

УДК 577.322.5

DOI 10.5281/ZENODO.20787712

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА КРАУДИНГА В ЦИТОПЛАЗМЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Дроганова А. В., Бычкова Е. А., Громова Н. В., Кузьмина А. А., Ревин В. В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», Саранск, Республика Мордовия, Россия
E-mail: bychkovazhenya21@yandex.ru*

В исследовании использовали кровь доноров, из которой выделяли суспензию эритроцитов методом центрифугирования. Структурные изменения анализировали методом лазерной интерференционной микроскопии. В ходе исследования полимеры были протестированы на способность вызывать гемолиз и агрегацию эритроцитов. Было обнаружено, что ПЭГ 8000 и декстран 40 кДа с концентрациями 200 и 300 мг/мл не выдержали испытания. Инкубация эритроцитов в среде с декстраном (100 мг/мл) приводит к снижению среднего объема клеток и их общего объема на 20,9 % и 7,2 % соответственно по сравнению с контролем, а также к возрастанию фазового диаметра. При использовании полиэтиленгликоля (ПЭГ) в концентрации 100 мг/мл отмечается рост фазовой высоты эритроцитов на 6 % при неизменном объеме и уменьшении фазового диаметра. Макромолекулярный краудинг отражает реальные условия внутрисосудистой среды крови. Использование ПЭГ и декстрана как модельных краудеров позволяет изучать структурные изменения эритроцитов, в том числе агрегацию и целостность мембран.

Ключевые слова: молекулярный краудинг, эритроцит, гемолиз, лазерный интерферометр.

ВВЕДЕНИЕ

Живые системы отличаются тем, что внутри клеток создается плотная среда из макромолекул и низкомолекулярных соединений. Их концентрация может достигать 50–400 мг/мл, что занимает до 40% объема клетки. Из-за этого доступное пространство внутри клетки уменьшается. Это явление, называемое «молекулярным краудингом», оказывает значительное влияние на биохимические реакции, изменяя реакционную способность и пространственное распределение молекул, участвующих в этих процессах [1–3].

Влияние высоких концентраций макромолекул является результатом стерических взаимодействий, интересующих нас биомолекул с краудинг-агентами, которые химически инертны по отношению к исследуемому белку или нуклеиновой кислоте. Они занимают значительную часть объема раствора, оставляя биомолекулам лишь ограниченное пространство, поэтому часто используется термин «эффект исключенного объема». Например, плазма крови содержит примерно 80 г/л белка; концентрация достаточно высокая, чтобы вызвать значительные эффекты краудинга [4, 5].

Для экспериментального моделирования условий макромолекулярного краудинга *in vitro* используются химически инертные, незаряженные полимеры различного происхождения и молекулярной массы. Эти агенты, известные как краудинг-агенты, воспроизводят ключевой физический параметр цитоплазмы – высокую суммарную концентрацию макромолекул (50–400 г/л), что приводит к эффекту исключенного объема и существенно влияет на термодинамику и кинетику биохимических процессов.

Декстраны – разветвленные полисахариды на основе глюкозы, получаемые синтезом с помощью *Leuconostoc mesenteroides*. Диапазон молекулярных масс (от 1 до 2000 кДа) позволяет исследовать влияние размера эксклудирующей частицы.

Полиэтиленгликоли (ПЭГ) – линейные гибкоцепные полимеры. Диапазон молекулярных масс: от 0,2 до 35 кДа.

Фиколлы – синтетические сополимеры сахарозы и эпихлоргидрина.

Характеристика – нейтральные, жесткие, сферические гидрофильные частицы. Идеальны для изучения чисто объемных эффектов краудинга на скорость ферментативных реакций, константы ассоциации и укладку белков.

Поливинилпирролидоны (ПВП) – синтетические полимеры с пирролидоновыми боковыми группами. Характеристика: высокая гидрофильность и биосовместимость. Основное применение: в качестве осмотически активных агентов и стабилизаторов белков в растворах. Реже используются в фундаментальных исследованиях краудинга по сравнению с фиколлом и декстраном из-за потенциальных слабых специфических взаимодействий.

Биологические макромолекулы (например, бычий сывороточный альбумин – БСА). Характеристика – заряженные, глобулярные белки, способные к специфическим и неспецифическим взаимодействиям [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использовали донорскую кровь, полученную с Мордовской республиканской станции переливания крови города Саранск. В качестве объекта исследования выступали эритроциты, выделенные из периферической крови человека. Все этапы работы были выполнены в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Мордовского государственного университета (протокол № 12 от 17.09.2014 г.) и проводилось в рамках стандартов Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice).

1. Экстракция эритроцитарной фракции из цельной крови

Для получения суспензии эритроцитов цельную кровь разводили физиологическим раствором в соотношении 1:1. Полученную смесь перемешивали и подвергали центрифугированию на центрифуге модели СМ-6М (ELMI, Латвия) при 1000 g в течение 10 минут. После удаления плазмы и лейкоцитарного слоя процедуру промывания и центрифугирования повторяли дважды в идентичных условиях. Очищенную суспензию эритроцитов хранили при температуре 4 °С и

использовали для последующих экспериментов в течение 6 часов с момента приготовления [7].

2. Приготовление маточных растворов краудинг-агентов

Для дальнейшей работы в эксперименте готовили маточные растворы таких краудинг-агентов, как полиэтиленгликоль 8 кДа и декстран 40 кДа с концентрацией 30 % (300 мг/мл). Для приготовления 3,32 мл 30 % маточного раствора в физиологическом растворе разводили навеску краудинг-агента массой 1 грамм в подготовленную ёмкость.

3. Схема проведения гемолиза

Для экспериментов с гемолизом готовили серии разведений ПЭГ 8 кДа и декстрана 40 кДа различной концентрации из исходных маточных растворов с концентрациями 100, 200 и 300 мг/мл. Выбор данных концентрационных режимов обоснован необходимостью моделирования физиологических условий: концентрация ~100 мг/мл соответствует содержанию биополимеров в плазме крови, а уровень ~300 мг/мл – характерной концентрации макромолекул в цитоплазме клеток [8].

В пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, содержащие 1 мл раствора краудинг-агента с известной концентрацией, добавляли 500 мкл суспензии эритроцитов. Затем смесь инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации пробы центрифугировали на приборе MiniSpin (Eppendorf, Германия) со скоростью 1600 оборотов в минуту в течение 10 минут. Полученные образцы фотографировали для оценки степени гемолиза. Для контроля в 1 мл физиологического раствора добавляли 500 мкл эритроцитарной массы. Количество повторов каждой тестируемой концентрации – 3.

4. Лазерная интерференционная микроскопия

Лазерная интерференционная микроскопия позволяет проводить комплексный анализ оптических и геометрических свойств микро- и наноразмерных объектов с высокой пространственной детализацией [9, 10].

Фазовое изображение объекта формируется путем наложения контрольного луча на луч, прошедший через объект. Полученное изображение затем нормируется, используя длину волны лазера и оптической разности хода. Показатели преломления эритроцитов обычно одинаковы на всей клетке, поэтому их фазовая высота (ОРХ) пропорциональна их геометрической высоте [11].

Распределение плотности ОРХ (объем), мкм³, эритроцита рассчитывают по формуле 1.

$$V = \frac{ОРХ_{mean}}{n_1 - n_0} \times S, \quad (1)$$

где ОРХ_{mean} – средняя фазовая высота эритроцита, нм;

n_0 – показатель преломления среды;

n_1 – показатель преломления гемоглобина;

S – площадь клетки, мкм².

Плотность распределения гемоглобина (пг) внутри клетки рассчитывали по формуле 2.

$$m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{n_1 - n_0} \times OPX_{mean} \times S, \quad (2)$$

где ρ_{Hb} – удельная плотность гемоглобина, г/см³;

n_1 – показатель преломления гемоглобина;

n_0 – показатель преломления среды;

OPX_{mean} – средняя фазовая высота эритроцита, нм;

S – площадь клетки, мкм².

Морфометрические параметры эритроцитов человека исследовались с использованием лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ) на базе модели МИИ-4М, созданной компанией «Лаборатории Амфора» в Москве, Россия. Количество измеренных клеток – не менее 100. Обработанные изображения анализировались с помощью программного обеспечения FIJI (ImageJ, США) [12]. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения MS Excel.

Для оценки статистической значимости результатов использовали t-критерий. Результаты считали достоверно различающимися при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние краудинг-агентов на гемолиз эритроцитов человека

Для изучения влияния краудинг-агентов на гемолиз эритроцитов человека были приготовлены серии разведений с концентрациями ПЭГ 8000 и декстран 40, равными 100, 200 и 300 мг/мл. Далее в растворы полимеров в соотношении 1:3 была добавлена эритроцитарная масса, после чего пробы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре, центрифугировали и фотографировали для оценки гемолиза (рис. 1).

Появление красного цвета в надосадочном слое обусловлено выходом гемоглобина из разрушенных эритроцитов. Анализируя состояние надосадочной жидкости, можно заключить, что целостность эритроцитов сохранялась после инкубации суспензии человеческого происхождения в растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ) и декстрана в концентрации 100 мг/мл. Тем не менее, инкубация стабилизированных эритроцитов в растворах декстрана с концентрациями 200 и 300 мг/мл сопровождалось деградацией клеточных мембран, следствием которой стало освобождение гемоглобина и приобретение жидкостью красноватого оттенка.

На изображении можно увидеть на стенках проб с растворами ПЭГ скопления эритроцитов, данное наблюдение может говорить об агрегации эритроцитов и их дальнейшем склеивании при инкубации в растворах ПЭГ 200 и 300 мг/мл, что, вероятно, связано с влиянием осмотических эффектов и деплеционного эффекта (depletion attraction).

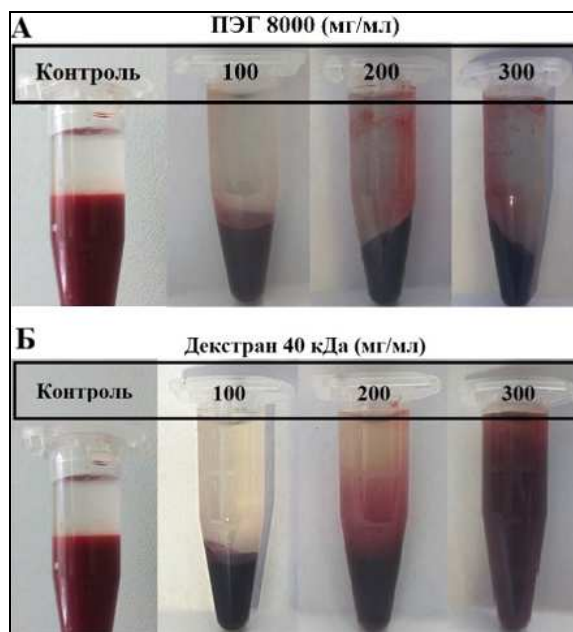


Рис. 1. Фотографическое изображение эритроцитов и супернатантов в отсутствие и присутствии ПЭГ 8000 (А) и декстрана 40 кДа (Б).

Полимеры были протестированы на их способность вызывать гемолиз и агрегацию эритроцитов. Результаты показали, что ПЭГ 8000 и декстран 40 кДа в концентрациях 200 и 300 мг/мл не прошли этот тест. Для дальнейших исследований методом ЛИМ были взяты пробы с ПЭГ в концентрациях 100, 200 и 300 мг/мл, а также проба с декстраном в концентрации 100 мг/мл.

2. Исследование морфометрических характеристик эритроцитов человека методом лазерной интерференционной микроскопии

Интерференционные изображения обрабатывались посредством специализированного программного обеспечения FJI. Последующая статистическая обработка и анализ полученных данных выполнялись с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2013. В рамках проведенного эксперимента методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) были получены соответствующие интерференционные изображения, прошедшие последующую обработку и интерпретацию в указанной программе.

На рисунке 2 представлены интерференционные изображения, обработанные в программе FJI, контрольного образца и пробы, инкубированной с декстраном молекулярной массой 40 кДа в концентрации 100 мг/мл.

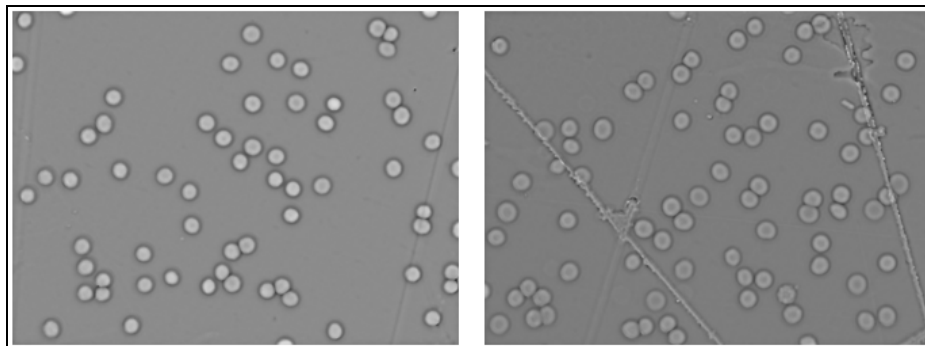


Рис. 2. Интерференционные изображения контрольного образца (слева) и пробы, инкубированной с декстраном (справа).

На рисунке 3 представлены интерференционные изображения проб, инкубированных с ПЭГ 8 кДа в концентрации 100, 200 и 300 мг/мл.

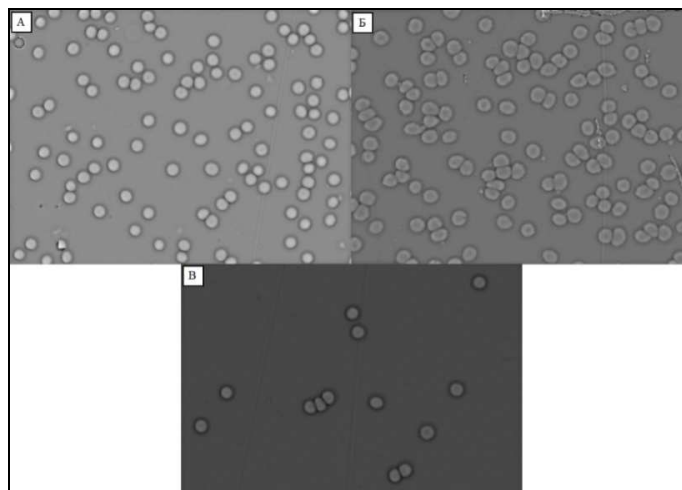


Рис. 3. Интерференционные изображения проб, инкубированных в ПЭГ в концентрации 100 мг/мл (А), 200 мг/мл (Б) и 300 мг/мл (В).

На изображении (В) видно небольшое количество эритроцитов, что связано с их повышенной агрегацией при инкубации в растворе ПЭГ с концентрацией 300 мг/мл. На изображении (Б) также наблюдается агрегация клеток при инкубации в растворе ПЭГ с концентрацией 200 мг/мл.

Лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) даёт возможность создавать трёхмерные модели эритроцитов, позволяя детально исследовать их внутреннее содержимое и поперечное сечение. На рисунке 4 представлены 3D-модели и поперечные профили эритроцитов из контрольной группы, а также эритроцитов, обработанных раствором декстрана с молекулярной массой 40 кДа в концентрации 100 мг/мл.

Анализ 3D-моделей продемонстрировал, что интактные эритроциты и образцы, обработанные раствором декстрана с молекулярной массой 40 кДа и концентрацией 100 мг/мл, сохраняли круглую форму. Внутри клеток структуры распределялись равномерно, а мембрана имела гладкую поверхность. Профиль клеток соответствовал дискоцитам, с двумя плечами и одним пеллором.

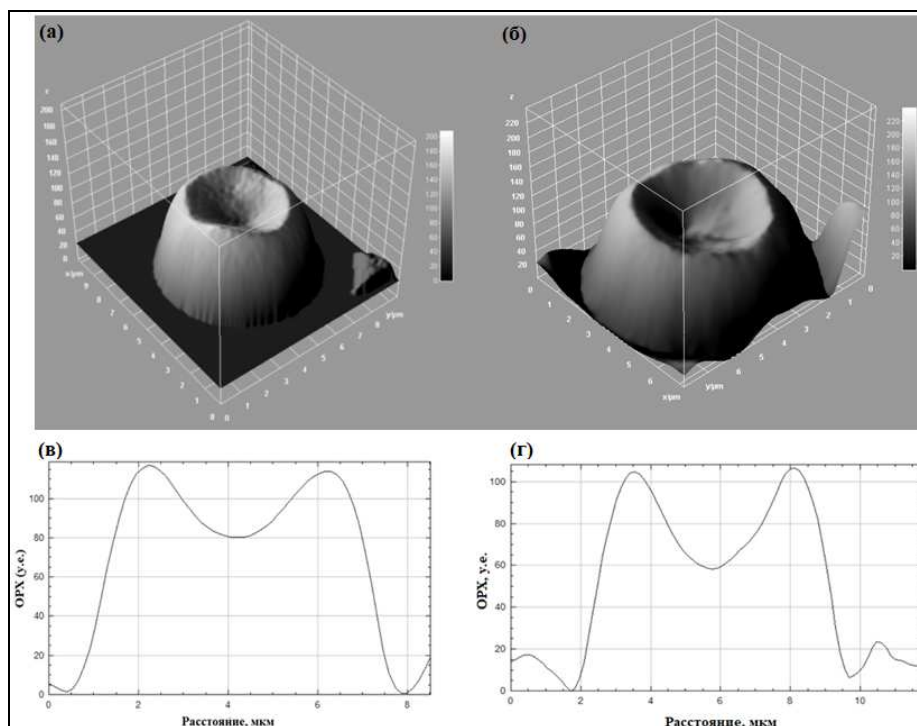


Рис. 4. 3D модель и профиль эритроцитов: а, в – 3D модель и профиль эритроцита контрольного образца; б, г – 3D модель и профиль эритроцита при инкубации с декстраном.

На рисунке 5 изображены 3D-модель и профиль эритроцитов, инкубированных с ПЭГ молекулярной массой 8 кДа в концентрациях 100 и 200 мг/мл.

На основе трёхмерных моделей установлены характерные морфологические изменения эритроцитов под действием ПЭГ. В среде с полимером (100 мг/мл) наблюдалась тенденция к сферизации клеток с одновременным сглаживанием пеллоры. При более высокой концентрации (200 мг/мл) морфологическая картина кардинально менялась, доминирующими признаками становились деформация поверхности и появление выступающих структур, придававших клеткам неправильную, шероховатую форму.

Далее были изучены оптико-геометрические показатели эритроцитов при действии разных агентов *in vitro*: ОРХ, площадь клетки (S), объем клетки (V),

плотность распределения гемоглобина (m_{Hb}). Полученные данные представлены в таблице 1.

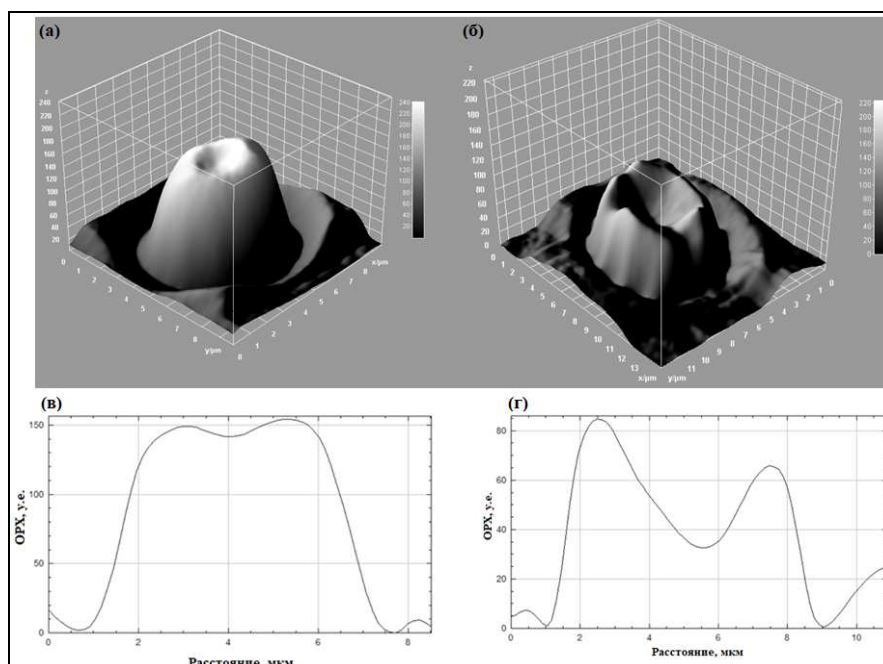


Рис. 5. 3D модель и профиль эритроцитов при инкубации с ПЭГ 100 мг/мл (а, в) и 200 мг/мл (б, г).

Таблица 1

Морфология и ОРХ эритроцитов человека

Показатель	Фазовый диаметр, мкм	ОРХ _{ср} , нм	S _{ср} , мкм ²	V _{ср} , мкм ³	m_{Hb} , пг
Интактные	7,51±0,07	96±1,42	32,28±0,64	41,33±1,06	15,35±0,4
Декстран, 100 мг/мл	7,77±0,08	75,98±1,12	37,91±0,77	38,34±0,8	14,23±0,3
ПЭГ, 100 мг/мл	7,39±0,07	102,39±1,35	30,46±0,74	41,63±1,22	15,46±0,45

Анализ воздействия полимеров выявил разнонаправленное влияние на морфометрические параметры эритроцитов. Инкубация в растворе декстрана (100 мг/мл) вызывала статистически значимое снижение средней фазовой высоты (ОРХ_{ср}) на 20,9 % и уменьшение клеточного объема (V) на 7,2 % относительно

контрольной группы. В отличие от этого, обработка ПЭГ в той же концентрации (100 мг/мл) приводила к увеличению фазовой высоты на 6 % при сохранении исходного объема клеток ($p \leq 0,05$).

В присутствии декстрана фазовый диаметр возрастал на 3 %, тогда как под действием ПЭГ наблюдалось его незначительное уменьшение на 1,2 % по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Данные результаты, вероятно, свидетельствуют о перераспределении Гб в цитоплазме и десорбции мембраносвязанного Гб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование гемолитической и агглютинационной активности полимеров показало, что при концентрации 100 мг/мл ни ПЭГ, ни декстран не вызывали гемолиза эритроцитов человека. Однако при повышении концентрации полимеров проявлялись различные эффекты – повышенные концентрации декстрана индуцировали гемолиз, а высокие концентрации ПЭГ приводили к агрегации эритроцитов.

Нами были изучены оптико-геометрические показатели эритроцитов при действии разных краудинг-агентов *in vitro*. Наблюдается понижение величины оптической разности хода и объема клеток эритроцитов относительно контроля при инкубации в декстране с концентрацией 100 мг/мл. В условиях инкубации с ПЭГ в концентрации 100 мг/мл было зафиксировано увеличение фазовой высоты эритроцитов, в то время как их объем оставался на уровне контрольных значений. Что касается фазового диаметра, то под воздействием декстрана данный показатель возрастал относительно контроля, тогда как в присутствии ПЭГ отмечалось его снижение.

Результаты исследования показали, что целостность эритроцитов не была нарушена после инкубации суспензии эритроцитов человека в растворах ПЭГ и декстрана в концентрации 100 мг/мл. Инкубация СЭ в растворах декстрана 200 и 300 мг/мл привела к высвобождению гемоглобина и окраске супернатанта в красный цвет.

Полученные данные подчеркивают важность изучения молекулярного краудинга, который отражает реальные условия внутрисосудистой среды крови. Использование ПЭГ и декстрана как модельных краудеров позволяет изучать структурные изменения эритроцитов, в том числе агрегацию и целостность мембран. Полученные результаты могут быть использованы при разработке инфузионных растворов, кровезаменителей и биомедицинских моделей, а также для более точной оценки влияния макромолекулярной среды на клетки крови в клинической практике. Статья может быть полезна специалистам, занимающимся вопросами гематологии, биохимии, биофизики и клинической медицины.

Список литературы

1. Чеботарева Н. А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза / Н. А. Чеботарева // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 233–258.
2. Rivas G. Macromolecular crowding in vitro, in vivo, and in between / G. Rivas, A. P. Minton // Trends in Biochemical Sciences. – 2016. – Vol. 41, No 11. – P. 970–981.
3. Zimmerman S. B. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli* / S. B. Zimmerman, S. O. Trach // Journal of Molecular Biology. – 1991. – Vol. 222, No 3. – P. 599–620.

4. Ellis R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated / R. J. Ellis // Trends in Biochemical Sciences. – 2001. – Vol. 26, No 10. – P. 597–604.
5. Ferreira L. A. Role of solvent properties of aqueous media in macromolecular crowding effects / L. A. Ferreira, P. P. Madeira, L. Breydo [et al.] // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2016. – Vol. 34, No 1. – P. 92–103.
6. Miklos A. C. Protein crowding tunes protein stability / A. C. Miklos, M. Sarkar, Y. Wang [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – Vol. 133, No 18. – P. 7116–7120.
7. Мороз В. В. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови / В. В. Мороз, А. М. Голубев, А. М. Черныш // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 5–12.
8. Chapanian R. Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding / R. Chapanian, D. H. Kwan, I. Constantinescu [et al.] // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–12.
9. Белоглазова Ю. А. Бесклеточный одиночный анализ жизнеспособности с использованием лазерной интерференционной микроскопии / Ю. А. Белоглазова, А. С. Никитюк, А. С. Воронина // Biology Basel. – 2021. – Т. 10, № 7. – С. 1–16.
10. Игнатьев П. С. Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий / П. С. Игнатьев, К. В. Индукаев, П. А. Осипов // Biology Basel. – 2013. – Т. 47, № 1. – С. 32–35.
11. Слатинская О. В. Исследование конформации и распределения гемоглобина при функционировании эритроцита : специальность 1.5.2 «Биофизика» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Слатинская Ольга Владимировна ; Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова. Москва, 2023. – 253 с.
12. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9, No 7. – P. 676–682.

METHODS FOR STUDYING MACROMOLECULAR CROWDING IN THE CYTOPLASM OF RED BLOOD CELLS

Droganova A. V., Bychkova E. A., Gromova N. V., Kuzmina A. A., Revin V. V.

***Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Ogarev Mordovia State University», Saransk, Russia
E-mail: bychkovazhenya21@yandex.ru***

Introduction – the relevance of the study is due to the fact that macromolecular crowding reflects the actual conditions of the intravascular blood environment. Using PEG and dextran as model crowders allows for the study of structural changes in red blood cells, including aggregation and membrane integrity. The aim of the study is a comprehensive investigation of the impact of macromolecular crowding on the condition of human red blood cells.

Materials and methods. A suspension of human RBCs was isolated from donor blood via standardized centrifugation and washing. Structural and morphological changes in individual RBCs were quantitatively analyzed using Laser Interference Microscopy (LIM). This label-free, high-resolution technique allows for the precise, real-time measurement of key cellular parameters, including optical path difference (OPDmean, correlating with intracellular dry mass density), cell volume, phase diameter, and phase height. RBCs were incubated in isotonic solutions containing varying concentrations (0–300 mg/mL) of the crowding agents.

Results. In the course of the study, the polymers were tested for their ability to induce hemolysis and erythrocyte aggregation, and it was found that PEG 8000 and 40 kDa dextran at concentrations of 200 and 300 mg/mL in samples failed this test. When incubating RBCs in dextran (100 mg/mL), a decrease in OPDmean and cell volume by 20.9 % and 7.2 % relative to the control, as well as an increase in phase diameter, was observed. In the presence of PEG (100 mg/mL), an increase in the phase height of RBCs by 6 % was observed with unchanged volume and a decrease in phase diameter.

Discussion and conclusion. This study demonstrates that macromolecular crowding, simulated by inert polymers, exerts a profound and chemically specific influence on RBC morphology beyond simple osmotic effects. The divergent effects of dextran (inducing dehydration and flattening) and PEG (promoting shape change without volume loss) underscore the critical role of the crowding agent's physicochemical properties. These findings have direct translational implications for the rational design of infusion solutions and blood substitutes, the development of accurate in vitro biomimetic models of blood, and the refined interpretation of RBC morphology in clinical pathologies associated with altered plasma composition. The work provides essential quantitative data for specialists in hematology, biochemistry, biophysics, and clinical medicine, establishing a foundation for further research into the role of molecular crowding in RBC pathophysiology and storage biology.

Keywords: molecular crowding, erythrocyte, hemolysis, laser interferometer.

References

1. Chebotareva N. A. The effect of molecular crowding on glycogenolysis enzymes, *Advances in Biological Chemistry*, **47**, 233 (2007).
2. Rivas G., Minton A. P. Macromolecular crowding in vitro, in vivo, and in between, *Trends in Biochemical Science*, **41**, 11, 970 (2016).
3. Zimmerman S. B., Trach S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology*, **222**, 3, 599 (1991).
4. Ellis R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 10, 597 (2001).
5. Ferreira L. A. Madeira P. P., Breydo L. [et al.] Role of solvent properties of aqueous media in macromolecular crowding effects, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **34**, 1, 92 (2016).
6. Miklos A. C., Sarkar M., Wang Y. [et al.] Protein crowding tunes protein stability, *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 18, 7116 (2011).
7. Moroz V. V., Golubev A. M., Chernysh A. M. Changes in the surface structure of erythrocyte membranes during long-term storage of donor blood, *General Reanimatology*, **8**, 3, 5 (2012).
8. Chapanian R., Kwan D. H., Constantinescu I. [et al.] Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding, *Nature Communications*, **5**, 1 (2014).
9. Beloglazova Yu. A., Nikityuk A. S., Voronina A. S. Cell-free single-cell viability analysis using laser interference microscopy, *Biology Basel*, **10**, 7, 1 (2021).
10. Ignatiev P. S., Indukaev K. V., Osipov P. A. Laser interference microscopy for nanobiotechnology, *Biology Basel*, **47**, 1, 32 (2013).
11. Slatinskaya O. V. *Investigation of hemoglobin conformation and distribution during erythrocyte functioning: Speciality 1.5.2 «Biophysics»* : Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, 253 (Lomonosov Moscow State University. Moscow, 2023). – 253 p.
12. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. [et al.] Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods*, **9**, 7, 676 (2012).