

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Уральский федеральный университет имени первого Президента
России Б.Н.Ельцина»

На правах рукописи

МАЛЫГИН Александр Сергеевич

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЗМА ИНТАКТНЫХ И ЗАРАЖЕННЫХ
ВИРУСОМ КЛЕТОК МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ СПЕКТР-
ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

Специальность 05.11.17 - Приборы, системы и изделия медицинского
назначения

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата
технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
А.П. Владимиров

Екатеринбург - 2015

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5-11
Глава 1. Лазерные методы изучения биологических объектов и постановка задач исследования	12
1.1 Лазерное излучение и биологический объект	12-13
1.2 Виды взаимодействия лазерного излучения с живыми объектами	14-17
1.3 Применение когерентно - оптических методов измерения и контроля в биологии и медицине	18-21
1.4 Культуры клеток. Преимущества использования культивируемых клеток в экспериментах	22-24
1.5 Метаболическая активность клеток	25-29
1.6 Оптические свойства клетки и динамика спеклов	30-35
1.7 Вирус простого герпеса. Морфология и внутриклеточное развитие	36-39
1.8 Современные подходы к диагностике герпетической инфекции	40-41
1.9 Постановка задачи	42-43
Глава 2. Теория метода и выработка требований к оптической системе	44
2.1 Теория динамики спеклов микроскопических процессов	44-49
2.2 Метод усреднения во времени в динамической спекл-интерферометрии тонких прозрачных объектов	50-53
2.3 Разработка оптической системы в соответствии с требованиями теории	54-55
Глава 3. Объект исследования и техника эксперимента	56
3.1. Клеточная линия Л - 41 КД84, подготовка культуры клеток Л-41 КД/84	57-60
3.2 Клеточная линия Vero, подготовка культуры клеток	61
3.3 Клеточная линия ЛЭЧ-3, подготовка культуры клеток	62-63
3.4 Процедура получения вируса герпеса простого ВПГ-1	64-65
3.5 Оптическая установка	66-67

	3
3.6 Программное обеспечение	69-76
3.7 Методика проведения экспериментов	77-79
3.8 Вопросы метрологии и погрешности измерений	80-86
3.9 Общие выводы по главе №3	87
Глава 4. Результаты исследований и их обсуждение	88
4.1 Эксперимент с питательным раствором	88-93
4.2 Исследование зависимостей активности слоя клеток Л-41 КД/84 от температуры	94-102
4.3 Эксперименты со слоем клеток Л-41 КД/84, зараженных герпесвирусной инфекцией	103-111
4.4 Исследование метаболизма интактных и зараженных ВПГ-1 клеток Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3 в режиме реального времени	112-122
4.5 Экспресс-диагностика вируса простого герпеса	123-127
4.6 Обсуждение и выводы по экспериментальной части	128-130
5. Заключение	131-132
Библиографический список	133-140
Приложения:	
Приложение 1. Акт внедрения результатов работ в ФБУН "ЕНИИВИ" РОСПОТРЕБНАДЗОРА	141
Приложение 2. Справка об использовании результатов исследований в НОЦ «Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ	142
Приложение 3. Акт внедрения в учебный процесс ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» результатов работ	143

Список сокращений

A	амплитуда волны
σ	вариация разности оптических путей пар волн
D	диаметр диафрагмы
k_{II}	дисперсия изменяющихся во времени фаз волн
λ	длина волны
I	интенсивность излучения
ρ	коэффициент корреляции спекловых изображений
l	оптическая длина пути волны
Δu	оптическая разность хода
n	показатель преломления среды
m	увеличение линзы
φ	фаза волны
f	фокусное расстояние
$k_{II}(\tau)$	временная автокорреляционная функция разностей фаз двух волн
N	число центров рассеяния
ВПГ-1	вирус простого герпеса
ГВИ	герпесвирусная инфекция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКТ	оптическая когерентная томография
ПВК	пространственно-временная картина
СКО	среднеквадратическое отклонение
ОПП	оригинальный программный пакет
ОПО	оригинальное программное обеспечение

Введение

Актуальность темы

Современные медицинские технологии базируются на фундаментальных исследованиях в физике, математике, химии и биологии. Хорошими примерами являются достижения в области медицинской томографии [1-3]. Другой не менее важный пример относится к развитию лазерных технологий. В общем случае применение лазеров в медицинских исследованиях основано на использовании широкого круга явлений, связанных с разнообразными эффектами взаимодействия света с биологическими объектами [1-5].

Расширение использования оптических, в том числе когерентно-оптических методов для контроля состояния объектов и диагностики обусловлено доступностью, быстродействием, наглядностью информации при возможности обеспечения высокой точности измерений. Кроме того, соизмеримость световой волны с элементами микроструктуры контролируемого объекта и интерференция многих волн дают возможность для изучения структур и объекта на микроуровне.

При попадании когерентного света на неоднородную структуру световые волны, отражённые от многочисленных центров рассеяния этой структуры, накладываются друг на друга и создают интерференционную спекл-картину. “Спекл” в переводе с английского означает пятно. Полученная картина из светлых и тёмных пятен отражает мгновенное состояние структуры объекта. При любом изменении структуры изменяются амплитуды и фазы рассеянных волн и картина спеклов меняется. Таким образом, динамика спеклов отражает динамику структуры объекта контроля [6].

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 [6,7,8,9,10,11-13]. Ранее динамика спеклов уже использовалась для оценки биологической активности семян [14], кожи человека [15] и других объектов.

Одним из наиболее успешных примеров использования биоспеклов является разработка подхода, предложенного впервые в работах [16,17] 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 [18].

Несмотря на указанные выше успехи в области теоретических и экспериментальных исследований динамических спеклов, свойства динамики спеклов, обусловленной микроскопическими процессами в клетках живых систем, изучены в недостаточной степени. Вместе с тем изучение процессов, протекающих в мембранах клеток и в самих клетках, является задачей, актуальной с научной и практической точки зрения.

Актуальность таких исследований связана с тем, что болезни людей прямо или косвенно связаны с нарушением нормального функционирования клеток или биологических мембран. В основе многих заболеваний лежат изменения структурно-функциональных свойств молекулярных компонентов клеток, возникающие под воздействием, как внешних факторов, так и внутренними функциональными расстройствами. Примером может служить цитопатогенное действие вируса простого герпеса. Среди вирусных заболеваний герпес занимает одно из ведущих мест. Это обусловлено повсеместным распространением вируса, многообразием клинических проявлений заболевания и, как правило, хроническим его течением, а также различными путями передачи возбудителя инфекции. Герпес может сопровождаться поражениями глаз, печени, слизистых оболочек и кожных покровов, поэтому всесторонние исследования механизмов функционирования клеток и биомембран в норме и при патологии (например, при герпесвирусной инфекции) необходимы как для разработки методов лечения и профилактики заболеваний, так для создания новых лекарственных препаратов. Внедрение новых экспресс - методов диагностирования зараженных клеточных культур может значительно сократить время исследований, постановки диагноза и улучшить качество лечения. В этих условиях особенно важны экспрессные

методы диагностики, в тоже время обладающие высокой надежностью получаемых результатов.

Наиболее удачными объектами в плане изучения метаболической активности клеток, являются клетки, культивированные на прозрачной подложке. Ранее исследования на культивированных клетках с применением спеклов не проводились. Поэтому было неизвестно, достаточна ли чувствительность метода для изучения микроскопических процессов в мембранах и в клетках. Теоретическое описание динамики спеклов, вызванной случайными изменениями фаз волн в тонких прозрачных объектах было дано в работе [19]. Было неясно, можно ли применять результаты теории для анализа процессов в клетках, как разделять эффекты, связанные с жизнедеятельностью клеток и с изменениями в среде поддержания, и какой параметр динамики спеклов следует использовать для непосредственной оценки активности клеток.

В связи с этим, **целью настоящей работы** являлось разработка динамического спекл-интерферометрического метода оценки метаболизма интактных и зараженных вирусом культивированных клеток. Для достижения поставленной цели в диссертационной работе были решены следующие задачи:

- научное обоснование и создание установки для оценки метаболизма интактных и зараженных вирусом культивированных клеток методом динамической спекл-интерферометрии;
- поиск и выбор параметров динамики спеклов, характеризующих метаболическую активность клеток;
- изучение температурных и временных зависимостей динамики спеклов, характеризующих метаболическую активность интактных и зараженных клеток;
- оценка погрешностей, чувствительности и воспроизводимости результатов, выработка рекомендаций для метрологической аттестации и практического применения метода.

Научная новизна

1. Разработан метод динамической спекл-интерферометрии с помощью которого экспериментально изучена метаболическая активность культивируемых на прозрачной подложке перевиваемых клеток. На основе данного метода разработана и откалибрована оптическая установка, позволяющая проводить оценку метаболизма интактных и зараженных вирусом герпеса клеток.

2. Впервые показано, что в плоскости изображения клеток имеется хорошее совпадение теоретической и экспериментальной зависимости временной автокорреляционной функции интенсивности излучения $\rho = \rho(\tau)$. В качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток выбран коэффициент корреляции цифровых спекловых изображений ρ и связанная с ним, вариация σ разности оптических путей Δl пар волн.

3. Показано, что при экспозициях телекамеры $T=0,04-0,1$ с. на временном интервале длительностью 20-40 с. зависимость $\rho = \rho(\tau)$ через определенное время $\tau_k \approx 5-8$ с. выходит на постоянный уровень ρ^* . Впервые обнаружен температурный эффект уменьшения величины ρ^* за счет термостимулированных метаболических процессов в клетках. Однако величины ρ^* , измеренные через 0,5 часов в течение 1-2 суток, характеризуются большим разбросом значений, а соответствующие зависимости $\rho^*(\tau)$ от времени недостаточно хорошо воспроизводятся.

4. Теоретически обоснован и экспериментально применен метод усреднения интенсивности излучения во времени, предусматривающий выбор времени экспозиции телекамеры, превышающего время релаксации τ_0 величины Δl , который позволяет получать в течение 1-2 суток хорошо воспроизводимые зависимости $\rho = \rho(\tau)$. Показано, что для интактных и зараженных вирусом герпеса трех клеточных культур зависимости $\rho = \rho(\tau)$ имеют аналогичный вид, а именно величина ρ нелинейно уменьшаются по мере увеличения времени τ .

5. Зависимости $\rho = \rho(\tau)$ для клеточных культур, зараженных герпесом и интактных клеточных культур, существенно различаются. Это различие надежно обнаруживается через 10 минут после начала эксперимента.

Практическая ценность

Практическая ценность результатов исследований, полученных в диссертационной работе, формулируется следующим образом:

1. Результаты работы расширяют представления о возможностях применения метода динамической спекл-интерферометрии. Установленная взаимосвязь параметра динамики спеклов, характеризующего метаболическую активность клеток, а именно коэффициента корреляции цифровых спекловых изображений ρ с вариацией разности оптических путей пар волн σ , позволили создать и успешно эксплуатировать лабораторную исследовательскую установку, защищенную патентом на полезную модель № 140765 от 20 мая 2013 г.

2. На основе теории динамической спекл-интерферометрии и эксплуатации созданной лабораторной установки выработаны технические требования по разработке опытного образца и рекомендации по его использованию в ЕНИИВИ (Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций), что позволит оценить факт заражения ВПГ-1 клетки через 10 минут после начала измерений (в 24 раза меньше времени обнаружения вируса герпеса традиционными методами).

3. Теоретические и экспериментальные результаты работы по исследованию метаболической активности живых перевиваемых клеточных культур могут быть использованы для разработки новых методов своевременной диагностики и комплексного лечения различных заболеваний, а так же индивидуального подбора лекарств.

4. Результаты работы по исследованию метаболической активности зараженных ВПГ-1 клеточных культур в режиме реального времени имеют научно-методологическое значение и могут быть использованы в сфере образования в области естественных и технических наук по направлению 12.03.04 “Биотехнические системы и технологии”, в современных учебных курсах по биофизике и физической оптике.

Положения, выносимые на защиту

1. Установленные взаимосвязи параметров динамики спеклов, характеризующие метаболическую активность клеток, культивируемых на подложке - коэффициент корреляции цифровых спекловых изображений ρ и связанную с ним, вариацию разности оптических путей пар волн σ , позволили создать экспериментальную установку и реализовать метод динамической спекл-интерферометрии.

2. Вывод о том, что использование варианта усреднения спекловых изображений во времени позволило увеличить степень корреляции массивов величин σ для клеток с вирусом ВПГ-1 и без вируса со значений 0,23 до 0,87, тем самым обеспечив получение хорошо воспроизводимых результатов.

3. Вывод о возможности применения метода динамической спекл-интерферометрии в качестве экспресс-метода оценки присутствия ВПГ-1 в клеточных культурах.

Достоверность полученных в работе результатов

Достоверность результатов обеспечивается корректностью поставленных задач и их физической обоснованностью, использованием стандартного оборудования и комплектующих материалов, современных методов исследования, большим массивом экспериментальных данных и их обработкой, сопоставлением полученных результатов с литературными данными.

Личный вклад автора

Постановка целей и задач исследований была проведена совместно с научным руководителем. Автором самостоятельно адаптирована теория динамики спекл-интерферометрии к изучению метаболизма клеток. Проведение экспериментальных исследований осуществлено автором. Анализ, интерпретация результатов моделирования экспериментальных данных, а так же формулировка выводов защищаемых положений диссертации принадлежит лично автору.

Большая часть экспериментов была проведена на базе ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора и автор

выражает благодарность сотрудникам Бахареву А.А. и Порываевой А.П. за помощь при проведении экспериментов и обсуждение полученных результатов.

Апробация работы и публикации

Результаты и выводы диссертации опубликованы в 15 научных работах [19-33] (в том числе 3 статьи в научных журналах из перечня ВАК, 4 статьи в других изданиях, 8 публикаций в материалах российских и международных конференций) и представлены на 11й международной семинар-ярмарка Российские технологии для индустрии (Санкт-Петербург, 2007), 8ой Международной Конференции “Измерение вибрации лазером” (Италия, Анкона, 2008), XII Всероссийской юбилейной молодежной школе - семинаре по проблемам физики конденсированного состояния вещества (Екатеринбург, 2012), Saratov Fall Meeting - 12 (25-28 сентября 2012, Саратов), XXVIII школе-симпозиуме по голографии и когерентной оптике (Нижний Новгород, 2013), 11ой Международной Конференции “Измерение вибрации лазером и бесконтактными методами” (Италия, Анкона, 2014), и III Всероссийском конгрессе молодых ученых в Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики (Санкт-Петербург, 2014). Оформлен патент на полезную модель № 140765 от 20.05.2014 г [34].

Глава 1. Лазерные методы изучения биологических объектов и постановка задач исследования

1.1 Лазерное излучение и биологический объект

Биологический объект представляет собой достаточно сложную структуру, поэтому общая картина взаимодействия лазерного излучения в световом диапазоне от ультрафиолетового до инфракрасного с биологическими тканями и жидкостями далека от завершения в смысле строгого научного обоснования и понимания всех механизмов действия лазерного излучения на биоткань. Пока несомненно лишь одно - лазерное излучение обладает самым разнообразным, многофакторным воздействием на биологические объекты. Особенности и степень его воздействия зависят от условий освещения, его энергетических, спектральных и временных характеристик, а также от оптических и других биофизических свойств самой ткани.

В настоящее время методы связанные с использованием лазеров в медицине используются в хирургии, терапии, стоматологии, офтальмологии, гинекологии, педиатрии, ветеринарии и других областях медицины [1-14,35-49].

Отличительной чертой лазерного излучения является его когерентность.

Когерентность, в переводе с латинского языка (*cohaerens*), означает "находящийся в связи". А это значит, что в различных точках пространства в одно и то же время или в одной и той же точке в различные отрезки времени световые колебания координированы между собой. Колебания когерентны, если разность их фаз постоянна во времени и при сложении колебаний получается колебание той же частоты. Благодаря данному свойству лазерное излучение используется для измерения и контроля различных объектов, в том числе параметров состояния биологических культур.

Одним из перспективных направлений в медицине является диагностика с использованием лазеров. Она способна дополнить существующие методы

лабораторного клинического анализа и может использоваться в самых различных областях медицины.

Это направление предполагает использование низкоинтенсивного лазерного излучения для зондирования тканей и органов с целью получения по отраженному (рассеянному) сигналу диагностической информации о состоянии обследуемого органа или ткани. Преимущества его очевидны. Оно является немедикаментозным, неинвазивным, при этом используемое излучение имеет широкий спектральный диапазон, характеризуется возможностью электронного компьютерного контроля и другими преимуществами [7,40-48].

1.2 Виды взаимодействия лазерного излучения с живыми объектами [7]

Лазерное излучение, так же как и обычный свет, может поглощаться, отражаться, рассеиваться, переизлучаться биологической средой; и каждый из указанных процессов несет информацию о микро- и макроструктуре этой среды, движении и форме отдельных ее составляющих (рис. 1). Видимый и ультрафиолетовый свет могут оказывать фотобиохимическое действие (примером является механизм зрения). Световое излучение - от ультрафиолетового (УФ) до инфракрасного (ИК) - обладает большей специфичностью по отношению к биологическим системам, чем коротковолновое рентгеновское и γ -излучение или длинноволновое электромагнитное излучение радиодиапазона, что связано с большим разнообразием процессов взаимодействия света с молекулами (диссоциация, электронное возбуждение, колебательное или вращательное возбуждение). Фотоны малых энергий (дальнее ИК и терагерцовое излучение, излучение крайне высоких частот (КВЧ) и сверхвысоких частот (СВЧ) радиодиапазона) могут оказывать селективное действие на некоторые биомолекулы и их комплексы с окружением, например за счет возбуждения вращательных уровней, механических колебаний макромолекул или акустических колебаний в клеточных мембранах, но в основном их действие неспецифическое и сводится к тепловому. Фотоны рентгеновского и более коротковолнового излучения имеют настолько высокую энергию, что могут с одинаковой эффективностью ионизировать любую молекулу, входящую в состав сложноорганизованной биологической материи, поэтому их взаимодействие с молекулами не зависит от химической природы молекул.

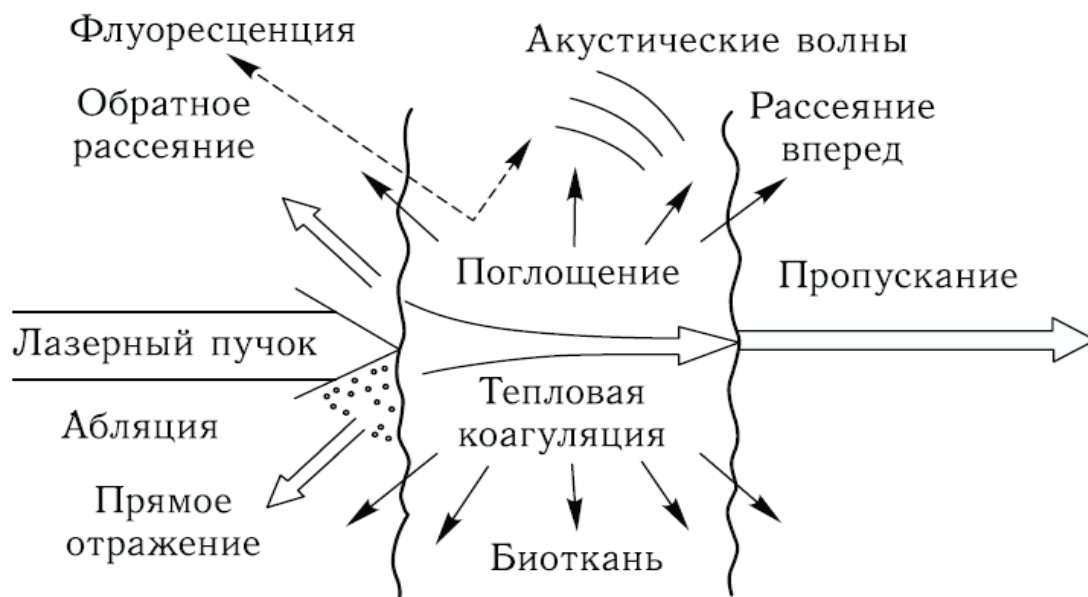


Рисунок 1 - Виды взаимодействия лазерного излучения с биотканью

Лазерное излучение умеренной интенсивности оказывает неспецифическое тепловое, а высокой интенсивности - разрушающее (деструктивное) действия на биообъекты, т. е. проявляет себя как электромагнитное излучение любой другой природы.

В отличие от нелазерных источников света тепловое действие и фоторазрушение могут быть осуществлены в очень малых объемах (в пределах клетки или даже ее частей). Таким образом, процессы, характеризующие взаимодействие лазерного излучения с биообъектами, можно разделить на три группы. К первой группе относятся все невозмущающие процессы (по крайней мере, не оказывающие заметного действия на биообъект), ко второй - процессы, в которых проявляется фотохимическое или тепловое действие, и к третьей - процессы, приводящие к фоторазрушению (абляция, фотокоагуляция) (рис. 1).

Поскольку рассматриваются живые объекты, то помимо физико-химических проявлений светового излучения необходимо учитывать влияние света на функционирование живой материи, определяющееся степенью гомеостаза живого объекта. Степень гомеостаза является функцией эволюционного развития и оказывается наименьшей у биологических молекул и наивысшей у позвоночных животных. Излучение малой интенсивности не

запускает адаптационные механизмы биосистемы, т. е. не затрагивается ее гомеостаз. При небольшом увеличении интенсивности происходят лишь возмущения локального гомеостаза, и не во всяких исследованиях они обнаруживаются. Рост интенсивности включает общие адаптационные и регуляционные механизмы живого объекта, полностью восстанавливающие систему, если интенсивность не слишком велика. При дальнейшем увеличении интенсивности они уже не справляются с полным восстановлением системы и происходят частично необратимые процессы. Такие необратимые изменения нарастают, и происходят разрушения в системе, но объект можно еще считать “живым”. В области очень больших интенсивностей разрушения оказываются настолько значительными, что объект уже не может считаться “живым”.

Таким образом, при сравнительно малых интенсивностях оказывается возможным с помощью света изучать процессы, происходящие в живом объекте, не внося серьезных возмущений в его поведение. Представляет интерес область очень малых интенсивностей, в которой возможно применение ряда наиболее чувствительных методов исследования, не требующих сильных световых потоков и, следовательно, не вносящих искажений в результаты измерений за счет гомеостаза живой материи даже на локальном уровне. В области очень больших интенсивностей измерения также оказываются неискаженными за счет регуляторных механизмов биосистемы, поскольку она уже “неживая”, однако исследователь в данном случае имеет дело лишь с органической материей, состав и свойства которой соответствуют моменту прекращения жизнедеятельности.

Важно вводить количественные критерии, которые могли бы грубо определять уровень высокой и низкой (для функционирования живого организма) интенсивности. При этом важно сравнивать интенсивности света лазерного и нелазерного, используемого в том или ином исследовании. В зависимости от условий эксперимента такое сравнение следует вести либо по параметрам плотности мощности (интенсивности) ($\text{Вт}/\text{см}^2$) или энергии ($\text{Дж}/\text{см}^2$) светового излучения, падающего на объект, либо по параметрам спектральной плотности мощности ($\text{Вт}/(\text{см}^2 \text{ нм})$) или энергии ($\text{Дж}/(\text{см}^2 \text{ нм})$). Для ориентировки можно

считать пороговыми параметрами для низкоинтенсивного излучения параметры излучения естественного светила - Солнца. Интегральная плотность мощности излучения Солнца в зените в диапазоне 250–2500 нм составляет 85 мВт/см².

Для взаимодействия света с биологическими объектами являются важными время облучения, режим облучения (непрерывный или импульсный), периодичность и длительность процессов. В этом также может проявить себя гомеостазная природа живой материи. В зависимости от длины волны и интенсивности света пороговая длительность облучения, при которой начинают происходить морфологические изменения, может быть весьма различной для одного и того же объекта, т. е. для живого объекта произведение интенсивности на время облучения не является константой. В зависимости от периодичности световых импульсов возможны резонансные явления в области частот, соответствующих периоду колебаний фотоотклика биологических систем, который изменяется в пределах от 10^{-3} до 10^3 с. Следует отметить, что сложность исследования поведения биологических систем заключается в том, что из-за включения адаптационных и регуляторных механизмов их отклик является нелинейным даже при очень малых интенсивностях света.

1.3 Применение когерентно - оптических методов измерения и контроля в биологии и медицине

Анализ литературы показал, что изучение процессов в клетках ведутся инвазивными и неинвазивными, в том числе когерентно-оптическими методами.

На данный момент в основном преобладают разрушающие методы. Например, метод фракционирования, когда клетку сначала разрушают, а затем из образовавшейся суспензии центрифугированием выделяют нужные частицы и органеллы [50-53].

Среди когерентно-оптических методов успешно развиваются спекл-интерферометрические методы контроля.

Обзор литературы [1-5,7,10,11-13,15,40-46,54-55] по применению когерентно-оптических методов в биофизике показывает, что их использование в настоящее время осуществляется в трех направлениях:

1. Использование статической картины, формируемой рассеянным излучением от объекта. Регистрируемыми параметрами являются статистические характеристики интенсивности и поляризации излучения. Определяемыми характеристиками объекта являются отражающие свойства поверхности, размеры и оптические свойства биологических структур;
2. Когерентно-оптическая томография биологических тканей, основанная на регистрации баллистических фотонов;
3. Использование динамических свойств спеклов при отражении и прохождении когерентного излучения через биологические среды.

Настоящая работа относится к третьему направлению и посвящена возможности применения биоспеклов для изучения метаболической активности клеток в зависимости от температуры, а также для исследования патологических процессов при вирусной инфекции *in vitro*.

Ниже приводится выборка исследований по использованию когерентно-оптических методов в разных областях биооптики, имеющих отношение к рассматриваемой в диссертационной работе теме.

Для визуализации клеток и клеточных структур применяется голографическая интерферометрия [40-42]. Мазки крови на стеклянных подложках помещаются в голографический интерференционный микроскоп, где система интерференционных полос создается интерференцией двух идентичных световых волн, прошедших через микрообъектив по одному пути, но в различные моменты времени. Одна из этих волн регистрируется и восстанавливается по голограмме с помощью опорного пучка. Фазовые сдвиги, вносимые изучаемыми микрообъектами в проходящую через них волну, преобразовываются в искривления интерференционных полос. В результате обработки зарегистрированных интерферограмм восстанавливаются трехмерные изображения эритроцитов крови. Широко применяется фазовая интерференционная микроскопия [8,43]. В этом методе также используются высокостабильные лазеры, что обеспечивает субклеточное разрешение вплоть до нанометров. Определение формы клеток и их изменения при различных заболеваниях является частью общего гематологического анализа.

В работе [9] для экспресс - анализа состояния эпидермиса при псориазе рекомендуется использовать интегральные параметры распределений интенсивности спекл - структур, формирующихся при зондировании эпидермиса сфокусированным когерентным лазерным пучком. Разработанные методы позволяют количественно охарактеризовать отличия нормы от патологии и зарегистрировать нарушения десквамации, не поддающейся визуальной оценке и классификации.

Работа [13] проводилась по дифрактометрии мазков крови и дифрактометрии суспензии (гипоосмотического набухания эритроцитов) с целью выявления информационных параметров наличия патологии и динамики ее лечения. Были исследованы показатель преломления суспензии сферулированных эритроцитов и изменение жесткости эритроцитарной

мембраны в гипоосмотической среде для крови доноров и больных множественной миеломой. Анализ и экспериментальные исследования выполнены на основе дифракции в соответствии с теорией Ми. Показано, что относительный показатель преломления в зависимости от патологии изменяется от 1.05 до 1.08.

В работе [45] исследована интенсивность коллимированной и диффузно - рассеянной составляющих потока света, прошедшего через слой жировой ткани при различной температуре. Получено, что при нагревании ткани от 5 до 50 °С в диапазоне температур 25-30 °С происходит резкая деградация рассеивающих свойств живой ткани.

Возможности оптической когерентной томографии (ОКТ) в оценке патологических состояний кожи были продемонстрированы в работе [46]. Метод ОКТ использовался для выявления оптических образов, присущих некоторым патологическим процессам при болезнях кожи. Установлено, что ОКТ прижизненно обнаруживает оптические образы таких общепатологических реакций организма как активное воспаление и некроз.

В работе [47] исследованы спектры флуктуации интенсивности света, рассеянными крупными и мелкими частицами. Показано, что метод фотон-корреляционной спектроскопии можно использовать для анализа изменений размеров биологических частиц в норме и патологиях.

Диффузионно - волновая спектроскопия в случайно-неоднородных средах [48] рассматривает многократное рассеивание лазерного излучения в мутной среде с локализованным в пространстве потоком частиц. Предложен и экспериментально апробирован метод определения положения динамической области преобладающего типа движения частиц и характерной скорости этого движения.

В работе [49] на основе модели прозрачного объекта в виде совокупности точечных рассеивающих центров теоретически были изучены закономерности динамики спеклов, вызванной случайными изменениями фаз волн. Теоретически было показано, что если длины оптических путей изменяются на несколько

межатомных расстояний, то изменения в картине спеклов можно зарегистрировать визуально. Теоретические положения были подтверждены экспериментами, в которых динамика спеклов создавалась пластической деформацией металлов и поступательным перемещением стандартов шероховатости.

Очевидно, что динамика спеклов может быть вызвана и микроскопическими процессами, происходящими в биологических объектах. В работе [54] было показано, что закономерности динамики спеклов для больных и здоровых участков кожи различны. Известно, что болезни прямо или косвенно связаны с процессами, происходящими в мембранах клетки. Данное обстоятельство послужило стимулом для проведения модельных экспериментов [15]. В этой работе было изучено взаимодействие везикул между собой, процесс их осаждения на стеклянную подложку кюветы, а также процесс испарения воды из жидкого кристалла. Были отработаны методика регистрации фильма динамики спеклов и диаграммы счета числа спеклов, автокорреляционный и спектральной функции сигналов в точке (пикселе) наблюдения.

В работе [10] был теоретически обоснован следующий вариант методики. Транспорт веществ через мембрану было предложено изучать в прозрачной со всех сторон кювете, разделенной пополам биологической мембраной. Микроскопические процессы, связанные с переходом веществ через мембрану предлагалось изучать с помощью динамической спекл - интерферометрии, освещая мембрану по нормали к поверхности. Для определения содержания веществ в обеих частях кюветы предлагалось использовать традиционный спектральный анализ. В работе [55] сообщалось о создании макет - образца прибора, включающего в себя указанную выше кювету.

1.4 Культуры клеток. Преимущества использования культивируемых клеток в экспериментах

Культуры клеток занимают все более заметное и важное место в токсикологических, фармакологических и других исследованиях. При этом сфера применения расширяется, а техника культивирования *in vitro* совершенствуется и автоматизируется. Использование культуральных тестов является свидетельством высокого уровня эксперимента в любой сфере как фундаментальных, так и прикладных народно-хозяйственных отраслях.

Культуры клеток представляют собой генетически однородную популяцию клеток, растущих в постоянных условиях. Более того, исследователь может изменять эти условия в определённых пределах, что позволяет ему оценивать влияние на рост клеток самых различных факторов - pH, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и др. Рост может быть оценен в течение короткого периода времени либо по увеличению числа или размеров клеток, либо по включению радиоактивных предшественников в клеточную ДНК. Эти реальные преимущества по сравнению с исследованиями на целых животных ставят клеточные культуры как экспериментальную систему в один ряд с культурами микроорганизмов.

При работе с культурами клеток существенные результаты могут быть получены при использовании очень небольшого числа клеток. Эксперименты, требующие для выяснения того или иного вопроса использования 100 крыс или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стёклах. Следовательно, если каждую клетку рассматривать как независимый объект эксперимента, то одна культура на покровном стекле может дать более достоверный ответ, чем целая клиника, полная больных. Это является важным преимуществом, когда дело касается человека, и, кроме того, снимает многие этические проблемы, возникающие при необходимости использовать для эксперимента большую группу животных.

Поскольку клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними радиоактивные предшественники, яды, гормоны могут быть введены в заданной концентрации и в течение заданного периода. Количество этих соединений может быть на порядок меньше, чем при экспериментах на целом животном. Исчезает также опасность того, что исследуемое соединение метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при определённой концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений.

Культура клеток используется в различных научных и практических областях:

– Генетика: способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияния клеток, методов получения и работы с мутантными клетками.

– Гибридная технология: если мышью иммунизировать неочищенным препаратом антигена и затем клетки её селезенки гибридизовать с клетками миеломы, то среди полученных гибридных клеток найдется по крайней мере одна, продуцирующая антитела, специфические к исходному антигену. Эта клетка может быть клонирована и трансплантирована в мышью в форме опухоли, продуцирующей высокоспецифические антитела в количестве, измеряемом граммами.

– Биотехнология: культуры клеток являются ценными источниками гормонов и других секретируемых материалов. Например, для получения интерферона используются фибробласты и лейкоциты; в число индуцирующих вирусов входят вирус Сендай и вирус ньюкаслской болезни (Gresser, 1961; Baron, Isaacs, 1962; Merigan et al., 1966)

– Вирусология и трансформация клеток. Прогресс в области вирусологии в значительной степени обусловлен возможностью выращивать вирусы в культурах

клеток. В результате применения этих методов выяснилось, что вирусы способны не только инфицировать и убивать клетки, но могут также вызывать изменения в характере роста клеток - феномен, известный как вирусная трансформация клеток. Эти изменения, приводящие к появлению клеток, не реагирующих на своих соседей так, как это характерно для нетрансформированных клеток, вызывают особый интерес в связи с тем, что они могут помочь понять природу трансформации, поскольку сходные изменения, происходящие с клетками *in vitro*, играют определенную роль в индукции опухоли. Выращивание вирусов имеет важное значение, как для идентификации вирусов, так и для их использования в получении вакцины. Все эти задачи решаются в основном с использованием клеточных культур.

1.5 Метаболическая активность клеток

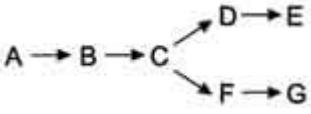
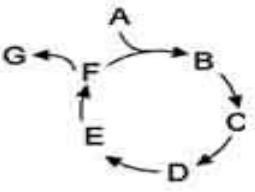
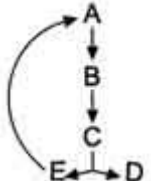
Живая клетка - открытая система, постоянно обменивающаяся с внешней средой веществами и энергией: в неё поступают питательные вещества, которые подвергаются превращениям и используются в качестве строительного и энергетического материала, из клетки выводятся конечные продукты метаболизма. В многоклеточном организме клетка реагирует не только на изменение окружающей среды, но и на функциональную активность соседних клеток. При этом она стремится сохранить неизменным свой внутренний состав. Это состояние называют стационарным или клеточным гомеостазом.

В клетке постоянно происходит большое количество разнообразных химических реакций, которые формируют метаболические пути - последовательное превращение одних соединений в другие [56-57]. Метаболизм - совокупность всех метаболических путей, протекающих в клетках организма.

Среди всех метаболических путей, протекающих в организме, выделяют противоположно направленные процессы: катаболизм и анаболизм. Катаболизм - распад сложных веществ до простых с высвобождением энергии. Анаболизм - синтез из простых более сложных веществ. Метаболические пути согласованы между собой по месту, времени и интенсивности протекания. Эта согласованность протекания всех процессов обеспечивается сложными и многообразными механизмами регуляции.

Структура метаболических путей в клетке крайне разнообразна (табл. 1). В случае, когда субстрат в результате ряда ферментативных процессов превращается в один продукт, такой путь носит название линейного метаболического пути. Часто встречаются разветвлённые метаболические пути, приводящие к синтезу различных конечных продуктов в зависимости от потребности клетки.

Таблица 1 - Типы метаболических путей

Схема	Название	Пример
$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$	Линейный	Гликолиз
	Разветвлённый	Синтез нуклеотидов
	Циклический	Цикл трикарбоновых кислот
		Синтез мочевины
	Спиральный	β -окисление жирных кислот

Все химические реакции в клетке протекают при участии ферментов (рис. 2). Поэтому, чтобы воздействовать на скорость протекания метаболического пути, достаточно регулировать количество или активность ферментов. Обычно в метаболических путях есть ключевые ферменты, благодаря которым происходит регуляция скорости всего пути. Эти ферменты (один или несколько в метаболическом пути) называются регуляторными ферментами; они катализируют, как правило, начальные реакции метаболического пути, необратимые реакции, скорость - лимитирующие реакции (самые медленные) или реакции в месте переключения метаболического пути (точки ветвления).

Регуляция скорости ферментативных реакций осуществляется на 3 независимых уровнях:

- изменением количества молекул фермента;
- доступностью молекул субстрата и кофермента;
- изменением каталитической активности молекулы фермента.

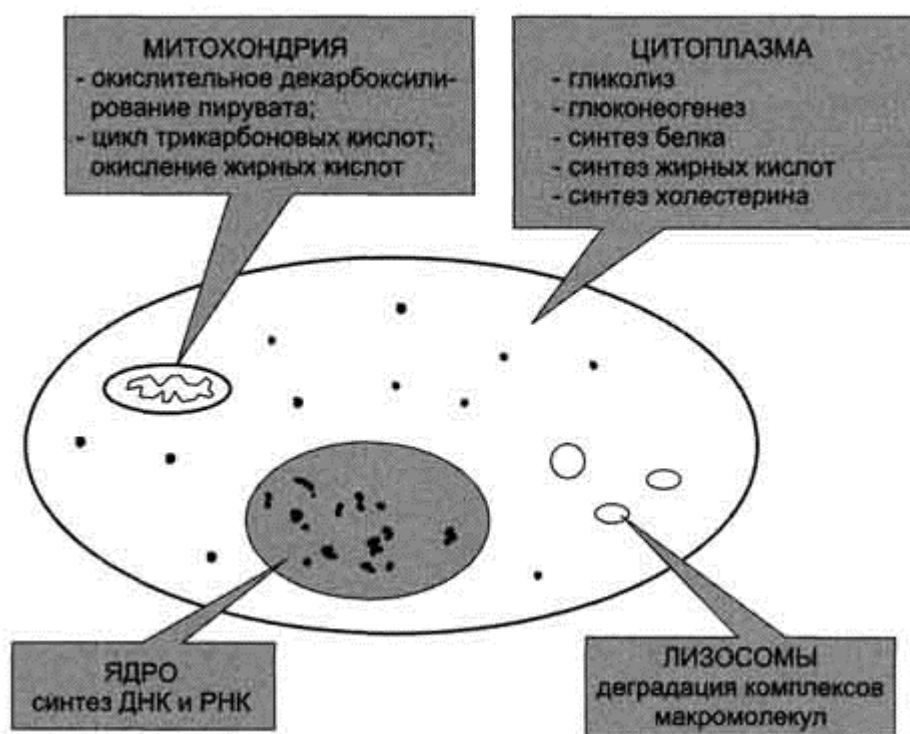


Рисунок 2 - Внутриклеточная локализация ферментов

Можно сформулировать некоторые общие понятия, касающиеся метаболизма:

1. Метаболические пути необратимы. Распад никогда не идет по пути, который являлся бы простым обращением реакций синтеза. В нем участвуют другие ферменты и другие промежуточные продукты. Нередко противоположно направленные процессы протекают в разных отсеках клетки. Так, жирные кислоты синтезируются в цитоплазме при участии одного набора ферментов, а окисляются в митохондриях при участии совсем другого набора.

2. Ферментов в живых клетках достаточно для того, чтобы все известные метаболические реакции могли протекать гораздо быстрее, чем это обычно наблюдается в организме. Следовательно, в клетках существуют регуляторные механизмы.

а) Фактором, ограничивающим скорость метаболических превращений данного вещества, может быть поступление этого вещества в клетку; именно на этот процесс в таком случае и направлена регуляция. Роль инсулина, например,

связана с тем, что он облегчает проникновение глюкозы во все клетки, глюкоза же подвергается превращениям с той скоростью, с какой она поступает. Сходным образом происходит проникновение железа и кальция из кишечника в кровь.

б) Внутриклеточный перенос веществ также регулируется стероидными гормонами.

3. В биосинтетических процессах участвует сравнительно небольшое число строительных блоков, каждый из которых используется для синтеза многих соединений. Среди них можно назвать ацетилкофермент А, глицерофосфат, глицин, карбамилфосфат, поставляющий карбамильную ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-$) группу, производные фолиевой кислоты, служащие источником гидроксиметильной и формильной групп, S-аденозилметионин – источник метильных групп, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, поставляющие аминогруппы, и наконец, глутамин – источник амидных групп.

4. Простые органические соединения редко участвуют в метаболических реакциях непосредственно. Обычно они должны быть сначала «активированы» путем присоединения к одному из ряда соединений, универсально используемых в метаболизме. Глюкоза, например, может подвергнуться окислению лишь после того, как она будет этерифицирована фосфорной кислотой, для прочих же своих превращений она должна быть этерифицирована уридиндифосфатом. Жирные кислоты не могут быть вовлечены в метаболические превращения прежде, чем они образуют эфиры с коферментом А. Каждый из этих активаторов либо родственен одному из нуклеотидов, входящих в состав рибонуклеиновой кислоты, либо образуется из какого-нибудь витамина. Легко понять в связи с этим, почему витамины требуются в таких небольших количествах. Они расходуются на образование «коферментов», а каждая молекула кофермента на протяжении жизни организма используется многократно, в отличие от основных питательных веществ (например, глюкозы), каждая молекула которых используется только один раз.

Термин «метаболическая активность клетки» применяется для обозначения тысяч ферментативных реакций, вся совокупность которых может быть

представлена как огромная сеть метаболических путей, многократно пересекающихся (из-за наличия общих промежуточных продуктов) и управляемых очень тонкими регуляторными механизмами.

1.6 Оптические свойства клетки и динамика спеклов

Оптическое излучение, которое используется в биооптике в качестве зондирующего, представляет собой электромагнитные волны в диапазоне длин волн от 0.4 мкм (фиолетовый свет) до 0.8 мкм (красный свет). Данное поле имеет несколько характеристик, изменяющихся при прохождении через микрообъект.

Их пространственно-временное распределение характеризуется амплитудой и фазой, а временное пространственной упорядоченностью - когерентностью.

Кратко рассмотрим основные параметры взаимодействия излучения оптического диапазона с биологической средой. Основными оптическими параметрами характеризующими взаимодействие исследуемой среды со светом являются коэффициент (показатель) поглощения k и показатель преломления n . Оба параметра зависят прежде всего от состава и плотности вещества, для неоднородных сред от их координат и характеризуют различные виды взаимодействия оптического излучения с веществом. Поглощение света представляет собой уменьшение его интенсивности при прохождении через среду за счет взаимодействия с ней. Показатель поглощения величина обратная расстоянию, которое прошел свет через среду. Из определения следует, что процесс поглощения приводит к изменению (модуляции) амплитуды света.

Преломление света представляет собой изменение направления распространения света при его прохождении через границу раздела двух сред. Количественно это явление характеризуется безразмерным показателем преломления света относительно двух сред n_{21} , характеризующего отношение скоростей распространения волн в первой V_1 и второй V_2 средах.

$$n_{21} = V_1/V_2, \quad (1)$$

где V_1 и V_2 - скорости распространения света в двух различных средах.

Как правило, в качестве одной из сред используют вакуум и рассматривают показатель преломления относительно вакуума, т.н. абсолютный показатель преломления

$$n = C/V, \quad (2)$$

где C - скорость света в вакууме.

Практически измеряют скорость света в воздухе. Так как скорость света в среде всегда меньше скорости в вакууме, то показатель преломления всегда больше единицы. Этот процесс взаимодействия оптического излучения со средой. Свет при этом не ослабевает, т.е. отсутствует модуляция амплитуды, но изменяет фазу излучения. Угол преломления зависит от угла падения света на границу раздела двух сред. При нормальном падении - свет не изменяет направление распространения.

При прохождении линейно-поляризованного света через оптически активное вещество изменяется (вращается) угол его поляризации. Угол поворота вектора поляризации зависит от концентрации вещества. К таким органическим веществам относятся, в частности, растворы сахарозы и глюкозы, а также растворы всех без исключения белков. Поэтому это явление чувствительно к изменению концентрации оптически активных веществ.

Ряд биообъектов обладают свойством двойного лучепреломления. Когда пучок линейно-поляризованного света распространяется в такой среде, то он разлагается на два луча, которые поляризованы во взаимно перпендикулярных плоскостях. Показатель преломления у таких веществ зависит от поляризации света. Один из лучей называется обыкновенным n_o . Он проходит через объект, подчиняясь обычному закону преломления. Другой - необыкновенный n_e , распространяется в среде с другой скоростью. Различия показателей преломления этих двух лучей на выходе из объекта несет информацию о свойствах вещества. К биологическим объектам, обладающим двойным лучепреломлением, относятся, в частности, клетки мышечных волокон.

Следует упомянуть еще одну важную характеристику взаимодействия света с биообъектом - естественная оптическая активность, обусловленная ассиметричным строением их молекул. Перечисленные свойства присущи, как однородным, так и неоднородным веществам. Очевидно, что клетка представляет собой пространственно неоднородную структуру с переменной плотностью. Такими неоднородностями служат мембраны клетки и ее органелл и сами

органеллы, находящиеся внутри клетки. Плотность различных органелл клетки изменяется в достаточно широких пределах и, следовательно, достаточно сильно изменяются ее оптические свойства. Если оптическое излучение в однородной среде распространяется прямолинейно, то в неоднородной среде свет начинает отклоняться от прямолинейного распространения.

Необходимо выделить два разных случая:

1. Если оптическая неоднородность не сильно отличается по плотности от окружающей среды и изменения плотности происходят плавно, то можно считать, что свет продолжает распространяться по лучу, который может при этом отклониться от прямолинейной траектории. Это явление получило название рефракции света. Это соответствует распространению излучения внутри цитоплазмы, ядра и других органелл, размер которых превышает 1-2 мкм.

2. В том случае, когда однородность меньше 1 мкм или границы ее резкие, то наблюдается такое явление, как дифракция света на оптических неоднородностях. Причем чем больше неоднородность отличается по плотности от окружающей среды, тем существеннее дифракционные эффекты. На резких границах отклонение очень существенное. Дифракция света тесно переплетается с явлениями рассеяния света в неоднородных средах. Поэтому часто в литературе эти эффекты не различают. В клетке таким структурам соответствуют в первую очередь мембраны, а также мелкие (меньше мкм) включения.

Морфологические характеристики самых различных клеток изучены очень хорошо и подробно описаны в литературе [51-53]. Как известно, они отличаются довольно широкой вариабельностью размеров и форм.

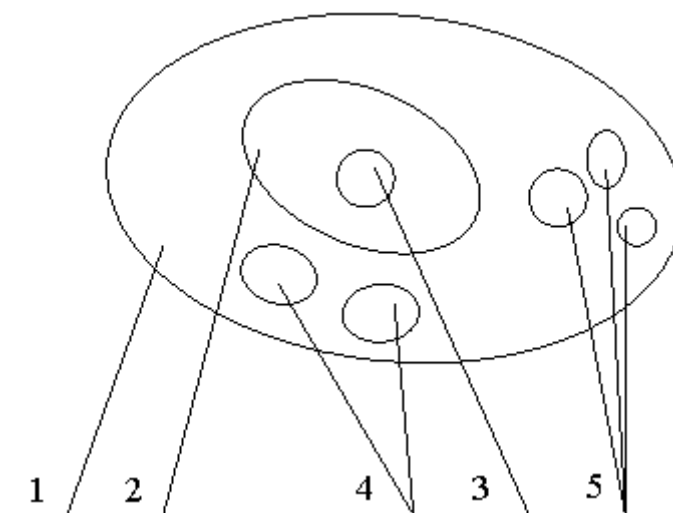


Рисунок 3 - Схематический рисунок клетки. 1 - цитоплазма, 2 - ядро, 3 - ядрышко, 4 - митохондрии, 5 - гранулы

Представим клетку в виде эллипсоида размером $8 \times 15 \times 15$ мкм. Размеры различных органелл клетки хорошо известны и некоторые из них приведены в табл. 2. Живая клетка, с точки зрения оптики, представляет собой трехмерное распределение вещества с переменной плотностью, окруженное достаточно плотной оболочкой.

Вещество, составляющее клетку характеризуется физическими величинами - показатели поглощения и преломления.

Известно, что в видимой области спектра живые одиночные клетки практически не поглощают излучения. В отдельных случаях, когда они содержат пигментные зерна, хлорофилл или иные подобного типа вещества возможно наблюдение заметного эффекта поглощения. Именно поэтому в микрофотоцитометрии используют специальные красители для исследования количественных характеристик концентрации вещества внутри клетки по показателю поглощения. Избирательное поглощение существует только в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра.

Таблица 2 - Градиенты показателей преломления органелл клетки

№	название	форма и размеры (усредненные)	плотность, г/см ³	Градиент показателя преломления Δn
1	цитоплазма		0,06	0,011
2	ядро	эллипсоид, 5x8x8 мкм	0,1	0,018
3	ядрышко	шар, диаметр 1 мкм	0,16÷0,19	0,029÷0,034
4	митохондрии	нити, толщина 0,5 мкм	0,09÷0,11	0,0016÷0,020
5	гранулы	шары, диаметр 0,51 мкм	0,12	0,022

Таким образом, основной физической величиной, определяющей прохождение оптического излучения через клетку, является показатель преломления, значения которого изменяются внутри клетки в существенных пределах. Напомним, что в таких объектах изменяется только фаза света, поэтому они получили название фазовых объектов.

Плотность и показатель преломления цитоплазмы, ядра других органелл клетки анализировались многими исследователями [7,40,45]. При этом различные физические методы измерений позволяют определять, как плотность, так показатель преломления составляющих клетки. Показатель преломления определяется только оптическими методами, а плотность может быть измерена также при помощи гисторентгенографии. Этот метод основан на измерении поглощения рентгеновского излучения веществом клетки.

Учитывая, что органеллы клетки представляют собой сгустки вещества в цитоплазме, перепад или, как говорят, градиент показателя преломления может составлять 0,1-0,01. В табл. 2 приведены значения градиентов показателя преломления, рассчитанные по измеренным данным плотности вещества внутри клетки.

Если тонкий биологический объект осветить лазерным излучением, то на экране, расположенным на некотором расстоянии от объекта, наблюдается в макроскопическом смысле однородная, но в микроскопическом смысле неоднородная структура рассеянного излучения. Неоднородности, пятна или

спеклы случайного размера и яркости появляются в результате взаимной интерференции многих когерентных волн, которые распространяются от центров рассеяния со случайными амплитудами и фазами. Спеклы формируются в плоскости изображения рассеивающего объекта. Под термином биоспекл в данной работе понимают спеклы, сформированные биологическими объектами. Если в наблюдаемом объекте происходят микроскопические процессы, локально изменяющие показатель преломления среды, то интерференционная картина спеклов будет меняться. При этом изменение яркости света в какой-либо точке картины можно интерпретировать как изменение интерференционных картин, создаваемых каждой парой центров рассеяния.

В данном случае изменения разности хода для пар волн с постоянной скоростью является идеализированным. В общем случае изменение разности оптических путей двух произвольно взятых волн является случайным процессом. В мутных средах, тканях живых систем имеет место многократное рассеяние света. Таким образом регистрация сигналов динамики спеклов обладает высокой чувствительностью к изменениям оптической разности хода, которая основана на многолучевой интерференции волн.

1.7 Вирус простого герпеса. Морфология и внутриклеточное развитие

Герпес (от греч. herpes - лихорадка) - вирусная инфекция, длительно существующая в организме, преимущественно в латентной форме [57]. Наиболее достоверные сведения о герпесе были получены после того, как удалось выделить вирус этого заболевания. W. Grüter (1912) впервые наблюдал развитие кератонъюнктивита у кроликов после введения им на скарифицированную оболочку глаз жидкости из герпетического пузырька человека. Впоследствии автор с успехом осуществил последовательные пассажи вируса на роговице кролика.

Используя метод негативного контрастирования препаратов, было обнаружено, что внешняя оболочка вируса ВПГ-1 (капсид) обладает кубическим типом симметрии и является двадцатигранником (икосаэдром). Капсомеры, составляющие капсид, - полые образования, пента- и гексагональные в поперечном сечении. Типичные вирусные частицы (вирионы) состоят из трех основных компонентов: нуклеоида, располагающегося в нейтральной части капсида, покрывающего нуклеоид и составленного из капсомеров, и оболочки, окружающей эти структуры (рис. 4). Оболочка частиц имеет разнообразную форму. Иногда она повторяет гексагональную проекцию капсида. Ее диаметр колеблется от 170 до 210 нм.

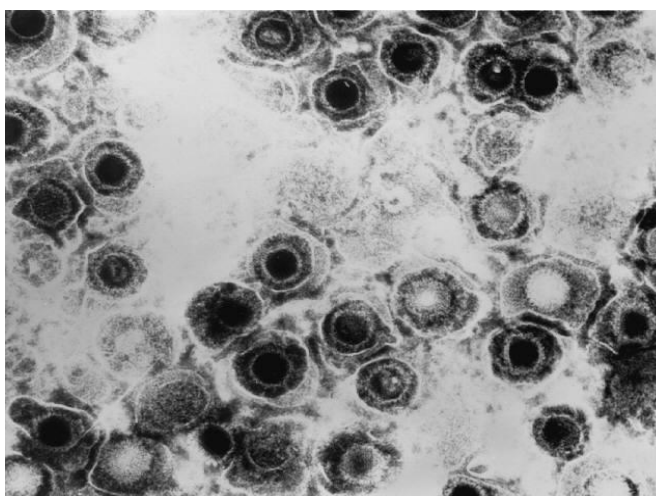


Рисунок 4 - Электронная микрофотография нуклеокапсидов вируса простого герпеса

На основании ряда согласующихся в общих чертах наблюдений установлено, что прикрепление ВПГ-1 к клеткам происходит довольно медленно, время при этом часто трудно измеримо. Вирус непрочно прикрепляется к клеткам, поэтому около 50% его всегда можно отделить различными способами. Через 2 ч. после адсорбции вируса на поверхности клеток можно еще наблюдать морфологически нормальные вирионы.

В месте адсорбции клеточная стенка образует своеобразный «карман», который затем превращается в вакуоль и таким образом вирус оказывается в цитоплазме. Далее следует процесс дезинтеграции вируса, конечным его результатом является освобождение нуклеиновой кислоты от белков внешних оболочек. Параллельно происходит быстрое снижение инфекционной активности инокулированного вируса. В перинуклеарном пространстве наблюдались «голые» частицы вирионов. Известно, что перинуклеарное пространство сообщается с внеклеточной системой каналов эндоплазматического ретикула. Считают, что в период инфицирования клеток при центростремительном продвижении вируса каналы могут служить естественными «ходами» для возбудителя, и описываемые разными авторами структуры, называемые вакуолями, являются не чем иным, как отдельными участками каналов эндоплазматического ретикула в поперечном сечении. В течение 10-12 часов после заражения в клетках не удается обнаружить каких-либо характерных признаков формирования вируса. В это время происходит образование структурных вирусных белков и нуклеиновых кислот, из которых в дальнейшем происходит организация нуклеиновой кислоты и капсомеров в единую структуру, условно называемую нуклеокапсидом, или виринуклеоном.

Развитие герпеса сопровождается образованием внутриядерных включений. Эти образования рассматриваются как место сборки вирусных частиц. Данные литературы позволили предположить несколько возможных путей формирования включений. Известно, например, что вирусное потомство включает не более 20% вновь синтезированной ДНК и около 35% белка. Исходя из этих данных, можно считать, что та часть нуклеиновой кислоты и структурных

белков, которая остается неиспользованной при формировании вируса, и может образовывать включения.

Цикл размножения ВПГ-1 продолжается около 10 ч. Продолжительность периода эclipse составляет при герпесе около 8 ч. В клетках Нер-2, зараженных ВПГ-1, вирусные белки появляются через 2 ч. и накапливаются в максимальных количествах приблизительно через 8ч. Вирусная ДНК обнаруживается на 1 ч позже, чем вирусные белки, и имеет сходную кинетику образования. Сходные инфекционные вирионы появляются через 10 ч. и достигают наивысших титров через 15 ч.

Синтез ДНК ВПГ-1 происходит в ядре. Синтез вирусной ДНК можно обнаружить благодаря высокому содержанию гуанина и цитозина в ней. Это позволяет разделить клеточные и вирусные ДНК при градиентном центрифугировании по плотности. В клетках Нер-2, зараженных ВПГ-1, основная масса вирусной ДНК синтезируется между 3-м и 7-м часами после начала заболевания. Показано, что ДНК вирусов семейства герпеса реплицируется полуконсервативно. Для инициации синтеза вирусной ДНК необходим синтез ранних белков. После начала синтеза вирусной ДНК он продолжается и в отсутствие сопутствующего синтеза белка.

ВПГ-1 вызывает постепенное подавление макромолекулярных синтезов в клетке. Подавление синтеза клеточной ДНК начинается приблизительно через 2 ч после начала заболевания и завершается к 7 ч. Свидетельством разрушения клеточной ДНК являются повреждения хромосом.

Внутриядерный цикл репродукции вируса завершается его «дозреванием». Морфологически это выражается в покрытии капсида оболочкой, которая в дальнейшем выполняет, по-видимому, защитную функцию. В настоящее время существует 2 точки зрения относительно места формирования этой оболочки. Одни исследователи придерживаются мнения о том, что формирование оболочки происходит из элементов ядерной мембраны. Другие авторы считают, что оболочка формируется из мембранных культур пластинчатого комплекса и цитоплазматической мембраны. Выход вирусных частиц из перинуклеарного

пространства или прямо из ядра в цитоплазму сопровождается дополнительным заключением вирионов в вакуоли, стенки которых формируются из материала наружного листка ядерной мембраны. Следовательно, в цитоплазме вирионы имеют уже 2 оболочки. Частицы, перемещающиеся в цитоплазме группами, заключены в общую вакуоль. Массовый выход вирусных частиц из клетки происходит между 15-ю и 18-ю часами и сопровождается образованием множества структур типа пластинчатого комплекса. В поздние сроки заболевания в момент разрушения клетки за ее пределы попадают различные типы вирусных частиц, находящиеся на разных стадиях формирования. Некоторые вирусные частицы, находящиеся в ядре, цитоплазме, на поверхности клеток и в межклеточных пространствах, бывают без нуклеоида. Дефектный вирус, в частности без нуклеоида, не обладает инфекционной активностью. Несмотря на это, «пустые» вироноуклеоны, как и «полные», приобретают оболочку во время продвижения по клетке.

1.8 Современные подходы к диагностике герпетической инфекции

Диагностика инфекции, основанная на клиническом течении, крайне затруднена вследствие многообразия проявления заболевания [58]. В клинических лабораториях для диагностики герпесвирусной инфекции (ГВИ) применяются иммуноферментный анализ (ИФА), который выявляет специфические антитела к ВПГ-1, и полимеразная цепная реакция (ПЦР) - для детекции ДНК вируса.

ИФА выявляет специфические антитела к ВПГ-1 классов Ig M и Ig G. Антитела класса M появляются в течение первых двух недель после заболевания (титр 1:100 и выше), что свидетельствует о первичном инфицировании или реактивации латентной инфекции. Однако у 15-18% больных низкие титры (1:100 - 1:200) могут сохраняться до 12 месяцев. Антитела класса G появляются через 14-21 день после заражения и у переболевших пациентов сохраняются до 10 лет. Об активном развитии инфекционного процесса достоверно можно свидетельствовать только 4-х кратное увеличение титра антител Ig G при исследовании парных сывороток, с интервалом забора в 2-3 недели. Вследствие ряда объективных причин не всегда можно исследовать повторные сыворотки. Также при хронической ГВИ нарастание титра не всегда выявляется, хотя уровень антител остается неизменно высоким (1:400-1:800), либо составляет 2-х кратное увеличение, что делает невозможным выявление периода рецидива заболевания.

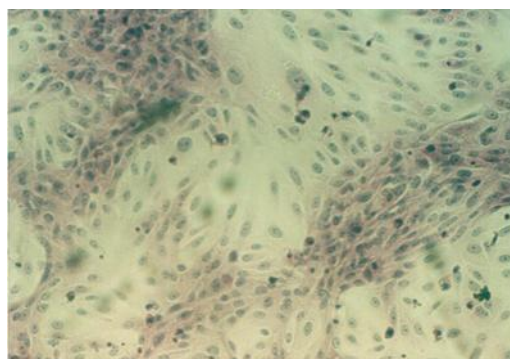
Применяемый в настоящее время в клиничко-лабораторной практике высокоспецифичный и чувствительный молекулярно-биологический метод ПЦР позволяет определить наличие вирусной ДНК в организме пациента при любой форме инфекции, что особенно важно при персистирующей и латентной инфекции, особенно у пациентов с выраженными нарушениями иммунной системы и у пациентов с микст-инфекциями. Однако, являясь высокочувствительным методом, ПЦР не позволяет дифференцировать периоды заболевания и оценить эффективность проводимого противовирусного лечения.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), относящаяся к серологическим методам диагностики, позволяет определить локализацию антигена ВПГ-1

непосредственно в клиническом материале от больного, что очень важно особенно при стертых и атипичных формах заболевания. Однако метод РИФ не дает возможности четко разграничить периоды заболевания и выявить персистирующий вирус.

Выделение вируса из клинического материала методом клеточных культур на чувствительных клетках (МКК) (рис. 5), в лабораториях используется в единичных случаях. Ценность метода заключается в том, что, во-первых, выделение вируса свидетельствует о его инфекционной активности, а во-вторых, о продуктивной инфекции. Выделение вируса может являться также доказательством генерализации инфекционного процесса.

а)



б)

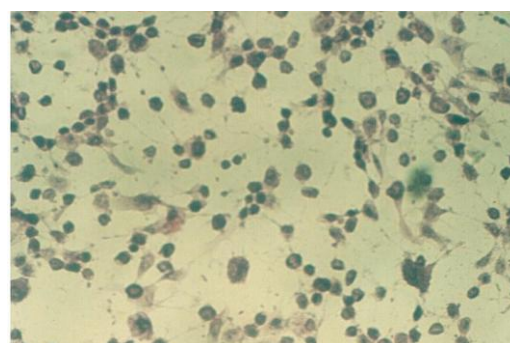


Рисунок 5 - Выделение герпесвируса от больного на клеточных культурах.
(а) - клеточная культура Vero (интакт), (б) - Цитопатическое действие ВПГ-1 (48 часов)

Каждый из применяемых методов для диагностики ГВИ обладает несомненными достоинствами, но все стороны развития и течения ГВИ у больного можно охватить только комплексным исследованием [59-63].

1.9 Постановка задачи

Метаболические процессы, проходящие в клетках сложны и на сегодняшний день до конца не изучены. 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 для создания новых лекарственных препаратов [3, 16, 56, 62-67].

Из анализа литературы следует, что изучение процессов в клетках ведутся инвазивными и неинвазивными, в том числе когерентно-оптическими методами [68-71]. Среди когерентно-оптических методов успешно развиваются спекл-интерферометрические методы контроля.

В данной работе проводится изучение динамики спеклов при однократном рассеивании от неподвижных центров рассеивания, а изменение спекл-поля происходит вследствие изменения показателя преломления и толщины монослоя клеточной культуры.

Теоретическое описание динамики спеклов, вызванной случайными изменениями фаз волн в тонких прозрачных объектах было дано в работах [19,54,72]. Однако было неясно, можно ли использовать положения теории для анализа процессов в клеточных культурах, можно ли выделить параметр, характеризующий метаболическую активность клеток, можно ли различать и разделять процессы, протекающие в питательном растворе, в монослое клеток, при наличии и отсутствие вируса. Было также неясно, какова чувствительность, погрешность и воспроизводимость метода, можно ли оперативно оценивать состояние клеток.

Таким образом, целью работы являлось разработка методики изучения закономерностей динамики спеклов в плоскости изображения монослоя культивированных клеток при неизменных условиях существования, а также при изменении температуры и инфицировании вирусом герпеса. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- научное обоснование и создание установки для диагностики метаболизма интактных и зараженных вирусом культивированных клеток методом динамической спекл-интерферометрии;
- поиск и выбор параметров динамики спеклов, характеризующих метаболическую активность клеток;
- изучение температурных и временных зависимостей динамики спеклов, характеризующих метаболическую активность интактных и зараженных клеток;
- оценка погрешности, чувствительности и воспроизводимости результатов, выработка рекомендаций для метрологической аттестации и применения метода.

Глава 2. Теория метода и выработка требований к оптической системе

2.1 Теория динамики спеклов микроскопических процессов

Возможности метода динамической спекл-интерферометрии широкие, однако применение этого метода в практике на данный момент не реализовано в "полную силу". Для практической реализации метода и выработки требований к экспериментальной установке приведены основные положения теории динамики спеклов микроскопических процессов, опубликованные в [19], адаптированные к изучению тонких трехмерных проницаемых объектов.

Пусть источник когерентного излучения с длиной волны λ , расположенный в точке \vec{s} , освещает точечные центры рассеяния, расположенные в тонком диффузоре 2 вблизи плоскости (x, y) , как показано на рис. 6:

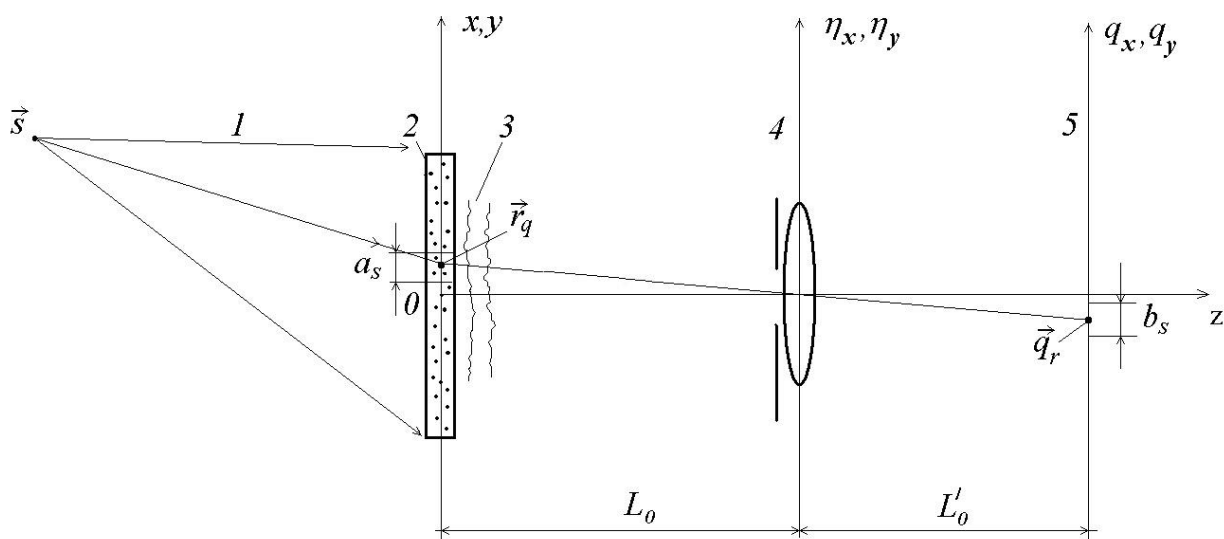


Рисунок 6 - Оптическая схема. 1- освещающий пучок, 2 - диффузор, 3 - фазовый объект, 4 - тонкая линза с диафрагмой, 5 - плоскость изображения

Для упрощения задачи принимается, что показатели преломления среды в диффузоре и вне диффузора одинаковы и равны единице. Тонкая линза с фокусным расстоянием f и диаметром диафрагмы D , расположенная в плоскости (η_x, η_z) , формирует изображение объекта в плоскости (q_x, q_y) . Все

рассматриваемые волны считаются линейно поляризованными в одном направлении. Пусть фаза φ_j волны, рассеянной j -ым центром, случайна, и в произвольную точку плоскости (η_x, η_y) приходят волны от всех центров рассеяния.

Выводится сначала выражение для интенсивности излучения $I(\vec{q})$ в некоторой точке \vec{q} плоскости изображения объекта в отсутствие фазового объекта.

Комплексную амплитуду света $A(\vec{q})$ в точке \vec{q} находят, суммируя амплитуды волн, пришедших от точек плоскости (η_x, η_y) до точки \vec{q} , учитывая амплитудное $P(\vec{\eta})$ и фазовое $\exp\frac{i|\vec{\eta}|^2}{2f}$ пропускание линзы:

$$A(\vec{q}) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int P(\vec{\eta}) e^{\frac{i|\vec{\eta}|^2}{2f}} e^{ik|\vec{L}_q(\vec{\eta})|} \sum_{j=1}^N a_j d\eta_x d\eta_y, \quad (3)$$

где i - мнимая единица, $\vec{L}_q(\vec{\eta})$ - вектор, направленный от точки $\vec{\eta}$ до точки \vec{q} , a_j - комплексная амплитуда j - волны.

Связь между комплексной амплитудой света в непосредственной близости от точки \vec{r}_j и в точке $\vec{\eta}$ берется в такой же форме, как и в работе [19]:

$$a_j(\vec{\eta}) = \sqrt{I_0(\vec{r}_j)} \xi(\vec{r}_j) e^{i\{k[|\vec{L}_s(\vec{r}_j)| + |\vec{L}_\eta(\vec{r}_j)|] + \varphi_j\}}, \quad (4)$$

где $I_0 = I_0(\vec{r})$ - распределение интенсивности освещающего излучения, $\xi = \xi(\vec{r})$ - в общем случае комплексный коэффициент, учитывающий долю излучения, идущего от точки \vec{r} до точки $\vec{\eta}$, $\vec{L}_s(\vec{r})$ - вектор, направленный от точки \vec{r} к точке \vec{s} , $\vec{L}_\eta(\vec{r})$ - вектор, направленный от точки \vec{r} к точке $\vec{\eta}$.

Берется произвольная точка $\vec{q} = \vec{q}_r$ и сопряженная ей точка \vec{r}_q . Известно, что волна, идущая от точки \vec{r}_q , в результате дифракции света на диафрагме диаметром D , формирует картину Эйри с центром в точке \vec{q}_r . Диаметр центрального пятна b_s

картины равен $1,22\lambda L'_0/D$, где L'_0 - расстояние от линзы до плоскости $q_x O q_y$. Области диаметром b_s в плоскости xOy соответствует область диаметром $a_s = b_s/m$, где m - увеличение линзы. Известно, что в центральное пятно картины Эйри приходится 85% энергии волны, прошедшей через линзу. Предлагается не учитывать энергию, приходящую вне область радиусом b_s . Это, в свою очередь, означает, что полагается, что в точку \vec{q}_r приходят волны от центров рассеяния, расположенных лишь в области радиусом a_s с центром в точке \vec{r}_q . Пусть теперь N - число таких центров.

Далее предполагается, что область a_s , толщина диффузора и величина D малы по сравнению с расстояниями от объекта до источника излучения и до линзы, а также от линзы до плоскости изображения. На основе этих предположений получается:

$$A(\vec{q}) = \sqrt{I_0} e^{i\psi} \sum_{j=1}^N e^{i\theta_j}, \quad (5)$$

где $\theta_j = k\vec{r}_j(\vec{l}_s + \vec{l}) + \varphi_j$, $\vec{l}_s = \vec{l}_s(l_{sx}, l_{sy}, l_{sz})$, $\vec{l} = \vec{l}(l_x, l_y, l_z)$ - единичные векторы, направленные от точки \vec{r}_q к источнику излучения и к наблюдателю соответственно, $\sqrt{I_0} e^{i\psi}$ - комплексный коэффициент.

Вносится тонкий фазовый объект между диффузором и линзой, как показано на рис.6. Предполагается, что объект изменит только фазу j -ой волны, а преломление (рефракция) света отсутствует. Изменение фазы ζ_j определяется выражением:

$$\zeta_j = \frac{2\pi}{\lambda} \left\{ \int_{l_j} [n_j(l) - n_0] dl \right\} = \frac{2\pi}{\lambda} u_j, \quad (6)$$

где $n_j(l)$ - распределение показателя преломления в фазовом объекте вдоль пути j -ой волны, l_j - длина пути j -ой волны в объекте, интегрирование ведется вдоль пути волны, u_j - оптическая разность хода j -ой волны в фазовом объекте.

Таким образом, для интенсивности излучения в точке \vec{q} получается:

$$I(\vec{q}) = A(\vec{q})A^*(\vec{q}) = I_{01} \sum_{j=1}^N \sum_{m=1}^N e^{i[k(u_j - u_m) + \theta_j - \theta_m]} = I_{01}N + 2I_{01} \sum_{\kappa=1}^K \cos[k\Delta u_{\kappa} + \Delta\theta_{\kappa}], \quad (7)$$

$$\Delta u_{\kappa} = u_j - u_m \quad (8)$$

где Δu_{κ} - относительная оптическая разность хода κ -ой пары центров рассеяния, $\Delta\theta_{\kappa} = \theta_j - \theta_m$, $j \neq m$, $\kappa = 1, 2 \dots K$, $K = N(N-1)/2$.

Далее выводится выражение для временной функции автокорреляции интенсивности излучения в точке \vec{q} , т.е. выражение:

$$R_{1,2}(t_1, t_2) = \langle [I_1 - \langle I_1 \rangle] \cdot [I_2 - \langle I_2 \rangle] \rangle = \langle I_1 I_2 \rangle - \langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle, \quad (9)$$

где индексы 1 и 2 означают моменты времени t_1 и $t_2 = t_1 + \tau$, угловыми скобками обозначено усреднение по ансамблю объектов (реализаций).

Предполагается, что Δu_{κ} для разных пар волн статистически независимы, а в одинаковых парах центров рассеяния в разные моменты времени имеется корреляция относительных оптических длин путей во времени. Полагается, что плотность вероятности для величин Δu_{κ} в два момента времени есть двумерная функция Гаусса.

В итоге получаем:

$$R_{1,2}(t_1, t_2) = I_{01}^2 N(N-1) \cos[\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle] \times e^{-\frac{1}{2}k_{11} - \frac{1}{2}k_{22} + k_{12}}, \quad (10)$$

где $x = k\Delta u$, опущен нижний индекс величины Δu_{κ} , k_{11} и k_{22} - дисперсии величины x в моменты времени 1 и 2, $k_{12} = \langle (x_1 - \langle x_1 \rangle)(x_2 - \langle x_2 \rangle) \rangle$.

Далее рассматривается важный для практики случай, когда либо $\langle \Delta u_1 \rangle = \langle \Delta u_2 \rangle$, либо величины $\langle \Delta u_1 \rangle$ и $\langle \Delta u_2 \rangle$ равны нулю. Кроме того, пусть процесс $\Delta u(t)$ - стационарный. Тогда $k_{11} = k_{22}$ и, следовательно,

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

где $\rho_{12}(\tau)$ - нормированная временная функция корреляции случайной величины $k\Delta u$;

τ - время.

Пусть при $\tau \rightarrow \infty$ $\rho_{12}(\tau) \rightarrow 0$. Таким свойством обладают, например, нормированная лоренцева и гауссова функции корреляции. Тогда в пределе

$$\eta = \eta^* = e^{-k_{11}}. \quad (12)$$

Таким образом, по выходу с течением времени величины η на постоянный уровень η^* можно определить дисперсию k_{11} изменяющихся во времени разностей фаз и вариацию σ_u величины Δu по формуле:

$$\sigma_u = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{k_{11}} \quad (13)$$

Корректность приведенных выше формул была проверена экспериментально в работе [19].

В предположении, что нормированная временная функция корреляции $\rho_{12}(\tau)$ является лоренцевой функцией вместо (11) получаем:

$$\eta(\tau) = e^{-k_{11} + k_{11} e^{-\frac{\tau}{\tau_0}}} \quad (14)$$

где

τ_0 - время корреляции разности фаз волн.

В экспериментах, проведенных в диссертационной работе величина η определялась по участкам кадров, зафиксированных в момент времени. Для того, что бы отличить теоретические и экспериментальные результаты величина коэффициента корреляции η , найденная экспериментально, ниже обозначена символом ρ .

Величина ρ определялась по формуле:

$$\rho = \frac{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}] [B_{i,j} - \bar{B}]}{\sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [A_{i,j} - \bar{A}]^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [B_{i,j} - \bar{B}]^2}}, \quad (15)$$

где

$A_{i,j}$ - сигналы в пикселях на участке размером $m \times n$ пикселей в начальный момент времени,

$B_{i,j}$ - сигналы в пикселях на этом же участке в другой момент времени τ ,

i, j - номера пикселей участков в направлении осей x и y соответственно,

\bar{A} - среднее значение сигналов на участке в начальный момент времени,

\bar{B} - среднее значение сигналов на участке в момент времени τ .

Как было отмечено выше, величина ρ имеет смысл величины η . Различие заключается в том, что в теории значение η определяется усреднением по ансамблю объектов, а величина ρ находится в эксперименте путем усреднения по участку изображения, содержащих достаточно большое число спеклов. Минимальному размеру спеклов в плоскости объекта соответствует область диаметром, равным линейному разрешению линзы. Таким образом, в эксперименте по-прежнему проводится усреднение по ансамблю объектов, а в качестве объектов выбираются области, размер которых сопоставим с линейным разрешением линзы.

2.2 Метод усреднения во времени в динамической спекл-интерферометрии тонких биологических объектов

Недостатком теории, опубликованной в работах [19,54], является трудность ее применения в случае, когда изменения фаз волн во времени происходят вследствие существования биологических процессов, одновременно протекающих с разной скоростью. Для устранения недостатков теории она была модернизирована в работе [72]. Идея заключалась в том, что при регистрации сигналов время усреднения выбирается таким образом, чтобы оно превышало время корреляции (время релаксации) τ_0 величины Δu наиболее быстро изменяющихся процессов. В этом случае динамика спеклов будет формироваться вследствие протекания более медленных биологических процессов, а интерпретация экспериментальных данных может упроститься.

Целью теоретического анализа на первом этапе являлось получение выражения для средней по времени T интенсивности излучения $\tilde{I}(\vec{q})$ в некоторой точке плоскости наблюдения \vec{q} , а затем - временной автокорреляционной функции случайного процесса $\tilde{I} = \tilde{I}(t)$.

Проведенные расчеты были аналогичны расчетам, приведенным в работах [19,54]. Для величины $\tilde{I}(\vec{q})$ было получено:

$$\tilde{I}(\vec{q}) = NI_0\xi_0^2 + I_0\xi_0^2 \sum_{n=1}^K \left[e^{i(\Delta\theta_n)} e^{ik\mu_n - k^2\sigma_n^2/2} + e^{-i(\Delta\theta_n)} e^{-ik\mu_n - k^2\sigma_n^2/2} \right], \quad (16)$$

где μ_n и σ_n^2 - соответственно среднее значение и дисперсия величины Δu_n , найденной за время T . Особо отметим, что эти величины характеризуют изменяющиеся за время T значения Δu_n , величина $\Delta\theta_n$ была определена в разделе 2.1

Пусть процесс $\Delta u_n = \Delta u_n(t)$ является в статистическом смысле однородным в области радиусом a_s . Тогда для всех пар волн $\mu_n = \mu$ и $\sigma_n^2 = \sigma^2$, вместо (16) имеем:

$$\tilde{I}(\vec{q}) = NI_0\xi_0^2 + 2I_0\xi_0^2 e^{-k^2\sigma^2/2} \sum_{n=1}^{\hat{E}} \cos[k\mu + \Delta\theta_n] =$$

$$= NI_0 \xi_0^2 + 2I_0 \xi_0^2 B e^{-k^2 \sigma^2 / 2} \cos(k\mu + \alpha), \quad (17)$$

где B и α - константы, зависящие от разностей фаз $\Delta\theta_n$ волн:

$$B^2 = E^2 + F^2, \quad E = \sum_{n=1}^K \cos(\Delta\theta_n), \quad F = \sum_{n=1}^K \sin(\Delta\theta_n), \quad \alpha = \arctg \frac{F}{E}. \quad (18)$$

Пусть теперь среди N центров рассеяния имеются две группы центров, в которых процессы $u_n = u_n(t)$ протекают в статистическом смысле однородно. Пусть число таких центров в группах 1 и 2 соответственно равно N_1 и N_2 . Показано, что

$$\tilde{I}(\bar{q}) = \tilde{I}_1 + \tilde{I}_2 + 2\tilde{I}_{12} \cos[k\Delta\mu + \theta], \quad (19)$$

где \tilde{I}_1 и \tilde{I}_2 - средние по времени интенсивности, формируемые участками 1 и 2 по отдельности, $\tilde{I}_{12} = I_0 \xi_0^2 e^{-\sigma_1^2 / 2 - \sigma_2^2 / 2} A_{12}$, $\Delta\mu$ - разность средних по времени значений u_n в группах 1 и 2.

Итак, если в оптической системе, показанной на рис. 6, за рассеивателем 2 поместить тонкий прозрачный объект 3, который случайным образом во времени изменяет фазы прошедших через него рассеянных волн, то картина спеклов в плоскости 5 будет изменяться. Согласно рассмотренной выше модели, выражение (16) определяет среднее по времени значение интенсивности излучения в точке \bar{q} , найденное путем интегрирования в промежутке времени от некоторого начального значения t_0 до $t_0 + T$. Таким образом, мы можем ввести в рассмотрение случайную непрерывную функцию $\tilde{I} = \tilde{I}(t)$, определяющую изменение величины \tilde{I} в точке \bar{q} во времени. Отметим, что величина t может соответствовать любому положению в промежутке времени длительностью T , лишь бы это положение было неизменным для любого t .

Далее в работе [72] получено выражение для временной автокорреляционной функции $R_{12}(t_1, t_2)$:

$$R_{12}(t_1, t_2) = \langle [\tilde{I}_1(t_1) - \langle \tilde{I}_1(t_1) \rangle] \cdot [\tilde{I}_2(t_2) - \langle \tilde{I}_2(t_2) \rangle] \rangle = \langle \tilde{I}_1(t_1) \tilde{I}_2(t_2) \rangle - \langle \tilde{I}_1(t_1) \rangle \langle \tilde{I}_2(t_2) \rangle, \quad (20)$$

где угловые скобки означают усреднение по ансамблю реализаций, $\tilde{I}_1(t_1)$ и $\tilde{I}_2(t_2)$ - значения \tilde{I} , соответствующие моментам времени t_1 и t_2 соответственно.

Расчеты показали, что

$$R_{1,2}(t_1, t_2) = I^2 N(N-1) C_0^2 \cos[\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle] \times e^{-\frac{1}{2}k_{11} - \frac{1}{2}k_{22} + k_{12}}. \quad (21)$$

С точностью до не существенного коэффициента C_0 выражение (21) совпадает с полученным ранее в работе [19] выражением для $R_{1,2}(t_1, t_2)$ при $T = 0$. Различие величин Δu_n , рассмотренных в работе [19] и в работе [72] заключается в следующем. В работе [19] разности путей волн Δu_n и интенсивность I рассматривались в фиксированный момент времени, а работе [72] брались эти же величины, но усредненные во времени.

На практике выбор времени усреднения T зависит от конкретного используемого материала в опыте. Желательно, чтобы величина T существенно превышала характерное время изменение величины Δu_n . Это условие может быть выполнено, например, в случае, если изменения фаз волн во времени происходят вследствие различных биологических процессов, одновременно протекающих на разных временных масштабных уровнях.

Пусть в выражении (21) время усреднения T превышает время корреляции величины $x = k\mu$. Тогда

$$R_{1,2}(\bar{q}, t_1, t_2) = I^2 N(N-1) \cos[\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle] \times e^{-k_{11}/2 - k_{22}/2}, \quad (22)$$

для нормированной функции автокорреляции имеем:

$$\eta(\bar{q}, t_1, t_2) = \frac{R_{1,2}(\bar{q}, t_1, t_2)}{R_{1,2}(\bar{q}, t_1, t_1)} = \cos[\langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle] e^{-k_{22}/2 + k_{11}/2}. \quad (23)$$

Полагая в формуле (23), что величины k_{11} , k_{22} и $k\mu$ малы по сравнению с единицей, можно разложить выражение (23) в ряд Тейлора в окрестности точек k_{22} и $k\mu$, равных нулю, сохранив производные первого порядка. Получаем

$$\eta(t) = 1 - (k_{22}(t) - k_{11})/2, \quad (24)$$

где $t = t_2 - t_1$.

Из формулы (24) видно, что если время усреднения T превышает время корреляции случайной величины $k\mu$, то связь между η и k_{22} линейная.

Из формулы (17) следует, что величина $\tilde{I}(\bar{q})$ содержит информацию о среднем за время T значении разности оптических путей μ и об их среднеквадратическом отклонении σ от среднего. Если $\sigma \approx \lambda$, то вторым слагаемым в правой части формулы (17) можно пренебречь. Тогда величина $\tilde{I}(\bar{q})$ равна средней интенсивности в спекл-поле. Рассмотрим далее выражение (17) при значениях $k\mu$ и $k^2\sigma^2/2$, малых по сравнению с единицей. Разложив вторую сумму в правой части выражения (17) в двумерный ряд Тейлора, сохраним производные первого порядка. Имеем:

$$\tilde{I} \cong NI + IB \cos \alpha - IB(\sin \alpha)k\mu = \tilde{I}_0 - \tilde{I}_f k\mu, \quad (25)$$

где

$$\tilde{I}_0 = NI + IB \cos(\alpha), \quad \tilde{I}_f = -IB(\sin \alpha).$$

Таким образом из выражения (25) следует, что при малых изменениях разности путей волн, средняя по времени интенсивность пропорциональна величине $k\mu$. Коэффициент пропорциональности \tilde{I}_f является случайной величиной, и может иметь знак плюс или минус, быть равным нулю.

2.3 Разработка оптической системы в соответствии с требованиями теории

Исходя из выводов теоретического анализа разделов 2.1 и 2.2 настоящей работы, а так же литературных данных, к оптической установке были разработаны требования по ее содержанию. Установка включает в себя следующие элементы:

- 1 - лазер,
- 2 - диффузор,
- 3 - тонкий биологический объект,
- 4 - линза с диафрагмой,
- 5 - матрица фотоприемника в плоскости изображения.

Характеристики компонентов оптической установки должны быть согласованы для ее корректного функционирования. Рассмотрим эти характеристики в указанной выше последовательности.

Как следует из теории, в точке наблюдения (пиксели фотоприемника) случайное значение интенсивности формируется в результате взаимной интерференции многих волн, распространяющихся от центров рассеивания, расположенные в области диаметром $2a_s$ в сопряженной плоскости (плоскости объекта). В нашем случае эта плоскость является плоскостью матового стекла. Следовательно, длина когерентности лазера должна быть больше разности оптических путей двух волн, а именно, испущенных из центра области и на ее периферии. В наших экспериментах $2a_s = 60$ мкм. Элементарные оценки показывают, что длина когерентности, выпускаемых коммерческих лазерных модулей с длиной когерентности 1 мм вполне достаточных для проведения экспериментальных исследований в диссертационной работе.

При использовании матового рассеивателя следует учесть, что в области диаметром $2a_s$ должно располагаться большое число центров рассеивания. Обычно полагают, что расстояние между центрами рассеивания примерно равно характерному размеру неоднородности рельефа. Следовательно, при

изготовлении матового стекла, оно должно обрабатываться абразивами, размер которых намного меньше диаметра $2a_s$.

Минимальный размер спеклов в плоскости изображения матового стекла должен быть больше, чем размер пикселя матрицы фотоприемника. В противном случае реализуется техника так называемых интегрированных спеклов, что не соответствует рассмотренной выше теории. В наших экспериментах размер пикселя был равен 8,3 мкм, а минимальный размер спеклов b_s , оцененный по формуле $b_s = 1,22\lambda L_0/D$ описанной в разделе 2.1 настоящей работы, был приблизительно равен 20 мкм. Спеклы данного размера необходимо формировать путем изменения диафрагмы D .

Из теории следует, что волны исходящая из области диаметром $2a_s$ должны зондировать разные участки в клетках. Следовательно, объект исследования должен располагаться как можно ближе к матовому рассеивателю. Поэтому в экспериментах кювета с прозрачной подложкой с клетками должна находиться вблизи матового рассеивателя.

Таким образом, на основе приведенных выше данных, можно сделать следующие выводы:

1. в настоящее время разработана теория динамики спеклов микроскопических процессов, учитывающая возможность регистрации интенсивности излучения в фиксированный момент времени и путем усреднения во времени;
2. установлены основные закономерности, связывающие параметры характеризующие, случайные изменения разности фаз волн и характеристики динамики спеклов;
3. сформулированы требования к характеристикам оптической установки, необходимые для разработки оптической системы в соответствии с требованиями теории.

3. Объект исследования и техника эксперимента

Все более широкое применение в разных областях биологии и медицины находят клеточные культуры. В современной биологии под понятием клеточная культура (лат. *cultus* - возделывание, обрабатывание) понимается популяция клеток определенного тканевого и видового происхождения, обладающая стабильными фенотипом и кариотипом существующая *in vitro*. Клеточная культура, как правило, относится к клеткам какого-то определенного вида ткани (напр., культура лимфоцитов, культура фибробластов и т. д.), но ткани в них, как правило, не образуются. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и др.

Существует четыре основных типа клеточных культур:

1. Высокотрансформированные. Получают на основе раковых тканей или путем трансформации диплоидных культур некоторыми вирусами
2. Спонтанно трансформированные, получены из диплоидных культур случайным образом, без использования специальных методик.

Трансформированные культуры имеют неограниченный срок жизни и генетические характеристики отличающиеся от исходных тканей организма из которых они получены.

В обоих случаях физиологические процессы в клетках отличаются в большей или меньшей степени от нормальных клеток в сторону интенсификации.

3. Диплоидные. Получают из нормальных тканей организма, их генетические и физиологические характеристики не отличаются от исходных организма донора. Кроме того, они имеют ограниченный срок жизни - 50 удвоений количества (т.н. предел Хейфлика), после чего включаются процессы апоптоза и культура отмирает без участия внешних факторов.

4. Первичные. Используются сравнительно редко и в данном исследовании не рассматривались.

В качестве объектов исследований были выбраны наиболее изученные типовые клеточные культуры:

1. культура клеток Л-41 КД/84 и культура клеток Л-41 КД/84, зараженная ВПГ-1. Данная культура является высокотрансформированная.

2. культура клеток Vero и культура клеток Vero, зараженная ВПГ-1. Эта культура относится к спонтанно трансформированному типу.

3. культура клеток ЛЭЧ-3 и культура клеток ЛЭЧ-3, зараженная ВПГ-1. Культура ЛЭЧ-3 является диплоидной.

В данной работе использовался монослой исследуемой клеточной культуры, то есть культуры, клетки которой прикреплены к ростовой подложке в один слой и не образуют пространственных скоплений. Все стадии развития данных культур хорошо изучены с помощью классических методов исследований и описаны в научной литературе [56].

Подготовка биологических образцов осуществлялась специалистами ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора (ЕНИИВИ) по методикам, приведенным ниже.

3.1 Клеточная линия Л - 41 КД84, подготовка культуры клеток Л-41 КД/84 и Vero

В данной работе использовалась клоновая линия Л-41 КД/84, которую получали сотрудники ЕНИИВИ в лаборатории клеточных культур в результате двукратного клонирования линии по методу Пака с последующей обработкой антибиотиками. Данная методика используется в лабораторных исследованиях с 1984 г.

Согласно паспорту клеточной линии Л-41 КД /84 [11], известен штамм перевиваемых клеток G-96, полученный из крови больного моноцитарной лейкемией, из которого В.Д. Соловьевым с соавторами в 1966 г. путем трехкратного воздействия большими дозами вируса Коксаки В3 была получена сублиния (G-41) специфически резистентная к этому вирусу.

По морфологическим признакам клеточная линия Л-41 представляет ровный монослой четких эпителиоподобных полигональных или округлых клеток; постоянно присутствуют гигантские клетки в количестве 4-6%. Цитоплазма мелкозернистая. Ядра округлые, содержат 2-4 ядрышка. Аномальных форм митоза до 6 %. Число клеток с ядрами неправильной формы до 8%. Монослой образовывался на 3-5 сутки с момента посадки в среде, состоящей из равных объемов среды Игла и среды 199 с добавлением 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота. Среда поддержания клеток содержит необходимые аминокислоты, витамины, соли и глюкозу.

Культура высоко чувствительна к вирусам полиомиелита, Коксаки В, ЕСНО-19, аденовирусам человека, вирусу кори.

Процесс получения культуры клеток Л-41 КД/84 и Vero одинаков, так как данные культуры схожи по морфологии и относятся к одному виду перевиваемых линий клеток.

Перевиваемые клетки представляют собой культуры, поддерживаемые неопределенно длительный срок путем непрерывного деления (пассирования). Качество культур на каждом из пассажей определяется жизнеспособностью исходной популяции, взятой для посева. Посев культуры осуществляли с интервалом 4-7 дней, по мере того, как популяция достигает максимальной для данного сосуда плотности. Интенсивность роста клеточной популяции регулировалась за счет изменения посевной дозы клеток и состава среды роста. При обычных условиях культивирования клеток прирост их за 4-7 дней (один пассаж) составляет до 6 раз, в зависимости от типа культуры.

При пассировании перевиваемых клеточных линий использовались питательные среды постоянного состава. Клетки, адаптированные к росту на определенных средах, отличаются относительной стабильностью своих биологических характеристик, что обуславливает получение однозначных результатов при их использовании в экспериментальной и диагностической работе.

Для культивирования данных клеток использовались среды 199, Игла и смесь равных количеств этих сред с 0,5 % раствором гидролизата лактальбумина.

К среде роста добавлялись антибиотики, гентамицин в дозе 100мкг/мл. Во время данного процесса тщательно соблюдались асептические условия работы с клеточными культурами при добавлении антибиотиков в среду культивирования, рН среды культивирования поддерживали в пределах 7.2-7.4.

Особого внимания заслуживает вопрос адаптации клеточных линий к новым условиям культивирования. Адаптация клеток к росту в новой по составу или среде с сывороткой другого вида проводилась поэтапно. Резкая смена условий и состава сред культивирования приводила не только к изменению биологических характеристик клеточной линии, но и к утрате культуры. Используемые для выращивания клеточные культуры среды отвечали главному условию: поддержание не только оптимального (не менее 4-6 кратного на 4-7 сутки) прироста клеток, но и последующей возможности использования этих культур в дальнейших вирусологических исследованиях.

Снятие культур при пересеве производили на 4-7-е сутки роста, когда образуется сплошной монослой. Матрасы с клетками просматривали в проходящем свете, обращая внимание на цвет среды роста: при хорошей пролиферации клеточной культуры происходит сдвиг рН среды в кислую сторону, что определяют по степени её пожелтения. Среда роста должна быть прозрачной. При этом особое внимание обращали на состояние клеток, составляющих монослой. Жизнеспособные клетки имеют чёткие границы и структуру, типичную морфологию без выраженной зернистости и вакуолизации. Для дальнейшего пассирования и работы отбирали матрасы с прозрачной средой и полноценным монослоем, при условии полной стерильности бактериологических контролей.

Перед работой в настольном боксе или на рабочем столе горловину матрасов с пробкой тщательно обжигали спиртовым факелом. У пламени горелок среду из матрасов сливали в стерильные сосуды, а на монослой наливали тёплый (20-37°C) раствор версена, либо версена с химопсином (1 ампула на 500 мл),

оставляли при комнатной температуре на 1-2 минуты, пока клетки на отдельных участках не начнут слегка отходить от стекла. Затем раствор сливали и матрасы оставляли еще на 5-30 минут в зависимости от типа клеток, после чего вносили питательную среду и встряхивали до полного отслоения клеток от стекла. Клеточную суспензию из отдельных матрасов собирали в общую колбу, затем пипетировали и отбирали 1 мл. для подсчета клеток [62].

Для подсчета клеток использовали камеру Горяева по общепринятой методике. Сетки камеры накрывали покровным стеклом, притирая его края к её поверхности до появления радужных колец. Из суспензии клеток для счета отбирали 1 мл, добавляли 1 мл 0,5%-ного раствора трипановой синей на физиологическом растворе, перемешивали и пастеровской пипеткой заполняли смесью счетную камеру. Излишек сноса удаляли фильтровальной бумагой. Клетки при этом должны располагаться равномерно, без пузырьков воздуха. Подсчет клеток проводился при слабом увеличении микроскопа. При этом живые клетки не окрашивались, а мертвые окрашивались в синий цвет. Затем подсчитывали общее число клеток количество живых и мертвых клеток. При пересеве культуры учитывались только живые клетки.

В соответствии с результатами подсчета клеточная взвесь разводилась питательной средой до необходимой концентрации и клетки засеивались в соответствующие требованиям культуральные флаконы. На матрасах обозначали дату посева, название линии клеток и номер пассажа. Питательную среду вносили в матрасы в количестве, соответствующем их объёму. Далее матрасы помещали в термостат и инкубировали при 37°C до следующего пересева.

Посев клеток на пробирки производили из расчета 100-200 тыс. кл/мл, в зависимости от вида клеток. После проведенных процедур монослой клеток использовали для работы через 48-72 часа роста.

3.2 Клеточная линия Vero

Данную клеточную линию сотрудники ЕНИИВИ получают из клеток нормальной почки обезьяны (взрослой африканской зеленой мартышки). Число генераций и пассажей: до начала анализа прошла более 120 пассажей. В лабораторных исследованиях используется с 1962 г., в лабораторию клеточных культур ЕНИИВИ получена из МНИИВП в 1969 году.

Монослой образуется на 3-5 сутки с момента посадки. Кратность прироста 6-7 на 5 сутки.

Морфологические характеристики: эпителиоподобные клетки, полигональные, с заметной вакуолизацией, зоны роста четко ориентированы

Кариологическая характеристика: По структуре кариотипа клетки соответствуют кариотипу обезьяны. Диплоидных клеток 44 %, гиперплоидных - 3 %, гипоплоидных - 53%.

Видовая принадлежность: обезьяна, подтверждено кариологически, Сведения о контаминации: бактерий, грибов, микоплазм не выявлено. Сохраняется в среде роста + 10% глицерина в жидком азоте. При размораживании восстанавливается 80-85 % клеток.

Культура высоко чувствительна к вирусам полиомиелита, арбовирусам. Процесс получения клеточной линии описан в разделе 3.1. настоящей работы.

3.3 Клеточная линия ЛЭЧ-3, подготовка культуры клеток

Клеточную линию ЛЭЧ-3 сотрудники ЕНИИВИ получали из нормальной ткани легкого эмбриона человека. Способ получения данной линии разработан в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ Н.П. Глинских с соавторами в 1980 году из легких 12-ти недельного эмбриона человека, от здоровой женщины не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний.

Число генераций и пассажей: до начала анализа прошла не более 20 пассажей.

Монослой образуется на 4-5 сутки с момента посадки. Морфологические характеристики: клетки фибробластоподобного типа с четкими границами.

Кариологическая характеристика: По структуре кариотипа клетки соответствуют кариотипу человека. Модальный класс содержит 87 % клеток с нормальным диплоидным набором хромосом человека.

Видовая принадлежность: человек, подтверждено кариологически, изоэнзимным методом.

Сведения о контаминации: бактерий, грибов, микоплазм не выявлено. Сохраняется в среде роста + 10% глицерина в жидком азоте. При размораживании восстанавливается 70 % клеток.

Чувствительность к вирусам: культура высоко чувствительна к полиовирусам 1,2,3 типов, Коксаки В3, ЕСНО 3,6,11,13,19,20,24,28, РС-вирусам, вирусу простого герпеса.

Ткани эмбриона человека являются одним из основных источников получения диплоидных клеточных культур. Учитывая возможность длительного поддержания штаммов клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ-3) с сохранением основных параметров, присущих культуре диплоидных клеток человека, ниже приведена оптимальная упрощенная схема получения таких культур.

Клетки ЛЭЧ формировали плотный монослой фибробластоподобных клеток на 3-4 сутки роста. Субкультивирование проводили по мере формирования монослоев с коэффициентом посева 1:2. Среда культивирования имеет рН в

пределах 7.2-7.4. Продолжительность жизни диплоидного штамма клеток ЛЭЧ составляет 40-50 пассажей.

Фаза активного роста клеток начинается с 4-5 пассажа и продолжается до 35-40 пассажа. Формирование сплошного клеточного монослоя на этой фазе развития культуры происходило на 3-4 сутки. Коэффициент посева клеток в этот период составляет 1:2. Фаза старения начиналась, как правило, после 35-40 пассажа.

Для создания фонда этих культур, клетки необходимо было накопить и заморозить при -196°C на ранних этапах до 10-12 пассажа.

Клеточные штаммы, замороженные в период активного роста, с использованием оптимального режима и условий консервации, обладают высокой жизнеспособностью - до 90-92 %, а по своим биологическим свойствам не отличаются от исходной культуры.

Для культивирования диплоидных клеток рекомендовано использование питательных сред постоянного состава. Оптимальной средой для клеток ЛЭЧ является среда Игла или Игла MFM с добавлением сыворотки крови плодов крупного рогатого скота. Антибиотики не используют, при pH среды - 7.2-7.4.

Данные по выделяемости и накоплению вирусов и скорости развития ЦПД на диплоидных клетках ЛЭЧ показал, что наиболее целесообразным является использование диплоидных клеток для вирусологических исследований с 5 до 30 пассажей. Диплоидные клетки ЛЭЧ чувствительны к аденовирусам человека, к вирусу гриппа (А,В), РС-вирусу, вирусам полиомиелита (типы 1-3), ЕСНО (типы 1-4 и 1-16), простого герпеса, арбовирусам.

3.4 Процедура получения вируса герпеса простого ВПГ-1

Для проведения исследований использовали эталонный в России штамм вируса простого герпеса L2 полученный в институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Для этого вирус был целенаправленно адаптирован к росту на каждой из применявшихся культур. Заражение культур проводили в дозах вызывающих выраженное поражение культуры через 72 часа.

Все работы с клеточными культурами и вирусом проводили согласно общепринятым методикам.

Процедура получения вируса герпеса простого осуществлялась по методике описанной ниже.

В 12 вращающихся бутылках Винчестер было посеяно по $2 \cdot 10^7$ клеток ВНКС13 в МСИТС (минимальная среда Игла с 10% триптозофосфатного бульона и 10% сыворотки теленка) Выращивание производили в термостате при 37°C в течение 3 дней [62,64]. Каждая культура была инфицирована вирусом (20 мл) в среде Игла, не содержащей сыворотки при множественности заражения 1 БОЕ на 300 клеток.

Далее культура была инкубирована при 37 °С в течение 1 ч для адсорбции вируса клетками. Затем было добавлено 50 мл среды Игла с 5% триптозофосфатом и 5% сыворотки теленка и инкубирование при 37°C в течение 2 дней или при 32°C в течение 3 дней. После этого, встряхивали сосуды, чтобы отделить клетки от стекла. Если клетки не отделялись, то производили обработку монослоя версеном. Путем центрифугирования клетки осаждались при 400g в течение 10 мин.

Надосадочную фракцию сливали и центрифугировали ее при 20000g в течение 90 мин. Полученную надосадочную фракцию сливали в раствор хлороса, а осадок суспендировали в МСИ с 10% триптозофосфата и 5% сыворотки теленка. Аликвоты суспензии разливали по маленьким бутылкам и хранили при - 70°C.

Образовавшие осадок клетки разрушали озвучиванием или тремя циклами замораживания и оттаивания в бане лед/этанол. Обломки клеток осаждали при 400g в течение 10 мин и аликвоты надосадочной фракции хранили при - 70°C.

Оба препарата вирусов проверяли на бактериальное загрязнение, инокулируя препараты в бульон с экстрактом сердца и мозга (1 неделя при 37 °C) или в жидкую среду Саборада (1 неделя при 37°C). Вирусы из хранящихся препаратов также очищали седиментацией в растворах с высокой плотностью, например в насыщенных растворах KBr или RbCl. В этих условиях выявлялись полосы, соответствующие вирионам и пустым частицам.

3.5 Оптическая установка

Для реализации цели поставленной в настоящей работе была сделана установка, оптическая система которой соответствует схеме приведенной на рис. 6. Разработка оптико-электронной системы визуализации динамики спеклов произведена в соответствии с результатами теоретического анализа динамики биоспеклов тонких биологических объектов.

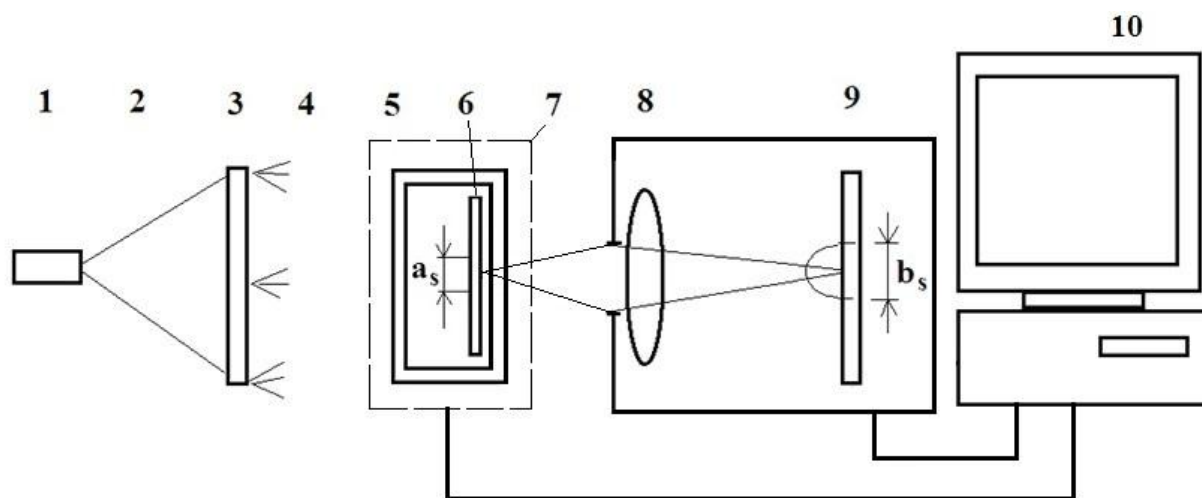


Рисунок 7 - Блок-схема оптической установки. 1 - полупроводниковый лазерный модуль, 2 - освещающий пучок, 3 - матовое стекло, 4 - рассеянное излучение, 5 - стеклянная кювета, 6 - подложка с монослоем клеток, 7 - моторизованный транслятор, 8 - линза с диафрагмой, 9 - матрица фотоприемников телекамеры, 10 - ноутбук.

В качестве источника света 1 был выбран полупроводниковый лазерный модуль модели KLM-D532-20-5, изготовленный на основе высоконадежных лазерных кристаллов и имеющий следующие характеристики:

1. длина волны $\lambda=0,532$ мкм;
2. выходная мощность излучения 5.0 до 20.0 мВт/см²;
3. выходной диаметр пучка излучения - 8 мм;
4. размер корпуса: диаметр 20 мм, длина 95 мм.

5. расходимость пучка излучения - 0.1 до 0.2 мрад;
6. коллиматор - стеклянный;
7. количество линз коллиматора - пять с просветлением;
8. рабочая температура от +5 до +40 °С.

Выбор данного модуля обусловлен двумя параметрами:

1. интегральная плотность мощности излучения не должна превышать 20 мВт/см², что обосновывается в разделе 1.2 настоящей работы;
2. согласование по спектру источника и приемника излучения.

Использованная в опытах монохромная телекамера типа Видеоскан - 415/П/К-USB регистрирует изменения на своей матрице фотоприемника 9 только в видимом диапазоне. Данная камера имела следующие характеристики:

1. матрица фотоприемника 9 типа ПЗС марки SONY ICX415 размером 6.5×4.8 мм., содержащую 780×582 ячеек размером 8.3×8.3 мкм;
2. частота ввода кадров - до 25 Гц;
3. режимы синхронизации: внешняя, внутренняя, программная;
4. размер корпуса: диаметр 59 мм, длина 46 мм;
5. длительность экспозиции (управляется программно): от 1 мкс до 500 с;
6. рабочая температура от -10 до +50 °С.

Излучение 2 от лазерного модуля попадало на матовый рассеиватель 3. Вблизи рассеивателя 3 располагали стеклянную кювету 5 размером 9×25×40 мм, внутри которой фиксировали подложку с монослоем клеток 6. Кювета заполнялась средой поддержания. Далее излучение попадало на линзу (объектив) 8 с диафрагмой, формирующей картину спеклов. Увеличение, формируемое линзой 8, равнялось 0.27×, линейное разрешение на матовом стекле 3 составляло 60 мкм. В области, соответствующей разрешению линзы 8, могли располагаться 2-3 клетки. Кювета располагалась на моторизованном трансляторе 7 фирмы Standa типа 8MT177-100 с разрешением 0,125 мкм. Транслятор использовался для калибровки прибора.

Для обеспечения жизни клеток в оптимальных условиях, установку впоследствии модернизировали, путем установки ее в термостат [29,30].

Температура в термостате поддерживалась равной 36 °С. Даная температура является оптимальной для нормального функционирования клеток.

На рис. 8 представлен общий вид экспериментальной оптической установки используемой в данной работе.

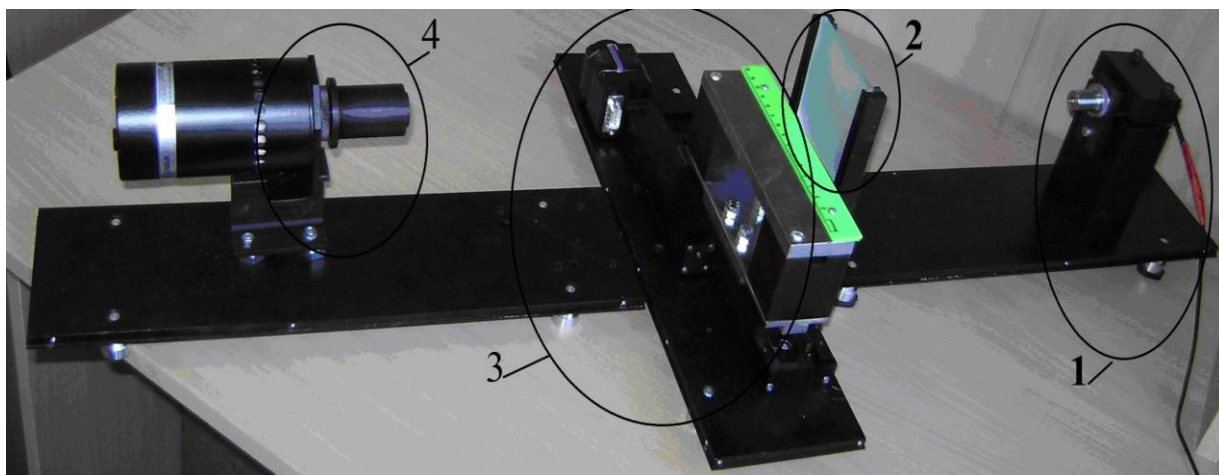


Рисунок 8 - Общий вид экспериментальной установки. 1 - узел фиксации лазерного модуля с расширителем пучка, 2 - узел фиксации матового рассеивателя, 3 - моторизованный транслятор с фиксатором кюветы или пластины для калибровки, 4 - узел для фиксации линзы диафрагмы и фокусировки на объект.

Особенностью узлов установки представленных на рис. 8 является жесткая фиксация всех элементов, которая обеспечивает их неподвижность при проведении эксперимента.

3.6 Программное обеспечение

Для ввода кадров изображения была использована программа «Viewer», поставляемая вместе с телекамерой «Видеоскан». Программа имеет опции, позволяющие записывать отдельные кадры, а также фильмы динамики спеклов. Запись кадров фильма осуществлялась в формате bmp. Программа позволяла задавать усиление сигнала, время экспонирования кадров и контролировать частоту вводимых кадров. Окно программы изображено на рис. 9.

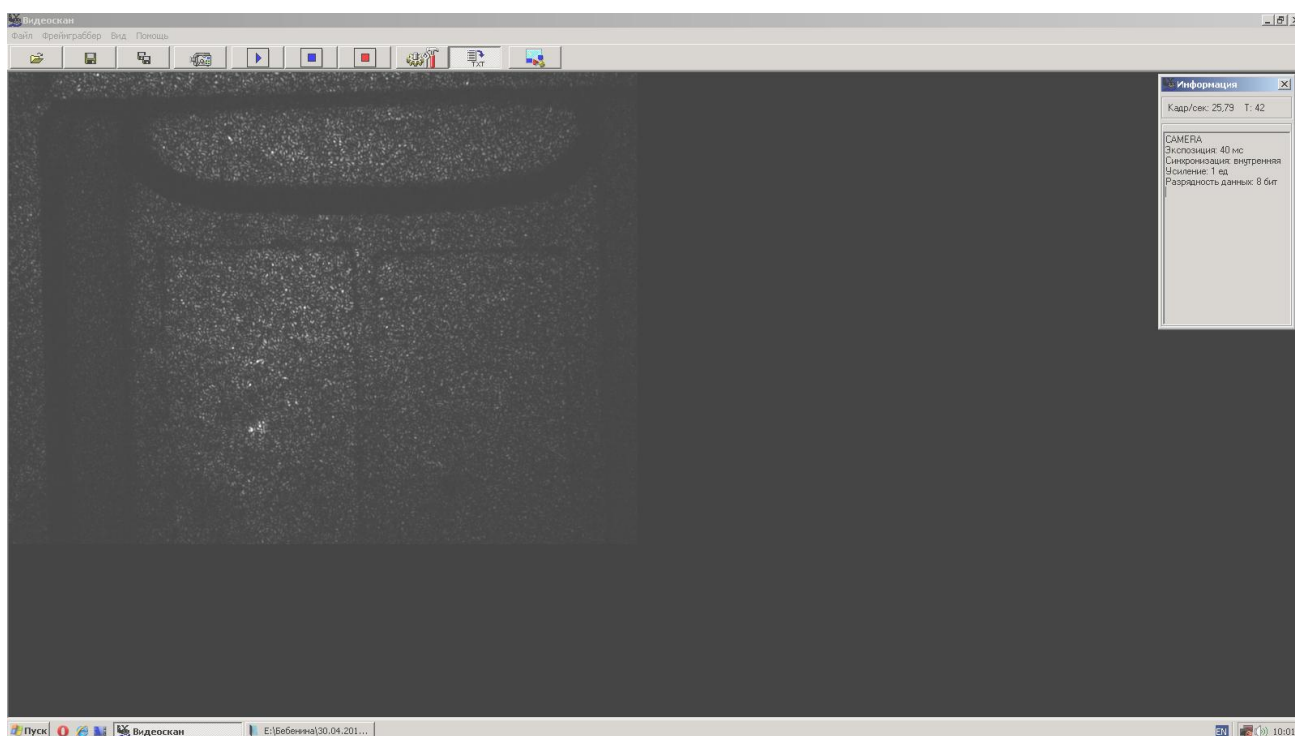


Рисунок 8 - Окно программы «Viewer»

Визуализация отдельных кадров, а также определение степени корреляции ρ выделенного участка на двух кадрах изображения осуществлялась с помощью оригинального программного пакета (ОПП) [26]. Данный программный пакет позволял определять значение ρ по формуле (15).

Интерфейс ОПП изображен на рис. 10.

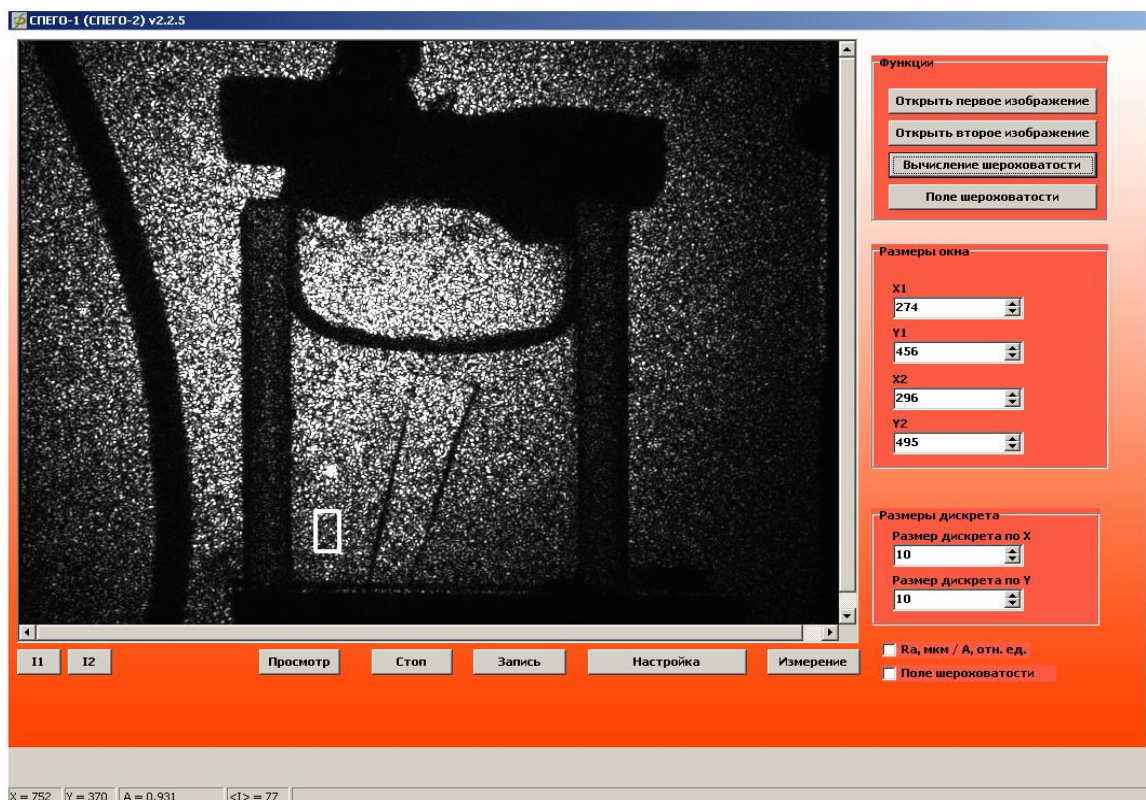


Рисунок 9 - Интерфейс ОПП

Работа с программой велась по следующему алгоритму:

1. при нажатии кнопки “Открыть первое изображение” в ОПП, вводился начальный кадр фильма. Это достигалось путем выбора оператором кадра из открывающего окна. После этого нажималась кнопка “Открыть второе изображение”, аналогичным образом вводился кадр, соответствующий другому времени того же фильма.
2. далее на мониторе оператор выбирал интересующий его участок. Участок выбирался с помощью курсора или путем задания координат. Например, можно было выделить участок, соответствующий монослою клеток или наоборот, участок, соответствующий только питательному раствору;
3. после выбора участка, при нажатии оператора кнопки ОПП по формуле (15) вычислял и выводил в нижней строке значение коэффициента корреляции выделенных участков спекловых изображений.

4. по полученным значениям коэффициентов корреляции спекловых изображений в стандартном пакете Microsoft Excel 2010 строилась зависимость ρ от времени;
5. используя формулу (13) раздела 2.1 настоящей работы находилось значение вариации разности оптических путей пар волн.

Для цифровой обработки кадров изображения, зафиксированных в виде фильма, было использовано программное обеспечение «Obr Rec», описанное ранее в работе [53].

Работа программным обеспечением «Obr Rec» велась по-схожему алгоритму работы с ОПШ:

1. в разделе “первоначальная обработка” при нажатии кнопки “Открыть первый кадр”, вводился начальный кадр фильма, путем выбора оператором кадра из открывающегося окна. После этого программа позволяла в левом окне просмотреть весь фильм, для этого достаточно было нажать в панели воспроизведения кнопку “▶”. Во время просмотра фильма можно было его приостановить фильмом нажатием кнопки “||” или остановить нажатием кнопки “■”. Интерфейс программы «Obr Rec» изображен на рис. 11;

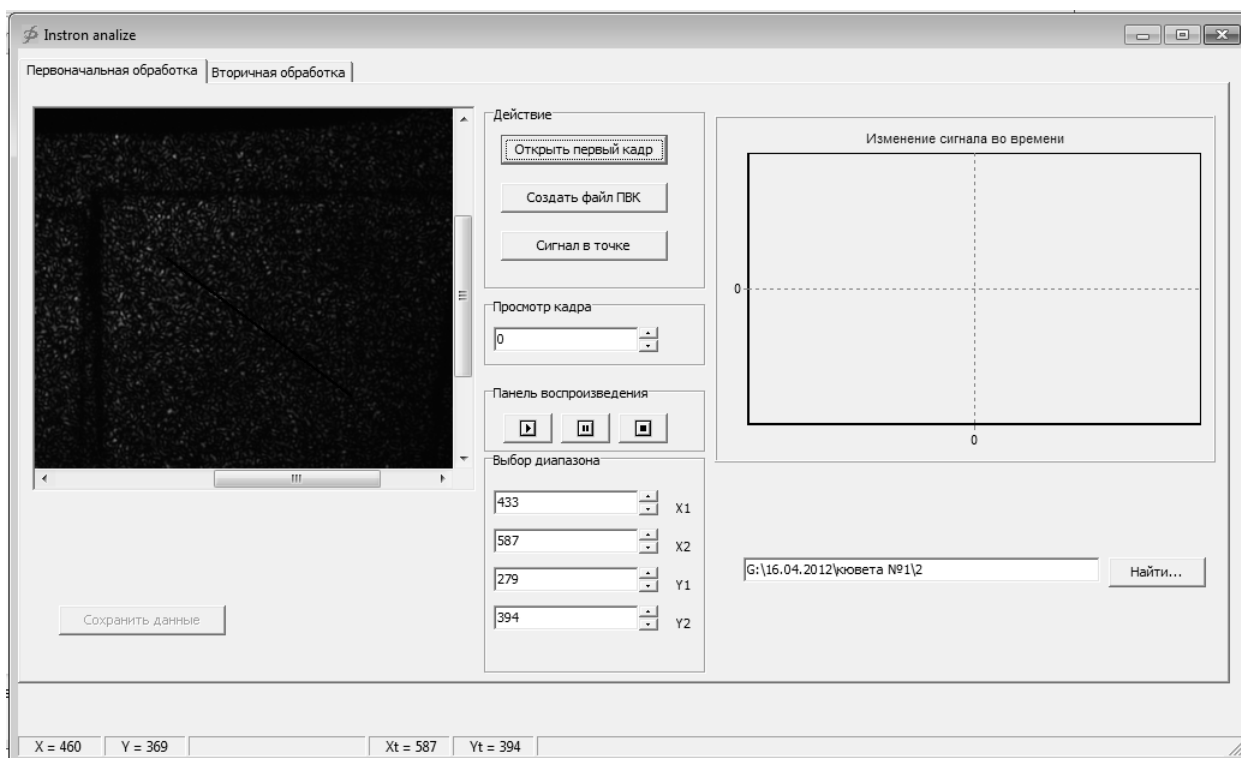


Рисунок 11 - Интерфейс программы «Obr Rec»

2. далее оператор задавал линию на кадре с помощью курсора или путем ввода координат в разделе “выбор диапазона”. При нажатии кнопки “Создать файл ПВК” программа захватывала изображение каждого кадра вдоль этой линии и последовательно располагала их сверху вниз. Тем самым формировалась двумерная картина, которая сохранялась в виде изображения в графическом формате BMP. Это изображение позволяло визуализировать сигналы, изменяющиеся в пространстве (вдоль линии) и во времени;
3. после регистрации картины оператор выбирал интересующий его участок. По его команде при нажатии кнопки “Сигнал в точке” программа начинала оцифровку сигналов и выводила на экран график зависимости величины сигнала в конкретной пиксели от времени. В программе предусмотрен вывод на экран спектра сигнала в правом окне, а так же сохранение данных в текстовом формате;

4. дальнейшая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью стандартных пакетов (Microsoft Excel 2010, MathCAD 14).

Обработка количественных параметров сигналов, пропорциональных интенсивности излучения I и величины ρ в режиме реального времени осуществлялось оригинальным программным обеспечением (ОПО), разработанным под операционную систему MS-DOS [31-33,72-73]. ОПО позволяло рассчитывать два параметра:

1. цифровое значение I в выбранных пикселях в зависимости от времени;
2. коэффициента корреляции спекловых изображений выбранного участка ρ в зависимости от времени.

Для подготовки данной программы к работе, вначале с помощью программы «Viewer», поставляемой вместе с телекамерой «Видеоскан», регистрировали кадр изображения объекта.

Данный кадр сохраняли в графическом формате bmp и открывали в графическом редакторе Paint Microsoft Windows любой версии. Затем на выбранном кадре с помощью графического редактора выделяли пиксели. Координаты пикселей заносили в конфигурационный файл ОПО с помощью текстового редактора Блокнот Microsoft Windows. В окрестности выделенных пикселей на участке размером 10×10 пикселей программа определяла величину ρ . Интерфейс графического редактора Paint Microsoft Windows с выделенными участками изображен на рис. 12. На данном рисунке выбрано по десять участков на изображении интактных и зараженных ВПГ-1 клеток Л-41 КД/84, а также пять контрольных участков за пределами изображения кюветы.

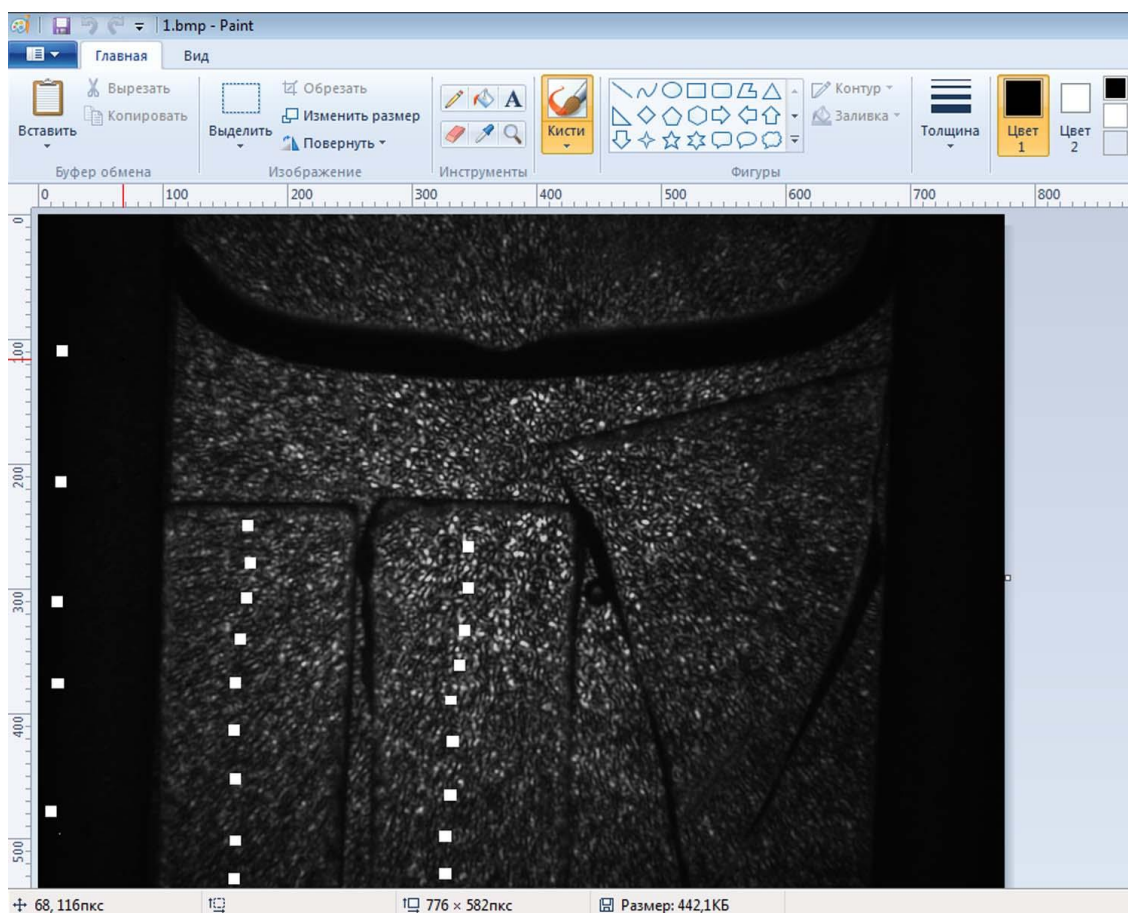


Рисунок 12 - Интерфейс графического редактора Paint Microsoft Windows с выделенными участками

Интерфейс текстового редактора Блокнот Microsoft Windows с заданными координатами участков изображен на рис. 13.

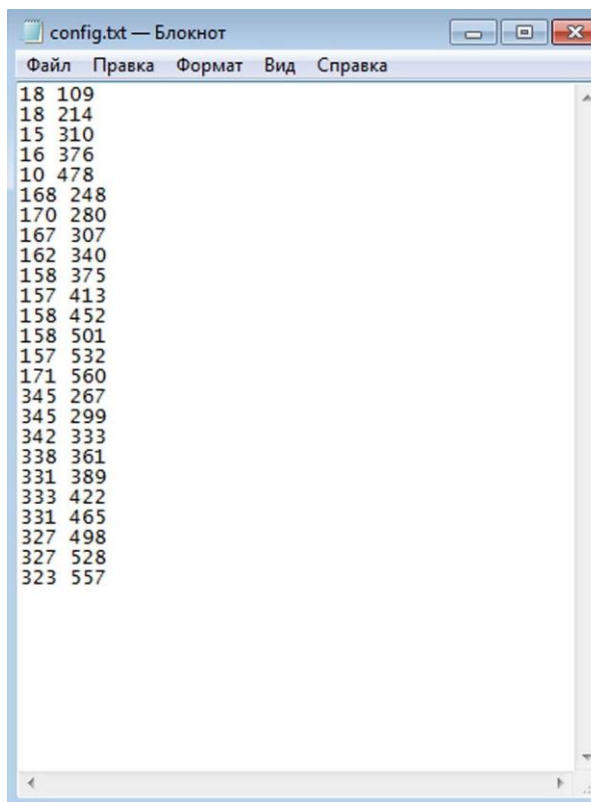


Рисунок 13 - Интерфейс текстового редактора Блокнот Microsoft Windows с заданными координатами участков

После введения координат выделенных участков оператором запускалось ОПО. ОПО производило непрерывную запись величин I и ρ в память компьютера в отдельные файлы, которые сохранялись в формате txt. Одновременно величина η в режиме реального времени выводилось на экран монитора. Окно интерфейса ОПО изображено на рис. 14.

```
C:\vc60\MSDev98\MyProjects\simple_new\simple.exe
Transfer OK
TransferSize 451632 TransferredSize 451632 Pixel 100 100 =Input Frame 5
Wait data
Data ready. Begin transfer.
0.996133 0.996797 0.992160 0.990144 0.993154 0.986889 0.987507 0.987859 0.988068
0.994266 0.998019 0.989262 0.994449 0.993299 0.989684 0.993599 0.994388 0.99225
0 0.994245 0.992347 0.993628 0.990140 0.991697 0.990744 0.994502
Transfer OK
TransferSize 451632 TransferredSize 451632 Pixel 100 100 =Input Frame 6
Wait data
Data ready. Begin transfer.
0.991862 0.996543 0.982468 0.979136 0.978051 0.985596 0.972893 0.976819 0.980515
0.991400 0.994622 0.979475 0.986960 0.985405 0.981055 0.984008 0.992123 0.98870
9 0.990091 0.988744 0.976873 0.966035 0.982074 0.975523 0.989883
Transfer OK
TransferSize 451632 TransferredSize 451632 Pixel 100 100 =Input Frame 7
Wait data
Data ready. Begin transfer.
0.987967 0.997809 0.967848 0.963570 0.964706 0.981562 0.961092 0.956527 0.971109
0.989720 0.990562 0.969423 0.982329 0.974408 0.959797 0.986069 0.979376 0.98179
3 0.981033 0.983950 0.966942 0.964806 0.967056 0.961764 0.984286
Transfer OK
TransferSize 451632 TransferredSize 451632 Pixel 100 100 =Input Frame 8
Wait data
```

Рисунок 14 - Интерфейс ОПО при работе в режиме реального времени

По истечении заданного промежутка времени, а в данной работе эти промежутки составляли около 2-х суток, оператор останавливает работу ОПО. Затем, используя стандартные пакеты (Microsoft Excel 2010, MathCAD 14) производилось обработка экспериментальных данных.

3.7 Методика проведения экспериментов и обработки результатов

В экспериментах по изучению влияния температуры на метаболическую активность клеток в кювету помещали подложку с клетками, после чего заполняли ее средой поддержания. Кювету закрывали герметически пробкой, через пробку вводили термопару для измерения температуры. Конец термопары находился на расстоянии ~ 3 мм над уровнем жидкости. Подачей подогретого воздуха и нагревали кювету до 40-42°C. Затем перекрывали потоки воздуха и проводили съемку фильмов динамики спеклов при естественном охлаждении до комнатной температуры. Время съемки фильма составляло от 20 до 25 с при частоте 25 кадров/с.

Для проведения исследований с вирусом простого герпеса использовались две кюветы №1 и №2, заполненные средой поддержания. В кювете №1 располагали две стеклянные подложки, на одной из которых наносился предварительно монослой клеток. В кювете №2 размещались такие же по геометрическим размерам стеклянные подложки, в отличие от кюветы №1, на одной из подложек монослой клеток был заражен герпесвирусной инфекцией. Время заражения точно фиксировалось. Оптическая установка с кюветами располагалась в термостате. Эксперименты проводились при температуре 36°C. Фильмы динамики спеклов записывались длительностью 20 с при частоте кадров - 25 кадров в секунду.

На рис. 15 представлена типичная картина спеклов в кювете №1, наблюдаемая в фиксированный момент времени на экране компьютера. Отмечены участки, соответствующие разным биологическим объектам, сигналы которых подвергались дальнейшей обработке. Участок 1 соответствует питательному раствору без клеток, а участок 2 - монослой клеток, помещенный в питательный раствор.

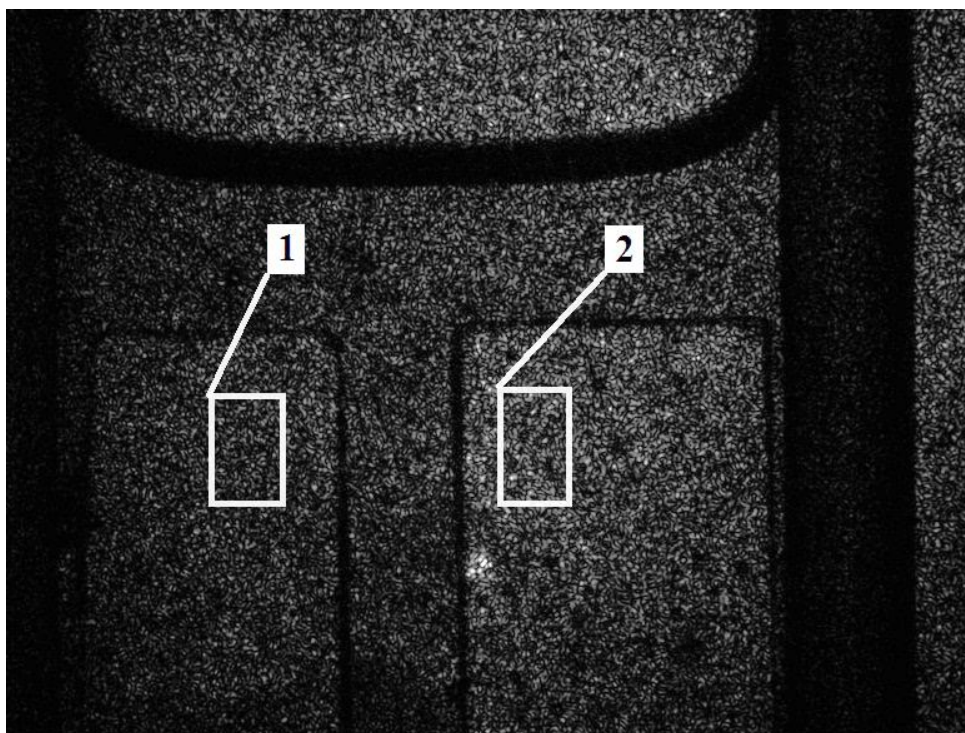


Рисунок 15 - Типичная картина спеклов, с выделенными участками.

На выделенных участках с помощью программы ОПП и ОПО [26,31-32,72-73] определяли коэффициент корреляции ρ оптических сигналов в разные моменты времени по формуле (15).

За начало отсчета брали начальный кадр фильма. Для сравнения выбирали кадры фильма через определенный интервал времени. Далее производились расчеты по алгоритму описанному к ОПП в разделе 3.6 настоящей работы.

Для аппроксимации экспериментальных данных использовалась автокорреляционная лоренцева функция $k_{12}(\tau)$. Методом наименьших квадратов оценивалась относительная погрешность аппроксимации, которая не превышала 11%.

Метаболические процессы, происходящие в клетке, являются сложными, разномасштабными во времени, то есть протекающими с разной скоростью и не стационарными. В связи с этим появляются сложности в интерпретации сигналов динамики спеклов.

В диссертационной работе применен метод усреднения динамики спеклов [73], который позволил существенно упростить интерпретацию данных и

получать хорошо воспроизводимые результаты. Суть подхода заключается в том, что при регистрации сигналов время усреднения выбирается таким образом, чтобы оно превышало время релаксации наиболее быстро изменяющихся процессов. Такой подход позволил регистрировать низкочастотные сигналы, соответствующие медленно протекающим процессам в клетках.

Метод усреднения динамики спеклов использовался в измерениях **в режиме реального времени**.

С использованием ОПО в режиме реального времени определялись значения сигналов I , пропорциональных интенсивности, и коэффициента корреляции ρ , определяемого по формуле (15). Алгоритм работы с ОПО так же описан выше в разделе 3.6 настоящей работы.

Регистрация параметров для каждой точки (пиксели) на картине спеклов производилась через каждые 9 секунд в течение 25 - 45 часов для различных экспериментов.

Также с помощью программы «Viewer» осуществлялась запись кадра (картины спеклов) в формате bmp в начале и конце эксперимента.

3.8 Вопросы метрологии и погрешности измерений

Нами разработана методика калибровки оптической установки, описанной в разделе 3.4 настоящей работы. Для разработки методики в установку были введены дополнительные компоненты на рис. 16. Луч лазера 1 расширяли микрообъективом 2 и освещали матовое стекло 3. Рассеянное на матовом стекле излучение проходило через плоскопараллельную пластину 4, закрепленную зажимом 5 на платформе 6 транслятора. Затем излучение проходило через линзу с диафрагмой 7 и попадало на матрицу фотоприемников 8 телекамеры 9. Кадры по команде оператора записывали в память ноутбука 10.

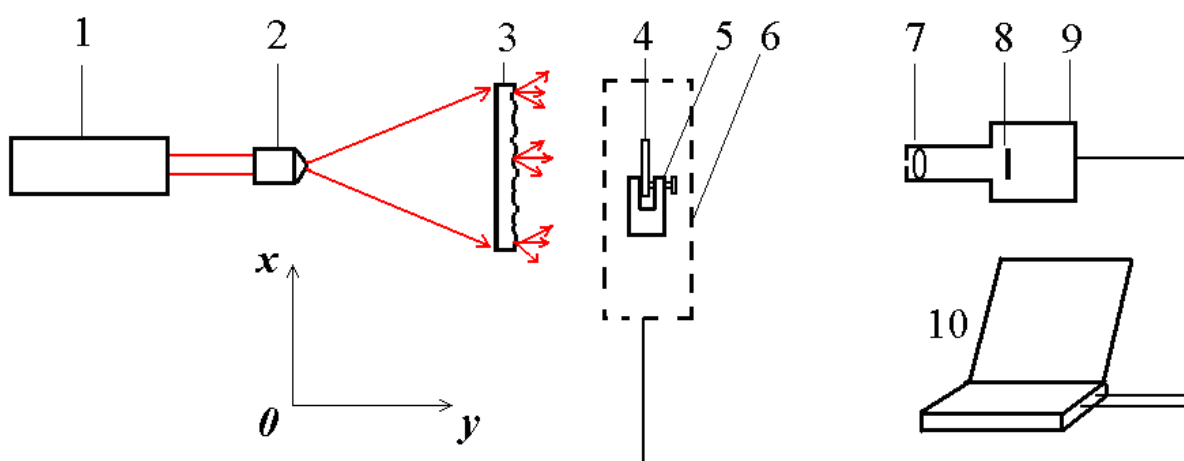


Рисунок 16 Блок-схема калибровки оптической установки 1 - лазерный модуль, 2 - микрообъектив, 3 - матовое стекло, 4 - плоскопараллельная пластина, 5 - зажим, 6 - платформа транслятора, 7 - линза с диафрагмой, 8 - матрица фотоприемников, 9 - телекамера, 10 - ноутбук.

В эксперименте так же проверялась корректность формулы (11). В работе были использованы полупроводниковый лазерный модуль типа KLM-D532-20-5 с длиной волны $\lambda = 0,532$ мкм мощностью 20 мВт, моторизованный транслятор фирмы Standa типа 8MT177-100 с разрешением 0,125 мкм, монохромная телекамера компании Видеоскан типа Видеоскан – 415/П/К-USB. Камера содержала матрицу фотоприемников размером 6.5×4.8 мм., содержащую 780×582

ячеек размером 8.3×8.3 мкм. Сигналы с телекамеры через USB-порт поступали на ноутбук Aspire 3692 WLMi фирмы Acer.

Динамика спеклов создавалась перемещением плоской стеклянной пластинки толщиной 1 мм и диаметром 23 мм в направлении оси ox . Пластина имела слабую шероховатость, $Ra = 0,01$ мкм. Шероховатость была измерена интерференционным профилометром Veeco WYKO NT1100. Показатель преломления пластинки был измерен с погрешностью не более 2% по углу Брюстера на лазерном эллипсометре ЛЭФ-3М-1 и равнялся 1,50.

На рис. 17 показана типичная картина спеклов, наблюдаемая оператором на экране монитора.

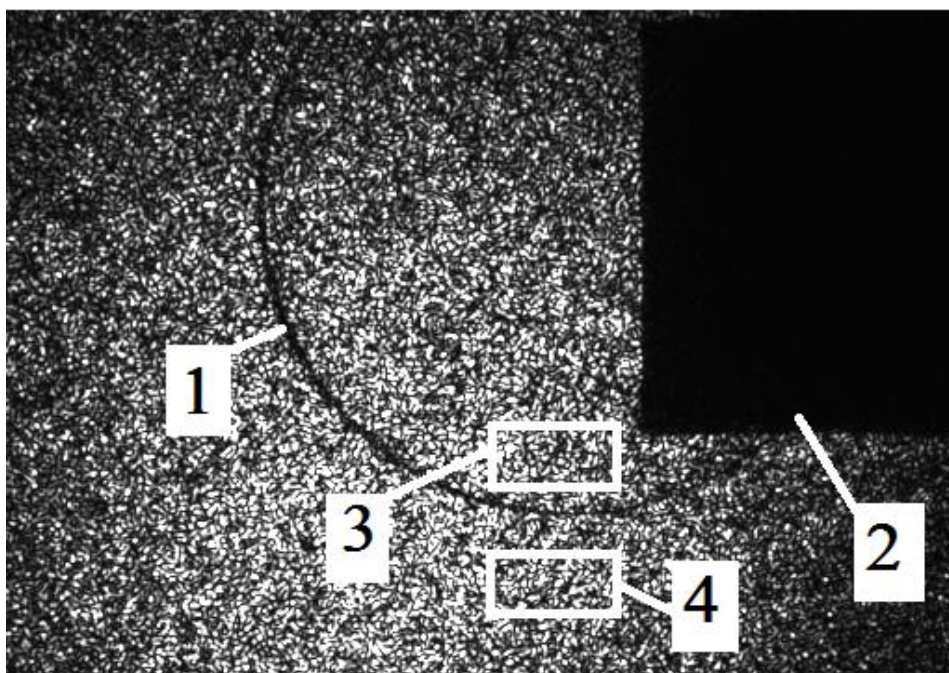


Рисунок 17 - Типичная картина спеклов в плоскости изображения стеклянной пластинки. 1 - край пластинки, 2 - зажим, 3 - участок на пластине, 4 - участок вне пластинки.

На рисунке показаны участки на изображении пластинки и вне пластинки соответственно, на которых определялась величина η . В наших экспериментах величина ρ , определяемая формулой (15), имеет смысл величины η . Различие заключается в том, что в теории значение η определяется усреднением по

ансамблю объектов, а величина ρ находится в эксперименте путем усреднения по участку изображения, содержащих достаточно большое число спеклов. В качестве объектов (реализаций) по-существу выступали участки изображения объекта размером порядка минимального размера спеклов. Исходя из этого, величину ρ находили по формуле (15).

На рис. 18 приведена зависимость величины ρ от перемещения u_x пластины перпендикулярно оси оптической системы, показанной на рис. 16.

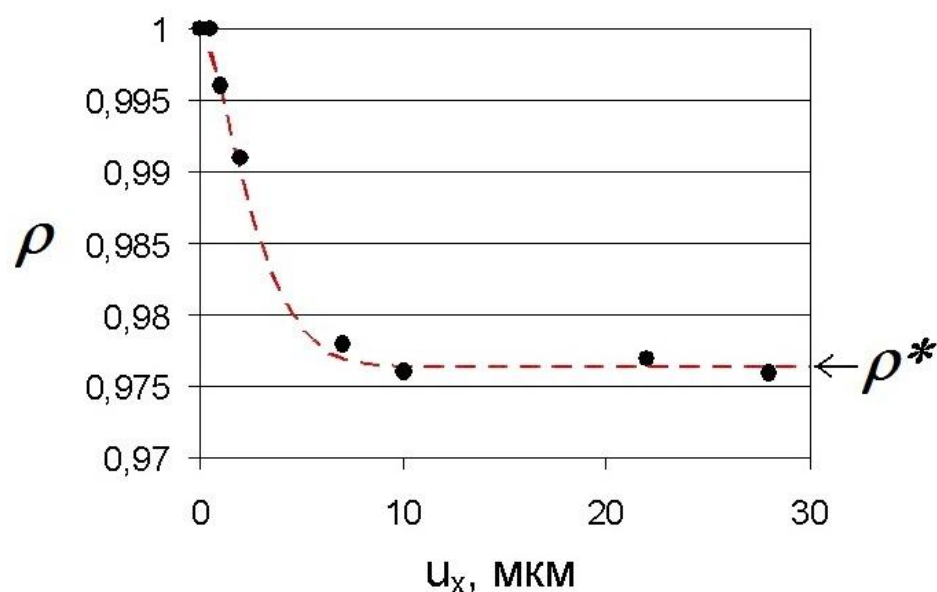


Рисунок 18 - Зависимость ρ от u_x . Погрешность аппроксимации функцией Гаусса – 2,4%.

Вариацию оптической разности хода оценивали двумя способами: а) по шероховатости пластины по формуле

$$\sigma = \frac{R_a}{0,8}(n - n_0) \times 2, \quad (26)$$

где

σ - вариация оптической разности хода,

R_a - шероховатость пластины = 0,01 мкм,

n - показатель преломления стекла = 1,50,

n_0 - показатель преломления воздуха = 1,00,

и в) по динамике спеклов, а именно по значению ρ на плато (рис. 17) по формуле:

$$\sigma = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{k_{11}} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{-\ln(\rho^*)}, \quad (27)$$

где

k_{11} - дисперсия разности фаз,

ρ^* - значение ρ на плато рис. 18.

Величины σ , найденные по формулам (26) и (27), равнялись 12,5 и 13,2 нм соответственно, т.е. разность величин σ была не более 6% .

Согласно формуле (15) величина ρ определяется путем косвенных измерений с использованием нелинейной функции с большим числом аргументов. Оценка погрешности определения таких величин регламентирована рекомендациями, опубликованными в работах [74-76]. В соответствие с этими рекомендациями, в результате громоздких, но элементарных преобразований, получаем формулу для определения погрешности величины ρ :

$$S(\tilde{\rho}) = \sqrt{\sum_i^m \left(\frac{\partial \rho}{\partial a_i} \right)^2 \cdot S^2(\tilde{a}_i) + \sum_i^m \left(\frac{\partial \rho}{\partial b_i} \right)^2 \cdot S^2(\tilde{b}_i)}, \quad (28)$$

где $S(\tilde{\rho})$ - среднее квадратическое отклонение случайной погрешности результата косвенного измерения, $\tilde{\rho}$ - найденное в эксперименте значение величины ρ .

Вместо A_{ij} введен аргумент a_i ($i=1, \dots, m$), а вместо величин B_{ij} - b_i ($i=1, \dots, m$), где m - число элементов массива, $\frac{\partial \rho}{\partial a_i}$ - первая производная от функции ρ по аргументу a_i , вычисленная в точке $\tilde{a}_1, \dots, \tilde{a}_m$, \tilde{a}_i - результат измерения величины a_i , $S(\tilde{a}_i)$ - среднее квадратическое отклонение случайных погрешностей результата измерения a_i -го аргумента. $\frac{\partial \rho}{\partial b_i}$ - первая производная от функции ρ по аргументу b_i , вычисленная в точке $\tilde{b}_1, \dots, \tilde{b}_m$, \tilde{b}_i - результат измерения величины b_i , $S(\tilde{b}_i)$ -

среднее квадратическое отклонение случайных погрешностей результата измерения b_i -го аргумента.

Для первой производной от функции ρ по аргументу a_i имеем:

$$\frac{\partial \rho}{\partial a_i} = \frac{(b_i - \bar{b}) \cdot B^2 - A \cdot (a_i - \bar{a})}{m \cdot B^3 C}, \quad (29)$$

где введены обозначения: \bar{b} - среднее арифметическое значение величин b_i ,
 \bar{a} - среднее арифметическое значение величин a_i ,

$$A = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (a_i - \bar{a})(b_i - \bar{b}), \quad (30)$$

$$B = \left(\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (a_i - \bar{a})^2 \right)^{1/2}, \quad (31)$$

$$C = \left(\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (b_i - \bar{b})^2 \right)^{1/2}. \quad (32)$$

Аналогично, для первой производной от функции ρ по аргументу b_i имеем:

$$\frac{\partial \rho}{\partial b_i} = \frac{(a_i - \bar{a}) \cdot C^2 - A \cdot (b_i - \bar{b})}{m \cdot B C^3}. \quad (33)$$

Анализ формулы (28)-(33) показал, что погрешность определения величины ρ зависит от погрешности определения величины I в j -ом пикселе, от числа пикселей и от распределения величины I на выбранном участке плоскости наблюдения. Особенностью спекл-поля является существенное отличие значений I в разных частях выбранного участка. Среднеквадратическое отклонение величины I от среднего значения примерно равнялось среднему значению. Проведенные нами расчеты показали, что для такого распределения интенсивности излучения I , погрешность определения величины ρ может быть меньше погрешности определения величины I в отдельной пиксели.

Нами был проведен эксперимент, в котором создавали изменения в картине спеклов, в реальном времени регистрировали значения a_i и b_i . Затем определялись величины ρ, A, B, C , а также по формулам (29) и (33) – значения $\frac{\partial \rho}{\partial a_i}$ и

$\frac{\partial \rho}{\partial b_i}$, по формуле (28) определяли величину $S(\tilde{\rho})$. Число элементов массива m

равнялось 40, среднее значение величин a_i и b_i было около 60. Изменения в картине спеклов создавали перемещением плоского образца в своей плоскости на десятые доли миллиметра. Числовые значения массива соответствовали фотоэлементам, расположенным на участке матрицы фотоприемников размером 10×10 элементов. Для определения величин $s(\tilde{a}_i)$ и $s(\tilde{b}_i)$ объектив телекамеры закрывали, в реальном времени регистрировали значения сигналов. Значения сигналов в фотоэлементах были на уровне 3 или 4 градаций, во времени сигналы меняли значения с 3 на 4 и наоборот. Величины $s(\tilde{a}_i)$ и $s(\tilde{b}_i)$ равнялись 0,7. На рис. 19 представлена зависимость погрешности определения величины $S(\tilde{\rho})$ от самой величины ρ .

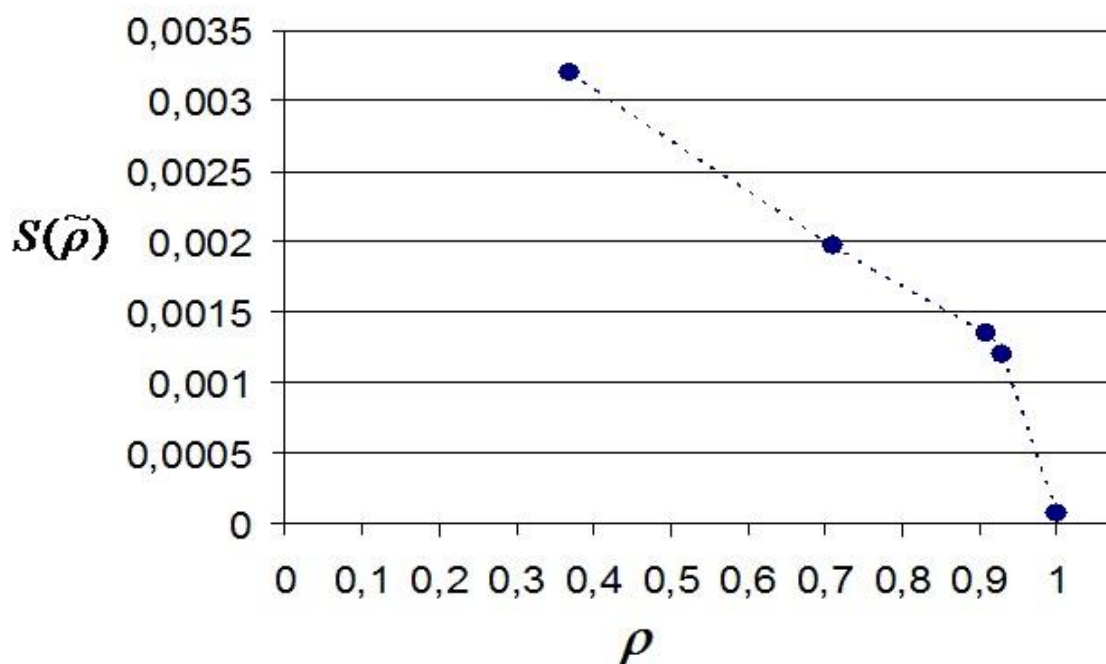


Рисунок 19 - Зависимость погрешности определения величины $S(\tilde{\rho})$ от величины ρ

По результатам проведенного исследования можно сделать следующее заключение: при среднем значении оцифрованных сигналов, равном 60, и 40 сигналов, взятых для усреднения, в диапазоне $0,37 < \rho < 1$ относительная погрешность определения величины ρ при выборе участка в 10×10 пикселей не превышает 1%.

Отметим, что данный вывод согласуется с выводами, сделанными в работе [68], в которой рассматривался вопрос о погрешности определения АКФ стационарного процесса. Было показано, что если АКФ определяется по одной реализации случайного процесса, а отклонения случайной величины от среднего значения достаточно велики, то увеличением числа измерений погрешность определения АКФ всегда можно сделать менее 1%.

3.9 Общие выводы по главе №3

1. Апробирована методика получения культуры клеток на примере слоев клеток Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3;
2. Разработана оптическая установка для исследования метаболической активности клеток;
3. Опробовано ПО на примере ОПП и ОПО с целью определения параметров теории динамики спеклов, связанных с метаболической активности клеток;
4. Разработана и апробирована установка калибровки данной оптической системы и соответствующая методика калибровки;
5. Оценена погрешность определения параметра, характеризующего метаболическую активность клеток.

4. Результаты исследований и их обсуждение

4.1 Эксперимент с питательным раствором [22]

Целью проведения экспериментов являлось изучение закономерности динамики спеклов в плоскости изображения кюветы, наполненной питательной средой для роста клеток. Параметры динамики спеклов регистрировали при разной температуре. Толщина слоя питательного раствора в кювете равнялась 3 мм. Полученные данные использовались нами при учете влияния слоя питательной среды в экспериментах по изучению клеточного метаболизма.

В качестве объекта исследования в данном эксперименте была использована среда роста, в которой в течение 5 суток культивировали клеточные культуры [59]. Основным материалом являлся белок, помимо этого, среда содержала продукты жизнедеятельности клеток, а также небольшое количество витаминов. На рис. 20 представлена типичная картина спеклов, наблюдаемая оператором в фиксируемый момент времени на экране компьютера.

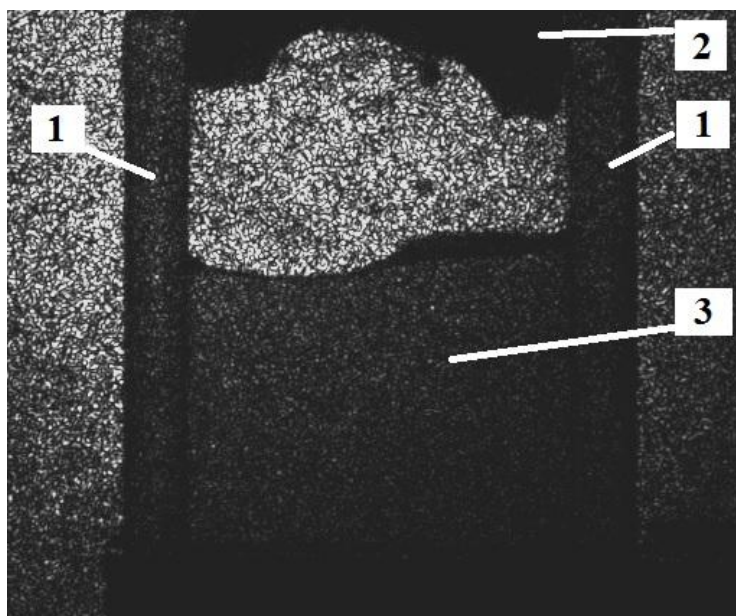


Рисунок 20 - Картина спеклов в плоскости изображения кюветы со средой роста. 1 - бок кюветы, 2 - крышка кюветы с цифровым термодатчиком DS1820, 3 - питательный раствор.

Динамика спеклов была рассчитана с помощью ОПП, описанного в разделе 3.7 настоящей работы, далее полученная пространственно-временная картина была использована для анализа оптических сигналов и их спектров. Цифровые данные преобразовывались из bmp формата в массивы чисел с градацией от 0 до 255. На рис. 21, 22 приведены типичные сигналы и их спектры, полученные при различных температурах.

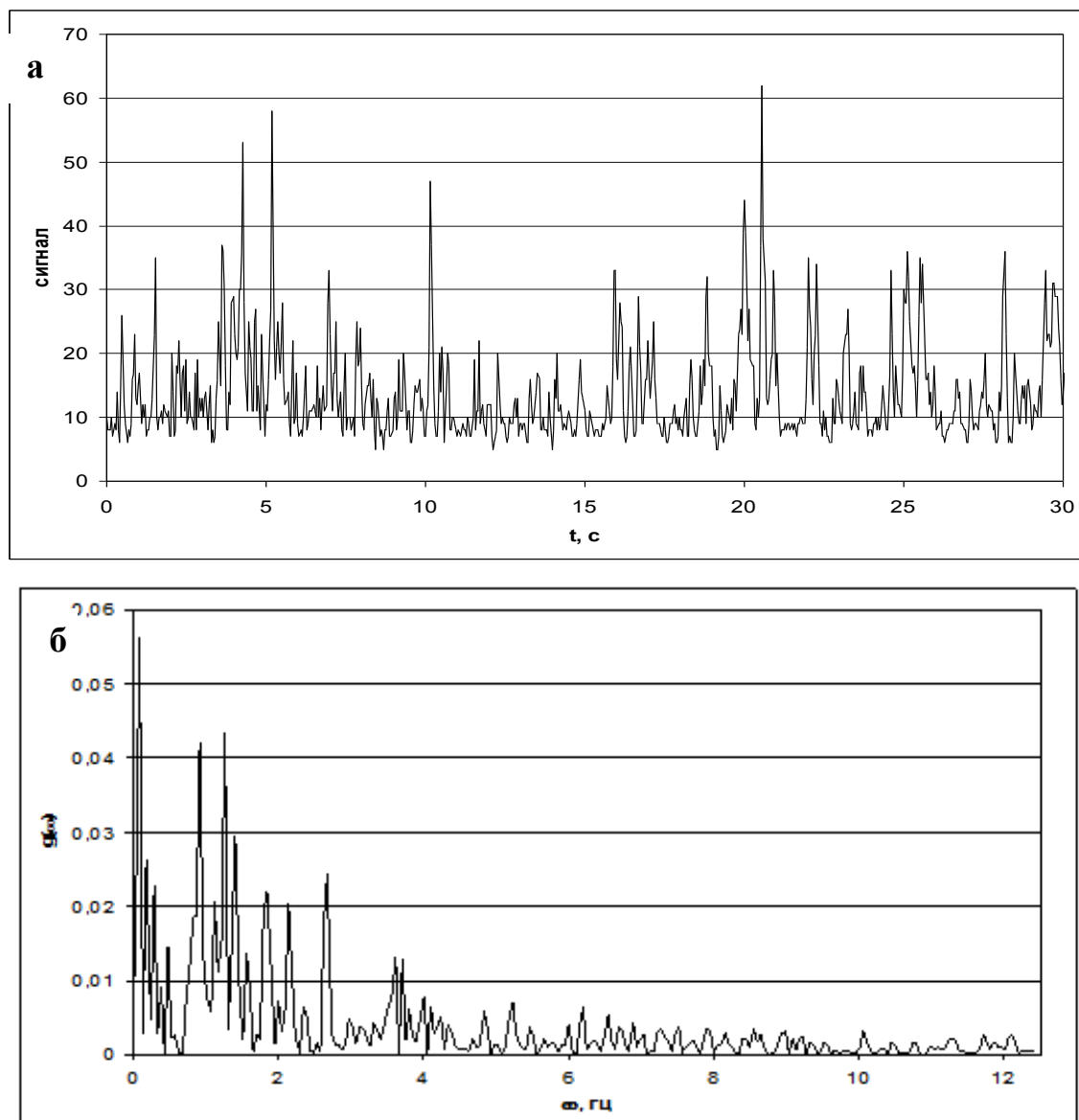


Рисунок 21 - Типичный сигнал (а) и спектр (б) среды роста при температуре 26°C

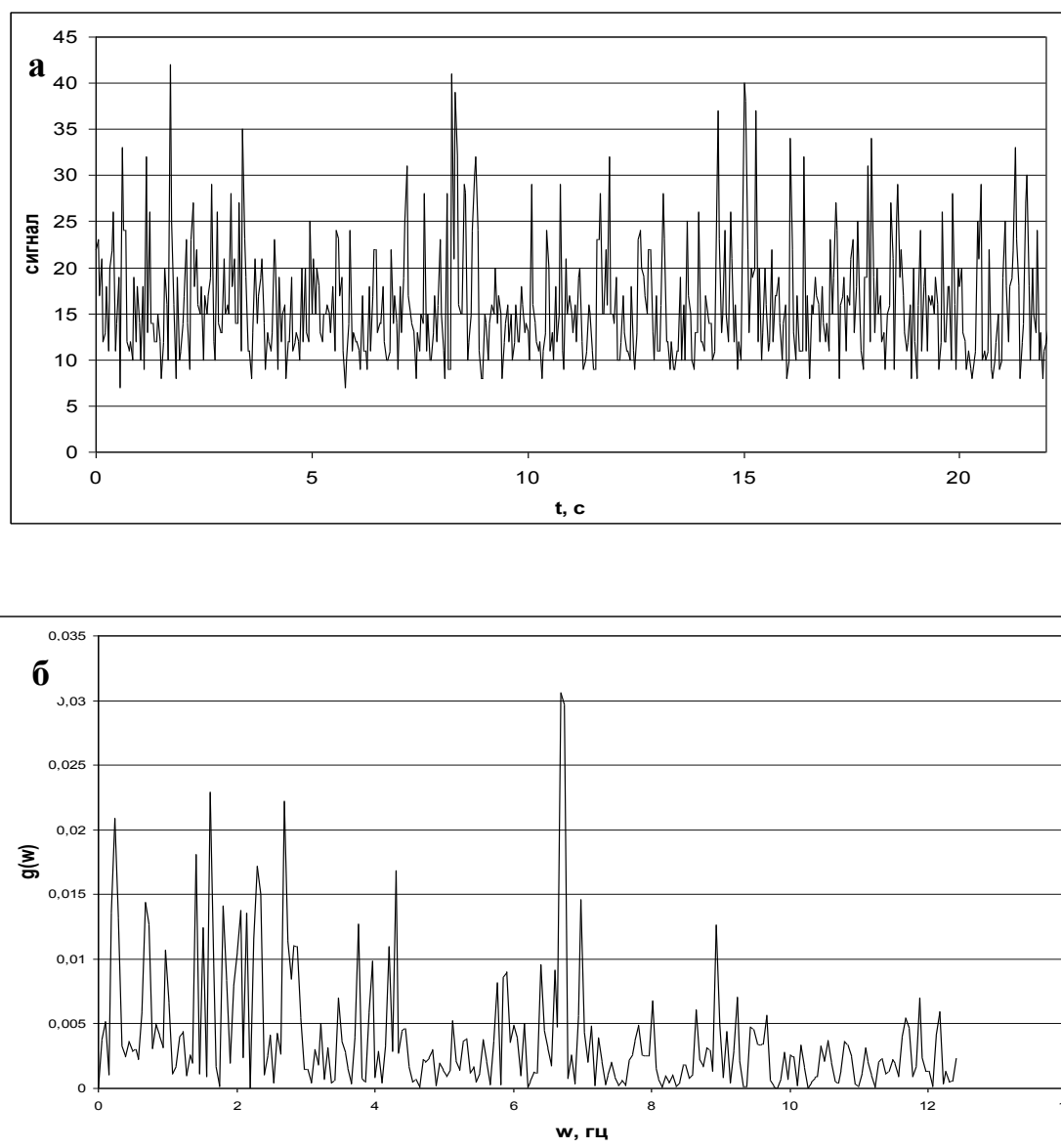


Рисунок 22 - Типичный сигнал (а) и спектр (б) среды роста при температуре 40°C

Некоторые результаты, полученные после обработки сигналов, приведены в табл. 3. Величина τ_0 находилась как значение, обратное ширине спектра, σ_0 - среднее квадратичное отклонение величины сигнала от среднего значения.

Измерение температуры в кювете производилось с использованием термодатчика DS1820 производства Dallas Semiconductor совместно с микроконтроллером. Данный датчик имеет большое количество преимуществ по сравнению с другими способами измерения температуры, например с использованием обычной термопары.

Преимущества использования термодатчика DS1820:

1. малые габаритные размеры. Толщина составляла всего 2,8 мм, что позволила поместить в крышку с кюветой, без контакта термодатчика со стенками кюветы;

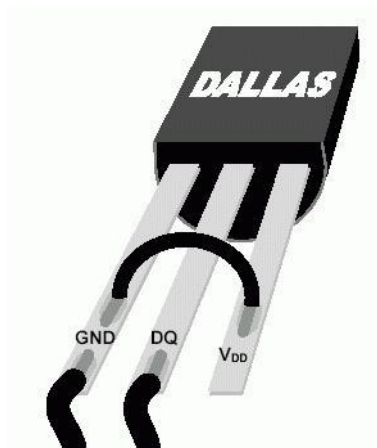


Рисунок 23 - Общий вид термодатчика DS1820. GND - общий выход, DQ - данные, VDD - выход на питание (+)

2. погрешность измерений в области температур 25 - 45 °C составляет менее $\pm 0,1$ °C;

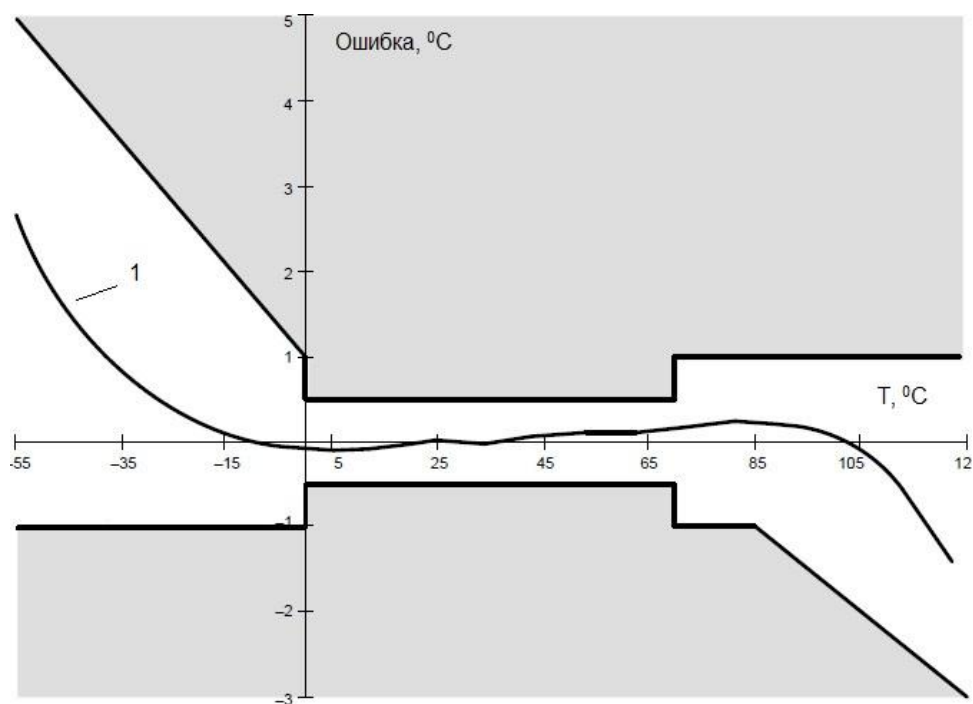


Рисунок 24 - Типичная кривая ошибки термодатчика DS1820. 1 - кривая, отображающая величину ошибки измерения температуры от температуры

3. не требуется калибровка данного датчика в связи с тем, что его калибровка осуществляется уже на заводе-изготовителе с использованием лазера.

Принцип действия данного температурного датчика основан на подсчете количества импульсов, вырабатываемых генератором с низким температурным коэффициентом во временном интервале, который формируется генератором с большим температурным коэффициентом. Счетчик инициализируется значением, соответствующим $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (минимальной измеряемой температуре). Если счетчик достигает нуля перед тем, как заканчивается временной интервал (это означает, что температура больше $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$), то регистр температуры, который также инициализирован значением $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$, инкрементируется. Одновременно счетчик предуславливается новым значением, которое задается схемой формирования наклона характеристики. Эта схема нужна для компенсации параболической зависимости частот генераторов от температуры. Счетчик снова начинает работать, и если он опять достигает нуля, когда интервал еще не закончен, процесс повторяется снова. Схема формирования наклона загружает счетчик значениями, которые соответствуют количеству импульсов генератора на один градус Цельсия для каждого конкретного значения температуры. По окончании процесса преобразования регистр температуры будет содержать значение температуры.

Таблица 3 - Результаты анализа экспериментальных данных

Среда	Температура, $^{\circ}\text{C}$	σ_0 , мкм	τ_0 , с
Воздух (шум)	26	0,004	1,062
Физиологический раствор	26	0,020	0,190
Физиологический раствор	37	0,030	0,081
Физиологический раствор	40	0,041	0,140

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что сигналы шума телекамеры, также сигналы при разных температурах, различны, что отражается в их спектрах. Ширина спектральной функции с изменением температуры изменяется: она увеличивается при 37°C и уменьшается при 40°C. Величина σ_0 увеличивалась с увеличением температуры. Все регистрируемые спектры являются линейчатыми, т.е. состоят из узких пиков. Изучение этой особенности спектров является предметом дальнейших исследований.

Несмотря на некоторые отличия, в целом, сигналы и их спектры для различных температур схожи. Картина спеклов, соответствующая процессам в среде роста, достаточно сильно меняется во времени. Следовательно, динамика спеклов, обусловленная микроскопическими процессами в среде, может являться сильным мешающим фактором при изучении функционирования клеток, помещенных в эту среду. Данное обстоятельство учитывалось при проведении экспериментов с монослоем клеток.

4.2 Исследование зависимостей активности слоя клеток Л-41 КД/84 от температуры

Следующим этапом исследования являлось изучение закономерностей динамики спеклов в плоскости изображения клеток в зависимости от температуры. Использовался монослой клеток Л-41 КД/84 на прозрачной подложке. Для проведения исследований данную клеточную культуру извлекали из стандартного ростового флакона и помещали в специальную кювету.

На рис. 25 представлена картина спеклов, наблюдаемая в фиксированный момент времени на экране компьютера. Отмечены участки, соответствующие разным биологическим объектам. Участок 1 соответствует клеткам, помещенным в среду роста толщиной 0.3 мм, а участок 2 - среде роста толщиной 0.5 мм без клеток.

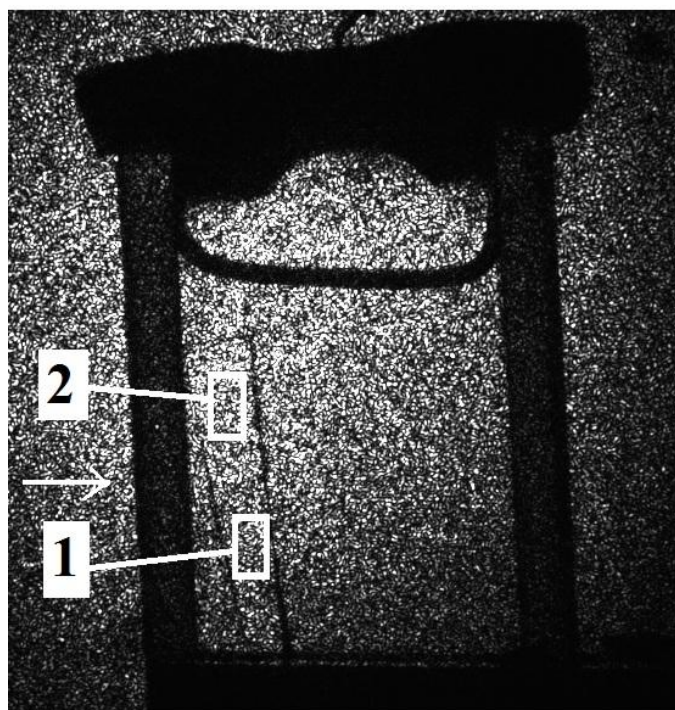


Рисунок 25 - Типичная картина спеклов, с выделенными участками. Стрелкой показан верхний уровень монослоя клеток на пластине

На выделенных участках с помощью ОПП определяли коэффициент корреляции ρ оптических сигналов в разные моменты времени.

На рис. 26-30 представлены результаты обработки экспериментальных данных при различных температурах 34°C , 32°C , 30°C , 28°C и 26°C соответственно. Измерения температуры производились аналогично с использованием термодатчика DS1820, работа которого описана в разделе 4.1 настоящей диссертации. Помимо экспериментальных данных, приведена функция $\eta(\tau)$, представляющая собой аппроксимацию с использованием автокорреляционной лоренцевой функции $k_{11}(\tau)$ по формуле (15).

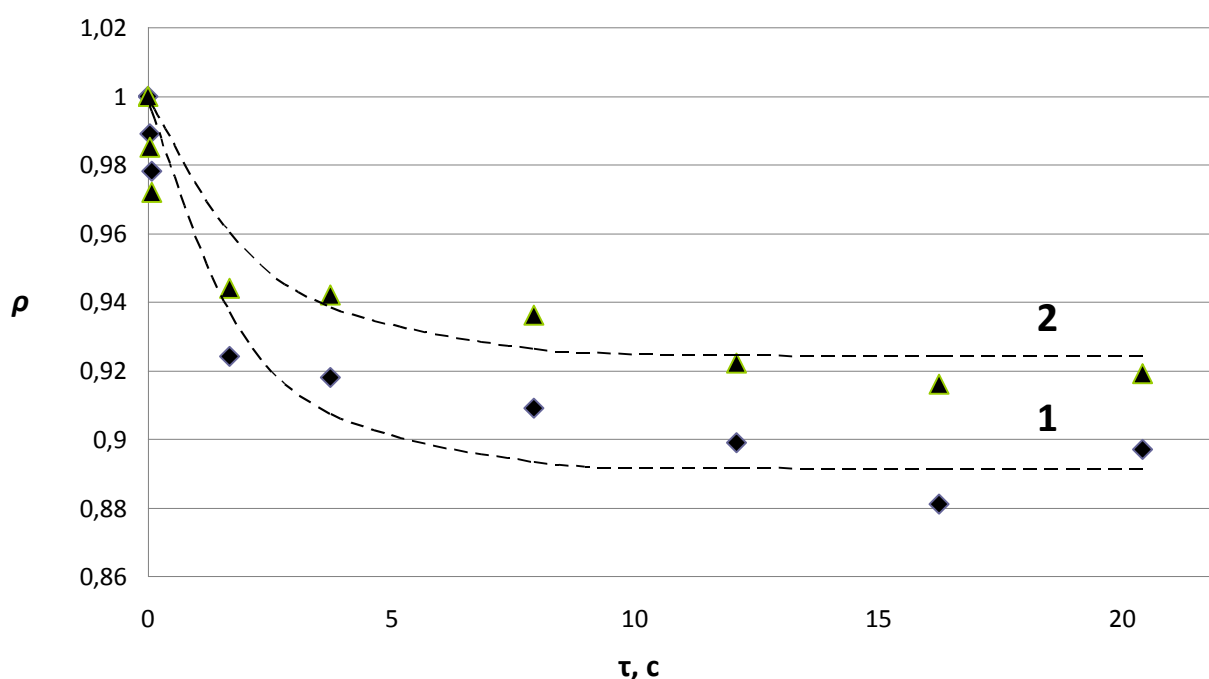


Рисунок 26 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 34°C (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

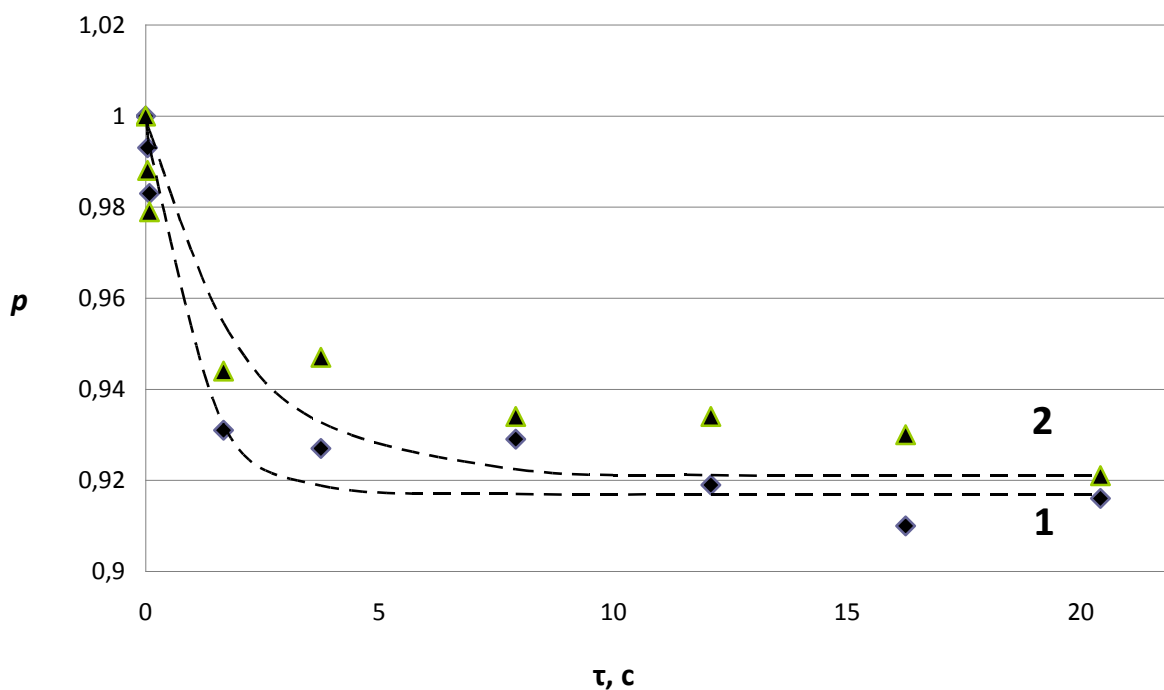


Рисунок 27 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 32°C (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

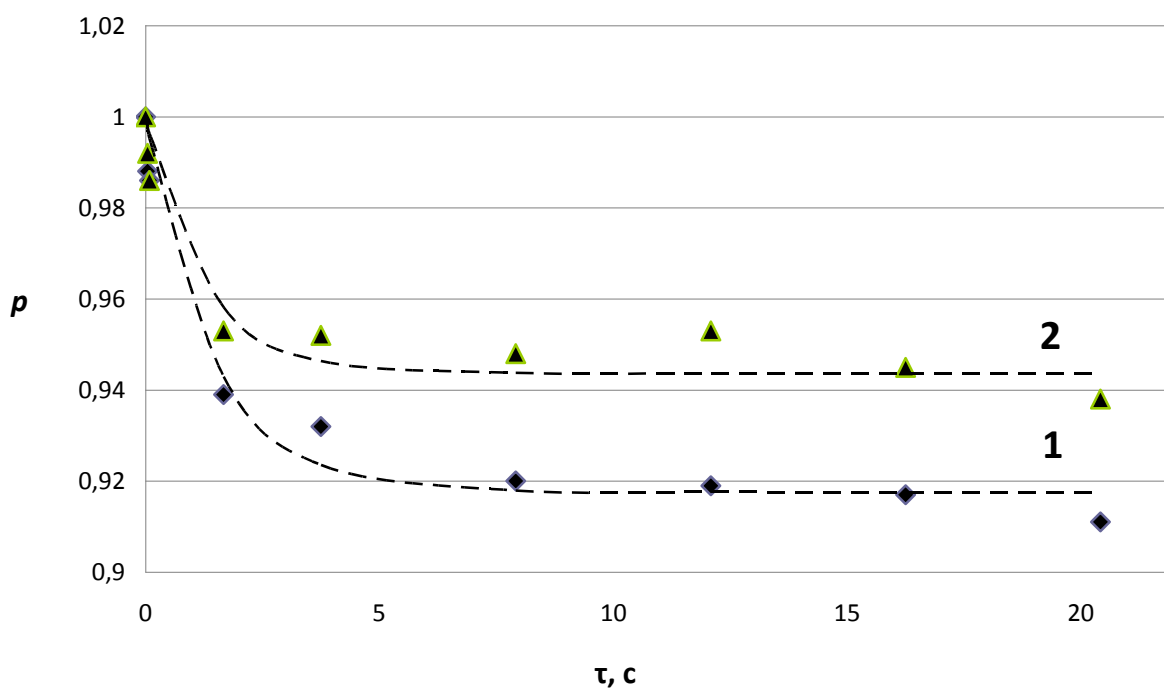


Рисунок 28 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 30°C (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

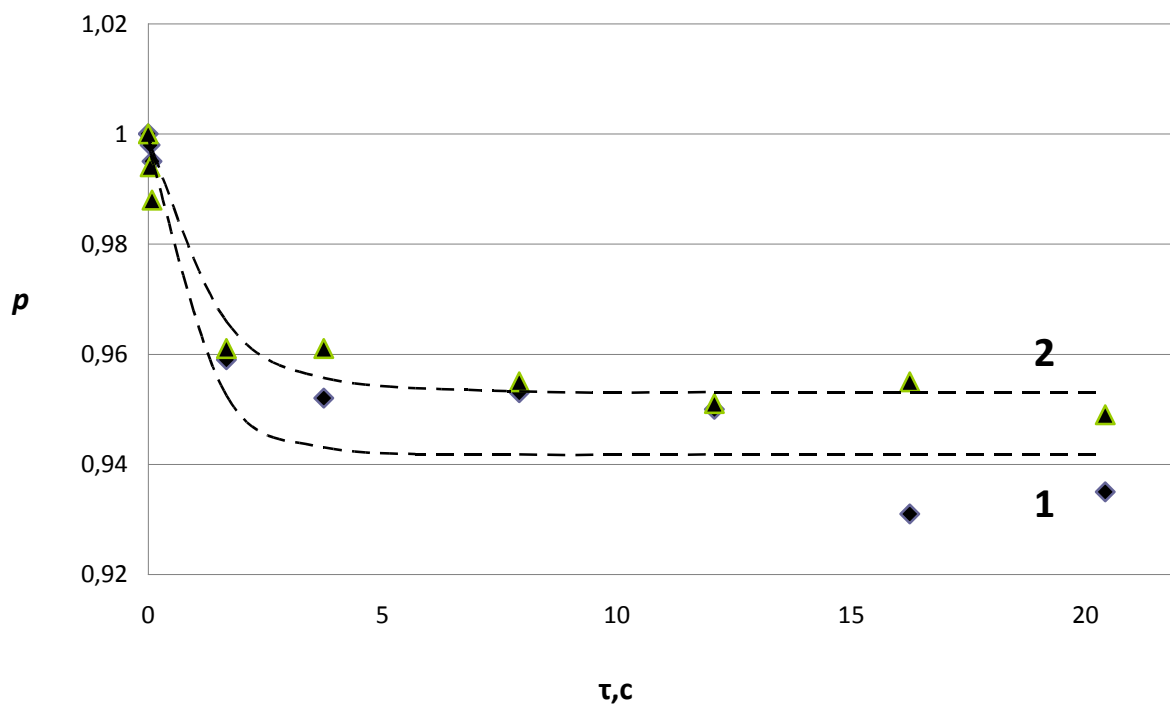


Рисунок 29 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 28°C (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

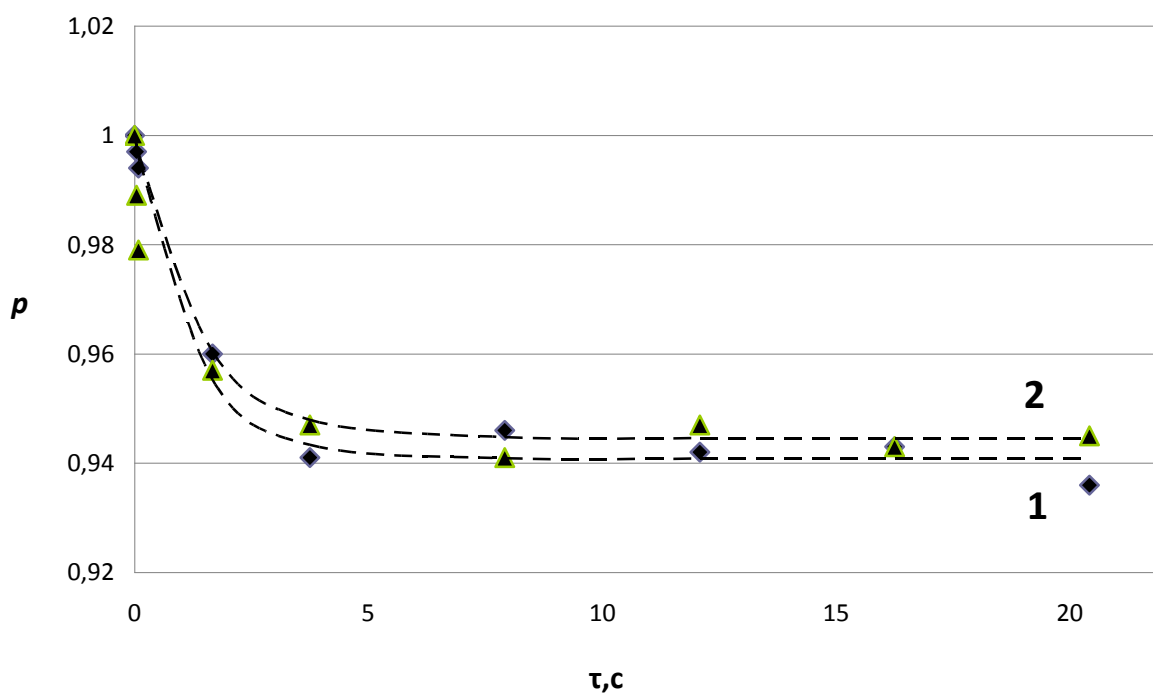


Рисунок 30 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 26°C (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

Анализ данных экспериментов с клетками показал, что величина ρ_{12} на участках 1 и 2 с течением времени сначала уменьшается, затем постепенно выходит на плато. Подобные изменения ρ находятся в согласии с теорией [19]. Согласно теории такой вид автокорреляционной функции соответствует случаю, когда динамика спеклов, а так же изменения оптической разности хода пар волн Δu_{κ} являются стационарными случайными процессами. Также согласно теории существует однозначная связь между значением автокорреляционной функции на постоянном уровне η^* и временной вариации оптической разности хода σ_u (формулы 11,12). В таблицах 4 и 5 приведены значения η^* , дисперсии разности фаз k_{11} , вариации оптической разности хода σ_u , найденные по формулам (11) и (12) для участков 1 и 2. Нижние индексы для величины σ_u соответствуют участкам 1 и 2.

Таблица 4 - Результаты эксперимента при различных температурах для участка 1

	26 °C	28 °C	30 °C	32 °C	34 °C
η^*	0,9408	0,9417	0,9175	0,9169	0,8913
k_{11}	0,0610	0,0600	0,0860	0,0867	0,1150
σ_{u1} , МКМ	0,0209	0,0207	0,0248	0,0249	0,0287
τ_0 , с	1,2	1,01	0,45	0,40	0,30

Таблица 5 - Результаты эксперимента при различных температурах для участка 2

	26 °C	28 °C	30 °C	32 °C	34 °C
η^*	0,9445	0,9531	0,9436	0,9210	0,9240
k_{11}	0,0570	0,0480	0,0580	0,0823	0,0790
σ_{u2} , МКМ	0,0202	0,0185	0,0204	0,0230	0,0237
τ_0 , с	0,35	0,30	0,25	0,15	0,20

На рис. 31 представлены зависимости σ_{u1} и σ_{u2} от температуры для двух участков.

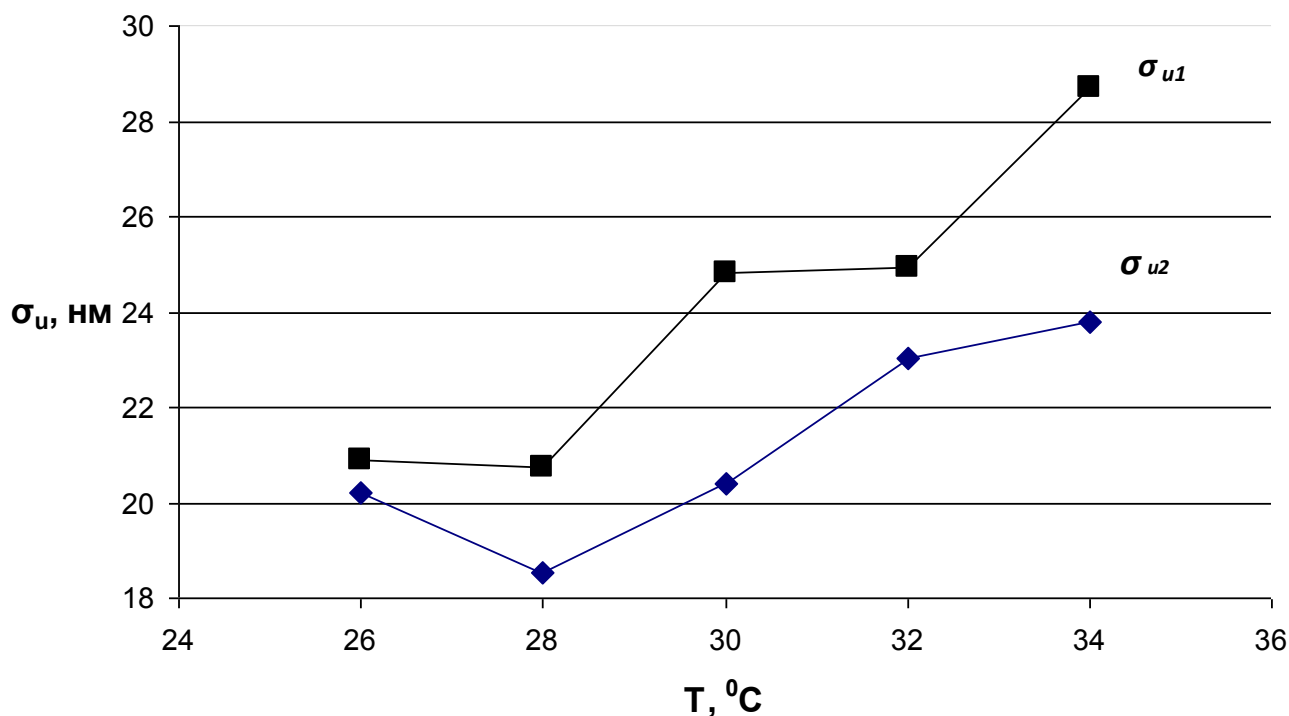


Рисунок 31 - Зависимость вариаций оптической разности хода от температуры на участках 1 - σ_{u1} и 2 - σ_{u2}

По значениям σ_{u1} и σ_{u2} нами была найдена величина σ - вариация оптической разности хода пар волн в клетках. Оптическая разность хода является величиной аддитивной. Нами было предположено, что случайные изменения оптической разности хода вне и внутри клетки являются статистически независимыми величинами. Тогда можно показать, что дисперсия оптической разности хода участка 1 равна сумме дисперсии оптической разности хода участка вне клетки и дисперсии оптической разности хода в клетках. Оптическая толщина клетки была существенно мала по сравнению с толщиной питательного раствора. Следовательно, вариации оптической разности хода для клеток σ можно найти как квадратный корень из разности дисперсий на участках 1 и 2:

$$\sigma = \sqrt{\sigma_{u1}^2 - \sigma_{u2}^2} \quad (34).$$

На рис. 32 представлена зависимость вариации оптической разности хода в клетках σ от температуры.

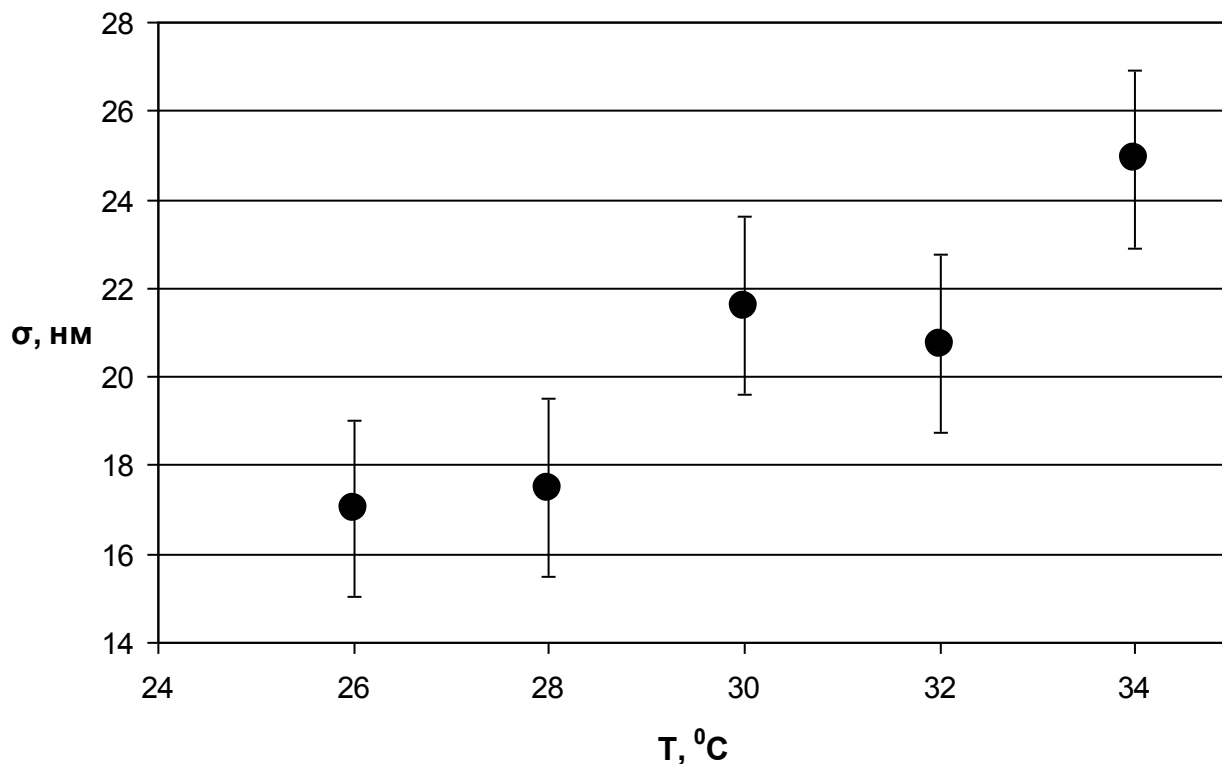


Рисунок 32 - Зависимость вариации оптической разности хода σ в клетках Л-41 КД/84 от температуры

Как видно из рис. 32, при увеличении температуры в диапазоне от 26°C до 32°C происходит приблизительно линейное увеличение значения вариации оптической разности хода в клетках от 17 до 25 нм. Известно [56-57], что метаболическая активность клеток так же линейно зависит от температуры. Нами в работе [26] было предположено, что такое изменение величины σ связано с физиологической активностью клеток, которая прямо связана с синтезом и перераспределением органических молекул. Известно, что физиологическая и соответственно ростовая активность клеток зависит от температуры и к 25°C снижается до минимальных величин, при которых ростовая активность приближается к нулевой. Согласно данным специалистов ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, среда роста, 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.

Нами выявлено уменьшение времени корреляции разности фаз волн для первого участка в четыре раза (1,2 с до 0,3 с). На рис. 32 представлена температурная зависимость времени корреляции разности фаз волн для первого и второго участков. Данное обстоятельство указывает на увеличение скорости изменения разности оптических путей пар волн. Изменение оптической длины пути зависит, от разных физических и химических процессов в клетке. Следовательно, изменение τ_0 отображает увеличение скорости физико-химических процессов (метаболических процессов), происходящих в клетках.

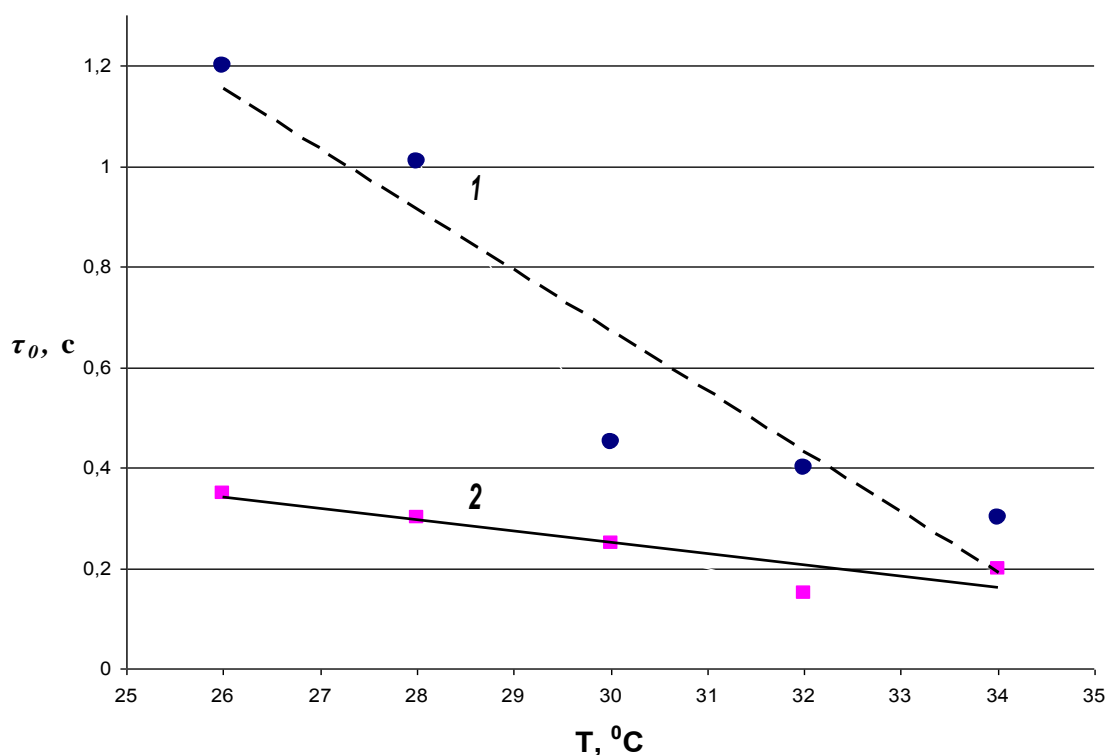


Рисунок 33 - Температурная зависимость времени корреляции разности фаз пар волн. 1- клетки Л-41 КД/84 в питательном растворе, 2 - питательная среда

Таким образом, поскольку на рис. 32 имеет место линейное увеличение величины σ от температуры, то эта зависимость отражает рост метаболической

активности клеток с повышением температуры. Следовательно, можно сделать вывод о том, что параметр σ можно использовать в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток.

Выводы:

1. полученная экспериментальная зависимость $\rho(\tau)$, а именно выход зависимости на постоянный уровень находится в хорошем соответствии с теорией динамики спеклов микроскопических процессов (13);
2. по значениям $\rho(\tau)$, соответствующим постоянному уровню были найдены значения вариации оптических путей волн σ в клетках;
3. параметр σ линейно зависит от температуры;
4. поскольку интенсивность физико-химических процессов в клетках также линейно зависит от температуры, предложено использовать величину σ в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток.

4.3 Эксперименты со слоем клеток Л-41 КД/84, зараженных герпесвирусной инфекцией

Результаты, полученные в предыдущем разделе были использованы для изучения клеточного метаболизма в присутствии вируса герпеса. Целью экспериментов являлось изучение возможности динамической спекл-интерферометрии для выявления вируса герпеса в клетках. Для проведения экспериментов использовались две кюветы №1 и №2, заполненные средой поддержания. В кювете №1 располагали две стеклянные подложки, на одной из которых наносился предварительно монослой клеток. В кювете №2 размещались такие же подложки, но на одной из пластин монослой клеток был заражен вирусом простого герпеса. Время заражения точно фиксировалось и спустя 1 час регистрировались фильмы динамики спеклов с временным интервалом - 30 минут.

Основной характеристикой биообъекта была выбрана вариация оптической разности хода σ . В ранее описанных экспериментах было предположено, что эта величина характеризует метаболическую активность клеток.

На рис. 34-35 представлены картины спеклов кюветы №1 и кюветы №2 в фиксируемый момент времени и отмечены участки, соответствующие разным биологическим объектам.

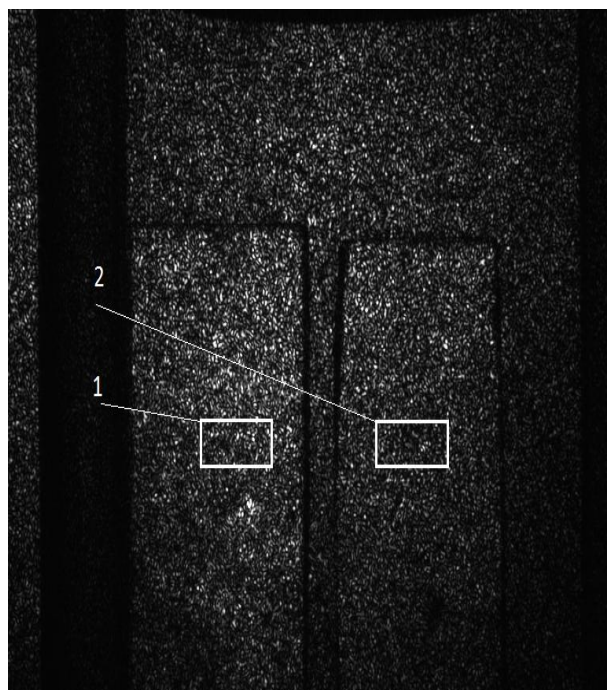


Рисунок 34 - Картина спеклов кюветы №1. Участок 1 соответствует клеткам, помещенным в среду поддержания, участок 2 среде поддержания без клеток

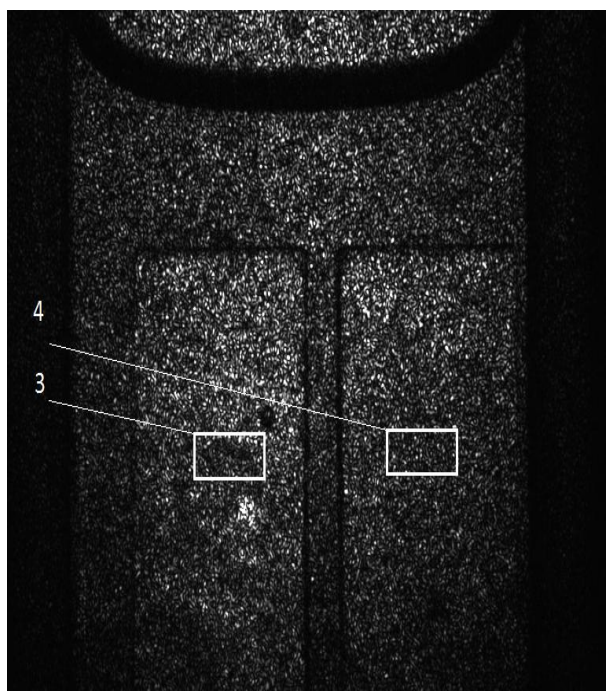


Рисунок 35 - Картина спеклов кюветы №2. Участок 3 соответствует зараженным ВПГ-1 клеткам, помещенным в среду поддержания, участок 4 среде поддержания без клеток

Далее представлены результаты обработки экспериментальных данных для интактных клеток, инфицированных клеток и среды поддержания (питательного раствора). На рис. 36, 37 изображены типичные графики для кюветы №1 в разные моменты времени, где помимо значений коэффициента корреляции ρ оптических сигналов, приведена функция $\eta(\tau)$, представляющая собой аппроксимацию с использованием автокорреляционной лоренцевой функции $k_{II}(\tau)$.

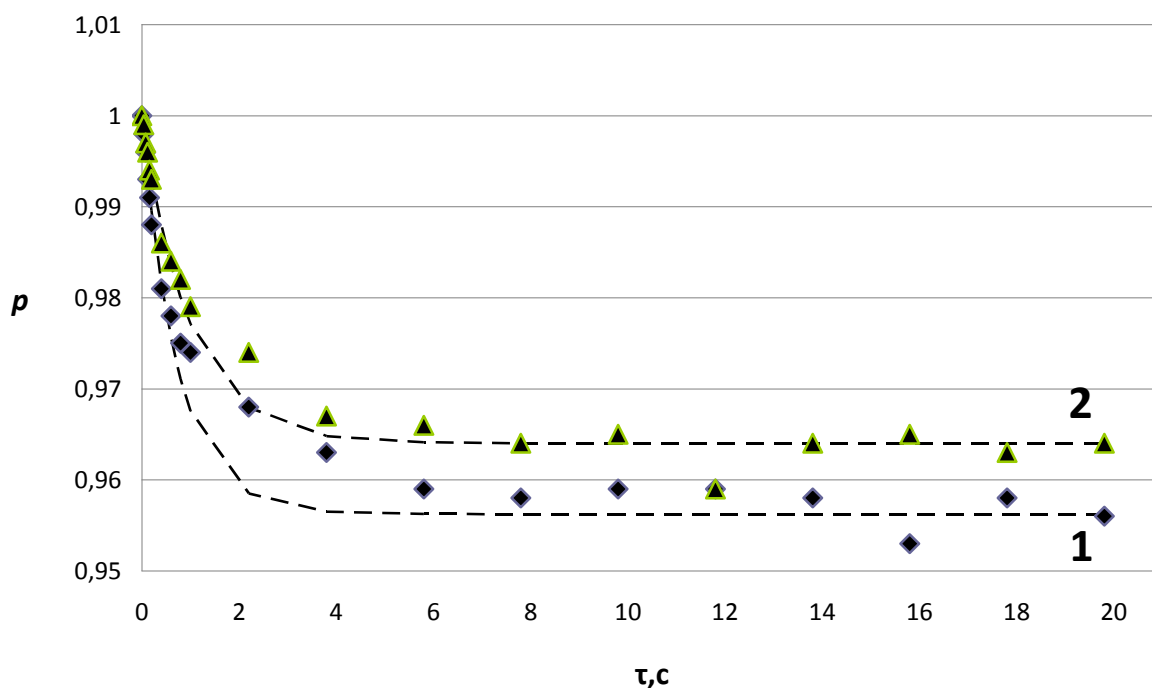


Рисунок 36 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) в 9 ч. 00 мин. (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

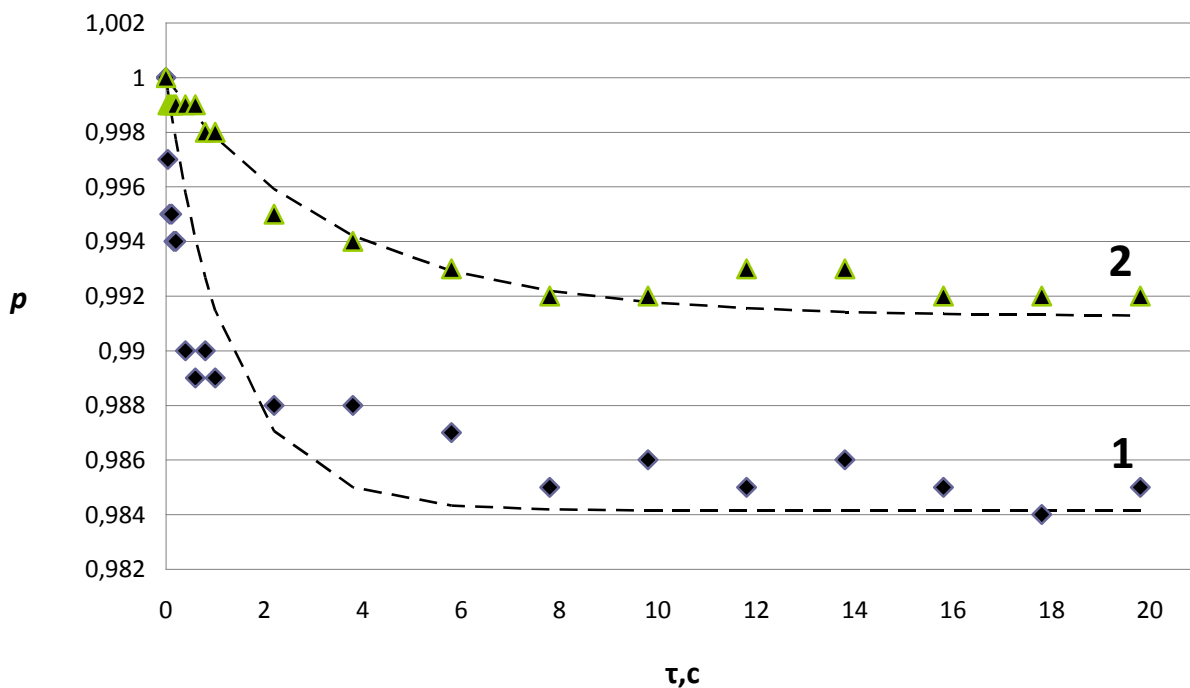


Рисунок 37 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 1 (1) и 2 (2) в 11 ч. 00 мин. (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

Величина ρ на участках 1 и 2 сначала уменьшается, затем постепенно выходит на плато. Схожая тенденция наблюдается и для кюветы №2 (участок 3 - клетки с ВПГ-1, 4 - среда поддержания) на рис. 38, 39. Время заражения клеток Л-41 КД/84 вирусом простого герпеса - 8ч.00мин. Фильмы динамики спеклов регистрировали спустя час после заражения. Это время необходимо для адсорбции вируса на поверхности клеток.

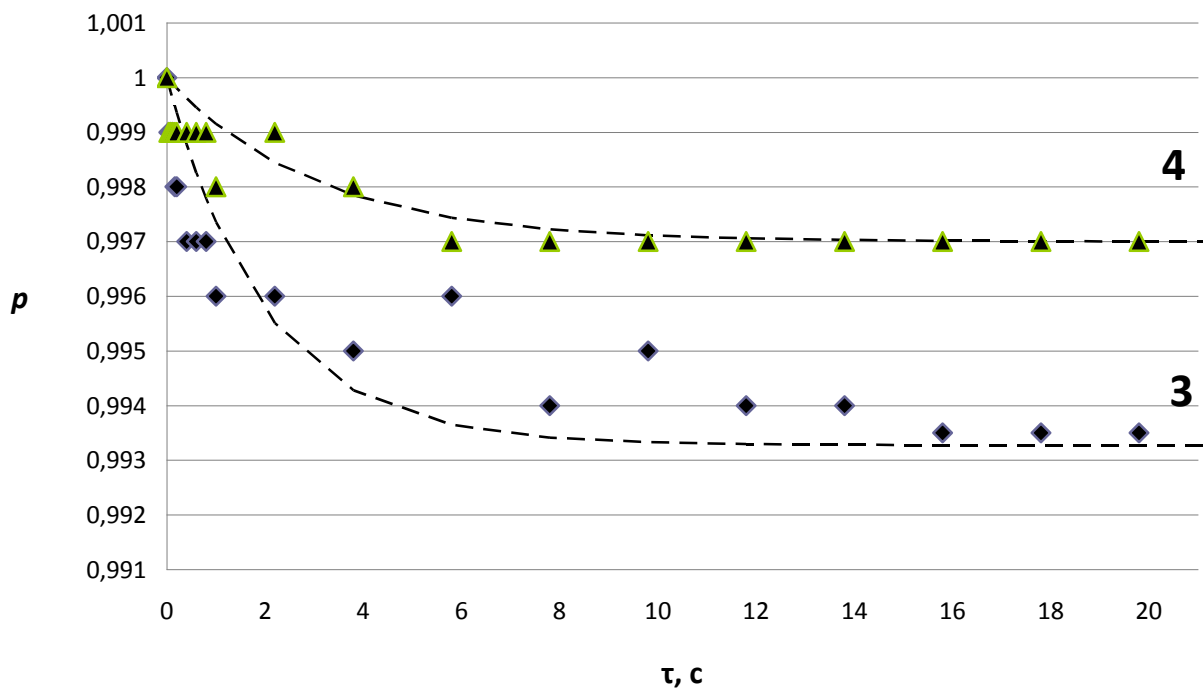


Рисунок 38 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 3 (3) и 4 (4) в 9 ч. 35 мин. (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

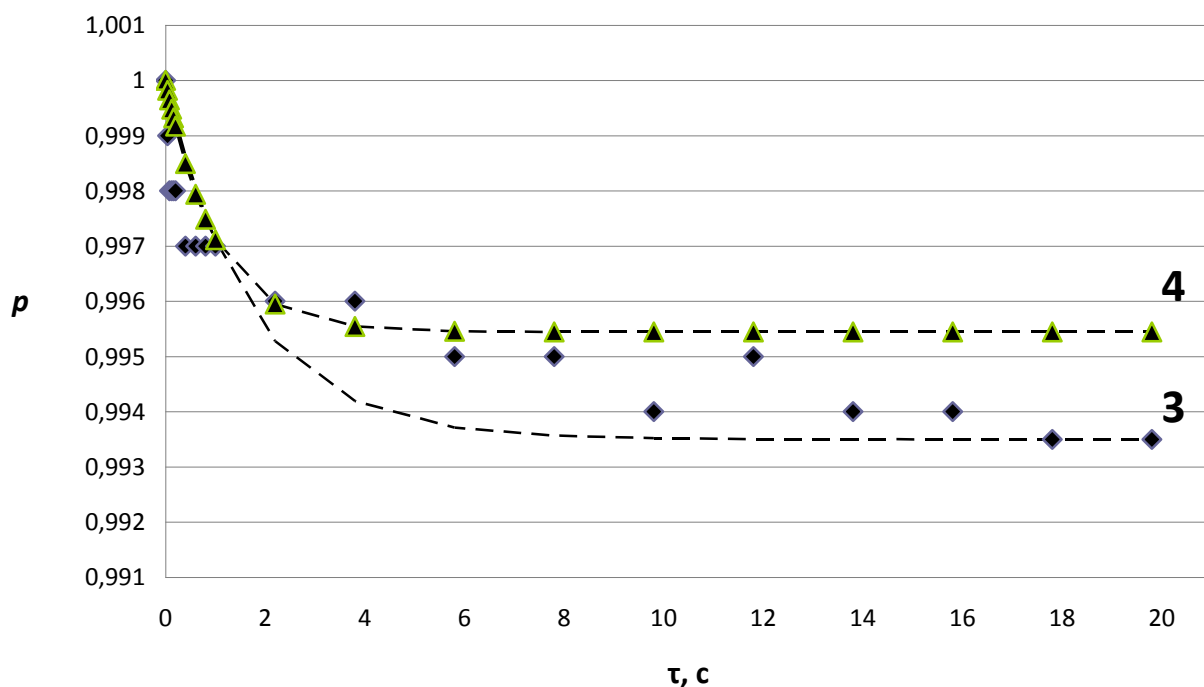


Рисунок 38 - Экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ на участках 3 (3) и 4 (4) в 10 ч. 35 мин. (точки - экспериментальные данные, штриховые кривые - аппроксимация функцией $\eta(\tau)$)

Обработка данных проводилась согласно методике, описанной выше. Значение коэффициента корреляция ρ для здоровых клеток изменяется в интервале 1-0,975, а для зараженных клеток этот интервал составляет примерно 1-0,992. Результаты анализа для четырёх участков представлены в табл. 6-9.

Таблица 6 - Результаты эксперимента для участка 1

	2 ч. после заражен ия	2,5 ч. после заражения	3 ч. после заражения	3,5 ч. после заражения	4 ч. после заражения	4,5 ч. после заражения
η^*	0,9562	0,9856	0,9843	0,9814	0,9842	0,9867
k_{11}	0,0447	0,0144	0,0157	0,0187	0,0159	0,0134
σ_{ul} , МКМ	0,0179	0,0102	0,0106	0,0116	0,0107	0,0098

Таблица 7 - Результаты эксперимента для участка 2

	2 ч. после заражени я	2,5 ч. после заражения	3 ч. после заражени я	3,5 ч. после заражения	4 ч. после заражени я	4,5 ч. после заражения
η^*	0,9640	0,9920	0,9910	0,9900	0,9910	0,9910
k_{11}	0,0366	0,0081	0,0101	0,0094	0,0088	0,0083
σ_{u2} , МКМ	0,0162	0,0076	0,0085	0,0082	0,0079	0,0077

Таблица 8 - Результаты эксперимента для участка 3

	2 ч. после заражения	2,5 ч. после заражения	3 ч. после заражения	3,5 ч. после заражения	4 ч. после заражения	4,5 ч. после заражения
η^*	0,9910	0,9932	0,9950	0,9935	0,9935	0,9950
k_{11}	0,0089	0,0067	0,0049	0,0065	0,0064	0,0050

$\sigma_{u3},$ МКМ	0,0080	0,0069	0,0059	0,0068	0,0067	0,0059
-----------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Таблица 9 - Результаты эксперимента для участка 4

	2 ч. после заражения	2,5 ч. после заражения	3 ч. после заражения	3,5 ч. после заражения	4 ч. после заражения	4,5 ч. после заражения
η^*	0,9931	0,997	0,9951	0,9954	0,9962	0,9972
k_{11}	0,0068	0,0030	0,0049	0,0045	0,0037	0,0028
$\sigma_{u4},$ МКМ	0,0070	0,0046	0,0059	0,0057	0,0051	0,0044

По формуле (33) были определены вариации оптической разности хода для интактных клеток σ и для клеток с вирусами σ_v в разные моменты времени. Изучение эволюций времени корреляции разности фаз волн для данных систем является предметом дальнейших исследований.

На рис. 40 представлены зависимости вариаций оптической разности хода в интактных клетках σ и в клетках с ВПГ-1 σ_v от времени.

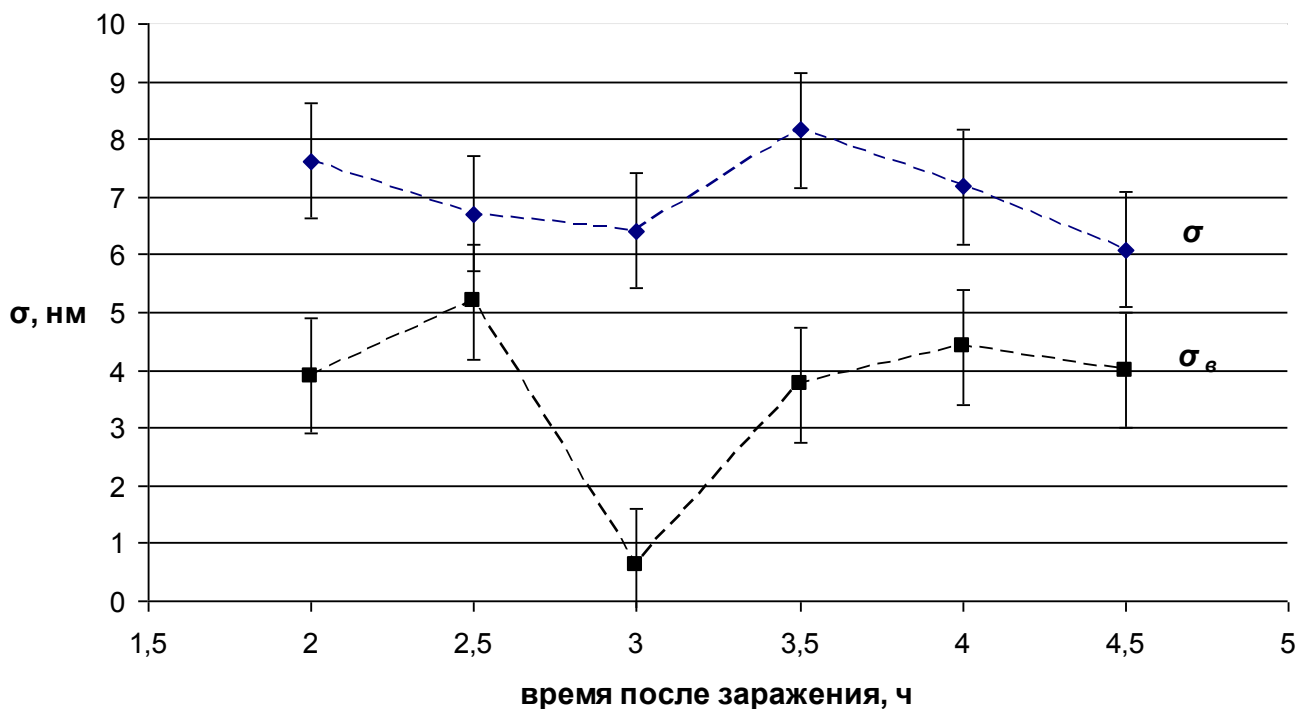


Рисунок 40 - Зависимости вариаций оптической разности хода в intactных клетках σ и в клетках зараженных ВПГ-1 $\sigma_{в}$ от времени

Из рис. 40 видно, что значения вариаций оптической разности хода несколько выше для клеток и изменяются от 6,0 нм до 8,1 нм. В то время как для клеток с вирусами этот показатель находится в интервале 0,6 - 5,2 нм. Вероятно, такое различие в изменениях параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, связано с цитопатогенным действием вируса на клетки. Важно отметить, что минимальное значение σ наступает спустя 3 часа после заражения. Согласно данным специалистов «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций», это время соответствует началу подавления макромолекулярных синтезов в клетке. ВПГ-1 вызывает постепенное подавление синтеза клеточной ДНК. Свидетельством разрушения клеточной ДНК являются повреждения хромосом. Развитие герпеса сопровождается торможением митотического процесса, нарушается естественный клеточный метаболизм. Работа клетки «перестраивается» на репродукцию ВПГ-1. Таким образом, рис. 39 демонстрирует возможность регистрировать раннюю стадию внутриклеточной репродукции вируса с помощью метода динамической спекл-интерферометрии. В это время

родительский вирус уже не обнаруживается в клетке, а дочерние вирионы еще не образовались.

Нами был вычислен коэффициент корреляции d для двух массивов, а именно массива $\sigma(\tau)$ для интактных клеток и массива для клеток с вирусом, который составил 0,23. Была изучена воспроизводимость данных. Было показано, что графики, приведенные на рис. 40 воспроизводятся в 50% случаев. Анализ причины такого результата, показал, что причина плохой воспроизводимости результатов связана тем, что одновременно идут конкурирующие между собой разные биологические процессы.

То есть процессы, в которых одновременно присутствуют изменения оптических длин путей, происходящих с разной скоростью, а включение и выключение разных процессов происходит случайным образом.

Выводы:

1. проведенные эксперименты показали чувствительность данного метода к наличию ВПГ-1 в клеточной культуре;
2. обнаружена плохая воспроизводимость результатов, связанная, по-видимому, с неконтролируемыми конкурирующими между собой биологическими процессами.

4.4 Исследование метаболизма интактных и зараженных ВПГ-1 клеток Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3 в режиме реального времени

В предыдущих исследованиях, описанных в разделах 4.1, 4.2, 4.3 настоящей работы, успешно апробирована спекл-интерферометрическая установка, позволяющая оценивать метаболическую активность клеток, культивированных на стеклянной подложке. В качестве параметра, характеризующего активность клеток, было выбрано значение вариации оптической разности хода σ пар волн, зондирующих объект.

Недостатком методики являлась трудоемкость, не позволяющая производить измерения в реальном времени, а так же плохая воспроизводимость результатов. Анализ факторов, влияющих на изменение оптических путей, показал, что важным фактором могут быть неконтролируемые конкурирующими между собой биологические процессы.

Целью последующих исследований, описанных ниже, являлось устранение недостатков методики и ее использование для сравнения метаболической активности трех клеточных культур. Устранение недостатков включало разработку методики измерений в реальном времени и исключение влияния на динамику спеклов процессов питания клеток и выведения продуктов их жизнедеятельности путем увеличения времени усреднения при регистрации сигналов. Теория метода приведена в разделе 2.2 настоящей работы.

В данном эксперименте зараженный ВПГ-1 монослой клеток, культивированный на подложку, помещался в кювету, заполненную средой роста. Рядом располагалась подложка без клеток (рис. 41). На рис. 41 представлена также картина спеклов, наблюдаемая в фиксированный момент времени на экране компьютера. Отмечены участки, соответствующие разным биологическим объектам.

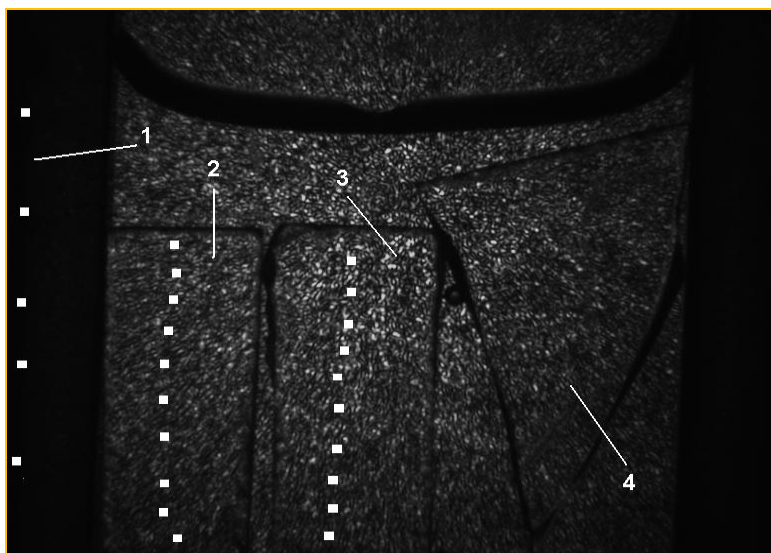


Рисунок 41 - Картина спеклов: участок 1 соответствует воздуху, участок 2 - среде поддержания без клеток, участок 3 - клеткам, зараженным вирусом герпеса простого, 4 - фиксатор

На рис. 42-44 представлены зависимости коэффициента корреляции ρ от времени для культур Vero, Л-41 и ЛЭЧ-3.

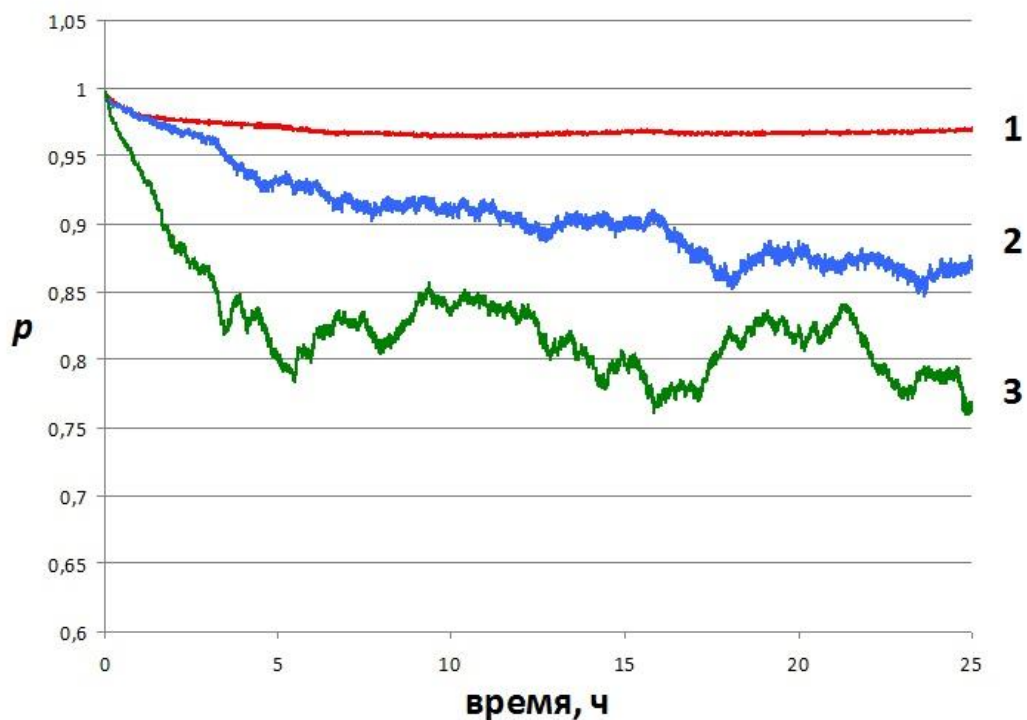


Рисунок 42 - Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры Vero: 1 - питательная среда, 2 - клетки, 3 - клетки, зараженные ВПГ-1

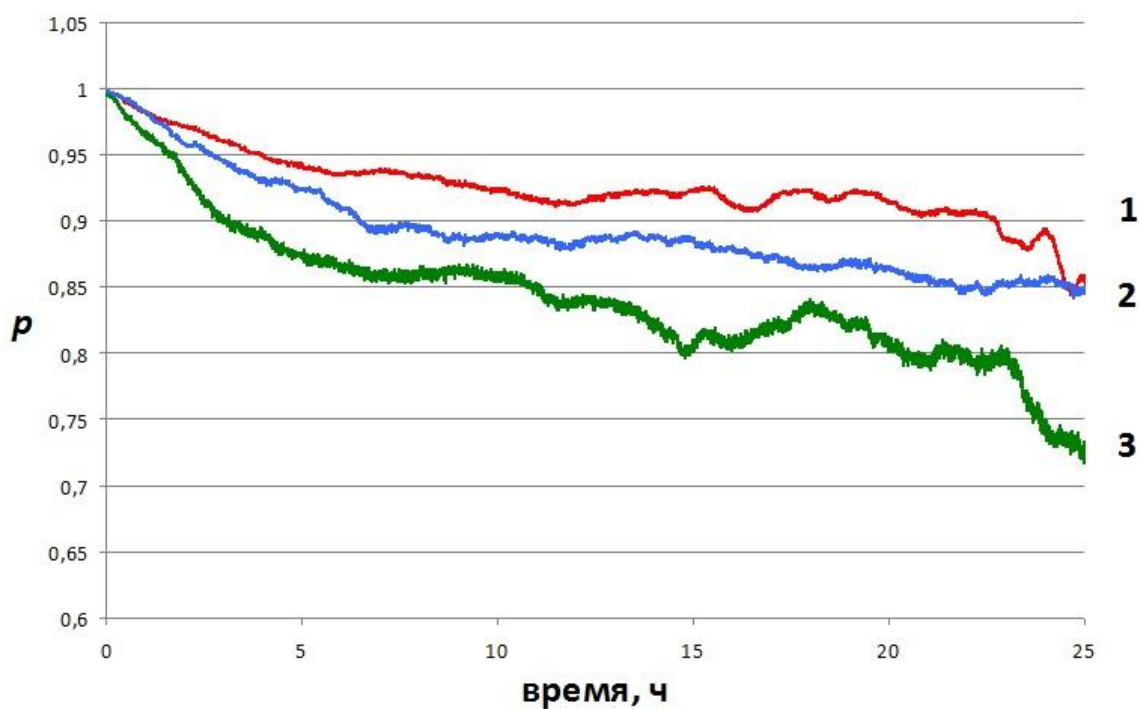


Рисунок 43 - Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры Л-41 КД 84: 1 - питательная среда, 2 - клетки, 3 - клетки, зараженные ВПГ-1

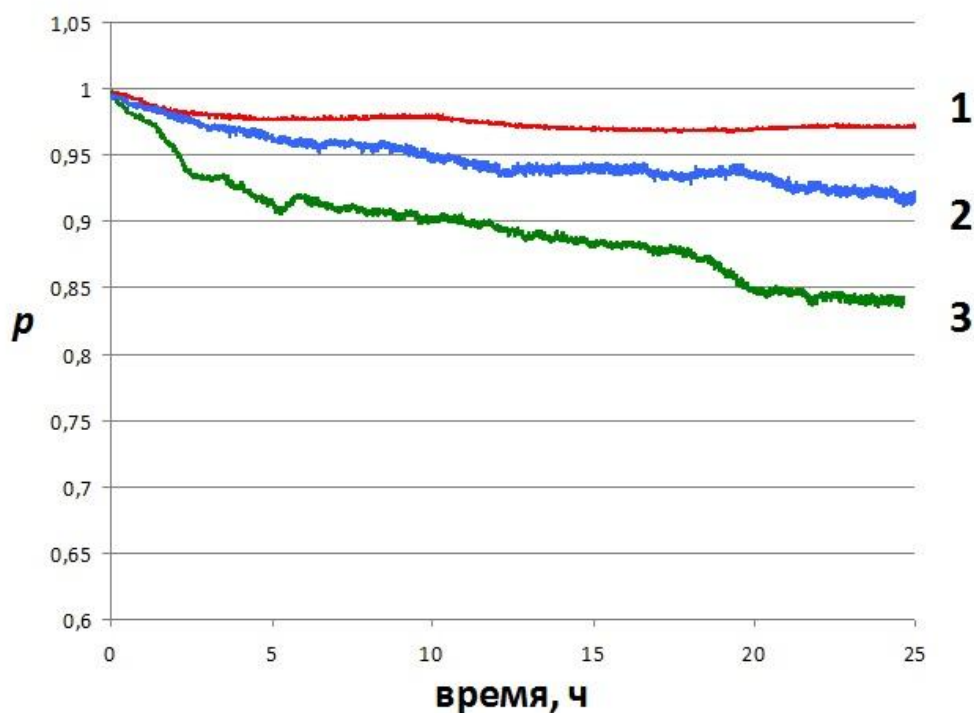


Рисунок 44 - Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры ЛЭЧ: 1 - питательная среда, 2 - клетки, 3 - клетки, зараженный ВПГ-1

На рис. 45-47 приведены зависимости сигнала $I(t)$ от времени для различных культур клеток в присутствии вируса и без него.

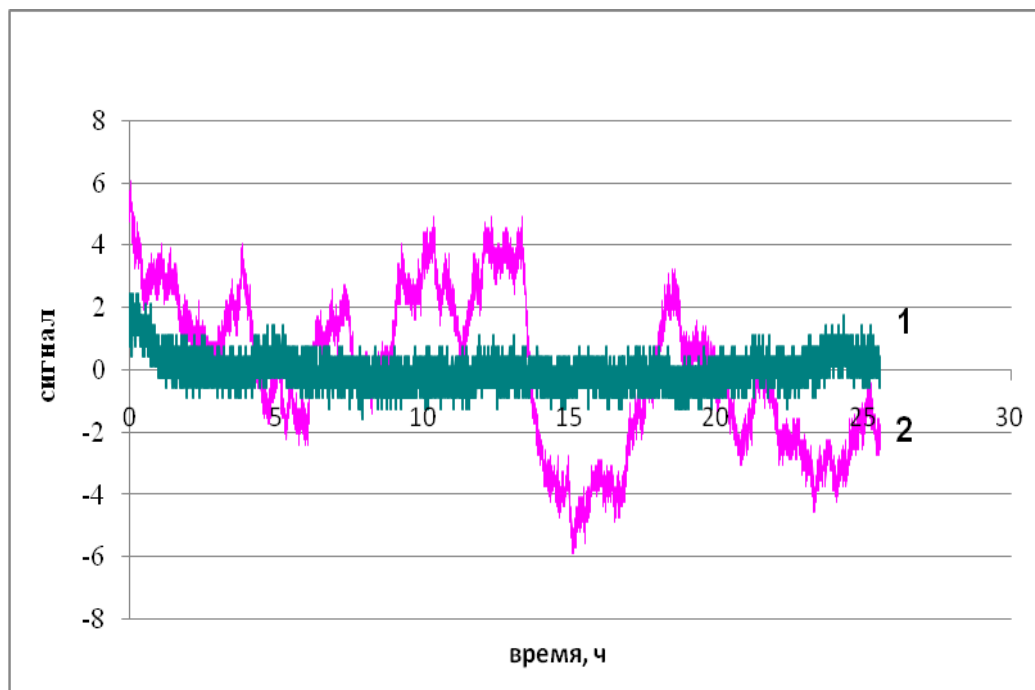


Рисунок 45 - Зависимость сигнала от времени для культуры Vero: 1 - клетки, 2 - клетки, зараженные ВПГ-1

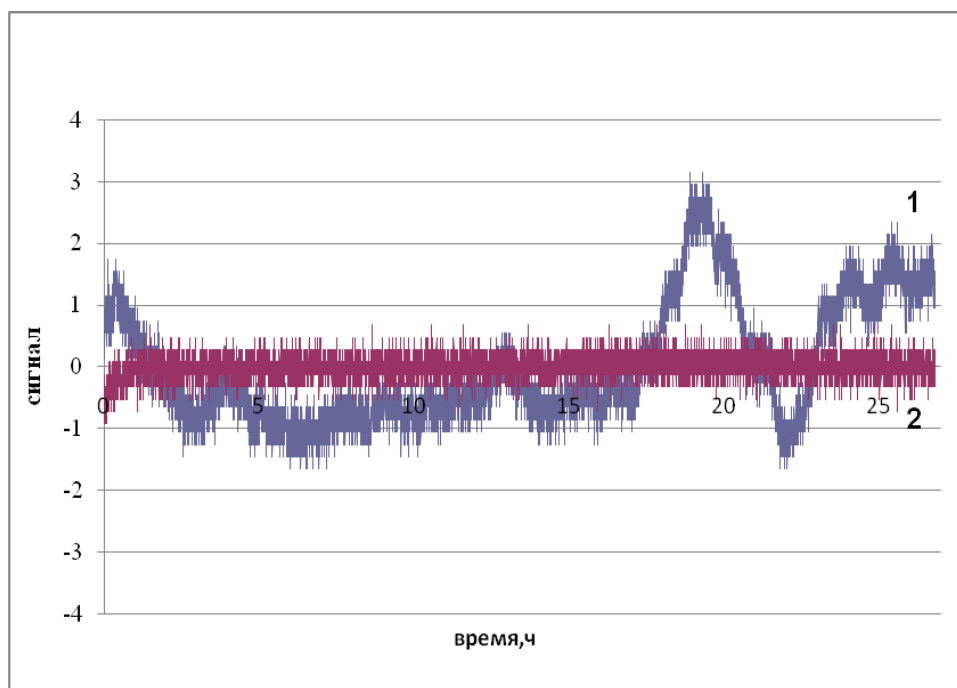


Рисунок 46 - Зависимость сигнала от времени для культуры Л-41 КД 84: 1 - клетки, зараженные ВПГ-1, 2 - клетки

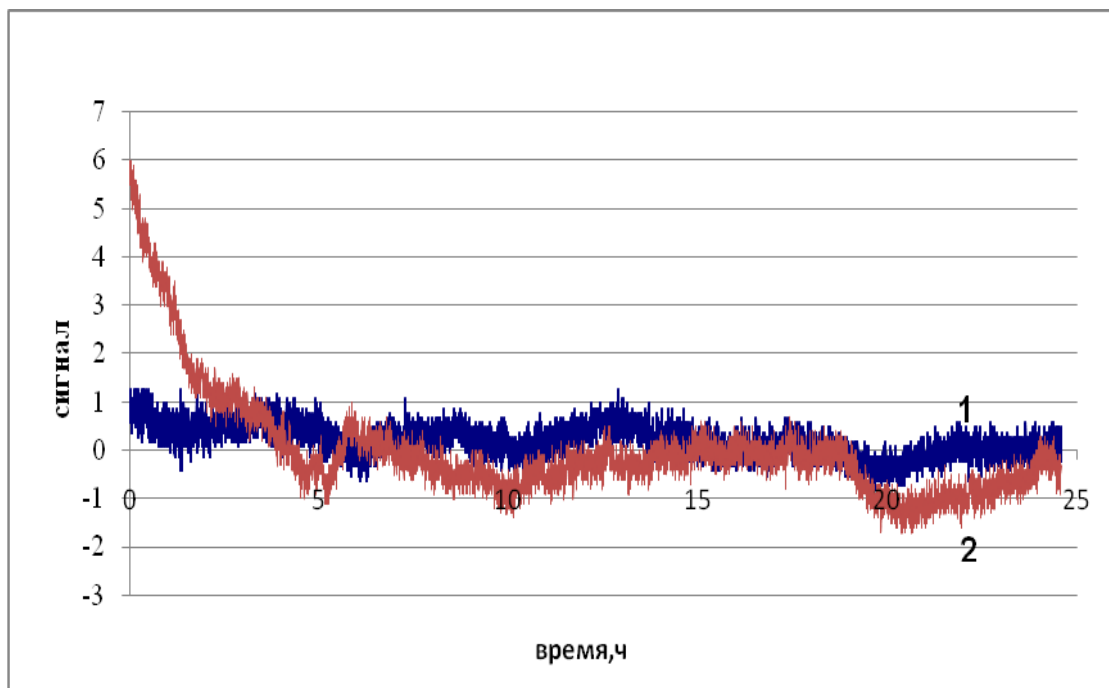


Рисунок 47 - Зависимость сигнала от времени для культуры ЛЭЧ: 1 - клетки, 2 - клетки, зараженные ВПГ-1

На рис. 48 для иллюстрации приведены усредненные по разным пикселям значения сигналов. Даны их зависимости от времени для разных клеточных культур, зараженных ВПГ-1.

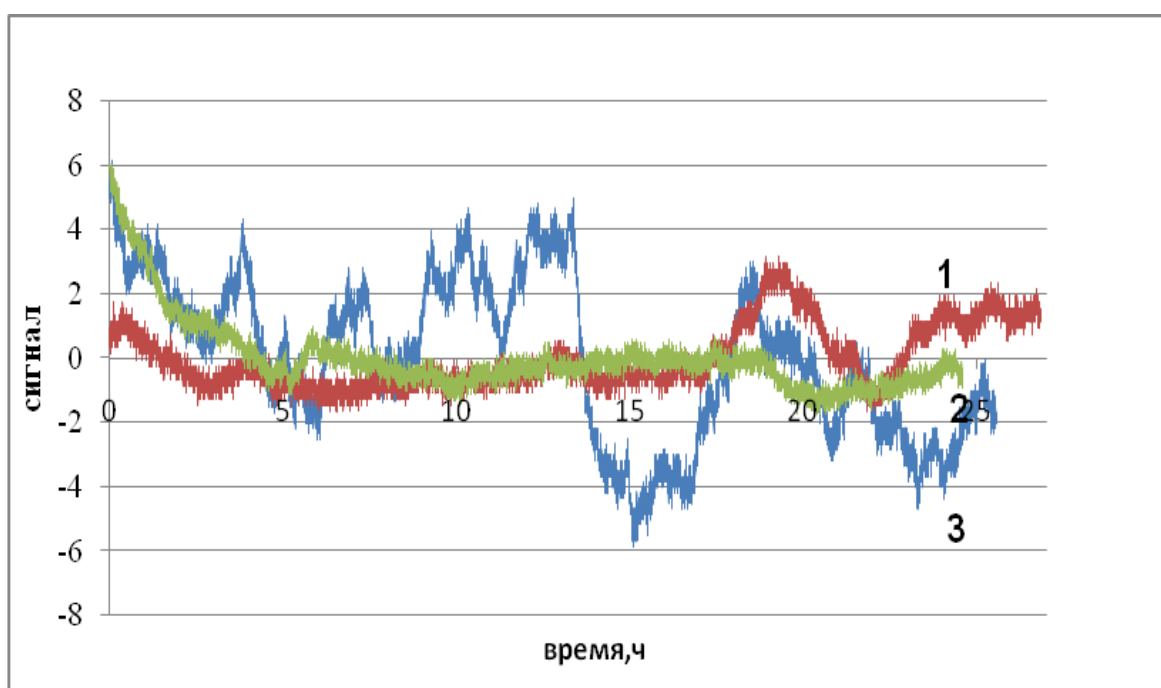


Рисунок 48 - Зависимость сигнала от времени для различных клеточных культур, зараженных ВПГ-1: 1 - Л-41КД 84, 2 - ЛЭЧ-3, 3 – Vero

Как видно из рис. 45-48 имеются существенные различия зависимостей $I(t)$ для интактных и зараженных ВПГ-1 клеток. В настоящее время неясно, как использовать это различие для дальнейших исследований и практического применения. В качестве параметра, который можно было бы использовать для характеристики различия зависимости $I(t)$ нами было выбрано СКО сигналов, зарегистрированных в течение эксперимента. Данные представлены в табл. 10.

Таблица 10 - Среднеквадратическое отклонение сигналов

Параметры	Культуры клеток					
	Vero		Л-41		ЛЭЧ-3	
	без ВПГ-1	с ВПГ-1	без ВПГ-1	с ВПГ-1	без ВПГ-1	с ВПГ-1
СКО	0,5	2,5	0,19	0,97	0,47	1,15

Значения СКО для клеток с ВПГ-1 превосходят значения СКО для клеток в 5 раз для культуры Vero и Л-41, в 2,4 раза - для культуры ЛЭЧ-3. Вопрос об использовании величин сигналов для оценки наличия вирусов требуют дальнейшего исследования.

На рис. 49 приведены зависимости коэффициента корреляции от времени для трех клеточных культур, зараженных ВПГ-1.

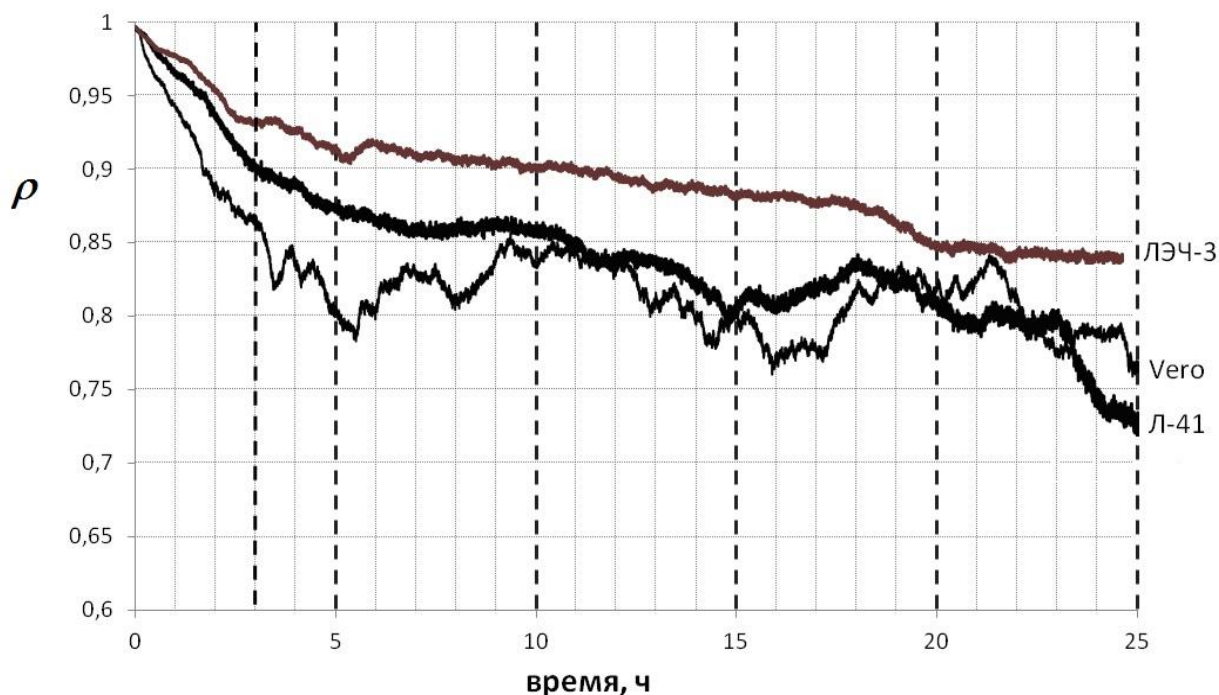


Рисунок 49 - Зависимость коэффициента корреляции от времени для различных клеточных культур, зараженных ВПГ-1

Данная зависимость коэффициента корреляции для трех клеточных культур, зараженных ВПГ-1 отражает стадии развития ВПГ-1 в клеточной культуре, а именно через:

- 3 часа после заражения происходит начало подавления макромолекулярных синтезов в клетке (ВПГ-1 вызывает постепенное подавление синтеза клеточной ДНК);

- 5 часов начинается собирание тяжелых белков в клетке;

- 15 часов происходит разрушение клеток (первый цикл вируса);

- 15-25 часов начинается второй цикл развития вируса.

Начало каждой стадии соответствует экстремум на рис. 48 для каждой клеточной культуры, что напрямую связано с изменениями физиологической активности клеток.

Коэффициент множественной корреляции составляет 0,945, что свидетельствует об однотипности изменений в клеточных культурах при

заражении ВПГ-1. Отличия же обусловлены различной чувствительностью клеточных культур к вирусу герпеса: наиболее чувствительна к вирусу культура ЛЭЧ, минимальная чувствительность - у культуры Л-41, культура Vero по чувствительности занимает промежуточное положение. Чем больше чувствительность культуры клеток, тем быстрее вирус поражает клеточную культуру. Отражение различной чувствительности клеток можно видеть на рис. 46: время релаксации (уменьшение величины коэффициента корреляции до определенного уровня) для культуры ЛЭЧ наименьшее, что свидетельствует о быстрых процессах взаимодействия вируса и клеток; для культуры Vero выход на плато происходит через 5 часов и для культуры Л-41 - наибольшее время релаксации.

Свидетельством разрушения клеточной ДНК являются повреждения хромосом. Развитие герпеса сопровождается торможением митотического процесса, нарушается естественный клеточный метаболизм. Работа клетки «перестраивается» на репродукцию ВПГ-1. Таким образом, вероятно, с помощью метода динамической спекл-интерферометрии возможно регистрировать раннюю стадию внутриклеточной репродукции вируса, во время которой родительский вирус уже не обнаруживается в клетке, а дочерние вирионы еще не образовались.

Как было указано выше, зависимости $\rho(\tau)$ приведенные на рис. 41-43 для интактных и зараженных ВПГ-1 клеток имеют одинаковую тенденцию, а именно величина ρ нелинейно уменьшается по мере увеличения времени проведения эксперимента. Одним из преимуществ измерений в режиме реального времени, является хорошая воспроизводимость данных зависимостей. По этим зависимостям можно перейти к вариации оптической разности хода волн σ , то есть фактически к вариациям показателя преломления среды. Методика определения величины σ описана в разделе 2.1.

На рис. 50 представлены зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток Л-41 КД/84 не зараженной $\sigma_{\text{Л-41}}$ и зараженной ВПГ-1 $\sigma_{\text{Л-41}}^*$ от времени.

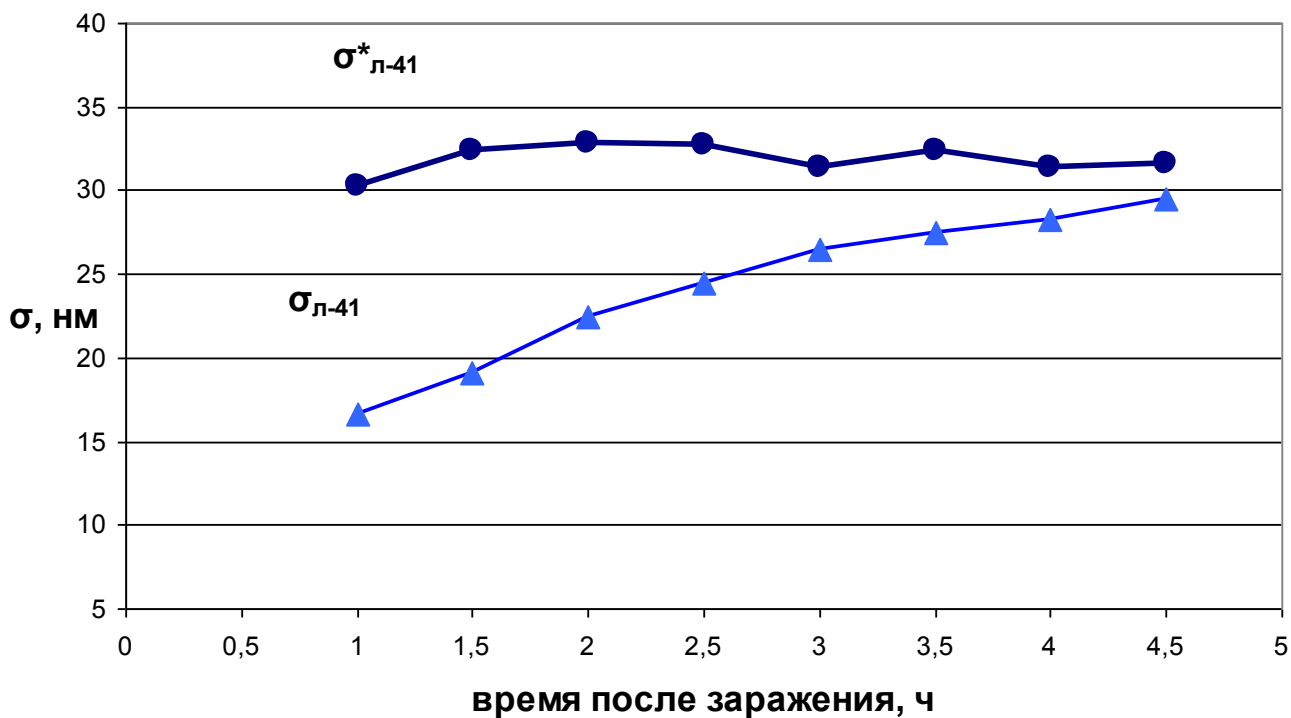


Рисунок 50 - Зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток Л-41 КД/84 не зараженной $\sigma_{\text{л-41}}$ и зараженной ВПГ-1 $\sigma^*_{\text{л-41}}$ от времени

На рис. 51 представлены зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток Vero не зараженной σ_{Vero} и зараженной ВПГ-1 σ^*_{Vero} от времени.

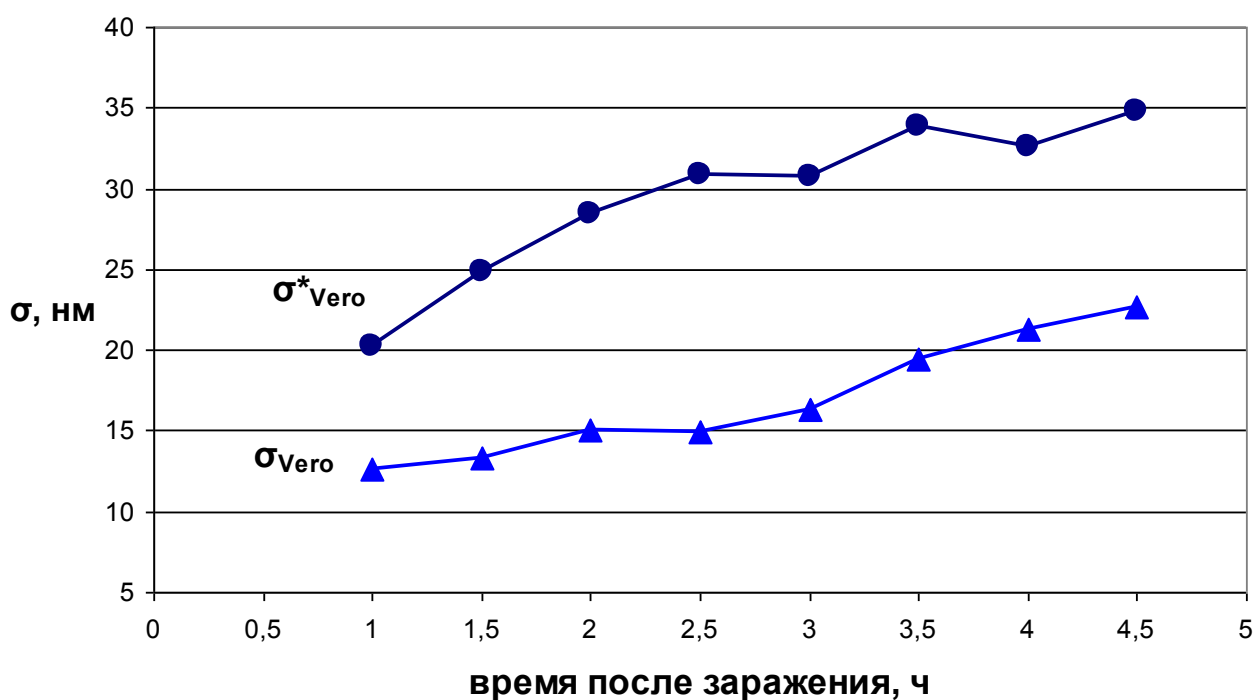


Рисунок 51 - Зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток Vero не зараженной σ_{Vero} и зараженной ВПГ-1 σ^*_{Vero} от времени

На рис. 52 представлены зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток ЛЭЧ-3 не зараженной $\sigma_{\text{ЛЭЧ-3}}$ и зараженной ВПГ-1 $\sigma^*_{\text{ЛЭЧ-3}}$ от времени.

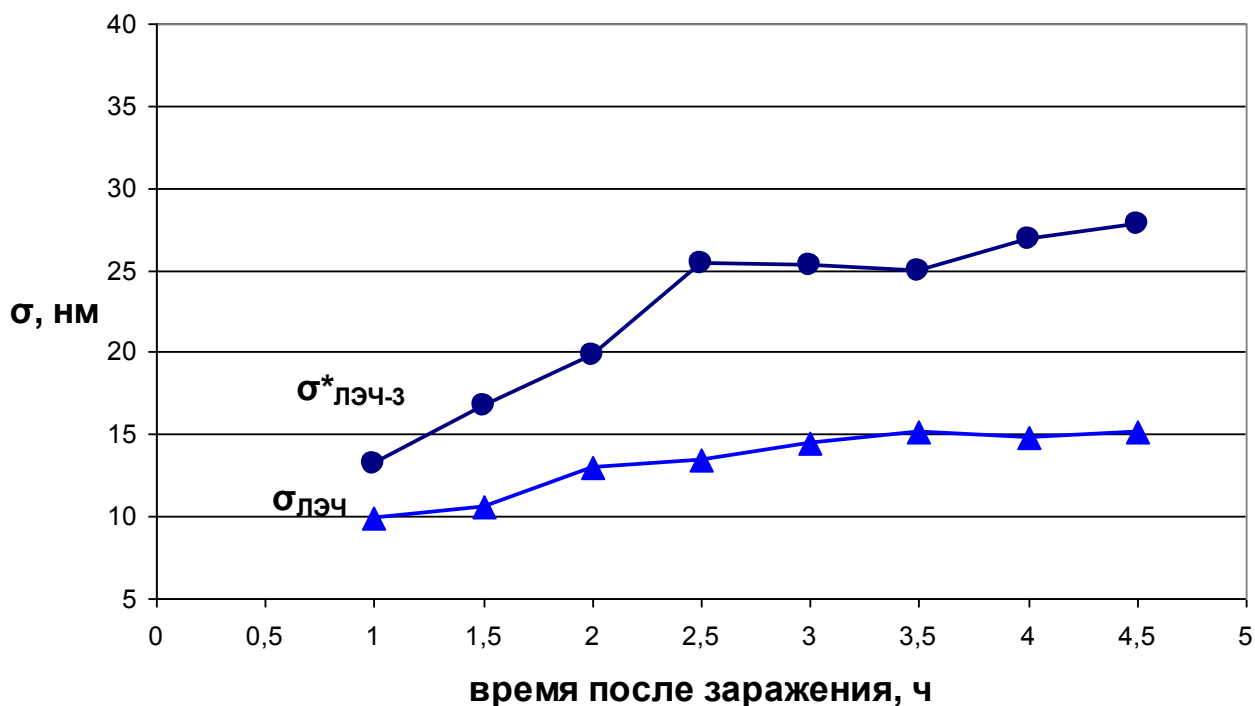


Рисунок 52 - Зависимости вариаций оптической разности хода в культуре клеток Л-41 КД/84 не зараженной $\sigma_{\text{ЛЭЧ-3}}$ и зараженной ВПГ-1 $\sigma^*_{\text{ЛЭЧ-3}}$ от времени

Нами был вычислен коэффициент корреляции d для двух массивов, а именно массива $\sigma(\tau)$ для интактных клеток и массива для клеток с вирусом. Данные представлены в табл. 11.

Таблица 11 - Коэффициент корреляции d

Параметры	Культуры клеток		
	Vero	Л-41	ЛЭЧ
d	0,890	0,871	0,936

Как видно из табл. 11 имеется хорошая корреляция массивов. Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетках с вирусом и без вируса протекают однотипные процессы.

Из рис. 50-52 видно что, зависимости σ и σ^* от времени являются возрастающими в среднем функциями. Особенностью зависимостей является то, что параметр σ^* , характеризующий метаболизм в клетках с вирусом, больше значений σ для клеток без вируса. Пока неясно в чем причина данного различия. Решение данной проблемы требует дальнейшей проработки.

В соответствии с теорией имеется однозначная связь между величиной ρ и σ . Это связь выражена формулой, поскольку связь однозначна, то на практике для оценки метаболизма можно использовать величину ρ или σ . В экспериментах величину ρ находили по участку содержащему 10×10 пикселей, этому участку в плоскости объекта соответствовала область содержащая примерно 500 клеток. Поэтому данная область является достаточно представительной.

На основе проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. осуществлена модернизация методики, предназначенной для оценки метаболической активности клеток, культивированных на подложке. Модернизация включала увеличение времени усреднения сигналов на 3 порядка, а так же регистрацию в реальном времени параметров, характеризующих динамику спеклов;

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

3. показано, что зависимости $\rho(\tau)$ для трех клеточных культур имеют схожий характер, коэффициент корреляции $\sigma(\tau)$ культуры Vero равен 0,890, культуры Л-41 равен 0,871, культуры ЛЭЧ равен 0,936 для интактных и зараженных клеток соответственно.

4.5 Экспресс-диагностика вируса простого герпеса в культивированных клетках

Как было показано выше в разделах 4.2, 4.3, 4.4 зависимости $\rho(\tau)$ для интактных и зараженных вирусом герпеса различаются. Целью дальнейшего исследования являлось определение минимального времени в течении которого можно надежно определить данное различие. Такой анализ имеет важное практическое значение, так как позволяет оценить возможную производительность аппаратуры, позволяющей оперативно оценивать наличия вируса герпеса в клетках. В качестве параметра, характеризующего наличие вируса герпеса нами было выбрана величина $\Delta\rho$:

$$\Delta\rho = (\rho - \rho_0) \quad (35)$$

где

ρ - коэффициент корреляции спекловых изображений интактных клеток,

ρ_0 - коэффициент корреляции спекловых изображений зараженных клеток,

зафиксированные в некоторый момент времени τ .

Детальный анализ зависимостей $\rho(\tau)$ показал, что изменения ρ характеризуются наличием высокочастотных флуктуаций небольшой амплитуды (рис. 53)

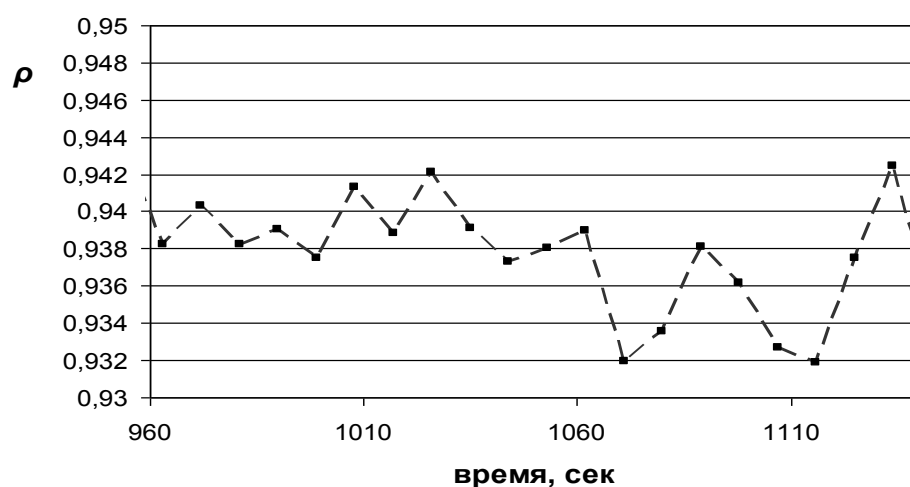


Рисунок 53 - Типичная зависимость $\rho(\tau)$ в пределах 3 минут. Клеточная культура L-41 без вируса

Эти флуктуации можно рассматривать как шум, препятствующий определению величины $\Delta\rho$ с хорошей точностью.

Было предположено, что величина $\Delta\rho$ надежно определяется, если она в 2 раза превышает уровень шума.

В качестве параметра, характеризующего шум, нами был выбран разброс значений разности $\Delta\rho$, а именно СКО величины $\Delta\rho$, определяемое на некотором интервале. Длина интервала была выбрана равной 3 минутам или 20 отсчетам. Таким образом, СКО определялось по формуле:

$$СКО(\Delta\rho) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\Delta\rho_i - \overline{\Delta\rho})^2}, \quad (36)$$

где

n - число измерений в 3-х минутном интервале;

$\Delta\rho_i$ - разность коэффициентов корреляции в i - момент времени;

$\overline{\Delta\rho}$ - среднее значение разности коэффициентов корреляции в данном 3-х минутном интервале.

Графики зависимостей отношения сигнал/шум ε для клеточных культур Л-41 КД 84, Vero, ЛЭЧ-3 от времени представлены на рис. 54-56, где ε определялось по формуле:

$$\varepsilon = \frac{\overline{\Delta\rho}}{СКО(\Delta\rho)} \quad (37)$$

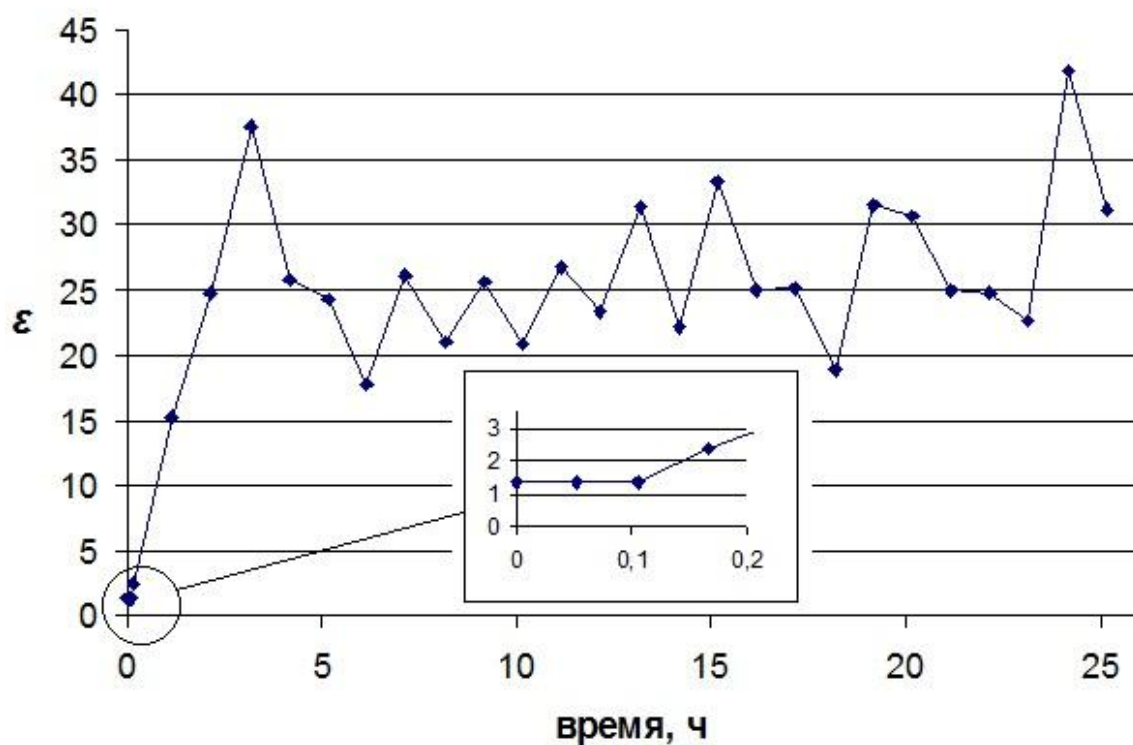


Рисунок 54 - Зависимость ε от времени для культуры Л-41 КД 84

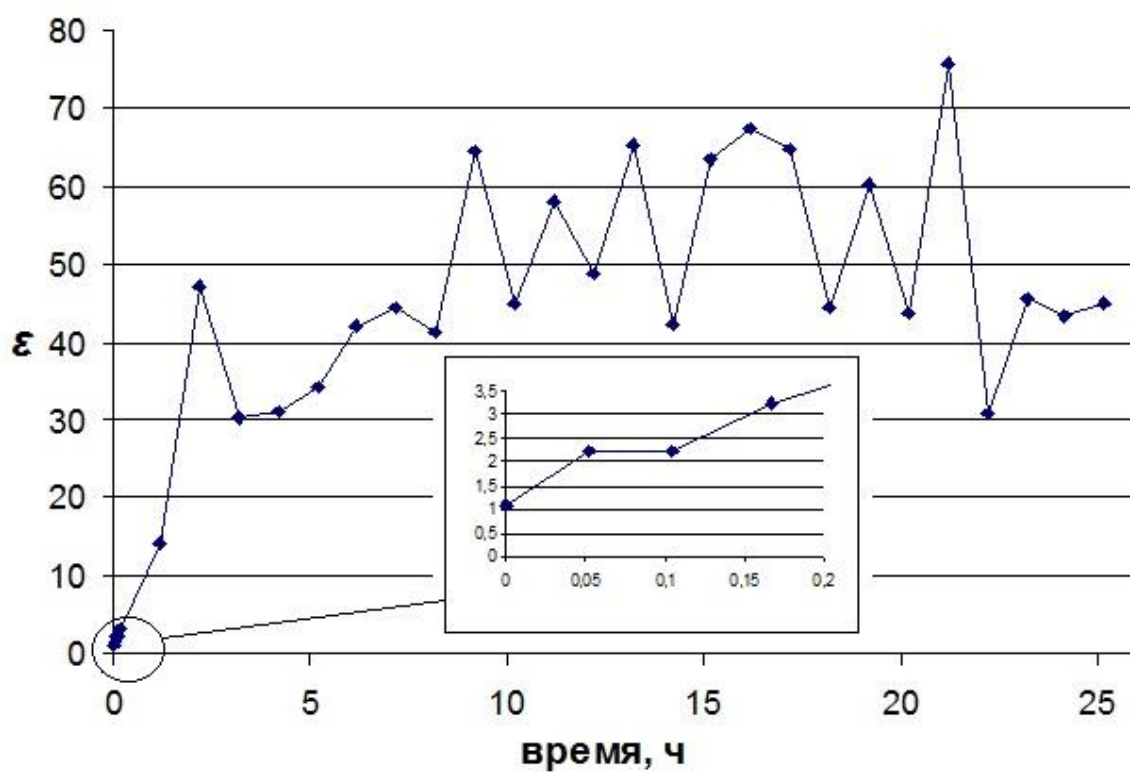


Рисунок 55 - Зависимость ε от времени для культуры Vero

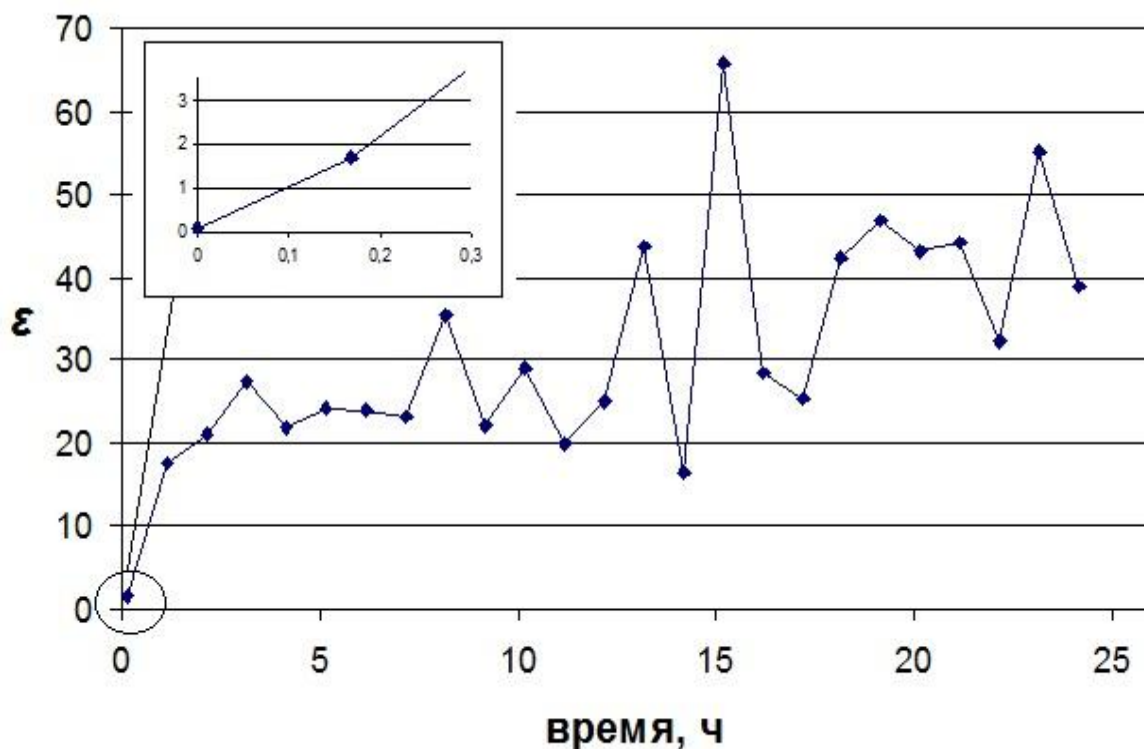


Рисунок 56 - Зависимость ε от времени для культуры ЛЭЧ-3

Из рис. 54-56 следует, что в режиме реального времени методом спекл-интерферометрии по критерию превышения сигналом шума в 2 раза, вирусы в клетках можно обнаруживать после 10 минут после начала измерений.

Диагностика ВПГ-1 в настоящее время проводится по трем направлениям:

1. Культуральный метод. Суть его заключается в том, что из герпетических высыпаний или пузырьков у больного человека забирают содержимое и подсаживают его на растущий куриный эмбрион. Затем по характерным поражениям определяют наличие ВПГ-1. Длительность исследования составляет 72-96 часов.

2. ДНК-диагностика, которая проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), т.е. выделение самого возбудителя. ПЦР может обнаружить вирус у больного только в момент рецидива. Материал для ПЦР забирают специальной щеточкой из мест высыпаний. Реакция позволяет узнать, есть или нет в организме тот или иной тип вируса герпеса. Длительность исследования составляет 6-8 часов.

3. Серодиагностика (обнаружение специфических антител к вирусу герпеса в сыворотке крови). Антитела к вирусу герпеса появляются в сыворотке крови к 4-7-му дню после первичного заражения, достигают пика через 2-3 недели и могут сохраняться всю жизнь. Поскольку для установления диагноза весьма важен прирост антител, наличие их в единственном образце сыворотки еще ничего не означает. В крови большинства взрослых всегда имеются антитела. Для того чтобы отличить первичный эпизод генитального герпеса от первого рецидива с видимыми симптомами, пациенту нужно сдать кровь из вены на антитела к первому и второму типам вируса герпеса. Если в крови есть IgG - защитные антитела - иммуноглобулины класса G, значит, герпес рецидивирующий и угрозы для плода или эмбриона практически нет. Если в крови нет IgG, а есть IgM - то это первичный эпизод герпеса. Длительность исследования так же составляет приблизительно 6-8 часов.

В предложенном в данной работе методе интервал времени исследования в 24 раза меньше времени обнаружения вируса герпеса традиционными методами.

4.6 Обсуждение и выводы по экспериментальной части

Получены в ходе опыта зависимости $\rho(\tau)$ показали, что экспериментальные данные хорошо совпадают с линиями аппроксимации автокорреляционной функции, полученными по теоретической формуле (15) для стационарного процесса изменения разностей фаз волн. Особенностью зависимости является ее выход на постоянный уровень, по которому и определялся параметр σ , характеризующий метаболизм клеток. Следует отметить, что данный параметр определялся путем усреднения по сотням клеток.

Использование величины σ в качестве параметра, характеризующий клеточный метаболизм имеет вполне определенное физическое обоснование. Действительно, величина σ есть среднее квадратическое отклонение величины Δu_k (8). Величина Δu_k для k -ой пары волн является разностью оптических путей j -ой и m -ой волн, прошедших через объект. Согласно формуле (7) оптическая длина пути волны является интегралом вдоль пути волны:

$$u_j = \int_{l_j} [n_j(l) - n_0] dl \quad (38)$$

где в пределе интегрирования входит толщина клетки на пути j -ой волны, а функция $n_j(l)$ содержит распределение показателя преломления среды в пределах клетки. В свою очередь величина n_j по формуле Лоренц - Лорентца зависит от ряда физических величин:

$$(n^2 - 1)/[\rho(n^2 + 2)] = \bar{r}(\lambda) = const \quad (39)$$

где

$\bar{r}(\lambda)$ - удельная преломляющая способность вещества, величина которой приводится в справочника,

ρ - плотность вещества.

Для многокомпонентных сред величина $\bar{r}(\lambda)$ является суммой произведений удельной преломляющей способности отдельных компоненты на их относительную концентрацию.

Процесс жизнедеятельности клеток сопровождается необратимыми химическими процессами, локально изменяющими температуру среды, а следовательно и плотность ρ . Изменение плотности неизбежно изменяет длину пути волны в клетке. Плотность среды на элементарном участке пути может изменится так же из-за переноса веществ в клетке с помощью разных механизмов. Концентрация веществ изменяется вследствие питания клеток и переноса веществ в пределах клеток. Таким образом указанные физические и химические процессы изменяют физические величины, входящие в формулы (38, 39). Как видно из приведенных формул (38, 39) при изменении на элементарном участке пути волны величин $\bar{r}(\lambda)$ и ρ , концентрации веществ, а так же толщины клетки изменяется величина u_j , Δu_k , величина σ . Следовательно, физические и химические процессы, протекающие в клетках, которые и определяют метаболическую активность клетки, в интегральной форме влияют на изменение величины σ . Возможность использования данной методики для контроля изменения клеточного метаболизма основано на сравнении изменения параметров, характеризующих динамику спеклов, с изменениями, происходящими в клетках, исследованными другими методами. Основными закономерностями демонстрирующими возможности анализа клеточного метаболизма являются линейное изменение величины σ при увеличении температуры, линейное уменьшение времени корреляции разности оптических путей от изменения температуры и совпадение интервалов характерного изменения $\tilde{I}(\vec{q})$ с характерными интервалами взаимодействия вируса с клетками.

При заражении клеточной культуры, в том числе ВПГ-1, происходит изменение метаболической активности. Для практических биологических и медицинских целей имеет значение фиксирование момента до того как начинают происходить физико-химические изменения в клетке при заражении вирусом.

Сокращение данного интервала времени в практической медицине играет большую роль в правильном подборе лекарств с целью избегания негативных последствий развития вируса. Метод предложенный в настоящей работе позволил регистрировать попадание ВПГ-1 на клеточную культуру в течении 10 минут после заражения, что является прогрессивным по сравнению с другими методами исследования.

По полученным экспериментальным данным можно сделать следующие выводы:

1. экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$, найденные на временном интервале 0-40 секунд, после характерного времени τ_0 выходят на постоянный уровень, что согласуется с теорией динамики спеклов стационарных случайных процессов;

2. показано, что параметр σ , найденный по постоянному уровню, характеризует метаболическую активность клеточных культур;

3. при малых временах усреднения T , порядка 0,1 секунды, экспериментальные зависимости $\rho(\tau)$ для клеточных культур с вирусом герпеса плохо воспроизводятся;

4. при выборе времени усреднения T превышающего τ_0 , зависимости $\rho(\tau)$ для интактных и зараженных клеток хорошо воспроизводятся, интерпретация экспериментальных значительно улучшается;

5. показано, что зависимости $\rho(\tau)$ для незараженных и зараженных клеток имеют аналогичный вид, с существенно разными параметрами;

6. показано, что для клеток Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3 метод усреднения во времени позволяет оценить факт заражения ВПГ-1 клетки уже после 10 минут после начала измерений.

Заключение

Основные результаты проведенного исследования можно сформулировать следующим образом:

1. Разработана, откалибрована и успешно использована оптическая установка, соответствующая оптической системе, рассмотренной в теории динамической спекл-интерферометрии тонких биологических объектов. Изготовлены оригинальные узлы для крепления лазерного модуля, матового рассеивателя, кюветы, транслятора эталона шероховатости, диафрагмы с линзой, телекамеры.

2. Предложена методика, позволяющая по зависимостям коэффициента корреляции спекловых изображений от времени $\rho = \rho(\tau)$, определять среднеквадратическое отклонение разности оптических путей σ пар волн, зондирующих клетки. Установленная температурная зависимость σ позволила обосновать величину σ в качестве параметра, характеризующую метаболическую активность клеток.

3. Обоснован и предложен метод усреднения во времени динамики спеклов, который позволил в режиме реального времени в течение 1-2 суток регистрировать хорошо воспроизводимые зависимости $\rho = \rho(\tau)$, соответствующие питательному раствору, клеткам в питательной среде, клеткам с вирусом герпеса в питательной среде. Показано, что для всех трех типов использованных клеток зависимости имеют аналогичный спадающий вид, однако параметры зависимостей для клеток с вирусами и без вирусов существенно различаются.

4. Обнаруженные закономерности использованы: а) для обоснования нового неразрушающего экспресс-метода оценки заражения ВПГ-1 клетки через 10 минут после начала измерений, что 24 раза меньше времени обнаружения вируса герпеса традиционными методами; б) для выработки технических рекомендаций по разработке опытного прибора и рекомендаций по его использованию в ЕНИИВИ; в) для разработки программы исследования степени

активности вируса герпеса в клетках пациентов клеток методом динамической спекл-интерферометрии; г) в учебном процессе по направлению 12.03.04 “Биотехнические системы и технологии”

Библиографический список

1. Гладкова, Н. Д. Оптическая когерентная томография в ряду методов медицинской визуализации / Н. Д. Гладкова // Н. Новгород: Институт прикладной физики РАН, 2005. 315 с.
2. Посудин, Ю. И. Лазерная фотобиология / Ю. И. Посудин // Киев: Вища школа, 1989. 248 с.
3. Приезжев, А. В. Лазерная диагностика в биологии и медицине / А. В. Приезжев, В. В. Тучин, Л. П. Шубочкин // М.: Наука, 1989. 240 с.
4. Лопатин, В.Н. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред / В. Н. Лопатин, А. В. Приезжев // М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 384 с.
5. da Silva, M. M. Optics Communications / J. R. de Almeida Nozela, M. J. Chaves // 2011. V. 284. P. 1798.
6. Франсон, М. Оптика спеклов Пер. с англ. под ред. Ю.И.Островского / М. Франсон // М.: Мир, 1980. 171 с.
7. Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика / В.В. Тучин // М., Издательство Физико-математической литературы, 2007.- Т.1. - 560 с.
8. Choi, W. Tomographic phase microscopy / W. Choi, C. Fang-Yen // Nature Methods 2007. V. 4.P. 717–719.
9. Тычинский, В. П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // В. П. Тычинский / УФН 2001. Т. 171. С. 649–661.
10. Vladimirov, A. P Speckle dynamics produced by lecithin - water sol-gel transition / A. P. Vladimirov, N. V. Kilunova, A. V. Michurov, S. V. Yakovleva // Asian J. Phys. Vol.15. No.1 – pp. 93-100.-2006
11. Niemz, H. Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications / H. Niemz // Berlin et al.,Springer-Verlag, 1996. P.307
12. Беднов, А. А. Исследование динамики лимфотока методами спекл-интерферометрии / А. А. Беднов, С. С. Ульянов, В. В. Тучин, Г. Е. Бриль, Е. И. Захарова // Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика, 4, № 6, 1996. С. 45-54

13. Зимняков, Д.А. Исследование статистических свойств частично-развитых спекл-полей применительно к диагностике структурных изменений кожи человека / Д. А. Зимняков, В. В. Тучин, С. Р. Утц // Оптика и спектроскопия. -1994. - №5.С. 13-16
14. Cardoso, R.R. Frequency signature of water activity by biospeckle laser / R.R. Cardoso, A. G. Costa, C. M. B. Nobre, R. A. Braga Jr. // Optics Communications, 2011, V.284, pp. 2131–2136.
15. Владимиров, А. П. Применение техники счета числа мерцаний спеклов для изучения биологической активности кожи / А. П. Владимиров, А. Л. Лисин, В.И. Микушин, М. М. Кохан, И. А. Куклин, Е. В. Кононенко // Письма в журнал технической физики. М. 2000. – Т. 26. - С.20-24
16. BRIERS, J. D. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow / J. D. BRIERS, S. WEBSTER // Journal of Biomedical Optics 1(2), 1996, pp. 174–179.
17. FERCHER, A. F. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography / A. F. FERCHER, J. D. BRIERS // Optics Communications 37(5), 1981, pp. 326–330.
18. Briers, J. D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow / J. D. Briers // Optica Applicata, Vol. XXXVII, No. 1–2, 2007, pp.139-152.
19. Malygin, A. S. Theory and calibration of speckle dynamics of phase Object / A.S. Malygin, A. P. Vladimirov, A. V. Druzhinin, K. N. Mikitas // Proc. of SPIE, Vol. 8337, pp. 83370C-1 - 83370C-15.
20. Малыгин, А. С. Динамическая спекл-интерферометрия биологических мембран / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, Т. Н. Павлов, Д. О. Попов, С. В. Яковлева // 11й международный семинар-ярмарка Российские технологии для индустрии. 20-23 ноября 2007 г. Санкт-Петербург, Россия; Сборник проектов, 2007 г., с. 83.
21. Malygin, A. Application of the spectral analysis of speckle dynamics in some problems of mechanics and nondestructive testing / A. Malygin, A. Vladimirov, D. Popov, A. Rzhannikov. // Eighth International Conference on Vibration

Measurements by Laser Techniques: Advances and Applications. Proc. of SPIE Vol. 7098. p. 48-53.

22. Малыгин, А. С. Применение динамики спеклов для исследования питательных сред, предназначенных для культивирования клеток / А. С. Малыгин, Н. В. Бебенина, К. Н. Микитась, А. П. Владимиров, А. В. Кружалов // Проблемы спектроскопии и спектрометрии: межвузовский сборник научных трудов. Екатеринбург, УрФУ, 2011, Вып. 28, с. 192-197.

23. Malygin, A. S. Dynamic speckle – interferometry of model biological membranes / A. S. Malygin, A. P. Vladimirov // Интернет доклад. Саратов, Саратовский государственный университет, 2011, Ссылка: <http://optics.sgu.ru/SFM/2008/report/670>.

24. Малыгин, А. С. Теория и калибровка динамики спеклов фазового объекта / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, А. В. Дружинин, К. Н. Микитась // Интернет доклад. Саратов, Саратовский государственный университет, 2011, Ссылка: <http://sfm.eventry.org/report/62>.

25. Малыгин, А. С. Изучение биологической активности клеток спекл – интерферометрическим методом / А. С. Малыгин, Н. В. Бебенина, А. П. Владимиров // Сборник тезисов XII Всероссийская юбилейная молодежная школа – семинар по проблемам физики конденсированного состояния вещества (СПФКС-12). Екатеринбург, ИФМ УрО РАН, 2011, Вып. 12, с. 181.

26. Малыгин, А. С. Спекл-интерферометрическая установка для изучения биологической активности клеток / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, К.Н.Микитась, А. А. Бахарев // Приборы и техника эксперимента, 2012, № 2, С. 1–4

27. Малыгин, А. С. Применение динамики спеклов для сравнения метаболической активности разных клеточных культур / А. С. Малыгин, Ю. А. Михайлова, А. А. Бахарев, А. П. Порываева // Журнал “Вестник Нижегородского университета”, г. Нижний Новгород, 2013, с. 154-155.

28. Малыгин, А. С. Динамическая спекл-интерферометрия клеточных культур с герпесом / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, Ю. А. Михайлова, А. А.

Бахарев, А. П. Порываева // Материалы XXVIII Школы-симпозиума по голографии и когерентной оптике. Нижний Новгород, 22–26 августа 2013 г. стр. 105

29. Малыгин, А. С. Устройство оценки в режиме реального времени метаболической активности клеточных культур с вирусом герпеса / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, Ю. А. Михайлова, А. А. Бахарев, А. П. Порываева // Журнал “Медицинская техника”, г. Москва, 2014 г, вып. № 4, стр. 8-11.

30. Малыгин, А. С. Сравнение метаболической активности разных клеточных культур по динамике спеклов / А. С. Малыгин, А.П. Владимиров, Ю.А. Михайлова, Е. М. Бородин, А. А. Бахарев, А. П. Порываева // Журнал Известия ВУЗов. Радиофизика г. Нижний Новгород, 2014 г, Том 57, № 8-9, стр. 654-659

31. Malygin, A. S. Application of speckle dynamics for studying metabolic activity of cell cultures with herpes virus / A. S. Malygin, A. P. Vladimirov, A. A. Bakharev, J. A. Mikhailova, E. M. Borodin, A. P. Poryvayeva and N. P. Glinskikh // AIP Conf. Proc. 1600, 357 (2014)

32. Malygin, A. S. Application of speckle dynamics for studies of cell metabolism / A. S. Malygin, A. P. Vladimirov, A. A. Baharev, J. A. Mikhailova, I. A. Novoselova, D. I. Yakin. // Proc. of SPIE, 2015, v. 9529, 95291F-1 - 95291F-10

33. Malygin, A. S. Dynamic speckle-interferometer for intracellular processes analyses at high optical magnification / A. S. Malygin, A. A. Baharev, A. P. Vladimirov, Y. A. Mihailova, I. A. Novoselova, D. I. Yakin, A. V. Druzhinin // Proc. of SPIE, 2015, v. 9529, 95291G-1 – 95291G-9

34. Устройство для оценки активности вируса в клеточной системе: патент на полезную модель № 140765 Российская Федерация / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, Н. П. Глинских, А. П. Порываева, А. А. Бахарев, Ю. А. Михайлова; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки "Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - № 2013158784/15; заявлено 27.12.2013; зарегистрировано 20.05.2014.

35. Ивков, В. Г. Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский // М.: Наука, 1978. 296 с.
36. Антонов, В.Ф. Липидные мембраны при фазовых превращениях / В. Ф. Антонов, Е. Ю. Смирнова, Е. В. Шевченко // М.: Наука, 1992. 125 с.
37. Королева, Л.Ф. Допированные фосфаты кальция – перспективный биоматериал / Л. Ф. Королева // Перспективные материалы, 2007, №4 , с.30-36.
38. Веселов, Л. М. Информационные свойства нестационарной во времени спекл-картины / Л. М. Веселов, И. А. Попов // Оптика и спектроскопия, 1993, т.74, вып.6, с.1155-1159.
39. Филонин, О. В. Общий курс компьютерной томографии / О. В. Филонин. - Самара : Самарский научный центр РАН, 2012. — 407 с.
40. Тучин, В. В. Лазеры и волоконные световоды в биомедицинских исследованиях / В.В. Тучин // 2-е изд., испр. и доп. - М.: Физматлит, 2010. 488 с.
41. Соколов, А. В. Применение методов оптической голографии для исследования биологических микрообъектов / А.В. Соколов // Л.: Знание, 1978. 254 с.
42. Василенко, Г. И. Голографические распознающие устройства / Г. И. Василенко, Л. М. Цибулькин // М.:Радио и связь, 1985. 213 с.
43. Woisetschlager, J. Phase-shifting holographic interferometry for breast cancer detection / J. Woisetschlager, D. B. Sheffer, C. W. Loughry // Appl. Opt. 1994. V. 33, №22. P. 5011–5015.
44. Зимняков, Д. А. Исследование статистических свойств частично-развитых спекл-полей применительно к диагностике структурных изменений кожи человека / Д. А. Зимняков, В. В. Тучин, С. Р. Утц // Оптика и спектроскопия. -1994. - №5.С. 13-16
45. Бессмельцев, С. С. Лазерная дифрактометрия оптических и механических свойств эритроцитов / С. С. Бессмельцев, А. В. Лендяев, Ю. А. Скворцова // Оптический журнал 2000 т.67. №4. С.47-51

46. Беликов, А. В. Температурная динамика оптических свойств липидов *in vitro* / А. В. Беликов, К. В. Приходько, О. А. Смолянская // Оптический журнал, том 70, № 11, 2003. С.55-58.

47. Гладков, Н. Д. Возможности оптической когерентной томографии в оценке патологических состояний кожи / Н. Д. Гладков, Г. А. Петров, Н. К. Никулин // Российский журнал кожных и венерических болезней. №5 1999, С. 9-18.

48. Корлевич, А. Н. Статистические характеристики рассеянного света для анализа размера агрегатов биологических частиц / А. Н. Корлевич, Н. П. Пригун // Оптика и спектроскопия, 2002, т. 93, С.969 – 974.

49. Скипетров, С. Е. Диффузионно-волновая спектроскопия в случайно-неоднородных средах с локализованными в пространстве потоками рассеивателей / С. Е. Скипетров, И. В. Меглинский // ЖЭТФ, 1998, т. 113, вып. 4, С. 1213-1222.

50. Hector, J. Rabal Dynamic Laser Speckle and Applications / J. Rabal Hector, A. Braga Jr. Roberto // Optica Applicata, Vol. XXXVII 2009, p.p.1-210

51. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки. В 5-ти томах. // Б. Албертс // М.: Мир, 1986 - 1987.

52. Абрамов, М. Г. «Клиническая цитология» / М. Г. Абрамов // Москва «МЕДИЦИНА» 1974.

53. Зенгбуш, П. Молекулярная и клеточная биология. В 3-х т. / П. Зенгбуш // М.: Мир, 1982.

54. Владимиров, А. П. Динамическая спекл-интерферометрия деформируемых тел / А.П. Владимиров // Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 241 с.

55. Владимиров, А. П. Прибор для визуализации и количественного анализа явлений в мембранах клеток / А. П. Владимиров // 10й международный семинар-ярмарка Российские технологии для индустрии. 1-3 ноября 2006 г. Санкт-Петербург, Россия; Сборник проектов, 2006г., с. 71.

56. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Адамс Р. // М.:Мир, 1983. 263 с.

57. Северина, Е. С. Биохимия Учеб. для вузов, под ред. Е.С. Северина. / Е. С. Северина // М.: ГЭОТАР-Медиа 2003. 779 с.
58. Баринский, И. Ф. Герпес (этиология, диагностика, лечение)/ И. Ф. Баринский, А. К. Шубладзе, А. А. Каспаров // М.: Медицина, 1986. 272 с.
59. Yamaguchi, I. Speckle displacement and decorrelation in the diffraction and image fields for small object deformation / I. Yamaguchi // Optica Acta, 1991, v.28, pp.1359-1376.
60. Акчурин, Г. Г. Лазерная спекл-интерферометрия и возможность определения ретинальной остроты зрения при катаракте / Г. Г. Акчурин, В. В. Бакуткин, Е. Ю. Радченко, В. В. Тучин // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, 2002, 1, С.19-27.
61. Дубнищев, Ю. Н. Оптические методы исследования потоков. Под ред. акад. РАН Накорякова В. Е. / Ю. Н. Дубнищев, В. А. Арбузов, П. П. Белоусов, П. Я. Белоусов // Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2003, 418 с.
62. Порываева, А. П. Клеточные культуры в комплексной диагностике герпесвирусных инфекций / А. П. Порываева, Т. С. Некрасова // 6-я региональная научно-практическая конференция «Перспективы использования в медицинской практике новых иммунобиологических препаратов, полученных на основе клеточных культур» 30-31 мая 2012 г. Екатеринбург. Сборник материалов конференции.
63. Баринский, И. Ф. Лейкоцитарные культуры в вирусологических исследованиях / И. Ф. Баринский, А. К. Шубладзе // М.: Медицина.1980, 174 с.
64. Хэм, А. «Гистология», том 1 / А. Хэм, Д. Кормак // Москва «МИР» 1982.
65. Bednov, A. A. Opto-acoustic monitoring of blood optical properties as a function of glucose concentration / A. A. Bednov, E. V. Savateeva, A. A. Oraevsky // Proc. SPIE. 2003. Vol.4960. P.21-29.

66. Беднов, А. А. Исследование оптических свойств соединительных тканей методами когерентной оптики и оптоакустики : Дис. канд. физ.-мат. наук : 03.00.02 / Беднов А.А. // Саратов, 2006 145 с. РГБ ОД, 61:06-1/900
67. Briers, J. D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow / J. D. Briers. // *Optica Applicata*, Vol. XXXVII, No. 1–2, 2007, pp.139-152.
68. Jakeman, E. Modeling Fluctuations in Scattered Waves / E. Jakeman, K. D. Ridley // Taylor and Francis, 2010, N.Y. P.336
69. Чудинова, О. В. Оптическая когерентная томография у пациентов с задними увеитами / О. В. Чудинова, В. М. Хокканен // Сборник научных трудов научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием Уфа, 2012. с. 359
70. Агафонова, В. В. Первый опыт применения метода оптической когерентной томографии для определения анатомо-топографического состояния экстраокулярных мышц / В. В. Агафонова, М. Л. Митронииа, В. А. Гусейнова, А. Б. Захидов, О. Т. Федченко // *Офтальмохирургия*. - 2009. -№3. - С. 45-46.
71. Нее, М. Optical coherence tomography of macular holes / М. Нее, С. А. Puliafito, С. Wong // *Ophthalmology*. 1995; 102: 748 - 756.
72. Владимиров, А. П. Динамическая спекл - интерферометрия микроскопических процессов, протекающих в тонких биологических объектах / Владимиров А. П. // *Известия вузов. Радиофизика*, Том LVII, № 8-9, 2014 г.
73. Vladimirov, A. P. Time-average dynamic speckle interferometry / A. P. Vladimirov // *AIP Conf. Proc.* 1600, 237 (2014)
74. Государственная Система Измерений. Измерения косвенные. Определение результатов измерений и оценка их погрешностей // МИ 2083-90. - 1991.
75. Владимиров, А. П. Трехмерный диффузор и трехмерные спеклы / А. П. Владимиров // *ЖТФ*, 1998, т. 68, №12, с.59-63.
76. Пугачев, В. С. Теория случайных функций / Пугачев В.С. // М: Гос. изд. физ.-мат. лит., 1962. – 884с.

Приложение 1. Акт внедрения результатов работ в ФБУН "ЕНИИВИ"
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ФБУН "ЕНИИВИ" РОСПОТРЕБНАДЗОРА



Алимов А.В.
2015

АКТ
внедрения результатов научно-исследовательских работ
Малыгина Александра Сергеевича

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя – Ученого секретаря, к.м.н. Гоголевой О.Ю. и членов комиссии: заведующего лаборатории клеточных культур, к.б.н. Бахарева А.А. и руководителя отдела научно-технического и инновационного развития, к.б.н. Артемкиной И.Ю. удостоверяем, что результаты исследований по динамической спекл-интерферометрии интактных и инфицированных вирусом культивированных клеток, проведенных в рамках договора о совместных исследованиях между ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора и Физико - технологическим институтом ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (в составе исполнителей А.С. Малыгин) от 01 августа 2012 г. внедрены в практические работы ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора.

Материалы были использованы для составления заявки и получения патента на полезную модель № 140765 от 20.05.2014 г. «Устройство для оценки активности вируса в клеточной системе». Владельцем патента является ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора.

Полученные данные использовались также для составления программы дальнейших исследований, включающих модернизацию экспериментальной установки, направленных на получение сведений, необходимых для создания динамической модели клетки.

Председатель комиссии:
Ученый секретарь, к.м.н.
Члены комиссии:

О.Ю. Гоголева

заведующий
лаборатории клеточных культур, к.б.н.

А.А. Бахарев

руководитель
отдела научно-технического и инновационного развития,
к.б.н.

И.Ю. Артемкина

Подписи подтверждаю,
инспектор по кадрам
ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора

Л.М. Шилиева

Приложение 2. Справка об использовании результатов исследований в НОЦ
«Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ

СПРАВКА
об использовании результатов научных исследований
ведущего электроника кафедры экспериментальной физики
Физико - технологического института ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина» А.С. Малыгина

Материалы исследования А.С. Малыгина по динамической спекл – интерферометрии клеточных культур были использованы для разработки и создания новой экспериментальной установки, позволяющей при больших оптических увеличениях изучать микроскопические процессы в разных частях отдельной клетки.

В настоящее время эта установка используется в Научно-Образовательном Центре «Наноматериалы и нанотехнологии» УрФУ в учебном процессе кафедры Физических методов и приборов контроля качества, а именно для проведения исследовательских работ магистрантки Новоселовой И.А., аспирантов Якина Д.И. и Михайловой Ю.А. под руководством проф. А.П.Владимирова.

Зав. кафедрой ФМПК
Физико - технологического института
ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина»,
директор НОЦ «Наноматериалы и
нанотехнологии» УрФУ,
д.ф.-м.н., профессор



И.А. Вайнштейн

Приложение 3. Акт внедрения в учебный процесс ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» результатов работ

Утверждаю
Проректор по учебной работе,
д.т.н., профессор

С.Т. Князев

2015 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс
ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»
результатов диссертационной работы Малыгина Александра Сергеевича
по теме «Оценка метаболизма интактных и зараженных вирусом клеток
методом динамической спекл-интерферометрии»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председатель комиссии – директор физико-технологического института В.Н.Рычков и члены комиссии – заведующий кафедрой экспериментальной физики В.Ю.Иванов и ученый секретарь кафедры экспериментальной физики И.А.Малкова удостоверяем, что результаты диссертационной работы Малыгина Александра Сергеевича по теме «Оценка метаболизма интактных и зараженных вирусом клеток методом динамической спекл-интерферометрии» внедрены в педагогическую практику на кафедре экспериментальной физики ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина» с 01 сентября 2013 года.

Результаты диссертационной работы используются в преподавании дисциплины «Математическое моделирование биологических процессов и систем» образовательного направления «Биотехнические системы и технологии».

Председатель комиссии:

Директор физико-технологического института,
д.х.н., профессор

В.Н.Рычков

Члены комиссии:

Заведующий кафедрой экспериментальной физики
к.ф. –м.н., доцент

В.Ю. Иванов

Ученый секретарь
кафедры экспериментальной физики

И.А. Малкова