

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ В КЛЕТКЕ ВОДОРОСЛИ

Е.Ю. Паршина¹

А.А. Самойленко²

Г.В. Максимов¹

А.И. Юсипович¹

Е.С. Лобакова¹

Я. Хе¹

Г.Г. Левин²

parshinae@gmail.com

asamoynenko@vniiofi.ru

gmaksimov@mail.ru

yusipovich@biophys.msu.ru

elena.lobakova@gmail.com

he.yanlin@qq.com

levin@vniiofi.ru

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

² ВНИИОФИ, Москва, Российская Федерация

Аннотация

С использованием атомно-силовой микроскопии, лазерной интерференционной микроскопии, микроспектроскопии комбинационного рассеяния и абсорбционной оптической томографии исследованы морфология и распределение структур клетки зеленой микроводоросли *Naematococcus lacustris*. Показано, что применение микроспектроскопии комбинационного рассеяния позволяет определить положение отдельных клеточных структур (хлоропласты), состав и конформацию молекул пигментов (каротиноиды), атомно-силовой микроскопии — латеральные и вертикальные размеры клетки, лазерной интерференционной микроскопии — оценить морфологию и/или показатель преломления вещества и, как следствие, локальную концентрацию вещества в клетке. Это дает возможность получить информацию о внутриклеточных структурах. Использование абсорбционной оптической томографии позволило получить трехмерные изображения полупрозрачных клеток микроводоросли *Naematococcus lacustris*, имеющих довольно сложную структуру, и визуализировать субклеточные структуры клетки водоросли несмотря на сильное поглощение света внутри клетки. Таким образом, комплексное использование атомно-силовой и лазерной интерференционной микроскопий, микроспектроскопии комбинационного рассеяния и аб-

Ключевые слова

Адсорбционная оптическая томография, атомно-силовая микроскопия, водоросли, *Naematococcus lacustris*, микроскопия комбинационного рассеяния, лазерная интерференционная микроскопия

сорбционной оптической томографии позволяет значительно расширить возможности исследования и получить детальную и комплексную информацию как о геометрии клетки и распределении субклеточных структур, так и об их молекулярном составе и конформации пигментов

Поступила 19.06.2023

Принята 05.07.2023

© Автор(ы), 2024

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «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

Введение. В настоящее время для исследования морфологии клетки и динамики субклеточных структур широко используют различные методы оптической фазовой микроскопии, включая лазерную интерференционную микроскопию (ЛИМ) [1–6]. Однако внедрение таких методов сопровождается трудностями, связанными с проблемой разрешения и идентификации внутриклеточных структур клетки. В связи с этим особое внимание уделяется разработке методик оптической томографии в сочетании с атомно-силовой микроскопией (АСМ), ЛИМ и микроскопии комбинационного рассеяния (КР) (см., например, [7, 8]). Атомно-силовая микроскопия клеток позволяет исследовать их размеры и в некоторых случаях модуль упругости (жесткость) клеток [8–10], КР-микроскопию используют для оценки состава, конформации и распределения веществ в клетках [7, 11, 12], оптическая фазовая томография и ЛИМ позволяют оценивать размеры, форму, механические характеристики и распределение вещества внутри клетки [3, 5, 13, 14]. Сочетание этих методов позволит получить подробную и комплексную информацию о геометрии клетки и распределении субклеточных структур, их молекулярном составе и конформации пигментов.

Одним из методов, позволяющих исследовать трехмерную структуру клетки, является абсорбционная оптическая томография (АОТ). Оптический микротомограф позволяет получать томограммы живых полупрозрачных клеток в режиме поглощения света. Основное преимущество использования АОТ заключается в том, что большое число биологических объектов характеризуется наличием полупрозрачных неоднородностей внутри клеток, что справедливо и в отношении *Naemotococcus lacustris* (*N. lacustris*). Все это не позволяет зарегистрировать фазовую составляющую поля в широком диапазоне значений углов зондирования объекта. Поэтому для исследования морфологии внутренней структуры клетки с большим числом неоднородностей необходимо использовать

АОТ, позволяющую определить абсолютную величину и контролировать динамику распределения коэффициента поглощения внутри клетки на длине волны зондирующего излучения.

В настоящее время методы и алгоритмы традиционной оптической компьютерной томографии не распространяются на клетки более сложной формы, например клетки водоросли, имеющие многочисленные внутриклеточные структуры (ядро, хлоропласты, вакуоли и т. п.), которые поглощают свет. Современные методы позволяют только реконструировать изображение внутриклеточных структур в некотором приближении даже при неполных и неточных проекциях. Очевидно, что достоверность полученных изображений вызывает сомнение, а выводы о корреляции изображения и реальных структур клетки необходимо делать с большой осторожностью.

Ранее возможности применения различных методов оптической компьютерной томографии продемонстрированы при исследовании клеток водоросли спиросиры [15–17], водорослей *Pandorina morum* [18–20], а также на диатомовых водорослях (например, [21, 22]). Полученные авторами данные морфологии клетки (длина, ширина, размеры пор и т. д.) хорошо согласуются с результатами, определенными с использованием других методов (например, сканирующей электронной микроскопии) [22]. С помощью оптической компьютерной томографии водорослей *Skeletonema marinoi* и диатомовых водорослей *Thalassiosira rotula* выявлены реальные формы и размеры хлоропластов и их расположение в клетке. При наличии в окружающей среде антропогенных веществ в хлоропластах водоросли обнаруживается нарушение структуры органеллы [23], что может привести к ингибированию фотосинтеза и синтеза АТФ. Оптическая компьютерная томография была использована для исследования микроводорослей *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) в целях определения содержания липидов в отдельной клетке [24]. Установлено, что при дефиците азота в *N. oculata* наблюдается накопление липидов и происходят изменения объема и массы сухих клеток, а также массы липидов отдельных клеток. Эти данные согласуются с представлением о том, что недостаток азота может компенсироваться разложением белков для поддержания метаболизма [25].

Цель работы — привести результаты исследования геометрических параметров клетки водоросли, локализации внутриклеточных структур и распределения отдельных молекул с помощью методов АСМ, ЛИМ и КР-микроспектроскопии, анализ морфологии клетки водоросли с использованием АОТ.

Материалы и методы. *Приготовление препаратов.* Изображения оптической ЛИМ, КР- и АСМ-изображения регистрировали на фиксирован-

ных препаратах зеленых водорослей *N. lacustris* [26]. Культуры микроводоросли выращивали на среде BG 11 [27] во флаконах стационарно при постоянном освещении 40 мкмоль фотонов ФАР/(м²·с) в течение двух недель. Для получения препаратов суспензию водорослей наносили на размеченное покровное стекло и высушивали на воздухе. Полученные препараты использовали для проведения КР- и АСМ-измерений. Для получения световых и ЛИМ-изображений микроскопии на покровное стекло, содержащее высушенные клетки, наносили 5 мкл раствора глицерин:вода (1:1 по объему) и через 10 мин помещали на зеркальную подложку (клетки к зеркалу), затем проводили измерения.

Абсорбционная оптическая томография. Подробное описание экспериментальной установки приведено в [28]. В качестве источника низкокогерентного излучения использовали коллимированный линзой точечный светодиод модели KED080RAXH (*Kyosemi Co.*, Япония): центральная длина волны излучения 650 нм, полуширина спектра излучения 10 нм, мощность излучения 0,6 мВ при токе 25 мА), размер площадки излучения 80 мкм² (это позволило снизить шумы получаемых изображений). Фазовые изображения получали с использованием сдвигового интерферометра (рис. 1). Образец помещали между двумя покровными стеклами и освещали параллельным лучом света (под различными углами) через широкоапертурный объектив для получения проекций. Наклон луча изменяли поворотом зеркала с помощью гальвосканера. Диапазон сканирования в установке составил примерно ± 60°.

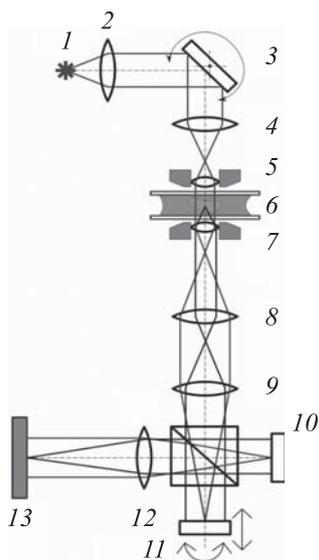


Рис. 1. Схема сдвигового интерференционного микротомографа:
 1 — низкокогерентный точечный светодиод (LED); 2 — коллиматорная линза;
 3 — управляемое поворотное полупрозрачное зеркало; 4 — плоскопараллельная линза; 5 — широкоапертурный объектив для освещения образца; 6 — образец; 7 — идентичный 5 широкоапертурный объектив для получения изображения; 8–12 — система линз; 10, 11 — зеркала сдвигового интерферометра, содержащего светоделительный кубик 50/50 между ними; 13 — светочувствительная матрица, используемая для формирования изображения

Изображение клетки получали с использованием алгоритма фазовых шагов, одно из зеркал смещалось с помощью пьезоэлемента. Изображение формировали на светочувствительной матрице, применяя системы линз. Восстановление фазовых изображений проводили методом интерферометрии фазовых шагов. В результате каждая проекция представляла собой изображение, аналогичное изображению, полученному в дифференциальном интерференционно-контрастном микроскопе, но с численными значениями, соответствующими производной фазе.

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 8...10 с. Для исследования клеток водоросли большого размера, диаметр которых составлял 80 мкм, томограф работал в режиме поглощения света.

Для того чтобы компенсировать влияние дифракции, использовали оригинальный алгоритм острой фокусировки. Для получения четкого изображения всей водоросли применяли процедуру многократного набора проекций при фокусировке на различные сечения внутри клетки. Сканирование вдоль оптической оси в процессе набора проекций осуществлялось механически. Для микроводорослей получено девять наборов проекций. При реконструкции томограмм для формирования 3D-изображения использовали только изображения сечений, полученные в области острой фокусировки. Описанная процедура позволила существенно ослабить влияние дифракционных эффектов и отфильтровать рассеянное излучение. Во многом этот алгоритм аналогичен получению наборов продольных томограмм в классическом томографе Бокажа (подробно теория формирования классических томограмм описана в [29]).

Для анализа АОТ-изображений микроводоросли *H. lacustris* использовали программу *3D Slicer*, которая позволила получить и исследовать произвольно ориентированные срезы клетки, строить модели поверхности из меток изображений и получить аппаратно-ускоренный объемный рендеринг (3D-изображение).

Оптическая и лазерная интерференционная микроскопия. Для сравнения с АОТ использовали лазерный автоматизированный интерференционный микроскоп МИА-1 с камерой модели UI-3140ср (IDS): черно-белая матрица с разрешением 1280 × 1024, частота кадров 50 fps, время экспозиции 10 мс, объектив 33×/0.65NA. Размер изображений объекта 200 × 150 мкм [30, 31]. Управление прибором и получение фазовых изображений по интерферограммам осуществляли с использованием про-

граммы *WinPhast*. При реконструкции одного фазового изображения применяли 10 интерференционных изображений, что позволяло регистрировать фазовые изображения с частотой 50 fps. ЛИМ-изображения и изображения в отраженном свете (оптическая микроскопия) получены с использованием лазера с длиной волны света 532 нм. Мощность лазеров составляла 20 мВт, мощность, приходящаяся на одну клетку, — менее 2 мВт. Лазерный луч направлен перпендикулярно плоскости клетки. Согласно описанию микроскопа, погрешность вдоль оптической оси составляла не более 1,9 нм, в плоскости XY — 0,5 мкм, повторяемость результатов измерений $s < 0,1$ нм.

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Измерения спектров КР проводили на комбинированном конфокальном микроскопе-спектрометре «Интегра-Спектра» (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия). Для регистрации спектров использовали длину волны возбуждающего света 532 нм, решетку 600 шт./мм, объектив 20×, время регистрации отдельного спектра для получения изображения 0,1 с. В каждой точке изображения записывали спектр КР в диапазоне значений 200...2400 см^{-1} . Наиболее интенсивные полосы в спектре принадлежат каротиноидам, для которых такая длина волны возбуждения является резонансной. Для построения изображений в каждой точке рассчитывали интеграл под кривой после вычитания базовой линии в диапазоне значений 1485...1565 см^{-1} . В этом диапазоне расположена полоса КР с максимумом 1530 см^{-1} , которая соответствует колебаниям двойных углеродных связей в молекуле каротиноида. Изображения регистрировали на площади 20 × 20 мкм (64 × 64 точки). Площадь под этой полосой и интенсивность в каждой точке изображения соответствуют содержанию каротиноидов в этой точке изображения [32].

Атомно-силовая микроскопия. Атомно-силовые изображения клеток получали на комбинированном конфокальном микроскопе-спектрометре Интегра-Спектра (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия). Для получения изображений использовали полуконтактный режим и кантилеверы NSG10 с радиусом кривизны иглы 10 нм, частота сканирования 1 Гц, размер изображения 256 × 256 точек.

Проведение измерений. АСМ- и КР-изображения получали на одних и тех же клетках без перемещения образца последовательно, сначала АСМ-изображение, затем КР. Для получения светового и ЛИМ-изображений на тех же клетках суспензию водорослей, нанесенную на размеченное стекло, после проведения АСМ- и КР-измерений и добавления раствора глицерина помещали на зеркальную подложку, находили соот-

ветствующий квадрат стекла и группу клеток, затем регистрировали световые и ЛИМ-изображения.

Результаты и их обсуждение. *Идентификация распределения структур и молекул пигментов в клетке водоросли с использованием КР-микроспектроскопии, АСМ и ЛИМ.* В результате исследования получены изображения трех групп клеток (2, 4 и 4 клетки). Предложенный здесь алгоритм позволил получить изображения одних и тех же клеток с помощью метода световой микроскопии (в белом свете), АСМ, КР (представлена общая интенсивность (интеграл) спектра и площадь под полосой 1530 см^{-1} , пропорциональная содержанию каротиноидов), методом ЛИМ (при возбуждении лазером 532 нм), а также поглощения (при освещении лазерами длиной волны 532 и 650 нм).

В работе использовали клетки штамма микроводоросли *N. lacustris* NAMSU VM1, которая характеризуется сложным жизненным циклом. Одновременно в культуре присутствуют различные жизненные формы разной морфологии [26]: 1) вегетативные клетки размером 4...12 мкм, окрашенные в зеленый цвет; 2) формирующиеся гематоцисты, частично окрашенные в красный цвет; 3) зрелые гематоцисты — крупные клетки диаметром до 20 мкм и более, полностью окрашенные в красный цвет за счет накопления вторичного каротиноида астаксантина; 4) автоспорангии — структуры вегетативного размножения содержащие 4–16 автоспор (рис. 2, а). Иногда в культуре идентифицируются подвижные зооспоры, имеющие на переднем конце два жгутика, которые лишены клеточной стенки и покрыты снаружи желатиновой капсулой, соединяющейся с протопластом тяжами.

Внутриклеточная организации клеток существенно зависит от морфотипа клеток. Так, зрелые неподвижные вегетативные зеленые клетки микроводоросли имеют четко очерченную клеточную стенку, к которой примыкает цитоплазматическая мембрана. В пристенной области цитоплазмы клетки располагается крупный чашевидный хлоропласт (хроматофор), в котором выявляются несколько пиреноидов (представляют собой центры синтеза сахаров) и крахмальные зерна. В центре клетки располагаются ядро, немногочисленные липидные глобулы (жировые капли) и другие органеллы [33]. В хлоропласте локализован фотосинтетический аппарат микроводоросли, включая хлорофиллы *a* и *b* и первичные каротиноиды. Схематическое изображение вегетативной клетки *N. lacustris* приведено на рис. 2, б. В стрессовых условиях вегетативные клетки трансформируются в гематоцисты, которые имеют совершенно другое строение:

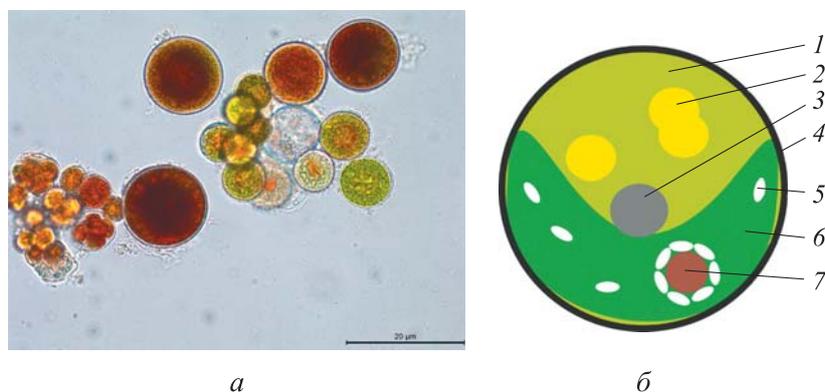


Рис. 2. Различные морфотипы клеток *N. lacustris* в культуре (а) и схематическое изображение вегетативной клетки (б):

- 1 — цитоплазма; 2 — липидные глобулы и клеточные органеллы; 3 — ядро;
 4 — клеточная стенка и плазматическая мембрана; 5 — крахмальные зерна;
 6 — хроматофор; 7 — пиреноид

клеточная стенка утолщается, клетка окрашивается в ярко-красный цвет за счет накопления в цитоплазме вторичного каротиноида астаксантина, размеры хлоропласта значительно уменьшаются, и он располагается в центре; по периферии клетки находятся крупные липидные глобулы, окрашенные в ярко-красный цвет. В целом протопласт вегетативной клетки представляет собой достаточно плотную структуру, основным компонентом которого является примыкающий к оболочке чашевидный хроматофор. Особенности внутреннего строения влияют на полученные разными методами изображения и спектры.

КР-микроспектроскопия клеток водоросли. При применении синих и зеленых лазеров КР-сигнал молекул каротиноидов значительно превосходит сигнал от других биологических молекул. Это обусловлено тем, что при таких длинах волн возбуждения регистрируются спектры резонансного КР, в результате чего сигнал может быть усилен в 1000 раз и более [34]. Поэтому наличие даже небольшого числа каротиноидов в составе объекта приводит к появлению типичных для каротиноидов полос в регистрируемых спектрах. В таком случае полосы каротиноидов являлись основными в регистрируемых спектрах (рис. 3). Поскольку первичные каротиноиды, в основном, могут находиться в хромофоре, участки с выраженными полосами, характерными для каротиноидов (~ 1000 , ~ 1160 и $\sim 1530 \text{ см}^{-1}$ [34]), являются маркерами расположения хромофора на изображении клетки. Согласно изображению на рис. 3, б, максимальное число каротиноидов распределено по периферии клетки, что позволяет судить

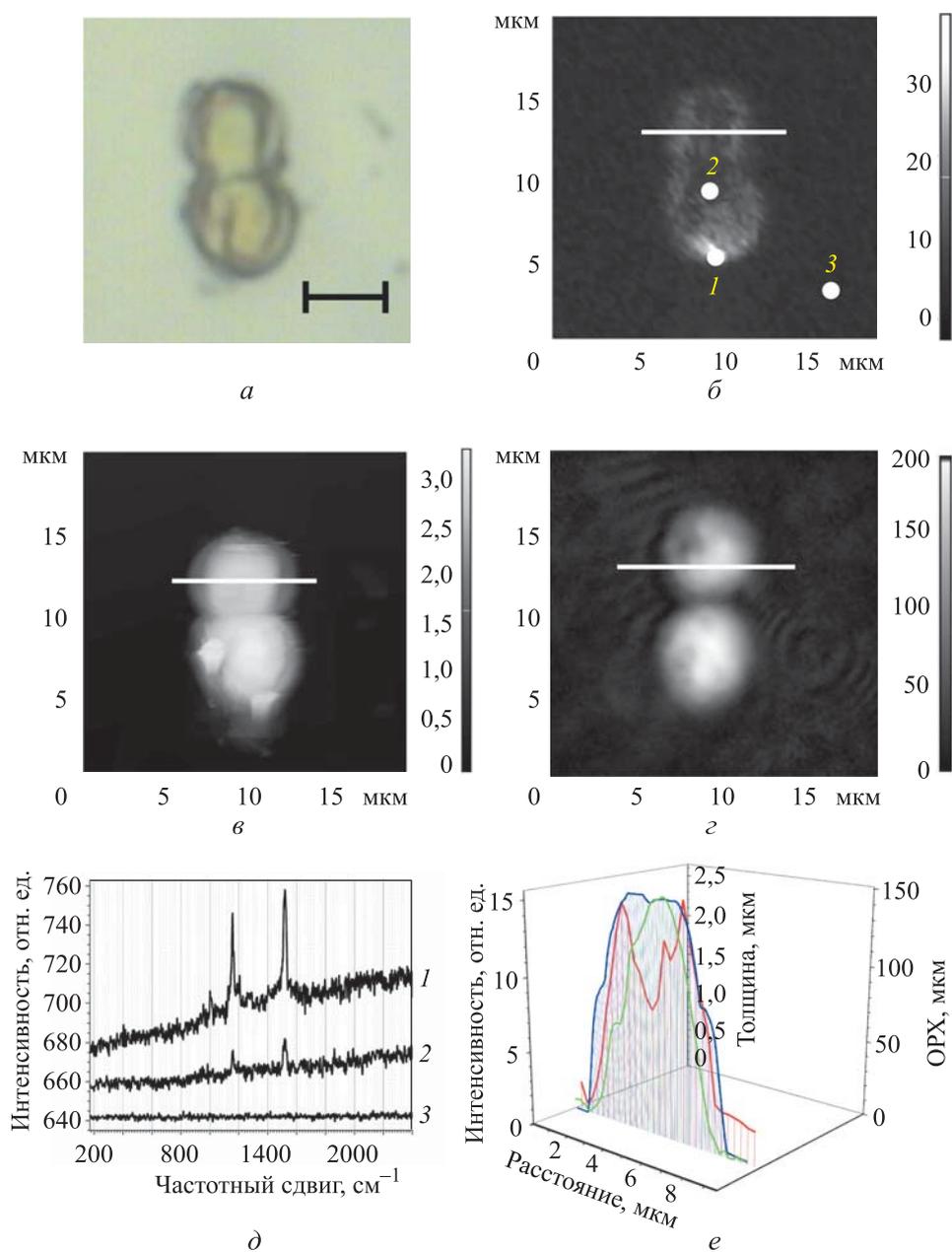


Рис. 3. Изображения клеток водоросли *N. lacustris*:

a — в проходящем свете, черный отрезок соответствует длине 5 мкм;
б — КР-изображение клеток водоросли, по оси *Z* отложена площадь пика с максимумом при 1520 см^{-1} (1 — хроматофор; 2 — центр клетки; 3 — подложка);
в — АСМ-изображение; *г* — ЛИМ-изображение; *д* — КР-спектры с различных участков водоросли (точки 1–3 на рис. 3, б); *е* — сравнение профилей изображений, полученных различными методами (положение сечений показаны линиями белого цвета на рис. 3, б, в, г; КР-профиль (—), АСМ- (—) и ЛИМ-изображения (—))

о локализации хроматофора. На профиле КР-изображения (рис. 3, е, кривая красного цвета) в середине клетки число каротиноидов меньше, чем по краям, поскольку центральную часть клетки занимают другие органеллы.

ЛИМ и АСМ клеток водорослей. АСМ-изображение представлено на рис. 3, в. Установлено, что клетки имеют выпуклую шаровидную форму, в центре наблюдается возвышение, которое, возможно, соответствует положению ядра в центре клетки. Используя АСМ-изображения, также можно оценить геометрические размеры клетки.

ЛИМ-изображение тех же клеток показано на рис. 3, г. Оптическая разность хода (ОРХ) в точке, измеряемая ЛИМ, представляет собой величину, пропорциональную геометрической толщине и показателю преломления биологического образца, в свою очередь он линейно пропорционален концентрации вещества): $ОРХ_i = (k - k_0)z_i$, где k — показатель преломления объекта в точке; k_0 — показатель преломления среды (показатель преломления глицерин:вода в соотношении 1:1); z_i — толщина объекта в точке.

Значение ОРХ можно интерпретировать как количество вещества в рассматриваемой точке объекта. Из распределения ОРХ ЛИМ следует, что количество вещества распределено неравномерно и не совпадает с АСМ-изображением. При сравнении выбранных ЛИМ- и АСМ-профилей (см. рис. 3, е) можно сделать вывод, что в центре клетки содержатся компоненты с высоким показателем преломления (ядро и гранулы), в левой части (где ЛИМ- и АСМ-профили не совпадают) располагаются органеллы с низким показателем преломления, возможно, вакуоль. Область клетки с низкими значениями ОРХ совпадает с областью максимальных значений содержания каротиноидов (по КР-профилю). Возможно, в этой области хроматофор находится над/под вакуолью. Можно также предположить, что молекулы каротиноидов локализованы в области с меньшей плотностью цитоплазмы (вакуоль) клетки водоросли, например, в виде липидных глобул или включений.

Следовательно, представленные на изображениях клетки возможно представляют собой вегетативную форму *H. lacustris*. Сопоставление сечений рельефа поверхности клетки (АСМ), распределения ОРХ и локализации молекул каротиноидов (КР) указывает на сложную трехмерную организацию клеток водоросли *H. lacustris*, которую можно исследовать выбранными методами.

Особенности АОТ клетки водоросли. В процессе исследования реализована возможность анализа пространственной структуры клеток с помощью АОТ на примере микроводоросли *H. lacustris* (80...100 мкм). Оче-

видно, что субклеточная структура этих клеток сложная и полученные методами обычной микроскопии изображения не позволяют получать детальное 3D-распределение вещества цитоплазмы. Отметим, что применение оптической фазовой томографии также не дало приемлемых результатов, так как сильное поглощение не позволило восстановить фазу прошедшего излучения в клетке. Именно использование АОТ дало возможность решить эту задачу, однако для компенсации дифракционных эффектов, которые возникают вследствие мелкой структуры внутри клетки, необходимо разработать специальный алгоритм острой фокусировки. Отметим, что такой подход перспективен для исследования динамики субклеточных структур в режиме метода локальной томографии. Результаты теоретических исследований и математического моделирования локальных алгоритмов томографии представлены в [28].

С использованием разработанных методов получены томограммы коэффициента поглощения микроводоросли *N. lacustris*, позволяющие исследовать ее внутреннюю структуру. Параллельные, последовательные сечения клетки (перпендикулярно оптической оси прибора) приведены на рис. 4. Толщина клетки составляет около 35 мкм. Другие использованные методы не позволяют полностью оценивать объекты такой толщины.

На полученных сечениях четко видна клеточная стенка. В среднем ряду (центральная часть клетки) расположена большая структура неправильной формы, примыкающая к клеточной стенке, которая, по-видимому, представляет собой хроматофор. Внутри структуры находятся шарообразные участки с меньшим коэффициентом поглощения (крайне правое сечение в центральном ряду и нижний ряд), которые, скорее всего, являются пиреноидами. Области клетки, не занятые хроматофором (нижний ряд), заполнены мелкими объектами, которые представляют собой различные клеточные органеллы (липидные глобулы). На основании изложенного можно предположить, что на рис. 4 приведены сечения микроцисты *N. lacustris*.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности исследования морфологии клеток водорослей методами АСМ, ЛИМ и КР-микроспектроскопии, а также АОТ. Метод АСМ позволяет получать информацию о поверхности клетки и ее геометрических размерах, ЛИМ — о показателе преломления и количестве вещества в определенной точке клетки, КР-микроспектроскопия — изучать состав клетки в каждой точке, судить о конформации основных молекул. В случае водорослей КР-изображения дают информацию о распределении и структуре молекул каротиноидов.

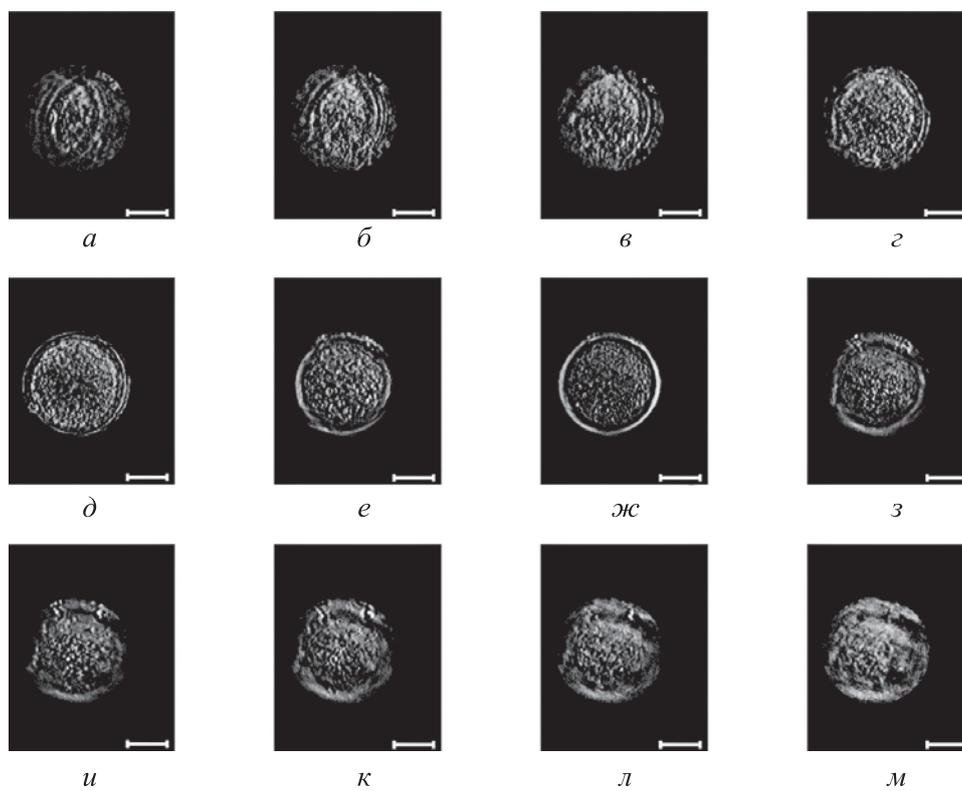


Рис. 4. Сечения параллельных предметному стеклу изображений клетки водоросли *H. lacustris* на расстоянии от поверхности клетки $z = 1$ (а), 4 (б), 7 (в), 10 (г), 13 (д), 16 (е), 19 (ж), 22 (з), 25 (и), 28 (к), 31 (л), 34 мкм (м); длина белой линии на сечении 10 мкм

Проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что АОТ сильно поглощающих объектов позволяет хорошо визуализировать морфологию внутренней структуры клеток. Использование алгоритмов острой фокусировки при наборе проекционных данных дает возможность существенно ослабить влияние эффектов рассеяния излучения на внутренних органеллах клетки, несмотря на некоторое увеличение времени сбора данных. Однако хорошие морфометрические данные не позволяют определять состав и количество различных веществ внутри клетки водоросли. Предлагаемый комплексный подход к измерению внутренней структуры клетки за счет применения различных методов микроскопии существенно расширяет возможности исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Юсипович А.И., Паршина Е.Ю., Байжуманов А.А. и др. Использование лазерного интерференционного микроскопа для оценки флуктуаций и эквивалентной константы упругости мембран клеток. *Приборы и техника эксперимента*, 2021, № 6, с. 93–101. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0032816221060136>
- [2] Левин Г.Г. Современные методы оптической томографии и голографии. *Измерительная техника*, 2005, № 11, с. 43–47.
- [3] Yusipovich A.I., Parshina E.Yu., Brysgalova N.Yu., et al. Laser interference microscopy in erythrocyte study. *J. Appl. Phys.*, 2009, vol. 105, iss. 10, art. 102037. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.3116609>
- [4] Юсипович А.И., Берестовская Ю.Ю., Шутова В.В. и др. Новые возможности исследования микробиологических объектов методом лазерной интерференционной микроскопии. *Метрология*, 2012, № 3, с. 17–26.
- [5] Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., et al. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index. *J. Microsc.*, 2011, vol. 244, iss. 3, pp. 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x>
- [6] Yusipovich A.I., Cherkashin A.A., Verdiyana E.E., et al. Laser interference microscopy: a novel approach to the visualization of structural changes in myelin during the propagation of nerve impulses. *Laser Phys. Lett.*, 2016, vol. 13, no. 8, art. 085601. DOI: <https://doi.org/10.1088/1612-2011/13/8/085601>
- [7] Parshina E.Yu., Sarycheva A.S., Yusipovich A.I., et al. Combined Raman and atomic force microscopy study of hemoglobin distribution inside erythrocytes and nanoparticle localization on the erythrocyte surface. *Laser Phys. Lett.*, 2013, vol. 10, no. 7, art. 075607. DOI: <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/7/075607>
- [8] Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., et al. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J. Biol. Phys.*, 2019, vol. 45, no. 4, pp. 367–377. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
- [9] Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.Ю. и др. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов. *Микробиология*, 2013, т. 82, № 4, с. 502–509. EDN: QCXYDV. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0026365613040162>
- [10] Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Platonova A.A., et al. Thermal inactivation of volume-sensitive K^+ , Cl^- cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol.*, 2013, vol. 465, no. 7, pp. 977–983. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1221-4>
- [11] Mojzeš P., Gao L., Ismagulova T., et al. Guanine, a high-capacity and rapid-turnover nitrogen reserve in microalgal cells. *PNAS*, 2020, vol. 117, no. 51, pp. 32722–32730. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2005460117>
- [12] Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I., et al. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Res.*, 2019, vol. 43, art. 101651. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>

- [13] Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А. и др. Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии. *Квантовая электроника*, 2006, т. 36, № 9, с. 874–878.
- [14] Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Yusipovich A.I., et al. $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl. *Heliyon*, 2021, vol. 7, iss. 9, art. e08088. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08088>
- [15] Wu Z., Sun Y., Matlock A., et al. SIMBA: scalable inversion in optical tomography using deep denoising priors. *IEEE J. Sel. Top. Signal Process.*, 2020, vol. 14, iss. 6, pp. 1163–1175. DOI: <https://doi.org/10.1109/JSTSP.2020.2999820>
- [16] Matlock A., Zhu J., Tian L. Multiple-scattering simulator-trained neural network for intensity diffraction tomography. *Opt. Express*, 2023, vol. 31, iss. 3, pp. 4094–4107. DOI: <https://doi.org/10.1364/oe.477396>
- [17] Li J., Matlock A., Li Y., et al. High-speed in vitro intensity diffraction tomography. *Adv. Photonics*, 2019, vol. 1, iss. 6, art. 066004. DOI: <https://doi.org/10.1117/1.AP.1.6.066004>
- [18] Li J., Sun J., Zhang J., et al. Three-dimensional optical diffraction tomographic microscopy with optimal frequency combination with partially coherent illuminations. *arXiv:1803.01151*. DOI: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1803.01151>
- [19] Zuo C., Sun J., Li J., et al. Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography. *Opt. Lasers Eng.*, 2020, vol. 128, art. 106003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2020.106003>
- [20] Li J., Chen Q., Zhang J., et al. Optical diffraction tomography microscopy with transport of intensity equation using a light-emitting diode array. *Opt. Lasers Eng.*, 2017, vol. 95, pp. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2017.03.010>
- [21] Soto J.M., Rodrigo J.A., Alieva T. Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy. *Opt. Express*, 2017, vol. 25, iss. 14, pp. 15699–15712. DOI: <https://doi.org/10.1364/oe.25.015699>
- [22] Hamano R., Mayama S., Umemura K. Localization analysis of intercellular materials of living diatom cells studied by tomographic phase microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 2022, vol. 120, iss. 13, art. 133701. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0086165>
- [23] Merola F., Memmolo P., Miccio L., et al. Phase contrast tomography at lab on chip scale by digital holography. *Methods*, 2018, vol. 136, pp. 108–115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.003>
- [24] Jung J., Hong S.-J., Kim H.-B., et al. Label-free non-invasive quantitative measurement of lipid contents in individual microalgal cells using refractive index tomography. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, art. 6524. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24393-0>
- [25] Shin H., Hong S.-J., Kim H., et al. Elucidation of the growth delimitation of *Dunaliella tertiolecta* under nitrogen stress by integrating transcriptome and peptidome analysis. *Bioresour. Technol.*, 2015, vol. 194, pp. 57–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.002>

[26] Kublanovskaya A., Baulina O., Chekanov K., et al. The microalga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) forms natural biofilms in supralittoral White Sea coastal rock ponds. *Planta*, 2020, vol. 252, no. 3, art. 37.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03438-7>

[27] Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, 1971, vol. 35, no. 2, pp. 171–205.

DOI: <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>

[28] Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L., et al. Investigation of the method of local optical tomography by differential projections. *Opt. Spectrosc.*, 2018, vol. 125, no. 6, pp. 1065–1073. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0030400X18120226>

[29] Левин Г.Г., Вишняков Г.Н. Оптическая томография. М., Радио и связь, 1989.

[30] Минаев В.Л., Юсипович А.И. Использование автоматизированного интерференционного микроскопа в биологических исследованиях. *Измерительная техника*, 2012, № 7, с. 66–69.

[31] Левин Г.Г., Вишняков Г.Н., Минаев В.Л. Автоматизированный интерференционный микроскоп для измерения динамических объектов. *Приборы и техника эксперимента*, 2014, № 1, с. 79–84. EDN: RTOVOT.

DOI: <https://doi.org/10.7868/S0032816214010066>

[32] Darvin M.E., Gersonde I., Meinke M., et al. Non-invasive *in vivo* determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, vol. 38, no. 15, art. 2696.

DOI: <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/15/023>

[33] Baudalet P.-H., Ricochon G., Linder M., et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.*, 2017, vol. 25, pp. 333–371.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>

[34] Pirutin S.K., Jia S., Yusipovich A.I., et al. Vibrational spectroscopy as a tool for bioanalytical and biomonitoring studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, iss. 8, art. 6947.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>

Паршина Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Самойленко Алексей Алексеевич — канд. физ.-мат. наук, начальник сектора НИО М-44 ВНИИОФИ (Российская Федерация, 119361, Москва, ул. Озерная, д. 46).

Максимов Георгий Владимирович — д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Юсипович Александр Иванович — канд. биол. наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Лобакова Елена Сергеевна — д-р биол. наук, профессор кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Хе Яньдинь — аспирант кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Левин Геннадий Генрихович — д-р техн. наук, профессор, начальник отделения голографии, оптической томографии, нанотехнологии и наноматериалов ВНИИОФИ (Российская Федерация, 119361, Москва, ул. Озерная, д. 46).

Просьба ссылаться на эту статью следующим образом:

Паршина Е.Ю., Самойленко А.А., Максимов Г.В. и др. Комплексный подход для исследования морфологии и распределения пигментов в клетке водоросли. *Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Естественные науки*, 2024, № 2 (113), с. 129–148. EDN: NBOFMH

INTEGRATED APPROACH TO STUDYING PIGMENT MORPHOLOGY AND DISTRIBUTION IN THE ALGAE CELL

E.Yu. Parshina¹

A.A. Samoylenko²

G.V. Maksimov¹

A.I. Yusipovich¹

E.S. Lobakova¹

Y. He¹

G.G. Levin²

parshinae@gmail.com

asamoylenko@vniiofi.ru

gmaksimov@mail.ru

yusipovich@biophys.msu.ru

elena.lobakova@gmail.com

he.yanlin@qq.com

levin@vniiofi.ru

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

²All-Russian Research Institute for Optical and Physical Measurements, Moscow, Russian Federation

Abstract

Atomic force microscopy, laser interference microscopy, Raman microspectroscopy and optical absorption tomography are used to study morphology and distribution of the green microalga *Haematococcus lacustris* cell structure. The paper shows that using Raman microspectroscopy makes it possible to identify position of separate cellular structures (chloroplasts), composition and conformation of the pigment molecules (carotenoids), atomic force microscopy, including the cell lateral and vertical size and laser interference microscopy, to determine the substance refraction indicator

Keywords

Adsorption optical tomography, atomic force microscopy, algae, Haematococcus lacustris, Raman microscopy, laser interference microscopy

and consequently the substance local concentration in a cell. This allows obtaining information about intracellular structures. Using the absorption optical tomography makes it possible to receive three-dimensional images of microalga *Haemotococcus lacustris* translucent cells, which have a rather complex structure, as well as to visualize the algae cell subcellular structures despite the light strong absorption inside the cell. Thus, integrated use of atomic force and laser interference microscopy, Raman microspectroscopy and absorption optical tomography allows significantly expanding research capabilities and obtaining detailed and comprehensive information about both the cell geometry and the subcellular structures distribution, as well as about their molecular composition and pigment conformation

Received 19.06.2023

Accepted 05.07.2023

© Author(s), 2024

The work was carried out with the support of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University "Molecular Technologies of Living Systems and Synthetic Biology". The sponsor was not involved in the development of the study, in the collection, analysis or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results

REFERENCES

- [1] Yusipovich A.I., Parshina E.Yu., Bayzhumanov A.A., et al. Use of a laser interference microscope for estimating fluctuations and the equivalent elastic constant of cell membranes. *Instrum. Exp. Tech.*, 2021, vol. 64, no. 6, pp. 877–885.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0020441221060129>
- [2] Levin G.G. Contemporary methods of optical tomography and holography. *Meas. Tech.*, 2005, vol. 48, no. 11, pp. 1103–1108.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11018-006-0028-5>
- [3] Yusipovich A.I., Parshina E.Yu., Brysgalova N.Yu., et al. Laser interference microscopy in erythrocyte study. *J. Appl. Phys.*, 2009, vol. 105, iss. 10, art. 102037.
DOI: <https://doi.org/10.1063/1.3116609>
- [4] Yusipovich A.I., Berestovskaya Yu.Yu., Shutova V.V., et al. New possibilities for the study of microbiological objects by laser interference microscopy. *Meas. Tech.*, 2012, vol. 55, no. 3, pp. 351–356. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11018-012-9963-5>
- [5] Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., et al. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: impact of cell volume and refractive index. *J. Microsc.*, 2011, vol. 244, iss. 3, pp. 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x>
- [6] Yusipovich A.I., Cherkashin A.A., Verdiyanyan E.E., et al. Laser interference microscopy: a novel approach to the visualization of structural changes in myelin during the propagation of nerve impulses. *Laser Phys. Lett.*, 2016, vol. 13, no. 8, art. 085601.
DOI: <https://doi.org/10.1088/1612-2011/13/8/085601>

- [7] Parshina E.Yu., Sarycheva A.S., Yusipovich A.I., et al. Combined Raman and atomic force microscopy study of hemoglobin distribution inside erythrocytes and nanoparticle localization on the erythrocyte surface. *Laser Phys. Lett.*, 2013, vol. 10, no. 7, art. 075607. DOI: <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/7/075607>
- [8] Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., et al. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J. Biol. Phys.*, 2019, vol. 45, no. 4, pp. 367–377. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
- [9] Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Parshina E.Yu., et al. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods. *Microbiology*, 2013, vol. 82, no. 4, pp. 517–524. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261713040164>
- [10] Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Platonova A.A., et al. Thermal inactivation of volume-sensitive K^+ , Cl^- cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol.*, 2013, vol. 465, no. 7, pp. 977–983. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1221-4>
- [11] Mojzeš P., Gao L., Ismagulova T., et al. Guanine, a high-capacity and rapid-turnover nitrogen reserve in microalgal cells. *PNAS*, 2020, vol. 117, no. 51, pp. 32722–32730. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2005460117>
- [12] Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I., et al. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Res.*, 2019, vol. 43, art. 101651. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>
- [13] Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., et al. Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy. *Quantum Electron.*, 2006, vol. 36, no. 9, pp. 874–878. DOI: <https://doi.org/10.1070/QE2006v036n09ABEH013408>
- [14] Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Yusipovich A.I., et al. Na^+ / K^+ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl. *Helijon*, 2021, vol. 7, iss. 9, art. e08088. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.helijon.2021.e08088>
- [15] Wu Z., Sun Y., Matlock A., et al. SIMBA: scalable inversion in optical tomography using deep denoising priors. *IEEE J. Sel. Top. Signal Process.*, 2020, vol. 14, iss. 6, pp. 1163–1175. DOI: <https://doi.org/10.1109/JSTSP.2020.2999820>
- [16] Matlock A., Zhu J., Tian L. Multiple-scattering simulator-trained neural network for intensity diffraction tomography. *Opt. Express*, 2023, vol. 31, iss. 3, pp. 4094–4107. DOI: <https://doi.org/10.1364/oe.477396>
- [17] Li J., Matlock A., Li Y., et al. High-speed in vitro intensity diffraction tomography. *Adv. Photonics*, 2019, vol. 1, iss. 6, art. 066004. DOI: <https://doi.org/10.1117/1.AP.1.6.066004>
- [18] Li J., Sun J., Zhang J., et al. Three-dimensional optical diffraction tomographic microscopy with optimal frequency combination with partially coherent illuminations. *arXiv:1803.01151*. DOI: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1803.01151>
- [19] Zuo C., Sun J., Li J., et al. Wide-field high-resolution 3D microscopy with Fourier ptychographic diffraction tomography. *Opt. Lasers Eng.*, 2020, vol. 128, art. 106003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2020.106003>

- [20] Li J., Chen Q., Zhang J., et al. Optical diffraction tomography microscopy with transport of intensity equation using a light-emitting diode array. *Opt. Lasers Eng.*, 2017, vol. 95, pp. 26–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2017.03.010>
- [21] Soto J.M., Rodrigo J.A., Alieva T. Label-free quantitative 3D tomographic imaging for partially coherent light microscopy. *Opt. Express*, 2017, vol. 25, iss. 14, pp. 15699–15712. DOI: <https://doi.org/10.1364/oe.25.015699>
- [22] Hamano R., Mayama S., Umemura K. Localization analysis of intercellular materials of living diatom cells studied by tomographic phase microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 2022, vol. 120, iss. 13, art. 133701. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0086165>
- [23] Merola F., Memmolo P., Miccio L., et al. Phase contrast tomography at lab on chip scale by digital holography. *Methods*, 2018, vol. 136, pp. 108–115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.003>
- [24] Jung J., Hong S.-J., Kim H.-B., et al. Label-free non-invasive quantitative measurement of lipid contents in individual microalgal cells using refractive index tomography. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, art. 6524. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24393-0>
- [25] Shin H., Hong S.-J., Kim H., et al. Elucidation of the growth delimitation of *Dunaliella tertiolecta* under nitrogen stress by integrating transcriptome and peptidome analysis. *Bioresour. Technol.*, 2015, vol. 194, pp. 57–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.002>
- [26] Kublanovskaya A., Baulina O., Chekanov K., et al. The microalga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) forms natural biofilms in supralittoral White Sea coastal rock ponds. *Planta*, 2020, vol. 252, no. 3, art. 37. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03438-7>
- [27] Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, 1971, vol. 35, no. 2, pp. 171–205. DOI: <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
- [28] Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L., et al. Investigation of the method of local optical tomography by differential projections. *Opt. Spectrosc.*, 2018, vol. 125, no. 6, pp. 1065–1073. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0030400X18120226>
- [29] Levin G.G., Vishnyakov G.N. *Opticheskaya tomografiya [Optical tomography]*. Moscow, Radio i svyaz Publ., 1989.
- [30] Minaev V.L., Yusipovich A.I. Use of an automated interference microscope in biological research. *Meas. Tech.*, 2012, vol. 55, no. 7, pp. 839–844. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11018-012-0048-2>
- [31] Levin G.G., Vishnyakov G.N., Minaev V.L. Automated interference microscope for measurement of dynamic objects. *Pribory i tekhnika eksperimenta*, 2014, no. 1, pp. 79–84 (in Russ.). EDN: RTOVOT. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0032816214010066>
- [32] Darvin M.E., Gersonde I., Meinke M., et al. Non-invasive *in vivo* determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, vol. 38, no. 15, art. 2696. DOI: <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/15/023>

[33] Baudalet P.-H., Ricochon G., Linder M., et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.*, 2017, vol. 25, pp. 333–371.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>

[34] Pirutin S.K., Jia S., Yusipovich A.I., et al. Vibrational spectroscopy as a tool for bioanalytical and biomonitoring studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, iss. 8, art. 6947.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>

Parshina E.Yu. — Cand. Sc. (Biol.), Senior Researcher, Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russian Federation).

Samoylenko A.A. — Cand. Sc. (Biol.), Head of Sector NIO M-44, All-Russian Research Institute for Optical and Physical Measurements (Ozernaya ul. 46, Moscow, 119361 Russian Federation).

Maksimov G.V. — Dr. Sc. (Biol.), Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russian Federation).

Yusipovich A.I. — Cand. Sc. (Biol.), Senior Researcher, Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russian Federation).

Lobakova E.S. — Dr. Sc. (Biol.), Professor, Department of Bioengineering, Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russian Federation).

He Y. — Post-Graduate Student, Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russian Federation).

Levin G.G. — Dr. Sc. (Eng.), Professor, Head of the Department of Holography, Optical Tomography, Nanotechnology and Nanomaterials, All-Russian Research Institute for Optical and Physical Measurements (Ozernaya ul. 46, Moscow, 119361 Russian Federation).

Please cite this article in English as:

Parshina E.Yu., Samoylenko A.A., Maksimov G.V., et al. Integrated approach to studying pigment morphology and distribution in the algae cell. *Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences*, 2024, no. 2 (113), pp. 129–148 (in Russ.). EDN: NBOFMH