказано выше, согласно предположению авторов, на изменение величины  $\Delta u$ , а следовательно, на формирование автокорреляционной функции (рис. 6), влияют четыре фактора (процесса): 1) процессы в питательном растворе; 2) внутриклеточные процессы; 3) контакты клеток друг с другом и 4) хаотическое движение клеток с изменением их формы. Типичные значения  $k_{1j}$  и  $\tau_{0j}$  для первых двух процессов известны из ранних работ авторов [21, 25]: для процессов в питательном растворе  $k_{1j} = 0,05$ ,  $\tau_{0j} = 0,16$  мин; для процессов в клетках — 0,08 и 0,8 мин соответственно. В указанных работах также показано, что нормированные автокорреляционные функции  $\rho(\tau)$  для питательного раствора и клеток являются функциям Лоренца. В данной работе авторы предположили, что все четыре функции  $\rho(\tau)$  являются функциями Лоренца. Также мы считали, что для процессов контакта клеток друг с другом и хаотического движения клеток с изменением их формы дисперсии  $k_{11j}$  на порядок больше и равны 0,6. Типичные значения  $\tau_{0j}$  для этих процессов были взяты равными 5 и 20 мин. Они соответствовали крупномасштабным временным изменениям в зависимости  $\tilde{I} = \tilde{I}(t)$  (см. рис. 7а).

Для того, чтобы по формуле (6) максимально приблизить теоретическую зависимость к экспериментальной, указанные первоначальные значения  $k_{1j}$  и  $\tau_{0j}$  нами были изменены: для подбора четырёх пар значений  $k_{1j}$  и  $\tau_{0j}$  (для 4 процессов) последовательно фиксировали значения семи параметров, а значение оставшегося параметра изменялось. Условием выбора значения оставшегося параметра являлось достижение в модели линейной регрессии максимального значения коэффициента корреляции теоретических и экспериментальных данных. На рис. 7б теоретическая зависимость показана штриховой линией, окончательное значение указанного коэффициента корреляции равнялось 0,99. Значения СКО  $\sigma_j = [\lambda/(2\pi)] \sqrt{k_{1j}}$  и времён корреляции  $\tau_{0j}$  величин  $\Delta u_j$ , подставленные в формулу (6), были следующими:  $\sigma_1 = 23$  нм и  $\tau_{01} = 0,45$  мин,  $\sigma_2 = 49$  нм

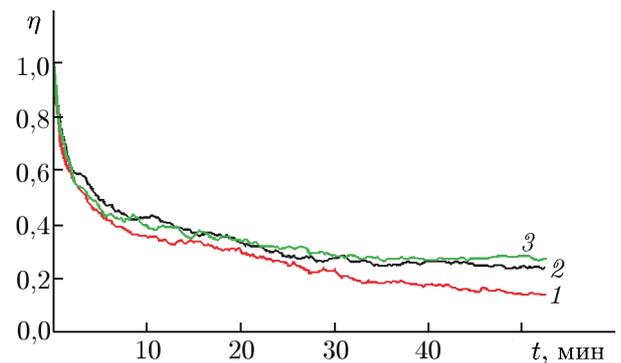


Рис. 6. Зависимости  $\eta(t)$  для фрагментов, содержащих изображение 132 клеток Л-41 КД/84, для разных временных интервалов. Продолжительность интервалов составляла 53 мин, промежутки между их начальными точками 3 ч (номер кривой соответствует порядковому номеру интервала). Размер области усреднения  $250 \times 250$  пикселей

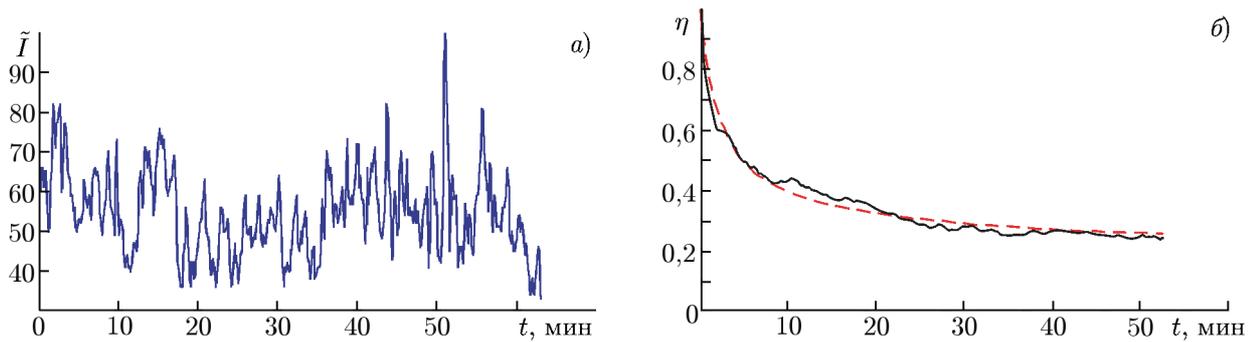


Рис. 7. Результаты для клеток Л-41 КД/84: типичная зависимость  $\tilde{I}(t)$  (а); теоретическая (штриховая линия) и экспериментальная (сплошная линия) зависимости  $\eta(t)$ , область усреднения  $250 \times 250$  пикселей (б)

и  $\tau_{02} = 2,25$  мин,  $\sigma_3 = 68$  нм и  $\tau_{03} = 3,75$  мин,  $\sigma_4 = 89$  нм и  $\tau_{04} = 22,5$  мин. Как было указано выше, все значения  $\langle \Delta u_{1j} \rangle$ ,  $j = 1, 2, 3, 4$ , равны нулю.

Близость результатов теории и эксперимента (рис. 7б) указывает на корректность использованной нами модели, в которой учитывается влияние нескольких факторов, изменяющих оптические пути зондирующих клетки волн. Определение на основе этой модели величины  $\sigma_2$ , соответствующей процессам, протекающим в клетках на структурном уровне, может иметь важное практическое значение. Продемонстрированная нами возможность выделения и определения величины  $\sigma_2$  на размороженных клетках позволяет в ряде экспериментов заменить объект в виде монослоя клеток, подготовка которого достаточно трудоёмкая, на размороженные клетки. Такая замена может существенно повысить эффективность указанных исследований.

На основе анализа данных, полученных при изучении динамики спеклов в плоскости изображения размороженных клеток, зарегистрированных при больших оптических увеличениях, можно сделать следующие выводы.

Зависимость интенсивности от времени,  $\tilde{I}(t)$ , характеризуется наличием нескольких временных неоднородностей, которые указывают на существование протекающих с разной скоростью процессов, влияющих на изменение разности фаз зондирующих волн. Зависимость  $\eta(t)$ , зарегистрированная на фрагменте  $3 \times 3$  пиксела внутри изображения клетки, характеризуется случайным изменением величины  $\eta$  в пределах от  $-1$  до  $+1$  со средним значением, равным нулю.

Полученная при усреднении данных по 132 клеткам автокорреляционная функция  $\eta(t)$  в течение часа спадает от единицы до некоторого постоянного уровня, равного примерно 0,2.

Автокорреляционные функции, полученные на разных участках кадра, и через промежутки времени, равные 3 ч, близки. Данный результат позволяет утверждать, что динамика спеклов в области, охватывающей большое число клеток, является однородным в пространстве и стационарным во времени случайным процессом.

Получена формула, учитывающая влияние четырёх независимых факторов, изменяющих разность оптических путей зондирующих волн. С её использованием достигнуто практическое совпадение теоретической и экспериментальной зависимости  $\eta(t)$ . На основе данного совпадения удалось оценить СКО  $\sigma$  и времена корреляции  $\tau_0$  четырёх независимых вкладов (процессов) в суммарное среднее значение разности оптических путей пар волн, проходящих через клетки.

## 5. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК, ЗАРАЖЁННЫХ ВИРУСОМ

Эксперименты проводились на установке, блок-схема которой представлена на рис. 1. В качестве источника излучения использовался лазерный модуль с длиной волны излучения  $\lambda = 650$  нм. При большом оптическом увеличении (в 250 раз) исследовались клетки культуры RD — интактные и зараженные вирусом ЕСНО11 [26].

Как видно из рис. 8, зависимость коэффициента корреляции  $\eta$  от времени для клеток RD с вирусом отличается от этой зависимости для клеток без вируса и для питательной среды. Периодичность изменения  $\eta$  обусловлена колебаниями температуры в пределах  $0,4^\circ\text{C}$  в термостате, где находилась экспериментальная установка.

В предположении, что величины  $\langle x_1 \rangle$ ,  $\langle x_2 \rangle$  в формуле (3) равны нулю, было найдено значение СКО разности оптических путей пар волн  $\sigma_u$  для клеток RD, заражённых вирусом ЕСНО11: оно составило 63 нм, что в 4 раза больше соответствующего значения для клеток, заражённых вирусом простого герпеса первого типа [27]. Полученные результаты согласуются с данными вирусологов об активности этих вирусов.

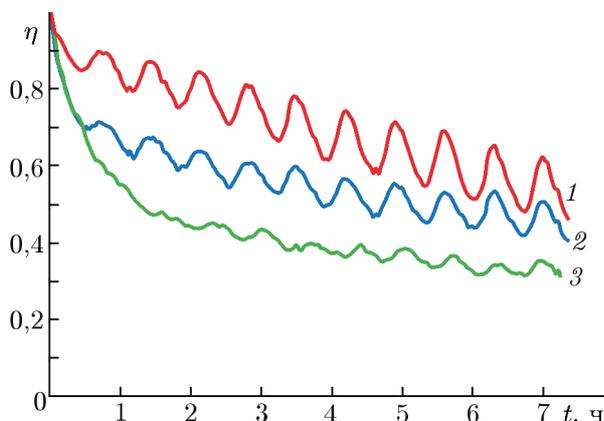


Рис. 8. Зависимость коэффициента корреляции спекловых изображений для питательной среды (кривая 1), интактных клеток RD (кривая 2) и клеток RD, заражённых вирусом ЕСНО11 (кривая 3). Размер области усреднения  $200 \times 200$  пикселей

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведённых исследований можно сделать следующие выводы.

1. При изменении температуры монослоя клеток со скоростью  $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$  динамика спеклов в плоскости его изображения является неоднородным в пространстве и нестационарным во времени случайным процессом. При уменьшении скорости изменения температуры до  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  клетки успевают приспособляться к изменениям температуры и, как следствие, динамику спеклов в плоскости их изображения можно рассматривать как однородный в пространстве и стационарный во времени процесс. При скорости  $0,01^\circ\text{C}/\text{мин}$  наблюдается хорошая корреляция между массивами среднеквадратического отклонения разности оптических путей  $\sigma_u$  пар волн, проходящих через объект, и температурой (коэффициент корреляции равен 0,88). На основе анализа изменений спекловых изображений клеток показано, что большая часть культивируемых клеток наиболее активна в диапазоне температур  $32 \div 34^\circ\text{C}$ , что позволяет предлагать именно данный диапазон для исследования процессов в живых клетках.

2. Исследования динамики спеклов в плоскости изображения большого числа размороженных клеток показали наличие нескольких случайных процессов, стационарных во времени и однородных в пространстве. В предположении о четырёх процессах, независимо влияющих на фазы зондирующих волн, получено практическое совпадение экспериментальной и теоретической временных автокорреляционных функций интенсивности излучения. На основе указанного совпадения впервые получены значения 12 параметров, характеризующих четыре процесса, влияющих на изменение оптических путей зондирующих волн.

3. На монослое культивируемых клеток, заражённых вирусом ЕСНО11, впервые получено

значение  $\sigma_u = 63$  нм, в 4 раза превышающее соответствующее значение для клеток, заражённых вирусом герпеса 1 типа [27].

Авторы полагают, что, в целом, проведённое исследование является важным шагом в создании физических моделей живых клеток в норме и при воздействии инфекций, токсичных веществ и лекарств, а также послужит основой для дальнейших исследований и разработок экспресс-методик по выявлению инфицированных клеток и оперативного подбора лекарств для конкретного пациента.

Авторы выражают благодарность сотруднику ИМАШ УрО РАН Друкаренко Н. А. за помощь в модернизации экспериментальной установки, сотрудникам лаборатории клеточных культур и лаборатории энтеральных вирусных инфекций ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Шмелёвой Н. А., Усольцевой П. С. и Резайкину А. В. за подготовку объекта исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anisimov V. I., Kozel S. M., Lokshin G. R. // *Opt. Spectroscopy*. 1969. V. 27, No. 3. P. 483–491.
2. Yoshimura T. // *J. Opt. Soc. Amer. A*. 1986. V. 3, No. 7. P. 1032–1054. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.3.001032>
3. Yamaguchi I. // *Opt. Acta: Int. J. Opt.* 1981. V. 28, No. 10. P. 1359–1376. <https://doi.org/10.1080/713820454>
4. Fomin N. A. *Speckle photography for fluid mechanics measurements*. Berlin : Springer Verlag, 1998. 244 p.
5. Maksymenko O. P., Muravsky L. I., Berezyuk M. I. // *J. Biomed. Opt.* 2015. V. 20, No. 9. Art. no. 095006. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.9.095006>
6. Vincitorio F. M., Mulone C., Marcuzzi P. A., et al. // *Proc. SPIE*. 2015. V. 9660. Art. no. 96601Q. <https://doi.org/10.1117/12.2196257>
7. Zdunek A., Muravsky L. I., Frankevych L., Konstankiewicz K. // *Int. Agrophys.* 2007. V. 21, No. 3. P. 305–310.
8. Carvalho P. H., Barreto J. B., Braga Jr. R. A., Rabelo G. F. // *Biosystems Engineering*. 2009. V. 102, No. 1. P. 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.09.025>
9. *Dynamic Laser Speckle and Applications* / ed. by H. J. Rabal, R. A. Braga. Boca Raton : CRC Press, 2008. 282 p.
10. Oulamara A., Tribillon G., Duvernoy J. // *J. Modern Opt.* V. 36, No. 2. P. 165–179. <https://doi.org/10.1080/09500348914550221>
11. Briers J. D. // *Opt. Applicata*. 2007. V. 37, No. 1–2. P. 139–152.
12. Zakharov P., Völkler A. C., Wyss M., et al. // *Opt. Express*. 2009. V. 17, No. 16. P. 13904–13917. <https://doi.org/10.1364/OE.17.013904>
13. Ansari M. Z., Humeau-Heurtier A., Offenhauser N., et al. // *Microvascular Res.* 2016. V. 107. P. 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.003>
14. Мухина И. В. // XXXI Международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике. 30 сентября–4 октября 2019 г., Екатеринбург. С. 22–23.
15. Cao R., Xiao W., Wu X., et al. // *Biomed. Opt. Express*. 2018. V. 9, No. 1. P. 72–85. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.000072>

16. Belashov A. V., Zhikhoreva A. A., Belyaeva T. N., et al. // J. Opt. Soc. Amer. A. 2020. V. 37, No. 2. P. 346–352. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.382135>
17. Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K., et al. // Nat. Methods. 2007. V. 4, No. 9. P. 717–719. <https://doi.org/10.1038/nmeth1078>
18. Fu R., Su Y., Wang R., Lin X., et al. // Biomed. Opt. Express. 2019. V. 10, No. 6. P. 2757–2767. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.002757>
19. Владимиров А. П. // Изв. вузов. Радиофизика. 2014. Т. 57, № 8–9. С. 632–645.
20. Малыгин А. С. Оценка метаболизма интактных и зараженных вирусом клеток методом динамической спекл-интерферометрии : дис. канд. техн. наук. Томск, 2015. 145 с.
21. Малыгин А. С., Бебенина Н. В., Владимиров А. П. и др. // Приборы и техника эксперимента. 2012. № 3. С. 124–127.
22. Vladimirov A. P., Druzhinin A. V., Malygin A. S., Mikitas K. N. // Proc. SPIE. 2012. V. 8337. Art. no. 8337OC. <https://doi.org/10.1117/12.924800>
23. Vladimirov A. P. // Opt. Eng. 2016. V. 55, No. 12. Art. no. 121727. <https://doi.org/10.1117/1.OE.55.12.121727>
24. Vladimirov A. P. // AIP Conf. Proc. 2016. V. 1740. Art. no. 040004. <https://doi.org/10.1063/1.4952663>
25. Михайлова Ю. А., Владимиров А. П., Бахарев А. А. и др. // Российский журнал биомеханики. 2017. Т. 21, № 1. С. 64–73. <https://doi.org/10.15593/RZhBiomeh/2017.1.06>
26. Vladimirov A. P., Mikhailova Y. A., Drukarenko N. A. // Proc. SPIE. 2018. V. 10834. Art. no. 1083427. <https://doi.org/10.1117/12.2319729>
27. Vladimirov A. P., Malygin A. S., Mikhailova Y. A., et al. // Biomed. Eng. 2014. V. 48, No. 4. P. 178–181. <https://doi.org/10.1007/s10527-014-9447-9>

Поступила в редакцию 12 мая 2020 г.; принята в печать 31 августа 2020 г.

## SPECKLE DYNAMICS IN THE IMAGE PLANE OF THE MONOLAYER OF CULTIVATED CELLS

*Yu. A. Mikhaylenko, A. P. Vladimirov, and A. A. Bakharev*

In this work, we study the L-41, KD/84, and RD cells, cultivated as a monolayer on a glass substrate. This work is aimed at studying the laws of variation in the speckle-dynamics signals in space and time in the imaging plane of the monolayer of cells for high optical magnifications, various rates of the environmental-temperature variations, exposure to another virus type, and after the cell defrosting. It is shown that at a temperature-variation rate of  $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a good correlation is observed between the arrays of the standard deviation  $\sigma_u$  of the optical-path difference  $\sigma_u$  of the wave pairs passing through the object and the temperature (the correlation coefficient is 0.88). It is noted that the major part of the cultured cells is the most active in the temperature range  $32\text{--}34\text{ }^{\circ}\text{C}$ , which allows us to propose this particular range for studying the processes in living cells. The value of  $\sigma_u$ , which four times exceeds the corresponding value for the cells infected by the herpes virus, was obtained for the first time on the monolayer of the cultured RD cells infected by the ECHO11 virus, which agrees with the virology data for the above-mentioned viruses. Assuming that the processes occurring in the nutrient solution and inside the cells, the cell contacts, and the chaotic movement of the cells independently change the phases of the sounding waves, an excellent matching (the correlation coefficient is 0.99) of the experimental and theoretical time autocorrelation functions of radiation intensity was obtained during the experiments with defrosted cells. It is concluded that the method used by the authors is promising for studying normal cell functioning and when exposed to infections, toxic substances, and drugs.

*Ю. А. Михайленко, А. П. Владимиров, А. А. Бахарев*