

УДК 577, 681.7

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ Т-ЛИМФОЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МЕТОДОМ КФМ

Тычинский В.П., д.т.н., проф. E-mail: vtych@yandex.ru

Кретушев А.В., к.т.н., доц. E-mail: kretushev@mail.ru

Вышенская Т.В., к.ф.-м.н., доц. E-mail: tvysh@yandex.ru

Звержховский В.Д., E-mail: wladzwer@mail.ru

Клемяшов И.В., E-mail: iv_klem@mail.ru

МГТУ МИРЭА, Москва, Россия

Аннотация Изменения морфологии Т-лимфоцитов при активации гелий-неоновым лазером регистрировались методом когерентной фазовой микроскопии. В «зонах» изображения, отличающихся по фазовой толщине, физические параметры (площадь, показатель преломления, фазовая толщина и объем) изменялись в процессе активации. Обсуждаются методические проблемы фазовой микроскопии и перспективы диагностики функционального состояния отдельной клетки.

Ключевые слова: фазовая микроскопия, активация лимфоцитов, диагностика функционального состояния клетки, секреция цитокинов.

CHANGES OF HUMAN T-LYMPHOCYTE STRUCTURE INDUCED BY HE-NE LASER RADIATION REGISTERED BY COHERENT PHASE MICROSCOPY

Tychinsky V.P., Dr.ofSci., proff., E-mail: vtych@yandex.ru

Kretushev A.V., Ph.D., E-mail: kretushev@mail.ru

Vyshenskaya T.V. Ph. D., E-mail: tvysh@yandex.ru

Zverzhkhovskiy V.D., E-mail: wladzwer@mail.ru

Klemyashov I.V., E-mail: iv_klem@mail.ru

MSTU MIREA, Moscow, Russia

Abstract Changes of T-lymphocytes under He-Ne laser radiations were registered by coherent phase microscopy. In zones of cell's phase image with different phase thickness physical parameters (square, refractive index, phase thickness and phase volume) changed in a process of activation with a He-Ne laser. Methodological problems of phase microscopy are discussed and possibilities for functional state diagnosis for a single cell.

Keywords: phase microscopy, lymphocyte activation, diagnostics of the functional state of the cell, cytokines secretion

Введение

Исследования функций, структуры и процессов в клетках имеют фундаментальное научное значение и практическое применение в медицинской диагностике [1-3]. Новые методы оптической микроскопии (SLIM, DHM, CPM, SIM, PALM, STORM, FRET, STED, TPLSM и др.), разработанные в последние годы, успешно используются в исследованиях живых клеток и происходящих в них процессов. Каждый из отмеченных новых методов обладает рядом специфических достоинств и мы здесь остановим

внимание на интерференционных методах (SLIM [4-7], DHM [8-10], CPM [11-15]), которые обладают важным уникальным свойством. В этих методах изображения клеток представлены в абсолютных, нормированных на длину волны значениях локальной фазовой толщины (quantitative phase imaging [4]). Эти методы обеспечивают также очень высокую чувствительность (единицы и доли нанометров). Методы SLIM, DHM и CPM отличаются техническими решениями [4-14], алгоритмами определения фазы и анализа изображений [4,5,7,10,12]. В качестве примера отметим (SLIM – spatial light interference microscopy) [4]. Его отличительной чертой является совмещение в одном приборе методов фазового контраста, голографии, амплитудной и фазовой микроскопии для разделения вкладов показателя преломления и геометрической толщины.

Совмещение оптических путей интерферирующих лучей существенно снизило чувствительность к внешним акустическим воздействиям. Разработанный модуль может быть приставкой к обычному микроскопу. В качестве следующего примера отметим цифровой голографический микроскоп [8,9]. В нем для реконструкции фазового изображения используется голограмма, записанная в памяти компьютера. Фирма Lyncее рекламирует серию голографических микроскопов для применений в биологии и медицине. В когерентном фазовом микроскопе CPM [11-15] был реализован компенсационный метод измерения оптической разности хода в каждом пикселе изображения. Показана возможность значительного сверх разрешения в статических и динамических изображениях и регистрации в реальном времени динамических процессов [16,17]. В работах [4-15] отмечалась также возможность использования достижений в области интерференционной микроскопии для разработки новых методов медицинской диагностики

Объектом наших исследований в этой работе были лимфоциты человека. Они выполняют основную функцию защиты организма от патогенов [1-3]. Принятые рецепторами лимфоцитов «сигналы» регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, их функциональную активность и переход в апоптоз [1-3]. Изучение взаимодействия рецепторов лимфоцитов с антигенами производится в основном биохимическими методами.

Интерес к исследованиям лимфоцитов объясняется также тем, что они являются хорошим объектом для исследования действия внешних факторов на органеллы клетки и, в частности, на процессы, сопровождающие секрецию цитокинов [1-3]. В последние годы заметно возрос интерес также к оптическим методам изучения внутриклеточной

динамики. В одном из последних обзоров [18] приведен обстоятельный анализ работ по активации лимфоцитов, в которых успешно использовались новые оптические методы. Тем не менее, в обзоре [18] и в других известных нам работах по активации отсутствуют сведения о физических параметрах органелл лимфоцитов. Нет также сведений о регистрации секреции цитокинов оптическими методами в реальном времени.

Для активации лимфоцитов мы использовали действие лазерного излучения. Его фотобиологическое действие было обстоятельно исследовано Т. Кару [19-24] и в [25]. В настоящей работе мы показываем возможность определения физических параметров органелл отдельных Т-лимфоцитов и регистрации пространственно-временных изменений их морфологии методом Когерентной Фазовой Микроскопии (КФМ) [11-14].

Наша методика основана на предположении, что внутриклеточные процессы различной природы влияют на морфологию клетки и, благодаря высокой чувствительности, методы интерференционной микроскопии позволяют регистрировать эти изменения. С другой стороны, информативность изображений, полученных новыми оптическими методами, зависит от адекватности экспериментальной техники, от эффективности алгоритмов анализа изображений и возможности корректной биофизической интерпретации. Естественно, что решение перечисленных задач в рамках одной небольшой заметки невозможно. Поэтому основной целью статьи является привлечь внимание к новым аспектам исследования активации лимфоцитов.

Материалы и методы

Измерения производились на разработанном в МИРЭА когерентном фазовом микроскопе (КФМ) «Эйрискан». Его описание приведено в [11-14] и мы здесь кратко остановимся на его основных параметрах. Микроскоп обеспечивал пространственное разрешение до 50 нм и временное до 1 мс [17,13]. В качестве источника освещения использовался гелий-неоновый лазер ($\lambda = 633$ нм, 1 мВт). Особенность КФМ «Эйрискан» состоит в компенсационном методе измерения оптической разности хода (ОРХ) в долях длины волны последовательно в каждом пикселе изображения. Ограниченная шумами чувствительность к изменениям ОРХ была около 1 нм. Оптическая схема микроскопа «Эйрискан» приведена на Рис. 1а. В данном случае, по-видимому, параметры интерференционного микроскопа не имели решающего влияния на результаты.

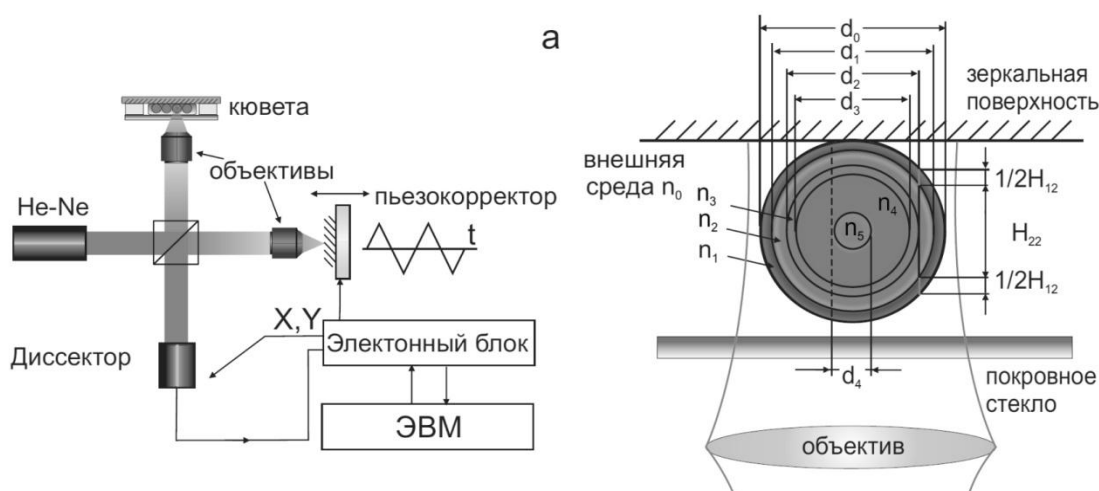


Рис. 1. Когерентная фазовая микроскопия

а. Оптическая схема микроскопа «Эйрискан». В качестве источника излучения использовался гелий-неоновый лазер. Измерения фазы производились компенсационным методом последовательно в каждой точке изображения.

б. Органеллы оптически неоднородной клетки условно представлены сферическими слоями с различным показателем преломления n_i , отличающимся от n_0 окружающей среды. Слои в поперечном сечении клетки показаны окружностями с диаметрами d_i . ОРХ в проекции j -й точки зависит от показателя преломления и геометрической толщины j -го слоя H_{ij} .

Суспензия Т-лимфоцитов в среде 199, выделенная из крови здорового донора по методу, описанному в [15], была предоставлена сотрудниками лаборатории проф. И.А. Василенко (МОНИКИ им.М.Ф. Владимирского). Перед началом измерений суспензию клеток помещали в термостат и выдерживали в течение 1 ч при 37^0 С. На полированную кремниевую подложку наносили каплю суспензии и помещали на предметный стол микроскопа. Спейсер (толщина ≈ 15 мкм) между кремниевой подложкой и покрывным стеклом препятствовал деформации клеток.

Для контролируемого облучения Т-лимфоцитов в процессе их активации мы использовали гелий-неоновый лазер, с помощью которого производились в микроскопе измерения. Контроль дозы и времени начала процесса активации имели решающее значение в связи с быстрым, порядка единиц и десятка минут, откликом на действие излучения. Измерения образца проводили в течение 30 мин с использованием предохранительной шторки для контроля дозы и для предотвращения избыточного облучения клетки лазером.

В нашем случае интенсивность облучения была на 2-3 порядка выше, чем в работах [19-24] и поэтому характерные для активации изменения параметров клетки в фазовых изображениях наблюдались, как правило, уже в течение первых 5-15 минут. Регистрация фазовых изображений производилась с интервалом 1-2 мин. Этого было

вполне достаточно для обнаружения в морфологии клетки характерных изменений. Положение клетки в измерительной камере схематически показано на Рис 1б. Предполагалось (см. ниже), что клетка оптически неоднородна и ее органеллы могут быть представлены в виде сферических слоев различного диаметра.

Результаты измерений

Клетка еще до начала измерений ($t = 0$) во время подготовки облучалась в течение 3-4 минут. Она показана в виде 3Д-изображения, профилей фазовой толщины $h(x)$, $h(y)$ и топограммы $h(x,y)$ на Рис. 2 в момент времени $t = 0$. Регистрация серии фазовых изображений (топограмм) одного Т-лимфоцита производилась обычно в течение 20-30 мин. В профиле $h(x)$ на Рис. 2б, полученном диаметральной сечением 3-Д изображения, отмечены точки (h_i) с характерным изменением крутизны. Проекции этих точек (см. Рис. 2в) образуют в топограмме замкнутые контуры $h_i(x,y) = \text{const}$, условно представленные окружностями диаметра d_i .

Кольца, ограниченные окружностями с диаметрами d_i и d_{i+1} , мы обозначаем термином «зоны», а контуры $h_i(x,y) = \text{const}$ и эквивалентные им окружности называем границами «зон». Значения параметров, например, фазовой толщины (h_i), диаметра (d_i), площади (S_i) и фазового объема (W_i), на границах и на площадях «зон» (колец) используются нами в дальнейшем в качестве параметров, характеризующих морфологию клетки.

График зависимости $S(h)$ площади 3Д-изображения в его сечении плоскостью $h(x,y) = \text{const}$, характерный для не активированного Т-лимфоцита, показан на Рис. 2г. Значения фазовой толщины h_i и площади S_i определялись по пересечению касательных. Аналогичные точки отмечены на графике зависимости $W(h)$ фазового объема на Рис. 2д. Алгоритмы определения характерных точек (h_i), проблемы интерпретации значимых параметров (h_i , S_i , W_i и др.) и другие важные, но далеко не очевидные аспекты фазовой микроскопии клеток частично рассматривались ранее [11-16] и будут обсуждаться позже.

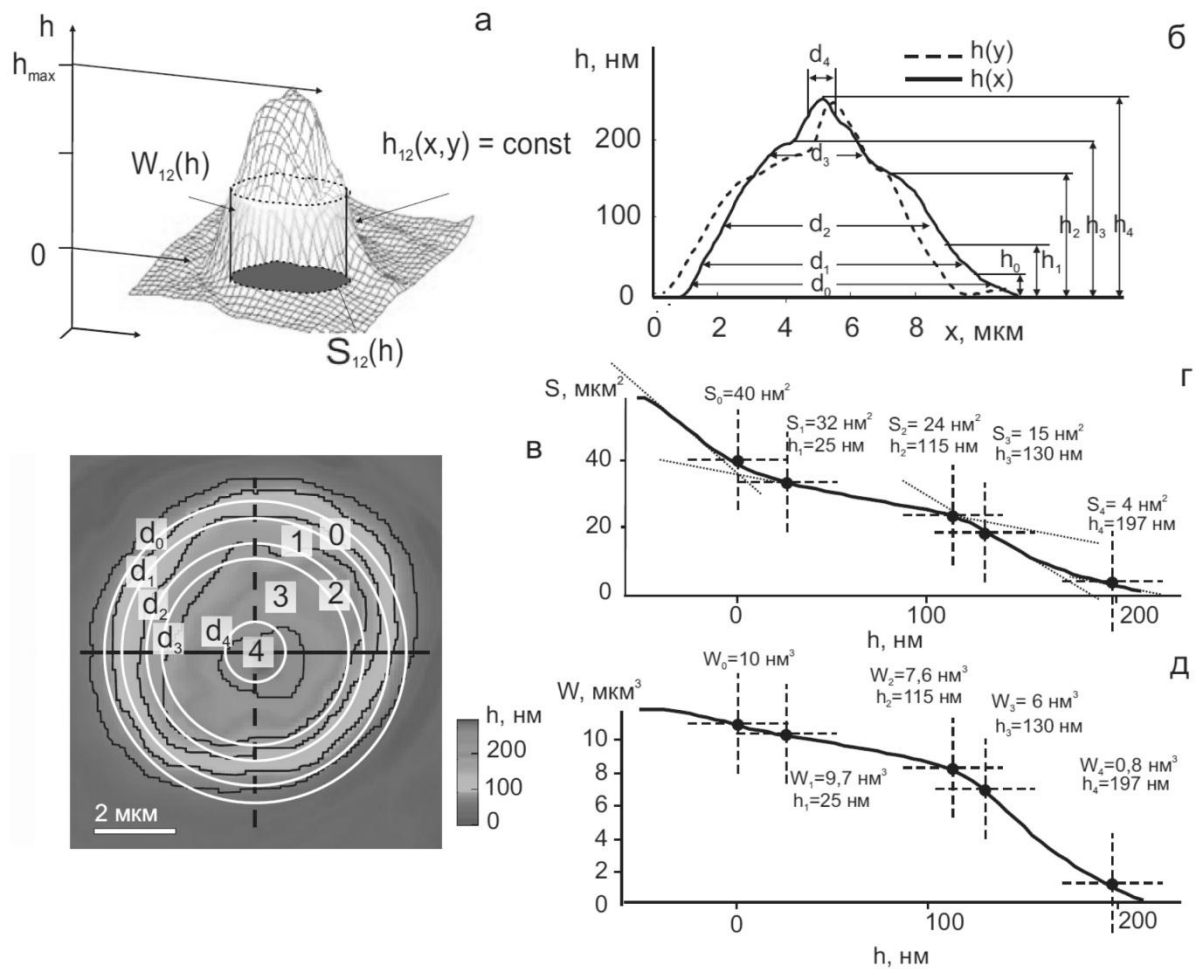


Рис. 2 «Зоны» и характерные точки в фазовом изображении Т-лимфоцита
 а – 3D изображение с площадью $S(h_i)$ в сечении горизонтальной плоскостью $h_i(x,y) = \text{const}$ и фазовым объемом $W(h_i)$ фрагмента, ограниченного значениями h_i и h_{max} .

б - Профили фазовой толщины $h(x)$, $h(y)$ в диаметральных сечениях 3Д изображения с обозначением характерных точек (h_i, d_i) границ «зон».

в - Фазовое изображение клетки (топограмма) представляет собой распределение оптической разности хода $h(x,y)$ в ее проекции. Контурами $h_i(x,y) = \text{const}$ и условно окружностями различных диаметров (d_i) на топограмме представлены границы «зон», которые разделяют участки с различной фазовой толщиной. «Зоны» обозначены номерами 0-4. Показана возможность отождествления «зон» с органеллами Т-лимфоцита. В центре видно оптически более плотное ядро.

г - Границы «зон» (h_i) определялись по характерным точкам пересечения касательных на участках изменения крутизны на графике функции $S(h)$ - зависимости площади от фазовой толщины.

д - Характерные точки на графиках функций фазового объема $W(h_i)$ и площади $S(h_i)$ по

Динамика изменений во времени фазовой толщины $h_i(t)$ на границах «зон» показана на Рис. 3а. Видно, что уже в первые минуты ($t = 5-10$ мин) на границах «зон» происходило увеличение значений h_0 , h_2 и h_3 . Несколько позже ($t \geq 10$ мин) начинался рост h_1 и заметно снижались значения h_0 и h_3 . Фазовая толщина клетки (h_0) в интервале $\Delta t = 9-18$ мин уменьшилась в два раза. Несколько меньше в за это время изменились

значения толщин h_2 и h_3 . Облучение повлияло также на другие параметры морфологии. Площадь всей клетки (S_0) (см. Рис. 3б) начала расти уже при $t \geq 5$ мин, удвоилась при $t = 18$ мин и затем ко времени $t \approx 25$ мин быстро уменьшилась до ≈ 35 $\mu\text{м}^2$. Площадь на границе третьей «зоны» ($S_3 \approx 10-15$ $\mu\text{м}^2$) за 25 мин почти не изменилась. Общий фазовый объем клетки (W_0), как следует из Рис. 3в, также изменился мало. Но фазовый объем W_3 на границе третьей «зоны» за 20 минут снизился в пять раз. Хорошо виден также рост разности фазовых объемов $\Delta W_{01} = W_0 - W_1$ и $\Delta W_{02} = W_0 - W_2$ в интервале $\Delta t = 10-23$ мин.

Параметры одной клетки в биологии принято считать недостаточно репрезентативными. Поэтому мы произвели измерения в одинаковых условиях нескольких клеток. Вариабельность основных параметров на границах «зон», определенную в двух интервалах времени $t_1 \approx 1-3$ мин и $t_2 \approx 17-23$ мин по результатам измерений 5 клеток, мы использовали для оценки воспроизводимости измерений и определения состояния Т-лимфоцита. Эти значения приведены соответственно в Таблицах 1 и 2. Там же указаны эквивалентные диаметры (d_i) границ «зон» и значения рефрактерности (Δn_{0i}). В дальнейшем для совокупности параметров в Таблице мы будем использовать термин «фазовый портрет». Биофизическая интерпретация результатов измерений производилась по параметрам «фазовых портретов» и графиков на Рис. 3.

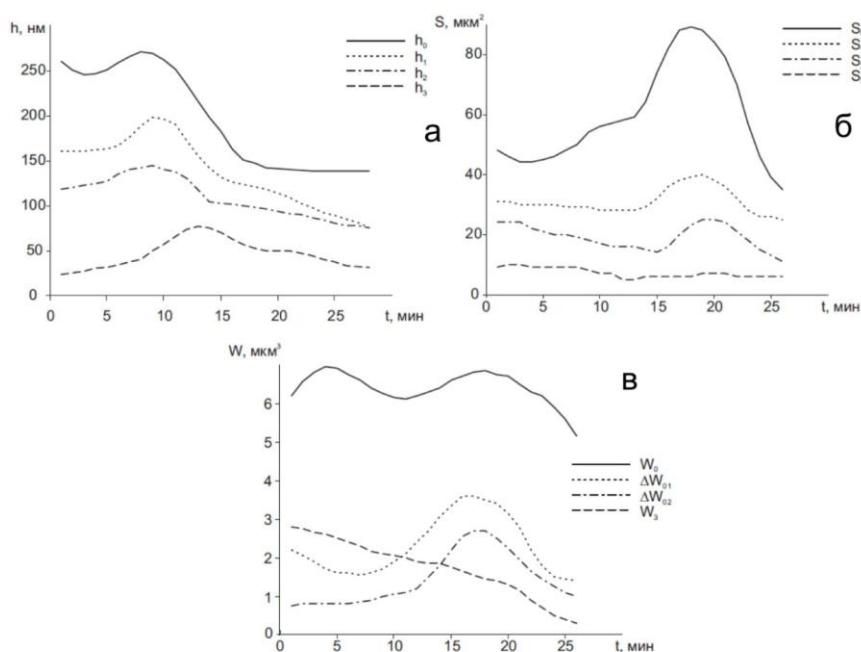


Рис. 3. Динамика изменения основных параметров морфологии при активации Т-лимфоцита излучением лазера.

а - Фазовая толщина h_0 , h_2 и h_3 в первые минуты ($\Delta t = 5-10$ мин) возростала. В интервале $\Delta t = 9-18$ мин фазовая толщина клетки (h_0) уменьшилась в два раза. Несколько меньше изменились значения толщин h_2 и h_3 .

б - Площадь всей клетки (S_0) удвоилась при $t = 18$ мин и затем начала снижаться до 35 мкм^2 .

в - В фазовом объеме наиболее заметные изменения видны на границе 3-й «зоны» - W_3 снизился в пять раз. В интервале $\Delta t = 10-23$ мин заметен рост разности фазовых объемов $\Delta W_{01} = W_0 - W_1$ и $\Delta W_{02} = W_0 - W_2$.

Таблица 1. «Фазовый портрет» не активированного Т-лимфоцита ($t_1 = 1-3$ мин)

Параметр	Граница 0	Граница 1	Граница 2	Граница 3	Граница 4	Граница 5
h_i , [мкм]	0	0,025-0,04	0,12-0,14	0,16-0,18	0,2-0,25	0,25-0,3
d_i , [мкм]	7,2-8	6,2-6,7	5,6-6	3,8-4,4	1,2-2	-
S_i , [мкм ²]	45-55	35-40	25-30	12-15	2-4	-
W_i , [мкм ³]	10-15	7-8	4-5	2-3	1,5-2	-
Δn_{0i}	0,005-0,01	0,025-0,03	0,04-0,05	0,04-0,05	0,05-0,55	-

Таблица 2. «Фазовый портрет» активированного Т-лимфоцита ($t_2 = 17-23$ мин)

Параметр	Граница 0	Граница 1	Граница 2	Граница 3	Граница 4	Граница 5
h_i , [мкм]	0	0,06-0,07	0,1-0,12	0,13-0,15	-	-
d_i , [мкм]	10,7-10,2	7,2-7,5	5-6	-	-	-
S_i , [мкм ²]	85-110	40-50	20-25	-	-	-
W_i , [мкм ³]	11-16	7-10	5-6	-	-	-
Δn_{0i}	0,015-0,02	0,025-0,03	0,025-0,03	-	-	-

Из сравнения параметров в таблицах видно, что наиболее заметные изменения при активации произошли в максимальных значениях фазовой толщины (h_0), в диаметрах (d_0) и в площади S_0 . Кроме того, из графиков функций $S(t)$ и $W(t)$ на Рис. 3 видно также, что в интервале $t_2 \approx 17-23$ мин произошло снижение контраста. Границы 3-й и 4-й «зон» оказались неразличимы и поэтому их параметры отсутствуют в Таблице 2. Мы это объясняем увеличением оптической однородности Т-лимфоцита, что может быть следствием изменения его органелл. Характерные изменения фазовой толщины, 3Д изображения и профиля в диаметральном сечении на различных фазах активации показаны на Рис. 4. Заслуживает особого внимания появление «протуберанца» в серии топограмм на Рис. 4а. Его размеры и заметно изменялись во времени. Изменение во времени формы, размеров «протуберанца» и фазовой толщины видно из продольных и поперечных его сечений на Рис. 4в и Рис. 4г. В структуре ядра при $t = 26$ мин стала более заметна структурная неоднородность.

Для проверки эффективности предложенной методики и подтверждения предложенной биофизической интерпретации изменений значимых параметров морфологии были произведены измерения в средах с предсказуемым действием на клетку. Измерения в среде с ФГА, активирующее действие которого хорошо известно, показали, что в интервале $t_2 \approx 17-20$ мин (см. Таблицу 3) основные параметры

«фазового портрета» почти не отличались от параметров активированного излучением лимфоцита (см. Таб. 2).

L149 -15; $t = 17$ мин $h_0 = 0,1-0,12$; $h_1 = 0,06-0,065$; $h_2 = 0,07-0,075$; $S_0 = 100$; $S_1 = 50-55$; $S_2 = 35-38$ мкм²; $W_0 = 9,5-11$; $W_1 = 6-7,5$; $W_2 = 4-5$; Для рефрактерности на границах «зон» были получены значения: $\Delta n_{01} = 0,015$; $\Delta n_{02} = \Delta n_{03} = 0,025$;

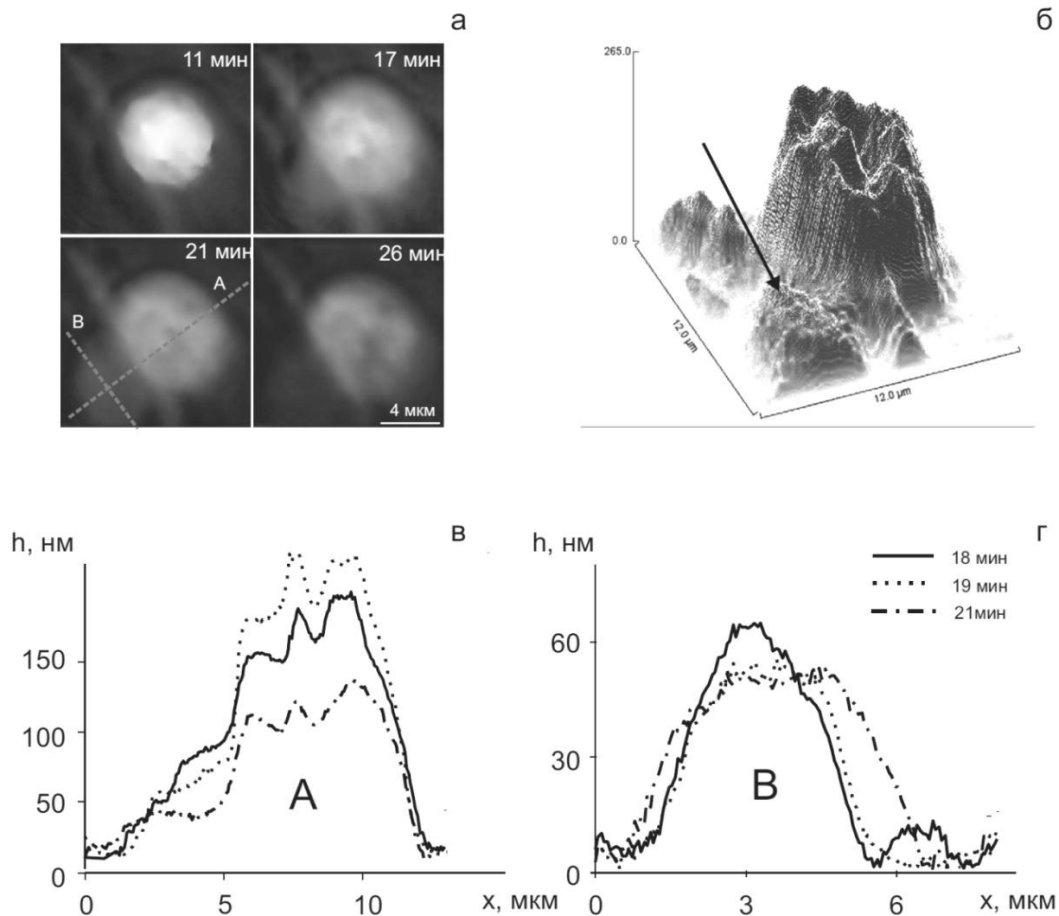


Рис. 4. Изменения морфологии Т-лимфоцита при его активации.

а - В топограммах видно появление «протуберанца» при $t \geq 17$ мин и изменение структуры ядра при $t \geq 26$ мин.

б - В 3Д изображении видна форма и размеры «протуберанца». В структуре ядра заметна грануляция хроматина.

в - Продольные сечения «протуберанца» и клетки изменяются во времени. Фазовая толщина «протуберанца» была максимальна при $t = 17$ мин. Видно снижение фазовой толщины клетки, изменение формы профиля и уменьшение контраста.

г - Ширина «протуберанца» в непосредственной близости к клетке мало изменялась во времени.

Таблица 3. «Фазовый портрет» ФГА-активированного Т-лимфоцита ($t = 17-20$ мин)

Параметр	Граница 0	Граница 1	Граница 2	Граница 3	Граница 4	Граница 5
h_i , [нм]	0	0,06-0,065	0,07-0,075	0,1-0,12	-	-
d_i , [мкм]	10,7-10,2	7,2-7,5	5-6	-	-	-
S_i , [мкм ²]	100-110	50-55	30-35	-	-	-
W_i , [мкм ³]	9,5-11	8	5-6	-	-	-
Δn_{0i}	0,015-0,02	0,025	0,025-0,03	0,025-0,03	-	-

Систематические исследования морфологии Т-лимфоцитов при более длительном ($t \geq 25$ мин) облучении не проводились. Тем не менее, из отдельных измерений следовал вывод, что при более длительном облучении, в интервале $25 \geq t \geq 50$ мин происходит разрушение ядра и другие изменения морфологии, характерные для апоптоза.

Обсуждение и выводы

В предлагаемой здесь интерпретации фазовых изображений Т-лимфоцита мы исходим из корректности оптической модели клетки, в которой ее органеллы схематически представлены в виде концентрических сферических слоев (см. Рис. 1б) и проецируются в виде «зон» на плоскость изображения. Нулевую «зону» на топограмме (см. Рис. 2а) и близкую к основанию часть профиля на Рис. 2а и 2б естественно отождествить с проекцией периферийной части цитоплазмы и мембранных рецепторов. Внешняя граница клетки на Рис. 2б и 2в, условно обозначенная диаметром d_0 , в реальных изображениях мало контрастна из-за рыхлого слоя рецепторов и отсутствия вблизи цитоплазматической мембраны оптически плотных структур в норме.

Заметим, что при активации Т-лимфоцита наблюдалось увеличение фазовой толщины и рефрактерности на внешней границе нулевой «зоны». Это вполне согласуется с известным перемещением части митохондрий в область синаптических контактов [28]. Для интерпретации следующей (первой) «зоны» следует учесть (см. Рис. 2б), что фазовая толщина увеличивается в направлении ядра. Причиной является дополнительный вклад структурных элементов первого слоя, ограниченного диаметрами d_1 и d_2 (см. Рис. 1б). Мы первый слой отождествляем с плотной частью цитоплазмы, включающей аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум.

По мере приближения к центру в фазовую толщину дают вклады следующих внутренних слоев. Соответственно, во вторую «зону» кроме нулевого и первого слоев дает дополнительный вклад прилегающий к ядру третий слой, ограниченный диаметрами d_2 и d_3 . Мы предполагаем, что в этом слое находится хондриом – разветвленная структура митохондрии [20]. Дополнительным основанием для этого, кроме литературных данных, являются результаты измерений активированных и дезэнергизованных ротеноном Т-лимфоцитов (данные не приводятся). Они показали значительное снижение фазовой толщины и рефрактерности во второй «зоне» в изображениях дезэнергизованных Т-лимфоцитов. Зависимость рефрактерности от энергизации была установлена при измерениях других клеток [12-14] и изолированных митохондрий [25]. Границу между второй и третьей «зонами» (диаметр d_3) мы

отождествляем с положением ядерной мембраны, а ограниченную диаметром d_4 четвертую «зону» - с ядрышком.

При активации Т-лимфоцита фазовая толщина и рефрактерность в третьей зоне снижались. Отсутствие ядрышка и снижение оптической плотности ядра естественно объясняется деконденсацией хроматина, по крайней мере, частичной. Это явление было обстоятельно исследовано и описано в работах Т. Кару [19,20]. По-видимому, увеличение оптической однородности Т-лимфоцита является следствием разрушения мембран, разделяющих клеточные структуры, и проявляется в снижении контраста на границах «зон». Приведенные выше аргументы показывают принципиальную возможность интерпретации «зон» в общепринятой терминологии и объяснить изменения параметров в Таблицах 1 и 2 активацией Т-лимфоцитов.

Согласно [20-23] процесс активации инициируется поглощением фотонов цитохром-С-оксидазой в хондриоме (гигантской митохондрии). За ним следуют синтез АТФ, ее преобразование в ГТФ (GTPase) и передача «сигналов» в ядро и в цитоплазму. Важная особенность активации излучением состоит в отсутствии избирательности, характерной для различных мембранных рецепторов. Это объясняется тем, что «сигнал» поступает от фото стимулированной митохондрии, а не от рецепторов на внешней мембране после контакта с антигеном. В наших условиях эта не критичность к подтипам Т-лимфоцитов проявлялась в малой вариабельности численных значений параметров в их «фазовых портретах».

После этих, достаточно общих замечаний, можно предложить более конкретную биофизическую интерпретацию приведенных на Рис. 3 и 4 результатов и параметров «фазовых портретов» в терминах биофизики клетки. До начала облучения и в первые ($t \leq 5$) минуты действия излучения Т-лимфоцит находился в состоянии G0. Характерные значения параметров его морфологии показаны в Таблице 1. В начальной фазе активации происходит кратковременный рост мембранного потенциала хондриома и увеличение скорости синтеза АТФ [26,27]. Согласно [27] максимальная скорость синтеза АТФ достигается через 15 мин после начала облучения. Мы с этим процессом связываем ростом мембранного потенциала [25], увеличение фазовой толщины до $h_3 \approx 200$ нм и оптической плотности хондриома при $t \approx 10$ мин на Рис. 3а. Последующее снижение фазовой толщины до $h_3 \approx 130$ нм и увеличение до $h_1 \approx 70$ нм фазовой толщины на границе с периферийной цитоплазмой, по нашему мнению, связано с разрушением хондриома и перемещением митохондрий на периферию в область синаптического контакта [28]. Увеличение фазового объема всей цитоплазмы (ΔW_{02}) и ее периферийной части (ΔW_{01}) согласуется с выводом об увеличении оптической

плотности цитоплазмы вследствие транспорта митохондрий в область синаптического контакта. Он обычно возникает при физическом контакте с клеткой-антигеном. В наших условиях, при отсутствии антигенов и интенсивном облучении этот «квази контакт» может возникнуть в произвольной точке физического контакта Т-лимфоцита с подложкой. Из топограммы, профиля фазовой толщины и Рис. 3а следует вывод, что основные органеллы клетки сохраняли характерные для состояния G0 параметры сравнительно недолго. Максимальная фазовая толщина ($h_0 \approx 285$ нм) клетки уже через 10-12 минут начала снижаться и стабилизировалась на низком ($h_0 \approx 150$ нм) уровне в интервале $\Delta t \approx 15-30$ минут.

Отметим, что при активации кроме общего снижения фазовой толщины наблюдалось также снижение контраста, и поэтому границы «зон» становились менее достоверными. Соответственно, в Таблице 2 отсутствуют параметры 3-й и 4-й «зон». Почти двукратное снижение до $h_3 \approx 130$ нм фазовой толщины ядра при сохранении его площади можно объяснить только уменьшением его оптической плотности (рефрактерности). Наши измерения показали двукратное снижение средней рефрактерности ядра при активации Т-лимфоцита. Фазовый объем ядра (W_3) (см. Рис. 3в) уже при $t \geq 6$ мин начал заметно уменьшаться, что согласуется с выводом о деконденсации хроматина. Это явление может быть следствием изменений в хроматине ядра. Деконденсация хроматина непосредственно наблюдалась в работе [19] по окраске акридином-оранжевым.

В графиках Рис. 3 и Таблицах 1 и 2 видна общая тенденция в изменениях параметров фазового изображения Т-лимфоцита при его активации: снижение фазовой толщины и контраста, исчезновение границ «зон» и увеличение поперечного размера клетки. Характерной чертой не активированных Т-лимфоцитов была более высокая рефрактерность хондриома и ядра. Отождествление начального состояния с фазой G0, короткой по длительности ($\Delta T \approx 8-10$ мин) активной фазы и последующего ($t \geq 15$ мин) за ней медленного снижения фазовой толщины с G1 находится в согласии с литературными данными. Из работ [22,23] следует, что при облучении не происходит переход в S-фазу. По-видимому, есть достаточно много признаков изменения формы Т-лимфоцита на последнем этапе активации. Кроме того известно, что действие излучения на Т-лимфоцит завершается апоптозом, а не бласт-трансформацией [23], как при ФГА-активации. Наблюдаемое изменение структуры ядра и монотонное снижение фазовой толщины в интервале $15 \geq t \geq 50$ мин, деэнергизация хондриома и фрагментации ядра являются характерными признаками апоптоза.

Снижение общей фазовой толщины h_0 сопровождалось (см. Рис 3б) заметным увеличением площади клетки, в основном, за счет площади нулевой «зоны» ($\Delta S_{01} = S_0 - S_1$). К ней мы отнесли периферийную часть цитоплазмы, для которой характерна малая фазовая толщина. Ее увеличение при активации естественно объяснить двумя факторами. Наиболее простое и естественное состоит в изменении формы клетки вследствие распластывания на подложке камеры [18]. Это также вполне согласуется со снижением фазовой толщины и предположением о сохранении геометрического объема клетки в процессе активации.

Другая интерпретация увеличения площади связана с вкладом в ΔS_{01} площади «протуберанца» (см. рис. 4а). Он появился на периферии клетки и его природа не известна. Одно из предположений состоит в связи «протуберанца» с секрецией цитокинов. Она является естественной функцией активированных Т-лимфоцитов и наблюдалась также при их облучении лазером [24]. Синтез цитокинов и других макромолекул начинается на рибосомах после перемещения мРНК в цитоплазму [24]. Продолжительность этих процессов не превышает десятка минут и, по-видимому, ограничена запасами субстрата и энергии ГТФ. Деэнергизация хондриома проявилась на графике Рис. 3а в снижении общей фазовой толщины клетки $h_0(t)$ и на границах хондриома $h_2(t)$ и ядра $h_3(t)$. Увеличение фазовой толщины периферийной части цитоплазмы ($h_1(t)$ при $t \geq 10$ мин) можно объяснить распадом хондриома и его трансформацией в малоразмерные митохондрии, которые переместились на периферию клетки [28].

Из литературы следует, что секреция цитокинов является одной из основных функций лимфоцитов и они из-за малых размеров недоступны наблюдению методами оптической микроскопии. Однако, сравнительно большие ($\approx 0,5-1$ мкм) гранулы с цитокинами хорошо различимы в области синаптических контактов во флуоресцентных изображениях Т-лимфоцитов [28]. Современными методами флуоресцентной микроскопии в принципе возможна регистрация отдельных макромолекул, но у нас нет сведений о наблюдении оптическими методами секреции цитокинов вне синаптических контактов. Мы ниже обсудим, есть ли косвенные признаки секреции цитокинов в фазовых изображениях активированных Т-лимфоцитов.

Области «протуберанца» с более высокой фазовой толщиной и рефрактерностью в непосредственной близости к периферии клетки видны в топограммах на Рис. 4а ($t \geq 17$ мин). Во многих случаях на периферии клетки вместо локального «протуберанца» появлялся сравнительно равномерный «ореол». Пространственная структура

«протуберанца» показана в 3Д изображении на Рис. 4б ($t = 21$ мин). В графиках $S_0(t)$ и $S_1(t)$ на Рис. 3б он проявлялся в увеличении площади нулевой «зоны» $\Delta S_{01} = S_0 - S_1$ интервале $\Delta t = 15-22$ мин. Из профилей фазовой толщины в продольном и поперечном сечениях на Рис. 4в и Рис. 4г видно изменение во времени его размеров, формы и фазовой толщины. Площадь при $t \approx 17$ мин достигала максимума $\Delta S_{01} \approx 45-50$ мкм² (см. Рис. 3б). Его средний показатель преломления был на 0,01-0,015 выше, чем у окружающей среды. Контраст «протуберанца» заметно убывал во времени: фазовая толщина снизилась в течение 3-х минут от 100 до 30 нм, поперечный размер соответственно увеличился. Грубая оценка его геометрического объема по размерам на Рис. 4 дает значение $V \approx 20-30$ мкм³, что на порядок меньше начального физического объема всей клетки ($V \approx 280-300$ мкм³). Аналогичные изменения площади $S_0(t)$ наблюдались при измерениях других Т-лимфоцитов (данные не приводятся). Их характерной чертой была малая ($\Delta t \approx 5-10$ мин) продолжительность и появление через $t \geq 10-12$ мин после начала облучения.

Природа «протуберанца» неизвестна, тем не менее, можно высказать ряд предположений. Наиболее естественное объяснение этого явления состоит в распластывании клетки, изменении формы и т. п. Согласно другому объяснению «протуберанец» (или «облако») представляют собой выброс клеткой каких-то макромолекул (частиц), например, цитокинов. Грубая оценка коэффициента диффузии дала значение $a = 2 \cdot 10^{-11}$ см²/с, что на несколько порядков меньше, чем для молекул воды. По-видимому, размеры частиц на один-два порядка больше, чем молекулы воды и этими частицами могут быть макромолекулы цитокинов. Литература по цитокинам огромна, однако, нам не известны факты регистрации оптическими методами цитокинов в реальном времени на отдельной клетке. Мы не исключаем, что цитокины могут быть «видимыми» в фазовых изображениях благодаря гидратной оболочке. Гидрофильные оболочки ионов в воде хорошо известны. Предположение об увеличении показателя преломления в «облаке» цитокинов не противоречит работам Поллака [32] и современным представлениям об оптических свойствах структурированной воды [33].

Ниже мы остановимся на ряде затронутых здесь вопросов, ответ на которые потребуют дополнительных исследований:

1. Т-лимфоциты составляют около 80% от выделенных из крови здоровых доноров мононуклеаров. Мы производили измерения на клетках диаметра ($d_0 \approx 7,5-8$ мкм) и с фазовой толщиной в интервале $h_0 \approx 250-300$ нм. Естественно, что при такой методике регистрировались изображения Т-лимфоцитов различных подтипов. Малую

вариабельность параметров в Таблицах 1 и 2 мы объясняем не критичностью активации Т-лимфоцитов излучением к рецепторам мембран. Из этого следует предварительный вывод, что, полученные в этой работе результаты имеют достаточно общее значение.

2. Концепция «зон», отождествление их с органеллами и численные значения физических параметров в «фазовых портретах» основаны на ряде далеко не очевидных предположений, которые следует проверить альтернативными методами. Тем не менее, независимо от корректности биофизической интерпретации конкретных результатов, следует обратить внимание на малую вариабельность приведенных в Таблицах 1 и 2 параметров, полученных при измерениях на небольшом числе клеток. Возможность характеризовать функциональное состояние отдельной клетки сравнительно большим числом параметров фазового изображения, которые измеряются с точностью, трудно достижимой традиционными методами, будет иметь важное методическое значение для биофизики клетки. Фундаментальное значение для исследования механизмов отклика в реальном времени клетки на действие внешних факторов будут иметь новые параметры фазового изображения.

3. Природа «протуберанца» и «ореола» неизвестна. У нас пока нет альтернативного цитокинам объяснения этого явления. Если будет показана возможность регистрации цитокинов в реальном времени, то это будет иметь фундаментальное и практическое значение.

В заключение кратко сформулируем основные результаты работы.

1. Показана принципиальная возможность регистрации в реальном времени отклика иммунокомпетентной клетки (Т-лимфоцита) на действие внешних факторов методом когерентной фазовой микроскопии.

2. Предложена интерпретация численным значениям параметров фазового изображения на границах «зон» в терминах современных биофизических представлений.

3. Показана связь между временными изменениями параметров фазового изображения и процессами в органеллах.

4. Подтвержден вывод об универсальности и неспецифичности отклика различных подтипов Т-лимфоцитов на действие лазерного излучения.

5. Показана реалистичность разработки новых экспресс методик иммунодиагностики на клеточном уровне, которые будут востребованы для решения проблем персонализированной медицины (аллергологии, трансплантологии и др.).

Список литературы

1. Хаитов Р.М., Иммунология, 2010, ГОЭТАР-Медиа, Москва.
2. Goldsby R.A., Kindt T.K., Osborne B.A., Kuby J., Immunology, 2003, San Francisco: W.H. Freeman.
3. Ярилин А.А., Основы иммунологии, 1999, Мед. Книга.
4. Wang Z., Millet L., Ding H., Unarunota S.i, Rogers J., Gillette M., Popescu G., Spatial light interference microscopy (SLIM), Optics Express, 2011, V19, N2, P1016.
5. Wang, Z. Millet L., Chan V., Ding H., Gillette M., Bashir R., Popescu G., Label-free intracellular transport measured by spatial light interference microscopy, J. of Biomed. Optics, 2011, V16, N2, P.26019.
6. Wang Z., Chun I. S., Li X., Ong Z. Y., Pop, Millet E, Gillette M., Popescu G., Topography and refractometry of nanostructures using spatial light interference microscopy, Optics Lett. ,2011, V.35, N.2, P.208.
7. Mir M., Tangella K., Popescu G., Blood testing at the single cell level using quantitative phase and amplitude microscopy, Biomed. Opt. Express, 2011, V.2, N.12, P.3259.
8. Rappaz B., Barbul A., Emery Y., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P., Marquet P., Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer, Cytometry 2008, Part A, 73A, P.895.
9. Rappaz B., Barbul A., Charriere F. Kuhn J., Marquet P., Korensyein R., Depeursinge C., Magistretti P., Erythrocyte volume and refractive index measurement with digital holographic microscope, Proc. SPIE V.6445, DOI 10.1117/12. 700463.
10. Rappaz B., Marquet P., Cuche E., Emery Y., Depeursinge C., Magistretti P., Measurements of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy, Opt. Express, 2005, V.13, N.23, P. 9361.
11. Tychinsky V.P., Tikhonov A.N., Interference Microscopy in Cell Biophysics. Principles and methodological aspects of Coherent Phase Microscopy, Cell Biochemistry and Biophysics, 2010, V.58, N.3, P.107.
12. Tychinsky V.P., Tikhonov A.N., Visualization of individual cells and energy-transducing organelles, Cell Biochemistry and Biophysics, 2010, V.58, N.3, P.117.
13. Tychinsky V. P., Dynamic phase microscopy: is a “dialog” with the cell possible? Pysics-Uspekhi 2007, V.50, N.5, P.513.
14. Tychinsky V. P., The metabolic component of cellular refractivity and its importance for optical cytometry, J. of Biophotonics, 2009, V.2, N.8-9, P.494.

15. Тычинский В.П., Вышенская Т.В., Терпигорев С.А., Василенко И.А., Метелин В.Б., Гаджиева З.Ш., Исследование активации лимфоцитов методом когерентной фазовой микроскопии в реальном времени, Вестник РАМН, 2011, Т. 11, С.28.
16. Tychinsky V.P., Super-resolution and singularities in phase images, *Physics-Uspekhi*, 2008, V. 51, N.11, P. 1161.
17. Tychinsky V.P., On super-resolution of phase objects, *Opt. Comm.*, 1989, V. 74, N.1-2, P.41.
18. Balagopalan L., Sherman E., Barr V., Samelson L., Imaging techniques for assaying lymphocyte activation in action, *Nature Rev. Immunology*, 2011, V.11, P.21.
19. Мантейфель В.М., Кару Т. Й., Снижение компактизации конденсированного хроматина в лимфоцитах человека под влиянием низкоинтенсивного излучения He-Ne лазера, Известия РАН, Серия биологическая, 2009, Т.6, С.654.
20. Manteifel V, Karu T, Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria, *J. Photochem. Photobiol. B/ Biology*, 1997, V.38, P.25.
21. Manteifel V.M., Karu T.I., Ultrastructural changes in human lymphocytes under He-Ne laser: radiation, *Laser Life Sci*, 1992, V.4, P.235.
22. Karu T.I., Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 1999, V.49, P.1.
23. Karu T., Smolyaninova N., Zelenin A., Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne radiation, *Lasers in the Life Sciences*, 1991, V.4, N.3, P.167.
24. Funk J.O, Kruse A, Kirchner H., Cytokine production after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells, *J Photochem Photobiol B*. 1992, V.16, N.3, P.347.
25. Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T., Mitochondria optical parameters are dependent on their energy state: a new electrooptical effect? *Eur. Biophys. J.*, 2004, V.33, N.8, P.700.
26. Karu T., Pyatibrat L., Kalendo G., Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in viro, *J. of Photochem. Photobiol. B: Biology*, 1995, V. 27, P.219.
27. Кару Т.Й., Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-С-оксидазы, Сб. «Современные лазерно-информационные технологии», 2005, С.131.
28. Schwindling C., Quintana A., Krause E., Hoth M., Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells, *Cell Calcium*, 2009, V.45, N.2, P.109..

29. Stanley A. C. and Lacy P., Pathways for Cytokine Secretion, Physiology, 2010, V.25, P.218.
30. Huse M., Lillemeier B. F, Kuhns M., Chen D., Davis M., T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion, Nature Immunology, 2006, V.7, P.247.
31. Jolly C., Sattentau Q., Regulated secretion from CD4+ T cells, Trends Immunol, 28(11): 474-481, 2007. R.
32. Pollack G., Cells, gels and the engines of life, 2001, Ebner&Sons,.
33. Tychinsky V. High electric susceptibility is the signature of structured water in water-containing objects, Water, 2011, V.3, P.95.