

ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОК: ПУТИ И ВОЗМОЖНОСТИ

М.С. Макаров

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: mcsimm@yandex.ru

В статье анализируются основные подходы к исследованию клеток с помощью флюоресценции, используемые в различных областях биологии и медицины, в том числе в молекулярной медицине; проблемы анализа витально окрашенных клеток, а также пути их решения; дается краткий анализ перспектив применения флюоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: флюоресценция, витальное окрашивание, митотрекеры, морфофункциональный анализ

FLUORESCENCE IN CELL RESEARCH: APPROACHES AND POSSIBILITIES

M.S. Makarov

Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow

A recent literature review presents main approaches of cell fluorescence study in various fields of biology and medicine, including molecular medicine, problems of vital stained cell analysis and the prospect of fluorescent microscopy application.

Key words: fluorescence, vital staining, mitotrackers, morphofunctional analysis

ВВЕДЕНИЕ

В биологии и медицине многие исследования базируются на использовании физических подходов к изучению живых систем – биофизике. Биофизическое направление позволяет изучать морфологию и функции биологических объектов на всех уровнях организации – от субмолекулярных структур до целостного организма [1]. Удобным объектом для биофизического исследования являются клетки животных и микроорганизмов, так как они обладают способностью к постоянному самовоспроизведению, не требуют повышенных материальных затрат и не вызывают этических затруднений. Клетки используют как для фундаментальных исследований, так и в качестве модельных систем для практических разработок [1, 3].

Биофизические подходы в исследовании клеток включают электрохимические (потенциометрия, «patch-clamp», электрофорез), электромагнитные (пульсация клеток, ядерно-магнитный резонанс), радиобиологические и оптические методы [3, 4, 10, 25, 27, 31, 43, 49]. При применении оптических методов изображения клеток и их структур могут быть получены 2 путями:

- с помощью регистрации проходящего или отраженного света – денситометрия, деполяризация, проточная цитометрия, фазово-контрастная и интерференционная морфометрия [2, 4, 5, 9, 11];
- с помощью регистрации индуцированного флюоресцентного света [22, 29, 30].

Флюоресценция клеток достигается за счет применения соответствующих красителей, которые связываются с определенной структурой клетки, сохраняя при этом способность флюоресцировать [19, 29]. Для окрашивания клеток используют как чистые флюорохромы (акридиновый оранжевый, DAPI и т.д.), так и флюорохромы, ассоциированные с определенными веществами (антитела в иммуноцитохимии, одноцепочечные комплементарные ДНК и ДНК-предшественники в цитогенетике). В результате под действием возбуждающего света определенной длины волны можно регистрировать флюоресценцию тех или иных участков исследуемой клетки.

Одно из главных преимуществ флюоресцентных методов исследования – возможность анализа биологической полноценности клеток при непосредственном наблюдении самих клеток и их структур. Флюоресцентная микроскопия позволяет исследовать прикрепленные клетки независимо от оптической плотности субстрата. Другим важным преимуществом является возможность комбинации нескольких флюоресцентных красителей с разной длиной возбуждения флюорохрома, что позволяет проводить параллельный анализ разных структур в одной и той же клетке. Наконец, ряд флюорохромов дает возможность прижизненно окрашивать клеточные компоненты и наблюдать динамические изменения клеток, такие, как внутриклеточный транспорт, секреция, процесс деления [39, 41, 44].

СПОСОБЫ АНАЛИЗА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК

В клеточной биологии выделяют 2 основных направления использования флюоресцентных методов: 1-й – окрашивание ядерных компонентов (ДНК, РНК, белки хроматина и т.д.), 2-й – окрашивание компонентов цитоплазмы клеток.

Для окраски ядра эукариот часто применяют различные флюорохромы, характеризующиеся избирательным связыванием с нуклеиновыми кислотами (DAPI, Hoechst, бромистый этидий, акридиновые красители), которые позволяют визуализировать контуры интерфазных клеточных ядер, митотических и мейотических хромосом, микроядер [22, 29]. Преимуществами таких красителей являются простота их применения и сравнительная дешевизна. Во многих работах используется флюоресцентное окрашивание ядерной ДНК с помощью DAPI или Hoechst для оценки общей архитектуры исследуемых клеток, а также для подсчета их количества [17, 19, 21]. Однако связывание флюорохромных красителей с ядерной ДНК приводит к необратимым изменениям структуры хроматина клеток [21], что негативно сказывается на их жизнеспособности [21, 50]. Поэтому флюоресцентное окрашивание нуклеиновых кислот применяют в основном для анализа химически фиксированных клеток или их выделенных хромосом (анализ топологии интерфазного хроматина, кариотипирование, трехмерная реконструкция тканей и биотрансплантатов).

В биологической и медицинской цитогенетике активно используют метод FISH (fluorescence *in situ* hybridization) для флюоресцентного выявления ДНК отдельных хромосом и их фрагментов *in situ*, т.е. без разрушения клеток [29]. С этой целью применяют меченные флюорохромами одноцепочечные ДНК-фрагменты, комплементарные определенным генетическим структурам исследуемых клеток. Такой подход позволяет проводить скрининг хромосомных анэуплоидий и aberrаций у диплоидных клеток человека в гематологии, онкологии, трансплантологии; клеток эмбрионов впренатальный и предимплантационный (в случае экстракорпорального оплодотворения) период; культивируемых клеток человека [38]. Отметим, что метод FISH осуществляют только на фиксированных клетках.

Для флюоресцентной окраски цитоплазмы, а также белковых компонентов ядер клеток широко используют методы иммуноцитохимии, в которых флюорохромный краситель, связанный с антителом или с другим высокоаффинным агентом, позволяет выявить внутриклеточную локализацию белковых молекул определенного типа. В результате представляется возможным оценить как внутреннюю топографию исследуемой клетки, так и ее химический состав [13, 23, 29]. Иммуноцитохимическое исследование позволяет оценить пролиферативную активность и

степень дифференцировки клеток. Это имеет большое значение в хирургии, трансплантологии, гематологии, онкологии, спортивной медицине. Однако для получения достоверных результатов с помощью иммуноцитохимии требуется предварительная химическая фиксация исследуемых клеток. Несмотря на несомненные достоинства, методы флюоресцентного анализа фиксированных клеток не позволяют оценить их биологическую полноценность в динамике.

Перспективным для морффункционального анализа клеток представляется использование витальных (прижизненных) флюорохромных красителей. Витальные красители – «красители, обладающие минимальной токсичностью», которые используются для выявления различных органел и анализа их изменений в процессе жизнедеятельности клетки, а также для изучения различных физиологических явлений, происходящих в клетке» [18]. Анализ окрашенных флюорохромами клеток может проводиться в ручном (микроскопия) и автоматическом (проточная флюориметрия) режимах. Автоматический метод позволяет оценить большую выборку клеток (до 500 тыс. за одно наблюдение) и удобен для количественного анализа структуры клеточной популяции, а также для выделения клеток определенного типа [35, 38]. Однако такой подход не является в полной мере морффункциональным, так как не позволяет оценить функциональную активность наблюдавшихся клеток. Поэтому главным способом морффункционального анализа клеток, окрашенных витальными флюорохромными красителями, по-прежнему остается микроскопия.

Во флюоресцентной микроскопии для витальной окраски клеток чаще используют так называемые митотрекеры (MitoTrackers) – специфические зонды, связанные с флюорохромами. Благодаря своей структуре эти зонды могут взаимодействовать с внутренними компонентами клеточных органел без нарушения их внутренней структуры, что позволяет наблюдать их в нефиксированных клетках в течение длительного времени [41].

Набор митотрекеров весьма велик – есть специфические красители для выявления цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭПР), аппарата Гольджи, лизосом, митохондрий и т.д. [26, 36, 41, 44]. В зависимости от целостности органеллы свечение митотрекера будет более или менее интенсивным. Например, прижизненный маркер митохондрий родамин-123 окрашивает только митохондрии с высоким трансмембранным потенциалом (функционально активные митохондрии); при нарушении структуры митохондрий или снижении их функциональной активности свечение родамина-123 исчезает [23, 26]. Существующие методы видеомикросъемки позволяют автоматически оценить миграцию флюоресцентной метки *in vivo* внутри клеток [30, 37]. Такой подход позволяет оценить динамическую измен-

чивость клеточных мембран, интенсивность работы вакуолярной системы, процессы внутриклеточного транспорта и энергообразования [7, 24, 37, 40]. Применение митотрекеров особенно эффективно при исследовании культивируемых клеток. Пожалуй, единственное ограничение для использования митотрекеров – их высокая стоимость.

Другим популярным направлением анализа прижизненной флюоресценции клеток служит исследование трансгенных животных и клеточных культур, содержащих гены флюоресцирующего белка GFP (green fluorescence protein) в разных модификациях [15, 45, 48]. Клетки, экспрессирующие ген *GFP*, под действием возбуждающего света способны флюоресцировать без всякого дополнительного окрашивания [45]. В результате появляется возможность морфофункционального анализа клеток внутри целостного организма на разных стадиях эмбриогенеза [48]. Кроме того, введение в клеточный геном структур, кодирующих GFP-белок, позволяет добиться прижизненной флюоресценции мелких высокодифференцированных клеток с уникальным строением или с малым набором органелл (нефотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли, клетки беспозвоночных) [38, 45]. Однако этот подход не применим для безъядерных клеток – тромбоцитов и эритроцитов млекопитающих, в том числе человека.

В последние десятилетия происходит массовое создание банков клеток, позволяющих хранить в течение длительного времени (с использованием методов криоконсервирования) как стволовые, так и дифференцированные клетки. Особую важность представляет длительное хранение при низких температурах ауто- и аллогенных клеток человека для последующего применения в клинической практике. К ним относятся клетки костного мозга, пуповины, а также тромбоциты и эритроциты.

Тромбоциты человека широко используются в клинической гематологии, трансфузиологии, реаниматологии, травматологии, хирургии, акушерстве и гинекологии, онкологии, в связи с чем возникает проблема оценки качества этих клеток. Такую оценку осуществляют с помощью световой [12, 16], электронной [34] и атомно-силовой микроскопии [6] фиксированных тромбоцитов, однако любая фиксация не позволяет оценить реальную жизнеспособность и функциональную активность исследуемых клеток [18]. Наиболее перспективной представляется интегральная оценка, включающая параллельный анализ целостности структуры тромбоцита и его функциональной активности с использованием методов витального окрашивания.

Однако в тромбоцитах человека большинство органелл, характерных для эукариотических клеток, отсутствуют (ядро, аппарат Гольджи) либо слабо развиты (митохондрии, цистерны ЭПР), а окрасить элементы цитоскелета витальными красителями очень

трудно. Таким образом, проблема выбора витально-го флюорохромного красителя для тромбоцитов по-прежнему актуальна.

ВИТАЛЬНОЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ

Применение витальных красителей для исследования клеток крови человека во флюоресцентном микроскопе описано довольно узко [8, 13, 46]. Во многом это связано с тем, что почти все современные методы микроскопического исследования клеток крови основаны на изучении фиксированных препаратов. Среди широко известных красителей для витального окрашивания клеток крови используют флюорохромы – пропидия йодид (для выявления мертвых клеток) и акридиновый оранжевый (АО). АО применяют для окраски нефиксированных ядродержащих клеток крови, выявления ретикулоцитов, количественного анализа ДНК и РНК лимфоцитов в зависимости от степени активности хроматина [38, 46, 50]. В настоящее время на примере культуры лимфоцитов, окрашенных АО, исследуют структуру митотических хромосом [50].

В норме тромбоциты не содержат ДНК-компонентов (исключая кольцевой геном немногочисленных митохондрий), однако в ряде исследований АО используется для работы с тромбоцитами. Так, описана способность тромбоцитов накапливать АО в α -гранулах, что позволяет видеть флюоресценцию этих гранул методом проточной флюориметрии. После активации тромбоцитов тромбином в присутствии Ca^{2+} флюоресценция гранул исчезает, а при действии блокатора активации (аминазина) – сохраняется [39]. Недостаток этого, безусловно, очень ценного наблюдения заключается в том, что все исследования проводились на проточном флюориметре без детального анализа морфологии тромбоцитов. По всей видимости, это было вызвано невозможностью выявить отдельные тромбоциты, окрашенные только АО.

Помимо α -гранул, АО обладает способностью накапливаться в гранулах, содержащих серотонин [39], а также в лизосомах и поздних эндосомах [21, 40]. Считается, что такое избирательное накопление обусловлено пониженным pH в α -гранулах и плотных тельцах, что обуславливает повышенное сродство АО с этими структурами тромбоцитов [39]. Следовательно, АО может быть применен для выявления α -гранул и плотных телец в тромбоцитах. В других исследованиях АО используется в качестве внеклеточного флюоресцирующего зонда, с помощью которого предлагается оценивать интенсивность эндоцитоза тромбоцитов [20]. Описана эндоцитозная активность тромбоцитов [13, 47]; более того, есть данные о способности тромбоцитов к уничтожению опухолевых клеток [28]; однако вряд ли эти функции являются определяющими в оценке биологической полноцен-

ности тромбоцитов. Предложенный метод [20] не включает проведение микроскопического исследования и не позволяет оценить морфофункциональные параметры тромбоцитов. Более того, сама структура красителя АО указывает на то, что он способен свободно проникать в живые клетки независимо от уровня их эндоцитозной активности.

Таким образом, АО может быть применен для витального окрашивания гранул тромбоцитов. Этот краситель окрашивает цитоплазму в тот же цвет, что и гранулы, в результате чего в витально окрашенных АО тромбоцитах часто не удается выявить гранулы отдельно от цитоплазмы [50]. Поэтому для витальной окраски тромбоцитов необходим еще один краситель, позволяющий дифференцированно окрасить цитоплазму клеток.

Для витального окрашивания цитоплазмы тромбоцитов человека был выбран флюорохром трипафлавин. Как и АО, трипафлавин можно использовать для приживленной окраски ядер [18], однако при окраске клеток трипафлавином наблюдается также флюоресценция цитоплазмы [3, 18], хотя до сих пор точно не установлено, с какими именно цитоплазматическими структурами взаимодействует трипафлавин. Вероятно, трипафлавином окрашиваются мембранные компоненты, так как другой акридиновый краситель – акридиновый желтый, сходный по структуре с трипафлавином, используется для приживленной окраски мембран некоторых бактерий [22]. Кроме того, установлено повышенное сродство трипафлавина с глиальными клетками мозга [24] и мышечной тканью [48] при различных патологиях, связанных с накоплением в клетках нейтральных липидов. Таким образом, трипафлавин способен связываться с нейтральными липидами биологических мембран. Это его свойство весьма замечательно, поскольку позволяет использовать трипафлавин для приживленного окрашивания цитоплазмы клеток.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИТАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

На основе трипафлавина и АО был разработан витальный флюорохромный краситель, позволяющий проводить морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью флюоресцентного микроскопа [14]. Цитоплазма окрашенных тромбоцитов имеет зеленое свечение, гранулы – красно-оранжевое. Витально окрашенные тромбоциты разделяются на несколько субпопуляций, различающихся по яркости свечения, количеству гранул на 1 клетку и функциональной активности. Показано, что функционально активными являются клетки, содержащие не менее 3 визуально различимых гранул («клетки с гранулами») – такие клетки способны к адгезии на стекле, а также к агрегации под действием индуктора. Яркость клеток с гранулами варьирует от 40 до 80 фут-кандел и позволяет оценить целостность их внутреннего со-

става (морфофункциональную активность). Самые яркие клетки с гранулами (60–80 фут-кандел) наиболее устойчивы к действию внешних факторов (изменение рН, снижение температуры, действие токсических веществ) и обладают наиболее выраженной функциональной активностью. Напротив, клетки с яркостью свечения <40 фут-кандел являются функционально неактивными и не проявляют адгезивной и агрегационной активности. Морфология таких тромбоцитов разнообразна – среди них встречаются клетки дисковидные: округлые, с отростками, а также клетки неправильной формы (деградирующие), однако все они не содержат гранул или содержат 1–2 мелкие гранулы, часто связанные с клеточной оболочкой.

Витальное окрашивание трипафлавином-АО позволяет проводить морфофункциональный анализ тромбоцитов человека независимо от их концентрации в пробе. Благодаря этому появляется возможность оценить биологическую полноценность тромбоцитов при разных патологических состояниях, в том числе при тромбоцитопении и тромбоцитозах, когда стандартные методы клинического анализа тромбоцитов (проточная цитометрия, агрегометрия, тромбоэластография) не могут быть использованы. Кроме того, витальная окраска тромбоцитов позволяет оценить чувствительность тромбоцитов пациентов к различным лекарственным препаратам, и прежде всего к препаратам-антиагрегантам (клопидогрел, ацетилсалicyловая кислота и т.д.). Помимо клинико-диагностического применения, предложенный метод может быть использован в клинической и производственной трансфузиологии с целью оценки качества концентрата тромбоцитов.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ: ДАЛЬНЕЙШИЕ НАПРАВЛЕНИЯ

Бурное развитие оптической техники в последние 20–30 лет позволило заметно улучшить качество получаемых флюоресцентных изображений клеток. В результате стало возможным исследовать клетки, витально окрашенные двумя и более флюоресцентными красителями, а также получать информацию о клеточных структурах с размером меньше классической разрешающей способности оптического микроскопа [24, 30, 32, 33]. В медицине использование современных методов флюоресцентной микроскопии представляется особенно перспективным в области биотехнологий, связанных с изготовлением биотрансплантатов, их трехмерной реконструкцией и моделированием [15, 17, 42]. Кроме того, использование флюоресцентных методов анализа может быть эффективным способом контроля качества клеток человека, используемых для клинических целей (эритроциты, тромбоциты, мезенхимальные клетки костного мозга, фибробласти и т.д.), а также в области клинической диагностики различных патологий.

Исходя из сказанного, можно заключить, что методы витального флюоресцентного анализа клеток представляют большую ценность как для фундамен-

тальной науки, так и для прикладных исследований; их внедрение может стать существенным вкладом в развитие отечественной биологии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. и др. // Биофизика. – М., 2000.
2. Василенко И.А., Кардашова Д.З., Тычинский В.П. и др. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии // Вестник последипломного медицинского образования. – 2009; 3–4: 64–8.
3. Геннис Р. Биомембранные: Молекулярная структура и функции // Пер. с англ. – М.: Мир, 1997.
4. Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов // Цитология. – 2007; 49 (3): 204–9.
5. Григорьев И.С., Чернобельская А.А., Воробьев И.А. Количественный анализ движений гранул в поляризованных фибробластах // Биологические мембранные. – 1997; 14 (2): 160–73.
6. Донников М.Ю., Орлов С.А., Зиновьева А.В. Качественная оценка морфофункциональной активности тромбоцитов по данным атомно-силовой микроскопии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009; 8: 30–2.
7. Зефиров А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минибаяев М.Г., Сюйткова Г.Ф. Приживленное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 // Цитология. – 2003; 45 (12): 34–40.
8. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. – М.: Триада-Х, 1997.
9. Колосова Е.Н., Василенко И.А., Ковалева Л.Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии // Бюллетень СО РАМН. – 2011; 31 (2): 58–63.
10. Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф., Рубин А.Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения // Учебник для ВУЗов. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008.
11. Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках // Цитология. – 2005; 47 (4): 348–56.
12. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. – М.: Литтера, 2011.
13. Макаров М.С., Хватов В.Б., Боровкова Н.В. Способ оценки морфофункционального статуса витально окрашенных тромбоцитов // Материалы V юбилейной конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – М., 2012. – С. 80–1.
14. Макаров М.С., Боровкова Н.В., Высоцин И.В., и др. Медицинский Алфавит // Современная лаборатория. – 2012; 3: 32–4.
15. Павлова Г.В., Ревишин А.В., Мирошникова О.А. и др. Влияние чужеродного гена *gdnf* в ксенотрансплантах на посттравматические процессы в мозге мышей // Молекулярная медицина. – 2006; 2: 44–8.
16. Погорелов В.М., Медовый В.С., Хазем Г.М., Козинец Г.И. Анализ клеточного изображения // Клинич. лаб. диагн. – 1995; 3: 40–3.
17. Пустолова О.Л., Агапов И.И., Мойсевич М.М. и др. Использование метода конфокальной микроскопии для изучения биологических свойств матрикса из рекомбинантной паутины // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. – 2009; 11 (2): 54–9.
18. Роксин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. – М.: Советская наука, 1957.
19. Световая микроскопия в биологии. Методы / Под ред. А. Лейси: Пер. с англ. И.А. Воробьева. – М.: Мир, 1992.
20. Трунилина Н.Н., Мурина М.А., Рощупкин Д.И. и др. Исследование начальной агрегации и аккумуляции акридинового оранжевого в тромбоцитах при хранении тромбокардного концентрата с использованием гипохлорита натрия // Гематология и трансфузиология. – 2000; 5: 17–9.
21. Фаддеева М.Д., Беляева Т.Н. ДНК-интеркаляторы: взаимодействие с ДНК и другими клеточными компонентами и применение в биологических исследованиях // Цитология. – 1991; 33 (10): 3–10.
22. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии. – М.: Химия, 1980.
23. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. – New York, Garland Science 2002.
24. Betz W., Mao F., Bewick G. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals // J. Neurosci. – 1992; 12 (2): 363–75.
25. Braun F., Hegemann P. Direct measurement of cytosolic calcium and pH in living Chlamydomonas reinhardtii cells // Eur. J. Cell. Biol. – 1999; 78: 199–208.
26. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes // Cold Spring Harb Protoc. – 2011; 8: 990–2.
27. Coates P., Lorimore S., Wright E. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation // Mutat. Res. – 2004; 568 (1): 5–20.
28. Gupta G., Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link // J. Clin. Invest. – 2004; 114 (12): 1691–3.
29. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6ed. NY, Molecular Probes 1996.
30. Hein B., Willig K., Hell S. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008; 105 (38): 14271–6.
31. Hennessey T., Kuruvilla H. Electrophysiology of Tetrahymena // Methods Cell. Biol. – 2000; 62: 363–77.
32. Hess S., Girirajan T., Mason M. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy // Biophys. J. – 2006; 91: 4258–72.
33. Klar T., Jakobs S., Dyba M. et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000; 97 (15): 8206–10.
34. Lam W., Chaudhuri O., Crow A. et al. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening // Nat. Mater. – 2011; 10: 61–6.
35. Maltsev V. Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // Review of Scientific Instruments. – 2000; 71: 243–55.
36. Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences // Anal. Sci. – 2008; 24: 67–72.
37. Pagano R. Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1990; 2 (4): 652–63.
38. Pollard M., Earnshaw W. // Cell. Biology – NY, Elsevier Science 2007.
39. Popov E., Mejlumian A., Gavrilov I. et al. Evaluation of the ability of intact platelets to accumulate acridine orange // Experientia. – 1988; 44 (7): 616–8.
40. Salzman N., Maxfield F. Quantitative fluorescence techniques for the characterization of endocytosis in intact cells // Subcell. Biochem. – 1993; 19: 95–123.
41. Shroff H., Galbraith C., Galbraith J., Betzig E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics // Nat. Methods. – 2008; 5: 417–23.
42. Stankus J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix // Biomaterials. – 2006; 27: 735–44.
43. Sugino K., Tominaga T., Allen R., Naitoh Y. Electrical properties and fusion dynamics in vitro membrane vesicles derived from separate parts of the contractile vacuole complex of Paramecium multimicronucleatum // J. Exp. Biol. – 2005; 208: 3957–69.
44. Terasaki M., Loew L., Lippincott-Schwartz J., Zaal K. Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria // Curr. Protoc. Cell. Biol. – 2001; Chapter 4: Unit 4.4.
45. Tsien R. The green fluorescent protein // Annu Rev. Biochem. – 1998; 67: 509–44.
46. Walker H., Hall W., Hurst J. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. – Boston, Butterworths. 1990.
47. White J. Why human platelets fail to kill bacteria // Platelets. – 2006; 17 (3): 191–200.
48. Willig K., Kellner R., Medda R. et al. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy // Nat. Methods. – 2006; 3: 721–3.
49. Yang H., Asaad N., Held K. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts // Oncogene. – 2005; 24 (12): 2096–103.
50. Zelenin A. Acridine orange as a probe for cell and molecular biology. In: Fluorescent and luminescent probes for biological activity. – London, Acad. Press, 1999.