

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

На правах рукописи

Белашов Андрей Владимирович

Развитие методов цифровой голографии и томографии
для исследования эффектов, обусловленных
фотосенсибилизированной генерацией активных
форм кислорода в растворах и клетках

01.04.05 - Оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2020 год

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе
Российской академии наук

Научный руководитель: *доктор физико-математических наук,
главный научный сотрудник ФТИ им. Иоффе,
Васютинский Олег Святославович*

Официальные оппоненты: *доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник Университета ИТМО,
Вениаминов Андрей Викторович*

*доктор физико-математических наук,
главный научный сотрудник ФТИ им. Иоффе,
Шамрай Александр Валерьевич*

Ведущая организация: *Государственный оптический институт
им. С.И. Вавилова*

Защита состоится « 09 » апреля 2020 г. в 14.00 часов на заседании
диссертационного совета ФТИ 34.01.03 ФГБУН Физико-технического института им.
А.Ф. Иоффе Российской академии наук по адресу: 194021, Санкт-Петербург,
Политехническая ул., 26. E-mail: post@mail.ioffe.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Физико-
технического института им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук и на веб-сайте
института <http://www.ioffe.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью,
просьба высылать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря
диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.ф.-м.н.

Н. В. Теплова

Общая характеристика диссертации

Актуальность работы

В последние годы все больше научных работ посвящается темам персонализированной медицины и разработки новых методов лечения онкологических заболеваний. В случаях, когда не требуется немедленное хирургическое вмешательство, предпочтение часто отдается менее инвазивным методам лечения, таким как фотодинамическая терапия [1]. Использование современных методов локализации оптического излучения в различных органах и тканях пациентов [2], а также создание новых фотосенсибилизаторов, способных эффективно накапливаться в злокачественных опухолях [3], приводит к улучшению эффективности данного метода в онкологии. Ключевую роль в фотодинамической терапии играют активные формы кислорода, которые генерируются в области локализации раковых клеток при оптическом возбуждении молекул фотосенсибилизатора.

Несмотря на то, что большое количество научных работ было посвящено разработке методов генерации, детектирования синглетного кислорода и изучению процессов, связанных с ним, многие механизмы его воздействия на живые клетки остаются невыясненными. Одним из существенных препятствий на пути таких исследований являются трудности, связанные с детектированием молекул синглетного кислорода традиционными методами спектроскопии. Вследствие сильного запрета излучательной релаксации синглетного кислорода в основное состояние, детектирование его сигнала флуоресценции весьма затруднительно [4]. Вместе с тем, регистрация безызлучательной релаксации синглетного кислорода в основное состояние может проводиться на основе мониторинга изменений, происходящих в окружающей среде. Такие изменения включают в себя локальное повышение температуры и формирование градиента показателя преломления, который может быть зарегистрирован с помощью методов цифровой голографии и голографической томографии, позволяющих восстанавливать как распределения фазового набегу, внесен-

ные температурным градиентом, так и сам температурный градиент.

Несмотря на то, что использование современных фотоэлектронных умножителей позволяет получать надежные сигналы флуоресценции синглетного кислорода в растворах [5], детектирование этой молекулы во внутриклеточной среде представляет большие трудности хотя и было продемонстрировано в нескольких работах [6, 7]. Вместе с тем, исследование синглетного кислорода в клетках и тканях представляет большой научный и прикладной интерес, поскольку он участвует в работе защитных механизмов клетки, но также отвечает за протекание механизмов клеточной гибели.

Исследование механизмов фотосенсибилизированной клеточной гибели традиционными методами, такими как флуоресцентная микроскопия, сопряжено с некоторыми трудностями. Так, добавление флуоресцентных красителей в живые клетки может само по себе исказить происходящие внутриклеточные процессы. Кроме того, возможное перекрытие спектров поглощения флуоресцентных красителей и фотосенсибилизатора может приводить к дополнительным нежелательным воздействиям на исследуемые клетки [8]. Цифровая голографическая микроскопия и томография лишены этих недостатков. Они позволяют использовать лазерное излучение небольшой плотности мощности, а также определять важные оптические, морфологические и физиологические параметры клеток [9].

Целью диссертационной работы являлась разработка и применение методов цифровой голографии и томографии для исследования физических процессов и структурных преобразований, происходящих в растворах и клетках при фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода, а также для совершенствования методов определения морфологических характеристик клеток. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние случайных и систематических погрешностей на качество восстановления фазовых изображений и трехмерных распределений показателя преломления, а также оптимизировать данные методы для даль-

нейшего применения к задачам детектирования температурных градиентов и изучения влияния фотодинамического воздействия на живые клетки.

2. Разработать экспериментальную установку и апробировать методы цифровой голографии и томографии для детектирования симметричных и ассиметричных температурных градиентов в растворах при безызлучательных переходах в молекулах фотосенсибилизатора и синглетного кислорода, разработать и апробировать метод изменения их вклада в общий наблюдаемый температурный градиент, а также оценить точность получаемых данных о распределении температуры.

3. Разработать голографический метод количественной оценки структурных изменений, происходящих в живых клетках в результате внутриклеточной фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода.

4. Развить методы цифровой голографической микроскопии для повышения точности определения толщины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в следующем:

1. Было впервые исследовано влияние случайных и систематических погрешностей методов голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения на точность получаемых данных.

2. Проведено восстановление симметричных и ассиметричных температурных градиентов в водных растворах фотосенсибилизатора Радахлорина, формируемых за счет безызлучательной релаксации молекул при фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода.

3. На основе методов цифровой голографической микроскопии и томографии разработан и реализован новый метод определения типов гибели живых клеток при фотодинамическом воздействии.

4. Повышена точность определения пространственных распределений толщины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток за счет использования оптических сред с сильно различающимися показате-

лями преломления.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что с помощью методов численного моделирования было исследовано влияние случайных и систематических погрешностей на точность восстановления трехмерного распределения показателя преломления с помощью методов голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения. Выявленные зависимости позволили выделить основные источники погрешностей наиболее сильно влияющие на процесс численной обработки зарегистрированного набора цифровых голограмм. Кроме того, был проведен анализ и подбор оптимальных параметров процесса восстановления внеосевых цифровых голограмм обеспечивающих наилучшее качество восстановления фазовых распределений и их пространственное разрешение при низких отношениях сигнал-шум.

Практическая значимость работы заключается в разработке и апробации методик применения цифровой голографии для исследования фотодинамического воздействия на живые клетки. Благодаря неинвазивности цифровой голографической микроскопии, разработанные методики могут найти широкое применение в биологии и медицине для сравнения эффективности различных фотосенсибилизаторов и режимов фотодинамического воздействия. Кроме того разработанные методы могут быть использованы для оценки эффективности фотодинамического воздействия на раковые и нормальные клетки различных типов. Измерение морфологических и физиологических параметров клеток посредством голографической томографии с использованием разработанных алгоритмов сегментации может быть применено в цитологических исследованиях при изучении воздействия других внешних факторов на живые клетки. Разработанная методика повышения точности определения морфологических параметров с использованием методов цифровой голографической микроскопии, также может быть применена на практике для клинических исследований фиксированных цитологических образцов.

Методология и метод исследования

Основными методами, использованными в данной работе были цифровая голографическая микроскопия и томография, основанные на численной обработке интерференционных картин. Проверка разработанных методов детектирования температурных градиентов, сформированных безызлучательными переходами в молекулах синглетного кислорода и фотосенсибилизатора, а также идентификация гибели живых клеток осуществлялась путем численных и физических экспериментов. Для проверки полученных результатов применялся традиционный метод идентификации механизмов гибели клеток - конфокальная флуоресцентная микроскопия.

На защиту выносятся следующие **основные научные положения**:

1. Погрешность восстановления объектов в методе цифровой голографической томографии вследствие неточного определения координат оси вращения объекта или отклонения направления распространения зондирующего волнового фронта от нормали к этой оси в несколько раз больше, чем погрешность вследствие неточного определения угла падения предметной волны на объект или аддитивного шума, и не устраняется при увеличении числа голограмм-проекций.

2. Методы голографической томографии позволяют восстанавливать трехмерные температурные градиенты произвольной формы, сформированные за счет процессов безызлучательной релаксации при фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в растворах

3. Анализ динамики среднего фазового набеге, внесенного живыми клетками в зондирующий волновой фронт, позволяет регистрировать изменение физических характеристик клеток и идентифицировать механизмы их гибели при фотодинамическом воздействии

4. Голографическое исследование дегидратированных клеток позволяет на порядок повысить точность определения их толщины и интегрального показателя преломления по сравнению с исследованием живых клеток за счет использования оптических сред с существенно разными показателями пре-

ломления.

Степень достоверности научных результатов

Достоверность полученных данных и сделанных выводов обусловлена использованием широко применимых на практике методов цифровой голографии, а также цифровой голографической микроскопии и томографии. Для обработки и восстановления голограмм использовались известные математические алгоритмы. Кроме того, достоверность результатов обусловлена хорошим согласием между экспериментальными данными, полученными различными методами. Для подтверждения правильности идентификации механизмов гибели живых клеток использовались традиционные методы конфокальной флуоресцентной микроскопии с хорошо отработанными протоколами эксперимента. Генерация синглетного кислорода в водных растворах фотосенсибилизатора, способствующая формированию температурного градиента, была подтверждена экспериментами по детектированию его сигнала фосфоресценции. Полученные значения интегрального показателя преломления клеток хорошо согласуются с данными о показателях преломления отдельных клеточных структур, представленными в литературе.

Апробация результатов и публикации

По теме диссертации было опубликовано 39 печатных работ, в том числе 14 статей в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. Основные результаты диссертации докладывались на 25 научных конференциях, в том числе на 16 конференция международного уровня и на 9 конференциях всероссийского уровня: Optic 2014 (Тайпей, 2014), Физика СПб 2014 (Санкт-Петербург, 2014), Stereodynamics 2014 (Санкт-Петербург, 2014), Optical Metrology 2015 (Мюнхен, 2015), OPTIC 2015 (Тайпей, 2015), Физика СПб 2015 (Санкт-Петербург, 2015), XXIX Школа-симпозиум по голографии и когерентной оптике 2015 (Санкт-Петербург, 2015), Современная химическая физика 2015 (Туапсе, 2015), Photonics Europe 2016 (Брюссель, 2016), OPTIC 2016 (Тайвань, 2016), Современная химическая физика 2016 (Туапсе, 2016), V Международная конференция по фотонике и информационной опти-

ке (Москва, 2016), Stereodynamics 2016 (Тайпей, 2016), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2016), European Conference on Biomedical Optics (Мюнхен, 2017), European Conference on Photobiology (Пиза, 2017), 8 съезд Российского фотобиологического общества (Туапсе, 2017), Современная химическая физика 2018 (Туапсе, 2018), СУТО 2018 (Прага, 2018), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2018), Физика СПб 2018 (Санкт-Петербург, 2018), 26th Conference of European Cell Death Organization (Санкт-Петербург, 2018), «Фундаментальные проблемы оптики» (Санкт-Петербург, 2018), School of Advanced Science on Modern Topics in Biophotonics (Сан-Карлос, 2019), VIII международная конференция по фотонике и информационной оптике (Москва, 2019).

Работа была поддержана следующими грантами:

1. РФФ №14-13-00266 "Сверхбыстрая лазерная спектроскопия и визуализация динамики анизотропных молекулярных зондов и синглетного кислорода в биологических средах"

2. РФФИ №18-32-00364 "Сравнительное исследование процессов некроза и апоптоза живых клеток методами цифровой голографической микроскопии"

3. УМНИК 9707ГУ/2015 "Разработка цифрового голографического микроскопа для исследования внутриклеточных процессов".

Личный вклад автора

Диссертация является законченной научной работой, где обобщены результаты нескольких исследований, проведенных лично автором и в соавторстве. Личный вклад состоит в анализе литературных данных, разработке и создании экспериментальной установки, разработке численных алгоритмов анализа полученных данных, проведении экспериментов и обработке экспериментальных данных, а также анализе и обобщении результатов работы. Обсуждение и интерпретация полученных результатов проводилась совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Вклад соавторов в работу

Применение метода локальных наименьших квадратов для обработки

голограмм записанных в схеме сфокусированного изображения в материалах пункта 3.2 и статьи [A1], а также для обработки голограмм клеточных культур подверженных направленному воздействию света в материалах пункта 4.1 и статьи [A10] было выполнено Петровым Н. В. и подробно обсуждается в его диссертационной работе.

Структура и объем диссертации Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Общий объем диссертации составляет 165 страниц, включая 52 рисунка, список литературы из 258 наименований на 30 страницах и список публикаций по диссертации индексируемых в Web of Science из 14 наименований на 3 страницах.

Краткое содержание работы

Во введении обосновывается актуальность работы, формулируются ее цель и задачи, а также кратко приводятся основные полученные результаты.

Первая глава представляет собой обзор литературы по теме диссертационной работы. В ней приводятся основные сведения о современном состоянии цифровой голографии и описаны основные области ее применения, в том числе в биологических исследованиях. Также описаны принципы и методы фотодинамического воздействия на растворы и клетки, и типы гибели живых клеток, индуцированные фотодинамическим воздействием. Описаны основные методы исследования морфологических характеристик живых клеток.

В п. 1.1. описаны основные области применения цифровой голографии и интерферометрии, а также различие между классической голографической интерферометрией и цифровой голографией.

В п. 1.2. представлены основные принципы цифровой голографии, обсуждаются основные методы регистрации и восстановления внеосевых цифровых голограмм, а также их последующей обработки и численного распространения волновых фронтов. Кроме того, в пункте 1.2.4. отмечены последние

достижения в области цифровой голографии, предельно достижимые пространственное разрешение, точность и чувствительность данного метода.

В п. 1.3. представлены основные области использования цифровой голографии в биологических исследованиях. Представлены схемы экспериментальных установок для реализации методов цифровой голографической микроскопии. Обсуждается использование голографических методов для изучения клеток крови, нейронов, стволовых клеток, исследования процессов их гибели и деления, классификации различных типов клеток. Представлен обзор методов извлечения морфологических параметров клеток из их фазовых изображений.

В п. 1.4. представлены основные сведения о фотодинамическом воздействии. Описана общая схема фотодинамической терапии, обсуждается роль синглетного кислорода, а также методы его генерации и детектирования. Описаны основные свойства используемого в данной работе фотосенсибилизатора Радахлорин, а также типы гибели живых клеток, индуцированные фотодинамическим воздействием.

В п. 1.5. описаны основные методы исследования морфологических характеристик живых клеток, обсуждаются их преимущества и недостатки по сравнению с методами цифровой голографии.

В п. 1.6. формулируются цели и задачи диссертационной работы, и основные положения, выносимые на защиту.

Вторая глава посвящена результатам работы по оптимизации процедуры восстановления распределений фазового запаздывания внесенного исследуемыми объектами. Рассмотрено влияние аддитивного и когерентного шума, на качество восстановления фазовых распределений. Найдены оптимальные параметры для восстановления фазовых распределений для низкого отношения сигнал/шум при регистрации внеосевых цифровых голограмм. Проведена апробация и анализ метода устранения когерентных шумов в цифровой голографической микроскопии с помощью поперечного сдвига исследуемого объекта и последующего усреднения с обратным сдвигом. Рассмотрено влия-

ние случайных и систематических погрешностей при проведении эксперимента по восстановлению трехмерных распределений показателя преломления методом голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения. Основные результаты главы опубликованы в работе [A1].

В п. 2.1. представлены результаты сравнительного анализа качества восстановления цифровых голограмм при использовании алгоритмов Фурье преобразования и метода локальных наименьших квадратов для различных значений сигнал/шум при регистрации голограммы. В результате проведенного анализа было продемонстрировано, что увеличение размера окна обработки в алгоритме наименьших квадратов, равно как и уменьшение области пространственной фильтрации в методе Фурье преобразования, приводят к уменьшению погрешностей восстановления фазы, обусловленных низким отношением сигнал/шум при регистрации цифровых голограмм, и снижению пространственного разрешения. Для отношения сигнал/шум в диапазоне 10-15, соответствующего используемой нами экспериментальной установке, наилучшее качество восстановления достигается при обработке голограмм с помощью метода наименьших квадратов при размере окна обработки 15x15 пикселей.

В п. 2.2. представлены результаты апробации алгоритма устранения когерентного шума во внеосевой цифровой голографии с использованием алгоритма обратного сдвига. Продемонстрировано уменьшение когерентного шума на восстановленных фазовых распределениях на величину от 0.05 до 0.25 радиан в зависимости от количества кадров, используемых для усреднения данных.

В п. 2.3. рассматривается влияние нескольких типов случайных и систематических погрешностей на точность восстановления трехмерного распределения показателя преломления при использовании голографической томографии с алгоритмом обратного распространения. Создано программное обеспечение для реализации метода голографической томографии (рисунок 1). Представлены результаты математического моделирования процессов запи-

си набора цифровых голограмм и последующего восстановления трехмерного распределения показателя преломления при следующих типах погрешностей: 1) аддитивный шум при регистрации цифровых голограмм, 2) неточность измерения угла падения зондирующего пучка на объект, 3) несовпадение оси вращения объекта в эксперименте и моделировании, а также 4) неперпендикулярность направления распространения зондирующей волны к оси вращения объекта.

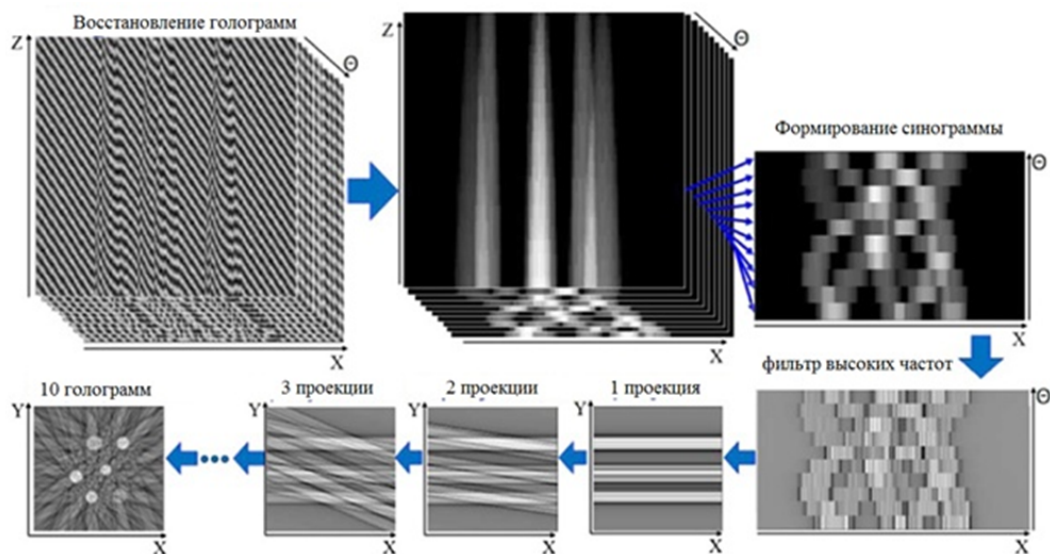


Рис. 1. Алгоритм обработки цифровых голограмм для восстановления трехмерного распределения показателя преломления.

В результате анализа данных ошибок было установлено, что первые два типа погрешностей являются случайными, их влияние легко снижается путем увеличения количества регистрируемых внеосевых цифровых голограмм, а сами эти факторы как правило не приводят к сильным искажениям полученных данных. В то же время систематические погрешности эксперимента (вышеуказанные типы 3 и 4) не могут быть устранены путем увеличения количества обрабатываемых внеосевых голограмм, а также приводят к существенному искажению результатов восстановления объекта, значительно более сильному чем первые два фактора. Было установлено, что для исследования макроскопических объектов без сложной внутренней структуры для качественного восстановления трехмерных распределений показателя прелом-

ления достаточно производить регистрацию 15-20 цифровых голограмм. Полученные результаты математического моделирования позволили минимизировать погрешности в реальных экспериментах при реализации голографической томографии.

В третьей главе представлены результаты разработки и апробации голографического метода детектирования температурных градиентов, сформированных безызлучательными переходами в молекулах фотосенсибилизатора и синглетного кислорода при их различных концентрациях. Рассмотрено восстановление температурных градиентов при наличии цилиндрической симметрии с использованием обратного преобразования Абеля, а также в случае неосесимметричного температурного градиента при помощи метода голографической томографии с использованием алгоритма обратного пространства. Проведено сравнение данных, полученных двумя указанными методами, и проведена оценка точности восстановления температурных градиентов. При повышении концентрации фотосенсибилизатора и кислорода в водном растворе продемонстрировано существенное увеличение фазового запаздывания, свидетельствующее об увеличении числа безызлучательных переходов в молекулах синглетного кислорода и фотосенсибилизатора.

Основные результаты главы опубликованы в работах [A1], [A2], [A3], [A4], [A5].

В п. 3.1. представлены результаты применения цифровой голографии с использованием обратного преобразования Абеля для детектирования осесимметричных температурных градиентов. Была создана экспериментальная установка для регистрации внеосевых цифровых голограмм при исследовании макроскопических объектов (поле зрения около 15 мм в диаметре). Восстановлены радиальные распределения температуры в водном растворе Радахлорина при воздействии лазерного излучения на длине волны 405 нм. и различных концентрациях фотосенсибилизатора (рисунок 2). Также восстановлена динамика изменения максимальной температуры в растворе при непрерывной фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в

течение 15 секунд.

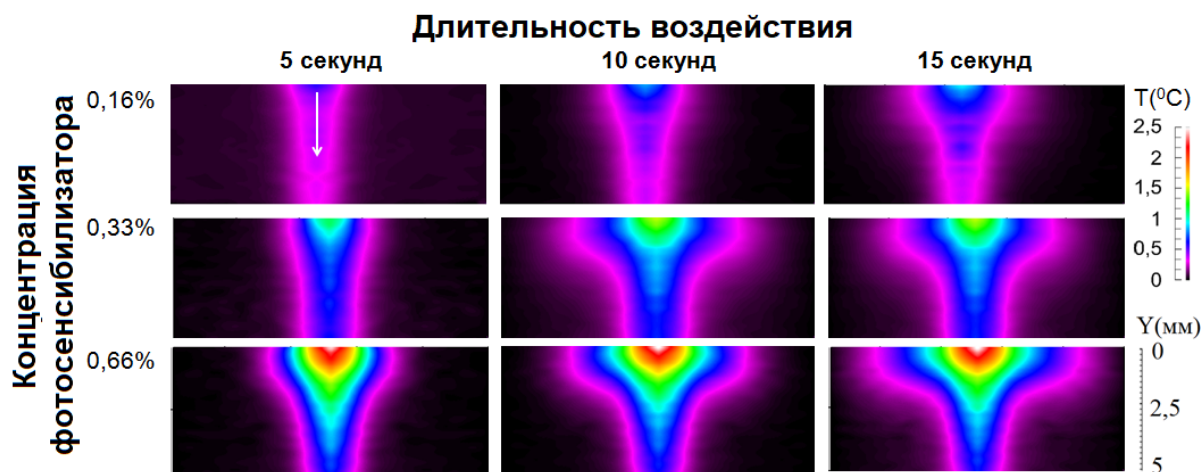


Рис. 2. Результаты восстановления радиальных распределений температурных градиентов соответствующих различным концентрациям фотосенсибилизатора и длительности воздействия лазерного излучения.

В п. 3.2. Представлены результаты использования цифровой голографической томографии для восстановления неосесимметричных температурных градиентов. В отличие от пункта 3.1. отсутствие осевой симметрии температурного градиента было обусловлено наклоном луча возбуждающего лазера, а также отсутствием радиальной симметрии в распределении интенсивности поперечного сечения его пучка. В результате применения метода голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения был восстановлен набор трехмерных температурных карт, соответствующих различным длительностям непрерывной фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода (рисунок 3). В результате сравнения динамики изменения максимальной температуры в случаях наличия и отсутствия аксиальной симметрии ошибка восстановления температурного градиента была оценена в 5-6%.

В п. 3.3. представлены результаты восстановления распределений фазовых сдвигов, сформированных в результате безызлучательной релаксации молекул синглетного кислорода и фотосенсибилизатора при различных концентрациях кислорода (рисунок 4). Изменение концентрации кислорода в водном

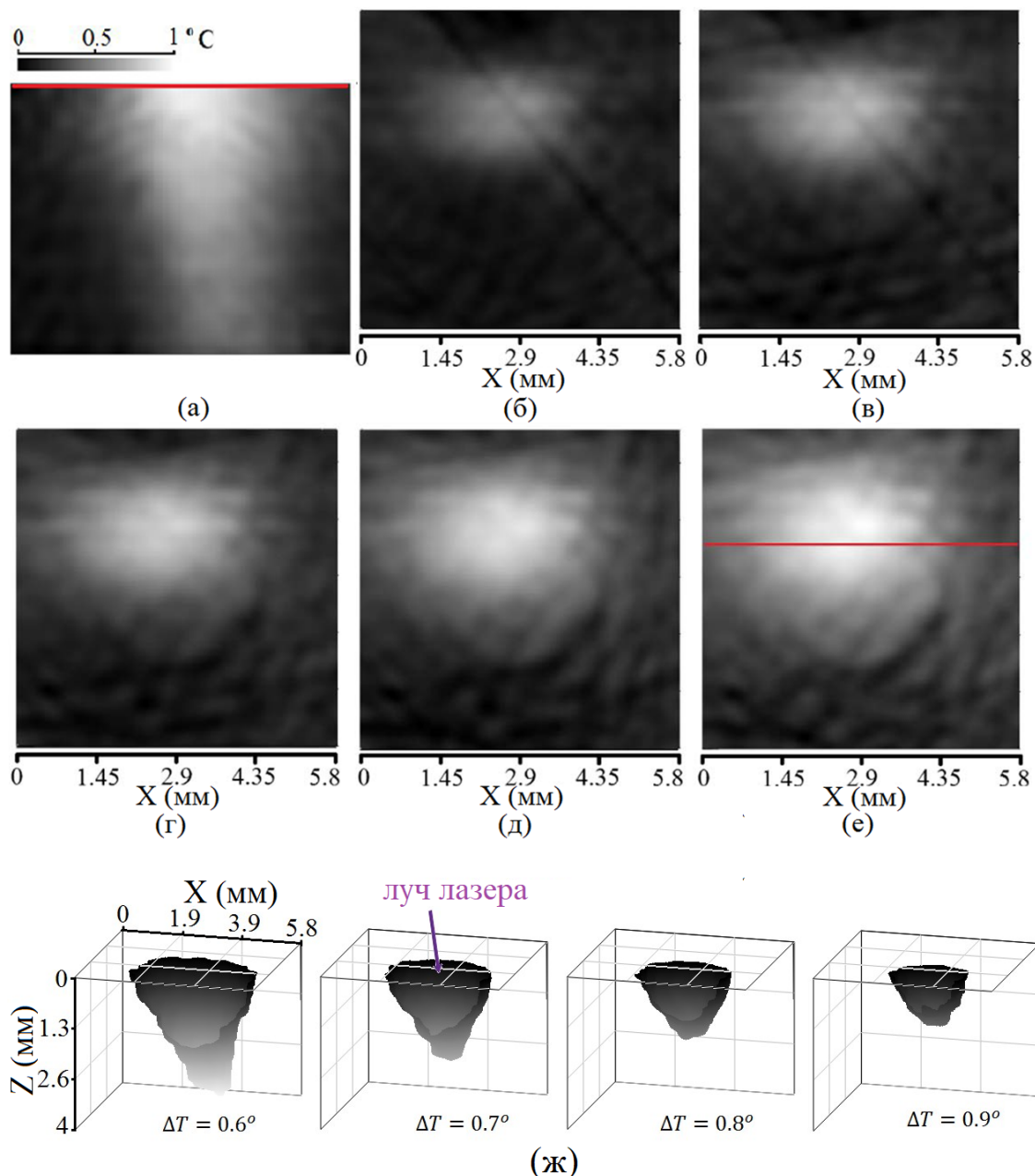


Рис. 3. (а) - вертикальное XZ-сечение температурного градиента, образовавшегося в результате генерации синглетного кислорода в течение 8 секунд и распределения температуры в горизонтальных сечениях у поверхности раствора после (б) – 2, (в) – 4, (г) – 6, (д) – 8 и (е) – 10 секунд. Красными линиями на рис. 3(а) и рис. 3(е) отмечены относительные положения данных сечений. (ж) - набор изображений эквитермальных поверхностей, соответствующих 10 секундам фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода.

растворе фотосенсибилизатора достигалось посредством изменения давления кислорода в герметичной кювете. Было показано, что повышение концентрации кислорода приводит к увеличению фазового набега, что по-видимому

связано с увеличением скорости генерации и безызлучательной релаксации синглетного кислорода.

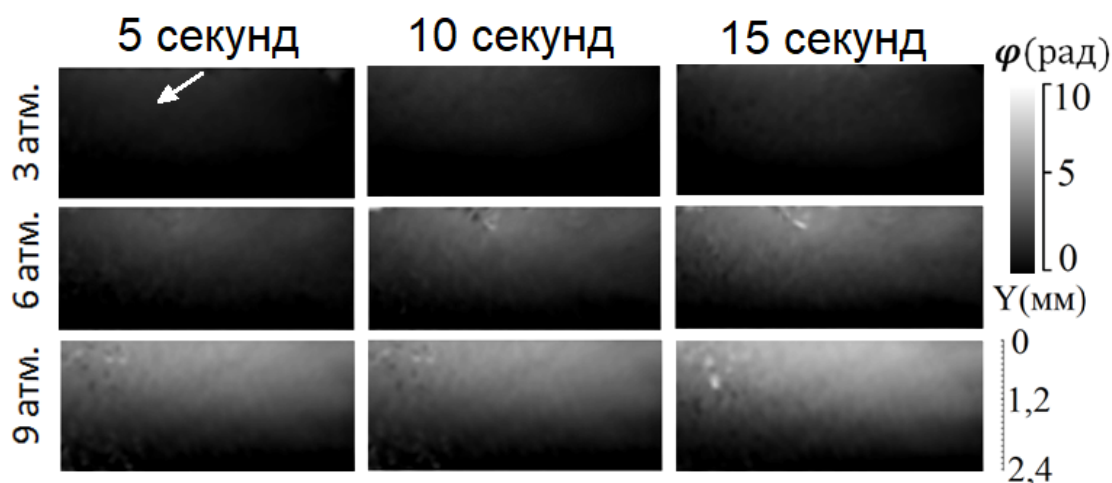


Рис. 4. Распределения интегрального фазового набега при различном времени возбуждения и давлении кислорода в кювете. Белой стрелкой обозначено направление излучения возбуждающего лазера.

Четвертая глава посвящена описанию нового голографического метода идентификации и мониторинга различных типов гибели живых клеток, индуцированных фотодинамическим воздействием. Описана методика проводимых экспериментов и методология обработки внеосевых цифровых голограмм для определения оптических, физиологических и морфологических параметров клеток. Проведен анализ динамики изменения среднего фазового набега, внесенного живыми клетками после фотодинамического воздействия при разных дозах и режимах облучения. Выделены характерные признаки апоптоза, вторичного некроза и некроза клеток. Для проверки разработанного подхода использованы традиционный метод идентификации типа клеточной гибели - конфокальная флуоресцентная микроскопия с применением стандартных наборов красителей. На основе полученных данных проведено сравнение резистивности клеток линий HeLa и A459 к фотодинамическому воздействию с использованием фотосенсибилизатора Радахлорина. Представлены результаты измерения скорости некротических процессов в клетках линии HeLa при различных режимах внутриклеточной генерации активных

форм кислорода. Продемонстрирована возможность использования методов голографической томографии для вычисления морфологических характеристик клеток и анализа их изменений при различных типах гибели. Основные результаты главы опубликованы в работах [A6], [A7], [A8], [A9], [A10], [A11], [A14].

В п. 4.1. описана экспериментальная установка для записи цифровых голограмм, а также алгоритм их восстановления и обработки. Описана методика эксперимента по голографическому мониторингу клеток линий HeLa и A549 в процессе их гибели, вызванной внутриклеточной генерацией активных форм кислорода (рисунок 5).

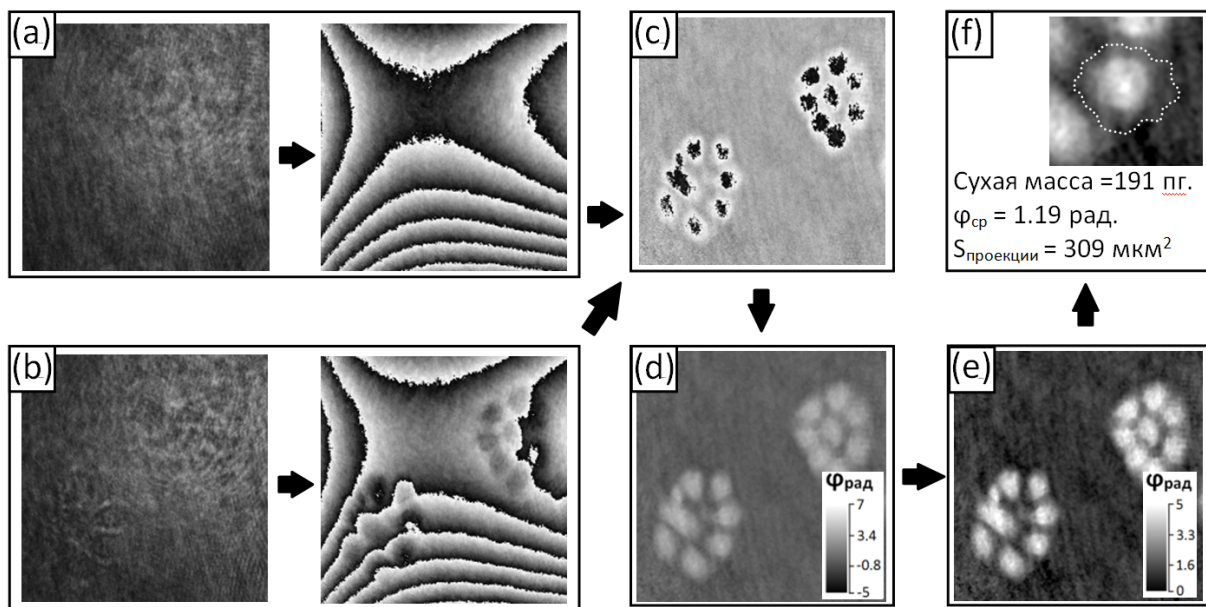


Рис. 5. Алгоритм обработки зарегистрированных внеосевых цифровых голограмм: (а) - регистрация цифровой голограммы и восстановление фазы предметной волны в отсутствие исследуемого объекта, (б) - регистрация цифровой голограммы и восстановление фазы предметной волны при наличии исследуемого объекта, (в) - вычитание двух восстановленных фазовых распределений из рисунков (а) и (б) для определения фазового распределения внесенного клетками, (г) - развертка фазового распределения, (д) - нормировка развернутого фазового распределения так, чтобы фазовый набег в области отсутствия клеток был равен нулю, (е) - сегментация отдельных клеток и измерение их характеристик.

Описаны методы вычисления основных оптических, морфологических

и физиологических параметров клеток из распределений фазового набега, а также представлен разработанный в ходе выполнения работы алгоритм автоматической сегментации клеток для автоматизации обработки экспериментальных данных (рисунок 6).

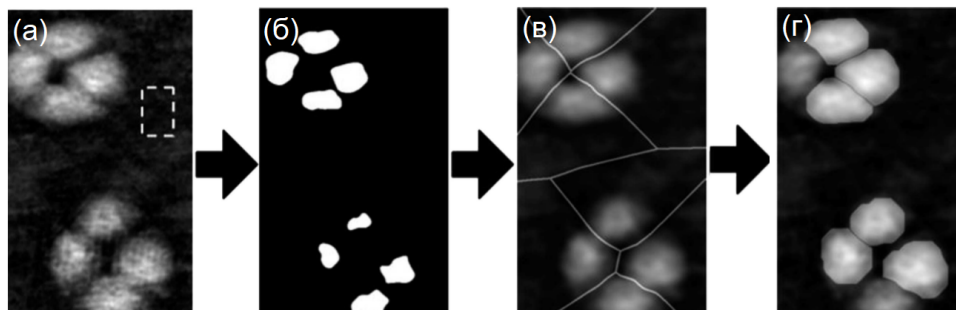


Рис. 6. Алгоритм автоматической сегментации клеток на фазовых изображениях. (а) исходное фазовое распределение клеток, (б) определение локальных максимумов на фазовом изображении, (в) построение линий, разделяющих близко расположенные клетки, (г) уточнение краев каждой клетки путем наращивания области исходного локального максимума.

В п. 4.2. представлены результаты применения методов голографической микроскопии для детектирования изменений в живых клетках линий HeLa и A549 произошедших в результате фотодинамического воздействия. Показано, что среди популяции клеток в нормальном состоянии наблюдается существенная вариация их характеристик, таких как средний фазовый набег и сухая масса. В связи с этим необходимо собирать и анализировать данные о характеристиках минимум 30-40 отдельных клеток для получения статистически достоверных данных об изменении их параметров.

В ходе контрольного эксперимента по непрерывному мониторингу группы фотосенсибилизированных живых клеток в течение 6 часов продемонстрирована неинвазивность метода цифровой голографической микроскопии. Показано, что различные динамики изменения среднего фазового набега клеток линий HeLa и A549 (рисунок 7(а,б)), а именно: 1) отсутствие изменений, 2) увеличение, 3) отложенное уменьшение и 4) резкое уменьшение данной величины, соответствуют четырем типам реакции клеток на фотодинамическое

воздействие: 1) выживанию клеток, 2) апоптозу, 3) вторичному некрозу и 4) некрозу клеток. При этом одни и те же дозы фотодинамического воздействия запускают различные внутриклеточные механизмы в клетках линий HeLa и A549 (рисунок 7(в)).

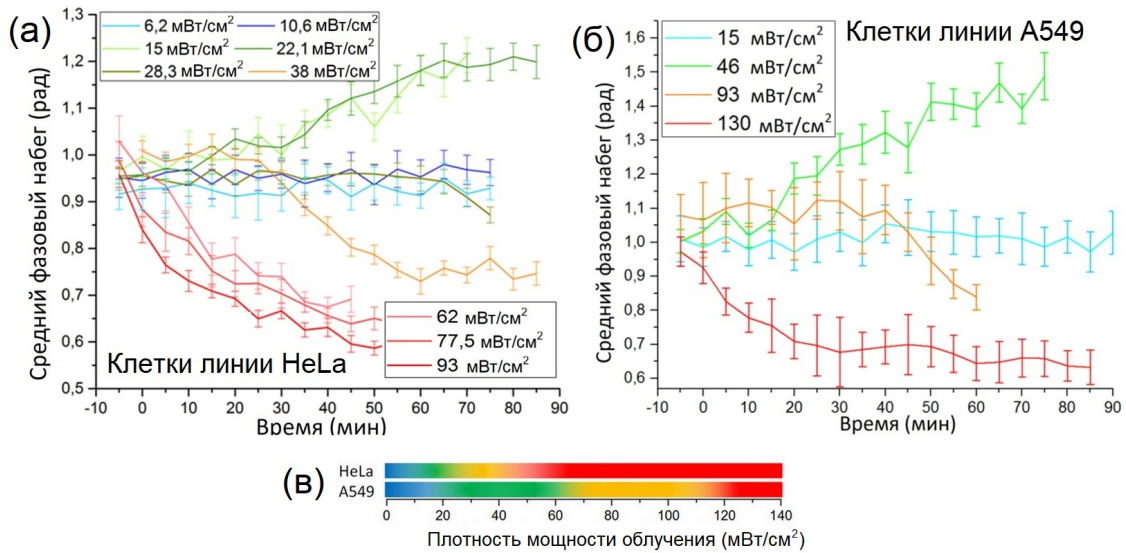


Рис. 7. Динамика изменения среднего фазового набега клеток линий (а) HeLa и (б) A549 при различных плотностях мощности облучения.

Это позволяет предположить, что клетки линии A549 обладают большей резистивностью к фотодинамическому воздействию с использованием фотосенсибилизатора Радахлорина. Типичные фазовые изображения клеток до и после фотодинамического воздействия при различных дозах облучения представлены на рисунке 8.

Также представлены результаты наблюдения динамики изменения среднего фазового набега клеток для различной скорости генерации активных форм кислорода при неизменной величине суммарной дозы фотодинамического воздействия. Показано, что увеличение данного параметра ведет к более быстрому уменьшению среднего фазового набега, то есть более быстрому протеканию процесса некроза. Для подтверждения сделанных предположений о типах клеточной гибели была проведена идентификация гибели живых клеток данных линий при помощи традиционных методов конфокальной флуоресцентной микроскопии.

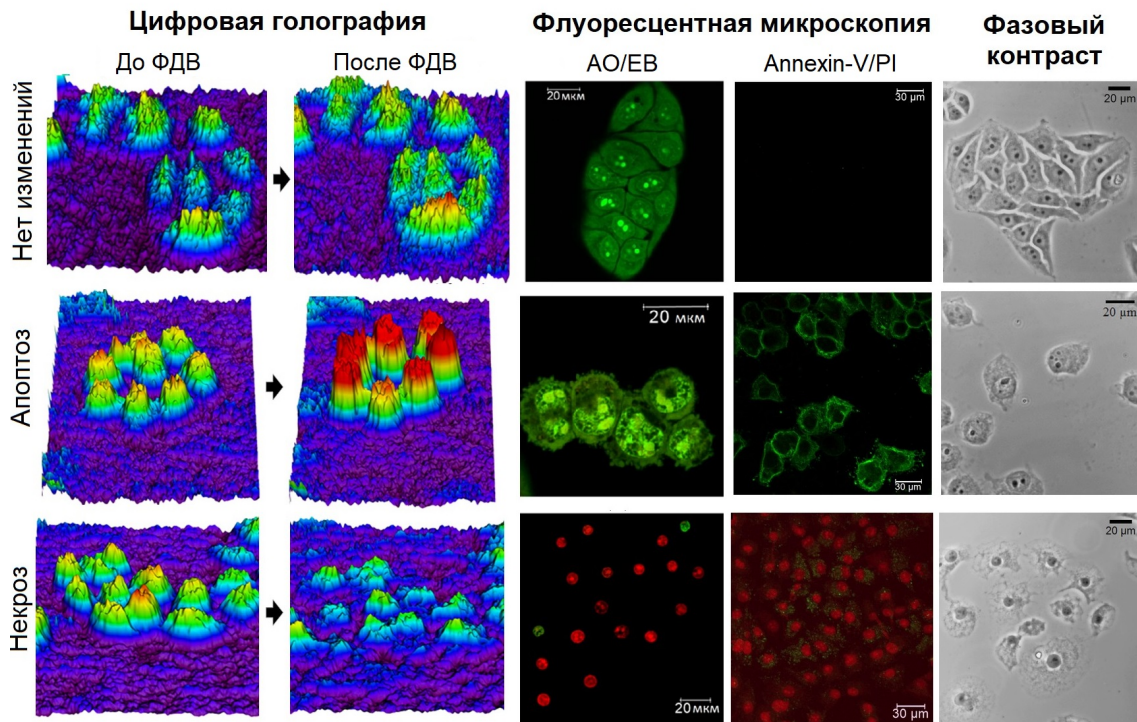


Рис. 8. Типичные изображения клеток линии HeLa при различных сценариях гибели клеток после ФДВ, полученные с помощью цифровой голографической микроскопии, конфокальной флуоресцентной микроскопии с использованием комбинаций красителей: 1) акридина оранжевого и бромистого этидия (АО/ЕВ) и 2) аннексина-V и пропридия йодида (Annexin-V/PI), а также микроскопии фазового контраста.

В п. 4.3. представлены результаты использования методов голографической томографии для мониторинга изменения морфологических и физиологических характеристик живых клеток линии A549 в результате фотодинамического воздействия при дозе 13.2 и 25 Джоулей. Предложен и апробирован алгоритм сегментации клеток на трехмерных распределениях показателя преломления и вычисления их характеристик (рисунок 9).

Продемонстрировано существенное уменьшение объема клеток в процессе апоптоза и снижение сухой массы при некрозе клеток.

Пятая глава посвящена разработке голографического метода восстановления интегрального показателя преломления и толщины фиксированных клеток. Данный подход основан на последовательной регистрации и обработке фазовых распределений фиксированной клетки в двух оптических средах

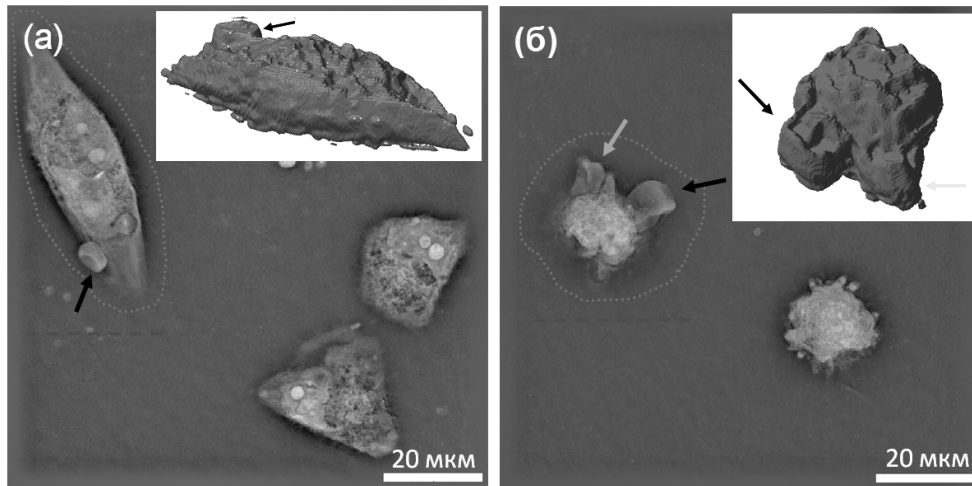


Рис. 9. Восстановленное распределение показателя преломления в поперечном XY-сечении и результат сегментации двух клеток на трехмерном распределении показателя преломления. Стрелками указаны морфологические особенности клетки, успешно сохраненные описанным алгоритмом сегментации.

с существенно различающимися показателями преломления. Было продемонстрировано, что предложенная методология эксперимента позволяет значительно повысить точность определения данных параметров.

Основные результаты главы опубликованы в работах [A11], [A12].

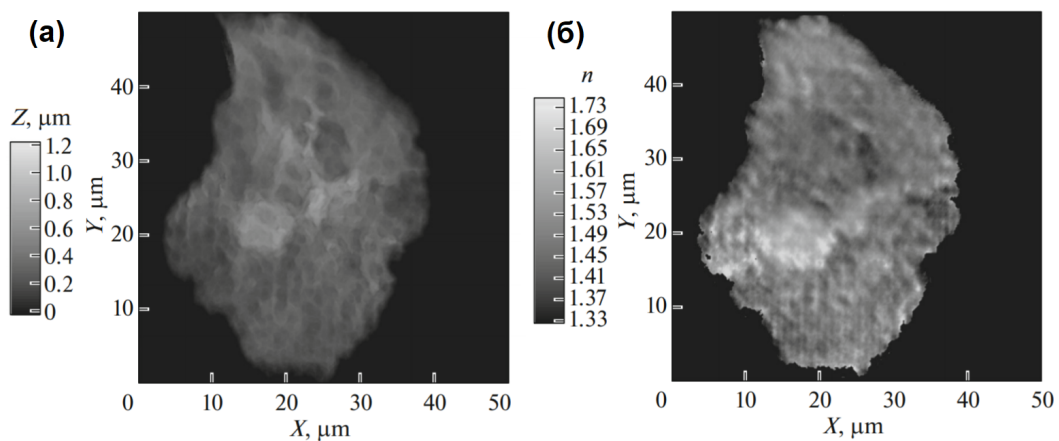


Рис. 10. Пространственные распределения (а) толщины и (б) интегрального показателя преломления фиксированных клеток эпителия ротовой полости человека вычисленные с использованием предложенного метода.

Это становится возможным вследствие того, что при работе с фиксированными клетками оказывается возможным использование более широкого

спектра оптических сред без существенного изменения морфологических характеристик клеток. Примеры пространственных распределений интегрального показателя преломления и толщины фиксированных клеток эпителия ротовой полости представлены на рисунке 10. Результаты измерения интегрального показателя преломления сопоставлены с другими литературными данными, в результате чего продемонстрирована высокая точность определения искомых характеристик клетки с помощью предложенного подхода.

В заключении кратко сформулированы основные результаты полученные в диссертационной работе.

Основные результаты

1. Произведена оптимизация алгоритма обработки внеосевых цифровых голограмм для получения наилучшего качества восстановления фазовых распределений в условиях низких отношений сигнал/шум. Апробирован алгоритм устранения когерентных шумов в цифровой голографической микроскопии и создана экспериментальная установка для исследования биологических объектов. Проведен анализ основных источников случайных и систематических погрешностей при реализации метода цифровой голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения. Это позволило разработать оптимальную экспериментальную установку для восстановления трехмерных распределений показателя преломления в макроскопических объектах, таких как температурные градиенты.

2. Разработаны и апробированы голографические методы детектирования температурных градиентов, сформированных безызлучательными переходами в процессе фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в водных растворах. Продемонстрирована возможность восстановления температурных градиентов как в осесимметричных распределениях температуры с помощью обратного преобразования Абеля, так и в случае отсутствия осевой симметрии исследуемого объекта при помощи методов голографической томографии. Проведена оценка точности восстановления температурных градиентов. Кроме того было показано, что за счет изменения concentra-

ции фотосенсибилизатора и кислорода в кювете можно изменять величину наблюдаемых градиентов фазового набега и относительный вклад безызлучательных переходов молекул фотосенсибилизатора и синглетного кислорода.

3. Создано программное обеспечение для обработки фазовых распределений живых клеток для получения данных об оптических, морфологических и физиологических характеристиках живых клеток. Проведена апробация данных алгоритмов и продемонстрирована возможность детектирования различных типов гибели живых клеток в результате фотодинамического воздействия на основе анализа динамики изменения среднего фазового набега, внесенного клетками. Было показано, что скорость некротических процессов в живых клетках может быть определена с помощью методов цифровой голографической микроскопии. Кроме того увеличение скорости генерации синглетного кислорода при постоянной суммарной дозе фотодинамического воздействия не сказывается на типе клеточной смерти, однако существенно влияет на скорость процессов некроза. Было показано, что методы голографической томографии также могут быть использованы для получения более точной информации об изменении морфологических характеристик живых клеток в процессе их гибели благодаря восстановлению и обработке трехмерного распределения показателя преломления.

4. Разработан метод измерения пространственных распределений толщины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток с повышенной точностью. Предложенный метод основан на обработке двух фазовых распределений соответствующих клеткам в различных оптических средах с существенно различающимися значениями показателя преломления. Сравнение найденных статистических распределений интегрального показателя преломления с данными, представленными в литературе показало хорошее согласие полученных результатов с типичными показателями преломления различных структур клеток.

Публикации в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science

[A1] Accuracy of image-plane holographic tomography with filtered backprojection: random and systematic errors / AV Belashov, NV Petrov, IV Semenova // Applied Optics. — 2016. — Т. 55, № 1. — С. 81–88.

[A2] Holographic monitoring of spatial distributions of singlet oxygen in water / AV Belashov, DM Bel'tyukova, OS Vasyutinskii et al. // Technical Physics Letters. — 2014. — Т. 40, № 12. — С. 1134–1135.

[A3] Holographic detection of nonradiative transitions in oxygen molecules: digital and classical approach / DM Beltukova, AV Belashov, NV Petrov et al. // Journal of Physics: Conference Series / IOP Publishing. — Т. 661. — 2015. — С. 012044.

[A4] Combined phosphorescence-holographic approach for singlet oxygen detection in biological media / IV Semenova, AV Belashov, DM Beltukova et al. // Proceedings of SPIE. Biophotonics South America / International Society for Optics and Photonics. — Т. 9531. — 2015. — С. 95310S.

[A5] Singlet oxygen detection in water by means of digital holography and digital holographic tomography / AV Belashov, NV Petrov, IV Semenova, OS Vasyutinskii // Proceedings of SPIE. Optics, Photonics and Digital Technologies for Imaging Applications IV / International Society for Optics and Photonics. — Т. 9896. — 2016. — С. 98961B.

[A6] Dry mass and average phase shift dynamics in HeLa cells subjected to low-dose photodynamic treatment / AV Belashov, AA Zhikhoreva, TN Belyaeva et al. // Proceedings of SPIE. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI / International Society for Optics and Photonics. — Т. 10685. — 2018. — С. 1068505.

[A7] Necrosis and apoptosis pathways of cell death at photodynamic treatment in vitro as revealed by digital holographic microscopy / IV Semenova, AV Belashov, TN Belyaeva et al. // Proceedings of SPIE. Imaging, Manipulation, and Analysis

of Biomolecules, Cells, and Tissues XVI / International Society for Optics and Photonics. — T. 10497. — 2018. — C. 104970D.

[A8] Holographic monitoring of cell death pathways induced by reactive oxygen species / AV Belashov, AA Zhikhoreva, DA Rogova et al. // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO) / IEEE. — 2018. — C. 555–555.

[A9] HeLa cells response to photodynamic treatment with Radachlorin at various irradiation parameters / AV Belashov, AA Zhikhoreva, TN Belyaeva et al. // European Conference on Biomedical Optics / Optical Society of America. — 2017. — C. 104140U.

[A10] Digital holographic microscopy in label-free analysis of cultured cells' response to photodynamic treatment / AV Belashov, AA Zhikhoreva, TN Belyaeva et al. // Optics Letters. — 2016. — T. 41, № 21. — C. 5035–5038.

[A11] Monitoring of laser-induced thermal gradients in plant cells by means of digital micointerferometry / AV Belashov, NV Petrov, IV Semenova, OS Vasyutinskii // 2016 International Conference Laser Optics / IEEE. — 2016. — C. S2–25.

[A12] Determination of the refractive index of dehydrated cells by means of digital holographic microscopy / AV Belashov, AA Zhikhoreva, VG Bespalov et al. // Technical Physics Letters. — 2017. — T. 43, № 10. — C. 932–935.

[A13] Refractive index distributions in dehydrated cells of human oral cavity epithelium / AV Belashov, AA Zhikhoreva, VG Bespalov et al. // JOSA B. — 2017. — T. 34, № 12. — C. 2538–2543.

[A14] Quantitative assessment of changes in cellular morphology at photodynamic treatment in vitro by means of digital holographic microscopy / Belashov A. V., AA Zhikhoreva et al. // Biomedical Optics Express. — 2019. — T. 10, №. 10. — C. 4975–4986.

Цитируемая литература

1. A review of progress in clinical photodynamic therapy / Zheng Huang // *Technology in cancer research and treatment*. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 283–293.
2. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy / Lorenzo Brancalion, H Moseley // *Lasers in medical science*. — 2002. — Т. 17, № 3. — С. 173–186.
3. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review / Ron R Allison, Claudio H Sibata // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2010. — Т. 7, № 2. — С. 61–75.
4. Photosensitized singlet oxygen and its applications / Maria C DeRosa, Robert J Crutchley // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2002. — Т. 233. — С. 351–371.
5. Phosphorescence dynamics of singlet oxygen and Radachlorin photosensitizer in aqueous solution / VP Belik, DM Beltukova, IM Gadzhiev et al. // *European Conference on Biomedical Optics / Opt. Society of America*. — 2017. — C.104170F.
6. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells / Jurgen Baier, Max Maier, Roland Engl et al. // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2005. — Т. 109, № 7. — С. 3041–3046.
7. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability / Sonja Hatz, John DC Lambert, Peter R Ogilby // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2007. — Т. 6, № 10. — С. 1106–1116.
8. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging / P Philippe Laissue, Rana A Alghamdi, Pavel Tomancak et al. // *Nature Methods*. — 2017. — Т. 14, № 7. — С. 657.
9. Girshovitz, Pinhas. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization / Pinhas Girshovitz, Natan T Shaked // *Biomedical Optics Express*. — 2012. — Т. 3, № 8. — С. 1757–1773.

