

43. Гиперспектральная голография гистологических срезов

С. Г. Каленков¹, Г. С. Каленков², Г. А. Меерович³

¹ НТЦ «Оптоэлектроника» Московского политехнического университета, Москва, Россия

² ООО «Микрохоло», Москва, Россия

³ Институт общей физики имени А. М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

Рассмотрен спектральный анализ биологических образцов при иммуногистохимическом, гистологическом, цитологическом, патоморфологическом исследованиями тканей и клеток методом гиперспектральной голографической микроскопии.

Ключевые слова: Оптика, Гиперспектральная голография, Спектральный анализ гистологических срезов.

Цитирование: Каленков, С. Г. Гиперспектральная голография гистологических срезов / С. Г. Каленков, Г. С. Каленков, Г. А. Меерович // HOLOEXPO 2018 : XV международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2018. — С. 185–186.

Как правило, толщина этих образцов составляет от 10 до 40 мкм, образцы (срезы, мазки, посаженные на стекло клетки) достаточно неоднородны (интересующие объекты — атипичные клетки, как правило, расположены неоднородно в монослое с плотностью упаковки менее 10 %). Атипичные клетки отличаются от нормальных измененной формой, размерами, расположением органелл в клетке, что может влиять на поглощение и, особенно, рассеяние, но это локальное влияние значительно ниже других флуктуационных факторов. Поэтому такие объекты обнаруживают либо опытные специалисты экспертным путем, либо с использованием окрашивающих, либо флуоресцирующих маркеров, обладающих тропностью к атипичным клеткам. Однако использование маркеров требует специальной технологической подготовки. Как правило, использование одного маркера препятствует применению другого маркера, поэтому использование для многофакторных исследований набора из нескольких узкоспецифичных маркеров может быть технологически

проблемным. Кроме того, спектры поглощения различных маркеров видимого диапазона могут перекрываться, а учитывая неоднородность изучаемого поля одновременно и по спектру, и по интенсивности, а также ограниченное спектральное разрешение оптических элементов микроскопов (поглощающих или дихроичных интерференционных фильтров), проведение таких исследований на высоком уровне является в настоящее время проблемой.

Подобные же проблемы встают и при использовании нового метода современной клеточной биологии — использовании клеточных моделей, трансфицированных цветными белками. Трансфицированные клетки должны иметь такие же клеточные свойства и иммунофенотип, как и нетрансфицированная клеточная линия, которую они моделируют, и отличаются присутствием в клетке цветного белка, имеющего характеристические полосы поглощения и флуоресценции. Считается, что по интенсивности флуоресценции можно оценить количество атипичных клеток в данной

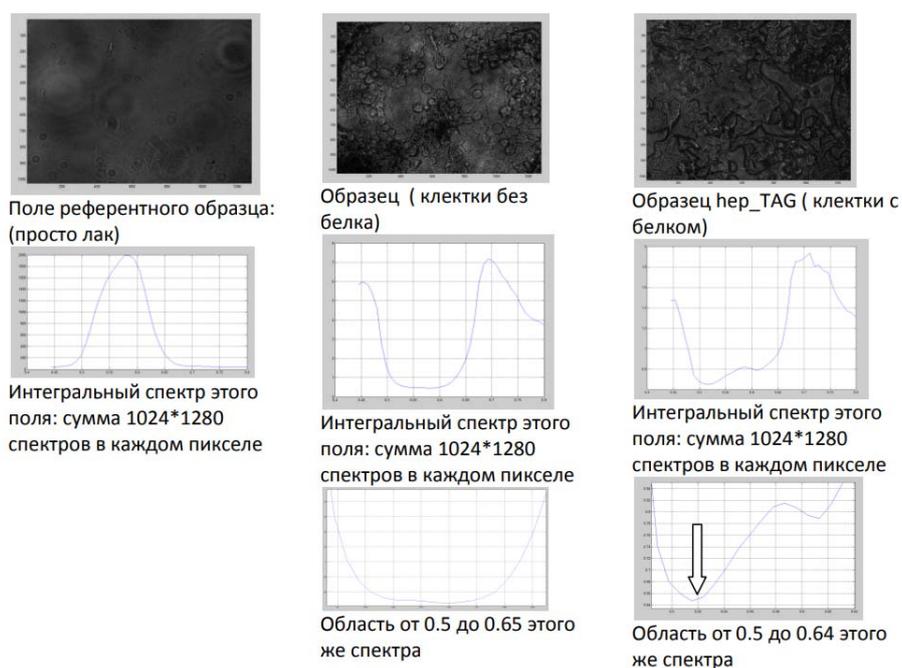


Рис. 1. Образец

зоне образца, а применительно к биологическим тканям тканям-развитие патологического (например, опухолевого процесса) [1]. Однако полосы поглощения и флуоресценции стабильны только для «зрелых» белков в ограниченном диапазоне концентраций и незафиксированных клетках. Поскольку реальные образцы могут не удовлетворять всем этим требованиям, очень важно иметь возможность контролировать не только флуоресценцию, но и поглощения образца с трансфицированными клетками на микроуровне. Понятно, что для изучения таких микрообразцов стандартные спектрофотометрические методы неприемлемы, и предложенный нами метод гиперспектральной голографической микроскопии [2, 3] мог бы быть очень полезным для таких исследований. Для исследования возможности такого применения предлагаемого метода изучались клетки эпидермоидной карциномы гортани человека Her2 в виде монослоя на покровном стекле и клетки соответствующей ей флуоресцирующей линии HerTagRFP, трансфицированной красным флуоресцентным белком TagRFP. В контрольном канале устройства было установлено покровное стекло, в рабочем канале поочередно устанавливались покровные стекла с нетрансфицированными клетками Her2, трансфицированными клетками HerTagRFP и покровное стекло, на которое была нанесена капля белка TagRFP, разбавленного до концентрации 5 мг/мл. Наблюдение в «неспектральном» режиме (режиме

стандартного микроскопа) не обнаруживает разницы между клетками трансфицированной и нетрансфицированных линий. Однако в режиме гиперспектрального анализа спектры поглощения в спектральном диапазоне 600–650 нм отличаются. Приведем в качестве примера один образец, представленный на рис. 1.

Разделив спектр пропускания клеток нетрансфицированной линии на спектр пропускания клеток трансфицированной линии, получаем выраженный пик поглощения со спектральным максимумом около 525 нм и полушириной около 25 нм. Аналогичную форму спектра можно получить, установив в рабочем канале покровное стекло с каплей белка TagRFP. Это позволяет сделать вывод о том, что в гиперспектральном режиме мы в спектрах поглощения клеток трансфицированной линии HerTagRFP наблюдаем узкую полосу поглощения белка TagRFP.

Заключение

Проведена серия экспериментов по регистрации пространственно-спектральных характеристик клеток трансфицированных красным флуоресцентным белком TagRFP. Разработан, собран и протестирован макет гиперспектрального голографического микроскопа, предназначенного для исследования таких объектов. Исследована пространственно-спектральная разрешающая способность метода.

Список источников

- [1] Savitsky, A. P. Three-dimensional in vivo imaging of tumors expressing red fluorescent proteins / V. V. Zherdeva, L. R. Arslanbaeva, O. S. Burova, D. V. Sokolova, E. M. Treshchalina, A. Y. Baryshnikov, I. I. Fiks, A. G. Orlova, M. S. Kleshnin, I. V. Turchin, A. M. Sergeev // *Methods Mol. Biol.*, Chapter 7. — 2012. — P. 97–114.
- [2] Каленков, Г. С. Гиперспектральная голографическая Фурье-микроскопия / С. Г. Каленков, А. Е. Штанько // *Квантовая электроника*. — 2015. — Том 45. — № 4. — С. 333–338.
- [3] Kalenkov, S. G. Spectrally-spatial Fourier-holography / G. S. Kalenkov, A. E. Shtanko // *Optics Express*. — 2017. — Vol. 21. — № 21. — P. 24985–24990.

Hyperspectral holography of histological sections

S. G. Kalenkov, G. S. Kalenkov, G. A. Meerovich

¹ Moscow Polytechnic University, Moscow, Russia

² Microholo Ltd., Moscow, Russia

³ Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences

The absorption properties of biological samples associated with immunohistochemical, histological, cytological, pathomorphological studies of tissues and cells by hyperspectral holographic microscopy are investigated.

Keywords: Optics, Hyperspectral holography, Spectral analysis of histological sections.