

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ МЕДИЦИНЫ, БИОЛОГИИ

УДК 535.681.787:576

СПЕКЛ-ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

© 2012 г. А. С. Малыгин, Н. В. Бебенина, А. П. Владимиров, К. Н. Микитась, А. А. Бахарев*

*Физико-технологический институт Уральского федерального университета
Россия, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19*

**Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора
Россия, 620030, Екатеринбург, ул. Летняя, 23*

Поступила в редакцию 09.08.2011 г.

Описана модернизированная установка, предназначенная для диагностики активности клеток в зависимости от температуры. Активность клеток определялась путем нахождения коэффициента корреляции оптических сигналов в картинах спеклов, зарегистрированных в разные моменты времени. Показано, что при увеличении температуры в диапазоне 26–36°C вариации оптических длин путей в клетках возрастают от 16 до 26 нм, что, вероятно, связано с физиологической активностью клеток – захватом крупных молекул или их конгломератов. В отличие от предыдущего варианта исполнения установки вместо липидной мембраны использован монослой клеток, который культивировали на стеклянной плоскопараллельной пластине. Для уменьшения вариации длин оптических путей в питательном растворе в кювету дополнительно вводили плоскопараллельную стеклянную пластину толщиной 1.7 мм. Модернизация установки включала также нагрев кюветы потоками горячего воздуха.

При освещении когерентным излучением рассеивающего объекта в свободном пространстве и в области его изображения наблюдается пятнистая картина рассеянного излучения. Пятна или спеклы случайного размера и яркости образуются в результате взаимной интерференции множества волн со случайными амплитудами и фазами.

Перспективным инструментом для изучения микроскопических процессов, происходящих в биологических средах, является метод регистрации динамики лазерных спеклов или биоспеклов. В настоящее время биоспеклы успешно применяются для изучения активности различных биологических объектов [1–3]. В данной работе динамика биоспеклов использована для изучения процессов, происходящих в биологических мембранах.

Актуальность таких исследований связана с тем, что болезни людей прямо или косвенно связаны с нарушением нормального функционирования клеток или биологических мембран. Согласно работе [4], в основе многих заболеваний лежат изменения структурно-функциональных свойств молекулярных компонентов биомембран, возникающие как под воздействием внешних факторов, так и в результате внутренних функциональных расстройств.

В связи с этим всесторонние исследования механизмов функционирования клеток и биомембран в норме и при патологии необходимы как для разработки методов лечения и профилактики

заболеваний, так и для создания новых лекарственных препаратов. В этих условиях особенно важны экспрессные методы диагностики, обеспечивающие высокую надежность получаемых результатов.

Традиционно изучение взаимодействия мембран с различными растворами осуществляется с использованием модельной липидной мембраны [4, 5]. В работах [6–8] описана лабораторная установка, в которой липидной мембраной перегородивалась прозрачная со всех сторон кювета. С помощью этой установки были изучены взаимодействия мембраны с дистиллированной водой, раствором перманганата калия, допированным раствором карбоната кальция. Недостатком установки является малая стабильность модельных липидных мембран – время их жизни составляет ~30 с. Кроме того, проведенные исследования не позволили получить полную картину биологических процессов.

Для экспериментов наиболее подходящим объектом можно считать монослойные клеточные культуры различного происхождения. Они однородны по своему клеточному составу, структуре, физиологии и другим показателям, существуют в среде постоянного состава, в стабильных условиях, что позволяет получить максимально воспроизводимые для биологических объектов результаты.

В качестве модели была выбрана культура клеток Л-41, полученная в Екатеринбургском НИИ вирусных инфекций в 1984 г. [9] и хорошо изучен-

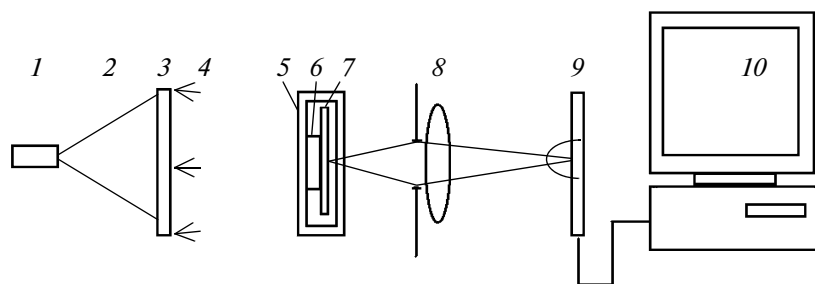


Рис. 1. Схема оптической установки. 1 – лазерный модуль, 2 – освещающий пучок, 3 – матовое стекло, 4 – рассеянное излучение, 5 – кювета, 6 – плоскопараллельная пластина, 7 – стеклянная подложка с монослоем клеток, 8 – линза с диафрагмой, 9 – матрица фотоприемников телекамеры, 10 – компьютер.

ная по своим биологическим показателям. Кроме того, данная культура обладает редким свойством отвечать на изменение внешних условий частичным изменением характеристик, что отличает ее от большинства культур, отвечающих на изменение внешних условий по принципу “все или ничего”.

В качестве основного фактора влияния для первичных экспериментов была выбрана температура окружающей среды. Как известно, оптимальная температура роста клеточных культур составляет $36.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Понижение температуры приводит к быстрому снижению физиологической активности клеток: при температуре $\sim 25^\circ\text{C}$ она снижается в несколько раз, что может быть выявлено как физическими, так и биологическими методами [10].

Целью настоящей работы является модернизация установки для изучения процессов, происходящих при взаимодействии мембран реальных клеток с питательным раствором, и ее применение для диагностики активности клеток в зависимости от температуры.

Работа была выполнена на установке, оптическая схема которой приведена на рис. 1.

В качестве источника света 1 был использован полупроводниковый лазер с длиной волны $\lambda = 0.532$ мкм. Излучение 2 от лазера направлялось на матовый рассеиватель 3. На расстоянии ~ 10 см от рассеивателя размещали стеклянную кювету 5 толщиной 3 мм, внутри которой фиксировали стеклянную подложку 7 толщиной 0.2 мм со слоем клеток. Для уменьшения оптической толщины раствора до 0.3 мм использовали стеклянную плоскопараллельную пластину 6. Далее излучение направлялось на объектив 8 с диафрагмой, формирующей картину спеклов.

В опытах использовалась монохромная телекамера типа Видеоскан – 415/П/К-USB. Камера имела матрицу фотоприемников 9 размером 6.5×4.8 мм, содержащую 780×582 ячеек размером 8.3×8.3 мкм. Частота ввода кадров составляла до 25 Гц. Сигналы с телекамеры через USB-порт по-

ступали на ноутбук 10 типа Aspire 3692 WLMi фирмы Acer.

В отличие от предыдущего варианта исполнения установки вместо липидной мембраны использовали монослой клеток, который культивировали на стеклянной плоскопараллельной пластине. В работе [6] было показано, что в питательном растворе имеются значительные вариации длин оптических путей. Для их уменьшения в кювету дополнительно вводили плоскопараллельную стеклянную пластину толщиной 1.7 мм. Модернизация установки включала также нагрев кюветы потоками горячего воздуха.

В эксперименте в кювету помещали подложку с клетками, плоскопараллельную пластину, после чего заполняли ее питательным раствором. Кювету закрывали герметически пробкой и нагревали до $40\text{--}42^\circ\text{C}$. Через пробку вводили термопару для измерения температуры. Конец термопары находился на расстоянии ~ 3 мм над уровнем жидкости. Затем перекрывали потоки воздуха и снимали динамику спеклов при естественном охлаждении до комнатной температуры. Время съемки составляло от 20 до 70 с при частоте 25 кадров/с.

На рис. 2 представлена типичная картина спеклов, наблюдаемая в фиксированный момент времени на экране компьютера. Отмечены участки, соответствующие разным биологическим объектам, сигналы которых подвергались дальнейшей обработке. Участок 1 соответствует клеткам, помещенным в питательный раствор толщиной 0.3 мм, а участок 2 – питательному раствору толщиной 0.5 мм без клеток.

На участках 1 и 2 определяли коэффициент корреляции ρ оптических сигналов в разные моменты времени по формуле:

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

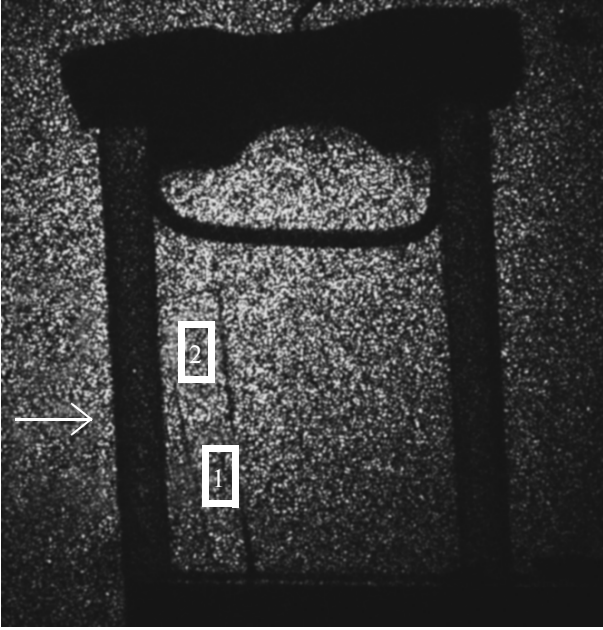


Рис. 2. Типичная картина спеклов с выделенными участками. Стрелкой показан верхний уровень пластины с клетками.

где $A_{i,j}$ — сигналы на участке размером $m \times n$ пикселей в начальный момент времени; $B_{i,j}$ — сигналы на этом же участке в момент времени τ ; i, j — номера пикселей участков в направлении осей x и y соответственно; \bar{A} , \bar{B} — среднее значение сигналов на участке в начальный момент времени и в момент времени τ соответственно.

За начало отсчета брали начальный кадр съемки. Для сравнения выбирали кадры через определенный интервал времени τ . На рис. 3 приведены типичные экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ для температуры $T = 34^\circ\text{C}$. Анализ рисунка показывает, что зависимость $\rho(\tau)$ для участка 1 находится ниже аналогичной зависимости для участка 2.

Согласно теории динамики спеклов [11], для данного варианта оптической системы нормированная временная автокорреляционная функция оптических сигналов $\eta(\tau)$ в некоторой точке плоскости изображения определяется формулой

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

где k_{11} — дисперсия изменяющихся во времени фаз волн в окрестности сопряженной точки объекта; $k_{12}(\tau)$ функция автокорреляции фаз в моменты времени 1 и 2, разделенные временным промежутком τ .

В [11] показано, что для стационарного процесса при стремлении интервала времени между моментами 1 и 2 к бесконечности величина η стремится к пределу, равному $e^{-k_{11}}$. Следовательно, по величине η можно определить дисперсию

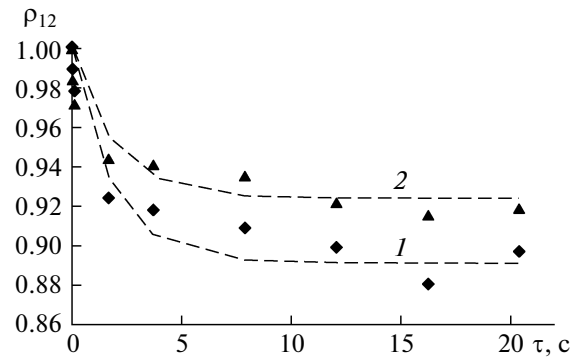


Рис. 3. Экспериментальные зависимости $\rho_{12}(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 34°C (точки — экспериментальные данные, штриховые кривые — аппроксимация функции $\eta(\tau)$).

фаз волн, а затем — временную вариацию оптических длин путей σ .

В наших экспериментах коэффициент корреляции ρ имеет тот же смысл, что и η . Различие заключается в том, что величина η определяется усреднением по ансамблю объектов, а ρ — усреднением по площади участков 1 и 2, содержащих достаточно большое число спеклов. На рис. 3, помимо экспериментальных данных, приведена функция $\eta(\tau)$, представляющая собой аппроксимацию с использованием автокорреляционной лоренцевой функции $k_{12}(\tau)$. Аппроксимация была выполнена методом наименьших квадратов с относительной погрешностью $\leq 11\%$.

Корректность приведенной выше формулы оценивалась следующим образом. Плоскопараллельная пластина толщиной 1 мм с показателем преломления 1.50 и шероховатостью $Ra = 0.01$ мкм, измеренной интерференционным профилометром Veeco WYKO NT1100, помещалась на место кюветы и перемещалась в своей плоскости перпендикулярно оптической оси линзы на расстояние до 28 мкм с точностью ± 0.1 мкм с одновременной фиксацией кадров изображения.

На участке 1 наблюдалось уменьшение ρ от 1 до 0.976 с выходом на плато. Экспериментальные данные с относительной погрешностью 2.4% аппроксимировались функцией $\eta(\tau)$ с использованием гауссовой функции $k_{12}(\tau)$ с интервалом корреляции, равным 1.5 мкм. По значению η на плато была оценена вариация оптических разностей хода, которая составила 0.0132 мкм. Вариация оптических разностей хода, определенная по величине Ra , составила 0.0125 мкм. Таким образом, различие значений вариаций, оцененных двумя разными методами, составило 5% от значения, оцененного по динамике спеклов.

На рис. 4 приведены зависимости вариаций оптических длин путей σ_1 и σ_2 для участков 1 и 2

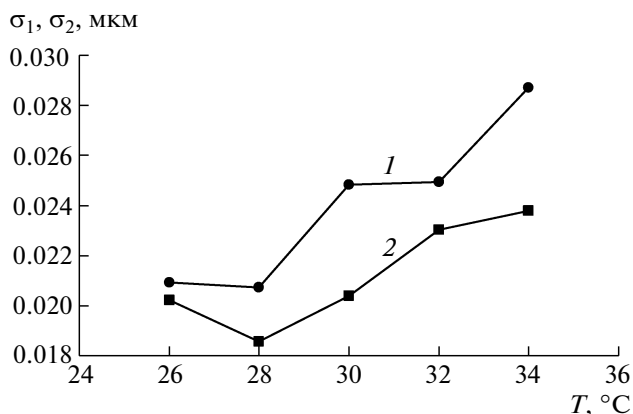


Рис. 4. Зависимость вариаций оптических длин путей от температуры на участках 1 (1) и 2 (2).

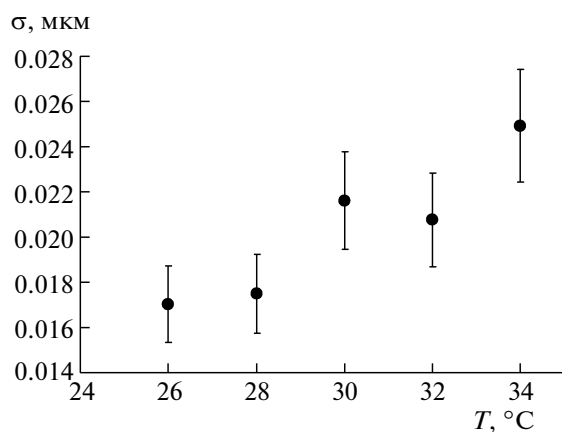


Рис. 5. Зависимость вариации оптических длин путей в клетках σ от температуры.

от температуры, а на рис. 5 — зависимость вариаций оптических длин путей σ в пределах клеток, найденная по этим двум зависимостям.

Величина σ находилась из предположения, что дисперсии оптических длин путей в пределах клеток и в растворе являются аддитивными величинами. Это легко показать, если предположить, что оптические длины путей в пределах и вне клеток являются статистически независимыми случайными величинами.

Как видно из рис. 5, при повышении температуры в диапазоне 26–34°C значения вариаций оптической длины пути в клетках увеличиваются от 16 до 26 нм, что, по-видимому, связано с физиологической активностью клеток — захватом крупных молекул или их конгломератов. При повы-

шении температуры начинается питание клеток и вывод продуктов их жизнедеятельности. Максимум активности клеток приходится на температуру ~36°C. Таким образом, рис. 5, по всей вероятности, отражает рост физиологической активности клеток с повышением температуры.

Согласно данным специалистов ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, питательная среда, в которую был помещен слой клеток Л-41 КД 84, содержит молекулы размером от 0.002 до 0.5 мкм. Полученное значение вариации оптической длины пути попадает в данный диапазон, что является подтверждением предположения о связи величины σ с физиологической активностью клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *da Silva M.M., de Almeida Nozela J.R., Chaves M.J. et al.* // Optics Communications. 2011. V. 284. P. 1798.
2. *Cardoso R.R., Costa A.G., Batista Nobre C.M., Alves Braga R. Jr.* // Optics Communications. 2011. V. 284. P. 2131.
3. *Martí-López L., Cabrera H., Martínez-Celorio R.A., González-Peña R.* // Optics Communications. 2010. V. 283. Issue 24. P. 4972.
4. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1978.
5. *Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В.* Липидные мембраны при фазовых превращениях. М.: Наука, 1992.
6. *Бибенина Н.В., Микитась К.Н., Малыгин А.С. и др.* // Проблемы спектроскопии и спектрометрии: межвузовский сборник научных трудов. Екатеринбург: УрФУ, 2011. Вып. 28. С. 192.
7. *Владимиров А.П.* // 10th международный семинар-ярмарка «Российские технологии для индустрии». (1–3 ноября 2006. С.-Петербург) Сборник проектов. С.-Петербург, Центр поддержки инноваций ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, 2006.
8. *Владимиров А.П., Малыгин А.С., Павлов Т.Н. и др.* // 11th международный семинар-ярмарка «Российские технологии для индустрии». (20–23 ноября 2007. С.-Петербург) Сборник проектов. С.-Петербург, Центр поддержки инноваций ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, 2007.
9. *Глинских Н.П., Виссарионов В.А., Бахарев А.А. и др.* Патент № 2148644 РФ. Класс G 01 N 33/15 // БИ. 2000. № 13. С. 296.
10. *Адамс Р.Г.* Культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983.
11. *Владимиров А.П.* Динамическая спекл-интерферометрия деформируемых тел. Екатеринбург: УрО РАН, 2004.