

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР В КЛЕТКЕ ВОДОРΟΣЛИ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ ЛАЗЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ

© 2025 г. А.А. Самойленко*, Г.Г. Левин*, А.А. Волгушева**,
А.П. Казаков**, Г.В. Максимов**, ***, #

*Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
ул. Озерная, 46, Москва, 119361, Россия

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119892, Россия

***Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
Ленинский просп., 4, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2025 г.

После доработки 10.01.2025 г.

Принята к публикации 22.01.2025 г.

С помощью разработанного метода оптической лазерной томографии доказана возможность регистрации и анализа трехмерного распределения субклеточных органелл у эукариотических водорослей (*C. reinhardtii*). Метод позволяет анализировать перераспределение субклеточных органелл (ядро, хлоропласт) в последовательных срезах одной клетки в норме и при действии модификаторов ее функционального состояния. По мнению авторов, предложенный подход позволит не только исследовать динамику распределения внутриклеточных структур (ядро, тилакоиды, митохондрии и т.д.), но и изменения отдельной структуры при функционировании клетки.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, оптическая лазерная томография, морфология клеток.

DOI: 10.31857/S0006302925020XXX, **EDN:**

Известно, что современные оптические методы успешно используются как для исследования изменений морфологии клетки, так и изучения распределения субклеточных органелл. Распределение субклеточных структур в функционирующей клетке обычно реализуется с помощью флуоресцентной, спектроскопии комбинационного рассеяния или атомно-силовой микроскопии (АСМ) [1–3]. Как мы отмечали ранее, спектроскопия комбинационного рассеяния и микроскопия позволяют сочетать анализ изменений химического состава и визуализацию клеток с высоким разрешением (до 130 нм) без использования флуоресцентных меток, что важно при исследовании клеток водорослей, содержащих собственные пигменты. С другой стороны, чувствительность и скорость регистрации изображения клеток с по-

мощью современной инфракрасной микроскопии существенно выше благодаря использованию квантово-каскадных лазеров, но дифракция света ограничивает латеральное разрешение объекта в микрометровом диапазоне, а также исследование морфологии субклеточных структур [4, 5]. В связи с этим в настоящее время широкое распространение получили методы сканирующей оптической микроскопии, которые позволяют объединить возможности АСМ (высокая разрешающая способность) и инфракрасной микроскопии. В данном методе латеральное разрешение не зависит от длины волны, но зависит от размера кончика микроскопического зонда, что позволяет получать инфракрасные изображения до 5 нм [6–8]. Важно, что все эти методы используются как для визуализации клетки, так и для получения последовательных сечений одной и той же клетки, хотя разрешающая способность при этом составляет больше 100 нм [9].

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия, ОЛТ – оптическая лазерная томография, CL – клотианидин (1-(2-хлоро-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил-2-нитрогуанидин).

Ранее, возможности применения метода оптической лазерной томографии (ОЛТ) были продемонстрированы при исследовании спирогиры, водорослей *Pandorina morum*, а также на диатомовых водорослях [10–13]. Данные ОЛТ о морфологии клетки (длина, ширина, размеры пор и т. д.) хорошо согласуются с результатами, полученными с помощью ряда других методов (например, сканирующей электронной микроскопии). С помощью ОЛТ водорослей *Skeletonema marinoi* и диатомовых водорослей *Thalassiosira rotula* были выявлены реальные формы и размеры хлоропластов и их расположение в клетке [13]. В связи с популярностью данного подхода в биофизике клетки ранее нами были опубликованы результаты теоретических исследований и математического моделирования алгоритмов ОЛТ, которые были использованы в данной работе [14–16].

Цель настоящей работы заключалась в получении 3D-изображения распределения оптической разности хода лучей света от внутриклеточных структур водоросли с помощью локальной оптической томографии.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследование проведено на одноклеточных зеленых водорослях *Chlamydomonas reinhardtii*, штамм cc124, выращенных на минеральной среде с высоким содержанием солей [13] в колбах (объем 300 мл) при постоянном перемешивании (120 об/мин) на шейкере S-3.02M (ELMI, Латвия) при температуре 24°C и освещенности ~80 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (10 ч света, 14 ч темноты). На поздней логарифмической фазе роста (концентрация клеток (4–6)·10⁶ кл./мл) клетки осаждали центрифугированием (2000 g в течение 3 мин) и ресуспендировали в среде с пестицидом клотианидином (CL, 1-(2-хлоро-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил-2-нитрогуанидин) в концентрациях 2 или 4 мг/л. Контрольные (без добавления пестицида) и обработанные CL водоросли инкубировали в колбах объемом 100 мл при непрерывном освещении (40 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹), 24°C при постоянном перемешивании (120 об/мин) в течение 4 суток.

Измерение содержания крахмала и хлорофилла. Содержание хлорофилла в суспензии определяли спектрофотометрически в 95% спирте [18]. Содержание крахмала определяли по методу, описанному в работе [19] как эквивалент содержания глюкозы.

Оптическая локальная дифференциальная томография. Используемый оптический томограф позволяет получать томограммы функционирующих клеток в режиме поглощения света. Подробное описание экспериментальной установки представлено в работе [14]. Источником света служил низкокогерентный, коллимированный

линзой точечный светодиод с размером площадки 80 мкм и длиной волны 650 нм, что позволило снизить шумы получаемых изображений; проекции (с разных углов) получали за счет освещения через широкоапертурный объектив. Образец помещали между двумя покровными стеклами и освещали параллельным лучом света под разными углами. Наклон луча меняли за счет поворота зеркала. Изображение клетки формировали на светочувствительной матрице с помощью системы линз.

Измерения проводили на томографе в режиме «на поглощение». В данном режиме одно из плеч томографа было перекрыто, контраст изображения достигался за счет частичного поглощения света образцом. Измерения проводили в диапазоне углов от –23.4° до 23.4°. В этом диапазоне снимали 20 эквидистантных по углу проекций.

Для сопоставления проекций, полученных в разных измерениях, была проведена нормировка изображений по формуле

$$k(x, y) = -\log_{10} \frac{I(x, y)}{I_{BG}},$$

где $k(x, y)$ — коэффициент поглощения в точке изображения с координатами (x, y) , I — яркость изображения в данной точке, I_{BG} — средняя яркость изображения вне клетки, т. е. яркость фона. Нормированные таким образом наборы проекций затем подвергали обратному преобразованию Радона.

Для визуализации изображения водоросли использовали программу 3D Slicer, которая позволяла получать произвольно ориентированные срезы клетки, а также изображения поверхности из меток изображений и аппаратно-ускоренный объемный рендеринг (3D-изображение). Для калибровки томографа использовали стеклянные сферы размером 5 мкм, что позволило определить размер вокселя в восстановленном изображении (0.1 мкм³). Время регистрации полного набора проекций составляло 8–10 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования были получены томограммы микроводоросли и 3D-изображения распределения оптической разности хода света от субклеточных структур в клетке (рис. 1а). Полученные изображения, вероятно, представляют собой трехмерное распределение хлоропластов в клетке водоросли, что следует из сопоставления полученных нами данных с результатами, полученными с помощью других методов на аналогичных клетках (электронная микроскопия, АСМ и nanoFTIR [20, 21]). Например, с помощью nanoFTIR (разрешение – 20 нм) на аналогичном объекте были получены инфракрасные спектры

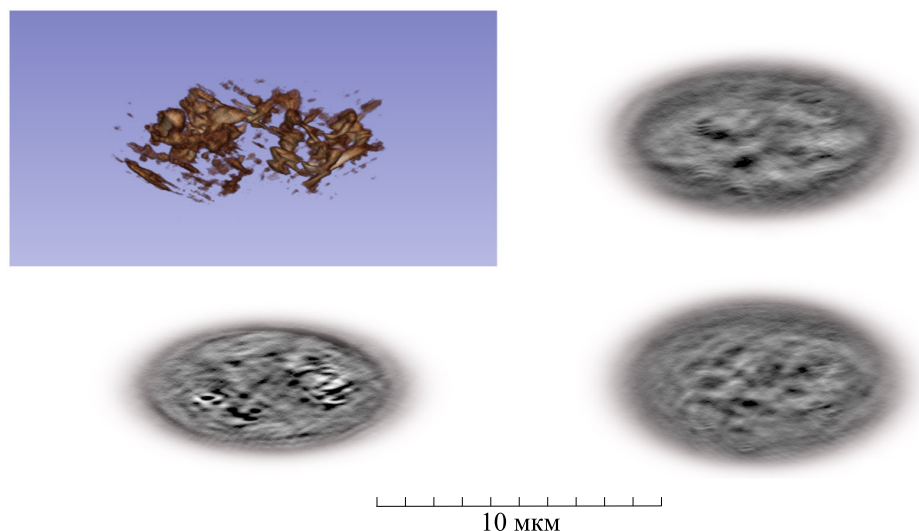


Рис. 1. Трехмерное распределение коэффициента поглощения $k(x,y,z)$ в клетке (слева); представлены три сечения: вверху клетки $k(x,y,z_1)$ (слева), в середине $k(x,y,z_2)$ (в середине) и внизу $k(x,y,z_3)$ (справа). Расстояние между сечениями 3.1 мкм.

молекул некоторых внутриклеточных органелл клетки водоросли, которые позволяют (в области 1800 см^{-1} и 1500 см^{-1}) идентифицировать молекулы белка, локализованные в центральной части пиреноида (1655 см^{-1} и 1540 см^{-1} , молекулярные колебания связи $\text{C}=\text{O}$ амида и моды изгиба NH - и растяжения CN -, известные как амид I и амид II соответственно), а также молекулы фотосинтетических комплексов – фотосистемы I и фотосистемы II [20, 21]. Ранее аналогичное распределение молекул субклеточных структур в клетке водоросли было показано с помощью флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния и АСМ [1–3].

Для того, чтобы доказать зависимость распределения величины оптической разности хода света (параметров ОЛТ) от функционального состояния клетки, водоросли инкубировали в среде с пестицидом, который влияет как на морфологию, состояние вязкости мембран, так и на фотосинтетическую активность пигментов водоросли. Доказано, что распределение оптической разности хода света при инкубации клеток *C. reinhardtii* зависит от концентрации пестицида в экстракционной среде (рис. 2 и 3).

Впервые изменения оптической разности хода света были выявлены в различных областях клетки, что подтверждает возможность эффективного использования ОЛТ для контроля за динамикой

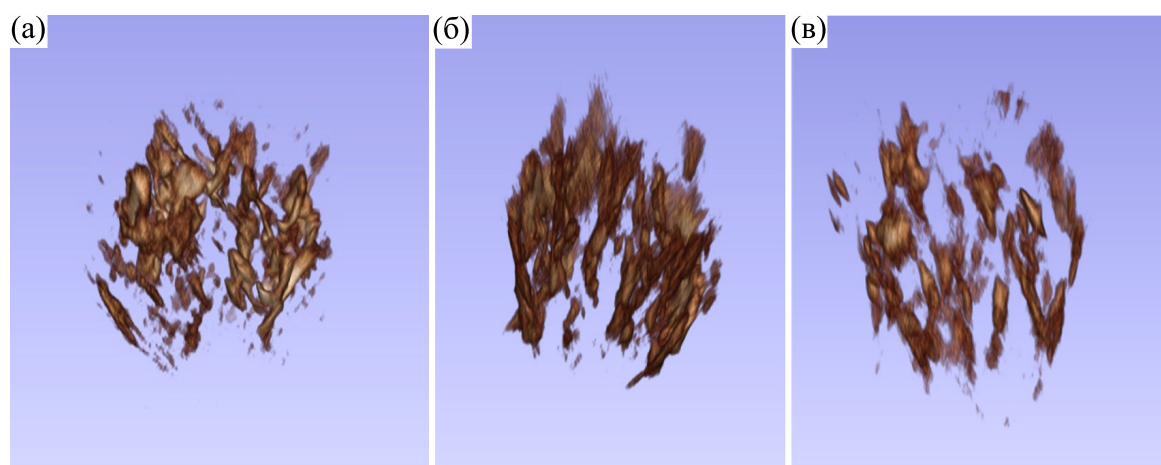


Рис. 2. Трехмерное распределение коэффициента поглощения $k(x,y,z)$ в клетке водоросли в норме (а) и при воздействии различных концентрация пестицида: 2 мг CL/л (б) и 4 мг CL/л (в).

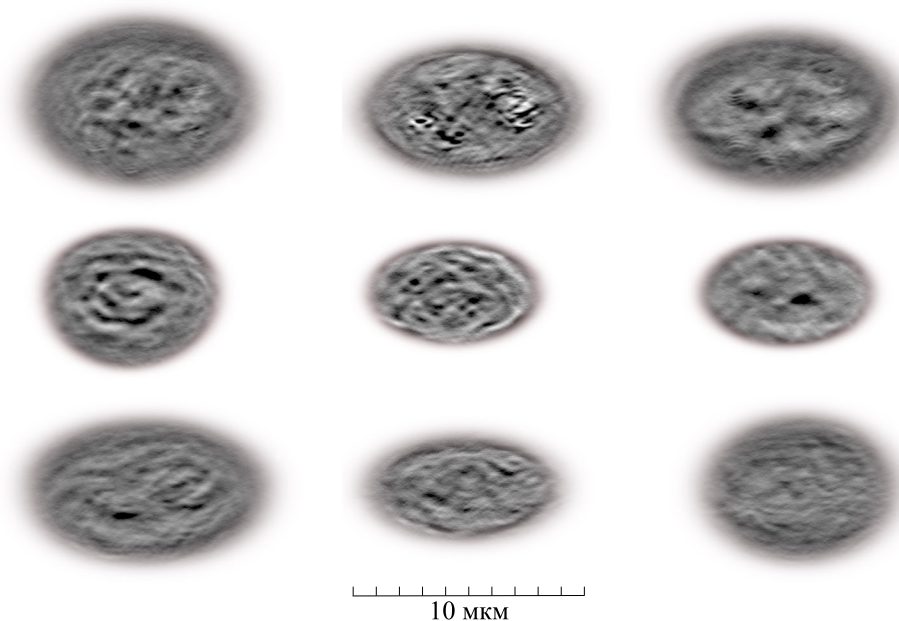


Рис. 3. Распределение коэффициента поглощения клеток *C. reinhardtii* в трех сечениях: верхнее сечение (слева), среднее сечение (середина), нижнее сечение (справа). Расстояние между сечениями клетки — 3.1 мкм. Контроль (слева), действие пестицида 2 мг CL/л (в центре) и 4 мг CL/л (справа).

перераспределения субклеточных структур при функционировании клетки. (рис. 2 и 3). Сопоставление полученных нами данных и результатов по распределению интенсивности полосы 1155 см^{-1} , полученных с помощью инфракрасной микроскопии, вероятно, позволяет говорить о наличии изменений в структуре хлоропласта вокруг пиреноида [20, 21].

Для анализа полученных результатов было проведено сопоставление локальных изменений ОЛТ (табл. 1, рис. 4) при действии пестицида на эффективность преобразования энергии в фотосистеме II (F_v/F_m), содержание хлорофилла (а + б) и крахмала (табл. 1). Содержание хлорофилла в суспензии определяли спектрофотометрически в 95%-м спирте [18], а содержание крахмала определяли как эквивалент содержания глюкозы [19].

Итак, обработка клеток водоросли пестицидом приводила к нарушению функционирования фотосинтетических процессов и структурной пе-

рестройке фотосинтетического аппарата, о чем свидетельствуют данные, приведенные в табл. 1. При этом негативный эффект был значительно сильнее при действии 2 мг CL/л и 4 мг CL/л. Так, при действии низкой концентрации параметр F_v/F_m снижался на 15%, содержание хлорофилла на клетку уменьшалось на 20%, а содержание крахмала увеличивалось на 13%. Обработка клеток раствором с большей концентрацией CL приводила к снижению F_v/F_m на 30%, хлорофилла на 40%, а содержание крахмала увеличивалось на 55%.

Как отмечалось ранее, с помощью разработанной нами программы возможна регистрация не только величины оптической разности хода света, но и содержания субклеточных органелл (например, хлоропластов) как в целой клетке (рис. 4а), так в различных участках клетки при действии пестицида (рис. 4б,в).

Итак, полученные нами ранее данные и новые результаты свидетельствуют о возможности ис-

Таблица 1. Эффективность преобразования энергии в фотосистеме II, содержание хлорофилла и крахмала при инкубации клетки с CL

	Контроль	2 мг/л CL	4 мг/л CL
F_v/F_m	0.75 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.52 ± 0.04
Хлорофилл, мкг/ 10^6 кл	2.73 ± 0.13	2.21 ± 0.18	1.63 ± 0.20
Крахмал, мкг глюкозы/ 10^6 кл	1.40 ± 0.14	1.58 ± 0.21	2.17 ± 0.30

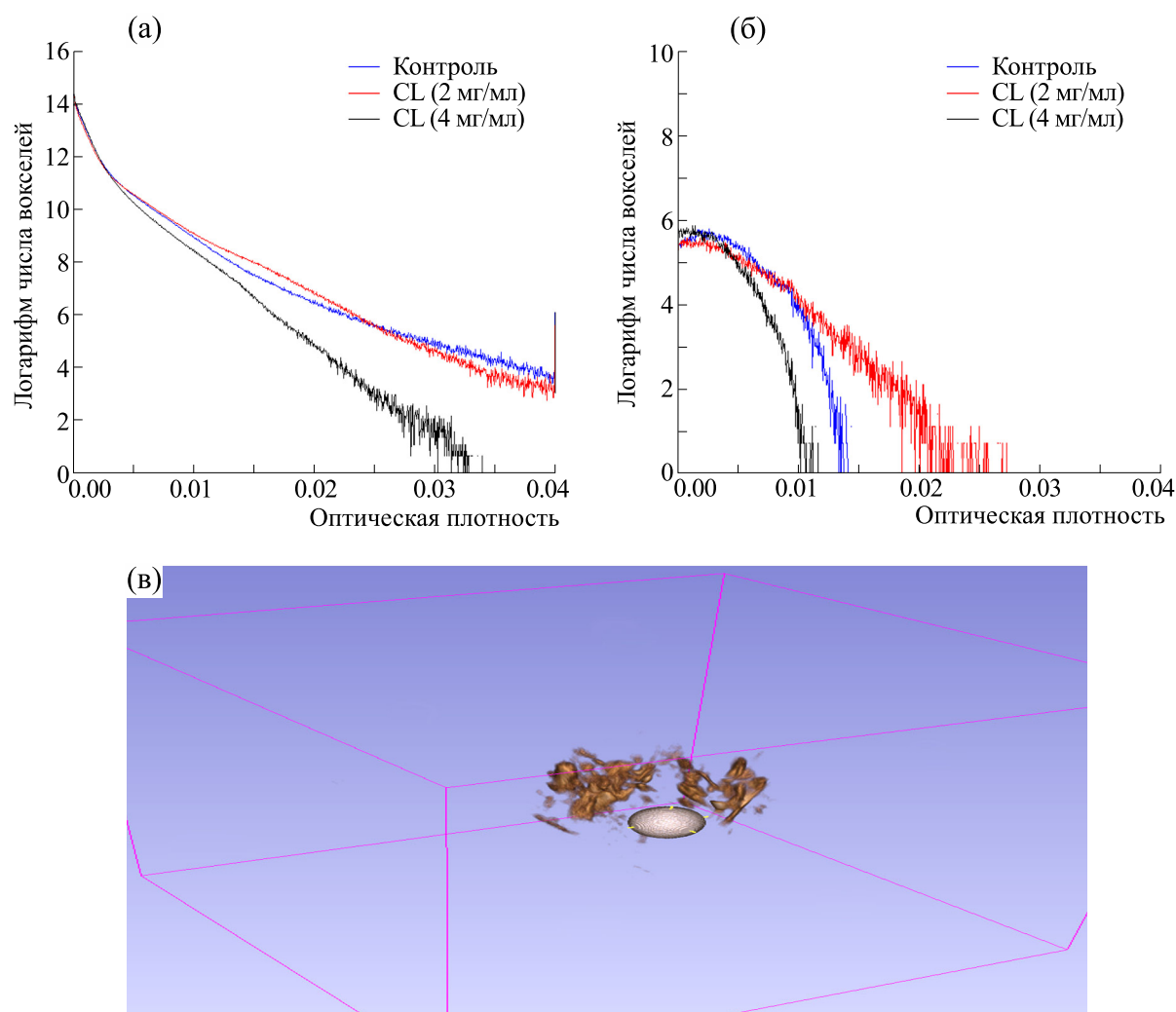


Рис. 4. Гистограммы распределения коэффициента поглощения, соответствующего концентрации хлорофилла, в клетке водоросли общее (а) и локальное (б) и при разных концентрациях пестицида. (в) — Сплошной сферой указана область локализации, в которой рассчитывалась гистограмма.

следования морфологии клеток водорослей методами АСМ, лазерной интерференционной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния, а также ОЛТ. Ранее мы доказали, что АСМ позволяет получать информацию о поверхности клетки и ее геометрических размерах, лазерная интерференционная микроскопия — о показателе преломления и, как следствие, о количестве вещества в определенной точке клетки [1]. Использование спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет изучать химический состав клетки, а также конформацию и распределение молекул пигментов (хлорофилла и каротиноидов).

Отличительной особенностью ОЛТ является возможность, помимо получения информации о трехмерной геометрии клетки, исследовать динамику 3D-распределения субклеточных структур

клетки водоросли. При этом существует возможность повышения эффективности контроля за изменениями координаты перемещения отдельных субклеточных структур для исследования механизма и роли при функционировании клетки (например, взаимное расположение хлоропластов и вакуоли в цитоплазме клетки водоросли). Важно, что в данной модификации метод ОЛТ позволяет исследовать небольшие клетки водоросли и клеточные структуры, т.к. не требует освещения (анализа) всего поля зрения.

Таким образом, как и визуализация клетки с помощью сканирующей оптической микроскопии, ОЛТ обеспечивает регистрацию распределения субклеточных оргanelл с высоким разрешением, в частности, у эукариотических водорослей (*C. reinhardtii*). Кроме того, ОЛТ позволяет анализировать распределение субклеточных структур

(хлоропластов) в нескольких последовательных срезах одной клетки в норме и при действии модификаторов ее функционального состояния (действие пестицидов). Такой подход позволяет не только выявить морфологию распределения и организации внутриклеточных структур (ядро, тилакоиды, митохондрии и т. д.) но и их динамику при функционировании клетки.

В настоящее время, методы и алгоритмы традиционной оптической компьютерной томографии не распространяются на клетки более сложной формы, такие, например, как клетки водоросли, имеющие многочисленные внутриклеточные структуры (ядро, хлоропласты, вакуоли и т.п.) [22, 23]. Современные методы позволяют только реконструировать изображение внутриклеточных структур в некотором приближении даже при неполных и неточных проекциях. Однако достоверность полученных изображений иногда вызывает сомнения, а выводы о корреляции полученного изображения и реальных структур клетки необходимо делать с большой осторожностью [10, 25–27].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Спонсор не участвовал в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Паршина Е. Ю., Самойленко А. А., Максимов Г. В., Юсипович А. И., Лобакова Е. С., Хе Я. и Левин Г. Г. Комплексный подход для исследования морфологии и распределения пигментов в клетке водоросли. Вестн. МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Естественные науки, № 2 (113), 129–148 (2024). EDN: NBOFMH
2. Parshina E. Y., Yusipovich A. I., Brazhe A. R., Silicheva M. A., and Maksimov G. V. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J. Biol. Phys.*, **45** (4), 367–377 (2019). DOI: 10.1007/s10867-019-09533-53.
3. Yusipovich A. I., Parshina E. Yu., Baizhumanov A. A., Pirutin S. K., Ivanov A. D., Minaev V. L., Levin G. G., and Maksimov G. V. Use of a laser interference microscope for estimating fluctuations and the equivalent elastic constant of cell membranes. *Instruments and Experimental Techniques*, **64** (6), 877 (2021). DOI: 10.1134/S0020441221060129
4. Faist J., Capasso F., Sivco D. L., Sirtori C., Hutchinson A. L., and Cho A. Y. Quantum cascade laser. *Science*, **264** (5158), 553–556 (1994). DOI: 10.1126/science.264.5158.553
5. Kuepper C., Kallenbach-Thieltges A., Juette H., Tanapfel A., Großerueschkamp F., and Gerwert K. Quantum Cascade laser-based infrared microscopy for label-free and automated cancer classification in tissue sections. *Sci. Rep.*, **8** (1), 7717 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-26098-w
6. Betzig E., Lewis A., Harootunian A., Isaacson M., and Kratschmer E. Near field scanning optical microscopy (NSOM): development and biophysical applications. *Biophys. J.*, **49** (1), 269–279 (1986)
7. Kawata S. and Inouye Y. Scanning probe optical microscopy using a metallic probe tip. *Ultramicroscopy*, **57**, 313–317 (1995).
8. Mastel S., Govyadinov A. A., Maissen C., Chuvilin A., Berger A., and Hillenbrand R. Understanding the image contrast of material boundaries in IR nanoscopy reaching 5 nm spatial resolution. *ACS Photonics*, **5**, 3372 (2018).
9. Hauer B., Engelhardt A. P., and Taubner T., Quasi-analytical model for scattering infrared near-field microscopy on layered systems. *Opt. Express*, **20** (12), 13173–13188 (2012).
10. Zuo C., Sun J., Li J., Asundi A., and Chen Q. (2020). Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography. *Optics and Lasers in Engineering*, **128**, 106003, (2020). DOI: 10.1016/j.optlaseng.2020.106003
11. Li J., Chen Q., Zhang J., Zhang Z., Zhang Y., and Zuo C. Optical diffraction tomography microscopy with transport of intensity equation using a light-emitting diode array. *Optics and Lasers in Engineering*, **95**, 26–34 (2017). DOI: 10.1016/j.optlaseng.2017.03.010
12. Soto J. M., Rodrigo J. A., and Alieva T., Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy. *Opt. Express*, **25**, 15699–15712 (2017). DOI: 10.1364/OE.25.015699
13. Hamano R., Mayama S., and Umemura K. Localization analysis of intercellular materials of living diatom cells studied by tomographic phase microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, **120** (13), 133701 (2022). DOI: 10.1063/5.0086165
14. Levin G. G. Contemporary methods of optical tomography and holography. *Meas. Tech.*, **48**, 1103–1108 (2005). DOI: 10.1007/s11018-006-0028-5

15. Vishnyakov G. N. and Levin G. G. Linnik tomographic microscope for investigation of optically transparent objects. *Meas. Tech.*, **41**, 906–911 (1998).
16. Minaev V. L. and Yusipovich A. I. Use of an automated interference microscope in biological research. *Meas. Tech.*, **55**, 839–844 (2012). DOI: 10.1007/s11018-012-0048-2
17. Harris E. H. *Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use* (Acad. Press, San Diego, CA, 1989).
18. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, **148**, 350–382 (1987). DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1
19. Gfeller R. P. and Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.*, **75** (1), 212–218 (1984). DOI: 10.1104/pp.75.1.212
20. Amenabar I., Poly S., Nuansing W., Hubrich E. H., Govyadinov A. A., Huth F., Krutokhvostov R., Zhang L., Knez M., Heberle J., Bittner A. M., and Hillenbrand R. Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nat. Commun.*, **4**, 2890 (2013). DOI: 10.1038/ncomms3890
21. Han Y., Han L., Yao Yu., Lia Ya., and Liu X. Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration. *Anal. Methods*, **10**, 2436–2443 (2018). DOI: 10.1039/C8AY00386F
22. Yusipovich A. I., Berestovskaya Yu. Yu., Shutova V. V., Levin G. G., Gerasimenko L. M., Maksimov G. V., and Rubin A. B. New possibilities for the study of microbiological objects by laser interference microscopy. *Meas. Tech.*, **55**, 351–356 (2012). DOI: 10.1007/s11018-012-9963-5
23. Zhurina M. V., Kostrikina N. A., Parshina E. Yu., Strelkova E. A., Yusipovich A. I., Maksimov G. V., and Plakunov V. K. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods. *Microbiology*, **82**, 517–524 (2013). DOI: 10.1134/S0026261713040164
24. Yusipovich, Berestovskaya Yu. Yu., Shutova V. V., Levin G. G., Gerasimenko L. M., Maksimov G. V., and Rubin A. B. New possibilities of studying microbial objects by laser interference microscopy. *Biophysics*, **56**, 1063–1068 (2011). DOI: 10.1134/S0006350911060224
25. Wu Z., Sun Y., Matlock A., Liu J., Tian L., Kamilov U. S. SIMBA: Scalable inversion in optical tomography using deep denoising priors. *IEEE J. Selected Topics Signal Process.*, **14**, 1163–1175 (2020).
26. Merola F., Memmolo P., Miccio L., Mugnano M., and Ferraro P. Phase contrast tomography at lab on chip scale by digital holography. *Methods*, **136**, 108–115 (2018). DOI: 10.1016/j.ymeth.2018.01.003
27. Jung J. H., Hong S. J., Kim H. B., Kim G., Lee M., Shin S., Lee S.-Y., Kim D.-J., Lee Ch.-G., and Park Y.-K. Label-free non-invasive quantitative measurement of lipid contents in individual microalgal cells using refractive index tomography. *Sci. Rep.*, **8** (1), 6524 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-24393-0

Study of the Distribution of Subcellular Structures in Algae Cells Using Optical Laser Tomography

A.A. Samoilenko*, G.G. Levin*, A.A. Volgusheva, A.P. Kazakov**, and G.V. Maksimov**, *****

*All-Russian Research Institute for Optical-Physical Measurements, Ozeraya St. 46, Moscow, 119361 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119892 Russia

***National University of Science and Technology "MISIS", Leninsky prosp. 4, Moscow, 119049 Russia

Using the developed method of optical laser tomography, the possibility of recording and analyzing the three-dimensional distribution of subcellular organelles in eukaryotic algae (*C. reinhardtii*) was proved. The method allows analyzing the redistribution of subcellular organelles (nucleus, chloroplast) in consecutive slices of one cell in norm and under the influence of modifiers of its functional state. According to the authors, the proposed approach will allow not only to study the dynamics of distribution of intracellular structures (nucleus, thylakoids, mitochondria, etc.), but also changes of a single structure during cell functioning.

Keywords: Chlamydomonas reinhardtii, optical laser tomography, cell morphology