

МЕТОДИКА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

В. В. Мороз, А. М. Черныш, Е. К. Козлова, О. Е. Гудкова,
В. А. Сергунова, Е. А. Мягкова, А. Н. Кузовлев

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, РАМН, Москва

Procedure for Microscopic Analysis of Red Blood Cell Membranes

V. V. Moroz, A. M. Chernysh, E. K. Kozlova, O. E. Gudkova,
V. A. Sergunova, E. A. Myagkova, A. N. Kuzovlev

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

При переходе размеров изображений от микронных до нанометровых возникают многие трудности, связанные с появлением разномасштабных неоднородностей объектов. Распознавание структурных единиц неоднородностей мембраны представляет собой сложную патофизиологическую и биофизическую задачу. *Цель работы* — показать основные методические подходы к анализу неоднородностей наноструктур мембран в процессе использования микроскопии, показать необходимость экспертной оценки при исследовании мембран эритроцитов в норме, при действии на кровь экзогенных физико-химических факторов. В работе обсуждаются проблемы границ применимости оптической и атомно-силовой микроскопии. Показаны неоднородности распределения клеток по ансамблю, по поверхности отдельной клетки, по форме и размерам локальных повреждений мембран и ряд других. Учет всех видов неоднородностей, формирование качественных монослоев клеток, адекватный задачам выбор наномасштабов сканирования могут способствовать успешному выполнению поставленных научных целей. *Ключевые слова:* мембраны, неоднородности, локальные дефекты, оптическая, атомно-силовая микроскопия.

Transition from micron to nanometric image sizes creates many problems associated with the emergence of non-uniform scale heterogeneities of objects. To recognize the structural units of membrane heterogeneities is a complex pathophysiological and biophysical task. *Objection:* to show main methodological approaches to analyzing the heterogeneities of membrane nanostructures when using microscopy and to demonstrate the need for an expert evaluation when investigating red blood cell membranes in health and the influence of exogenous and physicochemical factors on blood. The paper discusses the limits of applicability of optical and atomic force microscopy. It shows the heterogeneities of cell distribution over the ensemble, surface of an individual cell, by the pattern and extent of local membrane damages and by a number of others. To take into account all the types of heterogeneities, to form the qualitative monolayers of cells, and to choose scanning nanoscales adequately with the tasks may contribute to the successful implementation of the research goals set. *Key words:* membranes, heterogeneities, local defects, optical, atomic force microscopy.

Традиционно для анализа поверхностей мембран клеток применяются методы оптической и атомной силовой микроскопии (АСМ). Применение этих методов в биологии сопряжено с рядом особенностей. При переходе размеров изображений от микронных — оптическая микроскопия до нанометровых — атомная силовая микроскопия возникают многие трудности, связанные с появлением разномасштабных неоднородностей объектов. Неоднородности возникают уже на уровне клеточных популяций. Изначально в крови существуют фрагменты с разными концентрациями клеток [1]. При действии на кровь различных препаратов такие неоднородности могут меняться и по форме, и по свойствам отдельных фрагментов [2]. В свою очередь, мембраны эритроцитов имеют сложную изменяющуюся наноповерхность на

различных участках отдельной клетки [2, 3]. Воздействие на клетку физико-химических факторов может приводить к изменению структуры поверхности мембран, изменять степень неоднородностей [4–7]. Распознавание структурных единиц неоднородностей мембраны представляет собой сложную патофизиологическую и биофизическую задачу.

Цель работы — показать основные методические подходы к анализу неоднородностей наноструктур мембран в процессе использования микроскопии, показать необходимость экспертной оценки при исследовании мембран эритроцитов в норме, при действии на кровь экзогенных физико-химических факторов.

Для получения изображений в оптическом микроскопе использовали микроскоп Olympus CX41 с программным обеспечением «ImageScore» (Japan). Изображения наноповерхности мембран получали с помощью АСМ «Integra Prima» (РФ) в режиме резонансного сканирования с использованием математического обеспечения этого микроскопа. Использовали стандартные

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Черныш Александр Михайлович (Chernysh A. M.)
E-mail: amchernysh@mail.ru

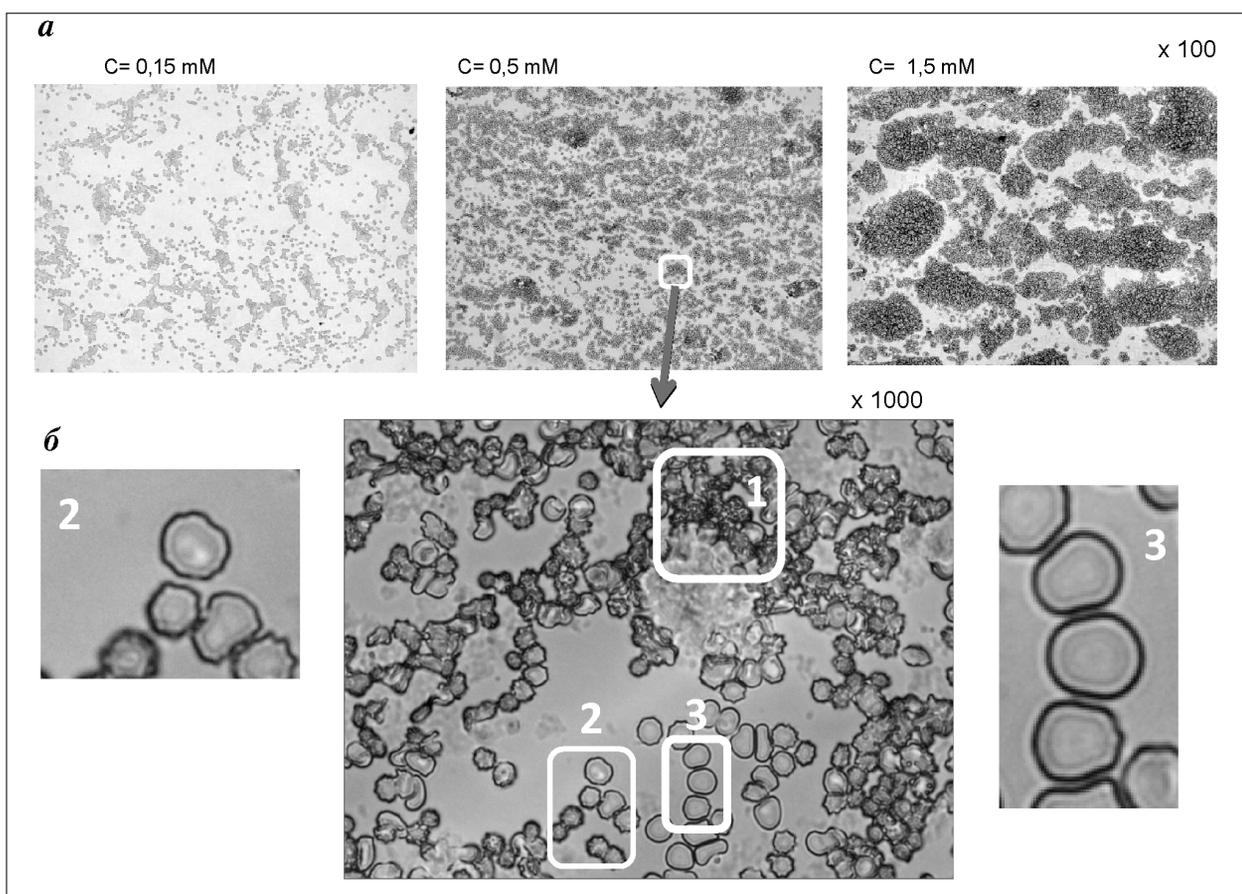


Рис. 1. Конгломераты клеток в поле оптического микроскопа при действии разных концентраций цинка: а – увеличение 100; б – увеличение 1000. 1, 2 и 3 фрагменты клеток и сгустков крови из 1б. С – концентрации цинка.

кантилеверы frN10 с углом при вершине $\leq 22^\circ$ и радиусом ~ 10 нм. Сила при сканировании в диапазоне 0,1–5 нН. Число точек сканирования – 512, поля сканирования: 10×10 мкм, 1000×1000 нм, 500×500 нм.

Всегда возникает вопрос о границах применимости того или иного метода, в частности, оптической и атомно-силовой микроскопии. Здесь определяющую роль имеют задачи исследования и ограничения по пределу разрешения. Предел разрешения микроскопа – это наименьшее расстояние между соседними точками, которые различаются как отдельные (не сливаются). Предел разрешения оптического микроскопа Z ограничен длиной волны света λ :

$$Z \sim \lambda/2,$$

то есть теоретически это 250 нм, практически – 500–900 нм. В этом диапазоне заканчивается возможность применения оптических систем. Более мелкие структуры, часто называемые наноструктурами, можно наблюдать в электронном или атомно-силовом микроскопах. Электронная микроскопия выходит за рамки данного обсуждения.

АСМ имеет предел разрешения до 0,1 А, что делает ее уникальным инструментом при исследованиях молекулярных структур биологических объектов [8–18].

Неоднородности распределения по ансамблю. Кровь изначально – неоднородная среда. При добавлении в нее фармхимпрепаратов могут появляться новые отдель-

ные образования (например, модифицированные клетки), их кластеры и их крупные конгломераты. При этом количество модифицированных клеток, кластеров, конгломератов может возрастать или убывать в зависимости от состава и концентрации вводимых препаратов. В этих случаях необходимо различать виды неоднородностей и выбирать из них специфические участки, которые интересуют исследователя в данной работе. Например, добавление ионов тяжелых металлов (Zn^{2+}) в суспензию эритроцитов порождает целый ряд неоднородных структур (рис. 1). С ростом концентрации металла возрастают и неоднородности. В крови появляются агрегаты клеток (рис. 1, а), которые увеличиваются в размерах. При этом в плазме остаются как небольшие кластеры, так и отдельные клетки, что хорошо видно на снимке при увеличении $\times 1000$ (рис. 1, б) [19, 20]. Клетки могли сохранять нормальную форму (рис. 1, б, фрагмент 3) и модифицироваться в эхиноциты (рис. 1, б, фрагмент 2). На фрагменте 1 этого рисунка показан участок сгустка клеток.

Неоднородности по поверхности клетки. Изучая мембраны эритроцитов с помощью АСМ, исследователь сталкивается с неоднородностью поверхности самой мембраны. На различных участках дискоцита – на поверхности тора, на склоне, на дне впадины наноструктура мембран неодинакова, она будет различна на сканах 500×500 нм и менее. Введение в кровь различных препаратов может вызывать на поверхности мембраны до-

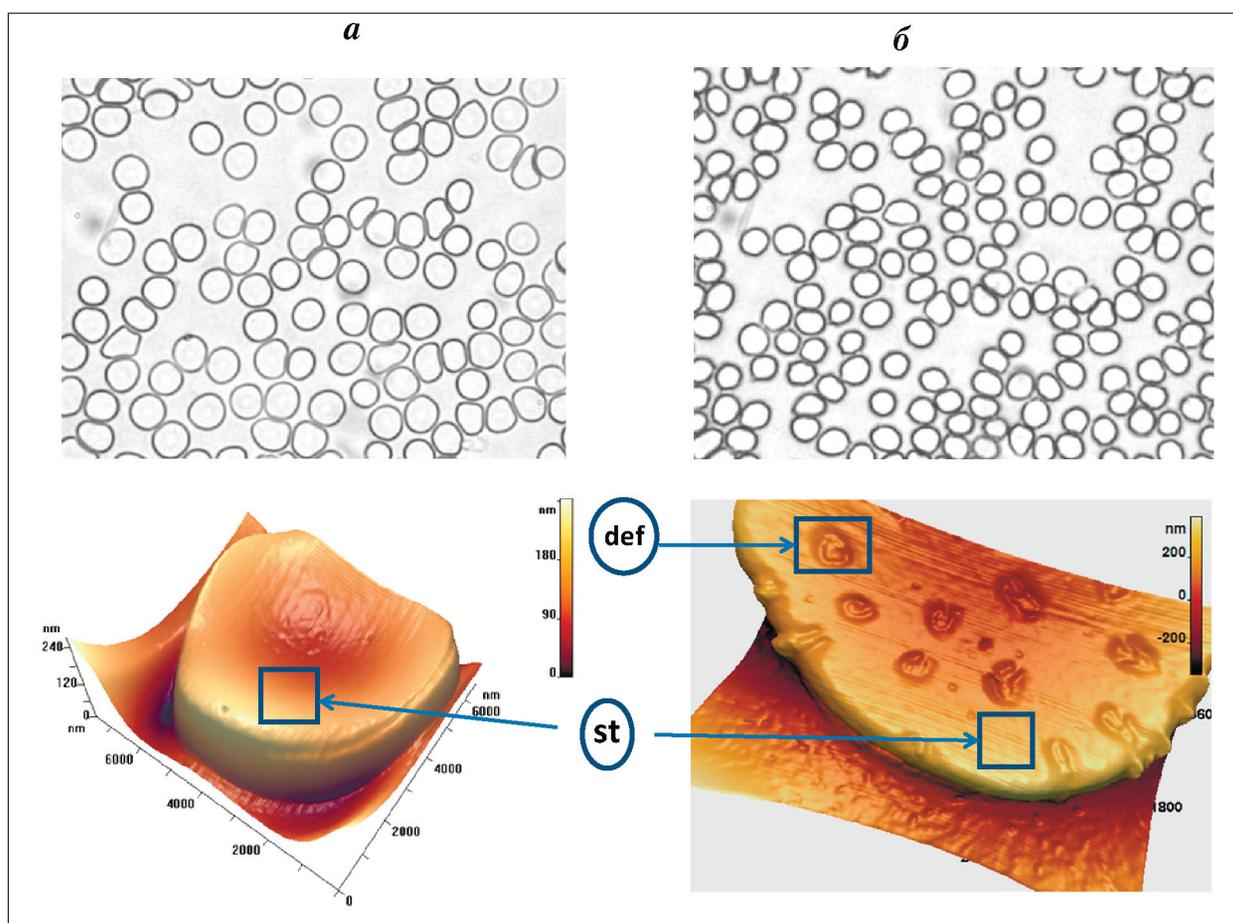


Рис. 2. Изображения контрольных эритроцитов в оптическом и АСМ микроскопах (а); то же при действии фуросемида (б); st – фрагменты «гладких» участков мембран; def – фрагменты поверхности с дефектом.

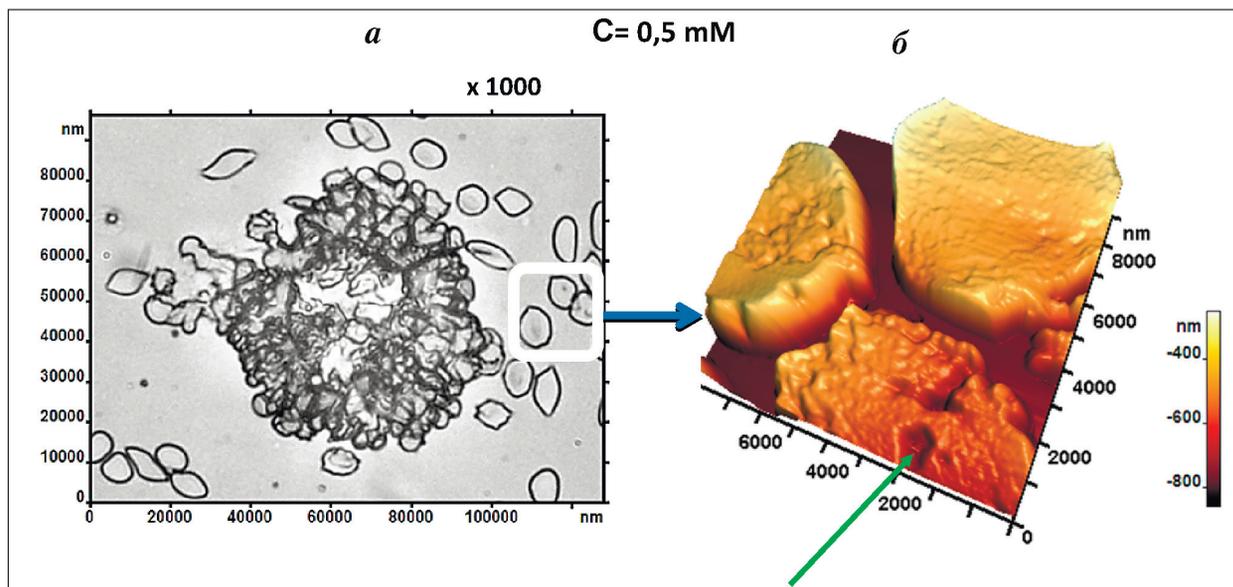


Рис. 3. Действие цинка в концентрации 0.5 мМ на клетки крови: изображение в оптическом микроскопе, увеличение 1000 (а); изображение в АСМ выделенных клеток на рис. 3, а. Стрелка указывает повреждения мембран.

полнительные повреждения. Причем эти повреждения будут носить локальный характер и не занимать всю поверхность мембраны, создавая неоднородности по поверхности клетки.

На рис. 2 представлен такой вид неоднородностей. Рисунок 2, а – оптическое и АСМ изображения контрольной клетки, рис. 2, б – то же при введении в кровь фуросемида. Оптические изображения не дают

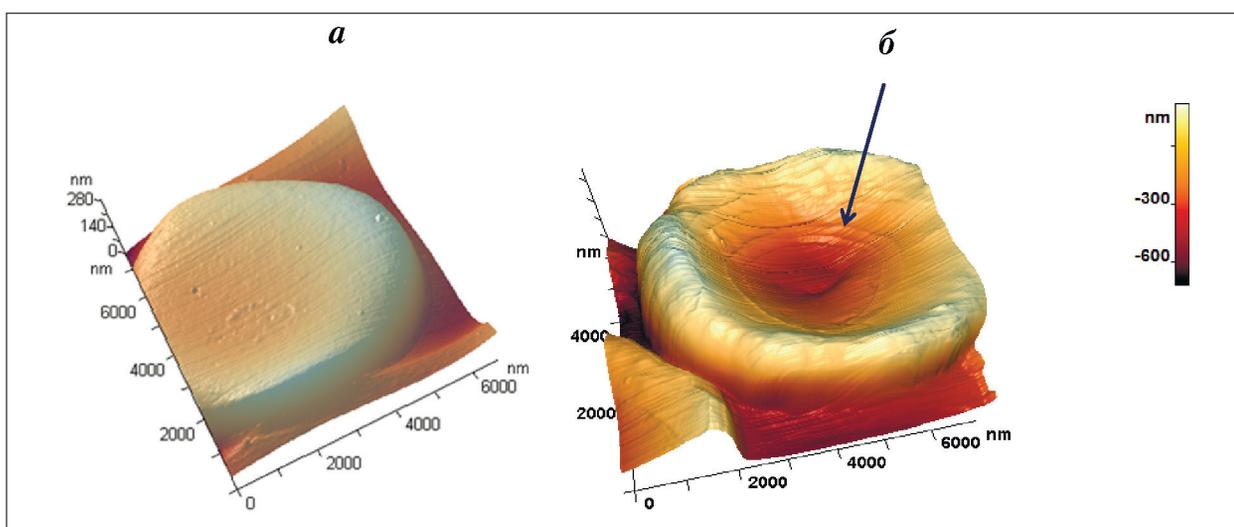


Рис. 4. Изображения эритроцита в АСМ: контрольный образец (а), контрольный образец фиксированный глутаровым альдегидом (б). Стрелка указывают характерные террасы.

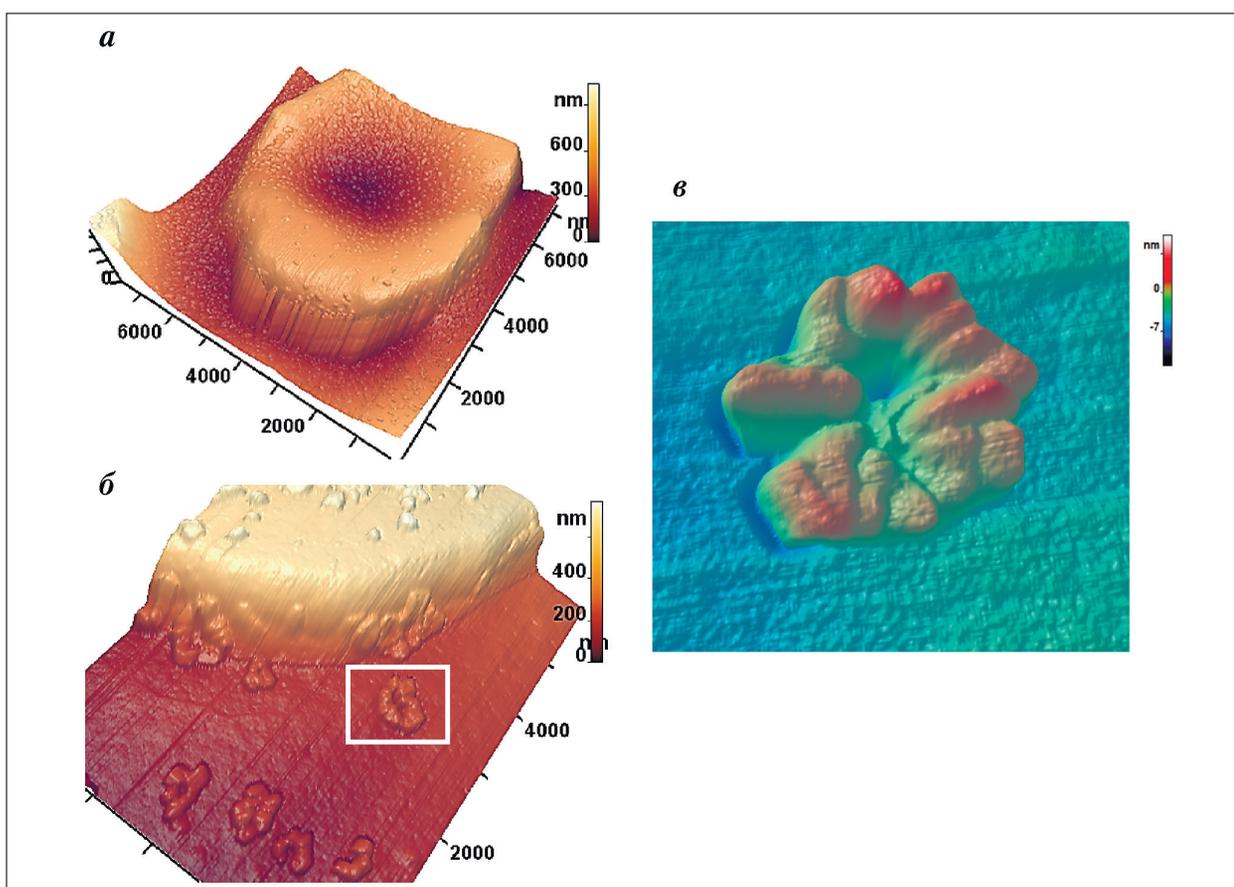


Рис. 5. Эритроцит при введении в кровь частиц фемтосистемы: масштаб 8000×8000 нм (а), фрагмент в масштабе 5000×5000 нм (б), образовавшаяся частица (выделена на рис. 5, б квадратом) при взаимодействии фемтосистемы и плазмы крови (с).

возможности дифференцировать эритроциты. Они и для контроля, и после введения фуросемида выглядят одинаково. На изображениях в АСМ иная картина. На них есть участки «гладких» поверхностей – фрагменты «st» и для а), и для б), но на рис. 2, б появились фрагменты «def», указывающие на возникшие локальные повреждения. В этом случае задача исследователя – не

только правильно выбрать клетку, но и участок мембраны для сканирования и дальнейшего изучения.

Неоднородность по форме и размерам локальных повреждений. Еще один пример неоднородности по поверхности мембраны представлен на рис. 3. Здесь оптическое изображение выделено из рис.1, а. На нем хорошо регистрируются и конгломерат, и отдельные

клетки, но не визуализируются следы повреждений поверхности мембран (рис. 3, а). На рис. 3, б показано изображение на АСМ выделенных клеток оптического снимка. Поверхность мембран на этом снимке имеет существенные локальные дефекты. На ней выделяются несквозные глубокие поры диаметром до 800 нм. Таким образом, на мембране присутствуют неоднородности по форме и размерам локальных повреждений.

Неоднородности предварительной обработки клеток. Ряд исследователей применяют предварительную обработку мембран глутаровым альдегидом [6, 21]. Однако необходимо учитывать, что фиксаторы кластеризуют белки мембран, тем самым модифицируют ее поверхность. Поэтому анализ таких поверхностей может в итоге привести к искаженным результатам.

На рисунке 4, а приведен пример контрольной клетки, а на рисунке 4, б та же клетка после фиксации глутаровым альдегидом. И размеры впадины дискоцита, и форма клетки в фиксаторе искажена. Края тора и склоны структурно нарушены. На склонах появляются характерные «террасы» (на рис. 4, б указаны стрелкой), которые не присутствуют в нативной клетке. Очевидно, что при изучении действия экзогенных факторов на клетку фиксаторы могут вносить искажения в результаты исследования.

При воздействии на эритроцит различными химическими агентами на его поверхности могут появляться не только дефекты, вызванные этим воздействием, но и следы взаимодействия химического агента с элементами плазмы крови. Так, на рисунке 5, а представлена

клетка при воздействии частиц фемтосистемы на кровь. На поверхности клетки присутствуют следы такого взаимодействия агента с плазмой, а на рисунке 5, б этот же эффект показан в большем масштабе. Эти частицы имеют сложную конфигурацию, которая при неправильно выбранном масштабе не регистрируется (на рис. 5, а и б). Однако при увеличении масштаба можно регистрировать и размеры частиц, и их оригинальную форму (рис. 5, в). Высота такой частицы составляет около 2–8 нм, а диаметр — порядка 200–800 нм.

Таким образом, при исследовании мембран с помощью АСМ необходимо учитывать целый ряд особенностей. Во-первых, это неоднородности распределения по ансамблю, во-вторых, неоднородности по поверхности клетки, в-третьих, неоднородности по форме и размерам клеток и микроповреждений. Кроме того, необходимо учитывать возможное смещение результатов, вызванное применением фиксаторов. При исследованиях эритроцитов в АСМ особую важность приобретает проблема формирования монослоев клеток и выбор масштаба сканирования [22].

Все вышеперечисленные особенности методологии применения атомной силовой микроскопии для исследования клеточных мембран требуют тщательной экспертной оценки объекта.

Лишь учет всех видов неоднородностей, выполнение требования формирования качественных монослоев клеток, правильный выбор наномасштабов сканирования могут способствовать успешному выполнению поставленных научных целей.

Литература

1. Льюис С.М., Бэйн Б., Бейтс И. Практическая и лабораторная гематология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 672.
2. Мороз В.В., Козлова Е.К., Черныш А.М., Гудкова О.Е., Бушуева А.В. Изменения структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (6): 5–10.
3. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227.
4. Мороз В.В., Черныш А.М., Богусевич М.С., Козлова Е.К., Близнюк У.А., Алексеева П.Ю., Козлов А.П. Скрытые повреждения мембран при физических и фармакологических воздействиях. *Общая реаниматология*. 2006; 2 (5–6): 55–60.
5. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Borshagovskaya P.Y., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M. Erythrocyte membrane surface after calibrated electroporation: visualization by atomic force microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 148 (3): 455–460.
6. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshagovskaya P.Y., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010; 25 (3): 539e1–539e12.
7. Алексеева П.Ю., Мороз В.В., Васильев В.Ю., Казиев Г.Р., Козлова Е.К., Черныш А.М., Богусевич М.С., Козлов А.П., Близнюк У.А. Воздействие анестезиологических препаратов на мембрану эритроцитов. *Общая реаниматология*. 2007; 3 (5–6): 134–138.
8. Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Дубровин Е.В., Шайтан К.В., Яминский И.В. Атомно-силовая микроскопия животных клеток: обзор достижений и перспективы развития. *Биофизика*. 2011; 56 (2): 288–303.
9. Мороз В.В., Голубев А.М., Черныш А.М., Козлова Е.К., Васильев В. Ю., Гудкова О.Е., Сергунова В.А., Федорова М.С. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 5–12.
10. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 52–60.
11. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С., Александрин В.В., Борщевская П.Ю., Близнюк У.А., Рысаева Р.М. Атомная силовая микроскопия структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и реинфузии. *Общая реаниматология*. 2009; 5 (5): 5–9.
12. Zachee P., Snaewaert J., Vandenberghe P., Hellemans L., Boogaerts M. Imaging red blood cells with the atomic force microscope. *Br. J. Haematol.* 1996; 5 (95): 472–481.
13. Cui Y., Guo Z., Zhao Y., Zheng Y., Qiao Y., Cai J., Liu S. Reactive effect of low intensity He-Ne laser upon damaged ultrastructure of human erythrocyte membrane in Fenton system by atomic force microscopy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2007; 39 (7): 484–489.
14. Dufrene Y.F., Lee G.U. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; 1509 (1–2): 14–41.
15. Ebner A., Schillers H., Hinterdorfer P. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2011; 736: 223–241.
16. Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumis G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J. Microsc.* 2001; 204 (Pt 1): 46–52.
17. Moroz V.V., Kirsanova A.K., Novodergkina I.S., Alexandrin V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and subsequent blood reinfusion. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2010; 14 (4): 248–255.
18. Мороз В.В., Млякова Е.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Остапенко Д.А., Черныш А.М., Решетняк В.И. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (3): 14–23.
19. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Sergunova V.A., Gudkova O.Y., Fedorova M.S. Reversible zinc-induced injuries to erythrocyte membrane nanostructure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 154 (1): 84–88.
20. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13.
21. Хайруллина А.Я., Ольшанская Т.В., Филимонок Д.С., Козлова Н. М., Гармаза Ю.М., Слобжанкина Е.И. Оптические, наноструктурные и

- биофизические свойства Zn-индуцированных изменений мембран эритроцитов человека. *Оптика и спектроскопия*. 2011; 110 (4): 574–580.
22. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология*. 2011; (7) 2: 5–9.
- References**
1. Lewis S.M., Bein B., Beits I. Prakticheskaya i laboratornaya gematologiya. [Practical and laboratory hematology]. Moscow: GEOTAR-Media; 2009: 672. [In Russ.]
 2. Moroz V.V., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Gudkova O.E., Bushueva A.V. Izmeneniya struktury membran eritrotsitov pri deistvii gemina. [Hemin-induced changes in the structure of red blood cell membranes]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (6): 5–10. [In Russ.]
 3. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227.
 4. Moroz V.V., Chernysh A.M., Bogushevich M.S., Kozlova E.K., Bliznyuk U.A., Alekseyeva P.Yu., Kozlov A.P. Skrytye povrezhdeniya membran pri fizicheskikh i farmakologicheskikh vozdeistviyakh. [Latent membrane damages upon physical and pharmacological exposures]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2006; 2 (5–6): 55–60. [In Russ.]
 5. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Borshagovskaya P.Y., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M. Erythrocyte membrane surface after calibrated electroporation: visualization by atomic force microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 148 (3): 455–460.
 6. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshagovskaya P.Y., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010; 25 (3): 539e1–539e12.
 7. Alekseyeva P.Yu., Moroz V.V., Vasilyev V.Yu., Kaziev G.R., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Bogushevich M.S., Kozlov A.P., Bliznyuk U.A. Vozdeistvie anesteziologicheskikh preparatov na membranu eritrotsitov. [Effect of anesthetics on the red blood cell membrane]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2007; 3 (5–6): 134–138. [In Russ.]
 8. Efremov Yu.M., Bagrov D.V., Dubrovin E.V., Shaitan K.V., Yaminsky I.V. Atomno-silovaya mikroskopiya chivotnykh kletok: obzor dostichenii i perspektivy razvitiya. [Atomic force microscopy of animal cells: a review of achievements and prospects for development]. *Biofizika*. 2011; 56 (2): 288–303. [In Russ.]
 9. Moroz V.V., Golubev A.M., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Vasilyev V.Yu., Gudkova O.E., Sergunova V.A., Fedorova M.S. Izmeneniya struktury poverkhnosti membran eritrotsitov pri dlitelnom khranении donorskoi krvi. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 5–12. [In Russ.]
 10. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyakh. [The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 52–60. [In Russ.]
 11. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., Aleksandrin V.V., Borshchegovskaya P.Yu., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M. Atomnaya silovaya mikroskopiya struktury membran eritrotsitov pri ostroi krvopotere i reinfuzii. [Atomic force microscopy of the structure of red blood cell membranes in acute blood loss and reinfusion]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2009; 5 (5): 5–9. [In Russ.]
 12. Zachee P., Snauwaert J., Vandenberghe P., Hellemans L., Boogaerts M. Imaging red blood cells with the atomic force microscope. *Br. J. Hematol.* 1996; 5 (95): 472–481.
 13. Cui Y., Guo Z., Zhao Y., Zheng Y., Qiao Y., Cai J., Liu S. Reactive effect of low intensity He-Ne laser upon damaged ultrastructure of human erythrocyte membrane in Fenton system by atomic force microscopy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2007; 39 (7): 484–489.
 14. Dufrière Y.F., Lee G.U. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; 1509 (1–2): 14–41.
 15. Ebner A., Schillers H., Hinterdorfer P. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2011; 736: 223–241.
 16. Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumris G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J. Microsc.* 2001; 204 (Pt 1): 46–52.
 17. Moroz V.V., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., Aleksandrin V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and subsequent blood reinfusion. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2010; 14 (4): 248–255.
 18. Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Ostapchenko D.A., Chernysh A.M., Reshetnyak V.I. Morfologicheskie osobennosti eritrotsitov u bolnykh s tyazheloi sochetannoi travmoi. [Morphological features of red blood cells in patients with severe concomitant injury]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2013; 9 (3): 14–23. [In Russ.]
 19. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Sergunova V.A., Gudkova O.Y., Fedorova M.S. Reversible zinc-induced injuries to erythrocyte membrane nanostructure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 154 (1): 84–88.
 20. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13.
 21. Khairullina A.Ya., Olshanskaya T.V., Filimonenko D.S., Kozlova N.M., Garmaza Yu.M., Slobozhanina E.I. Opticheskie, nanostrukturnye i biofizicheskie svoystva Zn-indutsirovannykh izmenenii membran eritrotsitov cheloveka. [The optical, nanostructural, and biophysical properties of Zn-induced changes in human red blood cell membranes]. *Optika i Spektroskopiya*. 2011; 110 (4): 574–580. [In Russ.]
 22. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Narusheniya nanostuktury membran eritrotsitov pri ostroi krvopotere i ikh korrektsiya perftoruglerodnoi emulsiiei. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; (7) 2: 5–9. [In Russ.]

Поступила 08.07.13