

Возможности прижизненной визуализации клеток крови при стрессе для оценки состояния организма

А.В. Дерюгина^{1,A}, М.Н. Иващенко^{2,B}, П.С. Игнатъев^{3,C}, В.Б. Метелин^{4,D},
М.Н. Таламанова^{5,A}

^A Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

^B Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, Нижний Новгород, Россия

^C Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», Екатеринбург, Россия

^D Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

¹ ORCID: 0000-0001-8812-8559, derugina69@yandex.ru

² ORCID: 0000-0001-6642-8518, marina.31@rambler.ru

³ ORCID: 0000-0001-5075-7034, ignasha2000@yandex.ru

⁴ ORCID: 0000-0003-0600-5729, verrv01@gmail.com

⁵ ORCID: 0000-0003-0512-6940, manjatal@ya.ru

Аннотация

Биологические образцы являются наиболее трудными для изучения, поскольку состоят почти исключительно из легких элементов, дающих лишь небольшую видимость, и имеют слабые структуры, которые уязвимы для повреждения почти на каждом этапе микроскопии. Оптимальным является изучение их фазовых изменений с использованием метода лазерной интерференционной микроскопии. Метод основан на анализе показателя преломления внутриклеточной среды клеток с последующим компьютерным анализом и обработкой фазовых изображений с трехмерной реконструкцией объекта. При этом полученные изображения регистрируются в цифровом виде, что позволяет их рассматривать с любой точки зрения. В работе методом лазерной интерференционной микроскопии проведено исследование клеток крови: нейтрофилов и эритроцитов, с последующей 3D реконструкцией клеточных образов. С использованием 3D реконструкции нейтрофилов показано изменение их функциональной активности, тогда как 3D реконструкция эритроцитов выявила нарушение нормальной дискоидальной формы клеток в условиях технологического стресса. Интерпретация полученных данных свидетельствует о перестройке клеточного звена неспецифической резистентности и ухудшении кислородтранспортной функции эритроцитов при технологическом стрессе. Визуализация интерференционных картин клеток крови через обработку 3D изображений позволяет получить витальный анализ клеток, что недоступно с использованием других методов микроскопии, в частности световой микроскопии, которая традиционно используется в качестве прогностического метода состояния организма. Данное направление представляет собой важнейшее условие дальнейшего развития работ в области клеточной диагностики. Полученные результаты доказывают применимость 3D реконструкции клеточных образов для биоскрининга технологического стресса.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, 3D изображения, клетки крови, технологический стресс.

1. Введение

Современный уровень развития оптической электроники и вычислительной техники позволяет создавать и успешно внедрять новые инструменты исследования биологических объектов. Наиболее перспективными оказывается метод интерференционной микроскопии, который дает возможность осуществлять неинвазивные исследования клеточной морфологии и динамики со сверхвысоким пространственным разрешением [1, 2]. Метод интерференционной микроскопии, в отличие от многих других методов микроскопии позволяет исследовать нативный объект без предварительной фиксации и окраски [3]. Важная особенность интерференционных методов заключается в том, что регистрируемая величина оптической разности хода лучей в интерферометре позволяет получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления объекта и его морфологии [4]. Оценка распределения фазовой высоты позволяет воссоздать истинно трехмерный рельеф объекта [5]. Исследование оптической плотности и воспроизведение геометрии клеток, на наш взгляд, может дать дополнительную информацию о клетках крови, которые традиционно исследуются методами световой микроскопии.

Цель работы – показать с помощью интерференционной микроскопии новые методические подходы к анализу состояния нейтрофилов и эритроцитов в норме и при стрессовом воздействии.

2. Лазерная интерференционная микроскопия

Метод интерференционной микроскопии основан на принципе измерения фаз, являющихся нормированными величинами, определяемыми оптическими параметрами объекта. Регистрация фазовых изображений осуществляется с помощью метода фазовых шагов при контроле поляризации [3]. Разность фаз объекта, вычисляемая методом фазовых шагов, схематично представлена следующим образом:

$$\begin{cases} I_0(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos(\Phi(x, y)) \\ I_1(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos(\Phi(x, y + kd)) \\ I_2(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos(\Phi(x, y + 2kd)) \\ I_3(x, y, t) = A(x, y) + B(x, y) \cos(\Phi(x, y + 3kd(t))) \end{cases}$$

Где $I_{0-3}(x, y)$ – распределение интенсивности излучения в поле зрения фотоприемника, k – волновое число, d – величина сдвига опорного зеркала.

Искомая величина разности фаз определяется с учетом распределения интенсивности в поле зрения фотоприемника:

$$\Phi(x, y) = \arctg \left[\frac{\sqrt{[(I_1 - I_2) + (I_0 - I_3(t_0))] \cdot [3(I_1 - I_2) - (I_0 - I_3(t_0))]} }{I_1 + I_2 - I_0 - I_3(t_0)} \right]$$

Где $I_3(t_0)$ – мгновенное значение интенсивности, определяемое временем экспозиции фотоприемника.

Интерференционные изображения кадра размером 1280x1024 пикселей включают 3 кадра в секунду и размером 128x128 пикселей до 250 кадров в секунду. При таком варианте подсчета фазовых шагов в фазовых изображениях достигается пространственное сверхразрешение [6], что дает дополнительную информацию по сравнению к классическим изображениям, полученной световой микроскопией. Преимущества измерения фазовых шагов с использованием интерференционной микроскопии можно наглядно продемонстрировать рисунком 1.

На рисунке 1 представлена интерпретация измерения фазовых шагов с учетом отдельных пикселей.

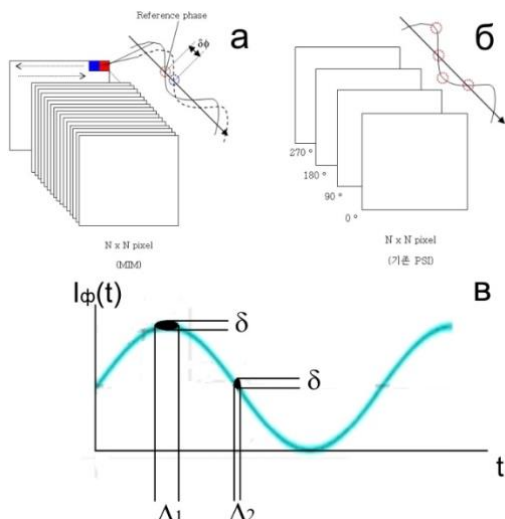


Рисунок 1 – Измерение фазовых шагов с использованием интерференционной микроскопии

На рисунке 1 (а) сплошной линией показана интерферограмма, полученная для пикселя, выделенного красным цветом с координатами (1,1). Интерферограмма в данном случае представляет временную зависимость значения интенсивности излучения в поле зрения одного пикселя фотоприемника и отражает последовательность однопиксельных фрагментов тысячи 1024x1024 пиксельных интерферограмм. Далее, как показано на рисунке 1(а) пунктирной линией, получают зависимость интенсивности излучения для соседнего (синего) пикселя с координатами (1, 2) и рассчитывают для этого участка значение фазы, используя соотношение $\delta\phi = \phi(1,2) - \phi(1,1)$. Повторение данной последовательности для всех пикселей позволяет получить полное фазовое изображение объекта. При этом высокое пространственное разрешение микроскопа определяется уменьшением фазовых шагов (рисунок 1а, 1б), тогда как при увеличении фазовых шагов доверительный интервал от Δ_1 до Δ_2 значения фазы в разных точках синусоиды рассчитывается довольно грубо (рисунок 1в). В результате построения интерферограмм разрешение интерференционной микроскопии достигает 0,1 нм по вертикали и 15 - 100 нм – в плоскости объекта.

Оптическая схема лазерного канала представляет собой модификацию интерферометра Маха-Цандера основанную на независимом управлении поляризацией в объектном и опорном плечах интерферометра.

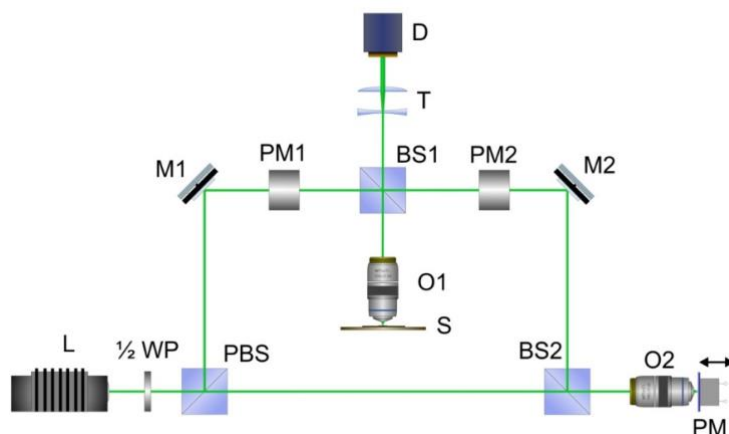


Рисунок 2 – Оптическая схема лазерного канала интерференционного микроскопа.

Как представлено на рисунке 2 лазерный луч от лазера (L) разделяется на два на поляризирующем светоделителе PBS. Один луч (объективный) фокусируется объективом O1 на объекте, который размещается на столике S, и отражаясь от зеркальной подложки через светоделитель BS1 и телескопическую систему T попадает на фотоприемник D – камеру Silicon Imaging модель SI – 128of. Другой луч (опорный) через объект не проходит, фокусируется объективом O2 и отражается от зеркала пьезопреобразователя (PM) и так же попадает в фотоприемник, где происходит интерференция лучей и формируется фазовое изображение. При построении фазового изображения сигнал нормируется по длине волны и определяется оптическая разность хода лучей, которая характеризует значение фазовой высоты объекта (Φ) в данной точке:

$$\Phi = \frac{(\varphi_0 - \varphi_{obj}) \lambda}{2\pi} - \Phi_0$$

Где φ_0 – начальная фаза, φ_{obj} – сдвиг фазы объектом, λ – длина волны излучения, Φ_0 – постоянный сдвиг, определяется выбором начальной точки отсчета фазы.

3D изображения формируются путем регистрации фазовой высоты (Φ) во всех точках объекта. Обработка полученных данных проводится с использованием среды LabView. Получение и обработка динамических фазовых изображений проводится в программе Airyscan V.6. Пользовательский интерфейс программы Airyscan V.6 состоит из двух частей: панель параметров определяющих корректную работу программы (левая часть) и правой части с основными элементами Tab Control, позволяющими отобразить фазовых изображений (рисунок 3).

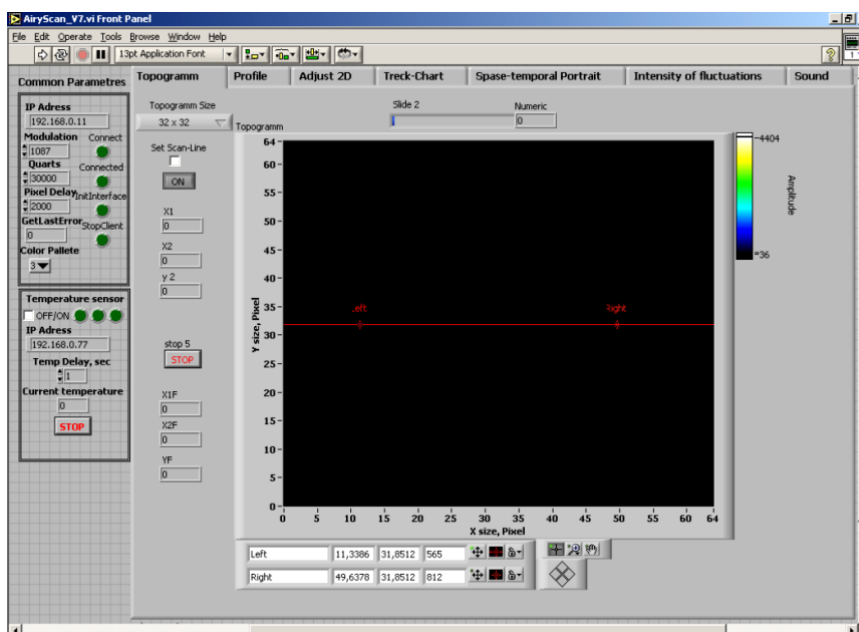


Рисунок 3 – Интерфейс программы Airyscan

Для воспроизведения 3D изображений используется программа TorozD. Программа последовательно воспроизводит серию статических фазовых изображений и отображает 3D изображение с возможным сечением фазовых изображений.

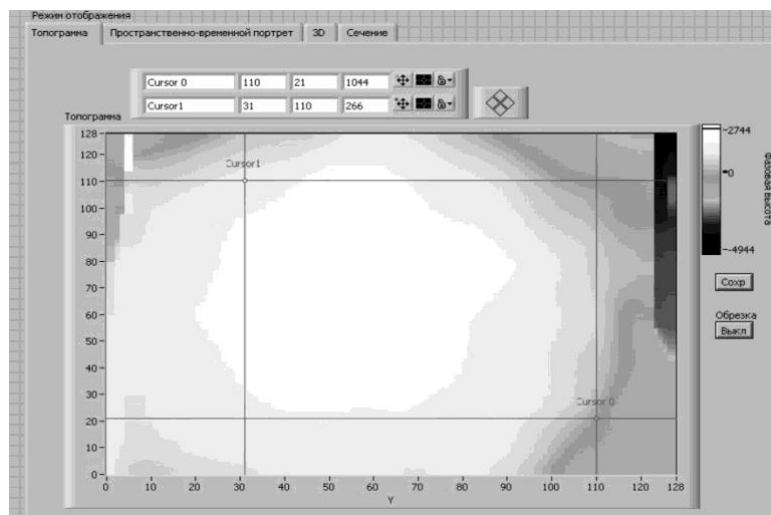


Рисунок 4 – Интерфейс программы Торос3D

Режимы воспроизведения включает страницу воспроизведения фазовых изображений с возможностью обрезки изображений при помощи двух курсоров, задающих область обрезки, что позволяет сохранить размерность обрезанных изображений.

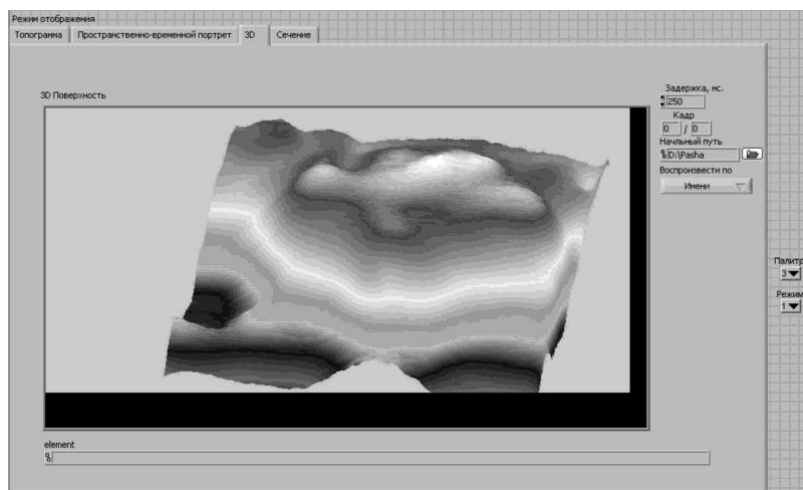


Рисунок 5 – Окно 3D режима фазовых изображений.

3. Объект исследования

В соответствии с целью исследования методом интерференционной микроскопии с дальнейшей 3D реконструкцией был проведен анализ нейтрофилов и эритроцитов при действии технологического стресса. В качестве объекта были изучены 30 клинически здоровых высокопродуктивных коров чёрно-пёстрой породы. Выбор объекта исследования продиктован стратегической задачей современного животноводства, связанной с уменьшением потерь наносимых технологическим стрессом, который вызывает более высокую восприимчивость животных к патогенам и снижение продуктивности животных. Технологическим стрессом для животных являлось совокупность факторов: перегруппировка, смена обслуживающего персонала, проведение ветеринарно-санитарных манипуляций. Во время исследования у всех подопытных животных забор крови осуществлялся до технологического стресса и после действия совокупности факторов, вызывающих технологический стресс.

Эритроциты исследовали в цельной крови. Нейтрофилы выделяли стандартным методом на двойном градиенте плотности (1,077 и 1,093). Клетки отмывали центрифугированием в растворе Хенкса. Надосадок сливали, нейтрофилы разводили раствором Хенкса до концентрации 2×10^6 .

Прижизненную оценку морфофункционального состояния клеток проводили методом компьютерной фазовой морфометрии на базе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа МИМ-340 (Россия, Екатеринбург) [7].

Дополнительно исследовали лейкоциты и эритроциты в мазках, окрашенных по Романовскому – Гимза. Исследование морфологии лейкоцитов и эритроцитов проводили на световом микроскопе Микромед С-11 (Россия) с программой МЕКОС-Ц.

4. Визуализация клеток крови методом интерференционной микроскопии

Проведение интерференционной микроскопии нейтрофилов у интактных животных, не подвергшихся действию технологического стресса, позволяет выделить две наиболее выраженные популяции клеток (рис. 6).

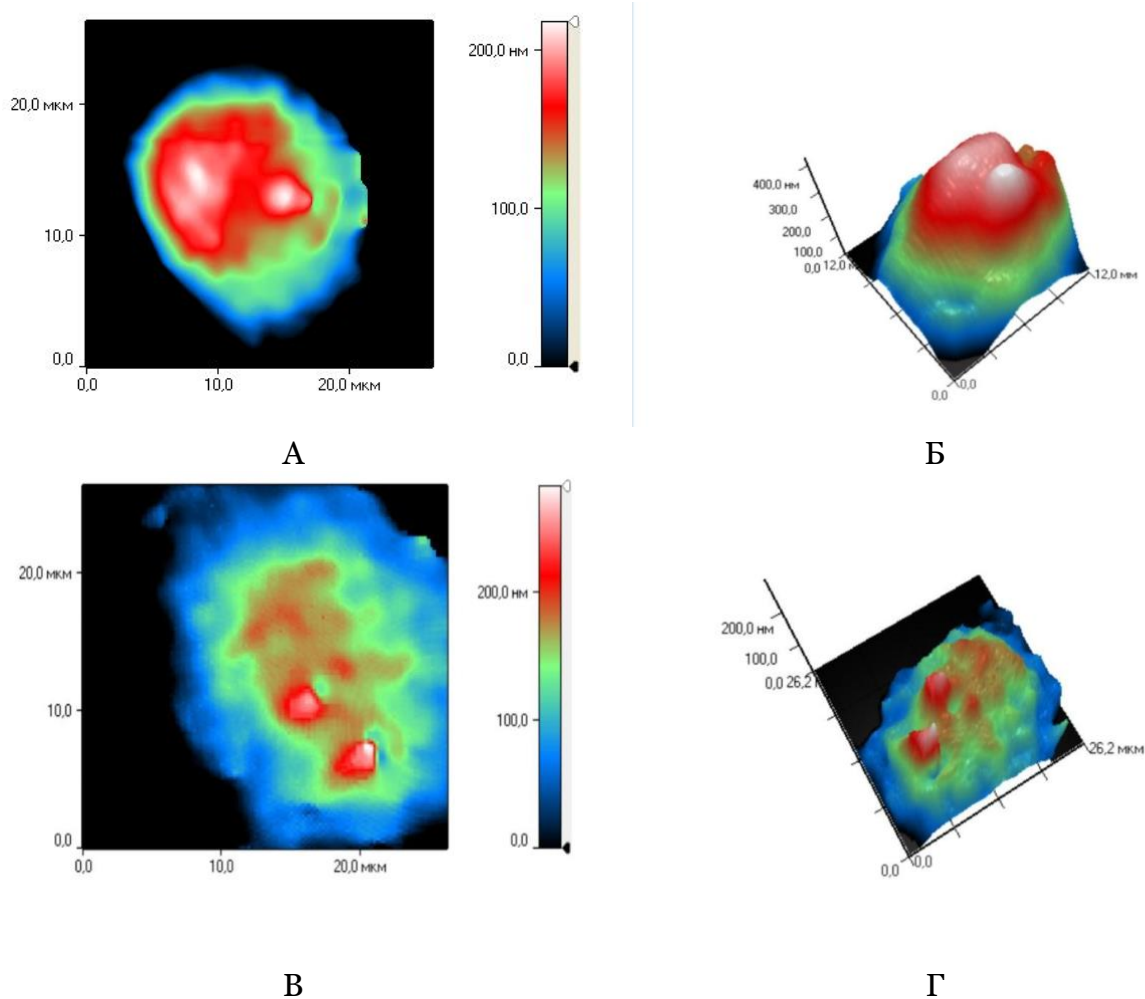


Рисунок 6 – Различные морфологические типы нейтрофилов. Фазовое изображение (топограмма) (А) и 3D реконструкция клеточного образа (Б) I морфологического типа. Фазовое изображение (топограмма) (В) и 3D реконструкция клеточного образа (Г) II морфологического типа.

Первая популяция нейтрофилов представлена I-м морфологическим типом клеток [8]: 3D реконструкция клеточного образа наглядно демонстрирует, что это клетки округлой формы с четко выделенным ядром и равномерным распределением внутриклеточного содержимого (рисунок 6 А, Б). 3D реконструкции второй популяции клеток отображает неровную поверхность с большим количеством выпуклостей и

впадин. Это связано с пространственным перераспределением цитоплазмы, внутриклеточных органелл и ядра. Это – II морфологический тип (рисунок 6 В, Г).

Подсчет I и II морфологического типов клеток показал, что при технологическом стрессе в 3 раза уменьшается I морфологический тип и в 2 раза увеличивается II морфологический тип нейтрофилов.

Проведение анализа морфологии эритроцитов интерференционной лазерной микроскопией выявил, что до технологического стресса эритроциты характеризовались нормальной двояковогнутой формой клеток (рисунок 7 А, Б). Технологический стресс вызывал изменение формы эритроцитов. 3D реконструкция клеточных образов позволила выявить шипы, гребни и выступы на поверхности клеток (рисунок 7 В, Г).

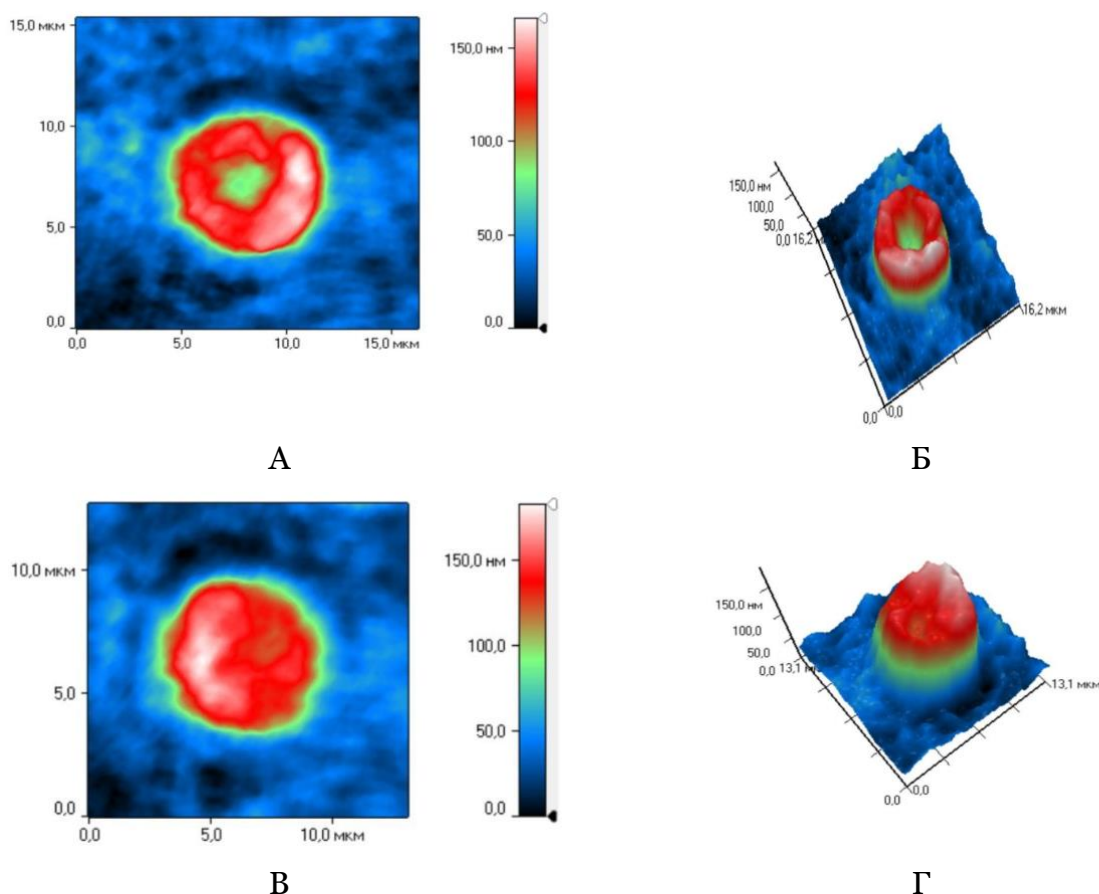


Рисунок 7 – Различные морфологические формы эритроцитов. Фазовое изображение (топограмма) (А) и 3D реконструкция клеточных образов (Б) эритроцитов до технологического стресса. Фазовое изображение (топограмма) (В) и 3D реконструкция клеточных образов (Г) эритроцитов после стресса.

Следует отметить, что в отличие от 3D реконструкции клеточных образов использование световой микроскопии не дает возможности определить изменение формы нейтрофилов и эритроцитов (рисунок 8). Все клетки имеют округлую форму.

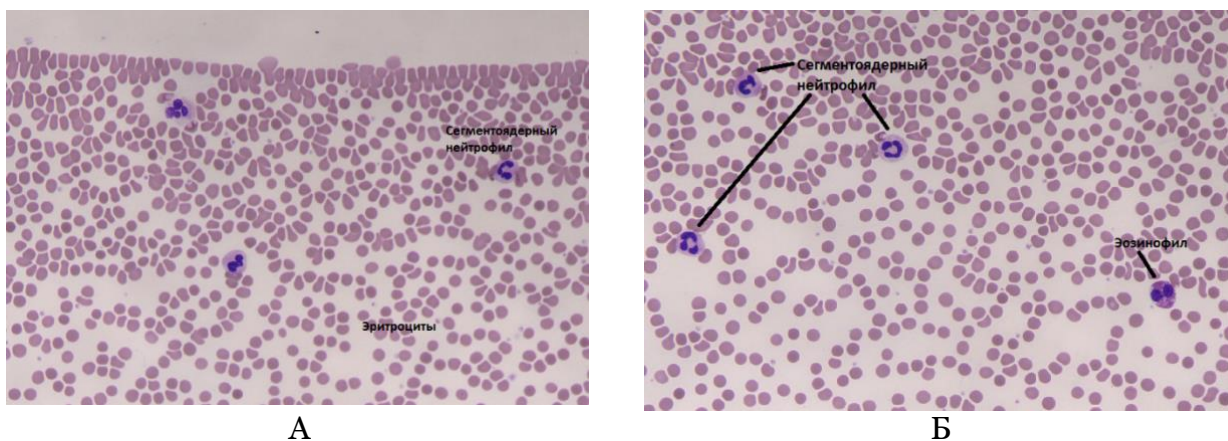


Рисунок 8 – Морфология клеток в световой микроскоп.
А – до стресса, Б – после стресса

На основе полученных результатов можно заключить, что реконструкция 3D изображений позволяет анализировать морфологию клеток и значительно дополняет данные световой микроскопии. Кроме того, визуализация является основой для анализа механизма стрессового воздействия.

Нейтрофилы рассматриваются как первый защитный клеточный барьер против инфекций, наиболее многочисленные фагоциты в организме человека, которые быстро мобилизуются из кровотока в инфекционный очаг или место повреждения [9]. Деформированность контуров клетки говорит о той или иной степени ее активности [10]. При этом, увеличение морфологически измененных эритроцитов имеет ключевое значение в выполнении их функций. Изменение морфологии эритроцитов отражается на кислородтранспортной функции крови [11], что приводит к нарушению кровоснабжения тканей [12].

Проведенное исследование раскрывает возможности применения лазерной интерференционной микроскопии для оценки морфологии клеток в нанометровом масштабе и позволяет выявить изменения клеточного звена неспецифической резистентности при ухудшении кислородтранспортной функции эритроцитов при технологическом стрессе.

5. Заключение

3D визуализация при использовании интерференционной микроскопии позволяет быстро определить и получить качественные и максимально информативные данные геометрических параметров клеток, которые при данном способе анализа не подвергаются дополнительной пробоподготовке перед исследованием (фиксации, окрашивании, обработке контрастирующими веществами), что сводит к минимуму возможность возникновения артефактов. Кроме того, компьютерные 3D изображения являются прижизненной визуализацией процессов, происходящих в клетках, которые можно получить в самые короткие сроки, что представляет собой важнейшее условие дальнейшего развития работ в области клеточной диагностики. С использованием компьютерных методов цитодиагностики в работе выявлены новые аспекты функциональной морфологии нейтрофилов и эритроцитов при стрессе, что может иметь фундаментальное значение для разработки новых методов экспресс-диагностики адаптационного резерва на клеточном уровне.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-26-00311.

Список источников

- [1] Lue N., Popescu G., Ikeda T., Dasari R., Badizadegan K., Feld M. Live cell refractometry using microfluidic devices // *Opt. Lett.*, 2006, 31(18), P. 2759-2761 doi: 10.1364/ol.31.002759
- [2] Park Y., Popescu G., Badizadegan K., Dasari R., Feld M. Diffraction phase and fluorescence microscopy // *Opt. Expr.*, 2006, 14(18), P.8263-8268. doi: 10.1364/oe.14.008263
- [3] Vishnyakov G.N., Levin G.G, Minaev V.L., Pickalov V.V., Likhachev A.V. Tomographic interference microscopy of living cells // *Microscopy and Analysis*, 2004, № 87, P. 19-23.
- [4] Загубиженко М. В., Юсипович А. И., Пирутин С. К., Минаев В. Л., Кудряшов Ю. Б.. Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для исследования состояния перитонеальных макрофагов мыши, облученных ультрафиолетовым светом // *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2011, Т. 51. № 6, С. 715.
- [5] Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Lodyanoy M.S., Samodelkin A.G. Alterations in the phase portrait and electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases // *Modern Technologies in Medicine*, 2019, Т. 11. № 2, С. 63-68. doi: 10.17691/stm2019.11.2.09.
- [6] Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T. V., Tikhonov A.N. Coherent phase microscopy in cell biology: visualization of metabolic states // *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, № 1708, P. 362-366. doi: 10.1016/j.bbabbio.2005.04.002
- [7] Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Белов А.А., Петров В.А. Диагностические возможности анализа эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии // *Клиническая лабораторная диагностика*, 2021, Т. 66, № 1. С. 22-25. doi: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-22-25
- [8] Василенко И.А., Никитин А.А., Малыченко Н.В., Иванюта И.А., Метелин В.Б., Агаджанян Б.Я. Цитометрия нейтрофилов в оценке эффективности комплексного лечения больных остеомиелитом нижней челюсти // *Альманах клинической медицины*, 2008, № 18, С. 63-68.
- [9] Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity // *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, № 11, P. 519-531. doi: 10.1038/nri3024
- [10] Тузлуков И.И. Особенности морфологии нейтрофильных лейкоцитов в послеродовом периоде // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*, 2004, №3-4, С. 113-117.
- [11] Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. Influence of microbes on neutrophil life and death // *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, № 7, P. 159. doi: 10.3389/fcimb.2017.00159
- [12] Емельянов В.В., Леонтьев Д.В., Ищенко А.В., Булавинцева Т.С., Саватеева Е.А., Данилова И.Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // *Биофизика*, 2016, Т. 61. № 5, С. 922-926.

Intravital Imaging of Blood Cells Under Stress to Assess the Organism Condition

A.V. Deryugina^{1,A}, M.N. Ivashchenko^{2,B}, P.S. Ignatiev^{3,C}, V.B. Metelin^{4,D},
M.N. Talamanova^{5,A}

^A National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russia

^B Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Nizhny Novgorod, Russia

^C Yalamov Ural Optical and Mechanical Plant Production Association,
Ekaterinburg, Russia

^D M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute, Moscow, Russia

¹ ORCID: 0000-0001-8812-8559, derugina69@yandex.ru

² ORCID: 0000-0001-6642-8518, marina.31@rambler.ru

³ ORCID: 0000-0001-5075-7034, ignasha2000@yandex.ru

⁴ ORCID: 0000-0003-0600-5729, verrv01@gmail.com

⁵ ORCID: 0000-0003-0512-6940, manjatal@ya.ru

Abstract

Biological specimens are the most difficult to study as almost exclusively light elements are considered, a little visibility yielded and structures are sparsely distinguishable. In addition cell structures are easily damaged on any stage of microscopic exploration. The optimal solution is to study their phase changes using laser interference microscopy. The method is based on the analysis of refractive index of intracellular medium of cells with subsequent computer analysis and processing of phase images followed by three-dimensional reconstruction of the object. The obtained images are digitally recorded, and any point of view can be introduced for viewing. This work uses laser interference microscopy followed by 3D reconstruction of cell images to study blood cells: neutrophils and erythrocytes by. 3D reconstruction of neutrophils have demonstrated changes of their functional activity under technological stress, while 3D reconstruction of erythrocytes revealed a violation of the normal discoidal cell shape. Interpretation of the obtained data indicates a restructuring of the cellular component of nonspecific resistance and deterioration of the oxygen transport function of erythrocytes under technological stress. Visualization of interference patterns of blood cells through 3D image processing allows obtaining a vital analysis of cells, the technique that is not available for other methods of microscopy, in particular light microscopy, which is traditionally used as a prognostic method of the state of the body. This direction represents the most important condition for further development of works in the field of cell diagnostics. The obtained results prove the applicability of 3D reconstruction of cell images for bioscanning of technological stress.

Keywords: laser interference microscopy, 3D image, blood cells, technological stress.

References

[1] Lue N., Popescu G., Ikeda T., Dasari R., Badizadegan K., Feld M. Live cell refractometry using microfluidic devices // *Opt. Lett.*, 2006, 31(18), P. 2759-2761 doi: 10.1364/ol.31.002759

[2] Park Y., Popescu G., Badizadegan K., Dasari R., Feld M. Diffraction phase and fluorescence microscopy // *Opt. Expr.* 2006, 14(18), P.8263-8268. doi: 10.1364/oe.14.008263

[3] Vishnyakov G.N., Levin G.G, Minaev V.L., Pickalov V.V., Likhachev A.V. Tomographic interference microscopy of living cells // *Microscopy and Analysis*, 2004, № 87, P. 19-23.

[4] Zagubizhenko M. V., Yusipovich A. I., Pirutin S. K., Minaev V. L., Kudryashov Yu. B. Use of laser interference microscopy to study the state of mouse peritoneal macrophages irradiated with ultraviolet light // *Radiation Biology. Radioecology*, 2011, V. 51. № 6, P. 715. [in Russian].

[5] Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Lodyanoy M.S., Samodelkin A.G. Alterations in the phase portrait and electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases // *Modern Technologies in Medicine*, 2019, T. 11. № 2, C. 63-68. doi: 10.17691/stm2019.11.2.09.

[6] Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T. V., Tikhonov A.N. Coherent phase microscopy in cell biology: visualization of metabolic states // *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, № 1708, P. 362-366. doi: 10.1016/j.bbabi.2005.04.002

[7] Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatyev P.S., Belov A.A., Petrov V.A. Diagnostics possibilities of erythrocytes analysis by the method of laser interference microscopy // *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2021, V. 66, № 1. P. 22-25. doi: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-22-25

[8] Vasilenko I.A., Nikitin A.A., Malichenko N.V., Ivanjuta I.A., Metelin V.B., Agadzhanyan B.J. Cytometry of neutrophils for evaluation of complex treatment efficiency in patients with mandibular osteomyelitis // *Clinical Medicine Almanac*, 2008, №.18, P. 63-68. [in Russian].

[9] Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutro-phils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity // *Nat. Rev. Immunol*, 2011, № 11, P. 519-531. doi: 10.1038/nri3024

[10] Tuzlukov I.I. Features of the morphology of neutrophilic leukocytes in the postpartum period // *Pavlov Russian Medical and Biological Bulletin*, 2004, № 3-4, P. 113-117. [in Russian].

[11] Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. Influence of microbes on neutrophil life and death // *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2017, № 7, P. 159. doi: 10.3389/fcimb.2017.00159

[12] Emelianov V.V., Leontev D.V., Ishchenko A.V., Bulavintseva T.S., Savateeva E.A., Danilova I.G.. Atomic force microscopy imaging of red blood cells and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and its correction with lipoic acid // *Biophysics*, 2016, V. 61. № 5, P. 922-926. [in Russian].