



Оригинальная статья

# Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии

Василенко И.А.<sup>1,2</sup> • Метелин В.Б.<sup>1,2</sup> • Игнатьев П.С.<sup>3</sup> • Кардашова З.З.<sup>2</sup> • Лифенко Р.А.<sup>4</sup>

**Василенко Ирина Анатольевна** – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры прикладной математики и программирования; заведующая научно-исследовательской лабораторией<sup>2</sup>

✉ 117997, г. Москва, ул. Садовническая, 33–1, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 951 54 97.

E-mail: vasilenko0604@gmail.com

**Метелин Владислав Борисович** – канд. биол. наук, доцент кафедры клинической психологии<sup>1</sup>; вед. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>

**Игнатьев Павел Сергеевич** – канд. физ.-мат. наук, главный конструктор<sup>3</sup>

**Кардашова Зивер Заиддин кызы** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>

**Лифенко Роман Александрович** – канд. мед. наук, главный врач<sup>4</sup>

В статье дан обзор современных методов интерференционной микроскопии живых функционирующих клеток, позволяющих на макромолекулярном уровне исследовать динамику субклеточных микроструктур в режиме реального времени с формированием двумерных и трехмерных реконструкций изображения и проведением многопараметрового анализа данных. Показана возможность получения новой диагностической информации в рамках научной методологии так называемого интерактивного диалога с клеткой с целью выявления изменений морфофункционального состояния живых клеток при регистрации их отклика на изменение внешних условий в реальном времени. Описаны физические основы лазерной интерферометрии, проблемы и особенности интерпретации фазовых изображений клеток. В качестве иллюстрации практического использования технологии в условиях клиники представлены собственные результаты исследования морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови у пациентов со злокачественными опухолями ротовой полости и разными стадиями опухолевого процесса. Анализ циркулирующей популяции тромбоцитов с использованием технологии лазерной интерферометрии реального времени позволил выявить наличие компенсированной активации тромбоцитарного звена гемостаза у обследованных больных,

зависимость между тяжестью онкологического заболевания и изменением размерных параметров клеток (увеличение средних значений диаметра и площади циркулирующих тромбоцитов на 23,4, 26,8 и 30,3%, и на 30,2, 32,5 и 38,1% у пациентов со II, III и IV стадиями злокачественных опухолей ротовой полости соответственно;  $p < 0,05$  для всех сравнений). Отмечено, что условием масштабирования новых диагностических технологий служит проведение критической оценки эффективности их практической реализации, выявление преимуществ, недостатков и различий между существующими и предлагаемыми диагностическими платформами.

**Ключевые слова:** трансляционная медицина, диагностика, лазерная интерференционная микроскопия, тромбоциты, морфофункциональное состояние, онкология

**Для цитирования:** Василенко ИА, Метелин ВБ, Игнатьев ПС, Кардашова ЗЗ, Лифенко РА. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):748–57. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.

Поступила 17.12.2018;  
принята к публикации 19.12.2018

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»; 117997, г. Москва, ул. Садовническая, 33–1, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

<sup>3</sup> АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова»; 620100, г. Екатеринбург, ул. Восточная, 33Б, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГБУЗ СК «Минераловодская районная больница»; 357202, г. Минеральные Воды, ул. Гагарина, 67А, Российская Федерация

**Т**рансляционная медицина представляет собой новый этап развития медицинской науки, в основе которого лежит междисциплинарная методология эффективного переноса (трансляции) результатов фундаментальных и прикладных исследований в сферу их практического применения. Одним из приоритетных направлений трансляционной

медицины считается разработка, совершенствование, внедрение и масштабирование инновационных диагностических технологий [1, 2]. При этом основные усилия специалистов направлены на создание высокотехнологичных методов, реализующих возможность визуализации, регистрации, мониторинга и многопараметрового анализа полученных данных с привлечением



современных математических алгоритмов восстановления и обработки медицинских изображений. Важную роль в этом процессе играют диагностические оптические системы и аппаратно-программные комплексы на основе интерференционной микроскопии и цифровой голографии, которые по сравнению с традиционными методами обладают ценными преимуществами (неинвазивность, быстродействие, сверхразрешение и др.), существенно расширяющими арсенал их применения в медико-биологических исследованиях [3–5].

Впервые возможности интерференционной микроскопии, основанной на принципах интерференции прямого и дифрагированного света в плоскости изображения, были продемонстрированы Эрнстом Аббе более 100 лет назад. Середина XX в. ознаменовалась созданием и использованием различных форм интерференционной микроскопии для качественной визуализации клеток на основе оптических схем Линника, Миро и Маха – Цандера. Однако из-за ряда технических проблем и активного развития новых методов электронной и флуоресцентной микроскопии применение интерференционной микроскопии оказалось незаслуженно ограниченным. Повторный всплеск интереса к данному методу приходится на начало 2000-х гг. и связан с совершенствованием элементной базы, развитием компьютерных технологий анализа и обработки данных [6–8].

Современные когерентные интерферометры реализуют переход от описательной к количественной морфологии живых функционирующих клеток на макромолекулярном уровне, позволяют исследователю в реальном времени отслеживать изменения субклеточных структур в широком диапазоне внешних воздействий с формированием двумерных и трехмерных реконструкций изображения и проведением многопараметрового анализа полученных данных [9–11]. А возможность представления результатов в количественной форме (квантификация), наглядность, высокая разрешающая способность, чувствительность и точность делают данный тип микроскопии универсальным инструментом для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований.

В одной из основополагающих работ, посвященных динамической лазерной интерферометрии в рамках исследовательской концепции «сигнал – структура – функция», была впервые сформулирована методология так называемого интерактивного диалога с клеткой [12]. Цель

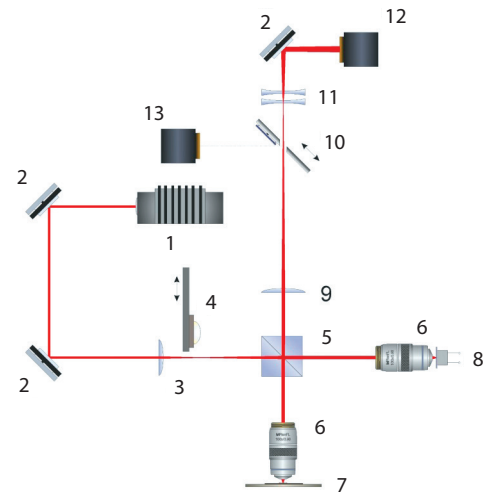
«диалога» – выявление и максимальная объективизация бесконечно малых изменений морфофункционального состояния живых клеток и тканей при исследовании пространственно-временной динамики субклеточных структур путем регистрации в реальном времени их отклика на изменение внешних условий. В результате применения инновационного подхода на междисциплинарной платформе взаимодействия физиков, математиков, биологов и медиков получены новые фундаментальные данные по установлению причинно-следственных связей между внутриклеточными процессами в детерминированных клеточных структурах с учетом тончайших изменений морфологической, метаболической и функциональной компонент их функционирования в условиях адаптационной нормы, дизадаптации и патологии [13–16]. Эти разработки убедительно продемонстрировали, что интерференционная микроскопия представляет собой перспективный метод клеточной диагностики на уровне наноразмерных внутриклеточных структур с сохранением их нативных свойств, который может быть востребован при решении широкого круга биомедицинских проблем, связанных с оптимизацией диагностики и лечения. Наиболее значимые результаты фундаментальных научных исследований в области клеточной биофизики и физиологии, молекулярной биологии и биохимии, полученные с использованием автоматических интерференционных микроскопов нового поколения и являющиеся следствием продуктивного сотрудничества между биологами, врачами, физиками, инженерами, разработчиками программного обеспечения и математиками, послужили основой для создания инновационной биомедицинской диагностической технологии, постепенно внедряемой в клиническую практику и систему здравоохранения. В настоящее время технология лазерной интерферометрии (или компьютерный фазовый имиджинг (QPI)) уже нашла успешное применение в различных областях клинической медицины: онкологии, дерматологии, иммунологии, урологии, неврологии, акушерстве и гинекологии и т.д. [17–21]. В перечне перспективных направлений фундаментального характера – неинвазивные исследования методами сверхвысокого разрешения пространственно-временной динамики отдельных молекул, органелл и клеток, выявление взаимосвязи процессов экспрессии генов, транскрипции, синтеза и транспорта белков, их пространственно-временные характеристики, интерактивная геновая инженерия и др.

## Физические основы лазерной интерферометрии

Основная задача любого вида микроскопии при исследовании клеточных объектов – получение изображения, адекватного исследуемому образцу. Морфологические характеристики различных клеток достаточно хорошо изучены и подробно описаны с указанием широкой вариабельности их размеров и форм. С точки зрения оптики живая клетка представляет собой структурированную, оптически неоднородную анизотропную среду, окруженную достаточно плотной оболочкой, с трехмерным распределением вещества переменной плотности.

Взаимодействие клетки с оптическим излучением оценивают двумя основными физическими величинами – показателями поглощения и преломления, величина которых находится в прямой зависимости от плотности внутриклеточного вещества. Показатель поглощения света характеризует уменьшение его интенсивности за счет взаимодействия с веществом клетки и приводит к изменению (модуляции) амплитуды света. Преломление вызывает снижение скорости распространения излучения в среде относительно скорости света в вакууме и приводит к изменению фазы оптического излучения. Значения этого показателя существенно изменяются внутри клетки в зависимости от наличия субклеточных структур (ядро, ядрышки, органеллы, включения и др.). Еще одна характеристика, имеющая значение для формирования фазового изображения клетки, – когерентность, определяющая взаимную согласованность электромагнитных колебаний (света) во времени и разных точках пространства [15, 22].

Оптическое излучение, которое используется в интерференционной микроскопии в качестве зондирующего, представляет собой электромагнитное поле в диапазоне длин волн от 0,4 мкм (синий свет) до 0,8 мкм (красный свет). К основным его характеристикам, изменяющимся при прохождении через микрообъект, относятся амплитуда  $A(x, y)$  и фаза  $\phi(x, y)$ , которые описывают пространственно-временное распределение поля. До объекта, расположенного в предметной плоскости  $x, y$ , распределение амплитуды и фазы поля считается постоянным ( $A(x, y) = \text{const}$ ,  $\phi(x, y) = \text{const}$ ), после объекта происходит модуляция этих составляющих поля ( $A(x, y) = \text{var}$ ,  $\phi(x, y) = \text{var}$ ). Оптическая система микроскопа представляет собой устройство с двумя оптическими каналами – навигационным (белого света) и измерительным, которые дают возможность



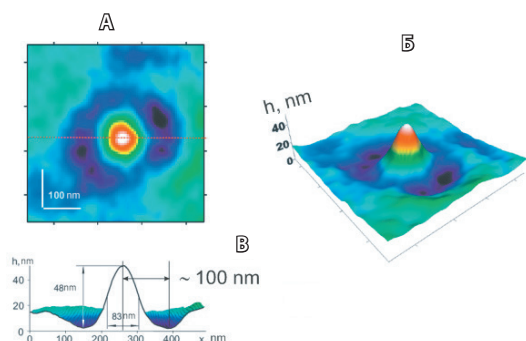
**Рис. 1.** Оптическая схема лазерного интерференционного микроскопа на основе интерферометра Линника (адаптирована по [23]). 1 – лазер ( $\lambda = 650$  м), 2 – поворотные зеркала, 3 – коллиматор, 4 – светодиод подсветки навигационного канала, 5 – светоделительный кубик, 6 – микрообъектив, 7 – исследуемый объект, 8 – фазовый модулятор, 9 – тубусная линза, 10 – зеркало камеры навигационного канала, 11 – проекционная система, 12 – камера лазерного измерительного канала, 13 – камера навигационного канала. Красными линиями указаны оптические пути навигационного и измерительного каналов

использования прибора в двух различных режимах: навигационном (поиск образца для исследования) и измерительном соответственно (рис. 1).

При интерференционной микроскопии исследователю, регистрируя интерференционный сигнал, проходящий через цитообъект, получает фазовое изображение клетки, которое представляет собой двумерное распределение фазы или оптическую разность хода (ОРХ) интерферирующих лучей. В случае прозрачных объектов, таких как нативная клетка, фазовое изображение может нести информацию не только о ее пространственных характеристиках, но и о распределении оптической плотности внутри цитообъекта.

Регистрация фазовой составляющей оптического излучения реализует важное преимущество интерференционной микроскопии – сверхразрешение. Под этим термином понимается превышение предела разрешающей способности метода, установленного критерием Рэля. Так, разрешающая способность при фазовых измерениях, определяемая дислокациями волнового фронта в областях высокого градиента, может варьировать от 10 (в латеральной плоскости) до 0,1 нм (по вертикали) [12, 24].

На рис. 2 изображена модель клетки в виде локальной неоднородности. Проходящая через



**Рис. 2.** Фазовое изображение модели клетки в псевдоцвете, демонстрирующее возможности сверхразрешения когерентной фазовой микроскопии в нанометровом диапазоне.

**А** – топограмма (фазовое изображение микрообъекта в плоскости сканирования); **Б** – 3D-реконструкция; **В** – профиль фазовой толщины клетки вдоль выбранной линии сечения;  $h$  – фазовая толщина

клетку волна когерентного источника испытывает искривление волнового фронта (пространственную модуляцию), которое преобразуется в распределение ОРХ или фазовой толщины. Эта исходная информация в цифровом виде закодирована в топограмме.

Необходимо отметить еще одно достоинство метода интерференционной микроскопии – количественный характер получаемых данных. В отличие от традиционных методов оптической и электронной микроскопии, где изображение представляет собой распределение яркости (интенсивности) излучения в плоскости фотоприемника, фазовый портрет характеризуется распределением нормированной статистически значимой величины – фазовой толщины объекта, не зависящей от внешних факторов и настроек прибора.

Однако не следует забывать об особенности фазово-интерференционных изображений. Как и любые другие функциональные изображения, получаемые фазовые портреты живых функционирующих клеток несколько необычны и непривычны для традиционного восприятия. Для корректной интерпретации интерферограмм необходим некоторый опыт исследователя и определенная априорная информация о цитообъекте.

### Особенности интерпретации фазовых изображений

Несмотря на уникальную возможность количественно измерять прозрачные структуры при

работе с нативными функционирующими клетками, широкое применение интерференционной микроскопии в медицинских и биологических исследованиях несколько ограничено из-за несовершенства алгоритмов извлечения количественной информации о цитообъекте по его фазовому изображению.

Для характеристики клеток традиционно используют комплекс оптико-геометрических параметров, генерирующих ее фазовый портрет: фазовый диаметр, периметр, толщина (высота), объем, фазовая площадь поверхности; отношение фазовой площади к объему и сухой массе; отношение проекции площади к объему; фазовые статистические параметры (дисперсия фазы и фазовый эксцесс); эксцентриситет (степень отклонения от окружности). Кроме того, значения оптической толщины, полученные методом интерференционной микроскопии, дают возможность рассчитать концентрацию вещества, причем не только всей клетки, но и отдельных органелл, а также реальную физическую толщину анализируемого объекта [25].

Почти всегда требуется несколько этапов для преобразования исходных данных в необходимый исследователю формат. Пакет оригинальных программ интерференционной микроскопии позволяет получать топограммы, 3D-фазовые изображения объектов и их фрагментов, проводить редактирование файлов, инверсию, вычитание кадров, картирование флуктуаций и другие операции. Некоторые лаборатории для обработки, просмотра и анализа полученных результатов используют комбинацию коммерческих, открытых и пользовательских программных продуктов.

В перспективе необходимы определенные организационные усилия для обеспечения стандартизации процедур обработки и анализа интерферограмм, полученных в отдельных лабораториях, создания унифицированных аналитических инструментов доступа к данным различных форматов и обеспечения их функциональной совместимости. Например, уже сейчас активно используются стандартные биоформаты для открытия, просмотра, поиска, аннотирования и загрузки файлов фазовых изображений в хранилищах данных микроскопии, представленных мировым научным сообществом [26, 27]. Благодаря этому становится возможным проведение совместной работы в научных международных проектах на основе исследовательских технологий и стабильных инструментов анализа полученных данных.



## Неинвазивная диагностика нарушений тромбоцитарного гемостаза у онкологических больных с использованием технологии лазерной интерферометрии

В качестве иллюстрации практического использования технологии лазерной интерферометрии в условиях клиники приводим результаты исследования морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови у онкологических больных.

К настоящему времени уже накоплено достаточное количество убедительных данных о том, что свертывающая система крови оказывает существенное влияние на рост опухолей, скорость формирования их стромы и диссеминацию опухолевых клеток [28]. В этой связи исследование способности тромбоцитов к активации, выявление их структурных и функциональных нарушений представляется актуальным для адекватной оценки тяжести состояния пациента. Понимание механизмов, лежащих в основе этих изменений, расширяет возможности профилактики и коррекции нарушений в системе гемостаза, которые не только отягощают течение онкологического заболевания, но и нередко определяют его исход.

### Материал и методы

Нами однократно обследованы 30 пациентов со злокачественными опухолями ротовой полости (ЗОРП) (средний возраст  $60,1 \pm 11,9$  года), проходивших лечение в отделении радиологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в течение 2015–2017 гг. Формирование клинических

групп по стадиям опухолевого процесса проводили согласно международной классификации «TNM, Классификация злокачественных опухолей» (шестое издание, перевод и редакция проф. Н.Н. Блинова, 2003). У 11 пациентов диагностировали II стадию онкологического заболевания, у 12 – III стадию, у 7 – IV стадию. Контрольную группу составили 30 практически здоровых человек (средний возраст  $52,3 \pm 9,7$  года). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (заседание № 3 от 19 марта 2015 г.).

Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, цельную кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Взвесью клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имеет зеркальное напыление. После 3–5-минутного интервала, необходимого для оседания клеток, проводили сканирование изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки составлял 50–100 клеток. Время измерения одного интерференционного поля размером  $20 \times 20$  мкм ( $m = n = 128$  пикселей), соответствующего изображению одной клетки, – 14 секунд. Результат обратного преобразования цифрового массива в видимое изображение и восстановление фазового портрета объекта отображались на мониторе компьютера. Результаты расчетов выводили на дисплей в виде таблицы параметров каждого объекта и серии графиков.

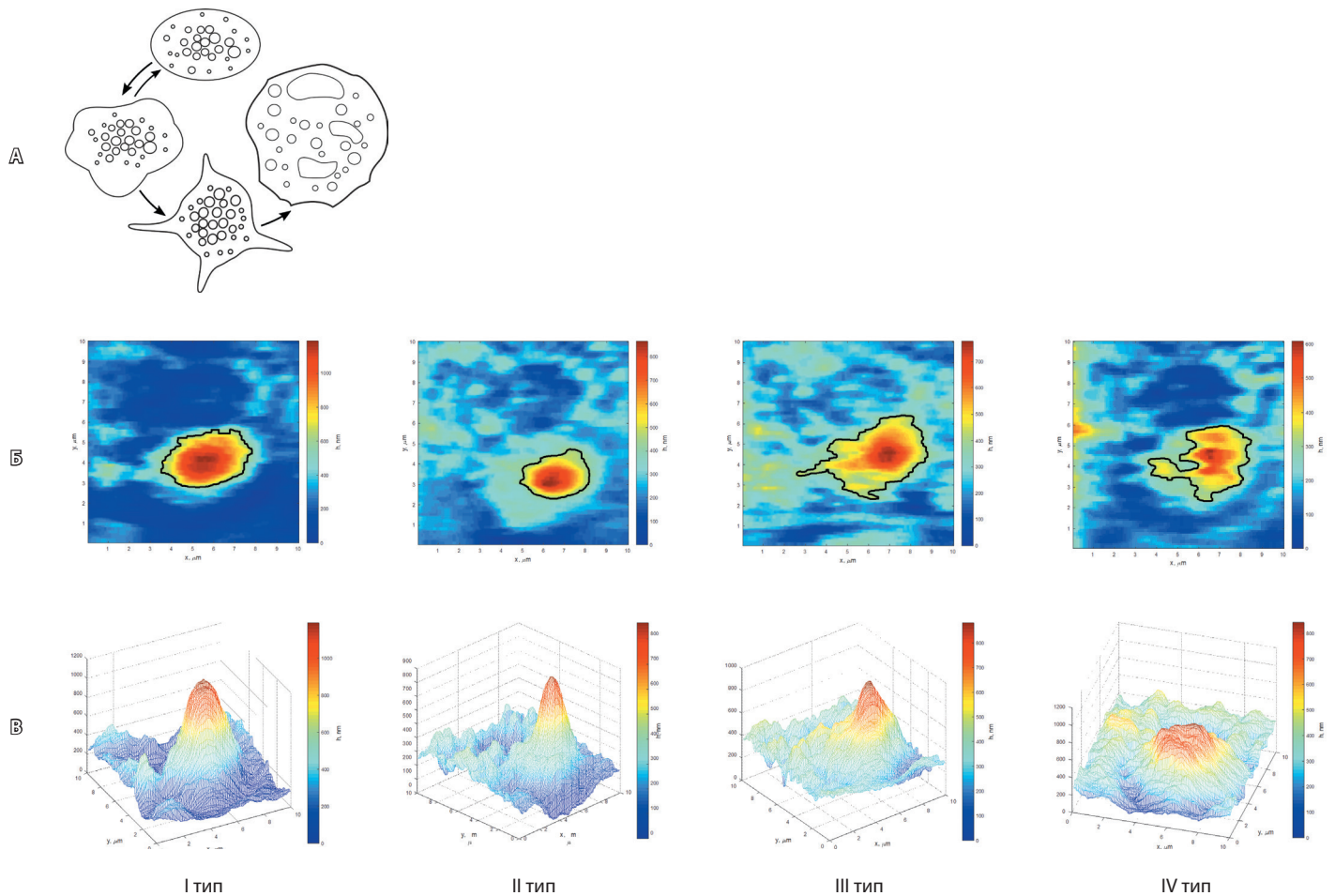
Статистический анализ проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и прикладных программ SPSS Statistics 21.0. Стандартная обработка

Состояние тромбоцитарного гемостаза у здоровых добровольцев и пациентов со злокачественными новообразованиями ротовой полости ( $M \pm \sigma$ )

Показатель	Здоровые добровольцы	Больные со злокачественными опухолями ротовой полости		
		II стадия	III стадия	IV стадия
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	$268,5 \pm 27,3$	$246,3 \pm 31,8$	$284,3 \pm 33,5$	$329,5 \pm 37,4$
Функциональные типы, %				
I	$62,9 \pm 4,9$	$21,7 \pm 1,9^*$	$32,7 \pm 3,1^*$	$28,4 \pm 2,2^*$
II	$21,2 \pm 2,3$	$48,8 \pm 3,1^*$	$39,9 \pm 2,5^*$	$44,5 \pm 3,5^*$
III	$11,9 \pm 1,2$	$25,8 \pm 2,2^*$	$25,1 \pm 1,7^*$	$25,6 \pm 1,9^*$
IV	$4 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1^*$
Морфометрические параметры				
D, мкм	$2,61 \pm 0,82$	$3,22 \pm 0,74^*$	$3,31 \pm 0,84^*$	$3,4 \pm 0,79^*$
P, мкм	$8,25 \pm 3,41$	$9,7 \pm 2,81$	$10,01 \pm 3,25^*$	$10,28 \pm 2,63^*$
H, мкм	$1,23 \pm 0,51$	$1,25 \pm 0,41$	$1,29 \pm 0,35$	$1,28 \pm 0,52$
A, мкм <sup>2</sup>	$4,67 \pm 2,12$	$6,08 \pm 6,29^*$	$6,19 \pm 3,36^*$	$6,45 \pm 3,01^*$
V, мкм <sup>3</sup>	$1,81 \pm 1,33$	$2,96 \pm 4,62^*$	$3,1 \pm 1,92^*$	$3,03 \pm 1,83^*$

D – диаметр, P – периметр, H – высота, A – площадь, V – объем

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями контроля (здоровые добровольцы)



**Рис. 3.** Морфологические типы живых тромбоцитов периферической крови, идентифицированные методом лазерной интерферометрии. **А** – схема активации тромбоцитов; **Б** – топограммы живых тромбоцитов в псевдочетве; **В** – 3D-реконструкция фазово-интерференционного портрета тромбоцитов. I тип – тромбоцит «покоя», II тип – тромбоцит с низким уровнем активности, III тип – высоко активированный тромбоцит, IV тип – дегенеративно измененный тромбоцит. Справа у рисунков Б и В представлена шкала соответствия цветового градиента фазовой высоте цитообъекта

выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, а также величины дисперсии и стандартного отклонения. Сравнение показателей по количественным признакам осуществляли непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна – Уитни. При сравнении двух групп с нормальным характером распределения данных использовали t-тест для независимых группировок при условии совпадения дисперсий. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Полученная нами ранее библиотека фазово-интерференционных образов клеток и данные современной литературы позволили выделить и идентифицировать 4 основных морфологических типа

живых тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации (рис. 3). Основой для дискриминации структурно измененных клеток служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина [15, 29, 30].

Мы не обнаружили статистически значимых различий в количественных показателях тромбоцитов между группами пациентов. Можно говорить только о тенденции к увеличению числа тромбоцитов у больных с ЗОРП III и IV стадии (таблица).

При анализе морфологической структуры циркулирующей популяции установлено, что в норме 63% тромбоцитов представлены клетками «покоя», 21% – тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество высоко

активированных клеток с длинными отростками-«антеннами» составляет 12% (III тип), а дегенеративно измененных (IV тип) – всего 4%.

У обследованных больных со злокачественными опухолями ротовой полости во всех группах сравнения зарегистрировано резкое снижение форм покоя (дискоцитов) в циркулирующей популяции тромбоцитов: 21,7, 32,7 и 28,4% при II, III и IV стадиях заболевания соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений). Практически в 2 раза возрастает число активированных тромбоцитов: клетки с низким уровнем активности – 48,8, 39,9 и 28,4% соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений); высоко активированные тромбоциты – 25,8, 25,1 и 25,6% соответственно ( $p < 0,05$  для всех сравнений). При этом, однако, не прослеживается зависимости данных изменений с тяжестью заболевания. В то же время процент дегенеративных форм с увеличением стадии патологического процесса статистически значимо снижается при ЗОРП IV степени до 1,5% ( $p < 0,05$ ). Следовательно, функциональное состояние тромбоцитарного звена гемостаза у обследованных пациентов можно характеризовать как компенсированную активацию.

При сравнении морфометрических параметров тромбоцитов группы контроля и больных ЗОРП было установлено, что средние в циркулирующей популяции размерные показатели клеток статистически значимо превышали нормативные значения. Обращало внимание увеличение средних значений диаметра циркулирующих тромбоцитов на 23,4, 26,8 и 30,3% ( $p < 0,05$  для всех сравнений) и площади – на 30,2, 32,5 и 38,1% ( $p < 0,05$  для всех сравнений) у пациентов со II, III и IV стадиями ЗОРП соответственно.

Анализируя морфометрические параметры тромбоцитов, важно отметить, что по величине диаметра, периметра и площади можно не только судить о возрастном составе клеточной популяции (молодые клетки обладают большими размерными показателями по сравнению со зрелыми и старыми тромбоцитами), но и косвенно оценить их активационный статус (распластывание, сферолизацию, появление отростков). Кроме того, величина фазовой высоты и объема позволяет охарактеризовать полноценность гранулярного аппарата: реакция выброса активированного тромбоцита отражается на снижении фазовой высоты клетки.

Выполнение тромбоцитами своей важнейшей роли – поддержания физиологического гемостаза – осуществляется благодаря характерным для них 4 функциям: адгезии, агрегации, реакции

освобождения и ретракции. Активация тромбоцитов приводит к изменению их формы из дисков, покоящихся клеток в циркулирующей крови, в сферы – активированные клетки с повышенной способностью к адгезии, агрегации и секреции биологически активных соединений, непосредственно участвующих или влияющих на гемостаз. Активируясь, тромбоциты быстро адгезируют, агрегируют и формируют тромбоцитарный тромб, а также способствуют запуску каскада свертывания [31].

Полученные нами результаты продемонстрировали определенную зависимость между тяжестью онкологического заболевания и изменением морфофункционального статуса тромбоцитов периферической крови: увеличением размерных параметров, повышением активационного статуса.

Данные современной литературы позволяют говорить об активации системы гемостаза с угрозой хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у онкологических больных [32]. При этом состояние гиперкоагуляции может быть обусловлено как развитием самой опухоли, так и повышением уровня тканевого фактора (TF), раковых прокоагулянтов, активирующих факторы VII и X, и дисбалансом в системе цитокинов. Кроме того, немаловажным усугубляющим фактором выступает локальный стаз, который может быть связан с несколькими причинами: длительной иммобилизацией пациентов вследствие распространенности и тяжести неопластического процесса, непосредственного прорастания опухоли в сосудистую стенку или проведения оперативного вмешательства [32, 33].

Очевидно, что патогенетические механизмы, обуславливающие развитие тромботических осложнений, основаны на взаимодействии опухоли, больного и системы гемостаза. При этом уровень активации тромбоцитарного компонента соответствует тяжести онкологического заболевания. Для профилактики и своевременной диагностики тромботических осложнений у онкологических пациентов необходимо учитывать изменения количества тромбоцитов, морфологические особенности и степень активности тромбоцитарного звена гемостаза. Интерференционная микроскопия в рамках одного метода предоставляет возможность оперативно оценить индивидуальные изменения размерных показателей и уровня функциональной полноценности циркулирующих тромбоцитов, проанализировать структуру популяционного состава клеточного



звена гемостаза с достаточной степенью объективности и информативности. Использование метода в клинике может способствовать улучшению диагностики, оценки тяжести заболевания и своевременному назначению адекватной терапии.

## Заключение

Темпы развития технологий визуализации живых функционирующих клеток в режиме реального времени открывают новые возможности для проведения фундаментальных научных исследований и повышения эффективности диагностического процесса в практическом здравоохранении. В основе эффективного анализа должны быть только количественные параметры для объективной оценки морфологических, метаболических и функциональных особенностей клеток и различных субклеточных структур, позволяющие отразить динамику процесса во времени. При этом важными условиями, отвечающими современным требованиям к диагностическому оборудованию, являются широкая универсальность, обеспечение неинвазивного подхода, высокая разрешающая способность, точность, чувствительность и информативность.

Интерференционная микроскопия позволяет получать новую информацию о внутренней структуре различных объектов и биологических систем без специальной подготовки проб и использования контрастирующих или флуоресцентных зондов, изучать биологические объекты на уровне наноразмерных внутриклеточных структур с сохранением их нативных свойств, что делает возможным поиск новых информативных биомаркеров для ранней диагностики заболеваний и оценки эффективности проводимого лечения.

Вместе с тем необходимо критично оценивать эффективность практической реализации новых технологий, выявлять их преимущества и недостатки, различия между существующими и предлагаемыми диагностическими платформами. Именно в этой плоскости лежат задачи трансляционной медицины, призванной обеспечить дальнейшее масштабирование научных исследований и прогрессивных медицинских технологий, привлечение финансовой поддержки от государства и частных инвесторов, пересмотр и разработку правовых и этических норм для ускорения внедрения достижений фундаментальной науки в клиническую практику. ©

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

## Литература

- Шляхто ЕВ, Конради АО, Галагудза ММ. Трансляционная медицина: вчера, сегодня, завтра. Вестник Росздравнадзора. 2016;(1):47–51.
- Wafi A, Mirnezami R. Translational-omics: Future potential and current challenges in precision medicine. *Methods*. 2018;151:3–11. doi: 10.1016/j.jymeth.2018.05.009.
- Park Y, Choi W, Yaqoob Z, Dasari R, Badizadegan K, Feld MS. Speckle-field digital holographic microscopy. *Opt Express*. 2009;17(15):12285–92. doi: 10.1364/OE.17.012285.
- Черная ВВ, Боровицкий ВН. Сравнительный анализ современных голографических и интерференционных микроскопов. Виміррювальна та обчислювальна техніка в технологічних процесах. 2010;(2):36–43.
- Вишняков ГН, Левин ГГ, Минаев ВЛ, Цельмина ИЮ. Интерференционная микроскопия субнанометрового разрешения по глубине. Экспериментальные исследования. Оптика и спектроскопия. 2014;116(1):170–5. doi: 10.7868/S003040341401022X.
- Тычинский ВП. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов. Успехи физических наук. 2001;171(6):649–62. doi: 10.3367/UFNr.0171.200106e.0649.
- Garini Y, Vermolen BJ, Young IT. From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(1):3–12. doi: 10.1016/j.copbio.2005.01.003.
- Shaked NT, Zhu Y, Rinehart MT, Wax A. Two-step-only phase-shifting interferometry with optimized detector bandwidth for microscopy of live cells. *Opt Express*. 2009;17(18):15585–91. doi: 10.1364/OE.17.015585.
- Tychinsky VP, Tikhonov AN. Interference microscopy in cell biophysics. 1. Principles and methodological aspects of coherent phase microscopy. *Cell Biochem Biophys*. 2010;58(3):107–16. doi: 10.1007/s12013-010-9114-z.
- Anna T, Srivastava V, Mehta DS, Shakher C. High-resolution full-field optical coherence microscopy using a Mirau interferometer for the quantitative imaging of biological cells. *Appl Opt*. 2011;50(34):6343–51. doi: 10.1364/AO.50.006343.
- Swedlow JR. Innovation in biological microscopy: current status and future directions. *Bioessays*. 2012;34(5):333–40. doi: 10.1002/bies.201100168.
- Тычинский ВП. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? Успехи физических наук. 2007;177(5):535–52. doi: 10.3367/UFNr.0177.200705c.0535.
- Казакова ТА, Новиков СМ, Левин ГГ, Максимов ГВ. Исследование состояния цитоплазмы нейрона методом динамической фазовой микроскопии. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2014;(4):25–31.
- Вышенская ТВ, Болотова АА, Василенко ИА, Звержховский ВД, Болдырев ДВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Метод определения цитотоксического потенциала по фазовым изображениям CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. *Биофизика*. 2016;61(3):523–7.
- Jiang W, Yin Z. Seeing the invisible in differential interference contrast microscopy images. *Med Image Anal*. 2016;34:65–81. doi: 10.1016/j.media.2016.04.010.
- Cherkezyan L, Zhang D, Subramanian H, Capoglu I, Taflove A, Backman V. Review of interferometric spectroscopy of scattered light for the quantification of subdiffractional structure of biomaterials. *J Biomed Opt*. 2017;22(3):30901. doi: 10.1117/1.JBO.22.3.030901.
- Власова ЕА, Василенко ИА, Суслов ВП, Пашкин ИН. Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран. *Урология*. 2011;(2):36–41.
- Лысенко МА, Метелин ВБ, Баранова НВ. Опыт применения инновационных клеточ-





- ных технологий в диагностике эндометри-  
оидных кист яичников. *Медицинский вест-  
ник Северного Кавказа*. 2012;2(26):33–6.
19. Золотовская ИА, Давыдкин ИЛ, Лимаре-  
ва ЛВ, Сустретов АС. Взаимосвязь эндоте-  
лиальной дисфункции и параметров окси-  
генации мембран эритроцитов у пациентов  
с фибрилляцией предсердий, перенесших  
кардиоэмболический инсульт. *Успехи ге-  
ронтологии*. 2018;31(3):379–86.
20. Gjørloff-Wingren A. Quantitative phase-con-  
trast imaging-A potential tool for future cancer  
diagnostics. *Cytometry A*. 2017;91(8):752–3.  
doi: 10.1002/cyto.a.23104.
21. Bettenworth D, Bokemeyer A, Poremba C,  
Ding NS, Ketelhut S, Lenz P, Kemper B. Quan-  
titative phase microscopy for evaluation of  
intestinal inflammation and wound healing  
utilizing label-free biophysical markers. *Histol  
Histopathol*. 2018;33(5):417–32. doi: 10.14670/  
HH-11-937.
22. Левин ГГ, Золотаревский СЮ. Количествен-  
ная фазовая микроскопия на основе прин-  
ципов интерференционной рефрактоме-  
трии. *Метрология*. 2008;(3):15–21.
23. Игнатъев ПС, Индукаев КВ, Лопарев АВ, Оси-  
пов ПА. Исследование оптических свойств  
наноструктур методом модуляционной ин-  
терференционной микроскопии. *Оптичес-  
кий журнал*. 2011;78(1):26–31.
24. Булыгин ФВ, Золотаревский СЮ, Кононо-  
гов СА, Илюшин ЯА, Левин ГГ, Лясковский Л.  
Анализ методов сверхразрешения в опти-  
ческой интерференционной микроскопии.  
*Метрология*. 2013;(8):22–30.
25. Болотова АА, Звержовский ВД, Вышен-  
ская ТВ, Кретушев АВ, Евдокимов АА. Ин-  
формативность фазовых изображений  
биологических клеток. В: Булатов МФ, ред.  
*Информатика и технологии. Инновацион-  
ные технологии в промышленности и ин-  
форматике («МНТК ФТИ-2017»)*. Сборник  
научных трудов. Вып. 23. М.: МИРЭА; 2017.  
с. 616–9.
26. Kvilekval K, Fedorov D, Obara B, Singh A, Man-  
junath BS. Bisque: a platform for bioimage  
analysis and management. *Bioinformatics*.  
2010;26(4):544–52. doi: 10.1093/bioinformat-  
ics/btp699.
27. Hiner MC, Rueden CT, Eliceiri KW. SCIFIO: an  
extensible framework to support scientific im-  
age formats. *BMC Bioinformatics*. 2016;17(1):  
521. doi: 10.1186/s12859-016-1383-0.
28. Contursi A, Grande R, Dovizio M, Bruno A,  
Fullone R, Patrignani P. Platelets in cancer  
development and diagnosis. *Biochem Soc  
Trans*. 2018;46(6):1517–27. doi: 10.1042/  
BST20180159.
29. Василенко ИА, Гаспарян СА, Антонова ИШ,  
Савушкин АВ, Бабакова СВ. Динамика пока-  
зателей тромбоцитарного звена гемостаза  
при физиологическом течении беременно-  
сти. *Вопросы гинекологии, акушерства и пе-  
ринатологии*. 2006;5(4):5–12.
30. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM.  
Platelet-based coagulation: different popula-  
tions, different functions. *J Thromb Haemost*.  
2013;11(1):2–16. doi: 10.1111/jth.12045.
31. Osman A, Hitzler WE, Provost P. The platelets'  
perspective to pathogen reduction tech-  
nologies. *Platelets*. 2018;29(2):140–7. doi:  
10.1080/09537104.2017.1293806.
32. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory  
role of platelets in cancer. *Platelets*. 2018;29(6):  
569–73. doi: 10.1080/09537104.2018.1453059.
33. Соконова ОВ, Маджуга АВ, Елизарова АЛ.  
Тромбозы и тромбоэмболии в онкологии.  
Современный взгляд на проблему. *Злока-  
чественные опухоли*. 2014;(3):172–6. doi:  
10.18027/2224-5057-2014-3-172-176.
15. Jiang W, Yin Z. Seeing the invisible in differ-  
ential interference contrast microscopy im-  
ages. *Med Image Anal*. 2016;34:65–81. doi:  
10.1016/j.media.2016.04.010.
16. Cherkezyan L, Zhang D, Subramanian H, Capog-  
lu I, Taflove A, Backman V. Review of interfer-  
ometric spectroscopy of scattered light for the  
quantification of subdiffractional structure of  
biomaterials. *J Biomed Opt*. 2017;22(3):30901.  
doi: 10.1117/1.JBO.22.3.030901.
17. Vlasova EA, Vasilenko IA, Suslov VP, Pashkin IN.  
Dynamics of morphometric parameters of pe-  
ripheral blood platelets as a criterion in assess-  
ing thrombogenicity of dialysis membranes.  
*Urologiia*. 2011;(2):36–41. Russian.
18. Lysenko MA, Metelyn VB, Baranova NV. New  
cellular technologies in diagnostics of endo-  
metrioid ovarian cysts. *Medical News of the  
North Caucasus*. 2012;2(26):33–6. Russian.
19. Zolotovskaia AI, Davydkin IL, Lymareva LV, Sus-  
tretov AS. Interrelation of endothelial dysfunc-  
tion and parameters of erythrocyte membrane  
oxygenation in patients with atrial fibrillation,  
after cardioembolic stroke. *Advances in Geron-  
tology*. 2018;31(3):379–86. Russian.
20. Gjørloff-Wingren A. Quantitative phase-con-  
trast imaging-A potential tool for future cancer  
diagnostics. *Cytometry A*. 2017;91(8):752–3.  
doi: 10.1002/cyto.a.23104.
21. Bettenworth D, Bokemeyer A, Poremba C,  
Ding NS, Ketelhut S, Lenz P, Kemper B. Quan-  
titative phase microscopy for evaluation of  
intestinal inflammation and wound healing  
of live cells. *Opt Express*. 2009;17(18):15585–  
91. doi: 10.1364/OE.17.015585.
9. Tychinsky VP, Tikhonov AN. Interference mi-  
croscopy in cell biophysics. 1. Principles and  
methodological aspects of coherent phase  
microscopy. *Cell Biochem Biophys*. 2010;58(3):  
107–16. doi: 10.1007/s12013-010-9114-z.
10. Anna T, Srivastava V, Mehta DS, Shakher C.  
High-resolution full-field optical coherence  
microscopy using a Mirau interferometer for  
the quantitative imaging of biological cells.  
*Appl Opt*. 2011;50(34):6343–51. doi: 10.1364/  
AO.50.006343.
11. Swedlow JR. Innovation in biological micro-  
scopy: current status and future directions.  
*Bioessays*. 2012;34(5):333–40. doi: 10.1002/  
bies.201100168.
12. Tychinskii VP. Dynamic phase microscopy: is  
a “dialogue” with the cell possible? *Phys Usp*.  
2007;50(5):513–28. doi: 10.1070/PU2007v-  
050n05ABEH006222.
13. Kazakova TA, Novikov SM, Levin GG, Maksi-  
mov GV. Using the dynamic phase micro-  
scopy for neuron cytoplasm studies. *Vestnik  
Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologi-  
ya*. 2014;(4):25–31. Russian.
14. Vyshenskaya TV, Bolotova AA, Vasilenko IA,  
Zverzhovskiy VD, Boldyrev DV, Kretushev AV,  
Evdokimov AA. A technique for the assessment  
of the cytotoxic capacity of CD8<sup>+</sup> lymphocytes  
based on phase images. *Biophysics*. 2016;61(3):  
440–4. doi: 10.1134/S0006350916030222.



- utilizing label-free biophysical markers. *Histol Histopathol.* 2018;33(5):417–32. doi: 10.14670/HH-11-937.
22. Levin GG, Zolotarevskiy SYu. Quantitative phase microscopy based on interferential refractometry principles. *Metrologiya.* 2008;(3): 15–21. Russian.
  23. Ignat'ev PS, Loparev AV, Indukaev KV, Osipov PA. Investigating the optical properties of nanostructures by modulation interference microscopy. *Journal of Optical Technology.* 2011;78(1):19–24. doi: 10.1364/JOT.78.000019.
  24. Bulygin FV, Zolotarevskiy SYu, Kononogov SA, Ilyushin YaA, Levin GG, Lyaskovsky L. Analysis of superresolution methods in optical interference microscopy. *Metrologiya.* 2013;(8):22–30. Russian.
  25. Bolotova AA, Zverzhkhovskiy VD, Vyshenskaya TV, Kretushev AV, Evdokimov AA. Informative phase images of biological cells. In: Bula-  
tov MF, editor. *Informatics and technologies. Innovative technologies in industry and informatics ("MNTK PTI-2017").* Collection of scientific papers. Issue 23. Moscow: MIREA; 2017. p. 616–9. Russian.
  26. Kvilekval K, Fedorov D, Obara B, Singh A, Manjunath BS. Bisque: a platform for bioimage analysis and management. *Bioinformatics.* 2010;26(4):544–52. doi: 10.1093/bioinformatics/btp699.
  27. Hiner MC, Rueden CT, Eliceiri KW. SCIFIO: an extensible framework to support scientific image formats. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(1): 521. doi: 10.1186/s12859-016-1383-0.
  28. Contursi A, Grande R, Dovizio M, Bruno A, Fullone R, Patrignani P. Platelets in cancer development and diagnosis. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(6):1517–27. doi: 10.1042/BST20180159.
  29. Vasilenko IA, Gasparyan SA, Antonova ISh, Savushkin AV, Babakova SV. Dynamics of platelet hemostasis during the physiological course of pregnancy. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2006;5(4):5–12. Russian.
  30. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):2–16. doi: 10.1111/jth.12045.
  31. Osman A, Hitzler WE, Provost P. The platelets' perspective to pathogen reduction technologies. *Platelets.* 2018;29(2):140–7. doi: 10.1080/09537104.2017.1293806.
  32. Olsson AK, Cedervall J. The pro-inflammatory role of platelets in cancer. *Platelets.* 2018;29(6): 569–73. doi: 10.1080/09537104.2018.1453059.
  33. Somonova OV, Madzhuga AV, Elizarova AL. Thromboembolism in oncology. Modern view on the problem. *Malignant Tumours.* 2014;(3): 172–6. Russian. doi: 10.18027/2224-5057-2014-3-172-176.

## A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry

I.A. Vasilenko<sup>1,2</sup> • V.B. Metelin<sup>1,2</sup> • P.S. Ignat'ev<sup>3</sup> • Z.Z. Kardashova<sup>2</sup> • R.A. Lifenko<sup>4</sup>

The paper presents a review of current techniques of the interference microscopy of living functioning cells that allow for assessment of the real-time changes of subcellular microstructures with 2D and 3D reconstructions of the images and multifactorial data analysis. It has been shown that new diagnostic information can be obtained within the research methodology of the so-called interactive dialogue with the cell to identify changes in the morphofunctional state of living cells through registration of their real-time response to environmental fluctuations. We describe physical basis of laser interferometry, problems and specifics of interpretation of cell phase pictures. As an illustration to the practical use of the technique in the clinic we present the results of studies on morphofunctional state of peripheral blood platelets in patients with oral malignancies (OM) and various stages of the tumor. Analysis of circulating platelets with a real-time technique of laser interferometry allowed for identification of compensated activation of the platelet compartment of hemostasis in these patients, as well as an association between the severity of cancer and changes of dimensional

cell parameters (an increase of the mean diameter and area of circulating platelets by 23.4, 26.8 and 30.3%, and by 30.2, 32.5 and 38.1% in the patients with OM grades II, III and IV, respectively ( $p < 0,05$  for all comparisons)). The necessary condition for a wider implementation of new diagnostic technologies is a critical evaluation of the efficacy of their use in routine practice, identification of their advantages, disadvantages and differences between current and proposed diagnostic platforms.

**Key words:** translational medicine, diagnostics, laser interference microscopy, platelets, morphofunctional state, oncology

**For citation:** Vasilenko IA, Metelin VB, Ignat'ev PS, Kardashova ZZ, Lifenko RA. A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018;46(8):748–57. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.

Received 17 December 2018;  
accepted 19 December 2018

**Irina A. Vasilenko** – MD, PhD, Professor, Department of Applied Mathematics and Programming<sup>1</sup>; Head of Research Laboratory<sup>2</sup>

✉ 33–1 Sadovnicheskaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 951 54 97. E-mail: vasilenko0604@gmail.com

**Vladislav B. Metelin** – PhD in Biology, Associate Professor, Chair of Clinical Psychology<sup>1</sup>; Leading Research Fellow, Research Laboratory<sup>2</sup>

**Pavel S. Ignat'ev** – PhD in Physics and Mathematics, Chief Designer<sup>3</sup>

**Ziver Z. Kardashova** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Research Laboratory<sup>2</sup>

**Roman A. Lifenko** – MD, PhD, Chief Physician<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Russian State University named after A.N. Kosygin (Technologies. Design. Art); 33–1 Sadovnicheskaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

<sup>3</sup> JSC "Production Association "Ural Optical and Mechanical Plant named after Mr. E.S. Yalamov" (UOMZ); 33B Vostochnaya ul., Ekaterinburg, 620100, Russian Federation

<sup>4</sup> Mineralnye Vody District Hospital; 67A Gagarina ul., Mineralnye Vody, 357202, Russian Federation

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.