

Устройство оценки в режиме реального времени метаболической активности клеточных культур с вирусом герпеса

Аннотация

Модернизирована, отлажена и апробирована спекл-интерферометрическая установка, предназначенная для оценки метаболической активности клеток, культивируемых на прозрачной подложке. Объектами исследования являлись клеточные культуры Л-41 КД/84, Vero, ЛЭЧ-3 зараженных вирусом простого герпеса (ВПГ), помещенные в среду роста. Модернизация включала в себя усреднение сигналов во времени и их обработку в режиме реального времени. Показано, что в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, может быть использована величина, определяющая степень корреляции фрагментов спекловых изображений, взятых в два момента времени.

Введение

Актуальным инструментом для изучения микроскопических процессов, происходящих в биологических средах, является метод регистрации динамики лазерных спеклов или биоспеклов [1]. Спеклы (англ. *speckle* – крапинка, пятнышко) – случайная интерференционная картина, которая образуется при взаимной интерференции многих когерентных волн, имеющих случайные сдвиги фаз.

При освещении лазерным излучением живых объектов, вследствие изменения во времени амплитуд и фаз рассеянных волн, картина спеклов меняется. Ранее динамика спеклов уже использовалась для оценки биологической активности семян [2], кожи человека [3] и других объектов. Ссылки на многочисленные исследования в данной области можно также найти в работе [1].

Определение связи между параметрами, характеризующими процессы в объектах, вызывающие случайные изменения амплитуд и фаз волн, и характеристиками динамики спеклов представляет наибольший интерес с научной и практической точки зрения.

В общем случае установление такой связи является сложной задачей. Одним из наиболее успешных примеров решения данной проблемы является разработка подхода, предложенного впервые в работах [4], [5] и доведенного до практического применения в клинических исследованиях. На данный момент метод достаточно проработан теоретически и экспериментально [6]. Он позволяет по контрасту спеклов оценивать скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента.

В работе [7] рассмотрена теория динамики спеклов, возникающих при зондировании когерентными волнами тонкого прозрачного объекта, расположенного вблизи неподвижного рассеивателя.

На основе полученных результатов в работе [8] была предложена спекл-интерферометрическая установка, позволяющая оценивать метаболическую активность клеток, культивируемых на стеклянной подложке. В качестве параметра, характеризующего активность клеток, было выбрано значение вариации оптической разности хода σ_u пар волн, зондирующих объект.

Недостатком установки являлась невозможность проведения измерений в реальном времени, а также трудности, возникающие при интерпретации данных. Последнее обстоятельство связано с наличием процессов в клетке, одновременно протекающих с разной скоростью.

Целью рассматриваемой работы было устранение указанных недостатков методики и ее использование для изучения метаболической активности клеточных культур с вирусом.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований были выбраны культуры перевиваемых клеток Л-41, ЛЭЧ-3, Vero из коллекции клеточных культур ЕНИИВИ (Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций) [9].

Согласно паспорту клеточной линии Л-41 КД /84 [10], известен штамм перевиваемых клеток G-96, полученный из крови больного моноцитарной лейкемией, из которого В.Д. Соловьевым с соавторами в 1966 году путем трехкратного воздействия большими дозами вируса Коксаки В3 была получена сублиния G-41. Клоновая линия Л-41 КД/84 была получена в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ в 1984 году в результате двукратного клонирования линии по методу Пака с последующей обработкой антибиотиками.

Клеточная линия Vero была получена в 1962 году из нормальной почки обезьяны (взрослой африканской зеленой мартышки), в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ была получена из МНИИВП (Московский научно-исследовательский институт вирусных препаратов) в 1969 году.

Культура ЛЭЧ-3 была получена из нормальной ткани легкого эмбриона человека в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ Н.П. Глинских с соавторами в 1980 году из легких 12-недельного эмбриона человека, от здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний.

Эксперименты проводились на установке, представленной на рис. 1.

В качестве источника света 6 был использован полупроводниковый лазерный модуль KLM-H650-40-5 с длиной волны $\lambda = 0,65$ мкм с регулируемой мощностью до 40 мВт. Излучение от модуля попадало на матовый рассеиватель 5. Вбли-

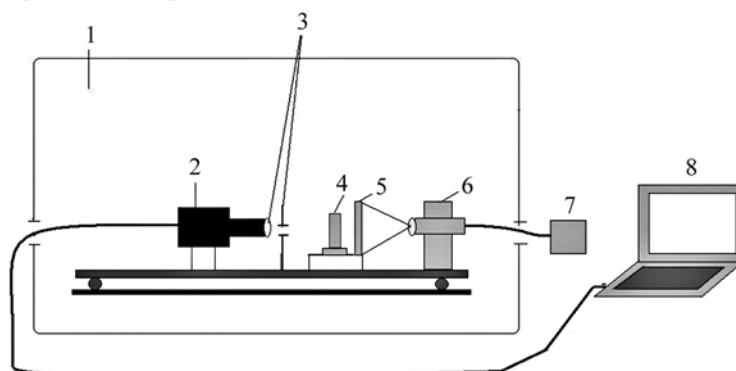


Рис. 1. Схема оптической установки: 1 – термостат; 2 – телекамера; 3 – линза с диафрагмой; 4 – кювета; 5 – матовое стекло; 6 – лазерный модуль; 7 – блок питания (5 В); 8 – ПК

зи рассеивателя располагали стеклянную кювету 4 толщиной 9 мм, внутри которой фиксировали стеклянную подложку толщиной 1,5 мм со слоем клеток, подложку без клеток и стеклянный фиксатор, расположенные рядом. Далее излучение попадало на объектив 3 с диафрагмой, формирующей картину спеклов. В опытах использовалась монохромная телекамера 2 типа «Видеоскан – 415/П/К-USB». Камера имела матрицу фотоприемников размером 6,5 × 4,8 мм, содержащую 780 × 582 ячеек размером 8,3 × 8,3 мкм. Частота ввода кадров – до 25 Гц. Время экспонирования телекамеры составляло 9 с.

Как известно, оптимальная температура роста клеточных культур – (36,6 ± 0,5) °С, снижение температуры приводит к быстрому снижению физиологической активности клеток, поэтому система устройств находилась в термостате 1. Сигналы с телекамеры через USB-порт поступали на ноутбук 8 типа «Aspire 3692 WLMi» фирмы «Acer».

Программное обеспечение в режиме реального времени в течение 1-2 суток регистрировало два параметра динамики спеклов – цифровые значения сигналов I , пропорциональные интенсивности излучения в пикселах, и параметр η , характеризующий изменение в распределении интенсивностей в два момента времени на участке 10 × 10 пикселей. Величина η определялась по формуле

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

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

Согласно [7], зависимость $\eta = \eta(\tau)$ является нормированной временной автокорреляционной функцией, характеризующей процесс случайного изменения величины I в плоскости изображения тонкого прозрачного объекта. Исходя из теории, если средние значения разностей оптических путей пар волн не меняются, то

$$\eta(\tau) = e^{-\frac{1}{2}k_{11} - \frac{1}{2}k_{22} + k_{12}(\tau)}, \quad (2)$$

где k_{11} и k_{22} – дисперсии разностей фаз волн в моменты времени t_1 и $t_1 + \tau$ соответственно; k_{12} – смешанный корреляционный момент разностей фаз волн в моменты времени t_1 и $t_1 + \tau$.

Анализ формулы (2) показывает, что если процесс измене-

ния разностей фаз волн во времени является стационарным, то величины k_{11} и k_{22} равны. Функция $\eta = \eta(\tau)$ выходит на постоянный уровень после времени, превышающего время корреляции разностей фаз. По значению этого уровня можно определить величину k_{11} . Если процесс изменения разности фаз является нестационарным, но время усреднения превышает указанное время корреляции, то по мере увеличения k_{22} величина η уменьшается. Отметим, что для фиксированных значений t_1 и t_2 величина η является коэффициентом корреляции интенсивностей в моменты времени t_1 и t_2 , а формула (1) соответствует усреднению по ансамблю объектов (реализаций). В качестве реализаций нами взяты различные области подложки с клетками, размер которых равен разрешению линзы.

Результаты и их обсуждение

Зависимости параметров η и I от времени представлены на рис. 2, 3.

На рис. 2 представлены типичные зависимости оцифрованных значений сигналов во времени для картины спеклов, соответствующей процессам в питательной среде и клеткам *Vero* в питательной среде.

На рис. 3 представлены типичные зависимости параметра η от времени для клеточной культуры *Vero*.

Видно, что величина η имеет тенденцию к постепенному уменьшению для клеток без вируса и клеток с вирусом. Следует отметить, что для клеточных культур ЛЭЧ-3 и Л-41 наблюдались подобные зависимости. Коэффициент множественной детерминированности при сравнении клеток с вирусом и без ВПГ был равен 0,934 – для ЛЭЧ; 0,89 – для *Vero*; 0,87 – для Л-41. В отсутствие вируса для трех типов клеток коэффициент множественной детерминированности был равен 0,939. Близость коэффициента к единице свидетельствует о том, что типы процессов в клетках, изменяющих пути рассеянных волн, подобны.

В настоящей работе время экспонирования T телекамеры было выбрано равным 9 с, что превышало время корреляции интенсивности излучения (5...8 с), найденное ранее в работе [8]. Данное время экспонирования на 3 порядка превышало значение T , использованное ранее. При малых по сравнению с единицей значениях k_{11} и k_{22} время корреляции интенсивности равно времени корреляции разности фаз волн [7]. Согласно формуле (2), уменьшение величины η соответствует увеличению дисперсии разности фаз k_{22} . Пока неясно, чем вызвано это увеличение. Возможно, по мере уменьшения количества питательных веществ в растворе изменение рельефа поверхности клеток, а также структура самих клеток становятся более неоднородными. Для внесения ясности в данный вопрос нужны дальнейшие исследования.

Как было отмечено выше, в работе [8] в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, была выбрана величина $\sqrt{k_{22}}$, соответствующая клеткам. Поскольку по условиям эксперимента имеется однозначное соот-

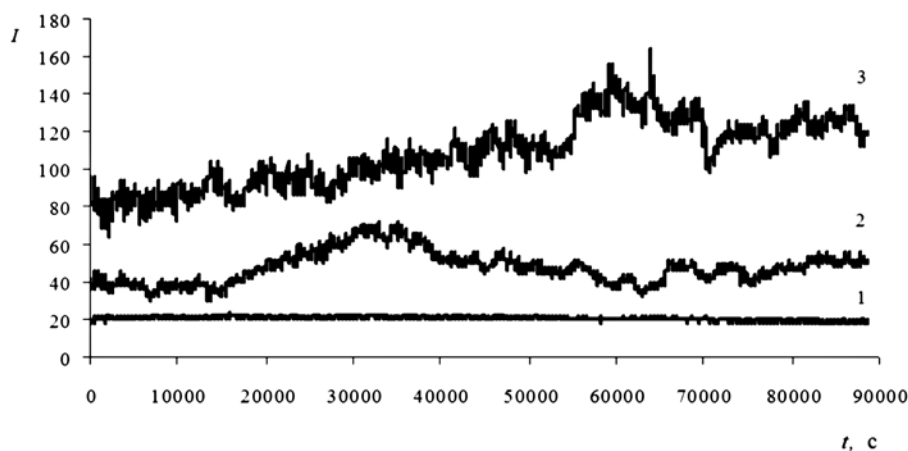


Рис. 2. Зависимость величины I от времени: 1 – для питательной среды; 2 – для клеток *Vero* в питательной среде; 3 – для клеток *Vero* с ВПГ

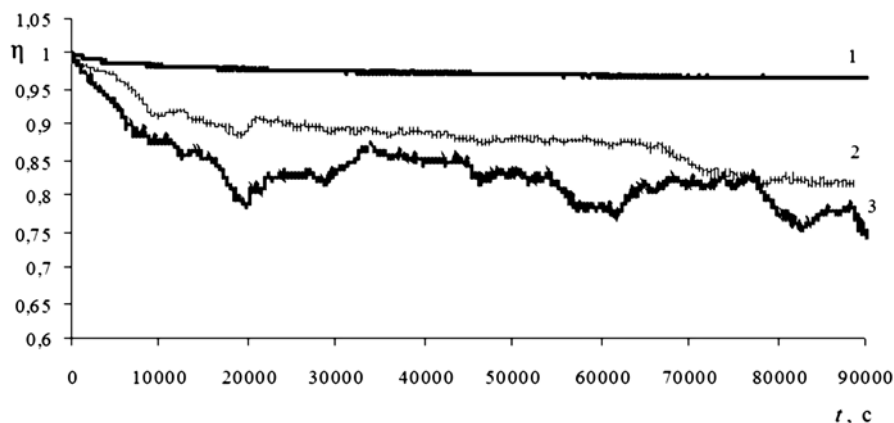


Рис. 3. Зависимость параметра η от времени: 1 – питательная среда; 2 – клетки Vero; 3 – клетки Vero с ВПГ

ветствие между величинами η и k_{22} , в подобных случаях для оценки метаболической активности можно использовать значение величины η .

В целом полученные результаты соответствуют общеизвестным характеристикам взаимодействия вирусов и клетки. Продуктивная вирусная инфекция приводит на первых этапах к угнетению синтеза крупных молекул, которое (для ВПГ) достигает максимума к 5 ч после заражения, максимум синтеза вирусной ДНК достигается через 8 ч, активный выход вирусных частиц наблюдается через 18...20 ч. Имеющиеся на приведенных графиках экстремумы соответствуют указанным периодам [11].

Графики зависимости I от времени содержат как низкочастотные, так и высокочастотные составляющие оптического сигнала. Последние можно рассматривать как шум.

Как показал анализ экспериментальных данных, на фоне шумов различие величины η для клеток без вируса и клеток, зараженных ВПГ, можно обнаружить через 10 мин после начала эксперимента, в то время как минимальное время обнаружения вируса традиционными методами составляет около 3 ч.

Заключение

На основе проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Модернизирована, отлажена и апробирована спекл-интерферометрическая установка, предназначенная для оценки метаболической активности клеток, культивируемых на прозрачной подложке. Модернизация включала в себя увеличение времени экспонирования на 3 порядка и обработку оптических сигналов в режиме реального времени.

2. Для разных клеточных культур, зараженных ВПГ, и intactных клеток зависимости η от времени имеют одинаковую тенденцию: величина η , отражающая степень изменения картин спеклов от времени, нелинейно уменьшается по мере увеличения времени проведения эксперимента. Коэффициент множественной детерминированности, найденный по зависимостям $\eta = \eta(\tau)$ для клеток без вируса, составляет 0,94. Коэффициент множественной детерминированности, найденный по зависимостям $\eta = \eta(\tau)$ для клеток с вирусом и без вируса, равен 0,934 – для ЛЭЧ; 0,89 – для Vero; 0,87 – для Л-41.

3. В качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, можно использовать параметр, определяющий степень корреляции изображений на участке размером в 10×10 пикселей, взятых в начальный момент и через время τ .

4. Зависимости η от времени для клеточных культур с вирусом и в отсутствие вируса существенно различаются. Различие величины η для клеток без вируса и клеток, зараженных ВПГ, можно обнаружить через 10 мин после начала эксперимента.

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования метода динамической спекл-интерферометрии для исследования в области биологии клетки.

Список литературы:

1. Dynamic Laser Speckle and Applications / Edited by H.J. Rabal and R.A. Braga. CRC Press, 2008.
2. Cardoso R.R., Costa A.G., Nobre C.M.B., Braga Jr. R.A. Frequency signature of water activity by biospeckle laser // Optics Communications. 2011. Vol. 284. PP. 2131-2136.
3. Владимиров А.П., Лусин А.Л., Микушин В.И. и др. Применение техники счета числа мерцаний спеклов для изучения биологической активности кожи // Письма в ЖТФ. 2000. Т. 26. С. 20-24.
4. Fercher A.F., Briers J.D. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography // Optics Communications. 1981. Vol. 37 (5). PP. 326-330.
5. Briers J.D., Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): A non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // Journal of Biomedical Optics. 1996. Vol. 1 (2). PP. 174-179.
6. Briers J.D. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow // Optica Applicata. 2007. Vol. XXXVII. № 1-2. PP. 139-152.
7. Vladimirov A.P., Druzhinin A.V., Malygin A.S., Mikitas K.N. Theory and calibration of speckle dynamics of phase object // Proc. SPIE. 2012. 8337, 83370C-1 – 83370C-15.
8. Малегин А.С., Бебенникова Н.В., Владимиров А.П., Микитас К.Н., Бахарев А.А. Спекл-интерферометрическая установка для изучения биологической активности клеток // ПТЭ. 2012. № 3. С. 124-127.
9. Каталог Российской коллекции клеточных культур. – С.-П., Омск: ОмГПУ, 1999.
10. Глинских Н.П., Авдеева В.Н., Зусман Ф.Я и др. / Патент № 2148644 РФ.
11. Бочаров А.Ф., Кицак В.Я., Бочаров Е.Ф., Трухачев А.А. Вирус простого герпеса. – Новосибирск: Наука, 1992.

Александр Петрович Владимиров,
д-р техн. наук, профессор,
Александр Сергеевич Малегин,
аспирант, инженер-электроник,
Юлия Александровна Михайлова,
магистрант,
Физико-технологический институт
Уральского федерального университета,
Алексей Анатольевич Бахарев,
канд. биол. наук, руководитель лаборатории,
Антонина Павловна Порываева,
канд. биол. наук, руководитель лаборатории,
ФБУН «Екатеринбургский НИИ
вирусных инфекций» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург,
e-mail: var52@bk.ru