

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФГАОУ ВО Национальный исследовательский  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

**Институт биологии и биомедицины  
Кафедра физиологии и анатомии**

Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Таламанова М.Н.

**ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ  
В КАЧЕСТВЕ МЕТОДА АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО  
СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ**

Методические рекомендации

Рекомендовано методической комиссией Института биологии и биомедицины для студентов ННГУ, обучающихся по направлениям подготовки 06.03.01 «Биология», 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика»

Нижегород  
2020 г.

УДК 612:576.6

ББК 28в631

Д 56

Д 56 Лазерная интерференционная микроскопия в качестве метода анализа функционального состояния эритроцитов. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Таламанова М.Н. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2020. – 31 с.

Рецензент: к.б.н. Кравченко Г.А.

В методических рекомендациях отражен анализ известного научно-методического аппарата для исследования морфологии и динамики биологических объектов в реальном времени и показана необходимость его совершенствования. Описаны основные методы, используемые для анализа клеточной морфологии и динамики внутриклеточных процессов в биологических объектах. В качестве наиболее перспективных выделены методы интерференционной микроскопии и показаны достижения этих методов в области исследования клеточной морфологии и динамики внутриклеточных процессов. Приведены описания экспериментальных установок интерференционной микроскопии. Представлены основные результаты исследования морфологии и динамики эритроцитов. Показано, что метод интерференционной микроскопии может быть использован для оценки функционального состояния эритроцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

Ответственный за выпуск:

председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины  
ННГУ к.б.н., доц. Воденеева Е.Л.

УДК 612:576.6

ББК 28в631

© Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского, 2020

© ДЕРЮГИНА А.В., ИВАЩЕНКО М.Н., ИГНАТЬЕВ П.С., ТАЛАМАНОВА М.Н.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Сравнительная характеристика различных методов микроскопии	6
2. Интерференционная микроскопия	9
2.1 Исследование динамически активных областей эритроцитов методом Гильберт-фазовой микроскопии	10
2.2 Оптическая когерентная томография клеток крови	13
2.3 Исследование фликкера эритроцитов методом динамической микрофотометрии	15
2.4 Метод локальной динамической микроскопии	18
2.5 Устройство лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340. Получение изображений.	20
3. Возможности использования фазовой интерференционной микроскопии при исследовании эритроцитов	24

## ВВЕДЕНИЕ

Использование оптических подходов позволяет создавать и успешно внедрять новые инструменты исследования функционального состояния эритроцитов. К таким методам относится лазерная интерференционная микроскопия. Метод основан на анализе изменения показателя преломления клеточных структур. Главным преимуществом метода является возможность исследования интактных, нативных клеток без применения красителей, использование которых может привести к дополнительному нежелательному воздействию на исследуемые биологические объекты.

В настоящее время для анализа динамических процессов в биологических объектах используются методы атомно-силовой микроскопии, однако вследствие инвазивности экспериментов применение подобных методов для исследования клеток мягких тканей ограничено.

Использование современных методов высокоскоростной конфокальной микроскопии при исследовании быстрых (более 10 Гц) динамических процессов также ограничено вследствие низкого пространственного и временного разрешения.

Значительных результатов в исследовании внутриклеточных процессов удалось достичь, используя метод флуоресцентной микроскопии. Однако ощутимых результатов в решении задач диагностики функциональных состояний субклеточной системы, метод традиционной флуоресцентной микроскопии не даёт. Это объясняется, в первую очередь, отсутствием механизма абсолютной нормировки интенсивности флуоресценции, а также сравнительно низкой чувствительностью и малым временным разрешением, которые ограничены в данном методе.

Наиболее перспективными оказываются методы интерференционной микроскопии, которые позволяют проводить исследования в области динамики внутриклеточных процессов, кооперативные явления в мембранах и ферментных комплексах, регистрации динамических процессов в реальном времени.

В данных методических разработках представлен метод интерференционной микроскопии как новый методологический подход для исследования морфологии и динамики эритроцитов в реальном времени, а так же показаны его преимущества по сравнению с другими методами микроскопии.

## 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИИ

Традиционно для анализа поверхностей мембран клеток применяются методы оптической и атомной силовой микроскопии (АСМ). Применение этих методов в биологии сопряжено с рядом особенностей. При переходе размеров изображений от микронных — оптическая микроскопия до нанометровых — атомная силовая микроскопия возникают трудности, связанные с появлением разномасштабных неоднородностей объектов. Неоднородности возникают уже на уровне клеточных популяций. Мембраны эритроцитов имеют сложную изменяющуюся наноповерхность на различных участках отдельной клетки. Воздействие на клетку физико-химических факторов может приводить к изменению структуры поверхности мембран, изменять степень неоднородностей. Распознавание структурных единиц неоднородностей мембраны представляет собой сложную физиологическую и патофизиологическую задачу.

АСМ позволяет получать топографические изображения с высоким разрешением при физиологически контролируемых условиях, расширяя многообразие локальных зондовых экспериментов. Высокое пространственное разрешение атомно-силового микроскопа в сочетании с его способностью работать в жидкости, позволяет ему работать с живыми биологическими системами.

С использованием АСМ проводятся исследования биологических объектов с разрешением, существенно превосходящим оптические микроскопы, однако есть ряд недостатков:

- Контактность. При использовании современных методик измерений в жидких средах применение АСМ для исследования мягких клеток тканей и крови весьма ограничено.

- Диапазон измерения динамических процессов клетки 100 Гц – 10 КГц не позволяет исследовать медленные динамические  $< 1$  Гц процессы, имеющие место в большинстве клеток.

В настоящее время ведущие разработчики атомно-силовых микроскопов разрабатывают огромное количество бесконтактных методик для исследования биологических объектов, однако применение этих методик также ограничено вследствие взаимодействия заряженного зонда АСМ с заряженными мембранами живых клеток.

Известно, что микроскопия многофотонного возбуждения (ММВ) находит широкое применение при исследовании медленных (до 10 Гц) изменений в живых клетках. Основные преимущества над сканирующей зондовой микроскопией заключаются в использовании неразрушающих инфракрасных источников излучения, в снижении рассеяния и использовании красителей возбуждающихся в ближнем ИК диапазоне. Использование ИК в качестве возбуждающего излучения позволяет минимизировать воздействие излучения на исследуемый объект, однако использование красителей зачастую требует ответа на вопрос: не нарушает ли краситель процессов жизнедеятельности клетки? Ответ на этот вопрос весьма не однозначен. Кроме того, ММВ разделяет недостаток с сканирующими микроскопами - низкую частоту кадров, что недопустимо для исследования ряда быстрых биологических процессов.

В 2008 году компания VisiTech выпустила новое поколение высокоскоростных конфокальных микроскопов предназначенных для изучения динамических процессов в живых клетках.

Важными преимуществами таких микроскопов является высокая (до 1000 кадров в секунду) скорость работы и низкий уровень фотообесцвечивания, что позволяет поддерживать жизнеспособность клетки в течение длительного эксперимента.

Главный оптический тракт микроскопа состоит из неподвижного массива микролинз (рис. 1), освещаемого расходящимся лучом лазера. Зеркало фотогальванометра сканирует образец и его флуоресценцию. Изображение объекта отделяется от освещающего пучка при помощи дихроичного зеркала и попадает на стационарный набор пинхоллов, формирующий конфокальное изображение.

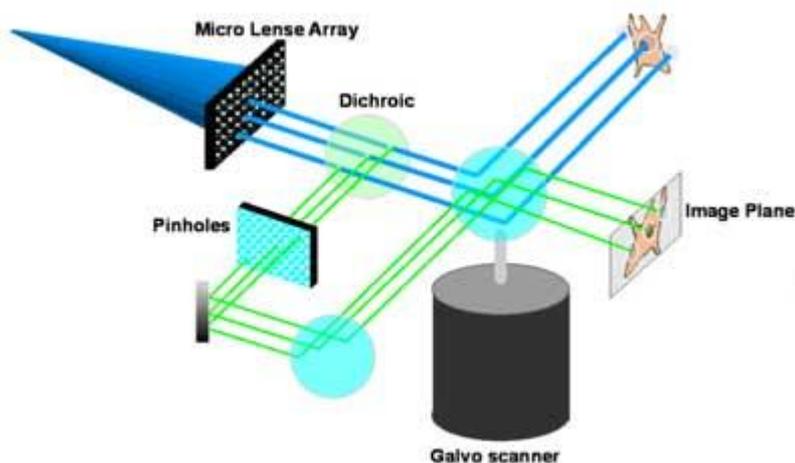


Рис. 1. Схема главного оптического тракта высокоскоростного оптического микроскопа VS Infinity 3.

Для лучшей синхронизации это же изображение повторно сканируется обратной стороной гальванометрического зеркала и регистрируется сверхчувствительной ПЗС камерой. Гальванический сканер легко синхронизируется с камерой путем подбора параметров захвата изображения (времени экспозиции и частоты кадров).

Правильный выбор размера пин-холлов в стационарном массиве позволяет достичь оптимизации требований эксперимента (увеличение микрообъектива, пространственное разрешение) и пропускной способности массива.

Максимальная скорость сканирования достигается тогда, когда частота сканирования зеркала гальванометра совпадает с максимальной скоростью работы камеры.

Важной особенностью описанного прибора является совместимость его оптической схемы с широким спектром источников излучения начиная с ультрафиолетовых и заканчивая ближним ИК диапазоном. Такая совместимость позволяет существенно упростить многометочные (multi-labeled) эксперименты путем одновременного использования нескольких источников с автоматизированным переключением и сменой загораживающих фильтров.

Высокоскоростные конфокальные микроскопы обеспечивают возможность получения динамических изображений клетки и совмещение конфокальных и флуоресцентных изображений. Однако пространственное разрешение метода ограничивается характеристиками массивов микролинз и пин-голов и не позволяет исследовать динамические процессы с амплитудами 1-10 нм. Кроме того, введение в клетку флуоресцентных методов в ряде случаев влияет на состояние клетки, что осложняет интерпретацию полученных данных.

## **2. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ**

Новые перспективы в изучении клеточных процессов появились в связи с разработкой интерференционных методов оптической микроскопии. Высокое пространственное разрешение, количественный характер получаемой информации и отсутствие необходимости применения дорогостоящих красителей позволяют использовать эти методы в качестве универсального инструмента для исследования оптических и динамических свойств живой клетки.

Важная особенность интерференционных методов заключается в том, что регистрируемая величина оптической разности хода лучей в интерферометре позволяет получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления объекта и его морфологии.

### **2.1. Исследование динамически активных областей эритроцитов методом Гильберт-фазовой микроскопии**

Гильберт-фазовая микроскопия (Hilbert Phase Microscopy, HPM) – новая техника получения и исследования количественных фазовых изображений оптически прозрачных объектов с высоким латеральным разрешением. Благодаря своему одношаговому алгоритму, HPM применяется для исследования быстрых явлений и процессов, которые имеют место в прозрачных биологических структурах, таких как клетки крови.

Схема экспериментальной установки приведена на рис. 2, где в качестве источника когерентного излучения в интерферометре Маха-Цендера используется He-Ne лазер. В каждом плече интерферометра расположены две идентичные телескопические системы с двадцатикратным увеличением. ПЗС камера расположена в Фурье плоскости линзы, где формируется увеличенное поле предмета. Опорное поле немного наклонено по отношению к объектному пучку таким образом, чтобы создать равномерную структуру интерференционных полос, ориентированную под  $45^\circ$  по отношению к осям  $x$  и  $y$  ПЗС камеры. Используется ПЗС камера со скоростью работы 291 кадр в секунду при полном разрешении  $640 \times 480$  пикс.

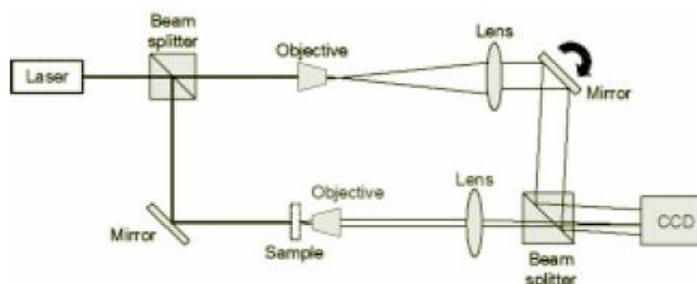


Рис. 2. Схема экспериментальной установки.

Для произвольного образца пространственное распределение интенсивности в плоскости изображения имеет вид:

$$I(x) = I_r + I_s \cos(2\pi q x + \varphi) \quad (1)$$

Где  $I_r$  и  $I_s$  интенсивности в опорном и объектном плечах интерферометра,  $q$  - пространственная частота полос,  $\varphi$  - фаза, связанная с объектом, представляющая количественный интерес в эксперименте. Для прозрачных объектов  $I_s(x)$  имеет слабую зависимость от  $x$ . При помощи настройки увеличения системы можно выбрать частоту  $q$  близкую или превышающую максимальную частоту интерференционных полос, ограниченную числовой апертурой объектива, поэтому фундаментальное дифракционное разрешение разрешающей способности сохраняется. Интерференционный член  $I_s \cos(2\pi q x + \varphi)$  может быть выделен при помощи высокочастотной Фурье фильтрации. Из этого следует, что комплексный аналитический сигнал, связанный с действительной функцией  $u(x)$  может быть получен как:

$$u(x) = \frac{1}{2} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} U(\xi) e^{i2\pi \xi x} d\xi + \int_{-\infty}^{\infty} U(\xi) e^{-i2\pi \xi x} d\xi \right] \quad (2)$$

В равенстве (2) мнимая часть первого выражения для главного значения интеграла, легко идентифицируется как преобразование Гильберта для  $u(x)$ . Поэтому фаза, связанная с комплексным аналитическим сигналом  $z$  вычисляется как:

$$z(x) = u(x) + i \mathcal{H}\{u(x)\} \quad (3)$$

Так как частота  $q$  выше, чем пространственная частота содержимого объекта, процедура восстановления скачков фазы работает эффективнее. И наконец, фаза связанная с объектом просто выражается как  $\varphi(x) = \Phi(x) - qx$ .

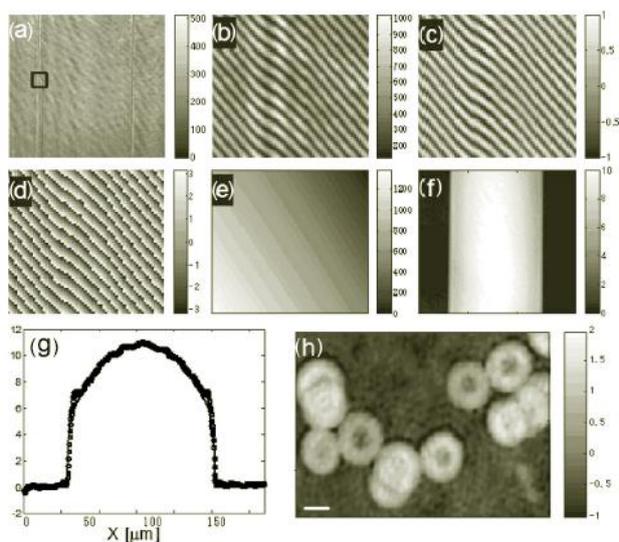


Рис. 3. Исходное амплитудное изображение объекта (a); интерферограммы (b) (c), скачки фазы, полученные в результате наклона волнового фронта (d), восстановление скачков фазы по всему полю (e), количественное фазовое изображение (f), полученное после вычитания наклона, поперечное сечение фазового изображения (g). НРМ изображение мазка крови при 40x увеличении (h).

Высокая скорость работы используемой ПЗС камеры, позволила локализовать области метаболической активности отдельного эритроцита крови человека. На рис. 4 (a) показан фазовый портрет эритроцита, на рис. 4 (b) приведены изменения фазы в точках А, В и С фазового портрета, сплошной синей линией показаны средние флуктуации толщины клетки. На рис. 4 (c) показана карта распределения частот, на которой четко видно, что колебания имеют место преимущественно в районах внутренней и внешней мембраны эритроцита.

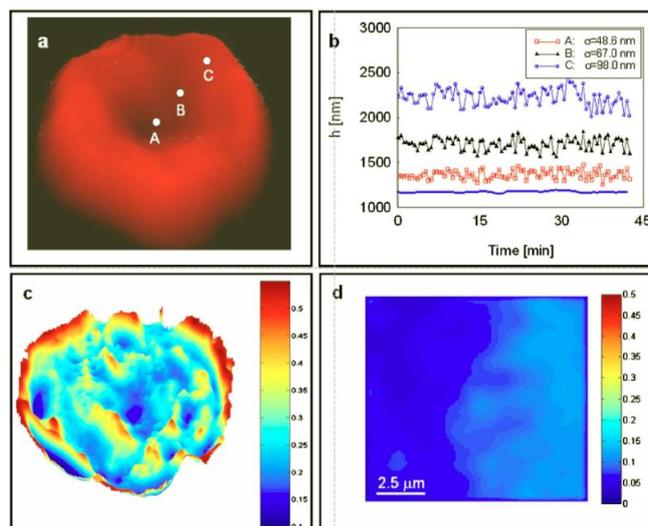


Рис. 4. (a) Фазовое изображение эритроцита, (b) временные флуктуации фазовой толщины соответствующие выделенным точкам в (a). Сплошная линия показывает средние флуктуации толщины клетки. (c) Карта средних частот флуктуаций вычисленные с помощью измеренного спектра мощности мембранных флуктуаций. Цветовая шкала показывает среднюю частоту в обратных минутах. Высокие значения на краях клетки вызваны поперечными колебаниями самой клетки. (d) усредненная частотная карта области.

Метод Гильберт-фазовой микроскопии идеально подходит для регистрации динамики клетки в широком диапазоне частот 0,1-130 Гц, однако разрешающая способность метода ограничена пространственной частотой интерференционных полос, что ограничивает использование метода для исследования динамики клеточных органелл субмикронного масштаба, а также интерпретацию полученных результатов. Более того, вертикальное разрешение описанной выше реализации метода НРМ ограничено 10 битной ПЗС камерой и не превышает 1,2 нм. Это ограничивает его применение при исследовании динамических процессов отражающихся в слабом изменении показателя преломления, например при окислении гемоглобина.

## 2.2. Оптическая когерентная томография клеток крови

Одним из классических методов интерференционной микроскопии является оптическая когерентная томография, лежащая в основе автоматизированного интерференционного микроскопа на базе

микроинтерферометра Линника МИИ-4 (рис. 5). МИИ-4 серийно выпускается предприятием ЛОМО и предназначен для визуальной оценки и измерения параметров шероховатости отражающих объектов.



Рис. 5. Автоматизированный интерференционный микроскоп.

1– автоматизированный двухкоординатный предметный стол; 2 – опорное зеркало на пьезоэлементе; 3, 5 – ПЗС-камеры; 4 – микроинтерферометр МИИ-4; 6 – лазерный осветитель с низкой пространственной когерентностью.

Важным достоинством этого интерферометра является возможность работы с широким источником пространственно-некогерентного монохроматического излучения. Наличие интерференционного контраста позволяет изучать живые неокрашенные клетки.

На рис. 6 представлено фазовое изображение эритроцита с параметрами сухого веса и морфометрии: эффективный радиус 4,3 мкм, площадь 58,7 мкм<sup>2</sup>, масса сухого вещества 48,3 пг.



Рис. 6. Фазовое изображение эритроцита с параметрами сухого веса и морфометрии.

К основным недостаткам относятся: сложности работы и настройки в белом и квазимонохроматическом свете, отсутствие видеорегистрации изображений, расшифровка интерферограмм производится оператором вручную. Это накладывает известные ограничения на точность и время измерений.

### 2.3. Исследование фликкера эритроцитов методом динамической микрофотометрии

Фликкер эритроцитов (ФЭ) представляет собой спонтанные низкочастотные изгибные колебания клеточной мембраны. Колебания формы возникают под действием высокочастотного электрического поля (1–2 МГц) с низкочастотной амплитудной модуляцией. Частотные спектры ФЭ измерялись для отдельных эритроцитов и для агрегатов типа монетных столбиков в диапазоне 0,03–500 Гц.

Серийный микроскоп MPV3 “Leitz” был модифицирован для обеспечения динамического фотометрирования клеток. На место стандартного блока для возбуждения люминесценции препаратов был установлен гелий-неоновый лазер ЛГ–78 на юстируемом столике. Это

позволило освещать препарат когерентным излучением лазера через наблюдательный объектив и реализовать оптический гетеродинный режим обратного рассеяния лазерного излучения.

Излучение лазера (показано на рисунке штрих–пунктиром) может быть направлено на объект как сверху, через светоделительную пластинку иллюминатора и наблюдательный объектив, так и снизу, через конденсор, при помощи поворотных зеркал (отмечены на рисунке дуговыми стрелками).

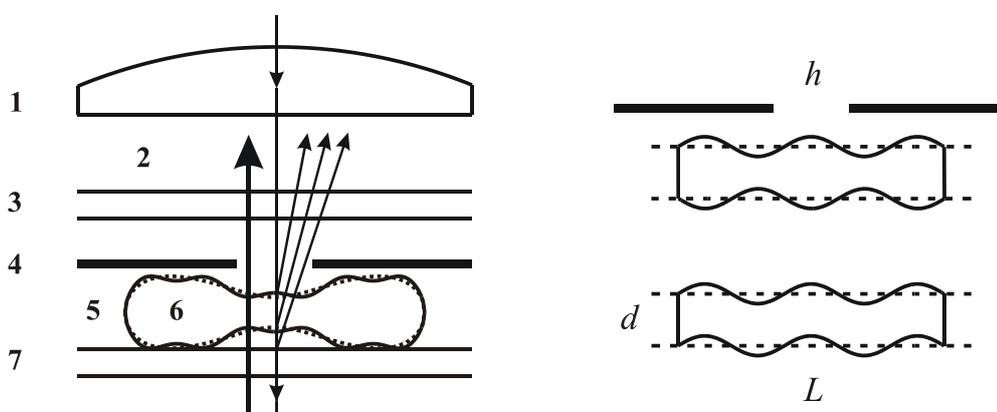


Рис. 7. Схема микрофотометрической регистрации фликкера мембраны в режимах фазового контраста (толстая стрелка) и отражательного лазерного зондирования (тонкие стрелки). 1 – объектив микроскопа; 2 – иммерсионное масло; 3, 7 – покровные стекла; 4 – проекция измерительной диафрагмы; 5 – физиологический раствор; 6 – эритроцит (пунктир – средний по времени, сплошная линия – мгновенный контур клетки). Справа – схематическое изображение контура дисковой модели эритроцита для симметричной (вверху) и антисимметричной (внизу) мод фликкера мембраны.

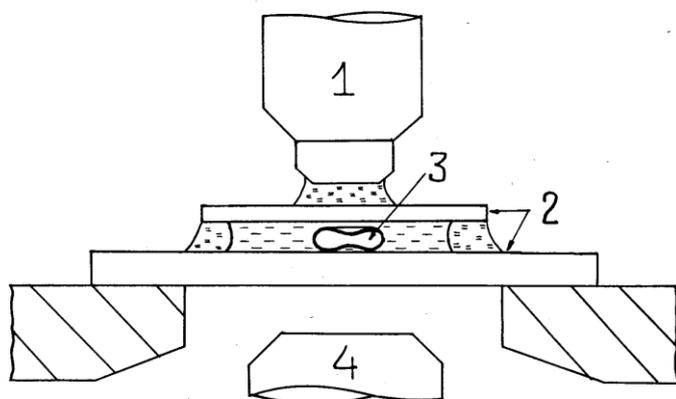


Рис. 8. Схематическое изображение микрокамеры в увеличенном масштабе фотометрируемого эритроцита. 1 – объектив микроскопа, 2 – покровные стёкла, 3 – эритроцит, 4 – конденсор.

Важной особенностью являлось то, что вследствие хаотической природы фликкера получение статистически достоверного спектра требует последовательной регистрации и усреднение нескольких сотен индивидуальных временных выборок сигнала.

Спектры измерялись двумя методами: путем регистрации спонтанных колебаний мембраны, индуцированных броуновским движением молекул в окружающей среде, и путем регистрации амплитудно-частотных характеристик вынужденных колебаний удлинения эритроцита под действием высокочастотного электрического поля с низкочастотной гармонической модуляцией амплитуды.

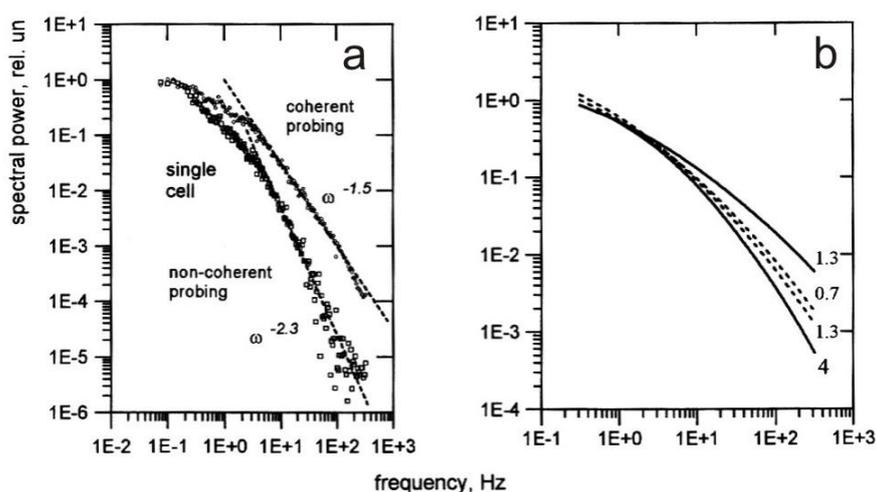


Рис. 9. Спектры фликкера одиночного эритроцита измеренные в режиме светорассеяния (сверху) и фазового контраста (внизу) (а), спектры фликкера, записанные в режиме фазового контраста, для двух эритроцитов (сплошные и пунктирные линии) с разным размером измерительной диафрагмы (б).

В работе показано, что спектры колебаний, измеренные обоими методами, не содержат резонансных частот и монотонно убывают с ростом частоты. В двойном логарифмическом масштабе наклон амплитудных спектров непостоянен, в отличие от спектров, типичных для многих флуктуационных и колебательных систем. Он изменяется от (0,4–0,6) в области ниже 10 Гц до (0,8–1,2) в области выше 50 Гц.

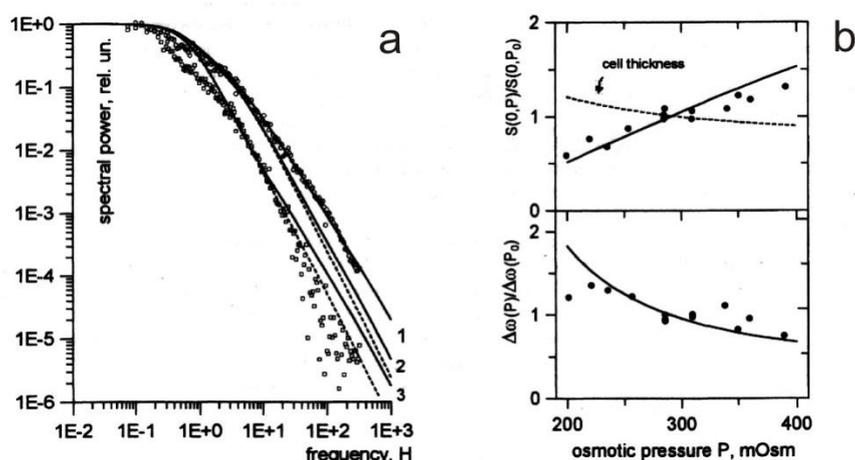


Рис. 10. Теоретические спектры фликкера (а): 1 – сумма всех режимов колебаний мембраны (спектр внутреннего фликкера); 2 – вклад вращательно симметричных режимов (симметричный и асимметричный режимы); 3 – вклад вращательно симметричных (симметричный режим). Сплошные линии для внутренней формы, пунктирные линии для инструментально искаженной формы для  $h = 4$  мкм. Рассчитанные изменения амплитуды нулевой гармоники (сверху) и эффективная ширина спектра (внизу) фликкера при изменении осмотического давления в окружающей среде.

Полученные экспериментальные данные, вместе с теоретическими оценками, доказывают отсутствие резонансных собственных колебаний формы нормальных эритроцитов человека.

#### 2.4. Метод локальной динамической микроскопии

На основе метода динамической фазовой микроскопии разработан новый метод локальной динамической микроскопии, который заключается в воспроизведении флуктуаций фазовой толщины биообъекта в одной точке изображения в реальном времени. Ввод сигнала в произвольной точке изображения является более привлекательным для интерактивного исследования локальной активности в реальном времени, который заключается в воспроизведении в реальном времени флуктуаций фазовой высоты объекта в произвольной точке его фазового портрета. Кроме того, метод локальной динамической микроскопии позволяет увеличить уровень восприятия сигналов флуктуаций фазовой толщины путем использования дополнительного канала звукового воспроизведения.

Оптическая схема экспериментальной установки показана на рис. 11. В качестве источника света используется ИК-лазер с длиной волны  $\lambda=875$  нм.

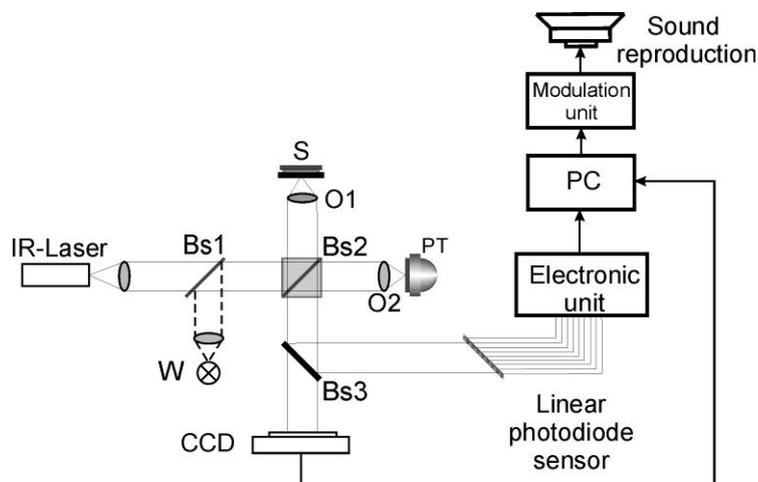


Рис. 11. Схема экспериментальной установки.

Принцип действия прибора заключается в следующем: излучение лазера проходит через светоделитель канала подсветки Bs1 и попадает на светоделитель Bs2, где разделяется на две равные части. Первый (объектный) фокусируется объективом O1 на объект S, и после отражения от полированной подложки образца S через светоделители Bs2 и Bs3 попадает на фотодиодную линейку и ПЗС камеру. Второй (опорный) луч, отражаясь от зеркала, закрепленного на пьезопреобразователе PT, через светоделители Bs2 и Bs3 также попадает на фотодиодную линейку и ПЗС камеру. В плоскости фотоприемника при сложении объектной и опорной волн возникает периодически изменяющаяся во времени интерференционная картина. Усиленные интерференционные сигналы с фотодиодной линейки поступают на вход 32-х канальной платы АЦП для дальнейшей параллельной обработки и вычисления оптической разности хода. В результате возникает возможность регистрации мгновенного фазового профиля биообъекта в реальном времени, а также регистрации флуктуаций фазовой толщины в одной точке профиля с временным разрешением порядка нескольких миллисекунд.

Фаза, в приближении геометрической оптики линейно связанная с ОРХ, измеряется методом временного интервала, следующим образом.

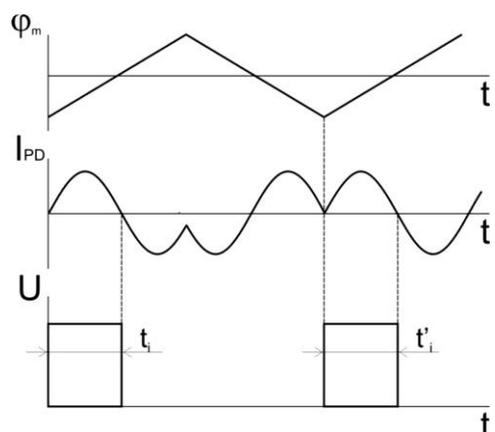


Рис. 12. Диаграмма вычисления ОРХ методом временного интервала.

При модуляции опорного плеча интерферометра по линейно периодическому закону (верхний график рис. 12) на выходе фотоприемника будет наблюдаться квазипериодический сигнал (средний график рис. 12), форма которого зависит от разности фаз интерферирующих лучей. Измерение ОРХ сводится к измерению длительности импульса (временного интервала) за период модуляции (нижний график рис. 12). Временной интервал формируется от старта опорного сигнала до первого пересечения нуля интерференционного сигнала. Длительность интервала пропорциональна фазе отраженного от объекта волнового фронта.

## 2.5. Устройство лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340.

### Получение изображений.

В основу метода модуляционной интерференционной микроскопии МИМ положен принцип измерения локальных фаз промодулированной объектом световой волны при полном контроле поляризации излучения. Учет фаз и контроль поляризации позволяет достичь непревзойденно высокого пространственного разрешения. Уникальной особенностью МИМ является принципиально новый алгоритм вычисления фазы отраженного от объекта волнового фронта, сочетающий в себе быстрдействие шаговых методов и

сверхразрешение фазометрических методов (метод временных интервалов). К настоящему моменту, быстродействие МИМ составляет 3 кадра в секунду при размере кадра 1280x1024 пикселей и до 250 кадров в секунду при размере кадра 128x128 пикселей. Использование такого подхода вовсе не означает, что МИМ использует тысячи интерферограмм для расчета фазы. Они только учитываются посредством специальной процедуры обработки сигнала, которая на 4 порядка снижает поток информации. Такое снижение позволяет осуществлять эффективную обработку сигнала на обычном персональном компьютере.

Оптическая схема лазерного канала представляет собой модификацию интерферометра Маха-Цандера с фазовым модулятором в опорном плече.

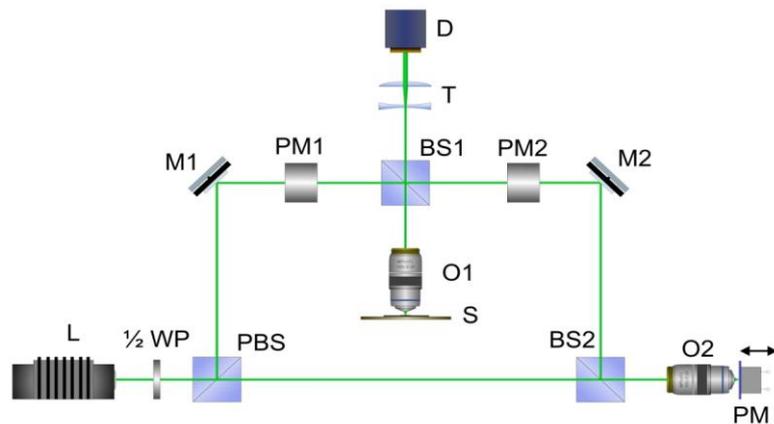


Рис. 13. Оптическая схема лазерного канала МИМ-340

Основное преимущество схемы Маха-Цандера состоит в возможности независимого управления поляризацией в объектном и опорном плечах интерферометра, а также последующим учетом поворота плоскости поляризации вносимого измеряемым образцом. Кроме того, применение новых конструкторских решений позволило существенно повысить жесткость конструкции, и, как следствие существенно снизить уровень собственных шумов прибора.

Управление поляризацией осуществляется при помощи автоматизированных поляризационных модуляторов (PM), позволяющих не

только вращать плоскости поляризации объектного и опорного лучей интерферометра, но и изменять тип поляризации на эллиптическую или круговую. Для анализа образцов, обладающих оптической активностью, перед CMOS камерой D устанавливается анализатор.

В качестве источника когерентного излучения используется твердотельный лазер с длиной волны 532 нм. Измеряемый объект размещается на столе S под микрообъективом O1. Сколлимированный пучок от лазера L проходит через полуволновую пластинку ( $1/2WP$ ) и затем расщепляется на поляризующем светоделителе PBS. Один из расщепленных пучков (объектный), фокусируется объективом O1 на объект S и после отражения от зеркальной подложки через светоделитель BS1 и телескопическую систему T попадает на фотоприемник D. В качестве фотоприемника используется 12-ти битная CMOS камера Silicon Imaging модель SI – 1280f.

Опорный пучок фокусируется объективом O2 на зеркало, закрепленное на пьезо-приводе PM, осуществляющее линейно-периодическую модуляцию OPX, и после отражения от него также попадает на фотоприемник. Фазовое изображение формируется модернизированным трехшаговым методом. В отличие от традиционных многошаговых методов, алгоритм расчета фазы, реализованный в МИМ, состоит в том, что точки стояния опорного зеркала и закон его перемещения выбираются из соображений минимизации погрешностей измерения фазы.

При исследовании на МИМ объектов достигается разрешение порядка 0,1 нм (по вертикали) и 15–100 нм – в плоскости объекта, что значительно превышает классический предел разрешения для световых микроскопов.

В МИМ в качестве окончательного результата измерений получают следующие параметры исследуемого объекта:

- карта истинных высот объекта, что эквивалентно ступенчатой аппроксимации рельефа;

- карта местной нормали, что эквивалентно аппроксимации рельефа линейными сплайнами;
- распределение оптических материальных параметров в приповерхностном слое объекта.

Восстановление параметров собственно объекта по результатам измерения распределения физических параметров рассеянного им света представляет собой завершающий этап исследования. Для оптических методов высокого разрешения этап требует весьма серьезного теоретического анализа. Однако в большинстве случаев вместо такого анализа используются простейшие эмпирические соображения. Например, в фазовых приборах, полученный фазовый рельеф отождествляется с истинным геометрическим рельефом объекта.

Отсутствие эффективного и универсального подхода к интерпретации результатов измерения физических параметров света, рассеянного объектом приводит к недопустимому сужению круга исследуемых объектов и числа исследуемых параметров.

В оптике наиболее распространены фазы Рытова-Владимирского  $\varphi_{RV}$  и Панчарантнама  $\varphi_P$ . Фаза Панчарантнама  $\varphi_P$  возникает в том случае, когда поляризация луча, двигающегося по оптической системе, меняется циклическим образом, так что соответствующая ей точка на сфере Пуанкаре описывает замкнутый контур. В этом случае начальное и конечное состояния света будут отличаться на фазу  $\varphi_P$ , величина которой определяется значением телесного угла, опирающегося на контур, который описала точка на сфере Пуанкаре. Фаза Рытова-Владимирского  $\varphi_{RV}$  имеет чисто геометрическую природу. Для её описания, аналогично сфере Пуанкаре, вводят сферу направлений и откладывают на ней траекторию луча, проходящего через оптическую систему. В случае, когда направления входящего и выходящего лучей совпадают, эта траектория имеет вид

замкнутого контура. Изменение поляризации луча определяется как величиной телесного угла, опирающегося на такой контур, так и его исходной поляризацией.

Другими словами, предполагается, что фаза Рытова-Владимирского применяется для определения ориентации элементов поверхности изучаемого объекта, с помощью фазы Панчарантнама можно изучать внутреннюю структуру прозрачных образцов, используя схемы интерферометров, действующих "напросвет" (просвечивая объект в разных направлениях и выделяя с помощью фазы Панчарантнама нужную информацию, можно затем с помощью томографических методов восстановить распределение коэффициента преломления во всем объеме образца).

### **3. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФАЗОВОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ**

Понимание происходящих в эритроцитах процессов имеет фундаментальное значение для физиологии и медицины. Одним из проявлений этих процессов являются метаболически зависимые кооперативные флуктуации.

Метод динамической фазовой микроскопии, которым регистрировались в реальном времени пространственно-временные флуктуации фазовой толщины эритроцитов заключается в периодическом сканировании профиля фазовой толщины объекта вдоль определенной линии (скан-линия). В результате, мы имеем возможность наблюдать флуктуации фазовой толщины объекта в каждой точке скан-линии, с временным разрешением порядка нескольких миллисекунд.

При измерении методом растровой фильтрации выявлялись области метаболической активности. На фазовых портретах (рис. 14) видно, что области активности располагались преимущественно на границах эритроцита

и в его тороидальной части, при этом амплитуды флуктуаций были порядка 10–15 нм. Важным является разделение внутренней динамики клетки и поперечных колебаний самого эритроцита.

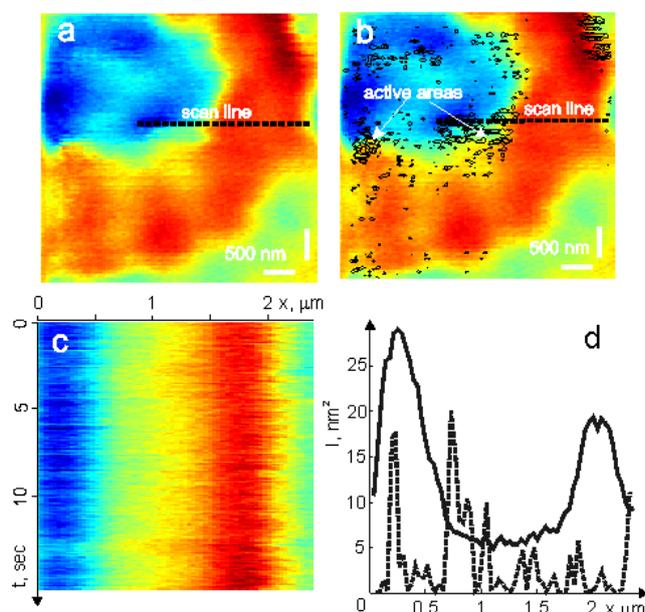


Рис. 14. Фазовый портрет участка эритроцита (а), фазовый портрет участка эритроцита с нанесенными контуром областями метаболической активности (b), трек-диаграмма, записанная вдоль скан-линии в течение 14 сек. (с), поперечное сечение фазового портрета и интенсивность флуктуаций (пунктирная линия) (d).

На фазовом портрете выбиралась скан-линия, вдоль которой записывались и воспроизводились в реальном времени флуктуации фазовой толщины. В подавляющем большинстве случаев скан-линия проводилась горизонтально через области с максимальной амплитудой флуктуаций (рис. 14d).

Проведение корреляционного анализа для выявления природы флуктуаций было основано на сопоставлении колебаний в различных точках сечения.

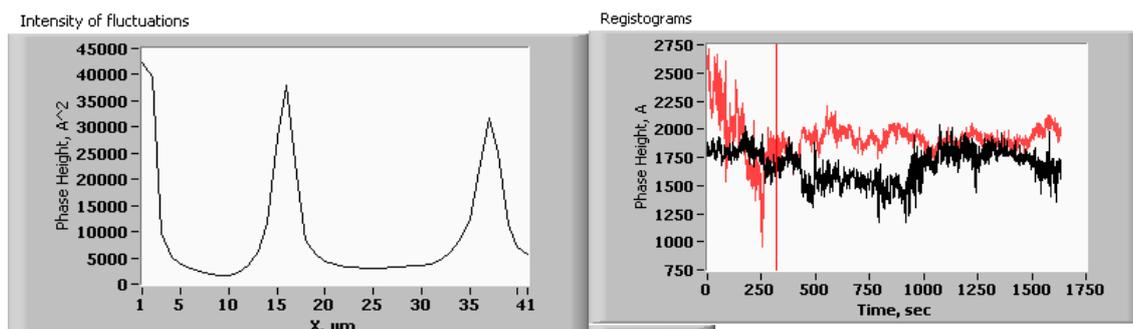


Рис. 15. Интенсивность флуктуаций в различных точках сечения эритроцита (слева) и флуктуации фазовой толщины эритроцита записанные в точках с максимальной амплитудой флуктуаций (справа).

На рис. 15 (справа) показано, что флуктуации фазовой толщины в точках с максимальной амплитудой происходят в противофазе, следовательно, эти колебания вызваны поперечными колебаниями самого эритроцита.

Из полученных результатов следует, что на стенках эритроцита наблюдаются взаимные колебания на частотах 2,5–2,8 Гц (что соответствует частотам синтеза АТФ). Однако, из-за того, что большинство колебаний наблюдается в противофазе, возможно, что данные колебания вызваны поперечными колебаниями самого эритроцита.

Важным преимуществом лазерной интерференционной микроскопии по сравнению с другими методами визуализации является способность с высокой точностью оценить перераспределение оптической плотности внутри клетки. Этот метод позволяет представить интерференционные изображения цветowych каналов и результирующее цветное изображение.

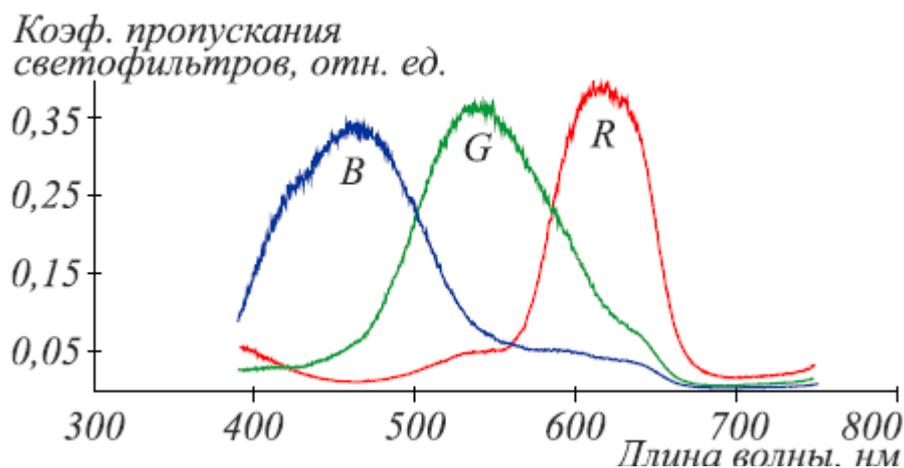


Рис. 16. Кривые пропускания красного R, зеленого G и синего B светофильтров матрицы.

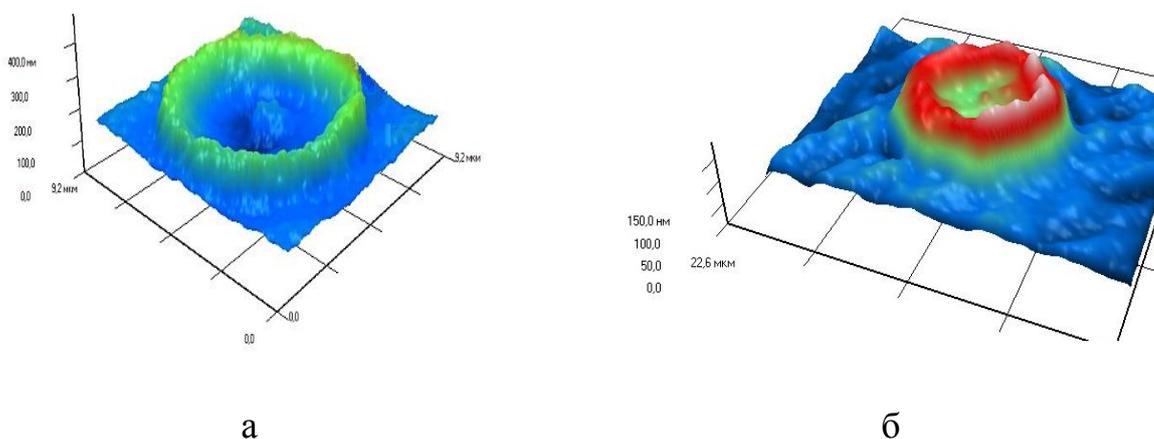


Рис. 17. Фазово-интерференционный портрет эритроцитов.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что фазовые портреты, возможно, характеризовать по длинам волн. Так, длина волн фазового портрета на рис. 17а находятся в области 500–600 нм, а фазового портрета рис. 17б преобладает увеличение длины волны до 600–650 нм. Данная динамика может быть связана с несколькими процессами, происходящими в клетках. Характерные максимумы поглощения для оксигемоглобина ( $\text{HbO}_2$ ) наблюдаются на длинах волн 541 и 576 нм, для других форм гемоглобина с  $\text{Fe}^{2+}$  они также находятся в области 500–600 нм. При окислении железа и увеличении количества метгемоглобина происходит смещение спектра к 630 нм. Кроме того, увеличение длины волны может

свидетельствовать об увеличении плотности упаковки гемоглобина. Следует учитывать также, что изменение фазового портрета может быть связано с изменением внутриклеточных продуктов метаболизма в клетке. Показано, что смещение спектра в сторону 650 нм наблюдается при увеличении  $H_2O_2$ .

Таким образом, фазовая картина эритроцитов, полученная с использованием интерференционной микроскопии позволяет оценивать перераспределение плотности клеток, что может зависеть от метаболической активности эритроцитов.

В рамках анализа измерения интегрального показателя преломления эритроцитов проведен анализ действия модифицирующих агентов.

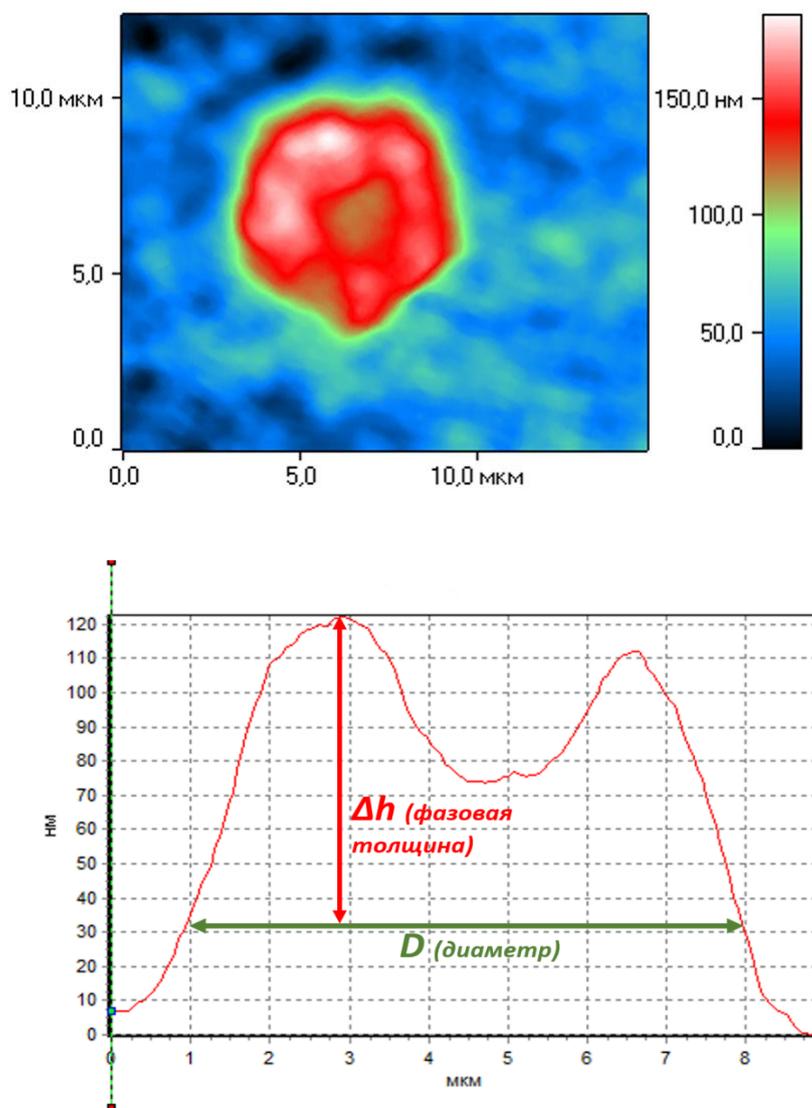


Рис. 18. Фазовое изображение (топограмма) (а) и профиль фазовой толщины (б) нормального эритроцита (дискоцита).

Анализ оптико-геометрических параметров показал, что фазовая высота эритроцитов, инкубированных с кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), пропранололом ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и глутаровым альдегидом (0,1%) снижалась относительно контроля на 18, 29 и 19% соответственно ( $p < 0,05$ ). В то же время после инкубация с адреналином ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) наблюдали рост фазовой высоты эритроцитов на 3% ( $p < 0,05$ ). Фазовый диаметр эритроцитов относительно значений контрольной группы увеличивался после инкубации клеток с глутаровым альдегидом (0,1%) на 8% ( $p < 0,05$ ), а после действия кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) или пропранолола ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл), напротив, снижался на 3,2 и 5% соответственно ( $p < 0,05$ ). При оценке показателей метаболизма эритроцитов установлено, что после воздействия модифицирующих агентов концентрация маркерного субстрата кислородного обеспечения – 2,3-ДФГ – во всех случаях значительно снижалась. Влияние используемых соединений на энергетический потенциал красных клеток крови было подтверждено изменением содержания АТФ под их воздействием. Выявлено статистически значимое повышение содержания АТФ в эритроцитах после их инкубации с кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) на 9%, пропранололом ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) на 5% и статистически значимое снижение – под воздействием адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) на 35% и глутарового альдегида (0,1%) на 8%. Концентрация МДА в эритроцитах, характеризующего интенсивность перекисного окисления липидов, значимо снижалась на 45% при действии кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), на 47% при действии пропранолола ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и увеличивалась при действии адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и глутарового альдегида (0,1%) на 27 и 17% соответственно.

Результаты продемонстрировали зависимость оптико-геометрических характеристик эритроцитов от особенностей их структурно-функциональной организации. Усиление метаболической активности клеток на фоне снижения окислительного потенциала при воздействии на эритроциты кортизола и пропранолола сопровождалось уменьшением фазовой высоты и фазового

диаметра эритроцитов. Снижение метаболической активности на фоне усиления окислительного стресса при воздействии на красные клетки крови адреналина и глутарового альдегида вызывало увеличение либо фазовой высоты, либо фазового диаметра клеток.

Анализ представленных данных позволяет заключить, что лазерная интерференционная микроскопия позволяет в режиме реального времени проводить метаболическую оценку состояния живых эритроцитов, что повышает информативность и объективизирует данные о морфологических особенностях и функциональных возможностях клеток.

**Лазерная интерференционная микроскопия в качестве метода анализа  
функционального состояния эритроцитов**

Методические рекомендации

Дерюгина Анна Вячеславовна  
Иващенко Марина Николаевна  
Игнатъев Павел Сергеевич  
Таламанова Мария Николаевна

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
Национальный исследовательский университет  
603950, Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23.

Подписано к печати. Формат 60×84 1/16  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл.печ.л. 1,5 Уч.-изд.л.  
Заказ. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии госуниверситета им. Н.И. Лобачевского  
603600, г. Н. Новгород, ул. Большая Покровская, 37  
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01.

