Вестник РУДН. Серия: МЕДИЦИНА
RUDN Journal of MEDICINE
2020 Vol. 24 No. 2 117—192
http://journals.rudn.ru/medicine

IMMUNOLOGY. RESEARCH ARTICLE
ИММУНОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175
УДК 616-092+681.7.069:636.934

Использование модуляционной интерференционной микроскопии в задачах прикладной иммунологии

О.А. Гизингер[1], Е.А. Левкова[1], С.З. Савин[2]

[1]Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
[2]Тихоокеанский государственный университет дружбы, Хабаровск, Россия

Аннотация. *Цель исследований*: определить осмотическую резистентность эритроцитов с использованием технологий модуляционной интерференционной микроскопии в режиме световой микроскопии биологических объектов для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. *Методы.* Изложены методологические подходы к использованию модуляционной интерференционной микроскопии и компьютерной томографии для задач диагностической медицины и прикладной иммунологии. Использована технология витальной компьютерной динамической фазометрии, специальные способы пробоподготовки цитообъектов, а также система компьютерного автоматизированного анализа цитологических изображений; алгоритмы распознавания, измерения и идентификации микрообъектов; методы статистической обработки данных. *Результаты.* С помощью отечественного инновационного лазерного микроскопа МИМ340 выполнена оценка осмотической резистентности эритроцитов с использованием метода модуляционной интерференционной микроскопии для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у больных с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом. Используя компьютерные методы цитодиагностики, были выявлены новые аспекты функциональной морфологии живых клеток, установлены клинико-морфологические параллели. Удалось оценить диагностическое и прогностическое значение витальной морфометрии клеток при различных патологических процессах и оценке эффективности лечебных мероприятий. Создан банк данных графических изображений эритроцитов и лимфоцитов крови пациентов с заболеваниями иммунной системы. *Выводы.* Исследование структурных особенностей и функциональной полноценности циркулирующих клеток крови имеет большое значение при решении вопросов патогенеза, диагностики, оценки тяжести различных патологических состояний и эффективности проводимой терапии. Полагаем, что изучение живых цитообъектов с использованием нового метода когерентной фазовой микроскопии позволит получить максимально объективные данные и повысит информативность анализа, что, несомненно, является актуальной и перспективной задачей. В ближайшие планы входит доработка математического, алгоритмического и программного обеспечения для поддержки принятий решений в системах компьютерного автоматизированного анализа изображений эпидермиса и поверхностной части дермы при неопластических процессах – злокачественных заболеваниях кожи. Необходимо также создание алгоритмических и программных средств компьютеризации исследований клеточных моделей для количественной и качественной оценки селективного накопления ксенобиотиков методами лазерной микроскопии.

Ключевые слова: компьютерная микроскопия, модуляционная интерференционная микроскопия (МИМ), резистентность эритроцитов, ревматоидный артрит, рассеянный склероз

© Гизингер О.А., Левкова Е.А., Савин С.З., 2020

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Вклад авторов. Гизингер О.А.– концепция исследования, редактирование текста, подготовка библиографии; Левкова Е.А. – дизайн исследования, подготовка и отбор биоматериалов, редактирование текста; Савин С.З. – сбор, обработка и анализ полученных данных, написание текста, подготовка иллюстраций.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.03.2020. Принята 20.04.2020

Для цитирования: *Гизингер О.А., Левкова Е.А., Савин С.З.* Использование модуляционной интерференционной микроскопии в задачах прикладной иммунологии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 2. С. 168–175. DOI:10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175

Use of modulation interference microscopy in applied immunology

O A. Gizinger[1], E.A. Levkova[1], S.Z. Savin[2]

[1]Peoples' Friendship University, Moscow, Russia
[2]Pacific National University, Khabarovsk, Russia

Abstract. *Objective:* to determine the osmotic resistance of red blood cells using modulation interference microscopy technologies in the light microscopy mode of biological objects to identify the dynamics and determine the possibilities for continuing apitherapy in patients with autoimmune diseases. *Methods.* Methodological approaches to the use of modulation interference microscopy and computed tomography for the tasks of diagnostic medicine and applied immunology are described. The technology of vital computer dynamic phase metering, special methods for sample preparation of cytoobjects, as well as a computer-aided automated analysis of cytological images were used; recognition algorithms, measurement and identification of micro-objects; methods of statistical data processing. *Results.* Using the domestic innovative laser microscope MIM340, the osmotic resistance of erythrocytes was estimated using the method of modulation interference microscopy to identify the dynamics and determine the possibilities for continuing apitherapy in patients with rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Using computer methods of cytodiagnostics, new aspects of the functional morphology of living cells were revealed, clinical and morphological parallels were established. It was possible to evaluate the diagnostic and prognostic value of vital cell morphometry in various pathological processes and assess the effectiveness of therapeutic measures. A data bank of graphic images of red blood cells and blood lymphocytes of patients with diseases of the immune system has been created. *Findings.* The study of the structural features and functional usefulness of circulating blood cells is of great importance in addressing the pathogenesis, diagnosis, assessment of the severity of various pathological conditions and the effectiveness of the therapy. We believe that the study of living cytoobjects using the new method of coherent phase microscopy will provide the most objective data and increase the information content of the analysis, which is undoubtedly an urgent and promising task. The immediate plans include the refinement of mathematical, algorithmic, and software to support decision-making in computer-aided analysis of images of the epidermis and the surface of the dermis in neoplastic processes – malignant skin diseases. It is also necessary to create algorithmic and software tools for computerizing studies of cell models for quantitative and qualitative assessment of the selective accumulation of xenobiotics by laser microscopy.

Keywords: computer microscopy, modulation interference microscopy (MIM), erythrocyte resistance, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis

Author Contributions. Gizinger O.A.-research concept, text editing, bibliography preparation; Levkova E.A.– research design, preparation and selection of biomaterials, text editing; Savin S.Z.– data collection, processing and analysis, text writing, illustrations preparation.

Conflict of Interest Statement. The authors declare no conflict of interest.

Received 19.03.2020. Accepted 20.04.2020

For citation: Gizinger O A., Levkova E.A., Savin S.Z. Use of modulation interference microscopy in applied immunology *RUDN Journal of Medicine*. 2020 May; 24(2): 168–175. DOI:10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175

Введение

Стремительное развитие средств оптоэлектроники и информационно-вычислительных систем в медицине и биологии позволил внедрить инновационные технологии при исследовании микробиообъектов. Передовые достижения отечественной науки в сфере компьютерной томографии и компьютерной микроскопии, наряду с системами автоматизированного распознавания изображений, невидимых при непосредственной визуализации, все чаще применяются как исследовательские и диагностические инструменты в биомедицине [1–3]. Исследование динамики внутриклеточных процессов, таких как кинетика молекулярных моторов, кооперативные явления в мембранах и ферментных комплексах и т.п., стимулируют дальнейшее развитие инновационных методов т.н. «прижизненной» биомикроскопии [4–7]. Актуальной для иммунологии стала регистрация динамических микропроцессов в реальном времени. Не менее важными стали исследования корреляции между функциональным состоянием отдельной клетки и физическими параметрами ее органелл [8–13]. Решение этой фундаментальной проблемы станет значительным этапом в понимании процесса внутриклеточной динамики, создав новые методы диагностики в клинической диагностике и молекулярной биомедицине. Важнейшими приложениями этих методов являются скрининг биологически активных соединений и экспресс-диагностика ряда заболеваний на клеточном уровне [14–16].

На основе запатентованных технологий Модуляционно-интерференционной микроскопии и бесконтактного перемещения икробиообъектов с использованием магнитно-аэростатических узлов была создана уникальная линейка лазерных микроскопов МИМ и комплекс прецизионных устройств «Наномеханика» для сверхточных измерений на уровне нанотехнологических систем [17].

Цель исследования. Изучение осмотической резистентности эритроцитов с использованием технологий модуляционно-интерференционной микроскопии в режиме светового микроскопирования биологических объектов (крови) для выявления динамики и определения возможностей продолжения апитерапии у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служила гепаринизированная капиллярная кровь. Микрометод исследования реализован как забора крови из пальца в объеме от 200 мкл. На одного пациента пробаподготовка в количестве 3 стекол. На каждого пациента заполнялось форма информированного согласия и карта учета морфологической картины крови – эритроцитарного ростка (размеры, форма, наличие дефектов – гемолиза полного и/или частичного). Методом случайной выборки по нозологичному принципу и лечебно-терапевтическому принципу автоматически было отобрано 38 пациентов. Доминирующий вид патологии – ревматоидный артрит (n=36 чел), два пациента страдали рассеянным склерозом (n=2 чел). Гендерный и возрастной принципы ранжирования не использовались. Все пациенты имели длительные хронические заболевания аутоиммунного генеза более 5 лет, в течение одного и более лет получила апитерапию.

Зрелые эритроциты человека (нормоциты) – это клетки крови асимметричной дисковидной двояковогнутой формы с диаметром 6,2 до 8,2 микрометра (мкм), толщина тонкой части 0,81 мкм, толстой части – 2,61 мкм, площадь поверхности 135 мкм^2, объем 90 мкм^3. У женщин норма эритроцитов составляет около 3,4–5,1×10^{12}/л, у мужчин – 4,1–5,7×10^{12}/л, в пожилом возрасте – 4,0×10^{12} на литр (менее 4 млн в 1 мм^3).

Измерения параметров эритроцитов проводились при помощи метода модуляционной интерференционной микроскопии – МИМ. Для статистической обработки значений характеристик эритроцитов использовалось программное обеспечение ППП SPSS-10. Достоверность различия показателей оценивалась по критериям Стьюдента, Пирсона при распределении по нормальному закону. При отклонении от нормального распределения использовались непараметрические критерии (критерий серий Вальда-Вольфовица, U-критерий Манна– Уитни, двухвыборочный критерий Колмогорова–Смирнова).

Принципиальная схема функционирования микроскопа МИМ340 представлена в [7]. В качестве источника когерентного излучения используется твердотельный лазер с длиной волны λ=532. В МИМ разрешение по вертикали в стандартных условиях достигает 0,3 нм, а с использованием системы активной виброзащиты – 0.1нм. Латеральное (по координатам X, Y) разрешение объектнозависимо. В МИМ величина латерального разрешения меняется от 10 нм до 100 нм в зависимости от фазового контраста исследуемого объекта. Использована технология витальной компьютерной динамической фазометрии, специальные способы пробоподготовки цитообъектов, а также система компьютерного автоматизированного анализа цитологических изображений; алгоритмы распознавания, измерения и идентификации микрообъектов; методы статистической обработки данных.

У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование одобрено комиссией по вопросам этики на клинической базе ОАО «Иммунореабилитационный центр».

Результаты исследований и их обсуждение

Используя компьютерные методы цитодиагностики, были выявлены новые аспекты функциональной морфологии живых клеток, установлены клинико-морфологические параллели. Удалось также оценить диагностическое и прогностическое значение витальной морфометрии клеток при различных патологических процессах и оценке эффективности лечебных мероприятий. В процессе апробации микробиологического варианта лазерного микроскопа МИМ340 были выявлены как некоторые преимущества и недостатки программно-технического комплекса, носящие некий диалектический характер. Прежде всего, в качестве положительных характеристик необходимо отметить простоту и низкую экономическая стоимость пробо-подготовок (расходные материалы для забора капиллярной крови). Реализована возможность сохранения клеточных паспортов в банке данных биомедицинских изображений с последующим динамическим сравнением цитологических образцов у индивида (например, при восстановлении эритроцитарного, тромбо- и лейкоцитарного профилей) – наличие базы данных.

На этапе световой микроскопии имеется возможность оценки дефицитарности эритроцитарного ростка (анемии), склонности к тромбообразованию (увеличение количества тромбоцитов). Аналогичных исследований в России пока нет. Но эти характеристики является субъективными по сравнению с данными современных гемоанализаторов. Для оценки клеток и длительности экспозиции необходимо добавление гепарина и/или приготовление лейко- или лимфовзвеси. Однако при переходе на высокие скорости захвата фазовых кадров возникает проблема недостаточной засветки матрицы камеры. В настоящей реализации МИМ чувствительность камеры позволяет уменьшить время экспозиции до 0,5 мс при мощности излучения лазера 5 мВт с сохранением линейности отклика камеры. Таким

образом, за счет увеличения пропускной способности интерфейса в ближайшее время скорость получения фазовых изображений МИМ может быть повышена до 6 полных фазовых изображений в секунду или до 500 фазовых изображений разрешением 128x128 точек. Это открывает перспективы применения МИМ в прижизненной регистрации морфологии клеток и ее органелл, а также создание на основе МИМ диагностических методов на клеточном уровне. Очень высока разрешающая способность на уровне световой микроскопии. Правда, без программ автоматического подсчета клеток, наличия окна по типу «стоп-кадр» практического применения данное свойство не находит. Принцип модуляционной интерференции позволяет создать фазовый профиль биологического объекта. Но этот процесс очень трудоемкий, настройка производится вручную и связана с применением существенных физических усилий. Возможна персонифицированная оценка клеточного ряда с 3D-восстановлением (рис. 1). Но на обработку одного клеточного элемента (особенно лейкоцита) уходит до 7 мин. При этом уровень доказательности при воспроизведении до 50 клеток приближается к нулю.

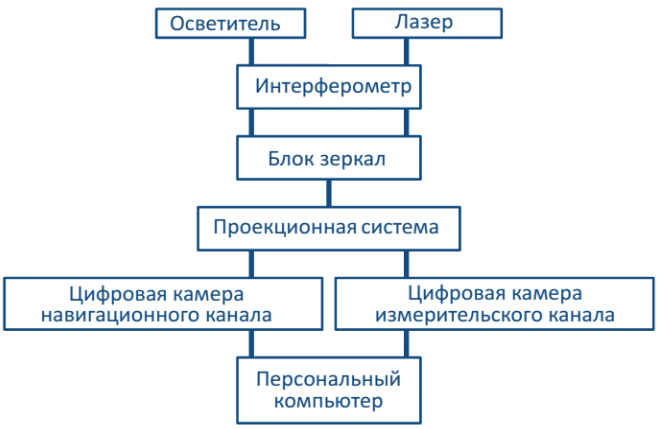

Рис. 1. 3D-анализ эритроцита
Fig. 1. 3D–Erythrocyte analysis

На уровне фазово-поляризационной микроскопии имеется возможность исследовать качество лейкоцитарной линии с изменением активности данной клеточной линии. Однако свойство малодоказательное и не может конкурировать с другими способами оценки активности лейкоцитов, например, реакцией торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). Тем не менее, необходимо констатировать, что с появлением в отечественной микроскопии инновационного продукта на основе модуляционной интерференционной микроскопии – МИМ340, наметился колоссальный прорыв. Этот вид лазерной микроскопии имеет возможности оптической микроскопии и электронной, позволяя работать с биологическими объектами в режиме реального времени. За очень короткий промежуток время, с минимальным набором для пробо-подготовки, можно оценить морфологический портрет клеток человека.

Одним из основных направлений исследований с помощью отечественного микроскопа МИМ340 была резистентность эритроцитов для решения вопроса о возможности продолжения апитерапии больных с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом – световой вариант. Подчеркивая еще раз актуальность проводимых исследований, необходимо сделать акцент на практически полном отсутствии экспресс-диагостических исследований, имеющих максимально короткий срок выполнения – до 10 мин. Нами использована экспресс-диагностическая технология сопровождения тяжелых форм соматической патологии, с нарушением толерантности – аутоиммунные заболевания в виде ревматоидного артрита и рассеянного склероза. На настоящее время несмотря на прогресс в области лечения названных патолого-нозологических форм таргетные виды и резистентность к ним сохраняются на достаточно высоким уровне. Это обстоятельство вызывает необходимость поиска инновационных способов лечения и реабилитации.

Ключевым феноменом при проведении апитерапии у подобных пациентов является свойство резистентности эритроцитов: отсутствие гемолиза при проведении провокационной пробы. Для уточнения дальнейшей тактики в проведении апитерапии требуется оценка стойкости эритроцитов или отсутствие признаков гемолиза.

По плану рандомизированных исследований были проведены наблюдения за фазовым портретом эритроцитов среди 38 пациентов, у которых

диагностировалась полипатология. У 36 чел. доминирующим видом патологии были поражения опорно-двигательного аппарата, которые имели верифицированный ревматоидный артрит (ACR/EULAR2010), двое пациентов страдали рассеянным склерозом. Всем пациентам перед апитерапевтическим лечением была проведена проба на определение чувствительности к апитерапии (проба на переносимость). Дополнительная характеристика – 22 пациента находились на супрессорной иммунотерапии. В ходе исследования клеток крови были идентифицированы фазовые портреты различных форм эритроцитов (рис. 2).

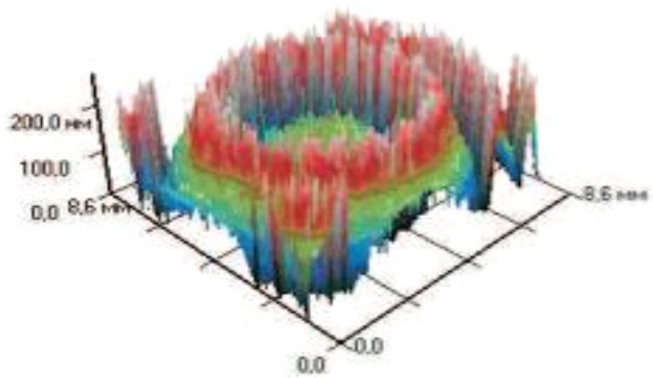

Рис. 2. Фазовый портрет эритроцита
Fig. 2. Erythrocyte phase portrait

Фазовый портрет эритроцита в норме отражает равномерное распределение гемоглобина по объему эритроцита. При различных патологиях распределение гемоглобина носит неравномерный характер. Традиционные методы оптической микроскопии не позволяют выявить подобные отличия. Из 38 человек у 2-х пациентов проба была сомнительная – наличие признаков гемолиза – нечеткая мембрана клетки, ее фрагментарная размытость (Рис. 2), при этом у одного пациента вероятность нестойкости эритроцитарной мембраны была вызвана анемией среднетяжелой степени, гормонально-индуцированной (получение иммуносупрессорной терапии). У 36 пациентов перед началом лечения количество лейкоцитов было более $10*10^9$. У одного больного количество лейкоцитов было в норме, $7,6*10^9$и еще у одного констатировалась лейкопения – $3,3*10^9$.

Выводы

Таким образом, при помощи МИМ340 в варианте экспресс-диагностики может проводиться корректная оценка резистентности эритроцитов, их морфологических свойств, насыщение эритроцитов гемоглобинов, наличие дефектных форм, а также оценено количество лейкоцитов. Дальнейшие исследования возможно продолжить по изучению зависимости морфологии и характера динамических процессов в эритроцитах от степени их оксигенирования.

Исследование структурных особенностей и функциональной полноценности циркулирующих клеток крови имеет большое значение при решении вопросов патогенеза, диагностики, оценки тяжести различных патологических состояний и эффективности проводимой терапии. Полагаем, что изучение живых цитообъектов с использованием нового метода когерентной фазовой микроскопии (КФМ) позволит получить максимально объективные данные и повысит информативность анализа, что, несомненно, является актуальной и перспективной задачей. Перспективы дальнейшего использования МИМ-340 могут быть связаны прежде всего с разработкой оригинальной методологии электронно-микроскопической, морфометрической, текстурной и гистологической оценки повреждающего эффекта плазматических мембран клеток-мишеней.

Исследования с помощью МИМ340 также возможны для морфологии опухолевых клеток для определения новых методов скрининга лекарственных препаратов. Для продолжения испытаний оборудования линейки МИМ, основанной на принципах модуляционной интерференционной микроскопии, необходимо создать современное программное обеспечение для регистрации обработки и анализа динамических процессов в реальном времени. Предстоит доработать средства программно-технической реализации модуляционного метода воспроизведения низкочастотных флуктуаций фазовой толщины. Вероятна разработка специализированного математического, алгоритмического и программного обеспечения для МИМ-340 с целью поддержки принятий решений по результатам визуализации оптически анизотропных структур размером менее 100 нм и регистрации нанодинамики в режиме нановидео.

Таким образом, заложенный в МИМ потенциал открывает новые перспективы в изучении морфологии клетки и ее органелл, а также их метаболизма. В ближайшие планы входит также доработка математического, алгоритмического и программного обеспечения для поддержки принятий решений в системах компьютерного автоматизированного анализа (КАД-анализ) для анализа изображений эпидермиса и поверхностной части дермы при неопластических процессах – злокачественных заболеваниях кожи. Необходимо создание и адаптация алгоритмических и программных средств для компьютерных исследований клеточных моделей: количественная и качественная оценка селективного накопления ксенобиотиков методами лазерной микроскопии.

Список литературы

1. *Brazhe A.R., Brazhe N.A., Ignatyev P.S.* Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study. J. Biomed. Opt. 2007. 3(13). P. 034004.
2. *Brehm-Stecher B., Johnson E.* Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications. Microbiology and Molecular Biology Review. 2004. № 68. P. 538–559.
3. *Carl D., Kemper B., Wernicke G.B.* Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis. Appl. 0pt. 2004. 43. P. 6536–6544.
4. *Дерюгина А.В., Игнатьев П.С., Иващенко М.Н.* Эритроциты и интерференционная микроскопия. Нижний Новгород: Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2019. 87 с.
5. *Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н.* Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках. Цитология. 2005. Т. 47. № 4. С. 348–356.
6. *Lazebnik M., Marks D., Potgier K.* Functional optical coherence tomography for detecting neural activity through scattering changes. Opt. Lett. 2003. 28(14) P. 1218–1220.
7. *Vishnyakov G.N., Levin G.G, Minaev V.L.* Tomographic interference microscopy of living cells. Microscopy and Analysis. 2004. 87. p. 19–21.
8. Лаборатория АМФОРА. Официальный сайт. [Электронный ресурс]. 2019.– Режим доступа: http://www.amphoralabs.ru/projects/laser_interference_microscopy.– Дата обращения 05.04.2020.
9. *Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G.* Low-level lazer therapy as a modifier of erythrocytes morphokinetic parameters in hyperadrenalinemia Lasers in Medical Science. 2019. Vol. 34. Iss. 8. pp. 1603–1612.
10. *Huang Y., Karashima T., Yamamoto M.* Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. J. Raman Spectrosc. 2004. 35. P. 525–526.
11. *LaPorta A., Kleinfeld D.* Interferometric Detection of Action Potentials.– Spring Harbor Laboratory Press at SERIALS/ BIOMED LIB0175B, 2013. 6 p. Published by http://cshprotocols.cshlp.org/
12. *Naito Y., Tohe A., Hamaguchi H.* In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. J. Raman Spectrosc. 2005. 36. P. 837–839.
13. *Rappaz B., Marquet P., Cuche E.* Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cell with digital holographic microscopy. Optics Express. 2005. № 13 (23). P. 9361–9373.
14. *Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С.* Изменение фазового портрета и элктрофоретической подвижности эритроцитов при различных видах заболеваний. Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11. № 2. С. 63–68.
15. *Кононенко В.Л.* Фликкер эритроцитов. 1. Обзор теории и методов регистрации. Биологические мембраны. 2009. Т. 26. № 5. С. 352–369.
16. *Игнатьев П.С., Тычинский В.П., Вышенская Т.В.* Исследование активации лимфоцитов методом когерентно фазовой микроскопии. Альманах клинической медицины. 2008. № 17(2). С. 65–67.
17. *Лопарев А.В., Игнатьев П.С., Индукаев К.В.* Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. Измерительная техника. 2009. № 11. С. 60–64.

References

1. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Ignatyev P.S. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study. *J. Biomed. Opt*. 2007; 3(13):034004.
2. Brehm-Stecher B., Johnson E. Single-cell microbiology: Tools, technologies, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 2004;68: 538–59.
3. Carl D., Kemper B., Wernicke G.B. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis. *Appl. 0pt*. 2004;43: 6536–44.
4. Deryugina A.V., Ignatiev P.S., Ivashchenko M.N. Erythrocytes and interference microscopy. *Nizhny Novgorod: Lobachevsky national research Nizhny Novgorod state University*.2019, 87 p.
5. Levin G.G., Bulygin F.V., Vishnyakov G.N. Coherent oscillations of the state of protein molecules in living cells.*Cytology*. 2005; 47(4):348–56.
6. Lazebnik M., Marks D., Potgier *K.* Functional optical coherence tomography for detecting neural activity through scattering changes. *Opt. Lett*. 2003;28(14):1218–20.
7. Vishnyakov G.N., Levin G.G, Minaev V.L. Tomographic interference microscopy of living cells. *Microscopy and Analysis*. 2004; 87:19–21.
8. Laboratory AMPHORA. Official site. [Electronic resource].– 2019.– access Mode: http://www.amphoralabs.ru/projects/laser_interference_microscopy.
9. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G. Low-level lazer therapy as a modifier of erythrocytes morphokinetic parameters in hyperadrenalinemia *Lasers in Medical Science*. 2019;8:1603–12.
10. Huang Y., Karashima T., Yamamoto M. Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. *J. Raman Spectrosc*. 2004;35:525–26.
11. LaPorta A., Kleinfeld D. Interferometric Detection of Action

Potentials. Spring Harbor Laboratory Press at SERIALS/ *BIOMED LIB0175B*, 2013. 6 p. Published by http://cshprotocols.cshlp.org/
12. Naito Y., Tohe A., Hamaguchi *H.* In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. *J. Raman Spectrosc.* 2005;36: 837–39.
13. Rappaz B., Marquet P., Cuche E. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cell with digital holographic microscopy. *Optics Express*. 2005;3(23):9361–73.
14. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S. Changes in the phase portrait and electrophoretic mobility of red blood cells in various types of diseases. *Modern technologies in medicine.* 2019. Vol. 11. No. 2. Pp. 63–68.
15. Kononenko B. JI. Flicker of red blood cells. 1. Review of the theory and methods of registration. *Biological membranes*. 2009; 26 (5): 352–69.
16. Ignatiev P.S., Tychinsky V.P., Vyshenskaya T.V. TInvestigation of lymphocyte activation by coherent phase microscopy.*Almanac of clinical medicine*. 2008;17(2):65–7.
17. Loparev A.B., Ignatiev P.S., Indukaev K.B. high-Speed modulation interference microscope for biomedical research. *Measuring technology.* 2009;11:60–4.

Ответственный за переписку: Левкова Елена Анатольевна, д.м.н., профессор кафедры «Аллергология и иммунология» Факультета непрерывного медицинского образования медицинского института ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, ул. Островитянова, д. 4, Москва, Россия. E-mail: elenaalevkova@gmail.com

Левкова Е.А. ORCID:0000–002–7633–4678, SPIN –код 6407–9880

Савин С.З. ORCID:0000–003–3051–0231, SPIN –код 8241–1541

Гизингер О.А. ORCID: 0000–0001–9302–0155, SPIN –код 7205–1836

Corresponding Author: Levkova Elena Anatolievna, Doctor of Medicine, professor, Peoples' Friendship University of Russia, 117513, Moscow, st. Ostrovityanova, 4, E-mail: elenaalevkova@gmail.com

Levkova E.A. ORCID: 0000–0002–7633–4678 SPIN – код: 6407–9880

Savin S.Z. ORCID: 0000–0003–3051–0231 SPIN – код: 8241–1541

Gizinger O.A. ORCID: 0000–0001–9302–0155, SPIN –код: 7205–1836