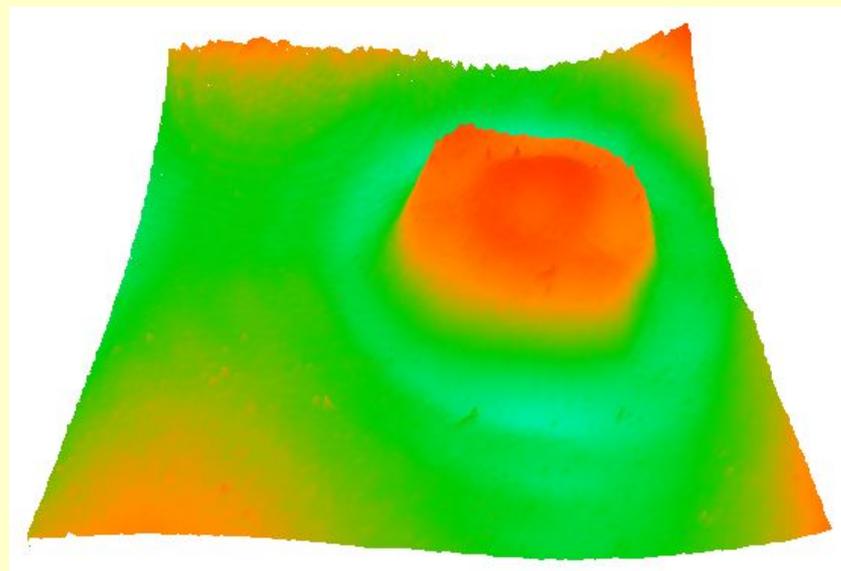
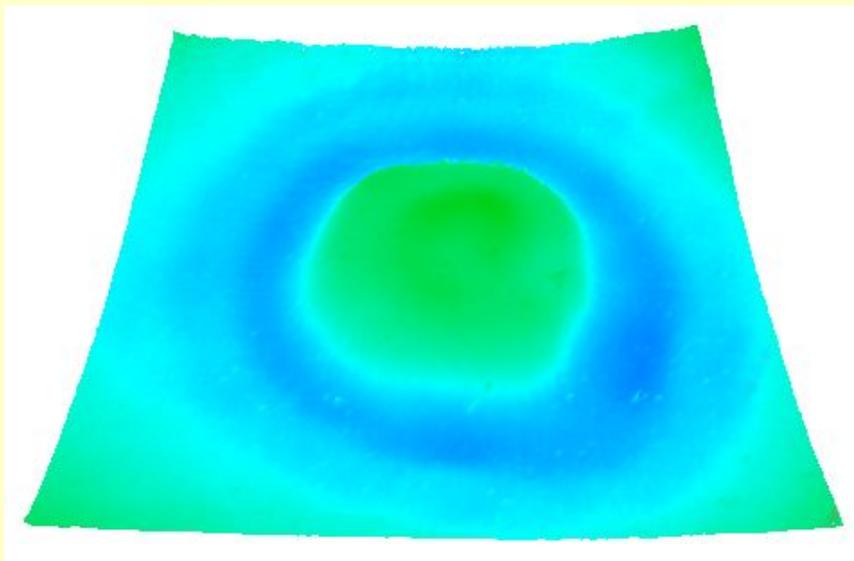


ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК



Использование различных методов микроскопии для исследования биологических объектов

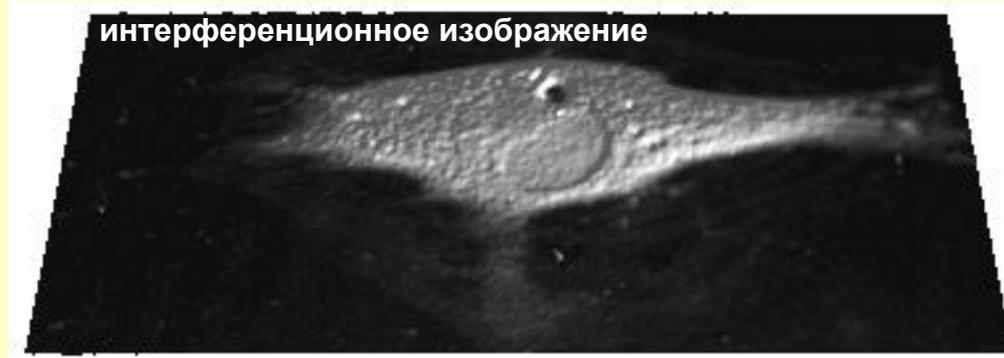


Биологические объекты, как правило, бесцветны и обладают низким контрастом для их визуализации необходимо

улучшение контраста

Увеличить контраст можно за счет увеличения интенсивности отдельных участков клетки (например использование красителей — увеличивается различие интенсивности между соседними окрашенными и неокрашенными органеллами клетки)

Также можно увеличить контраст изображения за счет регистрации изменения фазы образца и ее преобразования в видимое глазом изменение амплитуды. Это позволяет получить изображение живых объектов с их минимальными модификациями



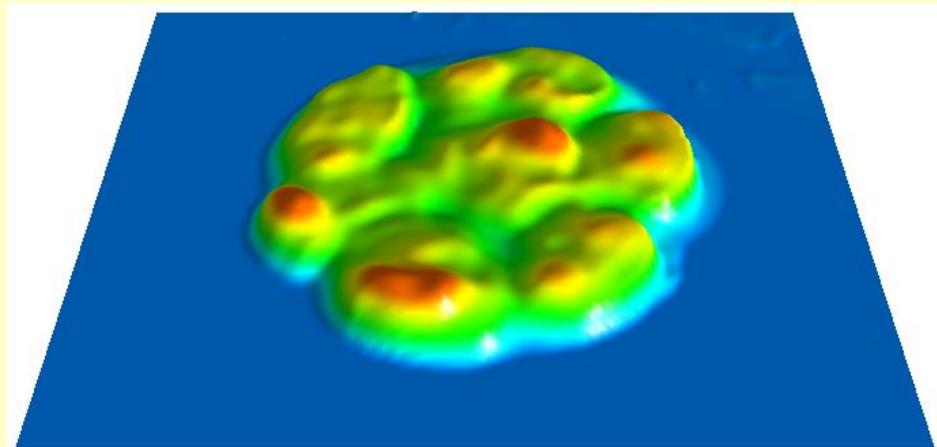
Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) относится к таким методам

Особенности ЛИМ

Помимо увеличения контраста и разрешения лазерная интерференционная микроскопия позволяет количественно оценить изменения показателя преломления и толщины биологических объектов, пропорциональные оптической плотности образцов

(то есть, используя ЛИМ можно получать функциональные изображения объектов, аналогично атомно-силовой микроскопии)

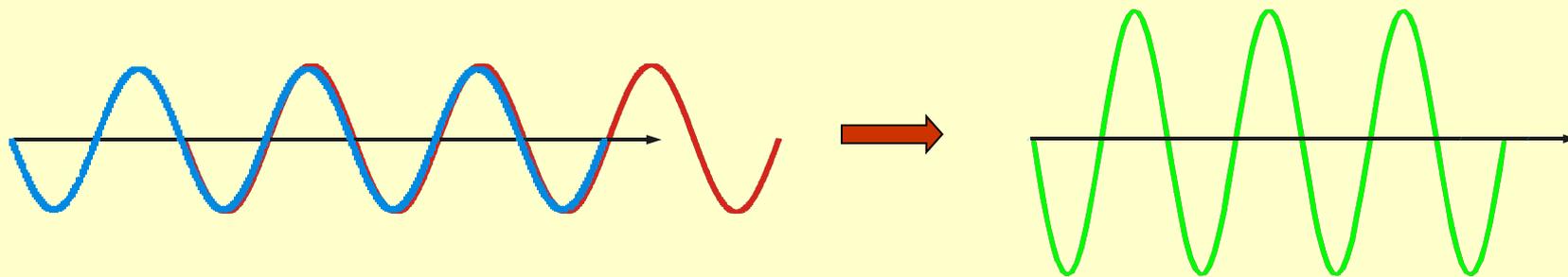
Таким образом можно получать трехмерные изображения объектов, причем высота в каждой точке объекта будет пропорциональна локальному изменению оптической плотности



Основные принципы ЛИМ

Луч лазера, являющегося источником освещения, разделяется на два луча: луч проходящий через образец и контрольный луч, используемый для сравнения.

В детекторе эти два луча интерферируют между собой. Поскольку лучи проходят через разные оптические среды, они имеют разную скорость продвижения, т. е. происходит сдвиг фазы. Таким образом за одно и тоже время лучи проходят различный оптический путь



Оптическая разность хода лучей, называемая оптическая разность хода (ОРХ), связана с разностью фаз этих лучей, Θ , соотношением:

$$ОРХ = \frac{\Theta}{2\pi} \frac{\lambda}{2}$$

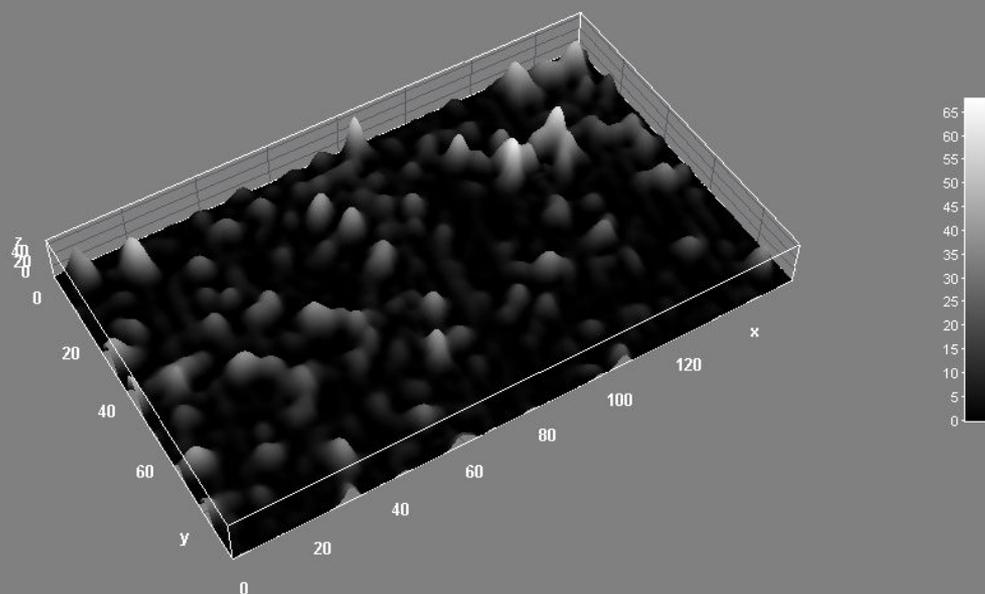
Величина ОРХ, пропорциональна показателю преломления и толщине образца. Значение фазовой высоты зависит от размеров и свойств образца

Разрешение ЛИМ

Латеральное разрешение определяется, аналогично традиционным оптическим микроскопам, критерием разрешения Релея и составляет величину около **0,5 мкм**.

Вертикальное разрешение может достигать величины порядка **1 нм**.

Коллоиды серебра в физиологическом растворе

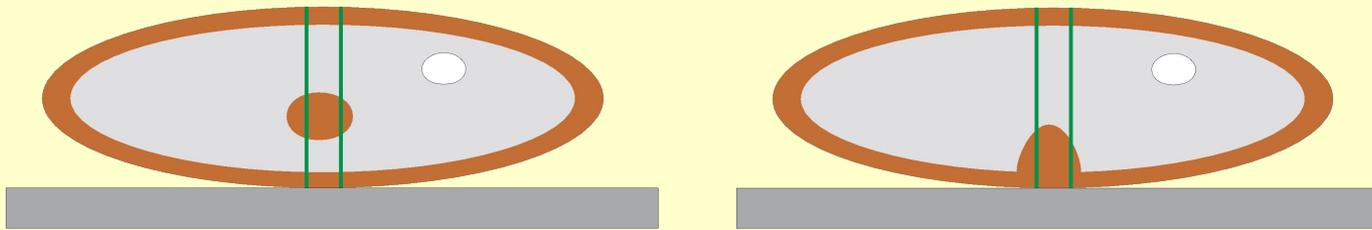


Особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ

Экспериментально измеряемая при помощи ЛИМ оптическая разность хода (ОРХ), или фазовая высота, в каждой точке плоскости объекта представляет из себя сумму произведений показателя преломления на толщину различных оптических сред в этой точке (напр. клеточных органелл). z и n – толщина и показатель преломления оптической среды, соответственно:

$$ОРХ = (n_1 z_1 + n_2 z_2 + \dots + n_n z_n) - n_m z$$

Нельзя разделить эти два случая



От перемены мест слагаемых сумма не меняется

$$n_5 z_5 + n_4 z_4 + n_3 z_3 + n_2 z_2 + n_1 z_1 - n_m z = n_1 z_1 + n_2 z_2 + n_3 z_3 + n_4 z_4 + n_5 z_5 - n_m z = OPD$$

3D форма объекта отличается от его 3D фазового изображения!

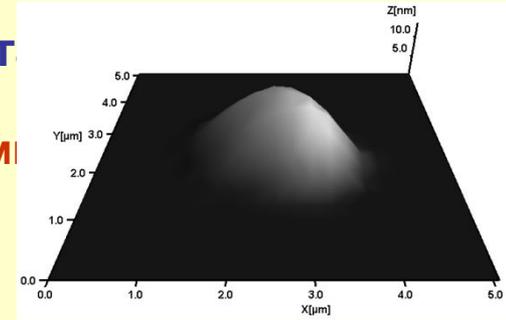
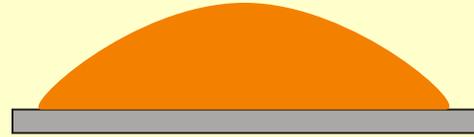
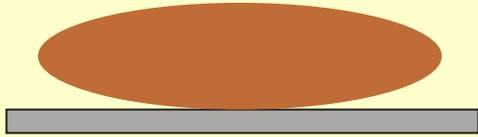
Особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ

Стр 8 из 58

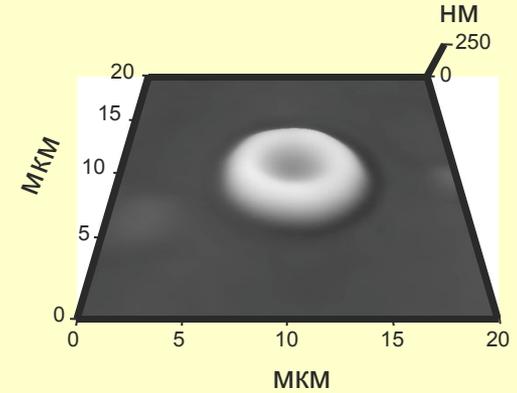
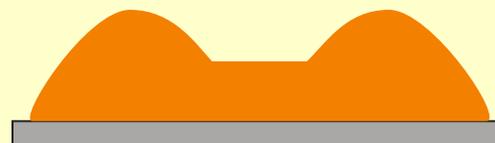
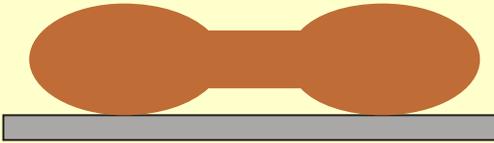
сечение реального
объекта

сечение фазового портрета

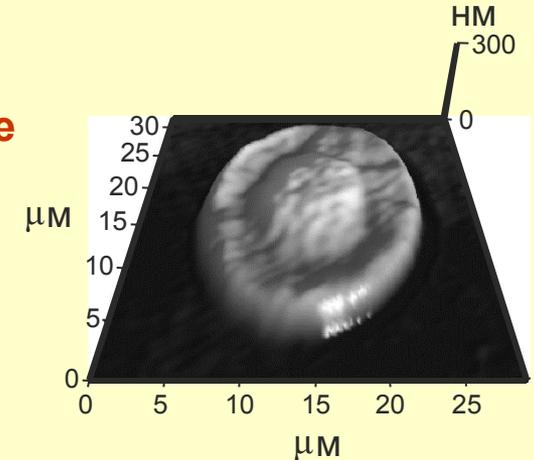
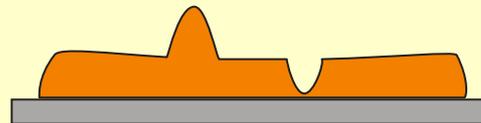
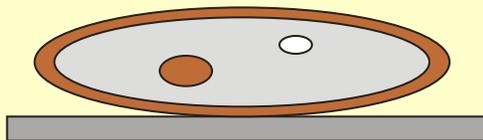
однородные клетки сферической или цилиндрической формы



однородные клетки более сложной формы (эритроциты)

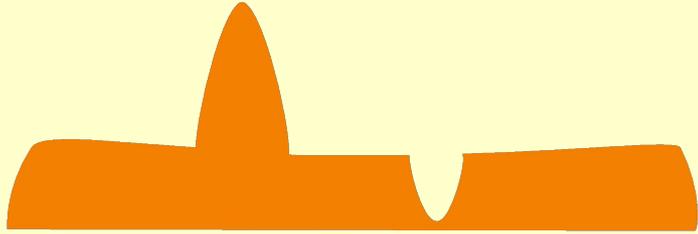


гетерогенные объекты (большинство клеток в том числе нейроны пиявки и прудовика)



Интерпретация изменения фазовой ВЫСОТЫ

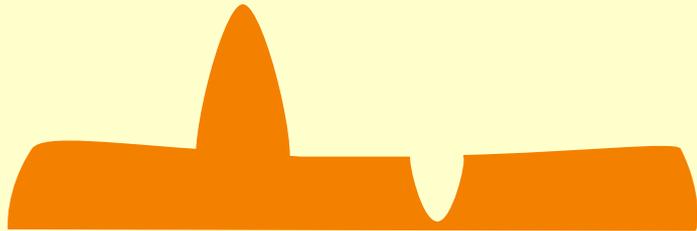
Продольное сечение фазового изображения $\Phi(x)$



ЛИМ микроскоп оценивает значение OPX , Φ , в каждой точке объекта

$$OPX = (n - n_0) \cdot z$$

Если величина Δn известна, то можно оценить толщину объекта и рассчитать его объем (напр., в случае эритроцитов)



Если известно изменение величины толщины (объема) то можно оценить изменение показателя преломления объекта. Изменение показателя преломления свидетельствует об изменении свойств объекта

Связь ОРХ с количеством вещества

Показатель преломления связан с концентрацией (m/V)

$$n = n_0 + \alpha C$$

n_0 - показатель преломления среды

α - экспериментально определяемый коэффициент, зависящий от рода вещества

В упрощенном виде объем есть произведение площади, S , на толщину, z

$$V = z \cdot S$$

$$ОРХ = (n - n_0) \cdot z$$

При этом величина ОРХ пропорциональна концентрации вещества, а произведение ОРХ на площадь пропорционально количеству вещества

$$ОРХ = \alpha C \cdot z \quad ОРХ = \alpha C \cdot zS = \alpha \frac{m}{V} \cdot V = \alpha m$$

α – зависит от показателей преломления вещества и среды, а также от удельной плотности вещества, ρ

$$\alpha = \frac{n - n_0}{\rho}$$

Основные используемые формулы

Показатель преломления связан с концентрацией

$$n = n_0 + \alpha C$$

Зная объем объекта можно рассчитать его показатель преломления

Зная показатель преломления объекта можно рассчитать его показатель преломления

$$n = \frac{\Phi S}{V_{\text{геом}}} + n_0$$

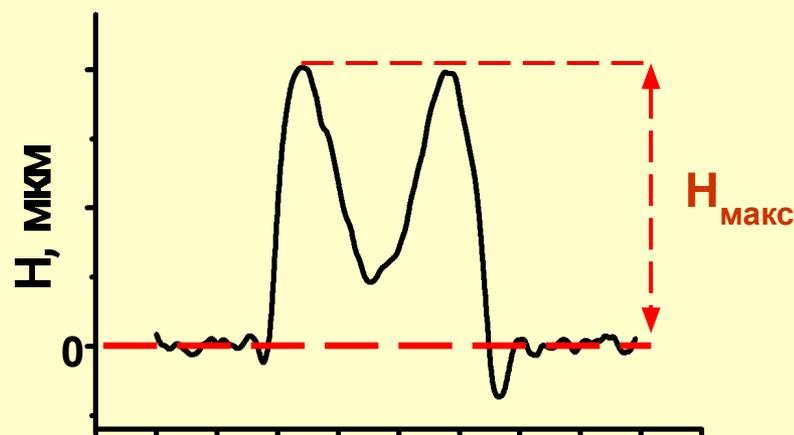
$$V = \frac{\Phi S}{(n - n_0)}$$

Из измеряемых параметров средней величины ОРХ и площади можно рассчитать количество вещества в клетке

$$m = \frac{\rho}{(n - n_0)} \Phi_{\text{mean}} S$$

Один из наиболее простых способов оценки состояния эритроцитов это оценка их объема

Определение высоты и объема эритроцитов при помощи ЛИМ



$H_{\text{макс}}$ — максимальное значение высоты объекта

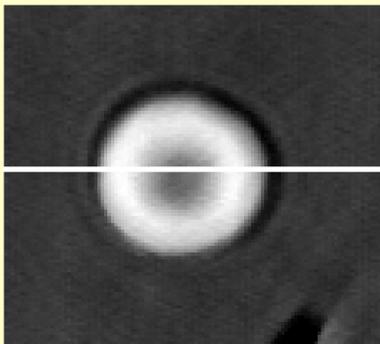
$H_{\text{среднее}}$ — среднее значение высоты, определяемое как сумма высот всех точек объекта, деленное на их количество.

Фазовый объем определяется как произведение средней высоты объекта на его площадь.

Фазовый объем, пропорционален фазовой высоте и, соответственно, пропорционален изменению как геометрических изменений клетки, так и изменению ее внутренних свойств, выражающихся в изменении показателя преломления клетки

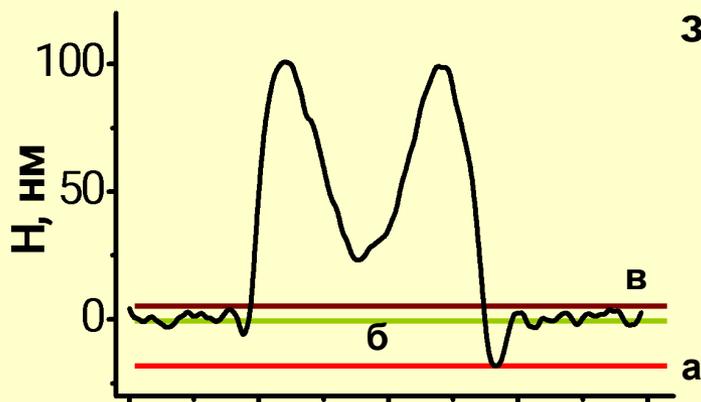
Определение размеров клеток

Определение площади объектов



Самый простой и используемый способ оценить площадь объектов это вычислять их, используя фоновое значение. Каждый объект, представляется как “остров”, окруженный “морем”, т.е. участками изображения, имеющего фоновое значение (или как “озеро”, окруженное “сушей”, в случае пор).

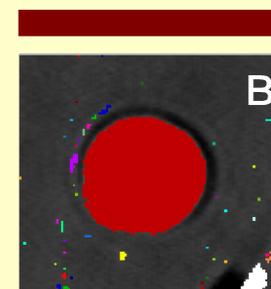
Изменение фонового значения приводит к значительным изменениям площади объектов.



$H = -20$ нм



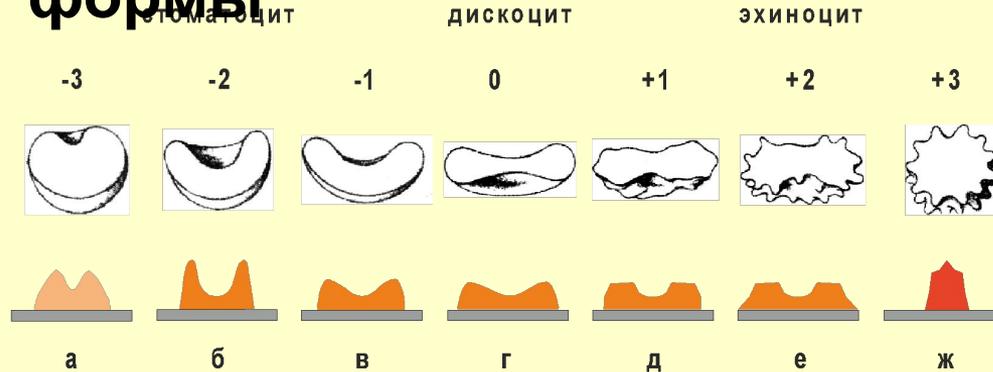
$H = 0$ нм



$H = 5$ нм

Какие характеристики эритроцитов можно измерить с помощью ЛИМ

Оценка формы



- а) стоматоцит 3-го порядка;
- б) стоматоцит 2-го порядка
- в) стоматоцит 1-го порядка;
- г) дискоцит;
- д) эхиноцит 1-го порядка;
- е) эхиноцит 2-го порядка;
- ж) эхиноцит 3-го порядка

морфологический индекс

Каждой клетке присваивался определенный балл в соответствии с ее формой.

Стоматоцитам третьего типа присваивалось значение -3, второго -2, первого -1, дискоцитам 0, эхиноцитам первого типа +1, второго +2, третьего +3.

Морфологический индекс определялся как отношение суммы баллов, характеризующих клетки, деленной на общее количество клеток

Площадь фазового изображения эритроцитов — экспериментально измеряемый параметр, достоверное различие площадей эритроцитов может свидетельствовать об изменении характеристик их мембран;

среднее ОРХ клетки — рассчитывалось как среднее арифметическое всех значений ОРХ, входящих в клетку, зависит от толщины клетки и количества вещества (гемоглобина), входящего в эритроцит, произведение площади на среднее значение ОРХ пропорционально содержанию гемоглобина в эритроците;

содержание гемоглобина — расчетная величина, для каждой клетки определяется как произведение среднего ОРХ на площадь эритроцита, а также константы, зависящих от молекулярных характеристик гемоглобина. Содержание гемоглобина оценивалось по формуле:

$$m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{(k_{hem} - k_0)} OPD_{mean} \cdot S$$

S- площадь эритроцита, k_0 - показатель преломления среды (при использовании смеси глицерин вода он составлял 1,40), k_0 - показатель преломления гемоглобина (принимался равным 1,615), ρ_{Hb} - удельная плотность гемоглобина, принимается равной 1,36 г/см³;

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что метод ЛИМ является эффективным и мощным средством, позволяющим не только получать изображения клеток с высоким разрешением, но и в ряде случаев количественно оценивать высоту, площадь, объем и содержание вещества в клетках. Полученные данные могут быть использованы для выявления наличия агрегации клеток и точного определения формы клеток. Используя дополнительные методы определения объема можно определять коэффициент преломления (концентрацию вещества) клеток, который может давать дополнительную информацию об изменениях, происходящих в клетке при различных воздействиях на нее

Обработка данных

Обработка изображений

Вычитание фоновой плоскости

Фильтрация случайных помех при помощи различных фильтров

Определение размеров клеток

Статистическая обработка

Описательная статистика

Дескриптивная статистика

И много чего еще

FIJI (ImageJ)

Gwiddion

Femtoskan

SPIP

Продукция компании Мекос

Семейство программ Image Pro Plus

Metamorph

И др.

Обработка изображений

вычитание фоновой плоскости

Данная процедура позволяет устранить дефекты, обусловленные следующими причинами

Постоянная составляющая



Обусловлена наличием: Жидкости ячейки, обладающей конечной толщиной, заполненной жидкостью с определенным показателем преломления



Удаляется из кадра путем вычитания

$$Z'_{ij} = Z_{ij} - \bar{Z} \quad \bar{Z} = \frac{1}{N^2} \sum_{ij} Z_{ij}$$

Постоянный наклон



Обусловлен наличием:

- неровностью подложки
- неточной установки образца относительно луча света



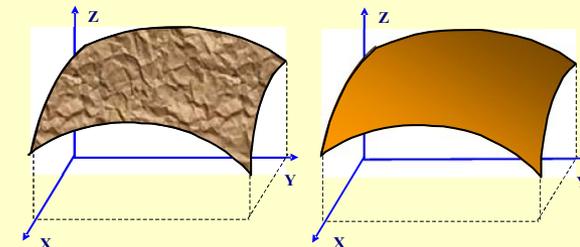
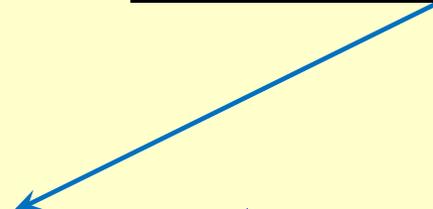
Удаляется из изображения путем вычитания постоянного наклона.

Для этого находится аппроксимирующая плоскость, которая вычитается из плоскости фазового изображения

Искажения, связанные с неравномерностью освещения



Обусловлен наличием: •Неравномерности освещения



Процедура позволяет увеличить точность и улучшить детализацию изображений

Фильтрация случайных помех при помощи различных фильтров

Случайные помехи обусловлены следующими причинами

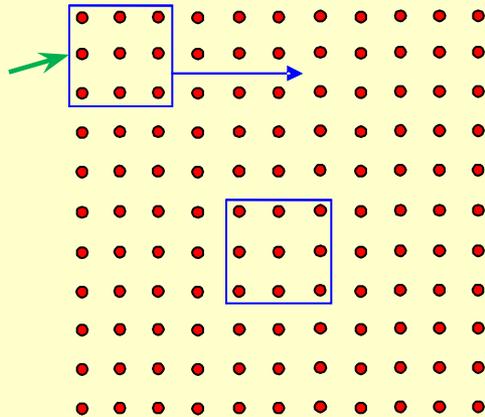
↓
Шумы аппаратуры

↓
Дефекты на матрице

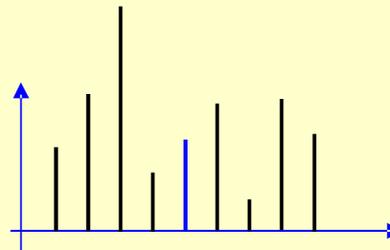
↓
Внешние акустические шумы и вибрации

↓
Устраняется из изображения в результате применения различных фильтров

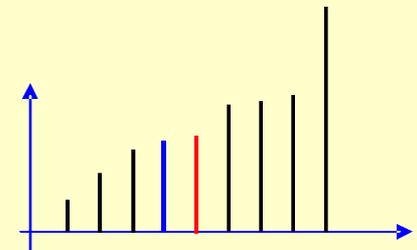
Участок применения фильтра



расположение элементов в неотсортированном массиве (синим цветом помечен центральный элемент)



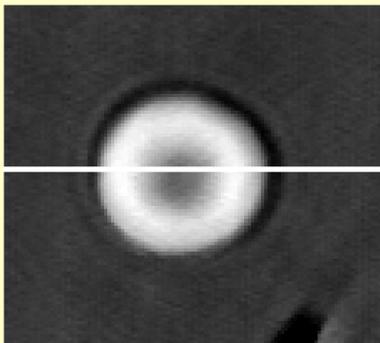
расположение элементов в отсортированном массиве (новый центральный элемент помечен красным цветом)



Процедура позволяет увеличить точность изображений

Определение размеров клеток

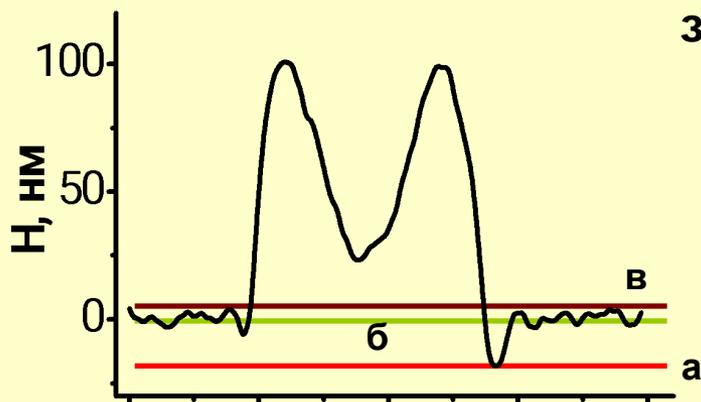
Определение границ объектов



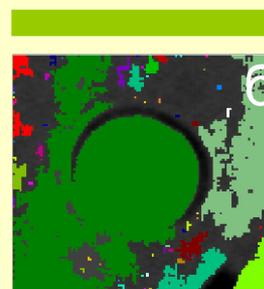
Пороговый алгоритм и его варианты

Самый простой и используемый способ оценить площадь объектов это вычислять их, используя фоновое значение. Каждый объект, представляется как “остров”, окруженный “морем”, т.е. участками изображения, имеющего фоновое значение (или как “озеро”, окруженное “сушей”, в случае пор).

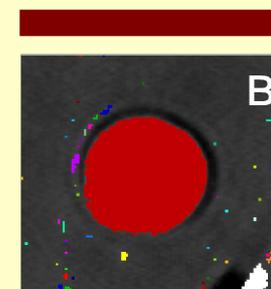
Изменение фонового значения приводит к значительным изменениям площади объектов.



$H = -20$ нм



$H = 0$ нм



$H = 5$ нм

Алгоритм водораздела и его варианты

Статистическая обработка

В последние годы требования к статистике при публикации результатов ужесточились, не все российские ученые адаптировались к этим требованиям. К счастью появилось большое количество программ, в которых все считают за вас, даже указывая на применимость или неприменимость метода. Для исследователя сейчас важно знать терминологию, чтобы нажать правильную кнопку (границы применимости методов тоже – увы, автоматический режим не всегда работает)

Программы, где можно достаточно просто обработать и представить свои данные

(хотя статистические модули есть во всех уважающих себя программах)

GraphPad Prism 7.04, GraphPad Software – проста, есть необходимый минимум и не только, есть подробный хелп по программе и статистике на сайте

Microcal Origin Pro 2018 – мощная программа для представления и обработки данных, есть подробный и понятный хелп

StatSoft, Inc. STATISTICA 10 – программа для статистических расчетов, неплохая подборка материалов о статистике на сайте

MedCalc Statistical Software version 15.8 – неплохая небольшая программа для статистических расчетов

Как правильно обработать статистические данные?

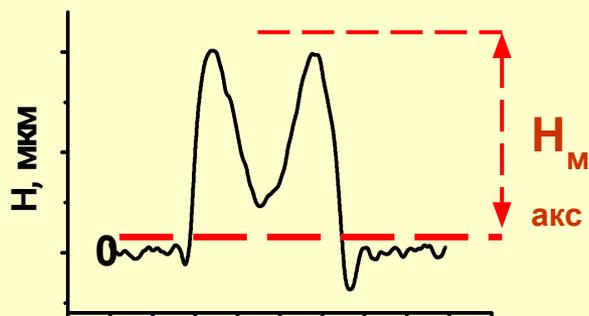
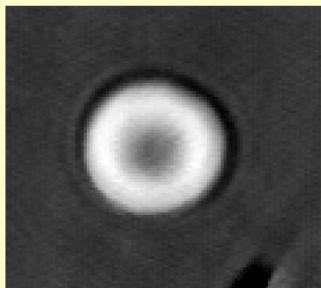
однозначного ответа нет, зависит от формы проведения эксперимента, количества экспериментальных данных, приборной погрешности и т.д.

Ниже приведены некоторые соображения по обработке статистических результатов применительно к конкретной задаче практикума по микроскопии

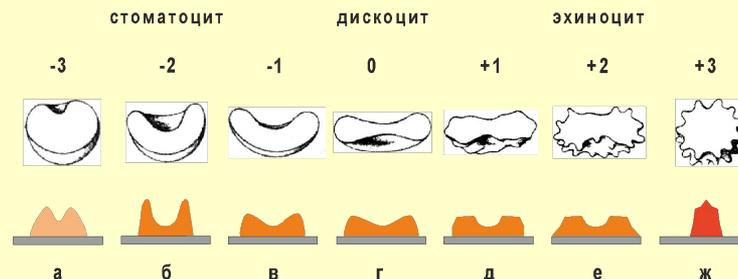
Тем не менее подобный подход применим к обработке любых микроскопических данных

Определение размеров клеток

Что можно посчитать?



Да что угодно



Площадь фазового изображения эритроцитов;
среднее ОРХ клетки;
содержание гемоглобина:

$$m = \frac{\rho_{Hb}}{(k_s - k_0)} OPD_{mean} S$$

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ

качественные

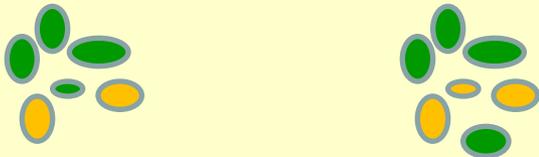
порядковые

(оценка их доли)

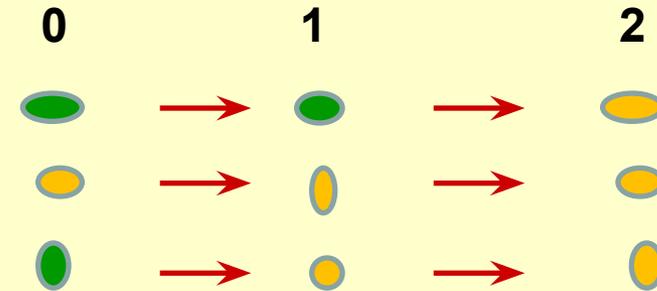
Статистическая обработка

Схема построения эксперимента

Сравниваем между собой (или с референсными значениями две или несколько проб

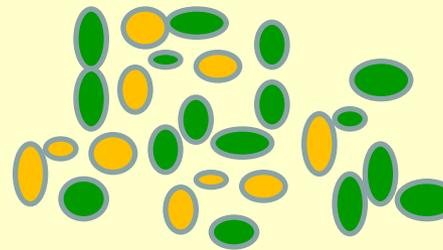


Изменение пробы во времени

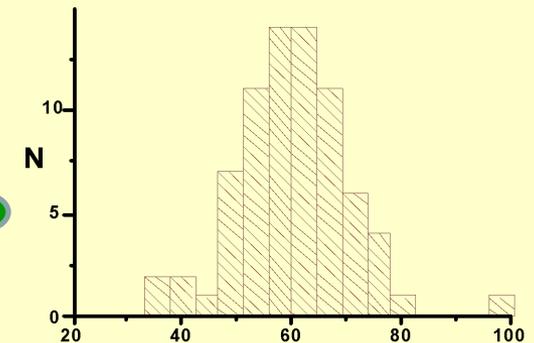


Количество объектов

Используется нормальное распределение или нет



Распределение объектов по размерам



Показатели положения экспериментальных данных на числовой оси

Среднее арифметическое

показатель центральной тенденции*, полученный делением суммы всех значений данных на число этих данных. Адекватно если у нас нормальное (!) распределение

Медиана

центральное значение признака в последовательном ряду всех полученных значений (половина объектов больше, а половина меньше).
Как вариант: медиана - 50-м перцентиль (0,5-квантиль) или второй квартиль выборки или распределения.
Медиана вместе с квартилями используется для представления дискретных или количественных переменных при ненормальном распределении.

Мода

наиболее часто встречаемое значение в выборке.
В некоторых случаях может быть две или более мод, что может свидетельствовать о наличии двух (нескольких) самостоятельных групп.

Максимальное и минимальное значение

Описательная (дескриптивная) статистика

показатели разброса, описывающие степень разброса данных

Доверительный интервал В биологических исследованиях значения параметра достаточно сильно варьирует, поэтому наиболее оптимальным описанием величины является диапазон, в который укладывается большинство значений исследуемого признака, т.е. ширина распределения. 95% доверительный интервал.

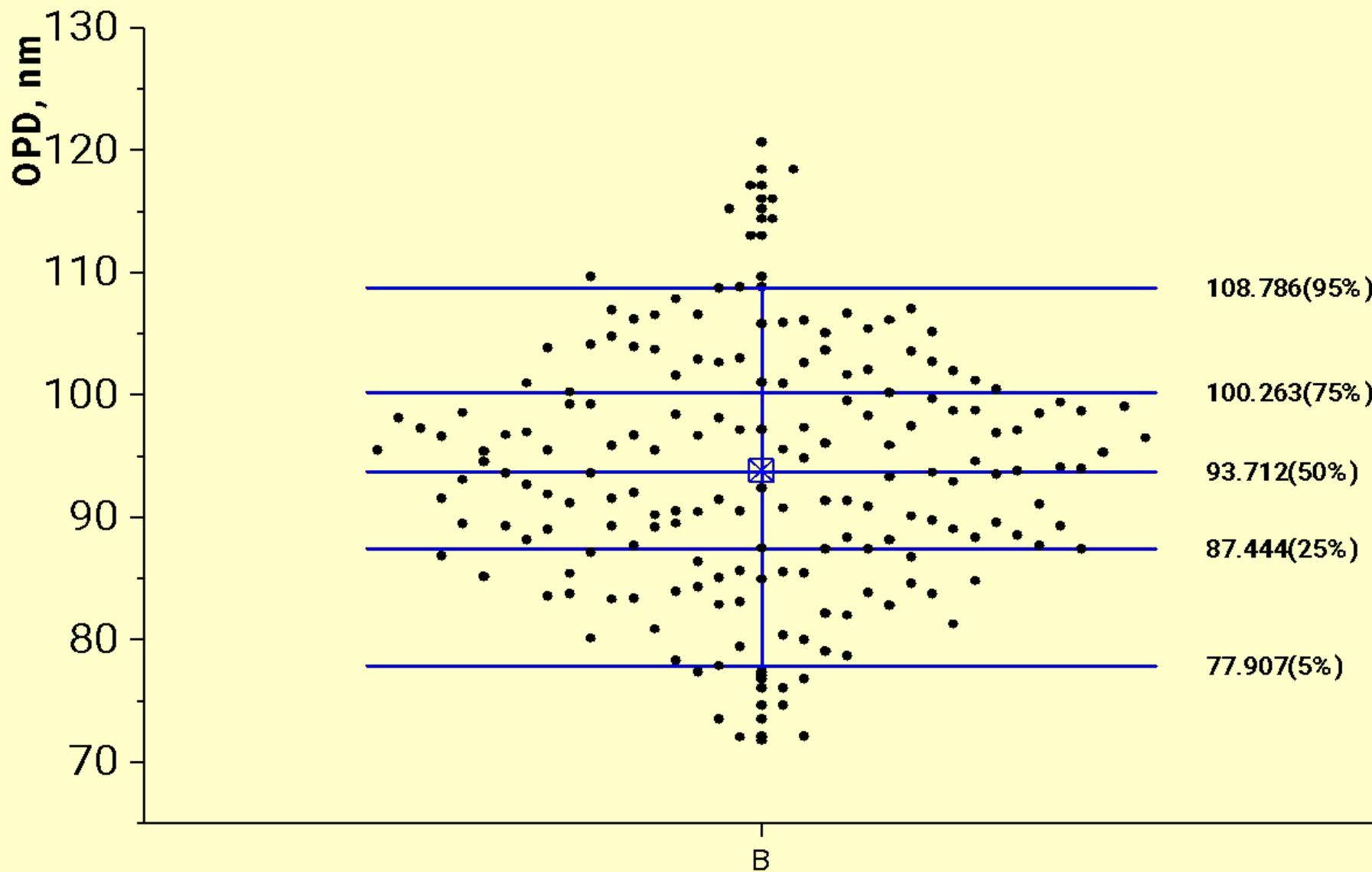
Стандартное отклонение
$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$
 Только для нормального распределения! Оценивает широту распределения, характеризует разброс данных

Стандартная ошибка среднего
$$s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$
 Только для нормального распределения! Характеризует точность нахождения среднего (если ошибка обусловлена случайными причинами)

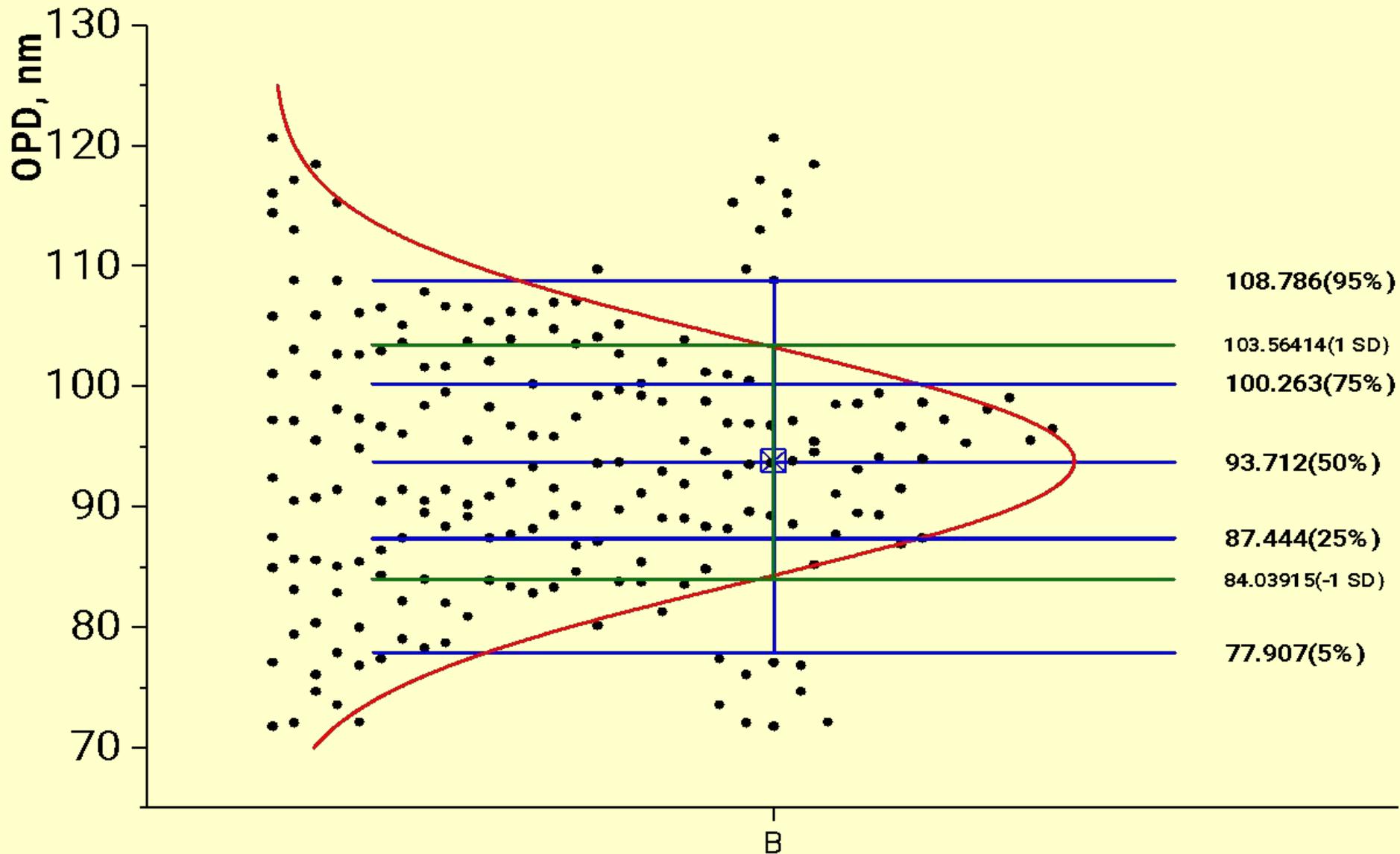
Квантили, квартили (интерквартильный размах) Квантили характеризует собой частоту попадания значений переменной в определённые интервалы. Чаще всего используется разделение на 4 интервала (25%, 50%, 75%).

При разделении на четыре квантиля (именуемых квартилями) для предоставления оценки центральной тенденции, ширины и асимметрии распределения результатов достаточно трёх чисел: нижний квартиль (попало 25% самых маленьких значений), 50% квартиль, который соответствует медиане (попало 50% значений), и верхний квартиль (попало 75% самых маленьких значений).
Интерквартильный размах - разность между верхней и нижней квартилью.

Описательная (дескриптивная) статистика



Описательная (дескриптивная) статистика



Графическое представление результатов

Количественные данные

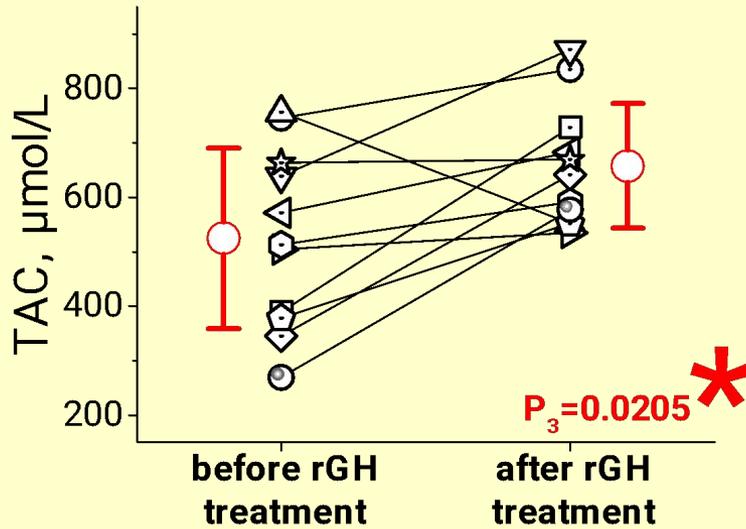
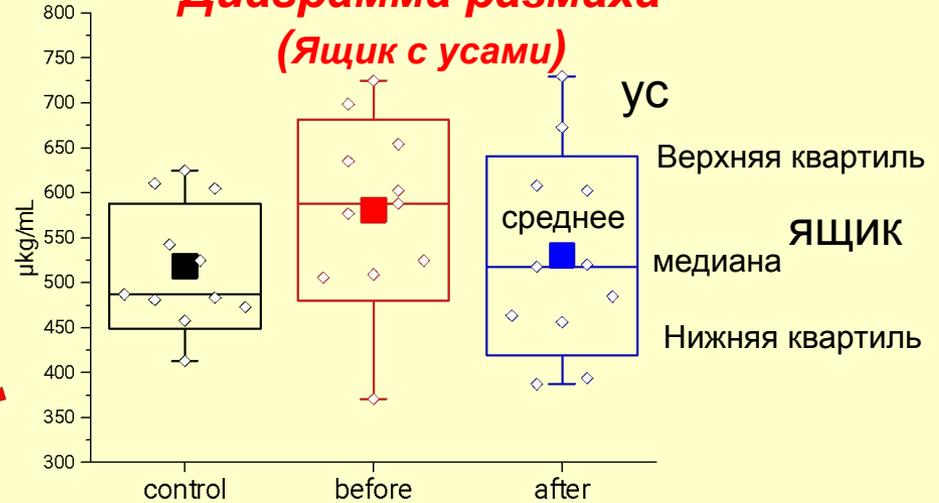


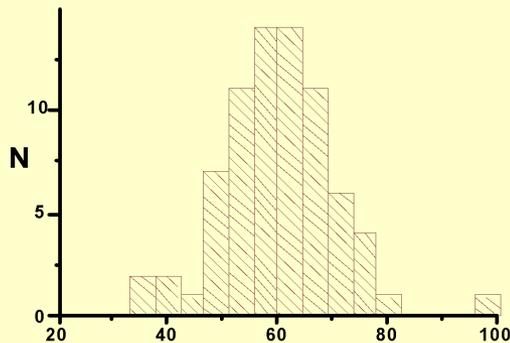
Диаграмма размаха (Ящик с усами)



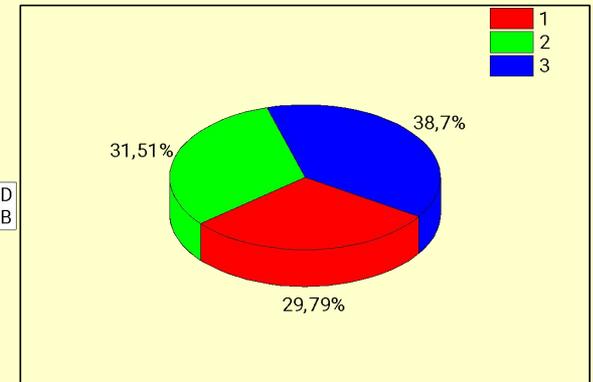
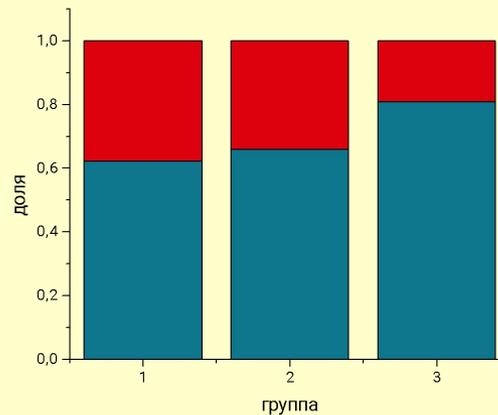
Качественные данные

Количественные данные

Гистограмма



Диаграммы



Статистическая обработка

Если у нас две выборки!

Оценка достоверности отличий между популяциями

Для этого существуют методы оценки статистической значимости отличий (дисперсионный анализ)

Принцип построения таких методов

Формулировка 0-вой гипотезы (полученные различия случайны или не случайны)

Определяем вероятность получить наблюдаемые различия при условии справедливости нулевой гипотезы

Есть параметрические (основанные на нормальном распределении – оценке дисперсии) и непараметрические

Т.е. если наша выборка является нормальным распределением – используем параметрические методы, если нет - непараметрические

Наиболее часто используемые критерии

параметрический – парный (двувывборочный) Т-тест Стьюдента (*с мод.*)

Непараметрический – Манна-Уитни U тест

Бывают для зависимых и независимых выборок

Параметрический – Т-тест (для зависимых и независимых выборок)

Непараметрический – Манн-Уитни (для независимых) Вилкоксона (для зависимых)

Статистическая обработка

Статистическая обработка измеренного параметра

Определяем нормальное ли у нас распределение

да

Находим среднее, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего

нет

Находим медиану и квартили

Строим гистограмму и корректируем данные (если есть основания)

Выбираем критерий и определяем достоверно ли отличаются пробы друг от друга

Здесь не упоминается метрология и основы обработки сигнала

ПРИМЕРЫ

Нейробластулы (стволовые клетки в культуре)

Ядерные эритроциты лягушки

Тромбоциты человека

Тучные клетки мыши

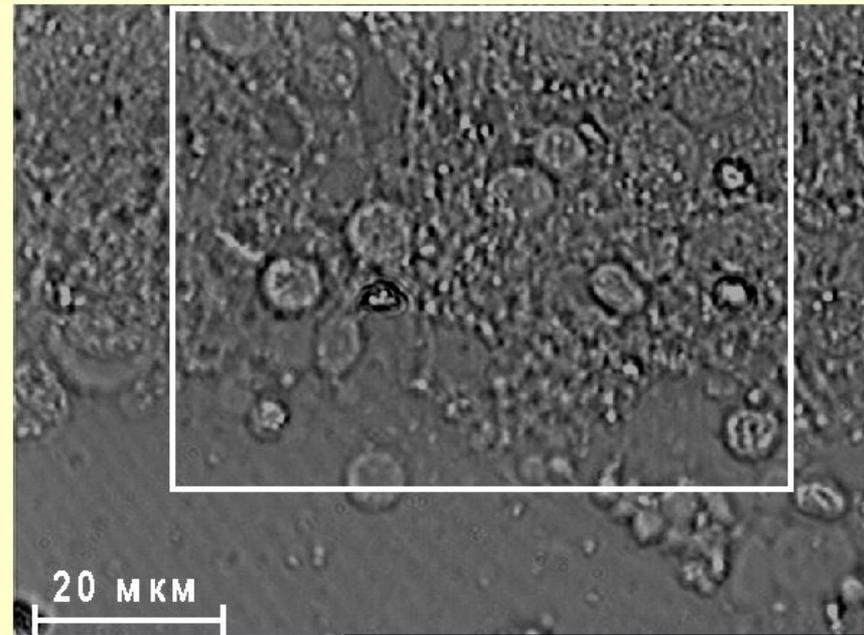
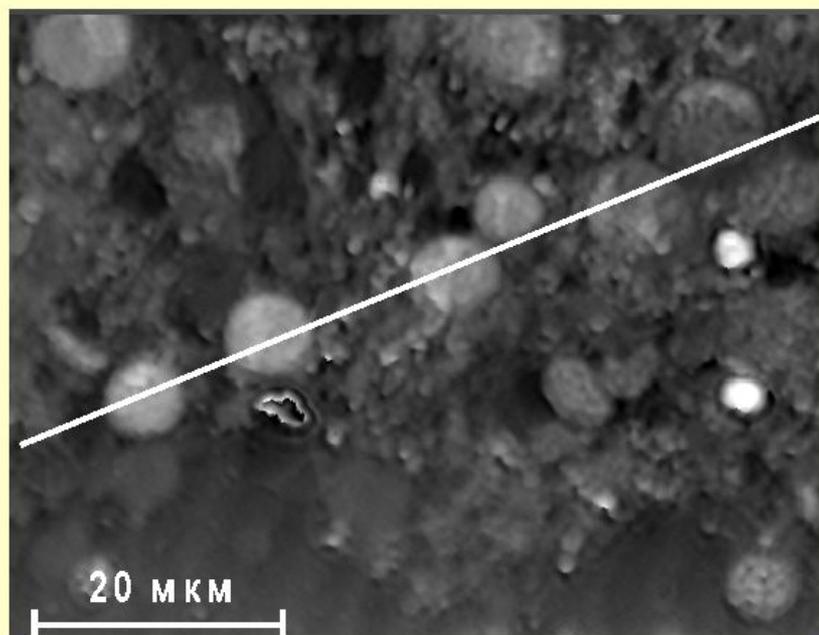
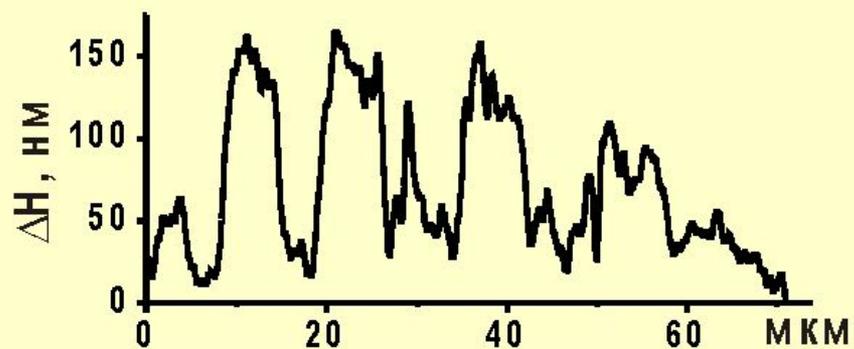
Эритроциты

Нервное волокно

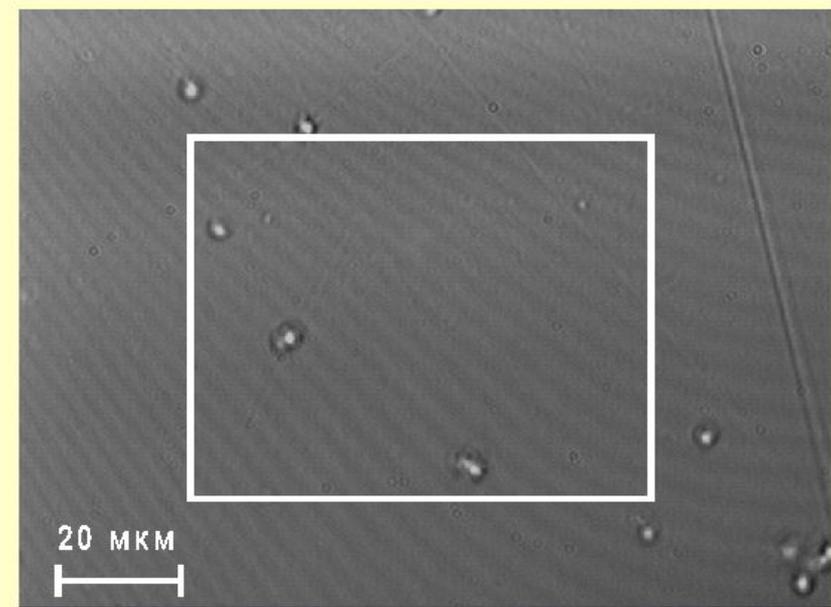
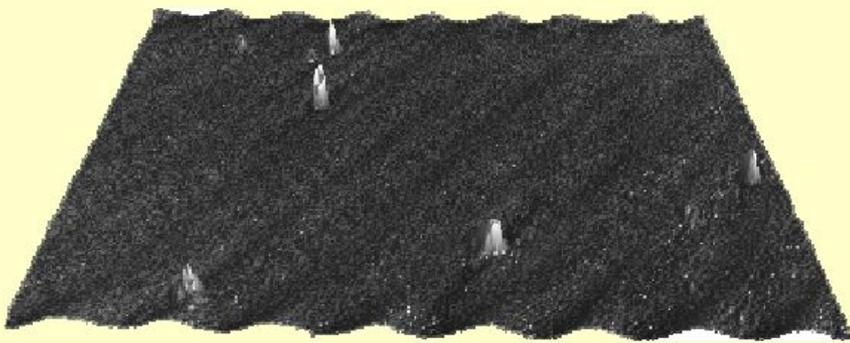
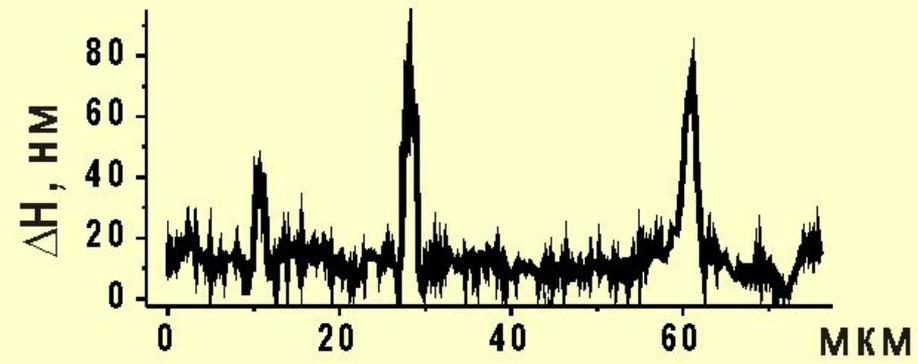
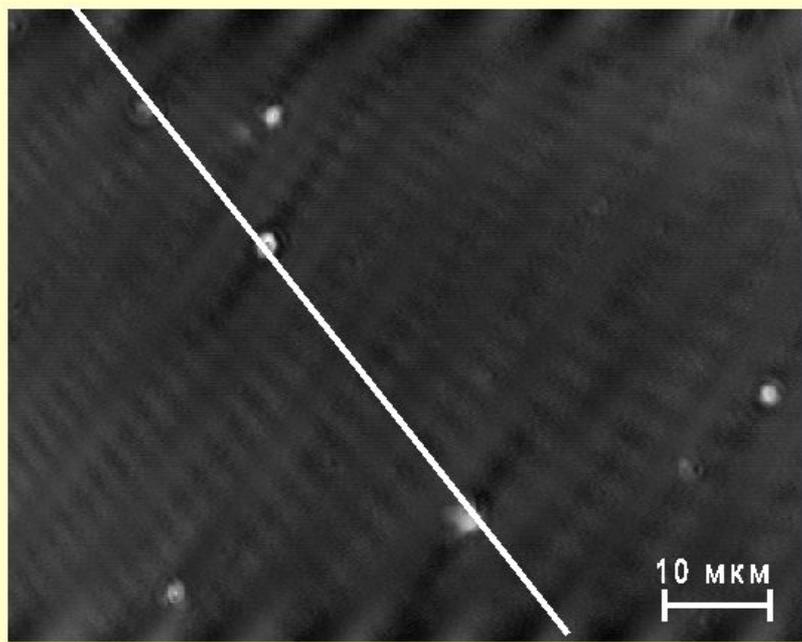
Визуализация коллоидов

Сравнение с атомно-силовой микроскопией

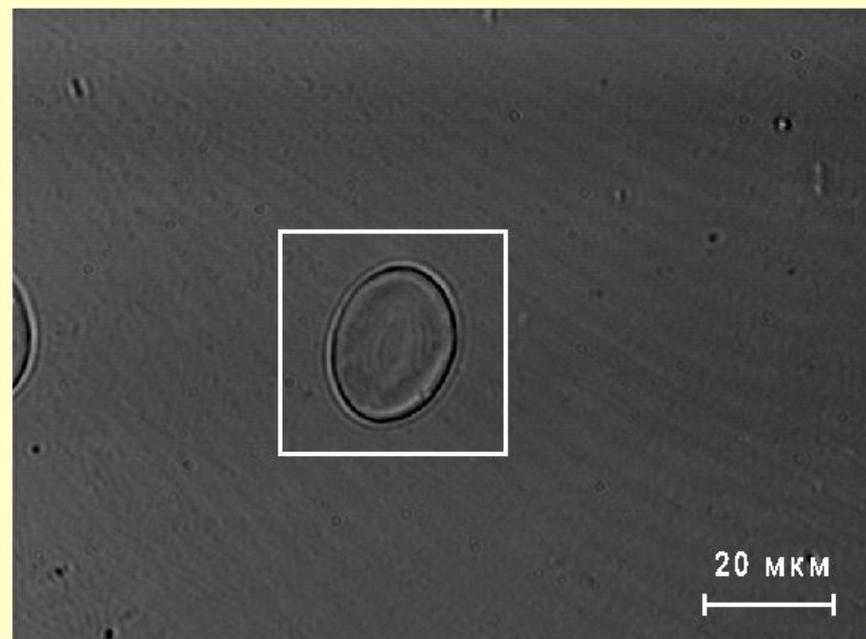
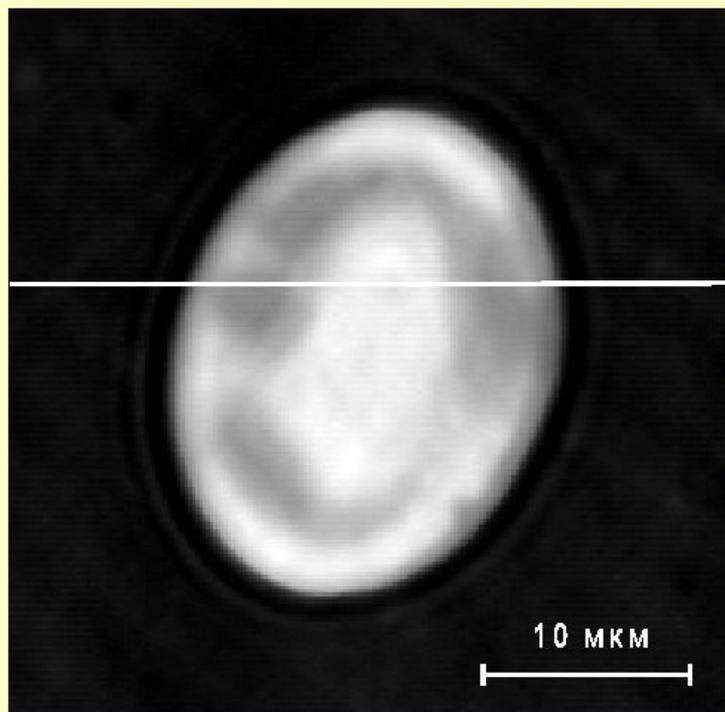
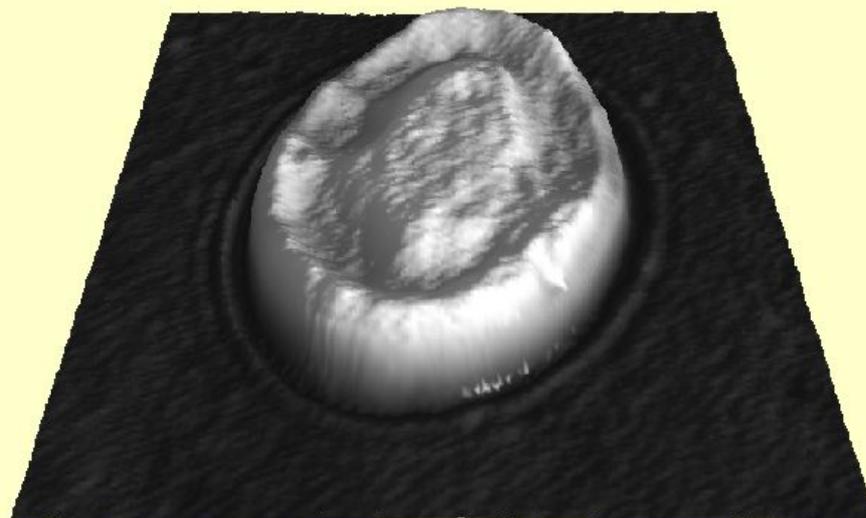
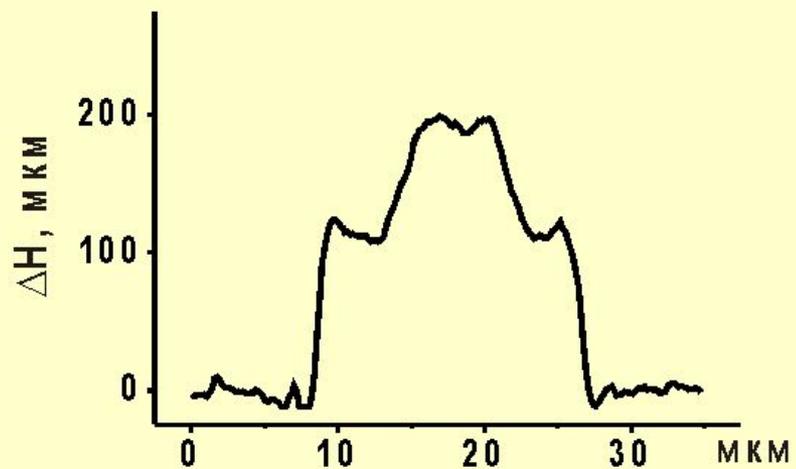
Нейробластулы (стволовые клетки в культуре)



Тромбоциты человека



Эритроциты лягушки



Эритроциты лягушки в растворах с различной осмолярностью

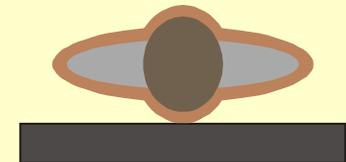
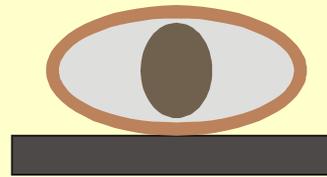
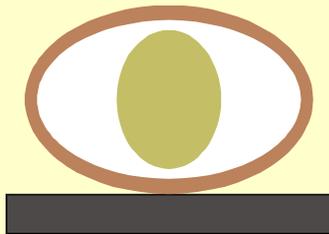
$$\Phi_i = (k_1^i z_1^i + k_2^i z_2^i + \dots + k_n^i z_n^i) - k_m z$$

Гипоосмолярный

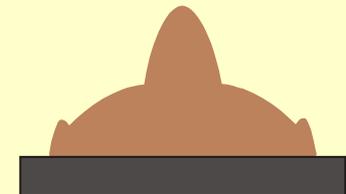
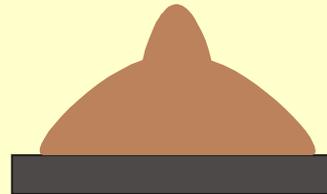
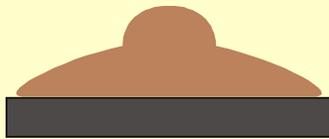
Нормоосмолярный

Гиперосмолярный

Сечение эритроцита лягушки



Сечение фазового портрета



Фазовая высота в точке

$$\Phi = (n_2 - n_1) \cdot z$$

n_1 и n_2 показатели преломления раствора и объекта, соответственно, z - толщина образца

Эритроциты лягушки в растворах с различной осмолярностью

$$\Phi_i = (k_1^i z_1^i + k_2^i z_2^i + \dots + k_n^i z_n^i) - k_m z$$

Гипоосмолярный

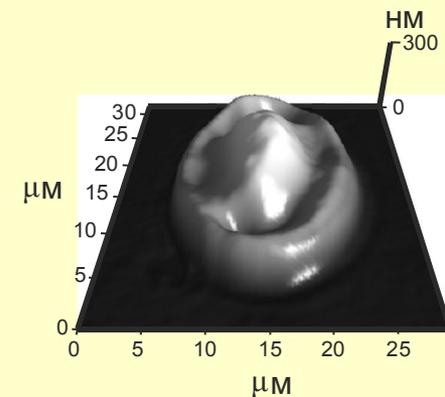
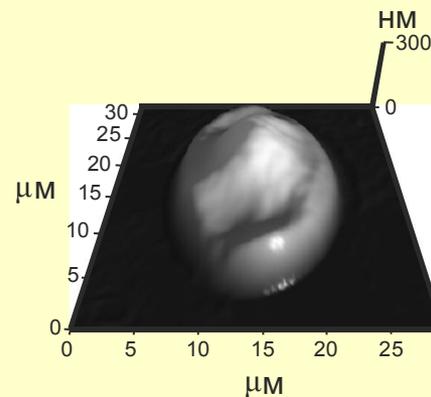
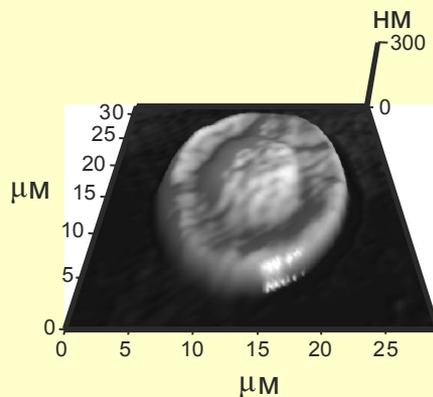
Нормоосмолярный

Гиперосмолярный

Световое
изображение

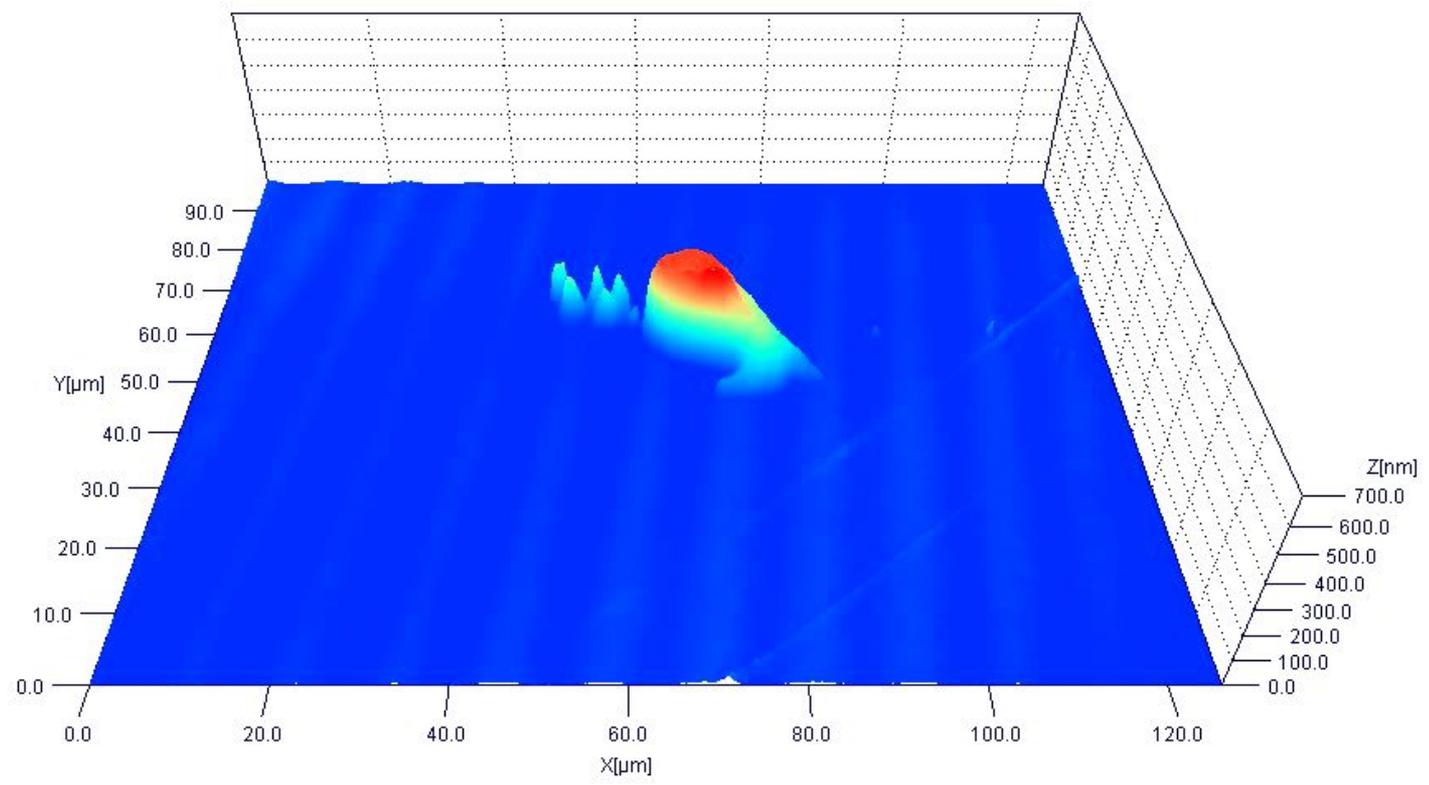


Фазовое
изображение



Эритроциты лягушки

Апоптоз эритроцита лягушки

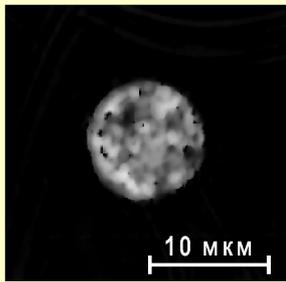


Тучные клетки мыши

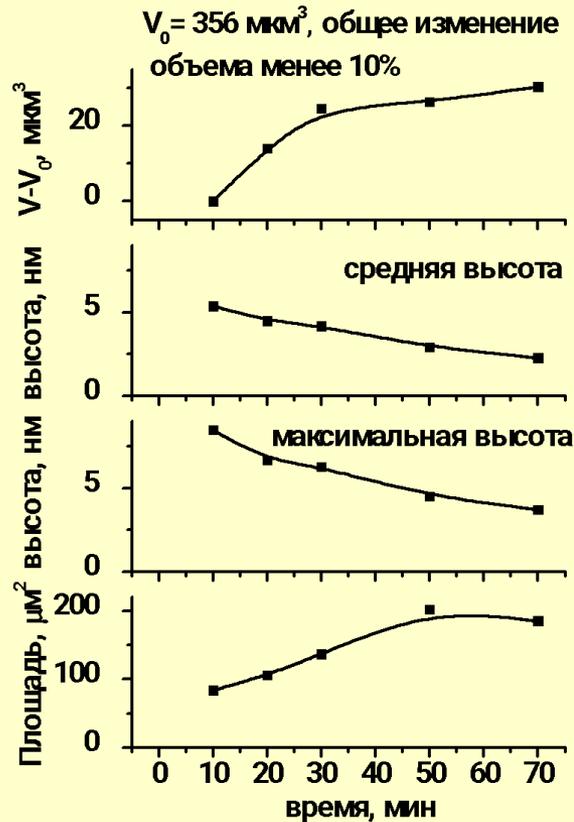
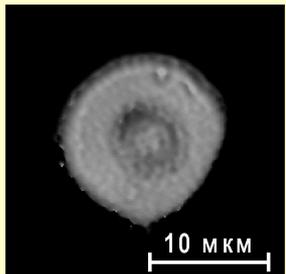
Действие ионофора

Приводит к выбросу гистамина

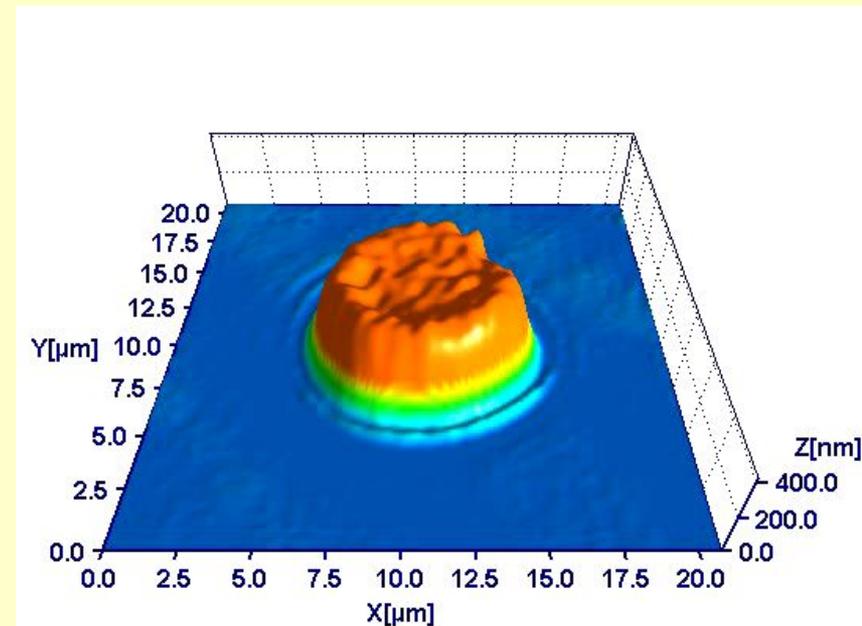
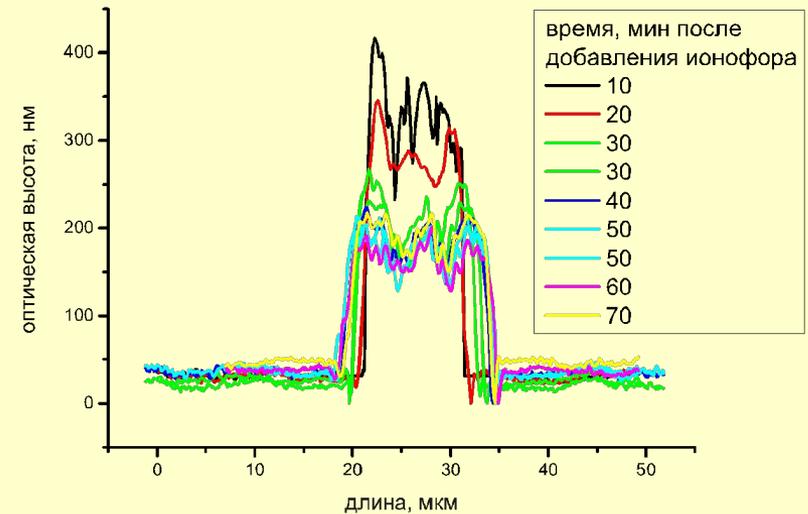
0 МИН



70 МИН



Изменение во времени



ЭРИТРОЦИТЫ

Эритроцит, размещенный на отражающей подложке в физиологическом растворе, является характерным примером измерения прозрачного образца. Содержимое эритроцита представляет собой достаточно однородную массу, поэтому высоту (толщину) рельефа эритроцита, z можно оценивать, используя **формулу**:

$$z = \frac{\Phi}{(n_2 - n_1)}$$

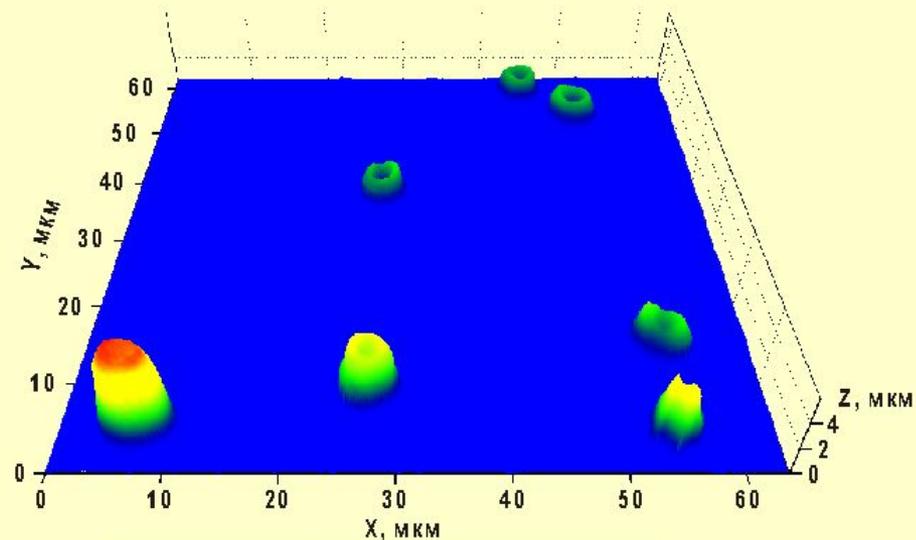
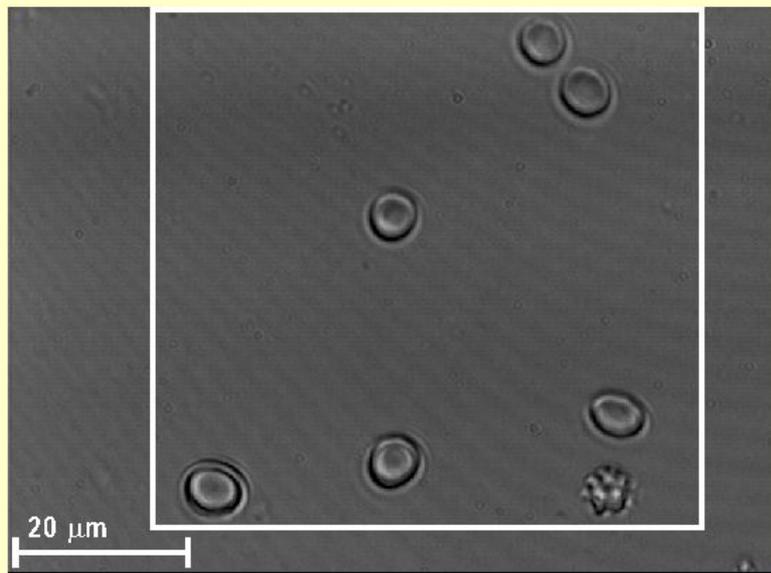
n_1 и n_2 – показатели преломления среды, напр. плазмы, (1,335) и эритроцита (1,405), соответственно

Параметры эритроцита хорошо изучены, с ним достаточно легко работать, что делает данную клетку удобным модельным объектом для разработки приемов и методик работы с клетками

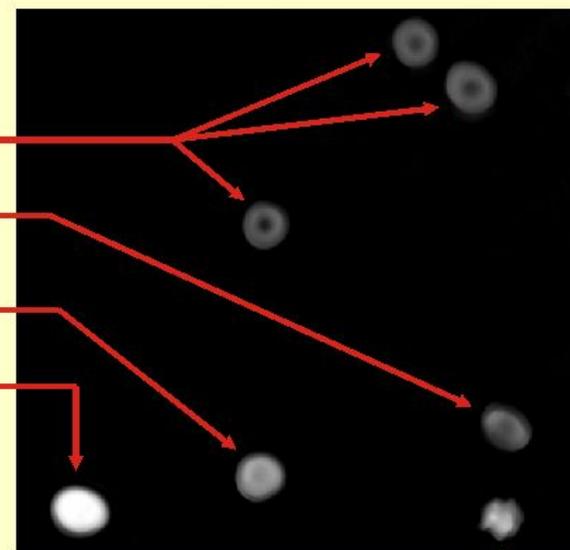
Кроме этого оценка состояния эритроцитов является диагностическим критерием при оценке ряда патологий

Оценка формы

Пример изображения различных форм эритроцитов



ДИСКОЦИТЫ
 СТОМАТОЦИТ
 “пачка” из двух клеток
 “пачка” из трех клеток



ЭХИНОЦИТ

Оценка формы

Особенности отображения эритроцитов при помощи ЛИМ

СТОМАТОЦИТ

ДИСКОЦИТ

ЭХИНОЦИТ

-
3

-
2

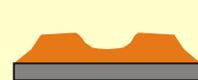
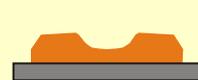
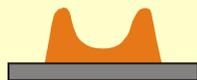
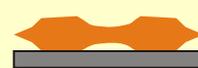
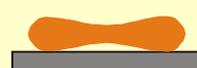
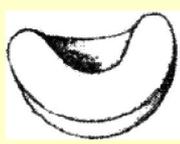
-
1

0

+
1

+
2

+
3



Сечение
Реального объекта

Сечение
фазового портрета

Преобразования эритроцитов при изменении pH

pH

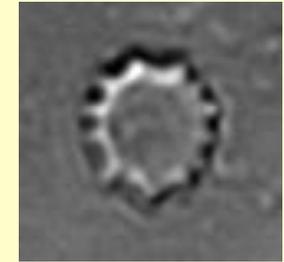
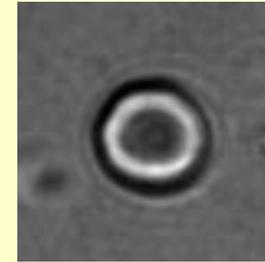
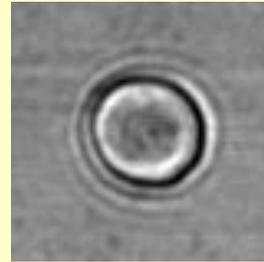
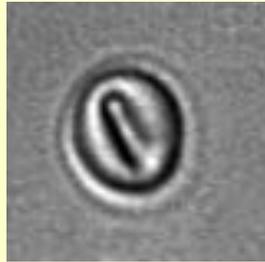
4.5

5.5

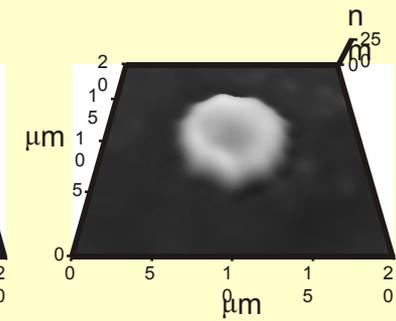
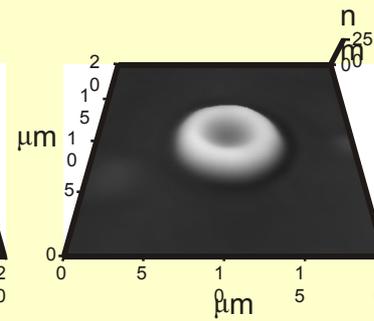
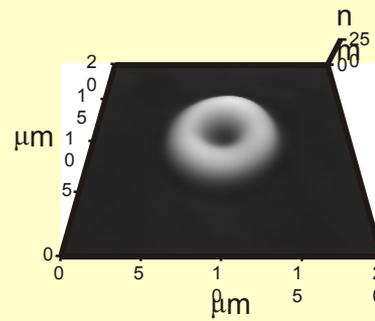
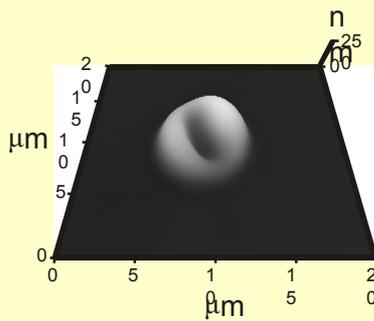
7.4

8.4

видео
изображение



Фазовое
изображение



Оценка формы

Превращения эритроцитов при изменении осмолярности

Осмолярность, мОсм

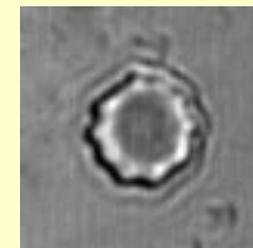
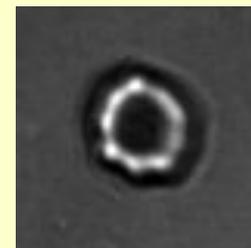
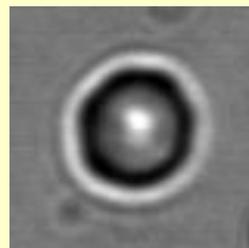
250

330

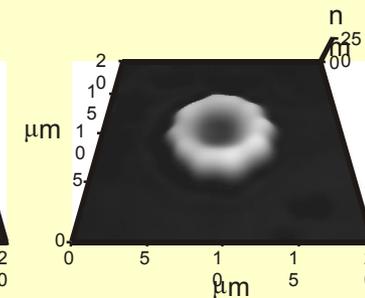
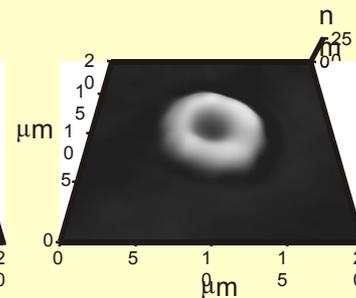
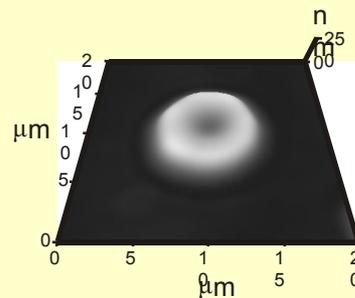
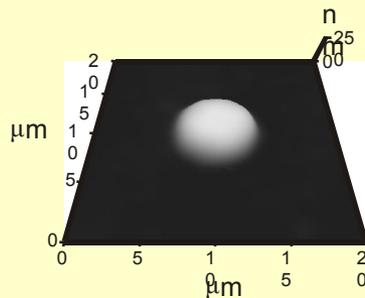
500

700

видео
изображение



Фазовое
изображение



Определение объема

Определив толщину эритроцитов, z , по формуле:

$$z = \frac{\Phi}{(n_2 - n_1)}$$

Можно рассчитать объем клетки (фазовый объем, V_{phase}), как произведение площади клетки, S , на ее толщину:

$$V_{phase} = zS \quad \text{или} \quad V_{phase} = \frac{\Phi S}{(n_2 - n_1)}$$

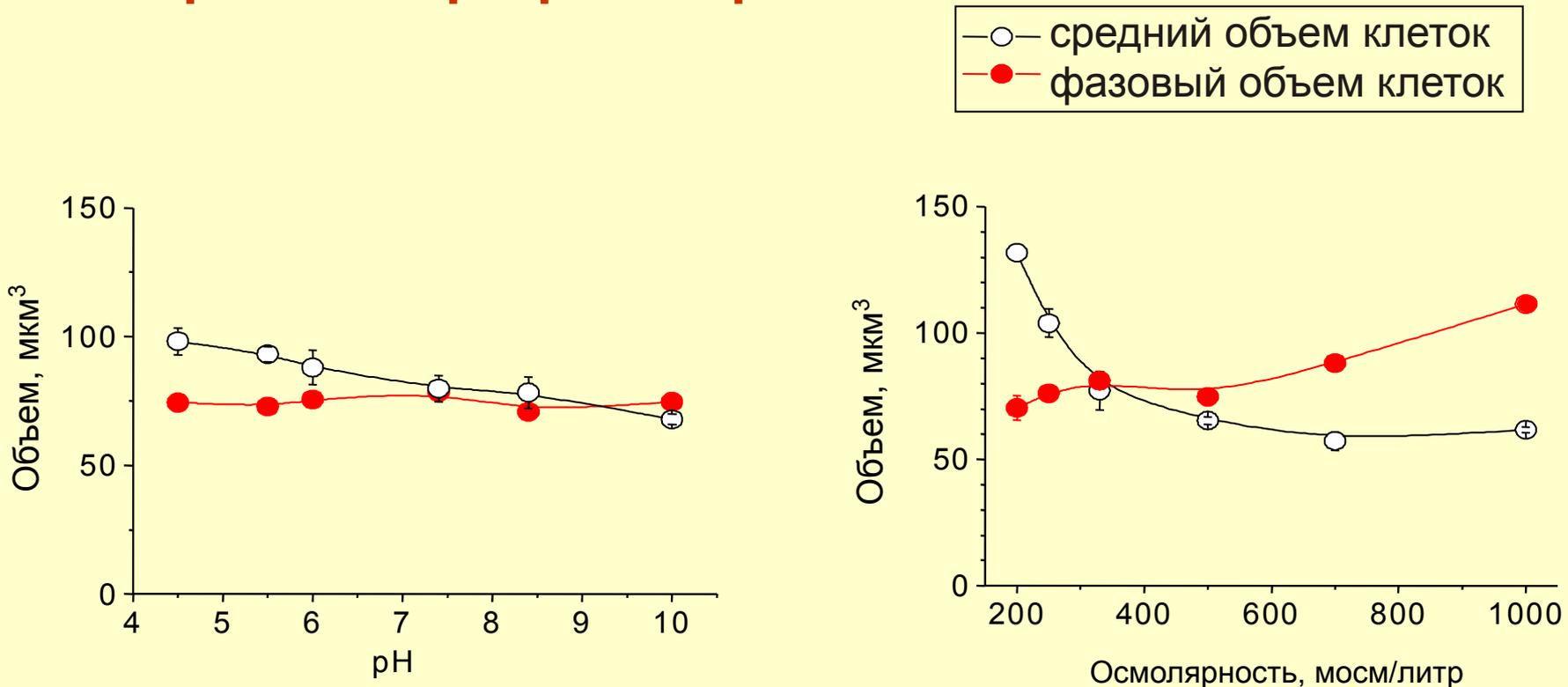
Таким образом, фазовый объем зависит от площади и показателей преломления среды и эритроцита

Показатель преломления может меняться при изменении состояния эритроцита

 В этой ситуации нам необходимо оценивать показатель преломления эритроцитов либо независимыми методами либо при помощи специализированных методик или расчетов показателя преломления из известной величины объема, что наиболее удобно в случае эритроцитов.

Определение объема

Изменение состояния эритроцитов при изменении осмолярности и pH раствора



При нормальной осмолярности и pH значения фазового и геометрического объема совпадают.

При изменении осмолярности наблюдаются значительные различия между величинами этих объемов

$$n_{\text{эрит}} = \frac{\Phi S}{V_{\text{гем}}} + n_{\text{раст}}$$

Изменение объема клеток приводит к изменению концентрации гемоглобина внутри клетки, что в свою очередь сказывается на показателе преломления эритроцита

Кроме того изменение показателя преломления может быть обусловлена и другими причинами, не связанными с изменением концентрации гемоглобина
(изменение свойств мембраны и гемоглобина)

Равенство показателей преломления в данном случае позволяет говорить о том что параметр $\Phi S/V$ пропорционален концентрации гемоглобина в эритроците

$$\frac{\Phi S}{V_{гем}} = \left(n_{гем} - n_{раст} \right) x$$

Объемную долю гемоглобина можно пересчитать в объемную концентрацию ($г/см^3$), C_V , используя удельную плотность гемоглобина ρ_{Hb} :

$$x = \frac{m_{Hb}}{\rho_{Hb} V} = \frac{C_V}{\rho_{Hb}}$$

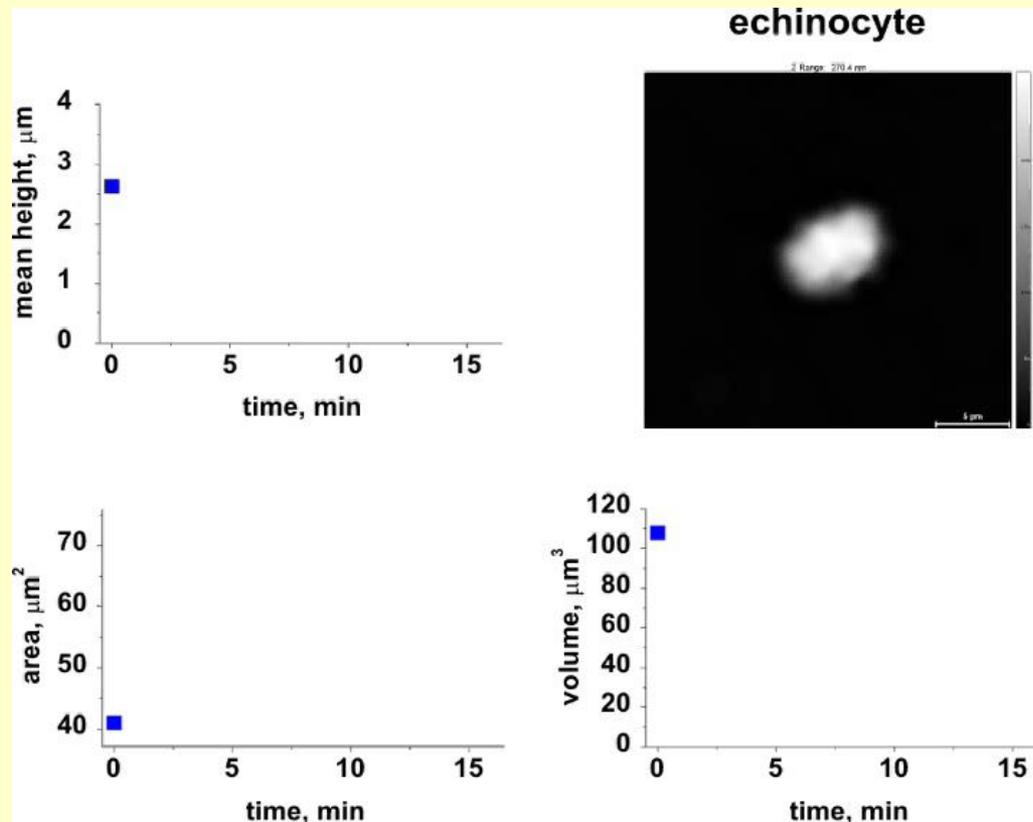
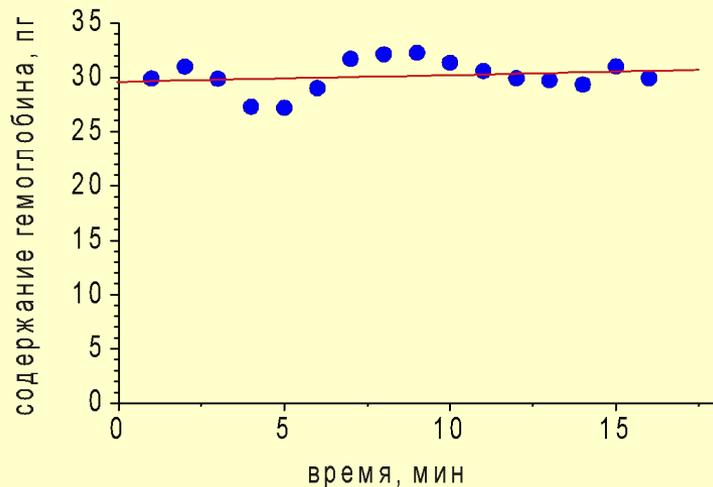
V_{Hb} и m_{Hb} – объем и масса гемоглобина в эритроците, Величина ρ_{Hb} , принимается равной $1,36 г/см^3$

$$C_V = \frac{\rho_{Hb}}{\left(n_{гем} - n_{раст} \right)} \frac{\Phi S}{V_{гем}} \quad m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{\left(n_{гем} - n_{раст} \right)} \Phi S$$

Фазовый объем пропорционален содержанию гемоглобина в эритроците

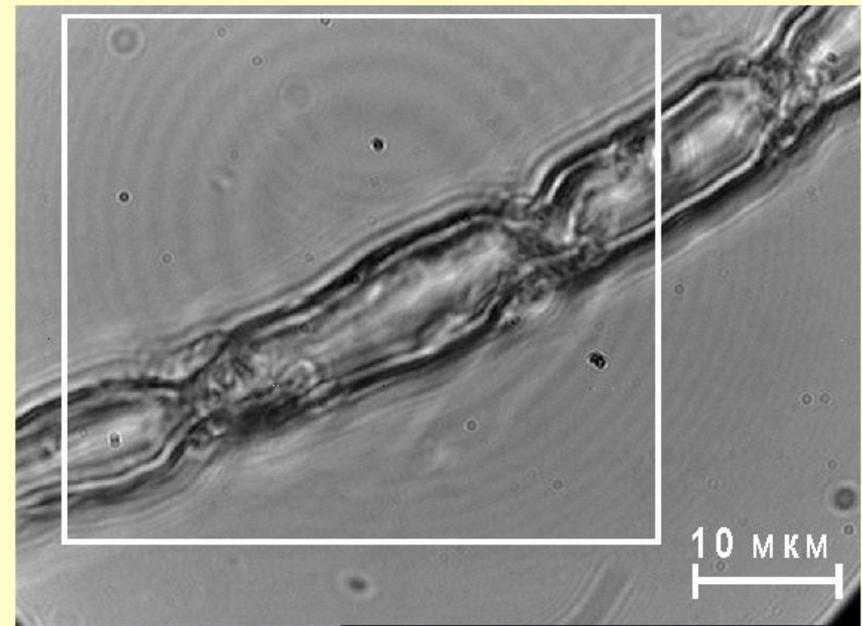
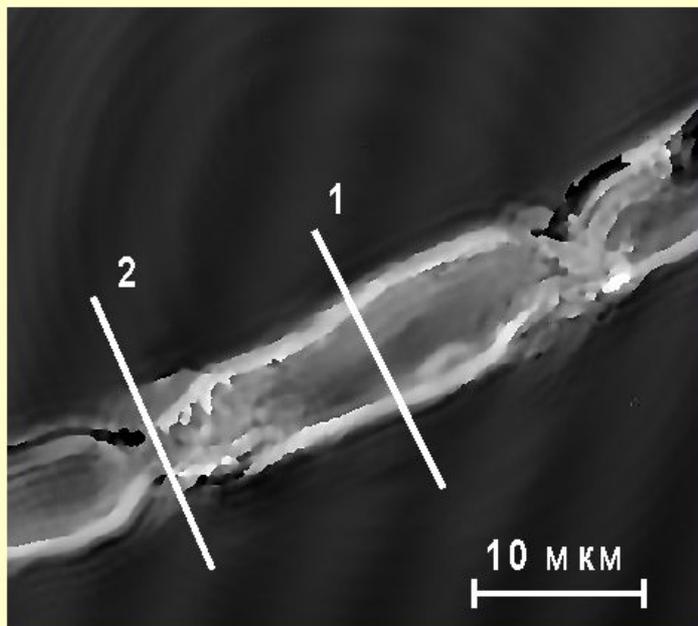
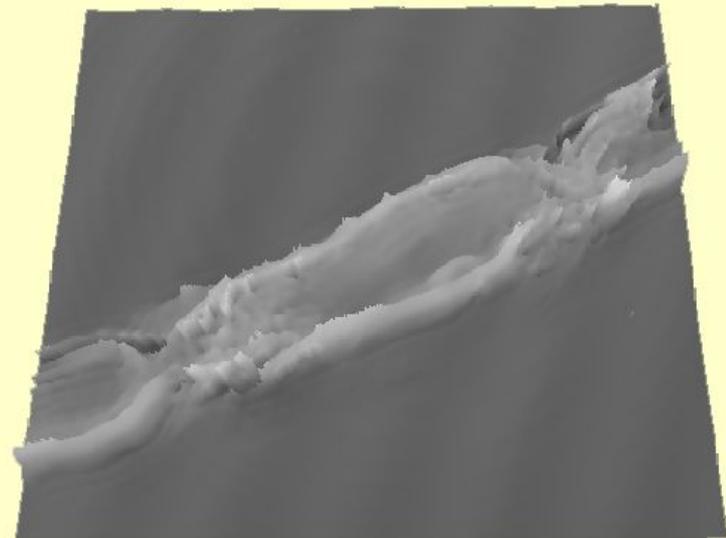
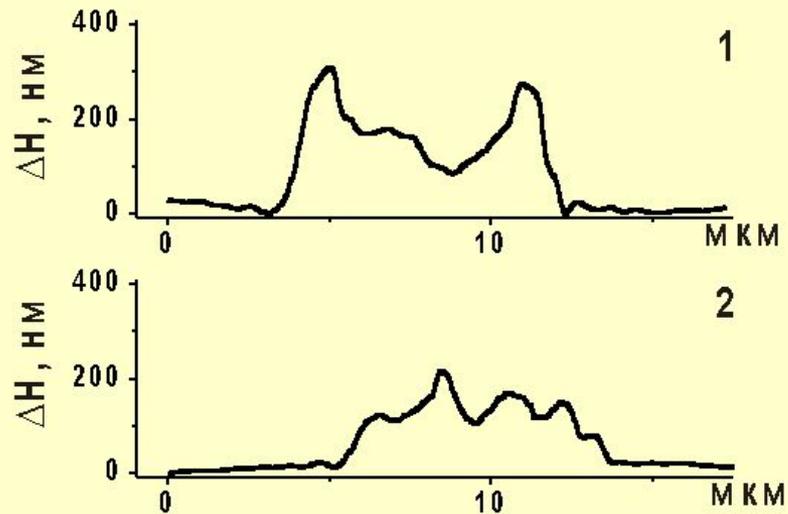
Определение содержания гемоглобина

Изменение формы эритроцитов



Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода ЛИМ для оценки содержания количества гемоглобина в эритроците и построения распределения содержания количества гемоглобина в популяции

Нервное волокно лягушки



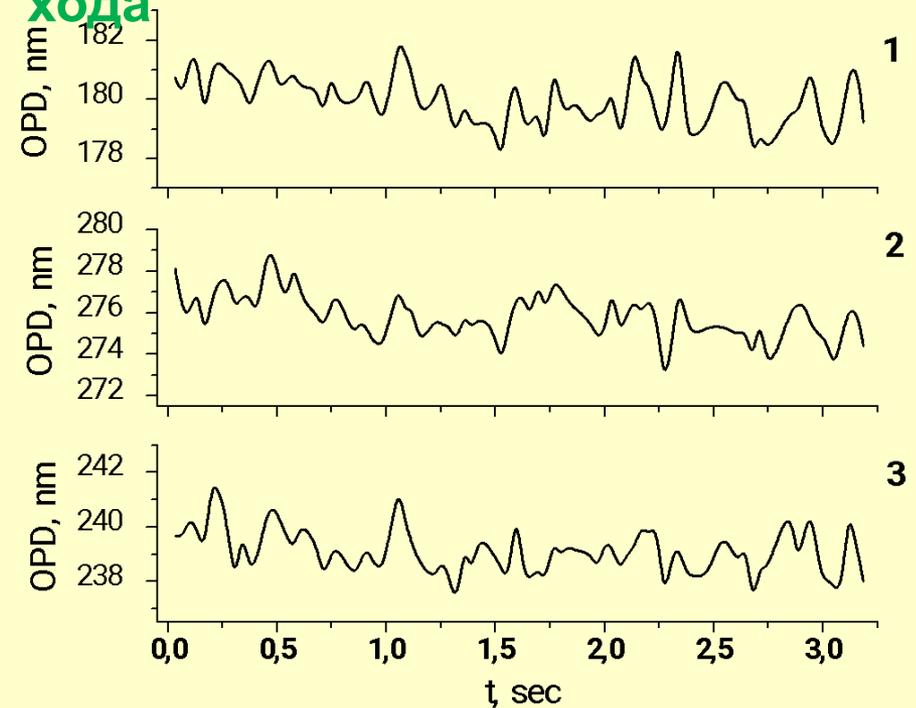
Нервное волокно лягушки

Фазовое изображение участка нервного волокна

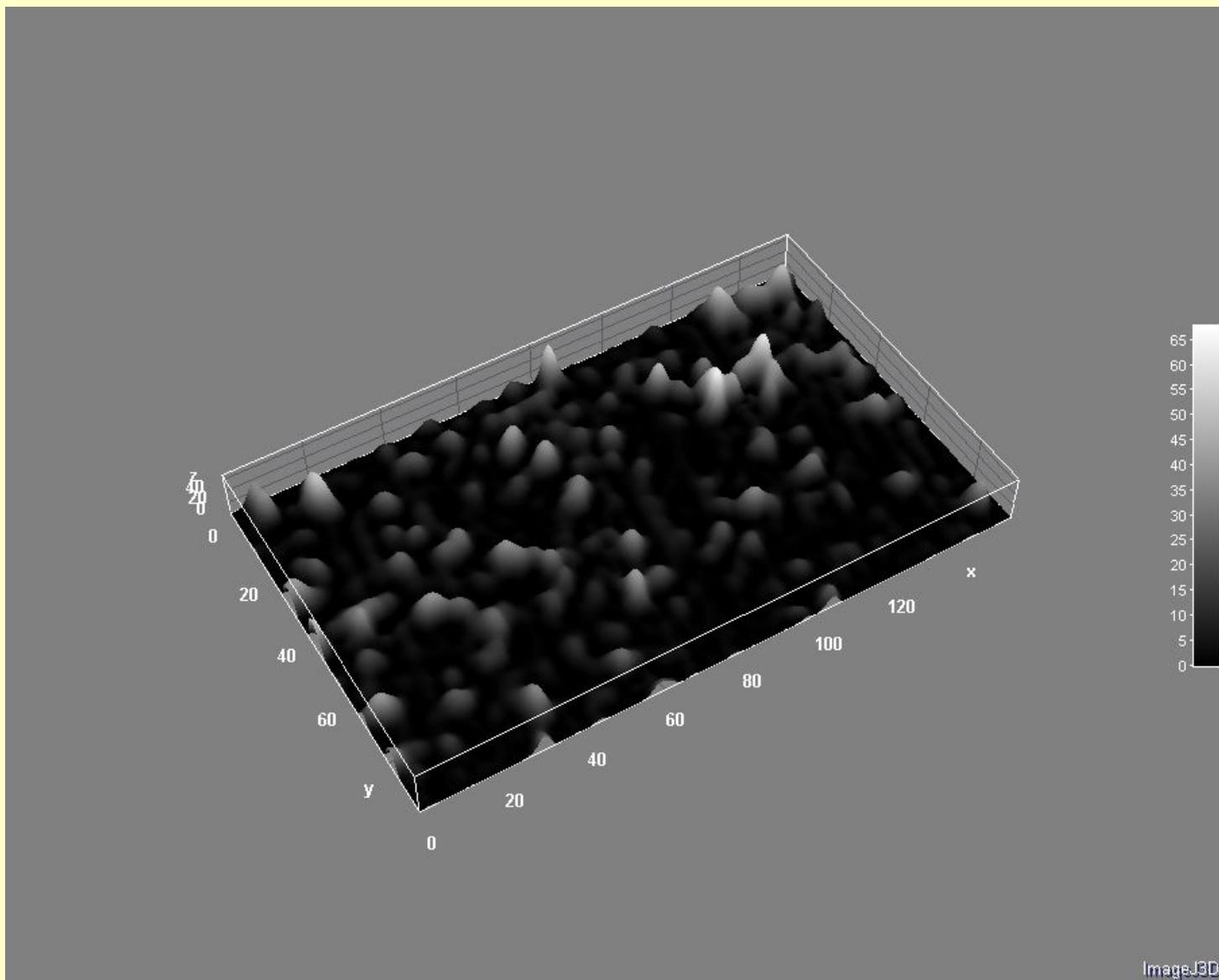


Скорость съемки -29.5 фазовых изображений в секунду

Изменение оптической разности хода

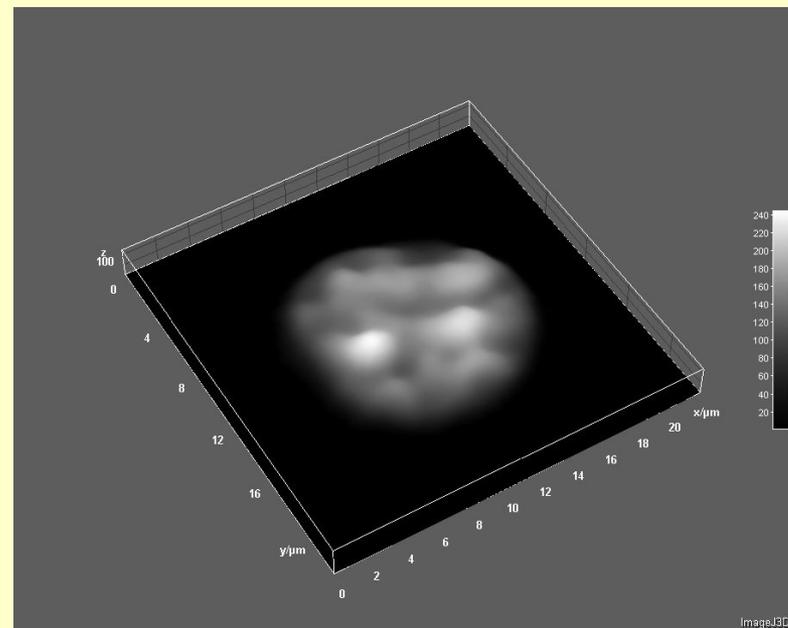
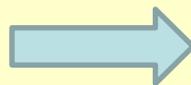


Визуализация КОЛЛОИДОВ

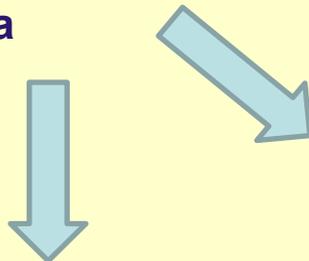


Нейроны прудовика

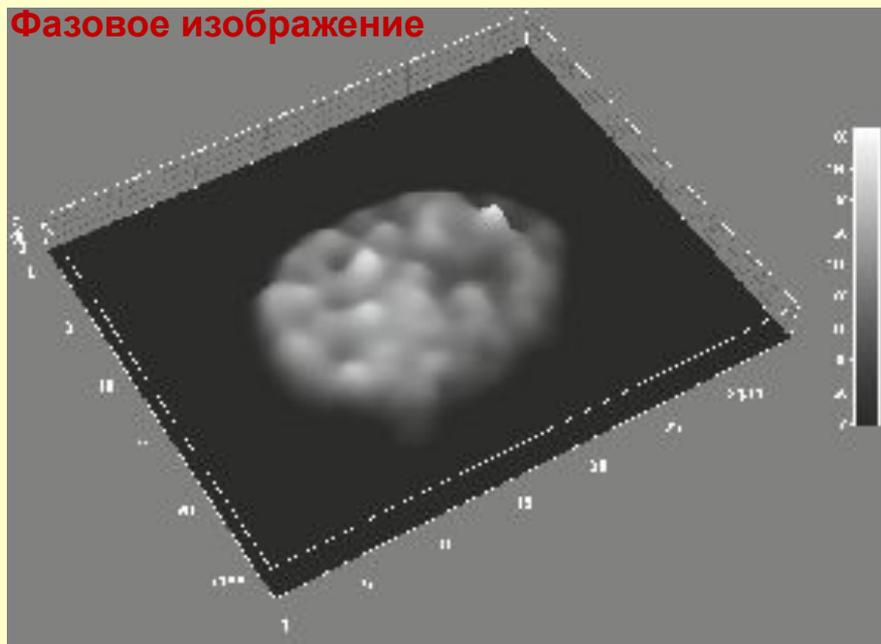
Нейроны прудовика в физиологическом растворе



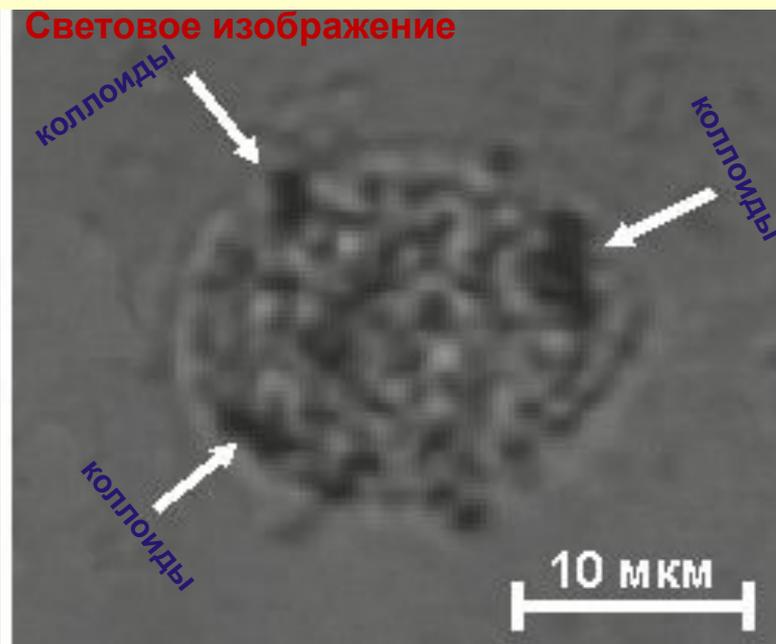
Нейроны прудовика в физиологическом растворе + коллоиды серебра



Фазовое изображение

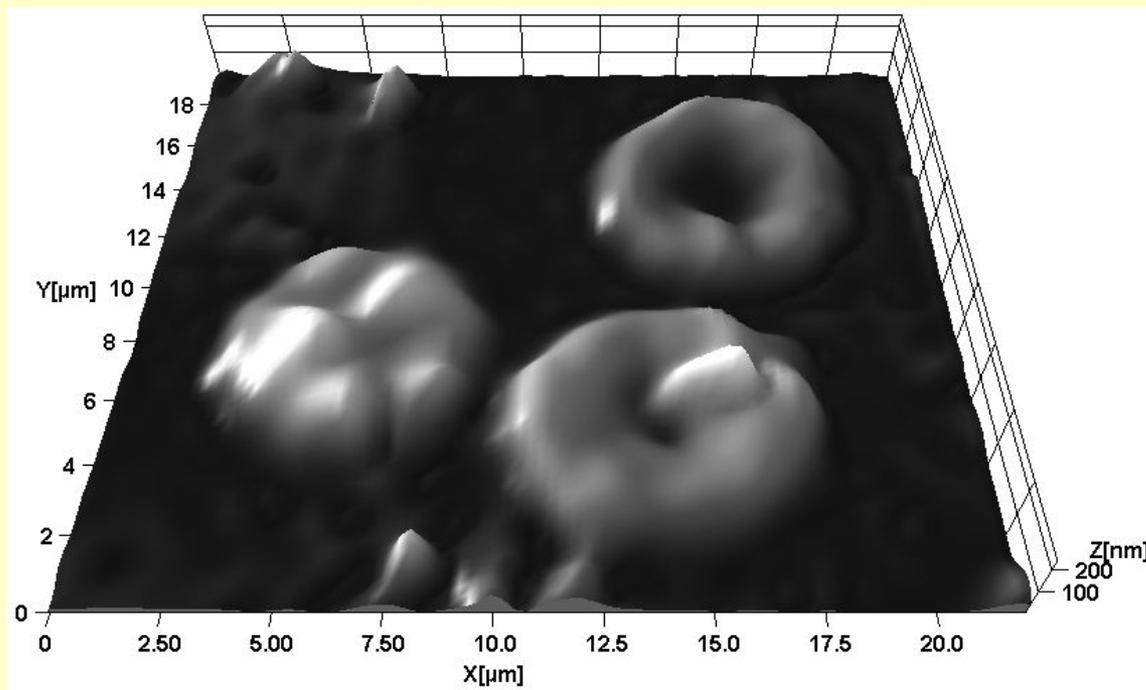


Световое изображение

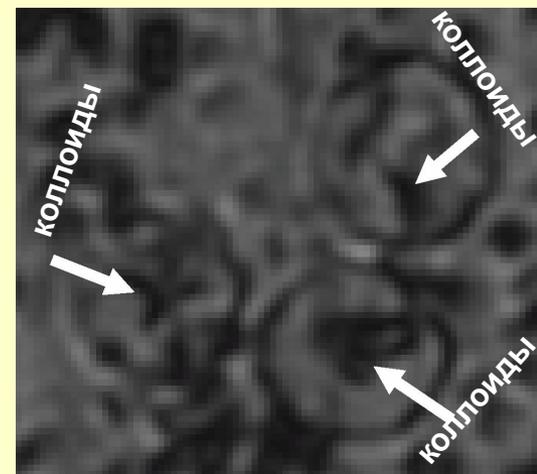


Эритроциты крысы физиологическом растворе + коллоиды серебра

Фазовое изображение



Световое изображение



Сравнение с атомно-силовой микроскопией

Эритроциты в растворах с различной осмолярностью

безъядерные

Гипотонически

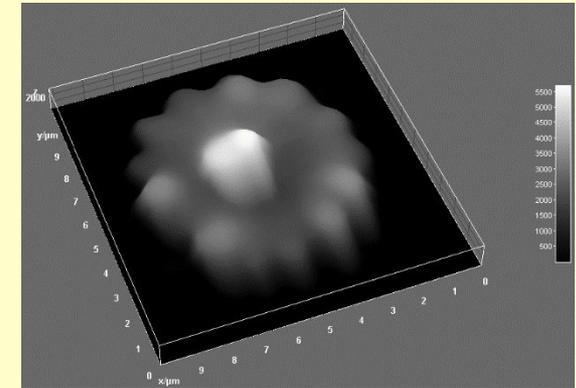
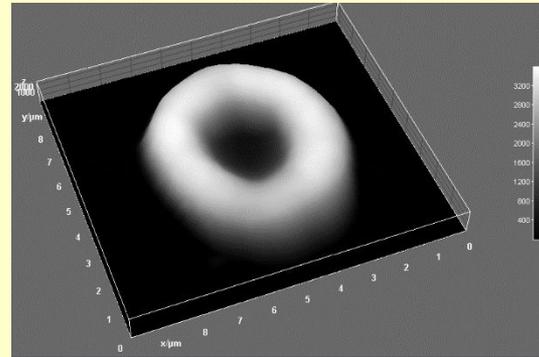
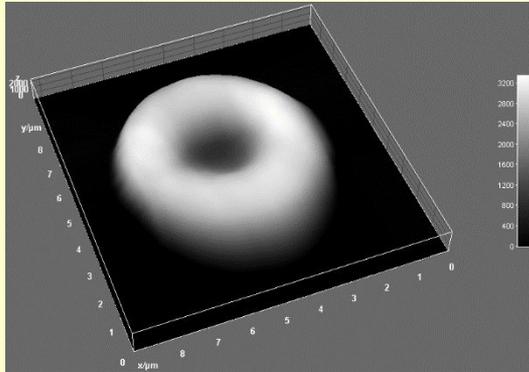
Изотонически

Гипертонически

АОМ

й

й

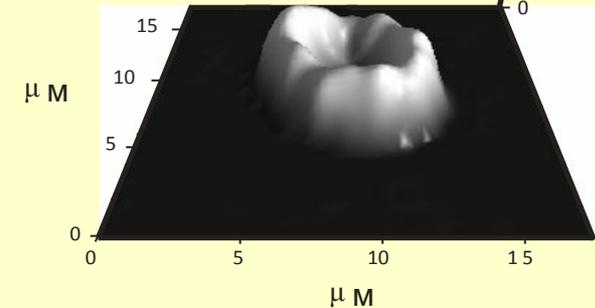
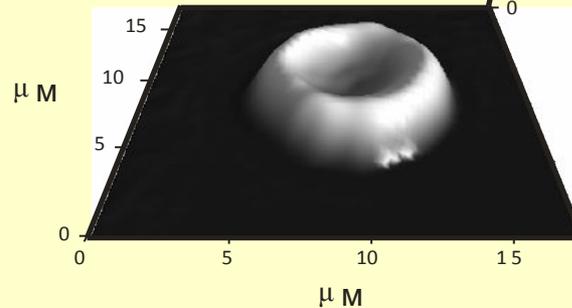
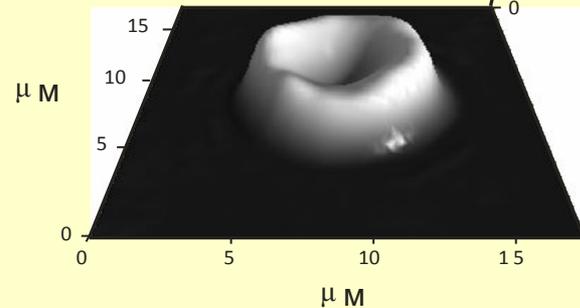


ЛИМ

НМ
300

НМ
300

НМ
300



Эритроциты в растворах с различной осмолярностью

ядерные

Гипотонически

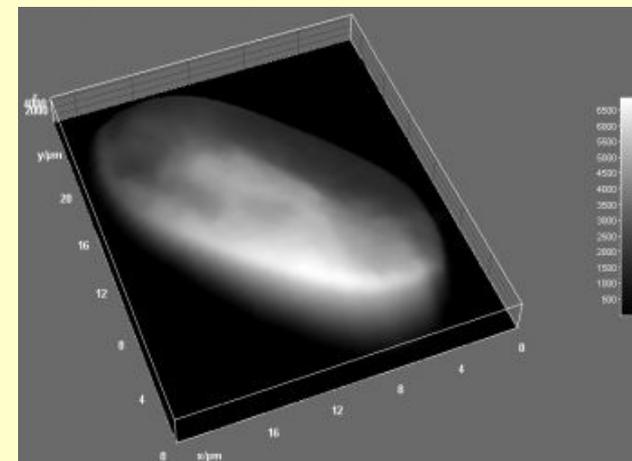
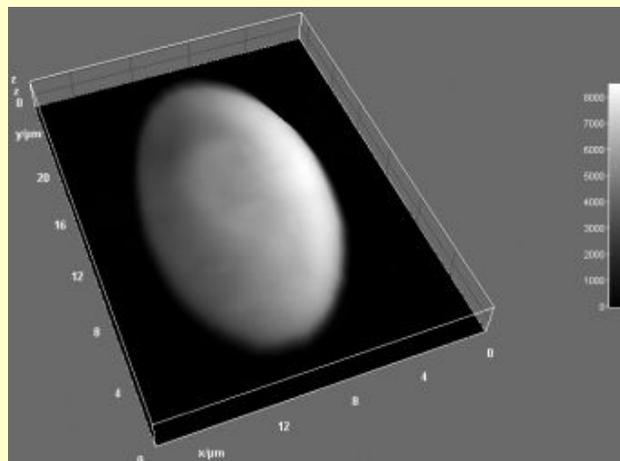
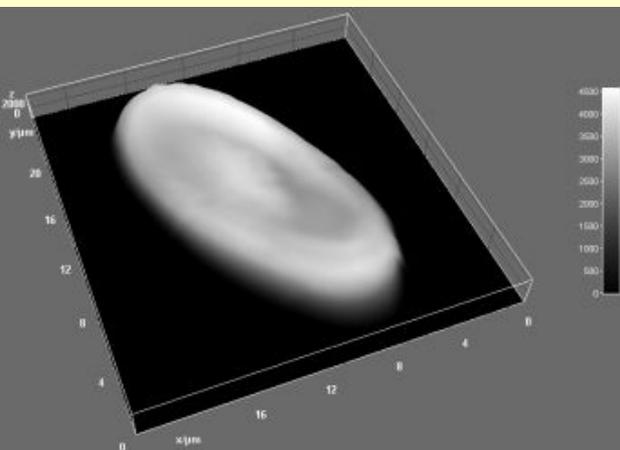
Изотонически

Гипертонически

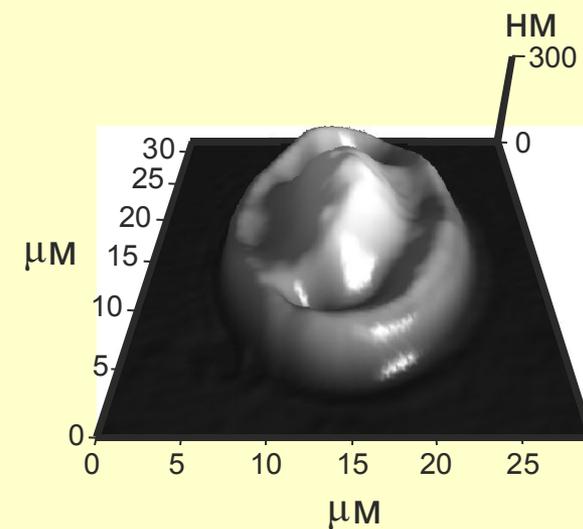
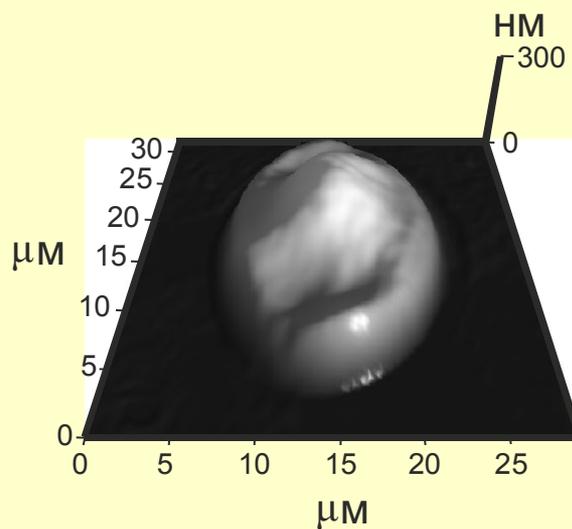
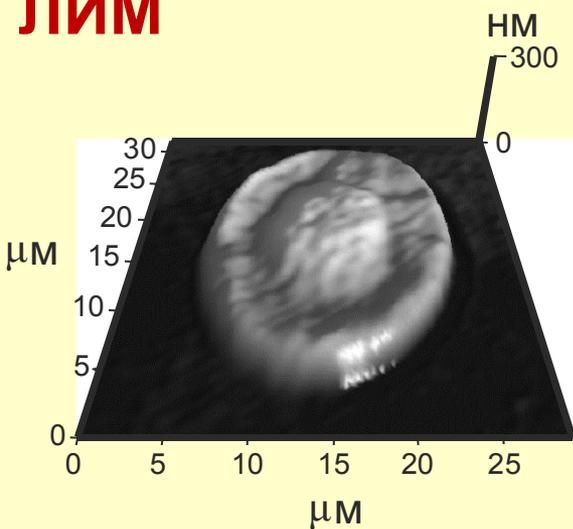
АОМ

Й

Й



ЛИМ



Сравнение ЛИМ и АСМ

при работе с клетками

Достоинства ЛИМ

- простая подготовка препаратов
- легко работать с живыми клетками
- высокая скорость получения изображений
- меньшая стоимость прибора

Достоинства АСМ

- возможность напрямую измерять геометрические размеры клеток