

# Использование низкокогерентной и когерентной голографической микроскопии для мониторинга клеточных структур в ходе внешнего воздействия

А. А. Жихорева<sup>1</sup>, А. В. Белашов<sup>1</sup>, П. С. Буторин<sup>1</sup>, Т. Н. Беляева<sup>2</sup>, А. В. Салова<sup>2</sup>,  
Е. С. Корнилова<sup>2</sup>, И. В. Семенова<sup>1</sup>, О. С. Васютинский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

В работе представлены результаты сравнительного анализа точности определения оптических и морфологических параметров клеток разными методами фазовой визуализации при использовании когерентного и низкокогерентного излучения. Основными методами исследования клеточных структур в работе являлись низкокогерентная голографическая микроскопия с использованием фазового модулятора света, фазовая визуализация, основанная на решении уравнение переноса интенсивности, и внеосевая когерентная цифровая голографическая микроскопия. В качестве референтного метода использовалась когерентная голографическая томография с высоким пространственным разрешением, достигнутым за счет эффекта синтетической апертуры. Перечисленные методы использовались для исследования изменений клеточных параметров в ходе внешнего воздействия, запускающего разные типы клеточной гибели. Было показано, что лучшее пространственное разрешение достигается при использовании низкокогерентного излучения, а наибольшая точность определения оптической толщины клеток с помощью когерентной голографической микроскопии.

**Ключевые слова:** количественный фазовый имиджинг, цифровая голографическая микроскопия, фазовое изображение, низкокогерентная голография, внеосевая цифровая голография.

*Цитирование:* Жихорева, А. А. Использование низкокогерентной и когерентной голографической микроскопии для мониторинга клеточных структур в ходе внешнего воздействия / А. А. Жихорева, А. В. Белашов, П. С. Буторин, Т. Н. Беляева, А. В. Салова, Е. С. Корнилова, И. В. Семенова, О. С. Васютинский // HOLOEXPO 2023: 20-я Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2023. — С. 390–394.

## Введение

Методы фазовой визуализации широко применяются для изучения различных клеточных структур и внутриклеточных процессов. Значительный интерес к этим методам обусловлен низкой инвазивностью данных методов и возможностью получить большое количество информации о морфологических и оптических параметрах клетки и динамике их изменения во времени. Анализ оптических и морфологических параметров в совокупности с методами автоматической классификации успешно был применен для автоматического определения типа гибели живых клеток в ходе фотодинамического воздействия при использовании когерентных методов фазовой визуализации [1]. К методам фазовой визуализации относятся цифровая когерентная голографическая микроскопия, численная фазовая визуализация,

голографическая томография и низкокогерентная голографическая микроскопия. Таким образом, развитие методов фазовой визуализации с возможностью определения как оптических, так и морфологических параметров клеток и применение методов машинного обучения для анализа клеточных параметров представляют большой интерес, что может повысить уровень лабораторной диагностики.

Данная работа, посвящена сравнительному анализу точности определения оптических и морфологических параметров клеток разными методами фазовой визуализации, которым в последнее время посвящено множество публикаций, как при использовании когерентного, так и низкокогерентного излучения. Реализованные методы фазовой визуализации были использованы для мониторинга клеток и определение их параметров в ходе внешнего воздействия.

### **Методы исследования**

В работе проведен анализ трех методов фазовой визуализации клеточных структур как при использовании когерентных, так и низкокогерентных источников излучения. Одним из применяемых методом фазовой визуализации являлась цифровая когерентная голографическая микроскопия (DHM). Голографический микроскоп представлял собой интерферометр Маха — Цендера в предметном пучке, которого установлен микрообъектов с коллимирующей линзой для исследования микроскопических объектов. В качестве источника излучения использовался гелий-неоновый лазер на длине волны 633 нм и малой плотностью излучения 50 мкВт/см<sup>2</sup>, что, как было показано ранее[1], позволяет проводить длительный мониторинг клеток без влияния на внутриклеточные процессы. Восстановление регистрируемой интерференционной картины проводилось численными методами, основанными на Фурье анализе. По восстановленному и развернутому фазовому изображению клеток была проведена сегментация клеток (выделение областей расположения клеток) и определение их оптических и морфологических параметров, таких как средняя оптическая толщина (фазовый сдвиг) клеток, сухая масса клеток, площадь проекции и др. [2].

В работе как же использовалась низкокогерентная голографическая микроскопия, реализованная на базе оптического микроскопа Nikon Eclipse Ti2. Метод SLIM основан на модернизации принципа фазово-контрастной микроскопии, в ходе которого наблюдается интерференционная картина между светом, рассеянным объектом, и исходным световым конусом, прошедшим через исследуемый объект без искажений. Пространственный модулятор света (LCOS-SLM), введенный в оптический путь микроскопа, позволил произвольным образом изменять фазу волны в нерассеянной части света. Регистрация серии осевых интерференционных картин в низкокогерентном свете с заданным сдвигом фазы и численный анализ набора распределений интенсивности (осевых интерференционных картин) методом фазовых шагов (phase shifting) позволили получить пространственное распределение фазового запаздывания, индуцированного клетками в проходящей волне [3].

Вместе с тем, фазовое изображение может быть получено из дефокусированных распределений интенсивности прошедшего света с помощью уравнения переноса интенсивности (transport-of-intensity equation). Данный метод TIE был реализован с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного высокоточной подвижной по оси z (Prior H117E1) с разрешением 0,01 нм. Данный метод основан на регистрации серии интенсивности света прошедшего через клеточные структуры при заданном изменении положения фокуса z. Метод восстановления изменения фазы волны, прошедшей через образец, основан на уравнении переноса интенсивности излучения (transport-of-intensity equation (TIE))[4] с помощью разных численных методов, например с помощью метода Фурье преобразования, предложенного в работе [5] (FFT-based solver).

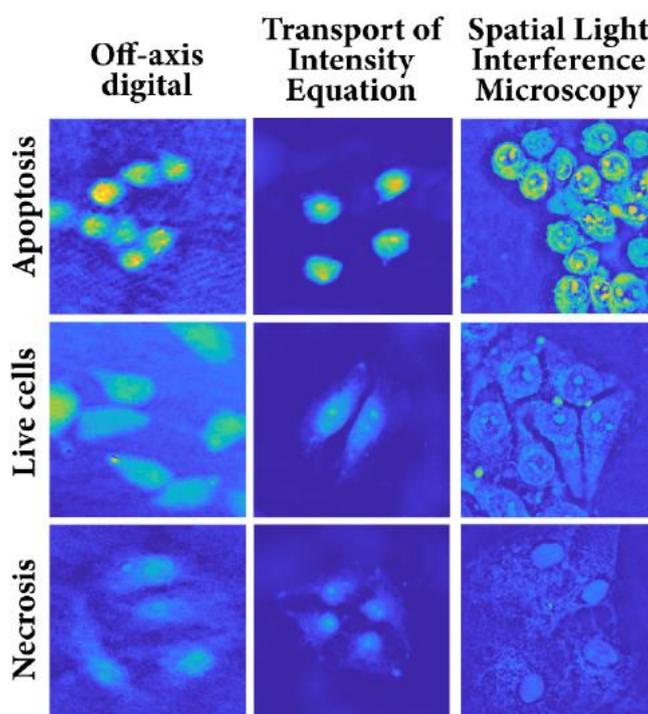
Другим методом фазовой визуализации являлась когерентная голографическая томография, в виде коммерчески реализованного голографического томографического микроскопа 3D Cell Explorer Nanolive. Метод основан на регистрации серии интерференционных картин при изменении угла падения предметного пучка на образец во внеосевом интерферометре. Данным методом фазовой визуализации использовался в качестве референтного метода с высоким пространственным разрешением, достигнутым за счет эффекта синтетической апертуры.

## **Результаты**

Был проведен сравнительный анализ фазовых изображений одних и тех же фиксированных клеточных структур разными методами фазовой визуализации, а также определены оптические и морфологические параметры клеток при сравнении с референтным методом – цифровой голографической томографии с высоким пространственным разрешением. Было получено, что использование низкокогерентного источника излучения для методов TIE и SLIM приводит к повышению пространственного разрешения и увеличивает точность определения морфологических параметров более чем на 5% по сравнению с когерентной голографической микроскопией, сопровождающейся когерентным шумом. При этом использование косвенных методов вычисления фазовых распределений и низкокогерентных источников излучения вносит ошибку вычисления фазового запаздывания, индуцированного клетками, порядка 3%.

Три описанных выше метода фазовой визуализации DHM, TIE и SLIM были применены для регистрации нескольких групп клеток HeLa до фотодинамического воздействия (т.е. живых клеток в нормальном состоянии) и после нее, в ходе апоптотических и некротических процессов. Несколько примеров фазовых изображений, полученных с использованием трех методов фазовой визуализации и соответствующих различным состояниям клеток, показаны на рисунке 1. Все три использованных метода продемонстрировали возможность различать различные состояния клеток в ходе качественного анализа фазовых изображений, так и при количественном анализе основных параметров клеток, таких как средний фазовый сдвиг, площадь и сухая масса клетки. В то время как типичный средний фазовый сдвиг живых клеток

HeLa оценивался в диапазоне  $\approx 1-1,1$  рад, при использовании всех трех методов визуализации клеток, погибших путем некроза, изменение фазового набега оценивалось примерно на 35-55%. Наблюдаемое экспоненциальное затухание среднего фазового сдвига, по-видимому, обусловлено потерей целостности мембраны и вытеканием внутриклеточной среды. Аналогичное уменьшение среднего фазового набега и сухой массы клеток было зарегистрировано и для других типов живых клеток [1]. С другой стороны, апоптоз клеток линии HeLa приводил к увеличению среднего фазового набега, что было продемонстрировано тремя методами DHM, TIE и SLIM.



**Рис. 1.** Примеры для трех методов QPI фазовых изображений живых, апоптотических и некротических клеток HeLa после различных доз фотодинамического воздействия

### Заключение

В ходе сравнительного анализа трех когерентных и некогерентных методов фазовой визуализации было показано, что использование некогерентных осевых методов фазовой визуализации приводит к увеличению пространственного разрешения и точности определения морфологических параметров клеточных структур за счет устранения когерентных шумов. Однако, наибольшая точность определения фазового запаздывания, индуцированного клетками, достигается при использовании цифровой голографической микроскопии. Несмотря на это, все реализованные методы фазовой визуализации показали возможность различать выраженные морфологические и оптические изменения клеток в ходе их гибели при внешнем фотодинамическом воздействии. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для автоматической классификации состояния клеток некогерентными методами фазовой визуализации с высокой точностью определения

морфологических параметров, как это было реализовано ранее для когерентных методов фазовой визуализации.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-72-10044).

### Список источников

- [1] **Belashov A. V.** et al. Machine learning assisted classification of cell lines and cell states on quantitative phase images //Cells. – 2021. – Т. 10. – №. 10. – С. 2587.
- [2] **Kim M. K.**, Kim M. K. Digital holographic microscopy. – Springer New York, 2011. – С. 149-190.
- [3] **Wang Z.** et al. Spatial light interference microscopy (SLIM) //Optics express. – 2011. – Т. 19. – №. 2. – С. 1016-1026.
- [4] **Zuo C.** et al. Transport of intensity equation: a tutorial //Optics and Lasers in Engineering. – 2020. – Т. 135. – С. 106187.
- [5] **Allen L. J.**, Oxley M. P. Phase retrieval from series of images obtained by defocus variation //Optics communications. – 2001. – Т. 199. – №. 1-4. – С. 65-75.

## Application of low-coherence and coherent holographic microscopy for monitoring of cells during treatment

*A. A. Zhikhoreva<sup>1</sup>, A. V. Belashov<sup>1</sup>, P. S. Butorin<sup>1</sup>, T. N. Belyaeva<sup>2</sup>, A. V. Salova<sup>2</sup>, E. S. Kornilova<sup>2</sup>, I. V. Semonova<sup>1</sup>, O. S. Vasyutinskii<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Ioffe Institute, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology of RAS, Saint-Petersburg, Russia

We present the comparative analysis of coherent and low-coherent phase imaging as methods for determination of cellular optical and morphological parameters. Low-coherence holographic microscopy, phase imaging based on the transport of intensity equation and off-axis coherent digital holographic microscopy were used to investigate cells. Coherent holographic tomography with high spatial resolution was reference method. Changes of cellular parameters during different cellular death ways were monitored by these methods. It was shown that the highest spatial resolution is achieved by low-coherence microscopy but the highest accuracy of optical parameters determination is achieved using coherent holographic microscopy.

*Keywords:* Digital Holographic Microscopy, Cells death, Phase images, Classification.