



УДК 57.086.2

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ В БИОЛОГИИ

© 2024 г. Д. О. Соловьева*, #, А. В. Алтунина*, **, М. В. Третьяк*,
К. Е. Мочалов*, В. А. Олейников*, ***

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский переулок, 9

*** Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Россия, 115409 Москва, Каширское ш., 31

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

За последние десятилетия оптическая микроскопия претерпела значительные изменения благодаря преодолению дифракционного предела оптического разрешения и развитию методов визуализации с высоким разрешением, которые объединили под термином флуоресцентная наноскопия. Такие подходы позволяют исследователям наблюдать биологические структуры и процессы с наномасштабным уровнем детализации, раскрывая их ранее скрытые особенности и помогая отвечать на фундаментальные биологические вопросы. Среди передовых методов флуоресцентной наноскопии можно выделить STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), SIM (Structured Illumination Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) и RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) и др. Большинство указанных методов позволяют получать объемные (3D) изображения исследуемых объектов. В данном обзоре рассмотрены принципы этих методов, их достоинства и недостатки, а также применение в биологических исследованиях.

Ключевые слова: оптическая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, сверхвысокое разрешение, флуоресцентная наноскопия, дифракционный предел

DOI: 10.31857/S0132342324040077, **EDN:** MWYVNA

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	463
2. МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ STED	465
3. RESOLFT	467
4. STORM	468
5. PALM	470
6. PAINT	471
7. MINFLUX	472
8. SIM	474
9. RIM	476
10. TIRF	477
11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	479
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	479

1. ВВЕДЕНИЕ

В обзоре рассмотрен ряд методов флуоресцентной наноскопии (оптической флуоресцентной микроскопии с наномасштабным разрешением): микроскопия со структурированным освещением (Structured Illumination Microscopy, SIM), микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED), микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM), фотоактивируемая локализационная микроскопия (Photo-activated Localization Microscopy, PALM), микроскопия обратимых насыщаемых оптических флуоресцентных переходов (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions, RESOLFT), наноскопия с минимальными потоками фотонов (Minimal Photon Fluxes, MINFLUX), флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF), накопление точек для визуализации

в наноразмерной топографии (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, PAINT).

Все эти методы используют флуорофоры, которые поглощают фотоны в “основном” состоянии и испускают флуоресценцию в “возбужденном” состоянии, что позволяет улучшить контраст во флуоресцентной микроскопии. Изначально флуоресцентная микроскопия имела ограничение оптического разрешения, связанное с числовой апертурой объектива и длиной волны света, которое было описано Эрнстом Аббе [1]. Так, разрешение светового оптического микроскопа определяется следующим образом. Поскольку световая волна может быть дифрагированной, функция трехмерного рассеяния точки (Point Spread Function, PSF), создаваемая точечным объектом, имеет конечный размер. Основываясь на конструктивной интерференции в пространстве, полная ширина на полувысоте (Full Width At Half Maximum, FWHM) PSF составляет $\Delta r \approx \lambda / (2\eta \times \sin\alpha)$ в фокальной плоскости и $\Delta l \approx \lambda / (\eta \times \sin 2\alpha)$ вдоль оптической оси, где λ – длина волны света, α – апер-

Сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2); FWHM – полная ширина на уровне половины высоты (Full Width at Half Maximum); HS-SIM – высокоскоростная микроскопия структурированного освещения (High Speed SIM); iPALM – интерферометрическая фотоактивируемая локализационная микроскопия (Interferometric Photoactivated Localization Microscopy); LIVE-PAINT – визуализация живых клеток с использованием накопления точек обратимых взаимодействий для визуализации в наномасштабной топографии (Live cell Imaging using reVversible intEractions Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography); MAI-SIM – интерферометрическая микроскопия со структурированным освещением на основе машинного обучения (Machine Learning Assisted Interferometric Structured Illumination Microscopy); MA-TIRF – многоугольная флуоресценция полного внутреннего отражения (Multiangle Total Internal Reflection Fluorescence); MICOS – место контакта митохондрий и кристы с внешней мембраной (Mitochondria Contact Site and Cristae to Outer Membrane); MINFLUX – минимальные флуктуации фотонов (MINimal photon FLUXes); NA – числовая апертура (Numerical Aperture); PAFP – фотоактивируемый флуоресцентный белок (Photoactivatable Fluorescent Protein); PAINT – накопление точек для визуализации наномасштабной топографии (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography); PALM – фотоактивируемая локализационная микроскопия (Photo-activated Localization Microscopy); PIEZO – механочувствительный компонент ионного канала пьезотипа (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component); pPAINT – накопление белковых точек для визуализации наномасштабной топографии (Protein Point Accumulation in Nanoscale Topography); PSF – функция рассеяния точки (Point Spread Function); RAIN-STORM – быстрая визуализация тканей с помощью наномасштабной микроскопии стохастической оптической реконструкции (Rapid Imaging of Tissues at the Nanoscale); RBD – рецептор-связывающий домен (Receptor-Binding Domain); RESOLFT – обратимые насыщающиеся оптические флуоресцентные переходы (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions); RIM – микроскопия случайного освещения (Random Illumination Microscopy); SARS-CoV-2 – коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2); SIM – микроскопия структурированного освещения (Structured Illumination Microscopy); SIMPLER – микроскопия сверхкритического освещения, фотометрическая z -локализация с повышенным разрешением (Supercritical Illumination Microscopy Photometric z -Localization with Enhanced Resolution); SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул (Single-Molecule Localization Microscopy); SR-SIM – высоко разрешающая микроскопия структурированного освещения (Super Resolution-Structured Illumination Microscopy); STED – микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (Stimulated Emission Depletion Microscopy); STORM – микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy); TIRF – флуоресценция полного внутреннего отражения (Total Internal Reflection Fluorescence); ЭМ – электронная микроскопия.

Автор для связи: (тел.: +7 (965) 392-24-91; эл. почта: d.solovieva@mail.ru).

турный угол объектива, η – показатель преломления иммерсионной среды; Δr – FWHM PSF в латеральных направлениях, Δl – FWHM PSF в аксиальных направлениях. Как показано на рис. 1, при визуализации в видимом свете ($\lambda = 632.8$ нм) и масляном иммерсионном объективе с числовой апертурой (Numerical aperture, NA) 1.40 (NA = $\eta \times \sin\alpha$) поперечный размер PSF составляет ~ 226 нм, а аксиальный размер PSF – ~ 487 нм. Таким образом, ограниченная дифракция света приводит к низкому разрешению структур, лежащих за дифракционным пределом, что создает проблемы для детекции молекулярных структур.

С середины XX века было введено несколько подходов, включая конфокальную флуоресцентную микроскопию [2] и многофотонную микроскопию [3], для уменьшения расфокусированного фона флуоресценции. Конфокальная флуоресцентная микроскопия улучшает пространственное разрешение в $\sqrt{2}$ раза по сравнению с традиционной флуоресцентной микроскопией, но на практике одно- и двухфотонная флуоресцентная конфокальная микроскопия обеспечивают практически одинаковое разрешение из-за конечного размера детектора. Однако в начале 1990-х гг. были разработаны базовые концепции, которые позволяют превзойти предел оптической дифракции в флуоресцентной микроскопии дальнего поля, в частности 4Pi-микроскопия, в которой за счет расширения волнового фронта освещения или обнаружения латеральное разрешение варьируется от 80 до 150 нм [4, 5].

Методы микроскопии сверхвысокого разрешения можно разделить на две группы (рис. 2). Первая группа (детерминированные методы) включает микроскопию структурированного освещения и ее производные, в которой для преодоления дифракционного предела используются волновая оптика и обработка изображений. Вторая группа (стохастические методы) – методы, преодолевающие дифракционный предел за счет преимуществ фотопереклаемых флуоресцентных маркеров. Ко второй группе относится локализационная микроскопия одиночных молекул (Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM) [6], которая охватывает целый ряд методов, например, STORM и PALM, которые улучшают разрешение за счет случайного включения и выключения излучения одной молекулы в дифракционно ограниченном объеме в разные моменты времени и детекции, т.е. в области дифракционного предела свет излучает только одна молекула, и в дальнейшем регистрируются разные наборы молекул. SMLM генерирует большие объемы данных в виде 2D- или 3D-облаков точек с миллионами локализаций и связанными с ними неопределенностями.

SMLM применяется во многих областях биологии и медицины, таких как изучение онкологических заболеваний, клеточного иммунитета, патогенеза неврологических заболеваний и разработка связанных с ними лекарственных препаратов [7, 8], исследования в клеточной биологии [9].

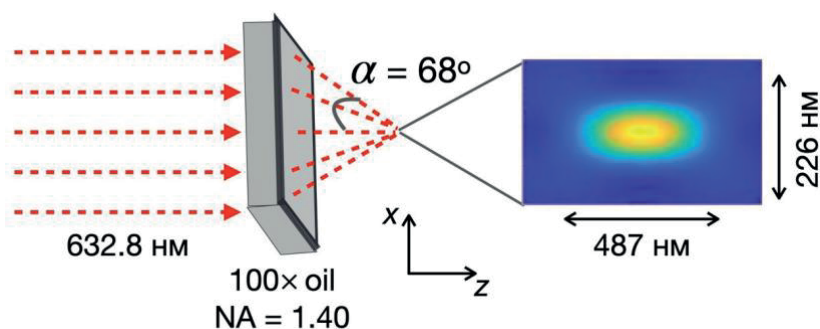


Рис. 1. Схема, отображающая разрешение светового оптического микроскопа.

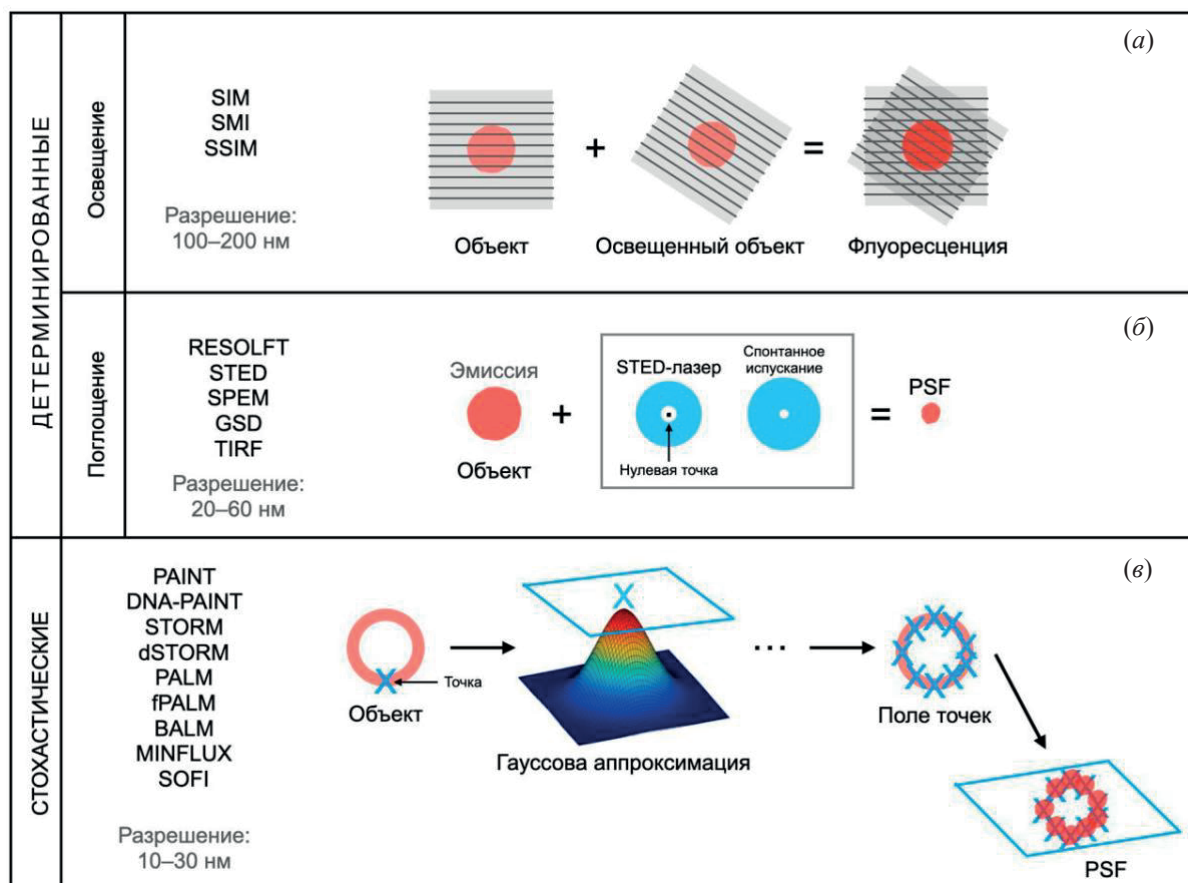


Рис. 2. Классификация методов микроскопии сверхвысокого разрешения. (a), (б) – Детерминированные методы, в основе которых лежит информация о пространственном распределении: (a) – заложенном в паттерн освещения (последовательное освещение образца стоячей волной): SIM (Structured Illumination Microscopy), SMI (Spatially Modulated Illumination Microscopy), SSIM (Saturated Structured Illumination Microscopy); (б) – о размере области, испускающей свет (отклик флуорофора на возбуждение света, которое стимулирует испускание): RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions), STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), SPEM (Scanning PhotoElectron Microscope), GSD (Ground State Depletion Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence); (в) – стохастические методы, в основе которых лежит возможность локализации одиночных молекул практически с любой точностью, которая определяется числом зарегистрированных фотонов: PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), DNA-PAINT (DNA Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), dSTORM (Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), fPALM (DNA structure fluctuation-assisted BALM), BALM (Binding-Activated Localization Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging).

Далее в обзоре рассмотрены некоторые наиболее широко распространенные методы наноскопии, а также представлены наиболее современные работы с их применением.

2. МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ НАНОСКОПИИ STED

Микроскопия на основе подавления спонтанного испускания позволяет получать флуорес-

центные изображения в дальнем поле с неограниченным дифракционным разрешением [10]. Технически метод довольно сложен, впервые он был описан в 1994 г. [11, 12]. В STED-микроскопии возбуждение флуорофоров производится двумя пространственно наложенными друг на друга лазерными пучками. Обычный (имеющий Гауссов профиль) пучок возбуждает флуоресценцию молекул, а сверхразрешение достигается путем ослаб-

ления возбуждения периферийных флуоресцентных молекул с помощью светового пучка, имеющего фокальное пятно в форме тора и смещенного по частоте в красную область спектра по сравнению с возбуждающим пучком – так называемый истощающий STED-пучок. STED-пучок перекрывает ограниченное дифракцией фокусное пятно возбуждения, и флуоресцентный сигнал излучается только из полой центральной области пучка STED, которая меньше, чем ограниченное дифракцией фокусное пятно возбуждающего пучка, что позволяет преодолеть дифракционный предел. Увеличение интенсивности пучка STED уменьшает эффективную функцию рассеяния точки (PSF) до размера, который в принципе не ограничен дифракцией. Однако стоит учитывать зависимость разрешения от интенсивности флуоресценции в центре пучка STED, т.е. если интенсивность флуоресценции изначально мала, то и ее величина в центре пучка будет также незначительна. Увеличивая интенсивность пучка STED, диаметр эффективных пятен ограничивается латеральным разрешением 20–70 нм. Аксиальное разрешение достигает 40–150 нм. Также необходимо использовать подходящие красители и адаптивное освещение, чтобы избежать фотообесцвечивания. Кроме того, системные и вызванные образом аберрации пучка STED могут значительно снизить качество луча и создать незначительную минимальную интенсивность.

Безусловно, метод STED совмещается с другими методами микроскопии, например, с TIRF, SIM, PAINT, которые рассмотрены ниже. Кроме того, STED может быть совместим технологиями получения 3D-изображений посредством ультрамикротомии с интегрированными оптическими системами, как, например, уникальная научная установка “Система зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии” (<https://ckp-rf.ru/usu/486825/>) [13].

Исходная конфигурация STED-пучка обеспечивает повышение разрешения только в латеральном направлении. Для достижения трехмерного субдифракционного разрешения необходимо создать трехмерную точку “нулевой” интенсивности, окруженную областями с высокой интенсивностью STED по всем направлениям. В

качестве примера решения такой задачи можно привести работу Heine et al. [14], в которой использовали два наложенных друг на друга STED-пучка. Один из этих пучков образует фокус в форме тора и ограничивает флуоресценцию в латеральном направлении, а другой создает пустую зону в области перетяжки фокуса и ограничивает флуоресценцию в аксиальном направлении. Такое решение наиболее практичное и простое.

Среди методов сверхразрешающей микроскопии (STORM, PALM, RESOLFT) STED-микроскопия эффективно применяется для визуализации *in vivo*, главным образом благодаря возможности трехмерного секционирования, что является идеальным подходом для микроскопии тканей при использовании стандартных флуоресцентных белков [15]. Прорывным применением STED-микроскопии стало исследование дендритных и аксональных структур мозга живой мыши [16–19]. В 2018 г. удалось получить изображения наномасштабного распределения каркасного белка PSD95 на постсинаптической мембране возбуждающих синапсов в зрительной коре у живых мышей [17]. Изображения отличались высоким контрастом и низкой фоновой засветкой, а латеральное разрешение составило ~70 нм на глубине ≤ 25 мкм. В обзоре Calovi et al. (2021) [20] описаны технические преимущества STED-микроскопии для визуализации живых тканей головного мозга, а также освещены ключевые нейробиологические результаты, полученные с помощью этого метода.

Одно из применений микроскопии 3D-STED – изучение синаптической функции и пластичности [8]. Например, Katsube et al. [21] использовали для количественной оценки числа возбуждающих синапсов у мышей с синдромом Кауфмана в зонах CA1 и CA2 гиппокампа.

Другое применение – изучение локализации и динамики белков внутри клеток. Так, в 2023 г. была опубликована работа по количественному анализу белковых маркеров литических гранул иммунологических синапсов с помощью визуализации тау-STED и 3D-количественной солокализации маркеров литических гранул [22]. С использованием 3D STED исследуют механизмы липид-

ного обмена в реальном времени. Carravilla et al. [23] выполнили количественную оценку биофизических параметров мембраны с высоким временным и пространственным разрешением, длительным временем сбора данных. В частности, на живых клетках показаны процессы образования пузырьков и липидного обмена во время слияния мембран, а также благодаря корреляционной спектроскопии выполнена одновременная количественная оценка мембранной динамики и упаковки липидов.

STED применяется и для получения объемных изображений целых клеток. Например, Spahn et al. [24] исследовали живые бактериальные (*Escherichia coli*) и эукариотические клетки с использованием флуорогенных меток, которые обратимо связываются со структурой-мишенью. Такую концепцию обратимого связывания флуорофоров используют в микроскопии локализации одиночных молекул (SMLM) [25], а изначально она была реализована в накоплении точек для визуализации в наноразмерной топографии (PAINT). Постоянный обмен метками гарантирует удаление фотообесцвеченных флуорофоров и их замену интактными флуорофорами, тем самым обходя ограничения, связанные с обесцвечиванием изображений сверхвысокого

разрешения STED. Эта концепция отличается от традиционных для STED подходов, которые уменьшают фотообесцвечивание постоянно связанных меток за счет заполнения дополнительных молекулярных состояний.

Так, Spahn et al. [24] с помощью сменных меток удалось достичь высокой плотности маркировки, избежать обесцвечивания флуорофоров и обеспечить многоцветную 3D STED-визуализацию живых клеток (рис. 3).

3. RESOLFT

Микроскопия RESOLFT – тип микроскопии сверхвысокого разрешения, в которой используется обратимое фотопереключение флуоресцентных молекул [26–28]. Метод RESOLFT – усовершенствование концепции STED, поскольку он может дать разрешение, подобное STED, при низкой интенсивности истощающего луча. Так, латеральное разрешение RESOLFT достигает 40–80 нм, а аксиальное – 70–90 нм.

В микроскопии RESOLFT образец метят специфическими фотопереключаемыми флуоресцентными красителями, которые могут переключаться между ярким и темным состояниями. Лазерный луч с фокальным пятном в форме

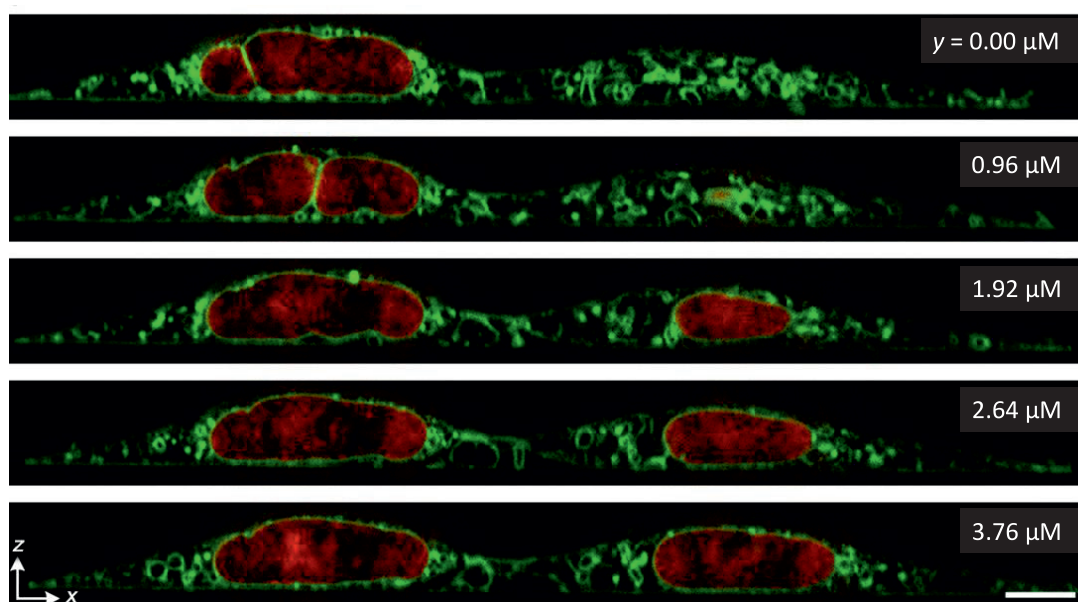


Рис. 3. 3D-STED-визуализация фиксированных клеток HeLa с флуоресцентно мечеными мембранами (зеленый) и ДНК (красный), с достижением почти изотропного разрешения, масштабный отрезок 5 мкм [24].

тора используется для перевода флуоресцентных молекул в темное состояние. Затем второй лазерный луч используется для возбуждения молекул в этой темной области и переключения их обратно в яркое состояние. Тщательно контролируя интенсивность и положение этих двух лазерных лучей, можно контролировать размер яркого пятна и уменьшать его до уровня ниже дифракционного предела света.

RESOLFT имеет преимущества перед STED-микроскопией с точки зрения уменьшения фотообесцвечивания и фотоповреждения образца, поскольку для получения истощения используется пучок низкой интенсивности. Кроме того, микроскопия STED может быть модифицирована до установки RESOLFT с использованием модуляционного луча вместо STED-луча.

Улучшение разрешения в RESOLFT, как и в STED, достигается различными способами: использованием разных оптических схем [29, 30], применением различных типов красителей. Например, используются так называемые диады, состоящие из фотохромного переключателя, ковалентно связанного с флуоресцентным красителем, которые позволяют контролировать излучение красителя за счет обратимой фотоизомеризации переключателя [31, 32]. Благодаря такой диаде Damenti et al. [32] получили 2D- и 3D-изображения тонкой трубчатой организации эндоплазматического ретикулума (ЭПР) аксонов, а максимальное пространственное разрешение составило 50 нм. Результаты показали сложную трубчатую сеть ЭПР вдоль нейритов с размером некоторых канальцев 60 нм. Авторы сделали следующие выводы: 1) сложность сети ЭПР с точки зрения количества канальцев, соединений и длины ветвей канальцев связана с размером ширины нейритов, а не с конкретной функцией компартмента; 2) трубчатая трехмерная геометрия нейронных ветвей влияет на пространственную организацию сети ЭПР для обеспечения и оптимизации распределения ресурсов.

Применение RESOLFT широко распространено, как и STED, особенно в областях клеточной биологии, нейробиологии и структурной биологии [33–35].

4. STORM

В отличие от STED-микроскопии, в STORM [36], PALM [37] и PAINT отдельные флуоресцентные молекулы считываются из случайных координат. При освещении широким полем включается или активируется отдельная молекула. Следующая активированная молекула находится на расстоянии $\lambda/2\eta$ (где λ – длина волны света, η – показатель преломления) от предыдущей активированной молекулы. Повторное возбуждение молекул формирует увеличенное дифракционное пятно на камере. Затем изображение собирается молекула за молекулой по механизму темного-яркого-темного состояния как для переключаемых, так и для не переключаемых флуорофоров. Обнаруженные фотоны позволяют локализовать положение центра пятна и определить латеральное положение молекул (рис. 4).

Следует отметить, что для получения высококачественных изображений STORM требуются флуорофоры с высоким выходом фотонов на одно событие переключения, высокой фотостабильностью и несколькими циклами переключения. Среди этих свойств низкий рабочий цикл включения-выключения приводит к максимальной плотности флуорофоров, что способствует достижению максимального разрешения изображения. Подбор флуорофоров – одна из главных задач для данного типа микроскопии, т.к. от них, по большей мере, и зависит разрешение изображений. Так, в обзорах [38, 39] описаны необходимые свойства существующих флуорофоров и даны рекомендации по использованию флуоресцентных зондов в микроскопии локализации одиночных молекул.

В статье 2008 г. Huang et al. [40] описан метод 3D-STORM, основанный на определении точного положения отдельных флуорофоров с помощью анализа астигматизма оптических изображений, возникающего за счет введения цилиндрической линзы в оптический тракт микроскопа. Таким образом, PSF по X и по Y будет иметь разную эллиптичность при разных Z . Иными словами, фокальные плоскости для X и Y будут отличаться. Коррелируя зависимости эллиптичности по Z для направлений X и Y , определяют глубину

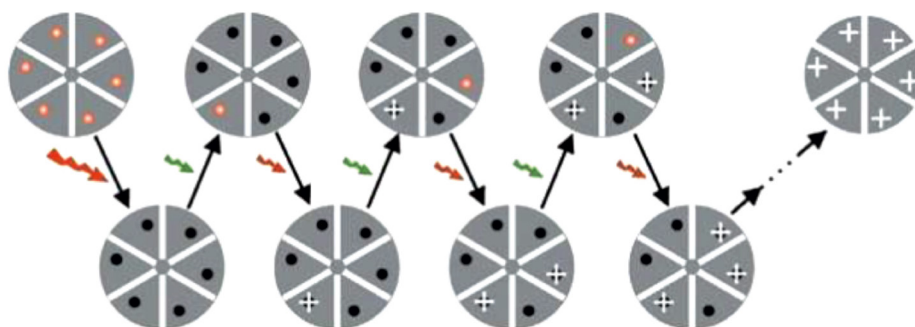


Рис. 4. Последовательность изображений STORM с использованием гипотетического гексамерного объекта, меченного красными флуорофорами, которые можно переключать между флуоресцентным и темным состоянием с помощью красного и зеленого лазеров. Все флуорофоры сначала переводятся в темное состояние импульсом красного лазера. В каждом цикле визуализации зеленый лазерный импульс используется для включения только части флуорофоров, образуя оптически разрешимый набор активных флуорофоров. Далее при красном освещении эти молекулы излучают флуоресценцию до тех пор, пока не выключатся, что позволяет с высокой точностью определить их положение (белые крестики). Затем общее изображение восстанавливается на основе положений флуорофора, полученных в результате нескольких циклов визуализации [36].

залегания флуорофора. С использованием данного подхода удалось достичь разрешения изображения в размере 20–30 нм в латеральном измерении и 50–60 нм в аксиальном измерении. В работе Albrecht et al. [41] представлен метод быстрой визуализации тканей на наноуровне (Rapid Imaging of Tissues at the Nanoscale, RAIN-STORM), улучшенный и масштабируемый подход к оптимизации наноскопических изображений, который улучшает 3D-визуализацию субклеточных мишеней в объеме ткани. По сути, RAIN-STORM – оптимизированная методика пробоподготовки и набор параметров для визуализации стандартных образцов тканей для широкого спектра молекулярных мишеней с использованием коммерчески доступных реагентов и систем визуализации. Также в статье Albrecht et al. [41] представлен избранный набор параметров 3D-визуализации тканей на основе разрешения, плотности маркировки антител и уменьшения фоновой флуоресценции. С помощью RAIN-STORM получены трехмерные наноскопические изображения для более чем 20 объектов, включая синапсы, нейроны, глию (рис. 5) и сосудистую сеть в сетчатке. Цикл измерений, начиная от подготовки образцов до получения изображений, занимает один день. Кроме того, метод можно применять к клиническим образцам для выявления

наноразмерных особенностей клеток и синапсов человека, что открывает путь для высокопроизводительных исследований наноскопических мишеней в тканях.

Микроскопия сверхвысокого разрешения 3D-STORM позволяет с наномасштабной точностью детектировать трехмерное пространственное положение флуорофоров. Так, Hu et al. [42] данным методом определили расположение зависимой от микротрубочек регуляции кластеров подосом, разрушающих матрикс, в макрофагах. Подосомы макрофагов – важная адгезионная архитектура на основе актина, они играют решающую роль в миграции клеток и инвазивности матрикса. Авторы определили ультраструктурную организацию кластеров подосом в первичных макрофагах, взаимную локализацию компонентов ядра и кольца подосомы, а также продемонстрировали, что микротрубочки проходят через подосомы в слой миозина (рис. 6). Пространственное разрешение достигло 20 и 50 нм в латеральном и аксиальном направлениях.

Наноскопию STORM применяют в сочетании с другими методиками, например, Kim et al. [43] предложили специфические протоколы подготовки образцов для STORM и методов электронной микроскопии (ЭМ). Данные протоколы реа-

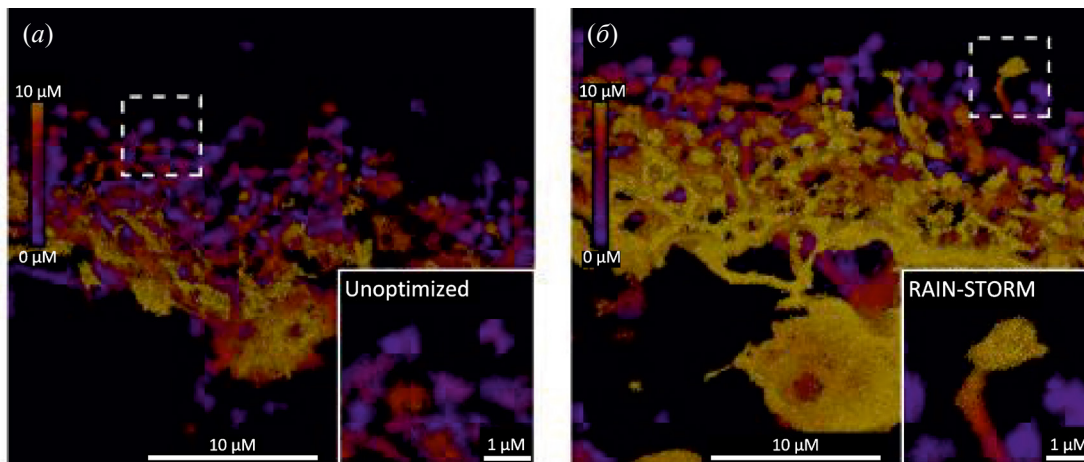


Рис. 5. (а) – Неоптимизированное изображение STORM горизонтальной клетки, меченной кальбиндином. Предполагаемые синапсы нечеткие, с малой определяющей морфологией или непрерывной структурой (неоптимизированная вставка); (б) – в оптимизированных условиях RAIN-STORM как горизонтальные синапсы клеток, так и их соединительные структуры помечены и расположены рядом (оптимизированная вставка), демонстрируя четкие структурные детали по всей ветви нейронов. Изображения репрезентативны от $n = 3$ животных. Изображения STORM имеют цветовую кодировку по глубине (от фиолетового – 0 мкм, до желтого – 10 мкм). Масштабные отрезки 10 и 1 мкм [41].

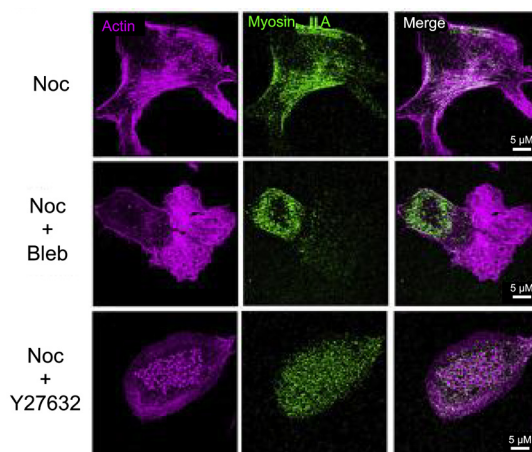


Рис. 6. Эффекты ингибирования передачи сигналов Rho/ROCK-миозина II на нокодазол-индуцированную разборку кластеров подосом. Репрезентативные двухцветные результаты STORM актина и миозина II в отдельных макрофагах, культивированных в течение 16 ч и затем обработанных Noc (10 мкМ), Noc (10 мкМ) + Y27632 (20 мкМ) и Noc (10 мкМ) + Bleb (20 мкМ) в течение 2 ч. Показаны отдельные изображения актина (фиолетовый) и миозина II (зеленый), а также наложенное изображение соответственно [42].

лизуют возможности получения ЭМ-изображений после STORM-наноскопии образца, а также наоборот – для реализации STORM после ЭМ. В качестве образцов, демонстрирующих успешность применения методик, авторы выбрали микро-трубочки и митохондрии клеток линии BS-C-1, а также филаменты вируса гриппа, отпочковавшиеся из инфицированных клеток.

5. PALM

PALM-микроскопия (photoactivation localization microscopy, микроскопия фотоактивируемой локализации) – это тип микроскопии сверхвысокого разрешения, который также основан на использовании флуоресцентных зондов – фотоактивируемых флуоресцентных белков, как и в

STORM, используются специфические органические красители. Впервые PALM была описана в 2006 г. [44], с помощью фотоактивируемого флуоресцирующего белка (Photoactivatable Fluorescent Protein, PAFP) авторы получили наномасштабное разрешение внутриклеточных белков, например, лизосомального трансмембранного белка CD63. Наряду с PALM, авторы также применяли TIRF-микроскопию и показали преимущество PALM в разрешении.

Простыми словами, принцип работы PAFP в PALM можно описать следующим образом. PAFP прикрепляются к интересующим молекулам или структурам, а затем образец освещается низкоинтенсивным лазером, чтобы активировать только небольшое подмножество PAFP. После активации PAFP излучают флуоресценцию, которую фиксирует камера. Затем активированные PAFP подвергаются фотообесцвечиванию, и, соответственно, больше не излучают флуоресценцию. Этот процесс повторяется несколько раз, при этом каждый раз активируются и визуализируются разные подмножества PAFP. Анализируя изображения активированных PAFP, локализацию каждой молекулы можно определить с высокой точностью. Затем эту информацию используют для восстановления изображения образца с высоким разрешением.

Однако, несмотря на преимущества сверхвысокого разрешения (10–50 нм в латеральном и 10–70 нм в аксиальном направлениях), PALM имеет существенное ограничение, т.к. в качестве меток используются только фотоактивируемые флуоресцентные белки (PA-FP), выборка которых на данный момент невелика.

Для получения 3D-изображений как в живых, так и в фиксированных препаратах используют метод iPALM (interferometric photoactivated localization microscopy, интерферометрическая фотоактивируемая локализационная микроскопия) [45]. Для получения iPALM в PALM интегрировали однофотонную многофазную интерферометрическую схему.

Несмотря на недостатки, PALM широко применяется для получения изображений различных внутриклеточных структур со сверхвысоким раз-

решением [46, 47], количественной оценки структурного созревания кардиомиоцитов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток [48], характеристики белков вирионов вируса иммунодефицита человека [49, 50], визуализации фагоцитирующих подосом во время фрустрированного фагоцитоза [51], визуализации петель хроматина [52, 53].

6. PAINT

PAINT – тип стохастической наноскопии, основанный на накоплении точек для последующего получения изображений методом наномасштабной топографии (PAINT, points accumulation for imaging in nanoscale topography), это разновидность метода SMLM [54]. Латеральное разрешение достигает 25 нм [54]. Особенность этого метода – использование свободно диффундирующих красителей или меченных красителем лигандов, нацеленных на интересующие молекулы путем постоянного или временного связывания, тогда как в других методах применяется мечение целевых молекул фиксированными флуорофорами. В PAINT поток молекул, попадающих на объект, зависит от коэффициента диффузии и градиента концентрации зондов. Молекула локализуется с высокой точностью в каждом отдельном событии связывания, после чего может быть получена карта сверхвысокого разрешения на основе локализации всех индивидуальных молекул-зондов.

На основе PAINT был разработан еще один метод анализа одиночных молекул для изучения кинетики ДНК-оригами – DNA-PAINT [55, 56]. Метод использует обратимое специфическое связывание меченых олигонуклеотидов с наноструктурами ДНК для визуализации со сверхвысоким разрешением вплоть до 30 нм.

Метод DNA-PAINT – это метод микроскопии сверхвысокого разрешения, в котором короткие одноцепочечные молекулы ДНК используются в качестве зондов для локализации конкретных мишеней с высокой точностью. Временное связывание коротких меченных красителем олигонуклеотидов с их комплементарными целевыми нитями создает необходимое “мигание”, позволяющее проводить стохастическую микроскопию сверхвы-

сокого разрешения [55]. Короткие одноцепочечные молекулы ДНК, называемые “цепями визуализации” или формирова́телями изображения, способны комплементарно связываться с определенной последовательностью на молекуле-мишени и метятся флуоресцентным красителем. Второй набор молекул ДНК, называемый “стыковочными цепями”, имеет последовательность, комплементарную цепям формирова́теля изображения, и также связаны с флуоресцентным красителем. Связывание стыковочных нитей с нитями формирова́теля изображения приводит к сближению двух флуоресцентных красителей, что позволяет создать яркий и специфический сигнал. DNA-PAINT успешно применялся для визуализации структуры и динамики различных клеточных компонентов, а также для изучения организации хроматина и экспрессии генов в клетках, локализации белков, организации ДНК и сигнальных путей клеток [57, 58].

Также разрабатываются зонды PAINT, не зависящие от ДНК. Эти зонды могут быть основаны на эндогенных взаимодействиях, сконструированных связующих веществах, слитых белках или синтетических молекулах и обеспечивать дополнительные приложения для SMLM [59, 60]. Например, показанный Riera et al. [61] метод Glyco-PAINT использует слабое и обратимое связывание сахара для непосредственного обнаружения и количественного определения одиночных молекул в клетках. Применяется для установления коэффициента диффузии рецептор – сахарный комплекс.

Еще один вариант метода – pPAINT (Protein Point Accumulation in Nanoscale Topography, точечное накопление белка в наноразмерной топографии) [62]. pPAINT использует связывающие домены сигнальных белков в качестве функциональных зондов для сайтов связывания на плазматической мембране, перемещая мишень визуализации на сам белок. Farrell et al. [62] использовали pPAINT для исследования пространственно-временного распределения фосфотирозин-связывающих SH2-доменов различных сигнальных и адаптерных молекул в активированных T-клетках на липидных бислоях.

В предложенном методе LIVE-PAINT (Live cell Imaging using reVersible intEractions PAINT) [63] за временные локализации, необходимые для SMLM, ответственны обратимые взаимодействия пептид–белок, а не связывание ДНК-олигонуклеотидов. Белок, который необходимо визуализировать, генетически слит с коротким пептидом и экспрессируется с помощью эндогенного промотора белка. Кроме того, интегрированный в подходящее место генома пептид-связывающий белок генетически слит с флуоресцентным белком и экспрессируется с помощью индуцируемого промотора, что позволяет контролировать и оптимизировать уровень его экспрессии.

7. MINFLUX

Одна из наиболее современных и совершенных методик MINFLUX (MINimal photon FLUXes) сочетает в себе принципы как стохастической микроскопии типа STORM/PALM, так и STED, и позволяет получать изображения биологических объектов с чрезвычайно высоким разрешением в трех измерениях [64, 65]. Для реализации методики MINFLUX используются два луча: луч для случайной фотоактивации одного из флуорофоров образца в зоне ~400 нм и возбуждающего луча, который локализует молекулы или отслеживает их перемещение. При этом осуществляется сканирование возбуждающим лучом, сформированным таким образом, что он имеет минимум интенсивности в фокусе. Этот минимум служит опорной координатой, при этом количество испускаемых фотонов уменьшается по мере приближения фокуса луча к флуорофору. Таким образом, если флуорофор расположен вблизи минимума интенсивности (центр фокуса возбуждающего пучка), он будет излучать лишь несколько фотонов флуоресценции, а любое небольшое смещение возбуждающего пучка приведет к увеличению числа испускаемых фотонов. Для непосредственной локализации флуорофора измерения проводят в четырех целевых точках, позволяющих определить локализацию флуорофора с точностью до 1 нм. Для выполнения 3D-измерений используется трехмерная кольцевая форма фокальной области возбуждающего луча с постепенно уменьшающимся диа-

метром. Аксиальное положение трехмерного минимума интенсивности контролируется с помощью электрически настраиваемой линзы, что позволяет перефокусироваться в диапазоне ~ 400 нм в течение 50 мкс. В целом указанный подход обеспечивает аксиальное разрешение порядка нескольких нанометров, а латеральное – до 1–3 нм в фиксированных и живых клетках [64, 66, 67] (рис. 7).

Развитие данного подхода – предложенный в 2023 г. интерферометрический микроскоп MINFLUX, который регистрирует движения белков с пространственно-временной точностью до 1.7 нм/мс [68, 69]. Такое прежде недостижимое

временное разрешение позволило изучить перемещение моторного белка кинезина-1 по микротрубочкам при физиологических концентрациях АТФ. Авторы обнаружили, что вращение ножки и головок кинезина без нагрузки происходит во время шагания, и показали, что АТФ захватывается одной головкой, связанной с микротрубочкой, а гидролиз АТФ происходит, когда связаны обе головки.

В 2022 г. Ostersehl et al. [70] использовали MINFLUX в сочетании с DNA-PAINT для получения изображений белковых комплексов в живых клетках со сверхвысоким разрешением. Они смогли визуализировать расположение белков,

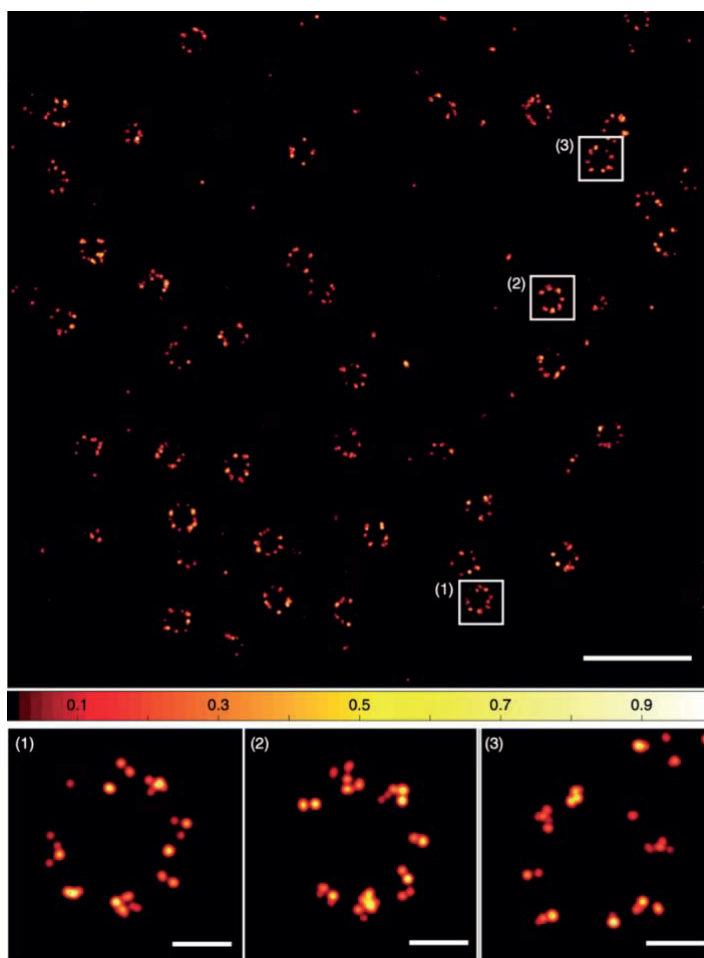


Рис. 7. Наноскопия MINFLUX клеток линии U-2 OS, экспрессирующих Nup96, белок комплекса ядерных пор (Nuclear Pore Complex, NPC), меченный органическим флуорофором Alexa Fluor 647 (сверху). Увеличенные фрагменты (ниже) показывают отдельные ядерные поры, где каждая точка выделяет группы локализаций, представляющих отдельные белки посредством их флуоресцентных меток. Масштабные отрезки: 500 нм (сверху), 50 нм (врезки) [64].

участвующих в репликации и восстановлении ДНК, что дало новое понимание этих фундаментальных клеточных процессов.

Недавняя работа Mulhall et al. [71] показала возможность применения MINFLUX для исследования механочувствительных ионных каналов PIEZO (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component, PIEZO), которые преобразуют силу в хемозлектрические сигналы и играют важную роль в различных физиологических условиях. PIEZO-каналы передают механическую силу посредством деформации обширных лопастей трансмембранных доменов, исходящих из центральной ионопроводящей поры. Благодаря наноскопии MINFLUX авторы показали, как эти каналы взаимодействуют с их естественной средой, и какие молекулярные движения лежат в основе активации.

В 2022 г. наноскопию MINFLUX впервые использовали для исследования бактерий и получения изображения бактериальной молекулярной машины (*Yersinia injectisome*) с точностью определения расположения белков и разрешением 5 нм [72].

Многоцветную 3D-наноскопию MINFLUX применили для визуализации плотно упакованных меченых белков – субъединиц комплекса MICOS (mitochondria contact site and cristae to outer membrane, место контакта митохондрий и крист с внешней мембраной), большого белкового комплекса внутри внутренней мембраны митохондрий, необходимого для структурной стабильности и организации крист. Pare et al. [73] продемонстрировали двухцветную 3D-наноскопию MINFLUX на митохондриях человека и показали, что данный тип наноскопии возможно использовать для визуализации субструктур органелл, обеспечивая точность 3D-локализации ~5 нм.

Подводя итог, можно с уверенностью сказать, что MINFLUX – передовой метод флуоресцентной наноскопии, который обеспечивает беспрецедентное пространственное разрешение, превосходит дифракционный предел и реализует детальное понимание молекулярных структур и динамики.

8. SIM

SIM использует периодически структурированное лазерное освещение для возбуждения флуоресценции образца. По сути, используется метод лазерной широкопольной микроскопии, где на пути луча возбуждения устанавливается подвижная дифракционная решетка [74], которая генерирует когерентные световые лучи, интерферирующие с образцом, что приводит к появлению эффекта муара, т.е. мультипликативного наложения двух периодических структур с отличными периодами с образованием высокочастотных пространственных паттернов. Одна из этих структур является пространственным распределением флуоресцентного красителя, а вторая – заведомо известной структурой освещения. В результате в наблюдаемой картине появляются муаровые полосы, связанные с интерференцией красителя и освещения. Получить искомую информацию возможно варьированием структуры освещения и сравнением результирующих структур. Разница между всеми результирующими структурами и будет содержать информацию об искомом распределении флуорофоров. Реконструкция получаемых изображений производится за счет обратного преобразования Фурье, что приводит к разделению пространственных частот и удвоению разрешения в трех измерениях. SIM обеспечивает разрешение в латеральной области 100–120 нм, а в аксиальной – до 300 нм. Разрешение восстановленного изображения излучающего объекта может быть улучшено как в латеральном, так и в аксиальном направлении при использовании суммы периодических схем освещения с разными фазами и ориентациями [75, 76]. Несмотря на изначально достаточное низкое разрешение, SIM нашла широкое применение благодаря тому, что не требует специфических флуорофоров, мощного лазерного возбуждения и имеет высокую скорость сканирования [74, 77]. На данный момент метод SIM – устаревшая методика из-за низкого разрешения, и в мире широко применяются различные вариации и комбинации SIM с другими методами сверхвысокого разрешения [78, 79],

такими как SIM-STORM [80], 3D SIM-STED [81, 82], TIRF-SIM [83, 84].

Одной из разработок, нашедших широкое применение, стала высокоскоростная многоцветная SIM (High Speed SIM, HS-SIM), функционирующая за счет применения волоконной SIM [85]. HS-SIM позволяет камере генерировать изображения с ограниченной частотой кадров и манипулировать ими в широком диапазоне длин волн. Схемы освещения генерируются путем объединения лазерных лучей в радиально противоположные пары волокон в шестиугольной одномодовой волоконной матрице, где выходные лучи передаются в заднюю фокальную плоскость объектива микроскопа. Фазовый переход и вращение диаграмм направленности контролируются быстродействующими электрооптическими устройствами, за счет чего скорость достигла 111 кадров SIM в секунду.

Один из распространенных и перспективных методов – микроскопия структурированного освещения со сверхразрешением (Super Resolution Structured Illumination Microscopy, SR-SIM) [86]. SR-SIM использует периодическую интерференционную картину с периодичностью, близкой к пределу оптической дифракции. Также метод не требует специфического мечения, высокой энергии возбуждения и большого количества фотонов флуоресценции. По этим причинам данный вид микроскопии – один из наиболее универсально применяемых оптических методов со сверхразрешением для широкого спектра биологических задач.

Большой вклад в улучшение качества изображений и разрешения вносят постобработки с использованием различного программного обеспечения. Так, в работе Ward et al. [87] представлена интерферометрическая микроскопия со структурированным освещением с поддержкой машинного обучения (Machine Learning Assisted Interferometric Structured Illumination Microscopy, MAI-SIM). MAI-SIM позиционируется как простой в реализации метод визуализации живых клеток со сверхвысоким разрешением на высокой скорости и в нескольких цветах. Прибор основан на конструкции интерферометра, в которой

паттерны освещения генерируются, вращаются и синхронизируются по фазе за счет движения гальванозеркала. Конструкция работает в широком диапазоне длин волн. Кроме прибора в работе представлен набор инструментов машинного обучения с открытым исходным кодом, который позволяет выполнять реконструкции изображений в реальном времени, обеспечивая мгновенную визуализацию со сверхвысоким разрешением.

Применение SIM описано во множестве обзоров, посвященных методам микроскопии сверхвысокого разрешения в различных областях биологических наук [8, 77, 78, 88]. Далее мы приведем некоторые частные примеры применения методов, основанных на SIM.

Волоконная HS-SIM была использована для получения многоцветных изображений микротрубочек и митохондрий клеток линии COS7 с субдифракционным разрешением [85] (рис. 8).

В работе Hong et al. [89] описана 3D-визуализация синаптических структур с помощью SIM. Для разработки матрицы преобразования использовали субдифракционные многоцветные флуоресцентные сферы размером 100–200 нм, затем полученную матрицу применяли к SIM-изображению для выравнивания цветовых каналов. Дальнейшая постобработка изображений позволила визуализировать в объеме с высоким

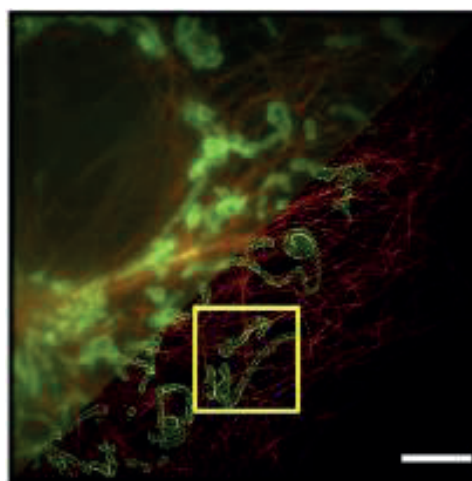


Рис. 8. Возможности многоцветной высокоскоростной SIM. Поле зрения 33×33 мкм, микротрубочки показаны красным, митохондрии – зеленым. Масштабный отрезок 5 мкм [85].

разрешением центры иммунореактивных пятен пресинаптического маркера синаптофизина и постсинаптического PSD-95, находящиеся в пределах 200 нм друг от друга.

3D-SIM использовали для обнаружения иммуногистохимических сигналов нервно-мышечных синапсов личинок дрозофилы с окрашенными пре- и постсинаптическими компонентами [90, 91]. Латеральное и аксиальное разрешение 3D-SIM составило ~100 и ~250 нм соответственно.

В работе Miao et al. [92] благодаря 2D- и 3D-SIM-визуализации (рис. 9) были выявлены места назначения белков рецептор-связывающего домена (RBD, receptor-binding domain) SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) и ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2), а также движение и созревание солокализованных везикул ACE2/RBD в живых клетках, движение везикул по микротрубочкам. В результате было показано, что инфицирующие вирусные RBD и, возможно, другие капсидные белки в конечном итоге захватываются и расщепляются лизосомами, даже если вирусная РНК стимулирует образование нового вируса.

9. RIM

Микроскопия со случайным освещением (Random Illumination Microscopy, RIM) преодолевает дифракционный барьер благодаря случайному спекл-освещению (Speckled Illumination), а построение изображений происходит за счет ста-

тистической реконструкции. По сравнению с классической SIM, метод RIM более устойчив к оптическим aberrациям и рассеянию, вносимым толстыми (сотни микрометров) образцами, линейен по яркости и совместим с многоцветной визуализацией, за счет чего считается более надежным методом визуализации живых клеток в течение длительных периодов времени. Впервые принцип RIM был предложен в 2012 г. [93]. Концепция RIM заключается в освещении образца несколькими неконтролируемыми спеклами и извлечении изображения со сверхразрешением из множества полученных изображений с низкими пространственными частотами. При этом разрешение метода оставалось слишком низким для визуализации субклеточной динамики, и в 2021 г. был предложен собственно метод RIM, основанный на спекл-освещении, который обеспечивает уровень сверхразрешения, сопоставимый с 3D SIM [94]. В 2022 г. опубликован [95] алгоритм реконструкции для флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, основанный на спекл-освещении и дисперсионном сопоставлении изображений – algoRIM. Алгоритм обеспечивает сверхразрешение с коэффициентом два с точки зрения количества изображений и соотношения сигнал/шум. Кроме того, предложен подход увеличения разрешения RIM за счет учета корреляции испускаемых фотонов [96].

На сегодняшний день метод RIM не популярен, но, исходя из его достоинств, он, вероятно, получит широкое распространение. Уже в 2023 г.

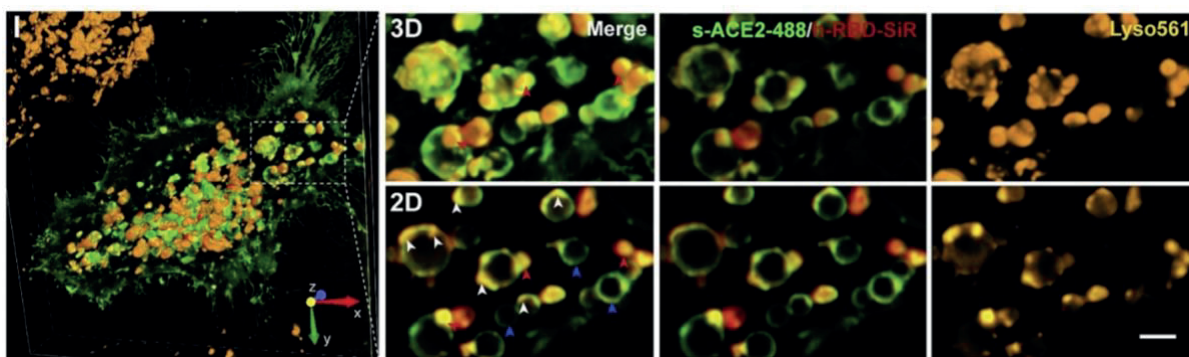


Рис. 9. 3D-SIM и увеличенное 2D/3D-изображение живых клеток HeLa, инкубированных с 25 нМ h-RBD-SiR в течение 10 ч. Масштабный отрезок 2 мкм [92].

была опубликована статья о комбинированном методе TIRF-RIM [97]. В TIRF-RIM образец освещается в условиях TIRF, но с добавлением случайно генерируемых спеклов. Эти спеклы создаются путем пропускания света освещения через рассеиватель или использования пространственных модуляторов света. В процессе измерений происходит регистрация нескольких изображений образца и восстановление изображения со сверхразрешением на основе их дисперсии. Оказалось, что TIRF-RIM превосходит стандартную TIRF-микроскопию более чем вдвое в разрешении и гораздо высоком контрасте с минимальным размытием вне фокуса. TIRF-RIM обеспечила разрешение кольцевой формы покрытых клатрином ямок (специализированные участки на плазматической мембране, которые концентрируют рецепторы) фиксированных клеток линии COS-7 и позволила получить изображение базальной поверхности фиксированных макрофагов с разрешением 86 нм. Также с использованием TIRF-RIM было получено двухцветное динамическое изображение нанокластеров паксиллина с пространственным (96–120 нм) и временным (1–8 Гц) разрешением.

10. TIRF

TIRF позволяет визуализировать флуоресцентные молекулы, расположенные вблизи границы раздела сред с существенным различием показателей преломления, таких как стекло/вода или стекло/образец [98, 99]. Высокое аксиальное разрешение достигается за счет возбуждения затухающей (эванесцентной) волны, которая, в свою очередь, возбуждает флуорофоры вместо прямого освещения. Эванесцентное поле возникает в тот момент, когда падающий свет полностью отражается на границе раздела двух прозрачных сред с разными показателями преломления. В биологических приложениях границей раздела, как правило, является покровное стекло и слой водного раствора между покровным стеклом и прикрепленными клетками. Возбуждающий свет проходит через стеклянную подложку к водному образцу под достаточно малым углом, так что происходит полное внутреннее отражение из-за уменьшения показателя преломления на

границе раздела стекло/вода. Поскольку энергия эванесцентного поля экспоненциально убывает с расстоянием до границы раздела, возбуждаются только флуорофоры, находящиеся в непосредственной близости к покровному стеклу. Это эффективно исключает фоновую флуоресценцию из основной массы образца и, тем самым, способствует достижению достаточно высокого отношения сигнал/шум для обнаружения одиночных молекул в широком поле зрения. Кроме того, микроскопия TIRF позволяет получать изображения с исключительно высоким аксиальным разрешением (< 100 нм) [100]. Это позволяет наблюдать мембраносвязанные процессы, такие как клеточная адгезия, связывание гормонов, транспорт молекул, а также процессы экзоцитоза и эндоцитоза (например, высвобождение и поглощение нейромедиаторов) [101]. Однако латеральное разрешение TIRF по-прежнему ограничено дифракционным пределом и составляет ~200–300 нм. Распространяющиеся (не эванесцентные) волны, возникающие из-за несовершенства оптики или из-за рассеяния света самим образцом, возбуждают флуоресцентные маркеры в объеме образца, что приводит к расфокусированной флуоресценции, отрицательно влияющей на контрастность изображения.

TIRF также сочетают с другими методами наноскопии с целью увеличения соотношения сигнал/шум [102]. Так, Fan et al. [103] предложили метод повышения точности аксиальной локализации в SMLM путем объединения с методикой TIRF. Недавняя передовая работа в области 3D TIRF представила многоугловой TIRF (MA-TIRF, Multiangle Total Internal Reflection Fluorescence) [104], который основан на использовании различных углов засветки. Этот метод позволяет исследовать образцы на глубине до 400 нм с аксиальным разрешением 10–20 нм и латеральным разрешением, ограниченным дифракционным пределом. Сочетание MA-TIRF с микроскопией локализации одиночных молекул (SMLM) позволило картировать топографию клеточной мембраны. Была восстановлена средняя трехмерная топографическая карта поверхности T-клеток и L-селектина на основе измерений с

тремя разными углами падения (65.5, 66.8 и 68.6°) [105] (рис. 10).

Изображения TIRF были получены путем последовательной визуализации и фотообесцвечивания флуоресцентных молекул из нескольких слоев в пределах нормальной зоны возбуждения TIRF. Глубину затухающей волны на разных слоях изменяли путем настройки угла падения возбуждающего света. Реконструкция изображений TIRF позволила получить 3D-изображение биологических образцов с аксиальным разрешением 20 нм и максимальной глубиной 250 нм. В каждом оптическом “срезе” применяли SMLM, что обеспечило латеральное разрешение ~100 нм.

Также недавно был разработан фотометрический метод локализации одиночных флуоресцентных молекул с нанометровой точностью в аксиальном направлении TIRF-микроскопа [106] – микроскопия сверхкритического освещения и фотометрическая z -локализация с повышенным разрешением (SIMPLER, Supercritical Illumination Microscopy Photometric z -Localization with Enhanced Resolution). SIMPLER – фотометрический метод декодирования аксиального положения одиночных молекул во флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [106]. SIMPLER не требует какой-либо аппаратной модификации обычного TIRF-микроскопа и дополняет любой метод 2D-микроскопии локализации одиночных молекул для получения 3D-изображений с почти

изотропным наномасштабным разрешением. SIMPLER позволяет определять аксиальное положение (z) одиночных молекул на основе учета трех параметров: z -зависимости интенсивности возбуждения, z -зависимости углового излучения и независимой от z латеральной функции рассеяния точки от одиночной молекулы. Также SIMPLER можно сочетать с DNA-PAINT и STORM, достигая точности аксиальной локализации < 10 и 20 нм соответственно во всем аксиальном диапазоне до 250 нм.

В микроскопии TIRF-SIM структурированное освещение ограничено плоскостью TIRF, являющейся границей раздела между стеклом и водной средой [84, 107]. Используя пространственный модулятор света, система TIRF-SIM может проецировать структурированное освещение образца со сдвигом по углу и фазе с достаточной скоростью для поддержки визуализации живых клеток. Это позволяет использовать более мягкое освещение SIM для получения изображений живых клеток с улучшенным разрешением. TIRF-SIM обеспечивает более высокое пространственное разрешение, чем стандартная 2D-SIM, и требует меньшего времени сбора данных, чем 3D-SIM, из-за ограничения до двух измерений.

Подобно традиционной флуоресцентной микроскопии, возможности TIRF-SIM ограничены случаем слабо флуоресцирующих и динамических образцов: длительное время сбора данных при-

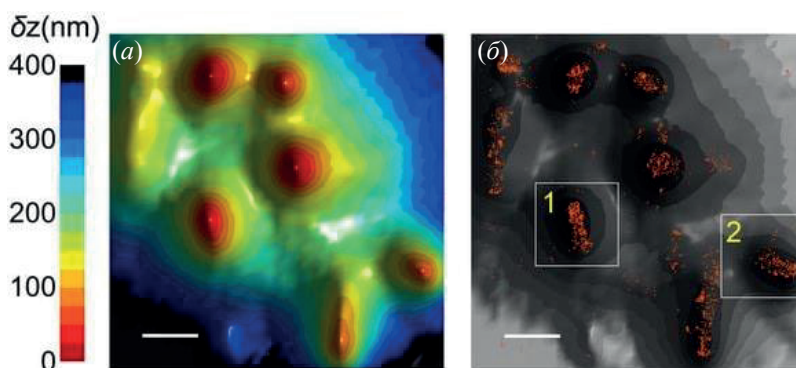


Рис. 10. Локализация L-селектина и CD44 на трехмерной топографии поверхности Т-клеток. (а) – Трехмерная реконструкция поверхности покоящейся мембраны Т-клеток человека с использованием МА-TIRFM; (б) – карта локализации молекул L-селектина (оранжевые точки), наложенная на карту реконструкции 3D-поверхности из панели (а). Масштабный отрезок 0.5 мкм [105].

водит к размытию движения, в то время как короткое время сбора данных приводит к получению изображений с низким соотношением сигнал/шум и ошибкам в процессе реконструкции. Для преодоления указанных недостатков Roth et al. [84] разработали систему TIRF-SIM с зеркалами с пьезосканированием и интерферометром Майкельсона для расщепления луча. Данная схема позволяет одновременно получать двухцветные изображения TIRF-SIM, тем самым сокращая время измерений. Также Roth et al. [84] продемонстрировали, что TIRF-SIM предлагает пространственное разрешение, близкое к 110 нм, с объективом $NA = 1.46$. Ключевое применение системы – отображение динамических белков, таких как MreB в бактериях и актина в эукариотических клетках, которые слабо флуоресцируют и обладают высокой динамикой.

В последнее время стала популярной и довольно многообещающей наноскопия на основе фотонных чипов (chip-TIRF) [108, 109]. Метод основан на использовании фотонного чипа, который используется как подложка для образца и, в то же время, обеспечивает возбуждающее освещение для флуоресценции. Обычно фотонный чип состоит из нескольких слоев: базовой кремниевой подложки, слоя диоксида кремния, биосовместимого основного слоя – волновода, пропускающего видимый свет и обеспечивающего полное внутреннее отражение, который состоит из нитрида кремния или пентаоксида тантала. Соответственно, на поверхности волновода возникает затухающее поле с дальностью освещения до ~150–200 нм, которое используется для возбуждения флуоресцентных маркеров, расположенных вблизи поверхности, а образцы размещаются непосредственно на поверхности волновода.

В работе Villegas-Hernández et al. [109] описаны протоколы окрашивания и параметры визуализации, необходимые для микроскопии образцов тканей на основе фотонных чипов, а также проблемы и преимущества, предлагаемые этой платформой визуализации для исследования срезов тканей. Кроме того, как утверждают авторы [109], их исследование микроскопии срезов тканей сверхвысокого разрешения на основе фотонных чипов является первым. Также впервые приведены

исследования плаценты человека и тканей почек человека со сверхвысоким разрешением с использованием методов оптической наноскопии, основанных на флуктуациях интенсивности.

11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия открытие принципов микроскопии сверхвысокого разрешения привело к разработке большого числа методов, которые способны выявлять особенности объектов на наночастице. Флуоресцентная наноскопия открыла новое понимание многих внутриклеточных, молекулярных, сигнальных процессов, а также важных процессов формирования мембран, движения рецепторов и многих других. Нам представлялось важным показать ряд самых современных работ, использующих методы флуоресцентной наноскопии в различных областях биологии, и, таким образом, отразить широту применения и высокую скорость развития наноскопии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10071 (<https://rscf.ru/project/23-24-10071/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abbe E.* // Archiv für mikroskopische Anatomie. 1873. V. 9. P. 413–468.
<https://doi.org/10.1007/BF02956173>
2. *Minsky M.* // Scanning. 1988. V. 10. P. 128–138.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>
3. *Kaiser W., Garrett C.* // Phys. Rev. Lett. 1961. V. 7. P. 229–231.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229>
4. *Hell S.W., Stelzer E.H.K., Lindek S., Cremer C.* // Opt. Lett. 1994. V. 19. P. 222–224.
<https://doi.org/10.1364/OL.19.000222>

5. *Bahlmann K., Jakobs S., Hell S.W.* // *Ultramicroscopy*. 2001. V. 87. P. 155–164.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(00\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(00)00092-9)
6. *Khater I.M., Nabi I.R., Hamarneh G.* // *Patterns*. 2020. V. 1. P. 100038.
<https://doi.org/10.1016/j.patter.2020.100038>
7. *Gong J., Jin Z., Chen H., He J., Zhang Y., Yang X.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023. V. 196. P. 114791.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114791>
8. *Werner C., Sauer M., Geis C.* // *Chem. Rev.* 2021. V. 121. P. 11971–12015.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01174>
9. *Jacquemet G., Carisey A.F., Hamidi H., Henriques R., Leterrier C.* // *J. Cell Sci.* 2020. V. 133. P. jcs240713.
<https://doi.org/10.1242/jcs.240713>
10. *Vicidomini G., Bianchini P., Diaspro A.* // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. P. 173–182.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>
11. *Hell S.W., Wichmann J.* // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 780–782.
<https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>
12. *Hell S.W., Kroug M.* // *Appl. Phys. B.* 1995. V. 60. P. 495–497.
<https://doi.org/10.1007/BF01081333>
13. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov A.E.* // *Ultramicroscopy*. 2017. V. 182. P. 118–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
14. *Heine J., Wurm C.A., Keller-Findeisen J., Schönle A., Harke B., Reuss M., Winter F.R., Donnert G.* // *Rev. Sci. Instrum.* 2018. V. 89. P. 053701.
<https://doi.org/10.1063/1.5020249>
15. *Blom H., Widengren J.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. V. 20. P. 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.06.004>
16. *Berning S., Willig K.I., Steffens H., Dibaj P., Hell S.W.* // *Science*. 2012. V. 335. P. 551–552.
<https://doi.org/10.1126/science.1215369>
17. *Masch J.-M., Steffens H., Fischer J., Engelhardt J., Hubrich J., Keller-Findeisen J., D'Este E., Urban N.T., Grant S.G.N., Sahl S.J., Kamin D., Hell S.W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. E8047–E8056.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1807104115>
18. *Pfeiffer T., Poll S., Bancelin S., Angibaud J., Inavalli V.K., Keppler K., Mittag M., Fuhrmann M., Nägerl U.V.* // *Elife*. 2018. V. 7. P. 1–17.
<https://doi.org/10.7554/eLife.34700>
19. *Steffens H., Wegner W., Willig K.I.* // *Methods*. 2020. V. 174. P. 42–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.020>
20. *Calovi S., Soria F.N., Tønnesen J.* // *Neurobiol. Dis.* 2021. V. 156. P. 105420.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105420>
21. *Katsube S., Koganezawa N., Hanamura K., Cuthill K.J., Tarabykin V., Ambrozkiwicz M.C., Kawabe H.* // *Neurosci. Lett.* 2023. V. 797. P. 137059.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137059>
22. *Scharrig E., Sanmillan M.L., Giraudo C.G.* // *Methods Cell Biol.* 2023.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2023.01.018>
23. *Carravilla P., Dasgupta A., Zhurgenbayeva G., Danylchuk D.I., Klymchenko A.S., Sezgin E., Eggeling C.* // *Biophys. Rep.* 2021. V. 1. P. 100023.
<https://doi.org/10.1016/j.bpr.2021.100023>
24. *Spahn C., Grimm J.B., Lavis L.D., Lampe M., Heilemann M.* // *Nano Lett.* 2019. V. 19. P. 500–505.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b04385>
25. *Sauer M., Heilemann M.* // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 7478–7509.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00667>
26. *Keller J., Schönle A., Hell S.W.* // *Opt. Express*. 2007. V. 15. P. 3361–3371.
<https://doi.org/10.1364/oe.15.003361>
27. *Rittweger E., Rankin B.R., Westphal V., Hell S.W.* // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 442. P. 483–487.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.06.017>
28. *Sharma R., Singh M., Sharma R.* // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. V. 231. P. 117715.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117715>
29. *Zhang P., Goodwin P.M., Werner J.H.* // *Opt. Express*. 2014. V. 22. P. 12398–12409.
<https://doi.org/10.1364/OE.22.012398>
30. *Yu W., Ji Z., Dong D., Yang X., Xiao Y., Gong Q., Xi P., Shi K.* // *Laser Photonics Rev.* 2016. V. 10. P. 147–152.
<https://doi.org/10.1002/lpor.201500151>
31. *Frawley A.T., Wycisk V., Xiong Y., Galiani S., Sezgin E., Urbančič I., Jentsch A.V., Leslie K.G., Eggeling C., Anderson H.L.* // *Chem. Sci.* 2020. V. 11. P. 8955–8960.
<https://doi.org/10.1039/D0SC02447C>
32. *Damenti M., Coceano G., Pennacchietti F., Bodén A., Testa I.* // *Neurobiol. Dis.* 2021. V. 155. P. 105361.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105361>

33. *Sahl, S.J., Hell, S.W.* // In: High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology / Eds. Bille J. Cham: Springer, 2019. P. 3–32.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-16638-0_1
34. *Boden A., Pennacchiotti F., Coceano G., Damenti M., Ratz M., Testa I.* // Nat. Biotechnol. 2021. V. 39. P. 609–618.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-00779-2>
35. *Willig K.I.* // iScience. 2022. V. 25. P. 104961.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104961>
36. *Rust M.J., Bates M., Zhuang X.W.* // Nat. Methods. 2006. V. 3. P. 793–795.
<https://doi.org/10.1038/nmeth929>
37. *Hess S.T., Girirajan T.P.K., Mason M.D.* // Biophys. J. 2006. V. 91. P. 4258–4272.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>
38. *Kikuchi K., Adair L.D., Lin J., New E.J., Kaur A.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2023. V. 62. P. e202204745.
<https://doi.org/10.1002/anie.202204745>
39. *Li H., Vaughan J.C.* // Chem. Rev. 2018. V. 118. P. 9412–9454.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00767>
40. *Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X.* // Science. 2008. V. 319. P. 810–813.
<https://doi.org/10.1126/science.1153529>
41. *Albrecht N.E., Jiang D., Akhanov V., Hobson R., Speer C.M., Robichaux M.A., Samuel M.A.* // Cell Rep. Methods. 2022. V. 2. P. 100253.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100253>
42. *Hu F., Zhu D., Dong H., Zhang P., Xing F., Li W., Yan R., Zhou J., Xu K., Pan L., Xu J.* // iScience. 2022. V. 25. P. 105514.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105514>
43. *Kim D., Deerinck T.J., Sigal Y.M., Babcock H.P., Ellisman M.H., Zhuang X.* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0124581.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124581>
44. *Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F.* // Science. 2006. V. 313. P. 1642–1645.
<https://doi.org/10.1126/science.1127344>
45. *Shtengel G., Galbraith J.A., Galbraith C.G., Lippincott-Schwartz J., Gillette J.M., Manley S., Sougrat R., Waterman C.M., Kanchanawong P., Davidson M.W., Fetter R.D., Hess H.F.* // PNAS. 2009. V. 106. P. 3125–3130.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813131106>
46. *Shtengel G., Wang Y., Zhang Z., Goh W.I., Hess H.F., Kanchanawong P.* // Methods Cell Biol. 2014. V. 123. P. 273–294.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00015-X>
47. *Baddeley D., Bewersdorf J.* // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 965–989.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014801>
48. *Lemcke H., Skorska A., Lang C.I., Johann L., David R.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2819.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082819>
49. *Saha I., Saffarian S.* // Biophys. J. 2020. V. 119. P. 581–592.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.023>
50. *Chojnacki J., Eggeling C.* // Retrovirology. 2018. V. 15. P. 41.
<https://doi.org/10.1186/s12977-018-0424-3>
51. *Herron J.C., Hu S., Watanabe T., Nogueira A.T., Liu B., Kern M.E., Aaron J., Taylor A., Pablo M., Chew T.L., Elston T.C., Hahn K.M.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 4363.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32038-0>
52. *Parteka-Tojek Z., Zhu J.J., Lee B., Jodkowska K., Wang P., Aaron J., Chew T.L., Banecki K., Plewczynski D., Ruan Y.* // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 8582.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12568-9>
53. *Trzaskoma P., Ruszczycki B., Lee B., Pels K.K., Krawczyk K., Bokota G., Szczepankiewicz A.A., Aaron J., Walczak A., Śliwińska M.A., Magalska A., Kadlof M., Wolny A., Parteka Z., Arabasz S., Kiss-Arabasz M., Plewczynski D., Ruan Y., Wilczyński G.M.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 2120.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15987-2>
54. *Sharonov A., Hochstrasser R.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 18911–18916.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>
55. *Schnitzbauer J., Strauss M., Schlichthaerle T., Schueder F., Jungmann R.* // Nat. Protoc. 2017. V. 12. P. 1198–1228.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>
56. *Jungmann R., Avendano M.S., Woehrstein J.B., Dai M., Shih W.M., Yin P.* // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 313–318.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2835>
57. *Niederauer C., Nguyen C., Wang-Henderson M., Stein J., Strauss S., Cumberworth A., Stehr F., Jungmann R., Schwillle P., Ganzinger K.A.* // Nat. Commun. 2023. V. 14. P. 4345.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40065-8>

58. Brockman J.M., Su H., Blanchard A.T., Duan Y., Meyer T., Quach M.E., Glazier R., Bazrafshan A., Bender R.L., Kellner A.V., Ogasawara H., Ma R., Schueder F., Petrich B.G., Jungmann R., Li R., Mattheyses A.L., Ke Y., Salaita K. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 1018–1024.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0929-2>
59. Tholen M.M.E., Tas R.P., Wang Y., Albertazzi L. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2023. V. 59. P. 8332–8342.
<https://doi.org/10.1039/d3cc00757j>
60. Chang Y., Kim D.H., Zhou K., Jeong M.G., Park S., Kwon Y., Hong T.M., Noh J., Ryu S.H. // *Exp. Mol. Med.* 2021. V. 53. P. 384–392.
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00572-4>
61. Riera R., Hogervorst T.P., Doelman W., Ni Y., Pujals S., Bolli E., Codée J.D.C., van Kasteren S.I., Albertazzi L. // *Nat. Chem. Biol.* 2021. V. 17. P. 1281–1288.
<https://doi.org/10.1038/s41589-021-00896-2>
62. Farrell M.V., Nunez A.C., Yang Z., Pérez-Ferreros P., Gaus K., Goyette J. // *Sci. Signal*. 2022. V. 15. P. eabg9782.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.abg9782>
63. Oi C., Gidden Z., Holyoake L., Kantelberg O., Mochrie S., Horrocks M.H., Regan L. // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. P. 458.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01188-6>
64. Gwosch K.C., Pape J.K., Balzarotti F., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Hell S.W. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 217–224.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0688-0>
65. Balzarotti F., Eilers Y., Gwosch K.C., Gynnå A.H., Westphal V., Stefani F.D., Elf J., Hell S.W. // *Science*. 2017. V. 355. P. 606–612.
<https://doi.org/10.1126/science.aak9913>
66. Prakash K., Curd A.P. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 48–51.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01694-x>
67. Gwosch K.C., Balzarotti F., Pape J.K., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Matti U., Schmidt R., Sahl S.J., Hell S.W. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 52–54.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01695-w>
68. Wolff J.O., Scheiderer L., Engelhardt T., Engelhardt J., Matthias J., Hell S.W. // *Science*. 2023. V. 379. P. 1004–1010.
<https://doi.org/10.1126/science.ade2650>
69. Deguchi T., Iwanski M.K., Schentarra E.M., Heidebrecht C., Schmidt L., Heck J., Weihs T., Schnorrenberg S., Hoess P., Liu S., Chevyreva V., Noh K.M., Kapitein L.C., Ries J. // *Science*. 2023. V. 379. P. 1010–1015.
<https://doi.org/10.1126/science.ade2676>
70. Ostersehl L.M., Jans D.C., Wittek A., Keller-Findeisen J., Inamdar K., Sahl S.J., Hell S.W., Jakobs S. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 1072–1075.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01577-1>
71. Mulhall E.M., Gharpure A., Lee R.M., Dubin A.E., Aaron J.S., Marshall K.L., Spencer K.R., Reiche M.A., Henderson S.C., Chew T.L., Patapoutian A. // *Nature*. 2023. V. 620. P. 1117–1125.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06427-4>
72. Carsten A., Rudolph M., Weihs T., Schmidt R., Jansen I., Wurm C.A., Diepold A., Failla A.V., Wolters M., Aepfelbacher M. // *Methods Appl. Fluoresc.* 2022. V. 11.
<https://doi.org/10.1088/2050-6120/aca880>
73. Pape J.K., Stephan T., Balzarotti F., Büchner R., Lange F., Riedel D., Jakobs S., Hell S.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. P. 20607–20614.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2009364117>
74. Gustafsson M.G.L. // *J. Microsc.* 2000. V. 198. P. 82–87.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>
75. Gustafsson M.G.L., Shao L., Carlton P.M., Wang C.J.R., Golubovskaya I.N., Cande W.Z., Agard D.A., Sedat J.W. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. P. 4957–4970.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120345>
76. Manton J.D. // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2022. V. 380. P. 20210109.
<https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0109>
77. Zhao T., Wang Z., Chen T., Lei M., Yao B., Bianco P.R. // *Front. Phys.* 2021. V. 9. P. 672555.
<https://doi.org/10.3389/fphy.2021.672555>
78. Chen X., Zhong S., Hou Y., Cao R., Wang W., Li D., Dai Q., Kim D., Xi P. // *Light Sci. Appl.* 2023. V. 12. P. 172.
<https://doi.org/10.1038/s41377-023-01204-4>
79. Wang M., Chen J., Wang L., Zheng X., Zhou J., Zeng Y., Qu J., Shao Y., Gao B.Z. // *Chemosensors*. 2021. V. 9. P. 364.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors9120364>

80. Hamel V., Guichard P., Fournier M., Guiet R., Fluckiger I., Seitz A., Gonczy P. // *Biomed. Opt. Express*. 2014. V. 5. P. 3326–3336.
<https://doi.org/10.1364/BOE.5.003326>
81. Dake F. // *Opt. Rev.* 2016. V. 23. P. 587–595.
<https://doi.org/10.1007/s10043-016-0234-6>
82. Xue Y., So P.T.C. // *Opt. Express*. 2018. V. 26. P. 20920–20928.
<https://doi.org/10.1364/OE.26.020920>
83. Fiolka R., Beck M., Stemmer A. // *Opt. Lett.* 2008. V. 33. P. 1629–1631.
<https://doi.org/10.1364/OL.33.001629>
84. Roth J., Mehl J., Rohrbach A. // *Biomed. Opt. Express*. 2020. V. 11. P. 4008–4026.
<https://doi.org/10.1364/BOE.391561>
85. Hinsdale T.A., Stallinga S., Rieger B. // *Biomed. Opt. Express*. 2021. V. 12. P. 1181–1194.
<https://doi.org/10.1364/BOE.416546>
86. Heintzmann R., Huser T. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 13890–13908.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>
87. Ward E.N., Hecker L., Christensen C.N., Lamb J.R., Lu M., Mascheroni L., Chung C.W., Wang A., Rowlands C.J., Schierle G.S.K., Kaminski C.F. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 7836.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35307-0>
88. Mennella V. // In: *Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)* / Eds. Ralph A., Hart B.G.W., Stahl P.D. Academic Press, 2023. P. 105–121.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00116-4>
89. Hong S., Wilton D.K., Stevens B., Richardson D.S. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1538. P. 155–167.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6688-2_12
90. Sulkowski M.J., Han T.H., Ott C., Wang Q., Verheyen E.M., Lippincott-Schwartz J., Serpe M. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. P. e1005810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005810>
91. Badawi Y., Nishimune H. // *Neurosci. Lett.* 2020. V. 715. P. 134644.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134644>
92. Miao L., Yan C., Chen Y., Zhou W., Zhou X., Qiao Q., Xu Z. // *Cell Chem. Biol.* 2023. V. 30. P. 248–260.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.02.001>
93. Mudry E., Belkebir K., Girard J., Savatier J., Le Moal E., Nicoletti C., Allain M., Sentenac A. // *Nat. Photon.* 2012. V. 6. P. 312–315.
<https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.83>
94. Mangeat T., Labouesse S., Allain M., Negash A., Martin E., Guérolé A., Poincloux R., Estibal C., Bouissou A., Cantaloube S., Vega E., Li T., Rouvière C., Allart S., Keller D., Debarnot V., Wang X.B., Michaux G., Pinot M., Le Borgne R., Tournier S., Suzanne M., Idier J., Sentenac A. // *Cell Rep. Methods*. 2021. V. 1. P. 100009.
<https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100009>
95. Labouesse S., Idier J., Sentenac A., Mangeat T., Allain M. // *Random Illumination Microscopy from Variance Images / 28th European Signal Processing Conference (EUSIPCO)*, Amsterdam, Netherlands, 2021. P. 785–789.
<https://doi.org/10.23919/Eusipco47968.2020.9287651>
96. Liu P. // *Appl. Opt.* 2022. V. 61. P. 2910–2914.
<https://doi.org/10.1364/AO.452709>
97. Affannoukoué K., Labouesse S., Maire G., Galais L., Savatier J., Allain M., Rasedujjaman M., Legoff L., Idier J., Poincloux R., Pelletier F., Leterrier C., Mangeat T., Sentenac A. // *Optica*. 2023. V. 10. P. 1009–1017.
<https://doi.org/10.1364/OPTICA.487003>
98. Axelrod D. // *Traffic*. 2001. V. 2. P. 764–774.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x>
99. Janco M., Dedova I., Bryce N.S., Hardeman E.C., Gunning P.W. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 879–885.
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00720-6>
100. Shen H., Huang E., Das T., Xu H., Ellisman M., Liu Z. // *Opt. Express*. 2014. V. 22. P. 10728–10734.
<https://doi.org/10.1364/OE.22.010728>
101. Fish K.N. // *Curr. Protoc. Cytom.* 2009. V. 12. P. Unit12.18.
<https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1218s50>
102. McCluskey K., Dekker N.H. // *Opt. Commun.* 2023. V. 538. P. 129474.
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2023.129474>
103. Fan D., Cnossen J., Hung S.-T., Kromm D., Dekker N.H., Verbiest G.J., Smith G.S. // *Opt. Commun.* 2023. V. 542. P. 129548.
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2023.129548>
104. Soubies E., Radwanska A., Grall D., Blanc-Féraud L., Van Obberghen-Schilling E., Schaub S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1926.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36119-3>
105. Jung Y., Riven I., Feigelson S.W., Kartvelishvili E., Tohya K., Miyasaka M., Alon R., Haran G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. E5916–E5924.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1605399113>

106. Szalai A.M., Siarry B., Lukin J., Williamson D.J., Unsain N., Cáceres A., Pilo-Pais M., Acuna G., Refojo D., Owen D.M., Simoncelli S., Stefani F.D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 517.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20863-0>
107. Young L.J., Ströhl F., Kaminski C.F.A. // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 111. P. e53988.
<https://doi.org/10.3791/53988>
108. Opstad I.S., Ströhl F., Fantham M., Hockings C., Vanderpoorten O., van Tartwijk F.W., Lin J.Q., Tinguely J.-C., Dullo F.T., Kaminski-Schierle G.S., Ahluwalia B.S., Kaminski C.F. // *J. Biophotonics.* 2020. V. 13. P. e201960222.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201960222>
109. Villegas-Hernández L.E., Dubey V., Nystad M., Tinguely J.-C., Coucheron D.A., Dullo F.T., Priyadarshi A., Acuña S., Ahmad A., Mateos J.M., Barmettler G., Ziegler U., Birgisdottir Á.B., Karlsson Hovd A.-M., Fenton K.A., Acharya G., Agarwal K., Ahluwalia B.S. // *Light Sci. Appl.* 2022. V. 11. P. 43.
<https://doi.org/10.1038/s41377-022-00731-w>

Modern Methods of Fluorescence Nanoscopy in Biology

D. O. Solovyeva^{*,#}, A. V. Altunina^{*,**}, M. V. Tretyak^{*},
 K. E. Mochalov^{*}, and V. A. Oleinikov^{*}

[#] Phone: +7 (965) 392-24-91; e-mail: d.solovieva@mail.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
 Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

^{***} National Research Nuclear University “MEPhI”, Kashirskoye sh. 31, Moscow, 115409 Russia

Optical microscopy has undergone significant changes in recent decades due to the breaking of the diffraction limit of optical resolution and the development of high-resolution imaging techniques, which are collectively known as fluorescence nanoscopy. These techniques allow researchers to observe biological structures and processes at a nanoscale level of detail, revealing previously hidden features and aiding in answering fundamental biological questions. Among the advanced methods of fluorescent nanoscopy are: STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), SIM (Structured Illumination Microscopy), MINFLUX (Minimal Photon Fluxes), PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) и RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) and others. In addition, most of these methods make it possible to obtain volumetric (3D) images of the objects under study. In this review, we will look at the principles of these methods, their advantages and disadvantages, and their application in biological researches.

Keywords: optical microscopy, fluorescence microscopy, super resolution, fluorescence nanoscopy, diffraction limit