

Анализ реакции клеток *in vitro* на фотодинамическое воздействие с использованием методов цифровой голографической микроскопии и томографии

И. В. Семенова, А. В. Белашов, А. А. Жихорева, О. С. Васютинский

Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

В докладе представлен новый подход к анализу реакции клеток на фотодинамическое воздействие на основе голографических методов. Он позволяет проводить неинвазивный мониторинг клеточных культур в течение длительного времени и предоставляет количественные данные об основных морфологических параметрах клеток и динамике их изменения. Полученные данные позволяют идентифицировать преобладающие механизмы гибели клеток при разных дозах воздействия. Эксперименты проводились как на постоянных клеточных линиях, так и на линиях, полученных из опухолевого материала пациентов с разными злокачественными новообразованиями. Разработанный подход может быть использован в дальнейшем для оценки эффективности разных видов терапии онкологических заболеваний, в том числе для персонализированной терапии.

Ключевые слова: Голографическая микроскопия, томография, фотодинамическое воздействие, клеточная морфология.

Цитирование: Семенова, И. В. Анализ реакции клеток *in vitro* на фотодинамическое воздействие с использованием методов цифровой голографической микроскопии и томографии / И. В. Семенова, А. В. Белашов, А. А. Жихорева, О. С. Васютинский // НОЛОЕХРО 2022: XIX Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — Барнаул: ИП Колмогоров И. А., 2022. — С. 404–409.

Введение

Фотодинамическая терапия все чаще применяется в качестве как самостоятельного, так и вспомогательного метода лечения различных злокачественных новообразований. Противоопухолевый эффект фотодинамической терапии обеспечивается тремя взаимосвязанными процессами: непосредственной гибелью опухолевых клеток, повреждением сосудов, питающих опухолевую ткань, и активацией иммунного ответа. Хотя общий вклад этих процессов в исход лечения хорошо известен, фотодинамическое воздействие на клеточном уровне еще недостаточно изучено.

При исследовании эффективности терапевтического воздействия на клеточном уровне важно не только выяснить, приводит ли это воздействие к гибели клеток или нет, но и идентифицировать механизмы гибели клеток при разных дозах воздействия и, таким образом, определить дозы, необходимые для запуска того или иного механизма. Наиболее часто используемый метод определения механизмов гибели клеток основан на применении различных флуоресцентных красителей с наблюдением их флуоресценции в конфокальном микроскопе. Также используется анализ морфологических изменений в клетках с помощью проточной цитофлуориметрии, оптической или электронной микроскопии. В работах [1-5]

мы показали преимущества методов цифровой голографической микроскопии для оценки морфологических изменений клеток при терапевтическом воздействии. Существенными преимуществами голографических методов в биологических исследованиях являются (1) практически полная неинвазивность, т.к. для регистрации голограмм используется излучение малой плотности мощности порядка мкВт/см²; (2) возможность получения количественной информации о широком наборе морфологических и оптических параметров клеток, (3) возможность наблюдения изменений этих параметров в динамике в течение длительного времени и (4) возможность автоматического определения данных о больших ансамблях клеток в образце. В частности, методами цифровой голографической микроскопии и томографии можно определять форму клеток, их толщину, объем, сухую массу, площадь проекции, площадь поверхности мембраны, трехмерное распределение показателя преломления и его градиента. Важным преимуществом этих методов является также работа с образцами без использования дополнительных химических реагентов. Мониторинг одних и тех же клеток, обеспечиваемый точным сканированием образцов, позволяет анализировать динамику изменений как в отдельных клетках, так и во всей популяции, что позволяет проводить статистический анализ полученных данных.

В докладе представлен обзор наших недавних исследований реакции *in vitro* клеток трех постоянных клеточных линий разной онкогенности (раковых клеток HeLa и A549 и псевдонормальных клеток 3T3), а также клеток, полученных из опухолевого материала пациентов с солидными опухолями разной локализации, на фотодинамическое воздействие (ФДВ) с использованием фотосенсибилизатора (ФС) Радахлорин, используемого в клинической практике. Работы выполнялись в сотрудничестве и на образцах клеточных культур, предоставленных коллегами из Института Цитологии РАН и Института Онкологии им. Н.Н. Петрова. Исследования проводились методами цифровой голографической микроскопии (ДНМ) с помощью лабораторной установки и цифровой голографической томографии (ДНТ) с использованием микроскопа 3D Cell Explorer (Nanolive).

1. Методика исследования

В чашки Петри с образцами культур клеток добавляли раствор ФС Радахлорин в культуральной среде в концентрации 5 мкг/мл. Клетки инкубировали в этом растворе в течение 4 часов, затем среду заменяли на чистую, без ФС. Нами было показано [5], что Радахлорин проникает в клетки и накапливается преимущественно в лизосомах. Образцы культур фотосенсибилизированных клеток облучали диодным лазером с длиной волны 660 нм, близкой к максимуму полосы поглощения ФС. Плотность лазерного луча варьировалась в пределах 6-130 мВт/см². Регистрация голограмм с помощью ДНМ проводилась HeNe лазером с плотностью мощности излучения около 50 мкВт/см². Для регистрации с помощью ДНТ использовался лазер на длине волны 532 нм.

Для получения большой выборки данных, необходимой для корректного статистического анализа, проводились сканирование и регистрация более 200

интерференционных картин по всей площади образца. Фазовые изображения восстанавливались с помощью стандартного алгоритма с использованием метода наименьших квадратов. Для обеспечения возможности анализа большого количества клеток в образцах нами были разработаны и апробированы алгоритмы автоматической сегментации клеток на фазовых изображениях и машинного обучения для распознавания клеток в разных состояниях [3,4].

Хотя голографические методы позволяют определять достаточно большой набор параметров клеток [6], в большинстве случаев анализ реакции клеток на ФДВ проводился нами на основе исследования изменений среднего фазового набега или сухой массы клеток. Эти параметры оказались наиболее информативными.

2. Полученные результаты

В таблице 1 приведены данные по морфологическим параметрам клеток трех постоянных клеточных линий (HeLa, A549 и 3T3), полученные с помощью ДНТ.

Таблица 1. Объем (V), площадь проекции (S_{proj}) и сухая масса (DM) клеток трех линий

Клеточная линия	V (μm^3)	S_{proj} (μm^2)	DM (pg)
HeLa	3470±1480	530±190	230±80
A549	4780±1310	650±210	330±130
3T3	7160±2300	840±320	390±140

На рис. 1 приведены графики, представляющие динамики изменения среднего фазового набега в клетках трех исследуемых линий после облучения с разными дозами (разной плотностью мощности в течение одинакового времени). Как видно из полученных зависимостей, при малых дозах облучения фазовый набег клеток не изменяется, клетки выживают. При увеличении дозы наблюдается постепенный рост среднего фазового набега с выходом на плато, при этом отсутствуют статистически значимые изменения сухой массы клеток; происходят изменения, характерные для гибели клеток путем апоптоза - округление и дегидратация клеток при сохранении целостности их мембран. При высоких дозах облучения возникают изменения, характерные для гибели путем некроза – клеточная мембрана разрушается, внутриклеточная среда вытекает в межклеточное пространство, что сопровождается уменьшением как среднего фазового набега, так и сухой массы. При этом скорость протекания некроза зависит от дозы облучения – чем выше доза, тем быстрее происходит некроз. Сделанные предположения по преобладающим механизмам гибели клеток были подтверждены стандартными биологическими тестами с соответствующими флуоресцентными красителями [1].

Анализ полученных зависимостей показал, что для клеток всех трех исследуемых линий последовательность смены механизмов гибели клеток с увеличением дозы облучения - апоптоз, вторичный некроз, некроз - остается постоянной. Однако для клеток разных линий эти механизмы реализуются при существенно разных дозах. Как видно из рис. 1, клетки

линии HeLa оказываются значительно более чувствительными к фотодинамическому воздействию, чем клетки A549 и 3T3.

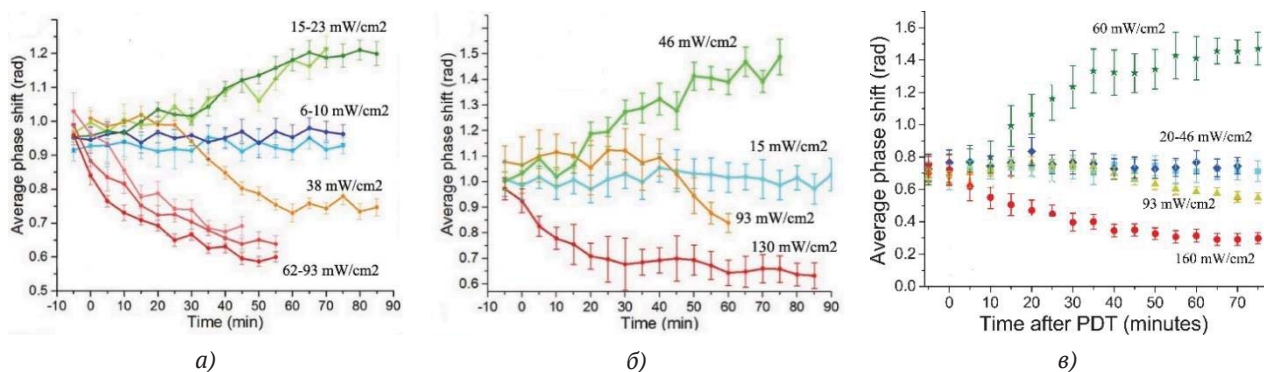


Рис. 1. Динамики изменения среднего фазового набега в культурах клеток HeLa (а), A549 (б) и 3Т3 (в) после ФДВ с разными дозами облучения

Анализ реакции на ФДВ культур клеточных линий, полученных из опухолевого материала пациентов, проводился на образцах меланомы, сарком мягких тканей, остеосарком и клеток рака почки. Использовалась высокая доза облучения, предполагающая гибель клеток по механизму некроза. Было показано, что клетки разных солидных опухолей демонстрируют существенно разную реакцию на ФДВ при одних и тех же дозах облучения. В частности, клетки меланомы показали гораздо более высокую устойчивость к ФДВ по сравнению с клетками сарком и, в особенности, клетками рака почки. В частности, из трех культур клеток меланомы только одна оказалась чувствительной к воздействию, а две другие оставались резистивными даже при высокой дозе облучения. Среди шести образцов сарком резистивной оказалась одна, а все три образца рака почки продемонстрировали хорошую чувствительность к ФДВ. При этом необходимо отметить, что клетки одной и той же локализации опухоли, но взятые у разных пациентов, также по-разному реагировали на воздействие с одинаковыми дозами.

На рис. 2 приведены полученные динамики изменения среднего фазового набега в клетках пациентов: рака почки (а), сарком (б) и меланом (в). Видны существенные различия как в исходных параметрах клеток разных пациентов с одинаковой локализацией и типом опухоли, так и в динамике изменения фазового набега в ходе гибели клеток.

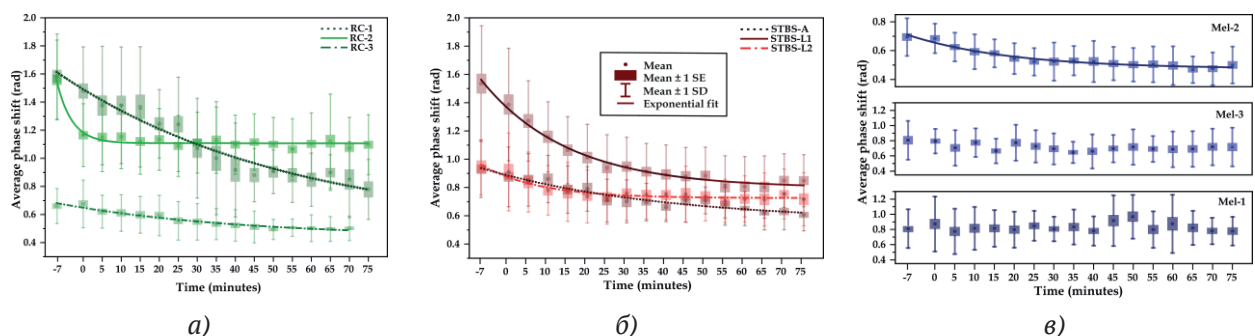


Рис. 2. Динамики изменения среднего фазового набега после ФДВ в культурах клеток опухолей пациентов: а) рака почки, б) сарком, в) меланом

Заключение

Таким образом, мы показали, что динамика изменения среднего фазового набега и сухой массы клеток может быть использована для определения механизма гибели клеток *in vitro* при внешнем воздействии и для оценки скорости их гибели. Голографические методы позволяют проводить мониторинг изменений клеточных параметров в течение длительного времени практически неинвазивно. Автоматическое сканирование образцов и использование при обработке данных разработанных алгоритмов автоматической сегментации и машинного обучения обеспечивает возможность анализа изменений как каждой отдельной клетки, так и всего ансамбля клеток в образце.

Исследование культур клеток пациентов перспективно для оценки резистивности пациента к фотодинамической терапии с конкретным фотосенсибилизатором и для разработки персонализированных протоколов лечения. Разработанная методика может быть использована для исследования реакции клеток на различные методы терапии.

Благодарность

Работа частично выполнялась в рамках гранта РФФИ № 21-72-10044.

Список источников

- [1] **Belashov, A.V.** Quantitative assessment of changes in cellular morphology at photodynamic treatment *in vitro* by means of digital holographic microscopy / A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, N.N. Nikolsky, I.V. Semenova, E.S. Kornilova, O.S. Vasyutinskii // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – 10. – 10. - 4975-4986.
- [2] **Zhikhoreva, A.A.** Significant difference in response of malignant tumor cells of individual patients to photodynamic treatment as revealed by digital holographic microscopy / A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, A.B. Danilova, N.A. Avdonkina, I.A. Baldueva, M.L. Gelfond, T.L. Nekhaeva, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2021. – 221. - 112235.
- [3] **Belashov, A.V.** In-vitro monitoring of photoinduced necrosis in HeLa cells using digital holographic microscopy and machine learning / A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, A.V. Salova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii // *JOSA A*. – 2020. – 37. – 2. - 346-352.
- [4] **Belashov, A.V.** Machine Learning Assisted Classification of Cell Lines and Cell States on Quantitative Phase Images / A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, A.V. Salova, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii // *Cells*. – 2021 – 10. – 2587.
- [5] **Zhikhoreva, A.A.** Comparative analysis of Radachlorin accumulation, localization, and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescence microscopy / A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, T.N. Belyaeva, A.V. Salova, I.K. Litvinov, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022 – accepted.
- [6] **Girshovitz, P.** Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization / P. Girshovitz, N.T. Shaked // *Biomedical Optics Express*. – 2012 – 3. – 8. – 1757.

Analysis of *in-vitro* cell response to photodynamic treatment using digital holographic microscopy and tomography

I. V. Semenova, A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva, O. S. Vasyutinskii

Ioffe Institute, St.Petersburg, Russia

We present a novel approach to the analysis of cell response to photodynamic treatment based on holographic techniques. The approach allows for long-term noninvasive monitoring of cell cultures and provides quantitative data on the main morphological parameters of cells and on their changes in dynamics. The data obtained make it possible to identify the predominant mechanisms of cell death at different treatment doses. The experiments were carried out both on established cell lines and on lines obtained from tumor material of patients with different malignant neoplasms. The developed approach can be further used to evaluate the efficacy of different modalities of anticancer therapy, including personalized therapy.

Keywords: Holographic microscopy, Tomography, Photodynamic treatment, Cellular morphology.