

**ГОУ ВПО «СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ РОСЗДРАВА»**

**ФГУН «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ „ВЕКТОР“ РОСПОТРЕБНАДЗОРА»**

**ФИЛИАЛ ФГУП «НПО „МИКРОГЕН“» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ В г. ТОМСКЕ
«НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ „ВИРИОН“»**

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. В.Н. КАРАЗИНА

**В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая,
Н.М. Шевцова, А.А. Миллер, Б.Н. Зайцев,
Т.В. Тишко, В.П. Титарь, Д.Н. Тишко**

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА МИКРОСКОПИИ ЭРИТРОЦИТА

Под редакцией академика РАМН В.В. Новицкого,
профессора Н.В. Рязанцевой



Томск — 2008

УДК 616.155.1-092:57.086

ББК Р252.711.51

Т338

Рецензенты:

академик РАМН, профессор **Г.С. Якобсон**,

академик РАМН, профессор **А.М. Дыгай**

В монографии отражены результаты исследований, поддержанных Советом по грантам при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (проекты «Молекулярные механизмы нарушения структуры, метаболизма и функции клеток крови при патологии», НШ-1051.2003.4; «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток крови при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы», НШ-4153.2006).

Теория и практика микроскопии эритроцита / В.В. Новицкий, Т338 Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, Н.М. Шевцова, А.А. Миллер, Б.Н. Зайцев, Т.В. Тишко, В.П. Титарь, Д.Н. Тишко; Под ред. акад. РАМН В.В. Новицкого, проф. Н.В. Рязанцевой. — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. — 152 с.

ISBN 978-5-94476-125-2

В книге систематизированы современные представления об использовании различных видов микроскопии для оценки структурно-функциональных свойств эритроцитов в клинической практике и научных исследованиях. Детализированы преимущества и недостатки широко используемых микроскопических подходов (светоптическая, интерференционная и люминесцентная микроскопия) и высокотехнологичных методов (сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, цифровая голографическая интерференционная микроскопия). В удобной с точки зрения практического использования форме изложено описание методов подготовки образцов крови для микроскопических исследований, даны рекомендации по интерпретации результатов исследований. Обобщен собственный уникальный материал оценки поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов при действии повреждающих эндо- и экзогенных факторов. Теоретические обобщения о закономерностях морфологических изменений красных клеток крови при патологии документированы микрофотографиями.

Для гематологов, морфологов, патофизиологов, специалистов в области микроскопии биологических объектов.

УДК 616.155.1-092:57.086

ББК Р252.711.51

© В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая,
Н.М. Шевцова, А.А. Миллер, Б.Н. Зайцев,
Т.В. Тишко, В.П. Титарь, Д.Н. Тишко, 2008

ISBN 978-5-94476-125-2

© ООО «Печатная мануфактура», макет, 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Традиционные методы микроскопии эритроцитов.....	8
1.1. Светооптическая микроскопия.....	8
1.2. Интерференционная микроскопия.....	12
1.3. Люминесцентная микроскопия.....	13
Глава 2. Применение электронной микроскопии в исследова- ниях эритроцитов	16
2.1. Принцип работы электронного микроскопа	16
2.2. Устройство растрового электронного микроскопа.....	18
2.3. Технические ошибки и артефакты при электронной микро- скопии.....	21
2.4. Методы подготовки биологических образцов для элект- ронной микроскопии.....	22
2.4.1. Подготовка эритроцитов к электронно-микроскопи- ческому исследованию	26
2.5. Исследование морфологии эритроцитов с использованием электронной микроскопии.....	29
2.5.1. Морфологическая номенклатура эритроцитов.....	29
2.5.2. Механизмы трансформации эритроцитов	52
2.5.3. Типовые изменения морфологии эритроцитов при патологических процессах разного генеза	59
Глава 3. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов.....	78
3.1. Устройство и принцип работы атомно-силового микро- скопа.....	79
3.2. Режимы работы атомно-силового микроскопа.....	82
3.3. Технические ошибки и артефакты при атомно-силовой микроскопии	85
3.4. Подготовка образцов для атомно-силовой микроскопии ...	87
3.4.1. Подготовка эритроцитов к исследованию в атомно- силовом микроскопе.....	87

3.5. Исследования морфологии эритроцитов крови с помощью атомно-силового микроскопа	90
Глава 4. Современные методы световой микроскопии эритроцитов	98
4.1. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия	99
4.1.1. Голография — метод записи и восстановления волнового фронта	99
4.1.2. Классические методы исследования фазовых микрообъектов	103
4.2. Голографические методы визуализации фазовых микрообъектов	109
4.2.1. Голографическая микроскопия	109
4.2.2. Голографический метод фазового контраста (метод сложения и вычитания световых волн в интерференционной полосе)	112
4.2.3. Метод голографической интерферометрии в полосах конечной ширины	119
4.2.4. Сравнение возможностей голографических методов для решения задачи получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов	123
4.3. Цифровой голографический интерференционный микроскоп	125
4.4. Исследования морфологии эритроцитов крови с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа	128
Литература	135

Введение

Стремительное развитие медико-биологической науки, разработка новых диагностических и лечебных высокотехнологичных подходов сопряжены с пониманием молекулярных механизмов повреждения клеток. Подавляющее большинство достижений медицины последних лет стало следствием накопления значительного фактического материала о структурно-функциональных нарушениях клеток при болезнях разного генеза. Установлено, что нарушение функций одних клеток может быть первопричиной развития болезни, тогда как состояние других клеток становится нарушенным вследствие развития основного патологического процесса. В частности, сегодня можно с убедительностью говорить о том, что такая высокоспециализированная клетка, как эритроцит, вовлекается в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевает серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза.

Повышенный интерес исследователей к эритроцитам при патологии обусловлен участием этих клеток в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма. Основная роль эритроцита состоит в транспорте кислорода из легких в ткани и углекислого газа в легкие. Выполнение данной функции требует от клетки способности к поддержанию функциональной полноценности гемоглобина в течение всей ее жизни, формы, позволяющей эффективно доставлять кислород в ткани, а также способности к деформации, облегчающей передвижение эритроцитов по капиллярам. Однако роль красных кровяных клеток в организме не ограничивается лишь газотранспортирующей функцией. Эритроциты участвуют в процессе тромбообразования, регуляции кислотно-основного состояния и водно-электролитного обмена, в иммунных реакциях, в депонировании, транспортировке и метаболизме гормонов и нейромедиаторов, в связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов, токсинов, а также лекарственных веществ.

Зрелая эритроцитарная клетка не имеет цитоплазматических органелл и ядра, поэтому она не способна к синтезу белков и липидов,

окислительному фосфорилированию и к поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот. Гемоглобин составляет 98% массы белков цитоплазмы клетки. Энергообеспечение эритроцита происходит за счет гликолиза. Указанные структурные и физиологические особенности эритроцитов, а также доступность для исследования делают их чрезвычайно удобной моделью изучения действия эндо- и экзогенных факторов, в том числе и малой интенсивности, позволяют использовать в качестве информативного тест-объекта при оценке состояния организма при различных патологических процессах в клинической практике и научных исследованиях.

С внедрением новых методов стало ясно, что при изучении эритроцитов в микроскопе можно получить информацию не только о морфологических особенностях, но и о функциональных свойствах красных клеток крови. Это становится реальным благодаря использованию как традиционной микроскопии, так и высокотехнологичных ее подходов. Именно поэтому объединяющей для авторов данной книги идеей оказалось представление читателю информации о состоянии эритроцитов, получаемой при различных видах микроскопии. Так, детально рассматривается широко используемая в клинической практике традиционная светооптическая микроскопия для оценки формы, размера эритроцитов, интенсивности их окраски, наличия в цитоплазме включений и ядерных фрагментов. Продемонстрированы возможности интерференционной и люминесцентной микроскопии для оценки содержания внутриклеточных субстратов эритроцитов (сухая масса, сульфгидрильные группы, липопротеины). Особое внимание уделено использованию сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии для изучения поверхностной архитектоники, ультраструктуры мембраны и стромы эритроцитов. Впервые широкому кругу читателей представлены возможности применения цифровой голографической интерференционной микроскопии для оценки красных кровяных клеток в трехмерном изображении, установления взаимосвязи между структурой и функцией эритроцитов.

Книга содержит общие представления о методах и показаниях к применению микроскопии красных кровяных клеток, преимуществах того или иного подхода, возможных технических ошибках и артефактах, а также теоретические основы для интерпретации морфологических находок. Кроме того, многолетние собственные исследования эритроцитов при разных патологических процессах с привлечением сканирующей и трансмиссионной электронной, атомно-силовой, а также цифровой голографической интерференционной микроскопии позво-

лили авторам обозначить основные закономерности и молекулярные механизмы развития структурных изменений красных кровяных клеток при болезнях, а также документировать теоретические обобщения микрофотографиями.

Создание этой книги явилось результатом многолетней работы сотрудников кафедр патофизиологии, фундаментальных основ клинической медицины, биохимии и молекулярной биологии, сектора гематологии и электронной микроскопии Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, Россия), специалистов в области электронной микроскопии научно-производственного объединения «Вирион» (г. Томск, Россия), а также сотрудников отдела микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (п. Кольцово, Новосибирская область, Россия), занимающихся проблемой вовлечения эритроцитов в патологический процесс при болезнях разного генеза и впервые получивших результаты в области электронной и атомно-силовой микроскопии эритроцитов. В книге отражены результаты исследований ученых-физиков Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (Украина), разработавших уникальный цифровой голографический интерференционный микроскоп и ставших новаторами его использования для микроскопии эритроцитов. Примечателен тот факт, что, работая многие годы в разных областях науки (гематология, патофизиология, цитология, физика и др.), используя различные методические подходы и будучи географически разделенными, авторы получили фактические данные, позволившие сформулировать единую концепцию о типовых изменениях морфологии эритроцитов при патологических воздействиях.

Авторы книги считают своим приятным долгом выразить глубокую признательность коллегам-теоретикам и ученикам, принявшим участие в выполнении фрагментов представленных в монографии исследований, за радость профессионального и человеческого общения, а также коллегам-клиницистам, любезно предоставившим возможность работать в возглавляемых ими клиниках.

Глава 1

ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ ЭРИТРОЦИТОВ

1.1. Светооптическая микроскопия

Одним из самых распространенных оптических приборов, нашедших широкое применение в биологии и медицине, начиная с XVII в. и до настоящего времени является микроскоп. Сравнительная простота эксплуатации и относительная дешевизна обычного светового микроскопа, а также легкость в приготовлении препаратов позволяют использовать его повсеместно как для самостоятельных исследований, так и в роли вспомогательных методов при проведении более сложных и дорогостоящих исследований. Вместе с тем оптическая (световая) микроскопия обеспечивает получение значительного объема информации об изучаемом объекте.

При этом наиболее широко распространенным и часто используемым вариантом оптической микроскопии является *микроскопия методом светлого поля в проходящем свете*, который применяется при исследовании прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями. Таковым, например, является мазок крови. Абсорбирующие элементы, имеющиеся в мазке, отчасти поглощают и отчасти рассеивают падающий на них свет, что и обуславливает появление изображения. Метод может быть полезен и при микроскопии неабсорбирующих объектов в случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив. Если свет на объект направлять под большим углом к направлению наблюдения, то в ряде случаев это позволяет выявить рельефность объекта за счет образования теней, а подобный вариант освещения называют *методом светлого поля в косом освещении*.

Изучение эритроцитов в светооптическом микроскопе — классический морфологический метод исследования клеток крови. Используя метод световой микроскопии, можно подсчитать количество эритроцитов в единице объема крови, обнаружить изменения в морфологии эритроцитов, при помощи окуляр-микрометра произвести эритроцитометрию (оценить распределение красных клеток крови по величине их диаметра). Повышенный интерес исследователей к эритроциту обусловлен его участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма как в норме, так и при различных

патологических процессах. К настоящему времени доказано, что красные кровяные клетки вовлекаются в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза.

Для проведения световой микроскопии большое значение имеют приготовление и окраска мазка крови. Приготовление мазков требует от лаборанта определенного навыка. Качественный мазок занимает 75% поверхности стандартного предметного стекла, имеет ровные края и заканчивается «метелочкой». Важным условием является толщина мазка: в его тонкой части клетки должны лежать в один слой, не соприкасаясь друг с другом. Техника приготовления, фиксации и окраски мазков крови достаточно подробно описана в руководствах и справочниках по лабораторному делу [79]. При проведении световой микроскопии эритроцитов обязательным является использование иммерсионной системы, так как обычные неиммерсионные объективы не дают достаточной четкости изображения [55].

При изучении морфологии эритроцитов в светооптическом микроскопе наиболее показательными характеристиками красных клеток крови служат их форма, размер, интенсивность и распределение окраски, наличие в цитоплазме включений, зернистости, ядер и ядерных фрагментов. Именно при исследовании мазков крови в светооптическом микроскопе было установлено, что в норме большинство эритроцитов имеют форму двояковогнутого диска. Кроме того, описаны такие морфологические формы красных клеток крови, как серповидные (drepanоциты), овальные (овалоциты), имеющие зубчатую форму (акантоциты), с шиповидными отростками (эхиноциты), вытянутые, грушевидные клетки, эритроциты в виде ракеток, песочных часов, микро-, макро- и мегалоциты, мишеневидные, стоматоциты, а также фрагментированные эритроциты (шистоциты, или шизоциты) (рис. 1). Установлено, что в некоторых случаях изменения формы эритроцитов имеют специфический характер и связаны с аномалиями структуры мембраны эритроцитов, а иногда носят наследственный характер.

Изучение интенсивности и характера окраски эритроцитов в мазках крови в норме и при различной патологии методом светооптической микроскопии позволяет выявить нарушения созревания эритроидных клеток (рис. 2, *д*). Методом микроскопии светлого поля в проходящем свете в мазках крови возможно обнаружить ядерные формы эритроцитов (нормобласты различной степени зрелости), тельца Жолли (фиолетово-красные включения) и кольца Кабо (бледно-розовые онтаминаты в виде эллипсов или восьмерок) (рис. 2, *а–г, е*), наличие которых также является признаком патологии.

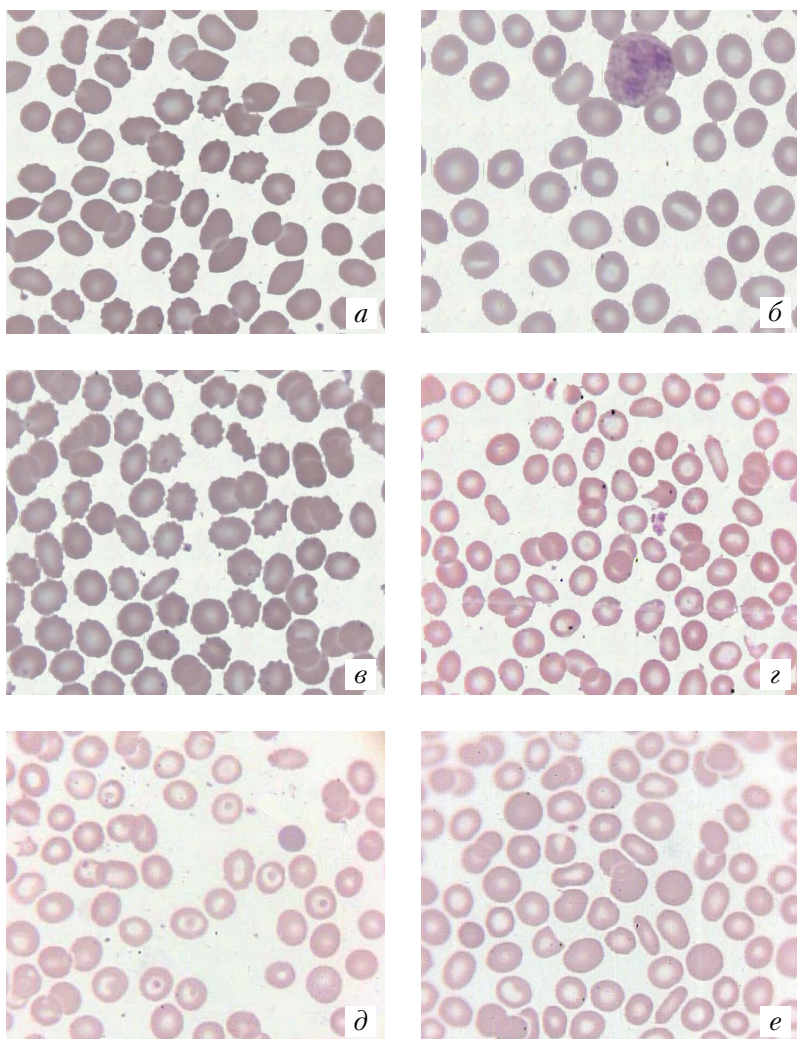


Рис. 1. Морфологические формы эритроцитов человека: *a* — акантоциты ($\times 630$); *б* — стоматоциты ($\times 900$); *в* — эхиноциты ($\times 630$); *г* — шистоциты ($\times 450$); *д* — мишеневидные эритроциты ($\times 630$); *е* — овалоциты ($\times 630$). Светооптическая микроскопия (окраска по Нохту—Максимуму)

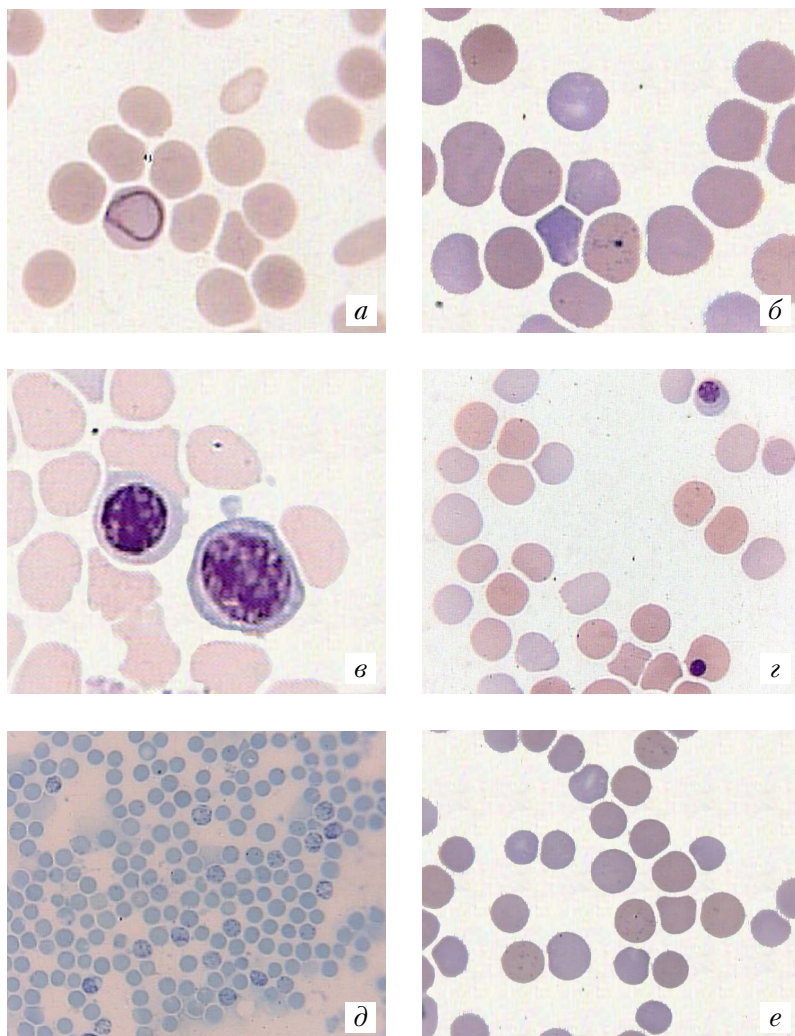


Рис. 2. Морфологические формы эритроцитов человека: *а* — эритроцит с кольцом Кабо ($\times 1350$); *б* — эритроцит с тельцем Жолли ($\times 1350$); *в* — полихроматофильный и базофильный нормобласты ($\times 2250$); *г* — полихроматофильный и оксифильный нормобласты ($\times 900$); *д* — полихроматофилы ($\times 900$); *е* — ретикулоциты ($\times 360$). Светооптическая микроскопия (*а–д* — окраска по Нохту–Максимуму; *е* — суправитальная окраска)

1.2. Интерференционная микроскопия

В 1970–1980-е гг. широкое применение в области морфологических исследований клеток крови, и эритроцитов в частности, получили методы, позволяющие оценить функциональное состояние клетки, ее структурную композицию. Эритроциты крови, как и многие другие клетки живых организмов, являются фазовыми микрообъектами. Они практически не изменяют интенсивность проходящего через них излучения, а вносят лишь фазовые изменения. Поэтому при наблюдении в обычный световой микроскоп эритроциты остаются невидимыми, так как ни глаз, ни любой другой фотоприемник излучения не воспринимает таких фазовых изменений. Для визуализации этих микрообъектов необходимо преобразовать фазовые изменения, которые они вносят в проходящую световую волну, в изменения распределения интенсивности. Интерференционная микроскопия позволяет получать не только контрастное изображение фазовых объектов и их структур, но и производить с высокой степенью точности измерение сухой массы клетки, а также ее отдельных компонентов, определять концентрацию плотных веществ, показатель преломления, толщину и объем эритроцита и вычислять такие физические величины, как светопропускаемость, двойное лучепреломление и др. [32]. И все же основным достоинством интерференционной микроскопии является высокая точность измерения толщины и сухой массы плотных веществ в живых фиксированных клетках и клеточных структурах, а также хорошая воспроизводимость результатов.

Для проведения интерференционной микроскопии эритроцитов большое значение имеет правильное приготовление препарата. При этом используемые стекла, как предметные, так и покровные, должны быть тщательно обезжирены, без царапин и радужных разводов. Определение содержания плотных веществ в эритроците производится в однородном интерференционном поле с большим раздвоением изображения при длине монохроматической волны света 546 нм под масляной иммерсией ($n = 1,555$) при увеличении 8×100 .

Основу сухой массы эритроцитов (95,5%) у здорового человека составляет гемоглобин [100, 148]. Зрелый эритроцит, по существу, представляет собой мембрану, заполненную концентрированным раствором гемоглобина, синтез которого заканчивается на ранних стадиях ретикулоцитов, и содержание гемоглобина не изменяется до конца жизни клетки. Следовательно, величина сухой массы является интегрированным показателем, отражающим процессы гемоглобинизации эритроидных элементов и характеризующим их по степени насыщения

гемоглобином [54]. Поскольку интерферометрические измерения проводятся в каждой взятой клетке, то полученные данные позволяют проанализировать распределение эритроцитов в зависимости от содержания плотных веществ, а следовательно, и гемоглобина, оценить и выразить количественно степень анизохромии [16]. Так как синтез гемоглобина заканчивается на ранних стадиях ретикулоцитов и его содержание не изменяется до конца жизни клетки, результаты интерферометрического изучения эритроцитов периферической крови позволяют в определенной мере судить и о гемоглобинообразовательных процессах в эритронормобластах костного мозга [93, 121, 122].

К настоящему времени использование интерферометрии для определения сухой массы эритроцитов позволило охарактеризовать структуру их популяции у здоровых людей и при ряде заболеваний, изучить некоторые закономерности процессов гемоглобинизации в физиологических и патологических условиях. Этот метод дал возможность выявить возрастные и половые различия гемоглобин-синтетических процессов в клетках костного мозга. С его помощью обнаружены выраженные изменения популяции эритроцитов по содержанию в клетках гемоглобина при физиологически протекающей беременности, анемиях различной этиологии, лейкозах, злокачественных новообразованиях различной локализации, хронических воспалительных заболеваниях, ожоговой болезни, вирусном гепатите и др. [32, 59, 81, 83, 84, 102, 120, 123, 135, 136].

Ценность микроскопии возрастает при сочетанном применении с гистохимическими исследованиями. Впервые метод окраски берлинской лазурью красных клеток крови для выявления железа был предложен М. Perl's в 1867 г. [131]. Однако широкое применение цитохимических методов в гематологии началось лишь с середины XX в. Вместе с разработкой новых цитохимических реакций появилась потребность в их количественной оценке. Это стало возможным, когда цитохимические исследования эритроцитов дополнили интерференционной и люминесцентной микроскопией.

1.3. Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия относится к разряду абсорбционной цитофотометрии, так как измеряет интенсивность светового потока, проходящего через клетку или излучаемого ею.

В основе абсорбционной цитофотометрии лежит закон Ламберта—Бера (Бугера—Ламберта—Бера), устанавливающий экспоненциальное соотношение между поглощением монохроматического света и

количеством поглощающего материала, через который проходит свет. Уменьшение интенсивности светового потока определенной длины волны при прохождении через окрашенный объект пропорционально логарифму концентрации красителя и расстоянию в красителе, которое проходит световой поток.

При люминесцентной микроскопии эритроцитов применяют цитофотометрию в видимой области спектра (590 нм) и измеряют содержание не самого вещества, а связанного с ним красителя. Люминесцентный микроскоп включает в себя источник света, монохроматор, измерительную диафрагму (при исследовании эритроцитов — зонд 0,5), фотоэлектронный умножитель и электронный блок, регистрирующий интенсивность светового потока. Люминесцентная микроскопия используется для определения содержания сульфгидрильных SH-групп и липопroteинов в эритроцитах [87, 93, 123], что дает дополнительные сведения о морфофункциональном статусе красных клеток крови в норме и при различной патологии. Например, анализ распределения эритроцитов по содержанию в них тиоловых групп и липопroteинов у онкологических больных позволил обнаружить признаки выраженной перестройки в структуре клеточной популяции с увеличением количества клеток с пониженным и низким содержанием изученных субстратов. Сульфгидрильные группы играют важную роль в создании нативной конформации белка и определении свойств ферментов, связанных с процессами деления и дифференцировки клеточных элементов. Считается, что по их содержанию можно судить о функциональном состоянии клеток (в том числе и клеток крови) в норме и при патологии. Функциональная полноценность эритроцита, прежде всего его газотранспортирующая функция, находится в прямой связи с метаболическими системами, регулирующими уровень восстановленного глутатиона, на который приходится около 90% всех сульфгидрильных групп [6, 72, 187]. Инактивация (или снижение содержания) SH-групп в эритроцитах приводит к сокращению периода их циркуляции в периферической крови. Уменьшение содержания липопroteинов в эритроцитах периферической крови, отмеченное у онкологических больных в результате проведенного цитоморфометрического исследования, может вызывать структурную перестройку мембран клеток красной крови и изменение их проницаемости для ионов Na [87, 93]. Вследствие этого изменяются форма эритроцитов, их способность к деформации, что, в свою очередь, провоцирует преждевременный гемолиз клеток [91–93, 120, 121]. Нарушения структурно-функциональных свойств эритроцитов, о чем свидетельствовало изменение содержания в них SH-групп и липопroteинов,

были обнаружены при острой пневмонии, сахарном диабете, шизофрениях, аутоиммунном тиреоидите, ожоговой болезни, atopическом дерматите и других патологических состояниях [2, 36, 41, 59, 74, 76, 81, 102, 103, 107, 120, 133, 138].

При проведении как интерференционной, так и люминесцентной микроскопии эритроцитов важно иметь четкое представление об ошибках методов, чтобы по возможности их скорректировать или, по крайней мере, учитывать при трактовке результатов. Как показывает опыт, артефакты в измерении в основном связаны с ошибками приготовления препарата для микроскопии и нестабильностью источников питания осветителя и регистрирующих устройств. Поэтому необходимо строго следовать методике приготовления препарата для микроскопии, соблюдая временные и температурные режимы окраски, а также проводить тщательную стабилизацию электрических узлов и электронных схем приборов.

Глава 2

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЭРИТРОЦИТОВ

Разрешающая способность светоптического микроскопа в основном зависит от длины световой волны, показатель которой является величиной постоянной и неизменной для каждой части спектра. Поэтому разрешающая способность не может быть выше 0,1–0,18 мкм [49]. В 1931–1932 гг. был создан электронный микроскоп, в котором вместо световых лучей используются пучки электронов, ускоренных до больших энергий (30–100 кэВ и более) в условиях глубокого вакуума. К настоящему времени разрешающая способность таких микроскопов составляет 0,2–0,3 нм, а в отдельных случаях — 0,12 нм. Это позволяет осуществлять исследования на субклеточном и молекулярном уровнях.

2.1. Принцип работы электронного микроскопа

Принцип работы любого электронного микроскопа основан на получении информации об исследуемом образце при помощи электронного пучка. Вместе с тем способы получения этой информации различаются: в просвечивающем электронном микроскопе электронный луч проходит сквозь объект, а в растровом пучок электронов, сформированный электронно-оптической системой в виде тонкого конусовидного зонда, сканирует поверхность исследуемого объекта. В последнем случае электронный зонд фокусируется на поверхности объекта в малый кружок диаметром обычно от 5 нм до 1 мкм [34]. Для получения растрового изображения с высоким пространственным разрешением главным требованием является малый диаметр пучка. В идеальном случае диаметр области считывания информации пучком на образце должен быть сравним с диаметром пучка. В действительности вследствие рассеивания электронов этого не происходит.

Рассеивание электронов можно разделить на два типа — упругое и неупругое. В случае упругого рассеивания изменяется направление движения электрона, а его скорость остается практически постоянной, так что кинетическая энергия электрона не меняется. При неупругом рассеивании энергия передается атомам и электро-

нам образца, в результате чего кинетическая энергия электрона в пучке уменьшается.

Существует множество процессов неупругого рассеивания, например: возбуждение электронов проводимости, способствующее эмиссии вторичных электронов; ионизация внутренних электронных оболочек, вызывающая характеристическое рентгеновское излучение и эмиссию оже-электронов; торможение электронов в кулоновском поле атома, следствием чего является тормозное или непрерывное рентгеновское излучение, а также ряд других процессов (рис. 3).

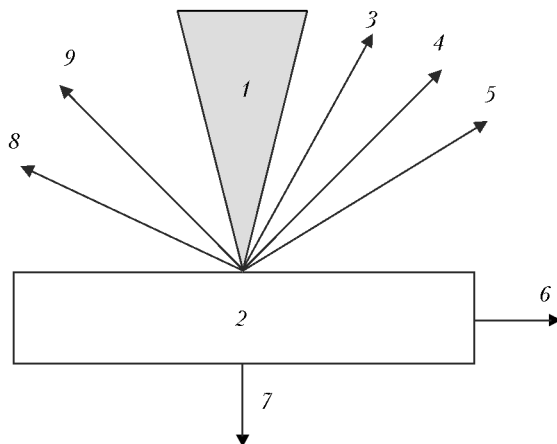


Рис. 3. Эффекты взаимодействия электронного луча с объектом [15]: 1 – электронный луч; 2 – объект; 3 – отраженные электроны; 4 – вторичные электроны; 5 – оже-электроны; 6 – ток поглощенных электронов; 7 – прошедшие через объект электроны; 8 – катодолуминесцентное излучение; 9 – рентгеновское излучение

Электроны, претерпевшие на образце упругое рассеивание, часто называют отраженными. Они образуются при рассеивании первичных электронов на большие (до 90°) углы в результате однократного упругого или многократного рассеивания на малые углы. Размеры области генерации отраженных электронов велики по сравнению с диаметром электронного зонда и могут достигать $0,1\text{--}1,0$ мкм. Чем выше ускоряющее электроны напряжение, тем с большей области регистрируются отраженные электроны, так как электроны с большими энергиями способны пройти большие расстояния в объекте, прежде чем покинуть его поверхность.

Неупруго рассеявшиеся электроны могут передавать часть энергии электронам внешних оболочек атомов объекта. Вследствие этого происходит ионизация атомов, а высвободившиеся электроны могут

покидать объект в виде вторичных электронов. Вторичные электроны характеризуются малой энергией (до 50 эВ), а потому выходят с очень близких к поверхности участков образца — с глубины около 5–10 нм. В пределах такого слоя рассеивание электронов очень мало, поэтому при регистрации вторичных электронов разрешающая способность электронного микроскопа определяется диаметром первичного электронного зонда. Как правило, паспортные характеристики растрового электронного микроскопа приводятся именно для случая получения изображения объекта в режиме регистрации вторичных электронов.

Для получения изображения поверхности объекта чаще всего используются вторичные, отраженные и поглощенные электроны. Остальные излучения применяются в растровом электронном микроскопе как дополнительные источники информации, например характеристическое рентгеновское излучение — для анализа элементного состава исследуемого объекта.

2.2. Устройство растрового электронного микроскопа

Растровый электронный микроскоп состоит из следующих основных узлов: электронной пушки, эмитирующей электроны; электронно-оптической системы, формирующей электронный зонд и обеспечивающей его сканирование на поверхности образца; системы формирования изображения. Растровый электронный микроскоп имеет вакуумную камеру, которая служит для создания необходимого разряжения ($\sim 10^{-3}$ Па) в рабочем объеме электронной пушки и электронно-оптической системы (рис. 4) [13].

Электронная пушка состоит из катода 1, цилиндра Венельта 2 и анода 3. Обычно в качестве катода используется V-образная вольфрамовая нить-проволока, как это показано на рис. 4. При нагреве катода прямым пропусканием тока возникает термоэмиссия электронов. Электроны ускоряются напряжением, приложенным между катодом и анодом, которое можно изменять от единиц до десятков киловольт. Цилиндр Венельта имеет высокий отрицательный потенциал и служит для регулировки потока электронов. Пучок электронов от пушки проходит через три электромагнитные линзы 5, 6, 9. Фокусировка потока электронов осуществляется магнитным полем, имеющим осевую симметрию. Оно создается электромагнитной линзой, которая представляет собой соленоид. Магнитное поле возникает при пропускании электрического тока через обмотку соленоида, концентрирует-

ся с помощью так называемого полюсного наконечника и воздействует на проходящий через него поток электронов. Фокусное расстояние линзы можно плавно регулировать путем изменения силы тока в обмотке соленоида. В системе имеются две диафрагмы 4, 10, ограничивающие расходимость пучка электронов.

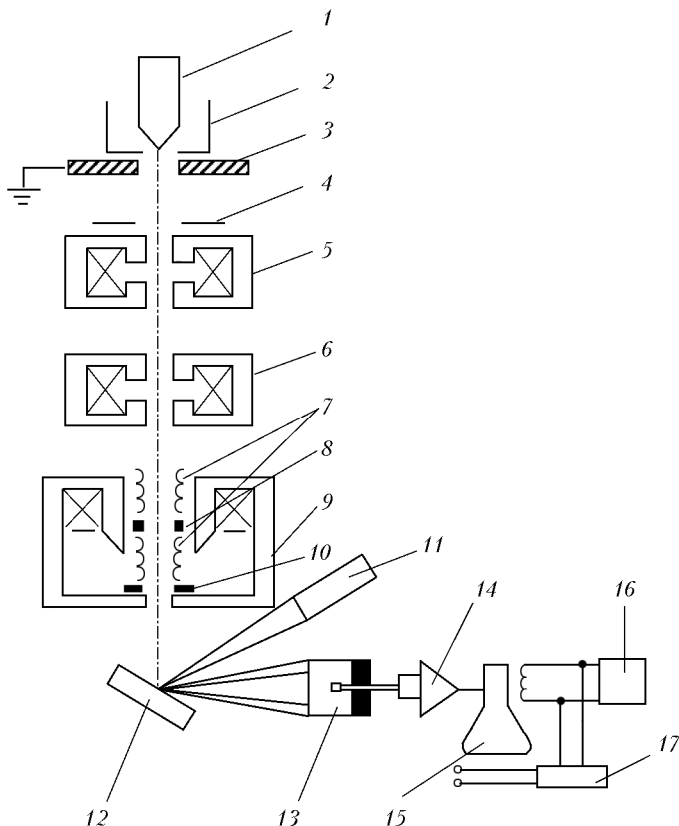


Рис. 4. Принципиальная схема растрового электронного микроскопа [34]: 1 — катод; 2 — модулятор (цилиндр Венельта); 3 — анод; 4 — ограничивающая диафрагма; 5 — первая конденсорная линза; 6 — вторая конденсорная линза; 7 — катушка двойного отклонения; 8 — стигматор; 9 — объективная линза; 10 — диафрагма, ограничивающая размер пучка; 11 — детектор рентгеновского излучения; 12 — образец; 13 — детектор вторичных электронов; 14 — усилитель фотоумножителя; 15 — электронно-лучевая трубка; 16 — генераторы развертки; 17 — блок управления увеличением

На разрешающую способность микроскопа оказывают влияние те же факторы, что и в случае просвечивающего электронного микроскопа.

К ним относятся хроматическая, сферическая аберрации, астигматизм, а также нестабильность токов и напряжений в приборе, неоднородность магнитных материалов и несовершенство их обработки.

Возникновение астигматизма связано с нарушением магнитной или геометрической симметрии линзы. Устранение асимметрии достигается обеспечением высокой геометрической точности изготовления полюсного наконечника линзы и введением специальной системы, называемой стигматором 8 (см. рис. 4), который корректирует магнитное поле линзы, восстанавливая его симметрию. Стигматор 8 расположен в объективной линзе 9. Внутри нее также находятся две пары электромагнитных отклоняющих катушек 7, каждая из которых служит для отклонения зонда во взаимно перпендикулярных направлениях в плоскости, перпендикулярной оси потока электронов. Катушки соединены с генератором 16, обеспечивающим синхронность передвижения электронного зонда по образцу и электронного луча по экрану электронно-лучевой трубки 15.

Образец 12 крепится на предметном столике, который может перемещаться в трех взаимно перпендикулярных направлениях, позволяет наклонять образец к электронно-оптической оси и вращать вокруг оси от 0 до 360°. Электронный пучок, сфокусированный на поверхности образца, вызывает появление отраженных, вторичных и поглощенных электронов, которые используются для получения изображения поверхности образца. Эти сигналы улавливаются специальными детекторами. На схеме растрового электронного микроскопа (см. рис. 4) представлен только один из возможного набора типов детекторов 13, используемых для регистрации вторичных электронов. В детекторе поток электронов преобразуется в электрический сигнал (ток). После прохождения тока через усилитель 14 модулируется яркость экрана.

При сканировании зонда по поверхности образца интенсивность сигнала будет меняться вследствие изменения рельефа и химической неоднородности его поверхности.

Сигналы, преобразованные детектором в электрический ток, после усиления служат для модулирования яркости точек на экране. Формирование изображения поверхности объекта на экране происходит следующим образом. С помощью отклоняющих катушек 7 осуществляется сканирование тонко сфокусированного зонда по поверхности образца, которое проходит по прямой линии. Совокупность параллельных линий (растр) дает представление о площади объекта. Генератор развертки 16, соединенный с отклоняющими катушками и монитором, обеспечивает синхронность передвижения электронного

зонда по образцу и электронного луча по экрану. Благодаря этому каждая точка на образце соответствует определенной точке на экране. В свою очередь, яркость точки на экране определяется интенсивностью сигнала, поступающего от соответствующей точки образца.

Совокупность сигналов различной интенсивности создает контраст яркости (изображение) на экране электронно-лучевой трубки. Увеличение растрового электронного микроскопа определяется отношением амплитуд развертки луча по экрану и зонда по поверхности образца. Так как максимальная длина развертки на экране фиксирована, то возрастание увеличения микроскопа достигается путем снижения амплитуды развертки зонда на поверхности образца. Изменение амплитуды колебания зонда задается с помощью блока управления увеличением 17 путем изменения силы тока в отклоняющих катушках. Обычно рабочий диапазон изменения увеличений, обеспечивающий высокую четкость изображения поверхности, составляет от 10 до 50 000. Увеличение, превышающее максимальное полезное увеличение микроскопа, используется только для его фокусирования.

2.3. Технические ошибки и артефакты при электронной микроскопии

Несмотря на то что сила тока электронного пучка в растровом электронном микроскопе, как правило, очень мала, что необходимо для получения на поверхности образца сфокусированного зонда диаметром в несколько нанометров, плотность тока на острие зонда получается очень высокой. Взаимодействие пучка электронов с образцом может вызывать тепловые и радиационные повреждения. За счет теплового воздействия объекты, содержащие влагу, могут ее терять и вследствие этого изменять свою форму. Кроме того, непроводящие объекты при воздействии пучка электронов заряжаются, что вносит искажения в наблюдаемое изображение объекта. Типичные же биологические объекты, как правило, имеют низкую плотность и высокое содержание влаги, а также низкую тепло- и электропроводность. Таким образом, биологический материал и электронно-лучевой прибор не соответствуют друг другу, и необходим некоторый компромисс для их объединения [35]. Это может быть достигнуто как за счет изменения работы микроскопа, так и за счет вариантов подготовки объекта исследования или образца.

Для того чтобы приспособить микроскоп для исследования биологического материала без препарирования (компромисс за счет прибора), существует несколько путей. Один из них — установка в микроскопе

камеры для исследуемого объекта с регулируемой средой, другой — использование необычных, нестандартных режимов работы микроскопа. В рамках первого пути исследователи пытаются обеспечить внутри колонны микроскопа микроклимат, подобный естественной среде объекта. Контролируемая среда создается в микрокамере, которая либо имеет окна, прозрачные для электронов, либо отсекается от остальной колонны диафрагмами, через которые подается постоянный слабый поток углекислого газа. Внутренняя часть камеры заполняется водной средой или постоянно в процессе работы инертным газом, насыщенным парами воды. Однако такие попытки изучения динамических процессов в биологических объектах не привели к положительным результатам из-за выраженных радиационных повреждений образцов [176, 177, 215].

Использование нестандартных режимов работы микроскопа, таких как работа при малых ускоряющих напряжениях, с малыми токами электронного пучка, с малым временем регистрации изображения или при «плохом» вакууме в колонне микроскопа, также не позволяет получить дополнительную информацию о биологических объектах, поэтому гораздо большее распространение получило направление компромисса за счет вариантов подготовки исследуемого объекта.

2.4. Методы подготовки биологических образцов для электронной микроскопии

Первый растровый электронный микроскоп был создан вскоре после просвечивающего в 1942 г. в США [49], однако методы подготовки биологических объектов для растровой электронной микроскопии были разработаны только в 70-х гг. прошлого века. Выбор образца для растровой электронной микроскопии следует производить с некоторой осторожностью. Прежде всего он должен быть небольших размеров: работа с маленькими образцами значительно упрощается, они легче фиксируются и обезвреживаются. Для исследования образца в растровом электронном микроскопе его поверхность нужно очистить, в противном случае загрязнения, а также пыль могут загоразживать исследуемую поверхность.

Исзуемые биологические объекты необходимо зафиксировать. Многие фиксаторы, используемые для растровой микроскопии, были заимствованы из просвечивающей электронной микроскопии. Поэтому, несмотря на множество химикатов, которые могут быть применены в качестве фиксаторов, традиционно считается, что для большинства тканей является пригодной двойная фиксация в альдегидном

фиксаторе, а затем в растворе четырехокси осмия. Наиболее часто используется 2–5%-й глютаровый альдегид. После первой фиксации биологический материал промывается в изотоническом буферном растворе и окончательно фиксируется в 1–2%-м растворе четырехокси осмия в течение 3–4 ч с последующим промыванием от избыточного количества осмия.

Одной из главных проблем подготовки биологических образцов является их обезвоживание. Методы обезвоживания для растровой электронной микроскопии могут быть такими же, как и для просвечивающей электронной микроскопии, и включают в себя проведение ткани через спирты (этиловый или метиловый) или ацетон возрастающей концентрации и последующую сушку препарата методом критической точки либо методом лиофильной сушки. Простая сушка на воздухе вследствие большого поверхностного натяжения жидкости обычно приводит к сильному искажению морфологической картины.

Способ сушки в критической точке был разработан в 1951 г. Андерсоном для высушивания биологических объектов при исследовании методом просвечивающей электронной микроскопии. Однако наибольшее применение этот метод нашел в растровой электронной микроскопии биологических объектов и основан на том, что при нагревании жидкости в герметичном сосуде ее плотность постепенно снижается, а плотность насыщающего пара возрастает. С продолжением нагревания может быть достигнута так называемая критическая точка, которая характеризуется определенными критическими значениями температуры и давления насыщающего пара. В критической точке исчезают различия в физических свойствах между жидкостью и паром, находящимися в равновесии, плотности жидкой и газообразной фаз становятся одинаковыми, а граница раздела между ними исчезает. Таким образом, если жидкость с погруженным в нее биологическим объектом поместить в замкнутый сосуд и подвергнуть нагреванию до температуры выше критической, то объект окажется в газовой среде, т.е. высушенным, избежав повреждающего воздействия сил поверхностного натяжения.

Подвергать сушке в критической точке насыщенные водой биологические объекты нецелесообразно, так как у воды высокие критические значения температуры и давления (374 °C; 217,7 атм) [24]. Поэтому воду в объекте замещают так называемой переходной жидкостью, в качестве которой чаще всего используют сжиженный углекислый газ CO₂. Так как CO₂ плохо смешивается с водой, образец предварительно дегидратируют этанолом или ацетоном, которые хорошо смешиваются с углекислым газом.

Сушку в критической точке проводят в специальных аппаратах. Биологический объект с остатками обезвоживающей жидкости переносят в предварительно охлажденную до 10–15 °С камеру, которую затем заполняют углекислым газом из баллона. Поступая под давлением около 60 атм в охлажденную камеру, углекислый газ конденсируется в жидкость. Для устранения из камеры остатков дегидратирующей жидкости (ацетона, этанола) проводят частичное стравливание углекислого газа через выпускной клапан при одновременном поступлении в камеру свежих порций CO_2 . После нескольких стравливаний камеру герметизируют и нагревают до температуры выше критической (примерно до 42 °С). По достижении критической точки углекислый газ переходит в газообразное состояние. Сохраняя температуру, газ выпускают из камеры, оставляя объект высушенным. Объект до просмотра должен храниться в эксикаторе.

Другим методом подготовки является лиофильная сушка. Маленькие кусочки объекта быстро замораживают в подходящей смеси (например, фреоне-13) и переносят в жидком азоте на предварительно охлажденный столик аппарата для лиофильной сушки. Воздух из камеры аппарата откачивают до рабочего вакуума порядка 20–100 МПа, при котором происходит сублимация льда из образца. Чем ниже температура в камере, тем выше требуется вакуум для того, чтобы вода могла испаряться из образца. В большинстве случаев лиофильная сушка производится приблизительно при температуре –70 °С и давлении 20–100 МПа. При сушке важно создать конденсирующую поверхность для молекул воды, поступающих из объекта. Высокоэффективна в качестве таковой расположенная вблизи образца ловушка, заполненная жидким азотом, но можно воспользоваться и химическими осушителями, например фосфорным ангидридом или цеолитом.

Считается, что при использовании метода лиофильной сушки лучше сохраняются детали клеточной структуры, а метод сушки в критической точке позволяет получить больше информации об образце в целом [35].

Биологический материал обладает высоким электрическим сопротивлением и быстро заряжается под действием электронного зонда. Проводимость биологического материала может быть повышена при добавлении тяжелых металлов или неметаллических проводящих материалов в виде тонкого слоя на поверхность образца либо заполнением всего материала солями тяжелых металлов.

Существует несколько методов повышения проводимости объектов. Так, проводимость можно увеличить, если перед обезвоживанием поместить кусочки биологических объектов на 2 ч в свежеприготовленный

насыщенный раствор уранилацетата при комнатной температуре. Количество тяжелого металла в образце может быть существенно увеличено при применении так называемого ОТО-метода (название метода произошло от используемых в нем реактивов: осмий — тиокарбогидразид — осмий) [196]. Для этого фиксированный в глютаровом альдегиде и осмии образец обрабатывается лигандсвязывающим агентом, например тиокарбогидразидом, который связывает имеющийся в ткани осмий в одной из конечных аминогрупп. Другие конечные аминогруппы позволяют возможность связать дополнительный осмий, добавляемый после удаления избытка тиокарбогидразида. До тех пор пока осмий остается несвязанным, последовательность операций может повторяться несколько раз. Общий эффект всех этих обработок заключается в увеличении объемной проводимости и эмиссионной способности образцов, что позволяет исследовать их в растровом электронном микроскопе без нанесения металлического покрытия.

Предотвращает зарядку поверхности образца и покрытие ее тонким слоем металла. Покрытие должно удовлетворять определенным требованиям. Необходимо, чтобы слой металла был сплошным и на всем протяжении имел одинаковую толщину независимо от расположения и ориентации отдельных элементов рельефа поверхности объекта. Структура самого покрытия должна быть мелкой и не выявляться при максимально высокой разрешающей способности растрового электронного микроскопа. Толщина металлического слоя должна быть достаточно большой, чтобы он не разрушался в процессе исследования, и достаточно малой, чтобы не скрывал мелкие детали рельефа или не искажал их истинные размеры. Обычная толщина покрытия составляет 10–20 нм. Для покрытия используют металлы Au, Pt, Ag и сплавы: Au/Pd, Pt/Pd. Покрытие металлом производится напылением в вакууме. Обычно используют два метода напыления — термическое испарение или катодное распыление. В первом случае навеска испаряемого металла помещается на проволоку или лодочку из тугоплавкого металла (W, Mo, Nb), через которые пропускается электрический ток, и навеска металла испаряется. Атомы испаряемого металла покрывают поверхность помещенного в камеру объекта. С целью более равномерного покрытия объект на протяжении всей процедуры напыления наклоняют и вращают, меняя его ориентацию относительно источника испарения. В случае катодного распыления металлическая мишень (например, из серебра) подвергается бомбардировке ионами инертного газа, например, аргона, в результате чего из мишени выбиваются атомы металла, которые и достигают поверхности объекта. Энергия атомов металла, выбиваемых из мишени,

существенно выше энергии в случае термического испарения, поэтому покрытия, полученные катодным распылением, имеют большую прочность. Кроме того, процесс катодного распыления происходит при более высоких давлениях газа в вакуумной камере, и вследствие множественных столкновений выбитые атомы металла лучше рассеиваются в разных направлениях, что дает возможность создать непрерывное покрытие объектов с самым сложным рельефом поверхности. Недостатком этого метода является опасность перегрева объекта, однако в настоящее время разработаны «холодные» аппараты для катодного распыления, конструкция которых предупреждает перегрев объекта.

Действие фиксаторов и других химических веществ, применяемых после фиксации, может вызывать артефакты той или иной степени выраженности. В частности, известно, что обработка четырехокисью осмия приводит к значительной потере белка из эритроцитарной мембраны [25]. Поэтому для исследования мембран можно применить ставший теперь уже классическим метод замораживания — скалывания. После замораживания образец, представляющий собой суспензию клеток или мембран, скалывают с помощью ножа при низкой температуре ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$) в глубоком вакууме. Возникающие при скалывании усилия приводят к образованию скола, проходящего через образец. Когда плоскость скола проходит через мембрану, последняя раскалывается преимущественно по своей срединной области и расщепляется на две части. В результате на образовавшихся плоскостях скола обнажается внутренняя область мембраны. Чтобы выявить топологические характеристики препарата, на получившийся образец напыляют платину под углом около 45° . Таким образом получают реплику, которую затем и изучают под электронным микроскопом. Платиновой реплике придают механическую прочность, нанося на нее слой углерода. После этого препарат оттаивают, реплика всплывает, и ее вылавливают с помощью специальной сеточки. При изучении мембран методом замораживания — скалывания можно получить информацию о состоянии многочисленных внутримембранных частиц диаметром от 80 до 100 Å, лежащих в плоскости мембранных сколов.

2.4.1. Подготовка эритроцитов к электронно-микроскопическому исследованию

В нормальных условиях эритроцит, фиксированный в суспензии, имеет форму двояковогнутого дискоцита. Его поверхность при изучении в растровом электронном микроскопе (с разрешающей способно-

стью порядка 5–7 нм) выглядит сглаженной: на ней не выявляются какие-либо рельефные образования.

В результате разного рода воздействий форма эритроцитов легко изменяется: возникают деформированные клетки с множественными пальцеобразными выростами на поверхности (эхиноциты), сферические эритроциты с гладкой поверхностью или с выростами, клетки куполообразной или кольцевидной формы. Так, например, превращение дискоцитов в эхиноциты и сферические клетки происходит при длительном хранении цитратной крови (в течение нескольких недель при температуре 2–6 °С), при помещении эритроцитов в не-свежую плазму крови, наличии в сыворотке или плазме агглютинирующих антител, повторном промывании эритроцитов физиологическим раствором, их гипотонической фиксации и других воздействиях.

Вследствие такой высокой реактивности эритроцитов их подготовка к электронной микроскопии требует особой тщательности. Данное требование усугубляется тем, что указанные выше видоизмененные формы эритроцитов носят неспецифический характер и могут встречаться при целом ряде патологических состояний.

Существуют различные варианты подготовки эритроцитов к сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Ниже приведены методики, которые на протяжении многих лет с успехом используются в оригинальных исследованиях, проводимых на базах отдела гематологии и лаборатории электронной микроскопии Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) (г. Томск) и лаборатории электронной микроскопии ФГУП «НПО „Вирин“» (г. Томск).

Подготовка эритроцитов к сканирующей электронной микроскопии

Эритроциты подвергают двойной фиксации: вначале в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,2 \div 7,4$), затем в течение 30–40 мин в 1%-м растворе четырехокси осмия¹ с последующим двукратным отмыванием эритроцитов фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,2 \div 7,4$).

Далее производится обезвоживание клеток в серии водных растворов этанола восходящей концентрации 30, 50, 70, 90, 100° по 15 мин в каждом и дважды в 100%-м ацетоне.

¹ Четырехокись осмия хранится в холодильнике в виде 2%-го водного раствора. Перед использованием готовится 1%-й раствор четырехокси осмия на фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,2 \div 7,4$).

Фиксированные и обезвоженные эритроциты наносятся тонким слоем на алюминиевые подложки.

*Подготовка эритроцитов к трансмиссионной
электронной микроскопии*

Эритроциты подвергаются двойной фиксации: вначале в течение 2–4 ч в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на 0,1М какодилатном или фосфатном буферном растворе ($\text{pH} = 7,4$) [49], затем в течение 1–1,5 ч в 1%-м растворе четырехокси осмия на 0,1М какодилатном буферном растворе с последующим отмыванием эритроцитов в 0,2М какодилатном буферном растворе в течение 10–15 мин.

Далее производится обезвоживание эритроцитов в серии водных растворов этанола восходящей концентрации по следующей схеме: в 50° — 3–5 мин; в 70° — 12 ч; в 80 и 90° — по 15–20 мин; в 100° — 15–20 мин, а затем дважды в абсолютном ацетоне по 15–20 мин. Затем ткань пропитывается заливочной средой следующего состава: 27 мл аралдита 502; 23 мл аралдита HY964; 0,5–0,7 мл аралдита-катализатора (DMP-30) и 1,5–2 мл пластификатора (дибутилфталата) [133]. Пропитка проводится по следующей схеме: 1,5–2 ч в смеси заливочной среды в ацетоне в соотношении 1 : 2; затем 3 ч в смеси заливочной среды в ацетоне в соотношении 2 : 1, после чего в течение 12 ч в чистой заливочной среде. Эритроциты переносятся в свежую заливочную среду, выдерживаются в течение 12–15 ч в термостате при температуре 37°C , затем полимеризуются в течение 2 сут при температуре 56 – 58°C . Срезы готовятся на ультрамикротоме.

Несколько лучшие результаты дает заливка препаратов в смесь эпон-аралдита следующего состава: эпон 812 — 4 г, аралдит 502 — 2 г, DDSA — 9 г. Смесь тщательно перемешивается на магнитной мешалке, затем в нее добавляются 8 капель катализатора DMP-30 и смесь снова перемешивается на магнитной мешалке в течение 30 мин. Пропитка проводится по схеме: ацетон : смесь смол в соотношении 3 : 1 в течение 4–12 ч; ацетон : смесь смол в соотношении 1 : 1 в течение 4 ч; ацетон : смесь смол 1 : 3 в течение 4 ч; чистая смесь смол в течение 12–24 ч. Затем препараты переносятся в свежую смесь смол в формы для полимеризации, где полимеризуются в течение 1,5–2 сут при температуре 60°C . Перед ультрамикротомированием блоки лучше выдержать при комнатной температуре в течение суток.

Готовятся ультратонкие срезы толщиной 60–100 нм на ультрамикротоме [224]. Полученные срезы по методу E. Reynolds [216] наносятся на объектные сеточки с формваровой пленкой-подложкой и контрастируются 2%-м раствором уранилацетата на 50° этаноле (10–

20 мин при температуре 37 °С) и цитратом свинца (от 3 до 10 мин при комнатной температуре). Полученные препараты просматриваются в рабочем режиме (апертурная диафрагма 25–30 мкм, ускоряющее напряжение 80 кВ) на электронном микроскопе JEM-100 CX II (Япония).

2.5. Исследование морфологии эритроцитов с использованием электронной микроскопии

2.5.1. Морфологическая номенклатура эритроцитов

Известно, что оптимальной формой эритроцита для участия клетки в газообмене является двояковогнутый диск. Однако по структуре поверхности эритроциты даже здорового человека представляют собой довольно гетерогенную популяцию [147]. Оценка красной кровяной клетки в трехмерном изображении, установление связи между структурой и функцией эритроцита становятся реальностью при использовании электронной микроскопии. Клеточная теория патологии человека, предложенная Р. Вирховом [18], не исключая структурно-функционального подхода в оценке патологических процессов, положила начало их микроскопическому изучению [113]. Благодаря высокой разрешающей способности электронного микроскопа и разработке методик специфической подготовки биологических объектов сканирующая электронная микроскопия позволила получить информацию об истинной форме клеток и микрорельефе клеточной поверхности (складчатость, наличие выростов, углублений и т.д.), их морфогенетических и патологических изменениях. Использование наряду со сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии делает возможным изучение не только поверхностной цитоархитектоники, но и строения внутриклеточных структур [47, 70, 137].

В 1967 г. А.Д. Салсбери и Д.А. Кларк получили четкое объемное изображение эритроцита (нормоцита) в виде двояковогнутого диска [218]. В последующем их данные были неоднократно подтверждены [56, 70, 147, 181, 182]. По мнению исследователей, большинство эритроцитов в крови здоровых людей представлены двояковогнутыми дискоцитами с диаметром центральной впадины, составляющим 33–55% от диаметра клетки. Эритроциты двояковогнутой формы (дискоциты, или нормоциты) в крови здоровых людей, по данным Л.Д. Крымского и соавт., составляют 60–70% [70]; по данным А. Хаттори — 76% [181]; по данным Г.И. Козинца и Ю.А. Симоварта — 85% [57]; по данным В.В. Новицкого и соавт. — 87% [93]; по данным Г.Н. Лонгстера и соавт. — 97% [195].

В настоящее время в литературе встречается множество классификаций, в основу которых положены различия клеток по форме и рельефу поверхности. Так, согласно А. Nattori [181], в крови доноров присутствуют дискоциты, мишеневидные клетки с возвышением в центре диска, эритроциты с мостикоподобным возвышением в центре впадины, выпуклые диски, эритроциты чаше-, блюдцеобразной, зубчатой формы, эритроциты в виде звезды, капельки, атрофические формы эритроцитов. G.H. Longster и соавт. [195] регистрировали в крови в процессе ее хранения шесть переходных форм эритроцитов: гладкий диск, зубчатый диск, зубчатый дискоид, зубчатый сфероид, зубчатая сфера и гладкая сфера. M. Bessis и соавт. [147] предложили классификацию, в которой наряду с традиционными для часто встречающихся эритроцитов введены дополнительные названия для редко наблюдаемых и смешанных форм эритроцитов: дискоцит, эхиноцит I, II, III степени (диск неровного контура с различным числом и размещением выростов), стоматоцит (куполообразная клетка), сфероцит (эритроцит в форме сферы), акантоцит (зубчатый эритроцит), кодоцит (эритроцит в форме колокола), дакриоцит (в форме капли), дрепаноцит (в форме серпа), кератоцит (в форме рога), лептоцит (тонкий диск), эллиптоцит (овалоцит), книзоцит (трояковогнутый эритроцит), мегалоцит (макроцит), тороцит (в форме тора). Наряду с этим были отмечены формы эритроцитов, в которых различные морфологические признаки присутствовали одновременно: сфероэхиноцит, сферостоматоцит, сферошизоцит, дрепаноэхиноцит, стоматоакантоцит и др.

По данным Л.Д. Крымского и соавт. [70], в крови здоровых людей обнаруживаются следующие формы эритроцитов: нормоциты, макроциты, микроциты, овалоциты, куполообразные нормоциты, деформированные эритроциты, а также пять видов шиповидных эритроцитов (шиповидный нормоцит, шиповидный дискоцит, шиповидный дискоцит в виде вздутого диска, шиповидный эллипсоид, игольчатый сфероцит). При исследовании эритроцитов крови крыс Б.В. Ионов и А.М. Чернух [45] использовали следующую классификацию: двояковогнутый диск (нормоцит), уплощенный диск, плоский диск, двуюмочные клетки в виде спущенного мяча, клетки в виде парашюта (стоматоциты), клетки с гребнем, клетки с конусообразным выпячиванием в центре, микроциты, макроциты, деструктивные клетки. К числу редко встречающихся эритроцитов были отнесены сфероциты, эхиноциты, клетки с амебоидными выростами. При этом соотношения отдельных морфологических форм эритроцитов в артериальной и венозной крови крыс были различными. На основании результатов собственных исследований Г.И. Козинцом и Ю.А. Симовартом [57] выделены девять

форм эритроцитов (дискоцит, дискоцит с одним выростом, дискоцит с гребнем, дискоцит с множественными выростами, эритроцит в виде тутовой ягоды, куполообразный эритроцит, гладкий сферический эритроцит, сферический эритроцит с выростами, эритроцит в виде спущенного мяча) и дегенеративно измененные эритроциты. В.Н. Кидалов и В.Ф. Лысак [50] предложили группировку более 40 известных форм эритроцитов по морфологическим признакам. Распределение эритроцитов (квантитативная эритрограмма) по морфологическим характеристикам выглядит следующим образом: дискоциты (нормоцит, планоцит), стоматоциты (I, II, III, IV степени), эхиноциты (I, II, III, IV степени), пойкило- и шизоциты (пойкилоциты, клетки с сочетанными деформациями, причудливо деформированные эритроциты и формы с признаками дегенерации и разрывами цитолеммы), гемолизирующиеся формы (сфероцит, эритроцитные тени, осколки-ахромоциты).

М. Bessis и соавт. [147] установили, что дискоцит в процессе физиологического старения или при воздействии различных факторов через определенные стадии превращается в клетку сферической формы. Превращение дискоцит — сфера может происходить двумя путями. Первый путь: дискоцит-эхиноцитарная трансформация, осуществляющаяся через следующие стадии: эхиноцит I, эхиноцит II, эхиноцит III, сфероэхиноцит I и II. Второй путь — через дискоцит-стоматоцитарную трансформацию: стоматоцит I, стоматоцит II, стоматоцит III, сферостоматоцит I и II.

Наряду с этим Л.Д. Крымским и Г.В. Нестайко [69] установлено, что в крови здорового человека и при различных заболеваниях эритроциты могут образовывать цитоплазматические мостики, соединяющие отдельные клетки или большое их количество в конгломераты. По их данным, такие структуры не являются морфологической основой агглютинации, не обнаруживаются у шиповидных эритроцитов, могут быстро появляться и распадаться [69, 70]. В то же время существует мнение о том, что такого рода образования (цитоплазматические мостики) встречаются только при патологии, в частности, при развитии злокачественных новообразований и при неспецифических воспалительных заболеваниях легких [3].

Ряд авторов выделяют предгемолитические и дегенеративные формы эритроцитов. Промежуточной стадией необратимой трансформации, по их сведениям, являются эритроциты, способные в определенных условиях восстанавливать свою дискоидную форму — переходные формы. Кроме того, при развитии различных патологических состояний в крови человека могут встречаться и формы красных клеток крови, в норме отсутствующие [45, 56, 57].

Такое множество классификаций и терминов, используемых для обозначения форм эритроцитов и различных морфологических образований, составляющих поверхностную архитектуру клеток, не случайно. С одной стороны, весьма часто в литературе, касающейся электронно-микроскопической характеристики биологических объектов, для обозначения какого-либо морфологического элемента разные авторы прибегают к использованию различных терминов [22]. С другой стороны, разнообразие морфологии эритроцитов действительно велико. Для того чтобы читатель представил себе все многообразие форм эритроцитов, причудливость микрорельефа клеточной поверхности и ультраструктуры красных кровяных клеток, детально опишем наиболее часто встречающиеся морфологические находки и проиллюстрируем их электронными микрофотографиями.

Эритроцитарный пул в основном представлен дискоцитами, имеющими форму двояковогнутого диска. Клеточная поверхность дискоцита в сканирующем электронном микроскопе выглядит сглаженной, она лишена каких-либо рельефных образований (рис. 5,*а* и 6,*а*). При исследовании двояковогнутого диска в трансмиссионном электронном микроскопе обнаружено, что мембрана клетки четко контурирована, имеет трехслойное строение, внутриклеточное содержимое равномерной электронной плотности и мелкозернистой структуры (рис. 5,*б*).

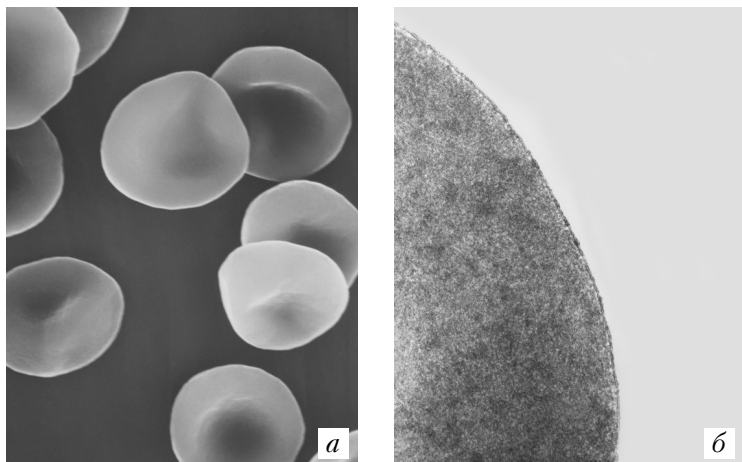


Рис. 5. Двояковогнутые дискоциты: *а* — поверхность клеток гладкая (сканирующая электронная микроскопия ($\times 7000$)); *б* — мембрана эритроцита четко контурирована, структура стромы равномерная, мелкозернистая (трансмиссионная электронная микроскопия ($\times 36000$))

Среди дискоидных форм эритроцитов редко встречаются дискоциты с неровными контурами, уплощенные диски, эллипсовидные клетки. В виде единичных экземпляров выявляются дискоциты с одним выростом конической формы с закругленной вершиной, расположенным в центре впадины дискоцита. Встречаются и дискоциты с неровными контурами и единичными выростами округлой формы (рис. 6,б—е и 7).

Дискоциты с гребнем представляют собой правильной формы гладкие диски, по всей длине которых выступает протяженное возвышение в виде гребня. Поверхность клетки и гребня без складок, гладкая. Гребни могут быть закругленной или заостренной формы, широкими или узкими; крайне редки гребни с раздвоением (рис. 8, 9).

Эхиноциты имеют вид уплощенного диска с множественными выростами конической формы с округлой вершиной. Поверхность клетки может быть как гладкой и ровной, так и с выраженной складчатостью и неровностью рельефа. От этих клеток следует отличать акантоциты, которые лишь с первого взгляда похожи на эхиноциты и имеют 5—10 спикул, неравномерно расположенных на клетке. Редко встречаются клетки, напоминающие по форме тутовую ягоду с множеством коротких и длинных шиповидных выростов (рис. 10, 11).

Изменение формы эритроцитов может происходить в сторону образования не только наружных выростов на клетке (кренаций) с последующим их отшнуровыванием в виде беспектриновых везикул с правильной ориентацией мембраны, но и образования инвагинированных форм клеток. К числу последних относятся куполообразные эритроциты (иначе эти клетки называют стоматоцитами), имеющие форму округлого диска с выраженной вогнутостью с одной стороны клетки, общий вид которой напоминает форму двустенной чаши. Поверхность куполообразного эритроцита ровная, без складок (рис. 12,а). Стоматоциты не следует путать с кодоцитами (колоколообразные клетки): при виде сверху последние напоминают мишень, сбоку — весьма похожи на колокол (рис. 12,б—е). Встречаются куполообразные эритроциты с инвагинацией различной степени (рис. 13).

Конечной стадией развития эритроцитов являются сферические клетки (сфероциты), поверхность их чаще всего гладкая, без шероховатостей (рис. 14,а). Встречаются и сфероциты с мелкими шаровидными выбуханиями и единичными «вмятинами» (рис. 14,б,в).

Редкой находкой являются клетки-сферы с «вмятинами», произвольно расположенными на клеточной поверхности. Такие клетки по своей форме напоминают спущенный мяч. Поверхность клетки гладкая (рис. 14,г—е).

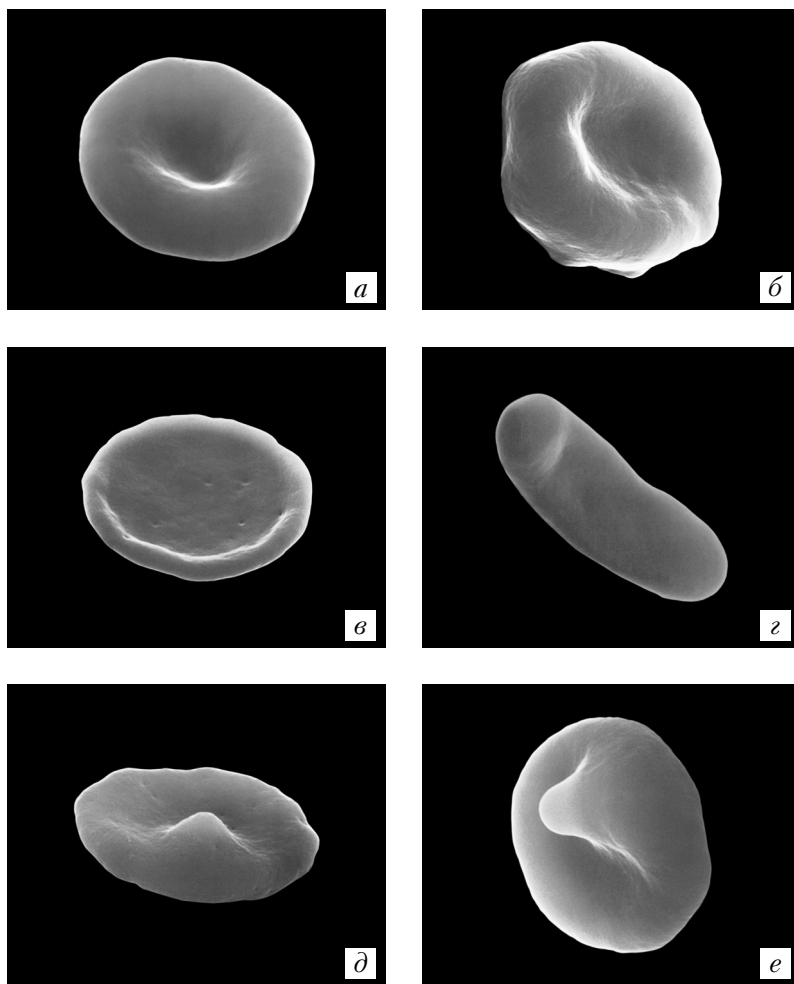


Рис. 6. Морфологические формы эритроцитов: *а* — двояковогнутый дискоцит с гладкой поверхностью; *б* — двояковогнутый дискоцит с неровными контурами; *в* — уплощенный дискоцит с увеличенным размером центральной впадины; *г* — эллипсоидный дискоцит; *д*, *е* — дискоциты с выростом. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

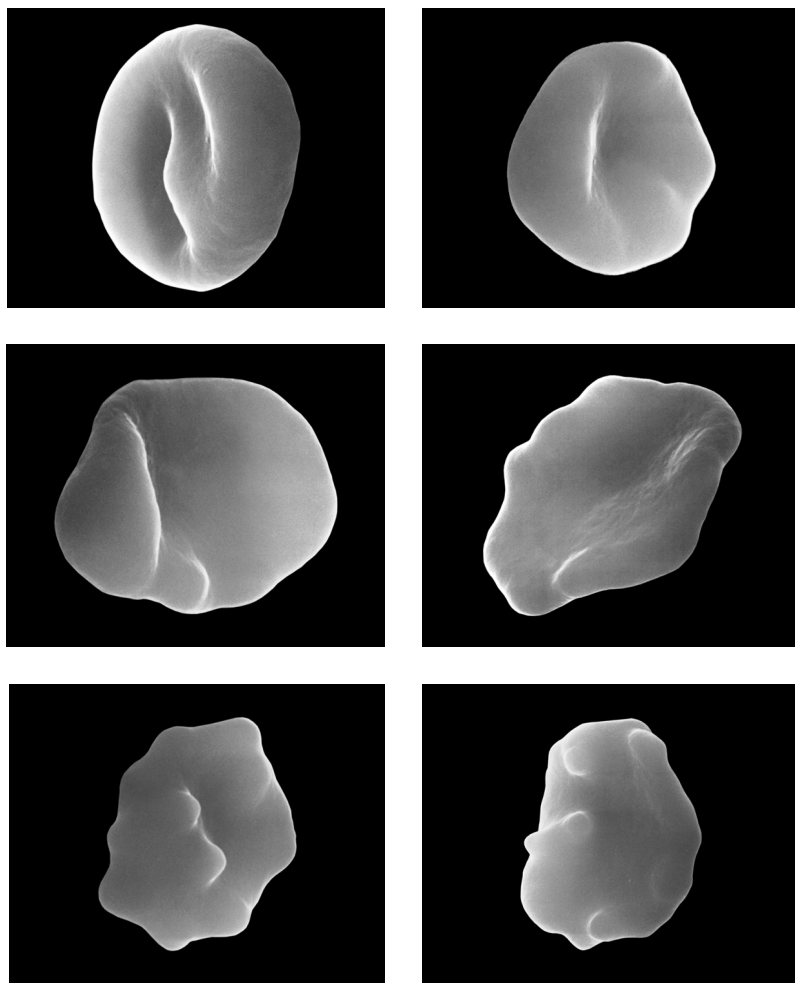


Рис. 7. Дискоциты с неровными контурами и единичными выростами округлой формы. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

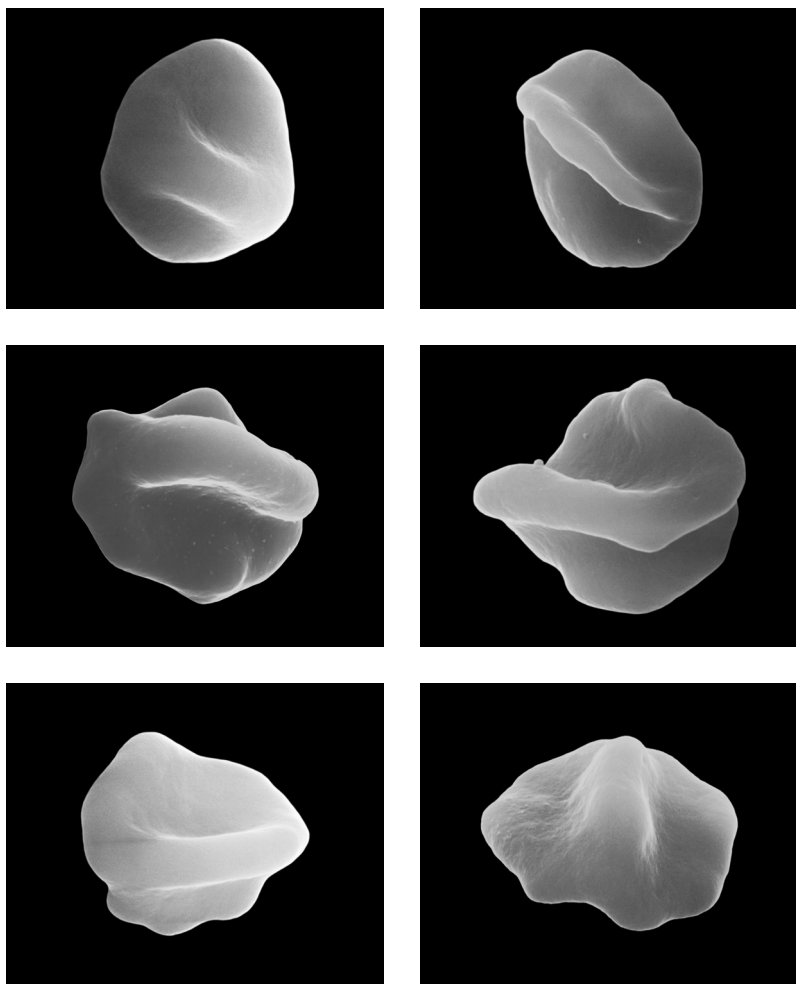


Рис. 8. Дискоциты с гребнями различной формы. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

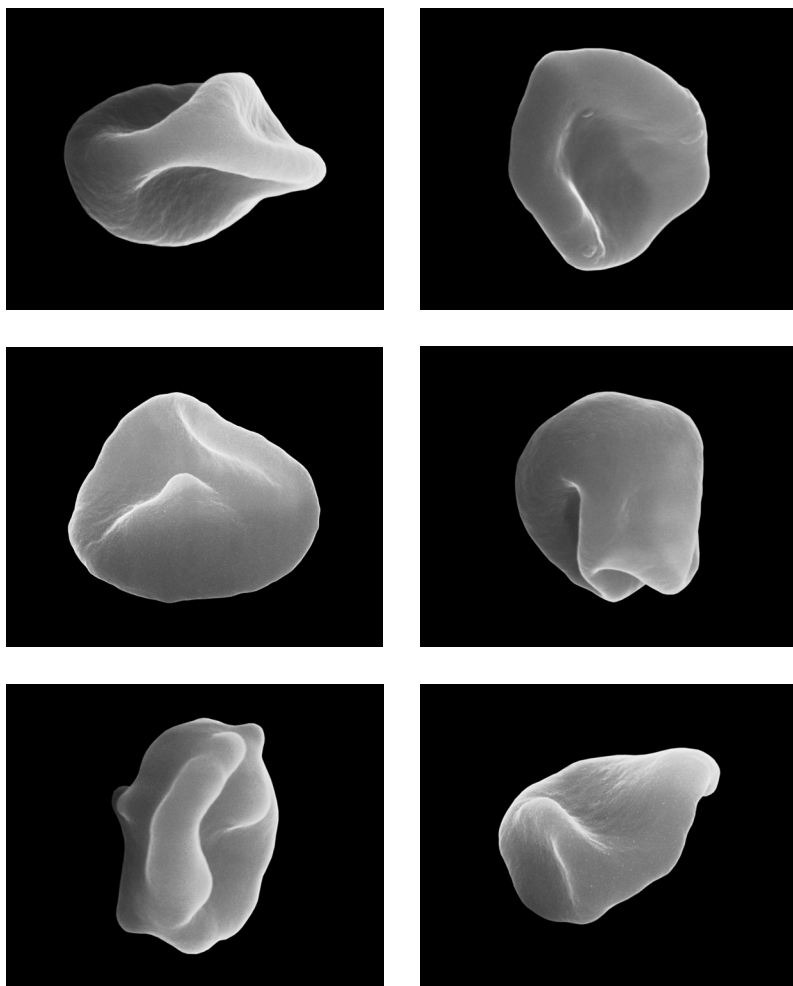


Рис. 9. Дискоциты с гребнями различной формы. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

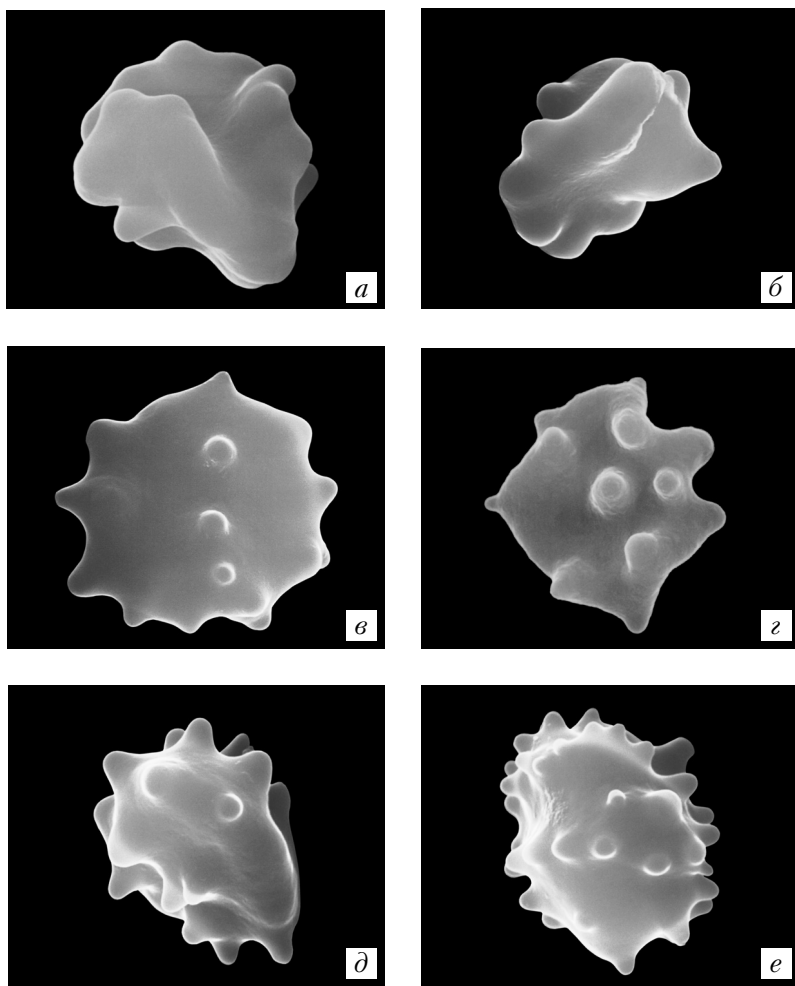


Рис. 10. Морфологические формы эритроцитов: *а, б* — эритроциты с множественными выростами; *в, г* — акантоциты; *д, е* — эхиноциты. Поверхность клеток гладкая. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

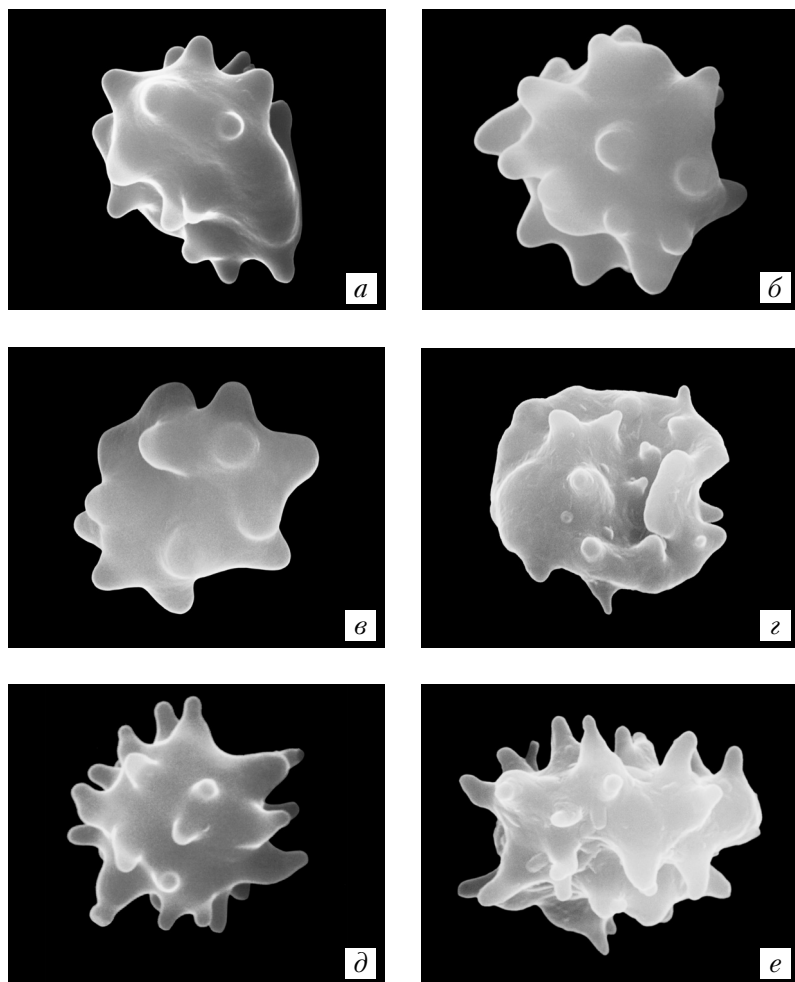


Рис. 11. Морфологические формы эритроцитов: *а, б, в* — эхиноциты с гладкой поверхностью; *г* — эритроцит с множественными выростами и выраженной складчатостью рельефа; *д, е* — эритроциты, по форме напоминающие тутовую ягоду.
Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

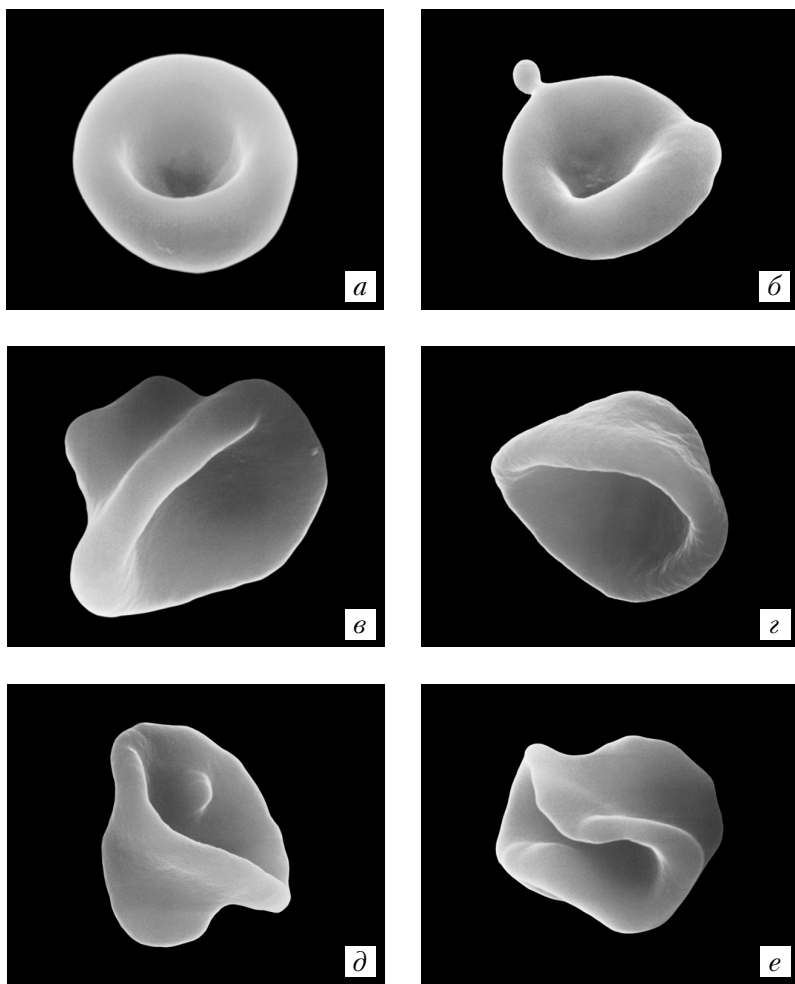


Рис. 12. Морфологические формы эритроцитов: *a* — куполообразный эритроцит с ровными краями, напоминающий по форме двустенную чашу (стоматоцит); *б* — куполообразный эритроцит с шаровидным выростом; *в–е* — колоколообразные эритроциты (кодоциты). Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

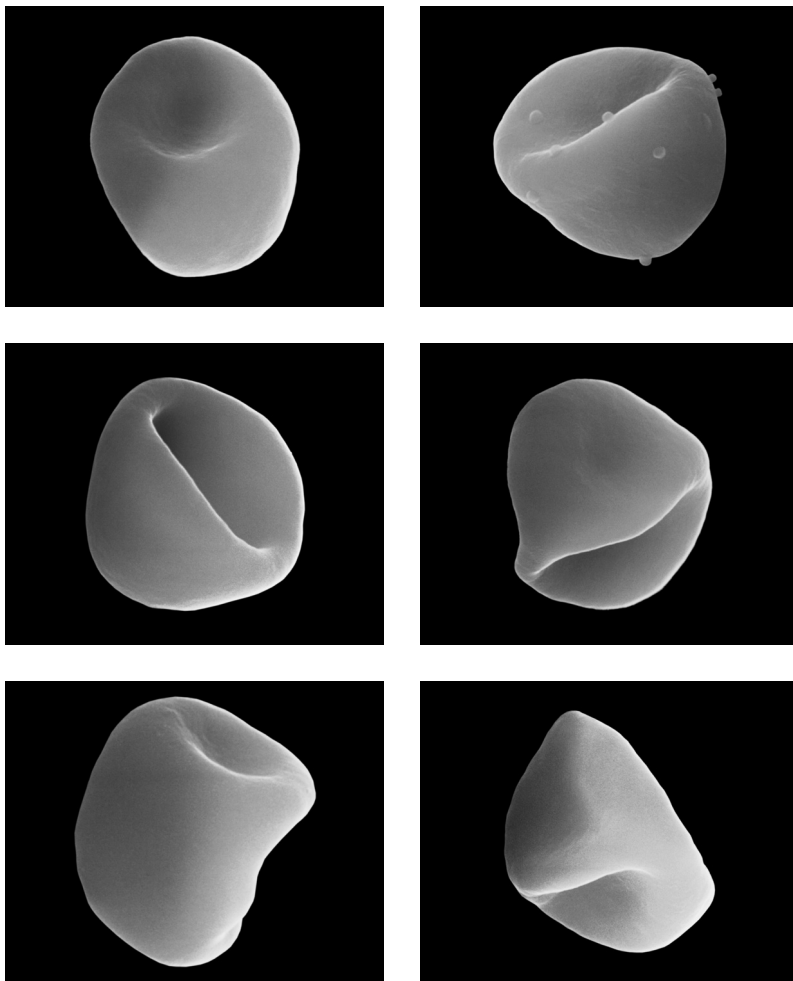


Рис. 13. Колоколообразные эритроциты с инвагинацией различной степени. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

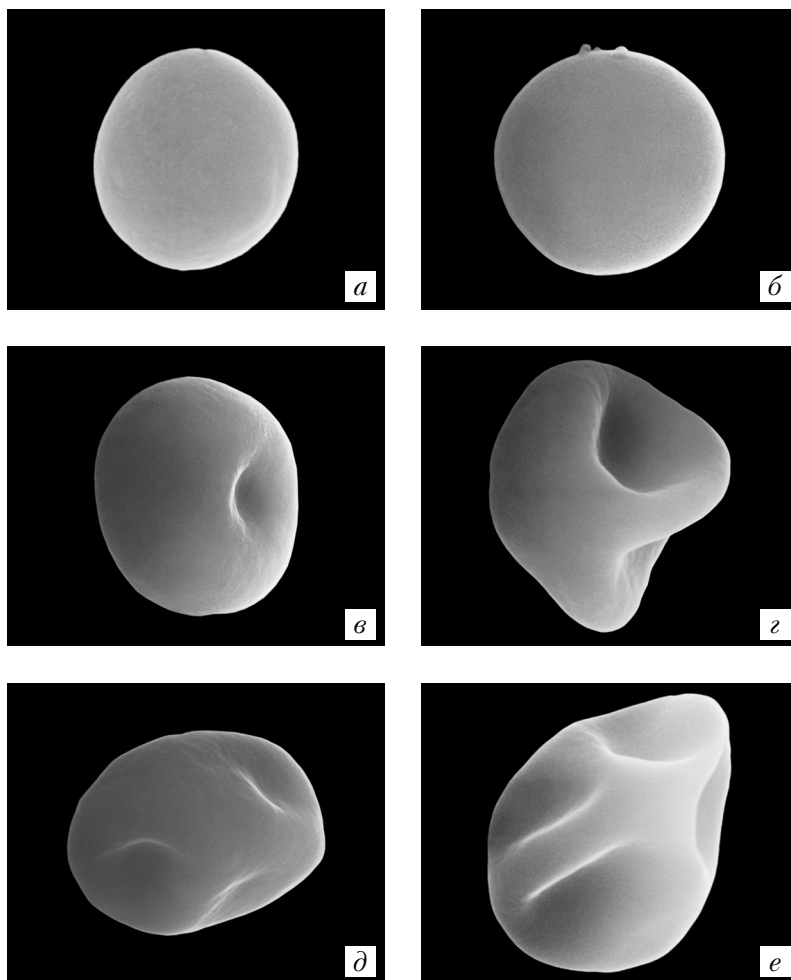


Рис. 14. Морфологические формы эритроцитов: *a* — сферический эритроцит с гладкой поверхностью; *б* — эритроцит с мелкими шаровидными выпуклостями; *в* — эритроцит с одной «вмятиной»; *г–е* — эритроциты с «вмятинами» неправильной формы, напоминающие спущенный мяч. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

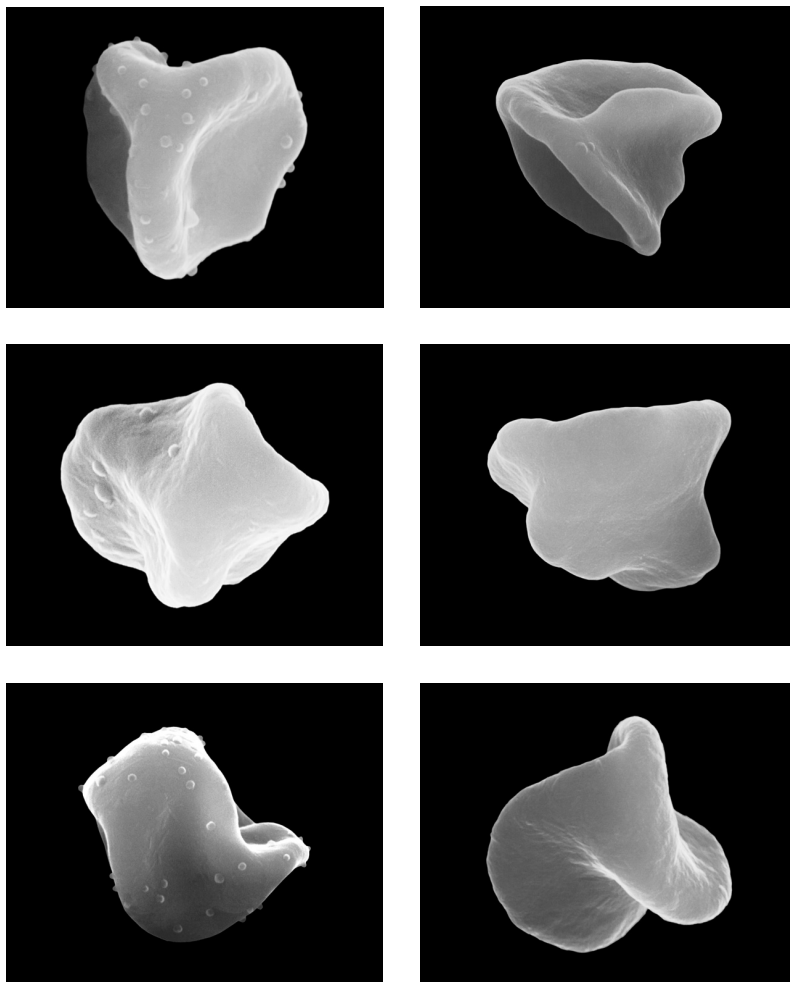


Рис. 15. Выраженная трансформация эритроцитов: видны гребни, глубокие «вмятины», неровности поверхности клеток. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

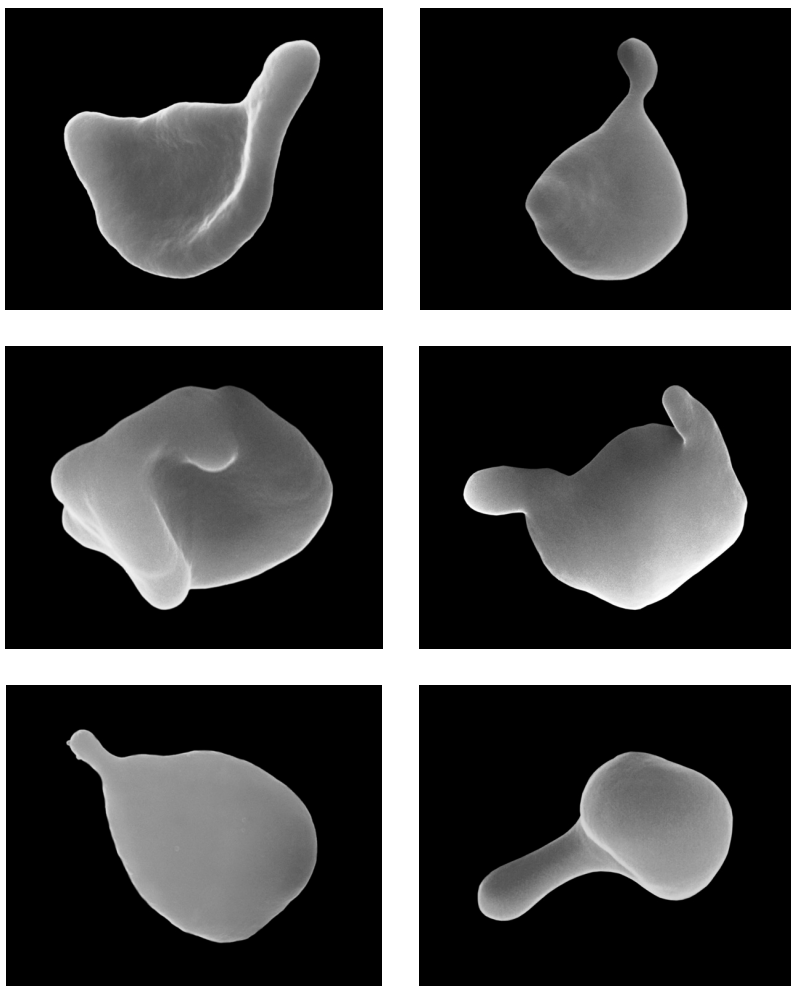


Рис. 16. Эритроциты с выростами различной величины и формы. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

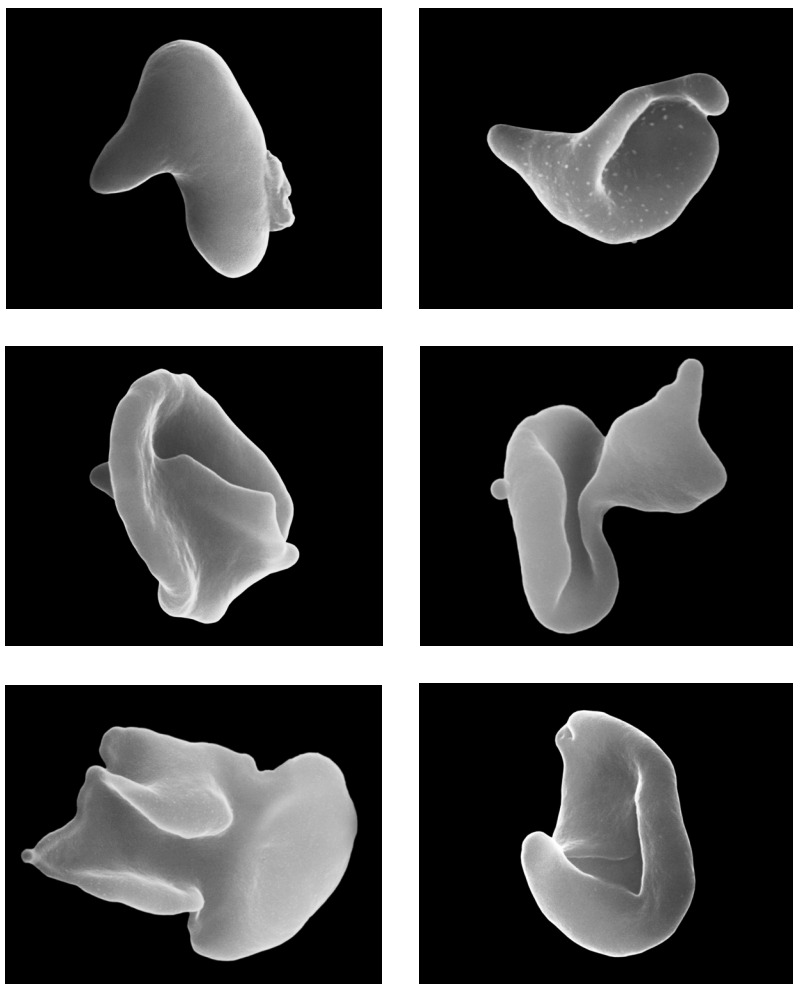


Рис. 17. Значительно трансформированные эритроциты с гребнями и выростами.
Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

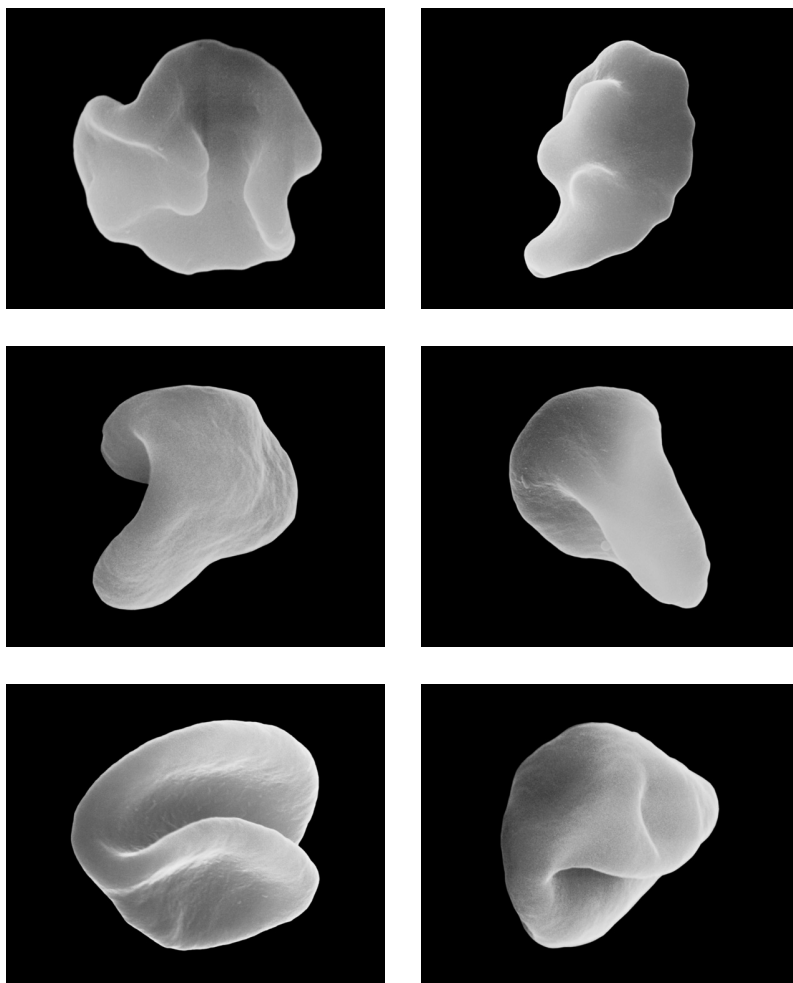


Рис. 18. Трудно классифицируемые дегенеративные формы эритроцитов. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

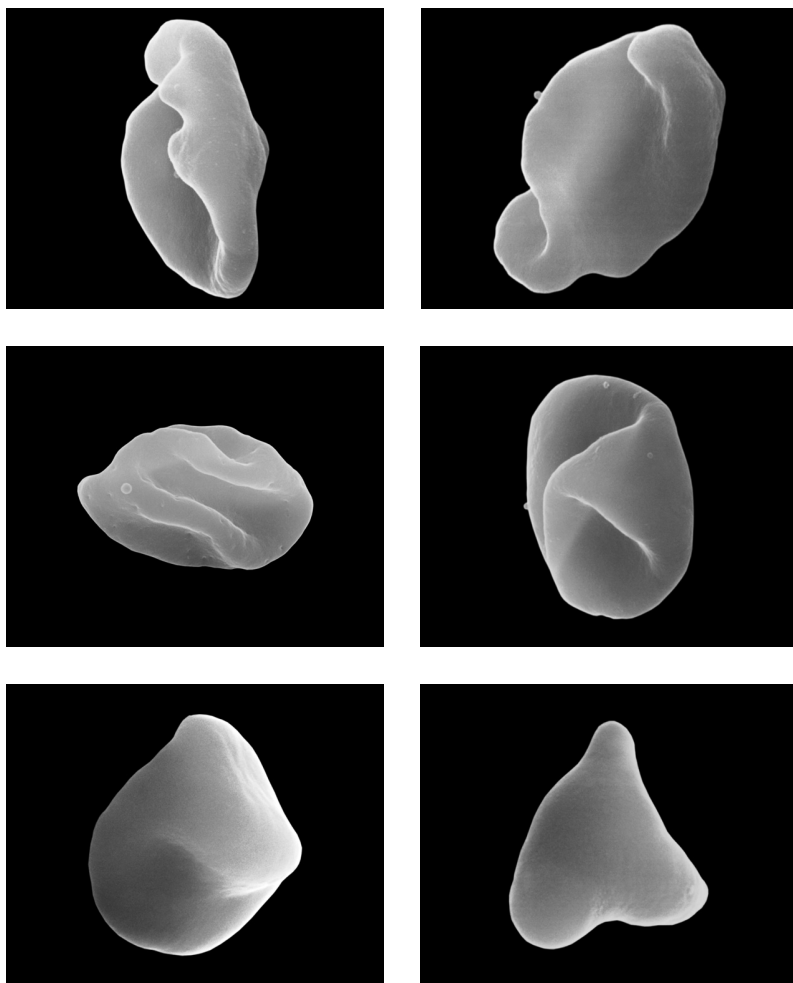


Рис. 19. Трудно классифицируемые дегенеративные формы эритроцитов. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

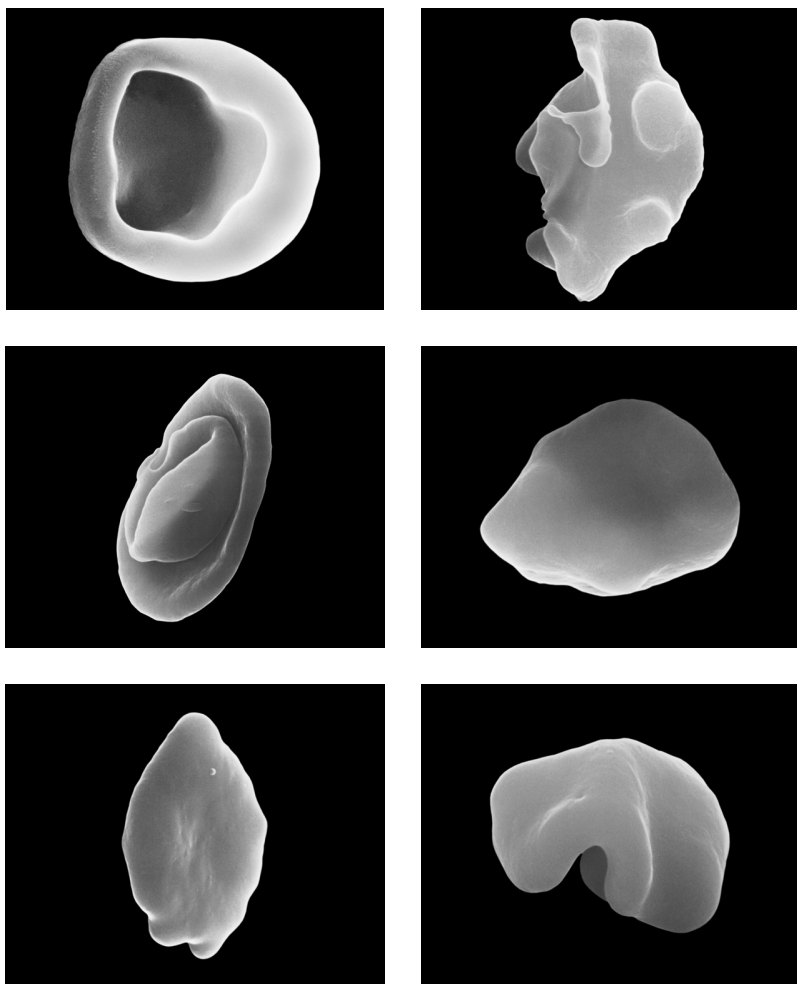


Рис. 20. Трудно классифицируемые дегенеративные формы эритроцитов. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 8000$)

Наряду с описанными выше морфологическими формами красных кровяных клеток в кровеносном русле встречаются эритроциты с одним-двумя остроконечными выростами при сохраненном объеме клеток (кератоциты), эритроциты, напоминающие по форме каплю (дакриоциты), клетки в виде серпа (дрепаноциты), эллипсоидные эритроциты, а также дегенеративные, трудно классифицируемые эритроциты неправильной формы с разнообразной конфигурацией (см. рис. 15–20). Рельеф поверхности трансформированных красных клеток крови может быть гладким, складчатым, бугристым и т.д. (рис. 21, 22).

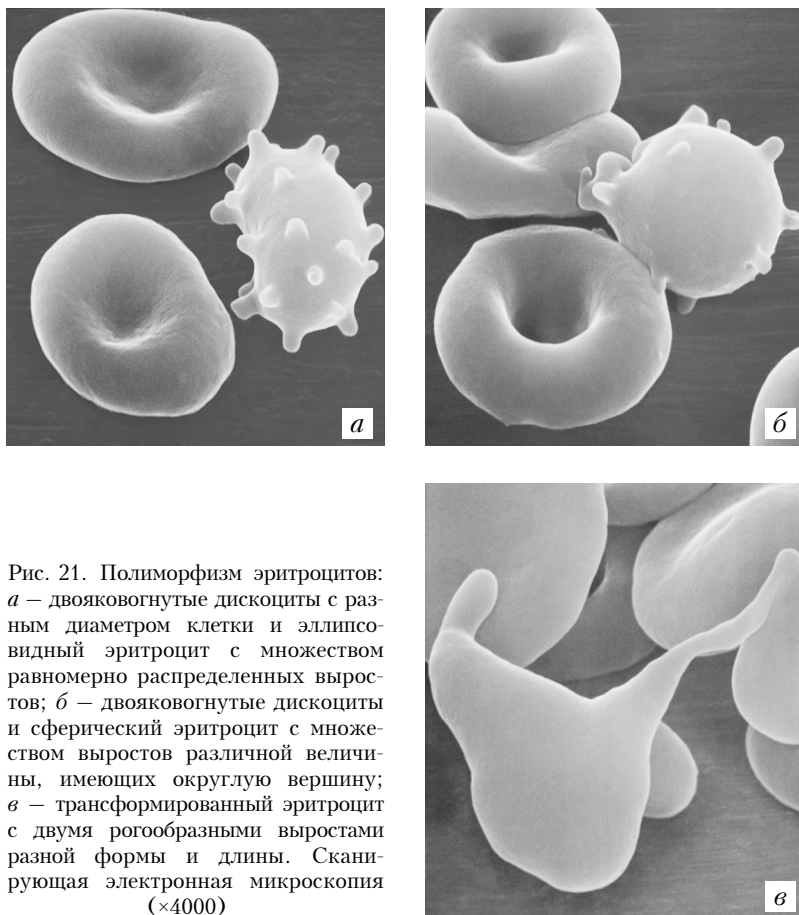


Рис. 21. Полиморфизм эритроцитов: *а* — двояковогнутые дискоциты с разным диаметром клетки и эллипсоидный эритроцит с множеством равномерно распределенных выростов; *б* — двояковогнутые дискоциты и сферический эритроцит с множеством выростов различной величины, имеющих округлую вершину; *в* — трансформированный эритроцит с двумя рогообразными выростами разной формы и длины. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 4000$)

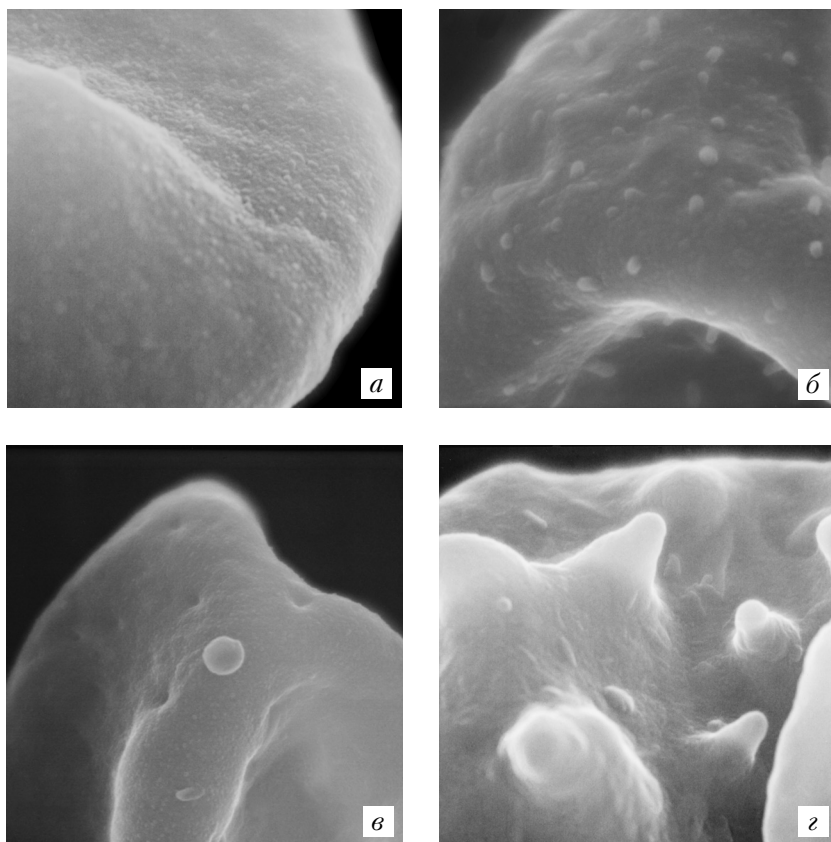


Рис. 22. Микрорельеф поверхности трансформированных эритроцитов: *а* — незначительная складчатость и множество неравномерно расположенных мелких пузырьков; *б* — выраженная дезорганизация клеточной поверхности; *в* — наличие единичных мелких углублений, в центре — пузыревидное образование; *г* — выраженная складчатость поверхности эритроцита. Сканирующая электронная микроскопия ($\times 48000$)

Использование трансмиссионной электронной микроскопии позволяет оценить ультраструктуру эритроцитов. Наряду с клетками с четко контурированной мембраной и цитоплазмой однородной структуры в периферической крови имеются формы с выраженным нарушением их ультраструктуры.

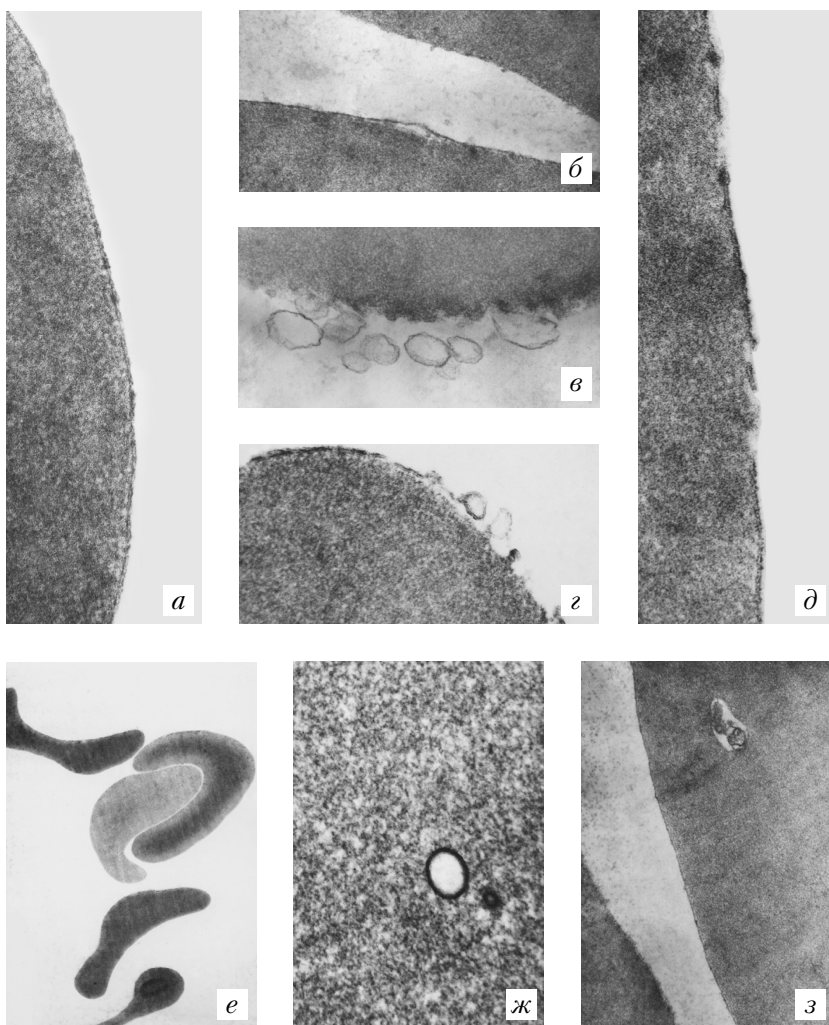


Рис. 23. Ультраструктура эритроцитов: *а* — фрагмент эритроцита с четко контурированной мембраной, имеющей трехслойное строение; *б–д* — локальные и обширные дефекты мембраны эритроцитов в виде отслоения от стромы (*б*), множественных макроэзовезикул (*в*) и микроэзовезикул (*з*), разрывов и фрагментаций (*д*); *е* — разная степень гемоглобинизации эритроцитов; *ж* — фрагмент клетки с эндовезикулой на фоне стромы разреженной структуры; *з* — эритроцит с эндовезикулой с электронно-плотными включениями. Трансмиссионная электронная микроскопия (*а, д, ж* — $\times 58000$; *б, в, з* — $\times 36000$; *г* — $\times 42000$; *е* — $\times 10000$)

Среди морфологических признаков ультраструктурного проявления мембранной патологии наиболее часто встречаются локальные и обширные дефекты цитолеммы в виде ее разрыхления, истончения, уплотнения и утолщения, а также разрыва, фрагментации, отслоения от стромы с образованием полостей. Разрушение мембраны может происходить по пути образования микро- и макроэксковезикул, часть которых утрачивает связь с клеткой. К морфологическим признакам дезорганизации стромы эритроцита отнесены неравномерность распределения гранул гемоглобина с образованием участков повышенной и сниженной электронной плотности, разрежение внутренней структуры вплоть до формирования полостей, а также эндоэксковезикулы, часть из которых содержит осмиофильные мелко- и крупнокалиберные включения (рис. 23).

Таковы основные морфологические феномены, выявляемые при исследовании красных кровяных клеток методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии.

2.5.2. Механизмы трансформации эритроцитов

Известно, что большая часть зрелых циркулирующих эритроцитов у здоровых людей представлена двояковогнутыми дискоцитами [28, 29, 56, 57]. Поддержание оптимальной формы, обеспечивающей адекватное участие клетки в газообмене, достигается стабильностью состояния катионтранспортирующих систем, ионного гомеостаза, сохранением на необходимом уровне аденозинтрифосфата (АТФ), сбалансированностью молекулярной организации белковых и липидных компонентов мембраны эритроцита [100, 171, 197, 200].

Нарастание полиморфизма эритроцитарной популяции, появление в крови трансформированных красных клеток не является случайным фактом, а есть отражение нарушений структуры и метаболизма эритроцита [75, 230].

По мнению Р. Элоя [139], основным формообразующим фактором эритроцита является локализованное сопротивление изгибу. Источник такого сопротивления может находиться либо в липидном бислое, либо в белковом цитоскелете или частично в каждом из этих компонентов, но вряд ли во всей мембране, действующей кооперативно. Вместе с тем существует предположение, что возникновение кренированных и чашеобразных форм эритроцитов обусловлено расширением одного монослоя липидного бислоя относительно другого: кренирование связано с расширением внешнего слоя, а чашеобразная форма — с расширением внутреннего [134, 139].

Происхождение спонтанной кривизны липидного бислоя, являющейся фактором, определяющим форму эритроцита, связано с различием площадей липидных монослоев, асимметричной формой молекул, входящих в состав мембраны, асимметричным распределением электрического заряда между внешней и внутренней поверхностью мембраны. Если спонтанная кривизна имеет отрицательное значение и не превосходит по абсолютной величине некоторое критическое, дискоцит превращается в стоматоцит. Положительная спонтанная кривизна приводит к образованию эхиноцитов.

Существует и иное представление о механизмах изменения формы эритроцита. По мнению С.В. Конева [66], имеют место несколько энергетически возможных состояний, соответствующих разным формам клетки, и любые изменения площади белкового каркаса (вследствие фосфорилирования, встраивания или потери белков) и липидного бислоя (изменение химического состава или фазового состояния) формируют новое метастабильное, напряженное состояние мембраны. Данный процесс может реализовываться и благодаря трансмембранному, поверхностному и осмотическому потенциалам.

Одним из необходимых условий для обеспечения физиологического статуса биологических мембран является стабильность количественного соотношения фракций липидов [68, 144]. В мембране эритроцитов фосфолипиды распределены неравномерно [66, 231]: фосфатидилхолин и сфингомиелин являются основными компонентами внешней поверхности мембраны, а фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин локализуются преимущественно на ее внутренней стороне. Переход молекул фосфолипидов с одной стороны мембраны на другую, избирательный гидролиз фосфолипидов в определенных областях мембраны или формирование небислойных липидных фаз играют важную роль в процессах образования везикул, трансформации и разрушения эритроцитов [176, 220]. Умеренное увеличение содержания лизофосфолипидов в мембранах клеток способствует повышению активности ферментов пентозофосфатного шунта, мембранотранспортных АТФ-аз; значительное же накопление лизофосфолипидов делает возможным переход липидного бислоя в монослой с нарушением проницаемости для Na^+ и K^+ , образованием гидрофильных каналов и изменением активности мембраносвязанных ферментов [10, 11]. Цитолитический эффект лизофосфолипидов обусловлен сочетанием их действия в качестве поверхностно-активных веществ и ионофоров, вызывающих структурные перестройки липидного компонента и белков в мембранах клеток [37]. Неблагоприятно сказывается на состоянии эритроцитарной мембраны и увеличение

содержания холестерина, определяющего текучесть и вязкость мембраны клеток и влияющего на такие свойства мембраны, как латеральная диффузия рецепторов, ионный транспорт, проницаемость для растворенных веществ [44, 53].

Известно, что процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и действие эндогенных фосфолипаз в норме и при патологии являются основными механизмами регуляции состояния липидного бислоя [20]. Интенсификация ПОЛ и угнетение антиокислительной системы эритроцитов при различных патологических процессах вызывают повреждение мембраны клеток. Пероксидация липидов ведет к резкому снижению количества полиненасыщенных жирнокислотных остатков, определяющих гибкость липидного бислоя. При этом происходит ограничение подвижности всей толщи мембраны, диффузия части фосфолипидов из глубины мембраны в поверхностный слой и их переориентация в сторону водной фазы, что находит свое отражение в изменениях поверхности клеток и их формы [153, 220]. Усиление ПОЛ в эритроцитах способствует активации процессов фосфолипаза, так как облегчает проникновение фосфолипаз в липидную фазу мембраны клеток и связывание их с субстратом. Активация фосфолипаз индуцирует гидролиз фосфолипидов; образующиеся при этом высокополярные соединения (лизосомальные липиды, свободные жирные кислоты) вызывают трансформацию дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты [48, 157, 199].

Встраивание молекул различных химических веществ в липидный бислой мембраны также приводит к нарушению ее структуры и изменению формы эритроцитов. Известно, что анионы («кренаторы»), встраиваясь во внешний монослой мембраны красных кровяных клеток, увеличивают его площадь (кривизна бислоя сдвигается в положительном направлении), способствуя трансформации диска в эхиноцит. Катионы («кап-формеры»), встраиваясь во внутренний монослой (кривизна бислоя становится более отрицательной), приводят к появлению стоматоцитарно трансформированных эритроцитов. Эхиноцитарную или стоматоцитарную трансформацию красных клеток крови можно вызвать воздействием различных химических веществ (фенотиразином, хлорпромазином, ремантадином, нитратом натрия и др.) [147].

Важнейшими компонентами биологических мембран являются белки, обеспечивающие транспорт молекул внутрь клетки и из нее, катализирующие в качестве ферментов ассоциированные с мембраной реакции, служащие в качестве рецепторов для получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды, а также опре-

деляющие морфологические и механические свойства клеток [33, 46, 119, 193]. Характер взаимодействия белков цитоскелета между собой, а также с интегральными белками и липидами мембраны клеток во многом определяет природу таких процессов, как изменение формы и деформируемости эритроцитов [47, 80, 161, 171].

Так, исследованиями некоторых авторов установлено, что наследственно обусловленный дефицит различных мембранных белков эритроцитов приводит к нарушению упорядоченности структуры цитоскелета и мембраны в целом, вызывая изменение формы клеток (сфероцитоз, эллиптоцитоз, пойкилоцитоз и т.д.) [172]. Анализ белков мембраны эритроцитов у пациентов с наследственным сфероцитозом позволил выявить четыре основные формы аномалии: только дефицит спектрина, сочетанный дефицит спектрина и анкирина, дефицит белка полосы 3 и дефекты белка полосы 4.2 [152]. Эллиптоцитоз может быть обусловлен дефектами спектрина или белка полосы 4.1, пойкилоцитоз — дефектом спектрина.

Наряду с этим известно, что к изменению формы и деформируемости красных кровяных клеток приводит модификация белков цитоскелета эритроцитов различными агентами [33, 180]. Очевидно, что агентами, которые влияют через уровень фосфорилирования спектрина и других компонентов цитоскелета на связи между белками цитоскелетного комплекса, являются АТФ и Ca^{2+} [177]. Перестройка белков цитоскелета является основой для формирования трансмембранных дефектов, через которые происходит утечка ионов и метаболитов [58]. По мнению Г.В. Гасс и соавт. [24], разрыв нескольких связей в спектрин-актиновой сети может приводить к образованию спиккулы на поверхности эритроцита. Окислительная денатурация белковых компонентов мембраны эритроцитов делает их доступными для действия эндогенных протеаз [124, 146].

Протеинкиназы А и С (цАМФ- и Ca^{2+} -фосфолипидзависимые протеинкиназы), усиливающие в том числе и фосфорилирование белков цитоскелета мембраны эритроцитов, играют важную роль в механизмах регуляции формы красных клеток крови. Одним из этапов в механизме регуляции объема и формы эритроцитов протеинкиназой С является активация фосфорилирования белка полосы 4.9 [67]. Вместе с тем известно, что эритроциты приобретают чашеобразную форму после обработки фосфолипазой С [47]. Однако эхиноцитарная трансформация интактных эритроцитов может быть связана с распадом фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата без признаков процесса дефосфорилирования белков цитоскелета эритроцитов.

Значительная роль в определении формы эритроцита принадлежит состоянию ионного гомеостаза клетки [171]. Повышение уровня внутриклеточного кальция приводит к агрегации белков мембраны, изменению взаимодействия ее липидных молекул, повышению микровязкости и сопровождается снижением деформируемости эритроцитов [11, 21]. Возрастание концентрации Ca^{2+} в эритроцитах сопровождается трансформацией дискоцитов в эхиноциты [198, 207], однако такое увеличение внутри клетки может сопровождаться образованием инвагинированных форм клеток с последующим эндоцитозом мембраны эритроцитов [150].

Набухание и сжатие эритроцитов человека значительно подавляют гиперполяризацию мембраны, что свидетельствует о наличии механизма регуляции цитоскелетом кальцийзависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцита. Белки цитоскелета, а именно спектрин, анкирин, белки полос 4.1 и 4.9, необходимы для объем-зависимой регуляции транспорта одновалентных ионов [95]. По мнению С.Н. Орлова и соавт., $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ -каналы эритроцитов являются одной из транспортных систем, ответственных за изменение объема и формы клеток [94]. Показано, что основная роль Ca^{2+} -управляемых калиевых каналов в эритроцитах состоит в стабилизации объема клеток при неспецифических изменениях проницаемости их мембраны [5].

Кальцийактивируемые калиевые каналы эритроцитов подвержены действию регуляторных систем, опосредованных ГТФ-связывающими белками, а также протеинкиназой С, активность которой зависит от метаболизма полифосфоинозитолов [98]. Активация протеинкиназы С происходит в результате действия эндогенного вторичного мессенджера диацилглицерола, образующегося при гидролизе фосфатидилинозитолбисфосфата. Диацилглицерол в присутствии Ca^{2+} и фосфатидилсерина как кофакторов активирует Ca^{2+} -фосфолипидзависимую протеинкиназу С, которая катализирует фосфорилирование ряда мембранных и цитоплазматических белков [112, 168, 188]. Нарушение фосфорилирования белков $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ -каналов приводит к изменению их активности. Показано, что активация протеинкиназы С ведет к стимуляции $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -обмена в различных клетках организма [7].

По мнению J.C. Freedman и соавт. [168], увеличение Ca^{2+} -индуцированной K^{+} -проницаемости мембраны эритроцитарных клеток является наиболее ранним событием в каскаде цитотоксических реакций, вызванных ионами Ca^{2+} . Утечка ионов K^{+} приводит к сжатию клеток, переходу их в пролитическое состояние и, наконец, гемолизу. Вместе с тем установлено, что повышенная активность $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ -каналов красных клеток крови предохраняет эритроциты от чрезмер-

ного разрушения при воздействии на них комплекса белков комплекса и при развитии микросфероцитоза.

Морфологическая характеристика красных кровяных клеток определяется не только концентрацией Ca^{2+} , но и внутриклеточным содержанием других двухвалентных и одновалентных катионов [124].

Для обеспечения целостности мембраны и двояковогнутой формы эритроцитов большое значение имеет энергия макроэргов [200]. Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза (и прежде всего ионного) в эритроцитах осуществляется за счет АТФ, образующегося в процессе гликолиза, который является основным путем обмена энергии в красных клетках крови [9, 101]. Истощение АТФ в эритроцитах приводит к ряду нарушений, в том числе к блокированию ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда — клетка, что способствует снижению соотношения площади поверхности к объему эритроцитов и превращению клеток в труднодеформируемые сферы.

Оптимальная форма эритроцитов в виде двояковогнутого диска поддерживается соответствующим уровнем активности не только ферментов гликолиза, но и пентозофосфатного цикла, который, в свою очередь, зависит от состояния липидного микроокружения и, наоборот, оказывает влияние на липидный бислой [14]. При этом нарушение процесса восстановления глутатиона, на который приходится около 90% всех SH-групп эритроцитов, зависящее от функционирования пентозофосфатного цикла, приводит к повышению доступности мембраны для действия продуктов ПОЛ, а также к необратимому окислению гемоглобина. Снижение уровня восстановленного глутатиона в красных кровяных клетках вызывает инактивацию ряда ключевых ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, пиروفосфатаза, гексокиназа), что способствует преждевременной гибели клеток. Дефицит восстановленного глутатиона сопровождается снижением деформируемости эритроцитов и приводит к развитию сфероцитоза зрелых клеток красной крови.

Тиоловые группы, активно образуя ковалентные связи, играют важную роль в поддержании определенной конформации полипептидных цепей. Существует мнение, что при интенсификации ПОЛ поражаются в первую очередь сульфгидрильные группы белков [20]. При пониженном содержании в клетках восстановленного глутатиона повышается степень риска окислительного повреждения белков цитоскелета свободными радикалами [17]. Так, в условиях ослабления системы антиоксидантной защиты, и прежде всего ее тиолового звена, одним из возможных эффектов действия активных окисляющих

веществ на мембраны эритроцитов может быть образование белковых агрегатов за счет появления межмолекулярных связей, в частности дисульфидных, между соседними молекулами белков [180]. В условиях дефицита восстановленного глутатиона воздействие активных форм кислорода способствует образованию спектрин-гемоглобиновых ассоциатов, а также усиливает окисление гемоглобина, приводя к образованию большого количества метгемоглобина, а затем гемихромов. Повышенное связывание гемоглобина и продуктов его катаболизма с различными белками мембраны эритроцитов может изменять нормальную структуру и функцию мембраны [116, 118]. Исследованиями ряда авторов показано, что количественное соотношение морфологических форм эритроцитов зависит и от содержания, и от состояния гемоглобина [45, 48]. Изменение концентрации гемоглобина в эритроцитах (как снижение, так и увеличение) приводит к возрастанию жесткости мембраны красных клеток крови и увеличению числа трансформированных форм эритроцитов.

Изменение формы эритроцитов и рельефа их поверхности сопровождается нарушениями ультраструктуры красных клеток крови, выражающимися в перераспределении в цитоплазме гемоглобина, усилении образования эндо- и экзовезикул, разрыхлении, уплотнении, деструкции цитолеммы, отслоении мембраны от стромы клетки и т.д. [1, 111].

Морфологическая альтерация двояковогнутого дискоцита во многом связана с нарушениями физико-химических свойств мембраны, сопровождающимися локальными изменениями сил ее поверхностного натяжения, которые определяются межмолекулярными взаимодействиями во внешнем и внутреннем ее монослоях. Ультраструктурно данный феномен может выражаться потерей мембранного материала во внешнюю среду в виде микро- и макроэкзовезикул. Важным моментом везикулообразования является физическое разделение мембранного цитоскелета и плазмалеммы в условиях интенсификации фосфолипаз [117]. Отделение мембранных пузырьков может приводить к удалению фосфолипидов, холестерина и мембранных белков. Феномен везикулообразования ассоциируется с процессом старения эритроцита, который считается необратимым и ведет к потере жизнеспособности клетки [115]. Однако другие исследователи считают, что эритроцит реагирует экзоцитозом на различные стрессовые воздействия, включая фиксацию на клетке активных иммунных комплексов, тем самым предупреждая ее деструкцию [184].

Обнаруживаемые при трансмиссионном электронно-микроскопическом исследовании участки утолщения и уплотнения мембра-

ны, ее отслоение с образованием полостей и последующим их разрывом, а также перераспределение гемоглобина в строме эритроцитов являются признаками деструктивных нарушений красных клеток крови и их старения [160]. По мнению Б.В. Втюрина и соавт. [23], ультраструктурная гетерогенность (разрыхление, уплотнение, деструкция) мембраны красных кровяных клеток, нарастающая по мере трансформации последних, обуславливается модификацией ее белково-липидных комплексов. Трансформация эритроцитов может сопровождаться глыбчатым распределением гемоглобина с тенденцией к его концентрации в центре, появлением деструктивных форм клеток с выходом внутриклеточного осmioфильного вещества в плазму.

Наличие клеток с разреженной внутренней структурой и полостями, сморщиванием наружной мембраны, везикуляцией и разрывом плазмалеммы, утолщением оболочки, наличием отростков, а также деформация эритроцитов являются, по мнению Н.А. Аряева [4], характерными признаками гемолиза. Известно, что при повреждении эритроцитарной мембраны в сосудистое русло поступает большое количество прокоагулянтных факторов, гемоглобина, ионов железа. Возникающая в результате этого активация перекисного окисления липидов в мембране и накопление фибриногена на поверхности эритроцитов способствуют снижению деформируемости клеток и уменьшению отрицательного заряда на их поверхности. При этом усиливается агрегация эритроцитов и становится возможным развитие сладж-синдрома с обтурацией сосудов и гемолизом эритроцитов. При сладже среди красных клеток крови обнаруживаются формы с измененной конфигурацией и деструкцией матрикса в виде появления в нем включений. Наиболее часто такие включения определяются в дегенеративных формах эритроцитов, сфероцитах и сфероэхиноцитах [23].

С точки зрения микроциркуляции, кислородтранспортной функции, способности к деформации, видоизмененные формы эритроцитов менее полноценны, чем дискоциты, в связи с чем увеличение их количества в эритроцитарной популяции является весьма неблагоприятным признаком.

2.5.3. Типовые изменения морфологии эритроцитов при патологических процессах разного генеза

Электронно-микроскопическое исследование эритроцита при патологии ставит вопросы, отвечая на которые приходится выходить за рамки исследуемого объекта и затрагивать ряд общепатологических

проблем, традиционно возникающих при изучении повреждений различных клеток. Это становится возможным, если на время абстрагироваться от видовой специфичности эритроцита и исходить из тех соображений, что любая клеточная система хотя и функционирует по собственным законам, в условиях патологии проявляет определенные единые черты нарушений [113, 114, 147]. Независимо от видовой принадлежности клетки (это в полной мере относится и к эритроциту) общие закономерности ее реагирования на патогенное воздействие разворачиваются по единому сценарию, что ультраструктурно проявляет себя ограниченным числом изменений морфологических признаков.

Принятие такого подхода стало возможным в результате многолетнего изучения формы, поверхностного рельефа и ультраструктуры эритроцитов при патологических процессах разного генеза [88]. В качестве доказательства существования типовой реакции трансформации эритроцитов при патологических процессах разного генеза приведем ряд клинико-морфологических иллюстраций, полученных отделом гематологии и лаборатории электронной микроскопии ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск) и лаборатории электронной микроскопии НПО «Вирион» (г. Томск).

Детальное исследование морфологии эритроцитов периферической крови у больных со злокачественными новообразованиями различных локализаций с применением метода сканирующей электронной микроскопии показало, что развитие опухолевого процесса приводит к снижению количества циркулирующих эритроцитов в форме двояковогнутого диска (дискоциты) и увеличению процентного содержания трансформированных форм клеток: переходных (эллипсы, плоские диски, дискоциты с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды), предгемолитических (сферические, куполообразные эритроциты и эритроциты в виде спущенного мяча) и дегенеративно измененных. При этом наиболее выраженное снижение количества двояковогнутых дискоцитов и возрастание предгемолитических форм клеток по сравнению с аналогичными величинами у здоровых лиц отмечалось у больных раком желудка, а также у пациентов, страдающих раком толстой и прямой кишки ($(76,98 \pm 0,25)$ и $(6,59 \pm 0,09)\%$; $(76,34 \pm 0,30)$ и $(6,50 \pm 0,09)\%$ соответственно при норме $(87,04 \pm 0,22)$ и $(2,18 \pm 0,05)\%$ соответственно); дегенеративно измененных форм — у больных раком толстой и прямой кишки ($(1,32 \pm 0,06)\%$ при $(0,13 \pm 0,01)\%$ у здоровых доноров). Наименее выраженные изменения морфологии эритроцитов были выявлены у больных раком легкого.

Результаты цитометрического исследования эритроцитов периферической крови показали, что у онкологических больных соотношение внутреннего и внешнего диаметров дискоцитов достоверно превышало соответствующую величину у здоровых лиц. При этом наибольший диаметр центральной впадины эритроцитов был характерен для больных раком легкого ($(57,03 \pm 0,25)\%$ против $(44,22 \pm 0,41)\%$ у здоровых доноров). Увеличение диаметра центральной впадины дискоцитов, их некоторое уплощение указывали на развитие планоцитоза эритроцитов.

Использование трансмиссионной электронной микроскопии продемонстрировало, что изменения формы эритроцитов у лиц со злокачественными новообразованиями различных локализаций (рак легкого, опухоли головы и шеи, рак желудка, толстой и прямой кишки) сопровождаются нарушением их ультраструктуры. Было отмечено увеличение числа клеток с эндовезикулами по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров. При этом величина данного показателя у пациентов с опухолями головы и шеи возрастала на 120%, у больных раком желудка — на 112%, у больных раком легкого, толстой и прямой кишки — на 65%. У пациентов с раком толстой и прямой кишки и с опухолями головы и шеи происходило возрастание количества эритроцитов с отслоениями наружной мембраны от стромы клетки (в 7,5 и 7,2 раза соответственно по сравнению с таковым у здоровых лиц). Менее выраженные изменения данного показателя были зарегистрированы у больных раком желудка (в 3,6 раза) и у пациентов с опухолью легкого (в 3 раза). Увеличение числа эритроцитов с экзовезикулами около и (или) на мембране клеток отмечалось у пациентов с опухолями головы и шеи (в 2,8 раза по сравнению с нормой) и в меньшей степени у больных раком желудка (в 1,9 раза) и раком легкого (в 1,5 раза). У больных раком толстой и прямой кишки показатель, характеризующий количество клеток красной крови с экзовезикулами в примембранном пространстве и (или) на мембране эритроцитов, не превышал соответствующую величину у здоровых лиц. Наряду с этим у онкологических больных в периферической крови встречались клетки с различной степенью осmioфильности внутреннего содержимого (рис. 24).

Таким образом, выявленные изменения поверхностной архитектуры, формы и ультраструктуры эритроцитов у пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций (рак легкого, опухоли головы и шеи, рак желудка, толстой и прямой кишки) были однонаправленными, однако степень выраженности указанных нарушений красных кровяных клеток зависела от локализации опухоли.

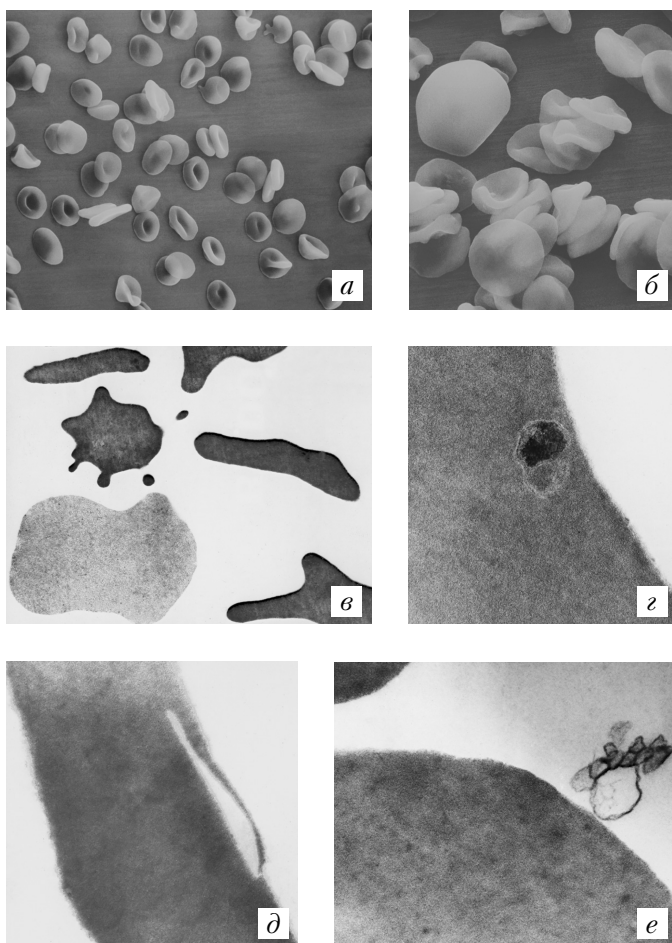


Рис. 24. Эритроциты крови больного раком легкого, IV стадия: *а, б* — двояковогнутые дискоциты, дискоциты с гребнем, клетки, подвергшиеся стоматоцитарной трансформации (куполообразные эритроциты, эритроциты в виде спущенного мяча), дегенеративно измененные формы клеток; *б* — среди эритроцитов нормальных размеров представлен макроцит; *в–е* — нарушения ультраструктуры эритроцитов в виде различной степени осмофильности внутреннего содержимого клеток (*в*), деструкции матрикса с образованием эндовезикул с электронно-плотными включениями (*з*), отслоения мембраны от стромы клетки с формированием полости (*д*), обширных дефектов эритроцитарной мембраны, сопровождающихся появлением экзовезикул (*е*). Сканирующая (*а* — $\times 1500$; *б* — $\times 3500$) и трансмиссионная (*в* — $\times 6000$; *з–е* — $\times 36000$) электронная микроскопия

Определенный интерес вызывают результаты сравнительной оценки изменений периферического звена эритрона у больных со злокачественными новообразованиями различных локализаций (рак легкого, опухоли головы и шеи, рак желудка, толстой и прямой кишки) в зависимости от стадии (II, III или IV) опухолевого процесса, а для больных раком легкого еще и в зависимости от гистологической формы опухоли. При этом у больных с мелкоклеточным раком легкого и дифференцированными формами опухоли достоверных различий по процентному соотношению различных морфологических форм эритроцитов и размеру центральной впадины дискоцитов не обнаружено. Вместе с тем у пациентов с IV стадией развития опухоли содержание предгемолитических форм клеток превышало аналогичную величину у больных с III стадией рака легкого. У больных с опухолями головы и шеи, а также раком желудка каких-либо различий изменения морфологических свойств эритроцитов в зависимости от стадии опухолевого процесса выявлено не было.

Обращал на себя внимание тот факт, что морфологические изменения эритроцитов у онкологических больных имелись как у пациентов с малокровием различной степени тяжести, так и у больных без признаков анемии.

При рассмотрении показателей, характеризующих морфологический состав популяции эритроцитов, — интегральных параметров, зависящих от состояния мембраны и метаболизма красных клеток крови, — установлено, что у больных раком толстой и прямой кишки с анемией значительно увеличивалось количество дискоцитов с множественными выростами и эритроцитов в виде тутовой ягоды (до $(1,64 \pm 0,05)$ и $(0,27 \pm 0,02)\%$ соответственно) по сравнению с аналогичными величинами у пациентов без малокровия ($(1,45 \pm 0,07)$ и $(0,18 \pm 0,03)\%$ соответственно); у пациентов с опухолями головы и шеи в сочетании с малокровием — эритроцитов в виде спущенного мяча и других непереходных форм клеток (до $(1,40 \pm 0,17)$ и $(5,86 \pm 0,46)\%$ соответственно) по сравнению с таковыми у больных с опухолями головы и шеи без анемии (до $(1,00 \pm 0,06)$ и $(4,98 \pm 0,14)\%$ соответственно). Представленные данные свидетельствуют о том, что нарушения структурно-метаболического статуса эритроцитов, в том числе топографии поверхности зрелых красных клеток крови, возникают раньше изменений количественных показателей периферического звена эритрона. При этом у онкологических больных с малокровием отклонения некоторых параметров, характеризующих морфофункциональное состояние эритроцитов, от контрольных значений были односторонними по сравнению с таковыми у пациентов с опухолью без

признаков анемии, но степень выраженности изменений по ряду изученных показателей оказалась различной. Механизмы анемии, развивающейся у больных со злокачественными новообразованиями, связаны с повышенным гемолизом циркулирующих эритроцитов в результате нарушений структуры мембраны и метаболизма красных клеток крови, возникающих изменений формы, поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов, а также с поступлением в кровотоки качественно неполноценных клеток из костного мозга.

Прогрессирование малокровия у онкологических больных может быть обусловлено использованием антибластной полихимиотерапии. Действие цитостатических препаратов, к сожалению, не избирательно и затрагивает наряду с опухолевыми и нормальные клетки организма [26, 30, 40, 82, 99]. Актуальность проблемы нарушения эритропоэза у больных со злокачественными новообразованиями в период проведения (или после окончания) противоопухолевой химиотерапии подчеркивается выраженным эритропоэзповреждающим действием абсолютного большинства используемых в клинике антибластных препаратов [28, 31, 208]. Токсическое действие ряда цитостатических средств во многом определяется их влиянием на мембранные структуры, в том числе красных клеток крови, что может сопровождаться изменениями формы, поверхностной архитектоники, ультраструктуры зрелых циркулирующих эритроцитов, приводя в конечном итоге к их интенсивному разрушению [89, 120, 143, 156].

Изучение эритроцитов крови методом сканирующей электронной микроскопии показало, что нарушения их формы и рельефа поверхности у больных раком легкого, а также у пациентов с опухолями головы и шеи в ходе цикловой полихимиотерапии становились еще более выраженными по сравнению с таковыми у нелеченых больных с опухолью. Так, у всех обследованных отмечалось прогрессирующее снижение числа двояковогнутых дискоцитов и увеличение количества трансформированных — переходных, предгемолитических и дегенеративно измененных — форм клеток. Результаты цитометрического исследования зрелых красных клеток крови свидетельствовали о прогрессирувавшем в ходе лечения цитостатиками уменьшении соотношения внутреннего и внешнего диаметров дискоцитов. Проведение цикловой полихимиотерапии у больных с опухолями головы и шеи по схеме, включающей цисплатин, 5-фторурацил и метотрексат, вызывало изменения изученных показателей, аналогичные таковым у больных раком легкого. Отмеченное во всех группах обследованных в ходе полихимиотерапии пациентов сокращение размера централь-

ной впадины дискоцитов, а также возрастание количества эритроцитов с множественными выростами, в виде тутовой ягоды, куполообразных и сферических эритроцитов свидетельствуют об усилении процессов трансформации двояковогнутых дискоцитов в сферы под влиянием цитостатиков. Обращало на себя внимание прогрессирувавшее в динамике проведения полихимиотерапии увеличение числа сферических форм эритроцитов.

Изменениям поверхностной архитектоники красных клеток крови сопутствовали нарушения ультраструктуры эритроцитов. После окончания 2-го курса лечения цитостатиками (циклофосамид, адриабластин, метотрексат) у больных раком легкого отмечалось возрастание количества красных клеток крови с отслоениями наружной мембраны от стромы по сравнению с таковым у нелеченых пациентов с опухолью. Кроме того, регистрировалось увеличение числа эритроцитов с расположенными возле и (или) на них экзозекулами, а также рост количества клеток с белками в примембранном пространстве (рис. 25). Аналогичные изменения были отмечены и у пациентов с опухолями головы и шеи после проведения двух курсов химиотерапии по схеме, включающей цисплатин, 5-фторурацил и метотрексат.

Таким образом, проведение цитостатической терапии у больных со злокачественными новообразованиями осуществлялось на фоне значительных, характерных для опухолевой болезни нарушений состояния периферического звена эритрона, обусловленных как непосредственным действием токсических продуктов опухоли на красные клетки крови разной степени зрелости, так и влиянием опухоли на эритрон опосредованно через контролирующие системы организма. Трансформация эритроцитов периферической крови при опухолевом росте связана с активацией свободнорадикальных реакций и снижением активности антиоксидантной системы в красных клетках крови, сопровождающихся нарушениями количественного и качественного состава липидов, белкового спектра мембран клеток, белок-липидных взаимодействий, а также снижением величины плотного остатка клеток, концентрации в них сульфгидрильных групп; нарушением катионного гомеостаза (в частности, содержания в клетках ионов Ca).

При обследовании детей, страдающих сахарным диабетом типа 1, в фазу клинικο-метаболической декомпенсации (диабетический кетоацидоз, кетоацидотическая кома) при поступлении в стационар и в период клинικο-метаболической субкомпенсации после проведения традиционной терапии также были обнаружены изменения морфологического статуса зрелых циркулирующих эритроцитов (рис. 26) [39, 59, 125].

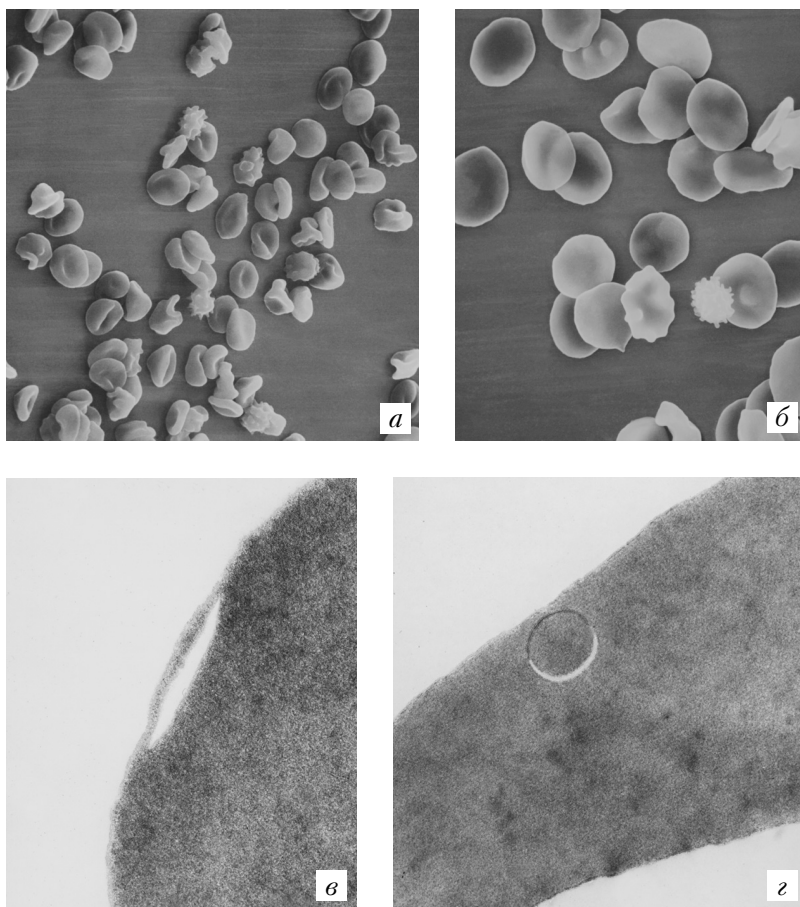


Рис. 25. Эритроциты крови больного раком легкого (III стадия) после проведения полихимиотерапии по схеме циклофосфамид — адриабластин — метотрексат: *а, б* — двояковогнутые дискоциты, эритроциты, подвергшиеся стоматоцитарной и эхиноцитарной трансформации (куполообразные эритроциты, эритроциты в виде спущенного мяча, тутовой ягоды, дискоциты с выростами), а также дегенеративно измененные формы клеток; *в, з* — нарушения ультраструктуры эритроцитов в виде обширных дефектов плазмалеммы: ее отслоение от стромы клетки с образованием полости (*в*), дезорганизация матрикса и появление в нем эндовезикул (*з*). Сканирующая (*а* — $\times 2000$; *б* — $\times 3500$) и трансмиссионная (*в, з* — $\times 36000$) электронная микроскопия

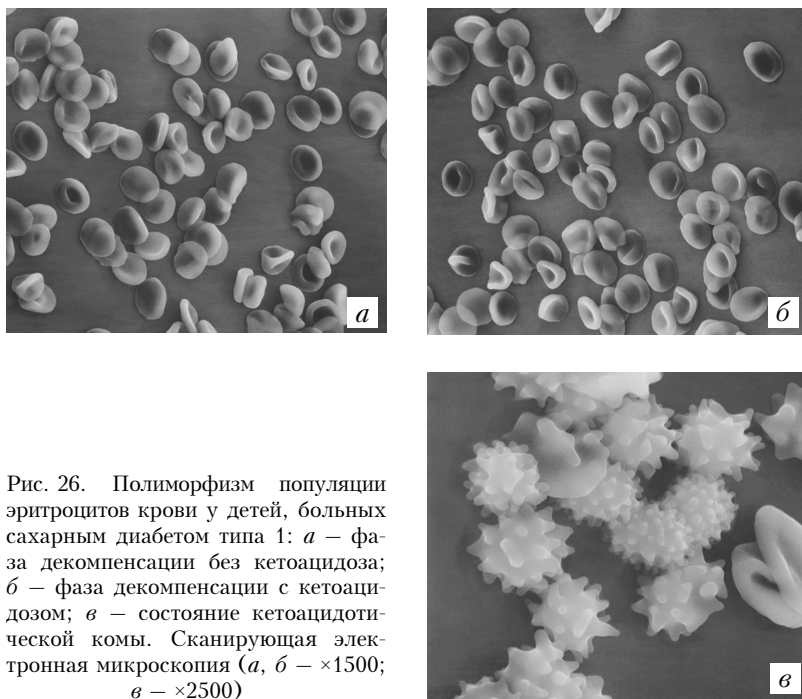


Рис. 26. Полиморфизм популяции эритроцитов крови у детей, больных сахарным диабетом типа 1: *а* — фаза декомпенсации без кетоацидоза; *б* — фаза декомпенсации с кетоацидозом; *в* — состояние кетоацидотической комы. Сканирующая электронная микроскопия (*а*, *б* — $\times 1500$; *в* — $\times 2500$)

У детей с сахарным диабетом типа 1 в фазу декомпенсации без кетоацидоза до проведения традиционной терапии количество двояковогнутых дискоцитов оказалось достоверно ниже их содержания в норме, составляя $(80,17 \pm 0,32)\%$. При этом число видоизмененных форм клеток (переходные, предгемолитические и дегенеративные — $(12,72 \pm 0,27)$; $(6,36 \pm 0,10)$ и $(0,75 \pm 0,05)\%$ соответственно) в данной клинической группе достоверно превышало соответствующие контрольные значения. В периферической крови у пациентов регистрировалось выраженное возрастание относительного содержания эллипсов, дискоцитов с одним и множественными выростами, с гребнем, эритроцитов в виде тутовой ягоды, сферических, куполообразных эритроцитов и клеток в виде спущенного мяча по сравнению с аналогичными показателями в норме. Результаты цитометрического исследования эритроцитов показали, что у детей, больных сахарным диабетом типа 1, в фазу декомпенсации без кетоацидоза до терапии соотношение внутреннего и внешнего диаметров дискоцитов достоверно превышало

соответствующую величину у здоровых детей. После проведения традиционной терапии у детей с сахарным диабетом типа 1 полиморфизм популяции эритроцитов сохранялся.

В фазу декомпенсации сахарного диабета типа 1 с кетоацидозом до начала лечения относительное содержание двояковогнутых дискоцитов в периферической крови у больных детей ($(79,61 \pm 0,42)\%$) оказалось достоверно ниже такового у здоровых. Было зарегистрировано существенное увеличение количества других морфологических форм зрелых красных клеток крови. Суммарное содержание переходных и предгемолитических форм эритроцитов у пациентов составляло соответственно $(13,73 \pm 0,31)$ и $(6,03 \pm 0,20)\%$, что достоверно превышало аналогичные значения у здоровых детей. При проведении терапии в фазу декомпенсации с кетоацидозом статистически значимых различий относительного содержания отдельных морфологических форм эритроцитов в периферической крови больных детей по сравнению с соответствующими показателями до начала лечебных мероприятий не выявлено. Достижение фазы клинико-метаболической субкомпенсации также сопровождалось выраженным полиморфизмом эритроцитарной популяции. В фазу декомпенсации с кетоацидозом у детей с сахарным диабетом типа 1 соотношение внутреннего и внешнего диаметров дискоцитов превышало аналогичный показатель у здоровых детей. После окончания терапии средние величины соотношения диаметра впадины и внешнего диаметра двояковогнутых дискоцитов у детей с сахарным диабетом типа 1 достоверно не отличались от контрольных значений.

Исследование поверхностной топографии эритроцитов периферической крови у детей с сахарным диабетом типа 1 в состоянии кетоацидотической комы позволило установить, что лишь $(79,11 \pm 0,59)\%$ клеток были представлены эритроцитами в форме двояковогнутого диска. В периферической крови достоверно возрастало количество видоизмененных форм клеток. В процессе проведения интенсивной терапии, а также в фазу клинико-метаболической субкомпенсации существенных признаков нормализации эритроцитарной популяции по морфологическому составу установлено не было. Наряду с этим анализ изученных показателей не выявил выраженных различий морфологического состава эритроцитарной популяции у детей с сахарным диабетом типа 1 в состоянии кетоацидотической комы и в фазу декомпенсации с кетоацидозом во все периоды наблюдения. Соотношение внутреннего и внешнего диаметров дискоцитов у детей с сахарным диабетом типа 1 в состоянии кетоацидотической комы при поступлении и после окончания терапии достоверно пре-

вышало данный показатель у здоровых детей. Стабилизация состояния пациентов и достижение фазы клинико-метаболической субкомпенсации не сопровождалась нормализацией данного параметра.

Использование метода трансмиссионной электронной микроскопии позволило установить, что у детей с сахарным диабетом типа 1 в фазу декомпенсации в небольшом количестве эритроцитов встречались эндовезикулы, а также отслоения клеточной мембраны от стромы клетки. Наряду с этим существенно возрастало число эритроцитов с экзовезикулами на мембране и (или) в примембранной области. Отмечалось скопление белков в межклеточном пространстве. У детей с сахарным диабетом типа 1 в фазу клинико-метаболической субкомпенсации в периферической крови также регистрировалось повышенное содержание эритроцитов с нарушениями ультраструктуры по сравнению с нормой.

Таким образом, при исследовании эритроцитов с использованием метода электронной микроскопии у детей, страдающих сахарным диабетом типа 1, установлено существенное увеличение в крови доли трансформированных форм клеток на фоне снижения содержания нормальных двояковогнутых дискоцитов. Следует отметить тот факт, что перераспределение относительного содержания различных морфологических форм эритроцитов регистрировалось как в фазу декомпенсации, так и в фазу клинико-метаболической субкомпенсации патологического процесса, а степень выраженности изменений коррелировала с глубиной метаболических нарушений. Неспецифические изменения поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов, регистрируемые при сахарном диабете типа 1, определяют нарушениями структурно-метаболического статуса клеток. К их числу могут быть отнесены изменения количественного и качественного состава липидов, белкового спектра мембраны эритроцитов, нарушения белок-липидных взаимодействий, повышение микровязкости липидного бислоя мембраны, нарушения функций катионтранспортирующих систем клеток, увеличение содержания внутриклеточного кальция, гликозилирование гемоглобина и белков мембраны, активация процессов перекисного окисления липидов, а также истощение системы антиокислительной защиты эритроцитов [66–69, 89].

На протяжении ряда лет в лабораториях электронной микроскопии СибГМУ и НПО «Вирион» проводилось комплексное исследование структурно-функционального статуса эритроцитов периферической крови у больных с тяжелыми термическими ожогами [85, 103–105]. Среди обследованных были пациенты с обширными (площадью

до 60% поверхности тела) поверхностными (I–IIIa степени) и глубокими (IIIб–IV степени) термическими поражениями кожи.

Электронно-микроскопическое исследование красных кровяных клеток у больных с термической травмой выявило отчетливую морфологическую перестройку эритроцитарной популяции, дезорганизацию поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов, степень выраженности которых коррелировала с тяжестью полученных ожогов кожи (рис. 27).

Наиболее существенные изменения морфологического статуса красных клеток крови обнаружены у больных с глубокими обширными ожогами. Несмотря на отсутствие явных количественных признаков нарушения периферического звена эритрона в раннем посттравматическом периоде из-за нарастания гемоконцентрации вследствие плазмопотери, характерной для обширных ожоговых повреждений кожных покровов, уже в течение 1-х сут с момента термической агрессии выявлялось выраженное снижение числа нормальных двояковогнутых дискоцитов (до $(77,52 \pm 0,26)\%$). В периферической крови у пострадавших отмечалось увеличение количества как обратимо, так и необратимо трансформированных форм эритроцитов. Высокий уровень переходных форм красных клеток ($(14,72 \pm 0,30)\%$) был обусловлен увеличением содержания эллипсовидных эритроцитов в 2,1 раза, клеток в виде плоского диска — в 2 раза, дискоцитов с гребнем — в 1,5 раза. Значительная часть клеток была подвергнута эхиноцитарной трансформации, о чем свидетельствовало увеличение по сравнению с показателями у здоровых доноров числа эритроцитов с множественными выростами, а также клеток в виде тутовой ягоды, крайне редко встречающихся в кровеносном русле у здоровых людей. Возрастание количества сфероцитов, стоматоцитов и эритроцитов в виде спущенного мяча приводило к трехкратному увеличению популяции нежизнеспособных предгемолитических элементов (до $(6,59 \pm 0,07)\%$). Изменение формы единичных эритроцитарных клеток сопровождалось появлением полушаровидных выбуханий цитолеммы. Дегенеративные признаки наблюдались у $(1,17 \pm 0,09)\%$ клеток. Подобный характер распределения морфологических форм эритроцитов отмечался в течение всего периода ожогового шока. Столь выраженную дезорганизацию структурного статуса эритроцитов правильнее отнести к категории неспецифической реакции периферического звена эритрона в ответ на комплекс патологических факторов, активируемых при воздействии термического агента (интенсификация липопероксидации, протеолиза, инициация эндогенных фосфолипаз и др.) [44]. Указанные ранние изменения эритроцитар-

ного гомеостаза во многом определяют функциональную неполноценность системы эритрона, а также нарастание дефицита эритроцитарной массы в позднем постожоговом периоде.

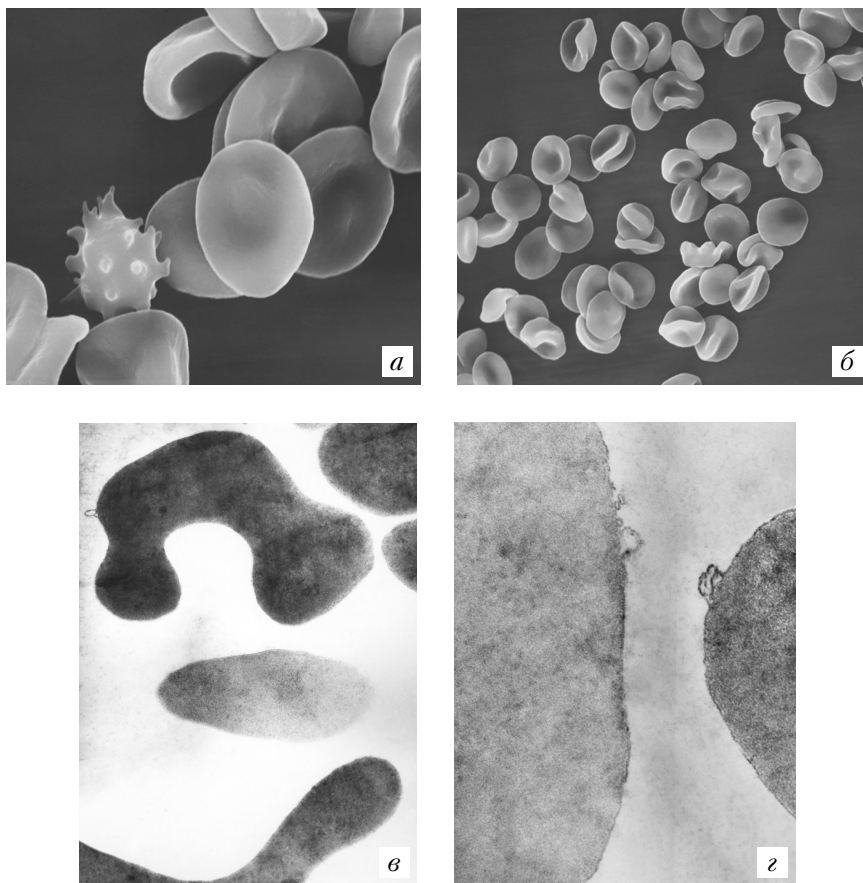


Рис. 27. Эритроциты крови больного с термическими ожогами кожи I–II–III степени площадью 12% поверхности тела на 7-е сут после травмы: *а* – среди двояковогнутых дискоцитов видны эритроцит в виде тутовой ягоды и куполообразная клетка; *б* – множество дискоцитов с гребнем и выростами; *в* – фрагмент стоматоцита на срезах клеток и различная электронная плотность стромы клеток; *г* – деструкция плазмалеммы эритроцитов с формированием микро- и макроэзовезикул. Сканирующая (*а* – $\times 6500$; *б* – $\times 2500$) и трансмиссионная (*в* – $\times 12000$; *г* – $\times 36000$) электронная микроскопия

Ультраструктурная гетерогенность поверхности эритроцитов определяла морфологическую неоднородность периферического звена эритрона во все последующие периоды ожоговой болезни. При этом каких-либо существенных изменений поверхностной архитектуры клеток эритроцитарного пула по сравнению с особенностями морфологического статуса эритроцитов в период ожогового шока выявить не удалось. В периоды острой ожоговой токсемии и септикотоксемии доля функционально полноценных двояковогнутых дискоцитов оказалась сниженной, а количество трансформированных эритроцитов, находящихся на различных стадиях дегенерации, значительно повышенным. Высокий уровень предгемолитических форм клеток был обусловлен главным образом увеличением числа сферических (в 2,5 раза по сравнению с таковыми у здоровых лиц) и куполообразных (в 2,7 раза) эритроцитов, теряющих способность к адекватной деформируемости. Морфологическая перестройка эритроцитарной популяции сопровождалась нарушением ультраструктуры красных кровяных клеток, о чем свидетельствовали результаты трансмиссионной электронной микроскопии. Наряду с интактными клетками с неизменной гладкогомогенной мембраной и равномерным мелкозернистым электронно-плотным матриксом определялись форменные элементы с повреждением цитолеммы в виде ее истончений, отслоений, формирования эндо- и экзовезикул. Достаточно часто встречались эритроциты с неравномерным распределением гранул гемоглобина внутри клетки, а также деструкцией стромы в виде участков с повышенной и сниженной электронной плотностью (рис. 28).

В позднем постожоговом периоде обращали на себя внимание длительность существования анемического синдрома и отставание восстановления морфологических особенностей периферического звена эритрона от времени наступления реконвалесценции и завершения процесса эпителизации ожоговых ран. На 60-е сут исследования количество стоматоцитов в 3,2 раза, сфероцитов — в 2,6 раза, клеток в виде спущенного мяча — в 2,5 раза, дегенеративно измененных форм — в 7,9 раза превосходило их нормальный уровень. Содержание переходных форм эритроцитов оказалось повышенным на 21%, а число нормальных дискоцитов, как и ранее, уменьшенным на 8% по сравнению с их содержанием у здоровых доноров. Эритроцитометрическое определение соотношения размеров центральной впадины к внешнему диаметру дискоидных клеток позволило выявить достоверное уменьшение данного показателя на протяжении всего времени исследования.

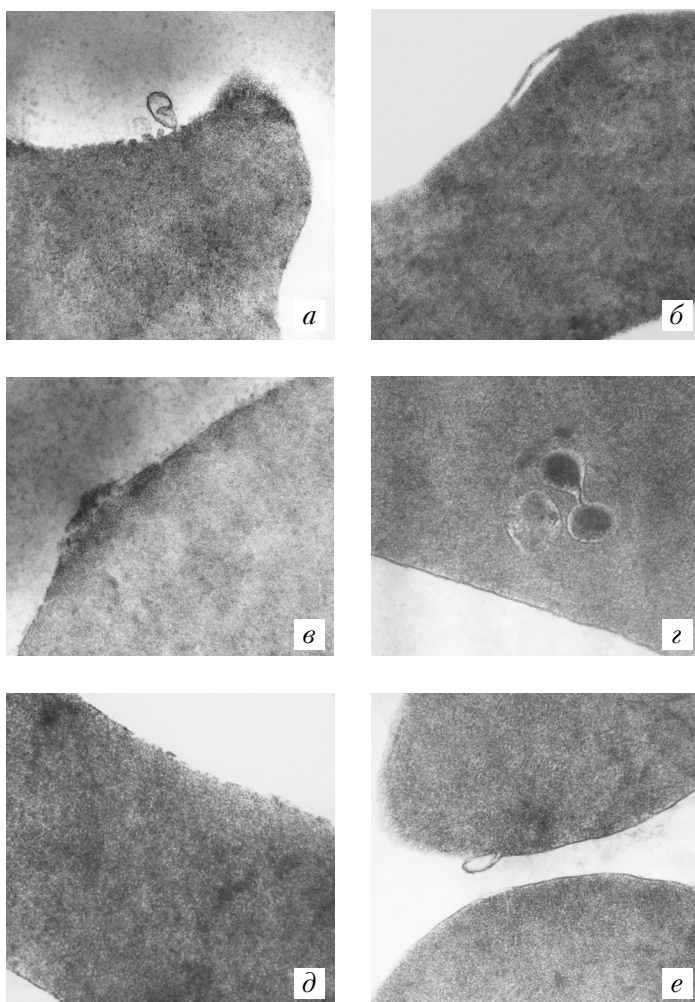


Рис. 28. Эритроциты крови больного с термическими ожогами кожи III–IV степени площадью 26% поверхности тела: *а, е* — локальные и обширные дефекты плазмалеммы эритроцитов в виде четко контурированных экзовезикул; *б* — отслоение деструктивной эритроцитарной мембраны от стромы клетки с образованием полости; *в, д* — разрывы и фрагментация плазмалеммы эритроцитов; *з* — в строме эритроцита хорошо видна группа эндовезикул с отчетливо выраженной оболочкой и включениями различной электронной плотности. Ожоговая болезнь. Период септико-токсемии. Трансмиссионная электронная микроскопия ($\times 36000$)

Результаты проведенного электронно-микроскопического исследования с убедительностью свидетельствуют о значительной дезорганизации поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов периферической крови у больных с тяжелыми термическими ожогами, наиболее выраженными в период ожогового шока и сохраняющимися в отдаленном посттравматическом периоде. Не исключено, что нарастание гетерогенности поверхностной и внутриклеточной ультраструктуры красных клеток крови при ожоговой болезни служит проявлением гематологического стресс-синдрома, развивающегося в ответ на запуск при тяжелой термической агрессии целого каскада патологических расстройств и характеризующегося вовлечением в патологический процесс как циркулирующей эритроцитарной популяции, так и костномозгового компартмента эритрона. Отправной точкой дисбаланса эритроцитарного гомеостаза у тяжело-обожженных явилось действие высокотемпературного агента в момент получения термической травмы [190], а также характерные для раннего постожогового периода глубокие микроциркуляторные расстройства, сладж эритроцитов, выброс в кровь катехоламинов, накопление кининов, простагландинов, интенсификация процессов перекисного окисления липидов, ослабление антиоксидантной защиты, повышение активности эндогенных фосфолипаз, протеаз [42]. В механизмах трансформации эритроцитов, уменьшения количества нормальных двояковогнутых дискоцитов и появления популяции нежизнеспособных форм красных клеток крови в отдаленном постожоговом периоде определенную роль могут играть эндогенная интоксикация, бактериальная токсемия, иммунные нарушения [52, 71], значительная кровопотеря, дисбаланс феррокинетики [8, 190]. Независимо от природы трансформации длительно сохраняющиеся нарушения формы, рельефа и ультраструктуры эритроцитов определяют их функциональную некомпетентность, что несомненно является одним из основных патогенетических звеньев развития и прогрессирования гипоксического состояния у больных с ожоговой травмой.

Таким образом, с использованием сканирующей электронной микроскопии было установлено, что при злокачественных новообразованиях, сахарном диабете, ожоговой травме, а также воспалении, эндокринопатиях, заболеваниях сердца и сосудов, инфекционных болезнях, психических расстройствах форма и поверхностная архитектура красных кровяных клеток претерпевают существенные изменения (рис. 29). На фоне сокращения численности популяции функционально полноценных двояковогнутых дискоцитов отмечалось

увеличение количества трансформированных клеток, находящихся на разных стадиях дегенерации: эллипсоидные клетки, эритроциты в виде плоского диска, дискоциты с гребнем, выростами, эритроциты, напоминающие по форме тутовую ягоду, сферические и куполообразные клетки, эритроциты в виде спущенного мяча, дегенеративно измененные эритроциты. При этом какой-либо специфичной, свойственной лишь определенной патологии трансформации красных кровяных клеток у больных не выявлено.

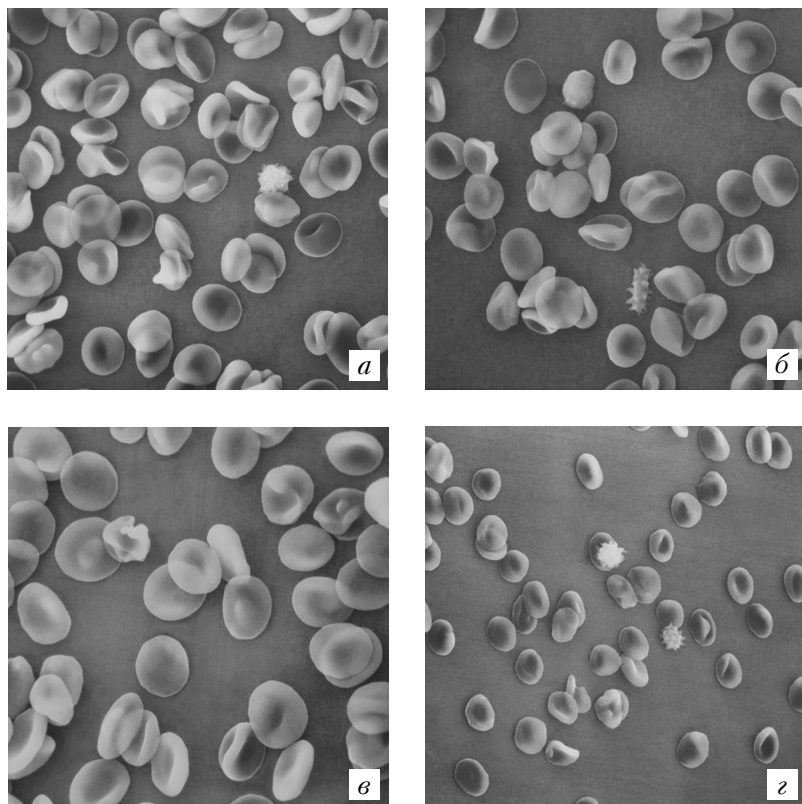


Рис. 29. Полиморфизм эритроцитов периферической крови: *а* — у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей; *б* — параноидальной шизофренией; *в* — неврастенией; *г* — хроническим бронхитом. Сканирующая электронная микроскопия (*а, б* — $\times 1800$; *в* — $\times 2500$; *г* — $\times 1500$)

Однотипные нарушения ультраструктуры эритроцитов в условиях развития различных по этиологии и патогенезу патологических процессов и состояний были обнаружены и при выполнении трансмиссионного электронно-микроскопического исследования. Наиболее часто встречались локальные и обширные дефекты цитолеммы в виде ее разрыхлений, истончений, уплотнений и утолщений, а также разрывов, фрагментаций, отслоений от стромы с образованием полостей, выявлялись микро- и макроэкзовезикулы. Деструкция стромы красных кровяных клеток характеризовалась неравномерностью распределения гранул гемоглобина с образованием участков повышенной и сниженной электронной плотности, формированием полостей, эндозекул [88, 93].

Трансформацию эритроцитов и дезорганизацию их ультраструктуры при различных заболеваниях, вероятно, правильнее отнести к числу реакций общепатологического характера, так как изменение формы зрелых красных клеток крови индуцируется разными факторами внешней и внутренней среды, являясь филогенетически предопределенной реакцией эритроцитов на повреждающие воздействия [87]. Более того, выявление однонаправленности изменений поверхностной архитектоники красных кровяных клеток при патологических процессах разного генеза дает возможность предположить универсальность нарастания полиморфизма периферического звена эритрона при различных механизмах воздействий, существование типовой реакции циркулирующей эритроцитарной популяции, не имеющей специфической нозологической и этиологической характеристики. Вероятно, причина такого стереотипа морфологических изменений эритроцитов в условиях действия разных патогенных факторов заключается в том, что сами молекулярные механизмы повреждения клеток во многом универсальны, даже если причины, вызвавшие это повреждение, различны. Несмотря на то что трансформация эритроцитарных клеток, дезорганизация их поверхностного рельефа при различной патологии являются результатом действия разных первичных патогенных факторов, при всем многообразии заболеваний и патологических процессов имеется сравнительно мало общих типовых механизмов дезорганизации плазматической мембраны клетки, состояние которой во многом определяет форму эритроцитов. К числу таковых прежде всего относится дефицит энергопродукции и интенсификация процессов свободнорадикального окисления. Усиление процессов перекисного окисления липидов в клеточных мембранах приводит к уплотнению либо деструкции липидного бислоя, увеличению его микровязкости, уменьшению площади белок-липидных кон-

тактов, нарушению функциональной активности белков, в том числе ферментов, изменению мембранной проницаемости и поверхностного заряда, нарушению функционального состояния мембрано-рецепторного комплекса. Свободнорадикальное окисление липидов играет роль триггерного механизма, обеспечивающего доступность липидно-белковых компонентов мембраны эритроцита соответственно для фосфолипаз и протеаз. Нарушение энергетического обмена стимулирует свободнорадикальные процессы в клетке, а активация свободнорадикального окисления приводит к повреждению мембраны и усугубляет дефицит энергии. Уменьшение содержания макроэргов в эритроцитах сопровождается накоплением в клетках ионов Са, так как снижение уровня АТФ приводит к выключению ионных насосов и просачиванию ионов Са из межклеточной среды, а также активацией фосфолипаз, гидролизом части фосфолипидов, увеличением проницаемости мембраны. Наряду с активацией ПОЛ накопление в эритроцитах ионов Са — вторичного мессенджера, переносящего сигнал от поверхности внутрь клетки, запускает совокупность процессов, к которым, в частности, относятся активация Са²⁺-зависимых фосфолипаз и протеаз, приводящих к нарушению структуры мембраны, метаболизма, ионного гомеостаза клетки и в дальнейшем — ее формы и функции [19, 25].

Однако не следует забывать, что в условиях развития генетически детерминированной патологии, когда на первый план выступают первичные механизмы модификации мембранных систем, вполне закономерно ожидать выявления специфических нарушений клеточных структур и морфологии эритроцитов. Это ни в коем случае не умаляет важности определения неспецифических изменений морфологии красных кровяных клеток, а лишь подчеркивает необходимость дифференцированного подхода к оценке структурных изменений эритроцитарной мембраны и их морфологических проявлений при разной патологии.

Глава 3

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

В последние 25 лет в научных исследованиях стали широко применяться новые приборы — сканирующие зондовые микроскопы, предназначенные для изучения поверхностей различной природы, с разрешением, позволяющим визуализировать отдельные атомы и молекулы. В 1981 г. был сконструирован первый сканирующий туннельный микроскоп, за изобретение которого в 1986 г. G. Binnig и H. Rohrer получили Нобелевскую премию в области физики. Следом появилось целое семейство приборов, работающих по этому принципу. В основе сканирующих зондовых микроскопов лежит осуществляемое пьезокерамическими сканерами перемещение относительно образца реагирующего с поверхностью зонда, а для построения изображения используются разные эффекты взаимодействия зонда с поверхностью.

Для биологических исследований наиболее перспективным является атомно-силовой микроскоп. Первый такой микроскоп в 1986 г. сконструировали G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber [149]. По характеру получаемых данных он близок к сканирующему электронному микроскопу, однако в отличие от последнего атомно-силовой микроскоп не требует вакуума и может работать с водными средами. Это позволяет исследовать биологические объекты в их естественной среде или в физиологическом растворе без проведения трудоемких и длительных процедур подготовки образцов к исследованию, связанных с фиксацией, обезвоживанием и напылением проводящего слоя.

Атомно-силовой микроскоп дает возможность изучать динамику биологических и физико-химических процессов, например движение клетки или рост кристаллов из жидкой фазы, последовательно сканируя одну и ту же область поверхности. Отличительной особенностью этого микроскопа является существование режима измерения сил взаимодействия объект — зонд, что позволяет оценивать механические свойства объекта (упругость, силы трения, силы адсорбции) в областях с нанометровыми размерами. Модифицировав зонд, «пришив» к нему биологическую или иную частицу, можно измерить силу взаимодействия между ней и изучаемой поверхностью.

Получаемые в ходе такого микроскопирования величины взаимодействия зонда с поверхностью изучаемого объекта в каждой точке по всей области сканирования сохраняются в виде компьютерного файла. В течение одного сканирования одновременно можно получить несколько видов данных: это могут быть топографические параметры, сила трения, эластические свойства поверхности или силовые кривые.

В настоящее время разработано несколько основных режимов работы прибора. Так, в контактном режиме зонд сканирует поверхность с некоторой заданной силой. При этом в зависимости от топографии сила взаимодействия изменяется, что регистрируется прибором. Отдельно измеряется горизонтальная составляющая силы взаимодействия, дающая информацию о локальной силе трения в точке. В модуляционном режиме зонд вибрирует с частотой, близкой к резонансной, а в качестве сигнала используется изменение характеристик колебания (амплитуда, фаза, частота) при взаимодействии зонда с образцом. Наконец, прибор позволяет проводить исследования в полуконтактном и бесконтактном режимах, исключающих даже минимальные повреждения поверхности зондом.

Сразу после появления зондовых микроскопов их внедрение в различные отрасли науки приобрело лавинообразный характер. По применению атомно-силового микроскопа в биологии к настоящему времени опубликовано более 1 тыс. работ, в которых прослеживается постоянное совершенствование и адаптация сканирующих зондов и микроскопов для новых исследований.

3.1. Устройство и принцип работы атомно-силового микроскопа

Принципиальная схема атомно-силового микроскопа представлена на рис. 30. Использующийся в микроскопе для сканирования зонд представляет собой острую иглу, расположенную на свободном конце плоской упругой балки (кантилевера). Перемещение зонда относительно образца или образца относительно зонда (в настоящее время реализованы оба способа) осуществляется с помощью пьезокерамического сканера, обеспечивающего два независимых движения: построчное сканирование в плоскости образца и вертикальное перемещение перпендикулярно плоскости. При взаимодействии зонда с поверхностью происходит изгиб кантилевера от первоначально установленного значения, величина которого измеряется с помощью регистрирующей системы. В процессе сканирования в каждой точке

поверхности система обратной связи перемещает зонд по нормали к поверхности таким образом, чтобы вернуть значение параметра взаимодействия к установленной величине. Одновременно величина перемещения зонда в направлении Z записывается в память компьютера и интерпретируется как рельеф образца. Этот режим работы называется режимом постоянной силы. Устройство прибора позволяет выбирать параметры сканирования: силу взаимодействия зонд — образец, скорость и направление сканирования.

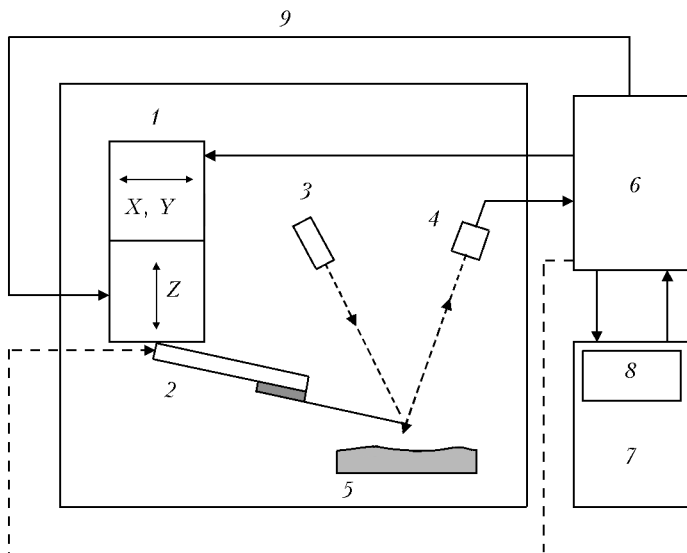


Рис. 30. Принципиальная схема атомно-силового микроскопа «Smena» (Россия): 1 — сканер; 2 — кантилевер; 3 — лазер; 4 — фотодетектор; 5 — образец; 6 — электронный блок; 7 — компьютер с интерфейсом 8; 9 — петля обратной связи

Деформация кантилевера регистрируется с помощью оптической системы, состоящей из лазера, луч которого направлен на отражающую поверхность кантилевера, и фотодетектора, регистрирующего отраженный свет. В начальном состоянии луч лазера, отражающийся от кантилевера, попадает в центральную область детектора. При деформации кантилевера луч смещается из центра, что приводит к изменению баланса токов, регистрируемых секциями детектора. Это позволяет измерять величину изгибов кантилевера относительно двух взаимно перпендикулярных осей (рис. 31). Вертикальная деформация отражает рельеф поверхности, а величина изгиба балки вдоль оси связана с силами трения.

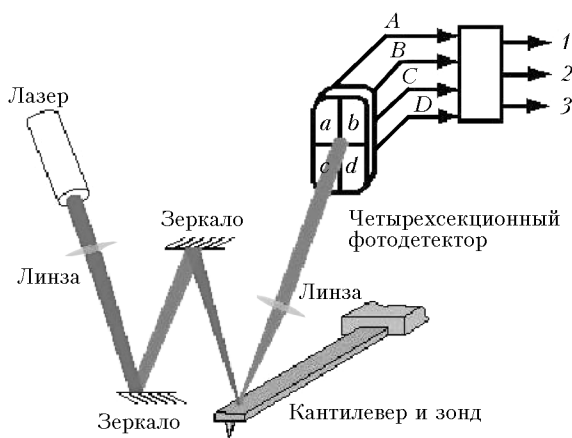


Рис. 31. Схема регистрации отклонений кантилевера: 1 — сигнал, пропорциональный вертикальному отклонению кантилевера; 2 — сигнал, пропорциональный изгибу по горизонтальной оси; 3 — суммарный сигнал

На рис. 32 представлены применяемые в атомно-силовом микроскопе зонды. Острие зонда имеет радиус кривизны менее 10 нм, угол при вершине 20° , длину — обычно от 3 до 15 мкм. При этом следует учитывать, что чем меньше радиус кривизны, тем большее разрешение может быть получено.

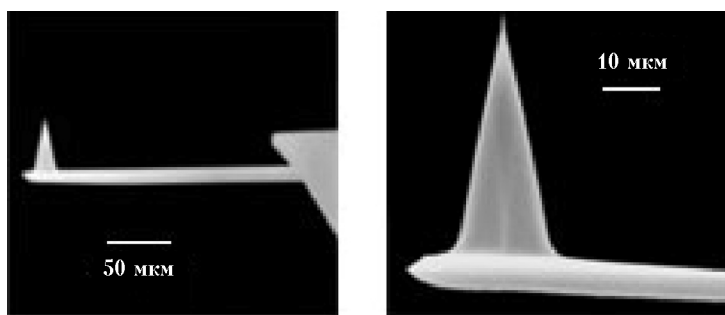


Рис. 32. Зонд атомно-силового микроскопа

Большинство кантилеверов имеют треугольную (V-образную) или прямоугольную форму и длину 80–350 мкм. В качестве основных материалов для изготовления кантилеверов применяются кремний и нитрид кремния. Важными параметрами кантилевера являются коэффициент упругости (жесткость) и резонансная частота. Величина коэффициента упругости определяется геометрическими размерами и

материалом кантилевера и составляет от 0,01 до 100 Н/м. Примечательно, что часто на одной подложке имеется два или несколько различных балок с остриями. Название «кантилевер» применяют также ко всей системе игла—кантилевер—подложка.

3.2. Режимы работы атомно-силового микроскопа

Рассмотрим процесс взаимодействия зонда с образцом. При приближении острия зонда к поверхности образца на зонд начинает действовать сила притяжения ван дер Ваальса (рис. 33). На зонд действуют также капиллярные силы, связанные со слоем воды, присутствующим на поверхности образца. Достаточно часто имеется электростатическое взаимодействие между зондом и образцом. Силы ван дер Ваальса дальнедействующие и заметны с расстояния десятков ангстрем. Затем на расстоянии в несколько ангстрем начинает действовать сила отталкивания. В этом диапазоне реализуется контактный режим работы атомно-силового микроскопа, при котором острие зонда непосредственно контактирует с поверхностью образца в процессе сканирования.

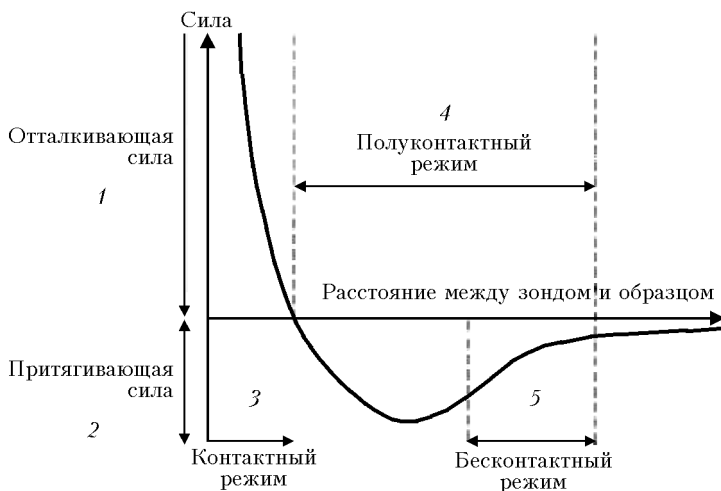


Рис. 33. Изменения сил ван дер Ваальса в процессе взаимодействия зонда с образцом: 1 — область сил отталкивания; 2 — область сил притяжения; 3 — область работы в контактном режиме; 4 — область работы в полуконтактном режиме (прерывистого контакта); 5 — область работы в бесконтактном режиме

Преимуществами контактного режима являются высокое разрешение, большие скорости сканирования, возможность измерения

локальных сил трения и локальных упругих свойств образца. К недостаткам контактного режима относятся сильное взаимодействие зонда с образцом, часто приводящее к разрушению образца, а также влияние капиллярных сил, затрудняющее получение изображения.

Для уменьшения силы взаимодействия зонда с образцом разработаны режимы, использующие вибрацию зонда. Зонд заставляют колебаться с частотой, близкой к собственной. Взаимодействие с поверхностью образца приводит к изменениям амплитуды и фазы колебаний зонда, которые регистрируются в процессе сканирования. Изменения амплитуды служат сигналом для системы обратной связи. Как и в контактном режиме, сканер перемещает зонд по направлению Z и возвращает значение параметра взаимодействия (амплитуды колебаний) к первоначально установленной величине. Изображением является проекция перемещения зонда. Примечательно, что использование вибрационного режима уменьшает время взаимодействия, так как колеблющееся острие при сканировании слегка «стучит» по поверхности образца, контактируя с ней лишь в нижней части своего размаха. При этом большую часть периода колебаний кантилевер не касается поверхности и относительно слабо взаимодействует с образцом. Редко применяемый бесконтактный режим также реализуется в режиме вибрации зонда.

Если в качестве сигнала для получения изображения использовать изменения фазы колебания зонда, получается фазовое изображение. Оно дает дополнительный контраст и часто применяется при исследовании клеток [203]. Контраст на фазовом изображении определяется изменениями таких свойств поверхности, как адгезия, трение или упругость.

Существует множество модификаций контактного и полуконтактного режимов атомно-силового микроскопа. Для изучения клеток интересны еще два: режим ошибки обратной связи (*error mode*) и режим измерения силовых кривых. Режим *error mode* используется для исследования мелких особенностей поверхности на фоне больших перепадов высоты. В этом режиме регистрируются резкие отклонения кантилевера от первоначально заданного положения, которые не успевает компенсировать система обратной связи (схема получения сигнала *error mode* показана на рис. 34). При этом *error mode* может применяться как в контактном, так и в резонансном режимах.

Еще одной важной особенностью атомно-силового микроскопа, применяемой при изучении эритроцитов, является возможность получения силовых кривых (рис. 35). Так принято называть зависимость отклонения кантилевера от расстояния между зондом и поверхностью.

Наклон кривой в области касания позволяет определить локальную эластичность поверхности [222]. Для исследования эритроцитов эта информация является очень важной, поскольку эластичность красных клеток крови определяет способность проникновения их через капилляры и является одной из важнейших характеристик эритроцитов.

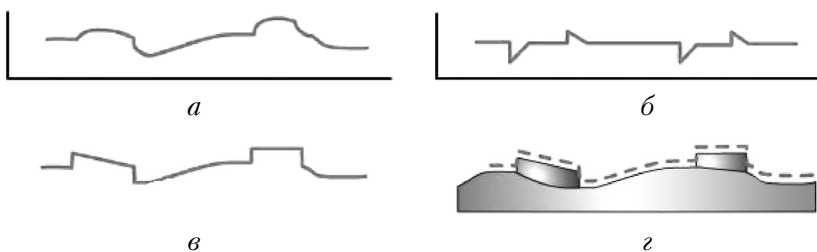


Рис. 34. Схема получения сигнала ошибки обратной связи (error mode): *a* — профиль движения сканера; *б* — профиль изменения отклонения кантилевера; *в* — профиль поверхности образца; *г* — образец

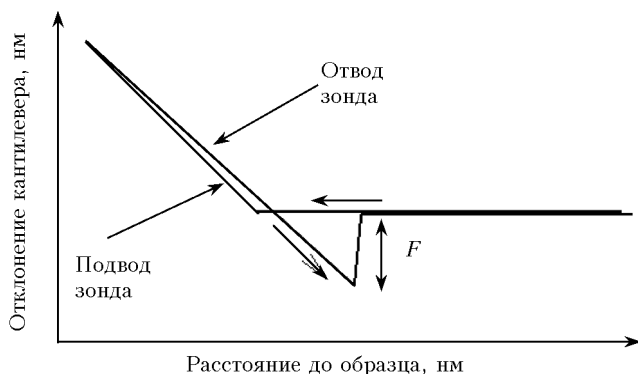


Рис. 35. Типичная кривая взаимодействия кантилевера с поверхностью образца. При подводе зонда к поверхности сила взаимодействия не меняется до момента касания, после чего кантилевер начинает изгибаться. Кривая взаимодействия при отводе несколько отличается от полученной при подводе. Это связано с существованием сил, возникающих при касании зонда (адгезионных, капиллярных или сил специфического взаимодействия). F — сила, необходимая для отрыва зонда. Угол наклона кривой при касании зонда к поверхности зависит от упругости исследуемой поверхности и жесткости кантилевера. На абсолютно жесткой поверхности угол наклона равен 45°

Особенности на кривой, позволяющие вычислить силу отрыва зонда F от поверхности, дают возможность измерить величину взаимодействия зонд — поверхность. В простейшем случае будут измеряться капилляр-

ные силы или силы электростатического взаимодействия. Модифицировав поверхности зонда или подложки, можно изучать более сложные случаи. Так, нанеся на подложку антиген и прикрепив к зонду антитело, оценивают силу специфического взаимодействия антиген — антитело [217]. Аналогично измеряется взаимодействие лиганд — рецептор [169].

Для биологических исследований предпочтителен специальный вариант атомно-силового микроскопа, отличающийся двумя главными особенностями: 1) совмещение со световым инвертированным микроскопом; 2) проведение исследований в жидкой среде с использованием обычной лабораторной посуды (например, чашек Петри). Последнее связано с возможностью сканирования зондом в отличие от обычно применяющейся схемы сканирования объектом.

В заключение следует остановиться на ограничениях использования атомно-силового микроскопа. Основным из них является необходимость прикрепления образцов к подложке, что затрудняет исследование клеток, особенно в жидкой фазе, когда оцениваемые объекты часто отрываются зондом от подложки. Другое ограничение — относительно малый интервал сканирования по вертикали (обычно 3–5 мкм, максимум 5–10 мкм). Это не позволяет исследовать относительно крупные объекты: элементы ткани, крупные культуральные клетки, а также крупные микроорганизмы, например, грибы. И, наконец, при использовании атомно-силового микроскопа возможно повреждение образца зондом (даже при малых силах взаимодействия). Так, на изображениях поверхности клеток, полученных в атомно-силовом микроскопе, отсутствуют мелкие «ворсинки», видные в сканирующем электронном микроскопе.

3.3. Технические ошибки и артефакты при атомно-силовой микроскопии

Несмотря на кажущуюся простоту процесса получения изображения в атомно-силовом микроскопе, интерпретация результатов достаточно сложна. Следует помнить, что полученное изображение одновременно несет информацию как о топографии исследуемой поверхности, так и о форме используемого зонда. Данное искажение принципиально неустранимо. Математически это выражается операцией свертки двух функций, описывающих форму образца и зонда. Сканирование толстой иглой приводит к уширению изображения на размер толщины зонда. Если же зонд имеет более сложную форму, то возможно удвоение изображения и другие эффекты. Искажения особенно заметны при изучении объектов, имеющих размеры, сопоставимые с толщиной зонда

(10–50 нм). Учесть изменения латеральных размеров сложно, так как обычно реальная толщина зонда (радиус закругления) неизвестна, а форма зонда может измениться в процессе сканирования. При изучении биологических объектов в процессе сканирования форма зонда часто искажается из-за налипания на него «грязи». В то же время из полученного при атомно-силовой микроскопии изображения можно определить точное значение высоты образца, поскольку его вертикальные размеры при сканировании не искажаются. Для эритроцитов, имеющих размеры в несколько микрон и значительный разброс по величине, увеличение латеральных размеров на 10–50 нм особого значения не имеет. Однако на высоте 1 мкм искажения изображения будут больше, так как толщина зонда на этой высоте составляет 350–400 нм (угол при вершине равен 20°). Для того чтобы избежать такого эффекта, существуют математические алгоритмы, позволяющие частично восстановить правильное изображение [227]. Также имеются специальные решетки для калибровки и проверки формы зонда.

Другим источником артефактов является процесс взаимодействия зонд – образец. На рис. 36 приведены артефакты сканирования, связанные с возбуждением зонда на краях эритроцитов при резких перепадах высот и разрыхлением эритроцитарной мембраны с появлением на ней участков, взаимодействующих с зондом. Последний эффект прямо связан с особенностями строения мембраны и может использоваться для регистрации изменений, произошедших в мембранной структуре.

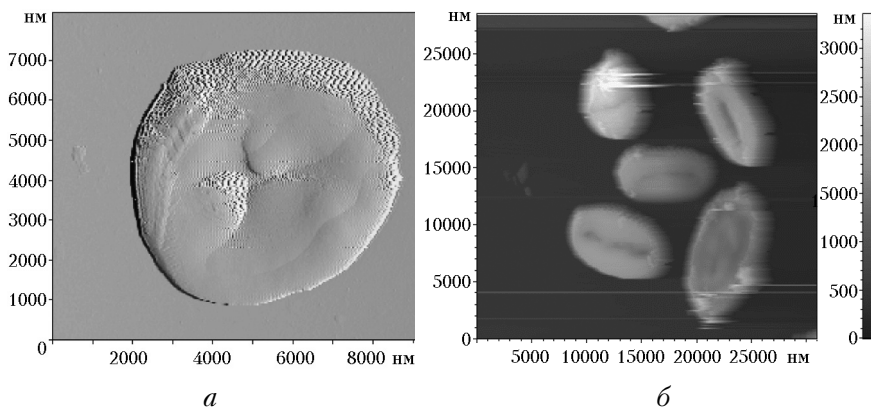


Рис. 36. Артефакты, возникающие при сканировании изображения: *а* — связанные с возбуждением зонда на краях эритроцитов при резких перепадах высот; *б* — связанные с разрыхлением эритроцитарной мембраны с появлением на ней участков, взаимодействующих с зондом. Атомно-силовая микроскопия

3.4. Подготовка образцов для атомно-силовой микроскопии

В атомно-силовой микроскопии подготовка образцов много проще, чем в других микроскопических методиках. Отсутствие необходимости в высоком вакууме, возможность проведения измерений в воздушной среде и даже в жидкости делает ненужной или, как минимум, некритичной операцию обезвоживания. Для работы на воздухе достаточно просто высушить нанесенный на подложку образец при комнатной температуре. Однако действие капиллярных сил, связанных с практически всегда присутствующим на поверхности слоем влаги, может затруднить получение качественного изображения. Поэтому при работе с клетками крови важно достигнуть снижения влажности образца.

Другой особенностью атомно-силовой микроскопии является отсутствие необходимости в окрашивании препаратов, применяемом в световой микроскопии, а также контрастировании или нанесении проводящего слоя, необходимых для электронной микроскопии. Поэтому артефактов, связанных с этими процедурами, при проведении атомно-силовой микроскопии не бывает. В то же время высокое разрешение метода требует внимания к процедурам адсорбции препарата на подложку и предварительным этапам процесса препарирования.

При подготовке образцов необходимо обеспечить выполнение двух основных задач: получить жесткое сцепление образца с подложкой и сохранить при этом нативные характеристики объекта (форма, тонкая структура и упругие свойства поверхности, если ведется их исследование). В качестве подложки для нанообъектов (вирусные частицы, белки или их агрегаты, нуклеиновые кислоты и их комплексы с белками) обычно выбирают свежий скол слюды, представляющий собой атомарно-плоскую поверхность. Для более крупных объектов (бактерии, клетки крови, клеточные культуры) применяется обычное предметное стекло.

3.4.1. Подготовка эритроцитов к исследованию в атомно-силовом микроскопе

Эритроциты — один из наиболее удобных объектов для атомно-силовой микроскопии в силу очевидной простоты строения и стабильности при обезвоживании. В зависимости от поставленных целей микроскопии существует несколько способов подготовки образца.

Исследование в мазке крови. Приготовление мазка крови занимает несколько минут. Присутствие в крови большого количества

белков исключает кристаллизацию солей при высушивании и делает ненужным их удаление. В то же время на скане мазка можно найти множество интересных объектов в разных диапазонах увеличения: от клеток крови величиной в несколько микрон до белков крови или элементов мембраны величиной в несколько нанометров. Часто мазок крови используют в качестве тест-объекта для проверки работоспособности микроскопа.

Для исследования пригоден простой мазок крови, приготовленный на предметном стекле стандартным для клинической лаборатории методом [79]. В световом микроскопе, на столике которого смонтирована сканирующая головка прибора, выбирается область, где клетки крови расположены в один слой. Препарат готов к исследованию практически сразу и не требует дополнительных манипуляций (рис. 37).

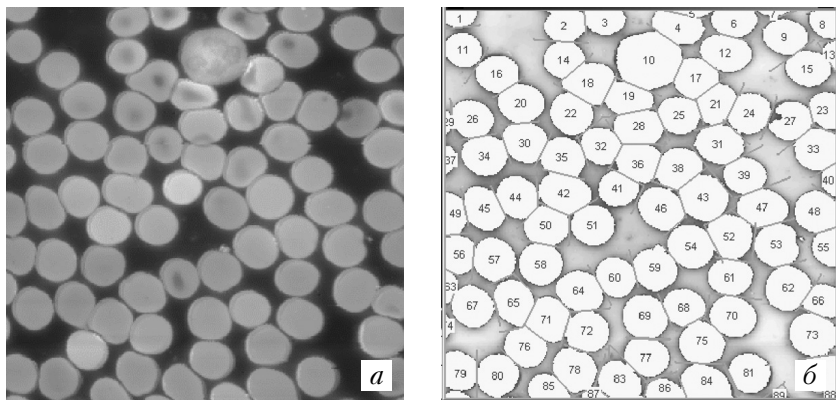


Рис. 37. Изображение мазка крови человека при атомно-силовой микроскопии: *а* — мазок крови; *б* — скан, приготовленный для компьютерного анализа. Размер скана 70×70 мкм

Недостатком метода мазка является значительная плотность объектов. Иногда даже на периферии мазка невозможно найти отдельно лежащие клетки. Клетки, имеющие контакты, искажены давлением соседних и не подходят для изучения. На таком препарате трудно делать выводы о форме эритроцитов, практически невозможно исследовать искажения формы, связанные с внешним воздействием, патологическим процессом или влиянием экзогенных токсических факторов. Также затруднительно оценить размеры отдельных клеток.

Исследование клеток из суспензии. Осаждение клеток из суспензии — более равновесный процесс, чем получение мазка. Оно применяется, когда необходимо получить распределение клеток крови

по форме и размерам в отсутствие механических искажений. Кроме того, при работе с суспензиями появляется возможность модельных экспериментов с клетками *in vitro*. Суспензии применяются при изучении воздействия на клетки физических, химических, биологических агентов. Однако получение препарата несколько сложнее, так как существует опасность внесения искусственных искажений формы или нарушения структуры мембраны, связанных с изменением pH или ионной силы буфера (рис. 38).

При неаккуратном обращении с суспензией изменение pH (в данном случае закисление раствора) привело к нарушению целостности мембраны (рис. 38,а), что спровоцировало сферическую трансформацию эритроцитов. Повышение ионной силы буфера сопровождалось обезвоживанием последних и, как следствие, искажением их формы (рис. 38,б).

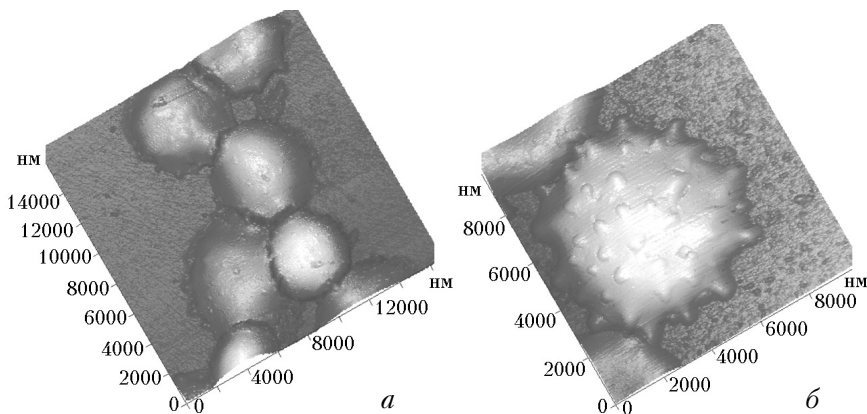


Рис. 38. Влияние нарушений методики приготовления эритроцитов на их форму: а — сдвиг pH при промывке; б — влияние гипертонического раствора. Атомно-силовая микроскопия

При высушивании препарата клеточной взвеси для наблюдения в воздушной среде на поверхности подложки и собственно клеток происходит кристаллизация солей. Удаление солей с помощью дистиллированной воды неэффективно, так как эритроциты, имеющие малый коэффициент сцепления с поверхностью, отрываются от подложки. Эту проблему решают иммобилизацией клеток с помощью агентов, связывающих их с подложкой (например, полилизин), или переводом клеток перед осаждением в дистиллированную воду. В свою очередь, чтобы избежать повреждений и искажений формы, вызываемых низкой ионной силой, предварительно проводится химическая

фиксация клеток. Однако искажения формы эритроцитов могут наблюдаться и в суспензионном случае при контакте двух или нескольких клеток. Поэтому для изучения изменений формы следует выбирать одиночно расположенные объекты.

Приведем для примера процедуру нанесения эритроцитов на подложку при изучении взаимодействия эритроцитов с вирусными частицами [43]. Образец представляет собой суспензию клеток крови (в основном эритроцитов) в фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,0$). Процесс инкубации эритроцитов с вирионами прерывается добавлением параформальдегида до конечной концентрации, составляющей 2%. Минимальное время фиксации соответствует 2 ч, после чего клетки могут храниться в течение нескольких дней. На следующем этапе клетки переносят в дистиллированную воду до конечной концентрации 10^{-8} /мл. Капля суспензии (5–10 мкл) наносится на предметное стекло размером 3×3 см и высушивается на воздухе. Стекло крепится к столику микроскопа «SolverBio» (Россия), и производится оценка формы и строения мембраны эритроцитов.

Исследование эритроцитов в жидкой фазе. Так как по физиологическим свойствам эритроциты плохо связываются с поверхностью, подготовка препаратов крови для изучения в жидкой фазе гораздо сложнее. Процедура приготовления препаратов предусматривает использование специального связывающего агента (обычно применяется полилизин) и описана рядом исследователей [222, 235]. В последнее время предложены и другие способы иммобилизации клеток на подложке [185, 194].

3.5. Исследования морфологии эритроцитов крови с помощью атомно-силового микроскопа

В настоящее время накоплены фактические данные о биологических исследованиях с использованием атомно-силового микроскопа [13, 51, 163, 164, 166, 179, 189, 214, 229]. По некоторым направлениям успехи использования атомно-силовой микроскопии не вызывают сомнений. Так, при изучении нуклеиновых кислот и комплексов нуклеиновая кислота — белок атомно-силовая микроскопия практически полностью вытеснила более трудоемкую электронную. В других областях пройдены лишь основные методические этапы оценки биологических объектов, а конкретные результаты еще предстоит получить. Развиваются подходы изучения упругих и адгезивных свойств клеточных мембран [140, 165, 214], измерения сил специфического взаимодействия биологических макромолекул между собой (взаимо-

действие антиген — антитело [217], лиганд — рецептор [169]) и с отдельными участками поверхности мембраны [158, 202].

Как указывалось выше, эритроциты — самые изученные методом атомно-силовой микроскопии клетки. Иногда используют препарат из эритроцитов в качестве теста для проверки работоспособности атомно-силового микроскопа. Для изучения эритроцитов обычно используются методы исследования в обычном мазке крови или в мазке из суспензии клеток, позволяющие получить высокое разрешение, хорошую воспроизводимость и меньшую трудоемкость. Однако ряд задач можно решить только при изучении эритроцитов в жидкой фазе.

С использованием атомно-силового микроскопа возможно получить информацию об особенностях формы и ультраструктуры мембран эритроцитов при действии ряда химических агентов [173, 174]. При этом сначала исследовался характер влияния на форму эритроцитов ряда веществ, применяемых при приготовлении препаратов для световой микроскопии: окрашивание с использованием красителя «cresyl blue» и по методу May-Grundwald Giemsa. Оба воздействия вызывали искажение формы, иногда не заметное в световом микроскопе, из чего авторы сделали вывод о желательности работы с нефиксированными и неокрашенными объектами. Затем были изучены морфологические особенности эритроцитов после добавления к клеточной взвеси среды с низкой ионной силой, лекарств, экзогенных фосфолипидов. Среди наиболее характерных деформаций отмечены формирование спикул с преобразованием нормальной клетки в эхиноцит (при инкубации клеток с лецитином), а также исчезновение центральной вогнутости, что характерно для сфероцитов (при помещении клеток в гипотонический буфер). На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что атомно-силовой микроскоп является подходящим инструментом для изучения морфофункциональных свойств эритроцитов при различных патологических процессах.

М. O'Reilly и соавт. (2001), определяя объем эритроцитов у здоровых лиц и пациентов с микро- и макроцитозом методами атомно-силовой микроскопии и с использованием автоматического анализатора крови, отмечали совпадение результатов, полученных обоими методами [212]. Y. Ohta и соавт. (2002) с использованием метода атомно-силовой микроскопии на эритроцитах крови барана показали, что сдвиговой (shear) стресс резко меняет тонкую структуру поверхности красных клеток [211]. Кроме того, с использованием атомно-силового микроскопа выполнялось исследование морфологических свойств клеток крови у больных, перенесших радиационное облучение [77, 78]. Ряд работ, проведенных при помощи атомно-силового

микроскопа, посвящен изучению феномена инфицирования эритроцитов малярийным плазмодием [141, 142, 155, 203, 204]. Для разделения стадий развития паразитов исследователи параллельно с атомно-силовой применили и флуоресцентную микроскопию. Авторам удалось выявить ряд особенностей изменения поверхности мембраны нефиксированных эритроцитов, что, по их мнению, может быть основным механизмом феномена повреждения эритроцитов при тропической малярии.

С использованием атомно-силового микроскопа проводилась оценка строения мембран эритроцитов при действии разных факторов *in vitro* [159, 222, 235]. Так, изучение особенностей поверхности эритроцитов, фиксированных в глutarовом альдегиде, выявило структуры, состоящие из плотно упакованных частиц размером до 10 нм [235]. Исследование методом атомно-силовой микроскопии цитоскелета эритроцитов с использованием сублимированных «теней» позволило визуализировать на изображениях решетку из спектрина, которая «прощупывалась» через плазматическую мембрану толщиной 4 нм [222]. Оценка изображения эритроцитов в нанометровом диапазоне показала, что поверхность интактных клеток характеризуется плотно упакованными частицами. Связывание Gd^{3+} с эритроцитом приводит к формированию доменной структуры при малых концентрациях и образованию пор при высоких концентрациях гадолиния. Такая доменная структура появляется после инкубации с 10^{-6} – 10^{-5} моль/л раствора Gd^{3+} в течение 30 мин и характеризуется агрегацией частиц с формированием округлых образований и разделяющих их впадин. Полученные результаты позволяют сделать вывод о включении механизмов формирования доменов на основе агрегации мембранных белков в результате связывания Gd^{3+} и наличии разных фаз мембранных липидов [159].

К настоящему времени выполнен ряд работ, посвященных исследованию эритроцитов в жидкой фазе [145, 201, 208, 209]. R. Nowakowski и соавт. (2001) при проведении исследований в физиологических условиях на разных областях подложки определили как отдельные эритроциты, так и монослои из клеток [209]. Они описывали двояковогнутые и сферические клетки. При изучении эластичности, являющейся важным свойством эритроцитов, R. Nowakowski и P. Luckham (2002) продемонстрировали возможность применения атомно-силового микроскопа для измерения локальной жесткости клеток крови [208]. Методические основы измерения эластичности эритроцитов атомно-силовой микроскопией для диагностики болезней разрабатывали также и другие авторы [167, 192, 201, 210, 221].

Опишем более подробно собственные результаты изучения взаимодействия клетка – вирус на примере модельной системы эритроцит – вирус [43, 210, 233, 234]. Исследования проводились в отделе микроскопических исследований анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская область, пос. Кольцово). Цитотропность вирусов является одной из ключевых проблем вирусологии. Хотя эритроциты не поражаются вирусами непосредственно, их мембрана может служить хорошей моделью для изучения этого процесса. В частности, реакция гемагглютинации эритроцитов в присутствии вирусов широко используется в вирусологии для количественного описания вирус-содержащих суспензий.

Для получения максимального разрешения изображения исследования проводились в «сухом» режиме с использованием эритроцитов макаки-резус, гуся и петуха. Оценивались несколько разных представителей семейств вирусов (вирус гриппа (А H7N7), парвовирус собак, вирус краснухи). Реакцию инициировали добавлением вирусной суспензии к взвеси эритроцитов при температуре 4–6 °С с последующим ее прерыванием параформальдегидом (конечная концентрация – 2%). После фиксации эритроциты осторожно переносили в дистиллированную воду (рН = 6,8). Каплю суспензии наносили на предметное стекло и высушивали на воздухе. Препараты изучали в атомно-силовом микроскопе «SolverBio» (Россия) в режиме прерывистого контакта.

Предварительные результаты исследования показали, что эритроциты стабильны при обезвоживании, но очень чувствительны к рН фиксатора и используемой воды. Закисление фиксирующего раствора приводило к изменению структуры мембран эритроцитов (см. рис. 38,а). Эритроциты изменяли форму, дополнительные искажения возникали в области контакта соседних клеток. При нормальных условиях препарирования в образцах нативных эритроцитов визуализировался мембранный цитоскелет, что свидетельствовало об адекватности процесса пробоподготовки [234].

Взаимодействие эритроцитов с вирусами влияло на структуру и физические свойства красных клеток крови. Изменения зависели от видового происхождения эритроцитов, семейства и концентрации вируса и соответствовали результатам реакции гемагглютинации. В условиях действия парвовируса собак и вируса гриппа трансформация агглютинирующих эритроцитов макаки происходила очень быстро. Эритроциты изменяли форму в течение первых минут взаимодействия с вирусной суспензией. На ранее тороидальных клетках появлялось центральное вздутие, затем изменения нарастали (рис. 39, 40).

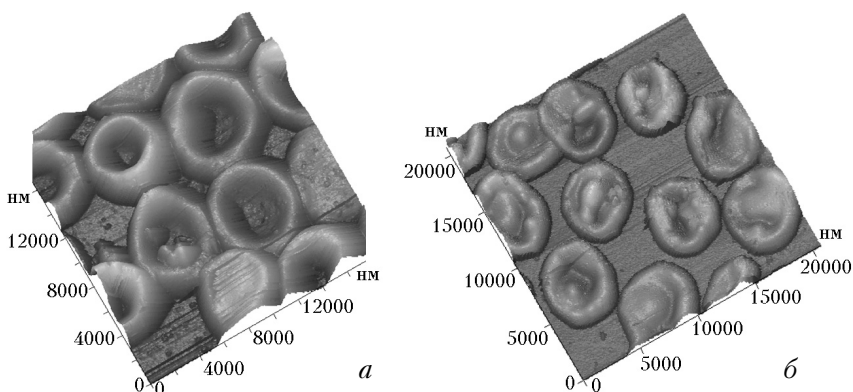


Рис. 39. Эритроциты крови макаки-резус: *а* — до инкубации с вирусом гриппа; *б* — после инкубации (в течение 1 мин при температуре 4 °С) с вирусом гриппа. Атомно-силовая микроскопия. Полуконтактный режим. Размер скана 20 × 20 мкм

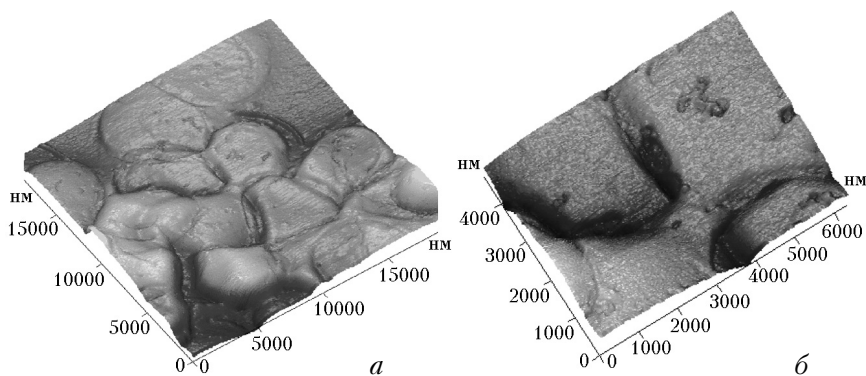


Рис. 40. Эритроциты крови макаки-резус через 90 мин от начала инкубации с парвовирусом собак. Атомно-силовая микроскопия. Размер скана 20 × 20 мкм (*а*), 5 × 6,5 мкм (*б*)

Высокая скорость реакции не позволила обнаружить вирусные частицы на мембране даже при мгновенной фиксации системы. В процессе взаимодействия на периферических областях мембраны возникали специфические упорядоченные образования из сцепленных частиц, по всей площади клетки обнаруживались многочисленные углубления (рис. 41). Возможно, вирионы проникали через мембрану или адсорбировались на краях клетки. При инкубации эритроцитов петуха с теми же вирусами при отрицательной реакции гемагглютинации изменения клеток возникали медленно и нарушения их формы носили менее выраженный характер. По всей площади клетки на ее

поверхности определялись сорбированные вирионы (рис. 42). Как видно на рис. 42, в топографическом режиме вирионы различаются только на части поверхности эритроцита. В режиме ошибки обратной связи вирионы видны на всей поверхности. Артефакты в нижнем правом углу связаны с возбуждением зонда при сканировании на крутом склоне.

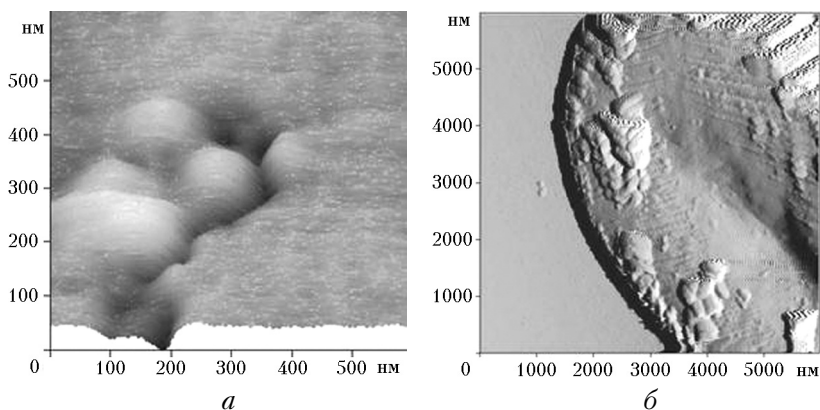


Рис. 41. Эритроциты после инкубации с различными вирусами: *а* — ямки на поверхности эритроцитов макаки после инкубации с парвовирусом собак (трехмерное изображение); *б* — поверхность эритроцита гуся после инкубации с вирусом краснухи (error mode). Высота частиц в цепочках 20–30 нм, длина цепочек — до 1 500 нм. Линейные размеры блоков — сотни нанометров. Атомно-силовая микроскопия. Размер скана 600×600 нм (*а*); 5×5 мкм (*б*)

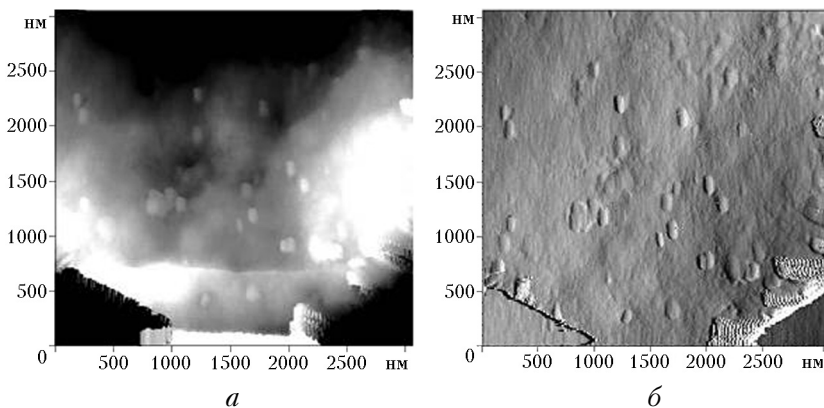


Рис. 42. Вирионы гриппа на мембране эритроцита петуха: *а* — топографический режим (трехмерное изображение); *б* — режим ошибки обратной связи (error mode). Атомно-силовая микроскопия. Размер скана 3×3 мкм

Таким образом, атомно-силовая микроскопия позволяет регистрировать изменения морфологии эритроцитов при взаимодействии вирус — эритроцит на двух уровнях. При этом изменения формы эритроцитов макаки-резус на макроуровне имеют схожий характер в условиях инкубации с совершенно разными по строению вирусом гриппа и парвовирусом собак. На микроуровне течение реакции вирус — эритроцит сопровождается появлением дефектов на мембране в виде ямок и бугров, краевых упорядоченных блоков, а также цепочек из наночастиц высотой около 20 нм. Подобные структуры не регистрируются на поверхности нативных клеток, что нельзя объяснить погрешностями метода.

Интересные результаты были получены и при исследовании методом атомно-силовой микроскопии изменений поверхности мембран эритроцитов у больных гематологическими заболеваниями (аутоиммунная и врожденная гемолитические анемии, железодифицитная анемия, миелодиспластический синдром) [213]. Для исследования использовались мазки крови, полученные по стандартной лабораторной методике (препараты крови пациентов были любезно предоставлены профессором Т.И. Пospelовой), применялась биологическая модификация атомно-силового микроскопа «SolverP47Bio» (Россия). Сканирование велось в контактном и полуконтактном режимах. Одновременно снимались два сигнала: error mode (рис. 43,а) и high (рис. 43,б).

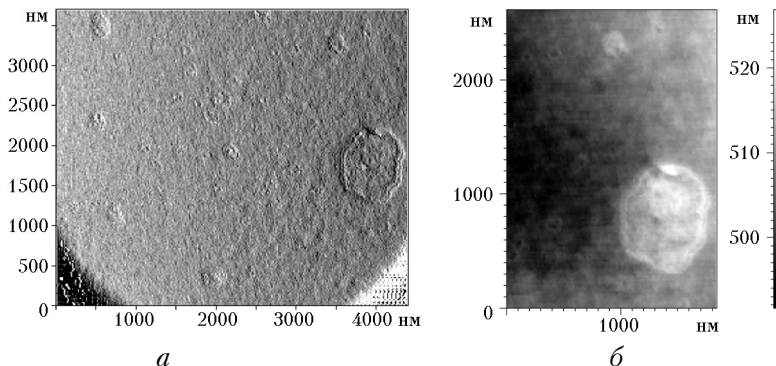


Рис. 43. Нарушения мембраны эритроцита крови у пациента с аутоиммунной гемолитической анемией. Атомно-силовая микроскопия: а — режим error mode; б — high режим

На поверхности мембраны эритроцита у пациента с аутоиммунной гемолитической анемией отмечались выпуклые образования сначала в виде «почек», затем — разрастающиеся в «заплату» (высота над по-

верхностью мембраны составляла 4–6 нм для «почки» и 9–10 нм — для «заплаты»). Структура в виде окружностей (незрелые «почки») была характерна для всей поверхности мембраны и фиксировалась внутри «заплаты». Иной характер носили изменения поверхности эритроцитов у больных хронической железодефицитной и витамин В₁₂-дефицитной анемиями (рис. 44). В отличие от аутоиммунной гемолитической анемии на поверхности большинства красных клеток крови у пациентов с хронической железодефицитной и В₁₂-дефицитной анемиями визуализировались крупные (диаметром 0,5–1 мкм) кратеры глубиной около 3 нм (внутри кратера поверхность была ниже общего уровня).

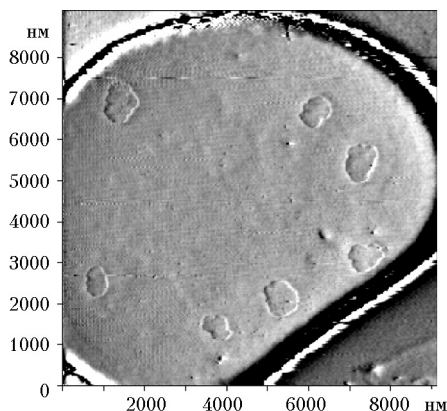


Рис. 44. Нарушения мембраны эритроцита крови у пациента с хронической анемией тяжелой степени (железодефицитная, витамин В₁₂-дефицитная, фолиеводефицитная). Атомно-силовая микроскопия (режим error mode)

Таким образом, представленные фактические данные свидетельствуют о том, что на сегодняшний день сделаны лишь первые шаги в перспективном направлении применения атомно-силовой микроскопии для изучения эритроцитов в целях медицинской диагностики.

Глава 4

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ ЭРИТРОЦИТОВ

В начале XX столетия в области биологии и медицины возник ряд исследовательских и прикладных задач, решение которых требовало получения достоверной и полной информации о структуре и свойствах биологических микрообъектов. Тот факт, что большинство биологических микрообъектов являются фазовыми, стал основной преградой на пути их исследования методами обычной световой микроскопии и поставил перед учеными задачу создания новых, более совершенных методов.

До недавнего времени единственным методом получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов являлся метод электронной микроскопии, который, как было показано выше, позволяет получать изображения с высоким разрешением, но требует специальной подготовки препарата, а используемые методики приготовления образца для исследования являются «разрушающими». Таким образом, задача получения трехмерных изображений биологических микрообъектов оптическими методами оставалась открытой.

Немецкий физик Е. Abbe (1875) разработал теорию построения изображений в микроскопе, основная идея которой состоит в том, что изображение является результатом интерференции волн, дифрагировавших на элементах микрообъекта, и волны нулевого порядка. Эта теория способствовала развитию различных оптических методов микроскопических исследований.

Широкое применение получили метод фазового контраста, за разработку которого голландский ученый F. Zernike был удостоен Нобелевской премии в области физики в 1953 г., и метод интерференционного контраста [12, 132]. В методе фазового контраста F. Zernike впервые фазовые изменения, вносимые микрообъектом в проходящую световую волну, были преобразованы в изменения интенсивности его изображения.

Попытка улучшить разрешающую способность электронного микроскопа привела D. Gabor к открытию голографии, за которое он был удостоен Нобелевской премии в области физики в 1971 г. [170]. Идея D. Gabor заключалась в записи голограммы микрообъекта при помощи электронного пучка и восстановлении голограммы в оптиче-

ском диапазоне. Однако до настоящего времени не удалось получить электронный пучок требуемой когерентности и реализовать идею D. Gabor в электронной микроскопии. Тем не менее голография привела к развитию голографических методов в световой микроскопии [108, 109], открывающих новые возможности исследования микрообъектов, недоступные классическим методам.

Появление компьютерной техники и развитие методов математической обработки изображений в сочетании с голографическими методами микроскопии позволило решить задачу трехмерной визуализации фазовых микрообъектов и измерения их морфологических параметров [129].

Впервые трехмерные изображения нативных биологических микрообъектов в реальном времени были получены с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа, созданного в лаборатории голографии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (Украина).

В данной главе приведен сравнительный анализ классических и голографических методов визуализации фазовых микрообъектов, дано описание цифрового голографического интерференционного микроскопа и представлены результаты по его применению для исследования трехмерной морфологии эритроцитов крови, при экспериментальных исследованиях.

4.1. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия

4.1.1. Голография – метод записи и восстановления волнового фронта

Прежде чем перейти к описанию голографических методов в микроскопии, необходимо рассмотреть суть самого голографического процесса.

Голография – это способ записи и восстановления волн, основанный на регистрации интерференционной картины, образованной объектной волной и когерентной с ней опорной волной. Зарегистрированная интерференционная картина называется голограммой. В зависимости от взаимного расположения опорного и объектного пучков получают различные виды голограмм, обладающие некоторыми отличительными особенностями.

Изобретатель голографии D. Gabor предложил схему, где две интерферирующие волны однонаправлены (осевые голограммы) [170].

Е.Н. Leith и J. Upatnieks в 1964 г. предложили схему, в которой две интерферирующие волны падают под различными углами на фотопластинку (внеосевые голограммы) [191]. Ю.Н. Денисюк в 1967 г. предложил формировать голограммы во встречных световых пучках [38]. Процессы записи и восстановления голограмм проанализированы в работах В.Н. Гинзбурга и соавт. [27] и Р. Кольер и соавт. [65].

Рассмотрим в качестве примера формирование голограмм прозрачных объектов (рис. 45).

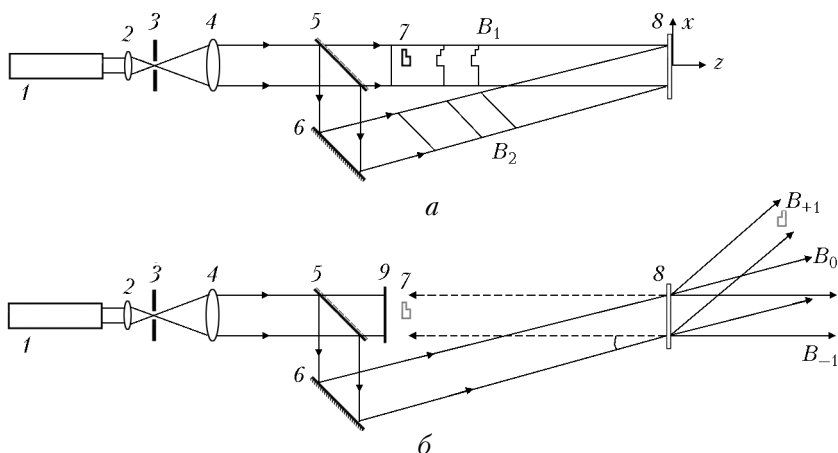


Рис. 45. Схема записи голограммы (а) и восстановления изображения (б) прозрачного объекта: 1 — лазер; 2, 4 — линзы; 3 — диафрагма; 5 — полупрозрачное зеркало; 6 — зеркало; 7 — объект; 8 — голограмма; 9 — непрозрачный экран; B_0 — прямая волна; B_1 — объемная волна; B_2 — опорная волна; B_{-1} — дифрагировавшая волна, образующая мнимое изображение; B_{+1} — дифрагировавшая волна, образующая действительное изображение

Голограмма в данной схеме образуется за счет интерференции объектной волны B_1 , прошедшей через прозрачный микрообъект 7, и опорной волны B_2 .

Пусть $A_1(x, y)$ — комплексная амплитуда объектной волны B_1 и $A_2(x, y)$ — комплексная амплитуда опорной волны B_2 в плоскости голограммы 8:

$$\begin{aligned} A_1(x, y) &= a_1(x, y) \exp [-\varphi_1(x, y)]; \\ A_2(x, y) &= a_2(x, y) \exp [-\varphi_2(x, y)], \end{aligned} \quad (1)$$

где $a_1(x, y)$ и $\varphi_1(x, y)$ — амплитуда и фаза объектной волны; $a_2(x, y)$ и $\varphi_2(x, y)$ — амплитуда и фаза опорной волны.

Комплексная амплитуда результирующей волны в плоскости голограммы 8 равна:

$$A(x, y) = A_1(x, y) + A_2(x, y)$$

и, следовательно, интенсивность

$$I(x, y) = A(x, y) A^*(x, y),$$

где $A^*(x, y)$ — величина, комплексно сопряженная $A(x, y)$.

Предположим, что волна, прошедшая через объект, падает нормально на голографическую пластинку, и объект изменяет только фазу вдоль оси x :

$$a_1(x, y) = a_1; \quad \varphi_1(x, y) = \varphi_1(x).$$

Далее предположим, что опорная волна падает под углом θ_2 на голограмму:

$$a_2(x, y) = a_2; \quad \varphi_2(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_2,$$

где λ — длина волны используемого света.

Тогда интенсивность интерферирующих волн в плоскости голограммы 8 имеет вид:

$$I(x) = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos \left[\frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_2 - \varphi_1(x) \right]. \quad (2)$$

Из формулы (2) видно, что интерференционная картина будет представлять собой чередование светлых и темных полос. Положение максимумов светлых x_{\max} и темных интерференционных полос x_{\min} зависит от фазы объектной волны $\varphi_1(x)$ следующим образом:

$$x_{\max} = \frac{[2m\pi + \varphi_1(x)]\lambda}{2\pi \sin \theta_2} -$$

светлые полосы, что соответствует максимальному значению косинуса разности фаз в формуле (2);

$$x_{\min} = \frac{[(2m+1)\pi + \varphi_1(x)]\lambda}{2\pi \sin \theta_2} -$$

темные полосы, что соответствует минимальному значению косинуса разности фаз, где $|m| = 0, 1, 2, \dots$

То есть информация о фазе объектного волнового фронта кодируется в распределении интерференционных полос, зарегистрированных на фотопластинке.

Информация об амплитуде волнового фронта кодируется в контрасте или видности v интерференционных полос:

$$v = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}},$$

где I_{\max} , I_{\min} — максимальное и минимальное значения интенсивности интерференционных полос соответственно.

Используя выражение (2), получим:

$$v = \frac{2a_1a_2}{a_1^2 + a_2^2}.$$

Амплитуда объектного пучка a_1 однозначно определена, если амплитуда опорного пучка a_2 является постоянной.

Таким образом, зарегистрированная картина интерференции объектной и опорной волн (голограмма) содержит информацию о фазе и амплитуде объектной волны.

Для того чтобы восстановить объектную волну $A_1(x, y)$, голограмма освещается таким же опорным пучком, что и при записи (см. рис. 45,б). Благодаря процессу дифракции света на интерференционной структуре голограммы происходит восстановление исходной световой волны. Такое восстановление осуществляется практически независимо от того, в каком виде зарегистрировано распределение интенсивности в интерференционной картине — в виде вариаций коэффициента поглощения либо отражения (амплитудная голограмма) или в виде вариации коэффициента преломления либо рельефа (фазовая голограмма). Голограмма может быть зарегистрирована на некоторой поверхности (двухмерная запись) или в некотором объеме (голограмма с записью в трехмерной среде).

Рассмотрим случай, когда распределение интенсивности в интерференционной картине зарегистрировано в виде вариаций коэффициента поглощения. Такая ситуация имеет место, например, при регистрации голограмм на промышленных голографических фотопластинках. В этом случае амплитуда прошедшего пучка будет зависеть от амплитудного пропускания голограммы τ_a , определяемого как отношение амплитуды прошедшего света к амплитуде падающего. Данное отношение зависит от экспозиции E , определяемой как произведение интенсивности света и времени экспозиции t . В общем случае, отношение τ_a от E нелинейно [68]. Голографическая запись обычно производится в области, где зависимость τ_a от E носит почти линейный характер.

В этом случае

$$\tau_a = \kappa I(x, y),$$

где κ — постоянная пропорциональности, а $I(x, y)$ — распределение интенсивности в интерференционной картине.

Если осветить полученную таким образом голограмму волной, которая идентична опорной волне, то комплексная амплитуда прошедшей волны равна:

$$A'(x, y) = \tau_a A_2 = \kappa I(x, y) A_2. \quad (3)$$

Тогда, подставляя в уравнение (3) выражения (1) и (2), получим:

$$\begin{aligned} A'(x) = k_1 a_2 \exp\left[-i \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_2\right] + k_2 a_1 \exp[-i \phi_1(x)] + \\ + k_2 a_1 \exp\left[i \phi_1(x) - 2i \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_2\right], \end{aligned} \quad (4)$$

где $k_1 = \kappa(a_1^2 + a_2^2)$; $k_2 = \kappa a_2^2$.

Первая величина соответствует прямой волне B_0 на рис. 45,б, вторая — дифрагировавшей волне B_{-1} , которая образует мнимое изображение, и третья — дифрагировавшей волне B_{+1} , образующей действительное изображение. Как видно из уравнения (4), фаза ϕ_1 волны B_{+1} изменена на величину $-2i \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_2$ по сравнению с фазой исходной объектной волны, и поэтому действительное изображение деформировано.

Итак, голографический метод позволяет регистрировать и восстанавливать амплитуду и фазу объектной волны; восстановленное мнимое изображение лишь с некоторой потерей интенсивности является ее точной копией.

4.1.2. Классические методы исследования фазовых микрообъектов

Эритроциты крови, как и многие другие клетки живых организмов, являются фазовыми микрообъектами. Они практически не изменяют интенсивность проходящего через них излучения, а вносят лишь фазовые изменения. Поэтому в обычном световом микроскопе эритроциты остаются невидимыми, так как ни глаз, ни любой другой фотоприемник излучения не воспринимает таких фазовых изменений. Для визуализации подобных микрообъектов необходимо фазовые изменения, которые они вносят в проходящую световую волну, преобразовать в изменения распределение интенсивности. В классической

микроскопии для решения этой задачи применяют два метода: метод фазового контраста F. Zernike и метод интерференционного контраста.

4.1.2.1. Метод фазового контраста Zernike

Функция пропускания фазового объекта имеет вид:

$$F(x, y) = \exp [i\varphi(x, y)],$$

где $\varphi(x, y)$ — фазовый сдвиг, вносимый микрообъектом в проходящую через него волну. При наблюдении фазового микрообъекта в плоскости изображения микроскопа интенсивность не модулируется его фазовым рельефом.

Согласно утверждению E. Abbe, изображение в микроскопе является результатом интерференции дифрагирующей на микрообъекте волны и волны нулевого порядка. F. Zernike, основываясь на теории E. Abbe, предложил метод визуализации фазовых микрообъектов, который получил название метода фазового контраста [12, 132]. Суть метода состоит в том, что при наблюдении фазового микрообъекта с помощью светового микроскопа в нулевой порядок дифракции помещается фазовая пластинка, которая вызывает отставание или опережение фазы волны нулевого порядка по сравнению с фазой дифрагирующей на микрообъекте волны. Действие такой фазовой пластинки, помещенной в заднюю фокальную плоскость объектива микроскопа, описывается функцией пропускания:

$$A = ae^{i\alpha}; \quad a \leq 1,$$

где a — коэффициент пропускания фазовой пластинки; α — фазовый сдвиг, внесенный этой пластинкой. В этом случае интенсивность в плоскости изображения микроскопа имеет вид [1]:

$$I(x', y') = |c|^2 \{a^2 + 2 [1 - a \cos \alpha - \cos \varphi(x, y) + \cos (\alpha - \varphi(x, y))]\}, \quad (5)$$

где c — постоянная.

Если фазовый микрообъект вносит малый фазовый сдвиг в проходящую волну ($\varphi \leq \pi/10$), то из уравнений дифракции света на микрообъективе микроскопа следует, что фаза нулевого порядка дифракционного спектра отличается на $\pi/2$ по сравнению с фазами дифракционных порядков спектра микрообъекта. Если разность фаз, вносимая пластинкой, $\alpha = \pm\pi/2$, то между волной нулевого порядка и дифрагировавшей на микрообъекте волной создается сдвиг фазы,

равный 0 или π . Интенсивность в плоскости изображения тогда принимает вид:

$$I(x', y') = |c|^2 (a^2 \pm 2a\varphi(x, y)),$$

где $|c|^2$ — интенсивность прямой волны; $\varphi(x, y)$ — фазовый сдвиг, вносимый микрообъектом в проходящую волну.

То есть изменение фазы, вносимое микрообъектом в прошедшую через него волну, превращается в изменение интенсивности, которая в плоскости изображения пропорциональна (с точностью до постоянной) изменению фазы. При отставании фазы в нулевом порядке относительно фазы дифракционных спектров (знак «+» в формуле (5)) изображения объекта кажутся ярче фона. Это так называемый *светлый фазовый контраст*. Если же фаза в нулевом порядке опережает фазу дифракционных спектров (знак «-» в формуле (5)), изображение микрообъекта темнее общего фона (*темный фазовый контраст*).

Если объект вносит фазовый сдвиг более значительный, чем $\pi/10$, то выражение для интенсивности изображения имеет вид:

$$I(x', y') = |c|^2 \{a^2 + 2 [1 - \cos \varphi(x, y) + a \sin \varphi(x, y)]\}. \quad (6)$$

В этом случае фаза волны нулевого порядка и фаза дифракционных спектров уже не отличаются на $\pi/2$, и зависимость интенсивности от фазы становится нелинейной. Контраст изображения определяется отношением второго элемента в квадратных скобках формулы (6) к первому и равен $2\varphi(x, y)/a$. Отсюда следует, что контраст тем выше, чем больше поглощение пластинки. Таким образом, удовлетворительный контраст достигается за счет поглощения прямого света, следствием чего является падение общей интенсивности изображения.

Если проанализировать метод фазового контраста Zernike, то можно выделить его следующие особенности:

1. Вследствие того что интенсивность нулевого порядка значительно выше интенсивностей высших порядков дифракции, сложение и вычитание волн не приводит к высокому контрасту изображений. Для увеличения контраста используют пластинки с поглощением $a < 1$, что приводит к падению общей интенсивности изображения.

2. При большой оптической толщине микрообъектов, когда $\varphi(x, y) \geq \pi/10$, фазовый сдвиг $\pi/2$ в нулевом порядке не является оптимальным, исчезает линейная зависимость интенсивности изображения от вносимого микрообъектом фазового сдвига.

3. Метод фазового контраста основан на возможности воздействовать отдельно на прямой свет, не изменяя света, дифрагировавшего

на исследуемом микрообъекте. Это возможно, если исследуемый микрообъект достаточно мал. В противном случае дифрагировавший свет будет смешан с прямым.

Из изложенного выше следует, что метод является тем более эффективным, чем меньше исследуемый микрообъект (имеются в виду как геометрические размеры, так и оптическая толщина).

Фазово-контрастная микроскопия является в основном качественным методом, но с успехом может применяться для исследования поверхностной архитектуры эритроцитов и ее количественной оценки. Метод фазово-контрастной микроскопии отличается малой трудоемкостью, не требует дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала, что немаловажно, например, для клинической практики. При исследовании эритроцитов этим методом выявляются такие формы красных клеток крови, как двояковогнутые дискоциты, плоские диски, эритроциты с гребнем, стоматоциты, эхиноциты, сфероциты и дегенеративные формы. Следует отметить, что полученные результаты практически не отличаются от данных сканирующей электронной микроскопии.

4.1.2.2. Метод интерференционного контраста

Использование метода интерференционного контраста возможно в двух основных вариантах: интерферометрии в бесконечно широкой полосе и интерферометрии в полосах конечной ширины.

Интерферометрия в бесконечно широкой полосе решает ту же задачу, что и фазово-контрастная микроскопия. Однако здесь фазовый микрообъект становится видимым за счет интерференции двух волн равной интенсивности, одна из которых прошла через исследуемый микрообъект.

В двухлучевом интерференционном микроскопе оба сравниваемых пучка формируются одновременно, но распространяются по разным путям, сводятся вместе и интерферируют. Результирующая интенсивность изображения $I_{из}$ при интерференции двух когерентных волн равной интенсивности, прошедших через два одинаковых канала микроскопа и отличающихся лишь тем, что в одном из волновых фронтов перед объективом микроскопа находится фазовый микрообъект, определяется основным уравнением интерференции

$$I_{из}(x', y') = 2I_0 \{1 + \cos [\Phi_2 - \Phi_1 + \varphi(x, y)]\}, \quad (7)$$

интенсивность фона при этом определяется выражением

$$I_{\phi}(x', y') = 2I_0 [1 + \cos (\Phi_2 - \Phi_1)], \quad (8)$$

где I_0 — интенсивность каждой из взаимодействующих волн; Φ_1 и Φ_2 — фазы двух волн; $\varphi(x, y)$ — фазовый сдвиг, внесенный объектом в проходящую волну.

Из выражений (7) и (8) следует, что интенсивность в области изображения микрообъекта отличается от интенсивности фона и зависит от фазового сдвига, вносимого микрообъектом. Оценим теперь влияние различных по величине фазовых сдвигов на интенсивность изображения и фона.

Предположим, что интерферометр настроен так, что $\Phi_2 - \Phi_1 = 0$, т.е. волны складываются в фазе (сложение волн). Тогда

$$I_{\text{из}+}(x', y') = 2I_0 [1 + \cos \varphi(x, y)],$$

$$I_{\text{ф}+}(x', y') = 4I_0.$$

Отсюда видно, что с ростом $\varphi(x, y)$ интенсивность изображения микрообъекта начинает падать по сравнению с интенсивностью фона, и в точках, где $\varphi(x, y) = \pi$, интенсивность изображения становится равной нулю. Таким образом, при сложении волн получаем темное изображение на светлом фоне — аналог темного фазового контраста в методе Zernike.

Если интерферометр настроен так, что $\Phi_2 - \Phi_1 = \pi$, т.е. взаимодействующие волны находятся в противофазе (вычитание волн), то

$$I_{\text{из}-}(x', y') = 2I_0 [1 - \cos \varphi(x, y)],$$

$$I_{\text{ф}-}(x', y') = 0.$$

Получаем светлые изображения на темном фоне — аналог светлого фазового контраста в методе Zernike.

Если $\Phi_2 - \Phi_1 = \pm\pi/2$, то получим аналог метода Zernike:

$$I_{\text{из}}(x', y') = 2I_0 [1 + \sin \varphi(x, y)],$$

$$I_{\text{ф}}(x', y') = 2I_0.$$

При малых $\varphi(x, y)$ зависимость интенсивности изображения объекта от вносимого им фазового сдвига линейна.

Отличие метода интерферометрии в бесконечно широкой полосе от метода фазового контраста Zernike состоит в следующем:

1. В методе интерференционного контраста взаимодействуют волны одинаковой амплитуды, что позволяет получить максимальный контраст изображений фазовых микрообъектов.

2. По своему принципу метод не различает большие и малые объекты, т.е. могут наблюдаться как микрообъекты, так и значительные фазовые объекты.

3. Метод позволяет производить количественные измерения фазовых сдвигов.

В методе интерферометрии в полосах конечной ширины взаимодействуют волны, между которыми задается некоторый угол θ . При этом вместо однородного получается линейчатое поле с равномерным чередованием максимумов и минимумов интенсивности. Распределение интенсивности в изображении микрообъекта и фона имеет вид:

$$I_{\text{из}}(x', y') = 2I_0 \{1 + \cos [\Phi_2 - \Phi_1 + \varphi(x, y) - 2\pi x/T]\},$$

$$I_{\text{ф}}(x', y') = 2I_0 [1 + \cos (\Phi_2 - \Phi_1) - 2\pi x/T],$$

где T — период фоновых интерференционных полос, $T = \frac{\lambda}{2\sin(\theta/2)}$;

λ — длина волны используемого излучения; Φ_2, Φ_1 — фазы взаимодействующих волн. Ось y направлена вдоль опорных полос конечной ширины.

Уравнение темных полос имеет вид:

$$\Phi_2 - \Phi_1 + \varphi(x, y) - 2\pi x/T = (2m + 1)\pi, \quad (9)$$

а уравнение светлых полос:

$$\Phi_2 - \Phi_1 + \varphi(x, y) - 2\pi x/T = 2m\pi, \quad (10)$$

где $|m| = 0, 1, 2, \dots$

Как видно, фазовый сдвиг, внесенный микрообъектом в проходящую через него волну, приводит к изменению первоначальной интерференционной картины, проявляющемуся в изломе опорных интерференционных полос. Эти изломы образуют своеобразный фазовый силуэт микрообъекта. По величине отклонения полос от первоначального положения можно воссоздать фазовый профиль микрообъекта. Таким образом, интерференционный метод в полосах конечной ширины позволяет не только визуализировать фазовый объект, но и проводить количественные измерения фазовых сдвигов, вносимых микрообъектом в проходящую волну.

Однако реализация методов интерферометрии в классической микроскопии наталкивается на ряд трудностей. В первую очередь, это сложность создания идентичных волновых фронтов и, как следствие, исключительно высокие требования к качеству оптики, сложность настройки системы и ее дороговизна. Существует несколько видов классических интерференционных микроскопов [64]. Они различаются в основном способом разделения и сведения световых пучков. При этом реализация каждого метода требует отдельного устройства.

4.2. Голографические методы визуализации фазовых микрообъектов

4.2.1. Голографическая микроскопия

Прежде чем перейти к описанию голографических методов визуализации фазовых объектов, необходимо сказать несколько слов о голографической микроскопии, поскольку осуществление этих методов тесно связано с техникой голографической микроскопии.

Собственно голография, как уже отмечалось выше, была предложена D. Gabor [170] как метод усовершенствования электронного микроскопа. Основное увеличение в системе D. Gabor достигается без применения оптики и определяется соотношением $\lambda_{\text{опт}}/\lambda_{\text{эл}}$, где $\lambda_{\text{опт}}$ — длина волны при восстановлении голограммы в оптическом диапазоне; $\lambda_{\text{эл}}$ — длина волны де Бройля электрона при регистрации голограммы. Предложенную схему D. Gabor обосновал теоретически и продемонстрировал голографический процесс записи и восстановления изображения в оптическом диапазоне. Однако в силу отсутствия когерентных источников излучения этот метод не нашел применения в электронной микроскопии.

Предложенная E.N. Leith и J. Upatnieks двухлучевая схема регистрации голограмм открыла новые возможности как для голографии, так и для микроскопии [191].

Первый голографический микроскоп, использующий объектив, описан R.F. van Ligten и H. Ostenberg в 1966 г. (рис. 46). С помощью этого микроскопа были получены голограммы окрашенной нейронной сети с разрешением около 1 мкм.

Основной характеристикой микроскопа является его разрешающая способность. Разрешающая способность классического микроскопа определяется двумя величинами: длиной волны используемого излучения λ и величиной числовой апертуры микрообъектива $A = n \sin u$. Минимально разрешимый элемент объекта при использовании некогерентного света определяется по формуле [73]

$$d \geq \frac{0,61\lambda}{n \sin u},$$

где u — апертурный угол; n — показатель преломления среды, находящейся между микрообъектом и объективом микроскопа.

В настоящее время в оптической технике с помощью иммерсионных жидкостей значение числовой апертуры доведено до 1,35, а минимальное разрешимое расстояние между двумя деталями исследуемого

микрообъекта лишь немного меньше, чем половина длины волны используемого излучения.

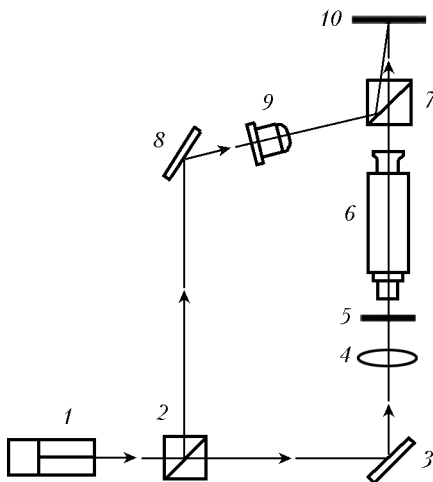


Рис. 46. Схема голографического микроскопа: 1 — лазер; 2 — делитель пучка; 3, 8 — зеркала; 4, 9 — коллиматоры; 5 — исследуемый микрообъект; 6 — микроскоп; 7 — соединитель пучков; 10 — голограмма

В голографическом микроскопе микрообъект освещается когерентным излучением лазера. В этом случае разрешающая способность микроскопа определяется формулой

$$d \geq \frac{\lambda}{n \sin u}.$$

То есть при использовании когерентного источника излучения в микроскопе наименьшее разрешимое расстояние между двумя деталями исследуемого микрообъекта составляет величину порядка длины волны. Снижение разрешающей способности голографических микроскопов является принципиальным недостатком рассматриваемого метода.

Следующим шагом в развитии голографической микроскопии было увеличение поля зрения и глубины регистрируемой сцены. G.W. Ellis [162] предложил помещать голограмму между объективом и окуляром микроскопа (рис. 47). Восстановленное изображение изучается через окуляр микроскопа, который можно перестраивать по глубине и перемещать по полю зрения зарегистрированной сцены. При этом сохраняется общее увеличение микроскопа, которое определяется объективом и окуляром совместно.

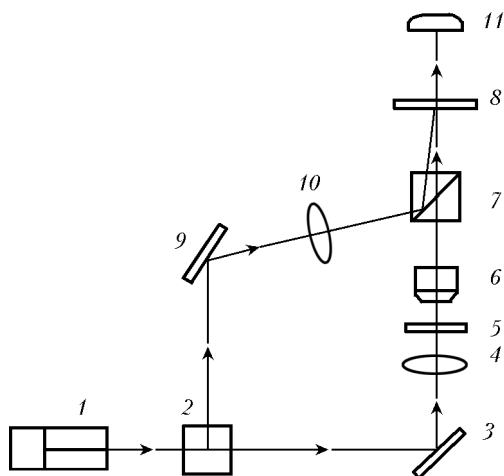


Рис. 47. Схема голографического микроскопа, предложенная G.W. Ellis: 1 — лазер; 2 — делитель пучков; 3, 9 — зеркала; 4, 10 — коллиматоры; 5 — исследуемый микрообъект; 6 — микрообъектив; 7 — соединитель пучков; 8 — голограмма; 11 — окуляр

Преимуществом голографического микроскопа является возможность апостериорного изучения восстановленного изображения, к которому можно применять все известные методы оптической и цифровой обработки, что особенно важно при исследовании короткоживущих перемещающихся микрообъектов. При применении импульсных лазеров, позволяющих получать короткие импульсные пучки излучения, возможно не только снять весьма жесткие требования по механической стабильности голографируемого объекта, но и проводить съемку быстропротекающих процессов.

С появлением и развитием голографической микроскопии для наблюдения изображений фазовых микрообъектов, восстанавливаемых по голограммам, стал применяться метод фазового контраста Zernike [162]. Было получено изображение фазового микрообъекта в светлом и темном поле. Однако при этом просто переносился принцип метода Zernike в голографическую микроскопию, т.е. контрастные изображения фазовых микрообъектов формировались путем помещения фазовой пластинки в нулевой порядок дифракционного спектра микрообъекта, зарегистрированного и восстановленного по голограмме. Вышеописанный метод фазового контраста в голографической микроскопии имеет два очень существенных недостатка. Это когерентный шум и спекл-структура голографических изображений, которые становятся тем более существенными помехами, чем меньше исследуемый

микрообъект. Поэтому применение метода Zernike, не позволяющего получить высокий контраст изображений фазовых микрообъектов, в голографической микроскопии является неэффективным.

Новые возможности открыло применение метода голографической интерферометрии, предложенного практически одновременно в ряде работ [27, 96]. Метод голографии позволяет легко преодолеть описанные выше сложности классической интерферометрии. Восстановленное по голограмме изображение является точной копией исходной объектной волны, и поэтому проблема получения двух идентичных волновых фронтов полностью снимается.

В отличие от классической в голографической интерферометрии осуществляется взаимодействие волн, проходящих по одному и тому же пути, но в разные моменты времени. Голографическая интерферометрия применяется в двух вариантах: в реальном времени и методе двух экспозиций. В интерферометрии в реальном времени на голограмме с помощью опорного пучка регистрируется одна объектная волна. Интерференционная картина, несущая информацию о микрообъекте, получается в результате взаимодействия двух объектных волн — реальной и восстановленной по голограмме. В методе двух экспозиций на голограмме регистрируются две объектные волны, характеризующие состояние объекта в различные моменты времени. Такой метод позволяет зафиксировать и сравнивать два состояния объекта.

Оба метода нашли применение в науке и технике для решения различных задач, в основном относящихся к изучению микродеформаций объектов и различных процессов [27, 96]. Однако задача визуализации фазовых микрообъектов в голографической микроскопии оставалась нерешенной.

4.2.2. Голографический метод фазового контраста (метод сложения и вычитания световых волн в интерференционной полосе)

Как было показано выше, метод интерферометрии в бесконечно широкой полосе является более эффективным для наблюдения фазовых микрообъектов. И если в классической микроскопии преимущества метода нейтрализуются сложностью получения двух идентичных волновых фронтов и настройки интерферометра, то применение голографии позволяет снять данную проблему. Это объясняется тем, что волна, зарегистрированная и восстановленная по голограмме, является точной копией исходной волны. Тем не менее метод голографической интерферометрии в бесконечно ши-

рокой полосе не применялся для получения изображений фазовых микрообъектов. Сложность заключалась в обеспечении сложения и вычитания волн. Возможность голографического вычитания волн для получения разностных изображений была предсказана еще в ранних работах D. Gabor.

Фаза волны, зарегистрированной и восстановленной по амплитудной голограмме (негатив исходной интерференционной картины), сдвинута на π относительно фазы исходной волны. Поэтому объектная волна и ее противофазная копия, восстановленная по голограмме, при одновременном их наблюдении должны гасить друг друга. И если в одной из волн находился фазовый микрообъект, то должно наблюдаться его яркое изображение на темном фоне. Такое вычитание волн реализуется при интерферометрии в реальном времени. С другой стороны, при регистрации на голограмме двух объектных волн, одна из которых прошла через исследуемый фазовый микрообъект, должно происходить сложение волн в силу того, что фазы обеих волн будут сдвинуты на π относительно фазы исходной волны. Сложение волн можно осуществить голографическим методом двух экспозиций. Однако вследствие фазовых сдвигов, возникающих при обработке голографических фотоэмульсий, и высокой чувствительности метода к вибрациям не удавалось получить сложения и вычитания волн, и проблема получения синфазных и противофазных волн оставалась открытой и обуславливала проблему осуществления фазового контраста в голографической микроскопии.

Впервые проблема осуществления фазового контраста в голографической микроскопии была решена в работе Г.С. Сафронова и Т.В. Тишко [109, 110]. Предложенный метод получил название метода голографического фазового контраста. Для получения контрастных изображений фазовых микрообъектов был предложен метод сложения и вычитания волн в интерференционной полосе, суть которого состоит в том, что между интерферирующими невозмущенной и возмущенной микрообъектом волнами, одна из которых зарегистрирована и восстановлена по голограмме, вводится малый угловой сдвиг — такой, чтобы в возникшей системе интерференционных полос их период значительно превосходил размер изображений микрообъектов. При этом в пределах темной интерференционной полосы автоматически соблюдаются условия противофазности волн (вычитание волн), а в пределах светлой интерференционной полосы — условие синфазности волн (сложение волн). Выявляются, соответственно, светлые изображения фазовых микрообъектов на темном фоне и темные изображения на светлом фоне.

При рассмотрении интерференции двух волн равной интенсивности было показано, что интенсивность в изображении фазового микрообъекта $I(x', y')$ в зависимости от вносимого им фазового сдвига и интенсивность фона I_ϕ при сложении волн в светлой интерференционной полосе определяется выражением

$$\begin{aligned} I_{\text{из}+}(x', y') &= 2I_0 [1 + \cos \varphi(x, y)]; \\ I_{\phi+}(x', y') &= 4I_0, \end{aligned} \quad (11)$$

при вычитании волн в темной интерференционной полосе выражением

$$\begin{aligned} I_{\text{из}-}(x', y') &= 2I_0 [1 - \cos \varphi(x, y)]; \\ I_{\phi-}(x', y') &= 0, \end{aligned} \quad (12)$$

где $\varphi(x, y)$ — фазовый сдвиг, вносимый микрообъектом в проходящую через него волну; I_0 — интенсивность каждой из взаимодействующих волн.

Из выражений (11), (12) видно, что зависимости распределения интенсивности изображения от фазового сдвига, вносимого микрообъектом в проходящую через него волну, при сложении и вычитании волн находятся в противофазе. Минимум интенсивности в изображении фазового микрообъекта при сложении волн соответствует максимуму интенсивности в изображении при вычитании и наоборот. Однозначное соответствие $I(\varphi)$ существует при значениях φ от 0 до π . Кроме того, четность зависимости $I(\varphi)$ приводит к тому, что фазовые сдвиги $\pm\varphi$ дают одно и то же значение интенсивности в изображении микрообъекта.

В данном методе взаимодействуют волны одинаковой интенсивности, что позволяет получить максимальный контраст в изображении фазового микрообъекта. При одном и том же фазовом сдвиге $\varphi(x, y)$ получаем одинаковую разность интенсивностей изображения и фона и при сложении, и при вычитании волн, следовательно, в случае сложения получаем обращенный контраст изображения по сравнению с вычитанием.

Для получения контрастных изображений фазовых микрообъектов необходимо, чтобы одна из волн (либо несущая информацию о микрообъекте, либо не возмущенная микрообъектом) регистрировалась на голограмме. Оба эти варианта находят применение в зависимости от типа решаемой научной задачи.

Вариант получения контрастных изображений фазовых микрообъектов, зарегистрированных и восстановленных по голограмме, применим для изучения живых перемещающихся микрообъектов либо

в тех случаях, когда микрообъекты возможно изучать лишь в течение короткого промежутка времени. В этом варианте исследуемый препарат помещается перед объективом микроскопа, и при помощи опорного пучка регистрируется его голограмма в течение короткого времени экспозиции или даже в импульсном режиме излучения лазера. Обработанная голографическая пластинка (голограмма) помещается в исходное положение. В результате получается картина взаимодействия объектных волн, одна из которых прошла через объектив, а другая восстановлена по голограмме. Изменением угла между взаимодействующими волнами путем поперечного сдвига голограммы относительно ее исходного положения можно достичь того, чтобы период интерференционных полос значительно превосходил размер микрообъектов. При этом наблюдаются темные изображения микрообъектов в пределах светлой интерференционной полосы и светлые изображения в пределах темной полосы. В данном варианте для каждого изучаемого препарата с микрообъектами регистрируется отдельная голограмма.

В варианте же получения контрастных изображений фазовых микрообъектов в реальном масштабе времени регистрируется голограмма волны, проходящей через микроскоп в отсутствие препарата с микрообъектами. Голограмма восстанавливается при помощи опорного пучка. В объектный пучок перед объективом микроскопа помещается исследуемый препарат. Интерференционная картина образуется взаимодействием восстановленной по голограмме «чистой» объектной и реальной объектной волны, проходящей через исследуемый микрообъект. Очевидно, что при изучении микрообъектов в реальном масштабе времени можно наблюдать за динамикой их изменений. В этом методе голограмма, записанная для данного микрообъектива, может быть использована для изучения серии идентичных препаратов. Для каждого микрообъектива должна быть изготовлена своя голограмма.

Детали технической реализации метода голографического сложения и вычитания волн будут описаны далее в разд. 4.3, посвященном устройству цифрового голографического интерференционного микроскопа.

Сравним классический и голографический методы фазового контраста для получения изображений эритроцитов крови (рис. 48). При получении изображений путем сложения и вычитания волн в качестве источника излучения в голографическом интерференционном микроскопе использовался He–Ne лазер с длиной волны излучения, равной 0,63 мкм. Изображения, приведенные на рис. 48, получены при

использовании разных препаратов крови. Они иллюстрируют эффективность применения метода голографического сложения и вычитания в интерференционной полосе для получения контрастных изображений фазовых микрообъектов. Контраст изображений, полученных при сложении и вычитании волн, максимален. Однако когерентный шум, обусловленный дифракцией излучения лазера на пылинках и неоднородностях подложки и оптических деталей, ухудшает качество изображений.

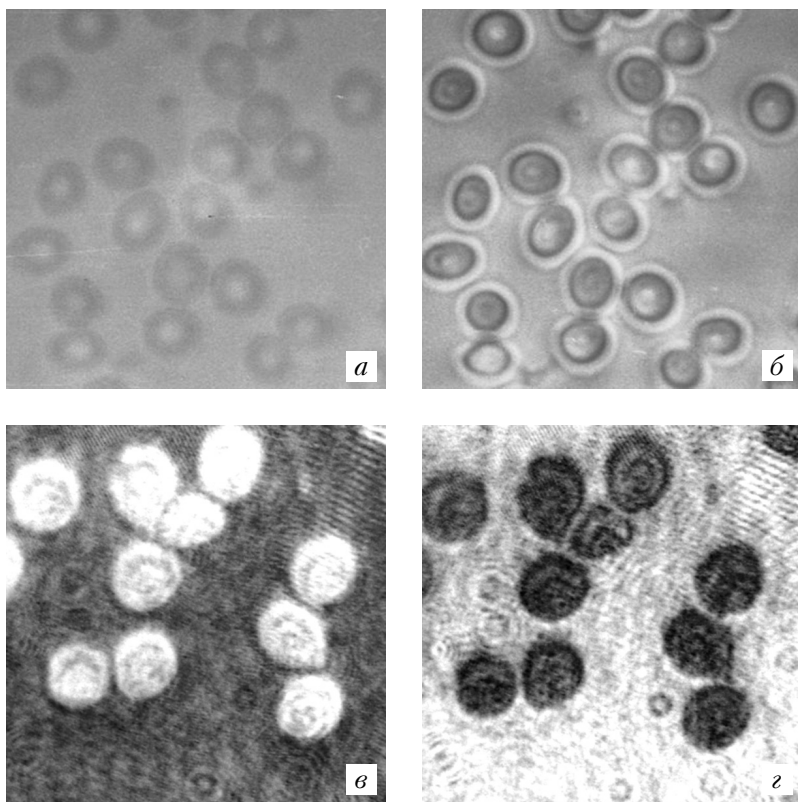


Рис. 48. Изображения эритроцитов крови человека, полученные классическим и голографическим методами ($\times 400$): *а* — с помощью микроскопа «Люмам» (Россия) в белом свете; *б* — методом F. Zernike с использованием фазово-контрастной насадки в микроскопе «Люмам» (Россия); *в* — методом голографического вычитания; *г* — методом голографического сложения при использовании голографического интерференционного микроскопа

Изменение интенсивности на интерферограмме при сложении и вычитании волн модулируется набегом фазы волны при прохождении через фазовый микрообъект. Согласно выражениям (11) и (12) фазовый набег равен:

$$\varphi(x, y) = \arccos \left[\pm \left(1 - \frac{I_{из\mp}(x', y')}{2I_0} \right) \right],$$

где $I_{из}(x', y')$ — интенсивность изображения микрообъекта на его интерферограмме, I_0 — интенсивность каждой из интерферирующих волн, «+» соответствует случаю вычитания волн, «-» — случаю сложения волн. Согласно формуле (11) $I_0 = I_{\phi+}/4$, где $I_{\phi+}$ — интенсивность фона при сложении волн. Тогда

$$\varphi(x, y) = \arccos \left[\pm \left(1 - \frac{2I_{из\mp}(x', y')}{I_{\phi+}} \right) \right].$$

Таким образом, измеряя интенсивность изображения фазового микрообъекта и интенсивность фона при сложении волн, можно построить фазовый рельеф изучаемого микрообъекта.

Изменение интенсивности на интерферограмме фазового микрообъекта обусловлено набегом фазы волны через всю толщину микрообъекта:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{z_1}^{z_2} \Delta n(x, y, z) dz,$$

где $\Delta n(x, y, z)$ — разность показателей преломления микрообъекта и окружающей среды; z — направление распространения просвечивающей волны.

Если микрообъект имеет однородное распределение показателя преломления, т.е. $\Delta n(x, y, z) = \text{const}$, то

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} t(x, y) \Delta n, \quad (13)$$

где $t(x, y) = z_2 - z_1$ — толщина микрообъекта в точке (x, y) . Отсюда

$$t(x, y) = \varphi(x, y) \frac{\lambda}{2\pi \Delta n}.$$

С учетом выражения (13) получим, что при голографическом сложении и вычитании волн толщина фазового микрообъекта в точке (x, y) определяется по формуле

$$t(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi \Delta n} \arccos \left[\pm \left(1 - \frac{2I_{из\mp}(x', y')}{I_{\phi+}} \right) \right], \quad (14)$$

где λ — длина волны используемого излучения; Δn — разность показателей преломления микрообъекта и окружающей его среды; $I_{\text{из}}(x', y')$ — интенсивность в соответствующей точке изображения; $I_{\text{ф+}}$ — интенсивность фона при сложении волн.

Таким образом, при изучении фазовых микрообъектов с однородным распределением показателя преломления метод голографического сложения и вычитания волновых фронтов позволяет определить физическую толщину фазового микрообъекта в каждой точке и восстановить его трехмерное изображение. Именно такими микрообъектами и являются эритроциты крови. При использовании сухих нативных мазков крови в формулу (14) входит разность показателей преломления эритроцитов и воздуха. Показатель преломления эритроцитов определяется с помощью рефрактометра Е. Abbe, а показатель преломления воздуха равен 1.

Применение метода компьютерной обработки интерферограмм позволило практически решить эту задачу (рис. 49). Для компьютерного восстановления трехмерного изображения фазового микрообъекта по его интерферограмме используется следующий алгоритм. Изображение преобразуется в массив значений интенсивности в каждой его точке.

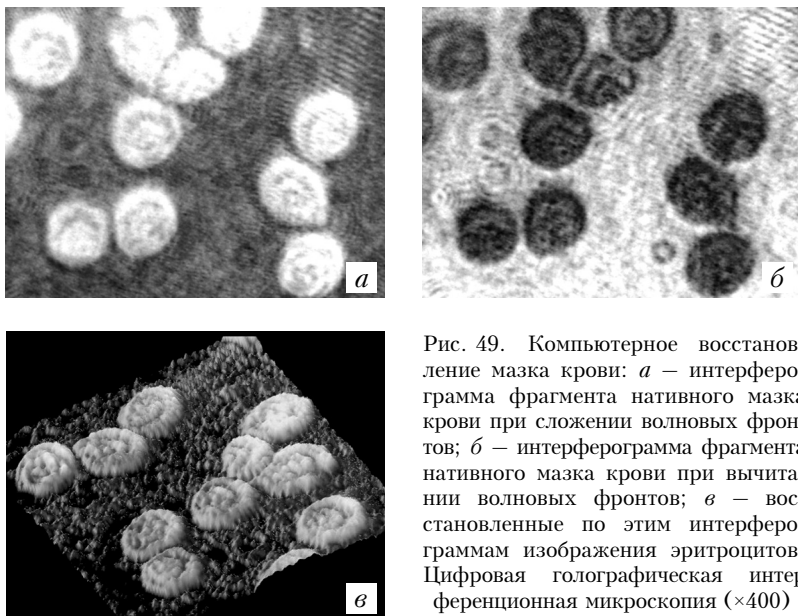


Рис. 49. Компьютерное восстановление мазка крови: *a* — интерферограмма фрагмента нативного мазка крови при сложении волновых фронтов; *b* — интерферограмма фрагмента нативного мазка крови при вычитании волновых фронтов; *c* — восстановленные по этим интерферограммам изображения эритроцитов. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

Затем находится среднее значение интенсивности фона при сложении волн (средняя интенсивность в выбранном фрагменте изображения, не содержащем микрообъекты). Далее рассчитывается значение толщины по формуле (14) для каждой точки изображения и формируется массив значений толщин микрообъекта в каждой точке. Алгоритм построения трехмерного изображения интерпретирует массив значений толщин микрообъекта как массив значений пространственных координат точек его поверхности.

4.2.3. Метод голографической интерферометрии в полосах конечной ширины

В голографическом методе сложения и вычитания волновых фронтов (интерферометрия в полосах бесконечной ширины) фазовый сдвиг, приобретаемый волной при прохождении через микрообъект, модулирует интенсивность изображения микрообъекта, и он становится видимым. В методе интерферометрии в полосах конечной ширины система опорных интерференционных полос модулируется фазовым рельефом микрообъекта, что проявляется в искривлении этих полос. Как следует из выражений (9) и (10), отклонение интерференционной полосы $h(x', y')$ от ее первоначального направления в данной точке интерферограммы пропорционально фазовому набегу в соответствующей точке объекта $\varphi(x, y)$, т.е. $h(x', y') = T\varphi(x, y)/2\pi$, где T — период системы интерференционных полос.

Основное отличие голографического метода интерферометрии в полосах конечной ширины от классического состоит в следующем. В классическом интерферометре система опорных интерференционных полос создается в результате интерференции двух световых волн, проходящих одновременно по двум разным путям и сведенным вместе. В голографическом интерферометре взаимодействуют волны, прошедшие по одному и тому же пути, но в различные моменты времени. Одна из этих волн регистрируется и восстанавливается по голограмме. Поэтому в отличие от двухплечевого классического интерферометра голографический является одноплечевым. Так как зарегистрированная и восстановленная по голограмме волна является точной копией исходной объектной волны, то в голографическом интерферометре полностью снимается проблема получения двух идентичных волновых фронтов.

Говоря об интерференционной микроскопии, как обычной, так и голографической, следует подчеркнуть ее уникальное свойство. Как известно, чем меньше исследуемый микрообъект, тем с большей числовой апертурой используется объектив микроскопа. Короткофокусные

объективы обладают малой глубиной резкости, которая убывает обратно пропорционально квадрату числовой апертуры. Поэтому при наблюдении в микроскоп можно видеть лишь некоторую область Δz вглубь микрообъекта (z — ось наблюдения). Но сдвиги полос на интерферограмме обусловлены набегом фазы просвечивающей волны через всю толщину микрообъекта:

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{z_1}^{z_2} \Delta n dz, \quad (15)$$

где Δn — разность показателей преломления микрообъекта и окружающей среды; z — направление распространения просвечивающей световой волны.

Следовательно, на какое бы сечение ни был сфокусирован объектив, сдвиги полос определяются интегралом от показателя преломления объектива по всей длине наблюдения. Таким образом, интерферограмма дает возможность увидеть весь «фазовый профиль» микрообъекта.

Чтобы получить интерферограммы в полосах конечной ширины, количество интерференционных полос на изображении микрообъекта должно быть достаточным для определения его формы. Для получения системы опорных интерференционных полос необходимо настраивать голографический интерферометр определенным образом. В.Н. Гинзбург и Б.М. Степанов (1978) для оценки интерферограмм эритроцитов крови предложили способ получения системы опорных полос необходимого периода путем введения в объектный пучок оптического клина, расположенного перед объективом микроскопа [27]. Период возникающей системы интерференционных полос определяется углом между волновыми фронтами, возникшим за счет введения клина. При этом минимальный получаемый период интерференционных полос составлял 2 мкм, что является недостаточным для получения интерферограмм эритроцитов, размер которых составляет около 8 мкм. При исследовании микрообъектов, размер которых составляет несколько микрометров, очень существенными помехами становятся спекл-структура и когерентный шум, которые смазывают интерференционную картину. Только при использовании метода усреднения шумов во времени удалось получить систему опорных интерференционных полос с периодом 1 мкм, что являлось достаточным условием для получения интерферограмм эритроцитов. Полученные интерферограммы позволили сделать определенные заключения о форме эритроцитов крови.

Г. Сафроновым и Т. Тишко предложен способ получения системы опорных интерференционных полос за счет наклона волновых фронтов путем поперечного сдвига голограммы, расположенной за объективом микроскопа [108]. В данном методе система опорных интерференционных полос возникает в области перекрытия волн за микрообъективом, и поэтому разрешение микрообъектива не ограничивает их минимальный период. Это позволяет независимо управлять как периодом, так и направлением полос интерференционной картины. Применение описываемого метода позволило получить интерферограммы микрообъектов размером около 2 мкм.

В методе голографической интерферометрии в полосах конечной ширины фазовый набег при прохождении просвечивающей волны через микрообъект проявляется в отклонении опорных интерференционных полос от их первоначального положения. Из уравнений (9) и (10) следует, что фазовый набег равен:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi h(x', y')}{T},$$

где $h(x', y')$ — отклонение интерференционной полосы от ее первоначального положения в данной точке; T — период системы опорных интерференционных полос. Для микрообъектов с однородным распределением показателя преломления из выражения (15) следует, что толщина микрообъекта $t(x, y)$ в данной точке равна:

$$t(x, y) = \varphi(x, y) \frac{\lambda}{2\pi\Delta n}.$$

Тогда при использовании метода голографической интерферометрии в полосах конечной ширины толщина микрообъекта в данной точке составляет

$$t(x, y) = \frac{\lambda h(x', y')}{T\Delta n}, \quad (16)$$

где λ — длина волны используемого излучения; $h(x', y')$ — отклонение интерференционной полосы от ее первоначального положения в данной точке; T — период системы опорных интерференционных полос; Δn — разность показателей преломления микрообъекта и окружающей среды.

Таким образом, измеряя период системы интерференционных полос и отклонение интерференционной полосы от первоначального положения, можно определить толщину фазового микрообъекта в каждой его точке и построить его трехмерное изображение.

Алгоритм математической обработки интерферограмм, полученных методом голографической интерферометрии в полосах конечной ширины, состоит в интерпретации величины отклонения интерференционной полосы как значения высоты микрообъекта в соответствии с формулой (16). Задача подобного рода не имеет точного математического решения, однако допускается использование приближенного алгоритма при условии, что вносимая им погрешность не превышает погрешности, вносимой в изображение принципиальными недостатками голографического метода (когерентный шум, спекл-структура). Более того, задача снижения влияния подобных помех на качество изображений также может быть решена при компьютерной обработке интерферограмм.

Экспериментальные исследования подтвердили эффективность применения метода голографической интерферометрии в полосах конечной ширины для получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов (рис. 50, 51). Впервые трехмерные изображения фазовых микрообъектов были получены при исследовании эритроцитов крови у пациентов с гемолитической анемией [128].

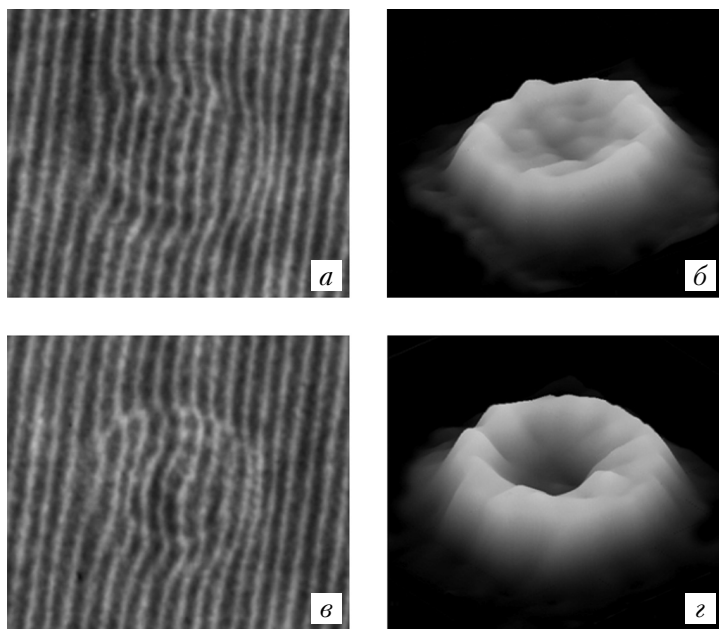


Рис. 50. Голографическая интерферометрия в полосах конечной ширины ($\times 400$): а, в — интерферограммы отдельных эритроцитов; б, г — восстановленные по ним изображения

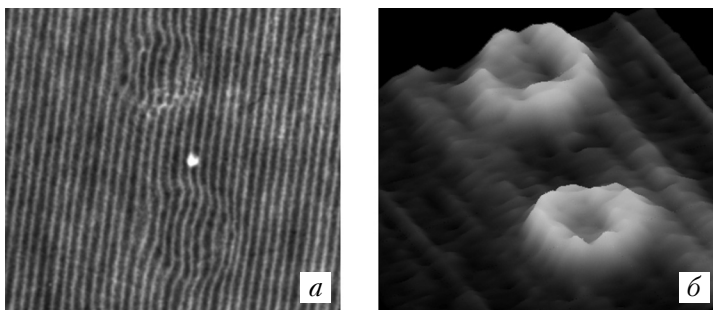


Рис. 51. Голографическая интерферометрия в полосах конечной ширины ($\times 400$): *a* — фрагмент интерферограммы нативного мазка крови; *б* — восстановленное трехмерное изображение

Следует отметить, что в нативных мазках крови помимо эритроцитов присутствует плазма крови, в которой они находились *in vivo*. При испарении воды из плазмы содержащиеся в ней вещества (преимущественно белки) образуют пространственные структуры, которые также являются фазовыми микрообъектами и доступны для визуализации. Так, элементы плазмы вытянуты в некие нити, что, очевидно, связано со способом подготовки препарата, а именно — с растягиванием капли крови вдоль предметного стекла (рис. 51).

4.2.4. Сравнение возможностей голографических методов для решения задачи получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов

Проведенные теоретические и экспериментальные исследования показали, что метод голографического сложения и вычитания волн и метод интерферометрии в полосах конечной ширины в сочетании с методами математической обработки интерферограмм могут быть использованы для получения трехмерных изображений фазовых микрообъектов, в том числе биологических. Неоспоримым преимуществом такого сочетания оптических и цифровых методов является возможность получения всей возможной информации о форме микрообъекта. Это позволяет не только изучать трехмерные изображения в любом ракурсе, но и измерять линейные размеры отдельных клеток, а также вычислять различные морфологические параметры, такие как, например, коэффициент сферичности.

Для сравнения возможностей голографических методов и достоверности получаемой информации о трехмерной форме фазового микрообъекта приведены фотография эритроцитов крови и их интерферограммы, полученные при сложении волновых фронтов и методом

голографической интерферометрии в полосах конечной ширины, а также восстановленные трехмерные изображения (рис. 52). Видно, что результаты, полученные разными методами, в достаточной мере согласуются.

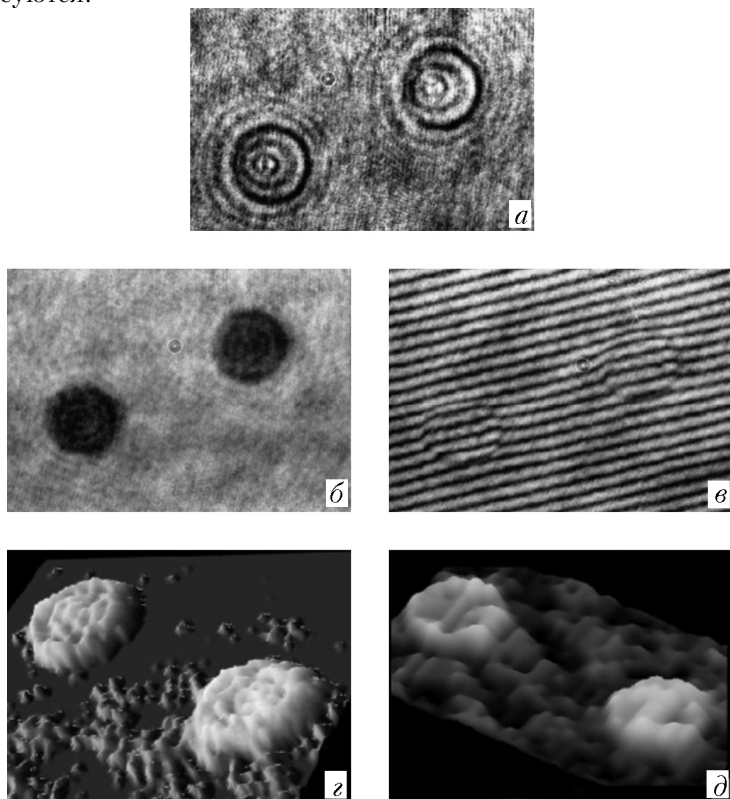


Рис. 52. Сравнение голографических методов трехмерной визуализации фазовых микрообъектов ($\times 400$): *a* — фотография эритроцитов; *б* — изображение эритроцитов при сложении волновых фронтов; *в* — интерферограмма эритроцитов в полосах конечной ширины; *г*, *д* — восстановленные по интерферограммам изображения эритроцитов

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки для решения задачи трехмерной визуализации фазовых микрообъектов.

При использовании метода сложения и вычитания в интерференционной полосе для компьютерной обработки интерферограмм могут использоваться достаточно простые и точные математические алгоритмы. Однако так как в этом методе для вычислений используются

абсолютные значения интенсивности, то для адекватной трехмерной визуализации необходимо, чтобы передаточная функция блока регистрации изображений была линейной. На этапе регистрации интерферограммы данный метод предъявляет очень высокие требования к виброустойчивости установки. Кроме того, для получения достаточно широких интерференционных полос голограмму приходится обрабатывать на месте или устанавливать точно в исходное положение.

Задача трехмерной визуализации фазовых микрообъектов при использовании метода интерферометрии в полосах конечной ширины не имеет точного математического решения и требует применения приближенных алгоритмов вычислений. Но с точки зрения практического применения для получения трехмерных изображений этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с методом голографического сложения и вычитания волновых фронтов. В данном методе для математических вычислений не используются абсолютные величины интенсивности, в результате чего не требуется линейность передаточной функции блока регистрации изображения. Метод не предъявляет высоких требований к виброустойчивости установки, что дает возможность работы не только в специализированной оптической лаборатории, но и в условиях любой медицинской или биологической лаборатории.

4.3. Цифровой голографический интерференционный микроскоп

В лаборатории радио- и оптической голографии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (Украина) создан цифровой голографический интерференционный микроскоп, в котором реализованы голографические методы визуализации фазовых микрообъектов и методы цифровой обработки изображений [110, 126, 129]. Этот микроскоп позволяет в реальном времени получать трехмерные изображения фазовых микрообъектов и измерять их морфологические параметры. Цифровой голографический интерференционный микроскоп состоит из трех основных блоков: голографического интерференционного микроскопа, цифровой видеокамеры, персонального компьютера. С помощью голографического интерференционного микроскопа получают интерферограммы исследуемых микрообъектов. Интерферограммы регистрируются с помощью цифровой видеокамеры. Оцифрованные интерферограммы передаются в компьютер, где к ним применяется ряд операций математической обработки. После этого осуществляется построение трехмерных изображений микрообъектов и вычисление их морфологических параметров.

Рассмотрим оптическую схему голографического интерференционного микроскопа (рис. 53). В качестве источника когерентного излучения в микроскопе используется лазер. Излучение лазера 1, отраженное зеркалом 2, делится полупрозрачным зеркалом 5 на два пучка: объектный и опорный. Объектный пучок, отраженный зеркалом 4, проходит через микрообъектив микроскопа 11 и направляется на фотопластинку 12. Опорный пучок, отраженный зеркалом 3, проходит через коллиматор 9 и направляется на фотопластинку 12.

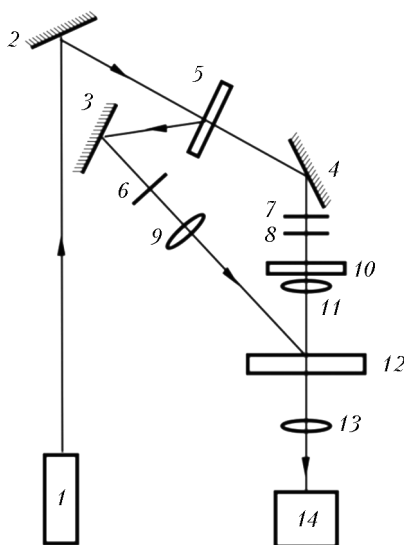


Рис 53. Оптическая схема голографического интерференционного микроскопа: 1 — лазер; 2–4 — зеркала; 5 — полупрозрачное зеркало; 6–8 — поляризаторы; 9 — коллиматор; 10 — исследуемый препарат; 11 — микрообъектив; 12 — голограмма; 13 — окуляр; 14 — блок регистрации изображений

На фотопластинке 12 в результате интерференции объектной и опорной волн регистрируется голограмма объектной волны в отсутствие микрообъекта. После химической обработки фотопластинка (теперь уже голограмма) помещается в исходное положение. С помощью опорного пучка по голограмме восстанавливается зарегистрированная на ней объектная волна. Голограмма в микроскопе играет роль оптического элемента, который заменяет второе плечо интерферометра. Опорный пучок играет вспомогательную роль, он необходим для восстановления голограммы. Система интерференционных полос для получения интерферограммы микрообъекта формируется в результате

взаимодействия реальной объектной волны и восстановленной по голограмме ее копии. Результат интерференции наблюдают в окуляр 13. Расположение голограммы между объективом и окуляром микроскопа позволяет увеличить поле зрения микроскопа за счет возможности перемещения окуляра в плоскости, перпендикулярной лучу. Специальный держатель позволяет перемещать голограмму относительно ее первоначального положения. Необходимый период интерференционных полос формируется поперечным сдвигом голограммы с помощью микровинтов держателя. При размещении микрообъекта 10 перед микрообъективом микроскопа его изображение или интерферограмма изучается в окуляр 13 и фиксируется с помощью цифровой видеокамеры — блока регистрации 14.

Для получения высокого качества голограммы и интерферограмм необходимо, чтобы глубина модуляции интерференционной картины была максимальной.

Как известно, глубина модуляции интерференционной картины зависит от соотношения интенсивностей и поляризации взаимодействующих волн [109]:

$$\mu = \frac{2\sqrt{\alpha} \cos \beta}{(1 + \alpha)},$$

где α — отношение интенсивностей взаимодействующих волн; β — угол между направлениями линейной поляризации взаимодействующих волн.

Как видно из приведенного соотношения, для получения максимального значения глубины модуляции необходимо, чтобы интенсивности и поляризации взаимодействующих волн были одинаковы. Для обеспечения данного условия в схему установки введены поляризаторы 6–8. Поляризаторы 6 и 8 задают одинаковые направления линейной поляризации объектной и опорной волн. Так как дифракционная эффективность голограмм не достигает 100%, интенсивность восстановленной по голограмме объектной волны меньше интенсивности объектной волны, непосредственно проходящей через микроскоп. Вращением направления плоскости поляризации поляризатора 7 относительно плоскости линейной поляризации поляризатора 8 можно выравнивать интенсивности взаимодействующих волн с целью получения максимального контраста интерферограмм. При этом интенсивность просвечивающей объектной волны изменяется по закону

$$I = I_0 \cos^2 \gamma,$$

где γ — угол между плоскостями пропускания поляризаторов 7 и 8.

Так как период интерференционной картины составляет величину порядка длины волны используемого оптического излучения, малейшие вибрации приводят к смазыванию интерференционной картины и ухудшению качества голограммы. Поэтому все элементы голографического интерференционного микроскопа крепятся на виброзащищенной плите.

В экспериментах в качестве источника когерентного излучения использовался He—Ne лазер ЛГ-38 с длиной излучения 0,63 мкм. Для получения изображений объектов использовался объектив 40 \times 0,65 и окуляр 7 \times . Регистрация голограмм производилась на высокоразрешающих фотопластинках ПФГ-03 (Россия). Для регистрации интерферограмм применялась USB-совместимая цифровая камера с разрешением ПЗС матрицы 5 мегапикселей и оптическим увеличением 12 \times . Математическая обработка интерферограмм и построение изображений осуществлялись с использованием компьютера на базе CPU Intel Celeron (566 МГц) и специально разработанных для данной задачи программ.

4.4. Исследования морфологии эритроцитов крови с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа

Цифровой голографический интерференционный микроскоп является уникальным прибором, не имеющим аналогов в мире, поэтому проведенные с его помощью исследования биологических микрообъектов весьма немногочисленны, однако они дали ряд интересных и неожиданных результатов. Ниже будут представлены основные экспериментальные данные по исследованию трехмерной морфологии эритроцитов, полученные с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа в лаборатории голографии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина.

Исследования нефиксированных и неокрашенных мазков крови проводили на стеклянных подложках, которые используются при лабораторном анализе крови в медицинской практике. Единственное специфическое требование к технике приготовления мазка заключалось в том, что мазок должен быть монослойным. При исследовании с применением цифрового голографического микроскопа мазки крови не подвергались никаким разрушающим воздействиям и в дальнейшем могли использоваться для исследования другими методами.

В ходе проведенных исследований кроме изучения морфологических свойств эритроцитов проводилась оценка их функционального

статуса [229]. При этом в настоящем исследовании руководствовались тем, что способность эритроцита к выполнению его основной функции — переносу кислорода — определяется помимо уровня содержания в нем гемоглобина площадью поверхности взаимодействия с обогащенной кислородом средой. При данном объеме эритроцита площадь его поверхности может быть различной в зависимости от формы. Наиболее функциональным является эритроцит с максимальным значением отношения площади его поверхности к объему. В связи с этим для характеристики функциональных возможностей эритроцита, определяемых его формой, был введен коэффициент сферичности k — отношение толщины эритроцита в центре к толщине на расстоянии половины радиуса.

Было установлено, что разные по форме эритроциты обладают разным значением коэффициента сферичности. Так, наибольшей способностью к переносу кислорода обладают двояковогнутые дискоциты, для которых характерно максимальное отношение площади поверхности к объему. Коэффициент сферичности таких эритроцитов меньше единицы (рис. 54). Коэффициент сферичности плоских дискоцитов приблизительно равен единице, сфероцитов — больше единицы (рис. 55). Функциональный потенциал таких эритроцитов снижен по сравнению с двояковогнутыми дискоцитами.

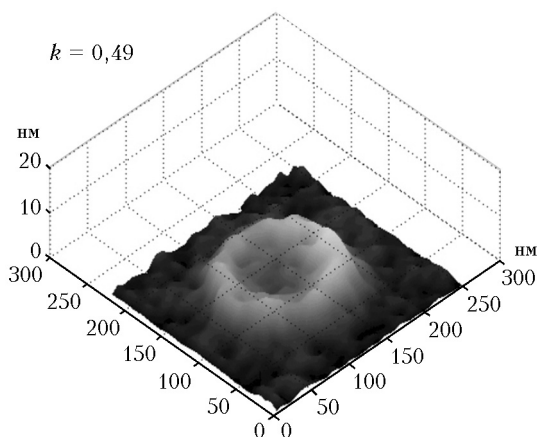


Рис. 54. Двояковогнутый дискоцит. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

Практически коэффициенты сферичности отдельных эритроцитов определялись в ходе компьютерной обработки интерферограмм. Однако

весьма важную информацию несет средний коэффициент сферичности, определяемый как среднее арифметическое значение отдельных k в выбранных случайным образом фрагментах мазка крови. На рис. 56 представлены фрагменты мазков крови здорового донора (a) и пациента с кавернозно-папиллярной гемангиомой (b). Средние коэффициенты сферичности эритроцитов у обследованных составляли 0,35 и 0,96 соответственно, морфология клеток была изменена (встречались сфероциты, эритроциты в форме плоских дисков).

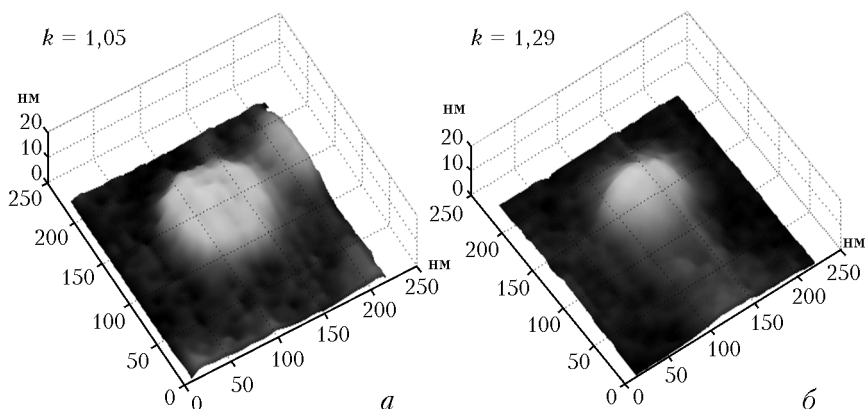


Рис. 55. Морфологические формы эритроцитов: a — плоский дискоцит; b — сфероцит. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

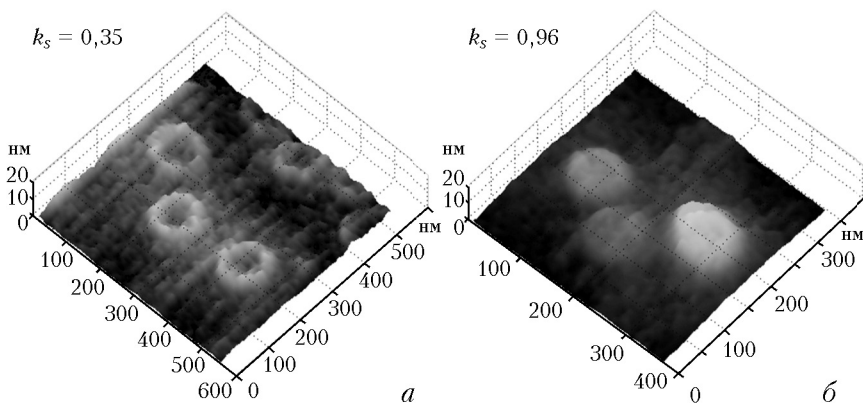


Рис. 56. Фрагмент мазка крови: a — здорового донора; b — пациента с кавернозно-папиллярной гемангиомой. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

В ходе проведенных исследований морфологических свойств эритроцитов с использованием цифровой голографической интерференционной микроскопии были обследованы пациенты с органическим поражением центральной нервной системы, с отоларингологической патологией, с тяжелыми формами острых инфекционных заболеваний, с нарушениями углеводного обмена различной степени тяжести, а также больные с гематологическими заболеваниями.

Как показало проведенное исследование, у большинства обследованных пациентов определялись патологические изменения морфологии эритроцитов, тенденция к повышению среднего коэффициента сферичности красных клеток крови. При этом каких-либо специфических изменений морфологии эритроцитов, характерных для того или иного соматического заболевания, не выявлено [128]. У больных с гемолитическими заболеваниями помимо сфероцитов встречалось множество дегенеративных форм эритроцитов, которые не поддаются классификации (рис. 57).

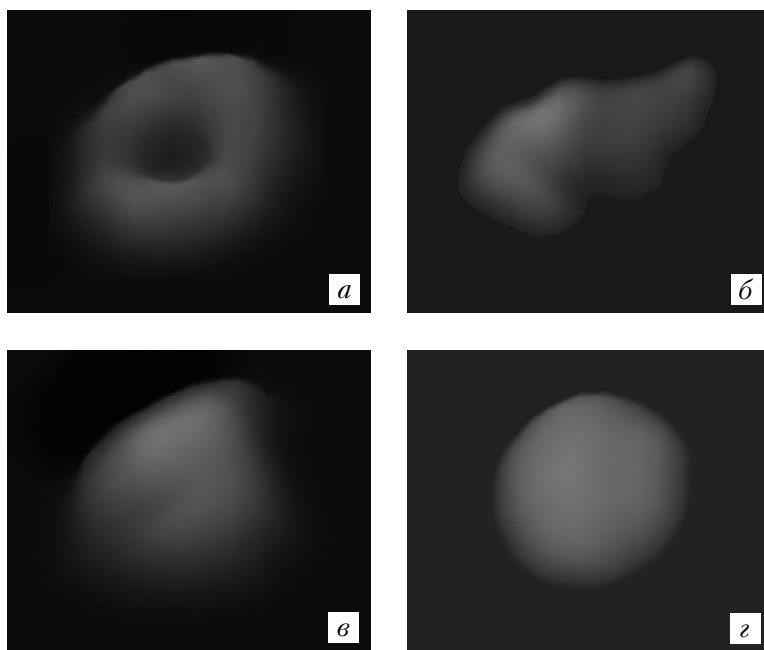


Рис. 57. Эритроциты крови: *а* — здорового донора; *б–г* — пациента с гемолитической анемией. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

Весьма интересные результаты были получены при обследовании пациентов с наследственным заболеванием системы крови — серповидно-клеточной анемией [116]. На рис. 58 представлена динамика изменения эритроцитов у пациента, страдающего серповидно-клеточной анемией, в условиях снижения уровня содержания кислорода в крови (локальная гипоксия создавалась перетягиванием пальца руки пациента). Было установлено, что трансформация формы эритроцитов при локальной гипоксии происходила в течение 5 мин. Приведенный факт является доказательством возможности использования метода цифровой голографической интерференционной микроскопии для оценки динамики изменения формы красных клеток крови.

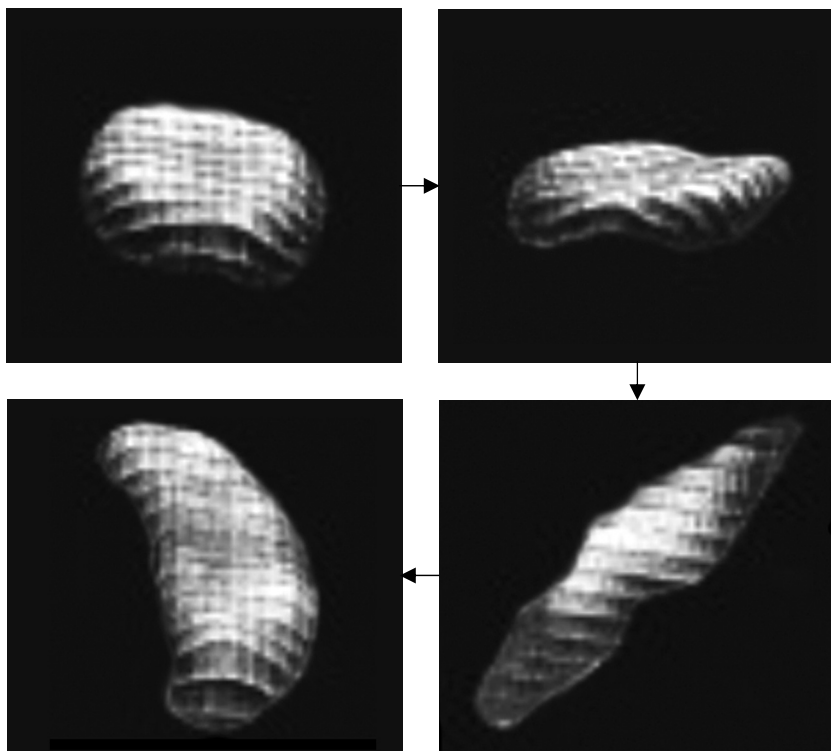


Рис. 58. Изменение формы эритроцитов крови у пациента с серповидно-клеточной анемией при снижении уровня содержания кислорода в крови. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

В лаборатории проводилась оценка трансформации эритроцитов в условиях действия на клетки и организм физических факторов. В частности, изучалось изменение морфологии эритроцитов крови крыс *in vivo* и *in vitro* при воздействии γ -радиации в сверхлетальной дозе [99]. Экспериментальных животных и кровь подвергали облучению γ -источником (60 °С) в дозе 200 Гр. Результаты этих экспериментов подтвердили чувствительность эритроцитов крови к действию ионизирующей радиации и выявили зависимость результата от условий облучения (рис. 59). При облучении крови *in vitro* в сверхлетальной дозе 200 Гр отмечался полный гемолиз эритроцитов. Отдельные уцелевшие в мазке эритроциты имели сильно искаженную форму (рис. 59,б). При облучении крыс гемолиз не наступал (рис. 59,в). Эритроциты артериальной крови крысы через 1 ч после облучения сохраняли форму двояковогнутых дискоцитов, однако коэффициент сферичности этих клеток значительно увеличивался.

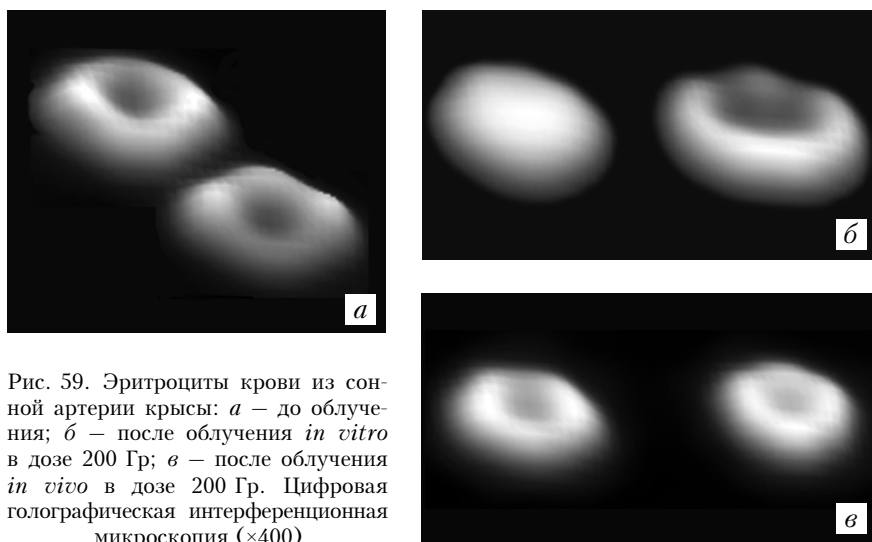


Рис. 59. Эритроциты крови из сонной артерии крысы: *a* — до облучения; *б* — после облучения *in vitro* в дозе 200 Гр; *в* — после облучения *in vivo* в дозе 200 Гр. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

Кроме того, было проведено исследование особенностей морфологии эритроцитов артериальной и венозной крови у крыс (рис. 60). Оказалось, что эритроциты артериальной крови имеют форму двояковогнутых дисков, а эритроциты венозной крови демонстрируют тенденцию к преобладанию формы плоских дисков, что свидетельствует о факте трансформации красных клеток крови в условиях их участия в газообмене.

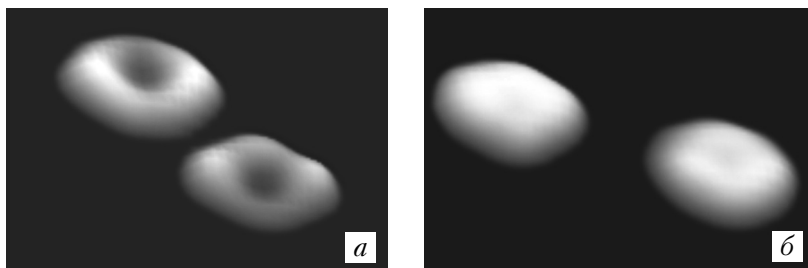


Рис. 60. Эритроциты крысы: *а* — из артериальной крови; *б* — из венозной крови. Цифровая голографическая интерференционная микроскопия ($\times 400$)

Таким образом, использование цифровой голографической интерференционной микроскопии подтверждает, что морфология эритроцитов крови претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологиях различного генеза, а также под действием широкого спектра внешних физических и химических факторов. При этом каких-либо специфических изменений морфологии эритроцитов, однозначно соответствующих тому или иному негематологическому заболеванию, выявлено не было. Исследование морфологии эритроцитов крови, вероятно, позволяет выявлять и анализировать скрытые гипоксические состояния, выступающие причиной развития различных патологий. Цифровой голографический интерференционный микроскоп, сочетающий методы голографической интерференционной микроскопии с методами компьютерной обработки информации, является прибором, вполне подходящим для проведения подобного рода исследований.

Литература

1. *Авцын А.Б., Шахламов В.А.* Ультраструктурные основы патологии клетки. М.: Медицина, 1979. 311 с.
2. *Агафонова А.В.* Морфофункциональные особенности эритроцитов и механизмы развития анемии у беременных женщин с различными формами цитомегаловирусной инфекции: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1999. 113 с.
3. *Александров О.В., Матюшкин В.А., Киценко Л.С.* Морфология эритроцитов при неспецифических заболеваниях легких (электронно-микроскопическое исследование) // Терапевт. архив. 1983. Т. 55. № 3. С. 85–87.
4. *Аряев Н.А.* Состояние клеточных мембран у детей, больных острой пневмонией // Вопр. охраны материнства и детства. 1983. № 5. С. 35–38.
5. *Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Кияткин А.Б., Пичугин А.В.* Регуляция объема эритроцитов человека. Роль калиевых каналов, активируемых кальцием // Биофизика. 1993. Т. 38. № 5. С. 809–821.
6. *Бармина С.Э., Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д.* Роль процессов липопероксидации в патогенезе паранеопластической анемии // Вопр. мед. химии. 1993. Т. 39. № 3. С. 28–29.
7. *Баскаков М.Б., Медведев М.А.* Роль вторичных мессенджеров и Na^+/H^+ -обмена в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // Кальций — регулятор метаболизма: Сб. науч. тр. Томск: ТМИ, 1987. С. 128–151.
8. *Бернат И.* Патогенез ожоговой анемии. Будапешт, 1975. 264 с.
9. *Бойтлер Э.* Нарушения метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. М.: Медицина, 1981. 256 с.
10. *Болдырев А.А.* Биологические мембраны и транспорт ионов. М.: Изд-во МГУ, 1985. 93 с.
11. *Болдырев А.А.* Введение в биомембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
12. *Борн М., Вольф Э.* Основы оптики. М.: Наука. 1973. 719 с.
13. *Боровик А.С., Тарасова О.С., Большакова А.В., Яминский И.В.* Использование атомно-силовой микроскопии для изучения живых клеток // Успехи соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 2. С. 217–224.
14. *Бурлакова Е.Б.* Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, 1981. С. 23–34.
15. *Быков Ю.А., Карпунин С.Д., Бойченко М.К., Чепцов В.О.* Растровая электронная микроскопия и рентгеноспектральный структурный анализ. Аппаратура, принцип работы, применение: Учебное пособие. <http://lab.bmstu.ru/rem/>.
16. *Быкова И.А., Юсупова Д.Х., Карашев Л.Э.* Интерференционная микроскопия эритроцитов в диагностике нарушений в системе эритрона при вирусном гепатите у детей // Вопр. охраны материнства и детства. 1981. № 5. С. 47–51.

17. Вельтищев Ю.Е., Капустян А.М. Проблемы патологии детского возраста в аспекте нарушения структуры и функции биологических мембран. М.: Медицина, 1982. 98 с.
18. Вирхов Р. Патология, основанная на теории ячеек (целлюлярная патология) в применении к микроскопической анатомии нормальных и ненормальных тканей: Пер. с нем. М., 1859. 472 с.
19. Владимиров Ю.А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1988. № 2. С. 7–19.
20. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1989. № 4. С. 7–19.
21. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. ПОЛ в биологических мембранах. М.: Медицина, 1972. 252 с.
22. Волкова О.В., Шахламов В.А., Миронов А.А. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. М.: Медицина, 1987. 464 с.
23. Втюрин Б.В., Каем Р.И., Червонская Н.В. Изменение мембраны эритроцитов и их конфигурации при ожоговой септикотоксемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1982. Т. 94. № 9. С. 117–119.
24. Гасс Г.В., Марголис Л.Б., Черномордик Л.В. Локальные деформации мембран эритроцитов в переменном электрическом поле // Биологические мембраны. 1990. Т. 7. № 6. С. 647–658.
25. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.
26. Гершанович М.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1982. 224 с.
27. Гинзбург В.Н., Степанов Б.М. Голографические измерения // Радио и связь. М., 1981. С. 215–221.
28. Гольдберг В.Е., Дыгай А.М., Новицкий В.В. Рак легкого и система крови. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 236 с.
29. Гольдберг Е.Д. Справочник по гематологии с атласом микрофотограмм. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1989. 468 с.
30. Гольдберг Е.Д., Карпова Г.В., Тимина Е.А., Хлусов И.А. Индуцированная гибель клеток в развитии гипоплазии кроветворной ткани после цитостатического воздействия // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1999. Т. 127. № 1. С. 39–42.
31. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1986. 240 с.
32. Гольдберг Е.Д., Степанова Е.И., Костарева И.В. Интерференционная микроскопия в гематологии. Томск: Красное знамя, 1983. 102 с.
33. Горбунов Н.В. Влияние структурной модификации мембранных белков на липид-белковое взаимодействие в мембранах эритроцитов человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1993. Т. 116. № 11. С. 488–491.
34. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. и др. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. В 2 кн.: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Кн. 1. 303 с.
35. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. и др. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. В 2 кн.: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Кн. 2. 348 с.

36. *Грацианова Н.Д.* Особенности структурно-метаболического статуса эритроцитов у детей с патологией щитовидной железы: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1999. 111 с.
37. *Грибанов Г.А.* Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов // *Вопр. мед. химии.* 1991. Т. 37. № 4. С. 2–10.
38. *Денисюк Ю.Н.* Об отображении оптических свойств объекта в волновом поле рассеянного им излучения // *ДАН СССР.* 1962. Т. 144. № 6. С. 1275.
39. *Доровских Я.А.* Структурно-метаболический статус эритроцитов и механизм нарушения периферического звена эритрона у детей с инсулинозависимым сахарным диабетом: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1998. 216 с.
40. *Дыгай А.М., Жданов В.В., Хлусов И.А. и др.* О регулирующем влиянии гемопозиндуцирующего микроокружения на процессы кроветворения при действии цитостатических препаратов // *Гематология и трансфузиология.* 1995. Т. 40. № 5. С. 11–15.
41. *Евтушенко И.Д.* Клинико-патофизиологические особенности течения беременности у женщин с различными формами цитомегаловирусной инфекции: Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1997. 231 с.
42. *Заец Т.Л., Лавров В.А., Марчук А.И. и др.* Изменение некоторых свойств эритроцитной мембраны и структуры эритроцитов при тяжелых ожогах в эксперименте // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1990. № 1. С. 27–30.
43. *Зайцев Б.Н., Дурыманов А.Г., Бакулина Л.Ф., Генералов В.М.* Исследование взаимодействия эритроцитов и вирусных частиц методом атомно-силовой микроскопии. Поверхность // *Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования.* 2003. № 7. С. 36–40.
44. *Захарова Н.Б., Титова Г.П.* Ультраструктура эритроцитов со сниженными текучими свойствами и их роль в развитии микроциркуляторных расстройств при экстремальных состояниях // *Патолог. физиология и эксперим. терапия.* 1992. № 2. С. 50–52.
45. *Ионов Б.В., Чернух А.М.* Морфологическая характеристика эритроцитов артериальной и венозной крови крысы по данным сканирующей электронной микроскопии // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1981. Т. 92. № 12. С. 749–751.
46. *Кагава Я.* Биомембраны. М.: Высшая школа, 1985. 304 с.
47. *Казеннов А.М., Маслова М.Н.* Структурно-биохимические свойства мембраны безядерных эритроцитов // *Физиол. журн. СССР им. Сеченова.* 1987. № 12. С. 1587–1596.
48. *Карабанов Г.Н., Инченко К.С.* Деформируемость эритроцитов в клиническом аспекте // *Вестн. хирургии им. Грекова.* 1986. Т. 137. № 2. С. 99–103.
49. *Каруну В.Я.* Электронная микроскопия. Киев.: Вища школа, 1984. 208 с.
50. *Кидалов В.Н., Лысак В.Ф.* Квантитативная эритрограмма и возможность ее использования в клинике и эксперименте // *Лаб. дело.* 1989. № 8. С. 36–40.
51. *Киселёва О.И., Яминский И.В.* Сканирующая зондовая микроскопия белков и белок-мембранных комплексов // *Коллоид. журн.* 1999. Т. 61. № 1. С. 5–24.
52. *Князева Л.И., Конопля А.И., Горяинов И.И.* Коррекция магнитно-лазерным облучением вторичного иммунодефицитного состояния при остром панкреатите и ожоговой травме // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 1997. № 3. С. 29–31.

53. *Кожевников Ю.Н.* О перекисном окислении липидов в норме и при патологии // *Вопр. мед. химии.* 1985. Т. 31. № 5. С. 2–7.
54. *Козинец Г.И., Быкова И.А., Мамедова Т.А. и др.* Метод интерферометрии в гематологии. Метод. рекомендации. М., 1980. 16 с.
55. *Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др.* Клетки крови: современные технологии их анализа. М.: Триада-фарм, 2002. 200 с.
56. *Козинец Г.И., Ряполова И.В., Шишканова З.Г. и др.* Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови здоровых людей (сканирующая электронная микроскопия) // *Проблемы гематологии и переливания крови.* 1977. № 7. С. 19–21.
57. *Козинец Г.И., Симоварт Ю.А.* Поверхностная архитектоника клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови. Таллин: Валгус, 1984. 116 с.
58. *Козлов М.М., Черномордик Л.В., Маркин В.Г.* Механизм образования безбелковых участков мембраны эритроцита. Разрыв мембранного скелета // *Биол. мембраны.* 1989. Т. 6. № 6. С. 5–12.
59. *Колосова М.В.* Общие закономерности и механизмы нарушений периферического звена эритрона при типовых патологических процессах в клинике детских болезней: Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1999. 468 с.
60. *Колосова М.В., Новицкий В.В., Кравец Е.Б. и др.* Обратимая агрегация эритроцитов при инсулинозависимом сахарном диабете у детей // *Клинич. лаб. диагностика.* 1997. № 8. С. 12–14.
61. *Колосова М.В., Новицкий В.В., Кравец Е.Б. и др.* Особенности поверхностной архитектоники и ультраструктуры эритроцитов периферической крови у детей, больных инсулинозависимым сахарным диабетом // *Клинич. лаб. диагностика.* 1997. № 9. С. 16–18.
62. *Колосова М.В., Новицкий В.В., Степовая Е.А.* Состав липидов мембран эритроцитов и их биофизические характеристики у детей с инсулинозависимым сахарным диабетом в процессе терапии // *Клинич. лаб. диагностика.* 2001. № 1. С. 10–12.
63. *Колосова М.В., Новицкий В.В., Степовая Е.А., Кравец Е.Б.* Белковый спектр и состояние липидного бислоя мембран эритроцитов у детей с инсулинозависимым сахарным диабетом (по данным электрофореза в полиакриламидном геле и флуоресцентного зондирования) // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2000. Т. 129. № 3. С. 306–309.
64. *Коломийцев Ю.В.* Интерферометры. Л.: Машиностроение, 1976. 294 с.
65. *Кольер Р., Бернхарт К., Линн Л.* Оптическая голография. М.: Мир, 1973. 688 с.
66. *Конев С.В.* Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Минск: Наука и техника, 1987. 240 с.
67. *Кравцов Г.М., Дулин Н.О., Котелевцев Ю.В., Постнов Ю.В.* Регуляция формы и объема эритроцитов человека протеинкиназами А и С // *Биохимия.* 1988. Т. 53. № 8. С. 1296–1302.
68. *Крепс Е.М.* Липиды в биологических мембранах. М.: Наука, 1982. 340 с.
69. *Крымский Л.Д., Нестайко Г.В.* Цитоплазматические мостики эритроцитов (наблюдения в РЭМ) // *Арх. патологии.* 1975. Т. 37. № 3. С. 66–73.
70. *Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г.* Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. М.: Медицина, 1976. 168 с.

-
71. Кузин М.И., Сологуб В.К., Юденич В.В. Ожоговая болезнь. М.: Медицина, 1982. 160 с.
 72. Кумерова А.О., Петухова В.И., Шкестерс А.П. и др. Возможность использования антиоксидантных ферментов эритроцитов в качестве индикаторов, характеризующих течение болезни у больных гемобластозами // *Вопр. мед. химии*. 1996. Т.42. №2. С. 144–147.
 73. Ландсберг Г.С. Оптика. М.: Физматлит, 2003. 848 с.
 74. Лапицкая О.И. Состояние периферического звена эритрона у больных с дисковыми протезами клапанов сердца: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1996. 156 с.
 75. Лисовский В.А., Кидалов В.Н., Гуц В.В. Трансформация эритроцитов как диагностический тест в клинической практике // *Лаб. дело*. 1986. № 10. С. 594–598.
 76. Мазур Е.С. Реактивность системы крови у больных с первичным и вторичным гипотиреозом: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2000. 179 с.
 77. Матюхина Т.Г. Исследование эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии // *Клинич. лаб. диагностика*. 1999. № 6. С. 13–16.
 78. Матюхина Т.Г., Комков О.Ю., Чижик С.А. АСМ-исследование клеток сердечно-сосудистой системы и крови: проблемы и надежды // *Тр. 4-го Белорус. семинара по сканирующей зондовой микроскопии*. Гомель, 24–25 окт. 2000 г. С. 44–47.
 79. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. С. 128–135.
 80. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям // *Гематология и трансфузиология*. 1987. Т. 32. № 7. С. 32–41.
 81. Нагаева Т.А. Клиническая характеристика нарушений периферического звена эритрона и микроциркуляции при атопическом дерматите у детей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2002. 43 с.
 82. Новицкий В.В. Реактивность системы крови в ранние и отдаленные сроки после действия противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1985. 38 с.
 83. Новицкий В.В., Колосова М.В., Кравец Е.Б. и др. Структурно-метаболический статус и функциональные особенности эритроцитов при инсулинозависимом сахарном диабете у детей // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1999. Т. 128. № 9. С. 347–351.
 84. Новицкий В.В., Корешкова К.Г., Степовая Е.А. и др. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого и с опухолями головы и шеи // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1999. Т. 127. Прил. 1. С. 18–20.
 85. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Михаленко А.Н. и др. Поверхностная архитектура и внутриклеточная ультраструктура эритроцитов при ожоговой болезни // *Бюл. Сибирского отделения РАМН*. 2000. Т. 95. № 1. С. 79–83.
 86. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Семин И.Р. Поверхностная архитектура эритроцитов периферической крови у психически больных // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2000. № 10. С. 429–432.
 87. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 200 с.

88. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та; М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 208 с.
89. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Баженова Н.Г. и др. Влияние противоопухолевой химиотерапии на липидный спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого // Эксперим. и клинич. фармакология. 1999. Т. 62. № 1. С. 56–59.
90. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Баженова Н.Г. и др. Липидный спектр мембран эритроцитов у онкологических больных // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1998. Т. 126. № 8. С. 204–206.
91. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е. и др. Поверхностная архитектура и ультраструктура эритроцитов периферической крови онкологических больных // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1999. Т. 127. № 6. С. 680–682.
92. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е. и др. Функциональная характеристика эритроцитов периферической крови у онкологических больных // Клинич. лаб. диагностика. 1997. № 12. С. 34–36.
93. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е. и др. Эритроциты и злокачественные новообразования. Томск: STT, 2000. 288 с.
94. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. № 9. С. 885–903.
95. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Ряжский Г.Г., Агнаев В.М. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при изменении объема клеток // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 10. С. 1030–1040.
96. Островский Ю.И., Бутусов М.М., Островская Г.В. Голографическая интерферометрия. М.: Наука, 1977. 339 с.
97. Паранич А.В., Тишко Т.В., Титарь В.П. и др. Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния гамма-радиации на морфологию эритроцитов крыс при облучении *in vivo* и *in vitro* // Вестн. Харьков. нац. ун-та им. В.Н. Каразина. Серия «Радиофизика и электроника». 2002. № 570. Вып. 2. С. 46–51.
98. Петрова И.В., Степовая Е.А., Колосова М.В. и др. Роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 123. № 6. С. 653–655.
99. Переводчикова Н.И. Противоопухолевая химиотерапия. М.: Медицина, 1993. 224 с.
100. Рябов С.И. Основы физиологии и патологии эритропоэза. Л.: Медицина, 1971. 254 с.
101. Рябов С.И., Шостка Г.Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. Л.: Наука, 1973. 280 с.
102. Рязанцева Н.В. Патофизиология эритроцитов при психических расстройствах: Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2001. 380 с.
103. Рязанцева Н.В. Структурно-метаболический статус эритроцитов и механизмы нарушения периферического звена эритрона при ожоговой травме: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1997. 188 с.

-
104. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Рязанцев В.П. Характеристика периферического звена эритрона у больных с ограниченными поверхностными термическими ожогами // Клинич. лаб. диагностика. 2000. № 6. С. 23–34.
 105. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Рязанцев В.П., Бычков А.В. Влияние ожоговой травмы на эритроциты // Гематология и трансфузиология. 2002. Т. 47. № 1. С. 25–29.
 106. Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Колосова М.В., Новицкий В.В. Типовая реакция периферического звена эритрона при патологических процессах // Бюл. сиб. медицины. 2002. Т. 1. № 1. С. 29–35.
 107. Савина Е.В. Особенности клинической картины, морфофункционального статуса эритроцитов и системы иммунитета при раннем сифилисе: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2003. 136 с.
 108. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Голографическая интерферометрия фазовых микрообъектов // Укр. физ. журн. 1985. Т. 30. № 7. С. 994–997.
 109. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Получение контрастных изображений фазовых микрообъектов путем суммирования волновых фронтов // Укр. физ. журн. 1985. Т. 30. № 3. С. 334–337.
 110. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. Фазово-контрастный голографический микроскоп // Приборы и техника эксперимента. 1987. № 2. С. 249.
 111. Свиридов Б.Е., Левин С.В., Янутка А.Л. и др. Слабосвязанные белки и ультраструктура мембран теней эритроцитов // Цитология. 1976. Т. 18. № 2. С. 178–182.
 112. Селищева А.А., Козлов Ю.П. Метаболизм фосфолипидов и биологических мембран. Иркутск, 1988. 88 с.
 113. Серов В.В. От клеточной патологии Вирхова до молекулярной патологии сегодняшнего дня // Арх. патологии. 2001. № 1. С. 3–5.
 114. Серов В.В., Пауков В.С. Ультраструктурная патология. М.: Медицина, 1975. 432 с.
 115. Слобожанина Е.И., Федорович И.Е., Черницкий Е.А. и др. Изменение состояния мембранных белков эритроцитов в процессе хранения консервированной крови // Биофизика. 1991. Т. 36. Вып. 4. С. 621–623.
 116. Сметанина Н.С., Ковригина Е.С., Токарев В.Н. Окислительное повреждение эритроцитов при талассемии // Гематология и трансфузиология. 1994. Т. 39. № 2. С. 39–41.
 117. Сороковой В.И., Моченова Н.Н., Никитина Г.М. Ультраструктура эритроцитов при кальцийактивируемом старении *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1994. Т. 117. № 5. С. 555–558.
 118. Сороковой В.И., Никитина Г.М., Лапинский А.Г., Моченова Н.Н. Изменения ультраструктуры эритроцитов человека и уровня свободных жирных кислот в них при инкубации с перекисью водорода и ионами кальция *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1994. Т. 118. № 8. С. 207–211.
 119. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Высш. шк., 1996. 335 с.
 120. Степовая Е.А. Механизмы нарушений структурно-метаболического статуса и функциональных свойств эритроцитов у больных со злокачественными новообразованиями: Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1999. 499 с.

121. *Степовая Е.А.* Структурно-функциональная характеристика периферического звена эритрона у больных раком легкого до и в процессе полихимиотерапии: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1991. 255 с.
122. *Степовая Е.А., Гольдберг В.Е., Новицкий В.В.* Функциональная характеристика эритроцитов у больных раком легкого // *Лаб. дело.* 1990. № 10. С. 51–53.
123. *Степовая Е.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. и др.* Хронический бронхит: участие эритроцитов в патологическом процессе // *Клинич. медицина.* 2004. Т. 82. № 1. С. 53–56.
124. *Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М.* Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень, 1997. 140 с.
125. *Тархова Е.П.* Липидный спектр мембран, поверхностная архитектура и ультраструктура эритроцитов при типовых патологических процессах у детей: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1998. 225 с.
126. *Тишко Т.В., Титарь В.П.* Голографическая микроскопия. Методы, устройства, применения. // *Вестн. Харьков. нац. ун-та им. В.Н. Каразина. Серия «Радиофизика и электроника».* 2002. Вып. 1. № 544. С. 54–61.
127. *Тишко Т.В., Титарь В.П., Бархоткина Т.М. и др.* Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови человека // *Биофиз. вестн. ХНУ им. В.Н. Каразина.* 2000. Т. 2 (7). № 497. С. 103–111.
128. *Тишко Т.В., Титарь В.П., Панфилов Д.А. и др.* Применение метода голографической микроинтерферометрии для определения формы эритроцитов крови человека // *Биол. вестн. ХНУ им. В.Н. Каразина.* 1998. Т. 2. № 1. С. 107–110.
129. *Тишко Т.В., Титарь В.П., Тишко Д.Н.* Голографические методы трехмерной визуализации фазовых микрообъектов // *Оптич. журн.* 2005. Т. 72. № 2. С. 48–55.
130. *Уикли И.Б.* Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
131. *Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д.* Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
132. *Франсон М.* Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы: Пер. с франц. М.: Гос. изд-во физ.-мат. литературы, 1960. 180 с.
133. *Часовских Н.Ю.* Поверхностная архитектура, ультраструктура и агрегационные свойства эритроцитов периферической крови у больных раком: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1997. 191 с.
134. *Черницкий Е.А., Воробей А.В.* Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск, 1981. 260 с.
135. *Шевцова Н.М., Овсянников Ю.А., Байков А.Н., Медведев М.А.* К вопросу о морфофункциональном состоянии эритроцитов в условиях биологической перфузии организма // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* 2000. Т. 129. Прил. 1. С. 98–100.
136. *Шевцова Н.М., Овсянников Ю.А., Медведев М.А.* Состояние эритроцитов периферической крови при прямом механическом массаже сердца // *Бюл. экспер. биологии и медицины.* 1997. № 3. С. 353–356.
137. *Шибяев С.В., Шияев Р.Р., Чемоданов В.В. и др.* Оценка поверхностной архитектуры клеток крови методами фазово-контрастной и сканирующей

- электронной микроскопии // Клинич. лаб. диагностика. 1993. № 3. С. 27–29.
138. Шперлинг И.А. Патоморфоз и патофизиология эритроцита при воздействии гематотропных ксенобиотиков : Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2006. 334 с.
139. Элойа Р. Текучесть мембран в биологии. Концепция мембранной структуры. Киев: Наукова думка, 1989. 310 с.
140. A-Hassan E., Heinz W.F., Antonik M.D. et al. Relative micro elastic mapping of living cells by atomic force microscopy // Biophys J. 1998. V. 74. № 3. P. 1564–1578.
141. Aikawa M. Studies on falciparum malaria with atomic-force and surface-potential microscopes // Ann. Trop. Med. Parasitology. 1997. V. 91. № 7. P. 689–692.
142. Aikawa M., Kamanura K., Shiraishi S. et al. Membrane knobs of unfixed *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes: new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy // Experim. Parasitology. 1996. V. 84. P. 339–343.
143. Arancia G., Molinari A., Crateri P. et al. Adriamycin – plasma membrane interaction in human erythrocytes // Eur. J. Cell. Biol. 1988. V. 47. № 2. P. 379–387.
144. Backman L., Jonasson J.B., Horstedt P. Phosphoinositide metabolism and shape control in sheep red blood cells // Mol. Membr. Biol. 1998. V. 15. № 1. P. 27–32.
145. Benoit M., Gaub H.E., Grandbois M., Dettmann W. Affinity imaging of Red Blood, cells using an Atomic Force Microscope // J. Histochemistry and Cytochemistry, 2000. V. 48. P. 719–724.
146. Beppu M., Takanashi M., Murokami K. Modification of glycophorin A during oxidation of erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes. 1990. Vol. 1023. № 3. P. 413–420.
147. Bessis M., Weed R.I., Leblond P.F. Red cell shape physiology, pathology, ultra structure. New York, Heidelberg, Berlin: Springer Verlag, 1973. 180 p.
148. Beyer H. Theorie und Praxis Interferenzmikroskopie. Leipzig, 1974. 338 s.
149. Binnig G., Quote C.F., Gerber C. Atomic force microscopy // Phys. Rev. Lett. 1986. V. 56. P. 930.
150. Birchmeir W., Lanz J.H., Winterhatter K.H. ATP-induced endocytosis in human erythrocyte ghosts. Characterization of the process and isolation of the endocytosed vesicles // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 18. P. 9288–9294.
151. Bluemink J.G., Dekker R.A., Kelley R.O. Ligand-mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy // J. Ultrastruct. Res. 1973. V. 45. № 3. P. 254–258.
152. Bossi D., Russo M. Hemolytic anemias due to disorder of red cell membrane skeleton // Mol. Aspects Med. 1996. V. 17. № 2. P. 171–188.
153. Brunauer L.S., Moxness M.S., Huestis W.H. Hydrogen peroxide oxidation induces the transfer of phospholipids from the membrane into the cytosol of human erythrocytes // Biochemistry. 1994. V. 33. № 15. P. 4527–4532.
154. Bushell G.R., Cahill C., Clarke F.M. et al. Imaging and force-distance analysis of human fibroblasts *in vitro* by atomic force microscopy // Cytometry. 1999. V. 36. № 3. P. 254–264.

155. *Cerlia R.S., Takeuschi G.M., Yoshioka K., and Miyamoto H.* Imaging Plasmodium falciparum-infected ghost and parasite by Atomic Force Microscopy // J. Structural Biology. 1997. V. 119. P. 92–98.
156. *Chahwala S.B., Hickman J.A.* Effects of the antitumor drug adriamycin on human red blood cell discocyte – echinocyte transition // Cancer. Res. 1985. V. 45. № 10. P. 4986–4989.
157. *Chasis J.A., Schrier S.* Membrane deformability and capacity for shape change in the erythrocyte // Blood. 1989. V. 74. № 7. P. 2562–2568.
158. *Chen A., Moy V.T.* Cross-linking of cell surface receptors enhances cooperativity of molecular adhesion // Biophys. J. 2000. V. 78. № 6. P. 2814–2820.
159. *Cheng Y., Liu M., Li R. et al.* Gadolinium induces domain and pore formation of human erythrocyte membrane: an atomic force microscopic study // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1421. № 2. P. 249–260.
160. *Devaux P.F.* Is lipid translocation involved during endo- and exocytosis? // Biochimie. 2000. V. 82. № 5. P. 497–509.
161. *Disher D.E., Mohandas N., Evans E.A. et al.* Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and *in situ* connectivity // Science. 1994. V. 266. № 5187. P. 1032–1035.
162. *Ellis G.W.* Holomicrography, transformation of image during reconstruction a posteriori // Science. 1966. Vol. 154. P. 1195.
163. *Engel A., Lyubchenko Yu., Muller D.* Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work // Trends in Cell Biology. 1999. V. 9. P. 77–80.
164. *Engel A., Schoenenberger C.-A., Muller D.J.* High-resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy // Current Opinion in Structural Biology. 1997. № 7. P. 279–284.
165. *Fang H.H., Chan K.Y., Xu L.C.* Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy // J. Microbiol. Methods. 2000. V. 40. № 1. P. 89–97.
166. *Fang Y., Spisz T.S., Wiltshire T. et al.* Solid-State DNA. Sizing by Atomic Force Microscopy // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 2123–2129.
167. *Fornal M., Lekka M., Pyka-Foćiak G. et al.* Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope // Styczeń J. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2006. V. 35. № 1–2. P. 273–276.
168. *Freedman J.C., Bifano E.M., Crespo L.M. et al.* Membrane potential and cytotoxic Ca^{2+} -cascade of human red blood cells // Cell. Physiol. Blood: 41st Annu. Simp. Soc. Gen. Physiol. New York, 1988. P. 217–231.
169. *Fritz J., Katopodis A.G., Kolbinger F., and Anselmetti D.* Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 21. P. 12283–12288.
170. *Gabor D.* A new microscopy principle // Nature. 1946. V. 161. P. 777–778.
171. *Gimsa J.* A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape // Biophys. J. 1998. V. 75. № 1. P. 568–569.
172. *Gimsa J., Ried C.* Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // Mol. Membr. Biol. 1995. V. 12. № 3. P. 247–254.
173. *Girasole M., Cricenti A., Generosi R. et al.* Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study // J. Microsc. 2001. V. 204. № 1. P. 46–52.

174. *Girasole M., Cricenti A., Generosi R. et al.* Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridinic drug // *Appl. Phys. Letters*. V. 76. № 24. P. 3650–3652.
175. *Glaeser R.M.* In introduction to Analytical Electron Microscopy / Eds. J.J. Hren, J.I. Goldstein, D.C. Joy. New York: Plenum, 1980. 423 p.
176. *Glaeser R.M., Taylor K.A.* Radiation damage relative to transmission electron microscopy of biological specimens at low temperature: a review // *J. Microsc.* 1978. V. 112. № 1. P. 127–128.
177. *Gratzer W.B.* The red cell membrane and its cytoskeleton // *Biochem. J.* 1981. V. 198. № 1. P. 1–8.
178. *Gudi S.R.P., Kumar A., Bhakuni V. et al.* Membrane skeleton-bilayer interaction is not the major determinant of membrane phospholipids asymmetry in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes*. 1990. V. 1023. № 1. P. 63–72.
179. *Hansma H.G., Pietrasanta L.* Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies // *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998. V. 2. P. 579–584.
180. *Hashimi A.N., Salemutdin M.* Phenilhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996. V. 40. № 3. P. 543–550.
181. *Hattori A.* Scanning electron microscopy of human peripheral blood cells // *Acta Haemat. Jap.* 1972. V. 35. № 4. P. 457–482.
182. *Hayes T.L., Pease R.F.* The scanning electron microscope: principles and applications in biology and medicine // *Adv. Biol. Med. Phys.* 1968. V. 12. P. 85–137.
183. *Hoh J.H., Schoenenberger C.A.* Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy // *J. Cell. Sci.* 1994. V. 107. P. 1105–1114.
184. *Iida K., Whitlow M.B., Nussenzweig V.* Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement // *J. Immunol.* 1991. V. 147. № 8. P. 2638–2642.
185. *Kamruzzahan A.S., Kienberger F., Stroh C.M. et al.* Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM // *Hinterdorfer P. Biol. Chem.* 2004. V. 385. № 10. P. 955–960.
186. *Kataoka N., Iwaki K., Hashimoto K., et al.* Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 24. P. 15638–15643.
187. *Klokouzas A., Wu C.-P., van Veen H.W. et al.* cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. The roles of the multidrug resistance-associated proteins, MRP1, MRP4 and MRP5 // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. № 18. P. 3696.
188. *Kon K., Murakami J.-K.* Shape change of erythrocytes by calmodulin inhibitors // *J. Pharmacobio.* 1987. V. 10. № 5. P. 121.
189. *Kuznetsov Y.G., Malkin A.J., McPherson A.* Atomic Force Microscopy studies of living cells: visualization of motility, division, aggregation, transformation, and apoptosis // *J. Struct. Biology.* 1997. V. 120. P. 180–191.

190. *Lawrens C., Atac B.* Hematological change in massive burn injury // *Crit. Care Med.* 1992. V. 20. № 9. P. 1284–1288.
191. *Leith E.N., Upatnieks J.* Reconstructed wavefronts and communication theory // *J. Opt. Soc. Am.* 1962. V. 52. P. 1123.
192. *Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G. et al.* Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope // *Styczeń J. Biorheology.* 2005. V. 42. № 4. P. 307–317.
193. *Ligi F., Ciacci C., Palma F., Palma F.* Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membrane // *Comparat. Biochem. Physiol.* 1998. V. 121. № 3. P. 265–273.
194. *Liu F., Burgess J., Mizukami H., Ostafin A.* Sample preparation and imaging of erythrocyte cytoskeleton with the atomic force microscopy // *Cell Biochem. Biophys.* 2003. V. 38. № 3. P. 251–270.
195. *Longster G.H., Buckley T., Sikorski J.* Scanning electron microscope studies of red cell morphology // *Vox. Sang.* 1972. V. 22. № 2. P. 161–169.
196. *Malick L.E., Wilson R.B.* Modified thiocarbonylhydrazide procedure for scanning electron microscopy: routine use for normal, pathological, or experimental tissues // *Stain. Technol.* 1975. V. 50. № 4. P. 265–269.
197. *McGough A.M., Josephs R.* On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeletons // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 13. P. 5208–5212.
198. *Mircevska L., Vitoria L., Rehockova H.* Dual effect of calcium on erythrocyte membrane contraction // *Haematologia.* 1989. V. 22. № 1. P. 3–10.
199. *Moor D.J., Sills R.H., Mendelsohn R.* Conformational order of specific phospholipids in human erythrocytes: correlations with changes in cell shape // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 3. P. 660–664.
200. *Mosior M., Mikolajczak A., Gomulkiewicz I.* The effect of ATP on the order and the mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes.* 1990. V. 1022. № 3. P. 361–364.
201. *Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Bukharaev A.A.* Local elastic properties of biological materials studied by SFM International Workshop // *Scanning Probe Microscopy-2002.* Nizhny Novgorod, 02.03–05.03.2003. P. 266.
202. *Müller D.J., Schoenenberger C.-A., Büldt G., Engel A.* Immunoatomic force microscopy of purple membrane // *Biophys. J.* 1996. V. 70. № 4. P. 1796–1802.
203. *Nagao E., Dvorak J.A.* Phase imaging by Atomic Force Microscopy: analysis of living homeothermic vertebrate cells // *Biophys. J.* 1999. Vol. 76. P. 3289–3297.
204. *Nagao E., Kaneko O., Dvorak J.A.* Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by Atomic Force Microscopy // *J. Struct. Biology.* 2000. V. 130. P. 34–44.
205. *Nagao E., Nishijima H., Akita S. et al.* The cell biological application of carbon nanotube probes for atomic force microscopy: comparative studies of malaria-infected erythrocytes // *J. Electron. Microsc. (Tokyo).* 2000. V. 49. № 3. P. 453–458.
206. *Naumov P.A., Zaitsev B.N., Kovynev I.B. et al.* Atomic force microscopy of blood cells of patients with hematological diseases // *International Workshop*

- «Scanning Probe Microscopy-2004», Nizhny Novgorod, 02.05–06.05.2004 P. 249–250.
207. *Noji S., Taniguchi S., Kon H.* Spin label study of erythrocyte deformability. Ca^{2+} -induced loss of deformability and the effects of stomatocytogenic reagents on the deformability loss in human erythrocytes in shear flow // *Biophys. J.* 1987. V. 52. № 2. P. 221–227.
208. *Nowakowski R., Luckham P.* Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy // *Surf. Interface Anal.* 2002. V. 33. P. 118–121.
209. *Nowakowski R., Luckham P., Winlove P.* Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1514. № 2. P. 170–176.
210. *Nurgazizov N.I., Bukharaev A.A., Mozhanova A.A., et al.* Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by atomic force microscopy // *International Workshop «Scanning Probe Microscopy-2002»*, Nizhny Novgorod, 02.03–05.03.2003. P. 29.
211. *Ohta Y., Okamoto H., Kanno M., Okuda T.* Atomic force microscopic observation of mechanically traumatized erythrocytes // *Artif. Organs.* 2002. V. 26. № 1. P. 10–17.
212. *O'Reilly M., McDonnell L., O'Mullane J.* Quantification of red blood cells using atomic force microscopy // *Ultramicroscopy.* 2001. V. 86. № 1–2. P. 107–112.
213. *Pirker R., Krajcnik G., Zochbauer S. et al.* Paclitaxel/cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) // *Ann. Oncol.* 1995. V. 6. № 8. P. 833–835.
214. *Radmacher M.* Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope // *Methods Cell Biol.* 2002. V. 68. P. 67–90.
215. *Reimer L.* In *Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis* / Eds. B.M. Siegal, D.R. Beamon, J. Wiley. New York, 1975. P. 231.
216. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
217. *Ros R., Schwesinger F., Anselmetti D. et al.* Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules // *PNAS.* 1998. V. 95. Issue 13. P. 7402–7405.
218. *Salsbury A.J., Clarke J.A.* New method for detecting changes in the surface appearance of human red blood cells // *J. Clin. Path.* 1967. V. 20. P. 603.
219. *Schilcher K., Hinterdorfer P., Gruber H.J., Schindler H.* A non-invasive method for the tight anchoring of cells for scanning force microscopy // *Cell Biol. Int.* 1997. V. 21. № 11. P. 769–778.
220. *Smith J.E.* Erythrocyte membrane: structure, function and pathophysiology // *Vet. Pathol.* 1987. V. 24. № 6. P. 471–476.
221. *Strasser S., Zink A., Kada G., et al.* Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy // *Forensic Sci. Int.* 2007. V. 170. № 1. P. 8–14.
222. *Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., et al.* Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by Atomic Force Microscopy // *Biophys. J.* 1998. V. 74. № 5. P. 2171–2183.
223. *Tishko T.V., Titar V.P., Tishko D.N.* Application of the digital holographic microscope for investigation of human red blood cells // *Proceedings of 2nd*

- International Conference on Advanced Optoelectronics and Lasers (CAOL-2005). 2005. V. 1. P. 284–287.
224. *Undeen A.H., Vavra J.I.* Research methods for entomopathogenic Protozoa // Lacey LA ed. Manual of techniques in insect pathology. San Diego Academic Press, 1997. P. 117–151.
225. *Ushiki T., Hitomi J., Umemoto T. et al.* Imaging of living cultured cells of an epithelial nature by atomic force microscopy // Arch. Histol. Cytol. 1999. V. 62. № 1. P. 47–55.
226. *Van Ligten R.F., Ostenberg H.* Holographic microscopy // Nature. 1966. V. 211. P. 282.
227. *Villarrubia J.S.* Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation // J. Research of the National Institute of Standards and Technology. 1997. V. 102. № 4, P. 135–140.
228. *Vinckier A., Semenza G.* Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy // FEBS Letters. 1998. V. 430. P. 12–16.
229. *Wagner P.* Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy // FEBS Letters. 1998. V. 430. P. 112–115.
230. *Wong P.* A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // J. Theor. Biol. 1999. V. 196. № 3. P. 343–361.
231. *Wustner D., Pomorski T., Herrmann A., Muller P.* Release of phospholipids from erythrocyte membranes by taurocholate is determined by their transbilayer orientation and hydrophobic backbone // Biochemistry. 1998. V. 37. № 48. P. 17093–17104.
232. *You H.X., Lau J.M., Zhang S., Yu L.* Atomic force microscopy imaging of living cells: a preliminary study of the disruptive effect of the cantilever tip on cell morphology // Ultramicroscopy. 2000. V. 82. № 1–4. P. 297–305.
233. *Zaitsev B., Durymanov A., Bakulina L., Generalov V.* Studies of erythrocyte changes caused by the viruses using atomic force microscopy // G.I.T. Imaging & Microscopy. 2003. V. 5. № 2. P. 14–17.
234. *Zaitsev B.N., Durymanov A.G., Generalov V.M.* Atomic force microscopy of the interaction of erythrocyte membrane and virus particles // International Workshop «Scanning Probe Microscopy-2002», Nizhniy Novgorod, 03.03–06.03.2002. Proceedings, P. 211–213.
235. *Zhang P.C., Bai C., Huang Y.M., et al.* Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells // Scan. Microsc. 1995. V. 9. № 4. P. 981–989.

Научное издание

Новицкий Вячеслав Викторович
Рязанцева Наталья Владимировна
Степовая Елена Алексеевна
Шевцова Наталья Михайловна
Миллер Андрей Александрович
Зайцев Борис Николаевич
Тишко Татьяна Васильевна
Титарь Владимир Петрович
Тишко Дмитрий Николаевич

**ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА
МИКРОСКОПИИ ЭРИТРОЦИТА**

Редактор **А.В. Базавлук**
Корректор **Е.В. Литвинова**
Технический редактор **О.А. Турчинович**
Оригинал-макет издательства **«Печатная мануфактура»**

Лицензия ИД № 03931 от 07.02.2001.

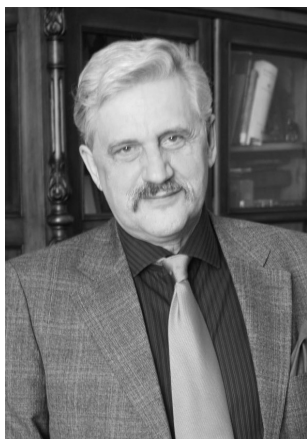
Подписано в печать 25.01.2008.

Формат 60×84¹/₁₆. Печать офсетная. Бумага мелованная.

Гарнитура «Кудряшов». Печ. л. 9,5. Усл. печ. л. 8,84. Уч.-изд. л. 10,2.

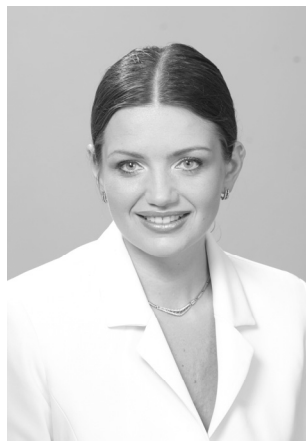
Тираж 1000 экз. Заказ № 811.

ООО «Печатная мануфактура».
634055, г. Томск, а/я 3967.
Тел./факс: (3822) 493-119.
E-mail: pechat@tomsk.ru



Новицкий Вячеслав Викторович — академик РАМН, профессор, заслуженный деятель науки России, заведующий кафедрой патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета. Автор свыше 500 научных работ в области теоретической гематологии, патофизиологии, цитологии и клеточной биологии, в том числе 19 монографий, атласа, 2 учебников по патофизиологии для студентов медицинских вузов. Подготовил более 25 докторов и 80 кандидатов наук.

Рязанцева Наталья Владимировна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фундаментальных основ клинической медицины Сибирского государственного медицинского университета. Автор более 300 научных работ в области молекулярной патофизиологии, патологии клетки, в том числе 10 монографий, атласа электронных микрофотографий клеток крови при патологии. Подготовила 5 докторов и 23 кандидата наук.



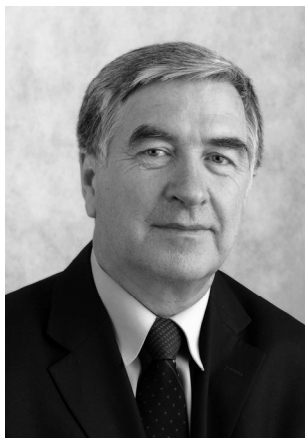
Степová Елена Алексеевна — доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета. Автор более 120 работ в области патофизиологии, биохимии, цитологии и клеточной биологии, в том числе 4 монографий, атласа. Подготовила 2 докторов и 2 кандидатов наук.

Шевцова Наталья Михайловна — доктор медицинских наук, заведующая сектором гематологии и электронной микроскопии Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета. Автор 70 работ в области патофизиологии, цитологии и клеточной биологии, в том числе 2 монографий.



Миллер Андрей Александрович — кандидат физико-математических наук, начальник лаборатории электронной микроскопии филиала ФГУП «НПО „Микроген“ МЗиСР РФ в г. Томске НПО „Вирион“». Область научных интересов — электронная микроскопия клеток крови, наночастиц. Автор 25 научных публикаций.

Зайцев Борис Николаевич — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник отдела микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“». Специалист в области экспериментальной и атомно-силовой микроскопии. Автор более 50 научных публикаций.





Тишко Татьяна Васильевна — научный сотрудник лаборатории радио- и оптической голографии радиофизического факультета Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (г. Харьков, Украина). Автор более 40 работ в области голографической интерференционной микроскопии фазовых микрообъективов, исследовании трехмерной морфологии эритроцитов крови.

Титарь Владимир Петрович — кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией радио- и оптической голографии радиофизического факультета Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (г. Харьков, Украина), директор института голографии Академии наук прикладной радиоэлектроники. Автор более 150 научных работ в области оптической голографии и интерферометрии.



Тишко Дмитрий Николаевич — младший научный сотрудник лаборатории радио- и оптической голографии радиофизического факультета Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина (г. Харьков, Украина). Автор 12 работ в области голографической интерференционной микроскопии фазовых микрообъективов и исследовании трехмерной морфологии клеток крови.