

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ЗАМЕТКИ

Когерентная фазовая микроскопия  
внутриклеточных процессов

В.П. Тычинский

*Записанная в ДНК информация в неявном виде определяет последовательность процессов на различных уровнях организации живой материи. Методы оптической микроскопии дают основную информацию о процессах в живой клетке. Развитие этих методов на базе современных достижений лазерной и компьютерной техники предопределяет в значительной мере дальнейший прогресс в биологии. В обзоре кратко рассмотрены современные методы получения функциональных изображений в прижизненной микроскопии клеток и уделено основное внимание динамической когерентной фазовой микроскопии, основанной на регистрации локальных флуктуаций показателя преломления. Приводятся результаты измерений на лазерном фазовом микроскопе.*

PACS numbers: 42.30.-d, 87.16.-b, 87.64.Rt

## Содержание

1. Введение (649).
  2. Физические основы когерентной микроскопии (651).
  3. Компьютерный фазовый микроскоп (655).
  4. Информационные аспекты прижизненной фазовой микроскопии (657).
  5. Результаты измерений (658).
  6. Заключение (661).
- Список литературы (661).

## 1. Введение

Изучение явлений самоорганизации и регуляции внутриклеточных процессов является одной из фундаментальных проблем биологии [1]. В последние годы были разработаны новые методы микроскопии, основанные на использовании современных достижений когерентной оптики, спектроскопии и компьютерной техники [2–4], и достигнуты важные результаты в молекулярной биомеханике [5–8]. Например, методы флуоресцентной микроскопии в сочетании с видеосъемкой позволили измерить скорость вращения  $\gamma$ -субъединицы изолированного АТФазного комплекса [5, 6], который является самым миниатюрным естественным молекулярным мотором. Для определения углового положения, связанного с  $\gamma$ -субъединицей маркированного актинового филамента, были использованы методы флуоресцентной микроско-

пии и видеомикроскопии. О связанной с активностью молекулярных моторов периодической (3 Гц)-компоненте в движении актиновых филаментов, которые были маркированы флуоресцентной меткой, сообщалось в работе [7].

Ниже мы приводим результаты некоторых исследований, иллюстрирующих основные тенденции в современной микроскопии. Методы многофотонной флуоресцентной микроскопии [2] успешно развиваются и привлекают все возрастающее внимание. Спектральная фильтрация и высокое разрешение по времени затухания флуоресценции позволили отождествить некоторые белки, их пространственное распределение и динамику. Разработанный метод [2, 3] многофокусной мультифотонной микроскопии (Multifocal Multiphoton Microscopy — МММ), в котором сканирование поверхности образца производилось одновременно 30 сфокусированными пучками излучения импульсного титан-сапфирового лазера, позволил значительно сократить время измерений. Комбинация МММ с (4 $\pi$ )-микроскопией позволила увеличить аксиальное разрешение до 100–150 нм. В этом методе исследуемый объект помещался в интерференционное поле, создаваемое встречными когерентными пучками, исходящими из двух симметрично расположенных объективов.

В качестве примера измерений динамических процессов в клетке отметим метод [8] темнопольной точечной микроскопии (Point Dark Field Microscopy). Этот метод был использован для исследования в реальном времени АТФ-стимулированных флуктуаций мембраны эритроцита. Его сущность заключалась в фотоэлектрической регистрации изменений интенсивности света в поле зрения микроскопа при смещении края объекта относительно оптической оси объектива.

Применение лазеров в микроскопии позволило разработать методы манипуляции микрочастицами и

**В.П. Тычинский.** Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики, 117454 Москва, просп. Вернадского 78, Российская Федерация  
E-mail: tych@tych.pvt.msu.ru

Статья поступила 8 августа 2000 г.,  
после доработки 7 декабря 2000 г.

внутриклеточной хирургии, реализовать принцип конфокальной микроскопии, управлять спектральными и временными характеристиками флуоресценции, повысить точность измерений и быстродействие приборов [2, 3, 5, 9, 10].

Анализ изображений в современных микроскопах осуществляется с помощью компьютеров. Принципиальное значение имеет характер первичной информации, которая закодирована в изображении и подвергается последующей обработке. В классической оптической микроскопии [11–13] обычно используются естественные изображения объектов, в которых информация связана с двумерным распределением интенсивности (или яркости) рассеянного объектом излучения некогерентного источника. Для усиления контраста во многих случаях используются селективное окрашивание органелл и различные оптические методы (фазового и дифференциального интерференционного контраста), а также компьютерные методы обработки изображений, например вычитание фона [12, 13]. Такие изображения, в которых информация представлена распределением интенсивности или спектральной плотности рассеянного объектом излучения, мы будем называть *амплитудными*, в отличие от других — так называемых *функциональных* изображений. В функциональных микроскопических изображениях первичная информация может быть представлена двумерным распределением параметра, не связанного непосредственно с топологией объекта. Таким параметром, например, может быть спектральная плотность флуоресценции [9, 14], спектр вынужденного комбинационного рассеяния [15] или время релаксации возбужденных состояний. Интенсивность и спектры флуктуаций оптических параметров объекта могут быть характерными параметрами при измерениях в фазовых микроскопах [16, 18]. Важное отличие фазовых методов состоит в том, что фаза является "естественно" нормированной величиной в основном интервале определения  $2\pi$  и ее значения при использовании когерентных источников света могут измеряться с большой точностью.

Вполне естественно, что функциональные изображения содержат дополнительную к классическим изображениям информацию и имеют ряд необычных свойств. В частности, следует отметить в фазовых изображениях возможность сверхразрешения и регистрации локальных динамических процессов [16–19].

Сделаем общее замечание к проблеме анализа динамических процессов, зафиксированных, например, в виде серии амплитудных видеоизображений.

В амплитудных изображениях практически невозможно получить воспроизводимые нормированные количественные данные о параметрах движения, поскольку контраст изображения, число различимых градаций в цвете, пространственное разрешение и другие характеристики зависят от многих неконтролируемых факторов (условий освещения, компенсации фона, спектральной чувствительности ПЗС-камеры и т.п.). В частности, в методе дифференциально-интерференционного контраста (DIC) в изображениях распределение интенсивности (или яркости) весьма сложным образом связано с ориентацией анизотропных элементов объекта относительно плоскости поляризации света.

Отсутствие нормированных параметров, не зависящих от условий освещения, является основной причиной,

не позволяющей сравнивать результаты, полученные в амплитудных изображениях на различных приборах.

Тем не менее с помощью современных компьютерных методов из амплитудных видеоизображений удается получить ограниченную количественную информацию о траектории движущихся частиц и о других динамических процессах. В качестве примера укажем разработанные для этой цели фирмой Hamamatsu оптоэлектронные приставки Argus-20-100. ПЗС-камеры этих приставок устанавливаются на обычных микроскопах и позволяют в реальном времени анализировать с помощью пакетов программ амплитудные изображения на мониторе компьютера. Приставка позволяет производить вычитание кадров и наблюдать изменения морфологии неокрашенных клеток с высоким пространственным разрешением, присущим дифференциальному контрасту. По-видимому, возможности этой техники в исследовании внутриклеточной динамики весьма ограничены, и о возможности получения других количественных характеристик, например, спектров флуктуаций и корреляционных функций, сведений нет.

Методы конфокальной микроскопии сейчас весьма популярны и оказались эффективными для реконструкции трехмерных изображений клеток и органелл. В основе этих методов лежит линейная зависимость интенсивности в сопряженной точке плоскости изображения от интенсивности рассеяния на локальной неоднородности в плоскости объекта. В проспектах фирм-поставщиков конфокальных микроскопов сообщается также о принципиальной возможности регистрации внутриклеточных динамических процессов. Однако в известной нам литературе нет публикаций с конкретными результатами таких измерений. По-видимому, это можно объяснить следующими причинами.

В конфокальных микроскопах фототок пропорционален локальной интенсивности рассеянного света, и поэтому возможна регистрация только оптически плотных элементов объекта. Следовательно, процессы, которые не сопровождаются заметными изменениями локальной оптической плотности объекта, не могут быть обнаружены.

Большие надежды на прогресс в микроскопии субмикронных структур в последнее десятилетие связаны с разработкой зондовых методов. В каталогах ряда фирм сообщается о туннельных, атомно-силовых и других типах микроскопов, обеспечивающих разрешение на атомном уровне. Известны также их оптические аналоги — микроскопы ближнего поля. Как правило, в таких микроскопах изображение получают при растровом сканировании оптического зонда вдоль поверхности образца и регистрации интенсивности рассеянного излучения. Проведенные недавно прямые измерения внутриклеточной динамики в физиологическом буфере [10, 11] подтвердили перспективность зондовых методов, несмотря на ряд проблем (необходимость очистки и замены иглы, трудности совмещения с визуальным каналом).

Однако зондовые методы нельзя считать в полной мере неинвазивными, поскольку градиенты поля в окрестности зонда, механические возмущения, контакт с инородным материалом и другие факторы влияют на состояние объекта. Кроме того, здесь также справедливы замечания, высказанные ранее в связи с амплитудными изображениями. Измеряемая величина — изменение

интенсивности света на выходе оптического зонда — должна быть нормирована. В противном случае ее трудно (или невозможно) сопоставить с физическими величинами, измеряемыми другими методами, и отождествить с принятыми в биологии параметрами. Чувствительность, разрешающая способность и быстродействие зондовых микроскопов вполне достаточны для решения многих задач исследования внутриклеточных процессов, но публикаций об их применении пока мало.

Фазовые изображения представляют собой двумерное распределение фазы, или оптическую разность хода (ОРХ) интерферирующих лучей. Традиционная область применения фазовых микроскопов — профилометрия микроструктуры поверхности и микроэлектроника. Геометрическая высота профиля  $H(r)$  оптически однородных непрозрачных объектов связана с фазой отраженной волны  $\varphi(r)$  очевидным соотношением

$$H(r) = \frac{4\pi\varphi(r)}{\lambda}, \quad H(x, y) = \frac{4\pi\varphi(x, y)}{\lambda}.$$

В изображениях оптически неоднородных прозрачных объектов ОРХ в известном приближении пропорциональна локальной проекции показателя преломления  $n(r)$  на направление  $z$  луча:

$$h(r) = \frac{4\pi\varphi(r)}{\lambda} = \int n(r) dz,$$

$$h(x, y) = \frac{4\pi\varphi(x, y)}{\lambda} = \int_0^{H(x, y)} n(x, y, z) dz.$$

Для измерений фазы, или ОРХ, используются интерференционные микроскопы с модуляцией фазы опорной волны [20, 21]. В многошаговых методах [20] фазовой микроскопии с помощью координатно-чувствительного фотоприемника (обычно ПЗС-камер) при фиксированных значениях фазы опорной волны регистрируют и вводят в память компьютера определенное число паттернов интенсивности  $I_q(X, Y)$  интерференционного поля и вычисляют для каждого пикселя изображения значения локальной фазы, или ОРХ. Здесь  $X, Y$  — координаты в плоскости изображения,  $q$  — индекс фазы опорной волны.

Для интенсивности интерференционного поля, представленной в виде

$$I_q(X, Y) = a(X, Y) + b(X, Y) \cos [\varphi(X, Y) + \Delta\varphi_q],$$

и при фиксированных значениях фазы опорной волны

$$\Delta\varphi_q = \frac{\pi q}{2},$$

где  $q = 1, 2, 3, \dots, n$ , фаза определяется по формулам

$$\varphi = \arctg \frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}, \quad \varphi = \arctg \frac{2I_4 - 2I_2}{I_1 - 2I_3 + I_5}$$

соответственно для четырех ( $n = 4$ ) и для пяти ( $n = 5$ ) шагов. По записанным в память компьютера паттернам  $I_q(X, Y)$  в каждом пикселе изображения  $(X, Y)$  по приведенным алгоритмам могут быть вычислены локальные значения фазы.

Многошаговый метод обеспечивает высокую точность измерений для стационарных интерференционных полей, быстродействие и большое число пикселей. Основные недостатки многошаговых методов связаны с

тем, что локальные значения фазы определяются через величины  $I_q(X, Y)$ , измеренные в различные моменты времени. Поэтому флуктуации интенсивности и частоты источника излучения, а также вибрации и механическая нестабильность интерферометра ограничивают точность измерений. По этой же причине этим методом практически невозможна регистрация внутриклеточных динамических процессов.

Одна из основных проблем микроскопии, актуальность которой возрастает в функциональных изображениях, состоит в интерпретации полученной информации. В связи с этим вполне оправдана тенденция к созданию многофункциональных микроскопов [9] с широким использованием для обработки изображений современной вычислительной техники.

## 2. Физические основы когерентной микроскопии

Ниже мы более подробно рассмотрим метод [18, 22] получения фазовых изображений, в котором было реализовано одно из решений проблемы внутриклеточной динамической микроскопии.

При практической реализации методов фазовой микроскопии неизбежно возникает ряд принципиальных препятствий. Действительно, нативный биообъект в тонком слое *in vitro* представляет собой структурированную, оптически неоднородную анизотропную среду, которую нельзя описать одной функцией координат в плоскости изображения.

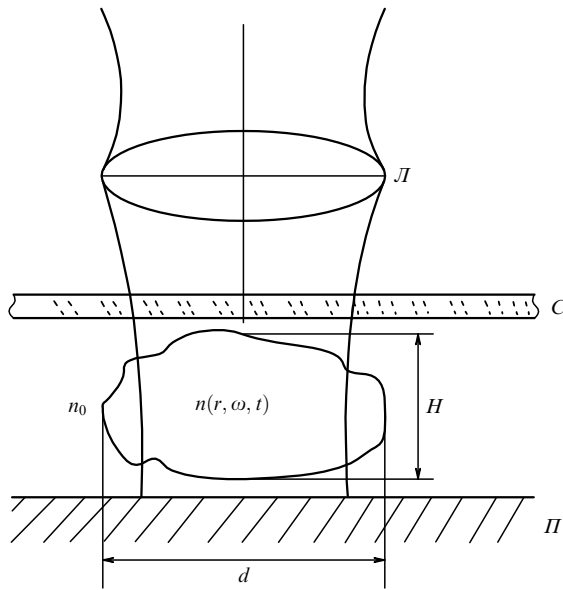
Например, распределение оптической плотности, или ОРХ, в фазовых изображениях связано с проекцией тензора показателя преломления  $n(r, t)$ , и отождествление органелл клетки можно производить на основании априорной информации (более плотное ядро, возрастающие градиенты плотности вблизи мембран клеток и т.д.). Препараты биообъектов для *in vitro* микроскопии обычно представляют собой помещенный в кювету или нанесенный на стеклянную пластину слой буферного раствора с суспензией клеток или органелл. Поэтому адекватной физической моделью биообъекта (рис. 1) в ограниченном поле зрения объектива  $L$  может служить слой иммерсионной жидкости с показателем преломления  $n_0$  под покровным стеклом  $C$ , в который вкраплена оптическая неоднородность с размером  $d$ , толщиной  $H$  и тензором показателя преломления  $n(r, \omega, t)$ , где  $n$  зависит от  $\omega$  — частоты источника света. В каждой точке плоскости изображения  $(X, Y)$  с помощью фотоприемного устройства измеряется интенсивность интерференционного поля и фаза  $\varphi(X, Y)$  рассеянной волны.

В приближении эйконала [23] поле рассеянной волны  $E(r, t)$ , где  $r[x, y, z]$  — координаты вблизи плоскости объекта, можно представить локальными плоскими волнами

$$E(r, t) = E_0(r) \exp [-jk_0 S(r) + j\omega t],$$

где  $E_0(r)$  — медленно меняющаяся функция координат,  $k_0 = \omega/c$ ,  $S(r)$  — эйконал, удовлетворяющий условию  $(\nabla S)^2 = n(r)^2$ . В геометро-оптическом приближении  $k_0 \nabla S = k(r)$  и при

$$\frac{dS}{dx}, \frac{dS}{dy} \ll \frac{dS}{dz}$$



**Рис. 1.** Модель биообъекта. Под покровным стеклом  $C$  в поле зрения объектива  $L$  в иммерсионной жидкости с показателем преломления  $n_0$  на полированной подложке  $\Pi$  находится оптически неоднородный элемент  $n(r, \omega, t) = n(r) + \delta n(r, \omega, t)$  с поперечным размером  $d$  и толщиной  $H$ . Фаза в каждой точке изображения пропорциональна проекции показателя преломления.

фаза рассеянной волны пропорциональна проекции показателя преломления в точке  $(x, y)$  в плоскости объекта

$$\varphi(x, y) = k_0 S(x, y) = k_0 \int n(x, y, z) dz = k_0 h(x, y).$$

Оптическая система микроскопа отсекает в поле  $E(r, t)$  высокие пространственные частоты и переносит модулированную объектом  $i$ -ю волну в плоскость  $X, Y$  изображения

$$E_{\Sigma}(X, Y, t) = \sum_i E_i(r, t) \otimes P(X, Y, r),$$

где  $P(X, Y, r)$  — когерентная передаточная функция объектива [11, 23],  $\otimes$  — обозначение свертки.

Модуляция волнового фронта  $\varphi(x, y)$  в плоскости объекта с точностью до высоких пространственных частот переносится в плоскость изображения

$$\varphi(x, y) \cong \varphi(X, Y),$$

где  $X/x = Y/y = M$  — линейное оптическое увеличение.

Интерферометры позволяют измерить разность фаз

$$\Delta\varphi(X, Y, t) = \arg [E_{\Sigma}(X, Y, t)]$$

рассеянной объектом волны

$$\Delta\varphi(X, Y) = \frac{2\pi h(X, Y)}{\lambda},$$

или ОРХ  $h(X, Y)$  в различных точках волнового фронта. Функции  $\varphi(X, Y)$  и  $h(X, Y)$  мы будем дальше рассматривать как фазовые изображения объекта  $n(x, y, z)$ . Следует напомнить, что функции  $\varphi(X, Y)$  определены с точностью до аддитивной константы и далеко не всегда являются

однозначной характеристикой объекта. Например,  $\varphi(X, Y)$  может зависеть от числовой апертуры объектива, точности фокусировки, поляризации проходящей волны.

В приближении геометрической оптики локальная неоднородность  $n(x, y, z)$  с большим поперечным размером ( $d \gg \lambda$ ) и аксиальной высотой  $H(x, y)$  будет иметь фазовый "портрет"

$$\Delta\varphi(X, Y) = \frac{2\pi h(X, Y)}{\lambda},$$

где ОРХ

$$h(X, Y) \approx h(x, y) = \int_0^{H(x, y)} n(x, y, z) dz \quad (1)$$

есть "проекция" функции  $n(x, y, z)$  в пределах интегрирования соответственно 0 и  $H(x, y)$ . Для оптически однородного объекта ( $n, H$ ) в иммерсионной среде  $n_0$

$$h(X, Y) \approx h(x, y) = H(n - n_0).$$

Напомним, что  $X, Y$  и  $x, y$  — координаты сопряженных точек в плоскостях изображения и объекта. Естественно, что в таком "портрете" невозможно разделить вклады высоты  $H(x, y)$  и показателя преломления  $n(x, y, z)$ .

Такая же неопределенность возникает в слоистой среде, когда измеряется суммарный вклад отдельных слоев

$$h(r) = \sum_k n_k H_k, \quad k = 1, 2, 3, \dots$$

Из (1) следует, что в фазовых изображениях должны быть систематические отличия в геометрической  $H(X, Y)$  и "фазовой"  $h(X, Y)$  высотах. "Фазовая" высота  $h(X, Y)$  зависит от локальной разности проекций показателей преломления, например, в неоднородности  $n(r, \omega, t)$  и буфера  $n_0$  на рис. 1. Обычно

$$[n(r, \omega, t) - n_0] \ll 1,$$

и поэтому фазовая высота (ОРХ) меньше реальной (геометрической) толщины:

$$h(X, Y) \ll H(x, y).$$

Интерпретация фазовых "портретов"

$$\Delta\varphi(X, Y) = \frac{2\pi h(X, Y)}{\lambda}$$

значительно усложняется при  $d \ll \lambda$ , когда приближение геометрической оптики некорректно. В фазовом "портрете" происходит дифракционное искажение размеров и формы субволновых структур оптической неоднородности  $n(x, y, z)$ . Кроме того, при  $H(x, y) \ll \lambda$  снижается общий фазовый контраст. Из сказанного следует, что для корректной интерпретации фазовых изображений с субволновыми структурами всегда желательна априорная информация об оптической модели объекта.

В связи с большим значением для прижизненной микроскопии информации о внутриклеточных процессах рассмотрим более обстоятельно ограничения, связанные с разрешающей способностью оптической

системы в функциональных изображениях. Понятие когерентной передаточной функции (или функции зрачка), с которой связан критерий разрешения, корректно для амплитудных изображений и только в параксиальном приближении. Вполне естественно, что критерий Рэлея [11], основанный на модели двух идентичных точечных амплитудных объектов, неприменим в общем случае к функциональным, а также к фазовым изображениям. Наиболее простым примером некорректности критерия Рэлея в функциональных изображениях, т.е. обнаружения элементов объекта на расстоянии, меньшем  $\lambda/2$ , является модель двух неидентичных по спектру точечных источников. В этом случае проблема разрешения сводится к точности определения координат источников при измерении спектральной плотности их излучения с помощью двух согласованных фильтров. Возможность сверхразрешения для квазиточечных объектов, различающихся по спектральным характеристикам, была подтверждена экспериментально методами флуоресцентной и многофотонной микроскопии. В функциональных изображениях точечные объекты могут отличаться разнообразными признаками, в том числе спектром флуктуаций или параметрами движения. Поэтому, как правило, критерии разрешения в функциональных изображениях оказываются энергозависимыми, и при достаточно высоком отношении сигнал/шум может быть реализовано сверхразрешение.

Сверхразрешение наблюдалось в фазовых изображениях также при регистрации динамических процессов. В этом случае в качестве критерия разрешения использовалось минимальное расстояние вдоль скан-линии между максимумами спектральной плотности компонент.

Однако этот подход не объясняет сверхразрешение в фазовых тест-объектах [18, 19], а также наблюдаемое методом дифференциального интерференционного контраста (DIC) в изображениях амплитудных объектов [12, 13]. В фазовых изображениях параметр сверхразрешения при достаточно высоком контрасте, когда

$$\Delta\varphi(X, Y) \cong \pi,$$

достигал 4–6 [8, 19]. Это противоречие с классической теорией оптических систем может быть устранено, если принять во внимание, что понятие когерентной передаточной функции точки справедливо только для параксиального приближения [23, 24].

Под динамическим процессом в фазовом объекте мы подразумеваем равномерную выборку значений ОРХ  $h(X, Y, t + m\tau)$  в определенной области координат в плоскости изображения  $X, Y$ , где  $m = 0, 1, 2, \dots$ ,  $\tau$  — время измерения одного пикселя. Для определенности мы предположим, что измеряемые физическими методами флуктуации значений  $h(X, Y, t + m\tau)$  причинно связаны с зависящей от времени компонентой показателя преломления

$$n(r, t) = n(r) + \delta n(r, t),$$

где  $r(x, y, z)$  — координаты в плоскости объекта. Нас в дальнейшем будут интересовать пространственно-временные характеристики флуктуирующей компоненты  $\delta n(r, t)$  и связанные с ними движения. Выделение полезной биологической информации  $\delta n(r, t)$  из  $\Delta\varphi(X, Y, t)$  эквивалентно решению обратной задачи — нахождению динамических параметров системы по измеренным в

плоскости изображения значениям фазы рассеянной волны. Некорректность задачи и неоднозначность решений, как отмечалось ранее, связаны с измерением одной величины (ОРХ), в которую дают вклады многие параметры. Поэтому  $\delta n(r, t)$  следует формально рассматривать в качестве функционала от многих переменных.

Физические причины, приводящие к временным изменениям  $\delta n(r, t)$  в биообъектах, могут быть весьма разнообразны. Например, флуктуации  $\delta n(r, t)$  в ограниченной области координат  $X, Y$ , соответствующей проекции клеточной мембраны со встроенными ионными каналами и ферментными комплексами, могут быть следствием конформационных изменений белков, локальных вариаций мембранного потенциала и т.п., не связанных с трансляционным движением объекта в целом. Такие процессы практически недоступны наблюдениям методами классической микроскопии, поскольку малые изменения показателя преломления не влияют на интенсивность рассеянного излучения.

Другим примером локальных изменений  $\delta n(r, t)$ , связанных с трансляционным движением, могут быть хорошо известные движения вдоль микротрубочек макромолекул, митохондрий и других органелл, наблюдаемые методами флуоресцентной микроскопии и DIC-видеомикроскопии [12, 13, 25].

В фазовых изображениях такие объекты формально можно представить функцией координат центра  $(r, t)$  частицы с фиксированным объемом  $V$  и показателем преломления

$$\delta n(r, t) = \delta n(r - ut),$$

где  $u$  — проекция средней скорости на траекторию  $r(t)$ . Если регулярное трансляционное движение сопровождается случайными или периодическими флуктуациями, то это приведет к появлению соответствующих компонент в спектрах фазовых флуктуаций.

В дальнейшем мы ограничимся видами движений, которые можно представить функциями с разделяющимися переменными координат и времени

$$\delta n(r, t) = \sum_m \{ \delta n_m(r) \exp[j\Omega_m t] \},$$

где  $\delta n_m(r)$  — функции, удовлетворяющие граничным условиям,  $\Omega_m$  — собственные значения частоты,  $m = 1, 2, \dots$ . При этом предполагаем, что внутри конечного объема  $V$  происходят локальные синхронные колебания. Следовательно, измерения ОРХ  $h(r, t)$  в принципе могут дать ряд значимых динамических параметров объекта: локальные частоты собственных колебаний  $\Omega_m$ , радиусы и времена корреляции, а также другие характеристики, известные из статистической теории открытых систем [26].

Ниже мы приведем результаты измерений конкретных процессов, а здесь ограничимся замечанием, что в реальных условиях внутриклеточной микроскопии вклад отдельных макромолекул в  $\delta n(r, t)$  оказывается значительно ниже порога чувствительности интерферометров. При отсутствии взаимной корреляции в спектрах будут преобладать стохастические компоненты.

В связи с этим рассмотрим зависимость средней интенсивности флуктуаций фазы от взаимной корреляции движений между элементами объекта. Предположим, что при когерентном освещении поверхности

объекта источником с частотой  $\omega$  рассеянную волну  $E_{\Sigma}(t)$  на площадке изображения  $S$  с координатами центра  $X, Y$  можно представить сверткой

$$E(X, Y, t) = \iint E(x, y, t) P\left(\frac{X}{M} - x, \frac{Y}{M} - y\right) dx dy, \quad (2)$$

где  $P(X/M - x, Y/M - y)$  — когерентная передаточная функция,  $M$  — коэффициент линейного увеличения оптической системы,

$$E(x, y, t) = \sum_p \left\{ a_p(x, y, t) \exp(j[\omega t + \delta\varphi_p(x, y, t)]) \right\} \quad (3)$$

— поле вторичных источников от  $N$  элементов ( $1 \leq p \leq N$ ) с амплитудами  $a_p(t)$  и фазами

$$\delta\varphi_p(x, y, t) = \frac{2\pi h(x, y)}{\lambda} = \frac{2\pi}{\lambda} \int n(x, y, z) dz.$$

Пусть эти  $N$  идентичных по размерам динамических объектов расположены вблизи фокальной плоскости  $z = 0$  внутри слоя с границами  $z = \pm H/2$  (рис. 2) и могут быть представлены не зависящей от координат скалярной функцией показателя преломления

$$n_p(x, y, z, t) = n_p(t).$$

Предположим далее, что  $S$  есть площадь пикселя в плоскости изображения, размер которого ограничен дифракцией на апертуре объектива. Тогда интегрирование в (2) должно происходить по площади  $s = \pi w^2 = S/M^2$  круга радиуса  $w$ , где  $w$  есть физическое прост-

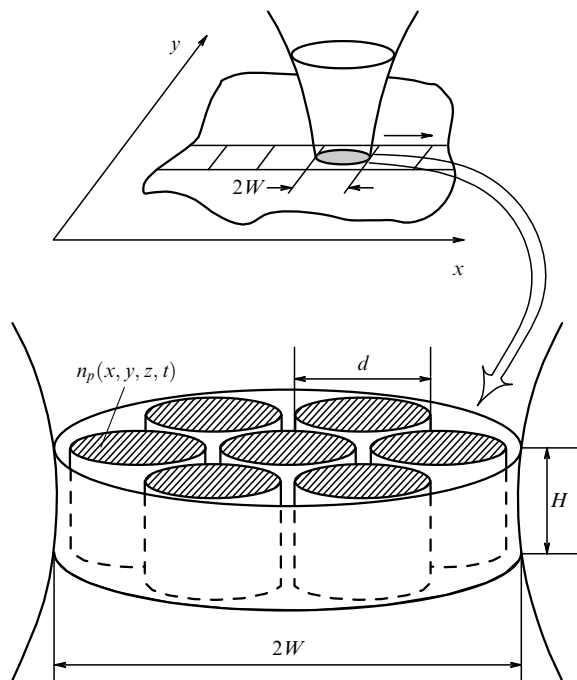


Рис. 2. Модель биообъекта с  $N$  идентичными элементами, флуктуации фазы которых частично коррелированы в пределах одного пикселя на площади кружка рассеяния  $S = \pi w^2$ . Интенсивность флуктуаций фазы рассеянной волны при полной пространственно-временной корреляции флуктуаций во всех элементах возрастает в  $N$  раз.

ранственное разрешение микроскопа. Естественно, эквивалентная процедура усреднения может быть произведена также в плоскости изображения  $X, Y$  на круге с площадью

$$S = \pi W^2,$$

где  $W/w = M$ .

Фотоприемник в плоскости изображения регистрирует среднюю по площади пикселя  $S$  интенсивность  $I_{\Sigma}(X, Y, t)$  интерференционного поля

$$\begin{aligned} I_{\Sigma}(X, Y, t) &= [E_{\Sigma} + E_r]^2 = \\ &= I_0 + 2E_0 E_{\Sigma}(X, Y, t) \cos[\varphi(X, Y, t) - \varphi_0(t)] = \\ &= I_0 + I_{\sim}(X, Y, t), \end{aligned}$$

где  $E_r(t) = E_0 \exp\{j[\omega t + \varphi_0(t)]\}$  — комплексная амплитуда опорной волны. Из переменной составляющей фототока  $I_{\sim}(X, Y, t)$  по некоторому алгоритму может быть определено среднее по площади  $S$  значение фазы интерференционного сигнала  $\varphi(X, Y, t)$ .

Естественно, что вклад рассеянной объектом волны

$$\begin{aligned} [E_{\Sigma}(X, Y, t)] \exp\{j\varphi(X, Y, t)\} &= \\ &= \sum_i \left\{ a_i(t) \exp(j[\omega t + \delta\varphi_i(t)]) \right\} \end{aligned}$$

в фазу переменной составляющей фототока  $I_{\sim}(X, Y, t)$  будет определяться статистическими характеристиками  $a_p(t)$  и  $\delta\varphi_p(t)$ .

Определим зависимость между флуктуациями  $\delta\varphi_p(t)$  и  $\delta\varphi(X, Y, t)$  в двух предельных случаях, предполагая отсутствие амплитудных флуктуаций. Тогда для малых флуктуаций ( $\delta\varphi_p(t) \ll 1, \delta\varphi(X, Y, t) \ll 1$ )

$$\delta\varphi(X, Y, t) \cong N^{-1} \sum_p \delta\varphi_p(t)$$

и

$$\langle E_{\Sigma}(X, Y, t) \rangle = \sum_p \langle a_p(t) \rangle = N \langle a_p(t) \rangle.$$

При отсутствии корреляции в фазовых флуктуациях динамических объектов:

$$\langle \delta\varphi_p(t) \delta\varphi_r(t + \tau) \rangle = 0 \quad (p \neq r),$$

корреляционная функция фазы интерференционного сигнала

$$\begin{aligned} K_{\Sigma}(X, Y, \tau) &= \langle \delta\varphi(X, Y, t) \delta\varphi(X, Y, t + \tau) \rangle = \\ &= N^{-2} \sum_p \sum_r \langle \delta\varphi_p(t) \delta\varphi_r(t + \tau) \rangle = N^{-1} k(\tau) \end{aligned} \quad (4)$$

будет в  $N$  раз меньше корреляционной функции фазы изолированного динамического объекта  $k(\tau) = \langle \delta\varphi_p(t) \times \delta\varphi_p(t + \tau) \rangle$ .

В другом предельном случае полной фазовой корреляции

$$K_{\Sigma}(X, Y, \tau) = N^{-2} \sum_p \sum_r \langle \delta\varphi_p(t) \delta\varphi_r(t + \tau) \rangle = k(\tau), \quad (5)$$

где

$$k(\tau) = \langle \delta\varphi_p(t) \delta\varphi_p(t + \tau) \rangle$$

— равные корреляционные функции фазы интерференционного сигнала и объекта.

Формулы (4) и (5) находятся в согласии с хорошо известным выводом о том, что в некоррелированных процессах суммируются интенсивности, а в коррелированных — амплитуды.

В соответствии с моделью на рис. 2 корреляция между фазами  $\delta\varphi_p(x, y, t)$  в различных элементах динамического объекта ( $1 \leq p \leq N$ ) возможна только при корреляции соответствующих флуктуаций коэффициента преломления

$$\langle \delta n_p(t) \delta n_p(t + \tau) \rangle \neq 0.$$

Если в спектрах флуктуаций отдельных элементов были доминирующие частотные компоненты, то при наличии корреляции их спектральная плотность

$$\rho(\Omega) = \frac{1}{2\pi} \int \langle n_p(t) n_p(t + \tau) \rangle \exp(-j\Omega\tau) d\tau$$

также возрастет в  $N$  раз. Для малых индексов модуляции  $[\delta\varphi_p(x, y, t)] \ll \pi$  спектры флуктуаций показателя преломления и фазы будут идентичны.

Из этого также следует, что преобладающий вклад в  $\delta\varphi(X, Y, t)$  будут давать кооперативные процессы с радиусами корреляции, соизмеримыми или большими размера пикселя. При частичной корреляции процессов их интенсивность при прочих равных условиях будет убывать с ростом числа  $N$  независимых элементов вместе с квадратом отношения радиуса корреляции  $R$  к разрешающей способности  $1/N = (R/W)^2$ .

Для иллюстрации рассмотрим численный пример. Предположим, что локальное изменение показателя преломления с амплитудой  $\delta n(t) = 0,1$  вызвано конформационными переходами в ферментном комплексе (например, в АТФазном) в области с линейными размерами  $20 \times 10 \times 10 \text{ нм}^3$  и объемом  $2 \times 10^{-6} \text{ мкм}^3$ . Эти комплексы расположены в виде тонкого слоя толщиной  $H = 20 \text{ нм}$  в фокальной плоскости объектива фазового микроскопа с линейным разрешением  $W = 0,1 \text{ мкм}$ . Для максимального числа ферментных комплексов на площади дифракционного пятна  $S = \pi W^2$ , соответствующего одному пикселю в плоскости изображения, получаем значение  $N \cong 300$ . При интенсивности флуктуаций ОРХ одного комплекса

$$\sigma_h^2 = \langle [H \delta n(t)]^2 \rangle = 2 \text{ нм}^2$$

и при отсутствии корреляции сумма вкладов в ОРХ от всех элементов будет

$$\sum_h \sigma_h^2 = N^{-1} \sigma_h^2 = 6,6 \times 10^{-3} \text{ нм}^2.$$

В противоположном случае полной корреляции флуктуации всех комплексов суммарная интенсивность  $\sum \sigma_h^2$  будет равна  $\sigma_h^2 = 2 \text{ нм}^2$ . При пороговой чувствительности  $h_{\min} = 0,5 \text{ нм}$  некогерентные флуктуации не будут заметны на фоне шумов, а при когерентном сложении они дадут превышение над уровнем шумов  $S/N = 4$ . При наличии в коррелированных флуктуациях гармонич-

еской компоненты со временем когерентности  $10 \text{ с}$  в фурье-спектре ей будет соответствовать спектральная плотность  $\rho(\Omega) = 20 \text{ нм}^2 \text{ Гц}^{-1}$ .

### 3. Компьютерный фазовый микроскоп

Оптическая схема компьютерного фазового микроскопа "Эйрискан" [27] (рис. 3), разработанного на базе интерференционного микроскопа МИИ-4 ЛОМО, является модификацией схемы микроинтерферометра Линника. В качестве источника когерентного излучения использовался одномодовый гелий-неоновый лазер ЛГ-207А ( $\lambda = 633 \text{ нм}$ ), что обеспечивало высокую точность фазовых измерений и не критичность к разности хода опорного и объектного лучей. Линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны осуществлялась зеркалом с пьезопреобразователем. Для регистрации интерференционного сигнала и его аналого-цифрового преобразования в локальные значения фазы использовались координатно-чувствительный фотоприемник-диссектор ЛИ-620 и электронный блок.

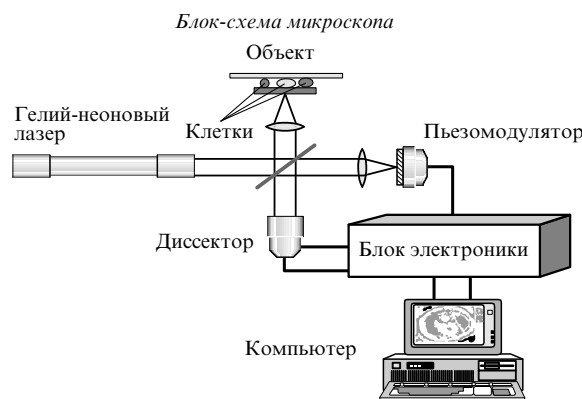


Рис. 3. Оптическая схема компьютерного фазового микроскопа "Эйрискан". Кювета с объектом устанавливается на предметном столе модифицированного микроинтерферометра Линника и освещается гелий-неоновым лазером. Линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны осуществляется зеркалом с пьезомодулятором. Для регистрации интерференционного сигнала и его аналого-цифрового преобразования в локальные значения фазы используется координатно-чувствительный фотоприемник — диссектор и блок электроники. Анализ фазового изображения и локальных флуктуаций оптической разности хода производится на компьютере.

Диссектор представляет собой электронно-оптический преобразователь с внешним фотоэффектом (без накопления заряда), с фотоэлектронным умножителем и магнитным переносом потока электронов в плоскость диафрагмы с малым отверстием. Сканирование проецированного на фотокатод изображения осуществляется магнитным полем. Пространственное разрешение, зависящее от диаметра отверстия диафрагмы, было около 200 линий. Размер и положение области сканирования определялись программой. Поле микроскопа могло изменяться в пределах 5–50 мкм, максимальная размерность изображения по одной координате — 1024 пикселя. Ограниченная шумами чувствительность была около  $h_{\min} = 0,5 \text{ нм}$ , периодичность выборки и скорость ввода изображения определялась частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель). Измеряемый объект (клетки,

органеллы) размещался в кювете с объемом 0,3 мл между полированной кремниевой подложкой и покровным стеклом. Внешний вид прибора "Эйрискан" показан на рис. 4. Кювета с объектом располагалась на предметном столе. Измерения производились в отраженном свете.

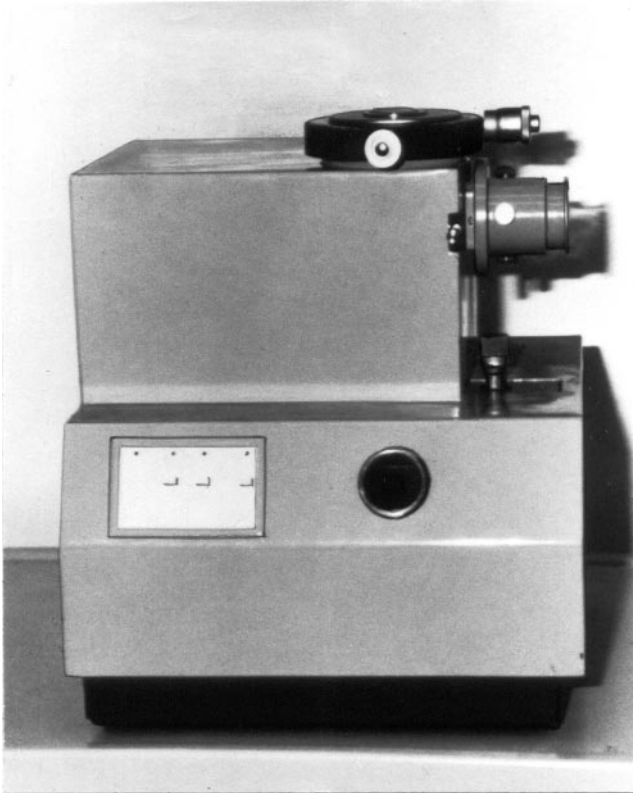


Рис. 4. Внешний вид микроскопа "Эйрискан", разработанного на базе серийного интерференционного микроскопа МИИ-4 ЛОМО.

Программное обеспечение позволяло получать двумерные псевдоцветные топограммы, профили фазовой высоты и ее дисперсию в произвольных сечениях, запись временных процессов вдоль произвольной линии в топограмме, вычитание тренда и экспорт файлов в кодах ASC-II.

В микроскопе был реализован компенсационный метод измерения фазы по одному значению фототока за период модуляции [22]. В этом методе фиксировался момент компенсации, а мгновенное значение фазы определялось по длительности нормированного временного интервала. Тестирование микроскопа производилось на эталонированных полупроводниковых микроструктурах и сферах латекса диаметром 100 нм [18, 19]. Измерения методом динамической фазовой микроскопии (ДФМ) осуществлялись в следующей последовательности.

1. *Получение фазового изображения.* Фототок диссектора пропорционален интенсивности распределения интерференционного поля

$$I_{\Sigma}(X, Y, t) = [E_{\Sigma} + E_r]^2 = I_0 + 2E_0 E_{\Sigma}(X, Y, t) \cos[\varphi(X, Y, t) - \varphi_0(t)]$$

в каждом пикселе  $X, Y$  изображения. В электронном блоке определялось локальное значение фазы  $\varphi(X, Y, t)$

за период модуляции  $T$  методом временных интервалов. Фазовое изображение в виде матрицы значений  $\varphi(X, Y, t)$  с максимальными значениями координат  $M_x, M_y$  ( $0 < X < M_x, 0 < Y < M_y$ ) раstra сохранялось в компьютере для последующей обработки. Время ввода изображения равно

$$T_{\sigma} = M_x M_y T.$$

В фазовом изображении объекта определялась область, в которой необходимо получить информацию о динамических процессах.

2. *Параметры временной выборки.* В методе ДФМ информацию о флуктуациях ОРХ получают на отрезке с координатами

$$R_1 = (X_1, Y_1) \quad \text{и} \quad R_2 = (X_2, Y_2).$$

В фазовом изображении объекта  $\varphi(X, Y)$  фиксируют координаты  $R_1$  и  $R_2$  и затем периодически с интервалом выборки

$$\tau = LT,$$

где  $L$  — длина отрезка в пикселях, производят измерения ОРХ при  $p$ -кратном сканировании отрезка  $R_1 - R_2$ . Полученная таким образом матрица (в дальнейшем — трек-диаграмма) содержит  $Lp$  элементов, где  $L$  — число столбцов,  $p$  — число строк, равное числу повторных сканов отрезка  $R_1 - R_2$  за время  $T_{\Sigma} = TLp$ . Трек-диаграмма содержит информацию о процессах в каждом  $j$ -м пикселе скан-линии ( $1 \leq j \leq L, 0 < t < T_{\Sigma}$ ). Сечение трек-диаграммы в фиксированной точке  $j$  дает "сигнал" в виде выборки значений

$$h_j(t + m\tau) \quad (m = 0, 1, 2, \dots),$$

по которому можно визуально определить характерные черты процесса. Фурье-преобразование матрицы  $Lp$  позволяет выделить в спектрах флуктуаций  $\rho(\Omega, j)$  ( $0 < j < L$ ) доминирующие частотные компоненты и определить их протяженность вдоль скан-линии. Предельная частота спектра

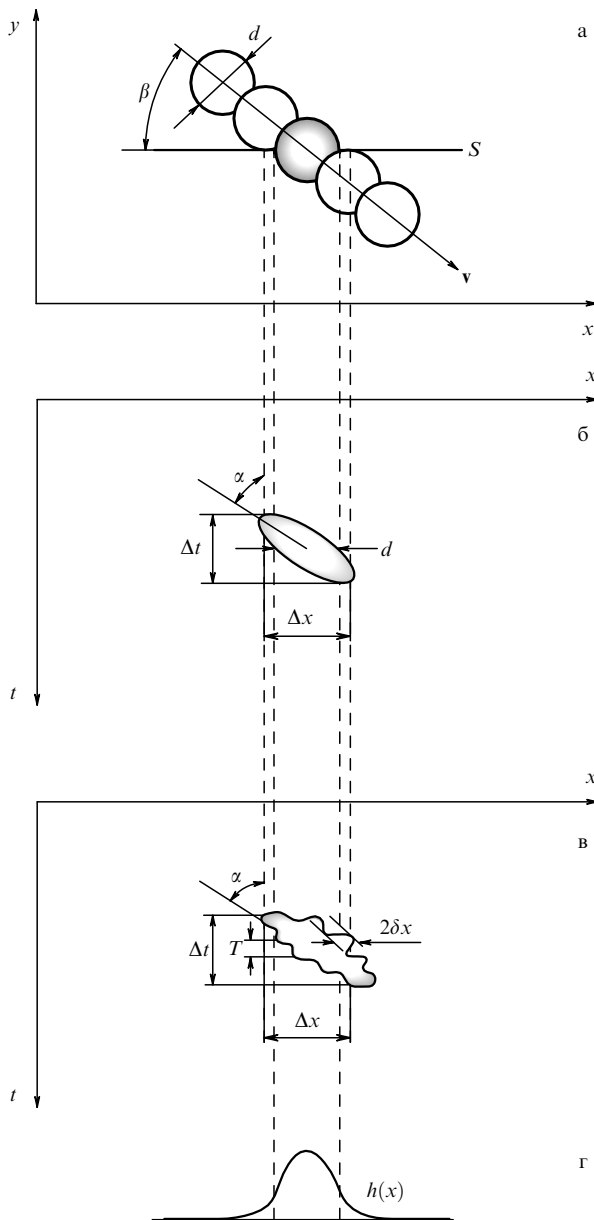
$$F_N = \frac{1}{2\tau} = \frac{1}{2LT}$$

обратно пропорциональна длине скан-линии  $L$ , поэтому при заданном периоде модуляции  $T = 1$  мс необходимо находить компромиссное значение частоты Найквиста  $F_N$  и длины скан-линии  $L$ .

3. *Корреляционный и спектральный анализ.* Статистический анализ процессов производился путем обработки  $Lp$ -матрицы в математических программах. "Спектральные портреты"  $\rho(\Omega, j)$  позволяли определить спектральную плотность в фиксированных  $j$  точках скан-линии и найти "профиль"  $\rho(j)$  спектральной компоненты  $\Omega = \text{const}$ . Корреляторы  $\langle h_j(t) h_i(t + \tau) \rangle$  позволяли определить основные статистические характеристики процессов: интенсивность флуктуаций ОРХ  $\langle h_j(t)^2 \rangle$ , время когерентности, радиус корреляции, гистограммы и т.п., а также сравнить эти функции с профилем ОРХ  $h(X_j)$  и установить связь флуктуаций с морфологией объекта.

Методом ДФМ можно было также получить ограниченную информацию о параметрах трансляционного движения частиц (рис. 5а). Предположим, что сферическая частица диаметра  $d$  движется в плоскости  $x, y$  с постоянной скоростью  $v$  под углом  $\beta$  к направлению





**Рис. 5.** Определение параметров трансляционного движения частиц: (а) сферическая частица диаметра  $d$  движется в плоскости  $x, y$  с постоянной скоростью  $v$  под углом  $\beta$  к направлению скан-линии  $S$ ; (б) на трек-диаграмме виден "след" от пересечения частицей скан-линии за время  $\Delta t = d/v_y$  в виде эллипса с углом наклона большой оси  $\alpha$ ,  $\tan \alpha = v_x = (\Delta x - d)/\Delta t$ ; угол  $\beta$  связан с шириной "следа" формулой  $\tan \beta = d/(\Delta x - d)$ ; (в) при наличии дополнительных периодических осцилляций координат частицы  $r(t) = r_0 + vt + \delta r \cos(\Omega t)$  на границах "следа" появляются характерные осцилляции с амплитудой  $\delta x = \delta r \cos \beta$  и периодом  $T = 2\pi/\Omega$ ; (г) профиль фазовой высоты частицы.

скан-линии  $S$ . На трек-диаграмме (рис. 5б) "след" от пересечения частицей скан-линии за время  $\Delta t = d/v_y$  имеет вид эллипса с углом наклона большой оси  $\alpha$ ,

$$\tan \alpha = v_x = \frac{\Delta x - d}{\Delta t}.$$

Угол  $\beta$  можно определить по формуле

$$\tan \beta = \frac{d}{\Delta x - d}.$$

Горизонтальное сечение эллипса в средней его части дает профиль фазовой высоты и позволяет определить диаметр частицы, профиль которой  $h(x)$  показан на рис. 5г. Если движение частицы неравномерно и она, например, имеет кроме постоянной компоненты скорости  $v$  периодические осцилляции координат  $\delta r \cos(\Omega t)$  с частотой  $\Omega$  и движение ее центра имеет вид

$$r(t) = r_0 + vt + \delta r \cos(\Omega t),$$

то на границах ее "следа" будут наблюдаться характерные осцилляции (рис. 5в).

#### 4. Информационные аспекты прижизненной фазовой микроскопии

Основной целью методов прижизненной микроскопии является получение новой количественной информации о внутриклеточных процессах. Для установления причинно-следственных связей во временных процессах необходимо одновременно производить измерения в нескольких участках объекта. Поскольку каждый из методов дает ограниченную информацию о морфологии и локальных процессах, всегда предпочтительны комбинированные устройства, в которых дополнительная информация получается в результате одновременных измерений несколькими методами. Примерами таких устройств может служить комбинация DIC и флуоресцентного микроскопов, микроскопов ближнего поля и обычного дальнего поля. Но далеко не все перспективные методы прижизненной микроскопии технически совместимы.

Примером фундаментальных задач, в которых решающее значение имеет изучение последовательности динамических процессов, может служить исследование фаз клеточного цикла в ядре и процесс программированной клеточной смерти (апоптоз). Например, в фазе  $G_1$  характерным процессом является интенсивный синтез рибосом в ядрышках [1]. Затем в  $S$ -фазе происходит активный транспорт аминокислот через ядерную мембрану и репликация хромосом, в профазе — репликация центриолей и сборка веретена [1]. Многие из этих процессов имеют характерные признаки самоорганизации и пространственно-временной корреляции. В апоптозе критической точкой является "сигнал", запускающий гены самоубийства, за которыми следует каскад реакций уничтожения внутриклеточных компонентов. Естественно, что кроме хорошо наблюдаемых структурных изменений эти процессы также сопровождаются более быстрыми конформационными изменениями макромолекул, работой ионных каналов, изменениями мембранного потенциала и т.д. Эти изменения на молекулярном уровне, по-видимому, приводят к изменениям поляризуемости и локальной плотности и в конечном счете к макроскопическим изменениям оптических параметров.

Иерархия пространственно-временных процессов в клетке весьма сложна, и пока нет общепризнанного подхода для их формального описания. Одно из возможных решений может быть основано на аналогии структуры некоторых органелл (мембран, актин-миозиновых комплексов) со структурой жидких кристаллов [28], в частности образованных липидами. В этом приближении биообъект можно представить в виде пространственно неоднородной динамической структуры, макро-

скопические оптические свойства которой могут быть представлены тензором восприимчивости  $\chi_{\alpha\beta}(r, t)$ , связывающим поляризацию  $P_\alpha = \varepsilon_0 \chi_{\alpha\beta} E_\beta$  и поле  $E$  (здесь  $\alpha, \beta = x, y, z$ ). Регистрируемые оптическими методами сигналы связаны с изменениями компонент тензора  $\chi_{\alpha\beta}(r, t)$ , и их интенсивность будет возрастать с радиусом корреляции флуктуаций. Динамическое рассеяние света на доменах Вильямса в нематических жидких кристаллах [28] может быть аналогом эффектов, возникающих в органеллах клетки при кооперативных процессах. Мы будем исходить из принятых в физике жидких кристаллов моделей и считать, что зависящий от координат и времени тензор показателя преломления может служить адекватным параметром порядка. Нам не известно, в каком виде хранится в ДНК информация, контролирующая пространственно-временной характер процессов в клетке. Можно только предполагать, что они в значительной мере детерминированы и роль случайных факторов относительно невелика. Мы здесь ограничиваемся самыми общими соображениями и оставляем в стороне много вопросов, связанных с физической реализуемостью, однозначностью и интерпретацией этих "сигналов".

Физические причины самоорганизации и сохранения макроскопического порядка в биосистемах были предметом многих работ, начиная с пионерской работы Шрёдингера [29]. В работах Хакена и Шмицу [30, 31] обсуждалась функциональная связь между макро- и микросистемами и отмечалась универсальность синергетического подхода для описания кооперативных процессов на субклеточном уровне. Среди приведенных в [30] необходимых и достаточных условий самоорганизации мы отметим основное.

*Органелла должна иметь достаточное число идентичных активных элементов. Результатом их взаимодействия должно быть состояние, описываемое параметром порядка.*

Можно предполагать, что условия самоорганизации [30] при определенных обстоятельствах могут выполняться также в ансамблях связанных ферментных комплексов. Однако нам не известны факты, подтверждающие существование в органеллах когерентных состояний, сопровождающихся колебаниями параметра порядка с какими-либо характерными частотами.

## 5. Результаты измерений

Здесь мы приводим некоторые результаты измерений, иллюстрирующих принцип действия и возможности микроскопа. Биологические препараты в буферном растворе предварительно помещались в кювету с полированной кремниевой пластинкой и закрывались покровным стеклом. Фокусировка производилась визуально по изображению объекта на матовом стекле в когерентном свете. Аттестация размеров рабочего поля для каждого объектива производилась при помощи дифракционной решетки  $1200 \text{ мм}^{-1}$ .

На рисунке 6 показаны топограмма, профиль сечения и 3D-изображение частицы латекса диаметром 100 нм, полученные с использованием объектива Zeiss ( $100\times/0,9$ ). Водная суспензия латекса наносилась на полированную подложку и располагалась на предметном столе. После высыхания суспензии на подложке были видны частицы латекса в виде точек. Фокусировка с точностью до

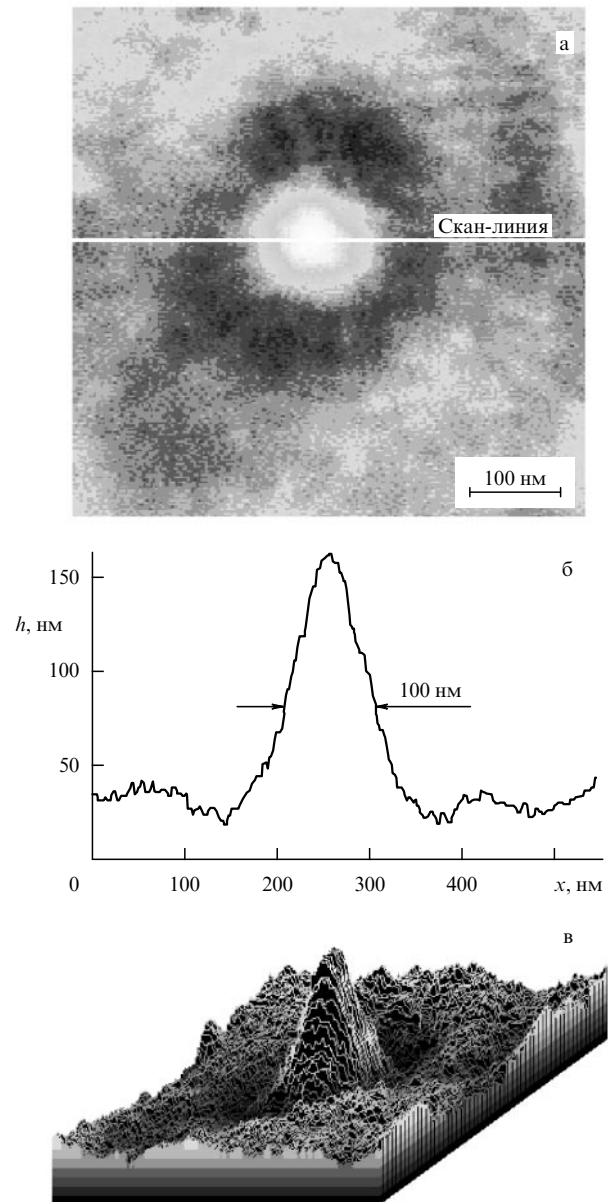


Рис. 6. Фазовые изображения частицы латекса диаметром 100 нм иллюстрируют возможность сверхразрешения: (а) топограмма с линией сканирования; (б) профиль фазовой высоты; (в) трехмерное фазовое изображение частицы.

десятков нанометров производилась по максимальному контрасту профиля в режиме сканирования изображения. Ширина и фазовая высота профиля вследствие ограниченного дифракцией разрешения зависела от числовой апертуры  $NA$  объектива. Для объектива с числовой апертурой  $NA = 0,9$  при длине волны  $\lambda = 633 \text{ нм}$  классическое разрешение по Рэлю равно  $R_R = 430 \text{ нм}$ . Параметру сверхразрешения  $S_R = R_R/d$ , где  $d$  — минимальный измеряемый линейный размер, в приведенном примере соответствует значение  $S_R = 4,3$ . Измерения с различными объективами показали [18], что заметное сверхразрешение получается только при больших апертурах. Максимальная фазовая высота профиля (ОРХ) зависела от  $NA$  и фокусировки. Аналогичные результаты были получены для щели шириной 100 нм в аттестованной полупроводниковой структуре [18, 19].

Ограниченная уровнем собственных шумов чувствительность  $h_{\min} = 0,5$  нм была определена по дисперсии флуктуаций в фиксированной точке изображения.

В изображениях биообъектов при большом увеличении также можно было наблюдать малоразмерные структуры, однако их отождествление с изображениями, полученными на электронном микроскопе, было недостаточно надежным. Более уверенная интерпретация фазовых изображений получалась для сравнительно больших биообъектов.

На рисунке 7 показано 3D-изображение ядра с едва различимым ядрышком в центре для клетки *Vero*, находящейся в фазе  $G_1$ . Оптически более плотное ядро хорошо видно в проекции

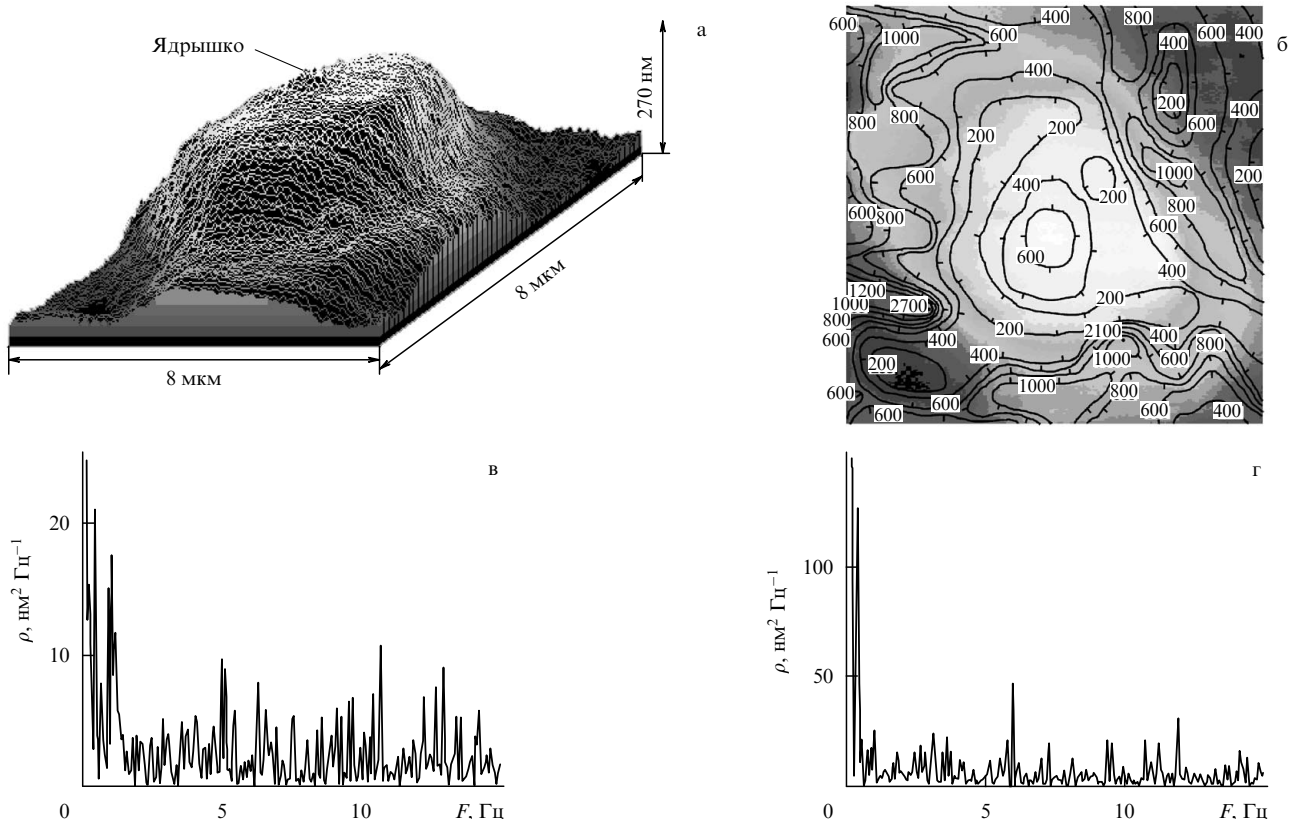
$$h(x, y) = \int n(x, y, z) dz$$

на фоне окружающей его цитоплазмы. В предположении сферической формы ядра диаметра  $d = 7$  мкм для указанной на рис. 7а средней разности фазовых высот  $\Delta h = 270$  нм можно получить оценку разности показателей преломления ядра и цитоплазмы

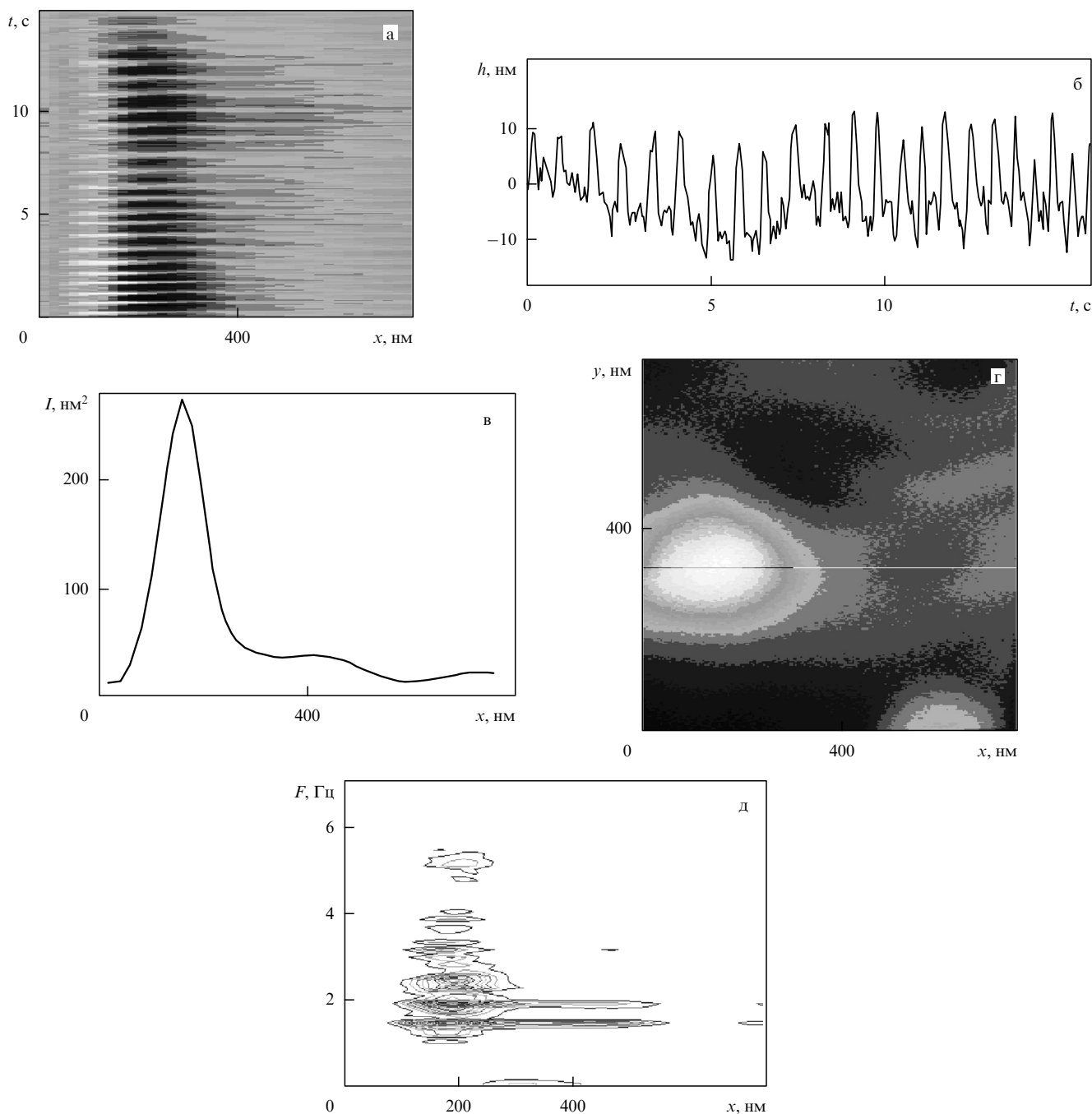
$$\Delta n \cong \frac{\Delta h}{d} = 0,04.$$

На рисунке 7б показана топограмма ядра с изолиниями интенсивности флуктуаций  $I(X, Y)$  в  $\text{\AA}^2$ . Положение максимума в центре, где  $I = 600 \text{\AA}^2$ , совпадает с ядрыш-

ком. Характерный для этой области спектр флуктуаций на рис. 7в содержит несколько контрастных компонент с частотами  $F = 1, 5; 5; 6,5; 11$  Гц. Функция ядрышка состоит в синтезе субъединиц рибосом, и можно предполагать, что интенсивности и частоты спектральных компонент зависят от скорости синтеза. На периферии проекции ядра видно несколько максимумов с интенсивностью до  $2700 \text{\AA}^2$ , которые предположительно связаны с конденсацией пристеночного хроматина. В спектрах флуктуаций в периферийных областях ядра также присутствовали контрастные компоненты. Один из таких спектров с компонентами  $F = 5,9$  Гц и  $F = 11,8$  Гц показан на рис. 7г. Кратность частот, по-видимому, является признаком ангармоничности колебаний с основной частотой 5,9 Гц. Интенсивные низкочастотные ( $F < 0,3$  Гц) компоненты в спектрах связаны с медленными движениями ядра в целом и с дрейфом интерферометра. В ряде случаев флуктуации были настолько интенсивны, что их можно было в интерференционном изображении наблюдать визуально. В качестве иллюстрации такого интенсивного движения на рис. 8 приведены результаты измерений биений ресничек бактерии. Трек-диаграмма процесса с хорошо различимыми горизонтальными полосами периодического изменения ОРХ на отрезке  $\Delta X = 800$  нм и временем регистрации  $T = 15$  с приведена на рис. 8а. Регистровая диаграмма в фиксированной точке скан-линии (рис. 8б), которая получается из вертикального сечения трека-диаграммы, позволяла



**Рис. 7.** Результаты измерений флуктуаций в ядре клетки *Vero*, находящейся в фазе  $G_1$  клеточного цикла: (а) 3D-изображение ядра с едва различимым ядрышком в центре (оптически более плотное ядро хорошо видно в проекции  $h(x, y) = \int n(x, y, z) dz$  на фоне окружающей его цитоплазмы); (б) на топограмме ядра показаны изолинии интенсивности флуктуаций  $I(X, Y)$  в  $\text{\AA}^2$  (максимум в центре с  $I = 600 \text{\AA}^2$  совпадает с положением ядрышка); (в) характерный для этой области спектр флуктуаций содержит несколько контрастных компонент с частотами  $F = 1, 5; 5; 6,5; 11$  Гц; (г) в спектрах флуктуаций на периферии ядра (где более заметны процессы конденсации пристеночного хроматина) присутствуют контрастные компоненты с частотами  $F = 5,9; 11,8$  Гц.



**Рис. 8.** Измерения биений ресничек бактерии: (а) трек-диаграмма процесса с хорошо различимыми горизонтальными полосами периодического изменения ОРХ на скан-линии протяженностью  $\Delta X = 800$  нм и временем регистрации  $T = 15$  с; (б) регистрограмма в фиксированной точке скан-линии, которая получается из вертикального сечения трек-диаграммы, позволяет определить характерные особенности движения ресничек, период и амплитуду изменений ОРХ; (в) изменение интенсивности флуктуаций вдоль скан-линии указывает на локализацию процесса в области шириной около 150 нм, которая заметно меньше визуально наблюдаемого размера бактерии; (г) топограмма бактерии со скан-линией; (д) спектральный портрет позволяет получить дополнительную информацию о локализации характерных частот. Ангармонизм движения наблюдался только в окрестности максимума. Расщепление (2 Гц)-компоненты обусловлено непостоянством периода колебаний за время измерений.

определить характерные особенности движения ресничек, период и амплитуду изменений ОРХ. Из рисунка 8б видна большая ( $\cong 20$  нм) амплитуда ОРХ, непостоянство периода колебаний и их ангармоничность. Следует напомнить, что измеренная амплитуда изменений ОРХ вследствие  $\Delta n < 1$  заметно меньше реальной. Изменение интенсивности флуктуаций вдоль скан-линии на рис. 8в указывает на локализацию процесса в области шириной

около 150 нм, которая была несколько меньше визуально наблюдаемого размера бактерии. Спектральный портрет на рис. 8г позволяет получить дополнительную информацию. Ангармонизм движения наблюдался только в окрестности максимума, а справа от него колебания были гармоническими. Расщепление компоненты с частотой 2 Гц обусловлено непостоянством периода на рис. 8б. Следует обратить внимание на то,

что динамические характеристики процесса приведены в абсолютных единицах ОРХ. Это позволяет сравнивать результаты измерений, полученные на различных объектах и при различных условиях.

Контрастные компоненты наблюдались также в спектрах флуктуаций клеток крови, в митохондриях, ферментных комплексах и других биообъектах.

## 6. Заключение

В живой клетке на различных уровнях ее организации одновременно происходит много биохимических реакций и биофизических процессов, которые сопровождаются изменением локальных макроскопических параметров и в принципе могут быть зарегистрированы оптическими методами. Изменения показателя преломления наиболее заметны в фазовых изображениях, которые относятся к широкому классу функциональных изображений. Впервые особенности функциональных изображений биообъектов при когерентном освещении были рассмотрены в книге [32]. Применение когерентных источников света позволило не только повысить точность измерений в фазовых микроскопах, но также реализовать качественно новый метод динамической фазовой микроскопии (ДФМ). Этот метод основан на равномерной выборке значений ОРХ вдоль скан-линии в фазовом изображении объекта и на последующем спектральном и корреляционном анализе сигналов. Простые физические соображения показывают, что преобладающий вклад во флуктуации ОРХ дают процессы с большим радиусом корреляции, который в случае синхронного движения макромолекул может заметно превосходить их поперечный размер. Несложный анализ показал, что вклад таких кооперативных процессов при пространственно-временной корреляции будет возрастать в  $N$  раз, где  $N$  — число проецированных в один пиксель макромолекул. Поэтому метод ДФМ обладает повышенной чувствительностью к пространственно-коррелированным и когерентным компонентам флуктуаций и к кооперативным процессам.

ДНК является единственным материальным носителем генетической информации и определяет с ограниченной детерминированностью в неявном виде последовательность процессов на различных уровнях организации. Эту наследственную информацию можно условно назвать "временным геномом" независимо от того, что нам не известно, как в последовательности нуклеотидов записана информация, регламентирующая динамические процессы. Естественно, что без надежных механизмов хранения, считывания и реализации этой информации было бы невозможно сохранение вида. Мы можем только предполагать, что контролируемые ДНК процессы имеют детерминированную временную структуру, которая в принципе может быть обнаружена неинвазивными методами в виде оптических сигналов. Вполне оправдана попытка, используя доступные оптические методы, понять на молекулярном уровне структуру "временного генома", механизмов управления динамическими процессами, их синхронизации и пространственно-временной корреляции. В последнее время усилился интерес к одномолекулярной энзимологии [33] и высказывается надежда идентифицировать последовательность шагов транскрипции генетической информации, регистрируемой в реальном времени [34].

Чувствительность современных флуоресцентных методов достаточна для обнаружения отдельных макромолекул, но до последнего времени сравнительно быстрые динамические процессы в нативных клетках (без флуоресцентных меток) были практически недоступны наблюдению на молекулярном уровне. Более реалистичский подход к решению этой проблемы основан на предположении, что по крайней мере некоторые биопроцессы сопровождаются конформационными переходами в макромолекулах и могут приводить к заметным локальным макроскопическим флуктуациям показателя преломления. Они окажутся доступными измерениям интерференционными оптическими методами, если соответствующие локальные значения ОРХ будут выше уровня шумов.

Значительно труднее идентифицировать такие оптические сигналы с реальными процессами в живой клетке или ее органелле. Из приведенных примеров следует, что только в некоторых случаях, когда известна "структура-функция" органеллы, удастся контрастные спектральные компоненты отождествить с конкретным процессом. Каждый элемент клетки, который проецируется в данную точку изображения, дает вклад в динамические процессы. Поэтому в каждом пикселе может одновременно присутствовать несколько сигналов от органелл, расположенных вне фокальной плоскости. Даже если сигналы удастся дифференцировать и выделить в них воспроизводимые специфические "фонетические" или структурные признаки, для их отождествления с конкретными процессами потребуются значительные усилия. Аналогичные проблемы по расшифровке последовательности нуклеотидов в генах были успешно решены на морфологическом уровне. В связи с "временным геномом" эти проблемы могут быть условно обозначены как "сигнал-структура-процесс". Накопленные к настоящему времени сведения об основных биохимических процессах и методах их контроля позволяют надеяться на успешные шаги в этом направлении. Действительно, если принять во внимание, что почти все известные биохимические процессы энергозависимы, то активность АТФазы может быть одним из первых объектов таких исследований. Ансамбль АТФазных комплексов можно рассматривать как систему тождественных активных осцилляторов. При динамическом взаимодействии между ними возникают процессы самосинхронизации [30] и когерентные состояния, характеризующиеся набором собственных функций и частот. Радиус корреляции и время когерентности могут служить количественными характеристиками степени кооперативности процессов в такой самоорганизующейся системе.

Из приведенного анализа и результатов предварительных исследований мы делаем вывод о перспективности применения метода когерентной фазовой микроскопии в изучении внутриклеточных процессов.

Работа выполнена при поддержке программы Innovations-Kolleg-27 университета г. Росток (Германия). Автор благодарит профессора Д. Вайса и профессора Л.С. Ягужинского за полезные дискуссии.

## Список литературы

1. Bruce A B et al. *Molecular Biology of the Cell* 3rd ed. (New York: Garland Publ., 1994)
2. Straub M, Hell S W *Appl. Phys. Lett.* **73** 1769 (1998)

3. Schrader M, Hell S W *J. Appl. Phys.* **84** 4033 (1998); Hell S W, Nagorni M *Opt. Lett.* **23** 1526 (1998)
4. Farkas D L et al. *Comput. Med. Imag. Graph.* (1998)
5. Mehta A D et al. *Science* **283** 1689 (1999)
6. Noji H et al. *Nature* **386** 299 (1997)
7. De Beer E L et al. *Cell Motil.* **38** 341 (1997)
8. Tuvia S et al. *Proc. Natl: Acad. Sci.* **94** 5045 (1997)
9. Farkas D L et al. *Annu. Rev. Physiol.* **55** 785 (1993)
10. Wachman E S, Nju W, Farkas D L *Biophys. J.* **73** 1215 (1997)
11. Борн М, Вольф Э *Основы оптики* (М.: Наука, 1970) с. 87
12. Weiss D G et al., in *Light Microscopy in Biology — A Practical Approach* (Ed. A J Lacey) (Oxford: Oxford, University Press, 1999) p. 73
13. Innoue S, Spring K R *Video Microscopy: The fundamentals* 2nd ed (New York: Plenum Press, 1997)
14. Schneider B et al., in *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes* Vol. 2 (Ed. J Slavic) (New York: Plenum Press, 1998) p. 63
15. Edelmann P et al. *Optik* **110** 194 (1999)
16. Tychinsky V et al. *Proc. SPIE* **1647** 96 (1992)
17. Tychinsky V et al. *Proc. SPIE* **2100** 129 (1993)
18. Тычинский В П и др. *Квантовая электроника* **24** (8) 754 (1997)
19. Тычинский В П и др. *Письма в ЖТФ* **17** (21–22) 80 (1991)
20. Schmit J, Creath K *Proc. SPIE* **2544** 102 (1995)
21. Creath K *Proc. SPIE* **1319** (1990)
22. Тычинский В П, Захаров В П, Снежко Ю А *Квантовая электроника* **6** 114 (1976)
23. Солимено С, Крозиньяни Б, Ди Порто П *Дифракция и волноводное распространение оптического излучения* (М.: Мир, 1989)
24. Тычинский В П *УФН* **166** 1219 (1996)
25. Weiss D G, Seitz-Tutter D, Langford G M *J. Cell Sci.* **S14** 157 (1991)
26. Климонтович Ю Л *Статистическая теория открытых систем* (М.: Янус, 1995)
27. Tychinsky V P et al. *Opt. Commun.* **74** 37 (1989)
28. Де Жен П *Физика жидких кристаллов* (М.: Мир, 1977)
29. Schrödinger E *What is Life?* (Cambridge: Cambridge University Press, 1944)
30. Shimizu H, Haken H J. *Theor. Biol.* **104** 261 (1983)
31. Shimizu H *Adv. Biophys.* **13** 195 (1979)
32. Иваницкий Г Р, Куниский А С *Исследование микроструктуры объектов методами когерентной оптики* 2-е изд. (М.: Энергия, 1981)
33. Xie S X, Lu H P *J. Biol. Chem.* **274** 15967 (1999)
34. Harada Y et al. *Nature* **409** 113 (2001)

### Coherent phase microscopy of intracellular processes

V.P. Tychinskii

Moscow State Institute for Radio-engineering, Electronics and Automation,  
 prosp. Vernadskogo 78, 117454 Moscow, Russian Federation  
 E-mail: vladimir@tych.pvt.msu.su

Information encoded in DNA implicitly determines the sequence of processes followed by living matter on various levels of its organization. Information about processes in the living cell is mainly obtained using optical microscopy techniques, and it is the development of such techniques based on modern advances in laser and computer technology that will, to a large extent, pace progress in biology. In this review, current microscopy techniques for the functional imaging of alive cells are discussed with particular emphasis on the coherent dynamic phase microscopy, in which local fluctuations in the refractive index are measured. The results obtained with a laser phase microscope are presented.

PACS numbers: **42.30.-d**, **87.16.-b**, 87.64.Rr

Bibliography — 34 references