



DOI: 10.15593/RZhBiomech/2017.1.06

УДК 535.41+576/57.085

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ СПЕКЛ-ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

Ю.А. Михайлова<sup>1,2</sup>, А.П. Владимиров<sup>1,3</sup>, А.А. Бахарев<sup>2</sup>,  
А.Г. Сергеев<sup>4</sup>, И.А. Новоселова<sup>1</sup>, Д.И. Якин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра физических методов и приборов контроля качества физико-технологического института Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Россия, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19, e-mail: var52@bk.ru

<sup>2</sup> Лаборатория клеточных культур Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Роспотребнадзора, 620030, ул. Летняя, 23, e-mail: mikhailova\_yuliya2104@mail.ru

<sup>3</sup> Лаборатория респираторных вирусных инфекций ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, ул. Летняя, 23, e-mail: var52@bk.ru

<sup>4</sup> Отдел индикации и диагностики вирусных инфекций ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, ул. Летняя, 23, e-mail: aldr31250@ya.ru

**Аннотация.** В настоящее время биоспеклы успешно применяются для изучения процессов, происходящих на поверхности и внутри различных биологических объектов: фруктов, овощей, зерен, кожи и сетчатки глаза пациента. Ранее были разработаны методика и установка для определения метаболической активности клеточных культур Vero, Л-41 и ЛЭЧ методом динамической спекл-интерферометрии. Параметрами, характеризующими активность клеток, являлись усредненное по времени цифровое значение интенсивности излучения  $\tilde{I}$  в пикселе телекамеры и коэффициент корреляции двух спекловых изображений  $\eta$ . Получены хорошо воспроизводимые результаты при исследовании клеточных культур, зараженных вирусом простого герпеса первого типа. В данной статье рассмотрена оптическая методика, позволяющая по коэффициенту корреляции фрагмента спекловых изображений определять среднеквадратическое отклонение разности оптических путей волн  $\sigma_u$  в малой области отдельной клетки либо в группе клеток. Объектом исследования являлась клеточная культура Л-41 в виде монослоя клеток на стеклянной подложке, помещенной в кювету с питательной средой. Кювету освещали излучением от лазерного модуля через матовый рассеиватель, спекловое изображение клеток формировали с оптическим увеличением, равным 11. Величину  $\sigma_u$  использовали в качестве параметра, характеризующего активность физико-химических процессов в клетках. Показано, что в процессе увеличения температуры  $T$  от 26 до 37 °С в течение часа имеют место значительные флуктуации величины  $\sigma_u$  в пространстве и во времени. При стабилизации температуры в течение 30 минут флуктуации практически прекращаются, а при изменении температуры на десятые доли градусов наблюдается хорошая корреляция между  $\sigma_u$  и  $T$ .

© Михайлова Ю.А., Владимиров А.П., Бахарев А.А., Сергеев А.Г., Новоселова И.А., Якин Д.И., 2017

Михайлова Юлия Александровна, аспирант кафедры физических методов и приборов контроля качества, м.н.с. лаборатории клеточных культур, Екатеринбург

Владимиров Александр Петрович, д.т.н., профессор кафедры физических методов и приборов контроля качества, с.н.с. лаборатории респираторных вирусных инфекций, Екатеринбург

Бахарев Алексей Анатольевич, к.биол.н., с.н.с., заведующий лабораторией клеточных культур, Екатеринбург

Сергеев Александр Григорьевич, в.н.с., руководитель отдела индикации и диагностики вирусных инфекций, Екатеринбург

Новоселова Ирина Алексеевна, магистрант кафедры физических методов и приборов контроля качества, Екатеринбург

Якин Дмитрий Иванович, аспирант кафедры физических методов и приборов контроля качества, Екатеринбург

**Ключевые слова:** спеклы, интерферометрия, клетка, линия Л-41, температура, метаболизм, неразрушающий контроль.

## ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивные методы диагностики, характеризующиеся быстротой и надежностью предоставляемых данных, как известно, представляют перспективное направление в биологии и медицине. Одним из таких методов является метод регистрации динамики спеклов. Спеклы (англ. *speckle* – крапинка, пятнышко) – случайная интерференционная картина, которая образуется при взаимной интерференции многих когерентных волн, имеющих случайные сдвиги фаз. Со свойствами неподвижных спеклов можно ознакомиться, например, в работах [2, 7, 12].

Хотя в большинстве случаев спеклы являются нежелательным явлением (существуют различные методики фильтрации спекл-шума), доказано, что они несут информацию об объекте исследования: если есть движение в рассеивающем объекте, то картина спеклов меняется – наблюдается динамика спеклов [12].

В настоящее время биоспеклы успешно применяются для изучения активности различных биологических объектов [1, 3, 8, 10–12, 15, 16, 18, 19]. Одним из наиболее успешных примеров использования биоспеклов является разработка подхода, предложенного впервые в работах [13, 17] и доведенного до практического применения в клинических исследованиях. Метод позволяет по контрасту спеклов оценивать скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента. На данный момент метод достаточно проработан теоретически и экспериментально [14]. Многочисленные ссылки на работы, посвященные применению спеклов для изучения процессов, происходящих в растениях, семенах и фруктах, можно найти в работе [20].

Ранее были разработаны теория метода и методика проведения экспериментов, позволяющие по регистрации динамики спеклов изучать динамику оптических путей волн (показателя преломления) в тонких биологических объектах [4]. Метод динамической спекл-интерферометрии успешно был применен для исследования метаболической активности трех клеточных культур, зараженных вирусом простого герпеса первого типа [6] и в отсутствие вируса [5]. Также с помощью метода была оценена реакция клеточных культур при изменении температуры. Усреднение данных было проведено по сотням клеток [9].

Целью данной работы является подробное изучение реакции малых участков отдельных клеток и группы клеток на изменение температуры. В данной статье приводятся результаты при изменении температуры от 26 до 37 °С.

## КРАТКАЯ ТЕОРИЯ МЕТОДА

В работе [4] представлены теория и методика динамической спекл-интерферометрии для усредненных во времени спеклов. Предполагалось, что когерентный источник света освещает неподвижные точечные рассеивающие центры, располагающиеся в тонком прозрачном диффузоре. Вблизи диффузора располагается тонкий прозрачный биологический объект. Линза с линейным разрешением  $a_s$  формирует изображение объекта. Фаза  $j$ -й волны изменяется случайным образом из-за изменения оптической длины пути  $u_j$  в тонком прозрачном объекте.

Было получено выражение для средней по времени интенсивности (1) и для нормированной временной автокорреляционной функции интенсивности излучения (2):

$$\tilde{I}(\vec{q}) = \tilde{I}_1 + \tilde{I}_2 e^{-k^2 \sigma^2 / 2} \cos(k\mu + \alpha), \quad (1)$$

$$\eta_{1,2}(t_1, t_2) = \cos[\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle] \times e^{-\frac{1}{2}k_{11} - \frac{1}{2}k_{22} + k_{12}}, \quad (2)$$

где  $\mu$  – средняя по области диаметром  $a_s$  и времени оптическая разность хода пар волн  $\Delta u_k$ ;  $\sigma^2$  – дисперсия  $\Delta u_k$ ,  $x = k\mu$ ,  $\tilde{I}_1, \tilde{I}_2$ ,  $\alpha = \text{const}$ , угловые скобки  $\langle \rangle$  означают усреднение по ансамблю объектов,  $x_1, x_2$  – значения  $x$  в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$ ;  $k_{11}, k_{22}$  – дисперсии величины  $x$  в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$ ;  $k_{12}$  – временная автокорреляционная функция величины  $x$ .

$$\Delta u_k = u_j - u_m, \quad (3)$$

$$u_j = \int_{l_j} [n_j(l) - n_0] dl, \quad (4)$$

$$u_m = \int_{l_m} [n_m(l) - n_0] dl, \quad (5)$$

где  $n_j(l)$  – показатель преломления вдоль пути  $j$ -й волны;  $n_0$  – показатель преломления в отсутствие объекта. Интегрирование ведется вдоль пути волны.

Если процесс изменения фаз волн стационарный, то вместо (2) имеем (6):

$$\eta(\tau) = e^{-k_{11} + k_{12}\rho_{12}(\tau)}, \quad (6)$$

где  $\rho_{12}(\tau)$  – нормированная автокорреляционная функция разности фаз пар волн,  $\tau = t_2 - t_1$ . Из формулы (6) ясно, что при  $\tau \rightarrow \infty$   $\eta^* = e^{-k_{11}}$ , где  $\sigma_u = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{k_{11}}$ .

Отсюда следует, что автокорреляционная функция выходит на постоянный уровень  $\eta^*$ , по значению которого можно найти среднеквадратическое отклонение  $\sigma_u$  величин  $\Delta u_k$  от среднего значения. Именно величина  $\sigma_u$  была использована нами в качестве параметра, характеризующего активность группы клеток или малого участка в пределах клетки.

### ТЕХНИКА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Эксперименты проводились на клетках линии Л-41, культивированных на стеклянной подложке. Блок-схема установки представлена на рис. 1. В качестве источника света в установке использовался полупроводниковый лазерный модуль *KLM-D532-20-5* с длиной волны 0,532 мкм. Излучение от модуля попадало на матовый рассеиватель, далее – на стеклянную кювету, внутри которой фиксировали стеклянную подложку со слоем клеток и стеклянный фиксатор в питательном растворе. В опытах использовалась монохромная телекамера типа «Видеоскан» 415/П/К-USB. Камера имела матрицу фотоприемников размером 6,5×4,8 мм, содержащую 780×582 ячеек размером 8,3×8,3 мкм. Частота ввода кадров – до 25 Гц. Время экспонирования телекамеры составляло 9 с. Оптическая система установки находилась в газовом термостате с возможностью изменения температуры. Для контроля температуры в кювете с точностью ±0,1 °С использовали термодатчик *DS1820 (Dallas Semiconductor)*. Оптическое увеличение микроскопа равнялось 11.

Запись кадров фильма динамики спеклов в формате *bmp* осуществляли с помощью программы *Viewer*, поставляемой вместе с телекамерой «Видеоскан». Сигналы с телекамеры через *USB*-порт поступали на ноутбук типа *Aspire 3692 WLMi* фирмы *Acer*. Время записи кадров составляло до 3 часов.

Значения коэффициента корреляции двух цифровых изображений  $\eta$  определяли

с помощью оригинального программного обеспечения по формуле (7)

$$\eta = \frac{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}] [B_{i,j} - \bar{B}]}{\sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}]^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [B_{i,j} - \bar{B}]^2}}, \quad (7)$$

где  $A_{i,j}$  – 8-битное цифровое значение интенсивности  $I$  на участке размером  $m \times n$  пикселей в начальный момент времени;  $B_{i,j}$  – 8-битное цифровое значение интенсивности  $I$  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  $\tau$ .

Дальнейшая обработка данных проводилась в стандартном пакете *Microsoft Excel 2010*.

Величина  $\sigma_u$ , соответствующая клеткам, определялась по двум зависимостям  $\eta(\tau)$  в предположении, что процессы в клетках и в питательном растворе протекают независимо. Первая зависимость соответствовала питательному раствору, вторая – клеткам в питательном растворе.

На рис. 2 показана фотография клеток, полученная в белом свете. По этой фотографии выбирали области, соответствующие малым участкам внутри отдельной клетки, либо область массива клеток для изучения их активности. В частности, для изображения массива клеток был выбран участок, содержащий изображение 120 клеток. Значение  $\sigma_u$  находили для  $\tau = 18$  с.

На рис. 3 приведены типичные графики зависимости  $\eta(\tau)$  для питательного раствора и клеток в питательном растворе, по которым определяли величину  $\sigma_u$  для клеток.

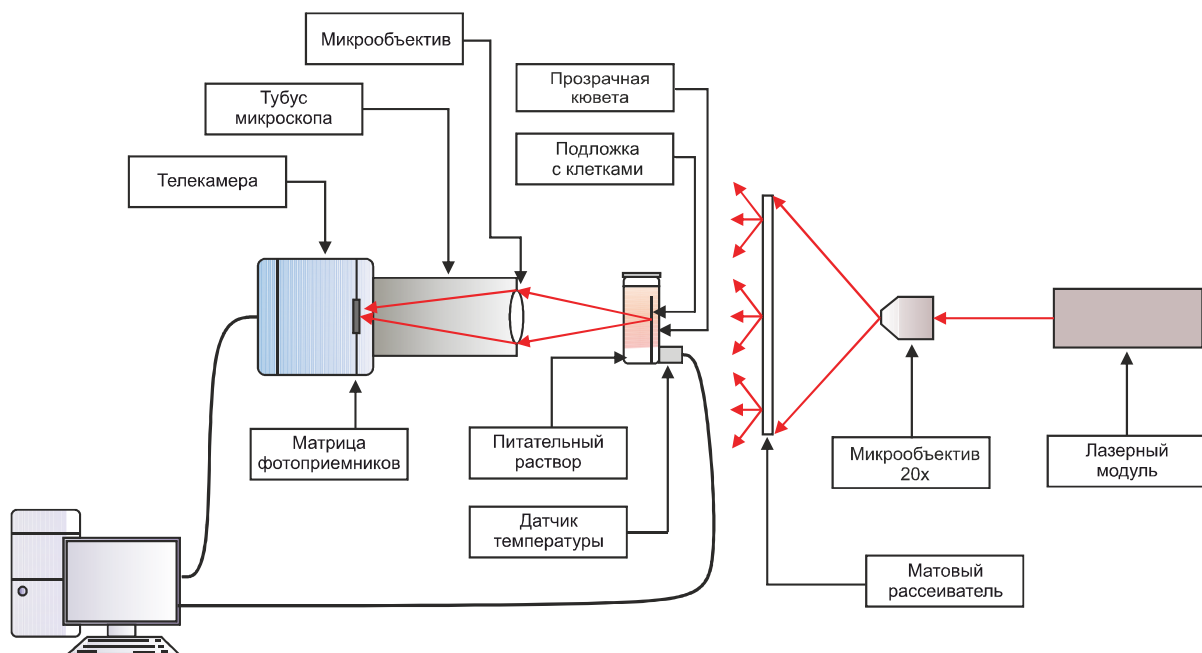


Рис. 1. Блок-схема установки

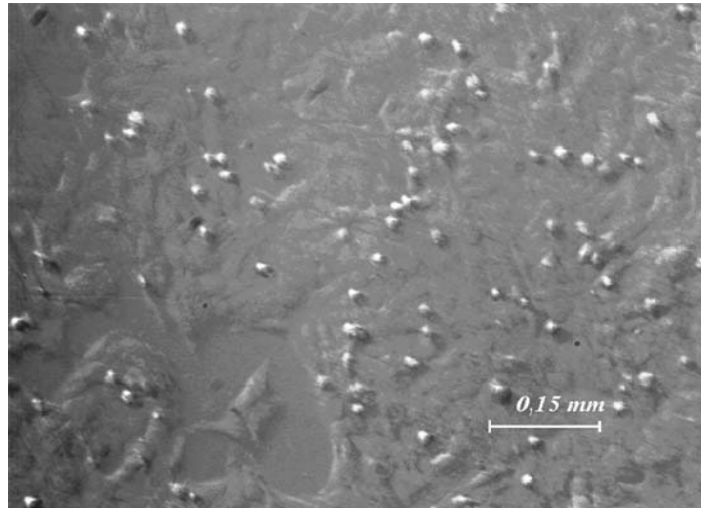


Рис. 2. Изображение клеток в белом свете

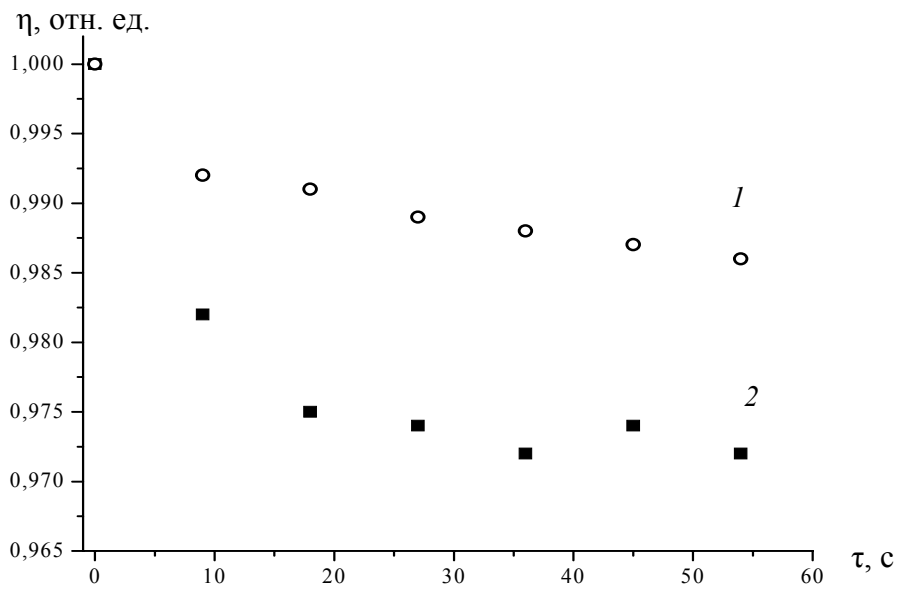


Рис. 3. Зависимости коэффициента корреляции от времени:  
1 – питательный раствор, 2 – клетки

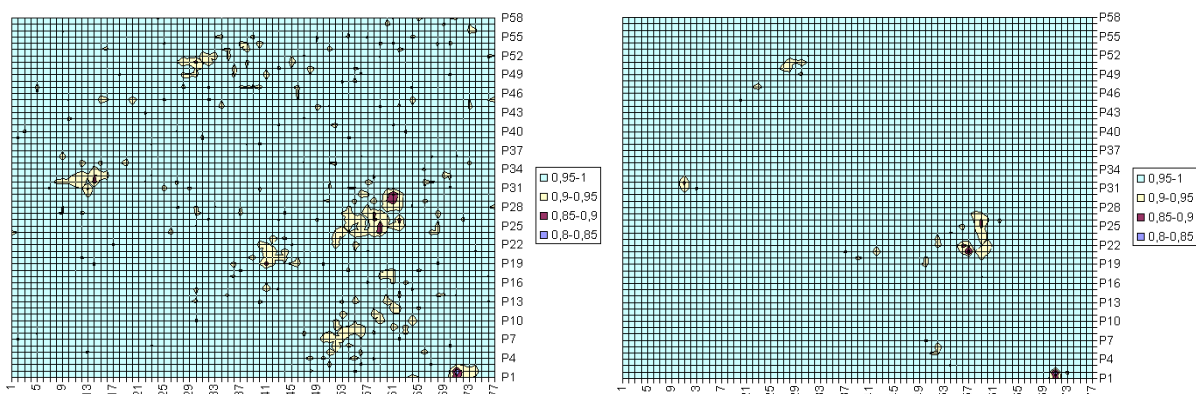


Рис. 4. Изменение в распределении величины  $\eta$  при температуре 25,9 °C, обнаруженное по четырем кадрам, записанным через 18 с: *a* – по первым двум кадрам, *b* – по последним двум кадрам

Распределения величины  $\eta$ , найденные по двум кадрам, взятым через 18 с, показаны на рис. 4. Значения  $\eta$  находились на участках размером  $10 \times 10$  пикселей, что соответствует области размером примерно в половину одиночной клетки.

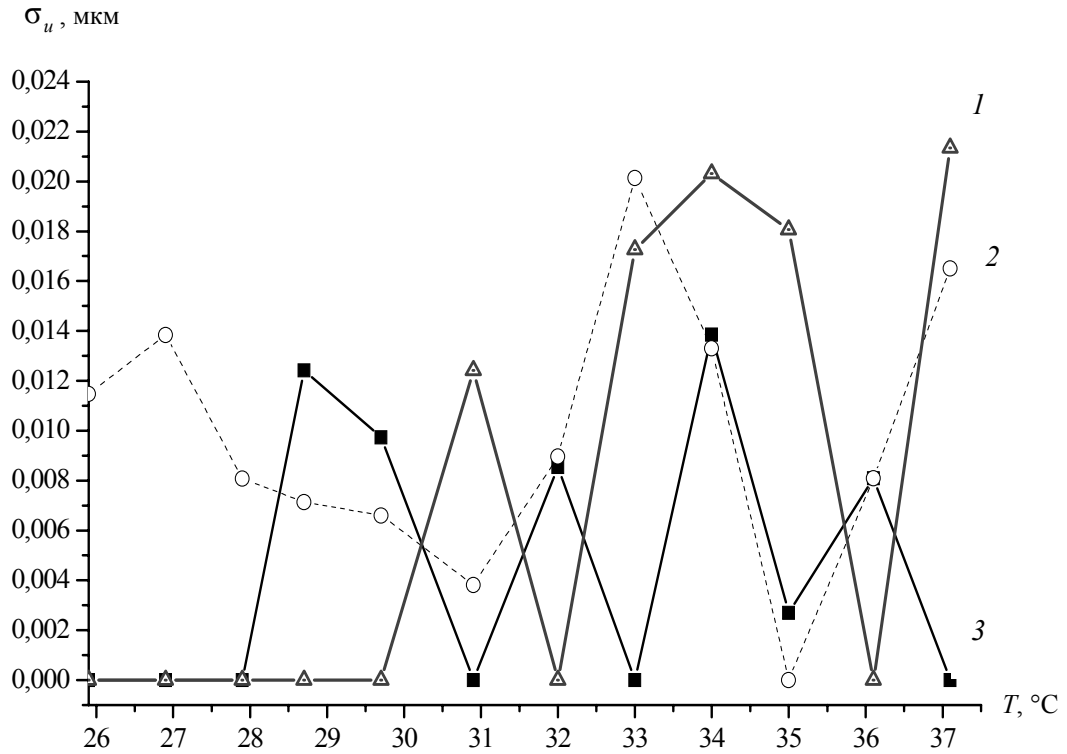


Рис. 5. Зависимость вариаций оптической разности хода от температуры внутриклеточных участков одной клетки: 1 – цитоплазма; 2 – край; 3 – центр

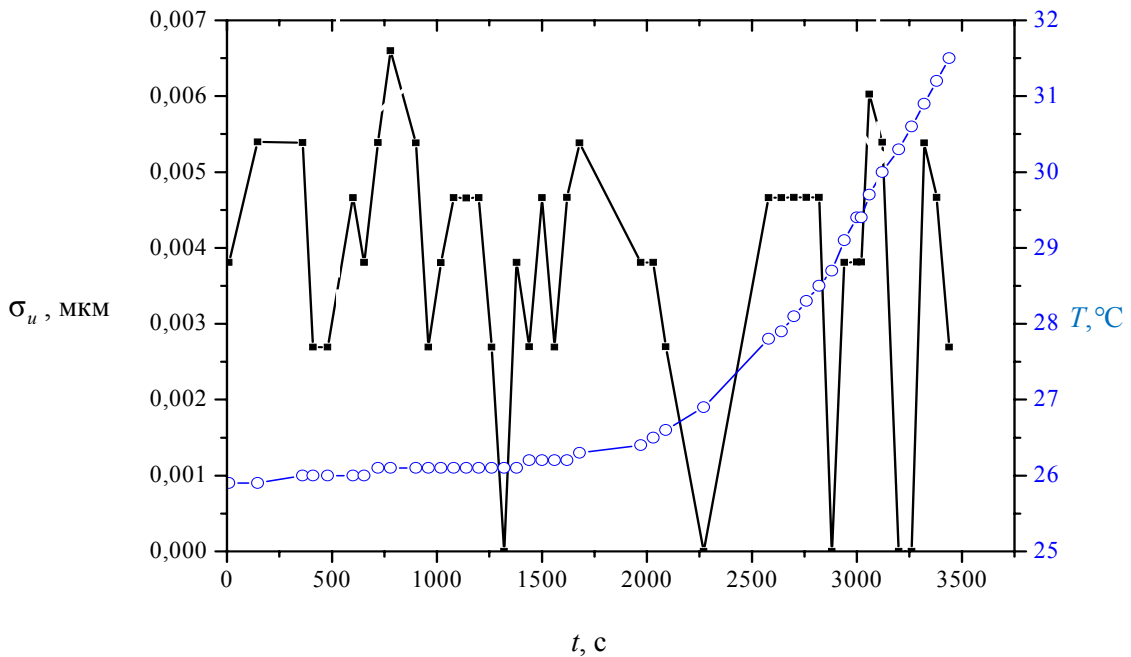


Рис. 6. Зависимости вариаций оптической разности хода (■) и температуры (○) от времени

На рис. 5 представлены типичные зависимости величины  $\sigma_u$  для малых участков в пределах изображения одной клетки.

На рис. 6, 7 приведены совмещенные графики зависимостей  $\sigma_u$  и температуры ( $T$ ) от времени для массива из 60 клеток.

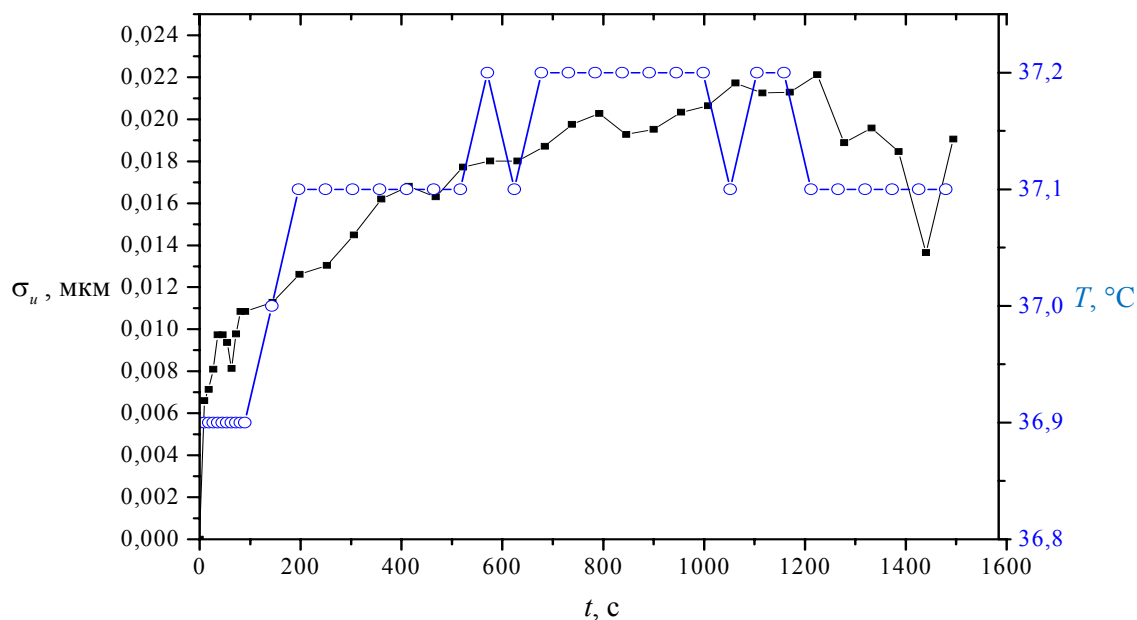


Рис. 7. Зависимости вариаций оптической разности хода (■) и температуры (○) от времени в пределах одного градуса температуры

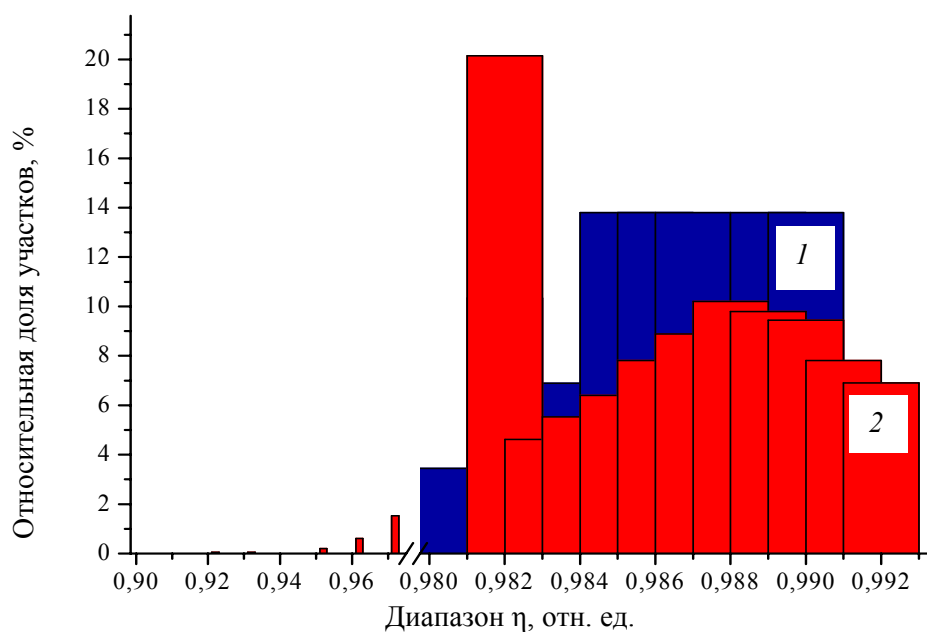


Рис. 8. Распределение величины  $\eta$ : 1 (синий) – для питательного раствора; 2 (красный) – для клеток

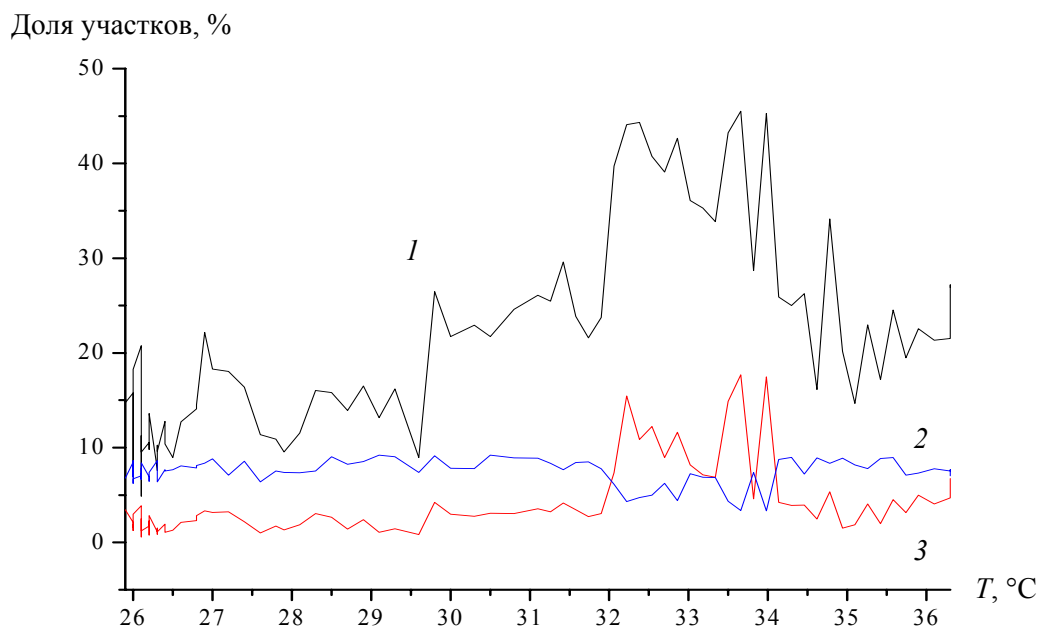


Рис. 9. Изменение относительной доли участков размером  $10 \times 10$  пикселей с 26 до  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ : 1 (черный) – для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,971 до 0,981; 2 (синий) – для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,985 до 0,986; 3 (красный) – для клеток с параметром  $\eta$  в диапазоне от 0,961 до 0,971

Из рис. 6, 7 следует, что при увеличении температуры наблюдаются значительные флуктуации активности клеток в пространстве и во времени.

Если температуру стабилизировать в течение 30 минут, то активность также стабилизируется (см. рис. 7). Коэффициент корреляции массивов  $\sigma_u$  и  $T$ , приведенных на рис. 7, равен 0,88.

На рис. 8 показана типичная гистограмма при  $T = 34,9 \text{ }^\circ\text{C}$ , характеризующая относительное число участков размером  $10 \times 10$  пикселей, значение  $\eta$  которых попадает в заданный интервал.

На следующем рис. 9 представлены зависимости, характеризующие изменение относительной доли числа участков, имеющих различную активность.

Из рис. 9 видно, что увеличение доли активных клеток происходит за счет вовлечения неактивной части популяции. Анализ гистограмм показал, что уменьшение значений зависимостей 1 и 3 после  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  может быть вызвано увеличением доли клеток, имеющих высокие показатели активности ( $\eta < 0,960$ , т.е.  $\sigma_u > 0,012 \text{ мкм}$ ).

## Выводы

Метод корреляции фрагментов спекловых изображений использован для детального изучения реакции клеток на изменение температуры. В качестве параметра, характеризующего активность малого участка в пределах клетки или группы клеток, использована величина  $\sigma_u$  – среднеквадратическое отклонение разности путей волн.

Показано:

1. При увеличении в течение одного часа температуры в диапазоне от 26 до  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  наблюдается сильный разброс активности участков в пределах одной клетки и для группы клеток в пространстве и во времени.



2. При стабилизации температуры в течение получаса (см. рис. 7) разброс активности существенно уменьшается и появляется хорошая корреляция между изменением температуры и изменением активности.

3. Значительный разброс активности единичных клеток, по-видимому, является следствием несинхронности прохождения клеток по циклу.

4. Данные, полученные в ходе исследования, могут быть использованы для создания приборов контроля биологической активности, в том числе контроля в реальном времени, в ряде разделов медицины и биологии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беднов А.А., Ульянов С.С., Тучин В.В., Бриль Г.Е., Захарова Е.И. Исследование динамики лимфотока методами спекл-интерферометрии // Известия вузов. Прикладная нелинейная динамика. – 1996. – Т. 4, № 6. – С. 45–54.
2. Вест Ч. Голографическая интерферометрия: пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 504 с.
3. Владимиров А.П., Лисин А.Л., Микушин В.И., Кохан М.М., Куклин И.А., Кононенко Е.В. Применение техники счета числа мерцаний спеклов для изучения биологической активности кожи // Письма в журнал технической физики. – 2000. – Т. 26. – С. 20–24.
4. Владимиров А.П. Динамическая спекл-интерферометрия микроскопических процессов, протекающих в тонких биологических объектах // Известия вузов. Радиофизика. – 2014. – Т. 57, № 8–9. – С. 632–645.
5. Владимиров А.П., Малыгин А.С., Михайлова Ю.А., Бородин Е.М., Бахарев А.А., Порываева А.П. Сравнение метаболической активности разных клеточных культур по динамике спеклов // Известия вузов. Радиофизика. – 2014. – Т. 57, № 8–9. – С. 654–659.
6. Владимиров А.П., Малыгин А.С., Михайлова Ю.А., Бахарев А.А., Порываева А.П. Устройство оценки в режиме реального времени метаболической активности клеточных культур с вирусом герпеса // Медицинская техника. – 2014. – № 4. – С. 8–10.
7. Гудмен Дж. Статистическая оптика: пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – 528 с.
8. Зимняков Д.А., Рябухо В.П., Тучин В.В., Ульянов С.С. Лазерные спекл-корреляционные диагностические технологии для машиностроения и медицины // Проблемы машиностроения и надежности машин. – 1999. – № 1. – С. 117–126.
9. Малыгин А.С., Бебенина Н.В., Владимиров А.П., Микитась К.Н., Бахарев А.А. Спекл-интерферометрическая установка для изучения биологической активности клеток // Приборы и техника эксперимента. – 2012. – № 3. – С. 124–127.
10. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. – М.: Физматлит, 2007. – Т. 1. – 560 с.
11. Тычинский В.П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // Успехи физических наук. – 2001. – Т. 171. – С. 649–662.
12. Франсон М. Оптика спеклов / пер. с англ. под ред. Ю.И. Островского. – М.: Мир, 1980. – 171 с.
13. Briers J.D., Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // Journal of Biomedical Optics. – 1996. – Vol. 1, № 2. – P. 174–179.
14. Briers J.D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow // Optica Applicata. – 2007. – Vol. XXXVII, № 1–2. – P. 139–152.
15. Cardoso R.R., Costa A.G., Nobre C.M.B., Braga Jr. R.A. Frequency signature of water activity by biospeckle laser // Optics Communications. – 2011. – Vol. 284, № 8. – P. 2131–2136.
16. Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K., Oh S., Lue N., Dasari R.R., Feld M.S. Tomographic phase microscopy // Nature Methods. – 2007. – Vol. 4, № 9. – P. 717–719.
17. Fercher A.F., Briers J.D. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography // Optics Communications. – 1981. – Vol. 37, № 5. – P. 326–330.
18. Niemz M.H. Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications. – Springer, 1996.
19. Oulamara A., Tribillon G., Duvernoy J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle // Journal of Modern Optics. – 1989. – Vol. 36, № 2. – P. 165–179.
20. Rabal H.J., Braga Jr. R.A. Dynamic Laser Speckle and Applications. – New York: CRC Press, 2008.

## STUDYING OF CELL CULTURE REACTION TO TEMPERATURE CHANGE BY DYNAMIC SPECKLE INTERFEROMETRY

Yu.A. Mikhailova, A.P. Vladimirov, A.A. Bakharev, A.G. Sergeev,  
I.A. Novosyolova, D.I. Yakin (Yekaterinburg, Russia)

At present, researchers effectively use biospeckles to study the processes occurring inside and on the surface of various biological objects: fruits, vegetables, grains and a patient's skin and retina. Previous research resulted in developing a technique and device for determination of the metabolic activity of Vero, L41 and HLE cell lines using dynamic speckle interferometry. The cell activity parameters were the time-average digital value of radiation intensity  $\tilde{I}$  in a TV camera pixel and the correlation coefficient of two speckle images  $\eta$ . The researchers obtained well-reproducible results in the course of studying herpes virus 1-infected cell lines. In this article, we present an optical technique that allows researchers to determine the standard deviation of the optical wave path difference  $\sigma_u$  in a small area of an individual cell or in a cell group by using the correlation coefficient of the speckle image fragment. The target of research was a L41 cell culture monolayer on a glass substrate placed in a cuvette with a growth medium. Radiation from a laser module illuminates the cuvette through a mat diffuser; the resulting speckle cell image had an optical magnification of  $\times 11$ . We used value  $\sigma_u$  as a parameter characterizing the activity of physical and chemical processes in cells. We showed that there are significant fluctuations of value  $\sigma_u$  in space and time with temperature  $T$  increasing from 26 to 37 °C in an hour. When the temperature stabilizes for 30 min, the fluctuations practically cease, and when the temperature changes by decimal points, there is good correlation between  $\sigma_u$  and  $T$ .

**Key words:** speckle interferometry, L41 cell line, temperature, metabolism, non-destructive testing.

*Получено 17 октября 2016*