

УДК 535.31; 681.7; 53.082.5

## СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЖИВЫХ И ФИКСИРОВАННЫХ 4% РАСТВОРОМ ФОРМАЛИНА ЛИМФОЦИТОВ

**Клемяшов И.В.**, научный сотрудник, E-mail: iv\_klem@mail.ru.

**Вышенская Т.В.**, к.ф.-м.н., E-mail: tvysh@yandex.ru.

**Звержховский В.Д.**, E-mail: wladzwer@mail.ru.

**Кретушев А.В.**, к.т.н., E-mail: kretushev@mail.ru.

**Румянцев С.А.**,\* д.мед.н., профессор, E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru.

**Евдокимов А.А.**, д.х.н., профессор, E-mail: evdokimov@mirea.ru.

МИРЭА, \*ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачёва, Москва, Россия

**Аннотация.** Сравнение фазовых изображений фиксированных и живых лимфоцитов, полученных методом когерентной фазовой микроскопии, позволило установить характерные изменения параметров фазовых портретов при фиксации 4% раствором формалина, а также его содержание внутри клетки. Показано, что в живой клетке диагностически значимые параметры (фазовая толщина, рефрактерность органелл и фазовый объём), связанные с метаболическими процессами, имеют характерные изменения на границах органелл, отсутствующие в фиксированных клетках. Площади органелл фиксированных Т-лимфоцитов, определенные с помощью S-функций, остаются без изменения.

**Ключевые слова:** фазовая микроскопия, оптические параметры клетки, фиксация клеток, лимфоциты.

## COMPARISON OF OPTICAL PARAMETERS OF THE LIVE AND FIXED 4% SOLUTION OF FORMALIN OF LYMPHOCYTES

**Klemyashov I.V.**, E-mail: iv\_klem@mail.ru.

**Vyshenskaya T.V.** Ph. D., E-mail: tvysh@yandex.ru.

**Zverzhkhovskiy V.D.**, E-mail: wladzwer@mail.ru.

**Kretushev A.V.** Ph.D., E-mail: kretushev@mail.ru.

**Rumyanzev S.A.** \* Dr. Sci., E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru.

**Evdokimov A.A.** Dr. Sci., E-mail: evdokimov@mirea.ru.

MIREA, \*FSCC PHOI n.a. D.Rogachev, Moscow, Russia.

**Abstract.** Comparison of phase images of the fixed and live lymphocytes obtained by the method of coherent phase microscopy allowed to reveal characteristic changes of parameters of phase portraits at fixation by 4% formalin solution. It is shown that in living cells the significant parameters for medical diagnostics (phase thickness, refractivity of organelles and phase volume) connected with metabolic processes have the characteristic changes on borders of organelles which are absent in the fixed samples. The areas of organelles of the fixed T-lymphocytes determined by means of integral S-functions remain without change

**Keywords:** phase microscopy, optical parameters of a sells, fixing of cages, lymphocytes.

### Введение.

Фазовая микроскопия - один из наиболее перспективных и динамично развивающихся методов микроскопии в биологии и медицине, что обусловлено рядом его особенностей - для этого метода не требуется фиксации, красителей и специальной подго-

товки образцов, клетки могут исследоваться живыми в питательной среде [1-6]. Было показано [2,5,6], что с помощью параметров фазовых изображений могут быть определены количественно не только размеры и форма живой клетки и ее органелл, но и их функциональное состояние. Большинство существующих методов микроскопии применяется для работы с фиксированными клетками - традиционным объектом учёных медиков. В фазовой микроскопии фиксированные клетки также применяются наравне с живыми [7,8]. В работе [7], выполненной на фиксированных срезах тканей опухоли, методом фазовой микроскопии было показано, что показатель преломления ядра опухолевой клетки больше, чем нормальной. Эти же авторы показали [9], что показатель преломления ядра пропорционален концентрации ДНК и находящегося в нем белка, что может служить маркером для определения стадии клеточного цикла и малигнизации.

Исследования динамических процессов методами КФМ и интерференционной микроскопии показали [10,11], насколько клетка чувствительна к внешним воздействиям и, в частности, лазерному излучению [11,12], которое часто используется в качестве источника света в микроскопе. Поэтому в ряде случаев перед проведением исследования конкретного функционального состояния клеток для исключения действия случайных факторов их удобно фиксировать, и ответ на вопрос, насколько при этом сохраняются значения фазовых параметров, является актуальной задачей. Сравнительный анализ живых и фиксированных клеток позволит выяснить, как проявляется в фазовом изображении вклад явлений, связанных с метаболизмом, предложить их биофизическую интерпретацию и количественно оценить артефакты фиксации.

С этой целью методом КФМ нами были исследованы живые и фиксированные Т-лимфоциты и проведено сравнение параметров их фазовых изображений. В качестве фиксатора нами был выбран формалин, поскольку он сохраняет общую морфологию клеток, образуя многочисленные сшивки между белковыми молекулами.

### **Материалы и методы**

**Выделение лимфоцитов.** Мононуклеары с содержанием Т-лимфоцитов около 70 % выделяли из свежей донорской крови с гепарином по стандартной методике *Woum* [13]. Часть выделенных клеток помещалась в свежий натрий-фосфатный буфер (НФБ) для проведения измерений, а другая фиксировалась в растворе НФБ с 4% содержанием формалина в течение месяца.

**Определение показателя преломления среды инкубации.** Для более точного определения значений показателя преломления органелл лимфоцитов и их фазовых объемов с помощью рефрактометра ЛОМО были измерены показатели преломления

натрий-фосфатного буфера ( $n_0=1,339$ ) и НФБ с 4% содержанием формалина ( $n_0=1,345$ ). Полученные значения хорошо согласуются с величиной показателя преломления стандартного 37% раствора формалина в воде 1,373.

**Приготовление препарата для измерений.** Для приготовления образца каплю суспензии клеток 3 мкл наносили на пластинку полированного кремния 24 x 24 мм и аккуратно накрывали покровным стеклом. Для предохранения клеток от деформации и обеспечения герметичности образца использовался спейсер толщиной 7 мкм из полиэтилена, покрытый смесью воска с глицерином.

**Метод когерентной фазовой микроскопии.** Исследования одиночных клеток проводились на фазовом микроскопе «Эйрискан», разработанном в МИРЭА [14]. В фазовой микроскопии объект рассматривается как оптическая неоднородность в иммерсионной среде с показателем преломления  $n_0$ . Его оптические свойства могут быть описаны пространственным распределением рефрактерности - разности показателя преломления объекта и показателя преломления внешней среды:

$$\Delta n(x, y, z) = n(x, y, z) - n_0, \quad (1)$$

где  $n(x, y, z)$  – пространственное распределение показателя преломления объекта,  $n_0$  – показатель преломления иммерсионной среды.

Фазовое изображение (топограмма) представляет собой двумерное распределение оптической толщины, которая определяется интегралом по оптической оси  $z$ :

$$h(x, y) = \int \Delta n(x, y, z) dz \quad (2)$$

Одним из основных параметров, определяемых при помощи топограммы, является фазовый объем – произведение средней рефрактерности по объему объекта на его геометрический объем:

$$W = V \cdot \Delta n_{cp} \quad (3)$$

Фазовое изображение лимфоцита можно разделить на 5 участков – «зон», отличающихся по рефрактерности и расположению относительно центра клетки. Зоны и характеризующие их количественные параметры обозначены нами с помощью индексов: 0 – внешняя среда, 1 – внешняя цитоплазма, 2 – плотная цитоплазма, 3 – ядро, 4 – ядрышко. Границы зон, соответственно, обозначены: 01 – внешняя граница клетки, 12 – граница внешней и плотной цитоплазм, 23 – граница плотной цитоплазмы и ядра, 34 – граница ядра и ядрышка. В интегральных функциях можно найти границы зон структурных элементов объекта, различающихся по локации и показателю преломления.

Для количественного описания оптических свойств внутренних структур клетки, связанных с ее функциональным состоянием, мы используем интегральные функции (ИФ) площади и фазового объема [5,6].

### Результаты

На Рис.1 представлены типичные фазовые изображения лимфоцитов в норме (а) и фиксированного формалином (в) с отмеченными проекциями зон 1,2,3,4, соответствующих тонкой цитоплазме, плотной цитоплазме, ядру и ядрышку и определенных с помощью метода интегральных функций, описанного в Методах. На рис.1, с, d приведены сечения фазовых изображений в направлениях, отмеченных на рис.1, а, в. Из профилей (рис.1, с, d) следует, что несмотря на то, что линейные размеры плотной части клетки при фиксации меняются незначительно, появляются отличия, указывающие на

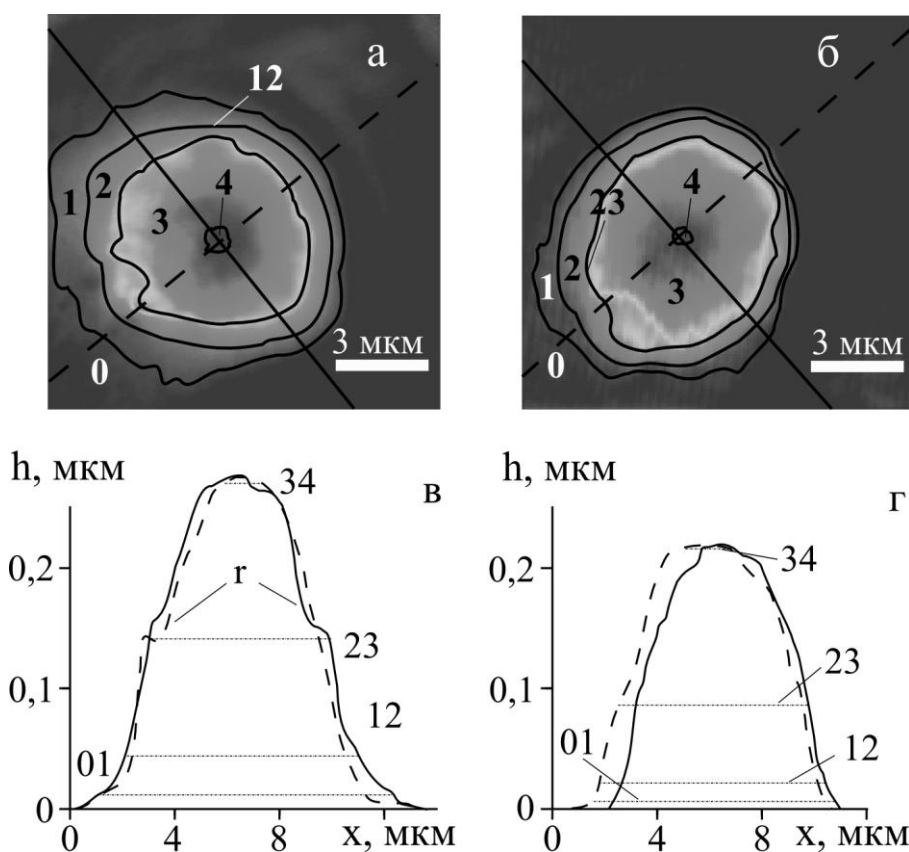


Рис. 1. Фазовые изображения и профили фазовой толщины живого лимфоцита (а, с) и фиксированного формалином (b,d). 0, 1, 2, 3, 4 – зоны фазового изображения, 01, 12, 23, 34 – их границы, г – область излома профиля фазовой толщины на границе ядра и цитоплазмы.

происшедшие изменения морфологии: при фиксации фазовый профиль становится более гладким, без характерных изломов на мембранах («г» на рис. 1, с), разграничивающих органеллы. Верхняя часть профиля, соответствующая ядру, становится более гладкой. Фазовая толщина фиксированного лимфоцита снижается в среднем на 30-40 нм по

сравнению с нормой. Для детального исследования изменений в фазовом изображении, вызванных фиксацией, мы использовали интегральные функции фазового изображения (рис. 2).

На рис. 2 приведены интегральные функции, построенные для фазовых изображений на рис.1 для лимфоцита в норме и через месяц после фиксации формалином с нанесенными характерными точками, соответствующими границам органелл, по которым были определены их фазовые параметры.

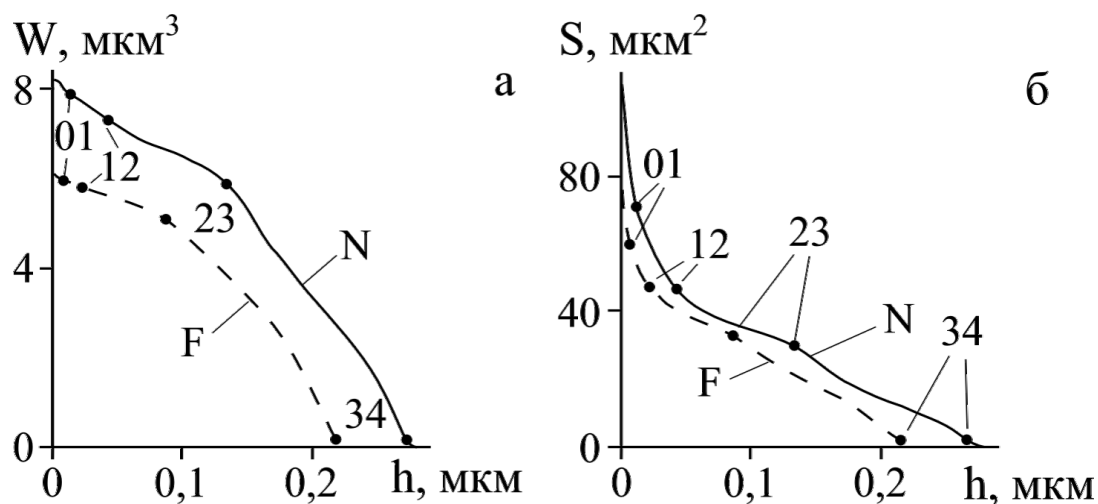


Рис. 2. Интегральные функции, построенные по фазовым изображениям на рис.1а,б лимфоцитов в норме (сплошная линия, N) и фиксированного (пунктир, F); а – функция фазового объема  $W(h)$ , б – функция площади  $S(h)$

Всего таким образом было измерено 30 клеток в норме и 30 после фиксации формалином, результаты статистической обработки значений площадей органелл, их фазовых объемов и рефрактерностей на границах различных зон фазовых изображений лимфоцитов в НФБ (N) и в растворе НФБ с 4% содержанием формалина (F).

Анализируя результаты, приведенные в табл. 1, можно сделать вывод, что при фиксации формалином морфологические параметры в основном сохраняются, хотя имеются и некоторые различия, особенно в области хондриома. Площади органелл, определенные с помощью  $S$  функций, при фиксации меняются в пределах 10-15% и соответствуют определенным в работе [16].

Значения площадей компартов лимфоцитов, определенные из фазовых изображений с помощью метода интегральных функций, при фиксации сохраняются с точностью 10-15%, за исключением уменьшения общей площади клетки  $S_{01}$  за счет уменьшения площади адгезии к подложке.

Таблица 1.

**Средние значения фазовых параметров живых (N) и фиксированных (F) лимфоцитов.**

| Параметр                    | Значения параметров лимфоцитов в различных средах |               |
|-----------------------------|---|---------------|
|                             | N   | F             |
| $S_{01}$ , мкм <sup>2</sup> | 71,5±6,6  | 61,3±7,2      |
| $S_{12}$ , мкм <sup>2</sup> | 47,3±2  | 42,7±5,5      |
| $S_{23}$ , мкм <sup>2</sup> | 31,9±2,1  | 32,5±4,7      |
| $S_{34}$ , мкм <sup>2</sup> | 2,1±0,6   | 1,13±0,5      |
| $W_{01}$ , мкм <sup>3</sup> | 8,86±1,78   | 6,31±1,31     |
| $W_{12}$ , мкм <sup>3</sup> | 8,3±1,37  | 5,36±1,27     |
| $W_{23}$ , мкм <sup>3</sup> | 6,68±1,1  | 4,45±0,85     |
| $W_{34}$ , мкм <sup>3</sup> | 1,2±0,16  | 1±0,07        |
| $\Delta n_{12}$             | 0,0058±0,0013                                     | 0,0067±0,0016 |
| $\Delta n_{23}$             | 0,031±0,001                                       | 0,0310±0,0015 |
| $\Delta n_{34}$             | 0,046±0,002                                       | 0,037±0,003   |
| $\Delta n_{\max}$           | 0,059±0,005                                       | 0,052±0,005   |

На рис.3 приведены характерные профили рефрактерности для лимфоцита в норме и фиксированного формалином. Сравнение профилей показателя преломления показывает, что при фиксации формалином ядро (зона 3, между точками 23 и 34 на рис. 3) стало более однородным по показателю преломления, увеличилась ширина горизонтального участка и гомогенность в целом.

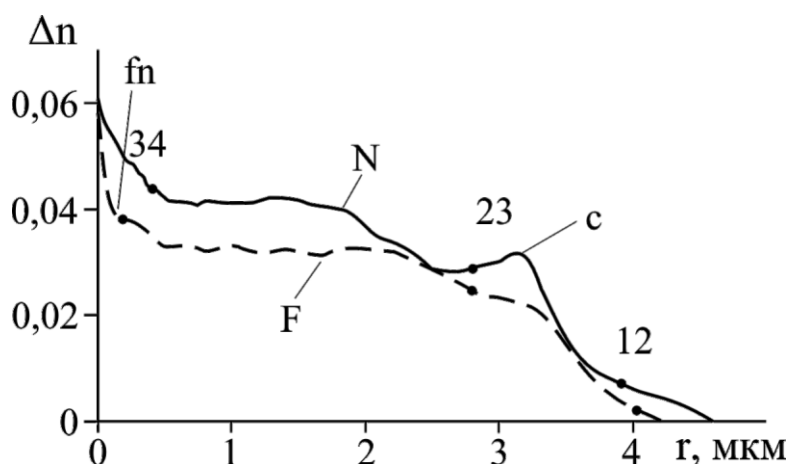


Рис. 3. Радиальные профили рефрактерности живого (сплошная линия, N) и фиксированного раствором 4% формалина (пунктирная линия, F) лимфоцита, с – хондриом клетки.

Изменился профиль рефрактерности ядрышка – в присутствии формалина в ядрышке стал контрастнее проявляться узкий фибриллярный центр с диаметром 0,2 мкм (fn на рис. 3). Эти изменения могут быть объяснены тем, что формалин вызывает ядрышковый стресс, наступающий раньше процесса фиксации [24].

Проявлением деэнергизации клетки в формалине является уменьшение локального максимума, соответствующего хондриому на профиле рефрактерности (обозначен как «с» на рис. 3). Разница рефрактерности хондриома и других компонент плотной части цитоплазмы в норме больше, чем в присутствии формалина. При сравнении S,W-функций живых и фиксированных клеток (рис. 2) заметно, что у фиксированных клеток излом в характерных точках, соответствующих границе органелл, сглажен. Эта сглаженность может быть объяснена тем, что в фиксированных клетках отсутствует потенциал на мембранах, и, следовательно, снижен градиент концентраций веществ по обе стороны мембраны, обусловленный активным транспортом через нее. В работах [17,18] показано, что мембранный потенциал вносит существенный вклад в фазовую толщину объекта, что может объяснить существенное снижение значений фазового объема и фазовой толщины всех органелл клетки.

В рамках подхода, предложенного в работе [19] можно предложить интерпретацию результатов, приведенных в табл. 1 и определить количество формалина в различных зонах клетки.

Показатель преломления  $n(x,y)$  зависит от поляризуемости молекул и связан с диэлектрической проницаемостью  $\chi$  соотношением:

$$\chi = n^2 - 1 \quad (4)$$

Клетку можно рассматривать как водную смесь таких компонент, как липиды, белки и хроматин. Диэлектрические восприимчивости компонент смеси  $\chi_i$  складываются с учетом их долей  $\eta_i$  в проекции на пиксел изображения с координатами  $(x,y)$ , поэтому в каждой точке фазового изображения

$$\chi(x,y) = \chi_l \eta_l(x,y) + \chi_b \eta_b(x,y) + \chi_x \eta_x(x,y) + \chi_v \eta_v(x,y) \quad (5)$$

$$\eta_l(x,y) + \eta_b(x,y) + \eta_x(x,y) + \eta_v(x,y) = 1,$$

где индексами В, Л, Б и Х обозначены вода, липиды, белки и хроматин соответственно.

Для средних значений  $\chi$  каждой из зон клетки

$$\chi = \chi_l \eta_l + \chi_b \eta_b + \chi_x \eta_x + \chi_v \eta_v \quad (6)$$

$$\eta_l + \eta_b + \eta_x + \eta_v = 1.$$

В случае фиксированных клеток необходимо учесть вклад формалина ( $\Phi$ ) внутри зоны, поэтому

$$\chi = \chi_l \eta_l + \chi_b \eta_b + \chi_x \eta_x + \chi_v \eta_v + \chi_\Phi \eta_\Phi \quad (7)$$

$$\eta_l + \eta_b + \eta_x + \eta_v + \eta_\Phi = 1.$$

Среднее значение показателя преломления и диэлектрической восприимчивости  $\chi$  для различных зон фазовых изображений, полученные из табл. 1, приведены в табл. 2.

Значения показателя преломления окружающей среды  $n$  и среды с добавлением 4% формалина  $n_{+f}$  в табл. 2 взяты из раздела Материалы и Методы.

Зная диэлектрическую восприимчивость формалина  $\chi_f = 1,193$ , соотношения (6) и (7) позволяют определить вклад, вносимый им в среднюю восприимчивость органелл клетки  $\eta_f$  (См. табл.2).

Диэлектрическая восприимчивость ядра уменьшилась при фиксации формалином на 0,01.

Таблица 2

|              | <b>Внешняя среда</b> | <b>Зона 12</b> | <b>Зона 23</b> | <b>Зона 34</b> | <b>Ядрышко</b> |
|--------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| $n$          | 1,339                | 1,345±0,00133  | 1,37 ±0,001    | 1,385±0,0048   | 1,398±0,01134  |
| $n_{+f}$     | 1,345                | 1,352±0,0011   | 1,376±0,0012   | 1,382±0,0048   | 1,397±0,01134  |
| $\chi$       | 0,793                | 0,809±0,022    | 0,877±0,00292  | 0,919±0,0062   | 0,955±0,01039  |
| $\chi_{+f}$  | 0,809                | 0,827±0,00163  | 0,893±0,00292  | 0,909±0,0062   | 0,952±0,01039  |
| $\eta_f, \%$ | 4                    | 1,5            | 1,3            | 0              | 0              |

### Обсуждение результатов

Анализируя результаты, приведенные в табл. 1, можно сделать вывод, что при фиксации формалином, в отличие от фиксации метанолом [8], морфологические и фазовые параметры в основном сохраняются. При фиксации клетки молекулы формальдегида связываются с аминокислотами белков и макромолекул, в том числе и с функциональными группами, образуя сшивки – каркас, сохраняющий форму клетки и ее органелл. В работе [15], в которой подробно разобраны механизмы фиксации формалином, отмечается, что значительно меняются физико-химические свойства клеток, мембранный потенциал, поверхностный заряд и способность к биохимическим реакциям. Таким образом, часть наблюдаемых различий можно объяснить деэнергизацией клетки, поскольку при фиксации прекращается активный транспорт и падает потенциал на мембранах. Это согласуется с установленным ранее снижением показателя преломления митохондрий при их деэнергизации [17,18]. Особенно это сказывается в области хондриома (локальный максимум «с» на рис. 3), контраст которой существенно снижается при фиксации, а также на общей фазовой толщине клетки (рис. 1, с, d).

Таким образом, при фиксации в растворе с 4% содержанием формалина значительного влияния на интегральные фазовые параметры ядра клетки не происходит, хотя морфология других органелл меняется. Это имеет существенное значение, поскольку средний показатель преломления ядра является диагностическим параметром для различения опухолевых и нормальных клеток [20]. В соответствии с [15] оптические свойства ядра становятся более однородными: под действием формалина конденсиро-



ванный хроматин меняет свою структуру и становится более гомогенным, что подтверждается профилями рефрактерности, представленными на рис. 3.

Отметим, что в норме профиль ядрышка лимфоцита конический с диаметром основания 0,8 мкм (точка 34 на радиальном профиле рефрактерности N на рис. 3).

Некоторое снижение диэлектрической восприимчивости ядра (см. табл.2) при фиксации формалином может быть объяснено перемещением из него при происходящей при этом неизбежной дезэнергизации части белков, связанных с хроматином [21], или уменьшением содержания связанной воды [19]. Незначительное уменьшение площади может быть связано с тем, что фиксированная клетка потеряла способность распластываться.

В большинстве работ по фазовой микроскопии за рубежом значения фазового объема клеток используют для определения их «сухой массы». Согласно работам [22, 23] для вычисления сухих масс объектов по их фазовым изображениям используется переводной коэффициент  $\alpha=1,8 \times 10^{-3} \text{ м}^3 \text{ кг}^{-1}$ .

Формализм, предложенный в работе [5], позволяет оценить массу отдельных органелл лимфоцита по значениям их фазового объема, приведенным в табл. 1. Мы приводим «сухую массу» (в пг, пикограммах) зон клеток, определенные из соответствующих значений фазовых объемов «зон», разделенных на переводной коэффициент 0,2 мл/г: масса лимфоцита равна 41,5 пг, из них масса ядра составляет 33,4 пг, ядрышка – 6 пг и цитоплазмы 8 пг.

### **Выводы**

Полученные значения морфологических параметров (размеров) и показателей преломления мононуклеаров с содержанием Т-лимфоцитов около 70 % согласуются с литературными данными, что говорит о том, что метод ФМ пригоден для получения геометрических параметров органелл (например, ядерно-цитоплазматического индекса). Добавление формалина вызывает перераспределение вещества внутри органелл, отражающееся в параметрах фазового изображения клетки. Установлено, что ряд параметров фазового изображения фиксированной клетки (фазовые высоты и объемы) существенно отличаются от аналогичных параметров живой клетки,

В то же время площади и рефрактерности ядра при фиксации практически не меняются, что открывает дальнейшие перспективы для работы с фиксированными клетками методами интерференционной микроскопии. Живые клетки быстро реагируют на условия измерений, внешнюю среду и излучение лазерного источника микроскопа, поэтому в ряде случаев возникает необходимость фиксации конкретных состояний клетки. Выполненная работа показывает перспективность использования фиксации клеток

4% раствором формалина для определения оптических параметров одиночных клеток методами фазовой микроскопии.

Работа выполнена в рамках договора о сотрудничестве с Федеральным научно-клиническим центром детской гематологии, онкологии и иммунологии при поддержке гранта Минобрнауки России по проектной части государственного задания № 8.344.2014/К.

### Список литературы

1. Tychinsky V.P. Interference Microscopy in Cell Biophysics. Principles and methodological aspects of Coherent Phase Microscopy / V.P. Tychinsky, A.N. Tikhonov // Cell Biochemistry and Biophysics. - 2010. 58(3). –p.107-116.
2. Girshovitz P. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization / P. Girshovitz, N. T. Shaked // Biomedical Optics Express, - 2012. Vol. 3, No. 8, - p.1757-1773.
3. Mir M. Label-free characterization of emerging human neuronal networks/ M. Mir [et al.] //, Scientific Reports, - 2014. 4, 4434.
4. Kim T. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells/T. Kim [et al.]// Nature Photonics, 8, 256-263 (2014).
5. Tychinsky V.P. Dissecting eukaryotic cells by coherent phase microscopy: a quantitative analysis of quiescent and activated T-lymphocytes / V.P. Tychinsky [et al.] // Journal of Biomedical Optics **17**(7), 076020 (2012).
6. Tychinsky V.P. Quantitative phase imaging of living cells. Application of the phase volume and area functions to the analysis of “nucleolar stress”/ V.P. Tychinsky [et al.] // Journal of Biomedical Optics. 18(11), 111413 (November 2013).
7. Bista R Nuclear nano-morphology markers of histologically normal cells detect the “field effect” of breast cancer/ R. Bista [et al.] // , Brest Cancer Res Treat, 2012, 135(1): 115-124.
8. Wang Y., Morphological Measurement of Living Cells in Methanol with Digital Holographic Microscopy/Y. Wang [et al.]// Computational and Mathematical Methods in Medicine Volume 2013 (2013), Article ID 715843, 7 pages.
9. Bista R. Quantification of nanoscale nuclear refractive index changes during the cell cycle/ R. Bista [et al.]// JBO let., 2011.
10. Tychinsky V.P. Quantitative real-time analysis of nucleolar stress by coherent phase microscopy/ V.P. Tychinsky [et al.]// Journal of Biomedical Optics. 2008. T. 13. № 6. C. 064032.

11. Игнатъев П.С. Исследование активации лимфоцитов методом когерентной фазовой микроскопии, П.С. Игнатъев [и др.] /Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения// - 2008. -Т. 8, № 1. - с.157-159.
12. Smolyaninova I.K. Effect of He-Ne laser irradiation on chromatin properties and synthesis of nucleic acids of human periferal blood lymphocytes/ I.K. Smolyaninova [et al.] //Biomedical Sciences, -1991, v.2, 2, - p.121-126.
13. Bryum A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media/A. Boyum// Methods in Enzymology Volume 108, 1984, P. 88–102 Immunochemical Techniques, Part G.
14. Тычинский В. П. “Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли “диалог” с клеткой?”, УФН, - 2007. - т.177, №5. - с.535–552.
15. Thavarajah R. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation / R. Thavarajah [et al.]// J Oral Maxillofac Pathol. 2012; 16(3). –p.400–405.
16. Segel G.B., The measurement of lymphocyte volume: importance of reference particle deformability and counting solution tonicity/ G.B. Segel, G.R. Cokelet, M.A. Lichtman // Blood, 57(5), - 1981.
17. Yaguzhinsky L.S. Identification of two discrete states of energized mitochondria; experiments on single mitochondria/ L. S. Yaguzhinsky [et al.] // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. - 2008. Т. 2. № 2. - p. 144-149.
18. Tychinsky V. Mitochondria optical parameters are dependent on their energy state: a new electrooptical effect? / V. Tychinsky, A. Kretushev, T. Vyshenskaja // European Biophysics Journal. - 2004. Т. 33. № 8. - p. 700-705.
19. Tychinsky V. Extension of the concept of an anomalous water component to images of T-cell organelles/V. Tychinsky // J. of Biomed. Optics, 19(12), 2014.
20. Mahjoubfar A. Label-free high-throughput cell screening in flow/ A. Mahjoubfar // BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, 2013 | Vol. 4, No. 9 | 1618.
21. Schmiedeberg L. A Temporal Threshold for Formaldehyde Crosslinking and Fixation/ L. Schmiedeberg // PLoS ONE. 2009; 4(2): e4636.
22. Ross K.F. Phase Contrast and Interference Microscopy of Cell Biologists /K.F. Ross // Edward Arnold, London, UK, 1967.
23. Barer R. Interference microscopy and mass determination/ R. Barer// Nature. 169: 366-367.
24. Тычинский В. П. Снижение фазовой толщины – характерная реакция ядрышек на различные токсические воздействия при исследовании методом когерентной фазовой микроскопии/ В. П. Тычинский [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2007. №4. - с.433-477.