

УДК 616-092

DOI: 10.14427/jipai.2020.1.27

## Использование модуляционной интерференционной микроскопии в задачах прикладной иммунологии

Е.А. Левкова<sup>1</sup>, С.З. Савин<sup>2</sup><sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия<sup>2</sup> Тихоокеанский государственный университет, Хабаровск, Россия

### Use of modulation interference microscopy in applied immunology

E.A. Levkova<sup>1</sup>, S.Z. Savin<sup>2</sup><sup>1</sup> Peoples' Friendship University, Moscow, Russia<sup>2</sup> Pacific National University, Khabarovsk, Russia

#### Аннотация

**Цель исследований:** определить осмотическую резистентность эритроцитов с использованием технологий модуляционной интерференционной микроскопии в режиме световой микроскопии биологических объектов для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

**Методы.** Изложены методологические подходы к использованию модуляционной интерференционной микроскопии и компьютерной томографии для задач диагностической медицины и прикладной иммунологии. Использована технология витальной компьютерной динамической фазометрии, специальные способы пробоподготовки цитообъектов, а также система компьютерного автоматизированного анализа цитологических изображений; алгоритмы распознавания, измерения и идентификации микрообъектов; методы статистической обработки данных.

**Результаты.** С помощью отечественного инновационного лазерного микроскопа МИМ340 выполнена оценка осмотической резистентности эритроцитов с использованием метода модуляционной интерференционной микроскопии для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у больных с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом. Используя компьютерные методы цитодиагностики, были выявлены новые аспекты функциональной морфологии живых клеток, установлены клинично-морфологические параллели. Удалось оценить диагностическое и прогностическое значение витальной морфометрии клеток при различных патологических процессах и оценке эффективности лечебных мероприятий. Создан банк данных графических изображений эритроцитов и лимфоцитов крови пациентов с заболеваниями иммунной системы.

**Выводы.** Исследование структурных особенностей и функциональной полноценности циркулирующих клеток

#### Summary

**Aim:** to determine the osmotic resistance of red blood cells using modulation interference microscopy technologies in the light microscopy mode of biological objects to identify the dynamics and determine the possibility of continuing apitherapy in patients with autoimmune diseases.

**Methods.** Methodological approaches to the use of modulation interference microscopy and computed tomography for diagnostic medicine and applied immunology are described. Vital computer dynamic photometry, special cytoobject preparation methods and the system of automated computer analysis of cytological images were used; as well as algorithms for recognition, measurement and identification of microorganisms; methods of statistical data processing.

**Results.** Using the domestic innovative laser microscope MIM340, the osmotic resistance of red blood cells was evaluated using the method of modulation interference microscopy to identify the dynamics and determine the possibility of continuing apitherapy in patients with rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Using computer methods of cytodiagnostics, new aspects of the functional morphology of living cells were identified, and clinical and morphological parallels were established. It was possible to evaluate the diagnostic and prognostic value of vital cell morphometry in various pathological processes and evaluate the effectiveness of therapeutic measures. A data bank of graphic images of red blood cells and lymphocytes of patients with diseases of the immune system was created.

**Conclusion.** The study of structural features and functional usefulness of circulating blood cells is of great importance for solving the issues of pathogenesis, diagnosis, assessment of the severity of various pathological conditions and the effectiveness of therapy. We believe that the study of living cytoobjects using a new method of coherent phase microscopy will allow us to obtain the most objective data and increase the information content of the analysis, which is undoubtedly an urgent and promising task. In the near future, we are

крови имеет большое значение при решении вопросов патогенеза, диагностики, оценки тяжести различных патологических состояний и эффективности проводимой терапии. Полагаем, что изучение живых цитообъектов с использованием нового метода когерентной фазовой микроскопии позволит получить максимально объективные данные и повысит информативность анализа, что, несомненно, является актуальной и перспективной задачей. В ближайшие планы входит доработка математического, алгоритмического и программного обеспечения для поддержки принятых решений в системах компьютерного автоматизированного анализа изображений эпидермиса и поверхностной части дермы при неопластических процессах – злокачественных заболеваниях кожи. Необходимо также создание алгоритмических и программных средств компьютеризации исследований клеточных моделей для количественной и качественной оценки селективного накопления ксенобиотиков методами лазерной микроскопии.

### **Ключевые слова**

Компьютерная микроскопия, медико-диагностические информационные системы, модуляционная интерференционная микроскопия (МИМ), социально значимые заболевания, резистентность эритроцитов, ревматоидный артрит, рассеянный склероз

### **Введение**

Современный уровень развития оптической электроники и вычислительной техники позволяет создавать и успешно внедрять новые инструменты для исследования микробиологических объектов. Последние достижения отечественной науки в области компьютерной микроскопии и томографии [1,2] в сочетании с автоматизированными системами распознавания образов широко используются в качестве исследовательских и диагностических инструментов в биологии и медицине [3-5]. Исследования корреляции между функциональным состоянием отдельной клетки и физическими параметрами ее органелл является одной из актуальных проблем биологии [6, 7-9]. Ее решение может иметь фундаментальное значение для понимания внутриклеточной динамики, а также откроет перспективу разработки новых методов диагностики в молекулярной медицине. Практически важными приложениями таких методов являются скрининг биологически активных соединений и экспресс-диагностика ряда заболеваний на клеточном уровне [10-12]. Исследования в области динамики внутриклеточных процессов, таких как кинетика молекулярных моторов, кооперативные явления в мембранах и ферментных комплексах и т.п. [13-18] стимулировали дальнейший прогресс в развитии новых методов «прижизненной» микроскопии. Возникла острая необходимость регистрации

planning to refine mathematical, algorithmic and software support for enhanced decision-making in computer-aided image analysis of the epidermis and the surface part of the dermis in neoplastic processes – malignant skin diseases. It is also necessary to create algorithmic and software tools for computerization of cell model studies for quantitative and qualitative assessment of selective xenobiotic accumulation using laser microscopy.

### **Keywords**

Computer microscopy, medical and diagnostic information systems, modulation interference microscopy (MIM), socially significant diseases, erythrocyte resistance, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis

динамических процессов в реальном времени. На основе запатентованных технологий Модуляционной Интерференционной Микроскопии (МИМ) и бесконтактного перемещения с использованием магнитно-аэростатических узлов была создана уникальная линейка лазерных микроскопов МИМ и комплекс прецизионных устройств («Наномеханика») для сверхточных измерений на уровне нанотехнологических систем [5, 7].

**Цель исследования.** Исследование осмотической резистентности эритроцитов с использование технологий модуляционной интерференционной микроскопии в режиме световой микроскопии биологических объектов (кровь) для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

### **Материалы и методы исследования**

Материалом для исследования служила гепаринизированная капиллярная кровь (микрометод исследования забора крови из пальца) в объеме от 200 мкл. Подготовка мазков extemporo («влажный» мазок), без фиксации. На одного пациента проба подготовка в количестве 3 стекл. На каждого пациента заполнялось информированное согласие и карта учета морфологической картины крови – эритроцитарного ростка (размеры, форма, наличие дефектов – гемолиза полного и/или частичного). Методом случайной

выборки по нозологичному принципу и лечебно-терапевтическому принципу автоматически было отобрано 38 пациентов. Доминирующий вид патологии – ревматоидный артрит (n=36 чел), два пациента страдали рассеянным склерозом (n=2 чел). Гендерный и возрастной принципы ранжирования не использовались. Все пациенты имели длительные хронические заболевания аутоиммунного генеза более 5 лет, в течение одного и более лет получила апитерапию.

Зрелые эритроциты человека (нормоциты) – это клетки крови асимметричной дисковидной двояковогнутой формы с диаметром 6,2 до 8,2 микрометра (мкм), толщина тонкой части 0,81 мкм, толстой части – 2,61 мкм, площадь поверхности 135 мкм<sup>2</sup>, объем 90 мкм<sup>3</sup>. У женщин норма эритроцитов составляет около  $3,4-5,1 \times 10^{12}/л$ , у мужчин –  $4,1-5,7 \times 10^{12}/л$ , в пожилом возрасте –  $4,0 \times 10^{12}$  на литр (менее 4 млн в 1 мм<sup>3</sup>).

Измерения параметров эритроцитов проводились при помощи метода модуляционной интерференционной микроскопии – МИМ. Для статистической обработки значений характеристик эритроцитов использовалось программное обеспечение ППП SPSS-10. Достоверность различия показателей оценивалась по критериям Стьюдента, Пирсона при распределении по нормальному закону. При отклонении от нормального распределения использовались непараметрические критерии (критерий серий Вальда-Вольфовица, U-критерий Манна–Уитни, двухвыборочный критерий Колмогорова–Смирнова).

Принципиальная схема функционирования микроскопа МИМ-340 представлена в [7]. В МИМ разрешение по вертикали в стандартных условиях достигает 0,3 нм, а с использованием системы активной виброзащиты – 0.1 нм. Латеральное (по координатам X,Y) разрешение объектнозависимо. В МИМ величина латерального разрешения меняется от 10 нм до 100 нм в зависимости от фазового контраста исследуемого объекта. Использована технология витальной компьютерной динамической фазометрии, специальные способы пробоподготовки цитообъектов, а также система компьютерного автоматизированного анализа цитологических изображений; алгоритмы распознавания, измерения и идентификации микрообъектов; методы статистической обработки данных.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Используя компьютерные методы цитодиагностики, были выявлены новые аспекты функ-

циональной морфологии живых клеток, установлены клиничко-морфологические параллели. Удалось также оценить диагностическое и прогностическое значение витальной морфометрии клеток при различных патологических процессах и оценке эффективности лечебных мероприятий. В процессе апробации микробиологического варианта лазерного микроскопа МИМ-340 были выявлены как некоторые преимущества и недостатки программно-технического комплекса, носящие некий диалектический характер. Прежде всего, в качестве положительных характеристик необходимо отметить простоту и низкую экономическую стоимость пробо-подготовок (расходные материалы для забора капиллярной крови). Реализована возможность сохранения клеточных паспортов в банке данных биомедицинских изображений с последующим динамическим сравнением цитологических образцов у индивида (например, при восстановлении эритроцитарного, тромбо и лейкоцитарного профилей) – наличие базы данных.

На этапе световой микроскопии имеется возможность оценки дефицитарность эритроцитарного роста (анемии), склонность к тромбообразованию (увеличение количества тромбоцитов). Аналогичных исследований в России пока нет. Но эти характеристики является субъективными по сравнению с данными современных гемоанализаторов. Для оценки клеток и длительности экспозиции необходимо добавление гепарина и/или приготовление лейко- или лимфовзвеси. Однако при переходе на высокие скорости захвата фазовых кадров возникает проблема недостаточной засветки матрицы камеры. В настоящей реализации МИМ, чувствительность камеры позволяет уменьшить время экспозиции до 0,5 мс при мощности излучения лазера 5 мВт с сохранением линейности отклика камеры. Таким образом, за счет увеличения пропускной способности интерфейса, в ближайшее время скорость получения фазовых изображений МИМ может быть повышена до 6 полных фазовых изображений в секунду или до 500 фазовых изображений разрешением 128x128 точек. Это открывает перспективы применения МИМ в прижизненной регистрации морфологии клеток и ее органелл, а также создание на основе МИМ диагностических методов на клеточном уровне. Очень высокая разрешающая способность на уровне световой микроскопии. Правда, без программ автоматического подсчета клеток, наличия окна по типу «стоп-кадр» практического применения данное свойство не находит. Принцип модуляционной

интерференции позволяет создать фазовый профиль биологического объекта. Но процесс очень трудоемкий, настройка производится вручную и связана с применением существенных физических усилий. Возможна персонифицированная оценка клеточного ряда с 3D-восстановлением (рис. 1). Но на обработку одного клеточного элемента (особенно лейкоцита) уходит до 7 мин времени. При этом уровень доказательности при воспроизведении до 50 клеток приближается к нулю.

На уровне фазово-поляризационной микроскопии имеется возможность исследовать качество лейкоцитарной линии с изменением активности данной клеточной линии. Однако свойство малоказательное и не может конкурировать с другими способами оценки активности лейкоцитов, например, реакцией торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). Тем не менее, необходимо констатировать, что с появлением в отечественной микроскопии инновационного продукта на основе модуляционной интерференционной микроскопии – МИМ-340, наметился колоссальный прорыв. Этот вид лазерной микроскопии имеет возможности оптической микроскопии и электронной, позволяя работать с биологическими объектами – кровь, в режиме реального времени. За очень короткий промежуток время, с минимальным набором для пробо-подготовки, можно оценить морфологический портрет клеток человека.

Одним из основных направлений исследований с помощью отечественного микроскопа МИМ-340 была резистентность эритроцитов для решения вопроса о возможности продолжения

апитерапии больных с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом – световой вариант. Подчеркивая еще раз актуальность проводимых исследований, необходимо сделать акцент на практически полном отсутствии экспресс-диагностических исследований, имеющих максимально короткий срок выполнения – до 10 мин.

В данной статье представлена экспресс-диагностическая технология сопровождения тяжелых форм соматической патологии, с нарушением толерантности – аутоиммунные заболевания в виде ревматоидного артрита и рассеянного склероза. На настоящее время несмотря на прогресс в области лечения названных патолого-нозологических форм таргетные виды и резистентность к ним сохраняются на достаточно высоком уровне. Это обстоятельство вызывает необходимость поиска инновационных способов лечения и реабилитации. Ключевым феноменом при проведении апитерапии у подобных пациентов является свойство резистентности эритроцитов: отсутствие гемолиза при проведении провокационной пробы. Для уточнения дальнейшей тактики в проведении апитерапии требуется оценка стойкости эритроцитов или отсутствие признаков гемолиза.

Дизайн исследования. По плану рандомизированных исследований были проведены наблюдения за фазовым портретом эритроцитов среди 38 пациентов, у которых диагностировалась полипатология. У 36 чел. доминирующим видом патологии было поражение опорно-двигательного аппарата, которые имели верифицированный ревматоидный артрит (ACR/EULAR 2010), двое пациентов страдали рассеянным склерозом.

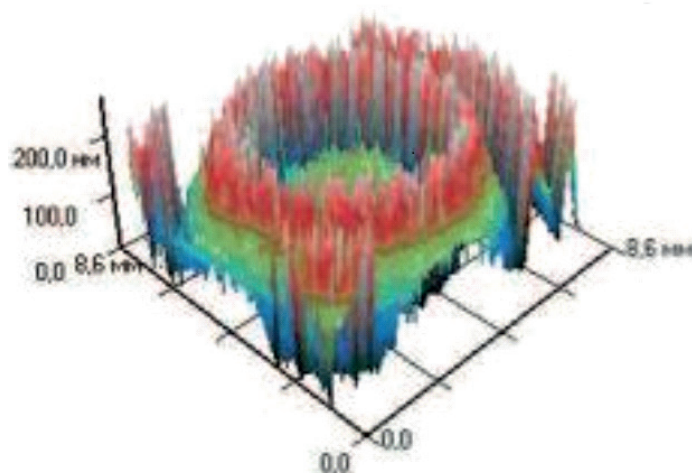


Рис. 1. 3D-анализ эритроцита

Всем пациентам перед апитерапевтическим лечением была проведена проба на определение чувствительности к апитерапии (проба на переносимость). Дополнительная характеристика – 22 пациента находились на супрессорной иммунотерапии.

В ходе исследования клеток крови были идентифицированы фазовые портреты различных форм эритроцитов (рис. 2).

Фазовый портрет эритроцита в норме отражает равномерное распределение гемоглобина по объему эритроцита. При различных патологиях распределение гемоглобина носит неравномерный характер. Традиционные методы оптической микроскопии не позволяют выявить подобные отличия. Из 38 человек у 2-х пациентов проба была сомнительная – наличие признаков гемолиза – нечеткая мембрана клетки, ее фрагментарная размытость (Рис. 2в), при этом у одного пациента вероятность нестойкости эритроцитарной мембраны была вызвана анемией среднетяжелой степени, гормонально-индуцированной (получение иммуносупрессорной терапии). У 36 пациентов перед началом лечения количество лейкоцитов было более  $10 \cdot 10^9$ . У одного больного количество лейкоцитов было в норме,  $7,6 \cdot 10^9$  и еще у одного констатировалась лейкопения –  $3,3 \cdot 10^9$ .

### Выводы

Таким образом, при помощи МИМ-340 в варианте экспресс-диагностики может быть проводится корректная оценка резистентности эритроцитов, их морфологических свойств, насыщение эритроцитов гемоглобином, наличие дефектных форм, а также оценено количество

лейкоцитов. Дальнейшие исследования возможно продолжить по изучению зависимости морфологии и характера динамических процессов в эритроцитах от степени их оксигенирования.

Исследование структурных особенностей и функциональной полноценности циркулирующих клеток крови имеет большое значение при решении вопросов патогенеза, диагностики, оценки тяжести различных патологических состояний и эффективности проводимой терапии. Полагаем, что изучение живых цитообъектов с использованием нового метода когерентной фазовой микроскопии (КФМ) позволит получить максимально объективные данные и повысит информативность анализа, что, несомненно, является актуальной и перспективной задачей. Перспективы дальнейшего использования МИМ-340 могут быть связаны прежде всего с разработкой оригинальной методологии электронно-микроскопической, морфометрической, текстурной и гистологической оценки повреждающего эффекта плазматических мембран клеток-мишеней.

Исследования с помощью МИМ 340 также возможны для морфологии опухолевых клеток для определения новых методов скрининга лекарственных препаратов. Для продолжения испытаний оборудования линейки МИМ, основанной на принципах модуляционной интерференционной микроскопии, необходимо создать современное программное обеспечение для регистрации обработки и анализа динамических процессов в реальном времени. Предстоит доработать средства программно-технической реализации модуляционного метода воспроизведения

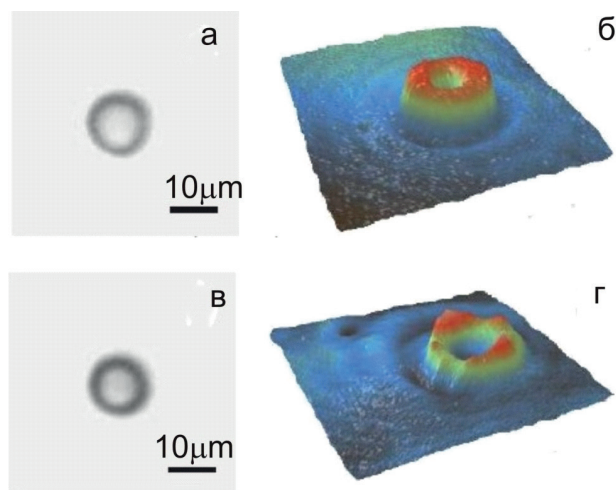


Рис. 2. Фазовый портрет эритроцита

низкочастотных флуктуаций фазовой толщины. Вероятна разработка специализированного математического, алгоритмического и программного обеспечения для МИМ-340 с целью поддержки принятых решений по результатам визуализации оптически анизотропных структур размером менее 100 нм и регистрации нанодинамики в режиме нановидео.

Таким образом, заложенный в МИМ потенциал открывает новые перспективы в изучении морфологии клетки и ее органелл, а также их метаболизма. В ближайшие планы входит также

доработка математического, алгоритмического и программного обеспечения для поддержки принятых решений в системах компьютерного автоматизированного анализа (КАД-анализ) для анализа изображений эпидермиса и поверхностной части дермы при неопластических процессах – злокачественных заболеваниях кожи. Необходимо создание алгоритмических и программных средств для компьютерных исследований клеточных моделей: количественная и качественная оценка селективного накопления ксенобиотиков методами лазерной микроскопии.

## Литература

1. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Лодяной М.С., Самоделкин А.Г. Изменение фазового портрета и электрофоретической подвижности эритроцитов при различных видах заболеваний. Современные технологии в медицине 2019; Т. 11, №2: 63-68.
2. Иванов А.Б., Кретушев А.В., Игнатъев П.С. и др. Расстровый метод локализации динамических областей клетки. Российские нанотехнологии 2007; №6: 54-59.
3. Игнатъев П.С., Тычинский В.П., Вышенская Т.В. и др. Исследование активации лимфоцитов методом когерентно фазовой микроскопии. Альманах клинической медицины 2008; №17-2: 65-67.
4. Кононенко В.И. Фликкер эритроцитов. 1. Обзор теории и методов регистрации. Биологические мембраны 2009; Т. 26, №5: 352-369.
5. Лаборатория АМФОРА. Официальный сайт. [Электронный ресурс]. 2019. Режим доступа: [http://www.amphoralabs.ru/projects/laser\\_interference\\_microscopy](http://www.amphoralabs.ru/projects/laser_interference_microscopy). Дата обращения 5.11.2019.
6. Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках. Цитология 2005; Т.47, №4: 348-356.
7. Лопарев А.В., Игнатъев П.С., Индукаев К.В. и др. Высокоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. Измерительная техника 2009; №11: 60-64.
8. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Maksimov G.V. et al. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study. J. Biomed. Opt. 2007; Vol. 3, №13: 034004.
9. Brehm-Stecher B., Johnson E. Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications. Microbiology and Molecular Biology Review. 2004; 68: 538-559.
10. Carl D., Kemper B., Wernicke G.B. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis. Appl. Opt. 2004; 43: 6536-6544.
11. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G. et al. Low-level laser therapy as a modifier of erythrocytes morphokinetic parameters in hyperadrenalinemia. Lasers in Medical Science. 2019; Vol. 34, Issue 8: 1603–1612.
12. EVOS FLoid Cell Imaging Station. <http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/cell-imaging-systems/fluid-cell-imaging-station.html>.
13. Huang Y., Karashima T., Yamamoto M. et al. Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. J. Raman Spectrosc. 2004; 35: 525-526.
14. LaPorta A., Kleinfeld D. Interferometric Detection of Action Potentials. Spring Harbor Laboratory Press at SERIALS/BIOMED LIB0175B, 2013, 6 p. Published by <http://cshprotocols.cshlp.org/>
15. Lazebnik M., Marks D., Potgier K. et al. Functional optical coherence tomography for detecting neural activity through scattering changes. Opt. Lett. 28(14): 1218-1220.
16. Naito Y., Tohe A., Hamaguchi H. In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. J. Raman Spectrosc. 2005; 36: 837-839.
17. Rappaz B., Marquet P., Cuhe E. et al. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cell with digital holographic microscopy. Optics Express 2005; 13 (23): 9361-9373.
18. Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L. et al. Tomographic interference microscopy of living cells. Microscopy and Analysis 2004; 87: 19-21.

## Сведения об авторах:

Левкова Елена Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов, член-корреспондент РАЕ, эксперт РАН, врач иммунолог-аллерголог, высшей квалификационной категории.

Савин Сергей Зиновьевич – кандидат технических наук, зав. лабораторией УРАН Вычислительный центр ДВО РАН, Тихоокеанский государственный университет. Мобильный телефон: 89990889859. E-mail для переписки: [savin.sergei@mail.ru](mailto:savin.sergei@mail.ru).

Статья участвует в конкурсе публикаций 2019 г. в категории "Имунопатология". Страница голосования: <https://vk.com/immunopathology>