

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.01

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

© *И. С. Сесорова*,^{1,*} *Г. В. Безнушенко*,² *Т. Е. Казакова*,¹ *В. В. Сесоров*,¹
И. Д. Димов,³ *А. А. Миронов*²

¹ *Кафедра анатомии Ивановской государственной медицинской академии, Иваново, 153000,*

² *Институт молекулярной онкологии, Милан, Италия, и*

³ *Кафедра анатомии С.-Петербургского государственного педиатрического
медицинского университета, Санкт-Петербург, 127994;*

* *электронный адрес: Irina-S3@yandex.ru*

В обзоре приведен анализ новых методических разработок и технических усовершенствований, появившихся за последние годы в световой микроскопии и направленных на увеличение оптического разрешения и качества светооптического изображения. Рассмотрены возможности и недостатки методов: «световой пластинки», лазерной сканирующей конфокальной и 2-фотонной микроскопии, 4Pi и FRET, TIRF, STED, STROM, PALM и GSD-микроскопии. Проанализированы достижения и проблемы новых методов световой микроскопии. Приведенные методы позволили значительно расширить исследовательские возможности, способствовали улучшению качества изображений, однако они так и не смогли обойти дифракционный предел, открытый Э. К. Аббе.

Ключевые слова: световая микроскопия, методы.

Принятые сокращения: СМ — световая микроскопия, СРСМ — сверхразрешающая световая микроскопия, ЭМ — электронная микроскопия, LSCM — лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Присуждение Нобелевской премии 2014 г. в области химии за разработку методов так называемой сверхразрешающей световой микроскопии (СРСМ) подвело своеобразный итог стремительному рывку, который совершила за последние 30 лет световая микроскопия (СМ). Был опубликован ряд обзорных статей, посвященных возможностям сканирующей лазерной конфокальной микроскопии, на русском языке (Ченцов, 1994; Лежнев и др., 2001; Азнабаев и др., 2006; Кларк, Эберхардт, 2007; Феофанов, 2007; Лукашева и др., 2008; Коржевский и др., 2009; Ковалев, 2010; Незлин, 2010; Митрошина, 2012; Федоров, 2013) и много блестящих книг и статей на английском языке (Diaspro, 2001; Fornasiero, Orazio, 2015; Sheppard, 2017). При этом появилась своеобразная эйфория, связанная с ожиданиями того, что СРСМ вытеснит электронную микроскопию (ЭМ). Однако оригинальных статей с новыми, неизвестными ранее результатами, полученными с использованием СРСМ, опубликовано сравнительно немного. В связи с этим мы попытаемся критически оценить возможности методов СРСМ. При этом мы остановимся преимущественно на оригинальных работах, давших начало новым методам, и статьях, в которых эти методы используются или усовершенствуются. Особое внимание также будет уделено проблемам реально достижимого в исследованиях оптического разрешения.

Для того чтобы понять, как новые методические подходы влияют на разрешение, получаемые результаты и

можно ли доверять этим результатам, необходимо знать, какие принципы положены в основу метода. В настоящем обзоре мы кратко остановимся преимущественно на новых методах СМ, которые позволяют непосредственно увеличить оптическое разрешение, не углубляясь при этом в подробное описание физических основ того или иного метода.

Современные разработки, направленные на увеличение оптического разрешения световых микроскопов

Одним из таких методов является метод «световой пластинки» (Light Sheet Fluorescence Microscopy; LSFМ). Он был разработан для исследования толстых образцов и получения оптических срезов на глубине более 100 мкм (Heintzmann, Cremer, 1999; Pampaloni et al., 2015). Метод получил свое название из-за формы светового луча, который трансформируется специальными линзами в очень узкий параллелограмм, или «световую пластинку». Обычно объект освещается «световой пластинкой» через объектив, расположенный сбоку перпендикулярно оси объектива, используемого для наблюдения (рис. 1, а). Метод снижает фототоксичность и фотовыцветание образца почти в 10 000 раз по сравнению с конфокальными микроскопами. Если освещать образец «световой пластинкой», то теоретическое разрешение по оси Z будет

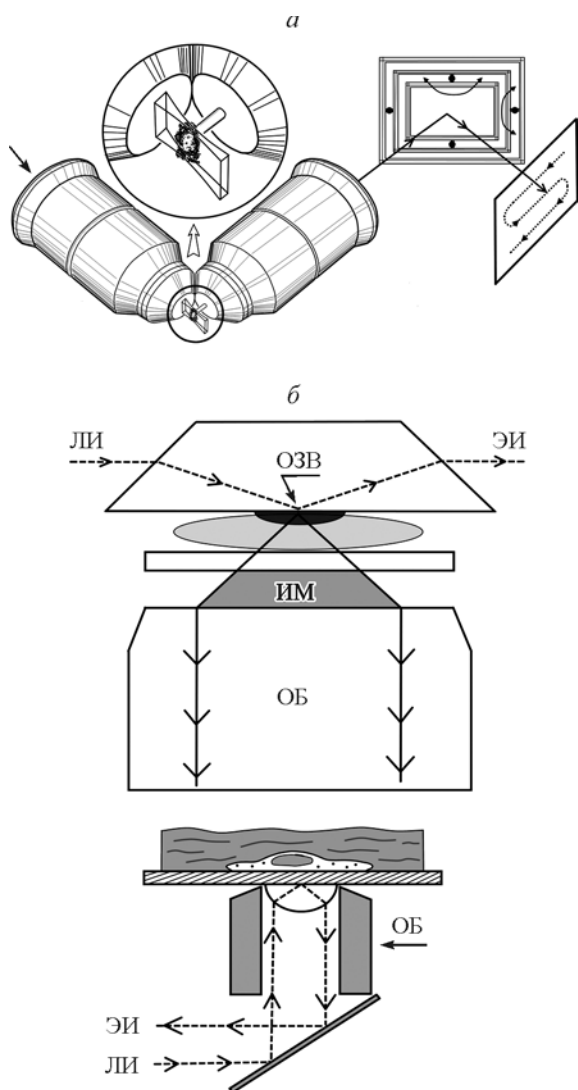


Рис. 1. Метод световой пластинки и TIRF-микроскопия.

a — схема конструкции микроскопа, работающего по методу «сверхтонкой световой пластинки»: левый объектив формирует световую пластинку, а правый служит для визуализации образца (образец под большим увеличением показан выше); *стрелка* — место входа световых лучей в осветительный объектив. *б* — принцип TIRF-микроскопии: лазерное излучение (ЛИ), эванесцентное излучение (ЭИ), ИМ — иммерсия, ОБ — объектив, ОЗВ — область затухающей волны.

равно толщине светового пучка (Chen et al., 2014; Strobl et al., 2017). Другим подходом для увеличения разрешения по оси является изучение криосрезов толщиной 90 нм под световым микроскопом (Dunlop et al., 2017).

Еще одной прогрессивной разработкой стал метод флуоресцентной микроскопии на основе затухающей электромагнитной волны (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy; TIRF-микроскопия). В флуоресцентном микроскопе используется затухающая электромагнитная волна, которая генерируется при полном отражении света от границы сред (например, стекла и воды). При этом часть энергии излучения распространяется в твердой фазе в виде быстро затухающей (эванесцентной) электромагнитной волны (рис. 1, *б*), которая способна возбуждать флуорофоры (Fornasiero, Orazio, 2015). Данный подход может применяться в микроскопах самых разных оптических конфигураций, оснащенных как трут-

ной лампой, так и лазерами. Именно в случае TIRF-микроскопии при использовании иммерсионных объективов было достигнуто максимальное значение числовой апертуры (1.65).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (Laser Scanning Confocal Microscopy; LSCM) является конечным этапом технических разработок в области сканирующей световой конфокальной микроскопии. В LSCM источник создает узкий пучок света, освещающий только одну точку в поле зрения (рис. 2, *а*). При этом луч движется по образцу, осуществляя растровое сканирование с помощью системы зеркал. Число фотонов, проходящих через периферические зоны поля зрения, меньше, поэтому качество изображения в центре образца значительно выше. Фокусирование луча лампы или лазера происходит с помощью диафрагмы, которая отсекает большую часть фотонов, испускаемых флуорофорами выше или ниже оптической фокальной плоскости (рис. 2, *б*). Тем не менее часть фотонов из этих плоскостей все же попадает на детектор, создавая «фон» и увеличивая размер точки образца по оси *Z*. Получить изображение с высоким разрешением и довольно низким уровнем «фона» можно, если, последовательно поднимая (опуская) объектив, получить серийные оптические срезы или «*Z*-стопку», на основе которых можно также построить 3D-модель объекта (рис. 2, *в*). При этом в каждый момент времени будет регистрироваться то количество фотонов, которое испускается из одной точки образца. Далее регистратор каждому пикселю (физическому элементу матрицы регистрирующих камер (дисплеев), формирующих изображение) присваивает число, пропорциональное числу зарегистрированных фотонов. Полное изображение строится компьютером путем присваивания каждому пикселю величины яркости, пропорциональной числу фотонов, полученных от каждой точки фокальной плоскости.

Снизить «фон» и увеличить качество изображения можно также уменьшая размер отверстия диафрагмы. Однако при этом количество фотонов, попадающих на образец, резко уменьшается, и возникает необходимость в увеличении яркости и длительности облучения образца, что повышает опасность выцветания флуорофора. Считается, что разрешение LSCM приблизительно в 1.4 раза выше, чем у «классического» светового микроскопа. Модификация LSCM на основе диска Нипкова позволяет увеличить скорость получения изображения (рис. 2, *в*) и представляет собой вращающийся диск с рядами узких отверстий, покрывающих его поле.

Для увеличения разрешения по оси *Z* в конфокальной лазерной сканирующей микроскопии используются так называемые 4Pi-микроскопы (Cremer et al., 1978; Hell et al., 1994). В них для возбуждения молекулы флуорофора, расположенной в одной точке пространства, и (или) регистрации флуоресценции используются два объектива (направленных один на другой), которые позволяют освещать и регистрировать флуоресценцию с двух сторон от образца (рис. 3, *а*). При этом изображение точки в зоне фокуса вместо формы овоида приобретает форму центральной крупной точки и двух более мелких — выше и ниже фокуса (рис. 3, *б*). Затем по определенному математическому алгоритму происходит деконволюция изображения (восстановление истинной формы сигнала), при этом верхняя и нижняя точки отсекаются. Однако из-за того, что фиксированная или живая клетка резко гетерогенна по своим физико-химическим параметрам, «отсечение» фона остается во многом субъективной операцией.

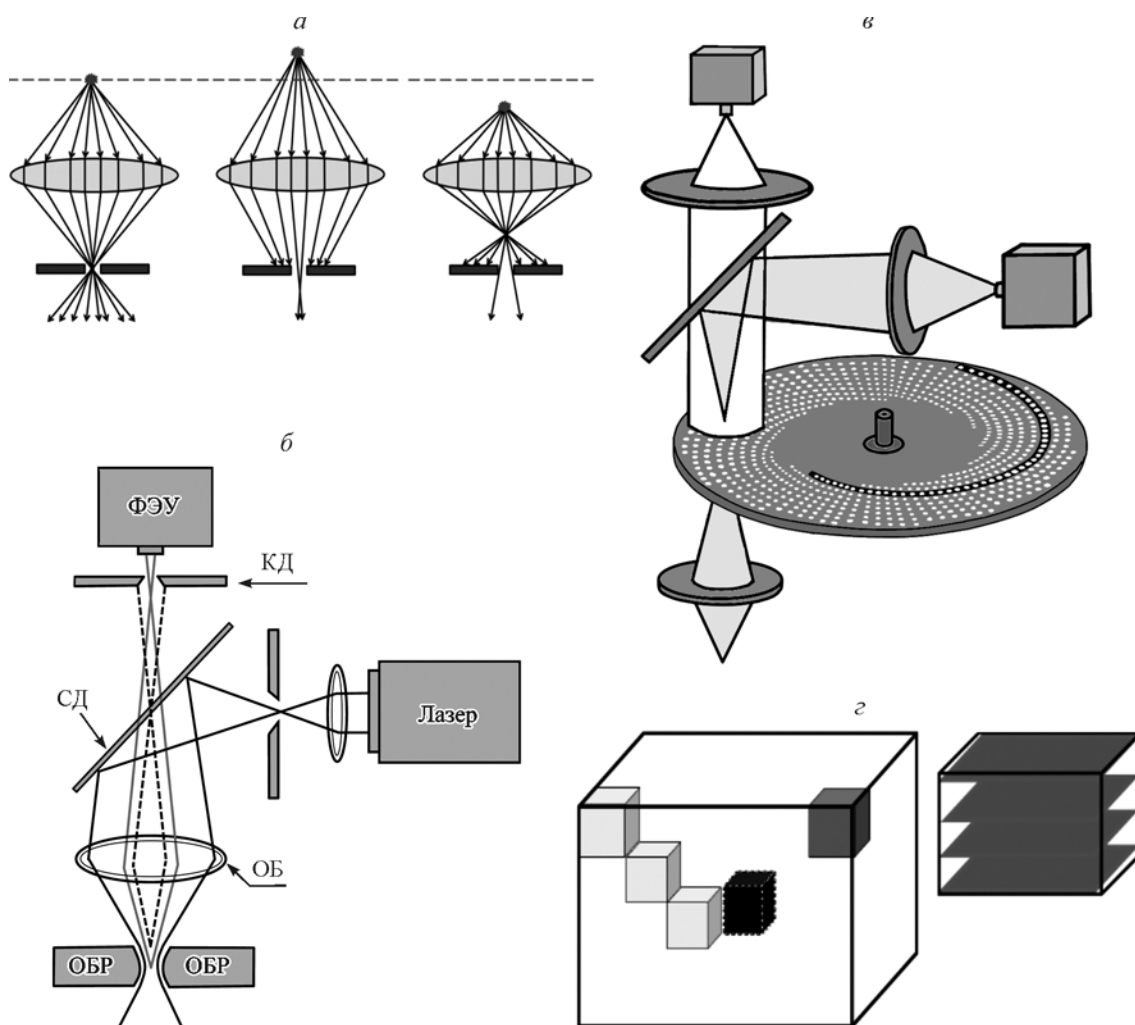


Рис. 2. Метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ).

а — принцип действия конфокальной диафрагмы, за счет узкого отверстия которой в максимальной степени детектором регистрируются фотоны из точки, находящейся в фокусе, остальные задерживаются. *б* — схема ЛСКМ: СД — дихроичное зеркало (светоделитель), ОБ — объектив, ОБР — образец, ФЭУ — детектор, КД — конфокальная диафрагма. *в* — схема ЛСКМ с диском Нипкова. *г* — схема формирования трехмерного изображения на основе серийных оптических срезов (высчитывается яркость каждого вокселя и строится цифровые оптические срезы).

Коммерческий опыт реализации 4Pi-микроскопов показал, что их преимущества (рис. 3, *в, г*) нивелируются возросшим неудобством в работе (например, достаточно трудно найти объект и правильно его расположить между двумя объективами) и стоимостью.

Эффект выцветания флуорофора при использовании LSCM нашел практическое применение в научных исследованиях, например при изучении диффузии белков после индуцированного выцветания флуорофора (рис. 4, *в*); транспорта белков или липидов, меченных флуорофором (рис. 4, *д*); клеточных структур, в том числе их структурных и функциональных связей (рис. 4, *а, б, г, д, е*).

Снизить фототоксичность и увеличить проникающую способность удалось при разработке 2-фотонного микроскопа (Two-Photon Microscopy; TPM). Идея TPM-микроскопии основана на том, что хотя вероятность одновременного попадания двух фотонов на одну молекулу флуорофора при низкой интенсивности излучения мала, но она резко увеличивается при фокусировке очень мощного и довольно кратковременного импульса света. Одновременное попадание двух фотонов обычно с длиной волны, соответствующей красному свету, вызывает

возбуждение флуорофора, который потом испускает один фотон, длина волны которого соответствует зеленому свету (Denk et al., 1990). В теории разрешение 2-фотонного микроскопа меньше, чем LSCM, так как в нем обычно используются флуорофоры, которые возбуждаются красным светом и, следовательно, испускают свет с большей длиной волны, чем в LSCM (где могут использоваться голубой и ультрафиолетовый свет, а регистрируется синий свет).

В последнее время интенсивно разрабатываются микроскопические системы (Betzig, Trautman, 1992; Klar et al., 2000; Hess et al., 2006; Sydor et al., 2015), которые при помощи различных технических приемов позволяют если не преодолеть, то обойти дифракционный барьер Аббе (Abbe, 1873). Остановимся, на наш взгляд, на наиболее значимых из них.

STED-микроскопия (Stimulated Emission Depletion Microscopy; STED) или микроскопия на основе подавления спонтанного испускания фотонов использует феномен обратимого подавления флуоресценции с помощью облучения флуорофора светом с большей длиной волны, чем свет, вызывающий флуоресценцию (Klar et al., 2000).

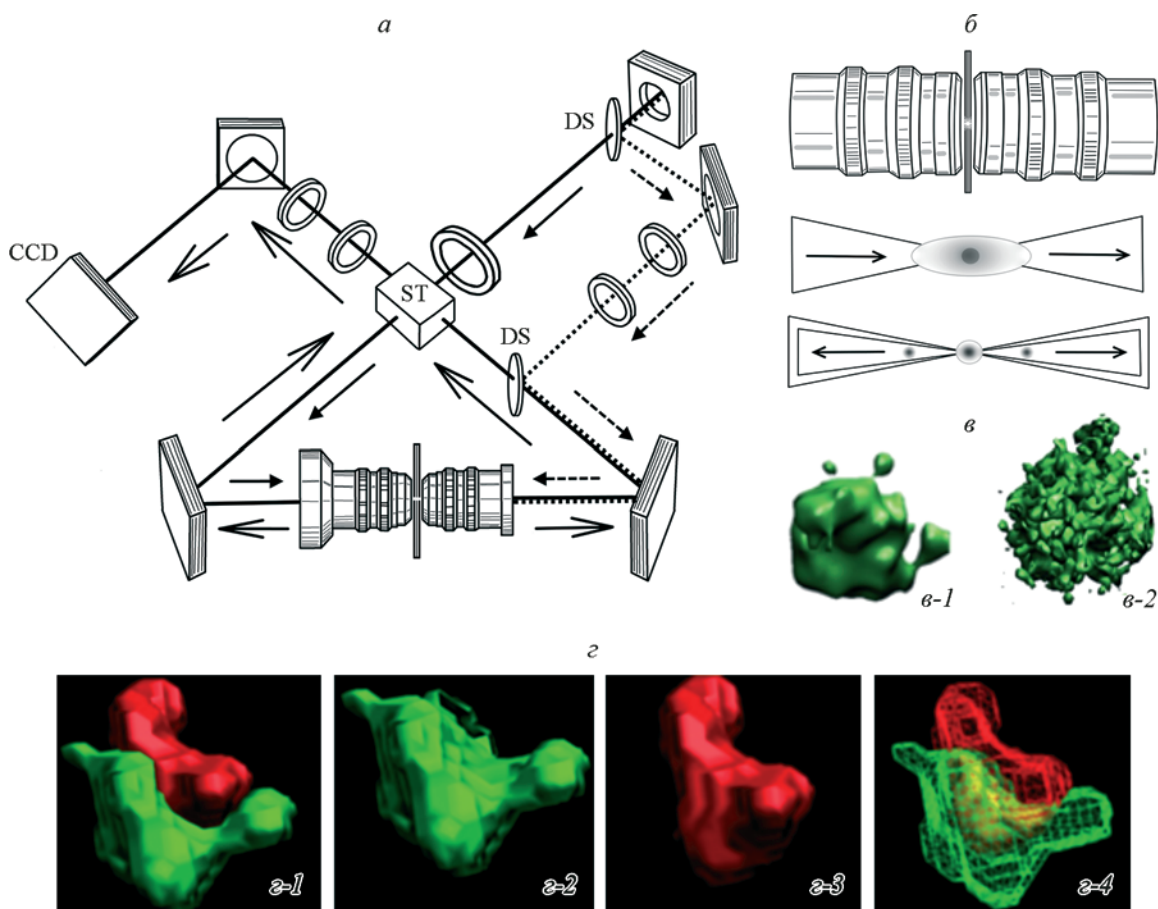


Рис. 3. Метод 4Pi-микроскопии.

a — схема микроскопа, где показан ход двух пучков света, которые получаются из единого пучка путем расщепления на дихроическом зеркале (DS), CCD — камера, ST — ветодельитель. *б* — формирование основной сферы света в фокусе и двух добавочных вне фокуса (отсекаются при последующей деконволюции) из сигнала овоидной формы. *в* — трехмерная реконструкция фрагмента комплекса Гольджи, полученная с помощью конфокальной лазерной сканирующей электронной микроскопии (*в-1*) и метода 4Pi (*в-2*). *z-1—z-4* — количественный анализ колокализации двух белков с помощью метода 4Pi; *зеленый сигнал* — белок галактозилтрансфераза (содержит в структуре зеленый флуоресцентный белок), *красный сигнал* — проколлаген-1 (в молекулу шит красный флуоресцентный белок), *желтый цвет* — зона колокализации. Изображения *в* и *z* любезно предоставлены д-ром Д. Перинетти.

При реализации метода образец сначала облучается импульсом света лазера с такой длиной волны, которая способна возбудить флуорофор, затем немедленно точка облучается светом с длиной волны, сдвинутой в сторону красного спектра. При этом луч имеет форму круга с очень узким пустым центром (дыркой) (рис. 5, *a*). Попадание второго кругового (с отверстием в центре) пучка света на зону с возбужденным флуорофором ведет к тому, что последний теряет возбуждение и не испускает фотоны. При встрече флуорофора, находящегося в возбужденном состоянии, с фотоном, энергия которого соответствует разнице энергий между возбужденным и основным состояниями флуорофора, флуорофор возвращается в невозбужденное состояние до того, как произойдет спонтанная флуоресценция. Таким образом, объем образца, из которого исходит флуоресценция, уменьшается за счет перевода части молекул по краям пятна засветки в состояние, при котором они не способны излучать свет на рабочей длине волны сфокусированного лазерного излучения. Исключение составляет только центральная точка, которая не была засвечена вторым лучом. Из нее и испускаются фотоны, регистрируемые детектором в виде фотоэлектронного умножителя или цифровой камеры. Таким образом, STED-микроскопия позволяет достичь вы-

сокого разрешения в центральной области фокусного пятна (рис. 5, *б-1*, *б-3*). STED-микроскопы продолжают совершенствоваться. Был добавлен второй источник облучения, что позволило улучшить качество изображения (Gao, Nienhaus, 2017).

В ряду разработок CPCM, позволяющих обойти дифракционный барьер, — методы статистического определения локализации точечного источника света. Так, например, при достаточно низкой концентрации «примесных» молекул в каждый момент времени, внутри каждого дифракционно ограниченного объема образца люминесцирует только одна молекула. Это позволяет зарегистрировать ее изображение и координаты. Регистрация нескольких последовательных вспышек дает возможность вычислить место, где вспышки появляются с наибольшей частотой. Для этого высчитывается среднестатистический центр тяжести поля точек, этот центр описывается как сама точка, которая запоминается компьютером. Эта точка и принимается за место расположения флуорофора (рис. 5, *в*). Такая точка объекта обычно определяется после получения 1000 изображений, а принципы статистической обработки точечных источников света, примененные в STED-микроскопии, позволили повесить разрешение (Klar et al., 2000).

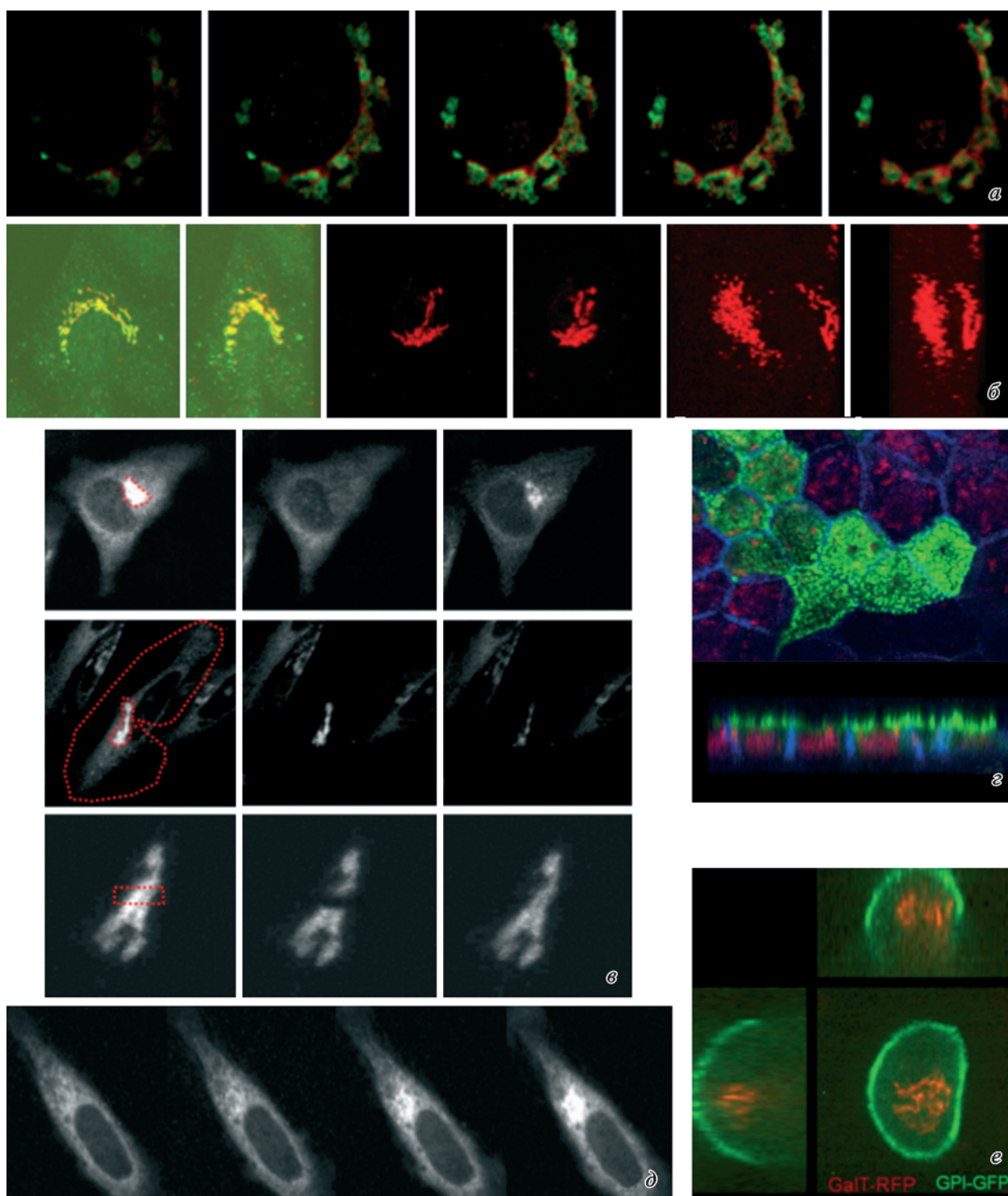


Рис. 4. Использование методов световой микроскопии для изучения механизмов работы комплекса Гольджи.

a — стопка оптических срезов через комплекс Гольджи: цискомпаратмент помечен антителами против джиантина (зеленый сигнал), транскомпаратмент — антителами против белка TGN 38 (красный сигнал), метод ЛСКМ. *б* — трехмерная реконструкция пластинчатого комплекса Гольджи, выполненная на основе стопки оптических срезов; показаны пары изображений, где комплекс Гольджи виден под разными углами. *в* — динамика восстановления флуоресценции после «фотовыцветания»: клетки HeLa, трансфицированные химерным альбумином, конъюгированным с зеленым флуоресцентным белком, метод ЛСКМ. *г* — выявление Е-кадгерина (голубой цвет), P75-GFP (зеленый цвет) и LAMP2 (красный цвет) в клетках МДСК с помощью метода ЛСКМ. *д* — динамика транспорта меченого альбумина через комплекс Гольджи после снятия транспортного блока на выходе из эндоплазматического ретикулума, метод ЛСКМ. *е* — проекции клетки HeLa, синтезирующей два разных химерных белка — галактозилтрансферазу (красный сигнал) и GPI-белок (зеленый сигнал), метод ЛСКМ.

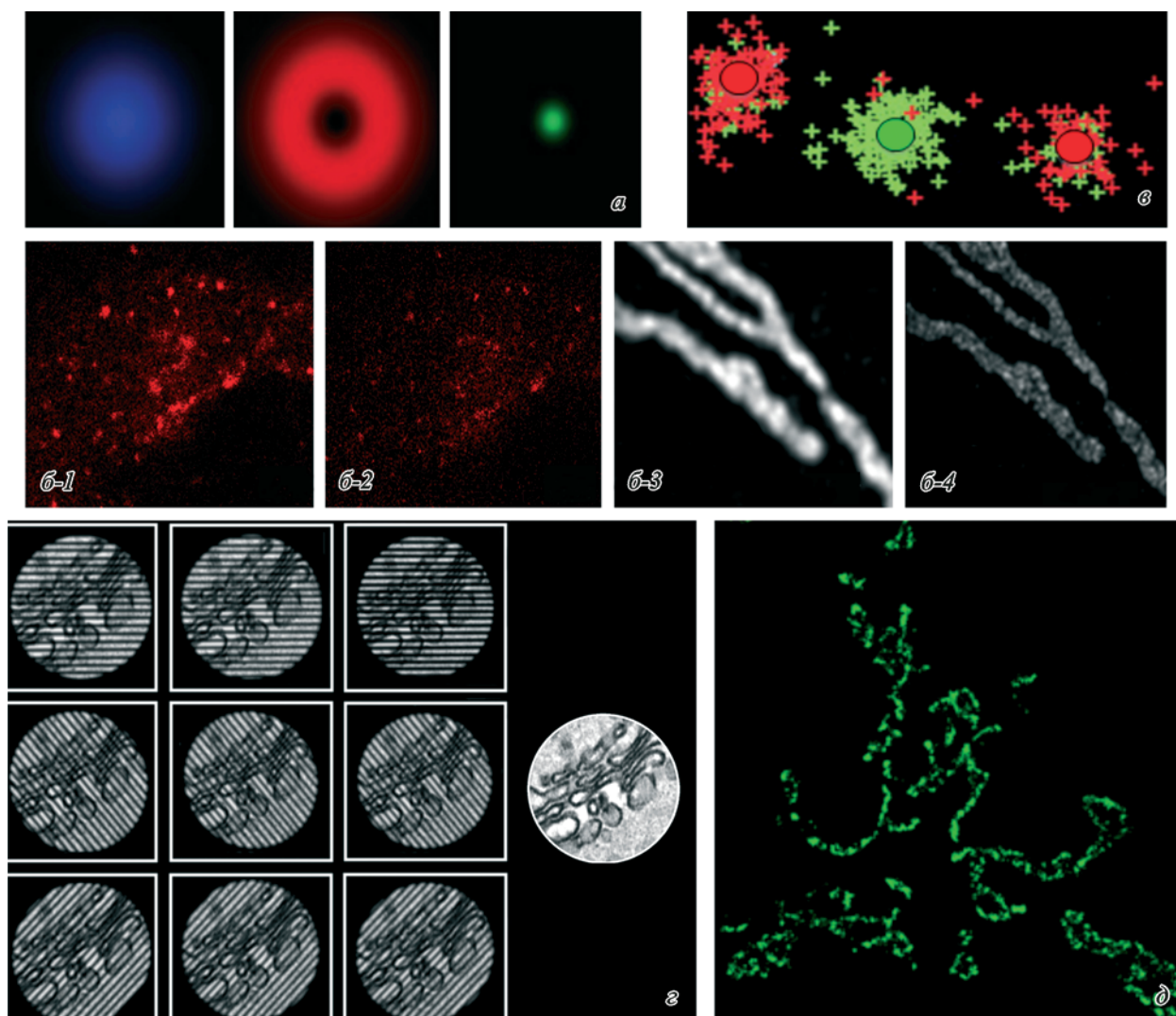


Рис. 5. Методы STED-, GSD- и SIM-микроскопии.

a — принцип STED-микроскопии: резкое уменьшение размера источника света за счет подавления испускания фотонов вокруг источника их испускания. *б* — клетки HeLa, визуализированные методами STED (*б-1*, *б-3*), конфокальной микроскопии (*б-2*) и GSD (*б-4*): красное свечение — антитела против белка Sec31. *в* — принцип GSD-микроскопии: за счет определения локализации позиции отдельных фотонов статистически определяется точка, где находится с наибольшей интенсивностью испускания, и эта точка принимается за источник света. *г* — принцип SIM-метода: деконволюция наложением вращающейся решетки, состоящей из узких параллельных непрозрачных линий. *д* — изображение митохондрии, полученное SIM-методом. Изображения любезно предоставлены д-ром Р. Парашураманом.

Идея случайной последовательной активации флуорофоров с последующим определением положения излучающей точки статистическими методами лежит в основе STORM- (Rust et al., 2006; Huang et al., 2008) и PALM-микроскопии (Betzi et al., 2006).

Стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия (STochastic Optical Reconstruction Microscopy; STORM) позволяет получить изображения клеток с высоким разрешением. В ней используется последовательное возбуждение молекул флуорофоров таким образом, чтобы каждая молекула была представлена в виде одной дифракционной точки. Это, в частности, возможно при использовании излучения малой мощности, достоверно возбуждающего лишь небольшую часть присутствующих в объекте флуорофоров. Повторяющиеся циклы импульсов позволяют определить положение всех молекул, а при наложении дают изображение с высоким разрешением и точными координатами каждой молекулы флуорофора.

Первоначально были получены двухмерные STORM-изображения с заявленным латеральным разрешением 20—30 нм. Добавление 3-й координаты было достигнуто путем использования «астигматического» метода получения изображений, который генерирует две незначительно отличающиеся фокальные плоскости, анализируя эллиптичность и ориентацию изображения флуорофора, что позволяет определить положение молекулы по оси Z с точностью до 50—60 нм.

Для построения трехмерного изображения биологических объектов применяют слабые цилиндрические линзы. У таких линз фокальные плоскости в направлениях X и Y несколько различаются. Поэтому эллиптичность и ориентация изображения флуорофора зависят от его положения по оси Z. Если флуорофор находится в средней фокальной плоскости (примерно посередине между фокальными плоскостями X и Y), то функция рассеяния точки изодиаметрична (имеет одинаковую длину по осям

X и Y). Когда флуорофор находится выше фокальной плоскости, изображение больше сфокусировано по оси Y, чем X, поэтому оно выглядит не круглым, как в предыдущем случае, а овальным. Наоборот, если флуорофор находится ниже средней фокальной плоскости, функция рассеяния точки оказывается вытянутой вдоль оси Y.

Фотоактивирующая световая микроскопия (Photo-Activated Localization Microscopy; PALM) основана на использовании возбуждающего излучения малой интенсивности. Она имеет определенные проблемы, поскольку в этом случае оказывается невозможным статистически достоверно осуществить регистрацию большого (несколько тысяч) числа фотонов от единственного флуорофора в пределах дифракционного пятна, не возбуждая другие близко лежащие флуорофоры. Решение этой проблемы было найдено в использовании так называемых переключаемых (photoswitchable) флуоресцентных красителей (Hell et al., 1994, 1995; Betzig et al., 2006). Такие флуорофоры могут находиться в трех состояниях — «активированном» (могут поглощать возбуждающее излучение), «возбужденном» (могут перейти в «темное» состояние с излучением фотона) и «темном» (молекула не может поглощать возбуждающее излучение). Переход из «темного» состояния в «активированное» происходит под действием «активирующего» излучения, длина волны которого меньше длины волны «возбуждающего» излучения.

PALM использует похожий на STORM принцип, однако в клетке должны находиться флуорофоры, активирующиеся под воздействием света определенной волны. При этом сначала облучают не испускающий свет флуорофора образец тонким лучом одного света, а затем медленно фиксируется флуоресценция облученной точки. Тем самым достигается минимизация размеров источника света.

Разработан метод микроскопии, основанный на снижении возбудимости флуорофора (Ground State Depletion Microscopy; GSD Microscopy). В основе этого метода лежит прием удаления фона и последующего постепенного восстановления флуоресценции (Betzi et al., 2006; Bretschneider et al., 2007; Han et al., 2010). GSD-микроскопия базируется на свойстве некоторых флуорофоров медленно восстанавливать флуоресценцию после ее подавления облучением пучком света высокой интенсивности. При этом объект сначала облучается мощным лазерным источником света и теряет способность к флуоресценции, затем включается детектор фотонов, который регистрирует «вспышки» отдельных молекул флуорофора, находящихся за счет предыдущего облучения в возбужденном состоянии. Эти вспышки очень похожи на те, что видны при использовании STORM, да и алгоритм обработки сигнала используется практически тот же: статистически вычисляется позиция (точка) молекулы флуорофора, испускающей фотоны, и строится изображение из этих точек (рис. 5, б-4).

Еще одним методом сверхвысокого разрешения является метод, использующий структурированное освещение, — SIM-микроскопия (Structured Illumination Microscopy; SIM). Для этого в плоскости, сопряженной с фокальной, располагается решетка, создающая определенный рисунок освещения (например, из параллельных черных полосок). Индуцируемая флуоресценция повторяет рисунок освещения, при этом флуоресценция объектов, расположенных в фокальной плоскости, меняется при перемещении этого рисунка. Напротив, флуоресценция, исходящая из расположенных вне фокуса объектов, практи-

чески не зависит от сдвига решетки. Последующая компьютерная обработка позволяет отсечь флуоресценцию вне фокуса, улучшить разрешение и получить четкое изображение. По сути SIM-микроскопия основана на том же феномене статистического вычисления положения точечного источника света (рис. 5, з, д). В ней используется метод деконволюции, основанный на реальных параметрах системы данного микроскопа. При использовании метода SIM для улучшения разрешения требуется каждый оптический срез снимать не менее 15 раз (Vermeulen et al., 2015). На практике SIM дает разрешение, в 2 раза превышающее разрешение LSCM (Fornasiero, Orazio, 2015) (рис. 5, б-2).

Возможности методов световой микроскопии высокого разрешения и сложности их использования

Методы CPCM постоянно совершенствуются. Разработана комбинация статистических методов с SIM и методом «световой пластинки». Последний используется с элементами томографии (Gustavsson et al., 2018). При этом если в объектив вставить цилиндрическую линзу, то появляется возможность различать точки, находящиеся выше и ниже фокусной плоскости, по их ориентации. В последние годы разработан математический аппарат для восстановления (деконволюции) размытых изображений (Wiesmann et al., 2015; Sage et al., 2017). Это позволяет улучшить качество светооптических изображений и несколько повысить разрешение (Zeitvogel et al., 2016).

Разработана методика для определения центра испускающих фотонов с помощью регистрации их уменьшенного числа (Nanoscopy with Minimal Photon Fluxes; MINIFLUX). В ней для измерения разрешения используют искусственные трехмерные структуры, получаемые из специально ранжированных молекул ДНК (оригами) и помещаемые в идеальные условия для регистрации фотонов (Balzarotti et al., 2017).

CPCM сегодня представляет собой быстро развивающуюся отрасль научных исследований, но история использования этих методов еще довольно короткая (Sydor et al., 2017). Практически ни в одной из работ, использующих CPCM, не было представлено данных о подтверждении полученного разрешения с помощью альтернативных методов, например коррелятивной светозлектронной микроскопии (Kreft et al., 2010). При этом, по нашему мнению, до сих пор CPCM не позволила получить по-настоящему новые результаты. Практически все наблюдения, сделанные с помощью этих методов, были описаны ранее с помощью электронной микроскопии. Например, с помощью усовершенствованного метода SIM на базальной части плазматической мембраны клеток, растущих *in vitro*, были визуализированы покрытые клатрином мембранные почки, которые имели вид колец (Li et al., 2015). Однако эта структура была описана более 30 лет назад (Robinson, 2015). Данные о быстром движении синаптических везикул, полученные с помощью STED, спорны (Kamin et al., 2010), в то время как LSKM этот факт однозначно доказывает (Darcy et al., 2006a, 2006b). Действительно, новым результатом, полученным с помощью CPCM, является обнаружение периодичности организации молекул актина (с шагом 180 нм), локализованных непосредственно под плазмалеммой отростков нейронов (Xu et al., 2013; D'Este et al., 2015; Sahl et al.,

2017), однако эти данные также желательно подтвердить с помощью коррелятивной световой микроскопии и ЭМ.

Использование методов CPCM на практике связано с многочисленными методическими сложностями. Так, живые клетки часто гибнут (Wäldchen et al., 2015), и требуется разработка способов поддержания их жизнеспособности. Есть проблемы с подготовкой клеток для анализа и выцветанием флуорофора. Например, все методы реконструкции на основе статистического анализа положения световой точки на горизонтальной плоскости (оси X и Y) вызывают сильное выцветание образца (Sydor et al., 2017), поэтому требуют высококоррозивных к выцветанию флуорофоров.

При PALM-микроскопии требуется луч с очень низкой интенсивностью излучения, чтобы как можно меньше молекул флуорофора было затронуто. Как следствие требуется длительное время для «сбора» необходимого количества фотонов. Кроме того, в случае PALM могут активироваться молекулы, расположенные как выше, так и ниже плоскости фокуса. Поэтому нужно учитывать ряд факторов, ведущих к артефактам: множественная локализация одного и того же флуорофора; «фотомерцание»; неполная конверсия цвета флуорофора; смещение молекул и образца при длительном наблюдении; неоптимальная регистрация двухцветных изображений (так как фотоны с разной длиной волны по-разному преломляются на границе сред) (Deschout et al., 2014).

4Pi-микроскопию можно расценивать как довольно субъективный метод, так как в его основе лежит прием «отсечения фона». Поэтому если исследователь не знает, какую именно структуру он наблюдает, возникает возможность неправильной интерпретации изображения. Например, известно, что меченные флуорофором мембраны особенно часто дают артефакты изображений из-за гетерогенности распределения липидов (Burgert et al., 2015).

Оказалось также, что SIM-микроскопия при проверке уровня разрешения с помощью коррелятивной световой микроскопии приводит к «потере» некоторых элементов (частиц) на изображении (не все точки оказываются на результирующем изображении) (Guggenheim et al., 2016).

Таким образом, несмотря на оптимистические заявления разработчиков методов микроскопии сверхвысокого разрешения (Juette et al., 2008), на практике получить высокое разрешение на толстых образцах довольно трудно (Vermeulen et al., 2015). Так, часто происходит завышение размеров мелких структур. Например, частица вируса *Semliki forest* с диаметром 70 нм под флуоресцентным микроскопом имеет размер 400 нм (Vonderheit, Helenius, 2005). Сравнение изображений, полученных с помощью метода STORM, с теми же ЭМ-изображениями показало, что визуализация митохондрий с помощью STORM увеличивает размеры органоидов в 2 раза (Kim et al., 2015). Причем везикулы комплекса Гольджи, образуемые коатомером-I и имеющие размер 52 нм (Marsh et al., 2001), на изображениях, представленных в статье Хуанга с соавторами (Huang et al., 2016), имеют размер 100 нм.

Теоретические проблемы разрешения в CPCM подробно описаны в литературе (Sheppard, 2017). Обычно авторы приводят математические доказательства теоретически возможного разрешения предложенного метода, но недостаточное число изображений конкретных объектов. Однако следует отличать теоретическое или предсказанное разрешение от разрешения, которое можно получить на модельных объектах путем отсечения фона,

статистического усреднения, а также при работе с биологическим образцом, с учетом его оптически гетерогенной среды, анизотропии и других факторов, мешающих достичь теоретически возможного разрешения.

Здесь полезно провести аналогию с методами ЭМ. На модельных системах разрешение просвечивающей и сканирующей ЭМ достигает 0.05 нм (Li et al., 2015). Однако в биологических образцах в реальности оно не превышает 2—3 нм, т. е. в 40 раз меньше. ЭМ не позволяет отличить золотые частицы диаметром 1.4 нм от осадка восстановленного осмия. Только при негативном контрастировании возможно достигнуть чуть большего разрешения, а использование ЭМ-томографии позволяет достигнуть разрешения 1 нм (Ziese et al., 2002; Yakushevskaya et al., 2007). Поэтому если на модельной системе нуклеиновых «оригами» разрешение CPCM достигает 5—10 нм (Baltz et al., 2017), то по аналогии с ЭМ на практике можно ожидать получение разрешения CPCM не более чем в 150 нм.

Разработчики методов CPCM утверждают, что на клеточном уровне достигнуто разрешение в 15—50 нм (Meurer et al., 2008), что практически не подтверждено реальными научными исследованиями, так как все полученные к настоящему времени результаты неоднозначны. Так, Ким с соавторами (Kim et al., 2015) заявляют о разрешении на уровне десятков нанометров, полученном при использовании метода STORM, при этом на изображениях, представленных в статье, не выявляются щели между митохондриями размером около 100 нм. В другой статье (Huang et al., 2008) описываются изображения, где разрешение по оси Z составляет 102 нм, однако судя по представленному изображению, оно не превышает 200 нм. Еще в одном исследовании с помощью CPCM были визуализированы триплеты микротрубочек в центриоле (Lau et al., 2012). При этом отдельные микротрубочки в триплетах остались неразрешимыми, а согласно приведенной масштабной линейке разрешение на изображении не превышало 150 нм.

С помощью комбинации методов PALM- и 4Pi-микроскопии при исследовании целой клетки были визуализированы везикулы около комплекса Гольджи, покрытые коатомером-I (однако, скорее всего, это мембранные почки на цистернах комплекса Гольджи, так как везикулы быстро теряют покрытие после отделения от цистерны) (Huang et al., 2016). Эти данные требуют подтверждения с помощью LSCM. Однако авторы использовали сложный в применении метод 4Pi-микроскопии, а не методы PALM и STORM, в которых заявлено разрешение по оси Z не ниже 100 нм. При этом с помощью усовершенствованного метода SIM также были визуализированы покрытые клатрином мембранные почки или пузырьки (Li et al., 2015).

Для проверки реального разрешения CPCM, видимо, требуется широкое сотрудничество ученых, работающих с разными методами, в том числе с коррелятивной микроскопией. В качестве модельных объектов, например, могут быть использованы квантовые точки или частицы золота (диаметром более 20 нм), конъюгированные с флуорофором. Можно определить число квантовых точек с помощью CPCM в эндосоме и затем проверить с помощью ЭМ-томографии. Везикулы можно метить «негативно» и по флуоресценции содержимого определять «слепым» методом их количество, а затем проверять полученные результаты с помощью коррелятивной микроскопии. Также в качестве модельных систем *in situ* можно

использовать микротрубочки, каждый триплет которых имеет диаметр около 75 нм, микросферы с известным диаметром, центриолы и другие структуры с обязательной проверкой полученных результатов с помощью ЭМ. К настоящему времени уже разработаны протоколы, которые позволяют использовать на одном срезе STORM и просвечивающую ЭМ (Kim et al., 2015).

Заключение

Таким образом, описанные нами методические разработки и технические усовершенствования способствовали улучшению качества получаемых светооптических изображений и значительно расширили исследовательские возможности СМ. Однако все перечисленные выше методы и разработки, несмотря на значительные возможности, все же не позволяют преодолеть «дифракционный предел» как таковой, а лишь «обходят» его. Пока реальное высокое разрешение методов СРСМ доказано только для линейных структур клетки, микротрубочек и митохондрий (Xu et al., 2013; D'Este et al., 2015; Sahl et al., 2017). Экспериментов, в которых полученное с помощью тех или иных методов СРСМ разрешение проверялось бы с помощью коррелятивной микроскопии, проведено чрезвычайно мало. Кроме того, требуется разработка или адаптация имеющихся методов стереологии (Безнусенко и др., 2005а, 2005б) для количественной оценки данных, полученных методами СРСМ.

Авторы выражают искреннюю признательность д-ру Д. Перинетти (D. Perinetti, Отдел биомедицины университета Триеста, Италия) и д-ру П. Парашураману (P. Parashuraman, Институт биохимии белка, Неаполь, Италия) за любезно предоставленные изображения.

Список литературы

- Азнабаев Б. М., Алимбекова З. Ф., Габбасов А. П. 2006. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Принцип работы и морфологические критерии диагностики состояния роговицы после ласик. Катаральная и рефракционная хирургия. 6 (2) : 10—14. (Aznabayev B. M., Alimbekova Z. F., Gabbasov A. P. 2006. The laser scanning confocal microscopy. The principle of work and morphological criteria of diagnostics of a condition of a cornea after lasek. Catarhal and refraction surgery. 6 (2) : 10—14.)
- Безнусенко Г. В., Сесорова И. С., Миронов А. А., Банин В. В. 2005а. Как измерять структуры, или новая стереология. I. Способ отбора и ориентации образцов. Морфология. 128 (5) : 72—75. (Beznusenko G. V., Sesorova I. S., Mironov A. A., Bannin V. V. 2005a. How to measure the structures, or new stereology. I. Sampling and orientation of samples. Morphology. 128 (5) : 72—75.)
- Безнусенко Г. В., Сесорова И. С., Миронов А. А., Банин В. В. 2005б. Как измерять структуры, или новая стереология. II. Методы определения абсолютных размеров клеточных структур при световой микроскопии. Морфология. 128 (6) : 63—66. (Beznusenko G. V., Sesorova I. S., Mironov A. A., Bannin V. V. 2005b. How to measure the structures, or new stereology. II. Methods of stereological estimation of the absolute dimensions of cell structures in light microscopy. Morphology. 128 (6) : 63—66.)
- Кларк Э., Эберхардт К. 2007. Микроскопические методы исследования материалов. М.: Техносфера. 376 с. (Clark E., Eberhardt K. 2007. Microscopic methods of a research of materials. M.: Technosphere. 376 p.)
- Ковалев Ю. С. 2010. Использование лазерной конфокальной микроскопии для исследования низкоразмерных структур. Письма в ЭЧАЯ. 7 (5) : 161. (Kovalyov Y. S. 2010. Use of laser confocal microscopy for a research of low-dimensional structures. Letters in EChAYa. 7 (5) : 161.)
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Гиляров А. В., Соловьев А. В., Грудинина Н. А. 2009. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии. Морфология. 135 (3) : 76—79. (Korzhevsky D. E., Quiricus O. V., Sukhorukova E. G., Giliarov A. V., Solovyov K. V., Grudinina N. A. 2009. Studying of the spatial organization of astrocytes of a brain by means of confocal laser microscopy. Morphology. 135 (3) : 76—79.)
- Лежнев Э. И., Попова И. И., Кузьмин С. В., Слащев С. М. 2001. Конфокальная сканирующая микроскопия: принципы, устройство, применение (часть 2). Научное приборостроение. 11 (3) : 26—42. (Lezhnev E. I., Popova I. I., Kuzmin S. V., Slashchev S. M. 2001. Confocal laser scanning microscopy: principles, arrangement, application (part 2). Scientific Instrumentation. 11 (3) : 26—42.)
- Лукашева Н. Н., Ткаченко С. Б., Потехаев Н. Н., Рузмина Т. С., Василевская Е. А. 2008. Прижизненная отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: история создания, принцип работы, возможности применения в дерматологии. Клиническая дерматология и венерология. 8 (5) : 10—15. (Lukasheva N. N., Tkachenko S. B., Potekhaev N. N., Ruzmina T. S., Vasilevskaya E. A. 2008. Lifetime-period reflecting confocal laser scan microscopy: the history of foundation, the principle of functioning, possibilities of using in dermatology. Russ. J. Dermatol. Venereol. 8 (5) : 10—15.)
- Митрошина Е. В. 2012. Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского. 40 с. (Mitroshina E. V. 2012. An optical imidjing in the annex to a research of neurobiological systems of a brain. Nizhny Novgorod: National Research N. I. Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. 40 p.)
- Незлин Л. П. 2010. Золотой век сравнительной морфологии: лазерная сканирующая микроскопия и нейрогенез трохлофорных животных. Онтогенез. 41 (5) : 370—380. (Nezlin L. P. 2010. Golden Age of comparative morphology: laser scan microscopy and neurogenesis trokhofornykh of animals. Ontogenesis. 41 (5) : 370—380.)
- Федоров А. А. 2013. Морфологические основы научных исследований в офтальмологии. Вестн. офтальмол. 129 (5) : 10—21. (Fedorov A. A. 2013. Morphological bases of scientific research in ophthalmology. Messenger of Ophthalmol. 129 (5) : 10—21.)
- Феофанов А. В. 2007. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Успехи биол. химии. 47 (4) : 371—410. (Feofanov A. V. 2007. The spectral laser scanning confocal microscopy in biological researches. Progress Biol. Chem. 47 (4) : 371—410.)
- Ченцов Ю. В. 1994. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в биологии и медицине. Оптический журнал. 61 (12) : 18—23. (Chentsov Y. V. 1994. The confocal laser scanning microscopy in biology and medicine. J. Optic. Techn. 61 (12) : 18—23.)
- Аббе Э. К. 1873. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Arch. Mikroskop. Anat. 9 : 413—468.
- Balzarotti F., Eilers Y., Gwosch K. C., Gynna A. H., Westphal V., Stefani F. D., Elf J., Hell S. W. 2017. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. Science. 355 : 606—612.
- Betzi E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Oleynich S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science. 313 : 1642—1645.
- Betzig E., Trautman J. K. 1992. Near-field optics: microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. Science. 257 : 189—195.

- Bretschneider S., Eggeling C., Hell S. W. 2007. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys. Rev.* 98 : 218103.
- Burgert A., Letschert S., Doose S., Sauer M. 2015. Artifacts in single molecule localization microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 144 : 123—131.
- Chen B. C., Legant W. R., Wang K., Shao L., Milkie D. E., Davidson M. W., Janetopoulos C., Wu X. S., Hammer J. A. 3rd, Liu Z., English B. P., Mimori-Kiyosue Y., Romero D. P., Ritter A. T., Lipincott-Schwartz J., Fritz-Laylin L., Mullins R. D., Mitchell D. M., Bembek J. N., Reymann A. C., Böhme R., Grill S. W., Wang J. T., Seydoux G., Tulu U. S., Kiehart D. P., Betzig E. 2014. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science.* 346 : 1257998
- Cremer C., Cremer T. 1978. Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microsc. Acta.* 8 : 13144.
- Darcy K. J., Staras K., Collinson L. M., Goda Y. 2006a. An ultrastructural readout of fluorescence recovery after photobleaching using correlative light and electron microscopy. *Nat. Protoc.* 1 : 988—994.
- Darcy K. J., Staras K., Collinson L. M., Goda Y. 2006b. Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat. Neurosci.* 9 : 315—321.
- Denk W., Strickler J. H., Webb W. W. 1990. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* 248 : 73—76.
- Deschout H., Shivanandan A., Annibale P., Scarselli M., Radenovic A. 2014. Progress in quantitative single-molecule localization microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 142 : 5—17.
- D'Este E., Kamin D., Gottfert F., El-Hady A., Hell S. W. 2015. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell Rep.* 10 : 1246—1251.
- Diaspro A. 2001. Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances. Wiley-VCH, 2001, 576 p.
- Dunlop M. H., Ernst A. M., Schroeder L. K., Toomre D. K., Lavieu G., Rothman J. E. 2017. Land-locked mammalian Golgi reveals cargo transport between stable cisternae. *Nat. Commun.* 8 : 432.
- Fornasiero E. F., Opazo F. 2015. Super-resolution imaging for cell biologists: concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays.* 37 : 436—451.
- Gao P., Nienhaus G. U. 2017. Precise background subtraction in stimulated emission double depletion nanoscopy. *Opt. Lett.* 42 : 831—834.
- Guggenheim E. J., Khan A., Pike J., Chang L., Lynch I., Rapoport J. Z. 2016. Comparison of confocal and super-resolution reflectance imaging of metal oxide nanoparticles. *PLoS ONE.* 11 : 159980.
- Gustavsson A. K., Petrov P. N., Lee M. Y., Shechtman Y., Moerner W. E. 2018. 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet. *Nat. Commun.* 9 : 123.
- Han K. Y., Kim S. K., Eggeling C., Hell S. 2010. Metastable dark states enable ground state depletion microscopy of nitrogen vacancy centers in diamond with diffraction-unlimited resolution. *Nano Lett.* 10 : 3199—3203.
- Heintzmann R., Cremer C. G. 1999. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc. SPIE.* 35 : 185—196.
- Hell S. W., Kroug M. 1995. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys.* 60 : 495—497.
- Hell S. W., Stelzer E. H., Lindek S., Cremer C. 1994. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt.* 19 : 222.
- Hess S. T., Girirajan T. P. K., Mason M. D. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 91 : 4258—4272.
- Huang B., Jones S. A., Brandenburg B., Zhuang X. 2008. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods.* 5 : 1047—1052.
- Huang F., Sirinakis G., Allgeyer E. S., Schroeder L. K., Duij W. C., Kromann E. B., Phan T., Rivera-Molina F. E., Myers J. R., Irnov I., Lessard M., Zhang Y., Handel M. A., Jacobs-Wagner C., Lusk C. P., Rothman J. E., Toomre D., Booth M. J., Bewersdorf J. 2016. Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells. *Cell.* 166 : 1028—1040.
- Juette M. F., Gould T. J., Lessard M. D., Mlodzianoski M. J., Nagpure B. S., Bennett B. T., Hess S. T., Bewersdorf J. 2008. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat. Methods.* 5 : 527—529.
- Kamin D., Lauterbach M. A., Westphal V., Keller J., Schönle A., Hell S. W., Rizzoli S. O. 2010. High- and low-mobility stages in the synaptic vesicle cycle. *Biophys. J.* 99 : 675—684.
- Kim D., Deerinck T. J., Sigal Y. M., Babcock H. P., Ellisman M. H., Zhuang X. 2015. Correlative stochastic optical reconstruction microscopy and electron microscopy. *PLoS ONE.* 10 : 0124581.
- Klar T. A., Jakobs S., Dyba M., Egner A., Hell S. W. 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *PNAS.* 97 : 8206—8210.
- Kreft M. E., Di Giandomenico D., Beznoussenko G. V., Resnik N., Mironov A. A., Jezernik K. 2010. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biol. Cell.* 102 : 593—607.
- Lau L., Lee Y. L., Sahl S. J., Stearns T., Moerner W. E. 2012. STED microscopy with optimized labeling density reveals 9-fold arrangement of a centriole protein. *Biophys. J.* 102 : 2926—2935.
- Li D., Shao L., Chen B. C., Zhang X., Zhang M., Moses B., Milkie D. E., Beach J. R., Hammer J. A., Pasham M., Kirchhausen T., Baird M. A., Davidson M. W., Xu P., Betzig E. 2015. Advanced imaging. Extended-resolution structure illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science.* 349 : 3500.
- Marsh B. J., Mastronarde D. N., Buttl K. F., Howell K. E., McIntosh J. R. 2001. Organellar relationships in the Golgi region of pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 2399—2406.
- Meyer L., Wildanger D., Medda R., Punge A., Rizzoli S. O., Donnert G., Hell S. W. 2008. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small.* 4 : 1095—1000.
- Pampaloni F., Chang B. J., Stelzer E. H. 2015. Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues. *Cell Tissue Res.* 360 : 129—141.
- Robinson M. S. 2015. Forty years of clathrin-coated vesicles. *Traffic.* 16 : 1210—1238.
- Rust M. J., Bates M., Zhuang X. W. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods.* 3 : 793—795.
- Sage D., Donati L., Soulez F., Fortun D., Schmit G., Seitz A., Guiet R., Vonesch C., Unser M. 2017. DeconvolutionLab2: an open-source software for deconvolution microscopy. *Methods.* 115 : 28—41.
- Sahl S. J., Hell S. W., Jakobs S. 2017. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 : 685—701.
- Sheppard C. J. R. 2017. Resolution and super-resolution. *Microsc. Res. Tech.* 80 : 590—598.
- Strobl F., Schmitz A., Stelzer E. H. K. 2017. Improving your four-dimensional image: traveling through a decade of light-sheet-based fluorescence microscopy research. *Nat. Protoc.* 12 : 1103—1109.
- Sydor A. M., Czymbek K. J., Puchner E. M., Mennella V. 2015. Super-resolution microscopy: from single molecules to supramolecular assemblies. *Trends Cell Biol.* 25 : 730—748.
- Vermeulen P., Zhan H., Orieux F., Olivo-Marin J. C., Lenkei Z., Lorient V., Fragola A. 2015. Out-of-focus background subtraction for fast structured illumination super-resolution microscopy of optically thick samples. *J. Microsc.* 259 : 257—268.
- Vonderheit A., Helenius A. 2005. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol.* 3 : 233.
- Wäldchen S., Lehmann J., Klein T., van de Linde S., Sauer M. 2015. Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Sci. Rep.* 5 : 15348.

Wiesmann V., Franz D., Held C., Münzenmayer C., Palmisano R., Wittenberg T. 2015. Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs. *J. Microsc.* 257 : 39—53.

Xu K., Zhong G., Zhuang X. 2013. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science.* 339 : 452—456.

Yakushevskaya A. E., Lebbink M. N., Geerts W. J., Spek L., van Donselaar E. G., Jansen K. A., Humbel B. M., Post J. A., Verkleij A. J., Koster A. J. 2007. STEM tomography in cell biology. *J. Struct. Biol.* 159 : 381—391.

Zeitvogel F., Schmid G., Hao L., Ingino P., Obst M. 2016. ScatterJ: an ImageJ plugin for the evaluation of analytical microscopy datasets. *J. Microsc.* 261 : 148—156.

Ziese U., Kübel C., Verkleij A., Koster A. J. 2002. Three-dimensional localization of ultrasmall immuno-gold labels by HA-ADF-STEM tomography. *J. Struct. Biol.* 138 : 58—62.

Поступила 30 X 2017

NEW OPPORTUNITIES OF LIGHT MICROSCOPY IN CYTOLOGY AND HISTOLOGY

I. S. Sesorova,¹ * G. V. Beznoussenko,² T. E. Kazakova,¹ V. V. Sesorov,¹
I. D. Dimov,³ A. A. Mironov²

¹ Department of Anatomy, Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, 153000,

² The FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy, and

³ Department of Anatomy, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 127994;

* e-mail: Irina-S3@yandex.ru

The article gives an analysis of the new methodological developments and technical improvements that have appeared in recent years in light microscopy and aimed at increasing the optical resolution and quality of a light-optical image. The possibilities and shortcomings of methods are considered: «a light plate», the confocal laser scanning microscopy and two-photon excitation microscopy, 4Pi and FRET, TIRF, STED, STROM, PALM, GSD-microscopy. The achievements and problems of new methods of light microscopy are analyzed. The brought methods over extended research possibilities of light microscopy considerably assisted the improvement of quality of images. However they could not bypass and diffraction limit which was discovered by E. K. Abbe.

Key words: light microscopy, methods.