

## 29. Комплементарное использование голографической микроскопии сверхвысокого разрешения для исследования клеточных культур *in vitro*

В. В. Дуденкова<sup>1</sup>, Ю. Н. Захаров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Center for Advanced Biomedical Imaging and Photonics, BIDMC, Harvard University, Boston, USA

В работе предложена оптическая схема, использующая методы внеосевой цифровой голографии и локализационной флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Такое сочетание позволяет проводить исследования динамических изменений живых биологических объектов. В результате применения голографического метода записи и последующего восстановления фазовой и амплитудной информации об объекте, появилась возможность проводить визуализацию динамических изменений в живых биологических образцах.

*Ключевые слова:* Оптика, Голография, Микроскопия сверхвысокого разрешения.

*Цитирование:* Дуденкова, В. В. Комплементарное использование голографической микроскопии сверхвысокого разрешения для исследования клеточных культур *in vitro* / В. В. Дуденкова, Ю. Н. Захаров // HOLOEXPO 2018 : XV международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2018. — С. 133–134.

Применение голографического подхода позволяет получать сверхвысокую чувствительность к продольным изменениям оптической длины пути, однако поперечное разрешение ограничено дифракционным пределом. Для преодоления этого ограничения можно комбинировать голографический метод с одним из подходов для улучшения поперечного разрешения — микроскопией сверхвысокого разрешения. В зависимости от типа флуоресцентного объекта можно подобрать оптимальный метод анализа данных для корректного восстановления последовательности флуоресцентных изображений.

Реализация совмещения в одной оптической схеме преимуществ цифровой внеосевой голографической микроскопии с применением интерферометрического сравнения восстановленных изображений [1] и метода микроскопии сверхвысокого разрешения VaLM [2] была проведена на базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). Это дополняет широкие возможности лабораторного микроскопа дополнительным способом сбора данных и значительным увеличением разрешения. Было использовано приложение цифровой внеосевой голографии к флуоресцентному микроскопу, так как для метода VaLM необходим именно флуоресцирующий образец. И такое совмещение требует незначительных конструктивных изменений для реализации возможности получения изображений со сверхвысоким разрешением и параллельного использования стандартных функций микроскопа. Для избежания перекрытия дифракционных порядков на этапе восстановления использована внеосевая голографическая схема Лейта — Упатниекса. Конструктивно элементы схемы подобраны для легкого перехода от одного метода к другому.

Источником излучения может быть использован лазер с любой другой длиной волны в зависимости от поставленных задач. В данной реализации оптической схемы использовался гелий-неоновый лазер с длиной

волны 633 нм, который может быть заменен. С помощью светоделительной призмы получаем два когерентных световых пучка. Предметный пучок, проходит через оптический тракт микроскопа и освещает объект исследования. Опорный пучок заводится на регистрирующую среду при помощи оптического клина. Опорный пучок расширяется с помощью коллиматора с диафрагмой, а предметный расширяется после прохождения микрообъектива. Необходимо также уравнивать интенсивности интерферирующих пучков. Предметный пучок претерпевает ослабление при прохождении через исследуемый препарат, поэтому необходимо поставить ослабляющий фильтр на опорный пучок. При конфигурировании схемы также соблюдалось равенство оптических путей предметного и опорного пучков. В качестве фоторегистратора для голограмм использовалась цифровая КМОП-камера VEC-545, имеющая матрицу формата 1/2,5" с числом пикселей 2592 × 1944, размером 2,2 мкм.

При записи серии флуоресцентных изображений для метода VaLM микроскопии, используется та же схема. Для возбуждения флуоресценции в исследуемом образце можно использовать когерентный источник излучения, поэтому для возбуждения флуорофоров с полосой поглощения вблизи 633 нм используется тот же гелий-неоновый лазер. Опорный пучок перекрывается. Пучок, освещающий образец, теперь возбуждает флуоресценцию в препарате. В такой конфигурации следует учесть, что вместе с интересующим нас эмиссионным излучением на регистрирующую цифровую матрицу также будет приходиться и большее по интенсивности возбуждающее излучение. Для того, чтобы отсечь слишком интенсивное на этом этапе излучение накачки, необходимо после образца, но перед матрицей поставить интерференционный фильтр на его длину волны. В противном случае на фоне излучения, используемого для возбуждения, невозможно будет детектировать более слабое по интенсивности длинноволновое мерцание флуорофоров.

В результате применения голографического метода записи и последующего восстановления фазовой и амплитудной информации объекта, появляется возможность проведения визуализации динамических изменений в живых биологических образцах. Для обработки VaLM данных может быть использован как метод SOFI, так и SHRIMP алгоритм. Выбор алгоритма зависит от типа флуорофоров (эндогенный или экзогенный), необходимой скорости восстановления, периода изменения объекта и типа самих получаемых данных.

При совмещении методов VaLM-микроскопии и голографической микроскопии выполнено мультимодальное исследование живых клеточных культур. Проведен анализ морфологической и функциональной динамики биообъектов на основе полученных данных. Анализ динамики структуры и функционального состояния биообъектов на основе данных, полученных при совместном использовании методов VaLM-микроскопии и голографической микроскопии, был проведен на культурах клеток линии кератиноцитов Het-1A в ходе их обычного развития при культивировании в питательной среде и при воздействии фармакологического ингибитора пролиферации клеток. Известно, что аппликация в среду выбранного фармакологического агента вызывает угнетение пролиферации клеток линии кератиноцитов Het-1A в течение 16–24 часов.

Фазовые портреты клеток культуры при фармакологическом воздействии и при нормальном развитии в начале наблюдения, через полчаса после введения в среду ингибитора пролиферации клеток в I-ом случае,

через 8 часов и через 16 часов, выявляют, что фармакологическое воздействие вызывает снижение плотности внутриклеточных компонент, что показывает уменьшение ОРХ. Через 8 часов остается лишь небольшое плотное образование, а через 16 часов по всему объему клетки плотность существенно снижается по сравнению с контрольной серией, в которой в процессе развития происходят структурные изменения, отражающиеся в перераспределении плотности, но в среднем она остается на прежнем уровне.

Вероятно, что динамика оптической плотности вызвана изменением структуры внутриклеточных оргanelл, в частности, микротрубочек, которые хорошо видны на флуоресцентных изображениях со сверхвысоким разрешением, полученных при параллельном применении методики VaLM.

Для получения флуоресцентных изображений использовали иммуоцитохимический метод маркирования белка микротрубочек. Четкая структура микротрубочек клетки в питательной среде сохраняется на протяжении всего эксперимента, тогда как с течением времени структура микротрубочек клетки, подвергшейся воздействию ингибитора пролиферации, нарушается.

Результаты показывают, что при мультимодальном (голографическом, совмещенном с VaLM-методикой сверхвысокого разрешения) исследовании живых систем можно получить уникальные прижизненные данные о динамике морфофункционального состояния живых культур и тканей с субклеточным разрешением.

#### Список источников

- [1] **Рыбников, А. И.** Применение цифровых внеосевых голограмм для исследования изменений состояния живых нейронных культур / А. И. Рыбников, В. В. Дуденкова, М. С. Муравьева, Ю. Н. Захаров // Оптический журнал. — 2013. — Том 80. — № 7. — С. 66–73.
- [2] **Burnette, D. T.** Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules / D. T. Burnette, P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, B. Kachar // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2011. — Vol 108. — № 52. — P. 21081–21086.

## Complementary use of holographic and Super-resolution microscopy for the study of cell cultures in vitro

V. V. Dudenkova<sup>1</sup>, Y. N. Zakharov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup> Center for Advanced Biomedical Imaging and Photonics, BIDMC, Harvard University, Boston, USA

An optical scheme is proposed that uses methods of off-axis digital holography and high-resolution localization fluorescence microscopy. Such a combination allows for the study of dynamic changes in living biological objects. As a result of the application of the holographic recording method and the subsequent restoration of phase and amplitude information about the object, it became possible to visualize the dynamic changes in living biological samples.

*Keywords:* Optics, Holography, Super-resolution microscopy.