

**СВЕТОВАЯ И СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ
ЦИТОАРХИТЕКТониКИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА:
ЗНАЧИМОСТЬ ПРОБОПОДГОТОВКИ**

Е.С. Баева^{1*}, В.Г. Артюхов², М.В. Бельских²

¹ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 12.06.2023 г.

Аннотация. В статье рассматриваются вопросы использования микроскопических методов в оценке цитоархитектоники эритроцитов человека. Современная практическая медицина активно оперирует данными автоматических гематологических анализаторов, позволяющих достаточно точно определить не только отдельные показатели крови, такие как количество клеток, уровень гемоглобина, гематокрит, но и отследить динамику эритроцитарных популяций на основании изменений в количестве ретикулоцитов. Показатель анизоцитоза – RDW – лишь количественно отражает сдвиги в изменениях формы и размеров эритроцитов, и не дает возможности визуализировать мельчайшие изменения мембранной конформации. Использование метода мазка дополняет нюансы исследования гематологических сдвигов и позволяет более детально проанализировать картину крови. Прицельная оценка эритроцитарной морфологии в данном случае может быть затруднена в связи с вариантами подготовки образцов, фиксации клеток и действия поверхностного потенциала подложки, который сам по себе влияет на форму клеток.

Наиболее точные данные о малейших изменениях эритроцитарной архитектоники могут быть получены методами микроскопии высокого разрешения, среди которых большой интерес представляет сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Ограничение использования метода СЭМ, в основном, обусловлено отсутствием электронных микроскопов в классических медицинских лабораториях. Поэтому появление высокоточных световых микроскопов, дающих увеличение $\times 600$ и более, является перспективным способом актуализации и дополнения данных геманализаторов. Введение световых микроскопов с целью изолированного исследования цитоархитектоники эритроцитов требует разработки специальных подходов пробоподготовки и проведения критической оценки качества проводимых исследований. В настоящей статье нами обсуждаются наиболее распространенные ошибки, возникающие вследствие нарушений пробоподготовки эритроцитов при использовании указанных методов исследования. Приводится иллюстративный материал, акцентирующий внимание на важности строгого соблюдения этапов пробоподготовки; даются рекомендации по минимизации возникновения ошибок.

Учитывая, что трансформация эритроцитарных клеток в условиях различного микроокружения является неотъемлемой частью «физиологического ответа» организма на патогенетические явления, своевременная оценка их количественных и качественных изменений повышает шансы на нормализацию его состояния.

Ключевые слова: эритроциты, цитоархитектоника, световая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия

В настоящее время исследование фармацевтических субстанций представляет значительный

интерес, так как знание их физико-химических свойств и особенностей вспомогательных веществ определяют большинство технологических характеристик порошков (сыпучесть, масса, электризу-

емость и т.д.), что, в свою очередь, сказывается на качестве готовой лекарственной формы [1]. Оптическая микроскопия позволяет выявить различия форм и размеров кристаллов лекарственных препаратов разных производителей, наличие фальсификатов, либо подтвердить их подлинность. Микроскопия дает возможность отследить физико-химические свойства действующих веществ, а также их особенности под действием различных факторов среды – влажность, температура, давление. Микрорентгенструктурный анализ образцов в выделенной области методом СЭМ с высокой точностью дает данные о количественном содержании элементов и в листьях изучаемых видов растений [2]. На этапе разработки препаратов световая и сканирующая электронная микроскопия позволяют проследить особенности влияния ряда фармакологических средств на биологические объекты, а на этапе синтеза – проконтролировать проведение химических реакций, получение необходимой формы вещества, оценить степень его безопасности.

Количественная оценка изображений, полученных с помощью световой микроскопии, является одним из столпов биологических и биомедицинских исследований. Анализ цитоархитектоники красных клеток крови (в зависимости от целей исследования) может включать измерение морфологических параметров – диаметра клеток и центрального пеллора, объема, толщины, наличия инвагинаций, выростов и т.д. Программное обеспечение, сопутствующее современным световым микроскопам, позволяет автоматически определять искомые величины. Однако изображения, получаемые методом световой микроскопии, по мнению ряда ученых, не всегда отражают истинное значение параметров клеток, что сопровождается допущением существенных ошибок при интерпретации количественных данных. За последние десятилетия был разработан ряд стереологических инструментов для получения объективных и надежных количественных оценок клеточных и тканевых элементов [3, 4]. С другой стороны, процесс подготовки высококачественного образца – залог его адекватной оценки для получения компетентного заключения специалиста.

В настоящей статье будут рассмотрены распространённые ошибки пробоподготовки, обнаруживаемые в процессе регистрации световых и электронных микрофотографий (по результатам собственных исследований и данных литературы), и даны рекомендации по их недопущению.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Проведен сравнительный анализ данных, полученных, с одной стороны, авторами статьи методами световой и сканирующей электронной микроскопии по исследованию морфофункционального состояния эритроцитов человека, с другой стороны, - литературы по теме исследования. Выделение суспензии эритроцитов из цельной крови донора осуществляли по стандартной методике [5]. Для подготовки образцов методом сканирующей электронной микроскопии эритроциты фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида при температуре 4°C в течение 1 ч. Производили обезвоживание клеток путем центрифугирования в серии водных растворов этанола восходящей концентрации - 30%, 50%, 70%, 90% - и ацетоном. Образцы готовили нанесением клеток на подложки и последующим высушиванием в термостате при 37 °С. Для обеспечения электропроводности часть объектов напыляли тонкой плёнкой золота. Препараты просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM – 6380 LU (Япония) при ускоряющем напряжении 20-25 кВ в лаборатории ЦКПНО ВГУ.

Подготовка эритроцитов крови доноров для их оценки в поле световых микроскопов Nikon Eclipse Ni-e (США) и PZO (Польша) проводилась аналогичным способом и методом простого нанесения нативных клеток на поверхность предметных стекол. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью прикладных пакетов Microsoft Excel (t-критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно классическому варианту метода мазка, кровь наносится на предметные стекла, фиксируется, окрашивается и просматривается в поле светового микроскопа. Для изолированной оценки эритроцитарных клеток необходимо их предварительное выделение и фиксация. Для подсчета эритроцитов в камере Горяева, к примеру, суспензию клеток готовят в присутствии гипертонического раствора хлорида натрия, что вызывает плазмолиз эритроцитов и облегчает их подсчет. В подобных условиях нивелируется потенциал твердой подложки, создаваемый на границе сред «поверхность эритроцита – предметное стекло». В то же время известно [6], что нанесение жидкой фазы суспензии нативных клеток способствует появлению ложно повышенного количества эхи-

ноцитарных клеток крови (рис. 1) и появлению так называемых «монетных столбиков» (рис. 2). Предварительная фиксация формы эритроцитарных клеток с помощью пробоподготовки, изначально разработанной для метода СЭМ, способствует более качественной, на наш взгляд, оценке цитоархитектоники образцов (рис. 3).

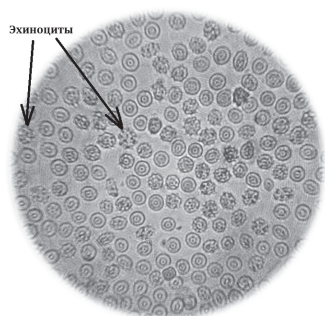


Рис. 1. Эритроцитарные клетки крови в поле светового микроскопа (отчетливо видны эхиноциты), увеличение $\times 100$

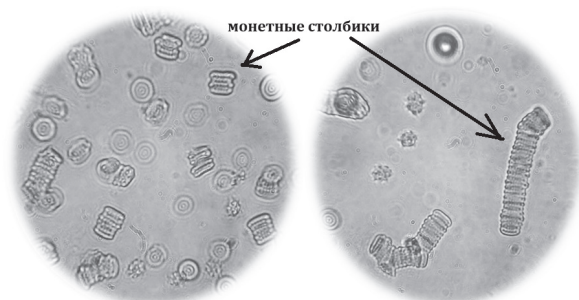


Рис. 2. Эритроциты крови в поле светового микроскопа (формирование «монетных столбиков»), увеличение $\times 100$

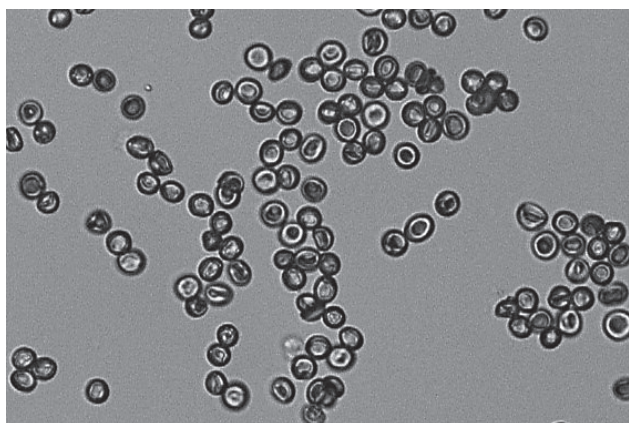


Рис. 3. Эритроциты крови в поле светового микроскопа Nikon Eclipse Ni-e, увеличение $\times 300$

В клинической практике оценка морфофункциональной организации эритроцитов имеет большое значение, так как она определяет микро-

реологические свойства крови и обеспечение ее адекватной газотранспортной функции. В современной научной литературе дискутируется вопрос касательно необходимости в проведении визуальной оценки морфологических особенностей эритроцитов, так как автоматические гематологические анализаторы способны достоверно информировать исследователя о характеристиках отдельных популяций и эритроцитарных индексах. Гематологические анализаторы не используют в своей работе твердой подложки, что само по себе могло бы приводить к появлению артефактов при оценке цитоархитектоники клеток. Математическое отражение картины крови исключает визуальную оценку архитектуры образцов, малейших нарушений, происходящих в клетке при изменении условий микроокружения. Последнее может быть достигнуто разработкой и использованием специальных микроскопических методов диагностики, в том числе, световой микроскопии.

Тип и возможности светового микроскопа напрямую влияют на качество получаемого материала. Лучшее разрешение и большее увеличение способны отразить нюансы клеточной морфологии. Так, световой микроскоп Nikon Eclipse Ni-e позволяет более детально визуализировать цитоархитектонику эритроцитов (рис. 3), чем PZO (рис. 1 и 2). Это способствует учету возможности трансформационных изменений клеток, необходимым как при физиологических, так и патологических процессах различной этиологии.

Известно, что для анализа эритроцитарных клеток крови методом световой микроскопии последние могут быть помещены не только на твердую подложку, но и в жидкую питательную среду. Подобный способ позволяет визуализировать количественное соотношение модифицированных клеток, однако, не отражает глубины варьирования цитоархитектоники образцов. Данная цель может быть достигнута при использовании метода сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографии клеток, получаемые использованием электронного микроскопа, позволяют идентифицировать мельчайшие поверхностные изменения эритроцитарных мембран. Существенный недостаток метода заключается в его ограниченной доступности для исследователей. Поэтому разработка подходов по пробоподготовке эритроцитарных клеток для их лучшей визуализации в поле светового микроскопа становится актуальной задачей.

Так, качество изображений, получаемых методом СЭМ, напрямую зависят не только от компе-

тентности оператора микроскопа, но и от пробоподготовки образцов. Использование физиологического раствора хлорида натрия для промывки эритроцитов и некачественное высушивание клеток способствует появлению артефактов на их поверхности, выражающихся кристаллизацией соли (рис. 4). Глутаровый альдегид, применяемый после промывки образцов, способствует фиксации клеток уже в течение первых нескольких минут. Это требует большой сноровки исследователя, так как осторожное равномерное перемешивание эритроцитов – основа качественного распределения фиксатора и стабилизации формы клетки. Водные растворы этанола восходящей концентрации, используемые далее для «высушивания» эритроцитов, должны применяться строго последовательно при постоянном перемешивании, центрифугировании, иначе недостаточно «подсушенные» эритроциты могут быть «склеены» между собой, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов (рис. 5).

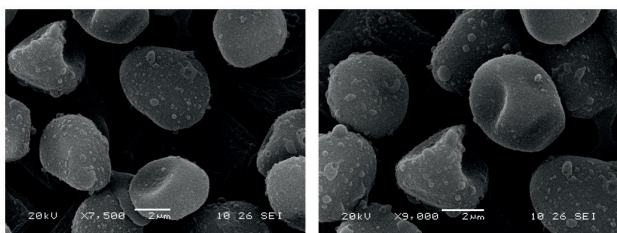


Рис. 4. Присутствие солевых кристаллов хлорида натрия на поверхности эритроцитов крови доноров, модифицированных доксициклином гидрохлоридом ($8.3 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

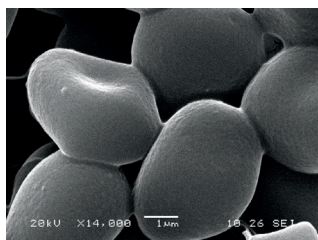


Рис. 5. «Склеивание» эритроцитов крови при неадекватном высушивании образцов

Центрифугирование эритроцитарных клеток, осуществляемое между отдельными этапами пробоподготовки, является необходимым условием их промывки, удаления излишков используемых растворов, перехода к следующему этапу. Режим работы центрифуги подбирается с учетом целей – осаждение или выделение отдельных фрагментов клеток, к примеру, микровезикул. Скорость вращения центрифуги в 1500-2000 об/мин достаточна для осаждения эритроцитов и последующего снятия

надосадочной жидкости. Превышение этого диапазона может способствовать появлению недавно открытой новой формы эритроцитов, названной «полиэдроцит», у которой клетка напоминает многогранник (рис. 6, А). Согласно авторам [7], изменение формы эритроцитов в сторону многогранников наблюдается в цитратной крови при ускорениях всего до 100 g, а при ускорениях более 1000 g преобладают мозаичные клетки, похожие на полиэдроциты. Учеными показано, что появление полиэдроцитов происходит при тромбообразовании у человека. Доказать наличие новой формы эритроцитов было возможно благодаря методу, в том числе, сканирующей электронной микроскопии.

Использование напыления клеток тонкой пленкой золота значительно улучшает электропроводность образцов, а, следовательно, и наглядность микрофотографий. На наш взгляд, этот этап является одним из ключевых для качественного анализа данных (рис. 6, Б).

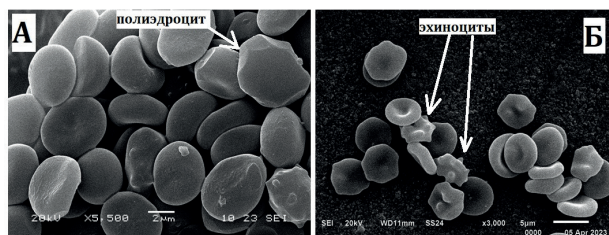


Рис. 6. Появление полиэдроцитов (справа сверху, А) и эхиноцитов человека (Б) в образцах крови

Разнообразие морфологических особенностей эритроцитов предопределяется факторами среды, окружающей клетку. Своевременное выявление отклонений, сопутствующих развитию ряда заболеваний человека, стало возможным при сочетании использовании гематологических анализаторов и прицельного анализа цитоархитектоники методами световой и сканирующей электронной микроскопии [8-13]. Каждый метод имеет свои особенности и ограничения к использованию, однако, знание нюансов работы, пробоподготовки позволяют компетентно подходить к анализу получаемых результатов.

В частности, наглядность изображений СЭМ позволила ряду ученых выявить особенности эритроцитарной организации при патогенетических процессах различной этиологии, разработать подходы к ее классификации, предложить актуальные концепции терапевтических стратегий [12-17]. Оценка морфологии эритроцитов сегодня – ключ к глубокому пониманию адаптивных воз-

возможностей организма человека, направленных на поддержание гомеостаза в целом. Понимание необходимости более глубокого анализа эритроцитарной структуры легло в основу разработки современных гематологических анализаторов, способных оценивать не только целочисленное количество клеток крови, уровня гемоглобина, гематокрита, определенных индексов, но и количества фрагментированных клеток, ретикулоцитов для учета динамики изменений реологии крови (Siemens Advia 120, 2120 и 2120i и Abbott Cell-DYN, США) [18-20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, существуют различные подходы к оценке трансформации эритроцитарных клеток в условиях различного микроокружения, являющихся неотъемлемой частью «физиологического ответа» организма на возникающие явления. Во избежание искажения трактовки морфологической картины крови рекомендуется строго следовать основным принципам пробоподготовки образцов и учитывать нюансы конкретных методов исследования. Для визуализации изолированных эритроцитов в поле светового микроскопа возможна их предварительная фиксация раствором глутарового альдегида, а для СЭМ – поэтапный контроль очищения клеток путем их промывки фосфатным буфером либо физиологическим раствором, но с обязательным равномерным перемешиванием образцов и высушиванием водными растворами этилового спирта. Напыление клеток тонкой пленкой золота будет способствовать их лучшей контрастности для последующей идентификации возможных морфологических изменений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новик Е.С., Доренская А.В., Борисова Н.А., Гунар О.В. // Успехи современного естествознания. 2016. № 11-2. С. 249-255.
2. Гудкова А.А., Чистякова А.С., Синецкая Д.А., Сливкин А.И., Болгов А.С., Болгова М.А. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022. № 11-1. С. 99-105.
3. Geuna S., Herrera-Rincon C. // Cell Tissue Res. 2015. Vol. 360, № 1. P. 5-12.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Баева Е. С., кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии

E-mail: galaxy1985@mail.ru

4. Passmore L. A., Russo C. J. // Methods Enzymol. 2016. Vol. 579. P. 51-86.

5. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Вашанов Г.А., Калаева Е.А., Лавриненко И.А., Наквасина М.А., Путинцева О.В., Радченко М.С., Резван С.Г. Практикум по биофизике. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2016, 313 с.

6. Mukhopadhyay M., Ghosh U.U., Sarkar D., DasGupta S. // Soft Matter. 2018. Vol. 14, № 36. P. 7335–7346.

7. Tutwiler V., Mukhitov A.R., Peshkova A.D., Le Minh G., Khismatullin R.R., Vicksman J., Nagaswami C., Litvinov R.I., Weisel J.W. // Sci Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 17907.

8. Godon A., Genevieve F., Marteau-Tessier A., Zandecki M. // Ann. Biol. Clin. (Paris). 2012. Vol. 70, № 2. P. 155-168.

9. Banno S., Ito Y., Tanaka C., Hori T., Fujimoto K., Suzuki T., Hashimoto T., Ueda R., Mizokami M. // Clin. Lab. Haematol. 2005. Vol. 27, № 5. P. 292–296.

10. Bhowmick S., Das D. K., Maiti A. K., Chakraborty C. // Micron. 2013. Vol. 44. P. 384–394.

11. Manna S., Biswas P., Haldar R., Naskar T.K., Law S. // Int J Lab Hematol. 2022. Vol. 44, № 3. P. 679-687.

12. Swanepoel A.C., Pretorius E. // Int J Lab Hematol. 2012 Vol. 34, № 2. P. 185-191.

13. Das D. K., Chakraborty C., Mitra B., Ray A. K. // J. Microsc. 2013. Vol. 249, № 2. P. 136-149.

14. Lesesve J. F., Asnafi V., Braun F., Zini G. // Int. J. Lab. Hematol. 2012. Vol. 34, № 6. P. 566-576.

15. Lesesve J. F., Salignac S., Alla F., Defente M. // Am. J. Clin. Pathol. 2004. Vol. 121. № 5. P. 739-745.

16. Lesesve J. F., Speyer E., Perol J. P. // Int. J. Lab. Hematol. 2015. Vol. 37, № 5. P. 583-587.

17. Sové R.J., Drakos N.E., Fraser G.M., Ellis C.G. // J Biophotonics. 2018. Vol. 11, № 11. P. e201800103.

18. Helms C.C., Marvel M., Zhao W., Stahle M., Vest R., Kato G.J., Lee J.S., Christ G., Gladwin M.T., Hantgan R.R., Kim-Shapiro D.B. // J Thromb Haemost. 2013. Vol. 11, № 12. P. 2148-2154.

19. Meintker L., Ringwald J., Rauh M., Krause S.W. // Am J Clin Pathol. 2013. Vol. 139, № 5. P. 641-650.

20. Woo K.S., An G.D., Lim H.H., Han J.Y. // Int J Lab Hematol. 2020. Vol. 42, № 5. P. e218-e219.

N.N. Burdenko State Medical University

**Bayeva Y. S., PhD, Associate Professor,*

Department of Normal Physiology

E-mail: galaxy1985@mail.ru

Баева Е.С., Артюхов В.Г., Бельских М.В.

Воронежский государственный университет
Артюхов В. Г., доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой биофизики и
биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Voronezh State University
Artyukhov V. G., PhD, DSci, Full Professor, Head
of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: Artyukhov@bio.vsu.ru

Бельских М. В., студентка 6 курса кафедры
биофизики и биотехнологии
E-mail: marina.belskikh2428@gmail.com

Belskikh M. V., 6-year student, Department of
Biophysics and Biotechnology
E-mail: marina.belskikh2428@gmail.com

LIGHT AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY IN THE STUDY OF HUMAN ERYTHROCYTES CYTOARCHITECTONICS: SIGNIFICANCE OF SAMPLE PREPARATION

Ye. S. Bayeva^{1*}, V. G. Artyukhov², M.V. Belskikh²

¹Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

²Voronezh State University

Abstract. The article discusses the use of microscopic methods in assessing the cytoarchitectonics of human erythrocytes. Modern practical medicine actively operates with the data of automatic hematological analyzers, which make it possible to accurately determine not only individual blood parameters, such as the number of cells, hemoglobin level, hematocrit, but also to track the dynamics of erythrocyte populations based on changes in the number of reticulocytes. The indicator of anisocytosis – RDW – only quantitatively reflects shifts in changes in the shape and size of red blood cells, and does not make it possible to visualize the smallest changes in the membrane conformation. The use of the smear method complements the nuances of the study of hematological shifts and allows for a more detailed analysis of the blood picture. A targeted assessment of erythrocyte morphology in this case may be difficult due to the options for sample preparation, cell fixation and the effect of the surface potential of the substrate, which itself affects the shape of cells.

The most accurate data on the slightest changes in erythrocyte architectonics can be obtained by high-resolution microscopy methods, among which scanning electron microscopy (SEM) is of great interest. The limitation of the use of the SEM method is mainly due to the lack of electron microscopes in classical medical laboratories. Therefore, the appearance of high-precision light microscopes that give an increase of x600 magnification or more is a promising way to update and supplement the data of hematological analyzers. The introduction of light microscopes for the purpose of an isolated study of the cytoarchitectonics of erythrocytes requires the development of special approaches to sample preparation and a critical assessment of the quality of research. In this article, we discuss the most common errors that occur due to violations of the sample preparation of erythrocytes when using these research methods. Illustrative material is provided, emphasizing the importance of strict compliance with the stages of sample preparation; recommendations are given to minimize the occurrence of errors.

Considering that the transformation of erythrocyte cells in various microenvironments is an integral part of the "physiological response" of the body to pathogenetic phenomena, a timely assessment of their quantitative and qualitative changes increases the chances of normalization of its condition.

Keywords: erythrocytes, cytoarchitectonics, light microscopy, scanning electron microscopy

REFERENCES

1. Novik E.S., Dorenskaja A.V., Borisova N.A., Gunar O.V. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*, 2016, No 11-2, pp. 249-255.
2. Gudkova A.A., Chistjakova A.S., Sineckaja D.A., Slivkin A.I., Bolgov A.S., Bolgova M.A.

- Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv, 2022, No 11-1, pp. 99-105.
3. Geuna S., Herrera-Rincon C. *Cell Tissue Res*, 2015, Vol. 360, No 1, pp. 5-12.
4. Passmore L. A., Russo C. J. *Methods Enzymol*, 2016, Vol. 579, pp. 51-86.

5. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Vashanov G.A., Kalaeva E.A., Lavrinenko I.A., Nakvasina M.A., Putinceva O.V., Radchenko M.S., Rezvan S.G. *Praktikum po biofizike*. Voronezh, Izdatel'skij dom VGU, 2016, 313 p.
6. Mukhopadhyay M., Ghosh U.U., Sarkar D., DasGupta S. *Soft Matter*, 2018, V. 14, No 36. pp. 7335–7346. DOI: doi: 10.1039/c8sm01146j.
7. Tutwiler V., Mukhitov A.R., Peshkova A.D., Le Minh G., Khismatullin R.R., Vicksman J., Nagaswami C., Litvinov R.I., Weisel J.W. *Sci Rep*, 2018, Vol. 8, No 1, pp. 17907.
8. Godon A., Genevieve F., Marteau-Tessier A., Zandecki M. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2012, Vol. 70, No 2, pp. 155 – 168.
9. Banno S., Ito Y., Tanaka C., Hori T., Fujimoto K., Suzuki T., Hashimoto T., Ueda R., Mizokami M. *Clin Lab Haematol*, 2005, Vol. 27, No 5, pp. 292–296. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2005.00704.x.
10. Bhowmick S., Das D. K., Maiti A. K., Chakraborty C. *Micron*. 2013, Vol. 44, pp. 384–394. DOI: 10.1016/j.micron.2012.09.003.
11. Manna S., Biswas P., Haldar R., Naskar T.K., Law S. *Int J Lab Hematol*, 2022, Vol. 44, No 3, pp.679-687. DOI: 10.1111/ijlh.13810.
12. Swanepoel A.C., Pretorius E. *Int J Lab Hematol*, 2012, Vol. 34, No 2, pp. 185-191. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2011.01379.x.
13. Das D. K., Chakraborty C., Mitra B., Ray A. K. *J. Microsc*, 2013, Vol. 249, No 2, pp. 136-149. DOI: 10.1111/jmi.12002.
14. Lesesve J. F., Asnafi V., Braun F., Zini G. *Int. J. Lab. Hematol*, 2012, Vol. 34, No 6, pp. 566-576. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2012.01434.x.
15. Lesesve J. F., Salignac S., Alla F., Defente M. *Am. J. Clin. Pathol*, 2004, Vol. 121, No 5, pp. 739-745. DOI: 10.1309/MY70-7798-9KWD-YP88.
16. Lesesve J. F., Speyer E., Perol J. P. *Int. J. Lab. Hematol*, 2015, Vol. 37, No 5, pp. 583-587. DOI: 10.1111/ijlh.12364.
17. Sové R.J., Drakos N.E., Fraser G.M., Ellis C.G. *J Biophotonics*, 2018, Vol. 11, No 11, pp. e201800103. DOI: 10.1002/jbio.201800103.
18. Helms C.C., Marvel M., Zhao W., Stahle M., Vest R., Kato G.J., Lee J.S., Christ G., Gladwin M.T., Hantgan R.R., Kim-Shapiro D.B. *J Thromb Haemost*, 2013, Vol. 11, No 12, pp.2148-2154. DOI: 10.1111/jth.12422.
19. Meintker L, Ringwald J., Rauh M., Krause S.W. *Am J Clin Pathol*, 2013, Vol. 139, No 5, pp. 641-650. DOI: 10.1309/AJCP7D8ECZRXXGCG.
20. Woo K.S., An G.D., Lim H.H., Han J.Y. *Int J Lab Hematol*, 2020, Vol. 42, No 5, pp. e218-e219. DOI: 10.1111/ijlh.13293.