

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель
д.ф.-м.н. Васютинский Олег Святославович

Санкт-Петербург – 2020 год

Содержание

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	7
1.1. Области применения методов интерферометрии и цифровой голографии	7
1.2. Современное состояние внеосевой цифровой голографии	11
1.3. Применение методов цифровой голографии в биологии и медицине	28
1.4. Фотодинамическая воздействие на клетки, роль синглетного кислорода	39
1.5. Другие методы определения морфологических характеристик клеток	49
1.6. Цели и задачи диссертационной работы	53
Глава 2. Исследование влияния случайных и систематических погрешностей на результаты восстановления фазы волнового фронта и трехмерных распределений показателя преломления	56
2.1. Определение оптимальных параметров восстановления внеосевых цифровых голограмм при разном уровне аддитивного случайного шума	58
2.2. Устранение систематического когерентного шума во внеосевой цифровой голографии с помощью алгоритма усреднения со сдвигом	64
2.3. Исследование влияния случайных и систематических погрешностей на точность метода цифровой голографической томографии с использованием обратного распространения для восстановления асимметричных градиентов показателя преломления	69
Глава 3. Исследование трехмерных температурных градиентов	

при фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в растворах с помощью голографических методов	77
3.1. Использование обратного преобразования Абеля для детектирования осесимметричных трехмерных температурных градиентов	78
3.2. Использование методов цифровой томографии для детектирования произвольных трехмерных температурных градиентов	83
3.3. Детектирование фазового набега, внесенного температурными градиентами при фотодинамическом воздействии, в зависимости от концентрации кислорода	87
Глава 4. Разработка голографических методов идентификации и исследования гибели живых клеток, индуцированной фотодинамическим воздействием	90
4.1. Экспериментальная установка для реализации метода цифровой голографической микроскопии и алгоритм обработки внеосевых цифровых голограмм	91
4.2. Применение методов цифровой голографической микроскопии для идентификации механизмов гибели живых клеток	100
4.3. Применение методов цифровой голографической томографии для исследования изменения морфологических характеристик в процессе гибели живых клеток	111
Глава 5. Разработка методики повышения точности определения толщины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток, основанной на регистрации цифровых голограмм объекта в различных оптических средах	119
Заключение	130
Литература	133
Список публикаций по теме диссертации	163

Введение

В последнее время множество научных работ посвящено разработке менее радикальных методов лечения онкологических заболеваний, которые могут успешно использоваться в случаях, когда не требуется немедленное хирургическое вмешательство. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия [1], основанная на генерации синглетного кислорода и других активных форм кислорода в области локализации злокачественной опухоли, инициирующих процессы гибели раковых клеток. Достаточно высокая эффективность, отсутствие побочных эффектов и осложнений и низкая инвазивность этого метода обуславливают актуальность поиска методов детектирования синглетного кислорода и исследования механизмов его воздействия на живые клетки. Одним из существенных препятствий на пути таких исследований являются трудности, связанные с детектированием синглетного кислорода по его сигналу флуоресценции. [2]. Однако регистрация синглетного кислорода может проводиться также и посредством мониторинга изменений окружающей среды, происходящих в результате его безызлучательной релаксации в основное состояние. Такие изменения приводят к формированию градиента показателя преломления, который может быть восстановлен с помощью методов цифровой голографии и голографической томографии.

Кроме того, имеются сведения о том что именно синглетный кислород участвует в работе защитных механизмов клетки и отвечает за протекание важнейших процессов программируемой клеточной гибели. Однако применение стандартных методов определения механизмов клеточной гибели для исследования фотосенсибилизированных живых клеток также сопряжено с некоторыми трудностями. Добавление фотосенсибилизатора в культуральную среду существенно увеличивает восприимчивость живых клеток к свету, что приводит к невозможности их длительного непрерывного мониторинга с помощью традиционно используемых методов флуоресцентной микроскопии. В то же время

цифровая голографическая микроскопия и томография с одной стороны позволяют использовать лазерное излучение малой плотности мощности, а с другой стороны - получать количественную информацию о важных оптических, морфологических и физиологических параметрах клеток [3, 4].

Целью данной диссертационной работы было развитие методов цифровой голографии и их применение для исследования физических процессов и структурных преобразований, происходящих в растворах и клетках при фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи: 1. Исследование влияния различных типов погрешностей на качество восстановления фазовых изображений и трехмерных распределений показателя преломления, и их оптимизация для наиболее качественного измерения распределений фазового запаздывания и градиентов показателя преломления. 2. Апробация методов цифровой голографии и томографии для восстановления симметричных и асимметричных температурных градиентов в растворах при безызлучательных переходах в молекулах фотосенсибилизатора и синглетного кислорода. 3. Разработка голографического метода количественного исследования изменений, происходящих в живых клетках в результате внутриклеточной фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода. 4. Развитие методов цифровой голографической микроскопии для повышения точности определения морфологических характеристик клеток и измерения их интегрального показателя преломления.

В результате выполнения диссертационной работы были получены следующие основные результаты: 1. Произведена оптимизация методов обработки внеосевых цифровых голограмм в условиях низких отношений сигнал/шум и апробация алгоритма устранения когерентного шума, а также проанализировано влияние случайных и систематических погрешностей при реализации метода цифровой голографической томографии с использованием алгоритма обратного распространения. 2. Выполнена разработка и апробация голографических методов детектирования симметричных и асимметричных температурных

градиентов, сформированных безызлучательными переходами в процессе фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в водных растворах, а также проведена оценка точности полученных результатов. 3. Была продемонстрирована возможность детектирования различных типов гибели живых клеток в результате фотодинамического воздействия на основе анализа динамики изменения среднего фазового набега, внесенного клетками. Показано, что с помощью методов цифровой голографии может быть проведена оценка скорости некротических процессов в живых клетках. В результате было установлено, что увеличение скорости генерации синглетного кислорода при постоянной суммарной дозе фотодинамического воздействия не сказывается на типе клеточной смерти, однако существенно влияет на скорость процесса некроза. 4. Разработан метод повышения точности измерения пространственных распределений толщины и интегрального показателя преломления клеток за счет их предварительной фиксации и дегидратации.

Глава 1

Обзор литературы

1.1. Области применения методов интерферометрии и цифровой голографии

Как известно [5], на сегодняшний день не существует детекторов способных регистрировать изменения электромагнитного поля на частотах, соответствующих оптическому диапазону (400-790 ТГц). В связи с этим при работе с электромагнитными волнами видимой части спектра может быть произведена регистрация лишь возмущения усредненного за время экспозиции, которое значительно превышает период колебаний. Таким образом, использование современных фотоприемников позволяет определить лишь интенсивность и амплитуду (которая может быть найдена как квадратный корень из интенсивности) электромагнитной волны. Однако информация о том в какой фазе находилась волна в каждой точке пространства в определенный момент времени оказывается недоступной. Регистрация интенсивности электромагнитной волны прошедшей через исследуемый объект, может быть использована для определения его показателя поглощения. Информация о показателе преломления вещества, влияющем на скорость распространения электромагнитной волны и форму волнового фронта, может быть получена за счет анализа фазового распределения волны.

Самыми первыми способами получения пространственного распределения фазы волнового фронта стали интерференционные методы, основанные на анализе картины интерференции двух монохроматических когерентных волн. Несмотря на то, что явление интерференции, то есть взаимного увеличения или уменьшения результирующей амплитуды двух или нескольких волн в зависимости от разности их фаз, имеет место и при отсутствии когерентности между ними,

для реального наблюдения интерференционной картины требуется ее стабильность. Это опять же связано с недостаточным быстродействием фотодетекторов, приводящим к тому, что время экспозиции значительно превышает период колебания электромагнитных волн оптического диапазона. Таким образом, для регистрации интерференционной картины необходимо выполнение нескольких условий: такая картина должна быть достаточно устойчивой, что имеет место, если интерферирующие волны когерентны, достаточно монохроматичны, имеют одну частоту, а колебания электрического вектора в них не ортогональны. Поэтому, хотя эксперименты по наблюдению интерференции, ее использованию для Фурье-спектроскопии и тестированию оптических элементов проводились уже в конце 19 века, по-настоящему широкое распространение интерференционные методы получили после создания и распространения лазеров во второй половине 20 века, излучение которых обладало высокой интенсивностью и удовлетворяло всем вышеперечисленным требованиям. Это позволило использовать методы интерферометрии при анализе аберраций [6], изучении распределения напряжений в различных объектах [7] и восстановлении распределений потоков воздуха [8], исследовании плазмы [9] и т.п.

Следующим шагом в развитии интерференционных методов стало появление метода голографической интерферометрии [10], позволяющего получать картины интерференции волновых фронтов, наблюдавшихся в разные моменты времени. Если при использовании обычных интерференционных методов производится запись лишь одной картины интерференции волн предметного и опорного пучков, то в случае голографической интерферометрии происходит последовательная запись двух голограмм предметной волны, соответствующей наличию и отсутствию исследуемого объекта или двум его различным состояниям. При последующем освещении голограммы опорной волной происходит одновременное восстановление двух предметных волн интерференция которых наблюдается на удаленном экране или записывается с помощью светочувствительной пластины. С помощью данного метода было проведено множество науч-

ных работ по исследованию вибраций пластин и анализу их колебательных мод [11], восстановлению температурных полей над нагретыми поверхностями [12], наблюдению эволюции индуцированной лазером световой искры [13], а также изучению распространения ударных волн в твердых телах [14] и жидкостях [15]. Таким образом, благодаря развитию голографической интерферометрии появилась возможность исследования динамики быстрых процессов и сопоставления формы и свойств одного и того же тела в различных состояниях. Более того голографическая интерферометрия сделала возможным изучение изменений, происходящих с диффузно-отражающими спекл-объектами [16].

В настоящее время интерференционные методы применяются для измерения расстояний с предельно высокой точностью [17], изучения квантовых эффектов [18], наблюдения гравитационных волн [19] и исследования различных объектов методами Фурье-спектроскопии [20]. Совершенствование фотодетекторов и ЭВМ также сделало возможной регистрацию интерференционных картин непосредственно на матричный фотоприемник и запись таких цифровых голограмм в память вычислительного устройства, с помощью которого в дальнейшем производится восстановление амплитуды и фазы предметной волны. Совокупность таких подходов, позволяющих восстановить полную информацию о предметной волне, то есть получить пространственное распределение ее амплитуды и фазы получили название методов цифровой голографии [21].

Методы цифровой голографии широко используются в различных технических приложениях. В частности, появление голографических методов внесло существенный вклад в развитие метрологии. Например, благодаря анализу амплитуды и фазы отраженного волнового фронта осуществляется метрологический анализ поверхностей микроэлектромеханических элементов [22]. В отличие от других методов, например сканирующей электронной или атомно-силовой микроскопии, цифровая голография позволяет моментально получить информацию о большой области поверхности образца, кроме того благодаря численным методам имеется возможность сдвига плоскости фокусировки. Цифровая

голография успешно используется и при решении других задач метрологии, например для контроля точности наноперемещений [23], формы деталей [24] и качества поверхностей [25]. Для контроля качества изготовления оптических элементов также обычно используются интерференционные методы, позволяющие детектировать и анализировать их дефекты [26]. Помимо оптических элементов цифровая голография может быть использована для анализа волноводов [27], качество передачи данных в которых сильно зависит от распределения показателя преломления. Использование помимо интерференционных методов пространственных модуляторов света позволяет также создавать высокоэффективные системы адаптивной оптики, позволяющие в соответствии с конкретными задачами менять форму волнового фронта в реальном времени [28]. Более того цифровая голография позволяет проводить детальный анализ формы пучка, что может быть использовано для оценки качества пучка лазерного излучения [29].

Многие задачи физики также могут быть решены с использованием алгоритмов восстановления амплитуды и фазы волнового фронта. Методы цифровой голографии широко используются при анализе распределений частиц и вычислении их скорости движения [30]. Полученные данные в свою очередь позволяют извлекать информацию о потоках газов и жидкостей [31].

Численные методы позволяют также восстанавливать удаленные от плоскости регистрации объекты и реализовывать системы автоматического распознавания объектов [32]. Кроме того, использование пространственных модуляторов света позволяет восстанавливать трехмерные изображения объектов после записи их цифровых голограмм [33].

Наряду с техническими приложениями, методы цифровой голографии широко используются в области биологии и медицины. Подробный обзор работ в этой области представлен в разделе 1.3.

1.2. Современное состояние внеосевой цифровой голографии

1.2.1. Методы регистрации внеосевых цифровых голограмм

На сегодняшний день существует множество методов восстановления волнового фронта, обладающих различными особенностями и сферами применения. Один из самых широко используемых подходов предполагает регистрацию внеосевой цифровой голограммы, то есть картины интерференции опорной и предметной волн в полосах конечной ширины.

Для этого могут быть использованы различные виды оптических схем, например интерферометр Майкельсона, используемый для работы с отражающими объектами или интерферометры Маха-Ценднера и Релея, позволяющие записывать цифровые голограммы волновых фронтов, прошедших через прозрачные или полупрозрачные объекты (рис. 1.1(а,б)). Также были разработаны оптические схемы представляющие собой их комбинацию и позволяющие регистрировать одновременно цифровые голограммы, как прошедшего, так и отраженного волновых фронтов для получения более полной информации об исследуемом объекте [34](рис. 1.1(в)). В представленных схемах могут быть использованы как источники лазерного излучения с высокой степенью временной и пространственной когерентности, так и источники частично-когерентного света [35], например светодиоды. В последнем случае, как правило, требуется прецизионная юстировка оптической установки для достижения равенства оптических путей предметной и опорной волн. С другой стороны низкая степень пространственной и временной когерентности позволяет повысить пространственное разрешение и улучшить качество получаемых распределений фазы и амплитуды.

Важнейшим критерием качества интерференционной картины, как известно, является ее контраст, который может быть определен с использованием фор-

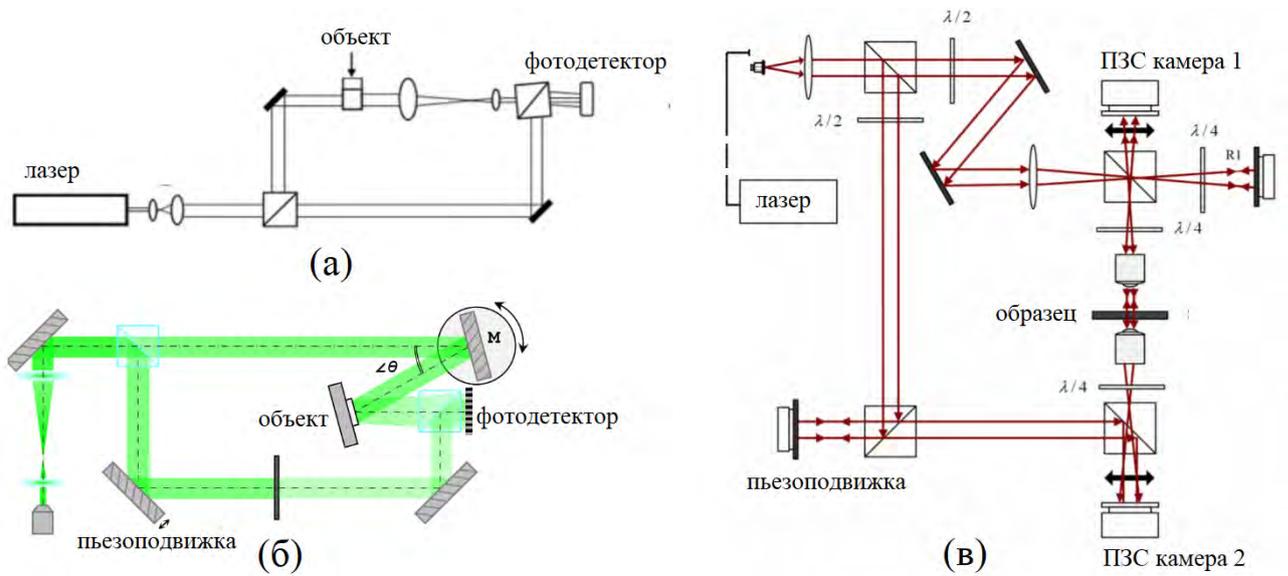


Рис. 1.1. Примеры оптических установок для записи цифровых голограмм (а) на пропускание [36], (б) на отражение [37], (в) комбинированная цифровая голография [34].

мулы (1.1):

$$V = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (1.1)$$

Максимальный контраст интерференционной картины достигается при параллельной поляризации опорной и предметной волн, равенстве их амплитуд, а также полной когерентности. Ввиду этого, для достижения наибольшего качества восстановления предметной волны необходимо использовать источники лазерного излучения с высокой степенью когерентностью. При использовании же светодиодов нередко в оптическую схему добавляются поляризаторы для достижения наилучшего контраста [35].

Помимо достижения высокого контраста для успешного восстановления цифровой голограммы необходимо также проследить за тем, чтоб период интерференционной картины превышал удвоенный размер минимального светочувствительного элемента используемого фотоприемника. Это требование возникает при рассмотрении цифровой голограммы как дискретного сигнала с периодом дискретизации равным размеру минимального светочувствительного элемента, кодирующего аналоговый сигнал (интерференционную картину). Теорема Котельникова, сформулированная в 1933 году, гласит, что любая функция

$f(t)$ состоящая из частот от θ до f_c , может быть представлена с любой точностью при дискретизации с частотой $1/2f_c$ [38]. Если при работе с голографическими пластинками и высокоразрешающими фотопленками пространственное разрешение фоточувствительных материалов могло достигать шести тысяч линий на миллиметр, то в случае современных матричных фотоприемников размер одного пикселя, как правило, составляет порядка 3-5 мкм. Это накладывает определенные ограничения на максимальный угол между предметной и опорной волнами при регистрации цифровых голограмм (1.2.2)

$$\sin(\alpha_{max}) = \frac{\lambda}{2\Delta X} \quad (1.2)$$

Так в случае использования He-Ne лазера с $\lambda = 632,8$ нм и ПЗС матрицы с $\Delta X = 4,65$ мкм $\alpha_{max} \approx 3,9^\circ$. Нужно отметить, что нарушение теоремы Котельникова не приводит к полной невозможности восстановления цифровой голограммы, как было показано в работах [39, 40]. Однако качество восстановления комплексной амплитуды предметной волны существенно уменьшается.

Также при записи цифровой голограммы необходимо помнить о различных источниках шума, прежде всего которыми являются темновой ток фотоприемника и посторонняя засветка. Изучению влияния данных факторов на качество восстановления цифровых голограмм было посвящено несколько работ [41]. Другим специфическим для цифровой голографии фактором, уменьшающим качество получаемых распределений амплитуды и фазы, являются вибрации, приводящие к смещению интерференционных полос. Уменьшить влияние данного источника погрешностей можно за счет повышения виброизоляции или уменьшения времени экспозиции [42]. При использовании лазерного излучения возможно возникновение спекл-шума, который также может быть уменьшен различными путями [43, 44].

1.2.2. Методы восстановления внеосевых цифровых голограмм

После записи цифровой голограммы необходимо провести ее восстановление, то есть найти двумерные распределения амплитуды и фазы предметной волны, при этом обычно считается, что опорная волна является плоской. На сегодняшний день существует несколько принципиально различных подходов к процессу восстановления голограммы, для рассмотрения основных принципов их работы представим предметную и опорную волну двумерными комплексными функциями $A(x, y) \cdot \exp(i\varphi(x, y))$ и $B(x, y) \cdot \exp(i\phi(x, y))$ соответственно. В общем случае фаза плоской опорной волны интерферирующей с предметным волновым фронтом под углом α по оси X и углом β по оси Y может быть описана выражением (1.3).

$$\phi(x, y) = 2\pi \left(\frac{x \cdot \sin(\alpha)}{\lambda} + \frac{y \cdot \sin(\beta)}{\lambda} \right) \quad (1.3)$$

В связи с малым значением углов и трудностью их измерения непосредственно в экспериментальной установке, значения α и β могут быть найдены в результате анализа цифровой голограммы с помощью уравнения, как это сделано в работе [45]. Интерференционная картина, регистрируемая на матричный фотоприемник представляет собой распределение интенсивности, описываемое формулой (1.4)

$$I(x, y) = (|A|^2 + |B|^2) + AB \cdot \exp(i\varphi) \cdot \exp(-i\phi) + AB \cdot \exp(-i\varphi) \cdot \exp(i\phi) \quad (1.4)$$

Правая часть уравнений представляет собой сумму трех слагаемых выражающих вклады нулевого, первого и минус первого дифракционных порядков соответственно. Задача цифровой голографии сводится к нахождению комплекснозначной функции первого или минус первого дифракционного порядка.

Один из возможных методов восстановления цифровых голограмм предполагает разделение данных дифракционных порядков с помощью использования Фурье преобразования [46]. Действительно, применим оператор Фурье преобразования к обеим частям уравнения (1.4) и воспользуемся теоремой о свертке

для второго и третьего слагаемого:

$$\mathbf{F}[I(x, y)] = \mathbf{F}[(A^2 + B^2)] + \mathbf{F}[AB \cdot e^{i\varphi}] \otimes \mathbf{F}[e^{-i\phi}] + \mathbf{F}[AB \cdot e^{-i\varphi}] \otimes \mathbf{F}[e^{i\phi}] \quad (1.5)$$

Рассмотрев выражение $\mathbf{F}[\exp(-i\phi)]$ и подставив распределение фазы плоской опорной волны из уравнения (1.3) получим:

$$\mathbf{F}[\exp(-i2\pi(\frac{x \cdot \sin(\alpha)}{\lambda} + \frac{y \cdot \sin(\beta)}{\lambda}))] = \delta(f_x - \eta, f_y - \xi) \quad (1.6)$$

Где $\eta = \sin(\alpha)/\lambda$ и $\xi = \sin(\beta)/\lambda$ - координаты в Фурье пространстве, зависящие только от углов между опорной и предметной волнами и длины волны. Таким образом, в Фурье пространстве происходит разделение дифракционных порядков. При этом центр нулевого дифракционного порядков находится в координатах (0;0) Фурье пространства, а центрам первого и минус первого порядков соответствуют координаты. $(\sin(\alpha)/\lambda; \sin(\beta)/\lambda)$ и $(-\sin(\alpha)/\lambda; -\sin(\beta)/\lambda)$.

На рисунке 1.2(а,б) представлен пример цифровой голограммы фазового объекта, а также результат Фурье преобразования. Вырезав один из дифракционных порядков, так чтобы его центру соответствовали координаты (0;0) Фурье пространства, и сделав обратное преобразование Фурье можно получить комплекснозначную функцию, соответствующую предметной волне. Результат восстановления фазового распределения из цифровой голограммы представлен на рисунке 1.2(в). Стоит заметить, что в данном случае происходит восстановление амплитуды и фазы предметной волны в плоскости ПЗС матрицы. В общем случае вследствие дифракции в свободном пространстве восстановленная волна не совпадает с волновым фронтом в плоскости объекта. Для нахождения распределений амплитуды и фазы волнового фронта в плоскости объекта могут быть использованы методы численного распространения или внедрение телескопической системы в предметное плечо [45].

Несколько иной метод восстановления цифровых голограмм обычно используется если объект удален от ПЗС матрицы на достаточно большое расстояние и необходимо провести восстановление волнового фронта в плоскости

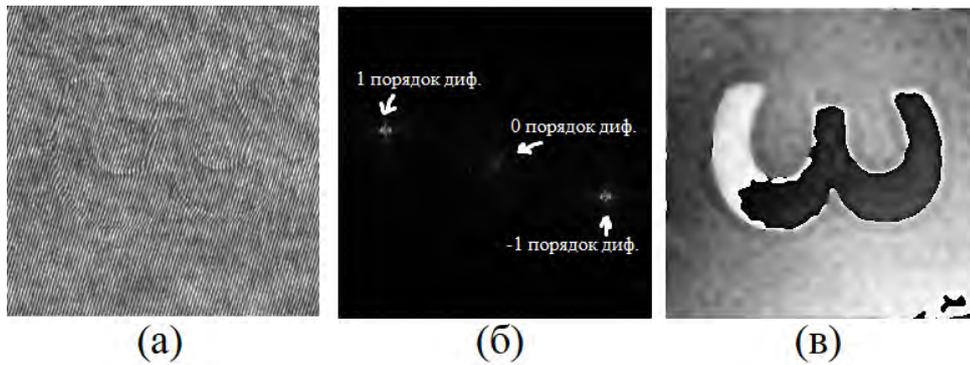


Рис. 1.2. (а) - исходная внеосевая цифровая голограмма, (б) - результат применения двухмерного преобразования Фурье, (в) - результат восстановления фазового распределения.

объекта. В таком случае процесс численного восстановления представляет собой точную копию процесса восстановления обычной голограммы [47]. В последнем случае необходимо осветить голографическую пластинку опорной волной в результате чего, изображение объекта будет восстановлено точно в том месте, где объект был установлен в ходе записи голограммы. В терминах численной обработки, освещению голограммы опорной волной соответствует умножение распределения интенсивности зарегистрированной интерференционной картины (см. формулу (1.4)) на комплексную функцию плоской опорной волны (формула (1.3)). Затем необходимо провести операцию численного распространения волнового фронта на расстояние равное дистанции между объектом и ПЗС матрицей во время записи цифровой голограммы. Для этого может быть использовано преобразование Френеля или метод свертки. Эти алгоритмы численного распространения волнового фронта будут рассмотрены далее. В случае бесконечного расстояния между объектом и плоскостью ПЗС матрицы (этот случай может быть реализован с помощью собирающей линзы [48]) вместо распространения волнового фронта на конечное расстояние может быть использовано преобразование Фурье, моделирующее распространение волны на бесконечное расстояние [39]. В результате этого происходит восстановление объектной волны в одном из дифракционных порядков.

Третий метод основан не на использовании интегральных преобразований,

а на решении множества переопределенных систем уравнений, решение которых позволяет найти амплитуду и фазу предметной волны в каждой точке плоскости ПЗС матрицы [49]. Ключевым предположением данного метода является допущение медленно меняющихся амплитуды опорной B и предметной A волн, а также фазы предметной волны φ по сравнению с быстро осциллирующей интенсивностью интерференционной картины I и фазы опорной волны ϕ . Данное допущение соблюдается практически во всех реальных случаях, так как структуры реальных объектов как правило представляют собой достаточно плавно меняющиеся распределения показателей поглощения и преломления по сравнению с периодом интерференционных картин. Приняв эти допущения, рассмотрим теперь один пиксель цифровой голограммы и построим вокруг него квадратную область размера $N \times N$ пикселей. Для каждого пикселя в рассматриваемой области может быть записано уравнение интерференции (1.4). При этом ввиду допущения медленно меняющихся B , A и φ можно предположить, что эти величины остаются постоянными в рамках данной области. Тогда, учитывая известные значения интенсивности интерференционной картины I и фазы смоделированной опорной волны ϕ (см. формулу (1.3)) для каждого пикселя, мы получим систему из N^2 уравнений с тремя неизвестными величинами: B , A и φ . Решение такой переопределенной системы уравнений можно свести к задаче минимизации функции 1.7:

$$\sum_{m=1}^{N^2} \omega_m |I^2 - |A \exp(i\varphi) + B \exp(i\phi_m)|^2|^2 \quad (1.7)$$

Здесь каждое слагаемое представляет собой правую и левую части уравнения интерференции, которое при верно подобранных значениях неизвестных величин стремится к нулю. Весовой множитель ω_m , представляющий собой, например распределение Гаусса, спадает от центра к краям, смягчая предположение постоянства параметров B , A и φ у границ рассматриваемой области. Так образом, в результате построения области вокруг каждого пикселя цифровой голограммы и минимизации этой функции 1.7 можно получить значения амплитуды

и фазы предметной волны в каждой точке.

1.2.3. Методы обработки и распространения волновых фронтов

С помощью описанных выше численных методов восстановления цифровых голограмм может быть найдено двумерное распределение амплитуды и фазы волнового фронта. Точность получаемых данных напрямую зависит от контраста интерференционных полос, соотношения сигнал/шум в ходе записи цифровой голограммы и степени дискретизации сигнала интенсивности в каждом пикселе (для большинства современных цифровых камер обычно интенсивность каждого пикселя представляется 8 битами, что соответствует 256 оттенкам серого). Во многих приложениях цифровой голографии невозможно достигнуть идеальных условий регистрации интерференционной картины, вследствие чего после процедуры восстановления волнового фронта нередко используются различные дополнительные методы обработки.

Для улучшения качества двумерных распределений амплитуды волнового фронта зачастую применяются стандартные методы, используемые при обработке изображений и сигналов в других областях науки и техники [50]. Так уменьшить влияние шума можно с помощью матриц свертки [51] или методов разреженного представления изображений [52], также весьма продуктивным методом устранения некоторых дефектов и анализа полученных результатов является использование вэйвлетов [43].

При обработке фазовых распределений ситуация зачастую осложняется тем, что фаза электромагнитной волны определена всегда с точностью до аддитивной величины $2\pi n$, где n - любое целое число. В связи с этим после численного восстановления цифровой голограммы распределение фазы будет представлять собой набор значений в диапазоне от 0 до 2π . В случае если перепады фазы волнового фронта превышали 2π , в полученных данных будут иметься так называемые разрывы фазы - области резкого изменения фазы на 2π радиан [53]. Для получения абсолютных значений фазы, то есть непрерывного фазового

распределения без разрывов, необходимо провести операцию развертки [54]. В простейшем случае эта процедура сводится к последовательному сканированию изображения, увеличению значения последующего пикселя на 2π , если происходит резкий скачок вниз или уменьшению значения данного пикселя на 2π радиан если произошел скачок вверх.

В связи с тем, что восстановленная фаза как правило имеет 2π -разрывы, использование обычных методов обработки изображений не всегда приводит к желаемому результату. Так, например, в результате сглаживания не развернутого фазового распределения неизбежно произойдет также и сглаживание скачков фазы, что значительно искажает экспериментальные данные. Этого можно избежать, если применять методы фильтрации не к самому фазовому распределению, а например к двумерным распределениям функций синуса и косинуса от фазы волнового фронта. После требуемой обработки этих распределений фаза волнового фронта может быть найдена через функцию арктангенса [55]. С другой стороны, дополнительная обработка фазовых распределений может проводится после операции развертки фазового распределения. В настоящее время существует несколько методов развертки фазы: одни из них основаны на регистрации дополнительных экспериментальных данных [56], другие предполагают использование численной обработки имеющегося фазового распределения [57, 58]. Основные сложности с разверткой возникают при наличии областей сингулярности на восстановленном фазовом распределении. Подобные явления могут возникать как из-за дефектов на цифровой голограмме, когда, например, в какой-то ее области по той или иной причине не наблюдается интерференционных полос вовсе, либо когда в предметной волне действительно имеются точки сингулярности. Последний случай может иметь место, например, в случаях прохождения волнового фронта через объект, обладающий резкими перепадами высот в рельефе толщины или показателе преломления. Основным различием вышеупомянутых методов развертки фазовых распределений является метод нахождения таких сингулярностей и алгоритм обработки фазы в их окрестно-

сти.

Другим важным аспектом обработки фазовых распределений является нахождение их разности. Вследствие несовершенства оптической системы, как правило, в результате восстановления цифровой голограммы даже в отсутствие объекта волновой фронт представляет собой не идеально плоскую волну. В таком случае при внесении объекта в предметное плечо интерферометра фазовое запаздывание будет обусловлено не только свойствами объекта, но и параметрами оптической схемы. В таком случае для получения корректных данных о фазовом сдвиге, внесенном исследуемым объектом, необходимо найти разность фазовых распределений при наличии и отсутствии данного объекта [59]. Существует несколько алгоритмов выполнения данной операции [60–62]. Наиболее прямой метод предполагает осуществление развертки двух фазовых распределений и последующее вычитание двумерных массивов. С другой стороны, данная операция может быть осуществлена благодаря использованию формулы (1.8):

$$\Delta\varphi_{AB} = \arctan\left(\frac{\Im A\Re B - \Im B\Re A}{\Im A\Im B + \Re A\Re B}\right) = \arctan\left(\frac{tg\varphi_1 - tg\varphi_2}{1 + tg\varphi_1 tg\varphi_2}\right) \quad (1.8)$$

В таком случае предварительная развертка фазовых распределений не требуется [60]. Также вычисление разности фазовых распределений необходимо при изучении динамических процессов или явлений связанных с изменением характеристик исследуемого объекта, например при изучении распространения упругих волн в твердотельных волноводах [63] или для нахождения изменения объема биологических образцов [64].

Современные вычислительные методы помимо возможности восстановления амплитудного и фазового распределения волнового фронта в плоскости ПЗС матрицы также позволяют распространять комплексную волну в любую другую плоскость, в том числе и плоскость объекта [65]. Это активно используется при отслеживании перемещений микроорганизмов [66], а также при исследовании распределений координат [67] и скоростей [68] микрочастиц. Также данные алгоритмы позволяют менять плоскость фокусировки уже после ре-

гистрации цифровой голограммы, что может быть использовано, например, в микроскопии [69]. Кроме того, численное распространение волнового фронта активно используется в некоторых методах восстановления цифровых голограмм. Таким образом, данная область неразрывно связана с цифровой голографией и ее приложениями, вследствие чего необходимо привести некоторые базовые сведения об основных существующих алгоритмах распространения волновых фронтов.

Главным принципом современной скалярной теории дифракции и численных методов распространения волнового фронта является принцип Гюйгенса-Френеля, [48] который утверждает, что поле в некоторой удаленной плоскости формируется множеством сферических волн, испускаемых из исходной плоскости. В наиболее общем случае математическая формулировка этого утверждения, справедливая при распространении комплексной волны на расстояние много большее длины волны может быть записана в виде уравнения Релея-Зоммерфельда (1.9).

$$u(x, y, l) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(i2\pi r/\lambda)l}{i\lambda r^2} u_0(x', y') dx' dy' \quad (1.9)$$

В ситуациях, когда расстояние распространения волнового фронта $l \gg \frac{D^{\frac{4}{3}}}{2\lambda^{\frac{1}{3}}}$ уравнение (1.9) можно упростить и получить выражение описывающее дифракцию Френеля (1.10).

$$u(x, y, l) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(ikl)l}{i\lambda l} \exp\left[i\frac{\pi}{\lambda l}[(x-x')^2 + (y-y')^2]\right] u_0(x', y') dx' dy' \quad (1.10)$$

Дальнейшее упрощение позволяет получить уравнение описывающее дифракцию Фраунгофера справедливую при выполнении условия $l \gg \frac{D^2}{\lambda}$ (1.13).

$$u(x, y, l) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(ikl)l}{i\lambda l} \exp\left[i\frac{\pi}{\lambda l}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[-\frac{2\pi i}{\lambda l}(xx' + yy')\right] u_0(x', y') dx' dy' \quad (1.11)$$

Также дифракция в свободном пространстве может быть вычислена с помощью двумерного Фурье преобразования [48]:

$$U(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} \exp[-2\pi i(f_x x + f_y y)] u_0(x', y') dx' dy' \quad (1.12)$$

Здесь f_x и f_y представляют собой пространственные частоты - координаты Фурье пространства. Они задают направления распространения пространственных частот - плоских волн, распространяющихся под различными углами к направлению движения волнового фронта. Для расчета дифракционной картины на расстоянии l следует умножить Фурье спектр волны на передаточную функцию $H(f_x, f_y, l)$

$$H(f_x, f_y, l) = \exp\left[i \frac{2\pi l}{\lambda} \sqrt{1 - \lambda^2(f_x^2 + f_y^2)}\right], \quad (1.13)$$

после чего необходимо вновь вернуться в реальное пространство, используя обратное преобразование Фурье. В ходе численной реализации данных алгоритмов интегралы заменяются суммированием по всем пикселям распределений амплитуды и фазы волнового фронта. Последний метод чрезвычайно удобен, так как Фурье преобразование обладает меньшей вычислительной сложностью нежели решение, например, уравнения Релея-Зоммерфельда.

1.2.4. Современное состояние внеосевой цифровой голографии

В настоящее время существует огромное количество различных направлений развития и совершенствования методов записи и восстановления внеосевых цифровых голограмм. Многие из них связаны с улучшением различных характеристик данного метода, таких как пространственное и временное разрешение, чувствительность и точность измерений фазы, стабильность работы в полевых условиях и т.п. Другие аспекты современного развития цифровой голографии связаны с записью и восстановлением цифровых голограмм, записанных на различных длинах волн, регистрации цифровых голограмм в раз-

личных спектральных диапазонах, использовании алгоритмов томографии для обработки полученных данных и т. п.

Как и любой физический метод, позволяющий проводить те или иные измерения, цифровую голографию можно охарактеризовать такими параметрами как чувствительность, временное и пространственное разрешение. Эти величины зависят как от характеристик экспериментальной установки, так и от особенностей алгоритмов обработки полученных данных.

В настоящее время при использовании восьмибитных матричных фотоприемников фаза предметной волны обычно может быть восстановлена с точностью $2\pi/150 - 2\pi/100$ радиан. В работе [70] было продемонстрировано восстановление фазы с временной стабильностью достигающей $2\pi/1800$ радиан. Динамический диапазон измерений (как и чувствительность) напрямую зависит от длины волны используемого излучения, но может быть расширен благодаря использованию подхода синтетической длины волны [71].

Высокое временное разрешение может быть достигнуто как за счет использования принципов стробоскопии [72], так и благодаря записи нескольких цифровых голограмм с малым шагом по времени в одном кадре [73]. Совершенствование лазерных источников сверхкоротких импульсов сделало возможным изучение динамических процессов голографическими методами с фемтосекундным разрешением [74, 75]. Однако использование фемтосекундных лазерных импульсов приводит к некоторому ухудшению интерференционной картины ввиду относительно широкого спектрального состава таких импульсов, а также к невозможности получения цифровой голограммы одновременно во всей области регистрации матричного фотоприемника, ввиду малой области перекрытия сверхкоротких импульсов [76]. В настоящее время благодаря применению методов накачка-зондирование и цифровой голографии удается исследовать широкий спектр быстрых процессов, например, лазерную абляцию [77], эволюцию распределения плазмы, индуцированной лазерным импульсом [78], распространение упругих волн в твердотельных волноводах [79], а также взаимодействие

ударных волн [73]. Также несколько работ было посвящено ускорению процессов обработки цифровых голограмм, для получения информации об амплитуде и фазе предметной волны в режиме реального времени [80, 81]. Еще одно интересное приложение импульсной цифровой голографии - возможность наблюдения распространения коротких импульсов света благодаря введению задержки между импульсами опорного и предметного пучков. В таком случае интерференционная картина содержит информацию о результате интерференции лишь некоего слоя предметной волны, что делает возможным восстановление волнового фронта полностью, путем регулирования задержки [82, 83].

Пространственное разрешение цифровой голографии является определяющим фактором возможности исследования данной группой методов микроскопических объектов, в том числе живых клеток и микроорганизмов. Этот параметр для большинства используемых в настоящее время голографических микроскопов близок к дифракционному пределу обычной микроскопии дальнего поля и может быть оценен формулой:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\varphi)} = \frac{\lambda}{2N_A}, \quad (1.14)$$

Здесь N_A - числовая апертура объектива. Использование современных микроскопов с масляной иммерсией позволяет достигнуть пространственного разрешения порядка 140 нм. Однако стоит отметить, что данный параметр относится к распределению интенсивности регистрируемому на фото детектор. При работе с внеосевыми цифровыми голограммами пространственное распределение фазового и амплитудного распределений будет всегда хуже данной величины. Это легко увидеть при восстановлении интерференционной картины с помощью Фурье преобразования (см. раздел 1.2.2). Количество пространственных частот, в вырезаемой области первого или минус первого дифракционного порядков будет всегда меньше полного количества частот в Фурье спектре. Соответственно пространственное разрешение восстановленной предметной волны будет заведомо меньше, чем пространственное разрешение принципиально достижимое

данной оптической системой.

Однако использование некоторых других подходов, например метода фазовых шагов не приводит к ухудшению пространственного разрешения в фазовом распределении по сравнению с пространственным разрешением оптической системы. Таким образом, в цифровой голографии данный параметр зависит не только от характеристик экспериментальной установки, но также и от методов последующей обработки полученных данных.

Одним из важнейших подходов с помощью которых может быть улучшено пространственное разрешение является метод синтетической апертуры. Данный подход предполагает искусственное увеличение количества обрабатываемой информации путем регистрации нескольких цифровых голограмм с разных точек наблюдения объекта [84]. В результате объединения полученных цифровых голограмм с начальной ограниченной апертурой в один набор данных имеющий увеличенную апертуру удается достичь улучшения качества восстановленного изображения. При этом пространственное разрешение возрастает прямо пропорционально количеству зарегистрированных цифровых голограмм, а увеличение размера синтезированной апертуры по определенной оси будет проявляться в увеличении разрешения объектов также в направлении этой оси [85]. На сегодняшний день существуют методы, позволяющие регистрировать и восстанавливать сразу несколько внеосевых цифровых голограмм в одном кадре, что позволяет сохранить высокое временное разрешение и избежать дополнительного усложнения оптической системы [86].

Своеобразным развитием метода синтетической апертуры сегодня стали 2π -голографическая микроскопия и голографическая томография. Оба этих метода предполагают регистрацию дополнительной информации об объекте, но не путем расширения угла обзора детектора, а благодаря изменению угла падения предметной волны на объект. Для экспериментальной реализации данной концепции можно производить вращение как самого объекта [87, 88], так и целой установки [89]. Однако наиболее популярным подходом стало исполь-

зование двух микрообъективов с высокими числовыми апертурами установленных навстречу друг к другу. В такой конфигурации параллельный сдвиг пучка на входе в один из микрообъективов приводит к изменению угла падения на объект. В методе 2π голографической микроскопии происходит сканирование образца путем вращения пучка в плоскости перпендикулярной главной оптической оси. В совокупности восстановленные голограммы в Фурье пространстве заполняют информацией гораздо большую область пространственных частот, чем могло бы быть достигнуто без вращения зондирующей волны. Это позволяет восстановить амплитуду и фазу предметной волны со значительно лучшим пространственным разрешением достигающим 90 нм [90].

Сканирование по углу в плоскости параллельной главной оптической оси позволяет регистрировать набор цифровых голограмм и получить из них набор проекций интегральных фазовых набегов из которых затем может быть произведено восстановление трехмерного распределения показателя преломления методом компьютерной томографии. Несмотря на то, что для наиболее качественного восстановления данных требуется производить сканирование по углам в диапазоне 180 градусов, а числовая апертура современных микрообъективов позволяет использовать лишь диапазон в 124 градуса [91], имеется немало работ, показывающих, что благодаря правильной обработке полученных данных можно добиться качественного восстановления трехмерного показателя преломления [92]. На сегодняшний день существует несколько алгоритмов для обработки проекций интегральных фазовых набегов, отличающихся как качеством восстановления данных так и простотой реализации и вычислительной сложностью [93, 94]. В голографии наиболее часто используются алгоритм обратного распространения [95] и метод предполагающий восстановление трехмерного распределения показателя преломления с помощью Фурье преобразования [96]. Помимо изменения угла падения волнового фронта могут быть использованы также и другие томографические методы [97]. Так недавно был предложен метод восстановления трехмерного распределения показателя преломления с

использованием частично когерентного излучения и регистрации данных с фокусировкой в различных плоскостях объекта [98]. При этом вращение образца или голографической установки не требуется.

Голографическая томография находит широкое применение в физике, позволяя восстанавливать температурные градиенты [99], распределение показателя преломления в оптическом волокне [100], или анализировать плотность вещества в различных точках пространства [101]. Однако по-видимому наиболее перспективными направлениями использования данной группы методов являются области биологии и медицины.

Одним из направлений развития современных методов цифровой голографии является восстановление амплитуд и фаз с использованием излучения на нескольких длинах волн. При восстановлении голограмм на отражение записанных в дальней зоне таким образом удается восстанавливать цветные изображения объектов, как это было продемонстрировано в работе [102]. При этом дифракционные порядки, соответствующие интерференции различных длин волн, можно расположить в Фурье пространстве таким образом, чтобы они не накладывались друг на друга и в этом случае из одной цифровой голограммы могут быть восстановлены несколько фазовых распределений [103, 104]. При этом для получения цифровых голограмм на нескольких длинах волн могут быть использованы как несколько лазеров [104], так и перестраиваемые по длине волны источники излучения [105]. В работах [104, 106] было показано, что использование излучения разной частоты и применение концепции синтезированной длины волны предоставляет возможность альтернативного решения задачи развертки фазы и расширения динамического диапазона так, что появляется возможность измерения резких перепадов высоты значительно превосходящих длину волны. Также восстановление фазовых распределений волновых фронтов на разных длинах волн может быть использовано для экспериментального измерения дисперсионной кривой и апробации аналитических зависимостей, как это было сделано в работах [105, 107] при исследовании живых клеток. При этом

несколько работ были направлены на рассмотрение алгоритмов для компенсации хроматических аберраций микро-объективов существенно искажающих фазовое распределение волновых фронтов на разных длинах волн [108, 109]

Кроме того, на сегодняшний день многие работы посвящены восстановлению амплитуды или фазы волнового фронта в других спектральных диапазонах, где методы внеосевой голографии используются реже. Так, например, недавно было продемонстрировано восстановление амплитуды и фазы волнового фронта с помощью итерационных методов с использованием низкоэнергетного источника излучения на длине волны 285 нм [110]. Внеосевая цифровая голография в дальнем ультрафиолетовом диапазоне (193 нм) использовалась для наблюдения микроорганизмов и детектирования дефектов в массивах микролинз [111]. Кроме того, интерференционные методы в рентгеновском диапазоне длин волн широко используются в области кристаллографии и в некоторых случаях позволяют достичь разрешения в несколько десятых долей нанометра. Ряд работ был посвящен реализации различных методов восстановления волнового фронта в инфракрасном [112], микроволновом [113] и терагерцовом [114] диапазонах длин волн.

Несколько работ было посвящено анализу и устранению ошибок и погрешностей различного рода в цифровой голографии и голографической томографии [99, 115, 116]. Также были опубликованы результаты сравнения экспериментальных установок [117] и методов восстановления внеосевых цифровых голограмм [118].

1.3. Применение методов цифровой голографии в биологии и медицине

Среди широкого спектра приложений методов цифровой голографии особое место занимает их использование для изучения биологических объектов. В связи с тем, что цифровая голография является бесконтактным методом, не тре-

бующим использования интенсивного электромагнитного излучения, данный подход нашел широкое применение при изучении живых объектов. Действительно, с точки зрения биологии цифровая голография, в отличие от традиционной микроскопии, позволяет получать информацию как о показателе поглощения исследуемого объекта, так и о коэффициенте преломления. Таким образом, развитие методов восстановления волнового фронта сделало возможным получение информации о свойствах объекта, не поддававшихся тщательному изучению вплоть до второй половины двадцатого века.

1.3.1. Экспериментальные методы цифровой голографической микроскопии

Вероятно, первым из методов визуализации показателя преломления биологических образцов стал метод фазового контраста Цернике [119], получивший широкое распространение во второй половине двадцатого века. В фазово-контрастной микроскопии помимо самого микрообъектива используется специальная пластина, которая вносит фазовое запаздывание в опорный пучок, не рассеянный на образце. В результате в плоскости изображения происходит интерференция опорной волны и волны, рассеянной на образце (предметной волны). Таким образом, интенсивность получаемого изображения зависит от распределения показателя преломления вещества в образце, что позволяет получить контрастное изображение без использования окрашивания. Однако данный подход в отличие от методов цифровой голографии не позволяет получить количественные данные о фазовом набеге волны прошедшей через объект. В то же время во многих случаях именно количественные данные позволяют объективно описывать те или иные параметры клетки и процессы, протекающие в ней.

На сегодняшний день разработано множество различных оптических схем цифровых голографических микроскопов, основные из которых представлены на рисунке 1.3 [120]. При этом, как было показано в работах [121, 122] про-

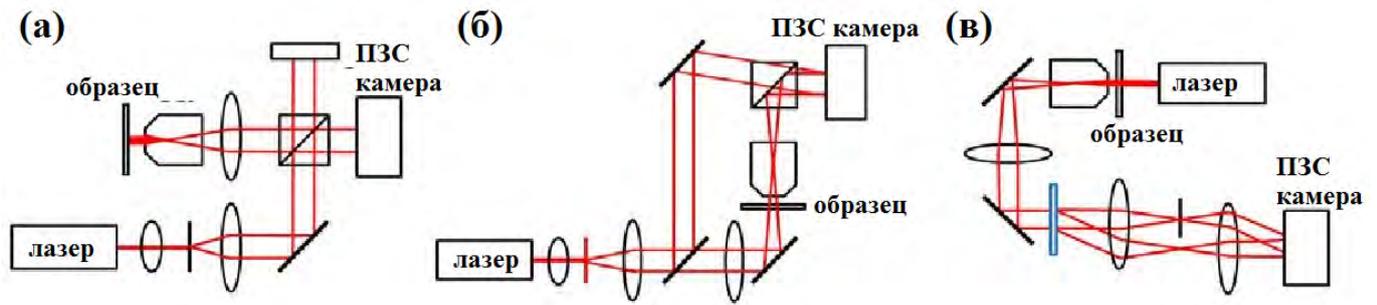


Рис. 1.3. Примеры схем оптических установок для реализации методов цифровой голографической микроскопии [120].

пространственное разрешение достаточно сильно зависит от параметров экспериментальной схемы и алгоритма восстановления. Основными компонентами голографического микроскопа являются микрообъектив и линза, коллимирующая расходящийся волновой фронт и строящая изображение объекта в плоскости фотоприемника. При этом увеличение оптической системы определяется отношением фокусных расстояний этих линз, в то время как пространственное разрешение в основном зависит от числовой апертуры микрообъектива.

В настоящее время выделилось несколько обособленных направлений посвященных использованию методов цифровой голографии в различных областях биологии и медицины.

1.3.2. Исследование эритроцитов, нейронов и стволовых клеток методами голографической микроскопии

Одним из таких направлений является изучение посредством цифровой голографии красных кровяных телец, их формы, размера и упругих свойств. Как известно эритроциты являются важнейшими индикаторами различных заболеваний, например, эритробластической анемии [123, 124]. Также объем эритроцитов отклоняется от нормального значения при наличии у пациента анемии или недостатка витамина B12 или солей фолиевой кислоты [125]. Кроме того, имеются сведения о том, что показатель преломления красных кровяных телец также зависит от концентрации в них гемоглобина [126]. Таким образом, на

основе измерения объема и показателя преломления эритроцитов может быть проведена диагностика некоторых заболеваний [127]. Использование оптического пинцета наряду с голографическими методами также позволяет получать различные проекции интегрального фазового набегу красных кровяных телец [128] и получать трехмерные распределения показателя преломления с помощью голографической томографии [129].

На основе формы и морфологических особенностей в работе [130] было выделено три типа эритроцитов: двояковогнутые эритроциты, эритроциты в виде плоских дисков и сфероциты. Проведенные исследования подтвердили, что морфология эритроцитов претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологиях другого рода и отражает общее состояние всего организма.

Благодаря параллельному использованию конфокального и голографического микроскопа удалось измерить толщину эритроцитов, а также вычислить их средний показатель преломления и объем [131]. В другой работе той же группой авторов было произведено измерение амплитуды колебаний мембраны нормальных эритроцитов и клеток, фиксированных в этаноле [132]. Стоит отметить, что проведение подобных точных измерений другими бесконтактными методами оказалось весьма затруднительным. Использование методов цифровой голографии также позволило наблюдать быстрое изменение формы красных кровяных телец при соприкосновении с некоторыми поверхностями, что вероятно было вызвано изменением структуры белков мембраны эритроцитов [133].

Другой областью использования интерференционных методов является измерение толщины различных структур глаза [134]. Это позволяет диагностировать и определять степень развития таких патологий как катаракта глаза, что позволяет повысить качество лечения [135], а также оценить его результаты [136].

Несколько работ было посвящено изучению нейронов голографическими

методами. Помимо традиционных исследований направленных на измерение морфологических характеристик данных клеток, с помощью анализа полученных фазовых изображений удастся визуализировать трансмембранную диффузию воды [137], а также измерять токи, ответственные за передачу сигнала [138]. Последнее становится возможным благодаря фазовому сдвигу, индуцированному потоками ионов. Данное уникальное явление изменения собственного показателя преломления нервными клетками в процессе активности может быть впоследствии использовано для неинвазивного изучения их взаимодействия в нейронной сети [139]. В работе [60] Рыбников вместе с коллегами также показали возможность использования цифровой голографии для изучения реакции клеток гиппокампа мозга мыши на внешние раздражители. В частности при добавлении арахидоноил дофамина возникают медленные колебания концентрации кальция с периодом в 30-60 секунд и соответственно колебания фазового набега. Подобные колебания с периодом порядка 100 секунд наблюдались исследователями в условиях гипоксии нервных клеток.

С помощью методов цифровой голографии также наблюдался процесс дифференциации (формирования специализированного фенотипа клеток) 3T3L1 фибробластов в адипоциты и изменения их формы и морфологии в ходе данного процесса. Изучение данного явления в нервных клетках человеческого мозга позволило также выделить некоторые количественные характеристики, присущие дифференцированным и недифференцированным клеткам [140]. В работе [141] исследовались процессы дифференциации клеток промиелоцитарной лейкемии человека в зрелые клетки крови. В ходе этой работы с помощью методов цифровой голографии удалось разделить процессы образования макрофагов, моноцитов и нейтрофилов и обозначить основные морфологические особенности этих видов клеток крови.

1.3.3. Исследование процессов гибели живых клеток

Значительное количество работ было посвящено описанию морфологических изменений клеток во время процессов клеточной смерти с помощью голографических методов. Было установлено, что различные виды клеточной смерти проявляются в виде разных морфологических изменений в клетках и, соответственно, различных изменениях интегрального фазового набегга, получаемого с помощью методов цифровой голографии.

Процессы апоптоза, то есть программируемой клеточной смерти, занимают важное место в поддержании гомеостаза в многоклеточных организмов. Обычно апоптоз характеризуется потерей асимметрии клетки, ее сжатием, фрагментацией ядра и конденсацией хроматина, а также выделением мелких визикул [142]. С точки зрения цифровой голографии этот процесс сопровождается увеличением интегрального фазового набегга, уменьшением площади клетки и ее округлением. Подобные изменения наблюдались в работе [143] при изучении апоптоза клеток рака простаты DU145. А. Хмаладзе и его коллеги наблюдали также значительное уменьшение объема клеток при добавлении в среду стауроспорин [144], что обычно наблюдается при апоптозе [145]. Добавление этого антибиотика в питательную среду приводит также к увеличению фазового набегга и округлению клеток олигодендроцитов [146]. Об аналогичных изменениях в морфологии клеток сообщается также в работе [147].

Некроз чаще всего бывает вызван быстрым ухудшением условий существования клетки. В таком случае в отличие от апоптоза происходит необратимое повреждение мембраны клетки и диффузия ее содержимого вовне. Это возможно, например при воздействии на клетку сильного токсина. Динамика фазового набегга в данном случае была проиллюстрирована Б. Кемпером в его статье [148]. Некроз клеток также может быть вызван воздействием интенсивного электромагнитного излучения. При данном типе смерти клеток наблюдается уменьшение объема клетки сопровождающееся вытеканием содержимого клет-

ки через поврежденную мембрану [149]. Подобный эффект уменьшения объема, интегрального фазового набега и увеличение площади НИН-ЗТЗ фибробластов наблюдался также в работе [150]. Также повреждение мембраны может быть вызвано воздействием на клетку фемтосекундного лазерного излучения. М. Антковяк и его коллеги установили с помощью методов цифровой голографии, что при малых дозах может наблюдаться полное восстановление клетки, однако превышение определенного порогового значения приводит к разрыву мембраны и некрозу [151].

Другим важным процессом жизнедеятельности клетки является процесс митоза или деления клетки. Для наблюдения данного процесса также использовались методы цифровой голографии, с помощью которых удалось подробно описать морфологические изменения раковых клеток поджелудочной железы в процессе их деления в течение 72 часов [143]. На фазовых изображениях четко проявляются стадии округления клетки, конденсация хроматина, разделение дочерних клеток, их постепенное отдаление друг от друга и образование индивидуальной мембраны у каждой из них. Авторы данной работы подчеркивают, что цифровая голография позволила выделить большое количество информации о морфологии клеток в ходе митоза, в частности о форме клеток, их объеме, занимаемой площади и т.п. В другой работе методы цифровой голографии использовались для описания процесса деления клеток в условиях отсутствия гравитации, которые удалось создать с помощью сверхпроводящих магнитов [152]. Авторам удалось выделить различия в поведении клеток при различных условиях гравитации, что вероятно может быть вызвано реорганизацией клеточных структур, цитоскелета и органелл. В работе [153] была показана возможность отслеживания координат клетки во время процесса деления, а также наличие резкого возрастания интегрального фазового набега на первых стадиях митоза. Процессы клеточного роста и развития также неоднократно наблюдались с помощью методов цифровой голографии. Количественное описание данного процесса может быть осуществлено с привлечением такой величины как сухая

масса клетки. Взаимосвязь этого параметра с интегральным фазовым набегом и площадью прикрепления была впервые описана в работе [154]. Так с помощью данной концепции были описан процесс деления дрожжевых клеток [155], установлен экспоненциальный характер роста сухой массы клеток *E. coli* во времени [156], описана связь между подвижностью и ростом клеток дрозофилы *s2* под воздействием поли-L-лизина [157].

1.3.4. Автоматическая классификация и построение траектории движения живых клеток

Помимо возможности получения большого количества информации о морфологических особенностях клеток, методы цифровой голографии наряду с алгоритмами численного распространения волнового фронта позволяют менять плоскость фокусировки после записи цифровой голограммы [158]. В работах [159, 160] были рассмотрены методы автоматической численной фокусировки на один или несколько амплитудных или фазовых объектов. Большинство таких методов основано на расчете некоторой функции резкости, максимум которой соответствует наилучшей фокусировке на данный участок изображения. Обзор и описание некоторых таких функций, а также сопоставление их алгоритмов работы на примере автофокусировки на фазовые объекты были представлены в статье [161]. Также было показано, что неточная фокусировка может привести к значительному искажению данных характеризующих микроскопический объект в цифровой голографии [162].

Несколько исследований было посвящено использованию цифровой голографии для отслеживания перемещений как неорганических частиц, так и живых организмов. Численная фокусировка делает возможным вычисление всех трех координат детектируемого объекта и построение его полной траектории движения. Так в работе [163] была показана возможность мониторинга движения клеток фибросаркомы человека HT-1080 и красных кровяных телец. Кроме того, были выделены и проанализированы несколько методов оценки координат

ты центра клетки в ходе аналогичных исследований по регистрации движения клеток остеосаркомы MG63 [164]. В работе [165] наряду с детектированием положения биологических объектов проведена апробация алгоритмов определения координат на тестовых микрообъектах и оценена точность регистрации координат. Также было предложено использовать методы цифровой голографии для наблюдения передвижения многоклеточных организмов в воде [166]. В результате были восстановлены траектории движения микроорганизмов различных размеров [167]. Во всех случаях явно различимым элементом траекторий движения была спираль, однако скорости движения больших по размеру микроорганизмов оказывались как правило выше.

Также методы цифровой голографии активно применяются в задачах автоматического распознавания и классификации клеток. Возможность изменения плоскости фокусировки и распределение интегрального фазового набега позволяют разрабатывать и создавать алгоритмы автоматического детектирования отдельных клеток. Например, работа [168] посвящена разработке алгоритмов автоматического распознавания и классификации стволовых клеток подсолнуха и кукурузы с помощью методов цифровой голографии. В работе [169] был разработан метод дифференциации зрелых и незрелых эритроцитов и их автоматического подсчета. Аналогичная система была создана для распознавания сходных по форме микроорганизмов [170]. Использование цифровой голографии также позволяет по морфологическим изменениям клетки в результате воздействия на нее химических веществ распознавать тип препарата [171].

1.3.5. Измерение морфологических характеристик клеток методами цифровой голографической микроскопии и томографии

Как было отмечено выше, цифровая голография в принципе позволяет получить информацию лишь об интегральном фазовом набеге в той или иной области волнового фронта. Данная величина в свою очередь пропорциональна произведению разности показателя преломления среды и исследуемого объекта

на толщину этого объекта. Таким образом измерение интегрального фазового набега само по себе не дает возможности определить ни показатель преломления образца, ни его толщину. В связи с этим ряд работ был посвящен разработке различных способов извлечения информации об обеих величинах. Так средний показатель преломления клетки может быть восстановлен из интегрального фазового набега, если предварительно была измерена толщина клетки, например с помощью конфокального микроскопа [172]. Однако данные параметры могут быть измерены и без использования других методов. Так, например, измерение интегрального фазового набега изучаемого образца в двух средах с различными показателями преломления позволяет точно определить толщину клетки и ее средний показатель преломления [131]. Кроме того, измерение интегрального фазового набега на нескольких длинах волн при наличии данных о показателях преломления для данных длин волн также позволяет восстановить искомые параметры [105]. Еще один подход, несколько более сложный в реализации чем предыдущие методы, предполагает подбор окружающей среды с таким же средним показателем преломления, как и у клетки. В таком случае, при отсутствии фазового запаздывания волнового фронта в определенной области, очевидно средний показатель преломления рассматриваемого участка клетки равен показателю преломления используемой среды [173]. Также были предложены голографические установки позволяющие восстановить волновые фронты как отраженные так и прошедшие через исследуемый объект. Это может быть использовано для регистрации формы клетки и интегрального фазового набега волны прошедшей через образец, что позволяет также восстановить средний показатель преломления [34].

Однако томографические методы (см. раздел 1.2.4), требующие регистрации большего количества информации и ее последующей обработки более сложными методами позволяют восстанавливать не только средний показатель преломления, но и распределение этой величины во всей клетке. В последнее время методы голографической томографии и некоторые его модификации начали

широко использоваться для получения информации о внутренних структурах различных биологических объектов. Так с помощью томографических методов были восстановлены трехмерные распределения показателя преломления как отдельных клеток линий HeLa [88], HT-29, T84 [174], HT-1080, U937 [175], клеток цветочной пыльцы [88], так и многоклеточных микроорганизмов, например, круглых червей [176]. Методы голографической томографии позволяют выделять в клетке отдельные структуры и определять их оптические свойства. Так, например, в работе [174] было проведено измерение показателей преломления некоторых органелл клеток, а также установлено, что в хромосомах наблюдается более сильная оптическая дисперсия, нежели в цитоплазме клетки. В других работах томографические методы использовались для визуализации внутренних структур и определения их показателя преломления в лимфоцитах [91], амёбах [87], дрожжах [177] и т.д.

Помимо процессов деления, роста и смерти клеток, много работ было посвящено изучению других аспектов жизнедеятельности биологических организмов. Так в работе [178] было показано, что цифровая голография позволяет также неинвазивно исследовать процессы инфицирования бактериями клеток и детектировать морфологические изменения происходящие в результате с клетками. Использование наряду с голографическими методами оптических пинцетов позволяет производить с отдельными клетками точные манипуляции и помещать в положение наиболее удобное для их наблюдения голографическими методами [179]. Помимо прочего цифровая голография позволяет визуализировать деформацию клеток при воздействии на них давления [180]. В работе [181] было установлено, что на различных стадиях инфицирования красных кровяных телец происходит изменение не только показателя преломления, но и всей дисперсионной кривой. Наряду с большим количеством исследований отдельных клеток голографические методы также используются для описания более сложных многоклеточных организмов, например пресноводных рыб даanio-рерио [182]. В данных микроорганизмах удалось визуализировать потоки

крови и оценить частоту сердечных сокращений, что может быть использовано для изучения патологий сердца [183]. Недавно также была представлена экспериментальная установка позволяющая анализировать содержание гемоглобина в капиллярах мышцы методами цифровой голографии *in vivo* [184].

Таким образом голографические методы предоставляют обширные возможности для исследования как физических, так и биологических процессов. Благодаря зависимости показателя от многих параметров вещества эти методы могут быть успешно использованы для бесконтактного мониторинга градиентов различных физических параметров: температуры, плотности, напряжения и т.п. Неинвазивность цифровой голографической микроскопии и томографии в свою очередь обеспечивают широкое применение данного класса методов для исследования биологически значимых процессов. Это оказывается возможным из-за зависимости фазовых картин биологических объектов как от их показателя преломления и химического состава, так и от их толщины.

1.4. Фотодинамическая воздействие на клетки, роль синглетного кислорода

1.4.1. Фотодинамическая терапия

В настоящее время множество работ в различных областях науки посвящено разработке новых и изучению существующих методов лечения онкологических заболеваний. Одним из весьма перспективных подходов, направленных на уничтожение злокачественных опухолей является фотодинамическая терапия, основой которой является фотохимическое воздействие на раковые клетки, индуцирующее их гибель. Помимо применения в онкологии данный метод может быть также успешно использован для лечения бактериальных [185] и инфекционных [186] заболеваний. Основными компонентами данной процедуры являются фотосенсибилизаторы, которые, находясь в возбужденном состоянии, запус-

кают цепь биохимических реакций, а также оптическое излучение, с помощью которого и производится возбуждение молекул этих веществ. В медицинской практике эта процедура состоит из двух этапов: сначала производится введение фотосенсибилизатора в область пораженных тканей пациента, после чего данная область облучается электромагнитным излучением на длине волны, попадающей в полосу поглощения фотосенсибилизатора. Возбуждение молекул фотосенсибилизатора внутри клетки квантами света запускает цепь фотохимических реакций, в результате которых происходит генерация большого количества свободных радикалов (реакция по типу I) и возбуждение молекулярного кислорода из основного триплетного состояния в возбужденное синглетное (реакция по типу II). Селективное уничтожение раковых клеток достигается как за счет преимущественной локализации молекул фотосенсибилизатора в злокачественных опухолях, так и благодаря локализации электромагнитного излучения, осуществляющего возбуждение этих молекул, в области наличия злокачественных тканей. Подобное воздействие ведет к уничтожению опухоли за счет: 1) запуска внутриклеточных биохимических реакций в больных клетках, 2) повреждения сосудов, снабжающих опухоль кислородом [187] и 3) активации иммунной системы организма [188]. Эти факторы в значительной степени связаны между собой, так как повреждение кровеносной системы, ведущей к гипоксии опухолевых тканей сопровождается апоптозом и некрозом клеток кровеносной системы, а активация иммунитета является результатом выделения специфических белков (цитокинов и факторов роста) и возникновения воспаления в ходе некроза опухолевых клеток и также клеток близлежащих капилляров [189].

Данные эффекты могут усиливать или ослаблять друг друга в зависимости от режима облучения. Так например медленное повреждение клеток кровеносной системы уменьшает содержание кислорода в опухолевых клетках, уменьшает влияние фотоиндуцированных биохимических реакций в клетке и вероятность ее гибели [190].

В отличие от других широко распространенных методов лечения онколо-

гических заболеваний, таких как химиотерапия или хирургическое вмешательство, фотодинамическая терапия обладает меньшей степенью инвазивности и особенно успешно применяется при начальных стадиях рака. Заживление происходит в ходе естественных процессов, что делает данный метод наиболее органосохраняющим и хорошо переносимым [191]. Это позволяет при необходимости проводить многократные процедуры, в том числе с использованием различных фотосенсибилизаторов для увеличения эффективности терапии. Кроме того, данный метод может быть использован и в других клинических практиках, например в эндокринологии, ортопедии, офтальмологии и оториноларингологии [191]. Столь широкое использование данного подхода обуславливает актуальность подробного изучения биологических процессов, происходящих в результате возбуждения молекул фотосенсибилизатора внутри живых клеток.

1.4.2. Методы генерации и детектирования синглетного кислорода

Синглетным кислородом обычно называют первые два возбужденных состояния этой молекулы с энергиями возбуждения равными 0,97эВ и 1,63 эВ, что соответствует энергиям фотонов электромагнитного излучения с длинами волн 1274 и 762 нм. Молекулярный кислород играет важнейшую роль во многих химических реакциях, протекающих в живой и неживой природе, из-за своей высокой реакционной способности. В частности в биологических средах он чаще всего выступает в роли окислителя в окислительно-восстановительных реакциях. Информация о временах безызлучательной релаксации синглетного кислорода, области его локализации в живых клетках, запускаемых им каскадах биохимических реакций, условиях генерации и тушения может быть использована для лучшего понимания процессов жизнедеятельности клеток и совершенствования методов фотодинамической терапии. В связи с этим, изучение процессов генерации возбужденных состояний молекулы кислорода, а также его взаимодействия с различными биологическими молекулами является весьма актуальной темой в последние годы.

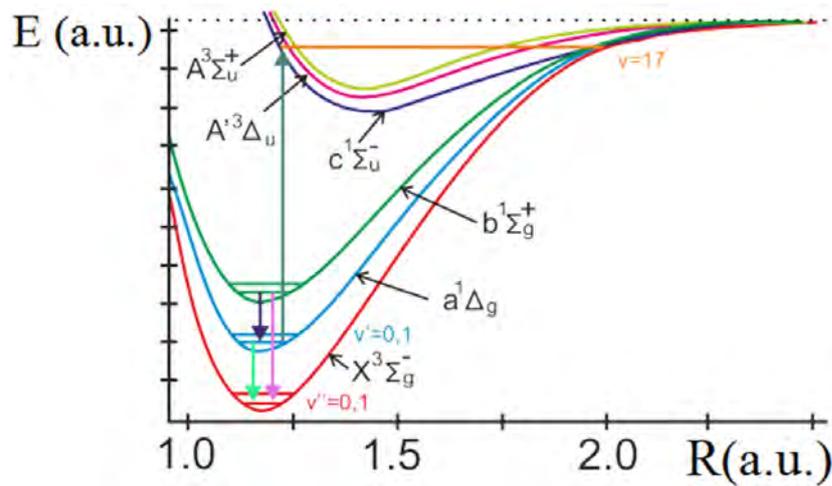


Рис. 1.4. Схема энергетических уровней молекулы кислорода [192].

Электронная конфигурация основного состояния молекулярного кислорода $(2\sigma_g)^2(2\sigma_u)^2(3\sigma_g)^2(1\pi_u)^4(1\pi_g)^2$ свидетельствует о наличии двух неспаренных электронов на разных орбиталях, которые имеют сонаправленные спины. Таким образом, суммарный спин данной парамагнитной молекулы равняется единице. В то же время в первых двух возбужденных состояниях валентные электроны имеют разнонаправленные спины, формируя, таким образом, синглетное состояние с суммарным спином молекулы равным нулю. Именно в возбужденном состоянии молекула кислорода обладает наибольшей химической активностью, что позволяет ему участвовать в передаче сигналов внутри клетки, выполнять защитную функцию, а также инициировать процессы программируемой клеточной гибели [193]. Ввиду запрета переходов между основным и возбужденными состояниями правилами отбора по спину, четности и симметрии время жизни нижнего синглетного состояния $a^1\Delta_g$ в вакууме составляет порядка 45 минут [2], а в воде несколько микросекунд [194]. Вышележащее синглетное состояние $b^1\Sigma_g^+$ является короткоживущим вследствие быстрой релаксации в состояние $a^1\Delta_g$.

Генерация синглетного кислорода может осуществляться физическими, химическими или фотохимическими методами. Одним из самых удобных методов получения синглетного кислорода для задач спектроскопии являются высоко-

частотные газоразрядные трубки, с помощью которых можно возбудить до 10% всех молекул кислорода в синглетное состояние [195]. Химические методы получения синглетного кислорода прежде всего основаны на разложении различных кислородосодержащих соединений, таких как трифенилфосфитозонид, пероксиацетилнитрат или пероксид водорода [196]. Для целей фотодинамической терапии генерация синглетного кислорода производится при помощи фотохимических методов с использованием фотосенсибилизаторов. Возбуждение молекул фотосенсибилизатора производится обычно с помощью однофотонного перехода между основным синглетным и возбужденным синглетным состояниями, после чего в ходе интеркомбинационной конверсии происходит переход с синглета на триплет. Далее возбуждение кислорода происходит при неупругом столкновении с триплетом ФС (рисунок 1.5) (реакция по типу II). Кроме того, формирование синглетного кислорода может произойти также в ходе реакции молекул кислорода в основном состоянии с другими свободными радикалами образовавшимися ранее в ходе взаимодействия возбужденных молекул фотосенсибилизатора с окружающим субстратом (реакция по типу I).

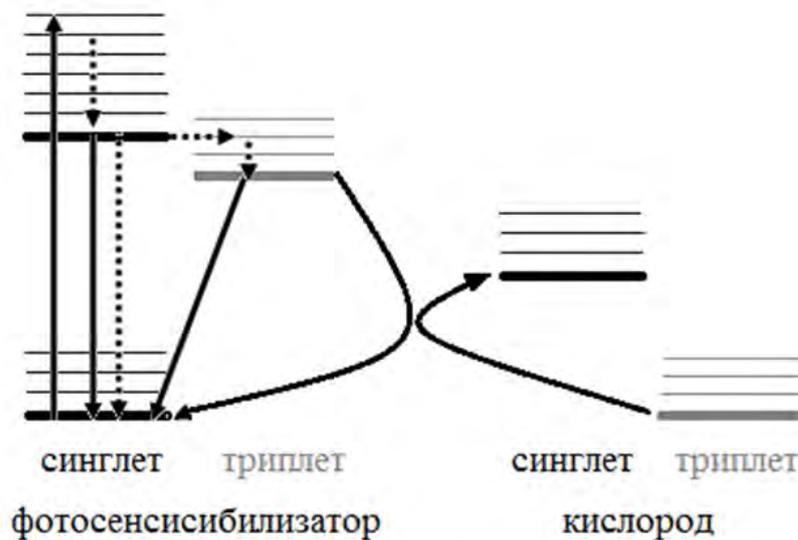


Рис. 1.5. Диаграмма, изображающая электронные переходы в результате поглощения света фотосенсибилизатором и перенос энергии молекуле кислорода. Слева показаны уровни фотосенсибилизатора, справа – кислорода.

Для детектирования синглетного кислорода в жидких средах и газе так-

же существует несколько подходов. Несмотря на низкую вероятность излучательных переходов синглетного кислорода, при его значительных концентрациях использование высокочувствительных фотодетекторов позволяет детектировать сигнал флуоресценции синглетного кислорода на длине волны 1274 нм. Несмотря на трудность регистрации слабого сигнала флуоресценции синглетного кислорода, в отдельных работах были представлены результаты детектирования и измерения его времен жизни в клетках различного типа [197, 198], хотя для получения стабильного сигнала от отдельных клеток требуются специальные условия культивирования клеток, а именно замена воды на дейтерированную воду [199]. Для регистрации синглетного кислорода в газовой фазе также может использоваться метод электронного парамагнитного резонанса.

При детектировании молекул синглетного кислорода в жидкой фазе могут быть использованы методы химических ловушек [200] и регистрации сигнала хемилюминесценции [201]. Кроме того оценка концентрации синглетного кислорода может быть проведена с помощью анализа флуоресцентных ловушек [202, 203]. При этом большое количество методов детектирования синглетного кислорода, основанных на использовании посторонних химических веществ, могут существенно влиять на внутриклеточные процессы, дезактивировать свободные радикалы и искажать реальную картину влияния фотохимического воздействия на клетку. Это обуславливает актуальность разработки новых методов детектирования синглетного кислорода, основанных, например, на регистрации его безызлучательных переходов в основное состояние.

1.4.3. Фотосенсибилизатор Радахлорин и его свойства

Существует несколько групп веществ, поглощающих электромагнитное излучение и генерирующих активные формы кислорода в результате интеркомбинаторной конверсии. К таким соединениям относятся некоторые порфирины, фталоцианины, некоторые органические красители и ароматические соединения и др. Однако для успешного использования вещества в качестве фотосен-

сенсибилизатора необходимо выполнение некоторых условий: 1) наличие полос поглощения в красном и ближнем ИК диапазоне, 2) высокая фотостабильность, 3) высокий квантовый выход образования возбужденного триплетного состояния фотосенсибилизатора и его длительное время жизни. При использовании фотосенсибилизаторов в биологии также необходимо убедиться в отсутствии токсичности при отсутствии электромагнитного излучения, а для использования в клинической практике также необходимо, чтоб это вещество преимущественно накапливалось в злокачественных опухолях. Как правило фотосенсибилизаторы накапливаются в тканях злокачественных опухолей в 3-15 раз лучше, чем в здоровых клетках.

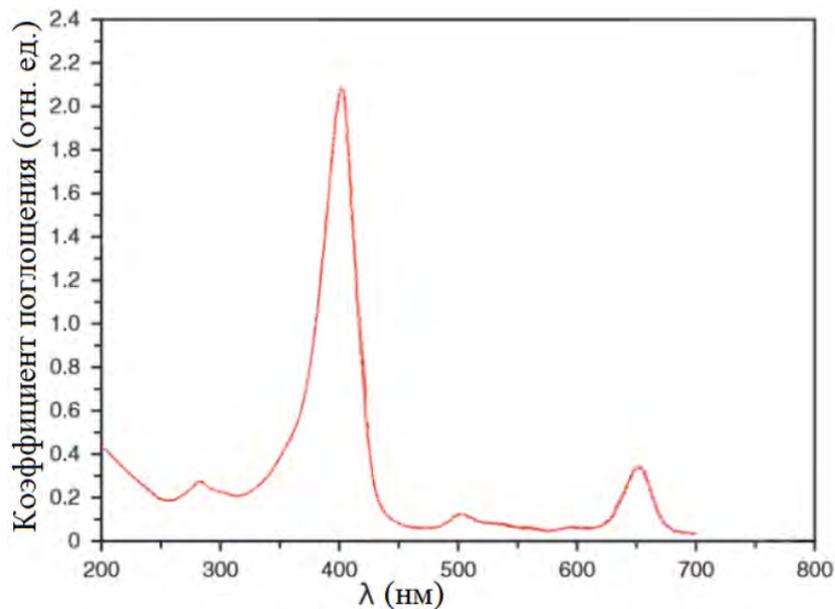


Рис. 1.6. Спектр поглощения фотосенсибилизатора Радахлорина [204].

Радахлорин принадлежит к группе фотосенсибилизаторов хлоринового ряда, основными преимуществами которых являются быстрое выведение из организма (1-2 дня), водорастворимость и наличие полосы поглощения в области 660 нм (рисунок 1.6). Большинство таких фотосенсибилизаторов основано на модификации хлорофилла α , для повышения его устойчивости. Сам же фотосенсибилизатор Радахлорин представляет собой смесь нескольких веществ: 80 – 90 % хлорина е6, 5 – 20 % пурпурина-5, 0 – 15 % пурпурина-18, 0 – 15 % хлорина р6 [205] (см. рисунок 1.7).

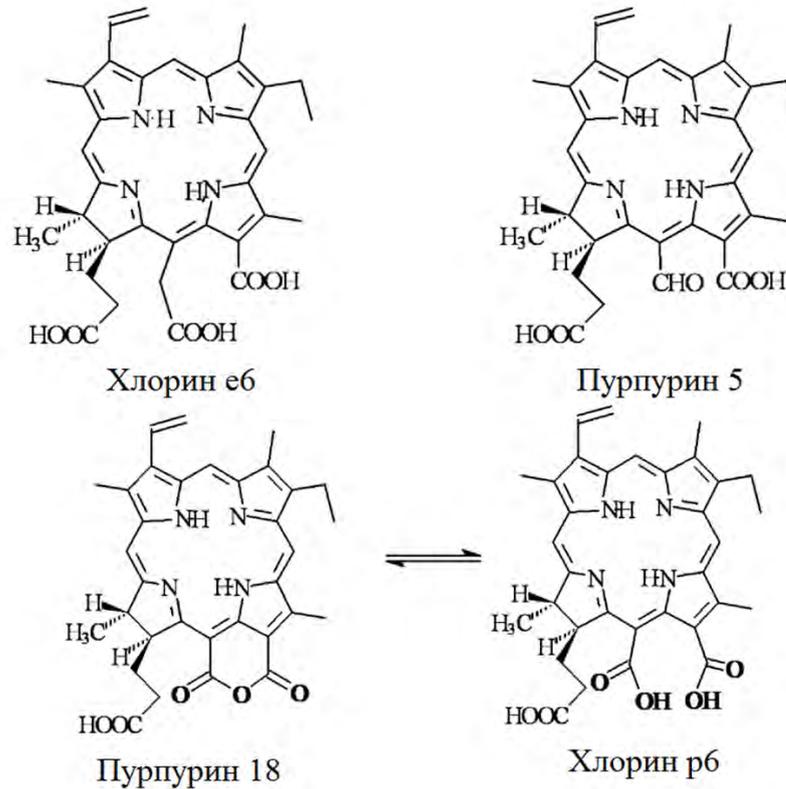


Рис. 1.7. Основные компоненты фотосенсибилизатора Радахлорина [205].

Спектр поглощения Радахлорина имеет несколько полос поглощения, положение которых незначительно зависит от pH и типа окружающей среды. При длительном хранении фотосенсибилизатора происходит уменьшение максимумов поглощения и их смещение в красную область спектра. Низкая темновая токсичность данного фотосенсибилизатора и удобное расположение полосы поглощения в диапазоне 630-670 нм обуславливают его широкое использование в клинической практике на протяжении уже более 15 лет. В научной литературе также немало работ было посвящено исследованию его физических свойств [204, 206] и воздействию на злокачественные опухоли [207, 208]. В результате исследования фотофизических свойств были изучены временные характеристики фотообесцвечивания сенсбилизатора [209] и посредством детектирования сигнала фосфоресценции синглетного кислорода была продемонстрирована его эффективная генерация в водных растворах фотосенсибилизатора [194].

1.4.4. Фотодинамическое воздействие на клетки: виды клеточной гибели

В зависимости от области локализации фотосенсибилизатора внутри клетки, его концентрации, фазы жизненного цикла клетки, а также плотности мощности лазерного излучения, приводящего к возбуждению молекул фотосенсибилизатора, могут наблюдаться различные сценарии биохимических реакций, происходящих с живой клеткой [210]. В норме каждая живая клетка обладает рядом механизмов позволяющих подавлять действие синглетного кислорода или других сильных окислителей, которые также могут образовываться в результате фотодинамического воздействия. Такие ферменты антиоксидантной системы как каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза и лутатионредуктаза позволяют превращать супероксидные радикалы в менее активный пероксид водорода, а также инактивировать пероксидные радикалы. Это позволяет сохранить относительно нормальное функционирование внутриклеточных механизмов при небольших дозах фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода.

Однако более высокие дозы фотодинамического воздействия могут приводить к серьезным изменениям, в том числе к апоптозу клетки. Механизм апоптоза является естественной цепочкой биохимических реакций, приводящих к гибели любой живой клетки. В норме данный процесс происходит с подавляющим большинством клеток живого организма, он позволяет обновлять и очищать органы и ткани, а также препятствует их бесконтрольному росту. Апоптоз, как правило, запускается при освобождении цитохрома С из митохондрий или при получении соответствующего сигнала извне рецепторами клетки [211]. Оба данных события приводят к запуску каскада биохимических реакций, связанных с каспазами 3, 6 и 7 и приводящих к специфическим биохимическим и морфологическим изменениям, характерным для данного механизма клеточной гибели. Однако ряд энзимов и протеинов семейства Bcl-2, ингибирующих каспазный

каскад, может остановить процесс апоптоза или замедлить его. С точки зрения морфологических изменений апоптоз сопровождается разрушением цитоскелета, реорганизацией актиновых микрофиламентов и последующим округлением живой клетки. При этом происходит уменьшение ее объема и концентрации воды. На второй стадии в результате сокращения периферийных актиновых колец происходит формирование мелких пузырей на поверхности мембраны, так называемый блеббинг [212]. На последней стадии апоптоза, происходящей примерно через 1-3 часа клетка фрагментируется на апоптотические тельца либо, целиком округляясь, заметно уменьшается в размерах. Данные морфологические изменения приводят к уменьшению ее площади проекции (площади прикрепления к чашке Петри) в то время как целостность мембраны не позволяет внутриклеточной среде выйти наружу, в результате чего сухая масса клетки остается неизменной. Кроме того, в ходе апоптоза происходит выделение на внешней стороне клеточной мембраны фосфатидилсерина, связывающегося с флуоресцентным красителем аннексином V, который используется для детектирования процесса апоптоза.

Иной механизм гибели живых клеток протекает при больших дозах и скоростях генерации активных форм кислорода. Некроз характеризуется быстрым разрушением некоторых клеточных органелл и мембраны клетки в процессе перекисного окисления липидов [213]. В отличие от апоптоза данный механизм клеточной гибели не является программируемой цепью биохимических реакций, не предполагает энергетических затрат и происходит достаточно быстро. Аналогичным образом некроз может быть вызван серьезными повреждениями клетки при воздействии физических или химических факторов. В результате разрыва клеточной мембраны происходит формирование больших пузырей, вытекание внутриклеточной среды наружу, увеличение площади проекции клетки и уменьшение ее высоты. Именно некротические процессы вызывают воспалительные реакции организма, а в некоторых случаях приводят и к противоопухолевой иммунной реакции организма [214]. Кроме того, иногда может

наблюдаться процесс вторичного некроза, который происходит с некоторой задержкой после фотодинамического воздействия на клетку. В ряде случаев на первой стадии вторичного некроза (когда еще не произошел разрыв значительной части клеточной мембраны) могут наблюдаться признаки характерные для апоптотического механизма гибели клетки.

Помимо указанных выше механизмов, некоторые исследователи выделяют также другие типы гибели живых клеток, например пироптоз, фероптоз и параптоз. Однако данные механизмы осуществляются обычно при весьма специфических условиях и сведений об их возникновении в результате фотодинамического воздействия на клетку не много.

1.5. Другие методы определения морфологических характеристик клеток

На сегодняшний день, известно множество методов исследования внутриклеточных процессов, в том числе механизмов гибели живых клеток. Вероятно, самой развитой группой методов, применяемых для детального исследования внутриклеточных биохимических реакций, являются методы флуоресцентной микроскопии. Благодаря значительным успехам в создании множества флуорофоров, специфичных к определенным химическим веществам удается детально изучать многие механизмы, связанные с жизнедеятельностью клеток. Однако помимо анализа биохимических преобразований важную роль играет также исследование морфологических параметров живых клеток, которые существенно изменяются при воздействии различных внешних факторов. Помимо методов цифровой голографической микроскопии и томографии обсуждавшийся ранее, на сегодняшний день основными подходами для получения информации о морфологии клеток являются: конфокальная флуоресцентная микроскопия, атомно-силовая микроскопия и цитофлуориметрия. В данном разделе приведены основные сведения о каждом из этих подходов, их преимуществах и недо-

статках при измерении морфологических параметров клеток.

В отличие от обычных методов флуоресцентной микроскопии, конфокальная микроскопия позволяет получить двухмерное распределение сигнала флуоресценции внутри образца, соответствующее слою толщиной несколько сотен нанометров. Благодаря использованию пинхола в конфокальной микроскопии возбуждение и детектирование сигнала флуоресценции происходит не во всем исследуемом образце, а в его небольшом объеме. Изменение положения исследуемой области образца осуществляется благодаря использованию гальванических зеркал или крутящегося диска с множеством пинхолов расположенных по спирали. В результате сканирования всего образца удастся получить информацию о распределении флуорофора в тонком слое, а сдвиг образца по оси z с помощью пьезоэлектрической подвижки позволяет получить информацию об этом распределении во всем объеме клетки. При использовании флуоресцентных красителей, накапливающихся во всей внутриклеточной среде (например, акридина оранжевого) можно построить трехмерное распределение всей клетки в целом, а затем подробно исследовать ее морфологические характеристики, включая объем, площадь поверхности мембраны, коэффициент сферичности и т.п.

Среди основных ограничений данного подхода можно отметить длительное время получения экспериментальных данных (порядка 3-5 минут), необходимость введения флуоресцентных красителей и освещения клеток интенсивным лазерным излучением. В некоторых случаях также необходимо проводить фиксацию живых клеток для того чтобы исключить их движение во время процесса сканирования образца. В случаях изучения фотосенсибилизированных клеток применение метода конфокальной флуоресцентной микроскопии оказывается особенно затруднительным ввиду повышения фототоксичности лазерного излучения. В то же время очевидным преимуществом метода конфокальной флуоресцентной микроскопии является возможность точного построения трехмерного распределения красителя и измерения основных морфологических парамет-

ров живых клеток с очень высокой точностью. Основным протоколом, используемым сегодня для изучения морфологических характеристик с помощью указанного подхода описан в работе [215]. Более подробное описание теоретических и практических основ такого метода приведено в статье [216]. Описанный подход был успешно использован в ряде работ для исследования изменения объема при различном давлении [217], активности эмбриональных стволовых клеток мыши [218] и морфологических изменений, происходящих при разрушении микротрубочек [219]. Однако трудности связанные с использованием данного подхода при исследовании фотосенсибилизированных клеток и длительное время регистрации данных приводят к необходимости использования альтернативных подходов при исследовании морфологических преобразований, происходящих с живыми клетками в процессе их гибели при фотодинамическом воздействии.

Альтернативным методом точного определения морфологии клеток является атомно-силовая микроскопия, позволяющая построить двумерное распределение карты высот поверхности с нанометровой точностью [220]. Данный метод основан на последовательном сканировании всей поверхности образца с помощью специальной иглы с площадью острия в несколько атомов. При изменении положения зонда на неровностях поверхности отклоняется и зеркальная площадка, отражающая лазерный луч на фотодетектор. Таким образом, по изменению положения луча лазера на детекторе в ходе сканирования можно построить карту рельефа поверхности образца. Благодаря измерению силы притяжения иглы с помощью пьезодатчика также имеется возможность исследования упругих свойств исследуемого объекта. Атомно-силовая микроскопия обладает высокой точностью и пространственным разрешением, что позволяет получать точное распределение высот клетки и исследовать ее морфологические характеристики. Этот метод неоднократно применялся для изучения формы красных кровяных телец, морфологические особенности которых нередко свидетельствуют о наличии патологий [221], а также изучения морфологии и механических свойств раковых клеток [222].

Однако, чаще всего исследование биологических образцов с помощью атомно-силовой микроскопии требует их специальной подготовки, а получение данных обо всей клетке требует длительного сканирования. Кроме того, отсутствует возможность исследования динамики морфологических изменений клеток в ходе внутриклеточных процессов. Другими словами, данный метод нельзя назвать полностью неинвазивным. Это делает его использование для исследования морфологических изменений в раковых клетках затруднительным, несмотря на высокую точность и пространственное разрешение атомно-силовой микроскопии.

Цитофлуориметрия предполагает анализ одиночных клеток, проходящих с потоком питательной среды через специальный узкий канал между двумя кюветами. При этом на данный канал направлен луч лазера, используемый для анализа характеристик рассеяния света и возбуждения молекул флуорофоров. Исследование живых клеток в таком случае может быть проведено с помощью двух методов: 1) детектирования для каждой клетки интенсивности сигнала флуоресценции интересующего флуорофора, добавленного предварительно в культуральную среду и 2) анализ характеристик рассеяния лазерного излучения на живых клетках. Первый метод используется для сбора массива данных о наличии или отсутствии интересующих исследователя поверхностных и внутриклеточных антигенов в каждой клетке с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Детектирование же рассеянного отдельными клетками лазерного излучения позволяет оценить некоторые морфологические параметры клетки. Для этого необходимо произвести регистрацию прямого рассеяния исследуемого объекта (под углами 2-15 градусов) и бокового рассеяния (под углами 75-105 градусов).

Обычно объекты больших размеров приводят к большей величине малоуглового рассеяния. В то же время боковое рассеяние происходит, как правило, в результате многократного переотражения и преломления света при прохождении через клетку. Поэтому больший сигнал углового рассеяния может свидетельствовать о более сложной форме объекта или разнородности его внутренней

структуры (наличия большого количества митохондрий, ядрышек, визикул, обладающих высоким показателем преломления) [223]. Комбинация информации, получаемой от двух фотодетекторов, позволяет судить о некоторых морфологических характеристиках клетки. Особенно удобным использование этого метода является при сборе большого количества статистических данных о всей популяции клеток в связи с тем, что для получения искомым характеристик не требуется сегментация отдельных клеток, а оценка их морфологических параметров может проводиться автоматически. Подходы, используемые в цитофлуориметрии, могут быть также модифицированы для автоматической классификации и разделения клеток по фенотипу и морфологическим особенностям за счет регулируемого перенаправления потока клеток. В то же время из-за использования косвенных данных о рассеянии света, точность измерения параметров единичных клеток оказывается намного меньшей, чем при применении методов конфокальной флуоресцентной микроскопии или атомно-силовой микроскопии. Кроме того, длительный мониторинг динамики изменения морфологических характеристик единственной клетки невозможно произвести с помощью этого подхода.

1.6. Цели и задачи диссертационной работы

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 синглетного 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 дальнейшего 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 асимметричных 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 синглетного 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 асимметричных 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 тол-

щины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток за счет использования оптических сред с сильно различающимися показателями преломления.

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 набега, 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 преломления.

Глава 2

Исследование влияния случайных и систематических погрешностей на результаты восстановления фазы волнового фронта и трехмерных распределений показателя преломления

В случае использования методов цифровой голографии в метрологии или при исследовании неорганических объектов как правило не возникает серьезных ограничений на плотность мощности излучения в зондирующем пучке. При работе с биологическими объектами непрерывное облучение живых клеток может отразиться на достоверности экспериментальных данных. Особенно сильно данное влияние может проявиться при введении в клетки различных фотосенсибилизирующих веществ, запускающих те или иные химические реакции в результате поглощения электромагнитного излучения (см. раздел 1.4.4). Ограничения, накладываемые в таком случае на максимально возможную плотность мощности предметной волны, могут явно отражаться на предельно достижимом отношении сигнал / шум в регистрируемой интерференционной картине. В этом случае, даже при идеальной виброизоляции оптической системы, обычно необходимой для получения качественных цифровых голограмм, интерференционные полосы могут быть искажены естественным аддитивным шумом. При восстановлении фазового и амплитудного распределений волнового фронта это приводит к появлению погрешностей и искажений различного рода. Другим источником ошибок в полученных данных является когерентный шум, возникающий в результате дифракции предметной и опорной волн на исследуемом объекте или элементах оптической системы. Высокая временная и простран-

ственная когерентность излучения, используемого в цифровой голографии, может привести к образованию дифракционных полос, отсутствующих при работе с другими видами оптических микроскопов. В отличие от аддитивного шума, даже при отсутствии ограничений на максимальную плотность мощности полностью избавиться от искажений, обусловленных когерентным шумом, при использовании лазерного излучения практически невозможно.

Стоит отметить, что оба данных вида шума практически всегда представляют собой высокочастотную составляющую зарегистрированных цифровых голограмм и обычно вносят искажения лишь в мелкие детали на исходной интерференционной картине. Восстановление цифровой голограммы предполагает выделение первого порядка дифракции, смещенного относительно нулевого порядка в сторону высокочастотной области на некоторую величину η , зависящую от угла интерференции предметного и опорного пучков, а также длины волны лазерного излучения. При этом искажения внесенные когерентным и аддитивным шумами как правило остаются в выделенной области Фурье-спектра и продолжают оказывать влияние на восстановленную фазовую картину.

Улучшение качества восстановления комплексной амплитуды волнового фронта при изучении внутриклеточных процессов и оптимизация является важной задачей, решение которой позволит получать более точные данные об исследуемом объекте даже при низкой плотности мощности зондирующего излучения и небольшом отношении сигнал/шум. В связи с этим первая часть данной работы была посвящена анализу и оптимизации методов обработки внеосевых цифровых голограмм, и методов голографической томографии.

Процесс восстановления комплексной амплитуды волнового фронта из внеосевой цифровой голограммы является неотъемлемым этапом работы в любом современном эксперименте, задействующим голографические методы для получения данных об исследуемом объекте. В связи с этим правильный выбор алгоритма обработки цифровых голограмм и режимов его функционирования для конкретных задач является важным этапом работы. В данном случае одними

из ключевых аспектов обработки цифровых голограмм является качество восстановления фазы волнового фронта при различном соотношении сигнал/шум на зарегистрированной цифровой голограмме, а также пространственное разрешение получаемого изображения. Оба данных параметра являются ключевыми при работе с микроскопическими объектами в условиях ограничения на максимальную плотность мощности волнового фронта предметного пучка. В связи с этим прежде всего была проведена работа по сравнению качества восстановления фазовых распределений волнового фронта из цифровых голограмм с различными отношениями сигнал/шум методом Фурье преобразования и методом наименьших квадратов. Краткое описание данных алгоритмов было представлено в разделе 1.2.2. Также стоит отметить, что в разделе 2.1 будет рассмотрен лишь случайный аддитивный шум, а вопросы связанные с методами устранения когерентного шума, вызванного дифракцией волнового фронта на границах оптических элементов, будет обсуждаться далее в разделе 2.2. Кроме того, нами были определены и исследованы (раздел 2.3) некоторые систематические и случайные погрешности, возникающие при реализации методов цифровой голографической томографии с алгоритмом обратного распространения, используемого впоследствии в главе 3.

2.1. Определение оптимальных параметров

восстановления внеосевых цифровых голограмм при разном уровне аддитивного случайного шума

Для определения качества восстановления фазовых распределений волнового фронта при различных соотношениях сигнал/шум с помощью алгоритма Фурье преобразования и метода наименьших квадратов было проведено моделирование волнового фронта с резким скачком фазы в 2,8828 рад и однородным распределением амплитуды. Такой выбор тестового объекта для численного мо-

делирования обусловлен необходимостью не только оценки точности восстановления фазового распределения, но и выявления зависимости пространственного разрешения данных алгоритмов от различных параметров восстановления. Затем было проведено моделирование картины интерференции данной волны с плоской опорной волной под углами 1 градус по вертикали и 2 градуса по горизонтали. При этом предполагалось, что длина волны используемого лазерного излучения составляет 632,8 нм, а размер пикселя равен 4,65 мкм. Данные параметры полностью соответствуют характеристикам лазерного излучения и ПЗС-матрицы, используемых впоследствии в данной работе.

После моделирования цифровой голограммы к полученному распределению интенсивности добавлялся случайный шум с Гауссовым распределением. В качестве параметра характеризующего уровень сигнала была принята контрастность интерференционных полос, в то время как среднеквадратическое отклонение в Гауссовом распределении задавало уровень шума (уравнение 2.1).

$$SNR = \frac{I_{int.max} - I_{int.min}}{\sigma_{noise}} \quad (2.1)$$

Таким образом, было проведено моделирование ряда цифровых голограмм с отношением сигнал/шум в диапазоне от 7,5 до 150. Примеры фрагментов таких цифровых голограмм, соответствующих различным значениям отношения сигнал/шум, представлены на рисунке 2.1.

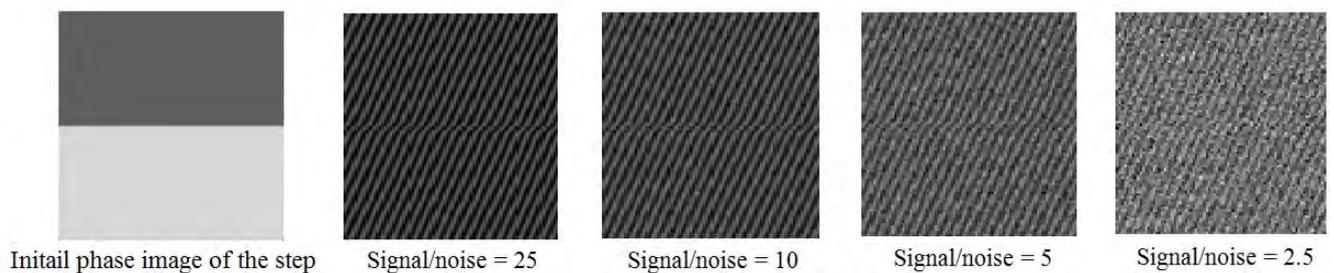


Рис. 2.1. Примеры фрагментов смоделированных цифровых голограмм с различными значениями параметра сигнал/шум.

Впоследствии было выполнено их восстановление с использованием мето-

да фильтрации пространственных частот посредством Фурье преобразования [46] и метода наименьших квадратов [49], описанными в разделе 1.2.2. Полученные фазовые распределения сравнивались с исходной фазой предметной волны в результате чего для каждого результата восстановления определялось среднеквадратическое отклонение восстановленной фазы от исходной. Данная величина и являлась определяющей характеристикой качества работы алгоритма. Результаты, полученные при восстановлении цифровых голограмм с помощью различных алгоритмов при разных значениях параметров области фильтрации и окна обработки, представлены на рисунке 2.2.

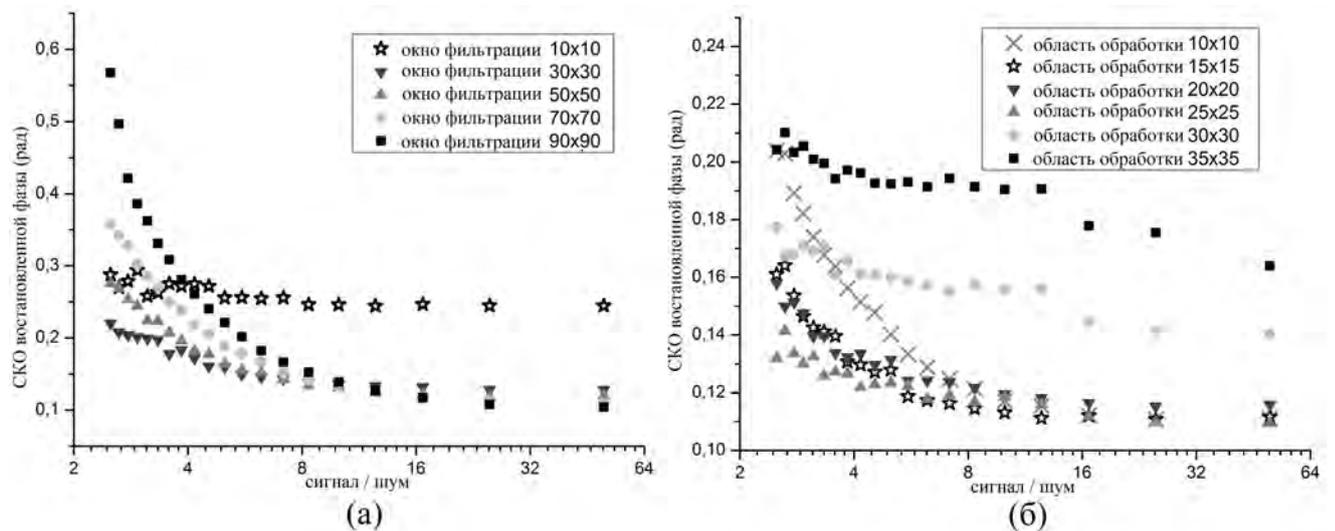


Рис. 2.2. Среднеквадратическое отклонение исходной фазы от фазового распределения восстановленного методами Фурье фильтрации и алгоритмом наименьших квадратов при различных параметрах данных методов. Ось X соответствует различным отношениям параметра сигнал/шум на записанной цифровой голограмме.

При использовании метода Фурье преобразования уменьшение области пространственной фильтрации до некоторой степени приводит к улучшению качества восстановления фазы, особенно когда речь идет о восстановлении цифровых голограмм с низким отношением сигнал/шум. Это объясняется уменьшением количества пространственных частот, используемых при формировании фазы цифровой голограммы, и как следствие, сглаживанием изображения. С другой стороны, использование слишком малой области пространственной

фильтрации может значительно исказить результаты восстановления. Это может произойти если используемых гармоник недостаточно, для того чтобы достаточно точно сформировать требуемое фазовое распределение.

При обработке цифровых голограмм с помощью алгоритма наименьших квадратов возникает аналогичная ситуация. При использовании большого окна обработки, область в которой согласно алгоритму требуется постоянство фазы предметной волны увеличивается. Это приводит к сглаживанию фазового распределения и устранению шумов. С другой стороны, использование слишком высокого значения данного параметра также как в случае с фильтрацией в Фурье пространстве ведет к чрезмерно сильному сглаживанию отдельных структур объекта за счет чего качество восстановления резко уменьшается.

Проявления данных эффектов хорошо видны на рисунке 2.3, где представлены типичные сечения фазовых распределений, полученных двумя методами при различных параметрах восстановления. Так, например, при использовании метода Фурье преобразования с очень малым окном фильтрации восстановленная фаза сильно искажается и явно имеет характер синусоиды. Это объясняется недостаточным количеством базисных функций, с помощью которых при вычислении обратного Фурье преобразования, конструируется искомое распределение. В случае использования большой области обработки в методе наименьших квадратов хорошо видно значительное сглаживание фазы в области резкого разрыва. В связи с этим, при выборе алгоритма восстановления необходимо обратить внимание не только на среднеквадратическое отклонение, но и на степень уменьшения пространственного разрешения получаемого фазового изображения.

Для количественной оценки данной величины был введен параметр наклона в восстановленной фазе равный отношению высоты разрыва фазы к ширине области промежуточных значений между верхней и нижней плоскостями. На рисунке 2.4 представлена схема определения данного параметра.

Расчет степени ухудшения пространственного разрешения при восстанов-

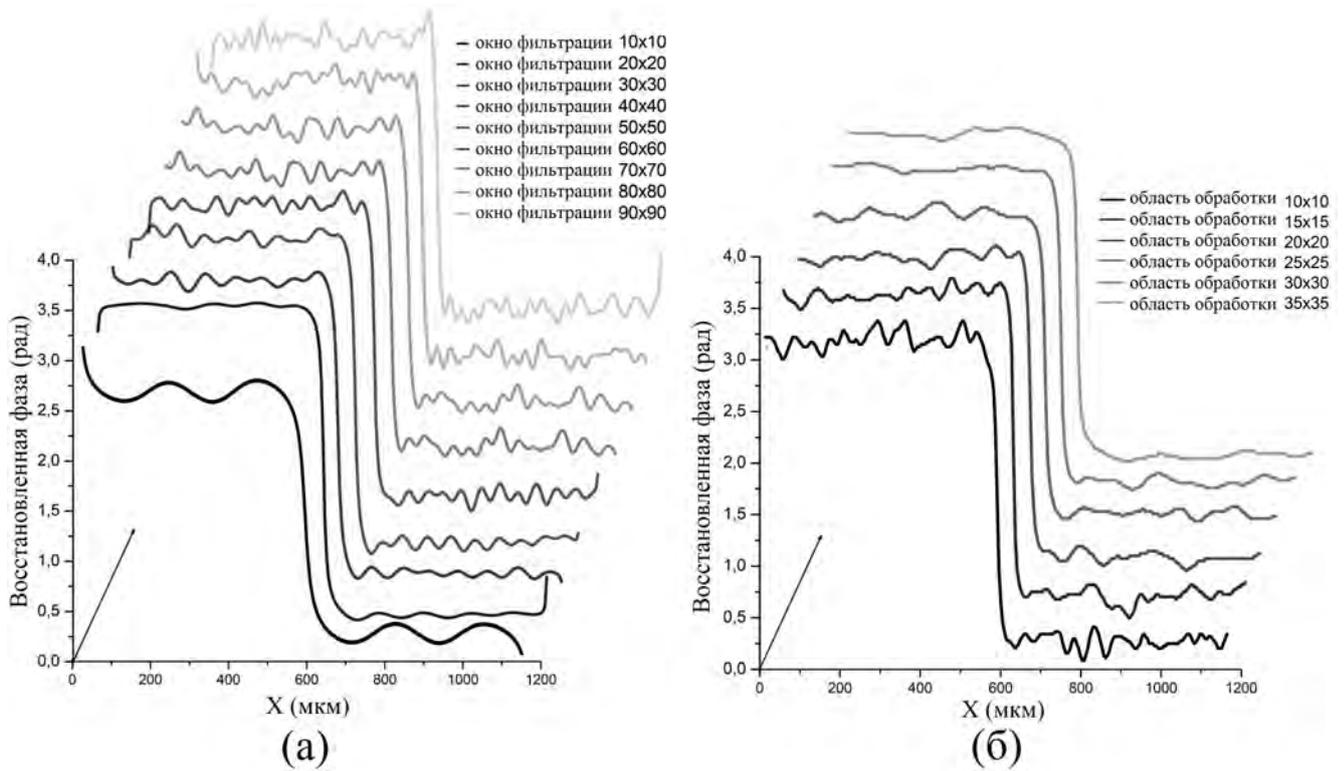


Рис. 2.3. Типичные сечения фазовых распределений восстановленных методом Фурье фильтрации и алгоритмом наименьших квадратов при различных значениях основных параметров этих алгоритмов.

лени фазовых распределений исследуемыми методами восстановления представлен на рисунке 2.5. Здесь важно отметить, что уменьшение пространственного разрешения амплитудного и фазового изображений, полученных в результате восстановления внеосевой цифровой голограммы любым принципиально возможным методом, в реальных ситуациях является неизбежным. Это легко увидеть при анализе результата Фурье преобразования интерференционной картины. Причина заключается в том, что количество пространственных частот, используемых при восстановлении распределения комплексной амплитуды первого дифракционного порядка всегда будет меньше количества частот в пространственном спектре исходного изображения. Именно поэтому чувствительность и пространственное разрешение в восстановленной комплексной амплитуде будет всегда меньше данных величин принципиально достижимых в обычной дальней-полной оптической микроскопии при использовании данной экспериментальной

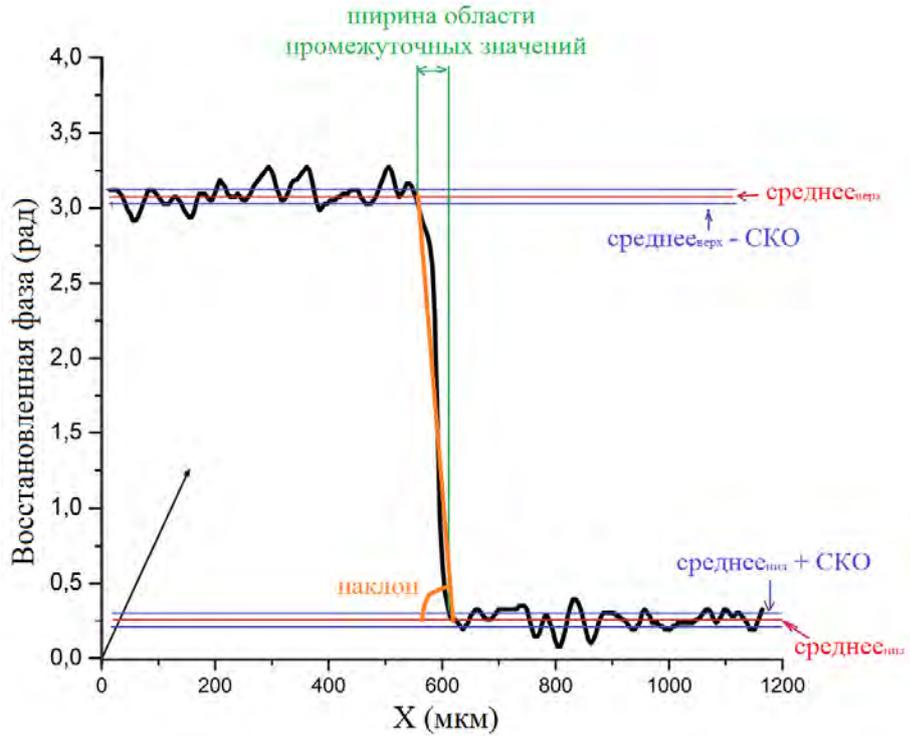


Рис. 2.4. Метод количественной оценки степени сглаживания фазы при восстановлении внеосевых цифровых голограмм на примере поперечного сечения пространственного распределения фазы.

установки.

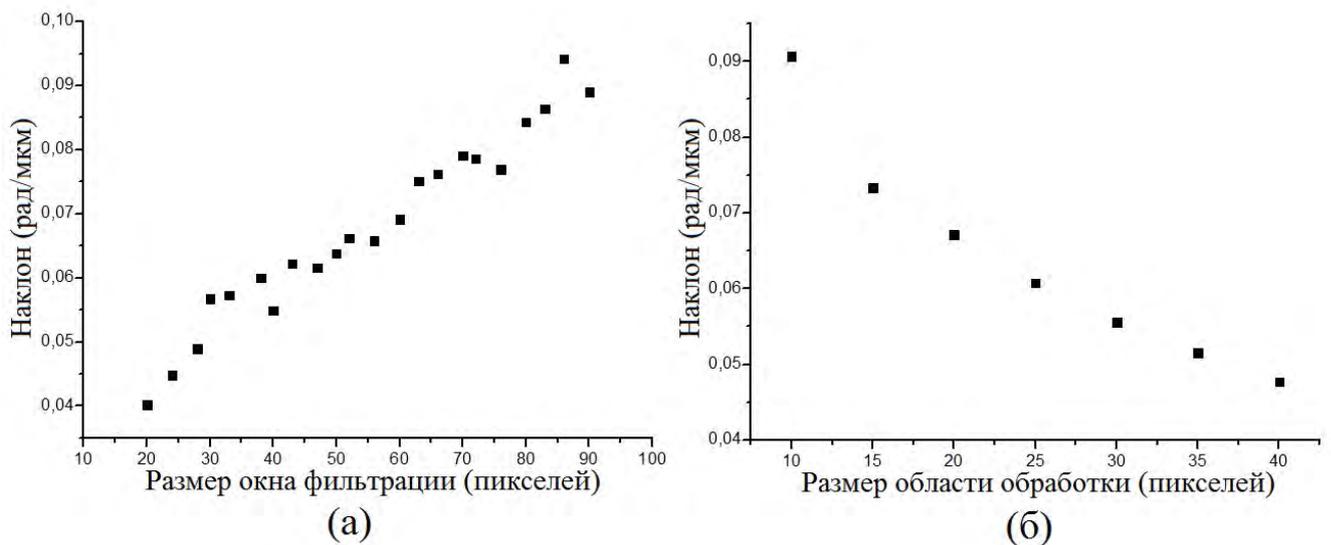


Рис. 2.5. Степень сглаживания фазового распределения при различных значениях основных параметров алгоритмов восстановления.

Из полученных данных видно, что в этом отношении качество восстановле-

ния при использовании методов фильтрации в Фурье пространстве и алгоритма наименьших квадратов практически одинаковое для рассмотренного диапазона параметров. Однако вследствие лучшего качества обработки методом наименьших квадратов при низких значениях сигнал/шум в ходе данной работы для восстановления внеосевых цифровых голограмм использовался именно этот алгоритм при размере области обработки 15x15 пикселей. Данные параметры соответствуют наилучшему качеству восстановления при отношении сигнал/шум, который в созданной нами экспериментальной установке находится в диапазоне 10-15.

2.2. Устранение систематического когерентного шума во внеосевой цифровой голографии с помощью алгоритма усреднения со сдвигом

В то время как аддитивный шум является случайным и может быть уменьшен при усреднении по большому количеству одинаковых экспериментов, когерентный шум представляет собой систематическую составляющую, повторяющуюся при проведении нескольких экспериментов при одинаковых условиях [224]. В результате дифракции предметного и опорного волновых фронтов на границах оптических элементов или отдельных структур исследуемого объекта происходит формирование дифракционных полос, искажающих результат восстановления цифровой голограммы. На рисунке 2.6 представлена цифровая голограмма и восстановленное не развернутое фазовое распределение клеток линии HeLa искаженное в результате присутствия значительного когерентного шума. Здесь когерентный шум проявляется в виде концентрических колец. В данном случае влияние когерентного шума было специально усилено для демонстрации данного эффекта, однако схожие искажения в той или иной степени присутствуют при восстановлении любых цифровых голограмм, запись кото-

рых осуществлялась с помощью когерентного лазерного излучения.

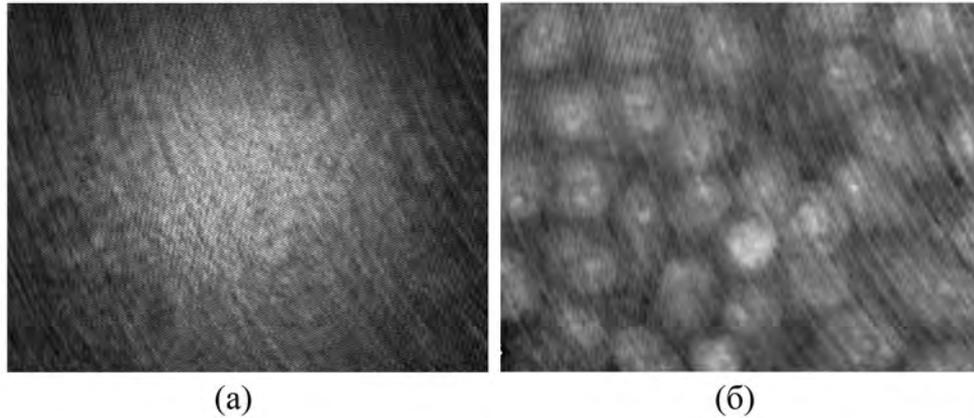


Рис. 2.6. Пример когерентного шума на (а) цифровой голограмме и (б) восстановленном фазовом распределении.

Интенсивность проявления таких дефектов зависит как правило от степени пространственной когерентности используемого излучения, оптической схемы и исследуемого объекта. Одним из наиболее очевидных путей снижения интенсивности таких шумов является использование частично когерентного излучения, что, однако, накладывает дополнительные требования на оптическую установку и затрудняет получение интерференционной картины с высоким контрастом. Целая группа методов, позволяющих значительно уменьшить влияние систематических погрешностей, возникающих из-за дифракционных эффектов также основана на различных способах модуляции когерентного лазерного излучения. Например, это может быть достигнуто благодаря использованию поляризаторов [225], специальных стекол-диффузоров [226] или вращению источника излучения [44]. Однако, избавиться от таких искажений можно и при использовании когерентного излучения путем усреднения по нескольким массивам фазовых распределений, если условия записи соответствующих цифровых голограмм несколько различались. Так, например, снизить влияние когерентного шума можно с помощью продольного сдвига матричного фотоприемника [227] или объекта при записи цифровых голограмм. В этом случае из-за изменения расстояния между объектом и матричным фотоприемником происходит изменение дифракционной картины и за счет усреднения по полученным

изображениям можно добиться улучшения качества восстановления фазового распределения. В данной работе для уменьшения влияния когерентного шума использовался альтернативный метод поперечного смещения исследуемого объекта с помощью моторизированной подвижки, используемой также для сканирования образца. Этот способ был выбран в связи с тем, что он не требует введения дополнительных оптомеханических элементов в используемую схему, а задействует уже имеющую двухкоординатную подвижку, необходимую для поиска живых клеток в образце и его сканирования.

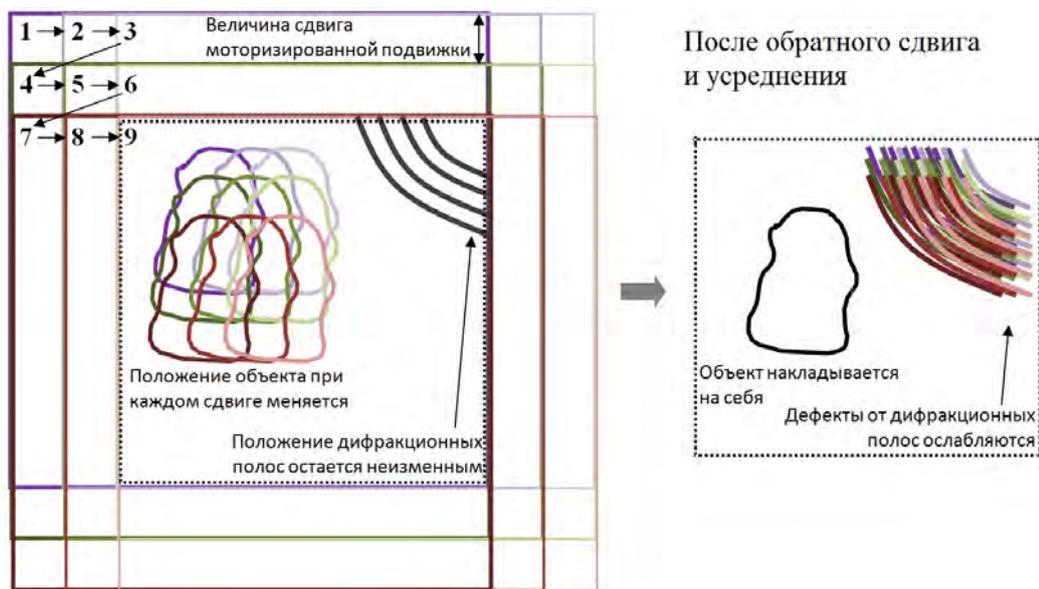


Рис. 2.7. Схема используемого метода поперечного смещения для устранения когерентного шума. Вначале производится регистрация N цифровых голограмм со смещением исследуемого объекта (здесь $N=3$). После восстановления фазы благодаря обратному сдвигу происходит совмещение объекта, но не когерентных шумов, в результате чего влияние последних уменьшается.

Схема используемого алгоритма регистрации и обработки цифровых голограмм представлена на рисунке 2.7. Вначале производится регистрация нескольких цифровых голограмм объекта при его смещениях вдоль осей X и Y с заранее известным шагом. Затем полученные данные восстанавливаются и обрабатываются согласно алгоритмам, описанным ранее. Таким образом в результате восстанавливается набор фазовых распределений объекта сдвинутых друг относи-

тельно друга. При этом меняется положение (и иногда форма) паразитных когерентных шумов относительно исследуемого объекта так, что при обратном смещении всех фазовых распределений данные дефекты не накладываются друг на друга (рисунок 2.7). Таким образом, метод усреднения с обратным сдвигом позволяет в некоторых случаях значительно увеличить качество получаемых данных, при этом не снижая пространственного разрешения. Очевидно, что для получения одинаковой степени качества восстановления по обеим осям желательно провести одинаковое количество сдвигов как вдоль оси X, так и вдоль оси Y. При этом усреднение такого рода предполагает некоторое уменьшение поля зрения, по сравнению с тем, что достигается при регистрации отдельной цифровой голограммы. Учитывая эти соображения легко понять, что оптимальной в таком случае является регистрация N^2 цифровых голограмм, с матрицей сдвигов представляющей собой квадрат со стороной $N \times N$.

В ходе апробации данного метода был проведен анализ степени компенсации когерентных шумов при различном количестве зарегистрированных цифровых голограмм. Для этого проводилась запись наборов из 1, 4, 9, ... 49 голограмм одного и того же тестового объекта, набора живых клеток линии HeLa, при использовании микрообъектива 40x с числовой апертурой 0.65, после чего полученные данные обрабатывались в соответствии с описанными выше методами. Пример исходного фазового распределения, полученного без использования описанного метода устранения когерентного шума показан на рисунке 2.8(а). Результаты полученные при устранении когерентного шума методами усреднения со сдвигом с использованием 16 и 49 цифровых голограмм представлены на рисунке 2.8(б,в). Из данных иллюстраций легко заметить, как при большем количестве кадров, используемом для устранения когерентного шума уменьшается влияние концентрических дифракционных колец, особенно в правом нижнем углу изображения. Для демонстрации количественного уменьшения вклада когерентного шума при увеличении количества фазовых изображений, используемых для усреднения было проведено вычисление среднеквадрата

тического отклонения от распределения фазы, полученного при усреднении 49 голограммы (последнее в данном случае считалось эталонным, хотя, очевидно, оно также обладает некоторыми искажениями).

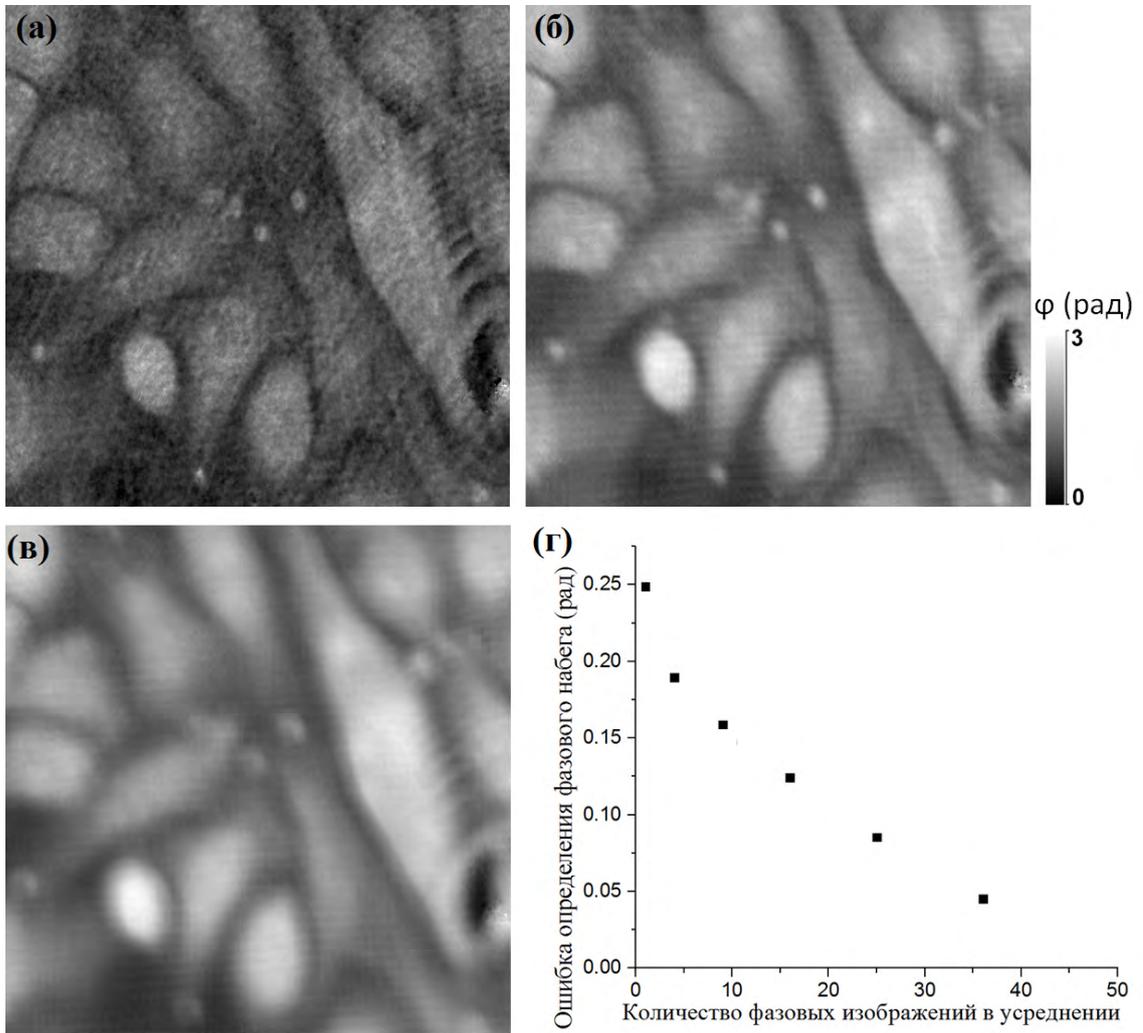


Рис. 2.8. Фазовые распределения группы клеток линии HeLa: (а) без устранения когерентного шума и при устранении когерентного шума с использованием (б) 16 и (в) 49 фазовых изображений. (г) график изменения ошибки восстановления фазового распределения от количества фазовых картин, используемых при реализации метода усреднения со сдвигом для устранения когерентных шумов.

Несмотря на то, что устранение когерентного шума позволяет значительно улучшить восстановление фазового изображений живых клеток, данная операция требует времени на регистрацию нескольких цифровых голограмм с поперечным сдвигом объекта исследования. Вместе с тем при вычислении многих параметров живых клеток, таких как средний фазовый набег, объем клетки

или их сухая масса используются лишь усредненные по площади клетки величины, что делает эти характеристики слабо чувствительными к когерентному шуму. При этом, как будет продемонстрировано далее, исследование динамики изменения клеточных параметров требует регистрации большого количества цифровых голограмм для анализа статистических данных об изменении оптических и морфологических параметров живых клеток во всей популяции. При этом актуальным становится восстановление большого числа разных фазовых распределений в образце и метод усреднения со сдвигом для устранения когерентного шума, ограничивающий временное разрешение цифровой голографической микроскопии, становится неприменимым в данных условиях. С другой стороны, при иной обработке фазовых распределений клеток сильно чувствительной к дефектам в фазовых распределениях устранение когерентного шума оказывается весьма актуальной процедурой, значительно повышающей качество вычисляемых параметров. Это будет продемонстрировано в разделе 5, посвященном восстановлению двухмерных распределений толщины и интегрального показателя преломления сухих клеток.

2.3. Исследование влияния случайных и систематических погрешностей на точность метода цифровой голографической томографии с использованием обратного распространения для восстановления асимметричных градиентов показателя преломления

Помимо оптимизации самих численных алгоритмов восстановления фазы предметной волны и выбора наилучших параметров для устранения случайных и систематических погрешностей также была выполнена работа по исследованию влияния таких ошибок на другой важный метод, использованный в данной работе - томографический алгоритм обратного распространения [228].

Данный подход позволяет восстановить трехмерное распределение показателя преломления в исследуемом объекте на основе численной обработки нескольких восстановленных распределений фазового запаздывания, соответствующих различным углам падения зондирующей волны на прозрачный объект.

Общая схема данного метода восстановления трехмерных оптических параметров объекта представлена на рисунке 2.9(а). Вначале производится регистрация набора внеосевых цифровых голограмм, которые затем восстанавливаются с помощью описанных выше методов обработки. После развертки полученных фазовых распределений из каждого из них выделяется одномерный массив значений фазы, соответствующий первой строке двумерного массива, с определенной координатой по оси Z . Затем комбинированием всех указанных строк формируется двумерный массив, так называемая синограмма, которая подвергается фильтрации высоких пространственных частот. После этого производится обратное распространение каждой из строк синограммы под углом равным углу падения зондирующей волны на исследуемый объект. В результате при обработке достаточно большого количества фазовых распределений происходит восстановление общей формы объекта в данной плоскости XY сечения. Затем аналогичная операция производится со следующей строкой синограммы и т.д. Таким образом формируется трехмерный массив, представляющий собой пространственное распределение показателя преломления в объекте. Стоит отметить, что использование фильтрации высоких пространственных частот необходимо для того, чтоб не допустить размытия резких краев объекта. На рисунке 2.9(б,в) представлены результаты применения данного алгоритма при наличии и отсутствии процедуры фильтрации. Основными преимуществами описанного метода является сравнительно низкая вычислительная сложность и приемлемое качество восстановления объекта даже при использовании небольшого набора данных из 10-15 цифровых голограмм. В связи с этим указанный алгоритм уже активно применялся в ряде работ посвященных цифровой голографической томографии [87, 175, 229, 230].

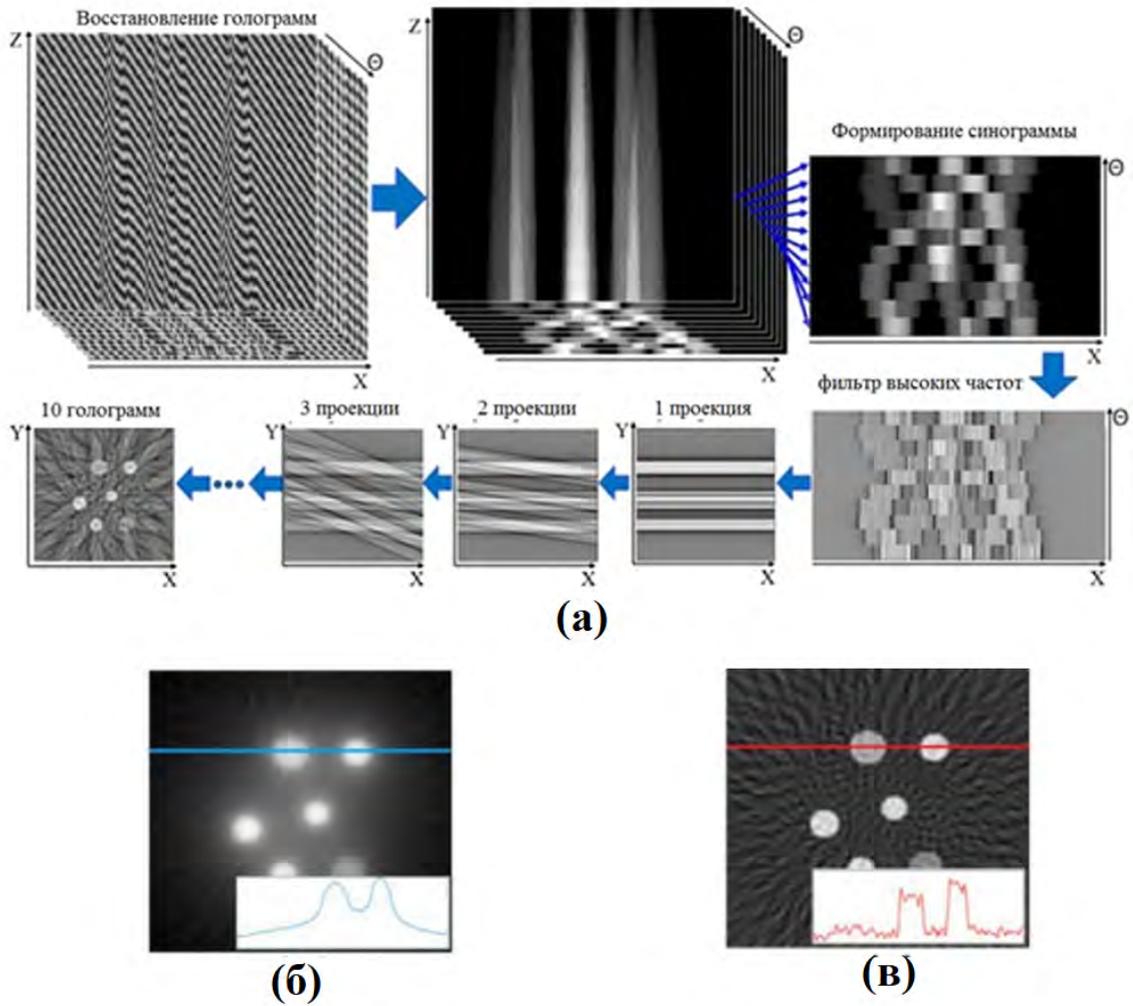


Рис. 2.9. (а) - алгоритм обработки цифровых голограмм для восстановления трехмерного распределения показателя преломления. Результат восстановления одного из слоев трехмерного распределения показателя преломления модельного объекта при (б) отсутствии и (в) наличии фильтрации высоких частот.

После программной реализации данного алгоритма перед его дальнейшим использованием на реальных данных было решено исследовать влияние основных случайных и систематических погрешностей, возникающих в экспериментальной работе. Для этого было разработано программное обеспечение, моделирующее процессы записи внеосевых цифровых голограмм тестового объекта с возможностью введения различного рода погрешностей. В частности, были учтены следующие факторы: аддитивный шум при регистрации цифровых голограмм, неточности измерения угла падения зондирующего пучка на объект, несовпадение оси вращения объекта в эксперименте и моделировании, а так-

же неперпендикулярность направления распространения зондирующей волны к оси вращения объекта. Это позволило изучить возможности данного алгоритма и предупредить возможные ошибки при постановке экспериментов с использованием методов цифровой голографической томографии.

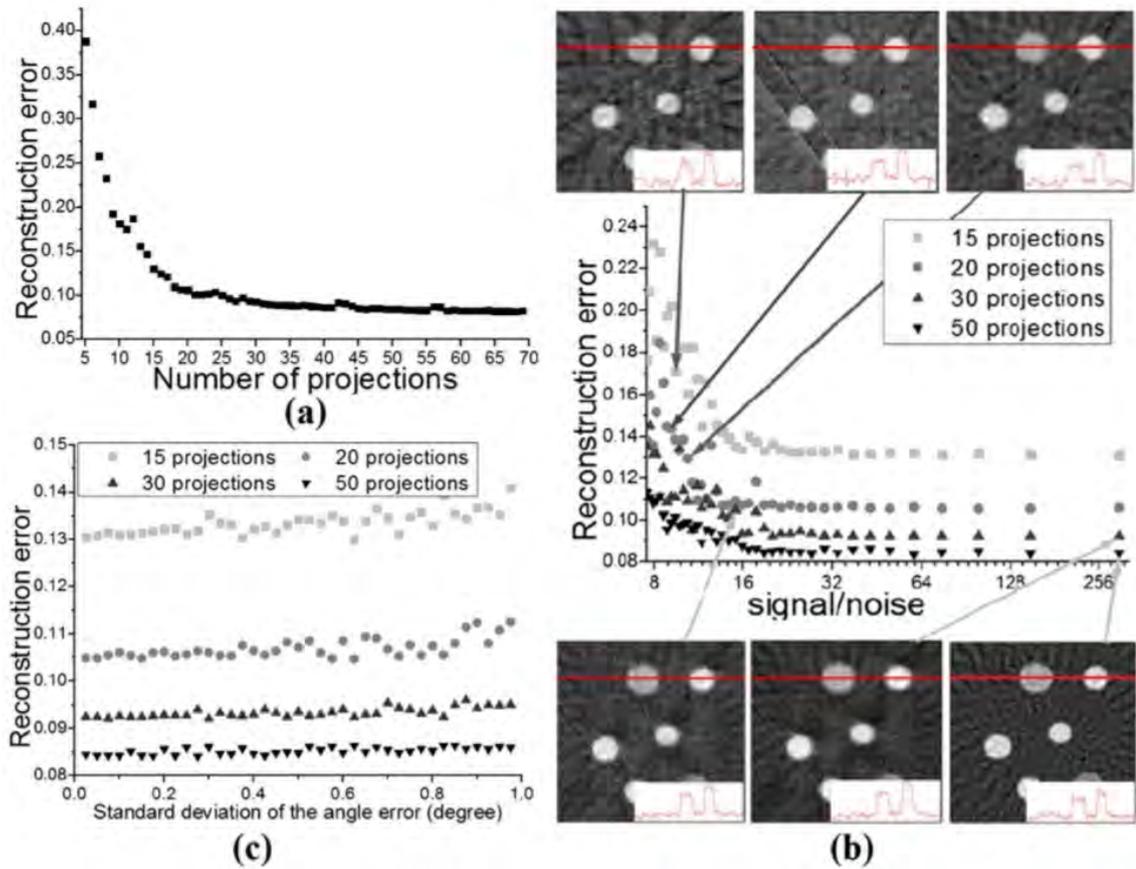


Рис. 2.10. (а) - график зависимости ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта в зависимости от количества цифровых голограмм, используемых для обработки данных. (б) - зависимость ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от отношения сигнал/шум при регистрации и обработке разного количества цифровых голограмм. На сносках представлены типичные результаты восстановления показателя преломления в сечении XY для указанных параметров численного эксперимента. Значения по оси X отложены в логарифмической шкале. (в) - зависимость ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от погрешности измерения угла падения зондирующей волны на исследуемый объект.

На первом этапе работы было исследовано качество восстановления заданного тестового объекта, представляющего собой набор из нескольких конусов с

постоянным показателем преломления, отличным от показателя преломления среды, в зависимости от количества внеосевых цифровых голограмм. График полученной зависимости (рисунок 2.10(а)) демонстрирует нелинейное убывание погрешности восстановления искомого объекта при увеличении набора исходных данных. Из полученного графика можно сделать вывод о том, что при реализации данного томографического метода целесообразно ограничиться регистрацией 15-20 цифровых голограмм в связи с тем, что дальнейшее увеличение набора исходных данных не приводит к существенному повышению точности восстановления, однако повышает вычислительную сложность алгоритма. При введении аддитивного гауссова шума в процесс регистрации цифровых голограмм, качество восстановления снижается. В такой ситуации для случаев низкого отношения сигнал/шум при регистрации внеосевых цифровых голограмм увеличение количества проекций значительно уменьшает погрешность восстановления тестового объекта (рисунок 2.10(б)), что связано с явлением взаимной компенсации случайных аддитивных шумов, которое усиливается при увеличении количества используемых данных. Аналогично, при наличии погрешностей в измерении угла вращения объекта, увеличение количества регистрируемых цифровых голограмм также приводит к лучшей компенсации ошибок, обусловленных такими неточностями. Это проявляется в меньшем наклоне прямых на рисунке 2.10(в), соответствующих большему числу используемых цифровых голограмм. Здесь алгоритм обратного распространения тоже отчасти приводит к усреднению данных, что позволяет уменьшить неточности восстановления при использовании большого числа регистрируемых цифровых голограмм.

Однако другой тип погрешностей, возникающих при экспериментальном исследовании трехмерных распределений показателя преломления томографическими методами, приводит к принципиально иным результатам. Ранее рассмотренные типы ошибок относились к классу случайных погрешностей, центр статистического распределения которых не смещен относительно верного значения соответствующей величины. Однако другие типы погрешностей, связанные

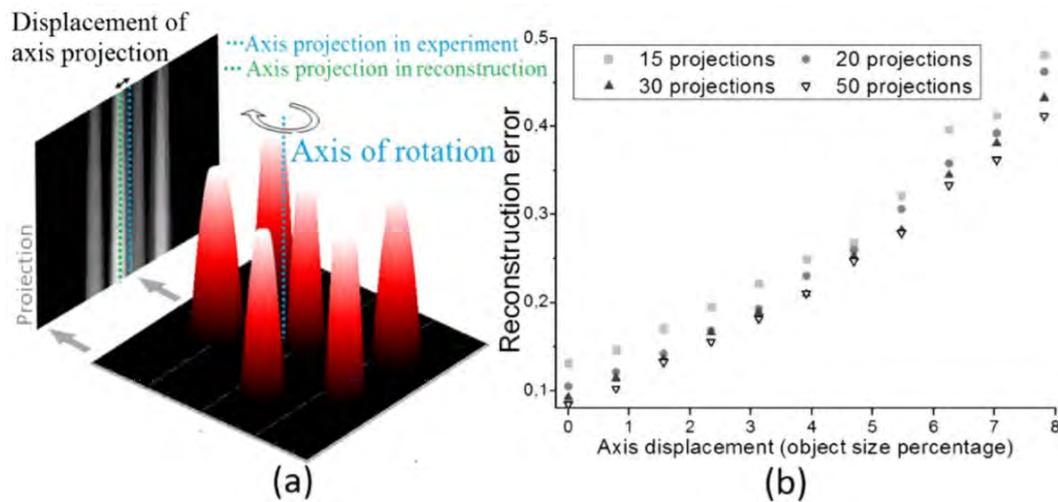


Рис. 2.11. (а) - иллюстрация возможного источника систематической погрешности, связанной с разницей положений оси вращения объекта в эксперименте и при обработке полученных данных. (б) - зависимость ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от смещения осей вращения в эксперименте и при обработке данных.

с неверной постановкой эксперимента, могут приводить к более существенным ошибкам при восстановлении трехмерного объекта. Одной из таких ошибок является различное положение оси вращения объекта при регистрации экспериментальных данных и обработке полученных цифровых голограмм (рисунок 2.11(а)). Это связано с тем, что процесс восстановления трехмерного распределения показателя преломления требует верного определения не только угла падения зондирующего волнового фронта на объект, но и положения оси его вращения. Для того чтобы избежать этой ошибки при создании экспериментальной установки желательно обеспечить такое расположение оптических элементов, чтобы ось вращения находилась в центре кадра регистрируемой голограммы. Незначительные погрешности в таком расположении объекта неизбежно приводят к существенному уменьшению точности восстановления искомого распределения показателя преломления (рисунок 2.11(б)). При этом такая ошибка является систематической и увеличение количества регистрируемых данных не позволяет уменьшить получаемые искажения. Аналогичная ситуация возникает, если ось вращения объекта оказывается не перпендикулярна направлению

распространения волнового фронта (рис. 2.12(а)). В таком случае каждая строка синограммы, распространяемая назад в ходе работы томографического алгоритма, не будет точно соответствовать одному горизонтальному слою с определенной координатой по оси Z . Это также приводит к возникновению ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления объекта, значение которой не может быть уменьшено путем увеличения числа регистрируемых цифровых голограмм. График зависимости погрешности восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от наклона между осью вращения и направлением распространения представлен на рисунке 2.12(б).

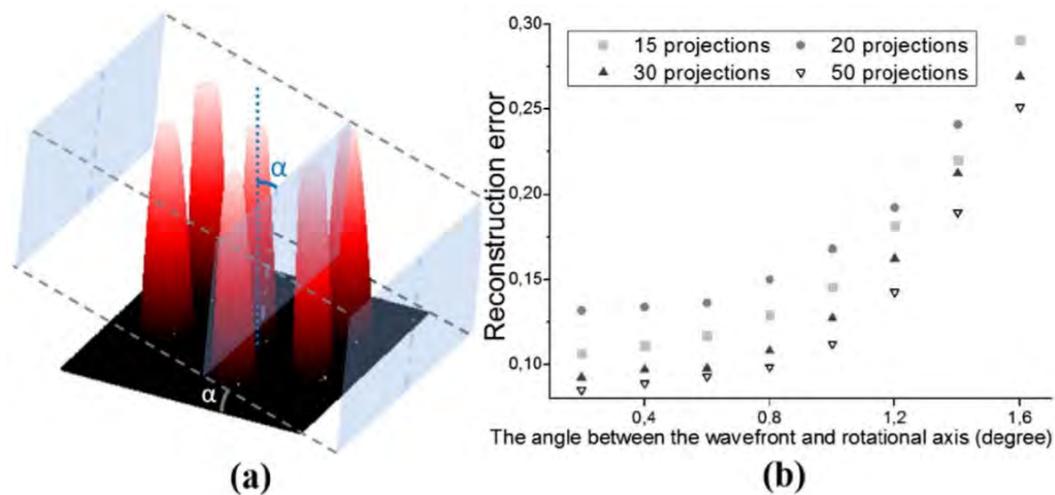


Рис. 2.12. (а) - иллюстрация возможного источника систематической погрешности, связанной с неперпендикулярностью оси вращения объекта к направлению распространения предметной волны. (б) - зависимость ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от наклона между осью вращения и направлением распространения.

Кроме того, стоит отметить, что систематические погрешности не только не могут быть устранены путем увеличения количества регистрируемых данных, но также и вносят, как правило, гораздо более существенные искажения в полученные результаты. Так, например, для созданной нами экспериментальной установки отклонение оси вращения от центра регистрируемой голограммы на 40-45 пикселей приводит к увеличению ошибки восстановления в 4 раза, а

наклон оси вращения объекта на 1.5 градуса ведет к ее увеличению в 3 раза. Таким образом, предотвращение данных ошибок чрезвычайно важно для получения верных результатов при реализации методов цифровой голографической томографии. В то же время влияние неточностей в угле вращения объекта или низкого отношения сигнал/шум на регистрируемых цифровых голограммах может быть уменьшено путем регистрации и обработки большего количества исходных данных.

В результате в первой главе данной работы было исследовано влияние основных случайных и систематических погрешностей на качество восстановления фазовых распределений во внеосевой цифровой голографии и голографической томографии. Это позволило оптимизировать процессы обработки исходных данных для получения наилучшего качества восстановления фазовых распределений и распределений показателя преломления в исследуемых объектах. В результате работы были реализованы численные алгоритмы восстановления фазовых распределений с компенсацией аддитивного и когерентного шума, а также методы последующего томографического восстановления, основанного на обработке набора цифровых голограмм, соответствующих различным углам падения предметной волны на объект. Как будет показано далее в разделе 3.2, компенсация систематических погрешностей в цифровой голографической томографии позволяет восстанавливать трехмерное распределение температурных градиентов с высокой точностью.

Глава 3

Исследование трехмерных температурных градиентов при фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в растворах с помощью голографических методов

Основой фотодинамической терапии, как метода лечения ряда онкологических и дерматологических заболеваний является генерация синглетного кислорода, являющегося высоко активной формой молекулярного кислорода, способного запускать ряд важных химических реакций в биологических средах, в том числе инициировать различные механизмы гибели живых клеток (см. раздел 1.4.4). Это и обуславливает высокую актуальность задач детектирования и исследования процессов генерации синглетного кислорода, прежде всего с использованием фотосенсибилизаторов, применяемых в клинической практике. Традиционным методом регистрации молекул синглетного кислорода является регистрация его сигнала флуоресценции на длине волны 1274 нм (см. раздел 1.4.2). Несмотря на то, что современные фотоэлектронные умножители используемые для регистрации одиночных фотонов позволяют детектировать даже столь слабые сигналы [194, 231], весьма перспективной является разработка альтернативных методов регистрации этих молекул. Такой подход может быть, например, основан на мониторинге температурных градиентов, формирующихся при безызлучательных переходах синглетного кислорода в основное состояние, которые значительно преобладают из-за сильной запрещенности излучательного перехода. В связи с этим, данная часть работы была посвящена разработке и апробации методов детектирования синглетного кислорода посредством регистрации градиента температуры, образующегося в области его локализации. Соответствующий градиент показателя преломления окружающей среды может

быть зарегистрирован по изменению фазы прошедшего нерезонансного излучения, для чего и использовались методы цифровой голографии и томографии. Стоит отметить, что помимо безызлучательных переходов синглетного кислорода определенный вклад вносят также и безызлучательные переходы молекул фотосенсибилизатора, также приводящие к нагреву окружающей среды.

3.1. Использование обратного преобразования Абея для детектирования осесимметричных трехмерных температурных градиентов

Схема экспериментальной установки, используемой для регистрации внеосевых цифровых голограмм представлена на рисунке 3.1. В качестве источника лазерного излучения использовался HeNe лазер, а экспериментальная установка представляла собой интерферометр Маха-Цендера с телескопической 4-f системой в предметном плече для адаптации размеров температурного градиента к размерам матрицы фотодетектора "Видеоскан-2-205". Кроме того использование телескопической системы позволяло переносить распределение комплексной амплитуды из плоскости объекта на фотодетектор и не учитывать дифракцию предметной волны. Возбуждение синглетного кислорода в водном растворе фотосенсибилизатора Радахлорина производилось с помощью лазерного излучения мощностью 50 мВт с длиной волны 405 нм. Схема используемой установки представлена на рисунке 3.1.

В данном исследовании генерация синглетного кислорода производилась в водном растворе фотосенсибилизатора при трех различных концентрациях равных 0.16%, 0.33% и 0.66%. При введении в предметное плечо интерферометра кюветы с водным раствором фотосенсибилизатора вследствие несовершенства оптических свойств объекта происходило искажение формы предметной волны. В связи с этим, даже при отсутствии температурного градиента, индуцирован-

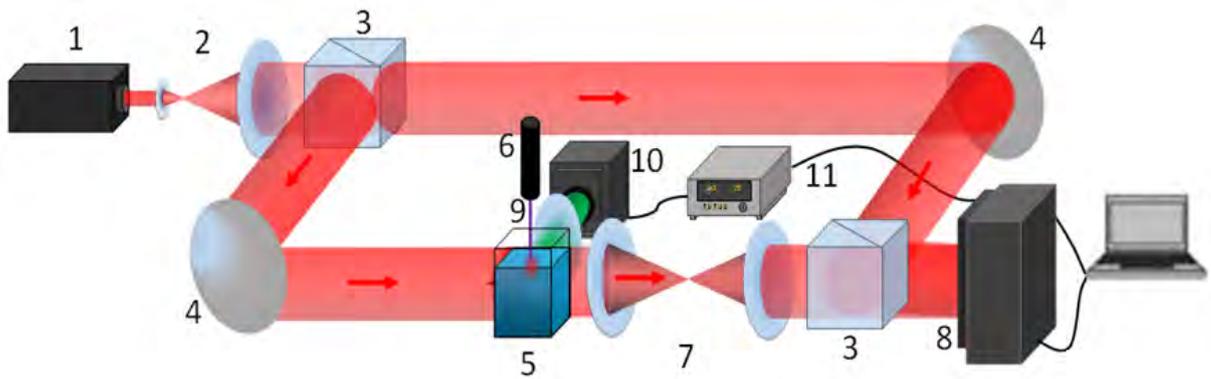


Рис. 3.1. Экспериментальная установка по регистрации температурных градиентов сформированных в результате фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода. 1 – регистрирующий лазер, 2 – расширитель пучка, 3 – делитель пучка, 4 – зеркало, 5 – кювета с водным раствором Радахлорина, 6 – возбуждающий лазер, 7 – телескопическая система, 8 – ПЗС матрица, 9 – коллимирующая линза, 10 – ФЭУ, 11 – счетчик фотонов.

ного безызлучательными переходами в водном растворе фотосенсибилизатора предметная волна интерферометра была не плоской. Для устранения данных aberrаций оптической системы, для определения фазового запаздывания, внесенного температурным градиентом в волновой фронт, производилось вычитание восстановленных фазовых распределений, соответствующих наличию и отсутствию температурного градиента в среде. Примеры фазовых распределений, соответствующих наличию и отсутствию нагрева в среде, а также их разность, иллюстрирующая пространственное распределение внесенного температурным градиентом фазового запаздывания представлены на рисунке 3.2.

В рамках первого этапа экспериментов по детектированию температурных градиентов, сформированных в результате фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода, луч лазера с цилиндрически симметричным распределением интенсивности в поперечном сечении пучка был направлен перпендикулярно к поверхности приготовленного водного раствора Радахлорина, как это показано на рисунке 3.1. В ходе экспериментов для каждой из трех выбранных концентраций фотосенсибилизатора в водном растворе был зарегистрирован набор цифровых голограмм, соответствующий различной длительности воздействия лазерного излучения с интервалом 1 секунда. Примеры полученных

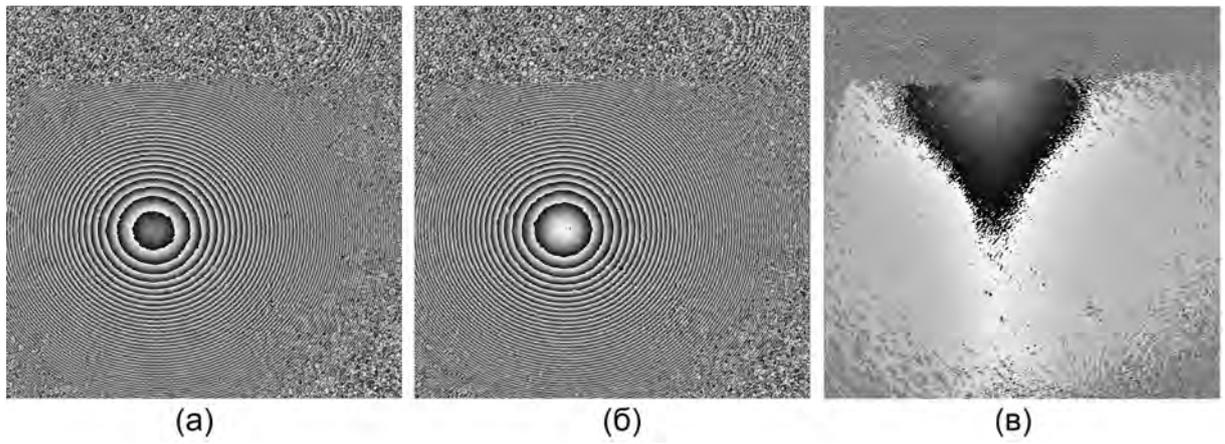


Рис. 3.2. Примеры фазовых распределений, соответствующих: (а) наличию и (б) отсутствию нагрева в водном растворе фотосенсибилизатора, а также (в) их разнице соответствующей картине фазового сдвига, внесенной градиентом температуры.

фазовых распределений для некоторых длительностей генерации синглетного кислорода представлены на рисунке 3.3.

Полученные картины фазового сдвига являются пространственными распределениями интегрального фазового сдвига, приобретенного проходящей через температурный градиент предметной волной. В общем случае это не позволяет определить точную температуру в исследуемой области в связи с тем, что полученные значения фазового набега зависят как от распределения показателя преломления в данной области, так и от ее пространственных размеров.

$$\Delta\phi(x_0, y_0) = -\frac{2\pi}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} n(x, y, z) dl \quad (3.1)$$

Однако, осесимметричное распределение интенсивности в сечении пучка лазера, возбуждающего молекулы фотосенсибилизатора и однородность приготовленного раствора позволяют сделать предположение о цилиндрической симметрии сформированного температурного градиента. В таком случае радиальное распределение показателя преломления в водном растворе фотосенсибилизатора может быть найдено благодаря обратному преобразованию Абеля:

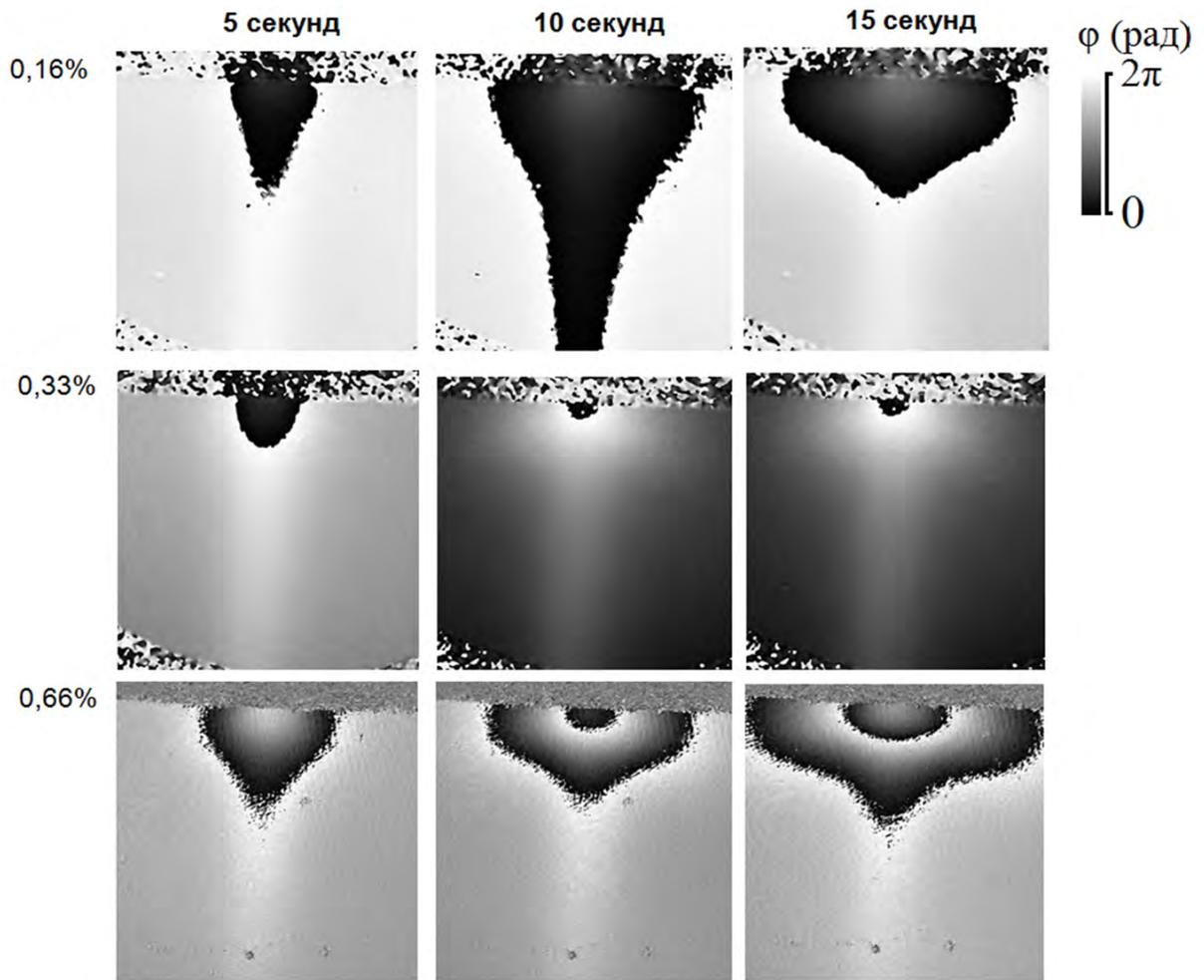


Рис. 3.3. Результаты восстановления распределений фазового сдвига, внесенных температурными градиентами при различных концентрациях фотосенсибилизатора и длительности воздействия лазерного излучения.

$$f(r) = -\frac{1}{\pi} \int_r^{\infty} \frac{dF(x)}{dx} \frac{dx}{\sqrt{x^2 - r^2}} \quad (3.2)$$

В результате применения данного преобразования к развернутым фазовым распределениям можно рассчитать радиальное распределение показателя преломления, которое с достаточно высокой точностью связано с температурой воды прямой пропорциональной зависимостью. Таким образом, благодаря осесимметричному распределению возбуждающего лазерного излучения удалось восстановить полное распределение температуры раствора во всей кювете. Из полученных данных видно, что как увеличение концентрации Радахлорина в растворе, так и увеличение длительности воздействия лазера приводит к росту

максимальной температуры и размеров градиента.

Для дополнительного контроля процесса фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода детектировался сигнал его фосфоресценции на длине волны 1274 нм с использованием узкополосного интерференционного фильтра и высокочувствительного фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), работающего в режиме счета фотонов. Для корректной регистрации детектируемых фотонов необходимо произвести коллимацию регистрируемого пучка, так чтоб он падал строго перпендикулярно входному отверстию, что было сделано с помощью собирающей линзы. Для дополнительной фильтрации также использовалась кремниевая пластина, поглощающая излучение с длиной волны менее 1050 нм. Частота счета фотонов равнялась 200 КГц и задавалась с помощью оптомеханического модулятора. В ходе проведения описанного выше эксперимента по голографическому мониторингу безызлучательной релаксации наблюдался устойчивый стабильный сигнал фосфоресценции, квантовый выход которого зависел от длительности воздействия лазерного излучения, что обусловлено обесцвечиванием молекул фотосенсибилизатора.

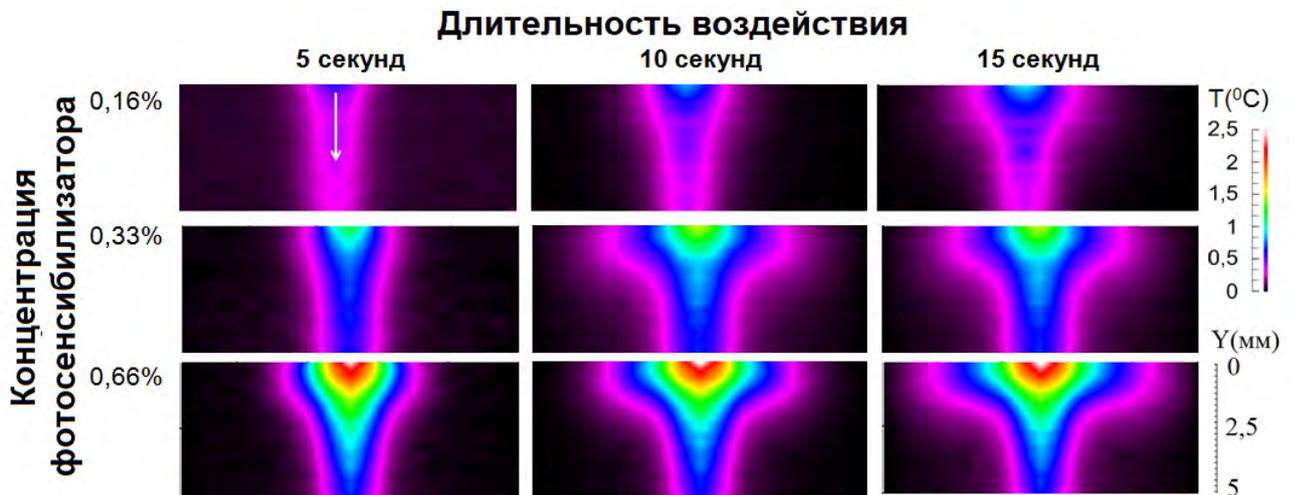


Рис. 3.4. Результаты восстановления радиальных распределений температурных градиентов соответствующих различным концентрациям фотосенсибилизатора и длительности воздействия лазерного излучения.

3.2. Использование методов цифровой томографии для детектирования произвольных трехмерных температурных градиентов

Однако, большой интерес представляет также измерение распределения температуры при отсутствии осевой симметрии в исследуемом объекте. Для исследования таких распределений целесообразно использовать метод голографической томографии, основанный на записи набора внеосевых цифровых голограмм, соответствующих различным углам падения предметной волны на исследуемый объект. В связи с тем, что фазовый сдвиг, внесенный температурным градиентом в волновой фронт в первом эксперименте не превышал 13 радиан, а его градиент занимал область много большую длины волны лазерного излучения, можно предположить, что предметная волна проходит через объект подобного рода без существенной дифракции и изменения направления распространения. Это предположение позволяет оправдать использование метода обратного распространения, так как данный подход может использоваться лишь в приближении геометрической оптики, применимом лишь в некоторых случаях. Например, когда дифракция предметной волны на исследуемом фазовом или амплитудно-фазовом объекте является существенной необходимо использовать другой класс методов дифракционной томографии, обладающих большей областью применимости и вычислительной сложности [232, 233].

В рамках данной работы для создания неосесимметричного пространственного распределения градиента температуры было решено использовать полупроводниковый лазер с неосесимметричным распределением интенсивности в сечении пучка (рис. 3.5(а)). Кроме того угол падения луча данного лазера на поверхность водного раствора фотосенсибилизатора был отличен от 90 градусов, как это показано на рисунке 3.5(б).

В результате таких изменений обратное преобразование Абеля оказывает

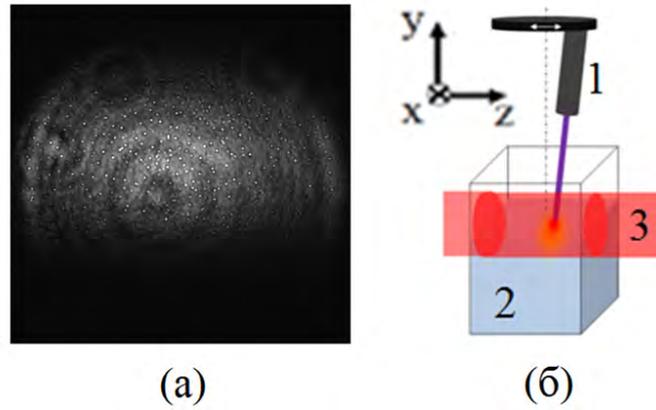


Рис. 3.5. (а) - распределение интенсивности в сечении пучка полупроводникового лазера, (б) – схема исследуемого объекта: 1 – полупроводниковый лазер, закрепленный на вращающейся подвижке, 2 – кювета с 0.17% водным раствором фотосенсибилизатора, 3 – зондирующее излучения He-Ne лазера

ся неприменимо в данной ситуации. Для регистрации набора цифровых голограмм соответствующих разным углам падения предметной волны на исследуемый объект было решено производить регулируемое вращение лазера, создающего градиент показателя преломления с интервалом 10° и использовать набор из 18 цифровых голограмм для восстановления трехмерного распределения температуры в кювете. Однако простое вращение исследуемого объекта в процессе воздействия лазерного излучения на водный раствор Радахлорина может дать неверные результаты вследствие изменения температурного градиента происходящего во время этого вращения. Из-за этого было решено записать несколько отдельных наборов из 15 голограмм регистрируемых с интервалом в одну секунду для каждого из 18 углов поворота исследуемого объекта. При этом в каждом из 18 экспериментов водный раствор фотосенсибилизатора менялся на новый чтобы предотвратить влияние эффектов связанных с фотообесцвечиванием. Затем для каждого момента времени извлекался набор восстановленных фазовых распределений, соответствующих различным углам поворота возбуждающего лазера. Пример набора из 6 фазовых распределений при разных положениях объекта представлен на рисунке 3.6. Эксперименты с использованием методов голографической томографии проводились при концентрации Радахло-

рина 0.16%.

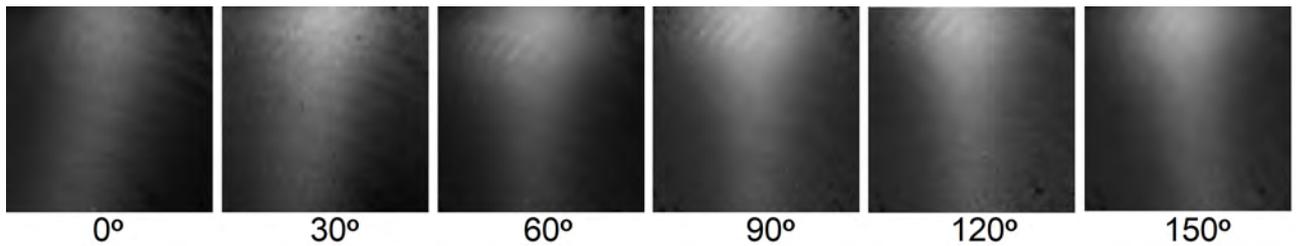


Рис. 3.6. Примеры фазовых распределений температурного градиента при разных углах падения предметной волны.

В результате обработки полученного набора фазовых распределений с использованием метода обратного распространения, описанного в предыдущей главе было восстановлено температурное распределение в каждый момент времени. Примеры поперечных сечений температурного распределения соответствующие различной длительности генерации синглетного кислорода представлены на рисунке 3.7(а-е). Кроме того, эквитермальные поверхности, показанные на рисунке 3.7(ж) демонстрируют небольшой наклон градиента и эллиптическое распределение температуры в XY сечении, в соответствии с постановкой эксперимента.

Несмотря на то, что прямое сравнение между распределениями температурных градиентов, полученных с помощью голографической томографии и обратного преобразования Абеля не может быть выполнено из-за разного распределения интенсивности в поперечном сечении пучка возбуждающего лазера, косвенное сравнение полученных данных может быть выполнено путем исследования временной динамики максимальной температуры в наблюдаемых градиентах. В связи с тем, что полная плотность мощности лазерных источников в обоих экспериментах была одинаковой и равнялась 50 мВт/см^2 , можно предположить, что различие максимальной температуры в первые несколько секунд при генерации синглетного кислорода лазерами с осесимметричным и неосесимметричным распределением интенсивности не будет сильным. Полученные графики временной динамики температуры для случаев восстановления тем-

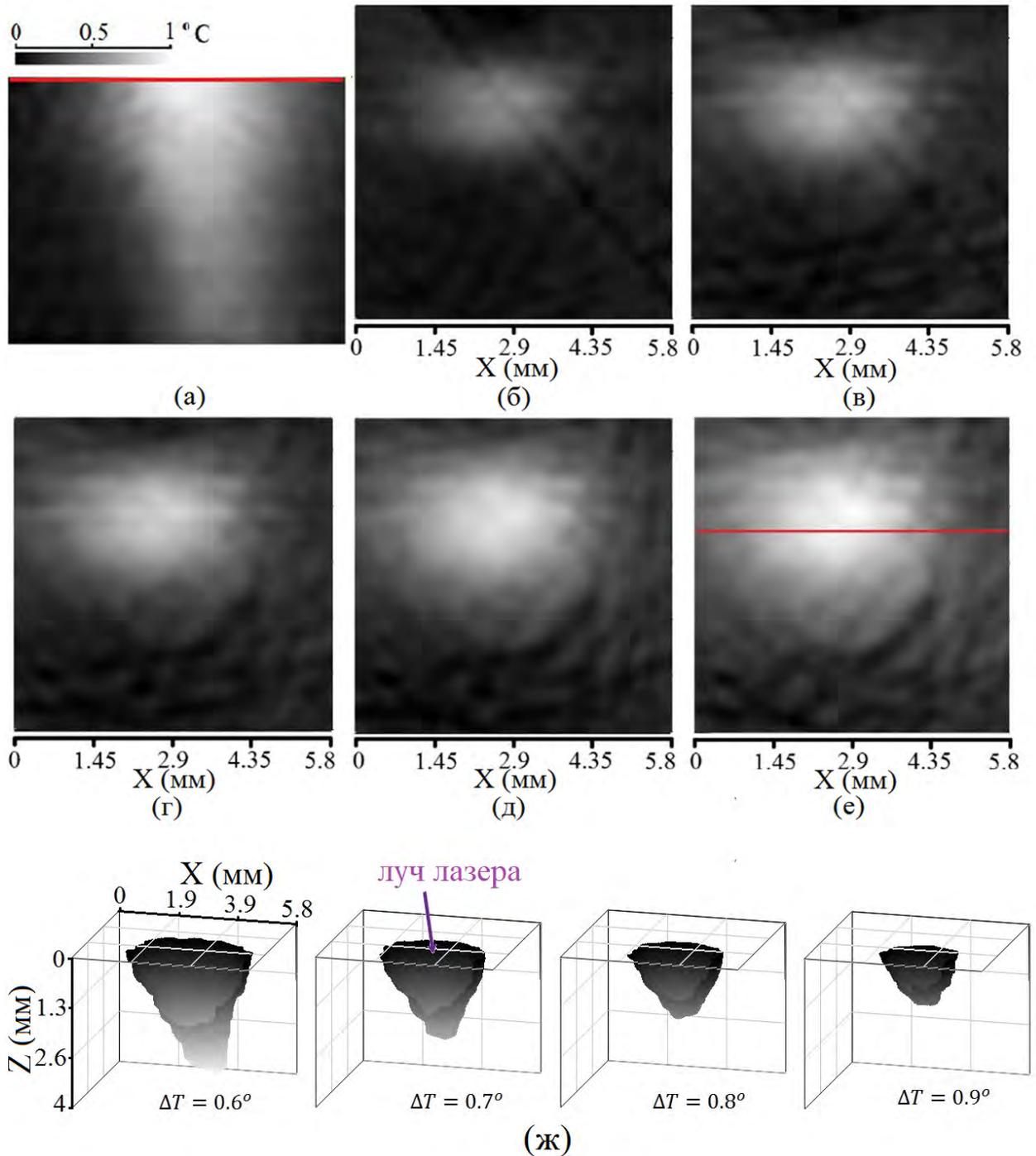


Рис. 3.7. (а) - вертикальное XZ-сечение температурного градиента, образовавшегося в результате генерации синглетного кислорода в течение 8 секунд и распределения температуры в горизонтальных сечениях у поверхности раствора после (б) – 2, (в) – 4, (г) – 6, (д) – 8 и (е) – 10 секунд генерации синглетного кислорода в кювете. Красными линиями на рис. 3.7(а) и рис. 3.7(е) отмечены относительные положения данных сечений. (ж) - набор изображений эквитермальных поверхностей, соответствующих 10 секундам фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода.

пературных градиентов преобразованием Абеля и методом обратного распространения демонстрируют хорошее совпадение с типичной погрешностью около 5-6% (рис. 3.8).

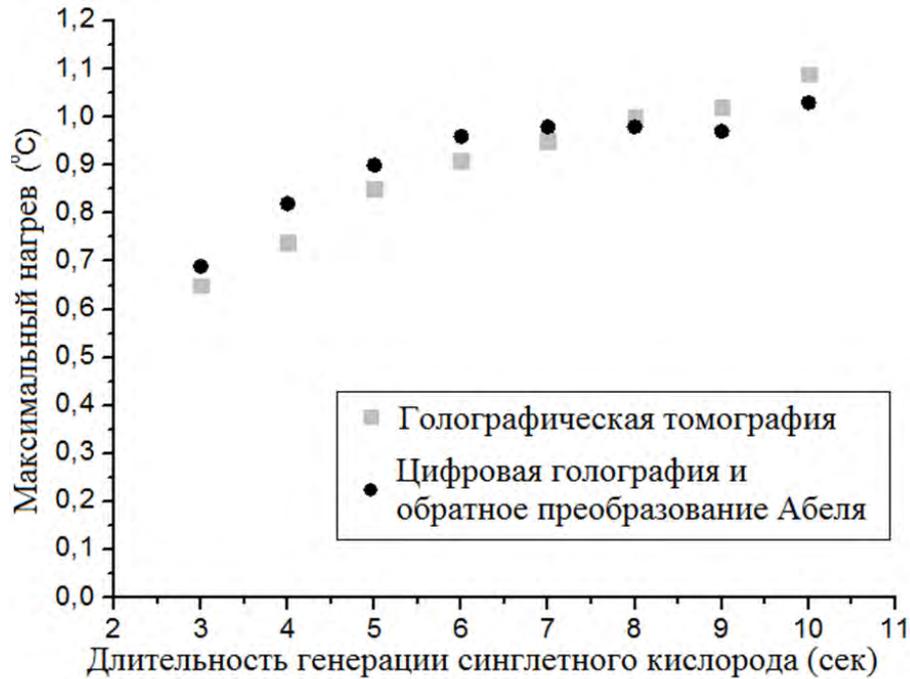


Рис. 3.8. Результат сравнения данных о максимальном нагреве полученных двумя методами: цифровой голографии с обратным преобразованием Абеля и голографической томографии.

3.3. Детектирование фазового набега, внесенного температурными градиентами при фотодинамическом воздействии, в зависимости от концентрации кислорода

В проведенных экспериментах температурные градиенты, регистрируемые с помощью методов цифровой голографии, возникали в результате безызлучательных переходов в двух типах молекул: молекулах фотосенсибилизатора Радахлорин, возбуждаемых при поглощении лазерного излучения, и синглетного кислорода. При этом регистрация сигнала флуоресценции Радахлорина на длине волны 660 нм не представляет труда, в отличие от детектирования фос-

форесценции синглетного кислорода. Для того, чтобы продемонстрировать то, что генерируемый синглетный кислород в данном эксперименте наряду с Радахлорином также вносит существенный вклад в формируемый температурный градиент нами была проведена серия экспериментов с различной концентрацией молекул кислорода в водном растворе фотосенсибилизатора. Для изменения этой концентрации была использована герметичная кювета с 0.16% водным раствором фотосенсибилизатора, куда производилась накачка кислорода (рис. 3.9).

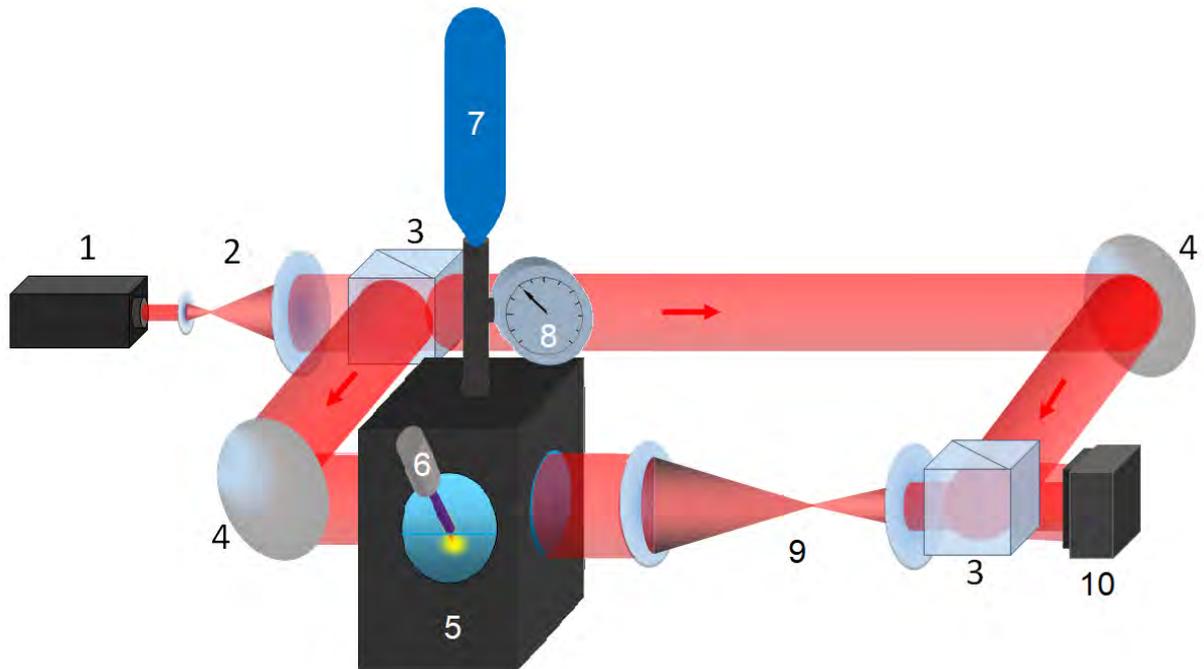


Рис. 3.9. Экспериментальная установка для голографического мониторинга температурных градиентов при различном давлении кислорода в кювете. 1 – регистрирующий лазер, 2 – расширитель пучка, 3 – делитель пучка, 4 – зеркало, 5 – кювета с водным раствором Радахлорина, 6 – возбуждающий лазер, 7 – баллон с кислородом, 8 – барометр, 9 – коллимирующая линза, 10 – матричный фотодетектор.

По прошествии некоторого времени кислород диффундировал в жидкость и его концентрация менялась. В силу конструктивных особенностей герметичной кюветы нам не удалось создать условия, позволяющие сохранить цилиндрическую симметрию градиента показателя преломления или значительно варьировать угол для реализации методов голографической томографии. В связи с этим, восстановление температурных карт оказалось невозможным, однако

из рисунка 3.10 видно, что интегральный фазовый набег возрастает при увеличении давления кислорода в кювете, соответственно происходит и увеличение температурного градиента.

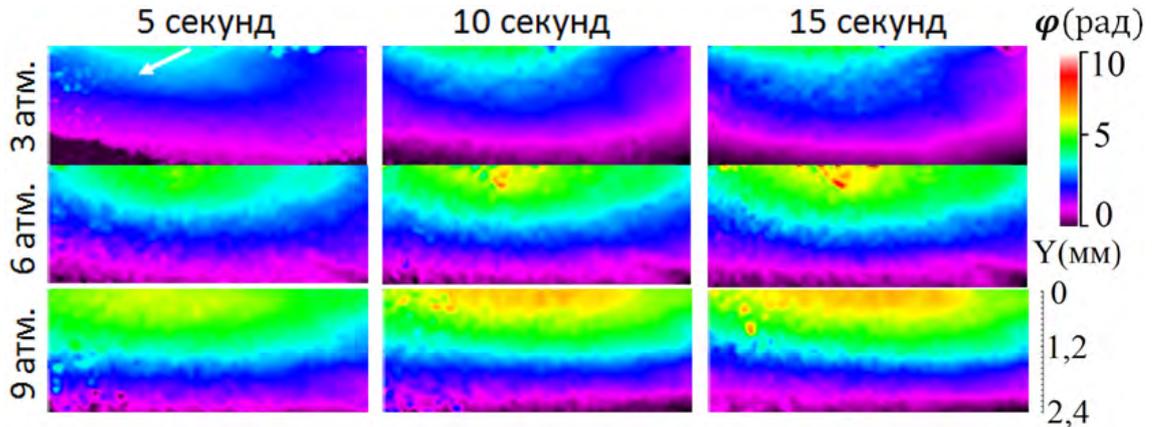


Рис. 3.10. Распределения интегрального фазового набега при различном времени возбуждения и давлении кислорода в кювете. Белой стрелкой обозначено направление излучения возбуждающего лазера.

В результате работы было показано, что увеличение концентрации кислорода, так же как и более длительная генерация синглетного кислорода приводят к возрастанию фазового набега. Причиной этого является более эффективная и продолжительная генерация и последующая релаксация синглетного кислорода. Вместе с тем повышение концентрации фотосенсибилизатора также приводит к росту фазового набега, обусловленного нагревом среды. Таким образом, было продемонстрирована возможность использования методов цифровой голографии и томографии для регистрации температурных градиентов, сформированных безызлучательными переходами возбужденных молекул фотосенсибилизатора и синглетного кислорода в основное состояние. При этом изменение концентрации фотосенсибилизатора и кислорода в водных растворах позволяет регулировать вклад безызлучательных переходов одних и других молекул в общее температурное распределение.

Глава 4

Разработка голографических методов идентификации и исследования гибели живых клеток, индуцированной фотодинамическим воздействием

Сегодня цифровая голографическая микроскопия активно используется для решения многих фундаментальных и прикладных задач биологии и медицины. Краткое описание некоторых основных областей применения данного метода было приведено в разделе 1.3. Но несмотря на большое количество работ, касающихся диагностики различных заболеваний с помощью голографической микроскопии, лишь сравнительно немного исследований было посвящено ее использованию для изучения процессов, происходящих с клетками и тканями в процессе их лечения. В то же время данный метод является абсолютно неинвазивным, и при малой плотности мощности зондирующего излучения он позволяет минимизировать стороннее влияние на клетку и получить важные количественные данные о ее характеристиках, которые в ряде случаев недоступны для изучения другими методами. Так, например, цифровая голографическая микроскопия может быть использована для исследования реакций живых клеток на фотодинамическое воздействие с различными режимами и механизмов их гибели при воздействии на фотосенсибилизированную клетку оптического излучения определенной длины волны.

4.1. Экспериментальная установка для реализации метода цифровой голографической микроскопии и алгоритм обработки внеосевых цифровых голограмм

В рамках данной работы было произведено исследование живых клеток двух стандартных линий HeLa и A549. Живые клетки данных типов из коллекции клеточных культур Санкт-Петербургского Института Цитологии РАН культивировались в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 1 % пенициллин-стрептомицина при температуре 37⁰С в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Для внедрения фотосенсибилизатора в клетки, Радохлорин был растворен в питательной среде клеток в концентрации 5 мкг/мл. В данном растворе спустя 48 часов после посева клетки инкубировались в чашках Петри в течении различных временных интервалов после чего накопление фотосенсибилизатора в клетках определялось по его флуоресценции в диапазоне 640-700 нм, возбуждаемой лазерным излучением на длине волны 405 нм. В результате анализа данных, полученных с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, было установлено, что существенное накопление Радахлорина в клетках происходит уже в первые 4 часа инкубации (см. рисунок 4.1), при этом фотосенсибилизатор успешно проникает во внутренние структуры клетки и преимущественно накапливается в околоядерной области. После диффузии фотосенсибилизатора в клетки, питательная среда заменялась на чистую среду DMEM, чтобы предотвратить воздействие генерируемых активных форм кислорода из внеклеточной среды.

На рис. 4.2 представлена схема собранного цифрового голографического микроскопа. После разделения луча He-Ne лазера с помощью первого светоделительного кубика происходит формирование когерентных предметного и опорного пучков. После прохождения предметного волнового фронта через исследуемый объект, закрепленный на двухкоординатной моторизированной подвижке,

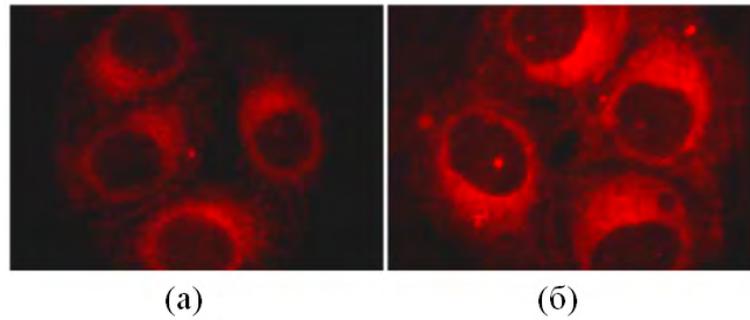


Рис. 4.1. Флуоресценция фотосенсибилизатора Радахлорина в клетках линии HeLa, наблюдаемая с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа после (а) двух и (б) четырех часов инкубации клеток в растворе Радахлорина.

происходит его расширение с помощью микрообъектива и коллимирующей линзы. Для увеличения размеров опорного пучка также используется телескопическая система. Затем благодаря второму делителю пучка происходит объединение волновых фронтов в плоскости матричного фотодетектора под некоторыми углами α и β по горизонтали и вертикали. Набор нейтральных светофильтров, помещенных сразу после источника лазерного излучения, использовался для уменьшения плотности мощности лазерного излучения в зондирующем пучке, которая равнялась $40\text{-}50 \text{ мкВт/см}^2$. Как будет продемонстрировано далее столь низкая плотность мощности позволила производить неинвазивный мониторинг фотосенсибилизированных клеток в течении нескольких часов.

При создании цифрового голографического микроскопа необходимо также обратить внимание на несколько важных аспектов, значительно влияющих на возможность получения качественной цифровой голограммы. Во первых, необходимо убедиться в том, что разность хода опорного и предметного волновых фронтов мала по сравнению с длиной когерентности используемого излучения. В связи с тем, что в данном случае в экспериментальной установке использовался He-Ne лазер, разность хода опорного и предметного пучков даже в $8\text{-}10 \text{ см}$ не приводит к заметному уменьшению контраста интерференционной картины. Во вторых, необходимо избавиться от вибраций оптических элементов интерферометра. На практике полностью устранить их движение относительно друг

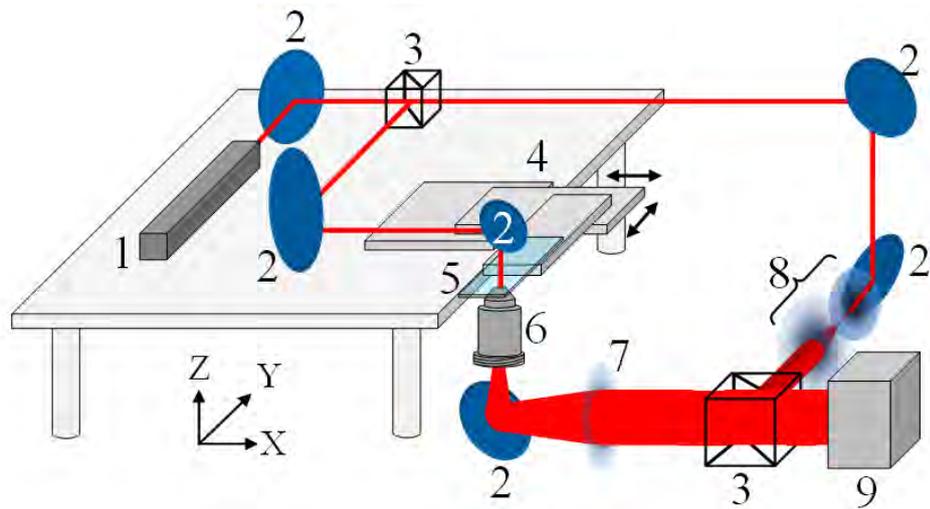


Рис. 4.2. Схема собранной оптической установки. 1 - He-Ne лазер, 2 - зеркала, 3 - делители пучка, 4 - двухосевая моторизированная подвижка, 5 - образец, 6 - микрообъектив, 7 - коллимирующая линза, 8 - бителескопическая система, 9 - матричный фотоприемник.

друга оказывается невозможным, в том числе из-за использования моторизированной подвижки, однако для получения хорошего контраста интерференционных полос достаточно минимизировать влияние вибраций период которых меньше времени экспозиции. С этой целью оптическая установка была собрана на виброизолированном столе.

Здесь также стоит отметить, что при выборе камеры помимо высокой светочувствительности особое внимание уделялось наличию кадрового (глобального) затвора, т.е. системы позволяющей одновременно считывать информацию со всех пикселей матрицы. Применение альтернативной системы считывания изображений, так называемого скользящего затвора, предполагает получение информации с разных строк (реже столбцов) матрицы в разное время и считывание всего изображения происходит не моментально, а в течение какого-то времени. Использование матричных фотоприемников с технологией скользящего затвора накладывает дополнительные ограничения на стабильность оптической установки. Характерное время колебания интерференционных полос должно быть намного меньше длительности экспозиции камеры.

Алгоритм обработки полученных цифровых голограмм представлен на ри-

сунке 4.3. Данная схема эксперимента предполагает последовательную регистрацию внеосевой цифровой голограммы при наличии и отсутствии исследуемого объекта (в данном случае группы живых клеток). После этого находится разность полученных восстановленных фазовых распределений и производится ее развертка. В связи с тем, что полученное фазовое распределение определено с точностью до аддитивной постоянной, необходимо произвести нормировку пространственного распределения фазы таким образом, чтобы в области отсутствия объекта, ее среднее значение было равно нулю. Наконец, на последнем этапе выполняется сегментация отдельных клеток и вычисление их характеристик.

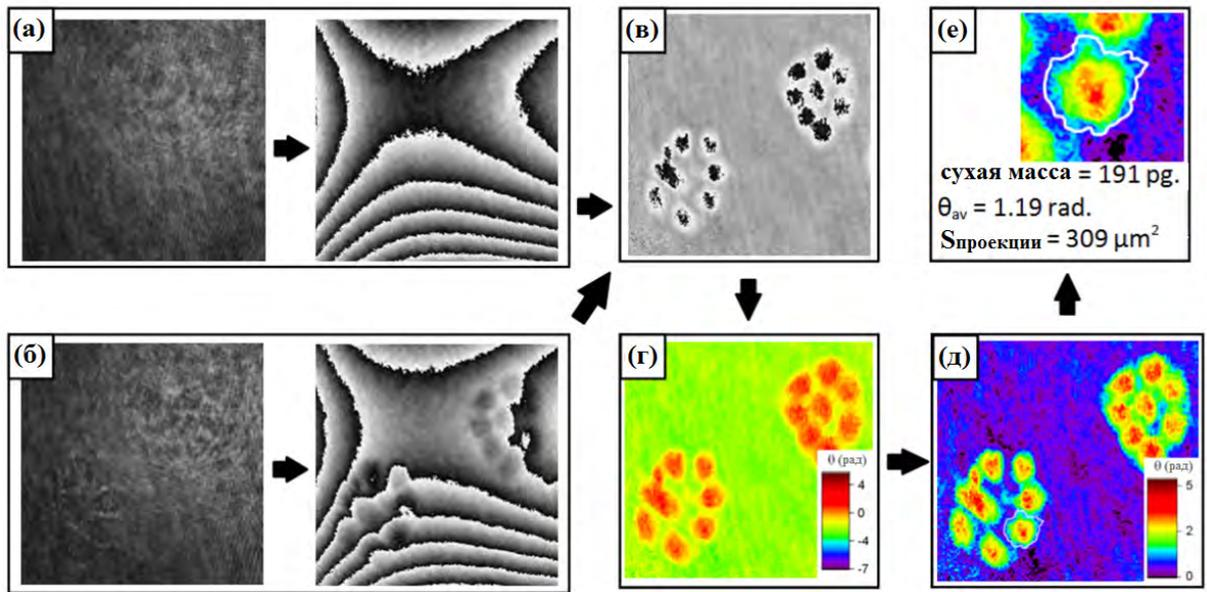


Рис. 4.3. Алгоритм обработки зарегистрированных внеосевых цифровых голограмм: (а) - регистрация цифровой голограммы и восстановление фазы предметной волны в отсутствии исследуемого объекта, (б) - - регистрация цифровой голограммы и восстановление фазы предметной волны при наличии исследуемого объекта, (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.

Помимо неинвазивности данного метода, другим важным преимуществом цифровой голографической микроскопии является возможность определения

многих морфологических, физиологических и оптических параметров живых клеток. Среди основных из этих параметров можно выделить средний фазовый набег, площадь проекции, сухую массу, вариацию фазового набега, примерный объем клетки и площадь мембраны [4]. Их вычисление может быть выполнено посредством обработки их фазовых изображений, предварительно сегментированных вручную или автоматически. Одна из важнейших физиологических характеристик живой клетки, ее сухая масса, может быть определена с использованием константы C_{pr} [156], связывающей концентрацию белков в водном растворе и показатель преломления раствора линейной зависимостью. Используя эти сведения при известном значении показателе преломления культуральной среды данная величина может быть найдена с использованием уравнения 4.1.

$$DM = \frac{10\lambda}{2\pi\alpha} \int_{S_{cell}} \Delta\varphi(x, y) dx dy \quad (4.1)$$

Другим важным физиологическим параметром вычисленным из фазовых изображений клеток может быть средняя плотность сухой массы, найденная как отношение сухой массы к площади проекции клетки. Несмотря на то, что показатель преломления, как и плотность белков варьируется внутри различных клеточных структур, при рассмотрении некоторых общих морфологических характеристик клетки приближенно эту величину можно считать постоянной. В таком случае при известных значениях показателя преломления среды n_{media} и среднего показателя преломления клетки n_{cell}^{av} можно рассчитать примерное распределение толщины клетки $h_{cell}(x, y)$ в каждой точке.

$$h_{cell}(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi} (n_{cell}^{av} - n_{media}) \cdot \varphi(x, y) \quad (4.2)$$

Из полученных данных о распределении толщины клетки $h_{cell}(x, y)$, могут быть определены основные морфологические параметры клетки, в том числе ее объем:

$$V_{cell} = \int_{Cell} h_{cell}(x, y) dx dy \quad (4.3)$$

или площадь поверхности мембраны:

$$S_{membrane} = \int_{Cell} \sqrt{1 + \left(\frac{\partial h_{cell}(x, y)}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial h_{cell}(x, y)}{\partial y}\right)^2} dx dy + S_{projection}, \quad (4.4)$$

где первое слагаемое в уравнении 4.4 представляет собой площадь верхней части поверхности мембраны, а $S_{projection}$ - площадь нижней части, прикрепленной к чашке Петри. На основе полученного примерного распределения высот клеток может быть проведена оценка и других морфологических параметров, индекса сферичности, средней и максимальной высоты клетки и т.д. Несмотря на то, что полученные параметры клеток являются лишь оценочными вследствие не выполнения условия неизменного показателя преломления клетки во всей ее области, полученные данные могут быть успешно использованы для грубого сравнения сильно различающихся популяций клеток при усреднении по большому количеству образцов, если их средние показатели преломления известны.

Пример результата расчета некоторых параметров клеток линии HeLa из их фазовых изображений продемонстрированы на рисунке 4.4(а,б). Из представленных данных видно, что две клетки имеющие визуальные различия в размере фазового запаздывания, внесенного в волновой фронт различаются также и по большому числу количественных параметров (рис. 4.4(в)). Таким образом цифровая голографическая микроскопия в отличие от некоторых других методов исследования живых и фиксированных клеток позволяет получить их количественные параметры, позволяющие делать выводы о статистической значимости различий между двумя популяциями клеток.

Для подтверждения или опровержения гипотезы о статистически значимом изменении определенных характеристик клеток в результате внешнего воз-



Рис. 4.4. (а,б) - фазовые изображения живых клеток линии HeLa. (в) - результат вычисления некоторых параметров из фазовых изображений двух живых клеток представленных на рисунках (а) и (б).

действия необходимо производить вычисление параметров нескольких десятков различных клеток в образце. В связи с этим при исследовании временной динамики изменения каких-либо параметров живых клеток возникает необходимость сегментации большого количества объектов на фазовых изображениях. Поэтому для упрощения и автоматизации процесса обработки экспериментальных данных был разработан алгоритм для автоматической сегментации клеток на фазовых изображениях состоящий из четырех этапов. Работа предложенного алгоритма продемонстрирована на сегментации нескольких клеток линии HeLa на рисунке 4.5.

Вначале (i) последовательным сканированием всего фазового изображения производится поиск небольшой области размером 50x50 пикселей с наименьшим градиентом фазового набега. Вследствие минимальности этих величин найденное поле не содержит клеток, вносящих искажения в волновой фронт и может служить для нормировки фазового изображения (рис. 4.5(а)). Затем (ii) определяется положение локальных максимумов, на которых формируются маски, обозначающие примерное положение клеток (рис. 4.5(б)). Также, с использованием преобразований, описанных в работе [234], строятся разграничительные линии, разделяющие близко расположенные клетки, (рис. 4.5(д)).

Для этого вначале производится вычисление карты расстояний до ближайшей выделенной клетки (рис. 4.5(в)), после чего линии разграничения проводятся по областям локальных минимумов этих карт (рис. 4.5(г)), то есть так, чтобы расстояние до центров соседних клеток было одинаковым. Далее, (iii) для определения точных границ клеток, каждый локальный максимум увеличивается с учетом разделяющих линий до тех пор (рис. 4.5(е-л)), пока средний фазовый набег приращенной области не будет сравним с набегом области нормировки, найденной на первом шаге алгоритма (рис. 4.5(а)). Такая операция независимо проводится для каждой сегментируемой клетки (рис. 4.5(м-о)). На последнем этапе (iv) выполняется удаление клеток, соприкасающихся с границей фазового изображения (рис. 4.5(п)). Это делается для того, чтобы впоследствии рассчитывать параметры лишь целых клеток и не допустить искажения результатов вычисления объема, площади проекции и других характеристик.

Другие примеры фазовых изображений клеток и результатов их сегментации представлены на рисунке 4.6(а). Для апробации предложенного алгоритма была проведена сегментация нескольких сотен одних и тех же фазовых изображений клеток линии HeLa в ручном и автоматическом режимах. Полученные статистические распределения их сухой массы и среднего фазового набега, представленные на рисунке 4.6(б,в) демонстрируют хорошее согласие между результатами автоматической и ручной сегментации. Это позволяет сделать вывод о том, что предложенный метод обработки фазовых изображений может быть успешно использован для автоматизации исследования клеточных культур с помощью методов цифровой голографической микроскопии.

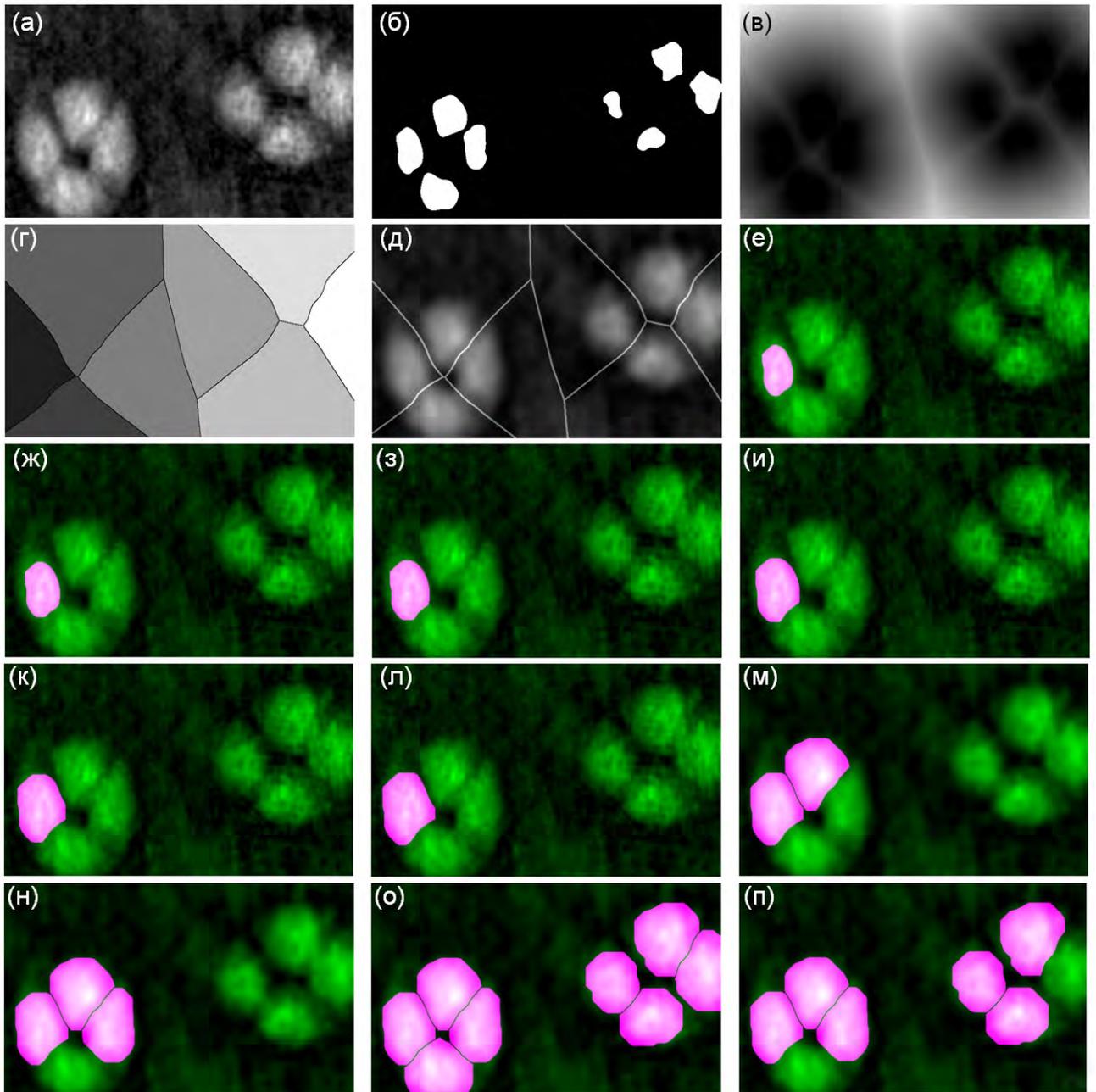


Рис. 4.5. Алгоритм автоматической сегментации клеток на фазовых изображениях. (а) исходное фазовое распределение клеток, (б) определение локальных максимумов на фазовом изображении, (в-д) построение линий, разделяющих близко расположенные клетки, (е-л) уточнение краев каждой клетки путем наращивания области исходной клетки, (м-о) - последовательная сегментация каждой клетки на фазовом изображении, (п) удаление сегментированных клеток, касающихся краев фазового изображения.

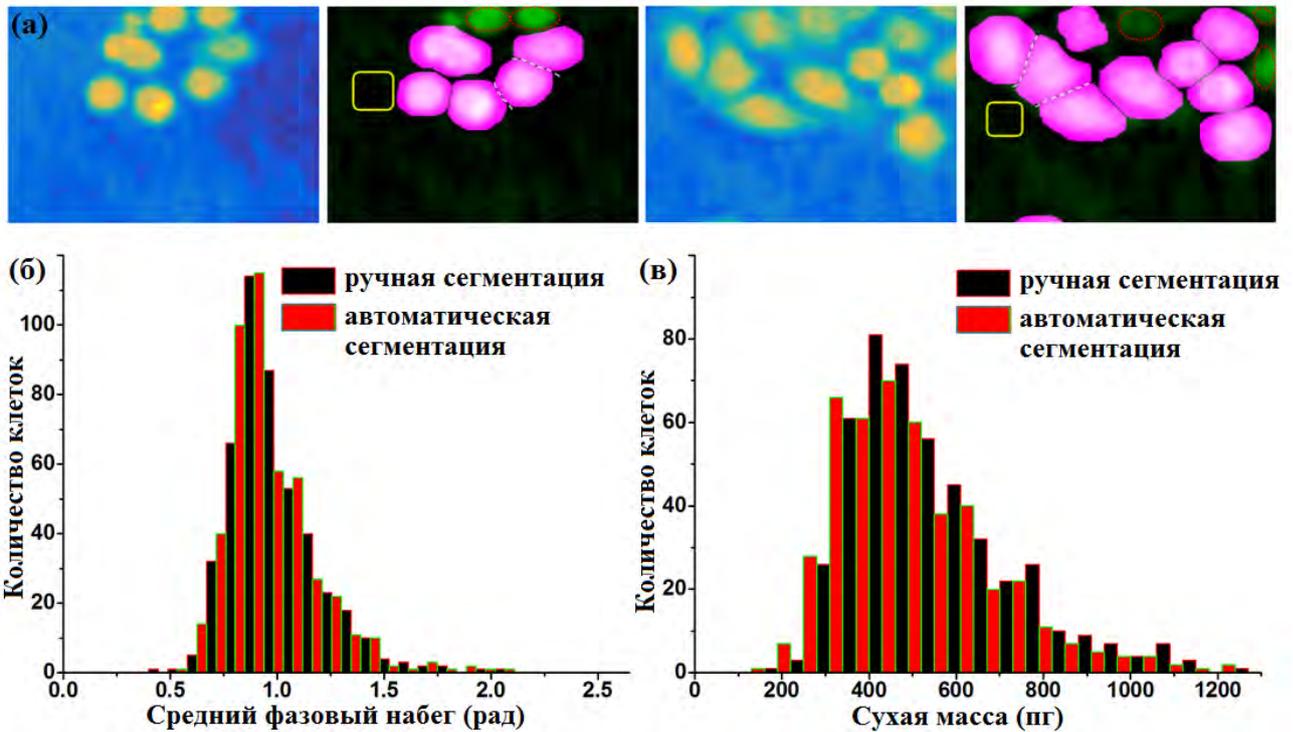


Рис. 4.6. (а) примеры фазовых изображений клеток и результата их автоматической сегментации с помощью описанного алгоритма. Статистические распределения (б) среднего фазового набега и (в) сухой массы полученных при ручной и автоматической сегментации нескольких сотен клеток на одних и тех же фазовых изображениях.

4.2. Применение методов цифровой голографической микроскопии для идентификации механизмов гибели живых клеток

В ходе первых экспериментов по наблюдению живых клеток *in vitro* с помощью цифровой голографической микроскопии нами было установлено, что оптические и морфологические параметры отдельных клеток в рамках одной популяции существенно разнятся. Типичные примеры фазовых изображений живых клеток в нормальном состоянии представлены на рисунке 4.7(а). Кроме того, как было показано нами в последующих экспериментах степень и характер изменений различных клеток одной линии в ответ на одинаковые дозы фотодинамического воздействия также могут меняться. Это связано как с отсутствием синхронизации всех клеток исследуемого образца по фазе жизненного

цикла, так и с их индивидуальными особенностями, обусловленными различными условиями роста и деления на этапе культивирования. Для демонстрации того насколько существенным может быть различие между параметрами живых клеток одного и того же типа в нормальном состоянии нами были измерены сухая масса и средний фазовый набег более четырехсот клеток линии HeLa, после чего построено их статистическое распределение (рис. 4.7(б,в)). Полученные данные показали, что среднеквадратическое отклонение сухой массы в рамках одной популяции составляет $\sigma_M = 98$ пг., в то время как ее среднее значение составляет $M = 272$ пг. Аналогичным образом были установлены эти характеристики среднего фазового набега: $\sigma_\phi = 0.19$ радиан и $\phi = 0.96$.

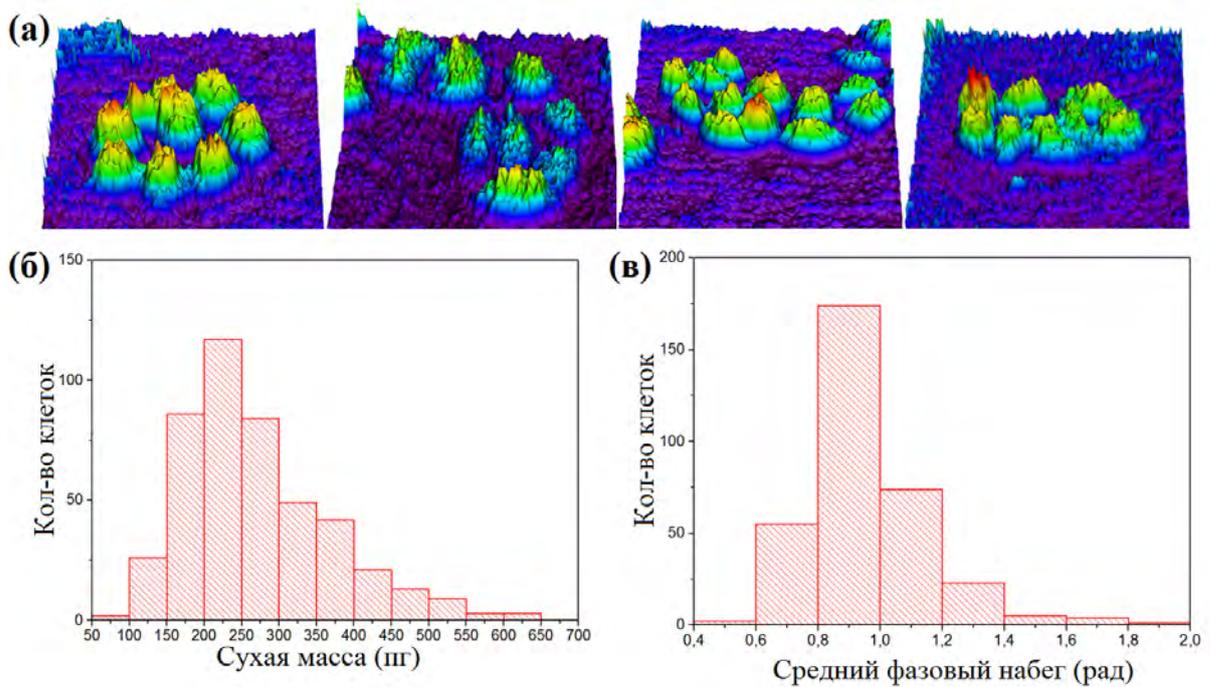


Рис. 4.7. (а) - примеры типичных фазовых распределений живых клеток линии HeLa в нормальном состоянии. Статистические распределения (б) сухой массы клеток линии HeLa и их (в) среднего фазового набега.

В ходе контрольных экспериментов было продемонстрировано отсутствие статистически значимой реакции живых фотосенсибилизированных клеток на их непрерывное облучение HeNe лазером на длине волны 633 нм в течение 6 часов. Как видно из графика зависимости среднего фазового набега, внесенного контрольными клетками в зондирующий волновой фронт, представленного на

рисунке 4.8, существенных колебаний этой величины в ходе всего эксперимента не наблюдается. Отсутствие вариации данного параметра на протяжении длительного времени свидетельствует о неинвазивности использованного метода. Кроме того, анализ морфологических характеристик клеток до и после проведения контрольного эксперимента с помощью методов дальнепольной оптической микроскопии также подтверждает сделанные выводы об отсутствии влияния зондирующего излучения столь малой плотности мощности на фотосенсибилизированные клетки.

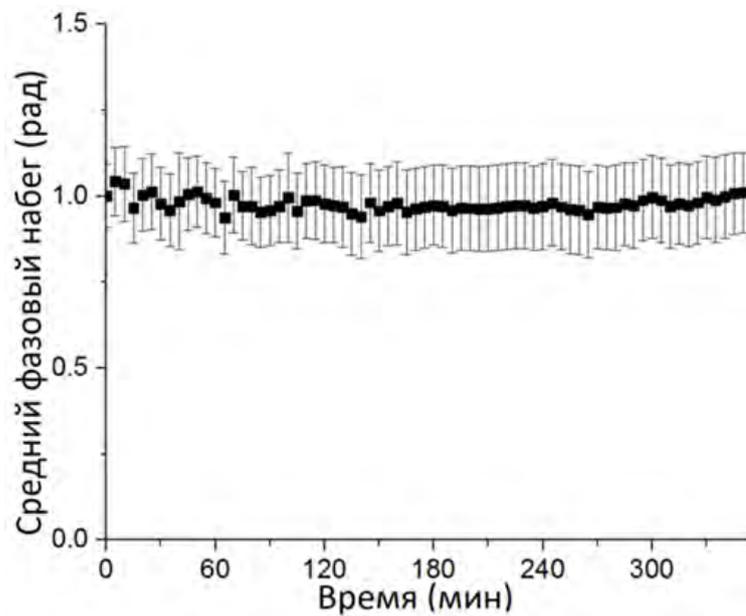


Рис. 4.8. Динамика изменения среднего фазового набега клеток линии HeLa в контрольных экспериментах по их мониторингу с помощью метода цифровой голографической микроскопии в течение шести часов. Отсутствие существенных изменений данного параметра на протяжении длительного времени свидетельствует о неинвазивности использованного метода.

После выполнения контрольных экспериментов был проведен ряд работ по исследованию динамики изменения основных параметров клеток прикрепленных к дну чашек Петри после фотодинамического воздействия. Непосредственно перед каждым из экспериментов по фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода проводилась запись нескольких десятков цифровых голограмм живых клеток в чашке Петри в нормальном состоянии. Затем в тече-

ние 5 минут производилось облучение исследуемого образца с помощью непрерывного излучения полупроводникового лазера на длине волны 660 нм при разных плотностях мощности. Таким образом производилось изменение скорости и дозы генерации активных форм кислорода индуцирующих смерть живых клеток посредством различных механизмов. После окончания фотодинамического воздействия каждые пять минут производилось сканирование нескольких десятков областей чашки Петри и запись соответствующих цифровых голограмм. В результате восстановления цифровых голограмм был получен набор фазовых изображений нескольких десятков клеток в процессе их гибели, вызванной фотодинамическим воздействием.

В ходе экспериментов было установлено, что характеристиками, наиболее сильно меняющимися в результате фотодинамического воздействия, являются усредненный по площади фазовый набег, вносимый клетками в волновой фронт, а также количество их сухой массы, определяемое из восстановленных распределений фазового запаздывания [155]. На рисунке 4.9 представлены результаты измерения динамики среднего фазового набега клеток линии HeLa, соответствующие различным плотностям мощности лазерного излучения на длине волны 660 нм, где каждая точка соответствует значению, усредненному при анализе нескольких десятков клеток. На графиках можно выделить четыре характерных типа изменения данного параметра клеток, каждый из которых соответствует своему механизму клеточной гибели, что было продемонстрировано нами с помощью наблюдений за клетками с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа и использования соответствующих маркеров.

При предельно низких дозах фотодинамического воздействия соответствующих плотностям мощности 6-10 мВт/см², не наблюдается существенного изменения среднего фазового набега внесенного живыми клетками (рис. 4.11(а,б)). При этом сухая масса клеток также остается практически неизменной, а флуоресцентные изображения демонстрируют нормальную морфологию на фазово-контрастных изображениях клеток и отсутствие сигнала флуоресценции бромид-

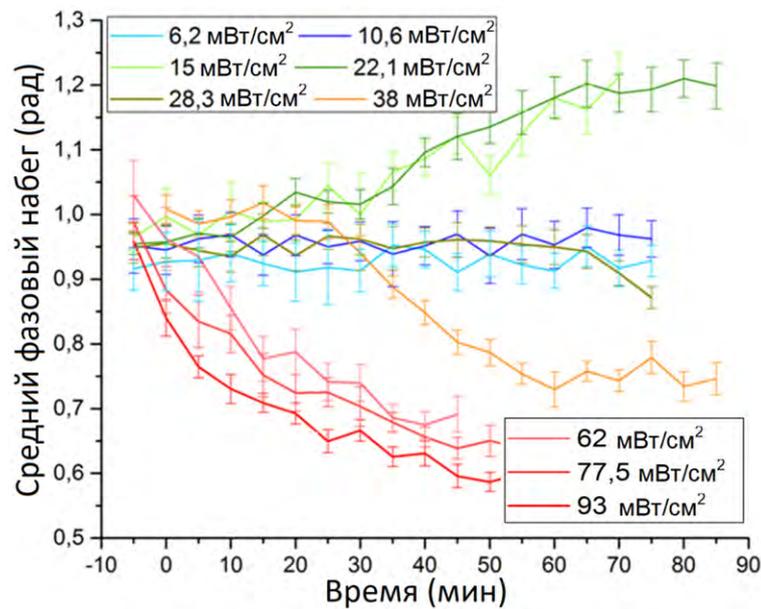


Рис. 4.9. Динамика изменения среднего фазового набега клеток линии HeLa при различных плотностях мощности облучения.

стого этидия и пропидия йодида (рис. 4.10(а-в)), традиционно использующихся в качестве индикаторов наличия разрывов клеточной мембраны. Полученные данные позволяют сделать вывод о выживании клеток при низких дозах фотодинамического воздействия благодаря действию механизмов антиоксидантной защиты.

При более высоких плотностях мощности (15-22 мВт/см²) возбуждающего лазерного излучения наблюдается увеличение среднего фазового набега (рис. 4.11 (в,г)), вносимого клетками. Уменьшение их площади прикрепления к чашке Петри, округление и образование мелких пузырьков на поверхности мембраны на флуоресцентном и фазово-контрастном изображениях клеток (рис. 4.10 (г,е)), а также флуоресценция аннексина-*v* на мембране клеток (рис. 4.10 (д)) свидетельствуют об апоптозе. При этом сухая масса клеток остается неизменной (271 нг в исходном состоянии и 275 нг через 70 минут после фотодинамического воздействия), а отсутствие флуоресценции бромистого этидия, аналогично предыдущему случаю свидетельствует о целостности мембраны. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о протекании апоптоза, программируемой клеточной смерти, связанной в ряде случаев с генерацией активных форм кислорода

[235, 236].

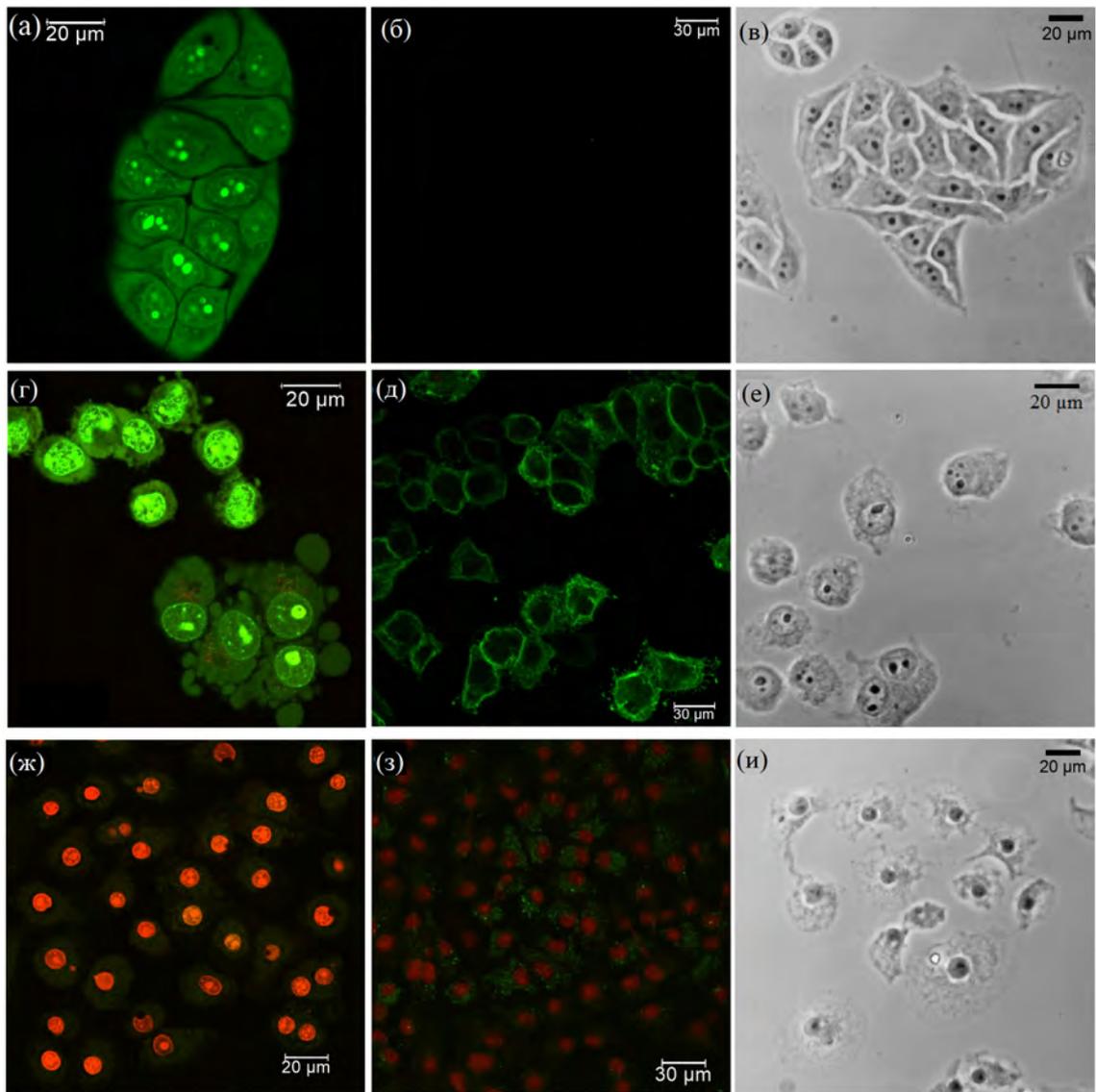


Рис. 4.10. Типичные флуоресцентные и фазово-контрастные изображения клеток линии HeLa зарегистрированные при различных дозах фотодинамического воздействия: (а-в) 10 мВт/см², (г-е) 22мВт/см², (ж-и) 93мВт/см². Левая колонка (а,г,ж) соответствует использованию комбинации акридина оранжевого (флуоресценция в зеленом диапазоне длин волн позволяет визуализировать клетку) и бромистого этидия (флуоресценция в красном диапазоне длин волн свидетельствует о разрыве клеточной мембраны). Средняя колонка (б,д,з) соответствует использованию комбинации аннексина-V (флуоресценция в зеленом диапазоне длин волн свидетельствует об апоптозе клеток) и пропидия йодида (флуоресценция в красном диапазоне длин волн позволяет сделать выводы о разрыве клеточной мембраны). В правой колонке (в,е,и) приведены изображения клеток, полученных с использованием микроскопии фазового контраста и иллюстрирует происходящие морфологические изменения клеток.

Дальнейшее повышение дозы фотодинамического воздействия (при плотностях мощности 28-38 мВт/см²) приводит к отложенному уменьшению среднего фазового набега клеток (рис. 4.11(д,е)). При этом в некоторых клетках в различное время начинает происходить образование больших пузырей, соответствующих вытеканию внутриклеточной среды наружу, что приводит к более четкому проявлению структур клеток на изображениях фазового контраста (рис. 4.10(и)). Возникновение сигнала флуоресценции бромистого этидия и пропидия иодида также свидетельствуют о разрыве мембраны клеток (рис. 4.10(ж,з)). Помимо этого анализ физиологических параметров клеток показал уменьшение их сухой массы на 30% по сравнению с ее количеством в нормальных живых клетках данного типа. Учитывая отложенный характер протекания данного процесса, а также наличие разрывов клеточной мембраны, наблюдаемое явление может быть идентифицировано как вторичный некроз.

Наконец, при наибольших дозах фотодинамического воздействия (62-93 мВт/см²) наблюдается резкий экспоненциальный спад среднего фазового набега внесенного клетками в проходящий волновой фронт, а также уменьшение сухой массы клеток на 100 пикограмм, составляющих 37% от исходной сухой массы (рис. 4.11 (ж,з)). Флуоресценция бромистого этидия в подавляющем большинстве клеток свидетельствует о протекании процесса некроза клеток и разрыве мембраны, индуцированном цепочкой окислительных процессов, происходящих в результате генерации активных форм кислорода. Вероятно, уменьшение, как среднего фазового набега, так и сухой массы клетки связано с вытеканием содержимого клетки через образующиеся разрывы мембраны.

Аналогичные эксперименты по мониторингу динамики изменения среднего фазового набега в ходе процессов гибели были также выполнены на клетках линии A549. В этом случае наблюдались те же типы изменения среднего фазового набега, что и в экспериментах с клетками линии HeLa (рис. 4.12). Тем не менее, в ходе экспериментов нами было продемонстрировано, что одни и те же дозы фотодинамического воздействия приводят к различной реакции клеток

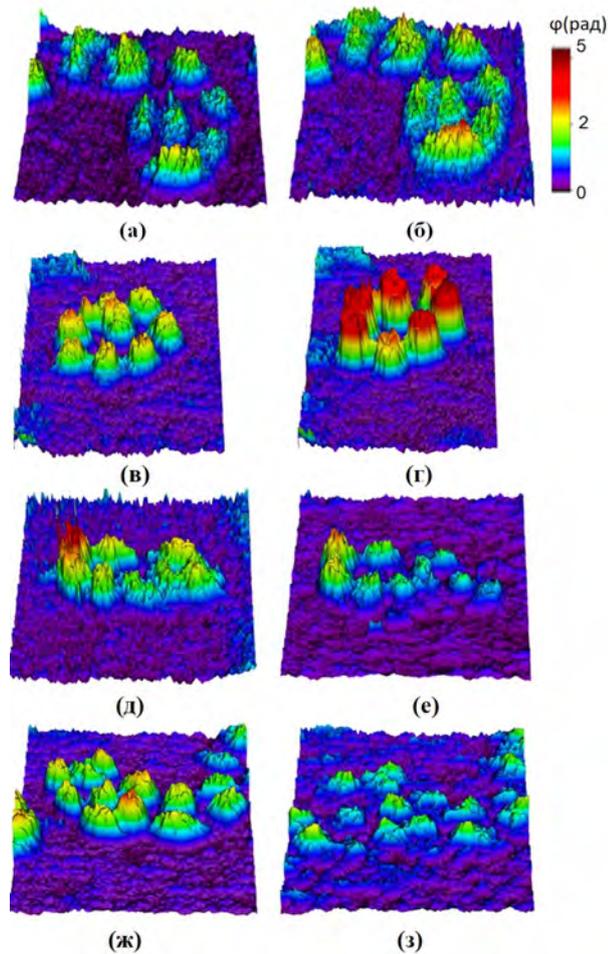


Рис. 4.11. Типичные фазовые изображения клеток линии HeLa зарегистрированные (а,в,д,ж) до фотодинамических воздействий и (б,г,е,з) спустя час после него, соответствующие (а-б) 10 мВт/см², (в-г) 22мВт/см², (д-е) 38мВт/см² и (ж-з) 93мВт/см².

линий HeLa и A549. Так, например, облучение фотосенсибилизированных клеток при плотности мощности 15 мВт/см² приводит к апоптозу клеток линии HeLa, в то время как в клетках A549 при этой дозе облучения существенных изменений морфологических характеристик не наблюдается. В то же время, дозы излучения, приводящие клетки линии HeLa к гибели посредством механизма некроза, вызывают лишь вторичный некроз в клетках линии A549.

Как было отмечено ранее, важным преимуществом использования голографического подхода для исследования биологических процессов является возможность получения количественных данных о различных явлениях и возможность их сопоставления с использованием статистических методов. Поскольку уменьшение среднего фазового набегу связано, прежде всего, именно с выте-

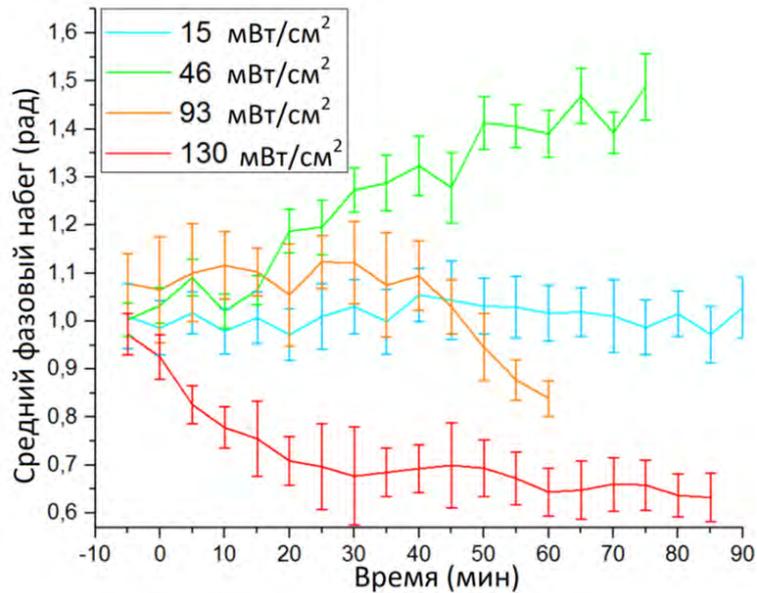


Рис. 4.12. Динамика изменения среднего фазового набега клеток линии А549 при разных плотностях мощности облучения.

канием внутриклеточного содержимого наружу и растворением в культуральной среде DMEM, скорость протекания данного процесса напрямую зависит от количества поврежденных участков мембраны клетки. Увеличение области повреждения цитоплазматической мембраны, произошедшее в результате химических реакций или физического воздействия, должно приводить к ускорению процесса уменьшения среднего фазового набега клеток.

Для подтверждения этого предположения нами был проведен ряд дополнительных экспериментов, соответствующих различной интенсивности повреждения клеточной мембраны, достигнутой благодаря изменению плотности мощности лазерного излучения, которое использовалось для фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода. Аналогичным образом, вариация скорости генерации АФК могла быть достигнута также посредством использования различной концентрации фотосенсибилизатора или различного времени инкубации клеток в растворе питательной среды DMEM и Радахлорина. Однако в случае таких экспериментов необходимо было бы учитывать возможный токсический эффект присутствия высоких концентраций фотосенсибилизатора в клетке, что затрудняло бы интерпретацию полученных результатов. Вслед-

ствие ограниченного количества молекул Радахлорина в живых клетках и явлении его фотовыцветания нельзя говорить о наличии строгой линейной зависимости между плотностью мощности возбуждающего излучения и скоростью генерации АФК. Тем не менее, можно с уверенностью сказать, что увеличение интенсивности возбуждающего излучения приводит к повышению количества окислительных агентов внутри клетки, а также вблизи клеточной мембраны.

Для проверки гипотезы о том, что различная скорость генерации синглетного кислорода может существенно влиять на динамику протекающих внутриклеточных реакций нами был проведен ряд экспериментов, в которых при постоянной суммарной дозе фотодинамического воздействия 21.5 джоуль, варьировалось отношение между плотностью мощности лазерного излучения и длительностью облучения. В каждом из экспериментов, проведенных с указанной дозой фотодинамического воздействия наблюдалось уменьшение среднего фазового набега, внесенного клетками, однако скорость уменьшения данной величины существенно варьировалась (рисунки 4.13). В случае высоких плотностей мощности лазерного излучения убывание среднего фазового набега, внесенного клетками происходит существенно быстрее, что может быть связано с ограниченной эффективностью работы внутриклеточных защитных механизмов, противостоящих перекисному окислению липидов мембраны активными формами кислорода [237, 238].

Стоит учесть, что представленные выше результаты мониторинга клеточной гибели посредством некроза основаны на анализе данных, полученных от большого количества разных клеток в каждый момент времени. Полученные результаты свидетельствуют об изменении важных оптических и физиологических характеристик клеток во всей популяции в целом, а также позволяют оценить скорость протекания таких изменений. Однако зачастую в цитологических исследованиях для описания результатов эксперимента помимо параметров, усредненных по всей популяции, используется также отношение количества клеток, претерпевших определенные изменения, к общему числу наблюдаемых

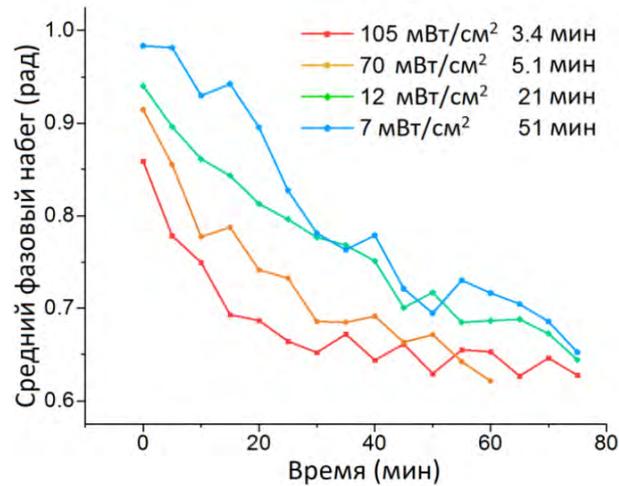


Рис. 4.13. Динамика изменения среднего фазового набега клеток линии HeLa при различных плотностях мощности облучения и скорости генерации активных форм кислорода, индуцирующих процессы некроза в клетках.

клеток. В случае изучения процессов клеточной гибели, такую характеристику можно определить как выживаемость. При измерении данного параметра игнорируется, однако, тот факт, что процессы, приводящие к гибели клетки, происходят непрерывно и постепенно, а граница между двумя состояниями клетки весьма условна и может интерпретироваться различными специалистами по-разному. Именно в связи с такими трудностями в интерпретации происходящих процессов, например, связан ряд публикаций [239–241] нацеленных на попытку стандартизации методов определения факта гибели живой клетки. На сегодняшний день основной группой методов для идентификации этого процесса считается флуоресцентная микроскопия, использующая те или иные флуоресцентные маркеры для детектирования изменений, специфичных для того или иного типа клеточной гибели. Например, в случае детектирования процессов некроза живых клеток, одним из наиболее часто используемых методов является окрашивание клеток смесью акридина оранжевого и бромистого этидия. Как показали результаты выполненной работы, цифровая голографическая микроскопия может служить хорошим дополнением традиционным методам флуоресцентной микроскопии позволяя получить новые количественные данные о динамике гибели живых клеток при фотосенсибилизированной гене-

рации активных форм кислорода.

4.3. Применение методов цифровой голографической томографии для исследования изменения морфологических характеристик в процессе гибели живых клеток

Несмотря на широкий диапазон возможностей, которые цифровая голографическая микроскопия предоставляет для исследования процессов гибели живых клеток, вызванных фотодинамическим воздействием, данный подход не позволяет точно определить морфологические параметры клетки. Как было отмечено ранее, для разделения вкладов показателя преломления и толщины клетки необходимо зарегистрировать более одной цифровой голограммы. Один из методов позволяющих осуществить такое разделение будет рассмотрен в главе 5. Несмотря на высокую точность определения толщины и интегрального показателя преломления, которой нам удалось достигнуть в данной работе, использование данного подхода не всегда удобно. С другой стороны методы голографической томографии, как было показано в главе 3, позволяют восстановить не только интегральный показатель преломления, но и показатель преломления в каждой точке исследуемого объема трехмерного пространства.

В отличие от температурного градиента, формируемого безызлучательными переходами и исследованного томографическими методами в главе 3, вращение живых клеток в большом диапазоне углов оказывается невозможным из-за их прикрепленности ко дну чашки Петри. В связи с этим для записи набора цифровых голограмм при различных углах падения предметной волны на исследуемые клетки необходимо вращать зеркала направляющие предметную волну непосредственно на образец. Именно такой подход реализован в томографическом микроскопе компании 3D Cell Explorer компании Nanolive, используемом

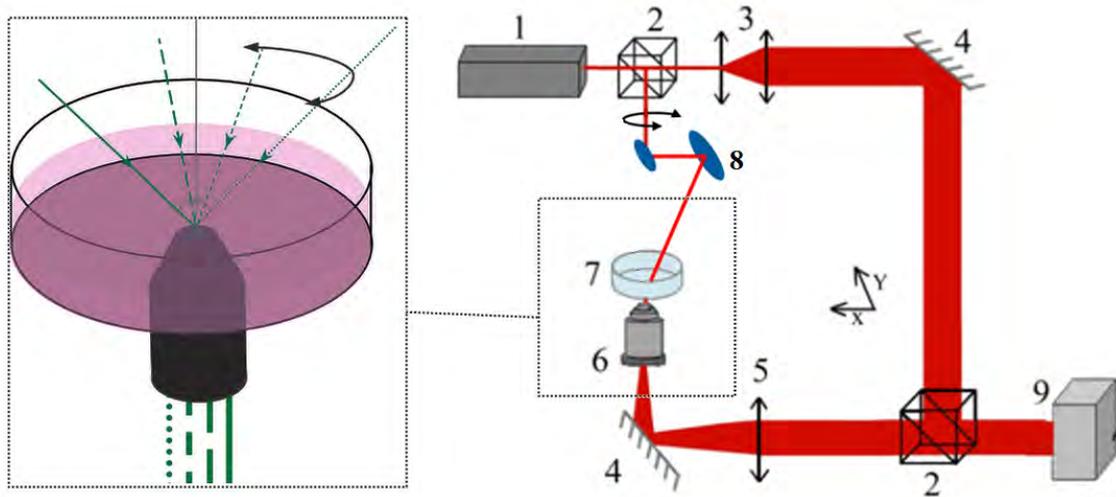


Рис. 4.14. Оптическая схема экспериментальной установки для реализации метода голографической томографии в микроскопе 3D Cell Explorer компании Nanolive. 1 - лазер, 2 - делители пучка, 3 - телескопическая система, 4 - зеркала, 5 - коллимирующая линза, 6 - микрообъектив, 7 - образец, 8 - система зеркал для изменения угла падения предметного пучка на объект, 9 - матричный фотоприемник.

в данной работе. Для восстановления трехмерного распределения показателя преломления производится регистрация набора из 100 цифровых голограмм при вращении зеркала, направляющего пучок предметной волны под углом 45 градусов к плоскости объекта 4.14. В результате использования микрообъектива с высокой числовой апертурой, предметная волна, прошедшая через объект проходит через оптическую систему и попадает на фотодетектор, интерферируя с неискаженной опорной волной.

При реализации метода голографической томографии, основанного на регистрации и восстановлении набора из нескольких десятков цифровых голограмм, зарегистрированных при различных углах падения предметной волны на исследуемый объект, может быть получен массив данных о трехмерном распределении показателя преломления в образце. Интересно сравнить данный метод исследования живых и фиксированных клеток с другим подходом, позволяющем восстанавливать клетки в трехмерном пространстве, конфокальной флуоресцентной микроскопией 1.5. Важным отличием цифровой голографической томографии от традиционного метода конфокальной флуоресцентной мик-

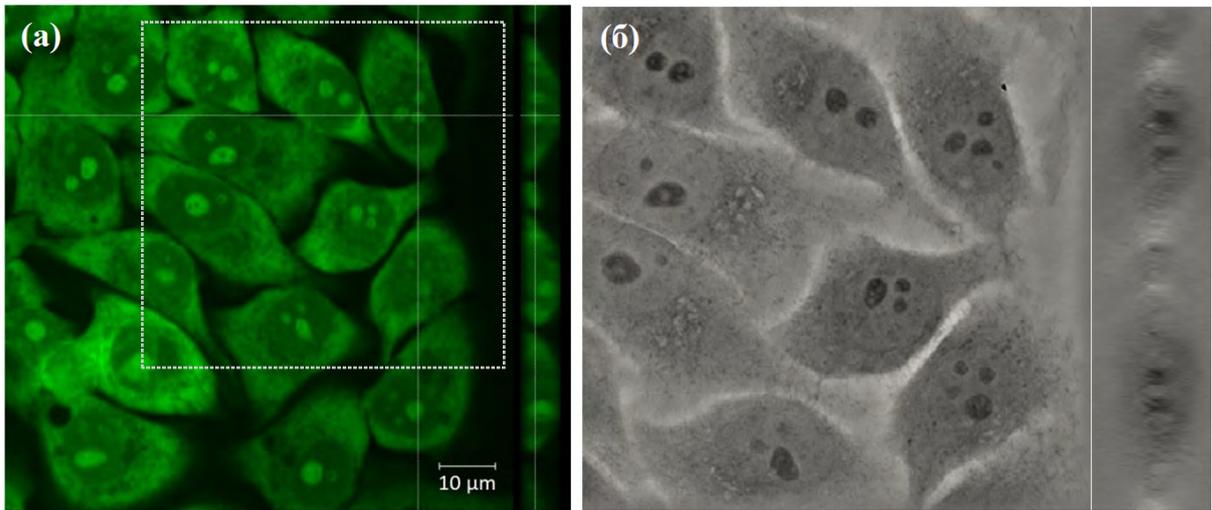


Рис. 4.15. Результат восстановления XY и YZ сечений группы клеток полученные с помощью (а) флуоресцентной конфокальной микроскопии и (б) голографической томографии.

роскопии является то, что первый подход требует регистрации нескольких десятков цифровых голограмм, в то время как полное сканирование образца клеточных культур флуоресцентным методом требует большого числа отдельных измерений интенсивности флуоресценции в отдельных конфокальных объемах образца. При этом время регистрации необходимого набора данных в голографической томографии не превышает нескольких секунд, а время регистрации трехмерного распределения флуорофора в образце составляет несколько минут. Однако использование методов голографической томографии требует численной обработки полученных данных и решения обратной задачи восстановления трехмерного массива данных из набора двумерных проекций, в то время как пространственное распределение флуорофора может быть получено напрямую без дополнительных вычислений. Это приводит к значительно более простой процедуре сегментации клеток при обработке данных полученных с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии [216]. Кроме того, численная обработка томографических данных зачастую приводит к искажениям в наблюдаемых массивах данных, особенно при построении изображений в XZ и YZ сечениях. Для повышения точности сегментации клеток на трехмерных распределениях показателя преломления было предложено использовать сег-

ментацию, основанную не на показателе преломления, а на его градиенте.

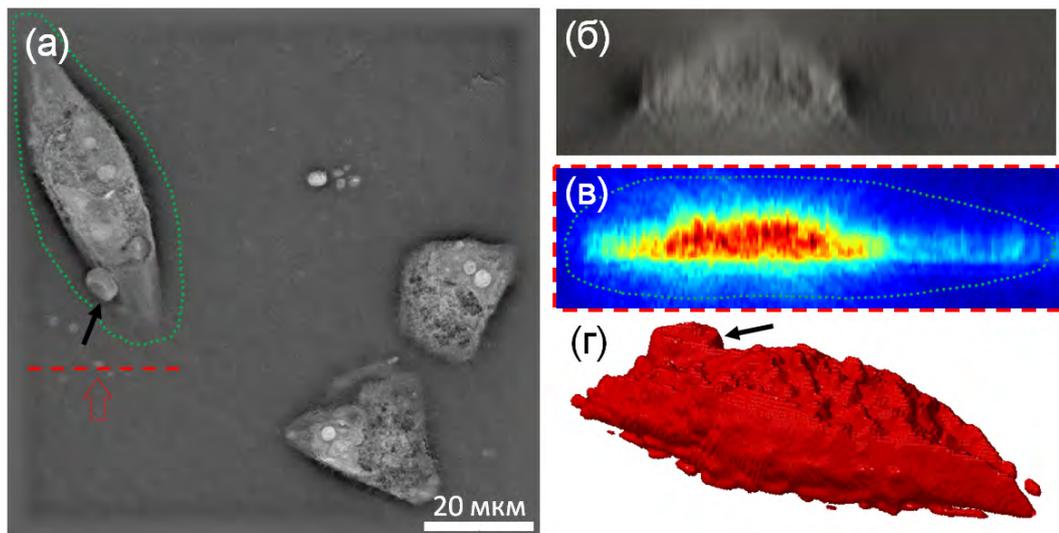


Рис. 4.16. Исходное восстановленное распределение показателя преломления на (а) поперечном XY-сечении и (б) XZ-сечении. Процесс сегментации клетки на YZ-сечении с вычислением градиента показателя преломления. (г) результат сегментации одной из клеток трехмерного распределения показателя преломления. Стрелкой указаны морфологические особенности клетки, успешно сохраненные описанным алгоритмом сегментации.

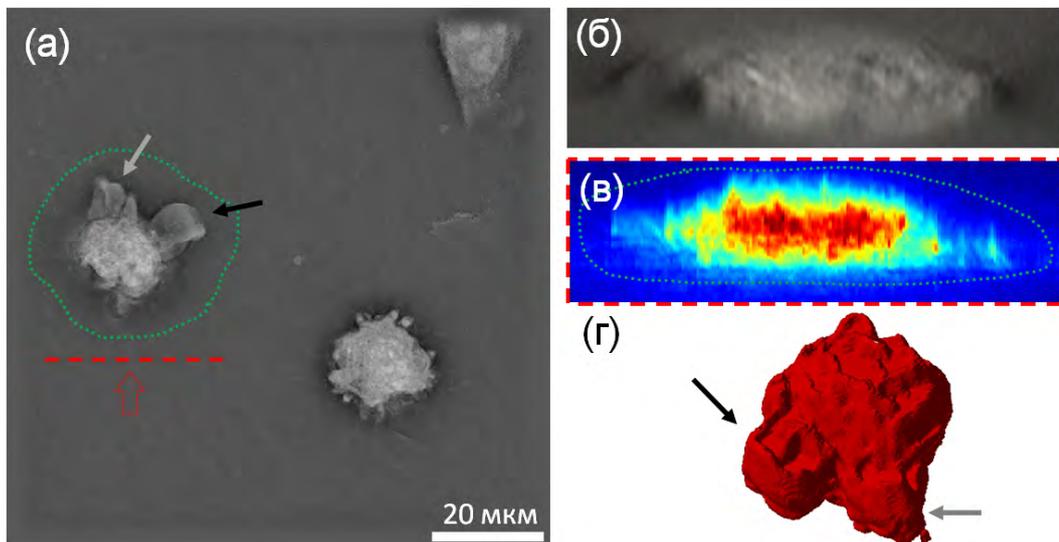


Рис. 4.17. Исходное восстановленное распределение показателя преломления клеток в процессе их апоптоза на (а) поперечном XY-сечении и (б) XZ-сечении. Процесс сегментации клетки на YZ-сечении с вычислением градиента показателя преломления. (г) результат сегментации одной из клеток трехмерного распределения показателя преломления. Стрелками указаны морфологические особенности клетки, успешно сохраненные описанным алгоритмом сегментации.

Предлагаемый алгоритм сегментации клеток работает следующим образом. Вначале исследуемая клетка приблизительно выделяется на XY и XZ сечениях. Для точного определения границ клетки используется процедура отсечения областей трехмерного массива с чрезмерно низкими значениями градиента показателя преломления. При этом параметр, характеризующий границу такого отбора сегментируемых областей должен подбираться отдельно под различные типы клеток, обладающие существенно различающимися морфологическими структурами. Затем к сегментированной области также добавляются те пиксели, которые имеют достаточно большой показатель преломления, заведомо присущий лишь структурам клеток. На третьем шаге в класс областей, принадлежащих клетке необходимо включить также полости, полностью или частично (на 70-80%) окруженные сегментированными структурами. Это связано с тем, что в нормальном состоянии мембрана клетки представляет собой выпуклую оболочку. Последний этап алгоритма может быть исключен из процесса сегментации, если проводится обработка фазовых изображений клеток с существенно искаженной морфологией, например в ходе процессов деления или некроза. При апробации указанного алгоритма было продемонстрировано хорошее качество сегментации клеток с различными особенностями морфологии. Примеры таких сегментированных клеток в нормальном состоянии и в процессе гибели представлены на рисунках 4.16 и 4.17 соответственно.

Стоит отметить, что при верной настройке параметров алгоритма происходит корректная сегментация некоторых морфологических особенностей исследованных клеток обозначенных стрелками на рисунках. Успешная работа предложенного алгоритма с клетками даже при наличии некоторых морфологических изменений демонстрирует возможность его использования не только для мониторинга живых клеток, но и для исследования клеток в процессе их гибели, а также фиксированных клеток. Тем не менее в некоторых случаях описанный выше алгоритм не может работать корректно. Например в случае исследования динамики процесса некроза при вытекании внутриклеточных ком-

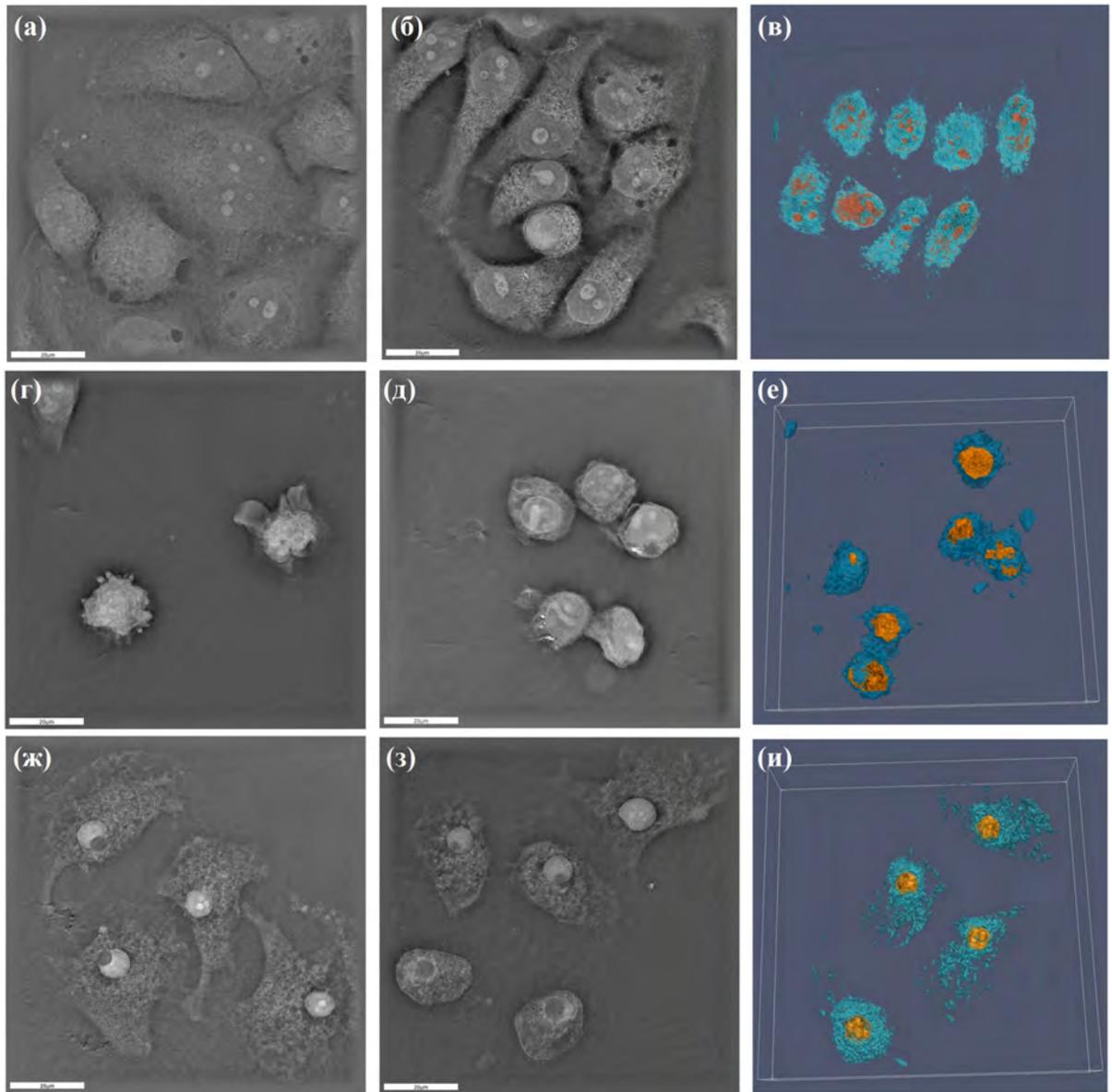


Рис. 4.18. XY-поперечные сечения восстановленные с использованием голографической томографии и трехмерные изображения клеток линии A549: (а-в) в нормальном состоянии, (г-е) при их апоптозе и (ж-и) некрозе.

понентов клетки наружу вначале градиент показателя преломления в области образовавшихся пузырей остается достаточным для их корректного учета. Однако со временем по мере диффузии этой жидкости в культуральную среду граница между ними размывается, что приводит к формированию плавного градиента показателя преломления, препятствующему верной работе алгоритма. Другой тип ошибок может быть связан с попаданием посторонних объектов в исследуемую область, что особенно часто встречается при исследовании фик-

сированных клеток. В этом случае подобные частицы с большим градиентом показателем преломления также могут быть ошибочно включены в сегментируемую область.

В результате реализации данного подхода к обработке трехмерных распределений показателя преломления была проведена сегментация клеток в нормальном состоянии, а также клеток подвергшихся фотодинамической терапии при разных дозах облучения. Типичные изображения клеток в их нормальном состоянии, а также после фотодинамического воздействия, приводящего к запуску апоптоза и некроза при дозах лазерного излучения на длине волны 660 нм в 13.2 и 25 Джоулей, представлены на рисунке 4.18.

Был проведен анализ трехмерных распределений показателя преломления нескольких групп фиксированных клеток до фотодинамического воздействия и спустя 24 часа после него. Фиксация клеток выполнялась с использованием глицерина и предполагала их обезвоживание. В результате сегментации и обработки данных по нескольким десяткам клеток было показано (см. рис. 4.19(а)), что для фиксированных клеток объем клеток существенно уменьшается в процессе их апоптоза (доза ФДВ 13.2 Джоуля), в то время как вследствие обезвоживания этот параметр практически не изменяется при некрозе клеток (доза ФДВ 25 Джоулей). С другой стороны из-за сохранения целостности мембраны при апоптозе не происходит уменьшения сухой массы живых клеток, в то время как некроз сопровождается существенным уменьшением этого параметра (см. рис. 4.19(б)).

Из полученных данных видно, что использование методов голографической томографии позволяет определить важные морфологические параметры клеток, изменяющиеся в процессе их гибели, индуцированной фотодинамическим воздействием. При этом по сравнению с конфокальной флуоресцентной микроскопией голографическая томография позволяет значительно ускорить процесс сбора данных, однако требует более аккуратной сегментации клеток на трехмерных распределениях показателя преломления. Полученные данные об

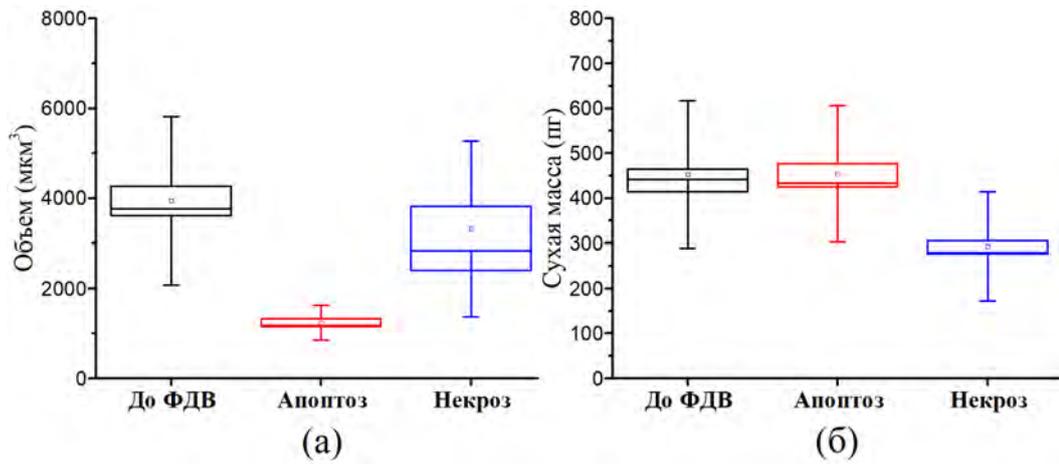


Рис. 4.19. Полученные с помощью голографической томографии данные по (а) объему и (б) сухой массе фиксированных клеток до фотодинамического воздействия, а также при дозах ФДВ 13.2 и 25 Джоулей, приводящих к процессам апоптоза и некроза.

изменении объема и сухой массы клеток в процессе некроза и апоптоза находятся в полном согласии с литературными данными о типичных морфологических преобразованиях, происходящих в ходе данных процессов.

Разработка методики повышения точности определения толщины и интегрального показателя преломления фиксированных клеток, основанной на регистрации цифровых голограмм объекта в различных оптических средах

В отличие от многих других оптических методов исследования биологических объектов, цифровая голографическая микроскопия связана не с абсорбционными или эмиссионными свойствами определенных внутриклеточных веществ, а с распределением показателя преломления в образце изменяющим форму электромагнитной волны, прошедшей через него. В последние несколько десятилетий благодаря развитию органической химии и нанотехнологий множество работ было посвящено разработке различных улучшений в области флуоресцентной микроскопии, созданию флуоресцирующих белков и квантовых точек. В рамках этих исследований было получено большое количество данных о спектрах поглощения и флуоресценции большинства фотоактивных белков и органических соединений. В то же время, многие методы флуоресцентной микроскопии с высоким пространственным разрешением такие как STED или нелинейная флуоресцентная микроскопия и их модификации подразумевают воздействие на клетку сильного электромагнитного излучения (обычно оптического диапазона), которое может оказывать токсическое воздействие на живые клетки, в особенности фотосенсибилизированные с помощью различных веществ. В связи с этим в ходе биологических исследований зачастую регистрируются данные о состоянии клеток в различные моменты времени с разных образцов. Это делает необходимым сбор большого количества статистических данных, для ис-

ключения влияния индивидуальных особенностей отдельных клеток. Обычная дальнепольная оптическая микроскопия лишена данных недостатков, хотя и не позволяет изучать внутриклеточные структуры с размерами менее 150-200 нанометров из-за наличия дифракционного предела.

В отличие от нее цифровая голографическая микроскопия, дополнительно дает возможность получить важную информацию о структуре клетки и происходящих с ней процессах за счет анализа распределений фазового запаздывания при прохождении электромагнитной волны через клетку. Это позволяет описывать внутриклеточные структуры с точки зрения распределения показателя преломления, а не коэффициента поглощения, как это происходит при использовании обычного микроскопа. При этом отдельные клеточные структуры могут обладать различными показателями преломления при достаточно близких коэффициентах поглощения – в таких случаях цифровая голографическая микроскопия является незаменимым инструментом для исследований внутриклеточных процессов. В отличие же от фазово-контрастной микроскопии, восстановление массива значений фазы волнового фронта, прошедшего через клетку позволяет получить количественную информацию, связанную с показателем преломления клетки. Именно эта величина с точки зрения голографической микроскопии является основным параметром, описывающим клетку. Как было показано в работах [120, 242], отклонение этого параметра от нормы может служить признаком наличия разного рода патологий. В том числе имеются данные о том, что типичный показатель преломления клеток злокачественных опухолей некоторых типов заметно выше данной величины у нормальных клетках [243–245].

В связи с этим было решено разработать и реализовать метод оценки показателей преломления типичных для обезвоженных фиксированных клеток с помощью методов цифровой голографической микроскопии. Апробация указанного метода была проведена на клетках эпителия ротовой полости. Результаты определения данного параметра у здоровых клеток представляют интерес как

для разработки новых методов экспресс-диагностики патологических изменений клеток в биологии и медицине, так и для идентификации и классификации живых и мертвых клеток в цитологических исследованиях. Несмотря на наличие большого количества работ по определению типичных показателей преломления в живых клетках различных культур [70, 105, 172, 244, 246], подобные исследования с фиксированными, обезвоженными клетками, насколько нам известно, еще не проводились. В то же время именно в таком виде образцы зачастую подвергаются цитологическому анализу в клинической практике, а также, как будет показано ниже, именно работа с фиксированными обезвоженными клетками позволяет существенно увеличить теоретическую точность определения их показателя преломления и толщины. Кроме того, такие исследования могут повысить точность диагностики патологических состояний, поскольку, очевидно, патологии клетки не приводят к изменению показателя преломления воды, но могут существенно влиять на средний показатель преломления и концентрацию сухой массы клетки. Также измерение показателя преломления позволяет определить процентное содержание воды в живых клетках, что может быть использовано при изучении реакции живых клеток на изменения, происходящие во внешней среде. Кроме того, на сегодняшний день имеются противоречивые сведения о показателях преломления, типичных для отдельных структур. Так, например, в различных работах было установлено, что этот параметр у ядра может быть как выше [247, 248], так и ниже [249, 250] показателя преломления остальных структур клетки. Кроме того имеются сведения о том, что данный параметр меняется в зависимости от фазы цикла клетки [251]. Таким образом, оценка типичных показателей преломления дегидратированных клеток и повышение точности данных измерений является актуальной задачей, решение которой позволит расширить спектр приложений цифровой голографической микроскопии для исследований биологических процессов и идентификации клеток злокачественных опухолей.

Во введении был приведен подробный разбор некоторых методов, позво-

ляющих оценить эту величину. Как правило их основным принципом является либо получение информации о фазовом набеге внесенным клеткой в волновой фронт при различном показателе преломления среды (что может быть сделано как благодаря изменению самого химического состава вещества или за счет использования излучения на нескольких длинах волн и использованию дисперсионной кривой) или измерение толщины клетки в каждой точке иными методами. Второй подход предполагает использование дополнительных инструментов, например конфокальной флуоресцентной микроскопии, что оказывается не всегда удобным. Так как для получения достоверных данных о распределении показателя преломления необходимо обладать информацией о толщине и фазовом набеге одной и той же клетки, что также значительно затрудняет проведение подобных экспериментов.

При использовании первого подхода в ходе работы с живыми клетками довольно жесткие условия их нормальной жизнедеятельности и, что важнее сохранения неизменной формы, не позволяют достичь большой разности показателей преломления сред. Так, например при работе живыми клетками одной из важнейших характеристик окружающей среды является осмотическая концентрация. При инкубации клетки в среде обладающей слишком низкими значениями данного параметра клетка будет создавать избыточное гидростатическое давление на раствор, стремясь уравновесить концентрации, что приведет к разрыву мембраны, гибели клетки и изменению ее морфологических характеристик. При этом как правило растворы обладающие близкими осмотическими концентрациями обладают показателями преломления различающимися на величину порядка 0,006-0,008 [70, 105]. Разница показателей преломления у биологических растворов, используемых для поддержания жизнедеятельности клетки на различных длинах волн, находящихся в оптическом диапазоне как правило еще ниже, что приводит к необходимости введения специальных красителей и работе на длинах волн вблизи максимума показателя поглощения. Именно в этой области классическая электронная теория дисперсии пред-

сказывает наибольшую разницу показателей преломления. Данный метод был продемонстрирован в работе [105] тем не менее даже при добавлении красителей изменение показателя преломления составляет порядка 0,01. Кроме того, необходимо учитывать возможную дисперсию света и в отдельных структурах исследуемого образца, которая может привести к искажению восстанавливаемых данных. В то же время, как будет показано далее, разница показателей преломления используемых сред, окружающих клетку является одним из факторов, значительно влияющим на погрешность восстановления распределений ее толщины и интегрального показателя преломления.

Для определения этих параметров из двух распределений фазового запаздывания исследуемого объекта $\phi_1(x, y)$ и $\phi_2(x, y)$, соответствующих двум средам с различными показателями преломления n_{m1} и n_{m2} , необходимо записать систему двух уравнений, описывающих зависимость этих распределений от толщины $l(x, y)$ и интегрального показателя преломления $n_c(x, y)$ в каждой точке (в каждом пикселе).

$$\begin{cases} \phi_1(x, y) = \frac{2\pi i}{\lambda} l(x, y) (n_c(x, y) - n_{m1}) \\ \phi_2(x, y) = \frac{2\pi i}{\lambda} l(x, y) (n_c(x, y) - n_{m2}) \end{cases} \quad (5.1)$$

Данная система уравнений справедлива в случаях использования зондирующего излучения с одной и той же длиной волны и двумя различными средами не искажающими форму объекта. Решение данной системы уравнений имеет вид:

$$\begin{cases} l = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\phi_1 - \phi_2}{n_{m1} - n_{m2}} \\ n_c = \frac{\phi_1 n_{m2} - \phi_2 n_{m1}}{\phi_1 - \phi_2} \end{cases} \quad (5.2)$$

При анализе теоретически достижимой точности определения показателя преломления и толщины клетки в каждой точке становится ясно, что основной вклад в погрешность измерения данных величин вносит ошибка, возникающая

при измерении фазового запаздывания внесенного клеткой $\Delta\phi$. Измерение длины волны лазерного излучения и показателя преломления среды, окружающей клетку может быть проведено с высокой точностью с помощью современных спектрометров и рефрактометров, в то время как типичная ошибка восстановления фазы из единственной внеосевой цифровой голограммы даже при оптимизации алгоритмов восстановления, выполненной в первой главе составляет порядка 0,1-0,15 рад. Зависимости абсолютной погрешности вычисления толщины и показателя преломления клетки от абсолютной погрешности измерения фазового запаздывания описываются следующими выражениями:

$$\begin{cases} \Delta l = \frac{\sqrt{2}\lambda}{2\pi(n_{m1}-n_{m2})} \Delta\phi \\ \Delta n_c = \frac{(n_{m1}-n_{m2})\sqrt{\phi_2^2+\phi_1^2}}{(\phi_1-\phi_2)^2} \Delta\phi \end{cases} \quad (5.3)$$

В данном случае предполагается, что погрешность восстановления фазы в различных средах одинакова и зависит преимущественно от характеристик цифрового голографического микроскопа и методов обработки полученных данных. Принимая во внимание прямую пропорциональную зависимость между величиной фазового сдвига, внесенного объектом, и разницей показателей преломлений образца и окружающей среды, из выражения 5.3 видно, что увеличение разницы между показателями преломления используемых сред приведет к увеличению точности вычисления как толщины клетки, так и ее показателя преломления. Таким образом, для повышения точности в общем случае следует использовать среды с максимально различными показателями преломления. Однако это оказывается не всегда возможным, прежде всего из-за различия свойств исследуемого объекта в этих средах. При работе с живыми клетками, этот аспект значительно сокращает спектр сред, которые могут быть использованы в эксперименте и разница показателей преломления в таком случае как правило ограничивается 0.006-0.008 рад [70, 105, 131]. Оценим точность определения показателя преломления в данном случае и примем типичные значения параметров живых клеток линии HeLa равными: $n_{lc} = 1,371$ [252], $l_{lc} = 5$ мкм

[253]. Для случая двух сред, использованных в работе [70] с показателями преломления 1,3410 и 1,3405 на длине волны зондирующего излучения $\lambda = 632$ нм получим значения типичных фазовых набегов, индуцированных клетками в разных средах: $\phi_{lc1} = 1,5153$ рад и $\phi_{lc2} = 1,4905$ рад. Согласно формуле 5.3 вычислим погрешность:

$$\Delta n_{lc} = \frac{(1,3710 - 1,3705)\sqrt{1,4905^2 + 1,5153^2}}{(1,5153 - 1,4905)^2} \Delta\phi = 1,728\Delta\phi \quad (5.4)$$

В отличие от живых, сухие фиксированные клетки обладают большими значениями показателя преломления вследствие отсутствия воды в их составе. В предположении 75% концентрации воды ($n_w = 1,333$) в живой клетке обладающей $n_{lc} = 1,371$, показатель преломления такой же сухой клетки может быть оценен как $n_{dc} = 1,485$. Помимо роста показателя преломления, также происходит уменьшение ее типичной толщины, которая составит примерно $l_{dc} = 1,25$ мкм. Если использовать в качестве двух сред воздух и физиологический раствора (0,9% раствора хлорида натрия в воде) ($n_{ps} = 1,334$), то величины фазовых набегов внесенных сухой фиксированной клеткой в данных условиях будут равны: $\phi_{dc1} = 6,0241$ и $\phi_{dc2} = 1,8755$. В таком случае получим:

$$\Delta n_{dc} = \frac{(1,334 - 1)\sqrt{6,0241^2 + 1,8755^2}}{(6,0241 - 1,8755)^2} \Delta\phi = 0,122\Delta\phi \quad (5.5)$$

Из выполненных оценок видно, что при работе с сухими фиксированными клетками и использовании сред с большей разностью показателей преломления при прочих равных удается повысить точность определения показателя преломления более чем в 10 раз. Несмотря на то, что данные оценки являются приблизительными и конкретные величины могут варьироваться в зависимости от типа клеток или их индивидуальных особенностей, из сделанных расчетов ясно, что проведение исследований подобного рода на сухих фиксированных клетках позволяет значительно повысить точность выполняемых измерений. Кроме того немаловажно то, что живые клетки в отличие от фиксированных

образцов могут двигаться в ходе эксперимента, что вносит временные флуктуации в измеряемые значения фазового набега, хотя такие движения как правило достаточно малы, так, что их амплитуда не превышает 0,026 рад.

Очевидно, что точность восстановления двумерных распределений интегрального показателя преломления и толщины клетки в высокой степени зависит от погрешности восстановления фазовых распределений. В отличие от некоторых других задач, где требуется лишь общее статистическое описание некоторых морфологических и оптических характеристик клетки (см. например [254]), задача вычисления распределений толщины и показателя преломления в отдельной клетке требует точного знания величины фазового запаздывания, внесенного клеткой в волновой фронт в той или иной среде. Если для описания того или иного процесса, как правило, собираются данные обо всей клетке в целом, то слабыми искажениями в фазовом распределении, вызванными когерентным и аддитивным шумами можно пренебречь. В нашем случае, как будет показано ниже, для получения точных данных необходимо минимизировать искажения, что может быть сделано, например, путем усреднения по нескольким фазовым распределениям. Этот метод был описан подробно в первой главе. В данной работе усреднение проводилось по 49 фазовым распределениям, зарегистрированным путем сдвигов вокруг клетки по квадратной области (7 сдвигов по каждой стороне). Учитывая метод обработки цифровых голограмм погрешность определения фазового набега в клетке можно оценить как 0,05-0,08 рад. Примеры фазовых распределений до и после такой фильтрации представлены на (рис. 5.1).

В связи с тем, что целью было получение информации о пространственном распределении показателя преломления в клетке, на данном этапе работы использовался микрообъектив х60 с числовой апертурой 0,85. Из-за необходимости регистрации цифровых голограмм клетки в воздухе и физиологическом растворе, возможность использования имерсионных микрообъективов отсутствовала. Тем не менее, как будет видно далее существующего увеличения достаточно

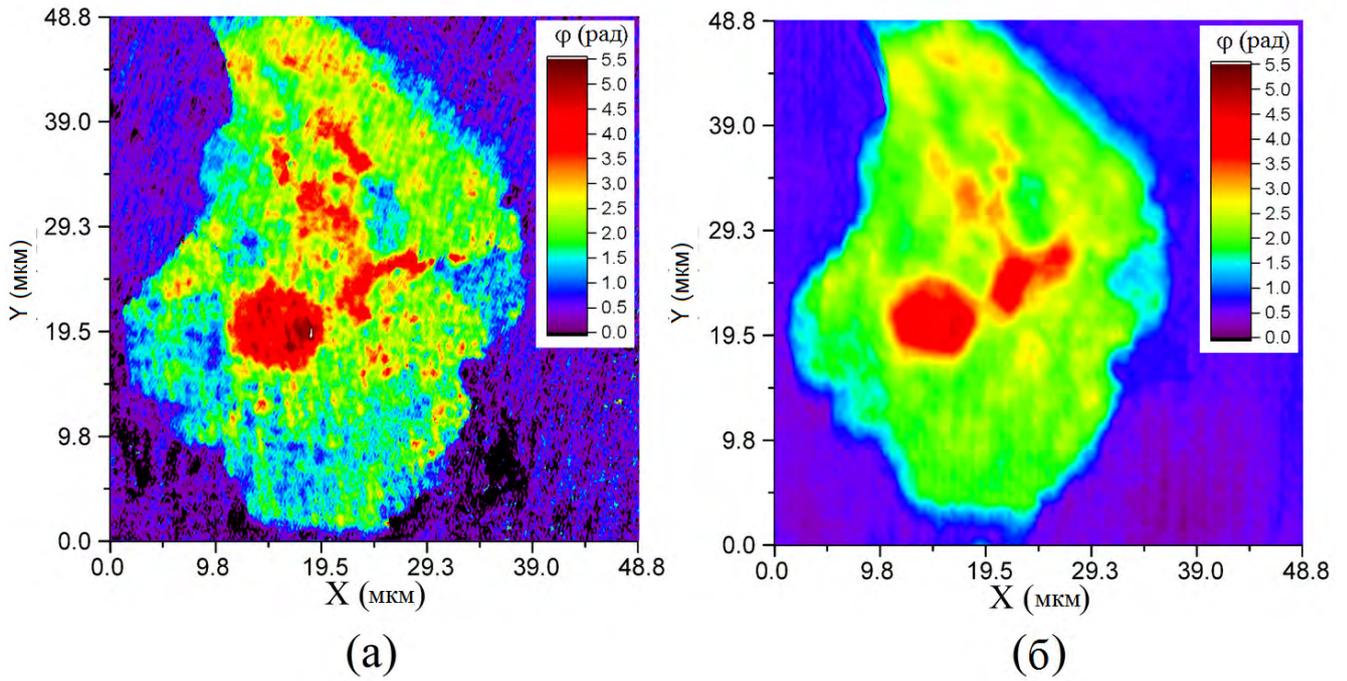


Рис. 5.1. Примеры фазовых распределений клетки эпителия ротовой полости до фильтрации когерентных шумов (а) и после нее (б).

для получения достаточно подробной картины клетки. При проведении подобного эксперимента важно обеспечить плоские и параллельные границы у используемой среды. При невыполнении данного условия в получаемое распределение фазового набега также будет вносить вклад неравномерность распределения среды, что приведет к искажению результатов (рис. 5.2).

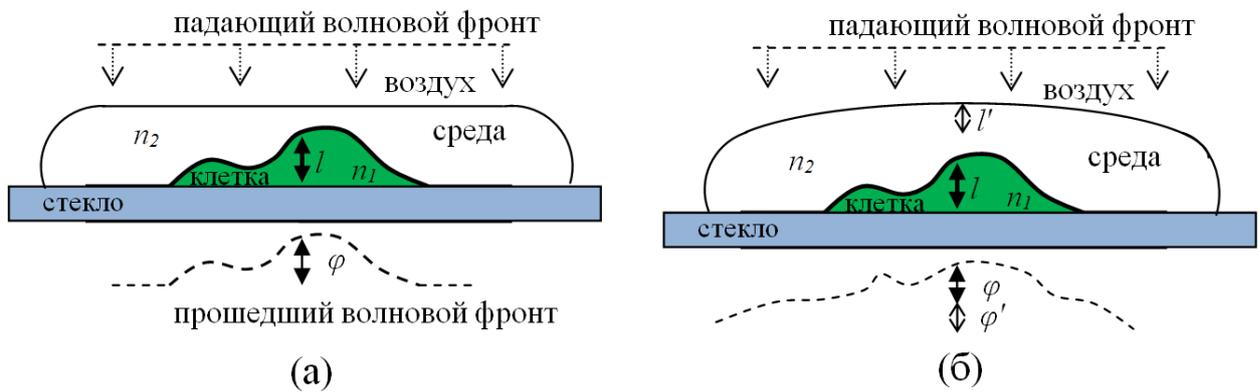


Рис. 5.2. Схема формирования фазового набега волнового фронта, проходящего через объект при (а) - плоских параллельных границах среды, окружающей клетку, (б) - неплоской границе среды.

Поэтому для получения корректных результатов необходимо проводить

исследования в кюветах с тонкими стенками или ограничивать используемую среду покровным или предметным стеклами. В нашем случае после регистрации набора цифровых голограмм исследуемых клеток в воздушной среде к образцу прикладывалось покровное стекло с каплей физраствора, которое удерживалось за счет силы поверхностного натяжения. После этого производилась повторная регистрация и восстановление фазовых набегов, вносимых теми же клетками. После попарного совмещения фазовых распределений клеток в двух средах с помощью системы уравнений 5.2 вычислялось распределение показателя преломления и толщины клетки. Стоит отметить, что ошибка определения показателя преломления в областях с предельно малой толщиной клетки значительно увеличивается, в связи с чем имеет смысл ограничиться рассмотрением лишь тех регионов клетки, толщина которых выше определенного уровня (например 150 нм). При этом погрешность вычисления толщины клетки согласно формуле 5.3 постоянна во всей области и определяется лишь показателями преломления используемых сред, длиной волны и точностью измерения фазового набегка. Пример пространственных распределений этих величин, для одной из наблюдаемых клеток представлен на рис. 5.3.

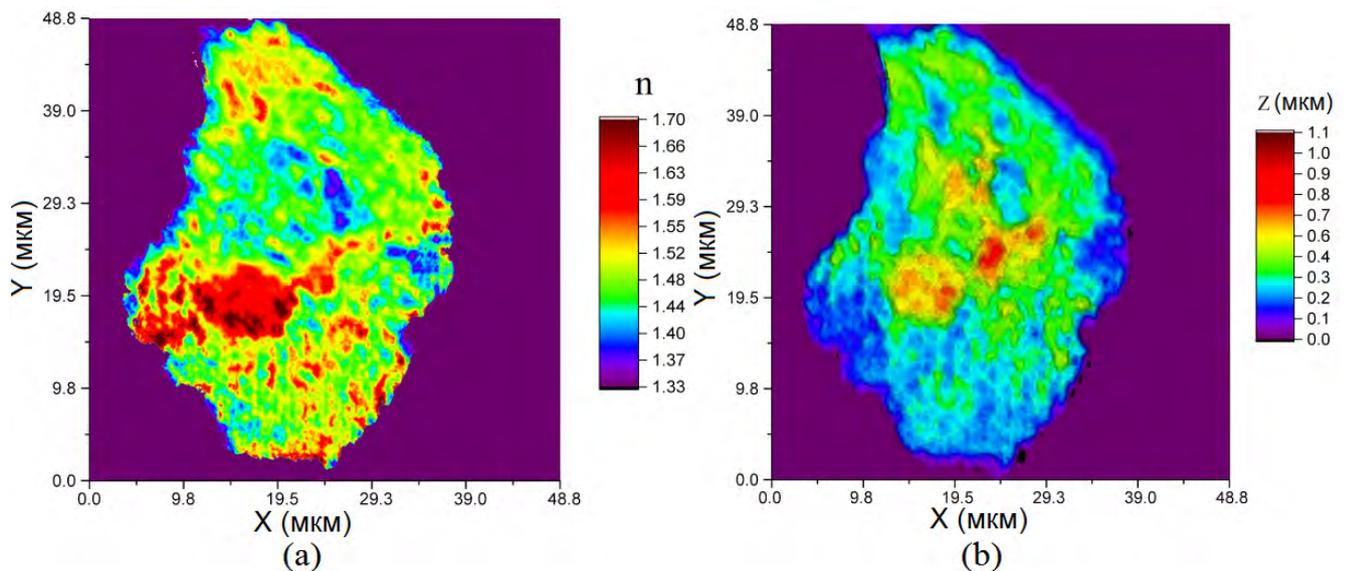


Рис. 5.3. Пространственные распределения (а) интегрального показателя преломления и (б) толщины фиксированной обезвоженной клетки мазка эпителия слизистой оболочки ротовой полости человека.

На основании данных, полученных на семи клетках того же типа, были построены их статистические распределения по показателю преломления (цветные точки), а также построена кривая полученная при усреднении этих данных (черная линия) (рис. 5.4). Из полученных данных также была проведена оценка среднего показателя преломления клеток данного вида как 1,478. Вариация данной величины для различных отдельно взятых клеток не превышает 0,025.

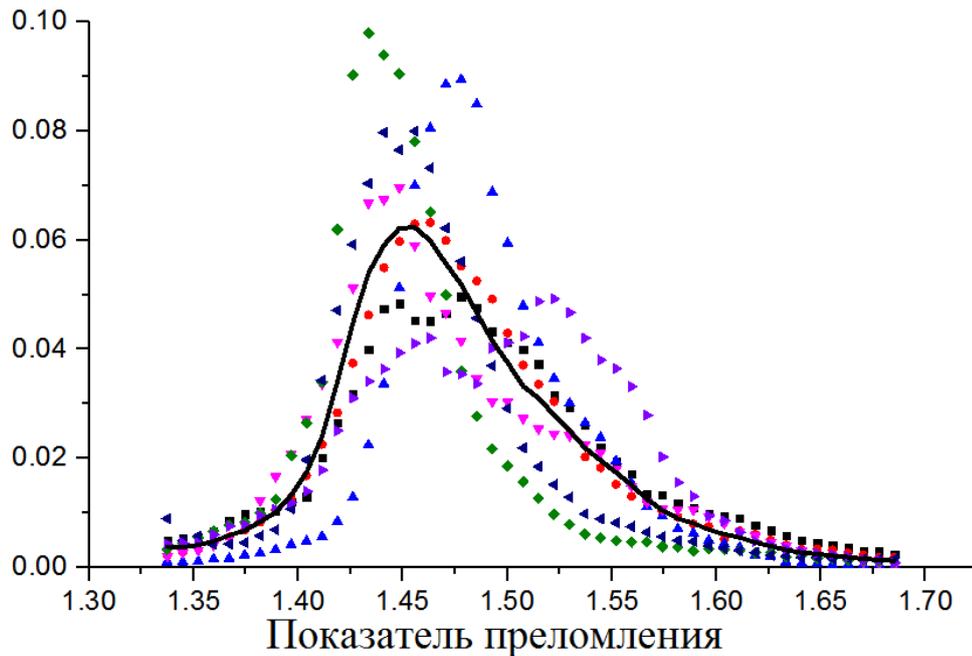


Рис. 5.4. Статистическое распределение интегрального показателя преломления фиксированных сухих клеток мазка слизистой оболочки ротовой полости человека, собранное по семи образцам, а также усредненная кривая (черная линия).

Полученные данные можно сравнить с результатами определения средних показателей преломления других живых клеток, опубликованных в статьях [105, 172, 246, 255], в пределах $n=1,358-1,375$. Основным отличием компонентного состава исследованных нами клеток от образцов, исследованных в этих работах, является значительное содержание воды в живых клетках и ее практически полное отсутствие в наших образцах. По различным данным, типичное содержание воды в живых клетках варьируется в диапазоне 73-83% [256]. При этом средний показатель преломления живой клетки может быть оценен с помощью выражения:

$$n_{lc} = p_w n_w + (1 - p_w) n_{dc} \quad (5.6)$$

где n_{lc} - показатель преломления живой клетки, n_{dc} - показатель преломления сухой клетки, p_w - концентрация воды в клетке, n_w - показатель преломления воды. На основании выражения 5.6 с использованием полученных экспериментальных данных был определен диапазон характерных значений среднего показателя преломления живых клеток, оказавшийся равным $n=1,357-1,372$, который хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными другими авторами. Эти данные также хорошо согласуются с информацией о типичных показателях преломления некоторых отдельных структур клетки, например показателя преломления ядра $n_{nuc} \approx 1,55$ [251], митохондрий $n_{mit} \approx 1,40 - 1,42$ [257], лизосом $n_{lis} \approx 1,6$ [258].

Заключение

В результате выполнения данной работы были получены следующие результаты.

1. Оптимизированы параметры обработки внеосевых цифровых голограмм для получения наилучшего качества восстановления фазовых распределений в условиях низких отношений сигнал/шум и проведена оценка погрешности данного метода. 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 методов 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 концентрации 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 протекания некротических процессов в живых клетках может быть определена с помощью методов цифровой голографической микроскопии. Кроме того увеличение скорости генерации активных форм 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.

Литература

1. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy // *Technology in cancer research & treatment*. 2005. Vol. 4, no. 3. P. 283–293.
2. DeRosa M. C., Crutchley R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications // *Coordination Chemistry Reviews*. 2002. Vol. 233. P. 351–371.
3. Marquet P., Rappaz B., Magistretti P. J. et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy // *Optics letters*. 2005. Vol. 30, no. 5. P. 468–470.
4. Girshovitz P., Shaked N. T. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization // *Biomedical optics express*. 2012. Vol. 3, no. 8. P. 1757–1773.
5. Ахманов С., Никитин С., *Физическая оптика: учебник 2-е изд.* М.: МГУ; Наука, 2004. P. 656.
6. Gates J. The measurement of comatic aberrations by interferometry // *Proceedings of the Physical Society. Section B*. 1955. Vol. 68, no. 12. P. 1065.
7. Nisida M., Saito H. A new interferometric method of two-dimensional stress analysis // *Experimental Mechanics*. 1964. Vol. 4, no. 12. P. 366–376.
8. Chevalerias R., Latron Y., Veret C. Methods of interferometry applied to the visualization of flows in wind tunnels // *JOSA*. 1957. Vol. 47, no. 8. P. 703–704.
9. Ashby D., Jephcott D., Malein A., Raynor F. Performance of the He–Ne gas laser as an interferometer for measuring plasma density // *Journal of Applied Physics*. 1965. Vol. 36, no. 1. P. 29–34.

10. Heflinger L., Wuerker R., Brooks R. Holographic interferometry // Journal of Applied Physics. 1966. Vol. 37, no. 2. P. 642–649.
11. Molin N., Stetson K. Measuring combination mode vibration patterns by hologram interferometry // Journal of Physics E: Scientific Instruments. 1969. Vol. 2, no. 7. P. 609.
12. Sweeney D., Vest C. Measurement of three-dimensional temperature fields above heated surfaces by holographic interferometry // International Journal of Heat and Mass Transfer. 1974. Vol. 17, no. 12. P. 1443–1454.
13. Kakos A., Ostrovskaya G., Ostrovskii Y. I., Zaidel A. Interferometry holographic investigation of a laser spark // Physics Letters. 1966. Vol. 23, no. 1. P. 81–83.
14. Semenova I. V., Dreiden G. V., Samsonov A. M. Holographic interferometry of strain solitary waves in plexiglas // Proc. SPIE. Vol. 4778. 2002. P. 293–301.
15. Harith M., Palleschi V., Salvetti A. et al. Dynamics of laser-driven shock waves in water // Journal of applied physics. 1989. Vol. 66, no. 11. P. 5194–5197.
16. Sollid J. E. Holographic interferometry applied to measurements of small static displacements of diffusely reflecting surfaces // Applied Optics. 1969. Vol. 8, no. 8. P. 1587–1595.
17. Xiaoli D., Katuo S. High-accuracy absolute distance measurement by means of wavelength scanning heterodyne interferometry // Measurement Science and Technology. 1998. Vol. 9, no. 7. P. 1031.
18. Hariharan P., Sanders B. II Quantum Phenomena in Optical Interferometry // Progress in Optics. 1996. Vol. 36. P. 49–128.
19. Abbott B., Abbott R., Adhikari R. et al. LIGO: the laser interferometer gravitational-wave observatory // Reports on Progress in Physics. 2009. Vol. 72, no. 7. P. 076901.

20. Palmer R. A., Manning C. J., Chao J. L. et al. Application of step-scan interferometry to two-dimensional Fourier transform infrared (2D FT-IR) correlation spectroscopy // *Applied spectroscopy*. 1991. Vol. 45, no. 1. P. 12–17.
21. Tahara T., Quan X., Otani R. et al. Digital holography and its multidimensional imaging applications: a review // *Microscopy*. 2018. Vol. 67, no. 2. P. 55–67.
22. Pagliarulo V., Russo T., Miccio L., Ferraro P. Numerical tools for the characterization of microelectromechanical systems by digital holographic microscopy // *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*. 2015. Vol. 14, no. 4. P. 041314–041314.
23. Гусев М. Е., Гусева И. Ю., Алексеенко И. В., Гуревич В. С., Исаев А. М., Редкоречев В. И., Применение методов цифровой голографической интерферометрии для регистрации наноперемещений // *Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта*. 2011. no. 5.
24. Wang H., Omid P., Carson J. J., Diop M. Holographic camera for non-contact measurement of nanoscale surface heights // *Practical Holography XXXIII: Displays, Materials, and Applications / International Society for Optics and Photonics*. Vol. 10944. 2019. P. 109440X.
25. Yamaguchi I., Kato J.-i., Ohta S. Surface shape measurement by phase-shifting digital holography // *Optical review*. 2001. Vol. 8, no. 2. P. 85–89.
26. Chen Y., Yu X., Yan L. Optical element surface defect measurement with lensless digital holographic microscopy // *Holography, Diffractive Optics, and Applications VIII / International Society for Optics and Photonics*. Vol. 10818. 2018. P. 108181J.

27. Bélanger E., Bérubé J.-P., de Dorlodot B. et al. Comparative study of quantitative phase imaging techniques for refractometry of optical waveguides // *Optics express*. 2018. Vol. 26, no. 13. P. 17498–17510.
28. Clark T. W., Offer R. F., Franke-Arnold S. et al. Comparison of beam generation techniques using a phase only spatial light modulator // *Optics express*. 2016. Vol. 24, no. 6. P. 6249–6264.
29. Litvin I. A., Dudley A., Roux F. S., Forbes A. Azimuthal decomposition with digital holograms // *Optics express*. 2012. Vol. 20, no. 10. P. 10996–11004.
30. Meng H., Pan G., Pu Y., Woodward S. H. Holographic particle image velocimetry: from film to digital recording // *Measurement Science and Technology*. 2004. Vol. 15, no. 4. P. 673.
31. Gopalan B., Malkiel E., Katz J. Experimental investigation of turbulent diffusion of slightly buoyant droplets in locally isotropic turbulence // *Physics of Fluids*. 2008. Vol. 20, no. 9. P. 095102.
32. Tajahuerce E., Matoba O., Javidi B. Shift-invariant three-dimensional object recognition by means of digital holography // *Applied optics*. 2001. Vol. 40, no. 23. P. 3877–3886.
33. Sutkowski M., Kujawińska M. Application of liquid crystal (LC) devices for optoelectronic reconstruction of digitally stored holograms // *Optics and Lasers in Engineering*. 2000. Vol. 33, no. 3. P. 191–201.
34. Lin Y.-C., Cheng C.-J. Determining the refractive index profile of micro-optical elements using transmissive digital holographic microscopy // *Journal of Optics*. 2010. Vol. 12, no. 11. P. 115402.
35. Potcoava M. C., Kim M. K. Fingerprint biometry applications of digital holog-

- raphy and low-coherence interferography // *Applied optics*. 2009. Vol. 48, no. 34. P. H9–H15.
36. Belashov A., Petrov N., Semenova I., Vasyutinskii O. Singlet oxygen detection in water by means of digital holography and digital holographic tomography // *Optics, Photonics and Digital Technologies for Imaging Applications IV / International Society for Optics and Photonics*. Vol. 9896. 2016. P. 98961B.
37. Petrov N. V., Skobnikov V. A., Shevkunov I. A. et al. Features of surface contouring by digital holographic interferometry with tilt of the object illumination // *Interferometry XIX / International Society for Optics and Photonics*. Vol. 10749. 2018. P. 1074906.
38. Котельников В.А., О пропускной способности «эфира» и проволоки в электросвязи // *Первая Всесоюзная Конференция по вопросам связи*. Vol. 14. 1933.
39. Гребенюк К.А., Гребенюк А. А., Рябухо В. П., Восстановление изображения с цифровой Фурье-голограммы в условиях превышения частоты Найквиста // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2012. Vol. 78, no. 2.
40. Belashov A. V., Petrov N. V., Lai X.-J., Cheng C.-J. Comparison of phase reconstruction algorithms accuracy in off-axis digital holography // *Proceedings of International conference OPTIC 2014*. 2014. P. P0402–P014.
41. Lesaffre M., Verrier N., Gross M. Noise and signal scaling factors in digital holography in weak illumination: relationship with shot noise // *Applied optics*. 2013. Vol. 52, no. 1. P. A81–A91.
42. Millerd J. E., Brock N. J., Baer J. W., Spuhler P. T. Vibration-insensitive interferometric measurements of mirror surface figures under cryogenic condi-

- tions // *Astronomical Telescopes and Instrumentation / International Society for Optics and Photonics*. 2003. P. 242–249.
43. Sharma A., Sheoran G., Jaffery Z. et al. Reduction of speckle noise in digital holographic images using wavelet transform // *Ninth International Symposium on Laser Metrology / International Society for Optics and Photonics*. 2008. P. 71551L–71551L.
 44. Kang X. An effective method for reducing speckle noise in digital holography // *Chinese Optics Letters*. 2008. Vol. 6, no. 2. P. 100–103.
 45. Belashov A., Petrov N., Semenova I., Vasyutinskii O. Investigation of phase objects using off-axis digital holography with a-priori known information on the reference wave // *Journal of Physics: Conference Series / IOP Publishing*. Vol. 536. 2014. P. 012003.
 46. Kreis T. Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method // *JOSA A*. 1986. Vol. 3, no. 6. P. 847–855.
 47. Schnars U., Jüptner W. P. Digital recording and numerical reconstruction of holograms // *Measurement science and technology*. 2002. Vol. 13, no. 9. P. R85.
 48. Goodman J. W. *Introduction to Fourier Optics, Second Edition* // *Optical Engineering*. 1996.
 49. Liebling M., Blu T., Unser M. Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram // *JOSA A*. 2004. Vol. 21, no. 3. P. 367–377.
 50. Yaroslavsky L. *Digital Holography and Digital Image Processing*. 2004.
 51. Garcia-Sucerquia J., Ramírez J. A. H., Prieto D. V. Reduction of speckle noise in digital holography by using digital image processing // *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*. 2005. Vol. 116, no. 1. P. 44–48.

52. Bianco V., Memmolo P., Finizio A. et al. Speckle suppression method for infrared digital holograms based on sparse object representation and noise diversity // Speckle 2018: VII International Conference on Speckle Metrology / International Society for Optics and Photonics. Vol. 10834. 2018. P. 1083410.
53. Белашов А. В., Петров Н. В., Семенова И. В., Метод вычисления динамического фазового набега в голографической интерферометрии без ликвидации фазовых разрывов // Компьютерная оптика. 2014. Vol. 38, no. 4.
54. Judge T. R., Bryanston-Cross P. A review of phase unwrapping techniques in fringe analysis // Optics and Lasers in Engineering. 1994. Vol. 21, no. 4. P.199–239.
55. Aebischer H. A., Waldner S. A simple and effective method for filtering speckle-interferometric phase fringe patterns // Optics Communications. 1999. Vol. 162, no. 4. P. 205–210.
56. Guo R., Zhang W., Liu R. et al. Phase unwrapping in dual-wavelength digital holographic microscopy with total variation regularization // Optics letters. 2018. Vol. 43, no. 14. P. 3449–3452.
57. Goldstein R. M., Zebker H. A., Werner C. L. Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping // Radio science. 1988. Vol. 23, no. 4. P. 713–720.
58. Zhang X., Zhang X., Xu M. et al. Phase unwrapping in digital holography based on non-subsampled contourlet transform // Optics communications. 2018. Vol. 407. P. 367–374.
59. Kreis T. Handbook of holographic interferometry: optical and digital methods. 2005. 2005.

60. Rybnikov A., Dudenkova V., Murav'eva M., Zakharov Y. N. Using digital off-axis holograms to investigate changes of state of living neuronal cultures // *Journal of Optical Technology*. 2013. Vol. 80, no. 7. P. 457–462.
61. Yu L., Mohanty S., Zhang J. et al. Digital holographic microscopy for quantitative cell dynamic evaluation during laser microsurgery // *Optics express*. 2009. Vol. 17, no. 14. P. 12031–12038.
62. Belashov A., Petrov N., Semenova I. Digital off-axis holographic interferometry with simulated wavefront // *Optics express*. 2014. Vol. 22, no. 23. P. 28363–28376.
63. Belashov A., Beltukov Y., Petrov N. et al. Indirect assessment of bulk strain soliton velocity in opaque solids // *Applied Physics Letters*. 2018. Vol. 112, no. 12. P. 121903.
64. Belashov A., Petrov N., Semenova I., Vasyutinskii O. Monitoring of laser-induced thermal gradients in plant cells by means of digital micro-interferometry // *2016 International Conference Laser Optics (LO) / IEEE*. 2016. P. S2–25.
65. Ren Z., Xu Z., Lam E. Y. Learning-based nonparametric autofocusing for digital holography // *Optica*. 2018. Vol. 5, no. 4. P. 337–344.
66. Sun H., Benzie P., Burns N. et al. Underwater digital holography for studies of marine plankton // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2008. Vol. 366, no. 1871. P. 1789–1806.
67. Murata S., Yasuda N. Potential of digital holography in particle measurement // *Optics & Laser Technology*. 2000. Vol. 32, no. 7. P. 567–574.

68. Hinsch K. D. Holographic particle image velocimetry // Measurement Science and Technology. 2002. Vol. 13, no. 7. P. R61.
69. Ferraro P., Grilli S., Alfieri D. et al. Extended focused image in microscopy by digital holography // Optics express. 2005. Vol. 13, no. 18. P. 6738–6749.
70. Rappaz B., Marquet P., Cuche E. et al. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy // Optics express. 2005. Vol. 13, no. 23. P. 9361–9373.
71. Wagner C., Osten W., Seebacher S. Direct shape measurement by digital wavefront reconstruction and multiwavelength contouring // Optical Engineering. 2000. Vol. 39, no. 1. P. 79–85.
72. Hariharan P., Oreb B. F. Stroboscopic holographic interferometry: application of digital techniques // Optics communications. 1986. Vol. 59, no. 2. P. 83–86.
73. Liu Z., Centurion M., Panotopoulos G. et al. Holographic recording of fast events on a CCD camera // Optics letters. 2002. Vol. 27, no. 1. P. 22–24.
74. Balciunas T., Melninkaitis A., Tamosauskas G., Sirutkaitis V. Time-resolved off-axis digital holography for characterization of ultrafast phenomena in water // Optics letters. 2008. Vol. 33, no. 1. P. 58–60.
75. Zhu L., Zhou C., Wu T. et al. Femtosecond off-axis digital holography for monitoring dynamic surface deformation // Applied Optics. 2010. Vol. 49, no. 13. P. 2510–2518.
76. Petrov N., Putilin S., Chipegin A. Time-resolved image plane off-axis digital holography // Applied Physics Letters. 2017. Vol. 110, no. 16. P. 161107.
77. Urniežius A., Šiaulys N., Kudriašov V. et al. Application of time-resolved digital holographic microscopy in studies of early femtosecond laser ablation // Applied Physics A. 2012. Vol. 108, no. 2. P. 343–349.

78. Bukin V., Garnov S., Malyutin A., Strelkov V. Interferometric diagnostics of femtosecond laser microplasma in gases // *Physics of Wave Phenomena*. 2012. Vol. 20, no. 2. P. 91–106.
79. Samsonov A., Semenova I., Belashov A. Direct determination of bulk strain soliton parameters in solid polymeric waveguides // *Wave Motion*. 2017. Vol. 71. P. 120–126.
80. Shimobaba T., Sato Y., Miura J. et al. Real-time digital holographic microscopy using the graphic processing unit // *Optics express*. 2008. Vol. 16, no. 16. P. 11776–11781.
81. Ahrenberg L., Page A. J., Hennelly B. M. et al. Using commodity graphics hardware for real-time digital hologram view-reconstruction // *Journal of display technology*. 2009. Vol. 5, no. 4. P. 111–119.
82. Staselko D., Denisyuk Y. N., Smirnov A. Holographic registration of a picture of temporal coherence of a wave train of a pulse radiation source // *Opt. Spectrosc.* 1969. Vol. 26. P. 413–420.
83. Abramson N. Light-in-flight recording: high-speed holographic motion pictures of ultrafast phenomena // *Applied optics*. 1983. Vol. 22, no. 2. P. 215–232.
84. Rosen J., Katz B. Synthetic aperture digital holography // *Fringe* 2009. Springer, 2009. P. 1–5.
85. Massig J. H. Digital off-axis holography with a synthetic aperture // *Optics letters*. 2002. Vol. 27, no. 24. P. 2179–2181.
86. Mico V., Zalevsky Z., García-Martínez P., García J. Synthetic aperture super-resolution with multiple off-axis holograms // *JOSA A*. 2006. Vol. 23, no. 12. P. 3162–3170.

87. Charrière F., Pavillon N., Colomb T. et al. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba // *Optics Express*. 2006. Vol. 14, no. 16. P. 7005–7013.
88. Charrière F., Marian A., Montfort F. et al. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy // *Optics letters*. 2006. Vol. 31, no. 2. P. 178–180.
89. Lin Y.-C., Cheng C.-J. Sectional imaging of spatially refractive index distribution using coaxial rotation digital holographic microtomography // *Journal of Optics*. 2014. Vol. 16, no. 6. P. 065401.
90. Cotte Y., Toy F., Jourdain P. et al. Marker-free phase nanoscopy // *Nature Photonics*. 2013. Vol. 7, no. 2. P. 113–117.
91. Levin G. G., Vishnyakov G. N., Minaev V. L. et al. Shearing interference microscopy for tomography of living cells // *European Conferences on Biomedical Optics / International Society for Optics and Photonics*. 2015. P. 95360G–95360G.
92. Kim K., Yaqoob Z., Lee K. et al. Diffraction optical tomography using a quantitative phase imaging unit // *Optics letters*. 2014. Vol. 39, no. 24. P. 6935–6938.
93. Nomura T., Kitazawa T. Digital holographic tomography using a light back propagation method and its application for refractive index measurement // *SPIE Optical Engineering+ Applications / International Society for Optics and Photonics*. 2013. P. 885506–885506.
94. Kostencka J., Kozacki T. Space-domain, filtered back propagation algorithm for tomographic configuration with scanning of illumination // *SPIE Photonics Europe / International Society for Optics and Photonics*. 2016. P. 98900F–98900F.

95. Devaney A. A filtered backpropagation algorithm for diffraction tomography // Ultrasonic imaging. 1982. Vol. 4, no. 4. P. 336–350.
96. Sung Y., Choi W., Fang-Yen C. et al. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging // Optics express. 2009. Vol. 17, no. 1. P. 266–277.
97. Hosseini P., Sung Y., Choi Y. et al. Scanning color optical tomography (SCOT) // Optics express. 2015. Vol. 23, no. 15. P. 19752–19762.
98. Kim T. M. M. B. S. D. C. P. S. G. L. L. P. G., Zhou R. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells // Nature Photonics. 2014. Vol. 8, no. 3. P. 256.
99. Belashov A., Petrov N., Semenova I. Accuracy of image-plane holographic tomography with filtered backprojection: random and systematic errors // Applied optics. 2016. Vol. 55, no. 1. P. 81–88.
100. Gorski W., Osten W. Tomographic imaging of photonic crystal fibers // Optics letters. 2007. Vol. 32, no. 14. P. 1977–1979.
101. Matulka R. D., Collins D. J. Determination of Three-Dimensional Density Fields from Holographic Interferograms // Journal of Applied Physics. 1971. Vol. 42, no. 3. P. 1109–1119.
102. Memmolo P., Finizio A., Paturzo M. et al. Multi-wavelengths digital holography: reconstruction, synthesis and display of holograms using adaptive transformation // Optics letters. 2012. Vol. 37, no. 9. P. 1445–1447.
103. Kühn J., Colomb T., Montfort F. et al. Real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a single hologram acquisition // Optics Express. 2007. Vol. 15, no. 12. P. 7231–7242.
104. Mann C. J., Bingham P. R., Paquit V. C., Tobin K. W. Quantitative phase

- imaging by three-wavelength digital holography // *Optics express*. 2008. Vol. 16, no. 13. P. 9753–9764.
105. Rappaz B., Charrière F., Depeursinge C. et al. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium // *Optics letters*. 2008. Vol. 33, no. 7. P. 744–746.
106. Osten W., Nadeborn W., Andrae P. General hierarchical approach in absolute phase measurement // *SPIE's 1996 International Symposium on Optical Science, Engineering, and Instrumentation / International Society for Optics and Photonics*. 1996. P. 2–13.
107. Lue N., Kang J. W., Hillman T. R. et al. Single-shot quantitative dispersion phase microscopy // *Applied physics letters*. 2012. Vol. 101, no. 8. P. 084101.
108. Ferraro P., Grilli S., Miccio L. et al. Full color 3-D imaging by digital holography and removal of chromatic aberrations // *Journal of Display Technology*. 2008. Vol. 4, no. 1. P. 97–100.
109. De Nicola S., Finizio A., Pierattini G. et al. Recovering correct phase information in multiwavelength digital holographic microscopy by compensation for chromatic aberrations // *Optics letters*. 2005. Vol. 30, no. 20. P. 2706–2708.
110. Singh A. K., Faridian A., Gao P. et al. Quantitative phase imaging using a deep UV LED source // *Optics letters*. 2014. Vol. 39, no. 12. P. 3468–3471.
111. Pedrini G., Zhang F., Osten W. Digital holographic microscopy in the deep (193 nm) ultraviolet // *Applied optics*. 2007. Vol. 46, no. 32. P. 7829–7835.
112. De Nicola S., Ferraro P., Grilli S. et al. Infrared digital reflective-holographic 3D shape measurements // *Optics Communications*. 2008. Vol. 281, no. 6. P. 1445–1449.

113. Mahon R. J., Murphy J. A., Lanigan W. Digital holography at millimetre wavelengths // *Optics Communications*. 2006. Vol. 260, no. 2. P. 469–473.
114. Petrov N. V., Gorodetsky A. A., Bepalov V. G. Holography and phase retrieval in terahertz imaging // *SPIE Optical Engineering+ Applications* / International Society for Optics and Photonics. 2013. P. 88460S–88460S.
115. Guo C.-S., Zhang L., Wang H.-T. et al. Phase-shifting error and its elimination in phase-shifting digital holography // *Optics letters*. 2002. Vol. 27, no. 19. P. 1687–1689.
116. Creath K. Error sources in phase-measuring interferometry // *International Symposium on Optical Fabrication, Testing, and Surface Evaluation* / International Society for Optics and Photonics. 1992. P. 428–435.
117. Claus D., Iliescu D., Watson J., Rodenburg J. Comparison of different digital holographic setup configurations // *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging* / Optical Society of America. 2012. P. DM4C–3.
118. Verrier N., Atlan M. Off-axis digital hologram reconstruction: some practical considerations // *Applied optics*. 2011. Vol. 50, no. 34. P. H136–H146.
119. Zernike F. Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung // *Z. Tech. Phys.* 1935. Vol. 16. P. 454–457.
120. Lee K. R., Kim K., Jung J. et al. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: From principles to applications. 2013.
121. Sánchez-Ortiga E., Doblaz A., Saavedra G. et al. Off-axis digital holographic microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit // *Applied optics*. 2014. Vol. 53, no. 10. P. 2058–2066.
122. Carl D., Kemper B., Wernicke G., von Bally G. Parameter-optimized digital

- holographic microscope for high-resolution living-cell analysis // Applied optics. 2004. Vol. 43, no. 36. P. 6536–6544.
123. Depeursinge C., Colomb T., Emery Y. et al. Digital holographic microscopy applied to life sciences // IEEE engineering in medicine and biology magazine. 2007. Vol. 1. P. 6244.
124. Yi F., Moon I., Javidi B. Cell morphology-based classification of red blood cells using holographic imaging informatics // Biomedical Optics Express. 2016. Vol. 7, no. 6. P. 2385.
125. Bessman J., Johnson R. Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects // Blood. 1975. Vol. 46, no. 3. P. 369–379.
126. Tycko D., Metz M., Epstein E., Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration // Applied optics. 1985. Vol. 24, no. 9. P. 1355–1365.
127. Boss D., Kühn J., Jourdain P. et al. Measurement of absolute cell volume, osmotic membrane water permeability, and refractive index of transmembrane water and solute flux by digital holographic microscopy // Journal of biomedical optics. 2013. Vol. 18, no. 3. P. 036007–036007.
128. Memmolo P., Miccio L., Merola F. et al. 3D morphometry of red blood cells by digital holography // Cytometry part A. 2014. Vol. 85, no. 12. P. 1030–1036.
129. Kim K., Yoon H., Diez-Silva M. et al. High-resolution three-dimensional imaging of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and in situ hemozoin crystals using optical diffraction tomography // Journal of biomedical optics. 2014. Vol. 19, no. 1. P. 011005–011005.
130. Тишко Т.В. и др., Исследование морфологии эритроцитов крови рожениц и новорожденных с помощью цифрового голографического

- интерференционного микроскопа // Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія. 2006. no. 3. P. 281–286.
131. Rappaz B., Barbul A., Emery Y. et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer // *Cytometry Part A*. 2008. Vol. 73, no. 10. P. 895–903.
132. Rappaz B., Barbul A., Hoffmann A. et al. Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009. Vol. 42, no. 3. P. 228–232.
133. Bernhardt I., Ivanova L., Langehanenberg P. et al. Application of digital holographic microscopy to investigate the sedimentation of intact red blood cells and their interaction with artificial surfaces // *Bioelectrochemistry*. 2008. Vol. 73, no. 2. P. 92–96.
134. Hosaka E., Kawamorita T., Ogasawara Y. et al. Interferometry in the evaluation of precorneal tear film thickness in dry eye // *American journal of ophthalmology*. 2011. Vol. 151, no. 1. P. 18–23.
135. Drexler W., Findl O., Menapace R. et al. Partial coherence interferometry: a novel approach to biometry in cataract surgery // *American journal of ophthalmology*. 1998. Vol. 126, no. 4. P. 524–534.
136. Jaycock P. D., Lobo L., Ibrahim J. et al. Interferometric technique to measure biomechanical changes in the cornea induced by refractive surgery // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2005. Vol. 31, no. 1. P. 175–184.
137. Jourdain P., Pavillon N., Moratal C. et al. Determination of transmembrane water fluxes in neurons elicited by glutamate ionotropic receptors and by the cotransporters KCC2 and NKCC1: a digital holographic microscopy study // *The Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 31, no. 33. P. 11846–11854.

138. Jourdain P., Boss D., Rappaz B. et al. Simultaneous optical recording in multiple cells by digital holographic microscopy of chloride current associated to activation of the ligand-gated chloride channel GABA A receptor // *PloS one*. 2012. Vol. 7, no. 12. P. e51041.
139. Marquet P., Jourdain P., Boss D. et al. Exploring neural cell dynamics with digital holographic microscopy // *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging* / Optical Society of America. 2013. P. DM4A-1.
140. Alm K., Cirenajwis H., Gisselsson L. et al. Digital Holography and Cell Studies // *Holography, Research and Technologies*. 2011.
141. Chalut K. J., Ekpenyong A. E., Clegg W. L. et al. Quantifying cellular differentiation by physical phenotype using digital holographic microscopy // *Integrative Biology*. 2012. Vol. 4, no. 3. P. 280–284.
142. Kroemer G., El-Deiry W., Golstein P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // *Cell Death & Differentiation*. 2005. Vol. 12. P. 1463–1467.
143. Alm K., El-Schich Z., Falck M. et al. Cells and Holograms – Holograms and Digital Holographic Microscopy as a Tool to Study the Morphology of Living Cells // *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications*. 2013.
144. Khmaladze A., Matz R. L., Epstein T. et al. Cell volume changes during apoptosis monitored in real time using digital holographic microscopy // *Journal of structural biology*. 2012. Vol. 178, no. 3. P. 270–278.
145. Bortner C., Cidlowski J. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell // *Cell death and differentiation*. 2002. Vol. 9, no. 12. P. 1307–1310.
146. Kemmler M., Fratz M., Giel D. et al. Noninvasive time-dependent cytometry

- monitoring by digital holography // *Journal of biomedical optics*. 2007. Vol. 12, no. 6. P. 064002–064002.
147. Colomb T., Charrière F., Kühn J. et al. Advantages of digital holographic microscopy for real-time full field absolute phase imaging // *Biomedical Optics (BiOS) 2008 / International Society for Optics and Photonics*. 2008. P. 686109–686109.
148. Kemper B., Carl D., Schnekenburger J. et al. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy // *Journal of biomedical optics*. 2006. Vol. 11, no. 3. P. 034005–034005.
149. Mugnano M., Calabuig A., Grilli S. et al. Monitoring cell morphology during necrosis and apoptosis by quantitative phase imaging // *SPIE Optical Metrology / International Society for Optics and Photonics*. 2015. P. 952909–952909.
150. Calabuig A., Mugnano M., Miccio L. et al. Investigating fibroblast cells under “safe” and “injurious” blue-light exposure by holographic microscopy // *Journal of Biophotonics*. 2017.
151. Antkowiak M., Torres-Mapa M. L., Dholakia K., Gunn-Moore F. J. Quantitative phase study of the dynamic cellular response in femtosecond laser photoporation // *Biomedical optics express*. 2010. Vol. 1, no. 2. P. 414–424.
152. Pan F., Liu S., Wang Z. et al. Digital holographic microscopy long-term and real-time monitoring of cell division and changes under simulated zero gravity // *Optics express*. 2012. Vol. 20, no. 10. P. 11496–11505.
153. Kemper B., Bauwens A., Vollmer A. et al. Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy // *Journal of biomedical optics*. 2010. Vol. 15, no. 3. P. 036009–036009.

154. Barer R. Interference microscopy and mass determination // *Nature*. 1952. Vol. 169. P. 366–367.
155. Rappaz B., Cano E., Colomb T. et al. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy // *Journal of biomedical optics*. 2009. Vol. 14, no. 3. P. 034049–034049.
156. Mir M., Wang Z., Shen Z. et al. Optical measurement of cycle-dependent cell growth // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108, no. 32. P. 13124–13129.
157. Sridharan S., Mir M., Popescu G. Simultaneous optical measurements of cell motility and growth // *Biomedical optics express*. 2011. Vol. 2, no. 10. P. 2815–2820.
158. Matrecano M., Paturzo M., Ferraro P. Extended focus imaging in digital holographic microscopy: a review // *Optical Engineering*. 2014. Vol. 53, no. 11. P. 112317–112317.
159. Langehanenberg P., von Bally G., Kemper B. Autofocusing in digital holographic microscopy // *3D Research*. 2011. Vol. 2, no. 1. P. 1–11.
160. Lyu M., Yuan C., Li D., Situ G. Fast autofocusing in digital holography using the magnitude differential // *Applied Optics*. 2017. Vol. 56, no. 13. P. F152.
161. Fonseca E. S. R., Fiadeiro P. T., Pereira M., Pinheiro A. Comparative analysis of autofocus functions in digital in-line phase-shifting holography // *Applied Optics*. 2016. Vol. 55, no. 27. P. 7663.
162. Rinehart M. T., Park H. S., Wax A. Influence of defocus on quantitative analysis of microscopic objects and individual cells with digital holography // *Biomedical optics express*. 2015. Vol. 6, no. 6. P. 2067–2075.

163. Langehanenberg P., Ivanova L., Bernhardt I. et al. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy // Journal of biomedical optics. 2009. Vol. 14, no. 1. P. 014018–014018.
164. Memmolo P., Iannone M., Ventre M. et al. On the holographic 3D tracking of in vitro cells characterized by a highly-morphological change // Optics express. 2012. Vol. 20, no. 27. P. 28485–28493.
165. Yu X., Hong J., Liu C. et al. Four-dimensional motility tracking of biological cells by digital holographic microscopy // Journal of biomedical optics. 2014. Vol. 19, no. 4. P. 045001–045001.
166. Демин В.В. и Ольшукоев А.С., Цифровое голографическое видео для исследования биологических частиц // Оптический журнал. 2012. Vol. 79, no. 6. P. 42–46.
167. Lee S. J., Seo K. W., Choi Y. S., Sohn M. H. Three-dimensional motion measurements of free-swimming microorganisms using digital holographic microscopy // Measurement Science and Technology. 2011. Vol. 22, no. 6. P. 064004.
168. Javidi B., Kim D. Three-dimensional-object recognition by use of single-exposure on-axis digital holography // Optics letters. 2005. Vol. 30, no. 3. P. 236–238.
169. Mihailescu M., Scarlat M., Gheorghiu A. et al. Automated imaging, identification, and counting of similar cells from digital hologram reconstructions // Applied optics. 2011. Vol. 50, no. 20. P. 3589–3597.
170. Moon I., Javidi B. Shape tolerant three-dimensional recognition of biological microorganisms using digital holography // Optics express. 2005. Vol. 13, no. 23. P. 9612–9622.

171. Rappaz B., Breton B., Shaffer E., Turcatti G. Digital holographic microscopy: a quantitative label-free microscopy technique for phenotypic screening // *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2014. Vol. 17, no. 1. P. 80–88.
172. Curl C. L., Bellair C. J., Harris T. et al. Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy // *Cytometry Part A*. 2005. Vol. 65, no. 1. P. 88–92.
173. Barer R. Refractometry and Interferometry of Living Cells // *JOSA*. 1957. Vol. 47, no. 6. P. 545–556.
174. Sung Y., Choi W., Lue N. et al. Stain-free quantification of chromosomes in live cells using regularized tomographic phase microscopy // *PloS one*. 2012. Vol. 7, no. 11. P. e49502.
175. Kuś A., Dudek M., Kemper B. et al. Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures // *Journal of biomedical optics*. 2014. Vol. 19, no. 4. P. 046009–046009.
176. Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K. et al. Tomographic phase microscopy // *Nature methods*. 2007. Vol. 4.
177. Habaza M., Gilboa B., Roichman Y., Shaked N. T. Tomographic phase microscopy with 180 rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers // *Optics letters*. 2015. Vol. 40, no. 8. P. 1881–1884.
178. Kemper B., Barroso A., Woerdemann M. et al. Towards 3D modelling and imaging of infection scenarios at the single cell level using holographic optical tweezers and digital holographic microscopy // *Journal of biophotonics*. 2013. Vol. 6, no. 3. P. 260–266.

179. Merola F., Miccio L., Memmolo P. et al. 3D manipulation and visualization of in-vitro cells by optical tweezers and digital holographic microscopy // SPIE BiOS / International Society for Optics and Photonics. 2014. P. 89471A–89471A.
180. Antkowiak M., Arita Y., Dholakia K., Gunn-Moore F. Imaging the cellular response to transient shear stress using stroboscopic digital holography // Journal of biomedical optics. 2011. Vol. 16, no. 12. P. 120508–1205083.
181. Rinehart M. T., Park H. S., Walzer K. A. et al. Hemoglobin consumption by *P. falciparum* in individual erythrocytes imaged via quantitative phase spectroscopy // Scientific reports. 2016. Vol. 6.
182. Lin Y.-C., Cheng C.-J., Poon T.-C. Optical sectioning with a low-coherence phase-shifting digital holographic microscope // Applied optics. 2011. Vol. 50, no. 7. P. B25–B30.
183. Gao J., Lyon J. A., Szeto D. P., Chen J. In vivo imaging and quantitative analysis of zebrafish embryos by digital holographic microscopy // Biomedical optics express. 2012. Vol. 3, no. 10. P. 2623–2635.
184. Kim K., Choe K., Kim P., Park Y. Intravital Quantitative Phase Microscopy for Studying Blood Flow in Live Mouse Mesentery // Asia Communications and Photonics Conference / Optical Society of America. 2015. P. AS3I–4.
185. Cieplik F., Buchalla W., Hellwig E. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions—a systematic review // Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2017. Vol. 18. P. 54–62.
186. Freire F., Ferraresi C., Jorge A. O. C., Hamblin M. R. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2016. Vol. 159. P. 161–168.

187. Debeve E., Cheng C., Schaefer S. C. et al. Photodynamic therapy induces selective extravasation of macromolecules: Insights using intravital microscopy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010. Vol. 98, no. 1. P. 69–76.
188. Jung N. C., Kim H. J., Kang M. S. et al. Photodynamic therapy-mediated DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of established solid tumors // *Cancer Letters*. 2012. Vol. 324, no. 1. P. 58–65.
189. Allison R. R., Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2013. Vol. 10, no. 4. P. 331–341.
190. Maas A. L., Carter S. L., Wiley E. P. et al. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy // *Cancer Research*. 2012. Vol. 72, no. 8. P. 2079–2088.
191. Филоненко ЕВ и Серова ЛГ, Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical photonics*. 2016. Vol. 5, no. 2. P. 26–37.
192. Parker D. H. Laser photochemistry of molecular oxygen // *Accounts of chemical research*. 2000. Vol. 33, no. 8. P. 563–571.
193. Briviba K., Klotz L.-O., Sies H. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. // *Biological chemistry*. 1997. Vol. 378, no. 11. P. 1259–1265.
194. Belik V., Beltukova D., Gadzhiev I. et al. Phosphorescence dynamics of singlet oxygen and Radachlorin photosensitizer in aqueous solution // *European Conference on Biomedical Optics / Optical Society of America*. 2017. P. 104170F.
195. Noxon J. Observation of the transition in O₂ // *Canadian Journal of Physics*. 1961. Vol. 39, no. 8. P. 1110–1119.

196. Khan A. U., Kasha M. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution // *The Journal of Chemical Physics*. 1963. Vol. 39, no. 8. P. 2105–2106.
197. Baier J., Maier M., Engl R. et al. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005. Vol. 109, no. 7. P. 3041–3046.
198. Hatz S., Lambert J. D., Ogilby P. R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2007. Vol. 6, no. 10. P. 1106–1116.
199. Scholz M., Dēdic R., Valenta J. et al. Real-time luminescence microspectroscopy monitoring of singlet oxygen in individual cells // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2014. Vol. 13, no. 8. P. 1203–1212.
200. Cerny J., Karaskova M., Rakusan J., Nespurek S. Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2010. Vol. 210, no. 1. P. 82–88.
201. Романов А.Н. и Руфов Ю.В., Высокочувствительный хемилюминесцентный метод регистрации синглетного кислорода в газовой фазе // *Журнал физической химии*. 1998. Vol. 72. P. 2094.
202. Gerola A. P., Semensato J., Pellosi D. S. et al. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: new calculation methodology considering the influence of photobleaching // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2012. Vol. 232. P. 14–21.
203. Neumann M., Hild M., Brauer H.-D. The [4+ 2]-cycloaddition of singlet oxygen ($1\Delta_g$) to aromatic hydrocarbons: An Easy Method for Determination of Oxygen Concentrations in Organic Solvents // *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*. 1998. Vol. 102, no. 8. P. 999–1001.

204. Ferreira J., Menezes P. F., Kurachi C. et al. Photostability of different chlorine photosensitizers // *Laser Physics Letters*. 2008. Vol. 5, no. 2. P. 156–161.
205. Douillard S., Olivier D., Patrice T. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2009. Vol. 8, no. 3. P. 405–413.
206. Belik V., Gadzhiev I., Petrenko M. et al. Visible to near IR luminescence spectrum of Radachlorin under excitation at 405 nm // *Chemical Physics Letters*. 2016. Vol. 665. P. 127–130.
207. Kochneva E. V., Filonenko E. V., Vakulovskaya E. G. et al. Photosensitizer Radachlorin®: Skin cancer PDT phase II clinical trials // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2010. Vol. 7, no. 4. P. 258–267.
208. Privalov V. A., Lappa A. V., Seliverstov O. V. et al. Clinical trials of a new chlorin photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors // *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XI* / International Society for Optics and Photonics. Vol. 4612. 2002. P. 178–189.
209. Beltukova D., Semenova I., Smolin A., Vasyutinskii O. Kinetics of photobleaching of Radachlorin® photosensitizer in aqueous solutions // *Chemical Physics Letters*. 2016. Vol. 662. P. 127–131.
210. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G. B., Hamblin M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer // *Cancers*. 2011. Vol. 3, no. 2. P. 2516–2539.
211. Rustin P. Mitochondria, from cell death to proliferation // *Nature genetics*. 2002. Vol. 30, no. 4. P. 352.
212. Mills J. C., Lee V., Pittman R. N. Activation of a PP2A-like phosphatase and

- dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis // *Journal of Cell Science*. 1998. Vol. 111, no. 5. P. 625–636.
213. Gaschler M. M., Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochemical and biophysical research communications*. 2017. Vol. 482, no. 3. P. 419–425.
214. Gollnick S. O., Brackett C. M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // *Immunologic Research*. 2010. Vol. 46, no. 1-3. P. 216–226.
215. Hevia D., Rodriguez-Garcia A., Alonso-Gervós M. et al. Cell volume and geometric parameters determination in living cells using confocal microscopy and 3D reconstruction // *Protocol Exchange*. 2011.
216. Blatter L. A. [16] Cell volume measurements by fluorescence confocal microscopy: Theoretical and practical aspects // *Methods in enzymology*. Elsevier, 1999. Vol. 307. P. 274–295.
217. Franks P. J., Buckley T. N., Shope J. C., Mott K. A. Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe // *Plant physiology*. 2001. Vol. 125, no. 4. P. 1577–1584.
218. Chang Y., Yokota H., Abe K. et al. 3D Segmentation, Visualization and Quantitative Analysis of Differentiation Activity for Mouse Embryonic Stem Cells using Time-Lapse Fluorescence Microscopy Images // *IEEE 17th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*. 2017. P. 139–144.
219. Ujihara Y., Nakamura M., Miyazaki H., Wada S. Segmentation and morphometric analysis of cells from fluorescence microscopy images of cytoskeletons // *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2013.
220. Haase K., Pelling A. E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy // *Journal of The Royal Society Interface*. 2015. Vol. 12, no. 104. P. 20140970.

221. Buys A. V., Van Rooy M.-J., Soma P. et al. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study // *Cardiovascular diabetology*. 2013. Vol. 12, no. 1. P. 25.
222. Deng X., Xiong F., Li X. et al. Application of atomic force microscopy in cancer research // *Journal of nanobiotechnology*. 2018. Vol. 16, no. 1. P. 102.
223. Балалаева И. В., Проточная цитофлуориметрия: Учебное методическое пособие. 2014.
224. Bianco V., Memmolo P., Leo M. et al. Strategies for reducing speckle noise in digital holography // *Light: Science & Applications*. 2018. Vol. 7, no. 1. P. 48.
225. Xiao W., Zhang J., Rong L. et al. Improvement of speckle noise suppression in digital holography by rotating linear polarization state // *Chinese Optics Letters*. 2011. Vol. 9, no. 6. P. 060901.
226. Dubois F., Requena M.-L. N., Minetti C. et al. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source // *Applied optics*. 2004. Vol. 43, no. 5. P. 1131–1139.
227. Pan F., Xiao W., Liu S., Rong L. Coherent noise reduction in digital holographic microscopy by laterally shifting camera // *Optics Communications*. 2013. Vol. 292. P. 68–72.
228. Kak A. C., Slaney M., Wang G. Principles of computerized tomographic imaging // *Medical Physics*. 2002. Vol. 29, no. 1. P. 107–107.
229. Su J.-W., Hsu W.-C., Chou C.-Y. et al. Digital holographic microtomography for high-resolution refractive index mapping of live cells // *Journal of biophotonics*. 2013. Vol. 6, no. 5. P. 416–424.
230. Lue N., Choi W., Popescu G. et al. Synthetic aperture tomographic phase mi-

- croscopy for 3D imaging of live cells in translational motion // *Optics express*. 2008. Vol. 16, no. 20. P. 16240–16246.
231. Il'ina A., Glazov A., Semenova I., Vasyutinskii O. The influence of excitation radiation parameters on photosensitized generation of singlet oxygen in water // *Optics and Spectroscopy*. 2016. Vol. 120, no. 6. P. 876–880.
232. Valle S., Rocca F., Zanzi L. Diffraction tomography through phase back-projection // *Geomatic Method for the Analysis of Data in the Earth Sciences*. Springer, 2000. P. 229–256.
233. Kozacki T., Krajewski R., Kujawińska M. Reconstruction of refractive-index distribution in off-axis digital holography optical diffraction tomographic system // *Optics express*. 2009. Vol. 17, no. 16. P. 13758–13767.
234. Meyer F. Topographic distance and watershed lines // *Signal processing*. 1994. Vol. 38, no. 1. P. 113–125.
235. Morita A., Werfel T., Stege H. et al. Evidence that Singlet Oxygen-induced Human T Helper Cell Apoptosis Is the Basic Mechanism of Ultraviolet-A Radiation Phototherapy // *The Journal of Experimental Medicine*. 2002. Vol. 186, no. 10. P. 1763–1768.
236. Cagnoli C. M., Atabay C., Kharlamova E., Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis // *Journal of Pineal Research*. 1995. Vol. 18, no. 4. P. 222–226.
237. Rusterucci C., Stallaert V., Milat M. L. et al. Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana* // *Plant Physiology*. 2016. Vol. 111, no. 3. P. 885–891.

238. Halliwell B., Chirico S., Crawford M. A. et al. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance // *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 57. 1993.
239. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. // *Cell death and differentiation*. 2018. Vol. 25, no. 3. P. 486–541.
240. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // *Cell Death Differ*. 2012. Vol. 19, no. 1. P. 107–120.
241. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell death and differentiation*. 2009. Vol. 16, no. 1. P. 3.
242. Park Y., Diez-Silva M., Popescu G. et al. Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105, no. 37. P. 13730–13735.
243. Backman V., Wallace M. B., Perelman L. T. et al. Detection of preinvasive cancer cells // *Nature*. 2000. Vol. 406, no. 6791. P. 35–36.
244. Liang X. J., Liu A. Q., Lim C. S. et al. Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip // *Sensors and Actuators, A: Physical*. 2007. Vol. 133, no. 2 SPEC. ISS. P. 349–354.
245. Labrou N. E., Walker J. M., Chen P. et al. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future // *Lab Chip*. 2018. Vol. 16, no. 4. P. 634–644.
246. Lanni F., Waggoner A. S., Taylor D. L. Structural organization of interphase

- 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy // Journal of Cell Biology. 1985. Vol. 100, no. 4. P. 1091–1102.
247. Maltsev V. P., Hoekstra A. G., Yurkin M. A. Optics of White Blood Cells: Optical Models, Simulations, and Experiments // Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses. 2011. P. 63–93.
248. Lue N., Popescu G., Ikeda T. et al. Live cell refractometry using Hilbert phase microscopy. 2013. P. SH1.
249. Choi W., Fang-Yen C., Badizadegan K. et al. Tomographic phase microscopy // Nature Methods. 2007. Vol. 4, no. 9. P. 717–719.
250. Schürmann M., Scholze J., Müller P. et al. Cell nuclei have lower refractive index and mass density than cytoplasm // Journal of biophotonics. 2016. Vol. 9, no. 10. P. 1068–1076.
251. Bista R. K., Uttam S., Wang P. et al. Quantification of nanoscale nuclear refractive index changes during the cell cycle // Journal of Biomedical Optics. 2011. Vol. 16, no. 7. P. 070503.
252. Lue N., Choi W., Popescu G. et al. Live cell refractometry using hilbert phase microscopy and confocal reflectance microscopy // Journal of Physical Chemistry A. 2009. Vol. 113, no. 47. P. 13327–13330.
253. Gregg J. L., McGuire K. M., Focht D. C., Model M. A. Measurement of the thickness and volume of adherent cells using transmission-through-dye microscopy // Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2010. Vol. 460, no. 6. P. 1097–1104.
254. Belashov A. V., Zhikhoreva A. A., Belyaeva T. N. et al. Digital holographic microscopy in label-free analysis of cultured cells' response to photodynamic treatment // Optics Letters. 2016. Vol. 41, no. 21. P. 5035.

255. Bereiter-Hahn J., Fox C. H., Thorell B. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells // *Journal of Cell Biology*. 1979. Vol. 82, no. 3. P. 767–779.
256. Ling G. What determines the normal water content of a living cell? // *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*. 2004. Vol. 36, no. 1. P. 1–9.
257. Haseda K., Kanematsu K., Noguchi K. et al. Significant correlation between refractive index and activity of mitochondria: single mitochondrion study // *Biomedical Optics Express*. 2015. Vol. 6, no. 3. P. 859.
258. Wilson J. D., Foster T. H. Characterization of lysosomal contribution to whole-cell light scattering by organelle ablation // *Journal of Biomedical Optics*. 2007. Vol. 12, no. 3. P. 030503.

Список публикаций по теме диссертации

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. // Biophotonics South America / International Society for Optics and Photonics. — T. 9531. — 2015. — C. 95310S.

[A5] Singlet oxygen detection in water by means of digital holography and digital holographic tomography / AV Belashov, NV Petrov, IV Semenova, OS Vasyutinskii // Optics, Photonics and Digital Technologies for Imaging Applications IV / International Society for Optics and Photonics. — T. 9896. — 2016. — C. 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. // Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI / International Society for Optics and Photonics. — T. 10685. — 2018. — C. 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. // 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 microinterferometry / AV Belashov, NV Petrov, IV Semenova, OS Vasyutinskii

// 2016 International Conference Laser Optics (LO) / 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.