На правах рукописи

Малыгин Александр Сергеевич

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

Специальность 05.11.17 – Приборы, системы
и изделия медицинского назначения

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Томск – 2015

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина».

Научный руководитель	доктор технических наук, профессор **Владимиров Александр Петрович**
Официальные оппоненты:	**Катаев Сергей Григорьевич**, доктор технических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Томский государственный педагогический университет», профессор кафедры общей физики физико-математического факультета
	Павлов Павел Владимирович, кандидат технических наук, федеральное государственное казенное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военный учебно-научный центр Военно-воздушных сил «Военно-воздушная академия имени профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина» (г. Воронеж) Министерства обороны Российской Федерации, старший преподаватель кафедры 91 Электрооборудования (и оптико-электронных систем) 9 факультета авиационного оборудования
Ведущая организация	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

Защита состоится «22» марта 2016 г. в 15ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 212.269.09 при ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: г. Томск, ул. Савиных, 7, ауд. 215.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: http://portal.tpu.ru/council/916/worklist.

Автореферат разослан

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.269.09 Васендина Е. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Современные медицинские технологии базируются на фундаментальных исследованиях в физике, математике, химии и биологии. Хорошими примерами являются достижения в области медицинской томографии. 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.

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.

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. При любом изменении структуры объекта изменяются амплитуды и фазы рассеянных волн и картина спеклов меняется. Таким образом, динамика спеклов отражает динамику структуры объекта контроля.

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. Ранее динамика спеклов уже использовалась для оценки биологической активности семян, кожи человека и других объектов. Одним из наиболее успешных примеров использования биоспеклов является разработка подхода, в котором по контрасту спеклов оценивали скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента. На данный момент метод достаточно проработан теоретически и экспериментально.

Несмотря на указанные выше успехи в области теоретических и экспериментальных исследований динамических спеклов, свойства динамики спеклов, обусловленной микроскопической 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. Внедрение новых экспресс – методов диагностирования зараженных клеточных культур может значительно сократить время исследований, постановки диагноза и улучшить качество лечения.

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 клетках. Также ранее была описана теория динамики спеклов, вызванной случайными изменениями фаз волн в тонких прозрачных объектах. 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 культивированных 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 хорошие 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 Δu 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 $\tau_к \approx$ 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

Δu, 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, культивированных 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 (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 11 международной семинар-ярмарка Российские технологии для индустрии (Санкт-Петербург, 2007), 8 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), 11 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.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, списка используемой литературы. Общий объем диссертации 143 страницы, включая 56 рисунков, 11 таблиц и списка литературы из 76 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулирована цель и задачи работы, представлены основные положения, выносимые на защиту, обоснованы научная новизна и практическая значимость работы.

В **первой главе** диссертации рассмотрены литературные данные по описанию оптических, в том числе когерентно-оптических методов изучения биообъектов.

Анализ работ, посвященных изучению объектов с помощью динамической спекл-интерферометрии, позволил сформулировать основные направления исследований в данной сфере:

1. На данный момент теоретически и экспериментально проработана оптическая методика, позволяющая по контрасту спеклов оценивать скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента, однако работы по изучению биообъектов на клеточном уровне в практике отсутствуют;

2. Информационные возможности динамики спеклов не достаточно полно изучены и представляют интерес с точки зрения направленности на реализацию современных медицинских технологий для профилактики и лечения заболеваний человека. Ранее этот метод был проработан для оценки шероховатости металлических объектов.

После анализа литературы рассмотрены преимущества использования культивируемых клеток в качестве объектов в экспериментах по изучению метаболической активности. Под активностью в диссертации понимается большое количество разнообразных химических реакций, которые формируют метаболические пути – последовательное превращение одних химических соединений в клетке в другие, то есть метаболизм – совокупность всех метаболических путей, протекающих в клетках организма.

Одним из главных преимуществ культивируемых клеток является статистическая достоверность получаемых результатов, так как каждую клетку можно рассматривать как независимый объект эксперимента.

В связи с тем, что тематика работы затрагивает вопросы оптики, кратко приведены оптические свойства клеток и соответственно динамики биоспеклов. Проведенный анализ проблемы позволил сделать вывод о перспективности использования метода динамической спекл-интерферометрии в качестве способа оценки метаболизма клеток, в связи с этим в конце главы определены задачи исследования.

Вторая глава посвящена теории метода и выработки требований к оптической системе с точки зрения теории. Для практической реализации метода и выработки требований к экспериментальной установке приведены основные положения теории динамики спеклов микроскопических процессов, адаптированные к изучению тонких трехмерных проницаемых объектов. Представлена оптическая схема (рис. 1), используемая применительно к данному методу. На рис. 1 источник когерентного излучения с длиной волны λ, расположенный в точке $\vec{s}$, освещает точечные центры рассеяния, расположенные в тонком диффузоре 2 вблизи плоскости ($x0y$):

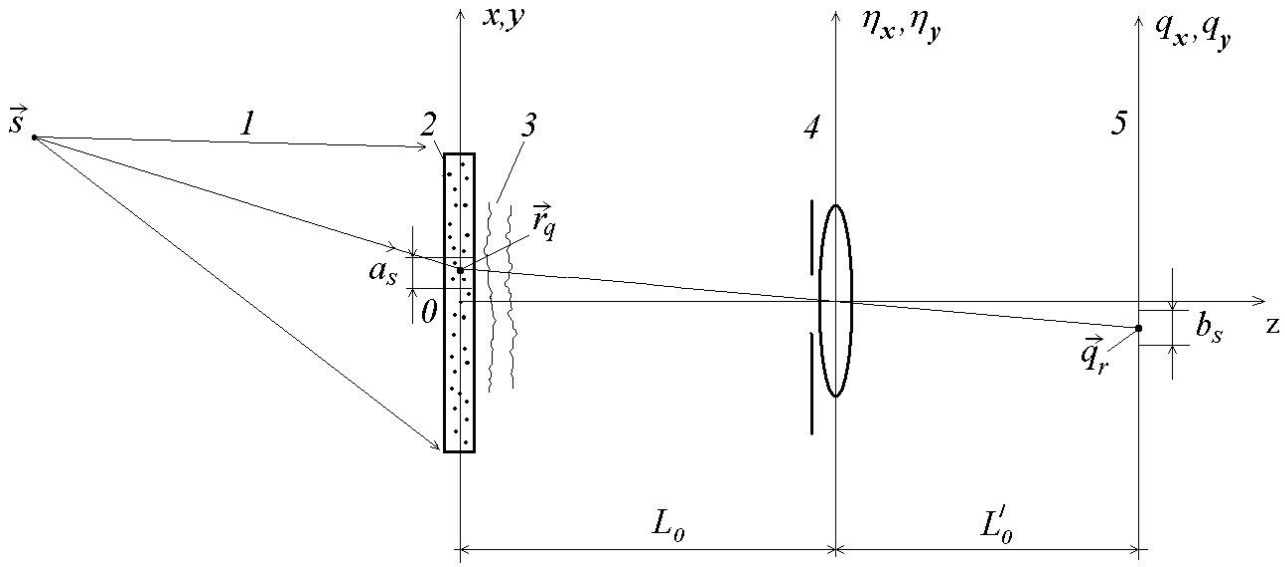

Рисунок 1 – Оптическая схема. 1 – освещающий пучок, 2 – диффузор, 3 – фазовый объект, 4 – тонкая линза с диафрагмой, 5 – плоскость изображения

Для данного варианта оптической системы нормированная временная автокорреляционная функция оптических сигналов $\eta(\tau)$ в некоторой точке плоскости изображения определяется формулой:

$$\eta(\tau) = e^{-k_{11}+k_{11}\rho_{12}(\tau)}, \quad (1)$$

где

k_{11} – дисперсия изменяющихся во времени разностей фаз пар волн в окрестности сопряженной точки объекта;

$\rho_{12}(\tau)$ – нормированная временная функция корреляции разности путей Δu пар волн;

τ – время.

В теории показано, что для стационарного процесса при стремлении промежутка времени между моментами 1 и 2 к бесконечности, то есть при $\tau \to \infty$ $\rho_{12} \to 0$. Тогда в пределе

$$\eta = \eta^* = e^{-k_{11}}. \quad (2)$$

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:

$$\sigma_u = \frac{\lambda}{2\pi}\sqrt{k_{11}}, \quad (3)$$

В экспериментах, проведенных в диссертационной работе, величина η определялась по участкам двух кадров, зафиксированных в два момента 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:

$$\rho = \frac{\frac{1}{m \cdot n}\sum_{i=0}^{m-1}\sum_{j=0}^{n-1}[A_{i,j} - \bar{A}][B_{i,j} - \bar{B}]}{\sqrt{\frac{1}{m \cdot n}\sum_{i=0}^{m-1}\sum_{j=0}^{n-1}[A_{i,j} - \bar{A}]^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{m \cdot n}\sum_{i=0}^{m-1}\sum_{j=0}^{n-1}[B_{i,j} - \bar{B}]^2}}, \quad (4)$$

где

$A_{i,j}$ – сигналы в пикселях на участке размером m×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 направление 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.

В диссертационной работе для интерпретации экспериментальных данных был использован модифицированный вариант теории, учитывающий наличие не стационарных микроскопических процессов, протекающих во времени с разной скоростью. Идея модификации заключалась в выборе такого времени усреднения при регистрации сигналов, чтобы оно превышало время релаксации τ_0 величины Δu наиболее быстро изменяющихся процессов. В этом случае динамика спеклов формируется вследствие протекания более медленных биологических процессов, а интерпретация экспериментальных данных упрощается.

Для модифицированного варианта теории рассмотрены основные закономерности, связывающие параметры, характеризующие случайные изменения разности фаз волн и характеристики динамики спеклов.

Исходя из выводов теоретического анализа, обоснована блок-схема оптической установки и сформулированы требования к оптической установке по ее содержанию, которая включает в себя:

1 – лазер,

2 – диффузор,

3 – тонкий биологический объект,

4 – линза с диафрагмой,

5 – матрица фотоприемника в плоскости изображения.

В **третьей главе** детально описаны объекты исследования и техника экспериментов.

Для реализации цели исследования была создана установка (рис. 2), оптическая система которой соответствует схеме приведенной на рис. 1. Разработка оптико-электронной системы произведена в соответствии с положениями теории динамики спеклов тонких биологических объектов.

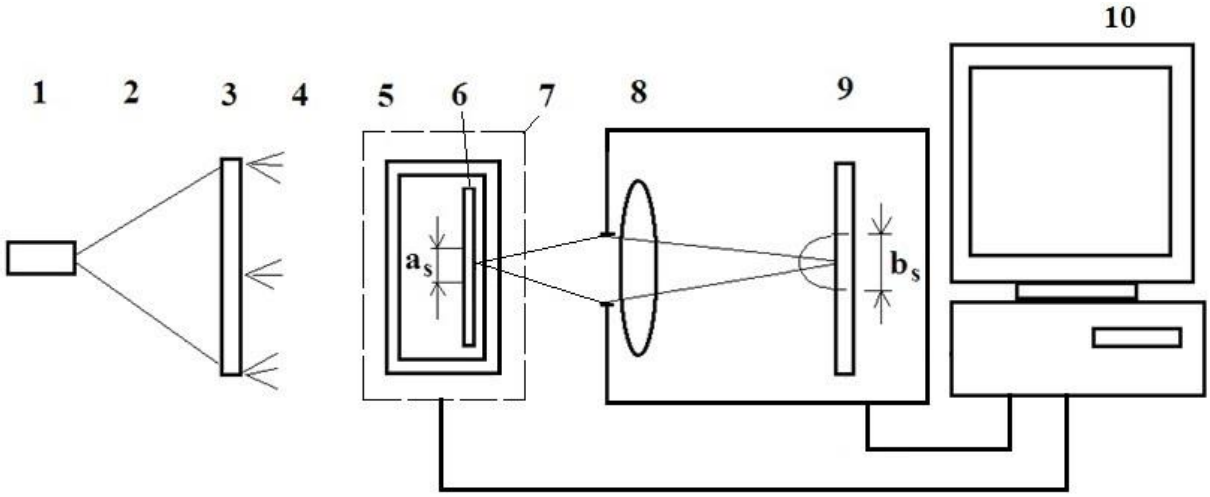

Рисунок 2 – Блок-схема оптической установки. 1 – полупроводниковый лазерный модуль, 2 – освещающий пучок, 3 – матовое стекло, 4 – рассеянное излучение, 5 – стеклянная кювета, 6 – подложка с монослоем клеток, 7 – моторизованный транслятор, 8 – линза с диафрагмой, 9 – матрица фотоприемников телекамеры,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

В качестве источника света 1 был выбран полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны λ = 0,532 мкм. Использованная в опытах монохромная телекамера типа Видеоскан – 415/П/К-USB регистрирует изменения в матрице фотоприемника 9 в видимом диапазоне. Камера содержала матрицу фотоприемников 9 размером 6.5 × 4.8 мм, содержащую 780 × 582 ячеек размером 8.3 × 8.3 мкм. Частота ввода кадров – до 25 Гц. Излучение 2 от лазерного модуля попадало на матовый рассеиватель 3. Вблизи рассеивателя 3 располагали стеклянную кювету 5 размером $9 \times 25 \times 40$ мм, внутри которой фиксировали подложку с монослоем клеток 6 (толщина внутренней полости и соответственно толщина слоя 3 мм), которая была помещена в термостат. 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 располагались на моторизованном трансляторе 7 фирмы Standa типа 8MT177-100 с разрешением 0,125 мкм. Транслятор 7 использовался для калибровки прибора.

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 (вирус простого герпеса);

2) культура клеток Vero и культура клеток Vero, зараженная ВПГ-1;

3) культура клеток ЛЭЧ-3 и культура клеток ЛЭЧ-3, зараженная ВПГ-1.

Все стадии развития данных культур хорошо изучены с помощью классических методов исследований и описаны в научной литературе. Подготовка биологических образцов осуществлялась специалистами ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора по методикам, приведенным в данной главе.

Далее поэтапно описана работа с программным обеспечением, используемым с целью определения параметров динамики спеклов, характеризующих метаболическую активность клеток.

Визуализация отдельных кадров, а также определение степени корреляции ρ выделенного участка на двух кадрах изображения осуществлялась с помощью оригинального программного пакета (ОПП). Данный программный пакет позволял определять значение ρ по формуле (4).

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. 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 понимания достоверности получаемых результатов была разработана методика калибровки оптической установки и рассмотрены погрешности измерения коэффициента корреляции цифровых спекловых изображений ρ и связанную с ним, вариацию разности оптических путей пар волн σ. Расчеты показали, что при выборе участка в 10 × 10 пикселей относительная погрешность определения величины ρ в диапазоне 0.3–1.0 не превышает 4%.

В **четвертой главе** приведены результаты исследования метаболизма клеточных культур Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3 с помощью метода динамической спекл-интерферометрии.

Ряд первых экспериментов был проведен с питательным раствором в кювете с целью изучения закономерностей динамики спеклов, вызванной процессами в питательном растворе. Полученные данные использовались при учете влияния слоя питательной среды в экспериментах по изучению температурной зависимости клеточного метаболизма.

На рис. 3 представлена типичная картина спеклов, наблюдаемая оператором в фиксируемый момент времени на экране компьютера.

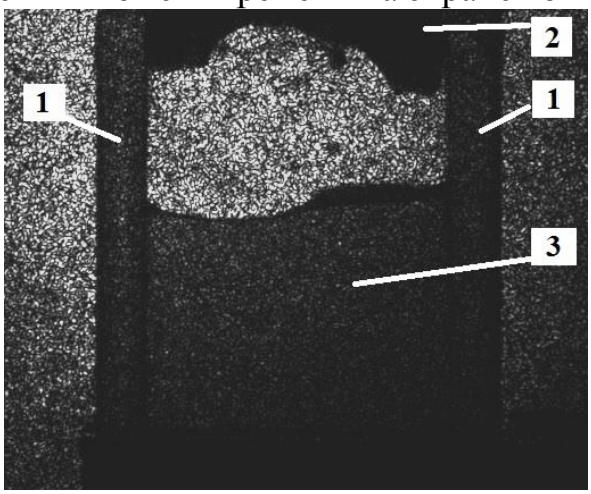

Рисунок 3 – Картина спеклов в плоскости изображения кюветы со средой роста.
1 – бок кюветы, 2 – крышка кюветы с цифровым термодатчиком DS1820,
3 – питательный раствор

Измерение температуры в кювете производилось с использованием термодатчика DS1820 производства Dallas Semiconduktor совместно с микро-контроллером, который имеет преимущества по сравнению с другими способами измерения температуры, например с использованием обычной термопары.

Преимущества использования термодатчика DS1820:

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

2) погрешность измерений в области температур 25–45°С составляет менее ±0,1°С. В диссертационной работе представлена кривая, характеризующая зависимость ошибки термодатчика DS1820 от температуры.

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

Параметры динамики спеклов фиксировались с помощью ОПП, 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.

Сигналы и их спектры для различных температур аналогичны. Картина спеклов, соответствующая процессам в среде роста, достаточно сильно менялась во времени. Следовательно, динамика спеклов, обусловленная микроскопическими процессами в питательной среде, является мешающим фактором при изучении функционирования клеток, помещенных в эту среду. Данное обстоятельство учитывалось при проведении дальнейших экспериментов.

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, помещенный в питательный раствор.

На рис. 4 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.

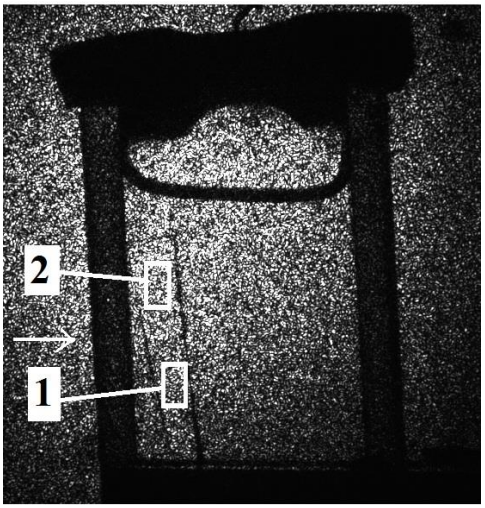

Рисунок 4 – Типичная картина спеклов, с выделенными участками. Стрелкой показан верхний уровень монослоя клеток на пластине

На выделенных участках с помощью ОПП рассчитывали коэффициент корреляции ρ оптических сигналов в разные моменты времени при разных температурах. На рис. 5 представлены результаты обработки экспериментальных данных при температуре 34ºС.

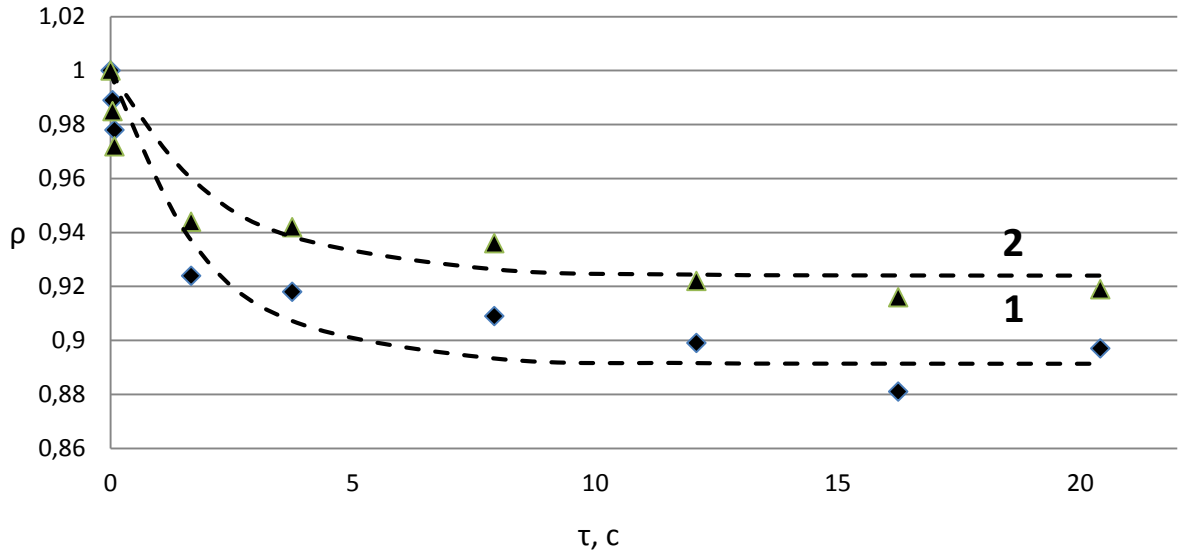

Рисунок 5 – Экспериментальные зависимости ρ(τ) на участках 1 (1) и 2 (2) при температуре 34°С (точки – экспериментальные данные, штриховые кривые – аппроксимация функцией η(τ))

Анализ данных экспериментов с клетками показал, что величина ρ на участках 1 и 2 с течением времени сначала уменьшается, затем постепенно выходит на плато. Подобные изменения ρ находится в согласии с теорией. Нами предполагалось, что случайные изменения оптической разности хода вне и внутри клетки являются статистически независимыми величинами. Тогда можно показать, что дисперсия оптической разности хода пар волн на участке 1 равна сумме дисперсии оптической разности хода волн участка, расположенного вне клетки и дисперсии оптической разности хода в клетках. Оптическая толщина клетки была существенно мала по сравнению с толщиной питательного раствора. В диссертации показано, что вариации оптической разности хода для клеток σ можно найти как квадратный корень из разности дисперсий на участках 1 и 2.

$$\sigma = \sqrt{\sigma_{u1}^2 - \sigma_{u2}^2} \qquad (5).$$

На рис. 6 представлена температурная зависимость вариации оптической разности хода в клетках σ.

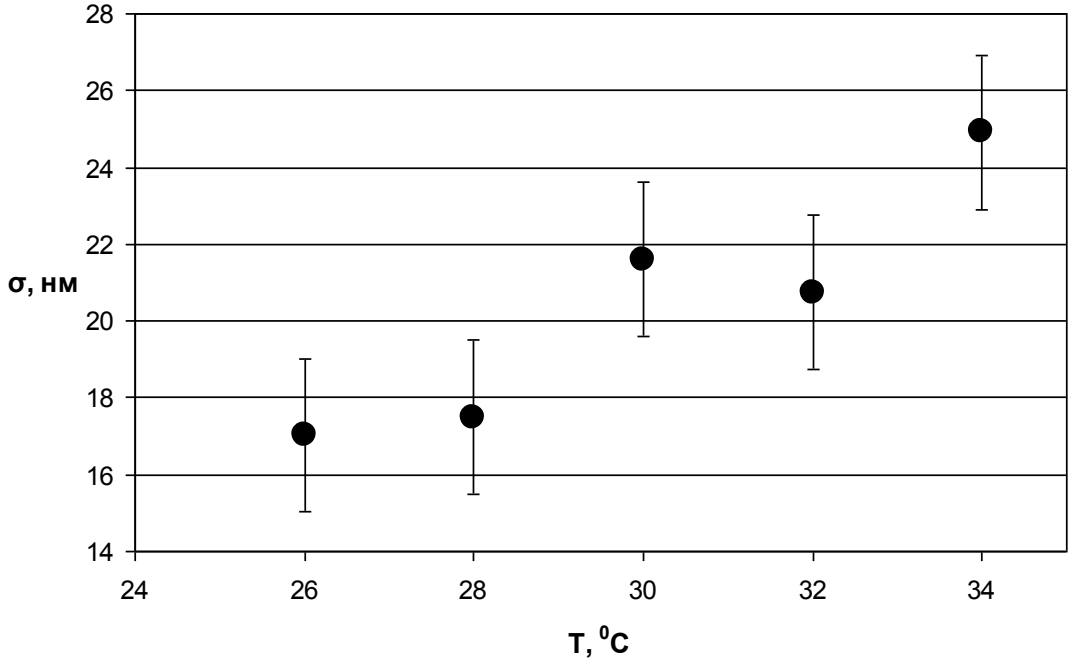

Рисунок 6 – Зависимость вариации оптической разности хода в клетках σ от температуры

Как видно из рис. 6, при увеличении температуры в диапазоне от 26°С до 32°С происходит приблизительно линейное увеличение значения вариации оптической разности хода в клетках от 17 до 25 нм. В научной литературе описано, что метаболическая активность клеток линейно зависит от температуры. Нами 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°С 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 до 0,3 с). Данное обстоятельств 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.

Таким образом, поскольку на рис. 6 имеет место линейное увеличение величины σ от температуры, то эта зависимость отражает рост метаболической активности клеток с повышением температуры. На основе данного факта, нами был сделан вывод о том, что параметр σ можно использовать в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток.

Целью дальнейших 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.

На рис. 7 представлены зависимости вариаций оптической разности хода в интактных клетках σ и в клетках с ВПГ-1 $\sigma_в$ от времени.

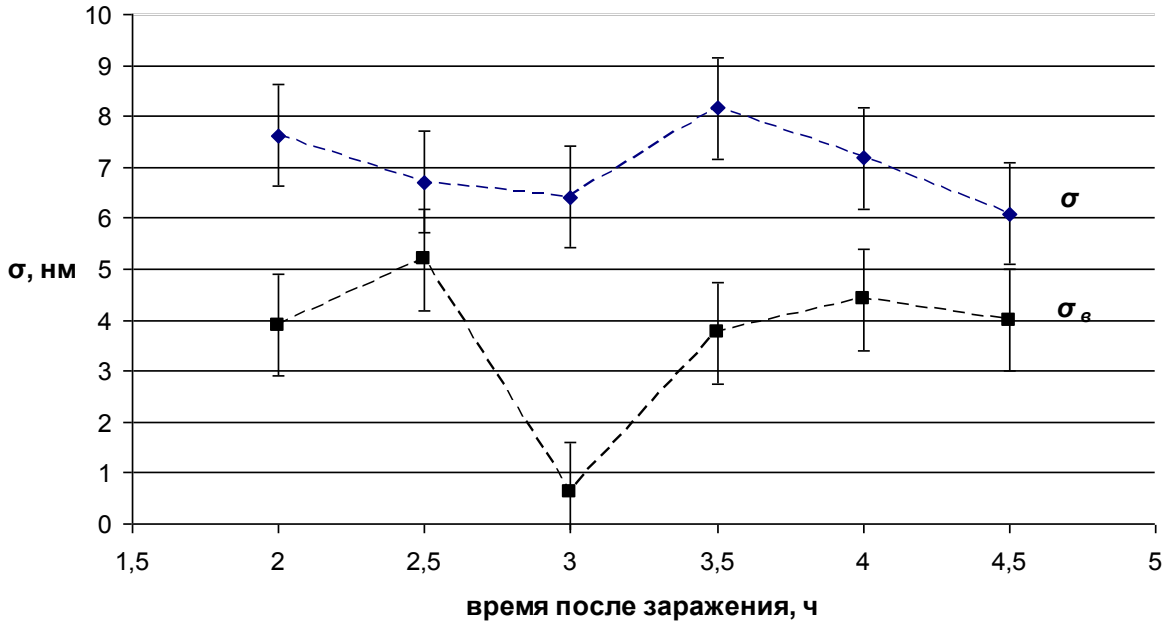

Рисунок 7 – Зависимости вариаций оптической разности хода в интактных клетках $\sigma_и$ в клетках зараженных ВПГ-1 $\sigma_в$ от времени

Из рис. 8 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. 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. 7 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.

Проведенные эксперименты показали, что графики, приведенные на рис. 7 воспроизводятся приблизительно в 50% случаев. Анализ причины такого результата, показал, что причина плохой воспроизводимости результатов связана тем, что одновременно идут конкурирующие между собой разные биологические процессы.

Увеличение воспроизводимости данных включало разработку методики измерений в реальном времени и исключение влияния на динамику спеклов процессов питания клеток и выведения продуктов их жизнедеятельности. Оно достигалось путем увеличения времени усреднения при регистрации сигналов на 3 порядка, а также регистрацию в реальном времени параметров, характеризующих динамику спеклов.

С помощью ОПО рассчитывали коэффициент корреляции спекловых изображений выбранного участка ρ в зависимости от времени τ. 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.

На рис. 8–10 представлены зависимости коэффициента корреляции ρ от времени для культур Vero, Л-41 и ЛЭЧ-3.

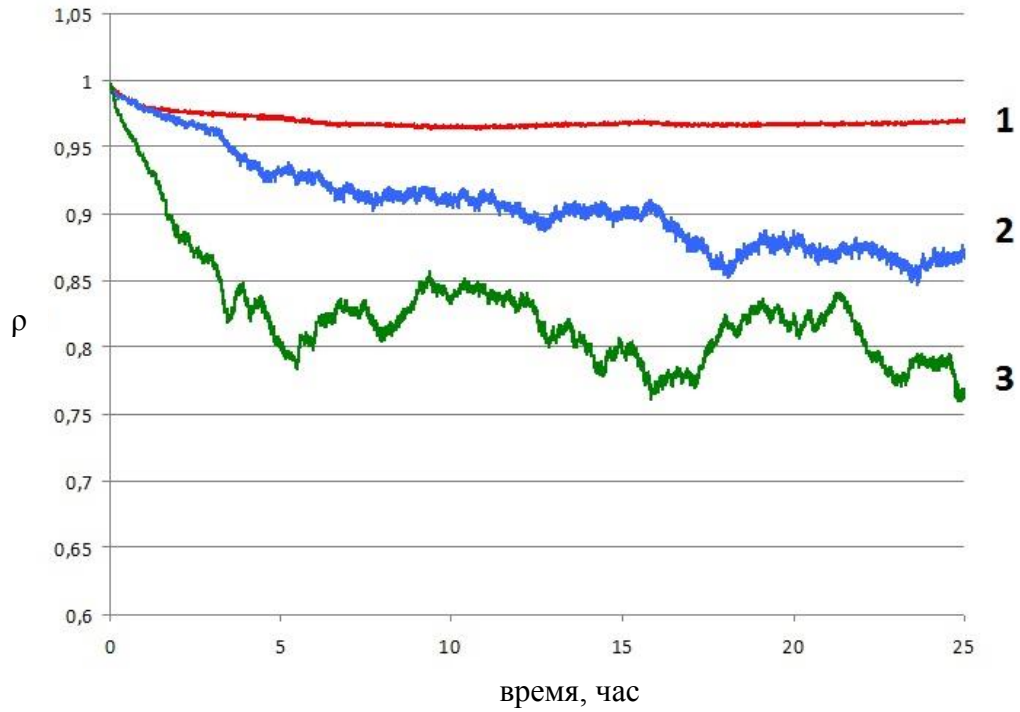

Рисунок 8 – Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры Vero: 1 – питательная среда, 2 – клетки, 3 – клетки, зараженные ВПГ-1

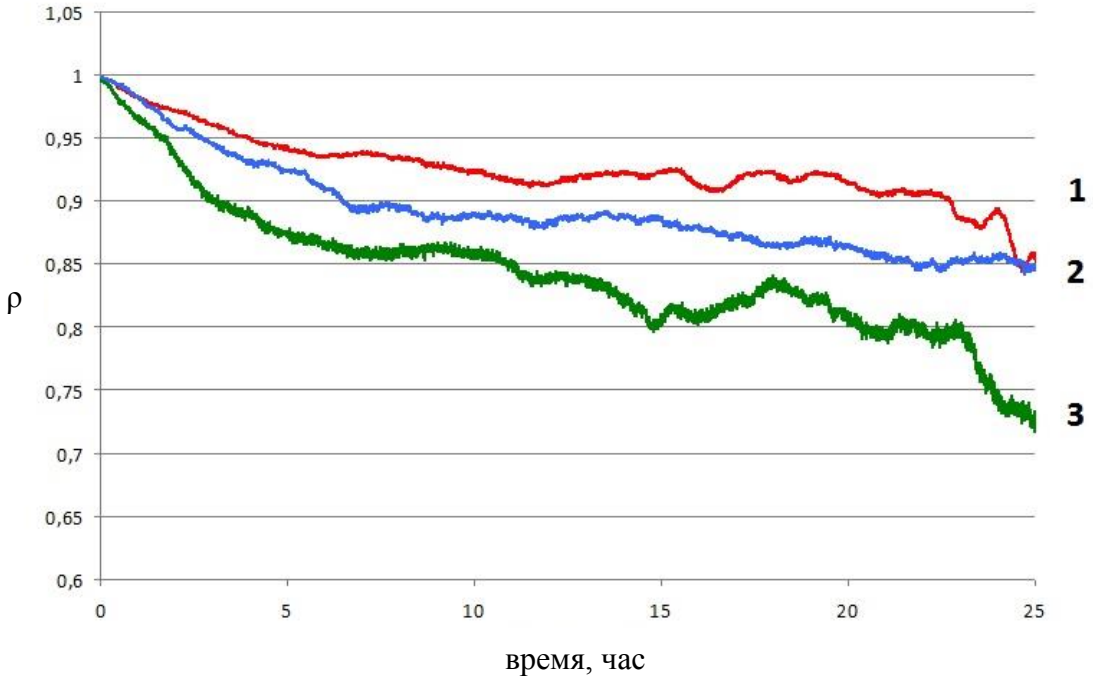

Рисунок 9 – Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры Л-41 КД 84: 1 – питательная среда, 2 – клетки, 3 – клетки, зараженные ВПГ-1

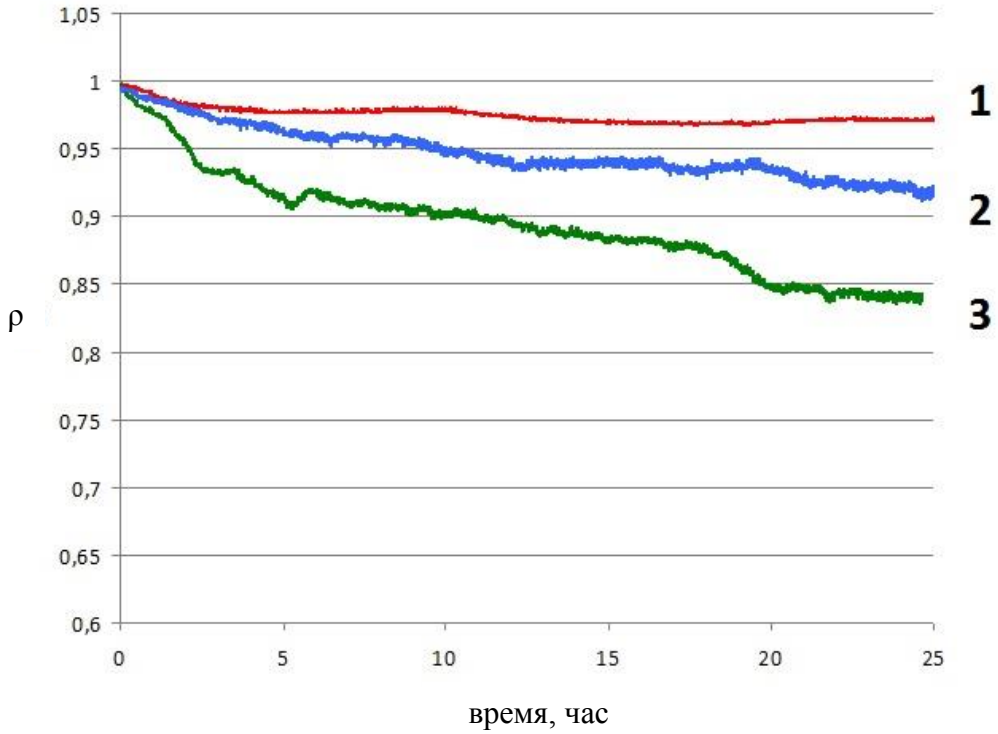

Рисунок 10 – Зависимость коэффициента корреляции от времени для культуры ЛЭЧ: 1 – питательная среда, 2 – клетки, 3 – клетки, зараженный ВПГ-1

Показано, что зависимости $\rho(\tau)$ для трех клеточных культур имеют аналогичный характер, коэффициент корреляции культуры Vero равен 0.890,

культуры Л-41 равен 0.871, культуры ЛЭЧ равен 0.936 для интактных и зараженных клеток соответственно.

Зависимости $\rho(\tau)$ для интактных и зараженных вирусом герпеса различались. 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 $\Delta\rho$:

$$\Delta\rho = (\rho - \rho_в), \tag{6}$$

где

ρ – коэффициент корреляции спекловых изображений интактных клеток,

$\rho_в$ – коэффициент корреляции спекловых изображений зараженных клеток, зафиксированные в некоторый момент времени τ.

Было предположено, что величина $\Delta\rho$ надежно определяется, если она в 2 раза превышает уровень шума. В качестве параметра, характеризующего шум, был выбран разброс значений разности $\Delta\rho$, а именно СКО величины $\Delta\rho$.

Графики зависимостей отношения сигнал / шум ε для клеточных культур Л-41 КД 84, Vero, ЛЭЧ-3 от времени представлены на рис. 11-13, где ε определялось по формуле:

$$\varepsilon = \frac{\overline{\Delta\rho}}{\text{СКО}(\Delta\rho)} \tag{7}$$

где

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

СКО($\Delta\rho$) – среднеквадратичное отклонение величины $\Delta\rho$ в 3-х минутном интервале.

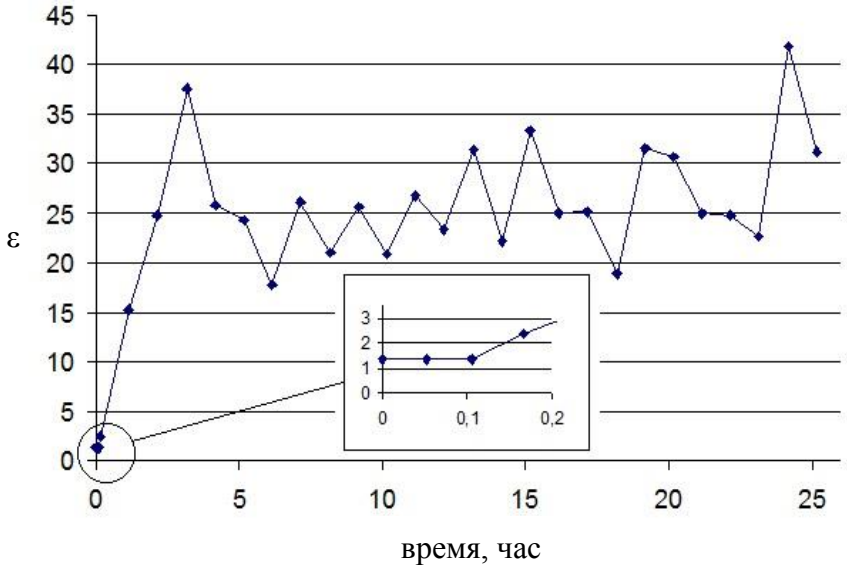

Рисунок 11 – Зависимость ε от времени для культуры Л-41 КД 84

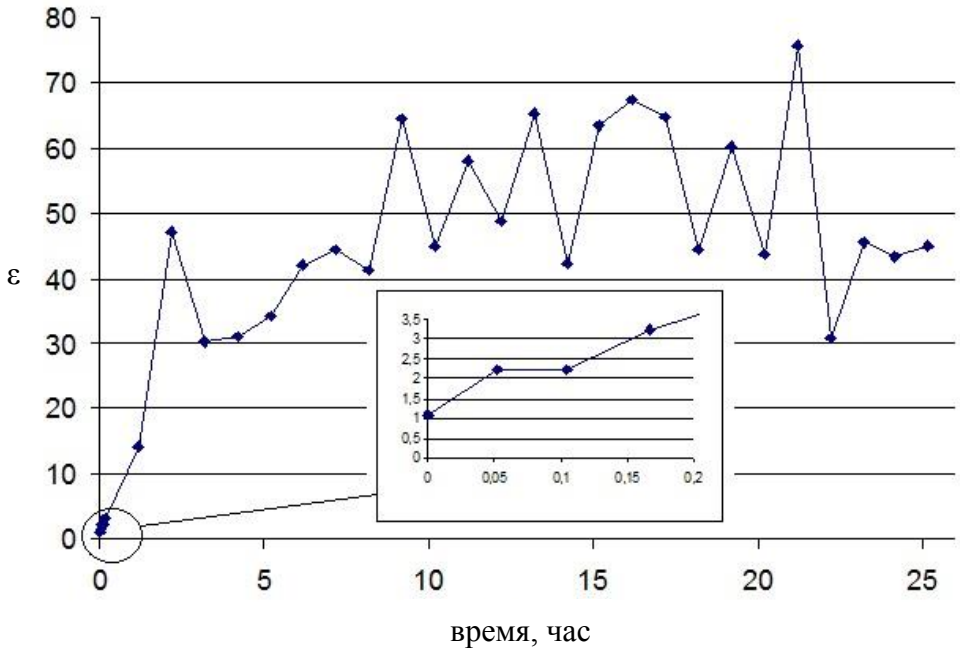

Рисунок 12 – Зависимость ε от времени для культуры Vero

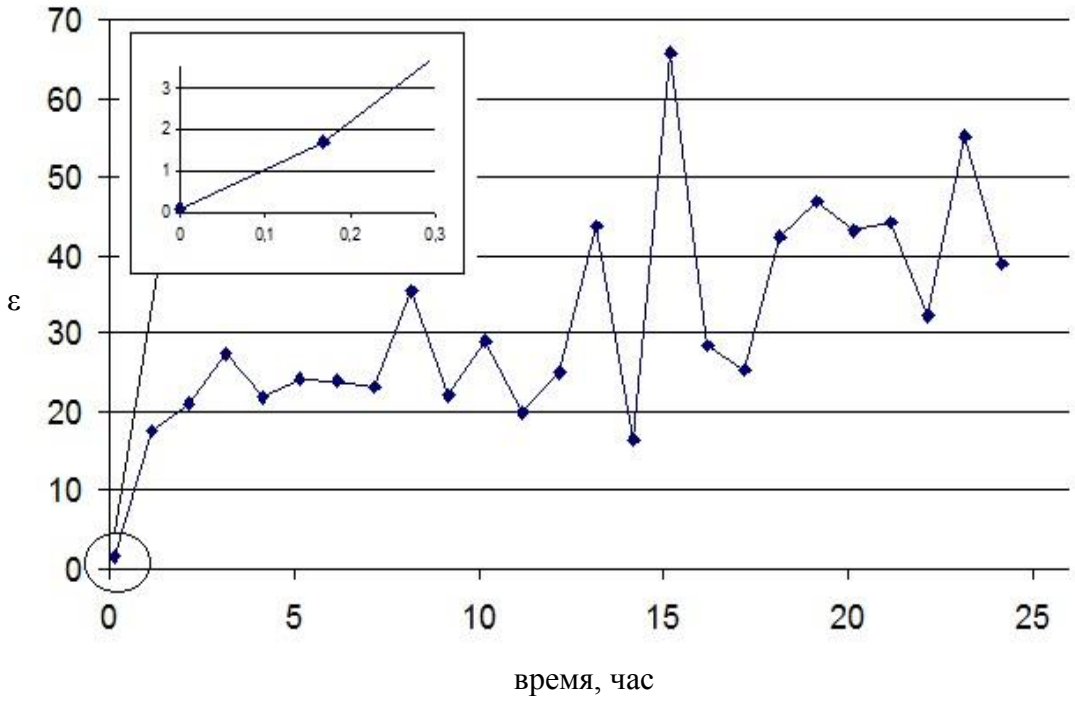

Рисунок 13 – Зависимость ε от времени для культуры ЛЭЧ-3

Из рис. 11–13 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. Данный интервал времени в 24 раза меньше времени обнаружения вируса герпеса традиционными методами.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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 использования 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»

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. 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.

2. 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 // Медицинская техника. – 2014. – № 4. – С. 8–11.

3. 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 // Известия ВУЗов. Радиофизика. – 2014. – Т. 57, № 8–9. – С. 654–659.

Публикации в других научных изданиях

4. Малыгин, А. С. Динамическая спекл-интерферометрия биологических мембран / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, Т. Н. Павлов, Д. О. Попов, С. В. Яковлева // Российские технологии для индустрии : 11 международный семинар-ярмарка, 20–23 ноября 2007, г. Санкт-Петербург : сборник проектов. – СПб., 2007. – С. 83.

5. 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. // 8th International Conference on Vibration Measurements by Laser Techniques: Advances and Applications. Proc. of SPIE. – 2008. – Vol. 7098. – P. 48–53.

6. 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.

7. Malygin, A. S. Dynamic speckle – interferometry of model biological membranes / A. S. Malygin, A. P. Vladimirov [Электронный ресурс] // Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике, Саратовский государственный университет. – Электрон. дан. – Саратов, 2008. – URL: http://optics.sgu.ru/SFM/2008/report/670.

8. Малыгин, А. С. Теория и калибровка динамики спеклов фазового объекта / А. С. Малыгин, А. П. Владимиров, А. В. Дружинин, К. Н. Микитась // Биофотоника, Саратовский государственный университет. – Электрон. дан. – Саратов, 2011. – URL: http://sfm.eventry.org/report/62.

9. 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.

10. 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. – 2011. – Vol. 8337. – P. 83370C-1–83370C-15.

11. 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 // Вестник Нижегородского университета. – 2013. – № 1. – С. 154–155.

12. 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, 22–26 августа 2013 г., г. Нижний Новгород. – Н. Новгород, 2013. – С. 105.

13. 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. Mikhaylova, E. M. Borodin, A. P. Poryvayeva, N. P. Glinskikh // AIP Conf. Proc. – 2014. – Vol. 1600. – P. 357.

14. 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. – Vol. 9529. P. 95291F-1–95291F-10.

15. 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. – Vol. 9529. – P. 95291G-1–95291G-9.

Подписано в печать 23.12.2015 г.
Формат А4/2. Ризография
Печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 07-12/15
Отпечатано в ООО «Позитив-НБ»
634050 г. Томск, пр. Ленина 34а