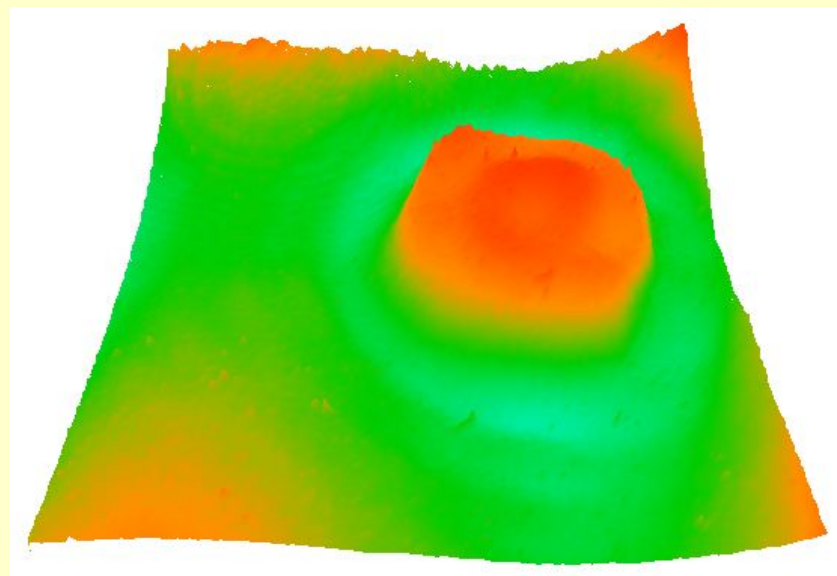
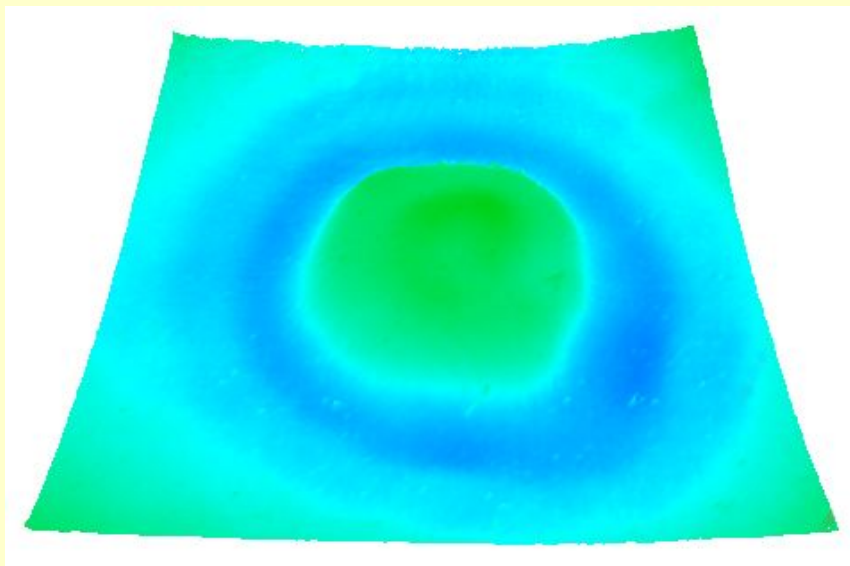


# ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК



# 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



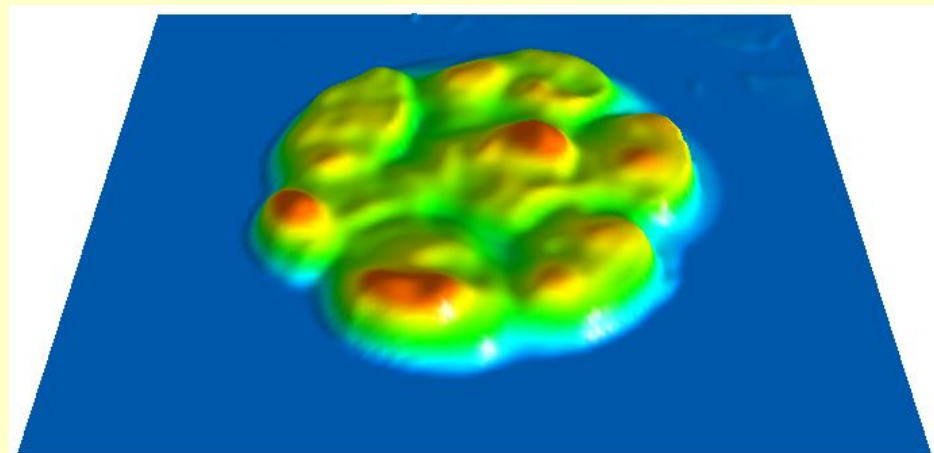
Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) относится к таким методам

# 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)

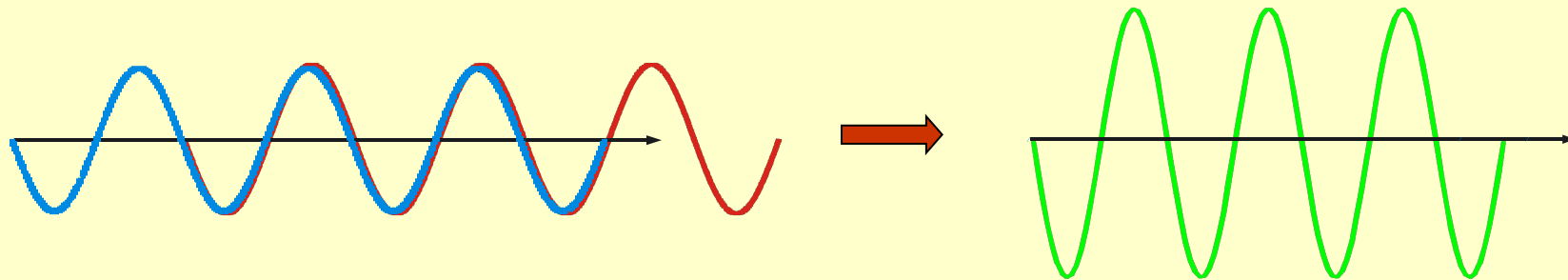
Таким образом можно получать трехмерные изображения объектов, причем высота в каждой точке объекта будет пропорциональна локальному изменению оптической плотности



# 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,  $\Theta$ , соотношением:

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

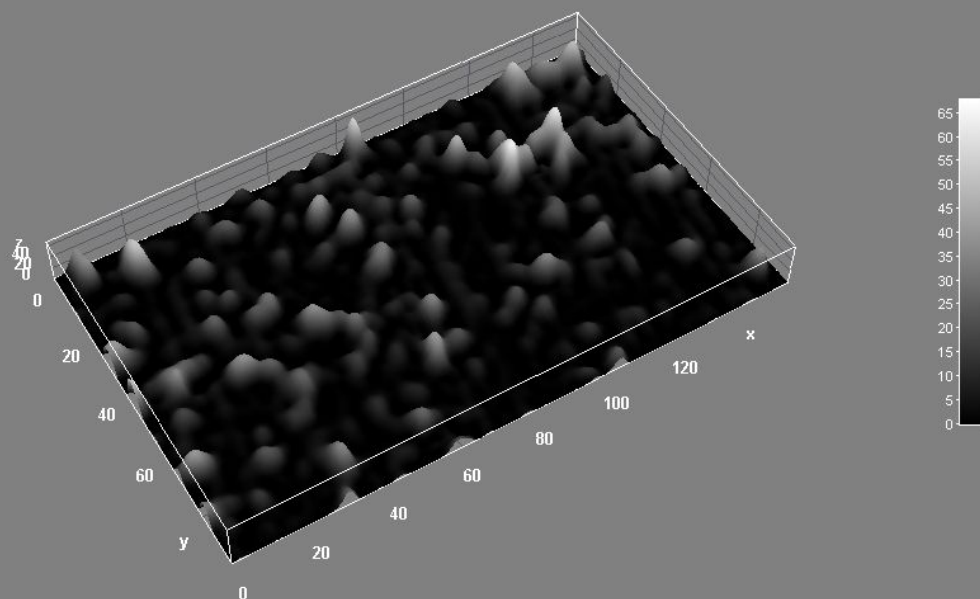
Величина ОРХ, пропорциональна показателю преломления и толщине образца. Значение фазовой высоты зависит от размеров и свойств образца

# 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

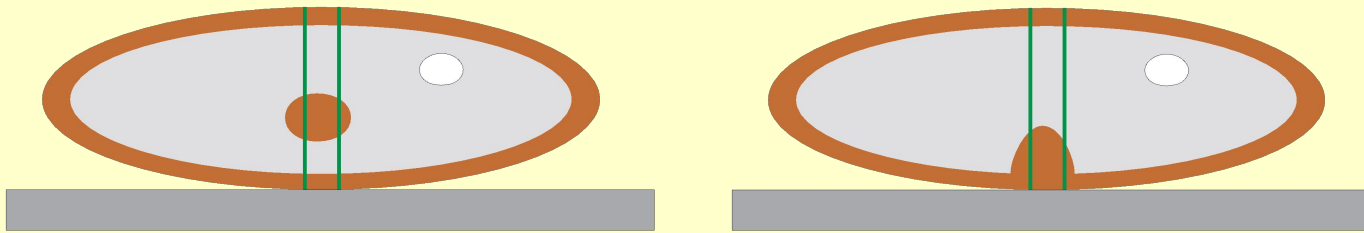


# Особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ

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

$$\begin{array}{c}
 n_5^m z_5 \\
 n_4^m z_4 \\
 n_3^m z_3 \\
 n_2^m z_2 \\
 n_1^m z_1
 \end{array}
 - n_1 z
 \quad \Leftrightarrow \quad
 \begin{array}{c}
 n_2^m z_2 \\
 n_4^m z_4 \\
 n_3^m z_3 \\
 n_5^m z_5 \\
 n_1^m z_1
 \end{array}
 - n_1 z
 = ОРХ$$

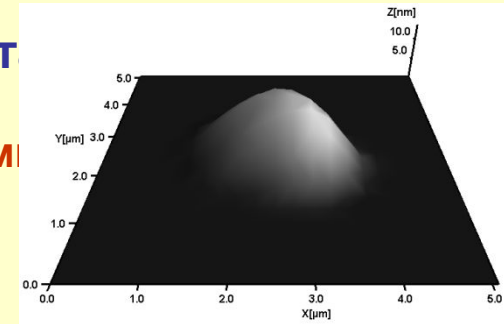
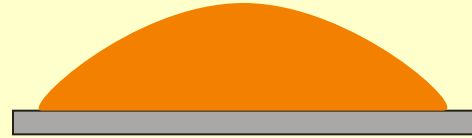
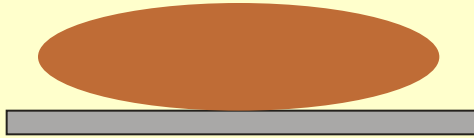
3D форма объекта отличается от его 3D фазового изображения!

# Особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ

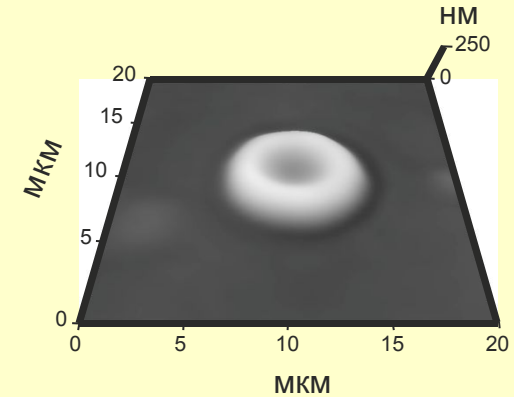
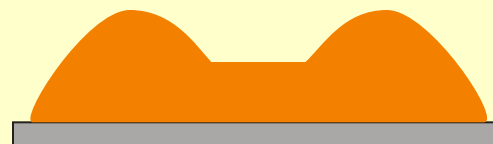
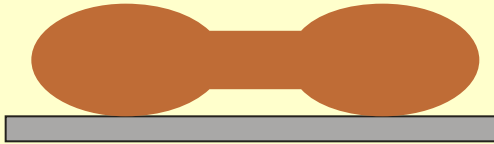
сечение реального  
объекта

сечение фазового портрета

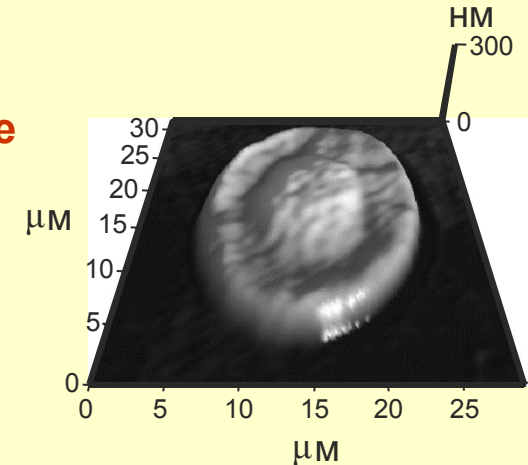
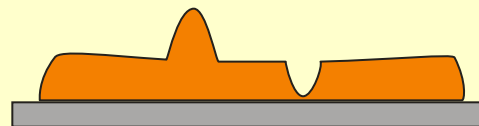
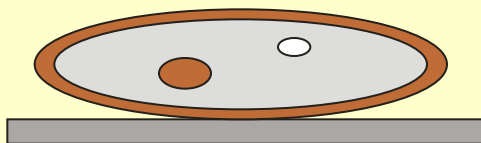
однородные клетки сферической или цилиндрической формы



однородные клетки более сложной формы (эритроциты)



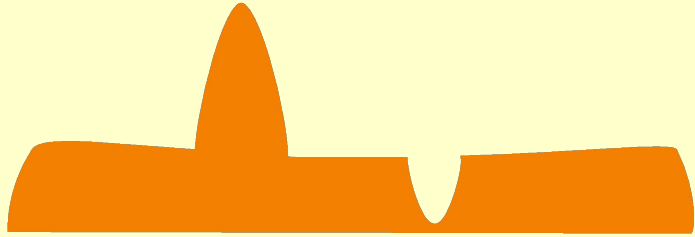
гетерогенные объекты (большинство клеток в том числе нейроны пиявки и прудовика)





# Интерпретация изменения фазовой ВЫСОТЫ

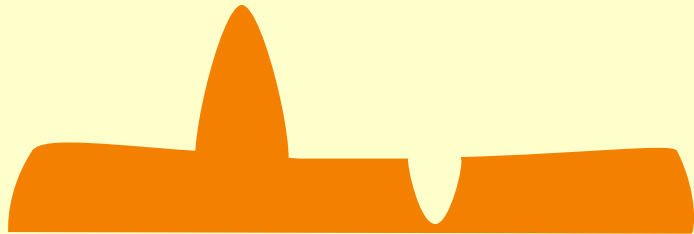
Продольное сечение фазового изображения  $\Phi(x)$



ЛИМ микроскоп оценивает значение  $OPX$ ,  $\Phi$ , в каждой точке объекта

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

Если величина  $\Delta n$  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

$\alpha$ - 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

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

$\alpha$  – зависит от показателей преломления вещества и среды, а также от удельной плотности вещества,  $\rho$

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

# 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

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

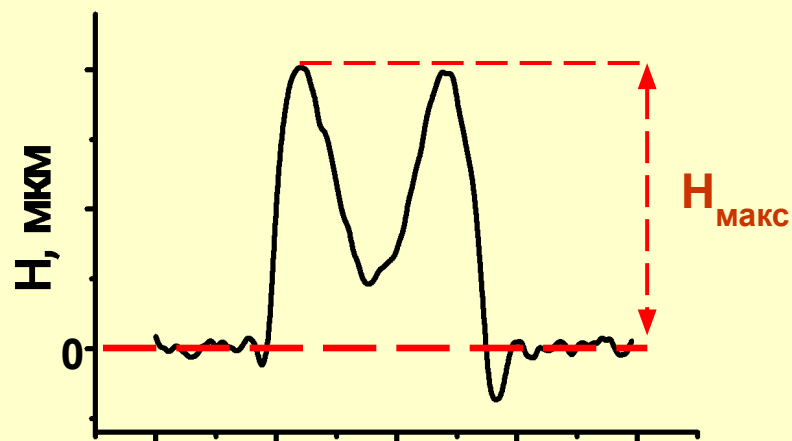
$$V = \frac{\Phi S}{(n - n_0)}$$

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

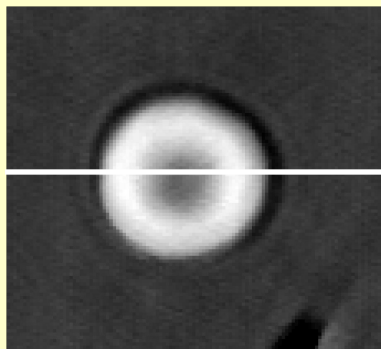
$H_{\text{среднее}}$  — среднее значение высоты, определяемое как сумма высот всех точек объекта, деленное на их количество.

**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

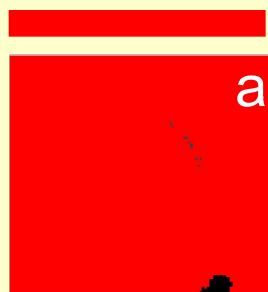
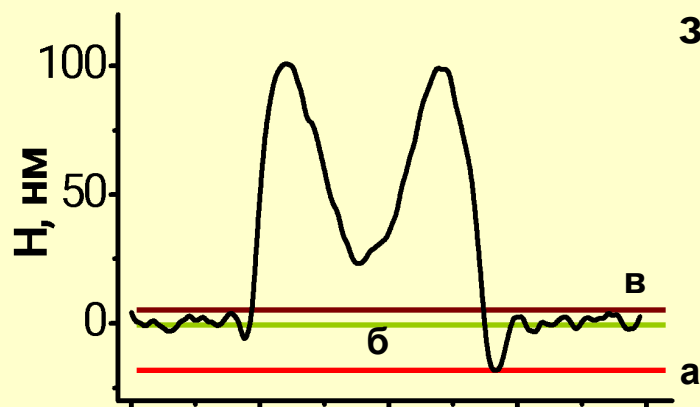
# Определение размеров клеток

## 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).

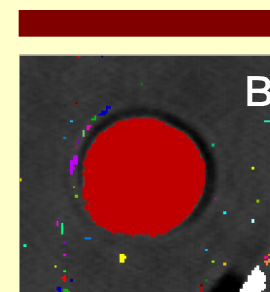
**Изменение фонового значения приводит к значительным изменениям площади объектов.**



$H = -20$  нм



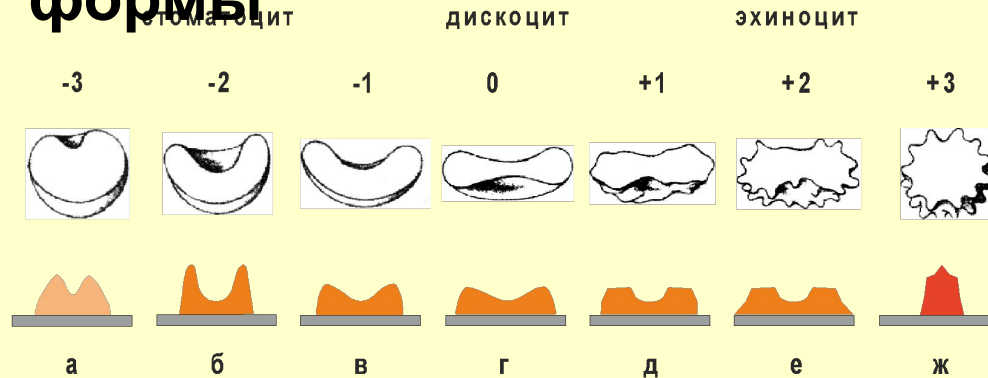
$H = 0$  нм



$H = 5$  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),  $\rho_{Hb}$ - удельная плотность гемоглобина, принимается равной 1,36 г/см<sup>3</sup>;

# 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



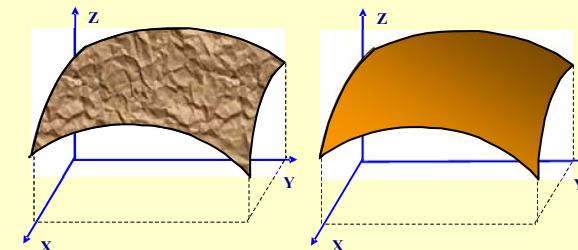
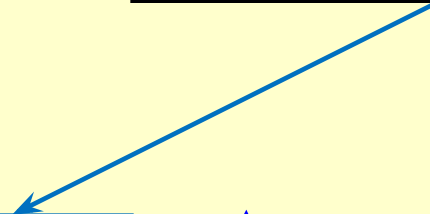
Удаляется из изображения путем вычитания постоянного наклона.

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

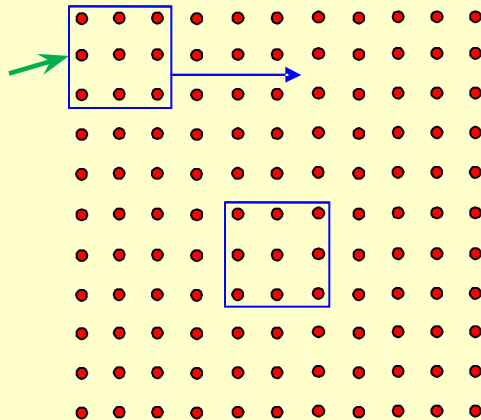
↓  
Шумы аппаратуры

↓  
Дефекты на матрице

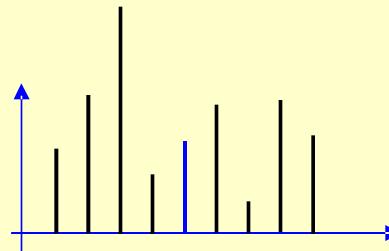
↓  
Внешние акустические шумы и вибрации

↓  
Устраняется из изображения в результате применения различных фильтров

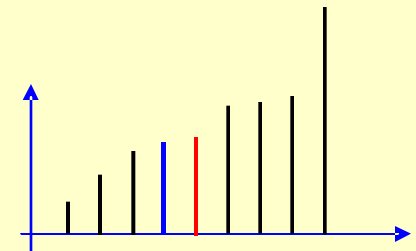
Участок применения фильтра



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



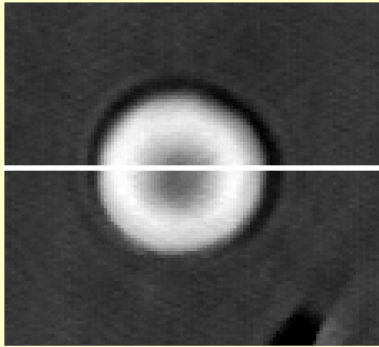
расположение элементов в отсортированном массиве (новый центральный элемент помечен красным цветом)



Процедура позволяет увеличить точность изображений

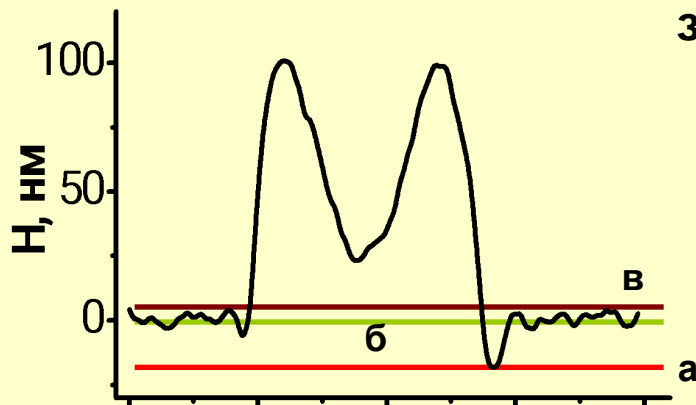
# Определение размеров клеток

## 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).

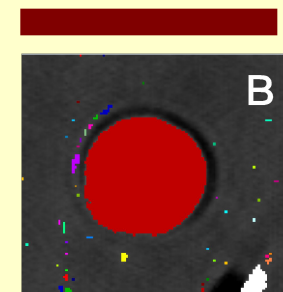
**Изменение фонового значения приводит к значительным изменениям площади объектов.**



$H = -20$  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?

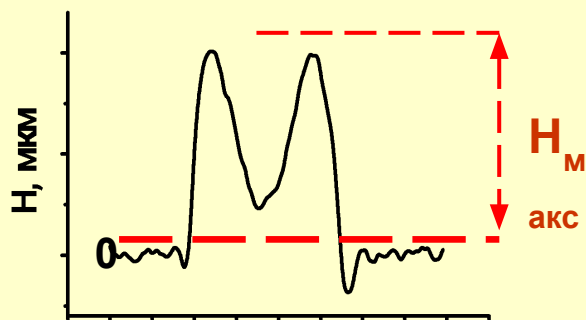
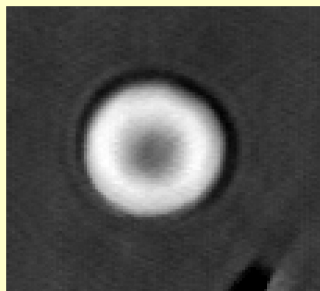
однозначного ответа нет, зависит от формы проведения эксперимента, количества экспериментальных данных, приборной погрешности и т.д.

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

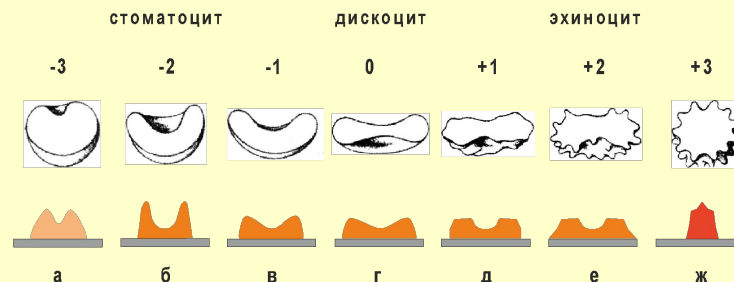
Тем не менее подобный подход применим к обработке любых микроскопических данных

# 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

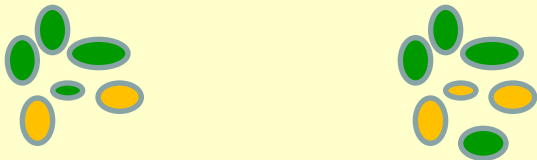
## порядковые

(оценка их доли)

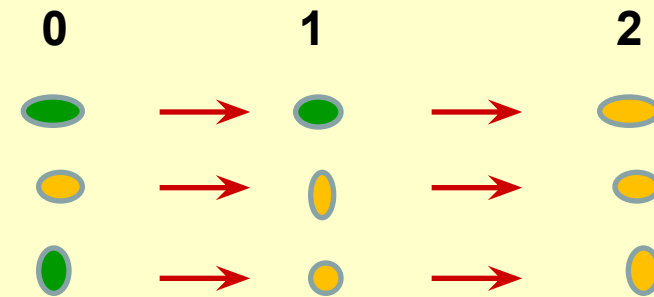
# Статистическая обработка

## Схема построения эксперимента

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



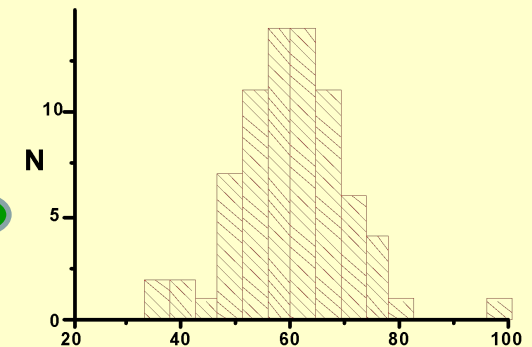
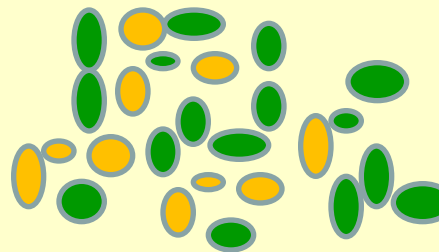
Изменение пробы во времени



## 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.

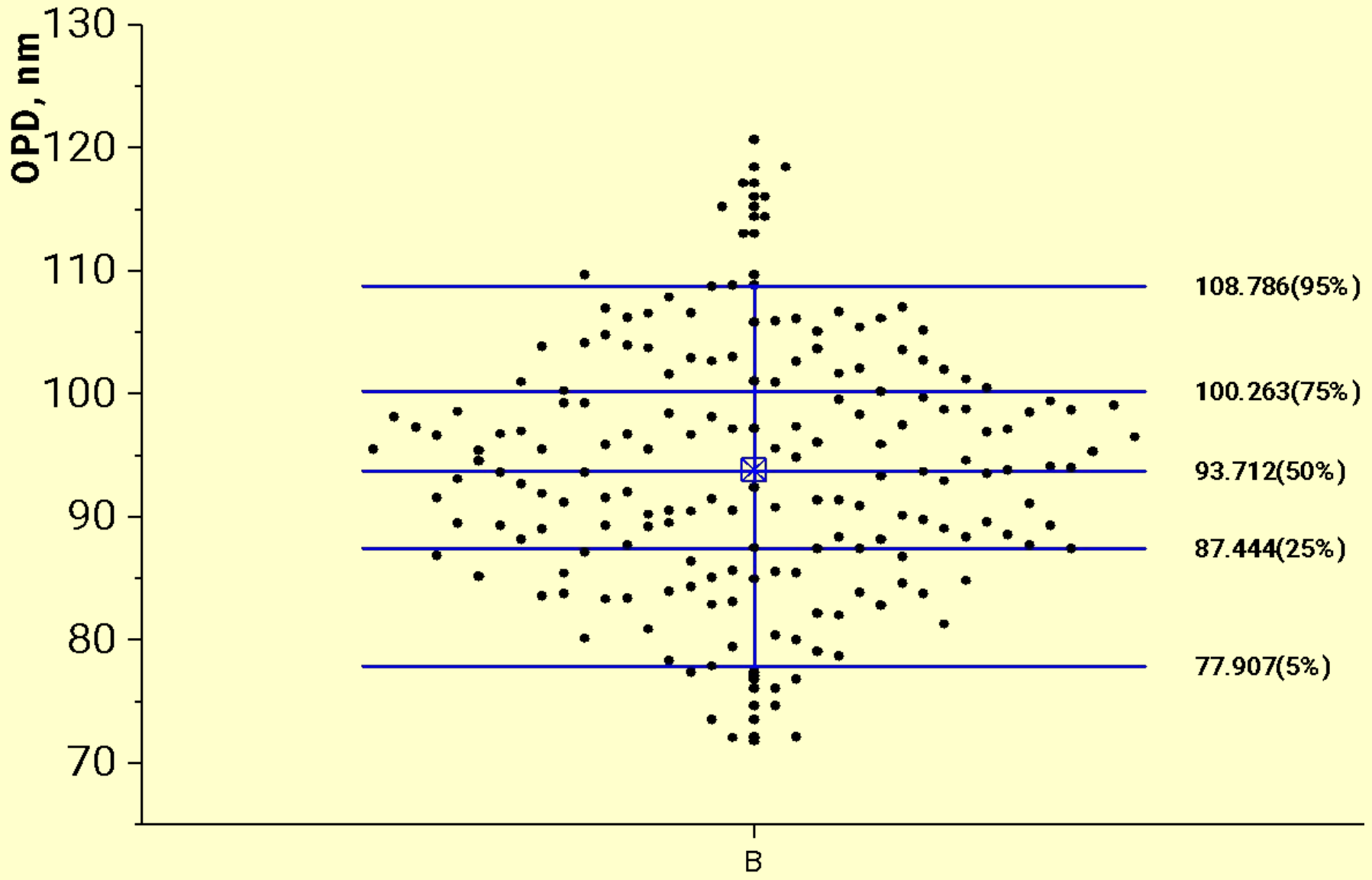
**Стандартное отклонение** 
$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$
 Только для нормального распределения!  
Оценивает широту распределения, характеризует разброс данных

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

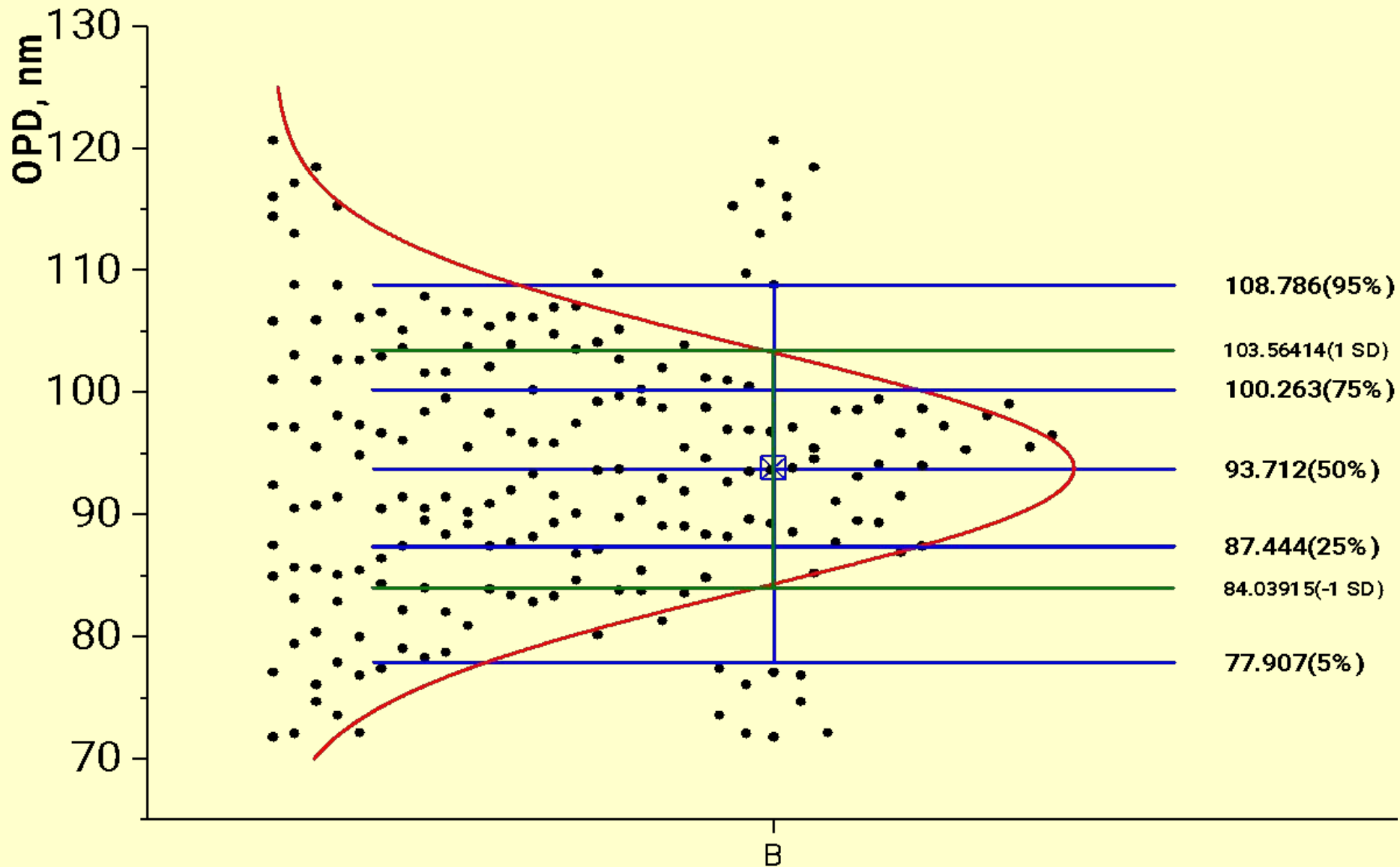
**Квантили, квартили (интерквартильный размах)** Квантили характеризует собой частоту попадания значений переменной в определённые интервалы. Чаще всего используется разделение на 4 интервала (25%, 50%, 75%).

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

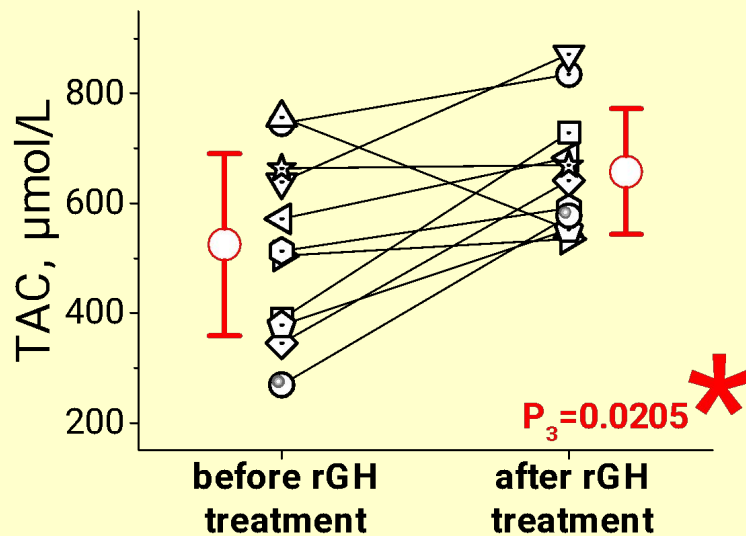


## Описательная (дескриптивная) статистика

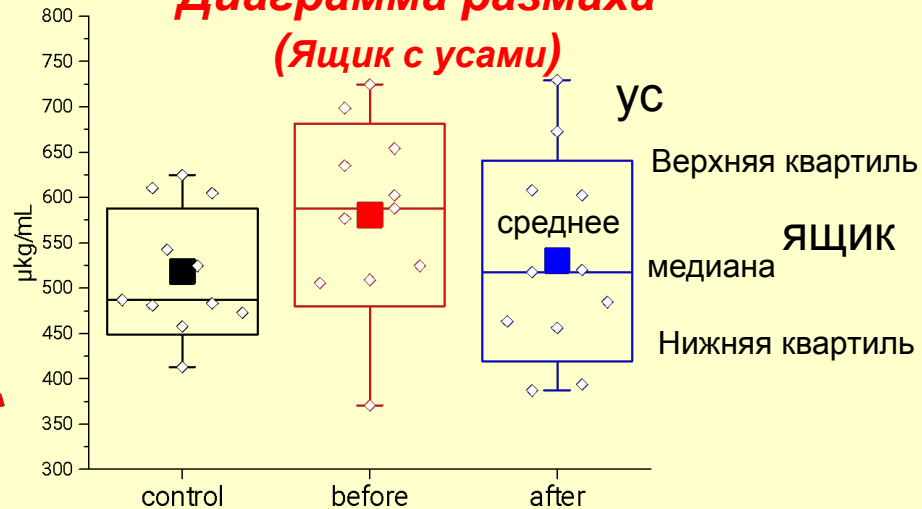


## Графическое представление результатов

### Количественные данные



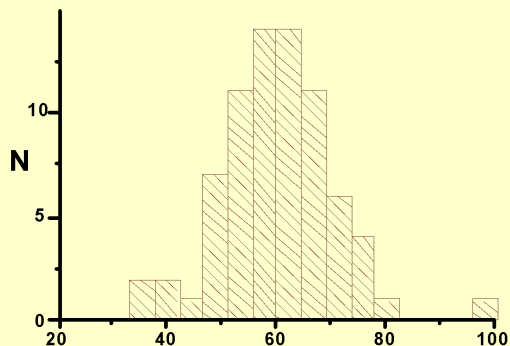
### Диаграмма размаха (Ящик с усами)



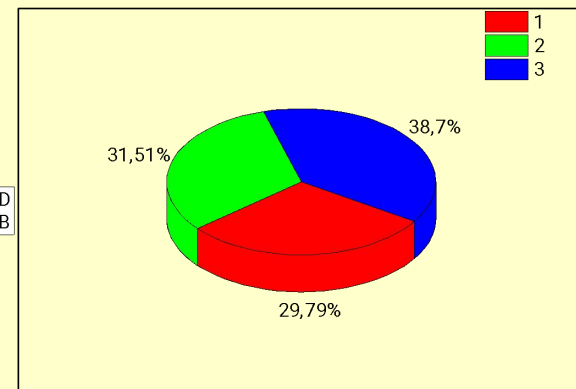
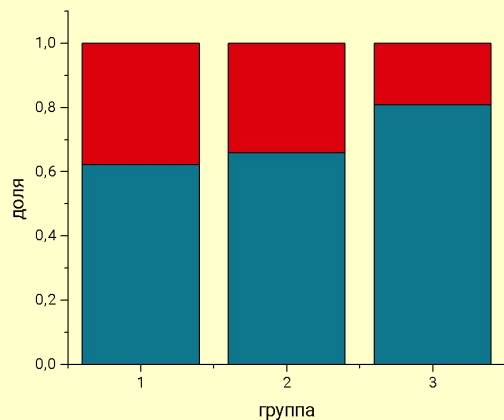
### Качественные данные

### 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 мышцы

Эритроциты

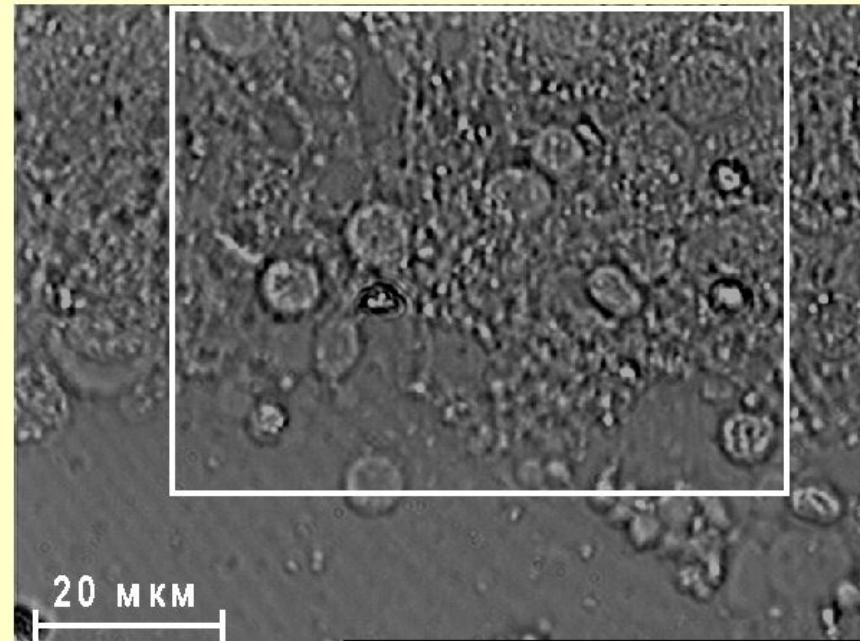
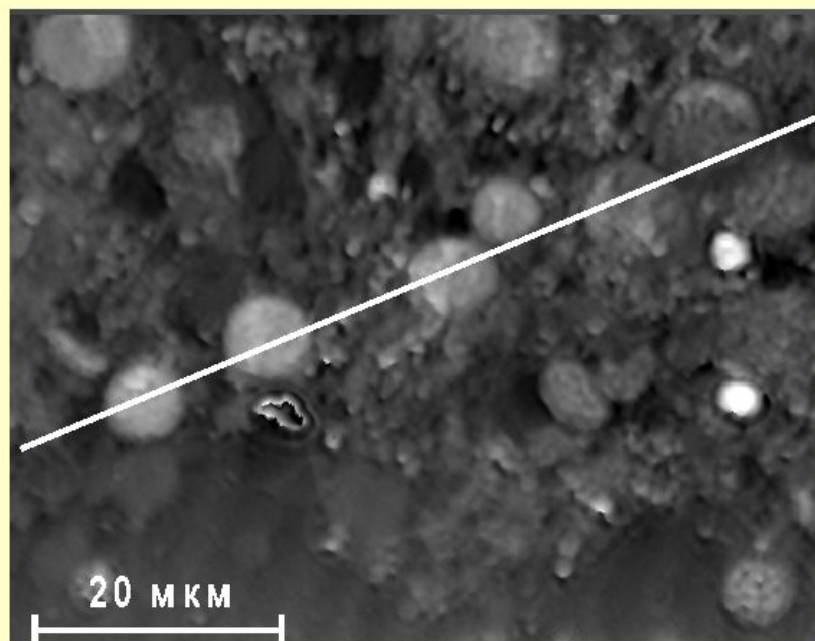
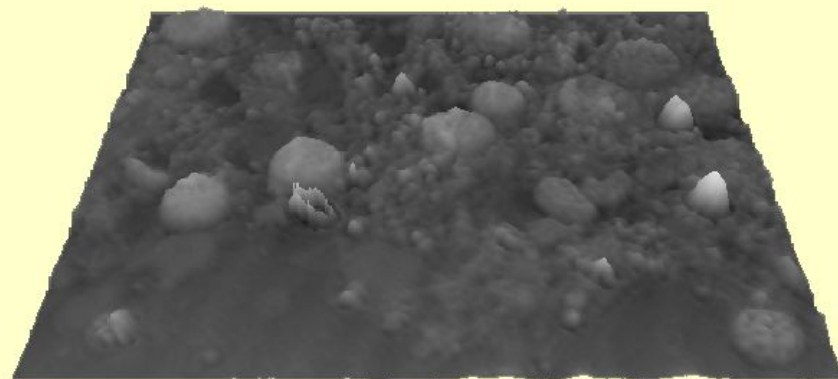
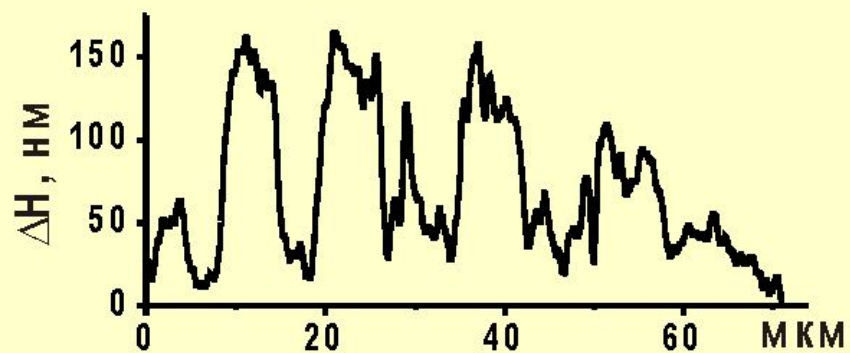
Нервное волокно

Визуализация коллоидов

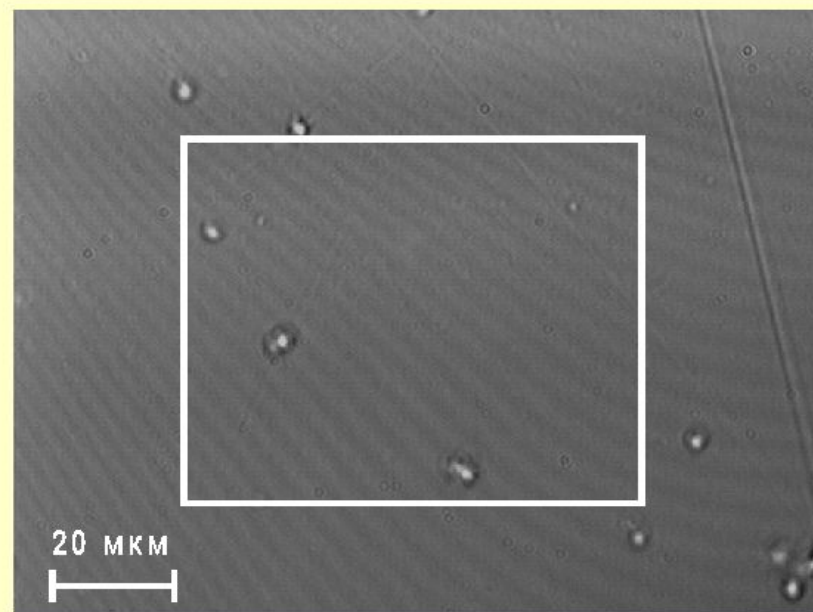
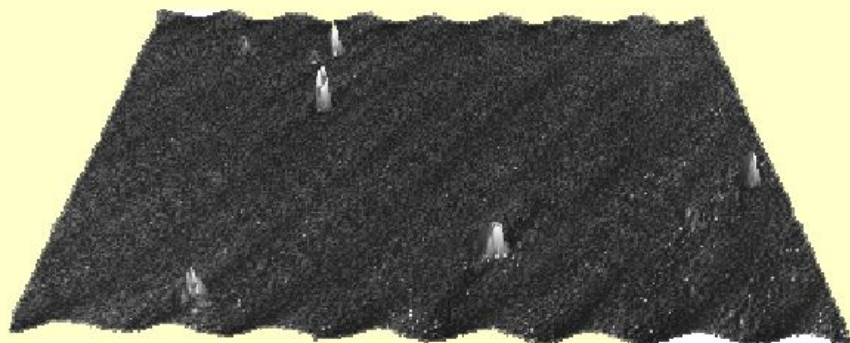
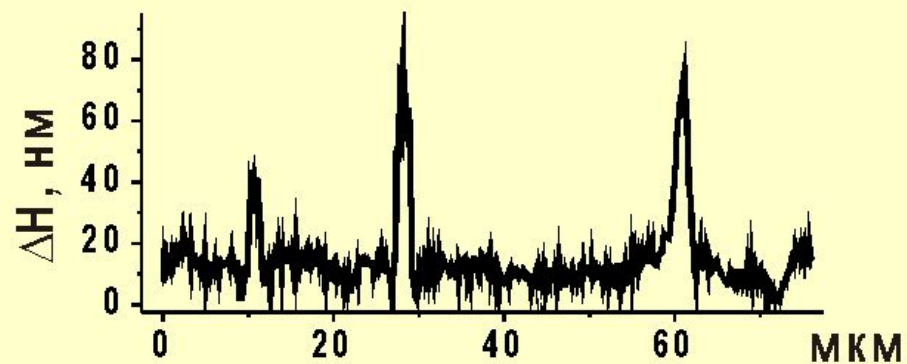
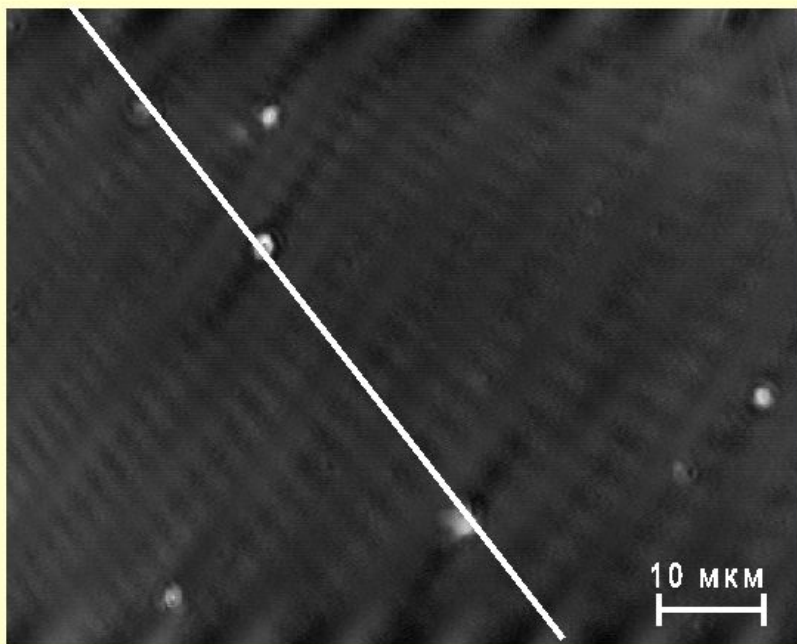
Сравнение с атомно-силовой микроскопией



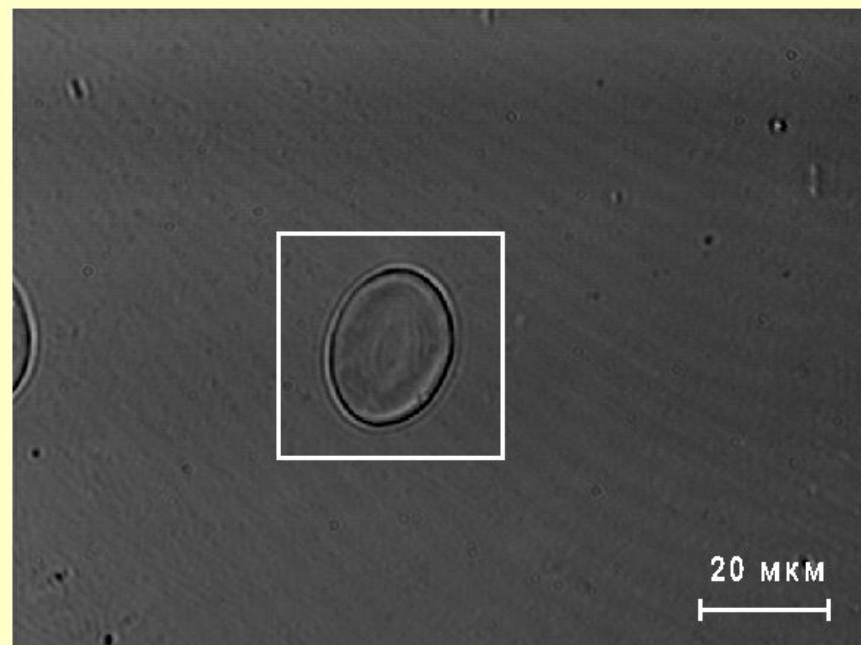
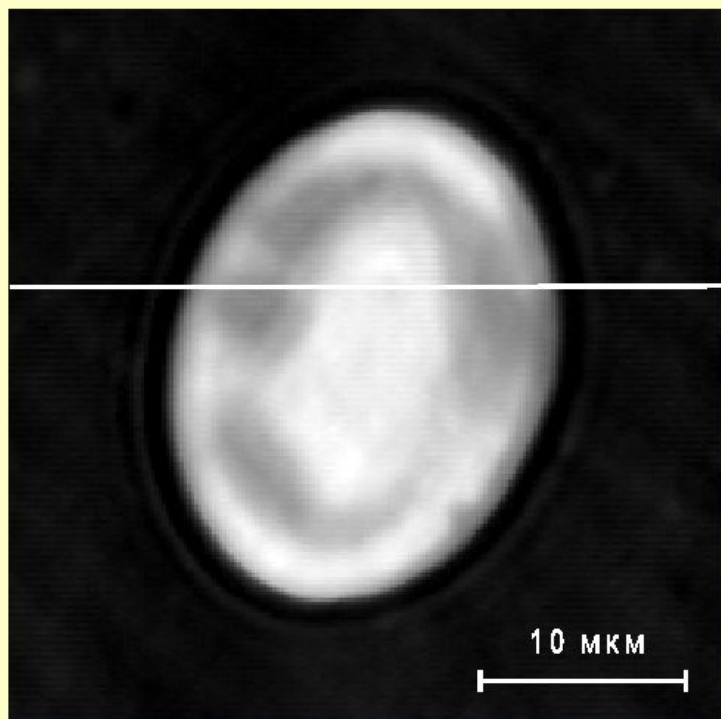
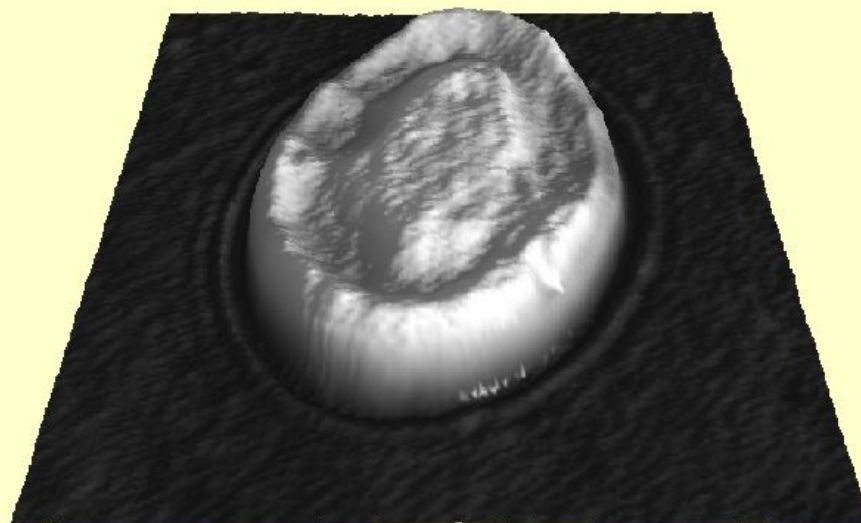
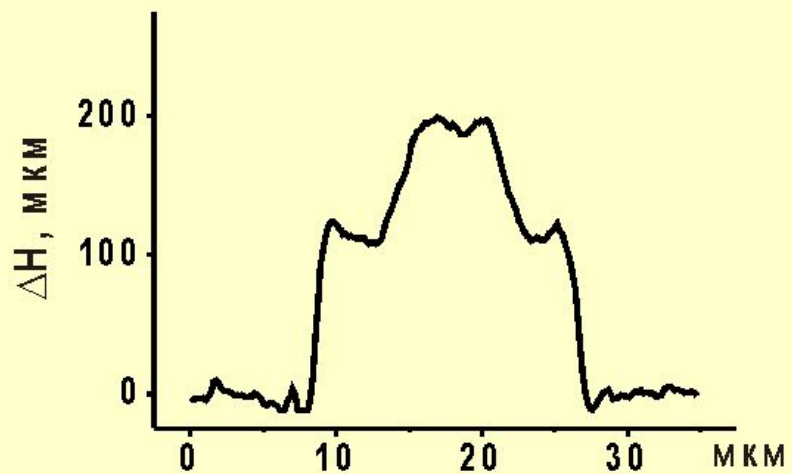
# Нейробластулы (стволовые клетки в культуре)



# Тромбоциты человека



# Эритроциты лягушки



# Эритроциты лягушки в растворах с различной осмолярностью

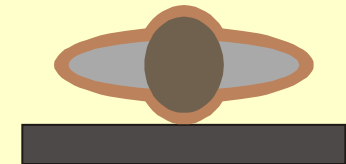
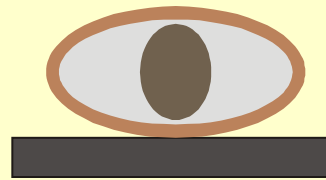
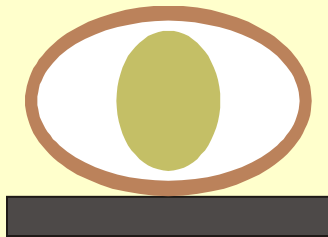
$$\Phi_i = (k_1^i z_1^i + k_2^i z_2^i + \dots + k_n^i z_n^i) - k_m z$$

Гипоосмолярный

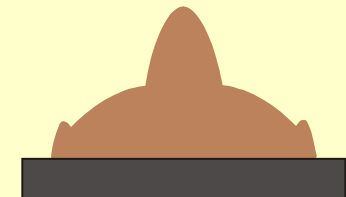
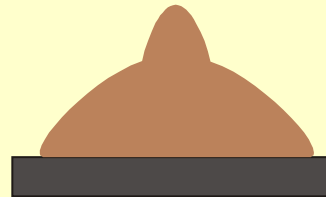
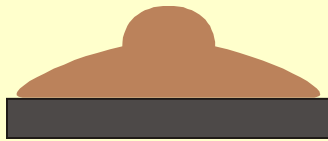
Нормоосмолярный

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

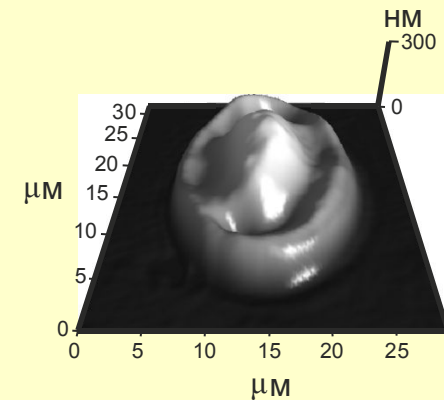
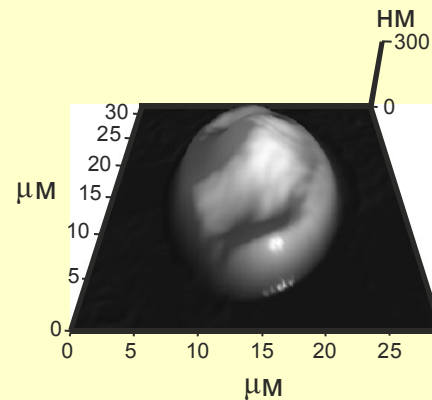
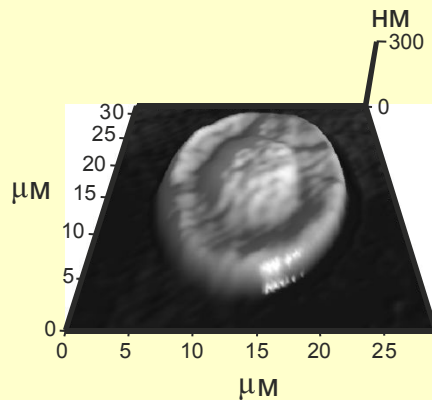
Нормоосмолярный

Гиперосмолярный

Световое  
изображение

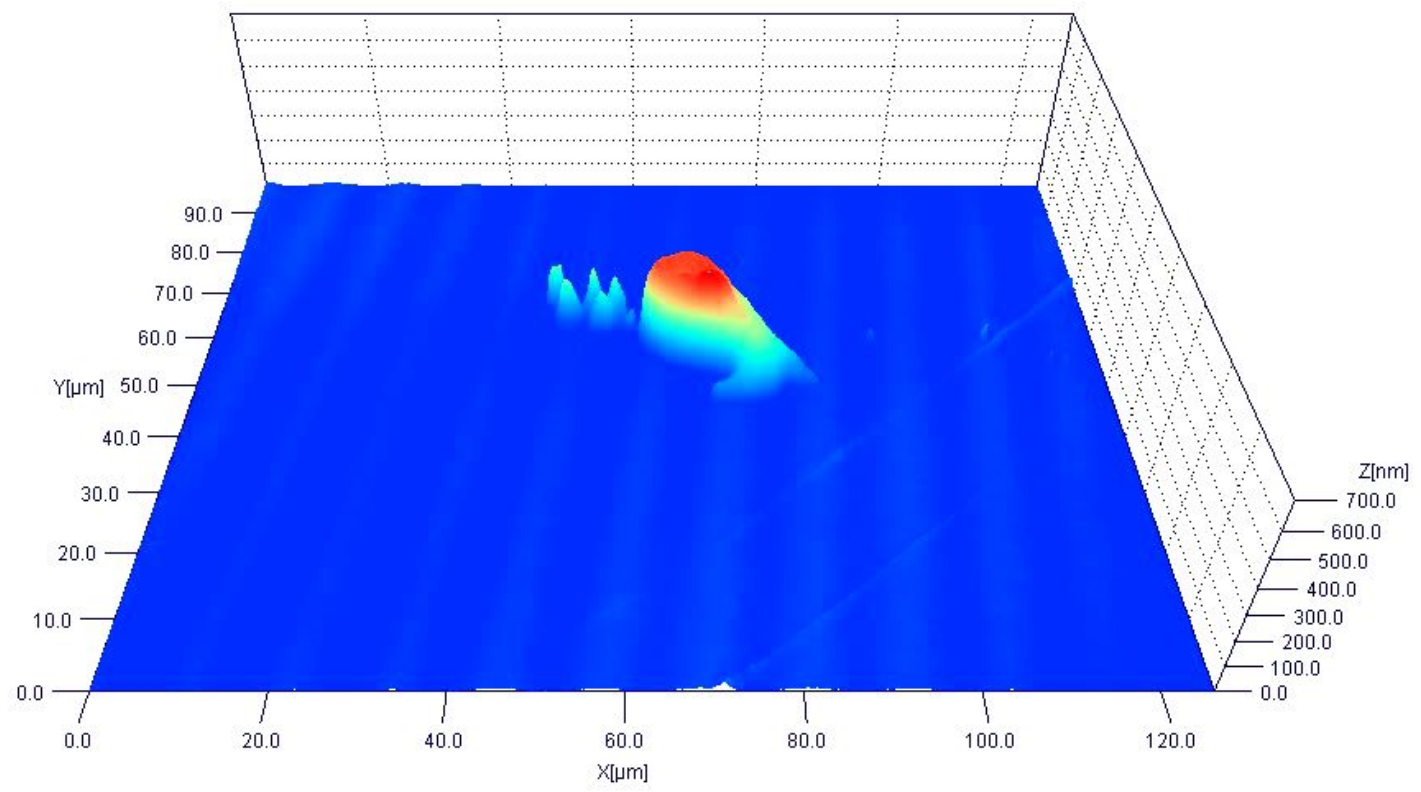


Фазовое  
изображение



# Эритроциты лягушки

## Апоптоз эритроцита лягушки



# Тучные клетки мыши

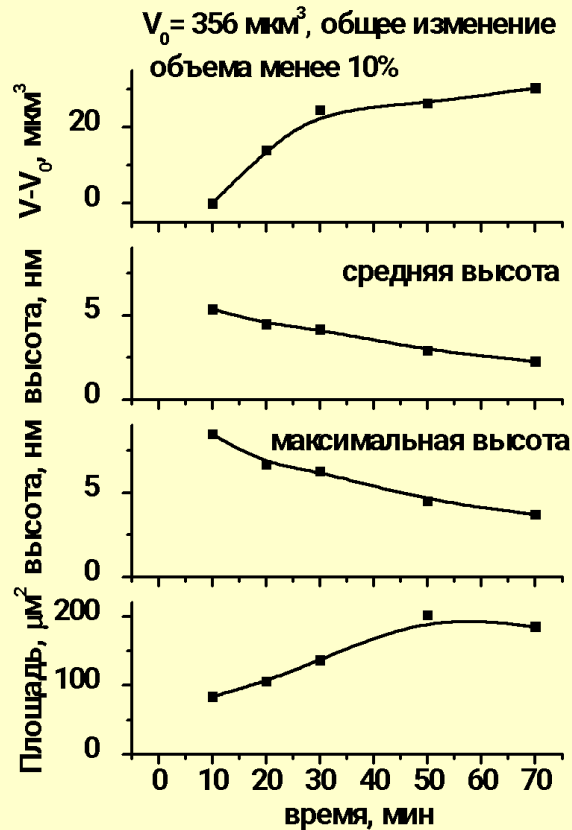
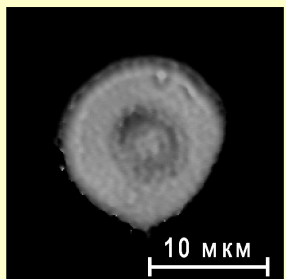
## Действие ионофора

Приводит к выбросу гистамина

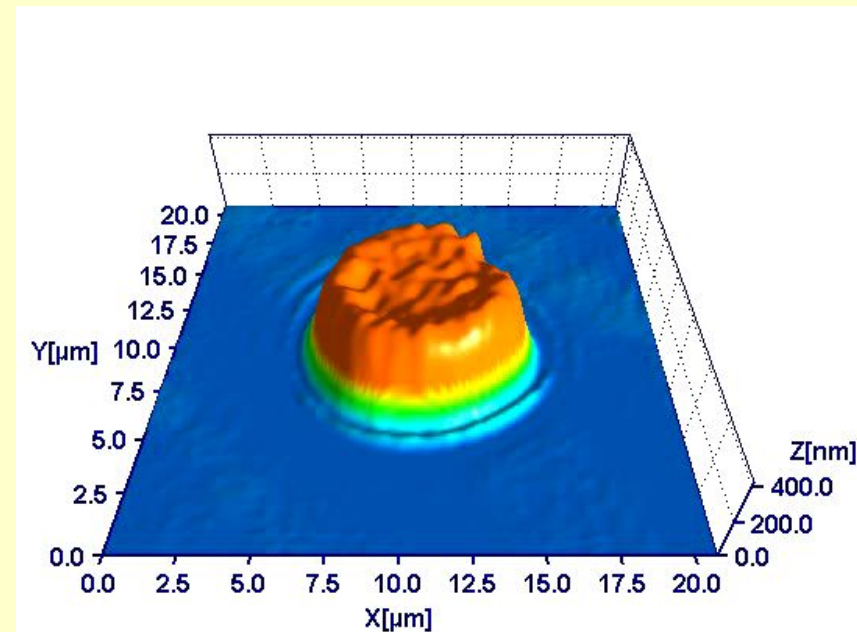
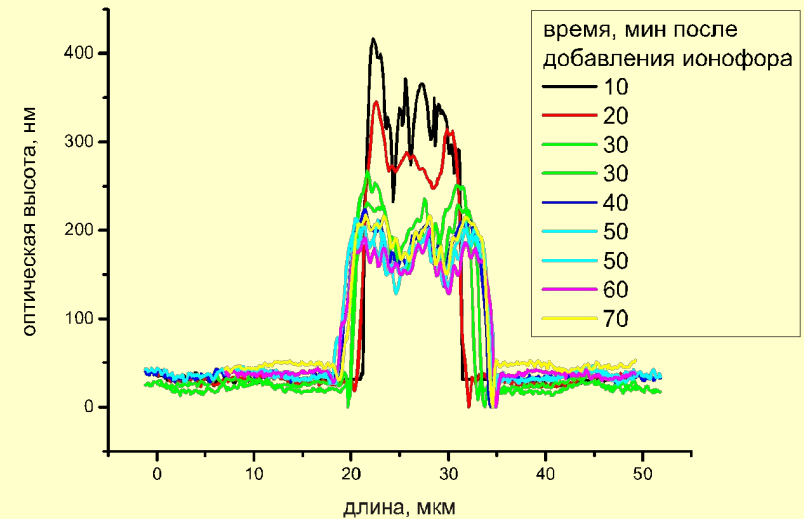
0 МИН



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**:

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

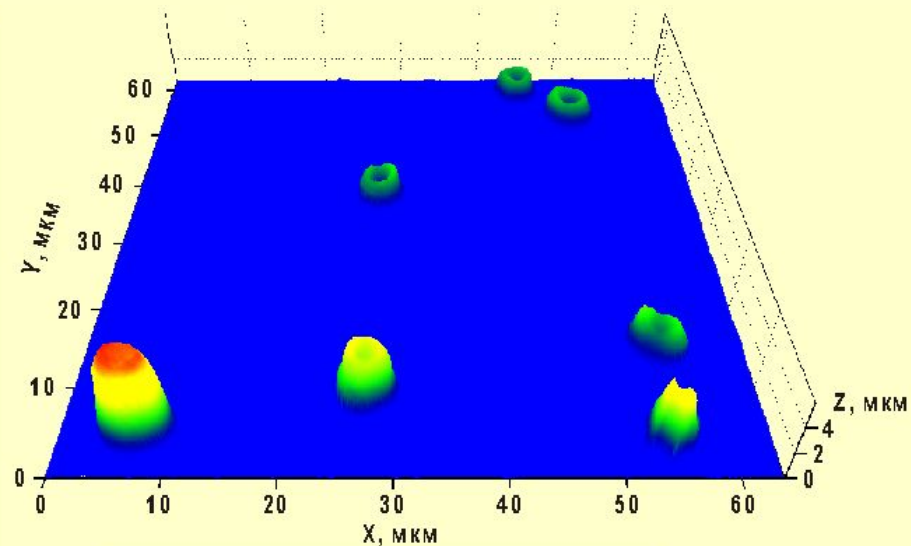
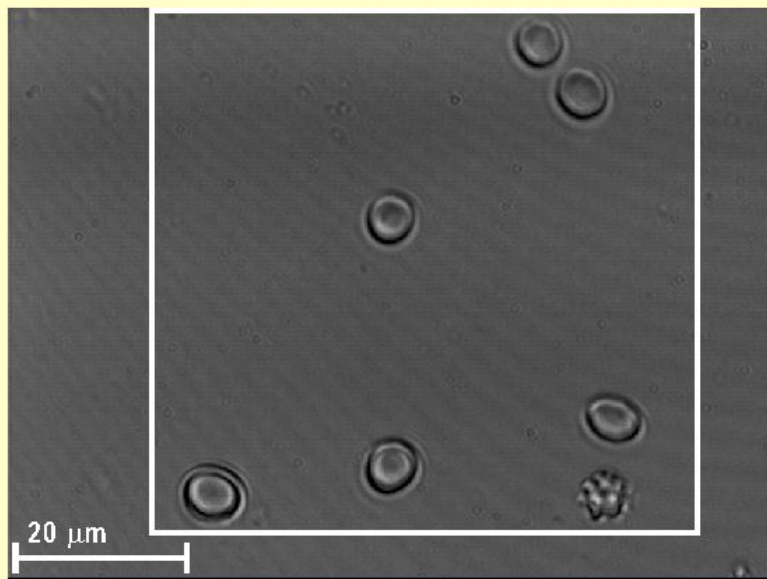
$n_1$  и  $n_2$  – показатели преломления среды, напр. плазмы, (1,335) и эритроцита (1,405), соответственно

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

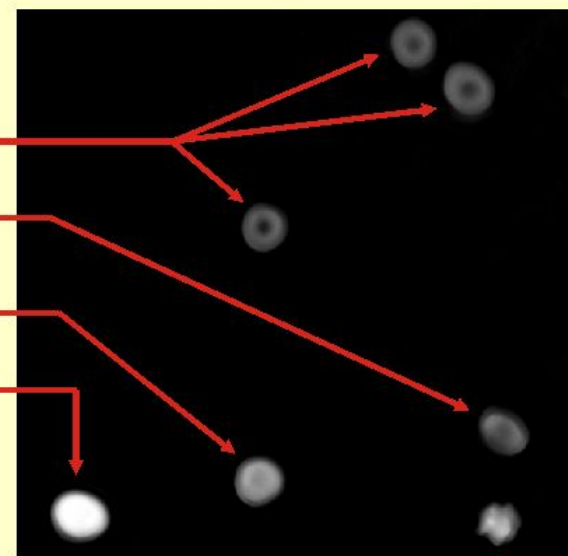
**Кроме этого оценка состояния эритроцитов является диагностическим критерием при оценке ряда патологий**

# 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

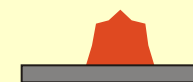
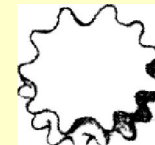
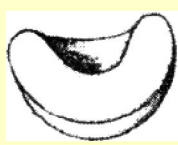
-  
1

0

+  
1

+  
2

+  
3



Сечение  
Реального объекта

Сечение  
фазового портрета

# Оценка формы

## Превращения эритроцитов при изменении pH

pH

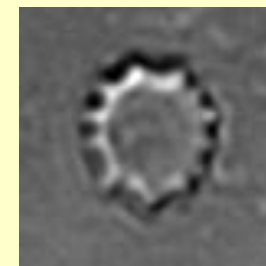
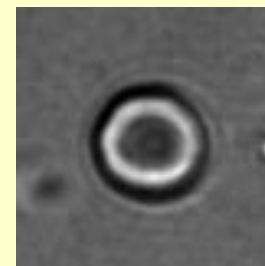
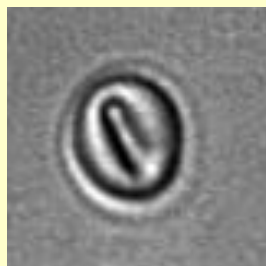
4.5

5.5

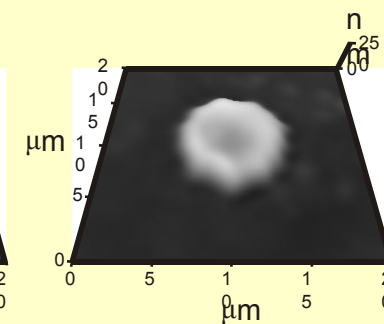
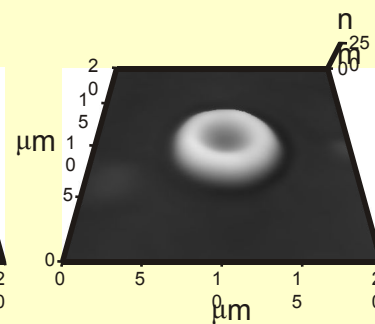
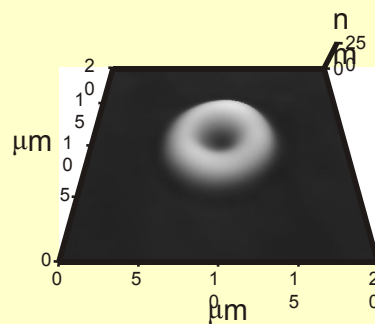
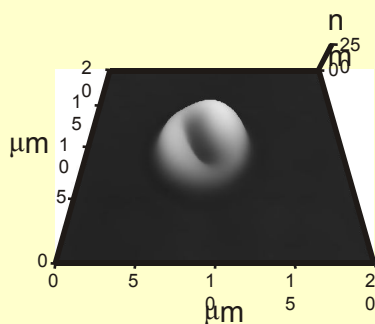
7.4

8.4

видео  
изображение

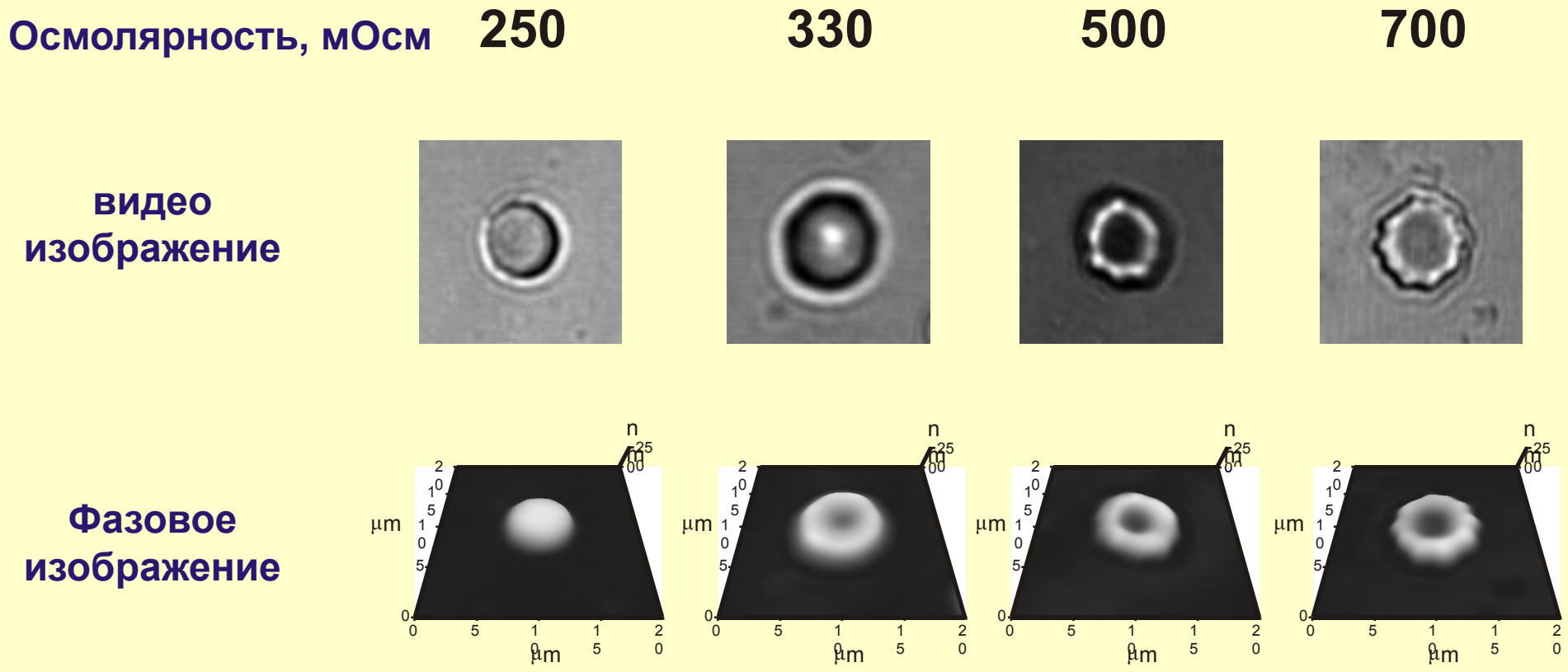


Фазовое  
изображение



# Оценка формы

## Превращения эритроцитов при изменении осмолярности



# 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:

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

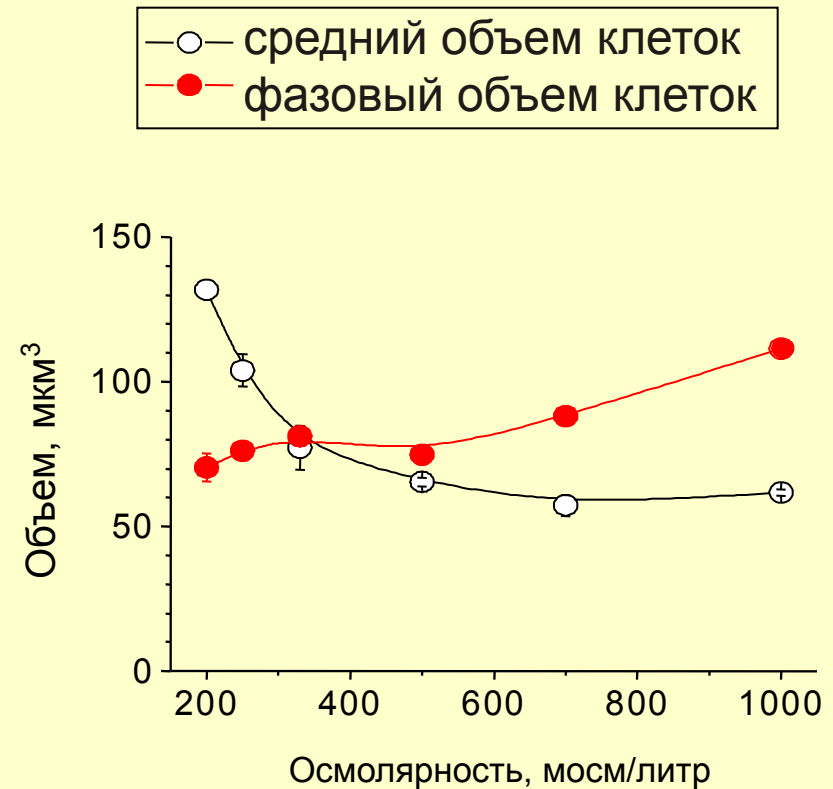
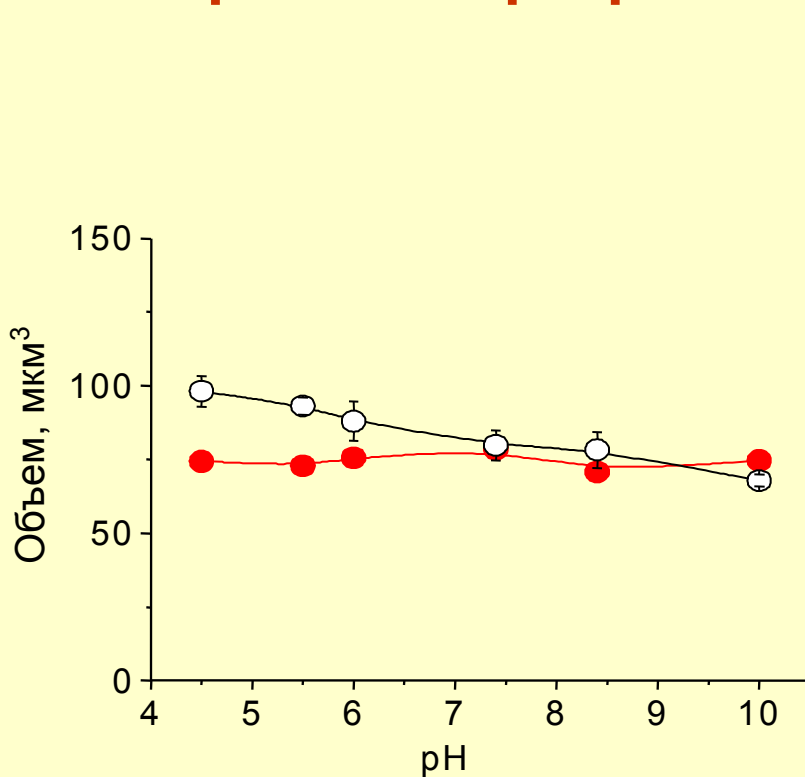
Таким образом, фазовый объем зависит от площади и показателей преломления среды и эритроцита

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

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

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

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

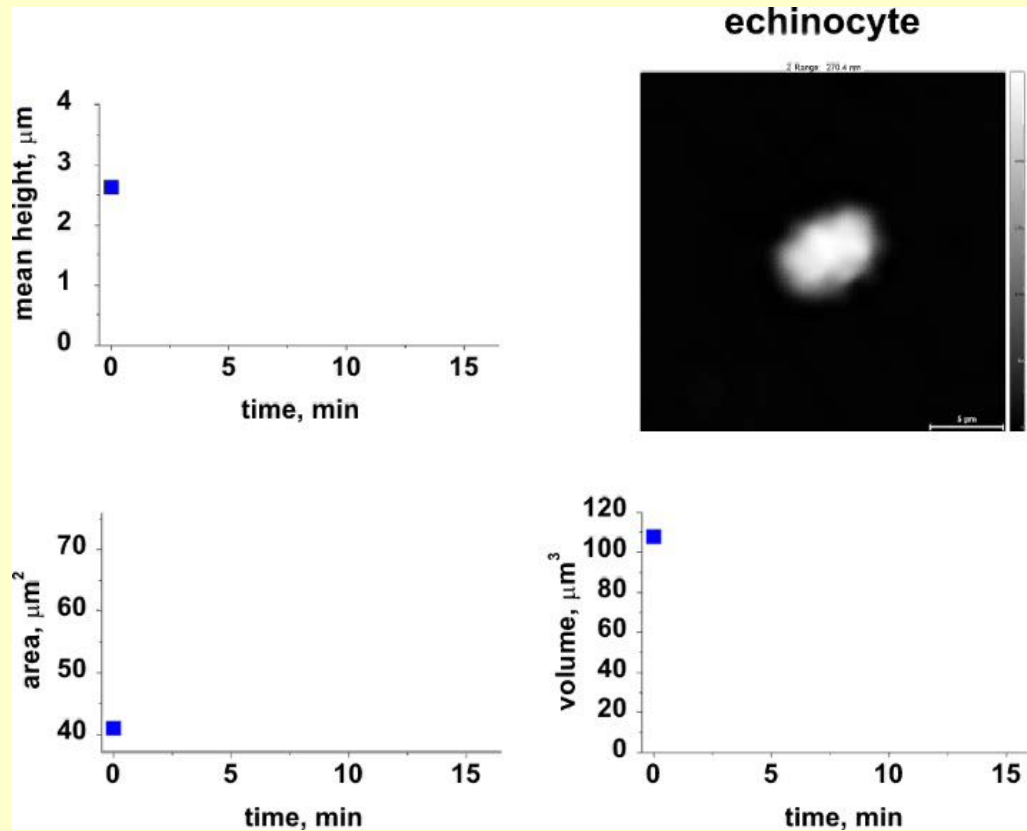
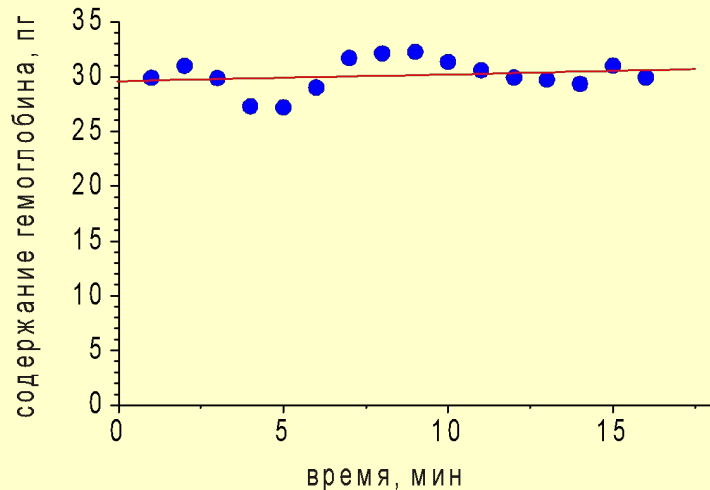
$V_{Hb}$  и  $m_{Hb}$  – объем и масса гемоглобина в эритроците, Величина  $\rho_{Hb}$ , принимается равной  $1,36 г/см^3$

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

Фазовый объем пропорционален содержанию гемоглобина в эритроците

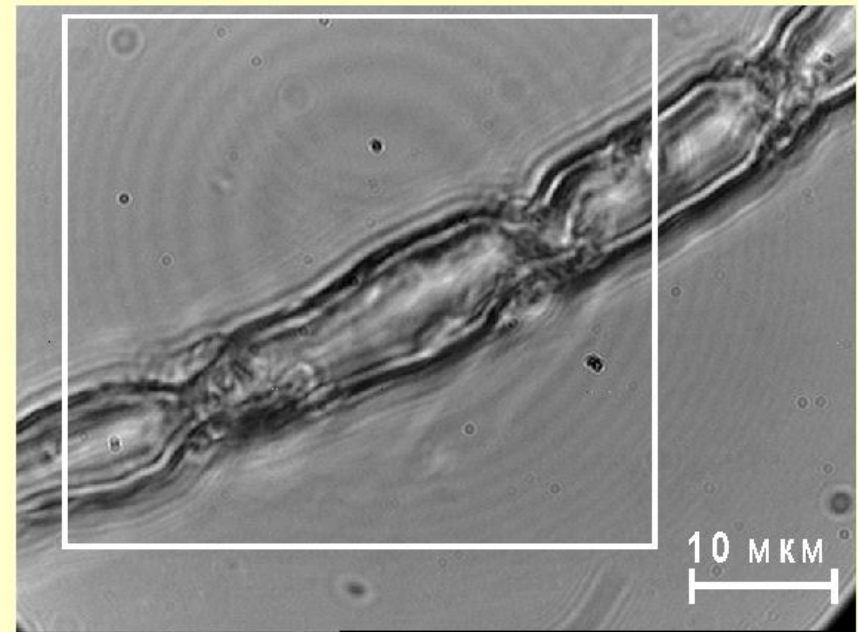
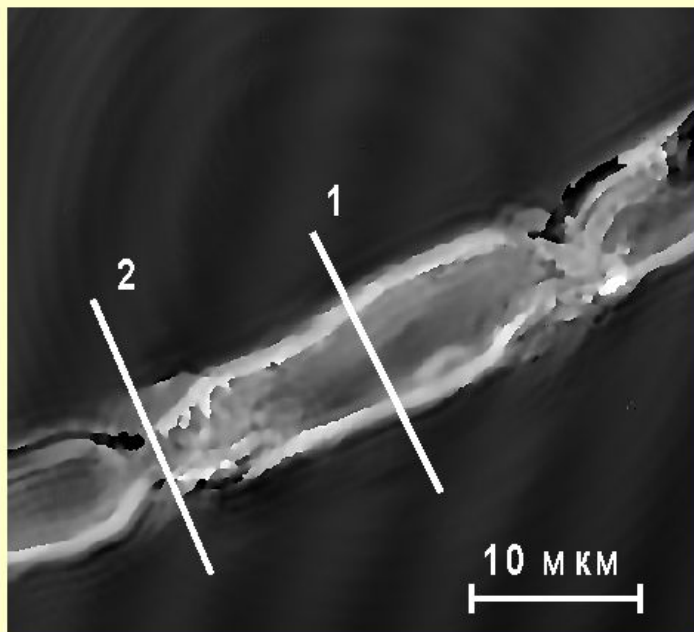
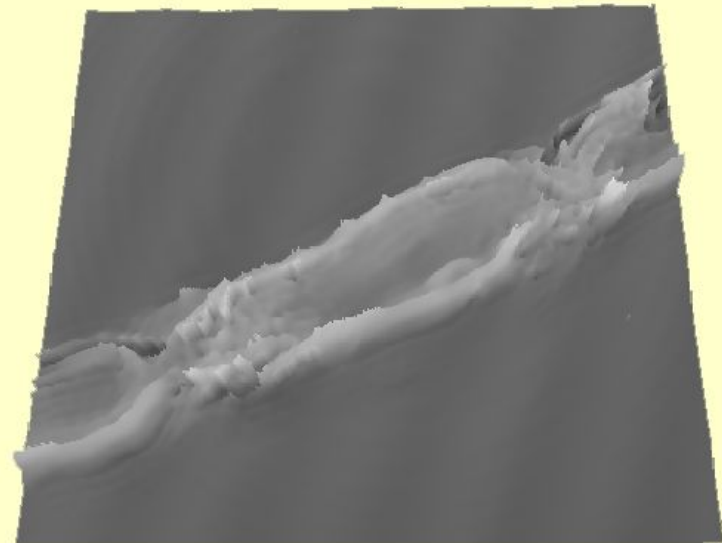
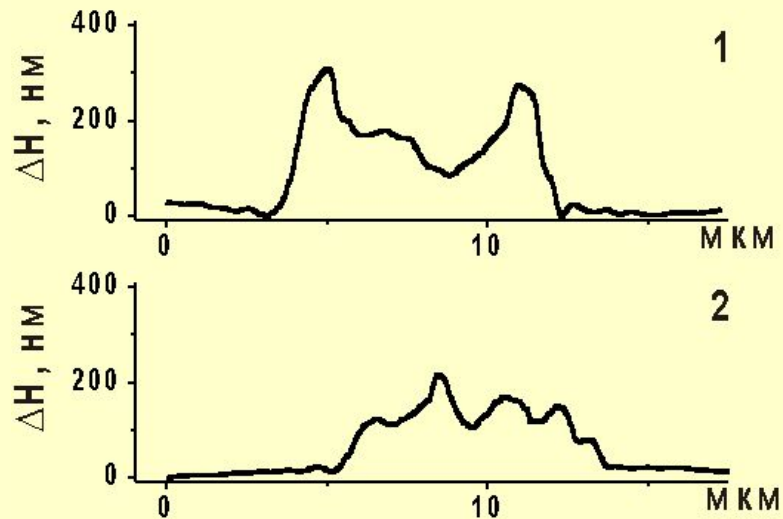
# Определение содержания гемоглобина

## 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



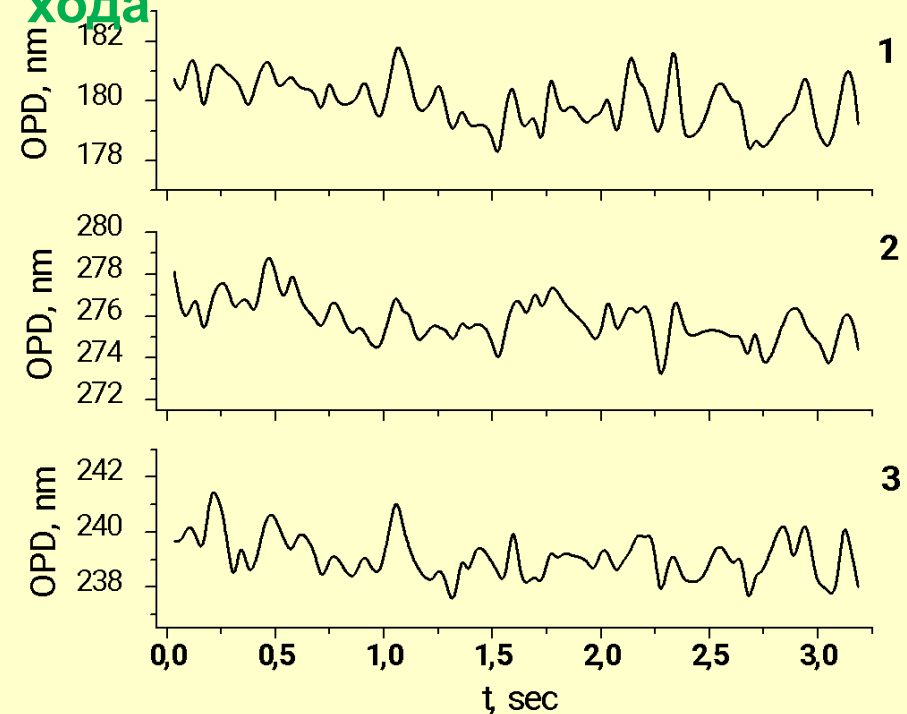
# Нервное волокно лягушки

Фазовое изображение участка нервного волокна

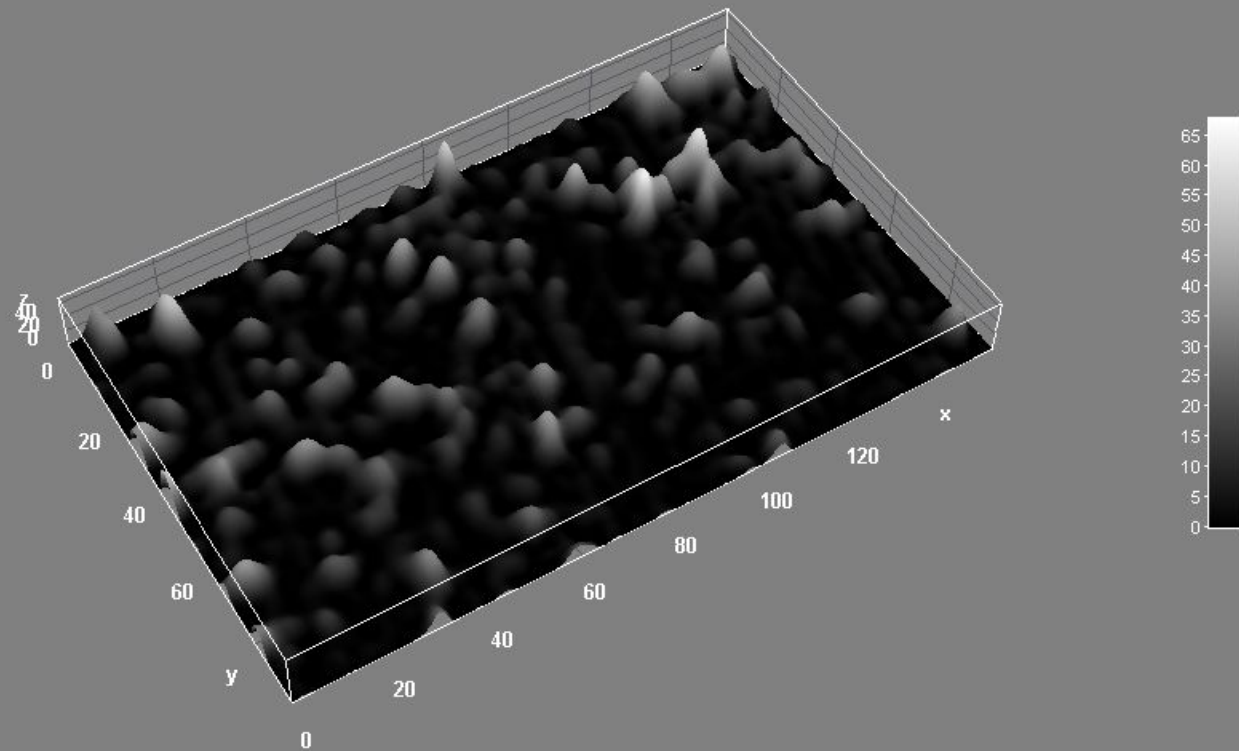


Скорость съемки -29.5 фазовых изображений в секунду

Изменение оптической разности хода

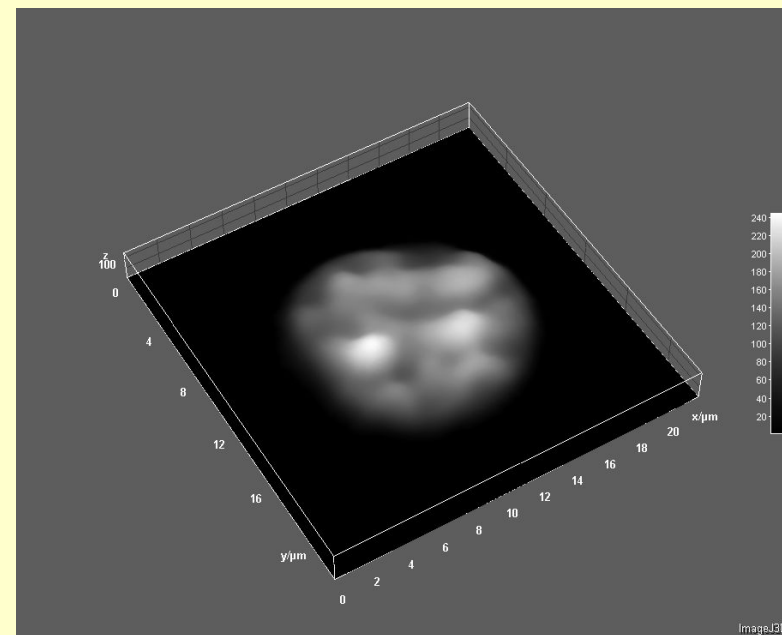


# **Визуализация КОЛЛОИДОВ**

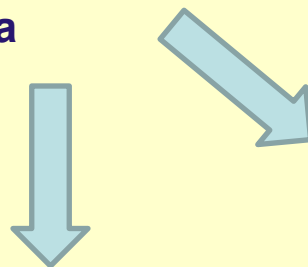


# Нейроны прудовика

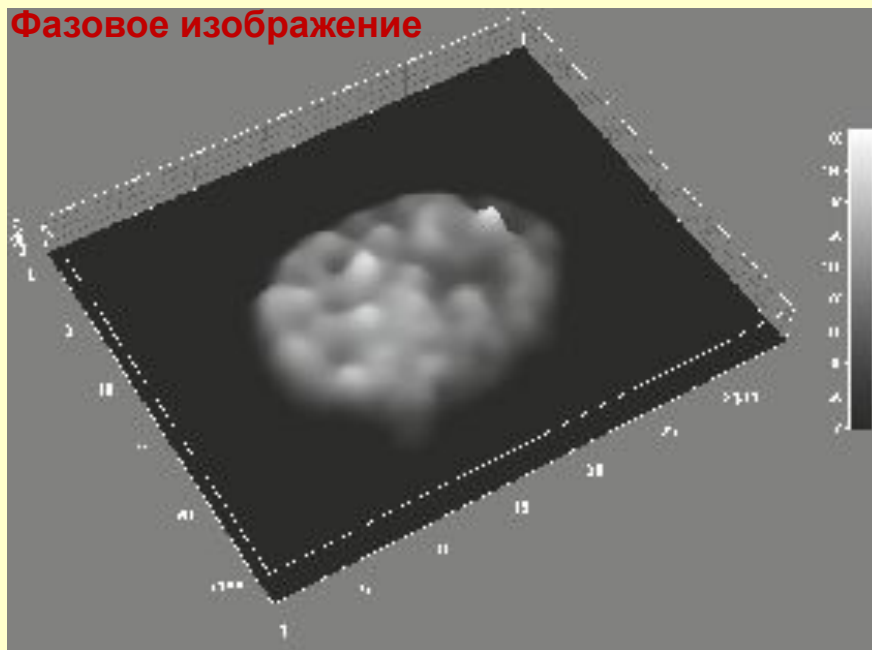
Нейроны прудовика в физиологическом растворе



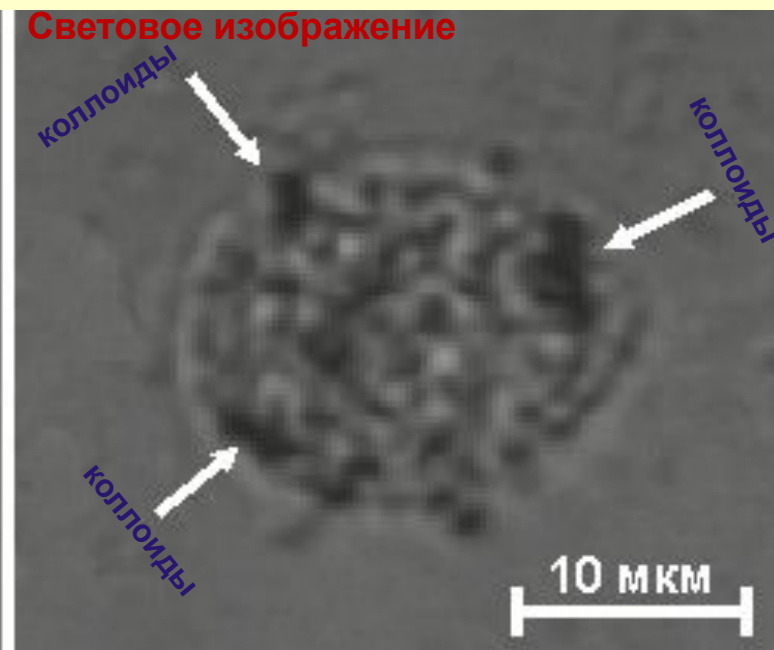
Нейроны прудовика в физиологическом растворе + коллоиды серебра



Фазовое изображение

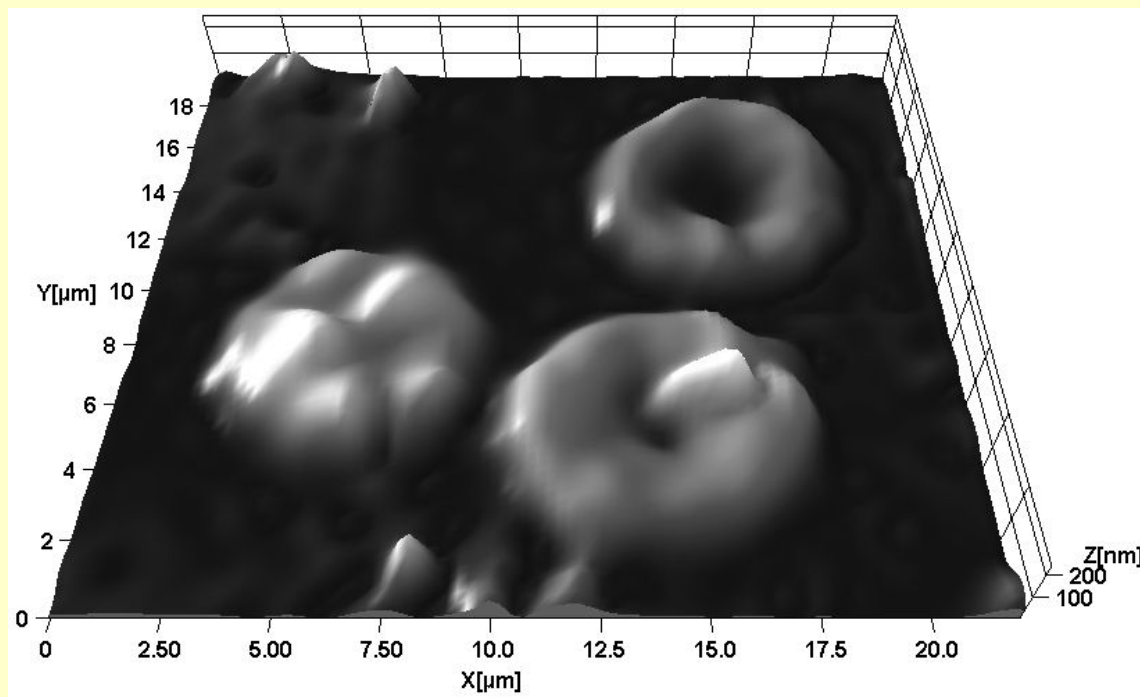


Световое изображение

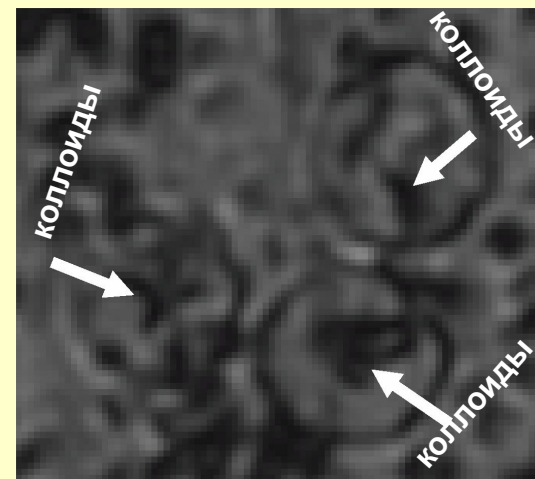


# Эритроциты крысы физиологическом растворе + коллоиды серебра

## Фазовое изображение



## Световое изображение





# Сравнение с атомно-силовой микроскопией

# Эритроциты в растворах с различной осмолярностью

безъядерные

Гипотонически

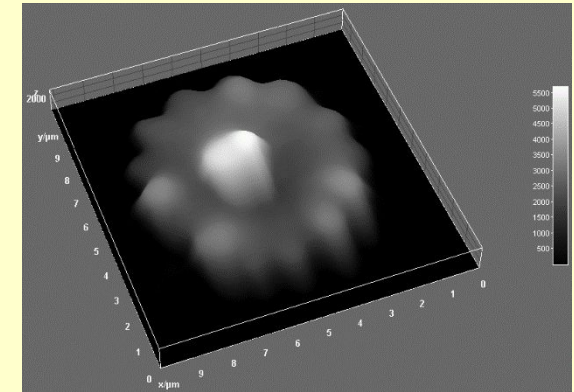
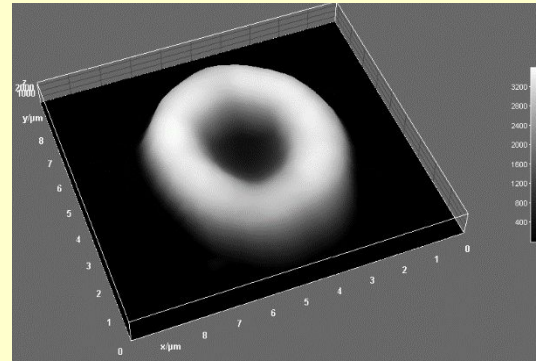
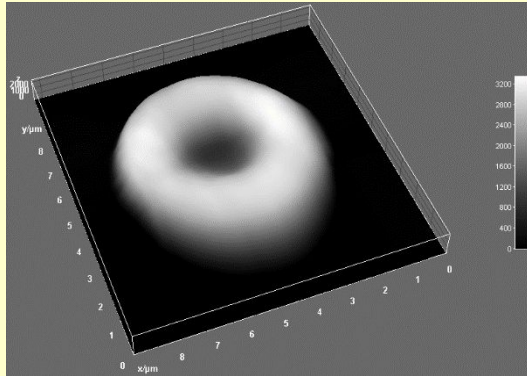
Изотонически

Гипертонически

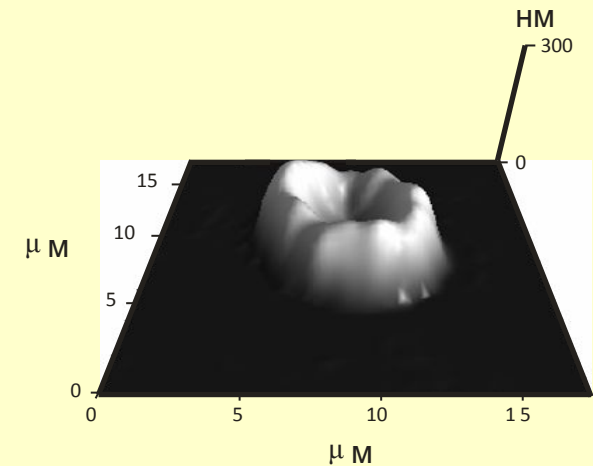
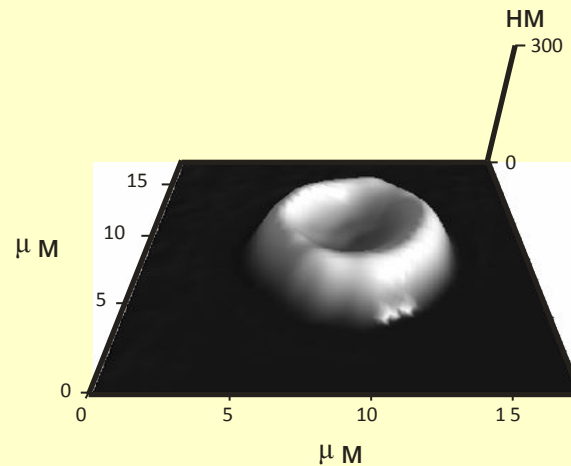
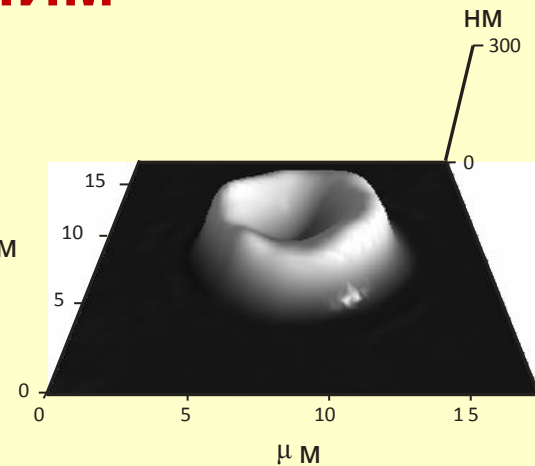
АОМ

й

й



ЛИМ



# Эритроциты в растворах с различной осмолярностью

ядерные

Гипотонически

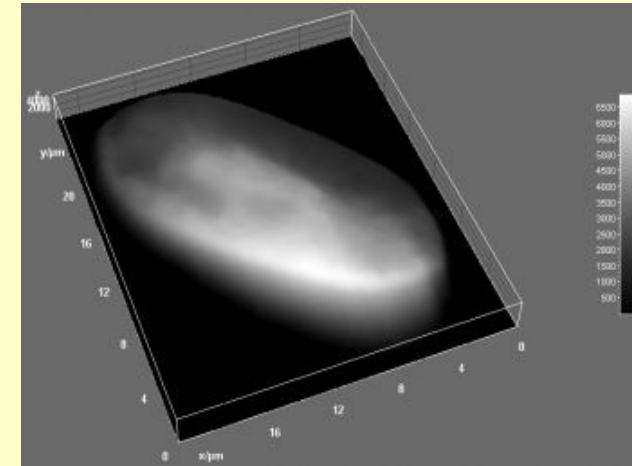
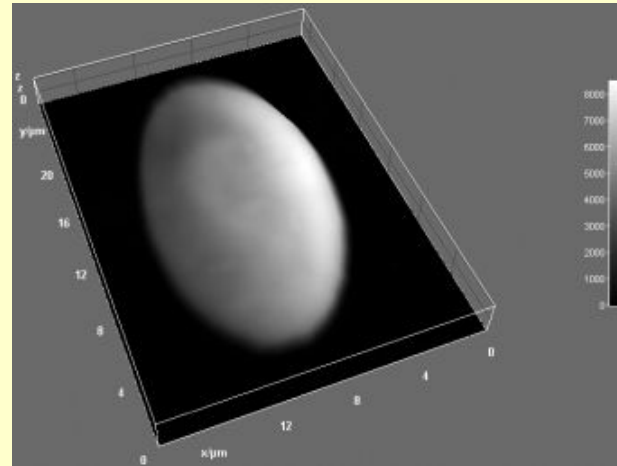
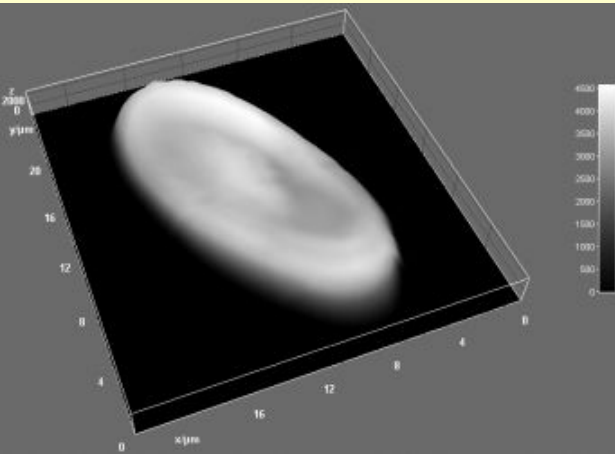
Изотонически

Гипертонически

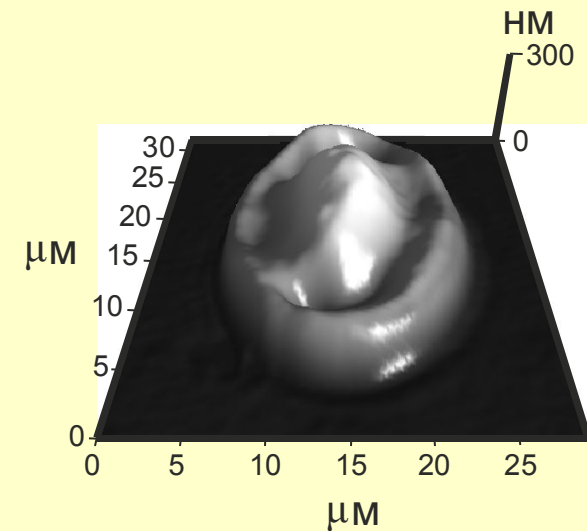
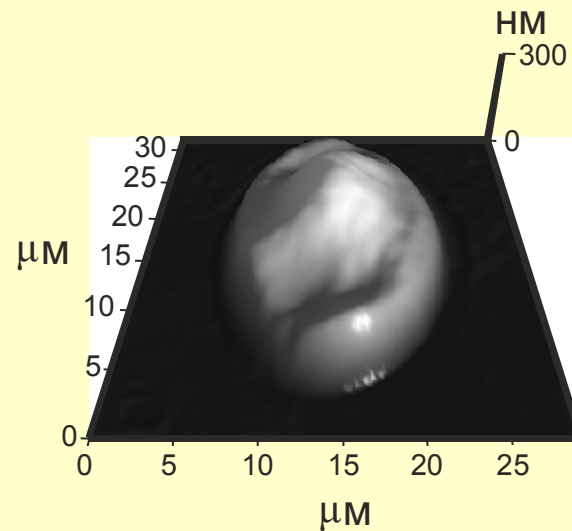
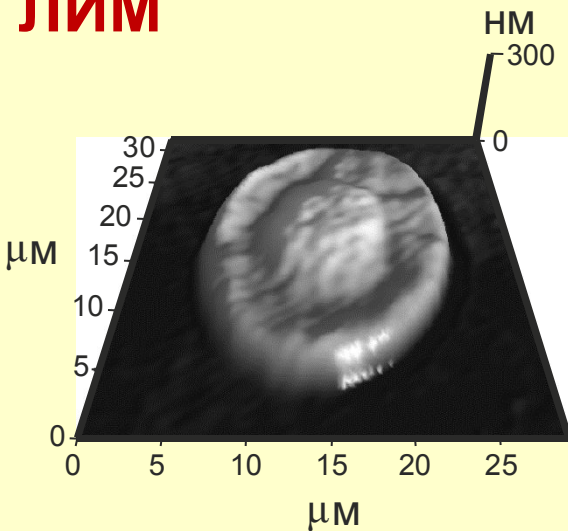
АОМ

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