**УДК 535.417**

Применение внеосевой и низкокогерентной цифровой голографической микроскопии для анализа резистивности живых клеток к фотодинамическому воздействию

**Андрей Владимирович Белашов, Анна Александровна Жихорева, Татьяна Николаевна Беляева, Илья Константинович Литвинов, Анна Владимировна Салова, Ирина Владимировна Семенова, Елена Сергеевна Корнилова, Олег Святославович Васютинский**

**Аннотация**

В работе представлены результаты анализа эффективности фотодинамического воздействия (ФДВ) для инициации гибели живых клеток трех различных линий с помощью методов фазового имиджинга. Было проведено определение оптических и морфологических параметров клеток в различных состояниях с помощью традиционной внеосевой голографической микроскопии с использованием когерентного лазерного излучения, а также с помощью низкокогерентной голографии с использованием уравнения переноса интенсивности. Было установлено, что среди клеток линий HeLa, A549 и 3T3 наименее резистивными оказываются клетки линии HeLa, что проявляется в возможности инициации клеточной гибели при сравнительно низких дозах ФДВ.

**Ключевые слова**

Цифровая голографическая микроскопия, фотодинамическое воздействие, фазовое изображение

**Благодарности**

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект #21-72-10044.

Application of off-axis and low-coherent phase microscopy for analysis of cells resistance to photodynamic treatment

Andrey V. Belashov, Anna A. Zhikhoreva, Tatyana N. Belyaeva, Ilya K. Litvinov, Anna V. Salova, Irina V. Semenova, Elena S. Kornilova, Oleg S. Vasyutinskii

**Abstract**

We report an analysis of resistance of cells of three cell lines (HeLa, A549 and 3T3) to photodynamic treatment (PDTr) using two phase imaging approaches. Evaluation of optical and morphological parameters of cells at different states (e.g. live, necrotic, apoptotic) was performed using off-axis digital holographic microscopy with coherent probe laser radiation and using transport of intensity approach allowing for phase imaging using low-coherent light. It was shown that among the three cell lines HeLa cells are the least resistant to PDTr with Radachlorin photosensitizer.

**Keywords**

Digital holographic microscopy, photodynamic treatment, phase imaging

**Aknowledgements**

Financial support from Russian Science Foundation under the grant #21-72-10044 is gratefully acknowledged.

**Введение**

Исследование токсичности воздействия различных препаратов на живые клетки in vitro является одной из самых актуальных тем в современной цитологии. Традиционно для этих целей используются специальные флуоресцентные маркеры, позволяющие определять состояние живых клеток с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии. Однако существенным недостатком такого подхода является невозможность долговременного непрерывного мониторинга клеток без оказания на них негативного воздействия с помощью самих инструментов мониторинга. Методы же фазового имиджинга позволяют получать важную количественную информацию о морфологических и оптических параметрах клеток без введения в них дополнительных красителей и обеспечивают возможность мониторинга в течение длительного времени. В рамках данной работы мы представляем результаты анализа эффективности цитотоксического воздействия активных форм кислорода, генерируемых при фотодинамическом воздействии, на разные клеточные линии.

Используемые методы и подходы

Для детектирования состояния клеток были использованы два оптических метода, позволяющие восстановить фазовое распределение плоской волны, прошедшей через исследуемый объект: внеосевая цифровая голографическая микроскопия с использованием HeNe лазера в качестве источника зондирующего излучения [1] и уравнение переноса интенсивности (transport of intensity equation) [2], предполагающее регистрацию и дальнейший численный анализ двух изображений исследуемого объекта с небольшой дефокусировкой образца. В ходе работы было установлено, что оба указанных метода позволяют с приемлемой точностью оценивать морфологические параметры живых и фиксированных клеток, в то время как каждый из них обладает своими преимуществами и недостатками. С одной стороны метод внеосевой цифровой голографии позволяет произвести восстановление фазового изображения из единственной интерференционной картины с использованием двумерного Фурье преобразования, однако качество восстановленного фазового изображения может оказаться недостаточно высоким из-за присутствия когерентного шума, обусловленного высокой пространственной когерентностью используемого лазерного излучения. С другой стороны анализ двух дефокусированных изображений объекта с помощью уравнения переноса интенсивности позволяет получить более качественное фазовое изображение, хотя требование регистрации двух дефокусированных изображений несколько уменьшает временное разрешение этого подхода. Была проведена оптимизация этого метода и найдены оптимальные условия регистрации набора дефокусированных изображений клеток с помощью микроскопа Nikon-TI2. В ходе работы было установлено, что оба метода позволяют идентифицировать живые, некротические и апоптотические клетки в результате анализа их среднего фазового набега, сухой массы, объема, средней высоты и динамики изменения этих параметров после фотодинамического воздействия.

Результаты и заключение

В ходе экспериментального исследования изменения оптических и морфологических параметров клеток линий HeLa, A549 и 3T3 при различных дозах фотодинамического воздействия на клетки было установлено, что апоптоз, некроз и вторичный некроз клеток линии HeLa запускается при сравнительно низких дозах воздействия. В то же время для инициации гибели псевдонормальных клеток линии 3T3 требуется осуществлять генерацию активных форм кислорода в намного больших дозах. Оба метода фазового имиджинга свидетельствуют об увеличении среднего фазового набега при гибели клеток путем апоптоза, и уменьшении этой величины при запуске процесса некроза. При этом, несмотря на то, что когерентный шум заметно ухудшает качество восстановленного фазового изображения, его влияние на определение среднего фазового набега, объема и сухой массы клеток оказывается незначительным. С другой стороны, для более точного определения площади мембраны, индекса сферичности клеток некоторых других морфологических параметров предпочтительно использовать уравнение переноса интенсивности для минимизации когерентного шума.

**Литература**

[1] Belashov A. V. et al. Quantitative assessment of changes in cellular morphology at photodynamic treatment in vitro by means of digital holographic microscopy // Biomedical Optics Express. 2019. V. 10. N. 10. P. 4975-4986.

[2] Zuo C. et al. Transport of intensity equation: a tutorial // Optics and Lasers in Engineering. 2020. V. 135. P. 106187.