

УДК 576.08:53.086

Микроскопия мягкого рентгеновского диапазона в клеточной биологии: современное состояние, вклад и перспективы

С. А. Голышев¹, Е. П. Казаков¹, И. И. Киреев¹, Д. Г. Реунов², И. В. Малышев²¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия²Институт физики микроструктур РАН, Нижний Новгород, 603950 Россия

*E-mail: sergei.golyshev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023

Принята к печати 27.11.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26551

РЕФЕРАТ Развитие микроскопии обеспечило серьезный прорыв в биологических исследованиях на рубеже 20–21 вв. Световая флуоресцентная микроскопия с суперразрешением позволила визуализировать субклеточные структуры вплоть до локализации в них отдельных молекул и их взаимного расположения на масштабах десятков нанометров, а современная электронная микроскопия дала возможность изучать строение белковых комплексов с разрешением, приближающимся к атомному, в их нативном внутриклеточном окружении. Однако и флуоресцентная, и электронная микроскопия не преодолели своих естественных ограничений – зависимости от меток и жестких требований к объему образца соответственно. На роль метода, компенсирующего эти ограничения, претендует микроскопия в мягком рентгеновском диапазоне. Этот метод позволяет наблюдать всю совокупность субклеточных структур в состоянии, близком к нативному, без химической фиксации и применения меток, с изотропным разрешением порядка 40–70 нм, перекрывая пусть и сокращающийся, но все еще существующий зазор в разрешающей способности между световой и электронной микроскопией, при этом сочетаясь с первой и, потенциально, со второй. Настоящий обзор ставит своей целью рассмотреть вклад и вычлнить принципиально новые возможности, которые уже дала биологическая микроскопия в мягком рентгеновском диапазоне, проанализировать особенности этого метода и оценить потенциальные направления его дальнейшего развития применительно к клеточно-биологическим исследованиям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рентгеновская микроскопия, клеточная биология, мягкое рентгеновское излучение, окно прозрачности воды, криотомография.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ктМРД – криотомография в мягком рентгеновском диапазоне; МРМ – мягкая рентгеновская микроскопия; ЭМ – электронная микроскопия (микроскоп); SMLM (Single Molecule Localization Microscopy) – локализационная микроскопия; STED (STimulated Emission Depletion) – микроскопия с гашением за счет вынужденного излучения; SIM/3D-SIM (Structured Illumination Microscopy) – микроскопия структурированного освещения; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

ПРИНЦИПЫ МРМ И ЕЕ СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ ВИДАМИ МИКРОСКОПИИ

Совокупность современных методов микроскопического исследования в биологии позволяет решать самые разнообразные задачи: от наблюдения за развитием эмбрионов через локализацию единичных молекул в клетке до прямой визуализации структуры макромолекул в их нативном состоянии [1–3]. Развитие как световой, так и электронной микроскопии постоянно расширяет спектр возможностей

для исследователей, однако при всех достигнутых успехах и тот, и другой подходы сохраняют свои принципиальные ограничения.

Световая микроскопия развивается в направлении совершенствования флуоресцентных методов, главным достоинством которых является высокий контраст получаемого изображения в сочетании с высочайшей избирательностью и чувствительностью методов флуоресцентного мечения [4]. Эксплуатация этих особенностей дала возможность

обойти дифракционное ограничение разрешающей способности световых микроскопов. В вошедших в широкое употребление методах световой микроскопии с суперразрешением рутинно реализуется разрешение порядка 30 нм [1]. Но достоинства флуоресцентной микроскопии являются одновременно и ее ограничениями. Позволяя наблюдать меченые молекулы и структуры, ими формируемые, флуоресцентный микроскоп не показывает компоненты, не несущие метки (рис. 1А,Г). Использование более трех-четырёх флуоресцентных меток в одном эксперименте затруднительно, а методы «оптического» контрастирования – фазовый и дифференциально-интерференционный контраст – существенно проигрывают флуоресценции по разрешающей силе (рис. 1А,Г). Немаловажным ограничением большинства флуоресцентных методов, направленных на максимальное увеличение разрешающей силы, является анизотропия разрешения – в аксиальном направлении предельное разрешение улучшается обратно пропорционально удвоенному квадрату числовой апертуры, в то время как латеральное разрешение обратно пропорционально ее первой степени.

Фундаментальным ограничением для просвечивающей электронной микроскопии является длина свободного пробега электрона в веществе, в максимуме не превышающая 300–500 нм, поэтому исследование с помощью ПЭМ требует приготовления ультратонких срезов исследуемого объекта, толщина которых сопоставима с длиной свободного пробега электронов [5]. Выполнение этого требования требует химической фиксации, изменяющей структуру и состав образца [5, 6]. Необходимость исследования серии срезов, иногда до сотен штук, затрудняет изучение трехмерной организации клетки, размеры которой на два порядка превосходят допустимую толщину срезов. Для преодоления этого ограничения используют разнообразные подходы, каждый из которых является компромиссом между величиной исследуемого объема, разрешающей силой и трудозатратами [7].

Методы криоэлектронной томографии, главным преимуществом которых является сохранение нативного строения и состава клетки, ограничены еще сильнее. Особенности пробоподготовки заставляют исследователей фокусироваться на той части клетки, где ее толщина мала, или необходимо изготовить из клетки методами травления ионным лучом единичную пластинку-ламелль толщиной 100–500 нм. Поэтому главное применение крио-ЭМ-томографии – именно анализ макромолекулярных комплексов в их нативном окружении [8].

На роль метода, который в какой-то мере позволяет преодолеть описанные ограничения, пре-

тендует наиболее развитое на сегодняшний день направление биологической мягкой рентгеновской микроскопии (МРМ) – криотомография в мягком рентгеновском диапазоне (кТМРД, cryo-SXT) [9]. Этот метод обладает следующим набором характеристик: 1) обеспечивает разрешение порядка 50 нм и 2) возможность исследовать объекты толщиной около 10 мкм без приготовления срезов 3) в близком к нативному витрифицированном состоянии и 4) без применения дополнительного контрастирования и селективных меток для выявления многих субклеточных структур.

В данном обзоре рассмотрены принципы метода, инструментальная база и вклад микроскопии мягкого рентгеновского диапазона в клеточную биологию. Выделены направления исследований, в которых особенности МРМ являются наиболее выигрышными, оценены перспективы дальнейшего развития и внедрения МРМ в клеточной биологии.

В методе МРМ используется рентгеновское излучение с энергией квантов порядка 500 эВ (длины волн от 2.3 до 4.4 нм), соответствующей так называемому «окну прозрачности воды». В этом диапазоне энергий атомы кислорода, а стало быть, и молекулы воды слабо поглощают рентгеновские фотоны (в зависимости от длины волны поглощение составляет от 10 до 40% в слое воды толщиной 1 мкм). Таким образом, для исследования оказывается доступным образец толщиной до 15 мкм [10–12]. Атомы углерода и других легких элементов становятся в этих условиях эффективными генераторами абсорбционного контраста. Современные синхротроны в большинстве своем имеют возможность генерировать излучение с такой энергией и с высокой интенсивностью светового потока [13].

Станция, предназначенная для проведения исследований с применением МРМ, состоит из синхротронного источника рентгеновских фотонов, монохроматора, фокусирующей системы, освещающей выходную апертуру (осветитель для микроскопа), и самого микроскопа, где в качестве конденсора используется или зонная пластинка или так называемый «капиллярный конденсор». Конденсор проецирует на образец уменьшенное изображение выходной апертуры синхротрона. Образец размещен на охлаждаемом поворотном столике с механизмом точного позиционирования. В качестве объектива используется зонная пластинка, формирующая увеличенное изображение образца на светочувствительной матрице цифрового детектора. Оптические пути таких станций позволяют формировать изображения с глубиной фокуса 1.5–10 мкм, а разрешение подобных установок составляет от 30 до 70 нм [10, 13, 14]. Сменные зонные пластинки-объективы

позволяют выбирать между глубиной фокуса и разрешающей силой [15].

При таком сочетании параметров оптического пути и толщины объекта изображение неизбежно будет представлять собой почти недоступную для визуальной расшифровки сумму проекций всех внутриклеточных структур, поэтому угловая томография становится наиболее продуктивным способом извлечения морфологических данных из такого изображения [16]. Высокая яркость синхротронного источника излучения позволяет получать необходимый объем данных для томографической реконструкции за разумное время.

В то же время МРД-фотоны не распространяются в воздухе, что требует помещения всех оптических элементов установки и исследуемого образца в глубокий вакуум [17]. Преодолению этого технического затруднения способствовало развитие инструментальной базы криоэлектронной микроскопии – появление автоматизированных устройств для криофиксации биологических объектов сверхбыстрым замораживанием путем погружения в жидкий этан, при котором вода не кристаллизуется, а становится аморфным твердым телом – витрифицируется (*vitrum* – лат. стекло) [18]. Такой образец, при поддержании его температуры на уровне -180 – 100°C , стабилен в вакууме и устойчив к облучению за счет постоянного отведения тепла.

Вторым вкладом ЭМ в развитие ктМРД стало создание гониометрических держателей образцов с охлаждением для оснащения ими крио-ЭМ-инструментов. Эти устройства были адаптированы к применению на некоторых МРМ-станциях, предназначенных для проведения биологических исследований, что унифицировало пробоподготовку вплоть до использования стандартных «сеток» для ЭМ в МРМ-инструментах, но и внесло ограничения, свойственные ЭМ-томографии, – увеличение эффективной толщины образца и его затенение конструкциями держателя при высоких углах поворота [10–13]. Особенностью МРМ-станции на синхротроне ALS (США) является полноповоротный капиллярный держатель образца, изготовленный специально для этой установки и позволяющий получать изотропное разрешение без искажений, вызванных ограничениями угла наклона [10, 19]. Витрификация образца погружением с использованием автоматического устройства – быстрый, хотя и требующий определенных навыков, процесс; подготовка образца к ктМРД-исследованию занимает порядка 4 ч, даже если конструкция держателя образца отличается особой сложностью [19].

Изображение клетки, получаемое с помощью ктМРД, весьма сходно с электронной микрофото-

графией малого увеличения [9, 16, 20] (рис. 1), поэтому для реконструкции объема по сериям угловых проекций, сегментации и последующего анализа пригодны программные пакеты для работы с ЭМ-данными [12, 13, 20]. Разрабатываются и специализированные средства для работы с данными ктМРД, осуществляющие восстановление изображений и повышение их информативности [21], облегчающие самый оператор-зависимый этап – сегментацию трехмерных данных, вычленение из массива «вокселей» контуров и поверхностей органоидов [22, 23].

Несколько менее приняты биологами просвечивающие сканирующие рентгеновские микроскопы (STXM, Scanning Transmission X-ray Microscope), работающие в МРД. В этих приборах образец размещен на сканирующей столике, который смещает его относительно тонко сфокусированного луча, а изображение строится на основе измеряемого точечным однопиксельным детектором изменения яркости проходящего луча от точки к точке [24, 25].

Можно заключить, что МРМ, особенно в реализации ктМРД, – это зрелый, в смысле развития технической базы, метод, ориентированный на биологические задачи, работающий на клеточных масштабах и занимающий особое место на стыке возможностей световой и электронной микроскопии (рис. 1).

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСКОПИИ МРД В КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

В работе [9] представлен каталог изображений внутриклеточных структур, полученных с помощью ктМРД, таких, как ядерная оболочка, ядрышко, митохондрии, лизосомы, ЭПР и другие эндомембраны. Объектом служили криофиксированные трансформированные клетки мыши толщиной 6–12 мкм. Контролем служили электронно-микроскопические изображения тех же структур. Авторы указывали, что мембранные структуры хорошо различимы и узнаваемы, поскольку визуально воспринимаются так же, как и с применением ЭМ, однако такие белковые компоненты, как субдомены хроматина и ядерные тельца, различимы гораздо хуже (что может быть связано с выбором длины волны для регистрации изображения), не говоря уже о рибосомах и элементах цитоскелета, находящихся вблизи границы разрешающей способности инструмента. Какой прогресс был достигнут в применении МРМ в клеточной биологии со времени публикации этой работы и какие результаты были получены?

Значительная часть работ посвящена применению метода к различным типам клеток: клеткам человека и животных, нормальным, опухолевым, зараженным вирусом, контактирующим с нано-

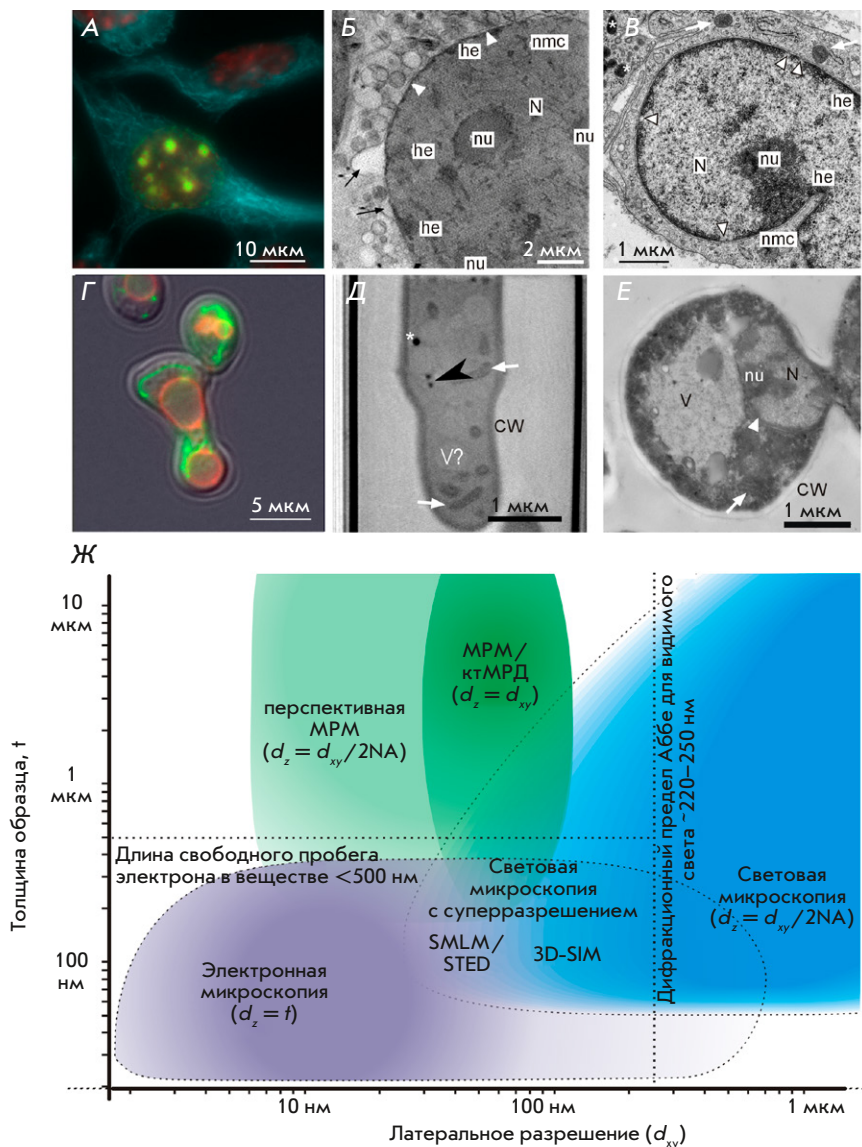


Рис. 1. Микроскопия мягкого рентгеновского диапазона в сравнении со световой флуоресцентной и электронной микроскопией. А–В – клетки млекопитающих (фибробласты мышцы). А – широкопольная флуоресцентная микроскопия, фиксированные клетки *in vitro*: голубой – микротрубочки, флуоресцентно меченные антитела против альфа-тубулина; зеленый – новореплицированная ДНК, click-реакция с этинилдезоксигуанидином; красный – ядра, ДНК-связывающий флуорохром DAPI. Б – виртуальный срез криофиксированной клетки, кТМРД: N – ядро, nu – ядрышки; he – гетерохроматин, nmc – впячивание ядерной оболочки внутрь ядра (nuclear membrane channel), указатель – ядерная оболочка, черные стрелки – выпячивания внешней мембраны ядерной оболочки (адаптировано с модификациями из [11] CC 4.0 BY). В – электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, фиксированной альдегидами и контрастированной тяжелыми металлами: стрелка – митохондрия; * – липидные капли. Г–Е – дрожжи *S. cerevisiae*. Г – живая клетка (зигота), целиком широкопольная флуоресцентная микроскопия: зеленый – митохондрии, химерный митохондриальный белок Ldh1-GFP; красный – мембрана вакуоли, флуорохром FM4-64; контуры клетки – дифференциальный интерференционный контраст (фотография любезно предоставлена Кнорре Д.А.). Д – виртуальный срез криофиксированной клетки, полученный методом кТМРД: V – вакуоль; CW – клеточная стенка; черный указатель – структура, использованная для корреляции, возможно, мелкая липидная капля (адаптировано с модификациями из [15], CC0 1.0). Е – электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, фиксированной альдегидами и контрастированной тяжелыми металлами. Расположение МРМ, световой и электронной микроскопии в «пространстве разрешающей способности» (Ж). Интенсивность цвета соответствует тем масштабам, на которых метод наиболее востребован в исследовании структур и функционирования клетки. NA – числовая апертура, геометрическое описание светособирающей способности объектива в сочетании с длиной волны излучения (λ) является главным фактором, определяющим предельное разрешение объектива: $d_{xy} = 0.61 \times \lambda / NA$ [4]. Фотографии А, В, Е сделаны авторами обзора

частицами и др. [22, 26–31], дрожжей [16, 26, 32] и бактерий [12] для проверки пригодности метода или конкретного МРМ-инструмента для решения задач визуализации субклеточных структур и сравнения МРМ со световой и электронной микроскопией. В этих работах вместе с «проверкой концепции» предлагаются различные усовершенствования или комбинации методов, например, корреляция флуоресцентной метки с МРМ-изображением [20, 28] или сочетание ктМРД с маркированием белков плазмалеммы антителами, меченными коллоидным золотом [29].

Параллельно с разработкой методики корреляционного флуоресцентного и МРМ-анализа изучали также систему эндосом (везикул, вовлеченных во внутриклеточное переваривание вещества, поглощенного извне) и аутофагосом, инкапсулирующих компоненты клетки, подлежащие рециркуляции [20]. Для идентификации аутофагосом применили две флуоресцентные генетически кодируемые метки, а весь эндоцитозный компартмент был *in vivo* помечен антителами с меткой коллоидного золота, захватываемыми клеткой путем эндоцитоза. На МРМ-изображении эндосомы идентифицируются по золотым частицам внутри и имеют прозрачное содержимое. Везикулы, попадающие в зоны колокализации флуоресцентных меток, отличаются плотным содержимым и прозрачным гало, соотношены с аутофагосомами. С помощью корреляции флуоресцентных и МРМ-изображений впервые визуализированы специализированные зоны генерации многочисленных предшественников аутофагосом (омегасом) в ЭПР. Параллельно подтверждено, что при голодании, используемом для инициации аутофагии, в системе митохондрий появляются тонкие и длинные трубчатые связи между отдельными митохондриями. Этот пример анализа системных изменений в клетке не только демонстрирует возможности ктМРД в сочетании со световой микроскопией, но и представляет новые данные и прямо подтверждает результаты, ранее полученные другими методами.

Возможность ктМРД визуализировать весь объем клетки, выявлять многие субклеточные системы и измерять размеры органелл без применения контрастирования/мечения использовали для исследования динамики перераспределения секреторных гранул тучных клеток при стимуляции антигеном [33], опустошения инсулиновых везикул в секреторных клетках поджелудочной железы в ответ на стимуляцию глюкозой [34], для визуализации и количественной оценки предапоптотических изменений под действием противоопухолевого агента цисплатина в сочетании с адьювантами для сни-

жения его эффективной концентрации [35], оценки среднего объема фрагментов митохондрий в раковых клетках после воздействия свободных радикалов, генерируемых фотосенсибилизатором на основе ионов иридия [36]; для измерения объема митохондрий, радиуса липидных капель и цитоплазматических везикул при заражении клеток вирусом SARS-CoV-2 [37], при анализе перераспределения цитоплазматических везикул и изменения морфологии митохондрий под воздействием вируса простого герпеса [22], для извлечения количественных параметров ответа эндотелиоцитов на стимуляцию глюкозой (*in vitro* модель процессов повреждения сосудов при диабете) [38].

Помимо возможности проводить морфометрию на уровне целой клетки, применение ктМРД позволяет обнаруживать новые и, зачастую, неожиданные структурные аспекты изучаемых явлений, например, формирование тонких, на пределе разрешающей силы ктМРД, нитевидных выростов цистерн ЭПР, формирующихся в зонах контактов ЭПР с митохондриями [39], маркируемых скоплением белков-участников деления митохондрий, выявляемых с помощью флуоресцентных химерных конструкций.

С применением ктМРД визуализировали фрагментацию митохондрий, увеличение числа липидных капель и вакуолизацию цитоплазмы в клетках млекопитающих и дрожжей при воздействии золотых наночастиц и ионов золота [40, 41]. Также показано, что небольшая доля золотых наночастиц, поглощенных клеткой, оказывается в цитоплазме, а не в эндосомно-лизосомном компартменте. Их количество слишком мало для обнаружения по флуоресцентному сигналу и на ультратонких срезах методами ЭМ. Кроме того, некоторое количество частиц выявлено в липидных каплях, что необычно [40].

Биогенные наночастицы золота, формируемые клетками дрожжей для последующего их выведения в периплазматическое пространство, обнаружены и идентифицированы также при помощи ктМРД. Идентификация этих частиц потребовала привлечения дополнительных физических методов измерения, а локализация частиц, в том числе (и впервые) в митохондриях, дополнительно подтверждена с помощью ЭМ [41].

Предполагать существование подобных структур и явлений *a priori* невозможно, в световой микроскоп они не разрешаются, а случайное их обнаружение методами электронной микроскопии крайне маловероятно, а если и произошло, то может быть проигнорировано.

Иногда изменения физиологии клетки, например, развитие патологии на клеточном уровне, приводят

к формированию новых структур, размеры которых сопоставимы с самой клеткой, что затрудняет их детальный анализ и установление топологии методами ЭМ, а их тонкая организация находится за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Пример – трансформация ЭПР при заражении вирусом гепатита С, когда эндоплазматическая сеть преобразуется в губчатый лабиринт мембранных каналов, занимающий почти всю цитоплазму [42, 43]. Детальный анализ геометрии мембранных каналов при этой трансформации в масштабе всей клетки проведен с помощью ктМРД [30]. Параллельно были исследованы изменения контактов ЭПР с митохондриями, источниками энергии клетки и важными участниками метаболизма липидов, которые также изменяются при вирусной инфекции. Производительность ктМРД позволила проанализировать динамику процесса преобразования ЭПР и показать, что преобразование начинается локально, но сразу вовлекает в себя и ЭПР, и митохондрии [30].

В работе [44] с применением ктМРД показано, что клетки дрожжей дикого типа и мутанты, продуцирующие только триацилглицериды, формируют гомогенные, эффективно поглощающие МРД-фотоны, липидные капли, а в клетках, производящих только стериды, липидные капли имеют прозрачное ядро, окруженное поглощающей оболочкой. Комбинируя данные ктМРД с другими неинвазивными методиками, авторы подтвердили предположение о слоистой структуре липидных капель с ядром из триацилглицеридов и оболочкой из стеридов. Эта двухслойная модель предложена на основе изучения выделенных липидных капель, но процедура выделения может вызвать перераспределение липидов, что не делало результат абсолютно убедительным.

Показателем состава органелл может быть не только плотность органического вещества в них. Варьируя длину волны МРД-фотонов, можно идентифицировать элементы, которые имеют пики поглощения в диапазоне прозрачности воды, оценивать их концентрацию, определять их состояние в кристаллических частицах и зоны их специфической концентрации. Это позволяет использовать МРМ для изучения таких процессов, как минерализация тканей, формирование скелетов беспозвоночных, поглощение и выведение из клетки наночастиц и других наноконструкций, используя особенности их состава в качестве дополнительного критерия для их идентификации.

Например, используя излучение с энергией больше и меньше скачка поглощения азота (410 эВ), визуализировали распределение азота и отношение

концентраций азота и углерода в клетках *Anabena* sp. [45]. Эти синезеленые водоросли в условиях голодания по азоту формируют специализированные клетки (гетероцисты), фиксирующие атмосферный азот. Используя разрешающую силу МРМ, смогли идентифицировать вегетативные клетки и гетероцисты и проанализировать исследуемый параметр в привязке к клеточному типу, чего ранее не делали. В клетках обоих типов элементы распределены неравномерно, отношение концентраций углерода к азоту растёт от периферии к центру клетки, но периферическая зона гетероцист маркирована слоем, обогащенным азотом, чего нет в вегетативных клетках.

Исследование путей концентрации кальция (края поглощения 352.6 и 338.3 эВ) в клетках одноклеточных водорослей, накапливающих кальциевые включения, и в мезенхимальных клетках личинки морского ежа, формирующих спиккулы из карбоната кальция, показало, что и у водорослей, и у личинок иглокожих есть специализированные везикулы, концентрирующие ионы кальция из морской воды и служащие промежуточным депо для этого иона [46, 47]. У водоросли это одна крупная «вакулоподобная» цистерна [46], а клетки личинок морского ежа содержат популяцию везикул диаметром около 100 нм с концентрацией иона кальция от 1 М (нижний предел обнаружения) до концентрации, соответствующей безводному аморфному карбонату кальция, из которого состоит спиккула. Использование МРМ позволило точно посчитать количество кальцийсодержащих везикул [47].

При поглощении клетками млекопитающих наночастиц гидроксиапатита, стимулирующих регенерацию костной ткани, флуоресцентные сенсоры кальция показывают появление популяции кальцийсодержащих везикул, однако применение электронной микроскопии не позволяет идентифицировать их на фоне общей совокупности везикул в клетках [48]. Применение ктМРД и анализ линейных коэффициентов поглощения органелл позволили вычленивать интернализированные наночастицы, идентифицировать жировые капли и отдельную популяцию везикул с промежуточной эффективностью поглощения, которую соотнесли с мультивезикулярными тельцами, а их коэффициент поглощения увязали с возможностью депонирования в них ионов кальция, высвободившихся при растворении наночастиц [48].

Большая плотность и, как следствие, повышенный контраст на ктМРД-изображениях, является отличительной чертой некоторых внутриклеточных патогенов и симбионтов, чем эффективно пользуются исследователи, изучающие жизненные циклы

этих организмов и их взаимодействие с клетками. При изучении формирования вирионов коровьей оспы (*Vaccinia*) и структур, появляющихся в инфицированных клетках, удалось различить зрелую и незрелую форму вирионов и обнаружить «вирусные фабрики», в которых происходит репликация вирусных геномов [49].

В работе [50] изучен перенос вещества от клетки-хозяина к вирусу в ходе развития неидентифицированного гигантского ДНК-вируса (предположительное *Cedratvirus*), заражающего амебу *Acanthamoeba castellanii*. Изучена динамика развития инфекции, уточнены данные по количеству вирионов, формирующихся в ходе размножения вируса. На основе измерения коэффициентов поглощения скорректированы ранние оценки переноса материала, полученные более грубыми методами. Показано, что в вирионы преобразуется 6–12% вещества клетки-хозяина. Обнаружена структура, возможно, являющаяся фабрикой репликации вируса. Показано, что изменения затрагивают сократимую вакуоль и фагосомы, но не ядро, что позволяет клетке функционировать вплоть до лизиса, увеличивая эффективность продукции вируса [50]. Линейная зависимость коэффициентов поглощения от концентрации органического вещества, визуализируемая на ктМРД-изображениях, плюс возможность обработки всего объема клетки делают ктМРД предпочтительным инструментом для проведения такого рода исследований по сравнению с ЭМ, которая позволяет обнаруживать вирионы куда меньшего размера, но ставит ограничения на объемы выборки. Тем не менее, в такого рода работах ЭМ является необходимым дополнительным методом, что прямо отмечают авторы цитируемых работ.

Полуавтоматическая сегментация изображений с последующим измерением объемов бактериальных клеток показали, что каждая внутриклеточная «инклюзия» – вакуоль, в которой размножаются патогенные бактерии *Chlamydia trachomatis*, содержит гораздо более широкий спектр форм клеток, чем считалось ранее [51], когда основным инструментом анализа была реконструкция по серийным ЭМ-изображениям (диаметр инклюзии 10–15 мкм). Подсчет количества хламидий в инклюзиях показал, что объем индивидуальных бактериальных клеток, являющийся главным критерием для разделения инфекционной и пролиферирующей форм хламидий, зависит не от абсолютного их количества в инклюзии, а от их концентрации. Чем плотнее заселена вакуоль, тем реже в ней встречаются крупные и аномально крупные клетки, а значит, концентрация клеток может быть сигналом для перехода от крупной размножающейся формы к малой ин-

фекционной, что сопровождается лизисом клетки-хозяина и следующим раундом распространения инфекции.

Используя ингибиторный анализ и останавливая выход зрелых бесполок клеток (мерозоитов) малярийного плазмодия из эритроцитов на различных стадиях этого процесса, ктМРД применили вспомогательно, для комплементации и свето-, и электронно-микроскопических данных [52]. Показано, что выход мерозоитов в кровяное русло с разрушением эритроцитов, вызывающий приступ лихорадки при малярии, строго координирован во времени. Перед разрушением эритроцита происходит распад мембраны вакуоли, в которой продуцируются мерозоиты и выход зрелых мерозоитов в цитоплазму эритроцита, затем наблюдается коллапс цитоскелета эритроцитов, ведущий к утрате ими их характерной формы и формированию тесных контактов между плазмолеммами эритроцита и мерозоитов, только после этого происходит выход нового поколения мерозоитов в кровь. ктМРД здесь является своеобразной контрольной процедурой, подкрепляющей свето-микроскопические данные структурными с лучшим разрешением и позволяющей избежать ошибок интерпретации, связанных с особенностями подготовки образцов для ЭМ.

Изучение изменений на уровне отдельных органелл, происходящих в клетках при инфекции *Shigella flexneri*, с использованием комбинации флуоресцентной микроскопии и ктМРД показало, что при инфекции в клетках происходит фрагментация митохондрий [53]. Корреляция данных световой микроскопии и ктМРД позволила визуализировать «ловушку» из септинов (белков, участвующих в ремоделировании мембран, цитоскелета и в инкапсуляции внутриклеточных патогенов [54]) вокруг клеток шигеллы, а также ее тесную связь с аутофагосомой.

Крайне любопытным выглядит исследование механизмов координации деления хозяина и симбионта у *Braarudosphaera bigelowii*, одноклеточной водоросли, в клетках которой облигатно присутствует эндосимбионт – цианобактерия с сильно редуцированным геномом, не способная к самостоятельному существованию, но имеющая механизм фиксации азота. Этот симбиоз может быть промежуточной эволюционной фазой симбиогенетического формирования новой органеллы («нитропласта»), как это когда-то произошло с митохондриями. Применение ктМРД в качестве основного инструмента в этом исследовании представляется вполне оправданным, принимая во внимание размеры организма и симбионта – порядка 10х5 мкм и 4х2 мкм соответственно, и высокий контраст между симбионтом и хлоропластами и митохондриями клетки-хозяина [55].

Обращает на себя внимание то, что в большинстве работ, рассмотренных выше, внимание фокусируется на органеллах, обогащенных липидами, – липидных каплях, митохондриях, цистернах ЭПР и т.п. При этом почти не представлено одно важное направление – исследование ультраструктуры и функционирования клеточного ядра и генетического аппарата. Это связано с тем, что эффективность поглощения МРД-фотонов липидами высокая, что выделяет их на фоне цитоплазмы [9, 11], а вариации коэффициента поглощения внутри клеточного ядра слабые, что позволяет различать только такие крупные и плотные образования, как ядрышко и гетерохроматиновые блоки на фоне эухроматина [28, 56]. При этом разрешающая сила метода пока недостаточна для визуализации хроматиновых субструктур размером 100 нм и меньше [57]. Попытки спектрального разделения ДНК, РНК и белков на МРМ-изображениях ядер и хромосом [25] позволяют надеяться на существенное улучшение контраста нуклеиновых кислот, что откроет новые возможности в изучении ядерных структур методами МРМ. На текущий момент наиболее подходящими для исследования с применением ктМРД видятся поздние стадии компактизации индивидуальных хромосом в ходе подготовки эукариотической клетки к делению, сегрегация хроматид перед их распределением по дочерним клеткам и начальные этапы деконденсации хромосом при формировании дочерних ядер.

МРМ и флуоресцентная микроскопия с суперразрешением

Корреляционная световая и электронная микроскопия, в том числе в криоформате, являются уже хорошо зарекомендовавшим себя сочетанием методов [58–60]. Поскольку ктМРД заимствует многие аспекты пробоподготовки из криоэлектронной микроскопии, понятно, что интеграция обычных флуоресцентных методов и ктМРД реализована и используется для решения рутинных задач, в первую очередь, для локализации объекта перед реализацией ктМРД, в том числе за счет интегрированного в МРМ-инструмент флуоресцентного микроскопа [11, 61]. В то же время современный уровень развития флуоресцентной микроскопии в ее вариантах с суперразрешением позволяет достигать разрешения 100–150 нм для микроскопии структурированного освещения и ~30 нм для SMLM и STED [1, 62], уже сопоставимых с разрешением МРМ.

Сочетание световой микроскопии с суперразрешением в вариантах STED и SMLM с МРМ выглядит весьма перспективным. Эта комбинация методов потенциально позволяет не только локализовать

молекулярные источники флуоресцентного сигнала с точностью до 20 нм, но и средствами МРМ соотнести их с внутриклеточными структурами, не несущими флуоресцентной метки.

Сочетание SMLM и ктМРД применено для локализации, изучения тонкой структуры и динамики кристаллов холестерина в клеточной модели атеросклероза [63, 64]. Липиды имеют высокий линейный коэффициент поглощения в МРД [9], так что липидные структуры являются самыми контрастными на МРМ-изображениях, но вычленив холестерин в общем липидном контексте невозможно. SMLM позволяет маркировать холестерин флуоресцентной меткой и изучить его распределение с высокой разрешающей силой, но без привязки к конкретным субклеточным структурам. При таком подходе разрешение световой составляющей превосходит рентгеновское – авторы заявляют о 35 нм против 70 нм [63].

Сочетание методов позволило соотнести флуоресцентную метку с резко очерченными на МРМ-изображении структурами на плазмалемме, а также с поверхностью липидных капель в цитоплазме [63], и отследить перемещение кристаллических структур, формируемых холестерином, внутрь клетки, идентифицировав их на фоне других липидных образований [64]. Эта интеграция методов, однако, не безупречна. SMLM требует множества, иногда десятков тысяч, пусть и коротких экспозиций, поэтому регистрация изображения занимает значительное время. Также для реализации механизмов обратимого гашения и возврата молекул флуорофора в «светлое» состояние необходимы условия, создаваемые искусственно [62]. Поэтому авторы проводили SMLM на фиксированных альдегидами клетках с применением стандартного микроскопа и лишь после препарата подвергали витрификации и осуществляли ктМРД. К ограничениям в данном случае относится не только необходимость фиксации клетки для реализации SMLM-регистрации, но и то, что носителями флуоресценции являются антитела, медленно и неэффективно проникающие сквозь мембраны, что заставило авторов сосредоточиться на плазмалемме, где мишень доступна для антител, и мириться с невысокой интенсивностью сигнала в цитоплазме. Сочетание SMLM и ктМРД привлекает сопоставимой разрешающей силой в обеих модальностях, но совокупность ограничений может оказаться критической для дальнейшего развития этого подхода.

Второе направление – использование системы с ограниченным суперразрешением SIM в сочетании в ктМРД, причем обе процедуры регистрации изображений реализуются в криоформате. SIM

позволяет работать с флуоресцентными белками, как следствие, дает возможность прямого совмещения световых и МРМ-изображений.

Криоформат делает применение высокоапертурных иммерсионных объективов крайне затруднительным, хотя и не невозможным [65, 66]. Для решения этой проблемы в МРМ-станцию был интегрирован специализированный крио-SIM-микроскоп, в котором технология 3D-SIM с использованием «сухого» объектива с числовой апертурой 0.9 и большим рабочим отрезком позволяет получать изображения с разрешением 210 нм (дифракционный предел ~340 нм) без передачи тепла образцу, находящемуся в криогенных условиях [67].

Сочетание крио-3D-SIM и ктМРД было применено для изучения динамики эндосом, содержащих частицы реовируса, в ходе развития инфекции [66]. Крио-3D-SIM позволил визуализировать везикулы нескольких размеров и различить везикулы, несущие частицы вируса, и везикулы, из которых произошел выход вирусного комплекса. Эффективное отсечение внефокусного свечения и лучшее, по сравнению с дифракционно ограниченной микроскопией, аксиальное разрешение 3D-SIM [62] позволили точно соотнести флуоресцентный сигнал от меченых везикул со структурами, наблюдаемыми на ктМРД-изображении. Ключевым наблюдением стало то, что эндосомы, из которых произошел выход вируса, остаются сферическими, без разрывов мембран. Предположили, что вирионы могут покидать эндосомы за счет образования пор в мембранах.

Метод 3D-SIM был применен для локализации на МРМ-изображении пучков актиновых филаментов, которые плохо поглощают рентгеновские фотоны и поэтому практически незаметны, но флуоресцентные данные с высокой детализацией позволяют точно определить зону, где находятся актиновые структуры, и идентифицировать их внутриклеточное окружение с помощью МРМ [68].

Для решения аналогичных задач корреляции флуоресцентного и рентгеновского изображения был построен уникальный «лазерный сканирующий конфокальный криотомограф» с иммерсионным объективом, использующий полноповоротный криодержатель образца от комплементарного ктМРД-инструмента [28]. Микроскоп испытан на модели локализации и визуализации тельца Барра (инактивированной X-хромосомы) в клетках самки мыши и стал частью МРМ-станции на синхротроне ALS (США).

Сочетание этих методов применяется для идентификации на рентгеновских изображениях слабо или совсем не охарактеризованных внутриклеточных структур, для которых известны белковые

маркеры, особенно в связи с работой по созданию «рентгеновских атласов» ультраморфологии клетки [9, 11]. Несмотря на общую схожесть ЭМ- и МРМ-изображений, не все структуры отображаются на них одинаково в связи с различиями в пробоподготовке. Остается дождаться появления крио-3D-SIM-установки с иммерсионным объективом, интегрированной в МРМ-станцию.

ПЕРСПЕКТИВЫ МРМ

Перспективный МРМ-инструмент

Альтернативой оптической схеме с зонными пластинками, ставшей отраслевым стандартом в ктМРД, может стать применение зеркальных объективов нормального падения, оптимизированных под длины волн окна прозрачности воды [69]. Расчет показывает, что такой микроскоп при вполне достижимой числовой апертуре 0.3 [70] (против ~0.05–0.06 у зонных пластинок) и при использовании длины волны 3.37 нм позволит реализовать латеральное разрешение около 5 нм, что на порядок лучше, чем стандартно достижимые 40–70 нм в ктМРД, и входит в диапазон, ранее доступный только ЭМ. Этот инструмент находится на стадии лабораторного прототипа и пока не вышел на проектные показатели, однако демонстрирует работоспособность всех элементов системы.

К определенным ограничениям этого инструмента относится анизотропия разрешения, связанная с растяжением функции рассеяния вдоль главной оптической оси прибора, как и в световом микроскопе [71]. Тот же простой расчет показывает, что аксиальное разрешение такого инструмента будет составлять около 40 нм, что несколько лучше, чем при работе на ЭМ в обычном режиме, где аксиальное разрешение определяется толщиной физического среза, очень редко достигающей 50 нм (обычно толще). Малая глубина фокуса этого МРМ существенно усложняет реализацию угловой томографии, так что для трехмерной реконструкции оптимальными становятся более простые алгоритмы восстановления объема по сериям оптических срезов (z-томография) с применением деконволюции [72–74], как в широкопольных и конфокальных световых микроскопах. Правильный подбор алгоритма и параметров деконволюции может частично компенсировать и анизотропию разрешения, но устранить ее полностью не удастся в силу ее фундаментальной природы.

На основе этой оптической схемы предложен проект МРМ-станции [71] для строящегося синхротронного источника СКИФ («Сибирский кольцевой источник фотонов»). Проект предполагает два ре-

жима работы: сканирующий, с использованием объектива с числовой апертурой 0.3 для освещения образца сфокусированным в пятно дифракционных размеров лучом, с регистрацией вариаций яркости проходящего пучка однопиксельным детектором при сканировании смещением образца относительно луча, и широкопольный режим, в котором второй объектив строит изображение образца на матричном детекторе. Для биологических применений предусматривается оснащение инструмента криостолом.

Потенциально, за счет короткого фокуса, малой толщины оптического среза и высокой светособирающей способности, уменьшающей необходимую для получения изображения дозу облучения, этот МРМ в широкопольном режиме позволит наблюдать динамические процессы в живых клетках, изолированных от вакуума в жидкостной микрокамере. Вопрос о практической реализуемости таких наблюдений остается открытым.

Селективные метки для МРМ

В отличие от световой микроскопии с ее богатым арсеналом методов высокоселективного мечения субклеточных структур и биомолекул (флуоресцентно меченные антитела, конструкции с флуоресцентными белками, флуоресцентные красители высокой специфичности и др.) (рис. 1А,Г), электронная микроскопия для идентификации наблюдаемого в значительной степени полагается на накопленный за десятилетия массив данных о морфологии клетки. Методы селективного мечения в ЭМ менее разнообразны и не так надежны, как в световой микроскопии. МРМ в своем развитии может оказаться в такой же ситуации.

Для совместимости с криофиксацией методы селективной визуализации не должны влиять на жизнеспособность клетки, функционируя *in vivo*. Если для визуализации меченой структуры требуется какое-либо вспомогательное действие, например фиксация, сразу же возникает вопрос: сохраняется ли «нативное состояние» клетки? Такая метка должна также эффективно генерировать контраст при использовании излучений, в которых биологическая материя прозрачна, а следовательно, должна радикально отличаться от «живого вещества» по строению или по составу. В работе Kong и соавт. для МРМ адаптирована разработанная для ЭМ система локализации белков на основе химерных конструкций с пероксидазами и фотоактивируемыми белками-генераторами активных форм кислорода [75]. В обоих случаях проявление метки – это инициируемое меченым белком окисление диаминобензидина (DAB), проникающего сквозь плазмалемму

как фиксированной, так и живой клетки [76]. Его нерастворимая окисленная форма локально осаждается и эффективно поглощает МРД-фотоны за счет высокой плотности осадка [75]. Методика предусматривает альдегидную фиксацию перед «проявлением» метки раствором DAB и пероксида водорода, но, в отличие от ЭМ-версии этого метода, не требует «проявки» с OsO₄ [76]. Применение белка-генератора свободных радикалов miniSOG вместо пероксидазы не требует инкубации с пероксидом водорода – он активируется при облучении видимым светом [75]. Очевидно, что протокол можно комбинировать с другими системами мечения [20, 63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всех своих особенностях и относительной «молодости» микроскопия мягкого рентгеновского диапазона, в первую очередь, в реализации криотомографии, продуктивно вошла в инструментарий клеточной биологии. Наиболее многообещающим направлением ее дальнейшего развития видится более тесная интеграция ктМРД и световой микроскопии с суперразрешением. Разработка генетически кодируемых меток, особенно «мультимодалых», способных генерировать и флуоресцентный сигнал, и абсорбционный контраст в МРД, добавит этому перспективному сочетанию методов совершенно новые возможности, позволяя перейти от корреляции и чисто морфологических критериев в анализе ультраструктуры к непосредственному рассмотрению молекулярных аспектов строения и динамики субклеточных систем. Остается надеяться, что имеющиеся на настоящий момент и рассмотренные выше технические трудности будут преодолены и такой комбинированный подход станет практически доступным.

Можно предполагать, что в дальнейшем произойдет и более тесное сближение МРМ с крио-ЭМ. Например, интеграция источника сфокусированного ионного луча в крио-МРМ-инструмент даст возможность навигации при помощи ктМРД для изготовления ламелей для крио-ЭМ-томографии, включающей интересные объекты. В идеале эта интеграция приведет к появлению «бесшовного конвейера», позволяющего всесторонне исследовать строение и функционирование клетки во всем диапазоне масштабов и разрешающей силы, используя сильные стороны всех доступных микроскопических методов.

Основными «организационными» проблемами ктМРД остается все еще не преодоленная привязка пробоподготовки к достаточно дорогому оборудованию для криофиксации и к считанному числу МРМ-установок на больших синхротронных источниках,

каждая из которых по-своему уникальна, что ограничивает доступность метода. Строительство новых источников, в том числе установок СКИФ с уже запланированной станцией рентгеновской микроскопии и РИФ («Российский источник фотонов») в РФ, приведет к существенно более глубокой интеграции МРМ в исследовательскую практику.

Появление достаточно ярких лазерно-плазменных источников МРД-фотонов подстегнуло попытки создания приборов «лабораторного уровня» [31, 32, 77], отделяющих МРМ-инструменты от mega-science-установок. Пока эти работы носят конструкторско-поисковый характер, но создание коммерчески распространяемого МРМ, сопоставимого по стоимости и эксплуатационным расходам с биологическим ЭМ, должно сделать методы МРМ столь же популярными, как световая и электронная микроскопия.

Создание же лабораторного крио-МРМ с высоко-апертурной оптикой и разрешением 5–7 нм может сместить ЭМ с положения главного метода ультраструктурной визуализации, оставив ей только сегмент разрешения, близкого к атомному. ●

Авторы выражают благодарности Кнорре Д.А. за предоставленные изображения и авторам, разрешающим использование своих работ на основе лицензии Creative Commons.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-62-00068).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schermelleh L., Ferrand A., Huser T., Eggeling C., Sauer M., Biehlmaier O., Drummen G.P.C. // Nat. Cell Biol. 2019. V. 21. № 1. P. 72–84.
- Wu Y., Shroff H. // Histochem. Cell. Biol. 2022. V. 158. № 4. P. 301–323.
- Saibil H.R. // Mol. Cell. 2022. V. 82. № 2. P. 274–284.
- Murphy D., Davidson M. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley-Blackwell, 2013. 538 p.
- Knott G., Genoud C. // J. Cell Sci. 2013. V. 15. № 126(Pt 20). P. 4545–4552.
- Osumi M. // J. Electron. Microsc. (Tokyo). 2012. V. 61. № 6. P. 343–365.
- Peddle C.J., Genoud C., Kreshuk A., Meechan K., Micheva K.D., Narayan K., Pape C., Parton R.G., Schieber N.L., Schwab Y., et al. // Nat. Rev. Meth. Primers. 2022. V. 2. P. 51.
- Wagner J., Schaffer M., Fernández-Busnadiego R. // FEBS Lett. 2017. V. 591. № 17. P. 2520–2533.
- Müller W.G., Heymann J.B., Nagashima K., Guttman P., Werner S., Rehbein S., Schneider G., McNally J.G. // J. Struct. Biol. 2012. V. 177. № 2. P. 179–192.
- Le Gros M.A., McDermott G., Cinquin B.P., Smith E.A., Do M., Chao W.L., Naulleau P.P., Larabell C.A. // J. Synchrotron Radiat. 2014. V. 21. № 6. P. 1370–1377.
- Groen J., Conesa J.J., Valcárcel R., Pereira E. // Biophys. Rev. 2019. V. 11. № 4. P. 611–619.
- Cossa A., Wien F., Turbant F., Kaczorowski T., Węgrzyn G., Arluison V., Pérez-Berná A.J., Trépout S., Pereira E. // Methods Mol. Biol. 2022. V. 2538. P. 319–333.
- Carzaniga R., Domart M.C., Collinson L.M., Duke E. // Protoplasma. 2014. V. 251. № 2. P. 449–458.
- Loconte V., Chen J.H., Vanslebrouck B., Ekman A.A., McDermott G., Le Gros M.A., Larabell C.A. // FASEB J. 2023. V. 37. № 1. P. e22681.
- Weinhardt V., Chen J.H., Ekman A.A., Guo J., Remesh S.G., Hammel M., McDermott G., Chao W., Oh S., Le Gros M.A., Larabell C.A. // PLoS One. 2020. V. 15. № 1. P. e0227601.
- Liu J., Li F., Chen L., Guan Y., Tian L., Xiong Y., Liu G., Tian Y. // J. Microsc. 2018. V. 270. № 1. P. 64–70.
- Reinhard J., Kaleta S., Abell J.J., Wiesner F., Wünsche M., Seemann E., Westermann M., Weber T., Nathanael J., Iliou A., et al. // arXiv. 2304. 14413v1
- Studer D., Humbel B.M., Chiquet M. // Histochem. Cell. Biol. 2008. V. 130. № 5. P. 877–889.
- Chen J.H., Vanslebrouck B., Loconte V., Ekman A., Cortese M., Bartenschlager R., McDermott G., Larabell C.A., Le Gros M.A., Weinhardt V. // STAR Protoc. 2022. V. 3. № 1. P. 101176.
- Duke E.M., Razi M., Weston A., Guttman P., Werner S., Henzler K., Schneider G., Tooze S.A., Collinson L.M. // Ultramicroscopy. 2014. V. 143. № 100. P. 77–87.
- Guzzi F., Gianoncelli A., Billè F., Carrato S., Kourousias G. // Life (Basel). 2023. V. 13. № 3. P. 629.
- Nahas K.L., Fernandes J.F., Vyas N., Crump C., Graham S., Harkiolaki M. // Biol. Imaging. 2022. V. 2. P. e3.
- Dyhr M.C.A., Sadeghi M., Moynova R., Knappe C., Kepsutlu Çakmak B., Werner S., Schneider G., McNally J., Noé F., Ewers H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2023. V. 120. № 24. P. e2209938120.
- Lühl L., Andrianov K., Dierks H., Haidl A., Dehlinger A., Heine M., Heeren J., Nisius T., Wilhein T., Kanngießer B. // J. Synchrotron Radiat. 2019. V. 26. № 2. P. 430–438.
- Shinohara K., Toné S., Ejima T., Ohigashi T., Ito A. // Cells. 2019. V. 8. № 2. P. 164.
- Larabell C.A., Nugent K.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. № 5. P. 623–631.
- Chiappi M., Conesa J.J., Pereira E., Sorzano C.O., Rodríguez M.J., Henzler K., Schneider G., Chichón F.J., Carrascosa J.L. // J. Nanobiotechnol. 2016. V. 14. P. 15.
- Smith E.A., McDermott G., Do M., Leung K., Panning B., Le Gros M.A., Larabell C.A. // Biophys. J. 2014. V. 107. № 8. P. 1988–1996.
- Niclis J.C., Murphy S.V., Parkinson D.Y., Zedan A., Sathananthan A.H., Cram D.S., Heraud P. // J. R. Soc. Interface. 2015. V. 12. № 108. P. 20150252.
- Pérez-Berná A.J., Rodríguez M.J., Chichón F.J., Friesland M.F., Sorrentino A., Carrascosa J.L., Pereira E., Gastaminza P. // ACS Nano. 2016. V. 10. № 7. P. 6597–6611.
- Fahy K., Weinhardt V., Vihinen-Ranta M., Fletcher N., Skoko D., Pereira E., Gastaminza P., Bartenschlager R., Scholz D., Ekman A., et al. // J. Phys. Photonics. 2021. V. 3. P. 031002.
- Carlson D.B., Gelb J., Palshin V., Evans J.E. // Microsc. Microanal. 2013. V. 19. № 1. P. 22–29.
- Chen H.Y., Chiang D.M., Lin Z.J., Hsieh C.C., Yin G.C., Weng I.C., Guttman P., Werner S., Henzler K., Schneider G., et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 34879.
- White K.L., Singla J., Loconte V., Chen J.H., Ekman A.,

- Sun L., Zhang X., Francis J.P., Li A., Lin W., et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 50. P. eabc8262.
35. Gil S., Solano E., Martínez-Trucharte F., Martínez-Esaín J., Pérez-Berná A.J., Conesa J.J., Kamma-Lorger C., Alsina M., Sabés M. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 3. P. e0230022.
36. Bolitho E.M., Sanchez-Cano C., Huang H., Hands-Portman I., Spink M., Quinn P.D., Harkiolaki M., Sadler P.J. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020. V. 25. № 2. P. 295–303.
37. Loconte V., Chen J.H., Cortese M., Ekman A., Le Gros M.A., Larabell C., Bartenschlager R., Weinhardt V. // *Cell. Rep. Methods.* 2021. V. 1. № 7. P. 100117.
38. Scrimieri R., Locatelli L., Cazzaniga A., Cazzola R., Malucelli E., Sorrentino A., Iotti S., Maier J.A. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 15133.
39. Elgass K.D., Smith E.A., LeGros M.A., Larabell C.A., Ryan M.T. // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 15. P. 2795–2804.
40. Kepsutlu B., Wycisk V., Achazi K., Kapishnikov S., Pérez-Berná A.J., Guttmann P., Cossmer A., Pereiro E., Ewers H., Ballauff M., et al. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 2. P. 2248–2264.
41. Dang Z., Tao X.Y., Guan Y., Wu Z., Xiong Y., Liu G., Tian Y., Tian L.J. // *ACS Nano.* 2023. V. 17. № 10. P. 9069–9081.
42. Egger D., Wölk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 12. P. 5974–5984.
43. Asselah T., Bièche I., Mansouri A., Laurendeau I., Cazals-Hatem D., Feldmann G., Bedossa P., Paradis V., Martinot-Peignoux M., Lebrech D., et al. // *J. Pathol.* 2010. V. 221. № 3. P. 264–274.
44. Jamme F., Cinquin B., Gohon Y., Pereiro E., Réfrégiers M., Froissard M. // *J. Synchrotron Radiat.* 2020. V. 27. № 3. P. 772–778.
45. Teramoto T., Azai C., Terauchi K., Yoshimura M., Ohta T. // *Plant Physiol.* 2018. V. 177. № 1. P. 52–61.
46. Sviben S., Gal A., Hood M.A., Bertinetti L., Politi Y., Bennet M., Krishnamoorthy P., Schertel A., Wirth R., Sorrentino A., Pereiro E., Faivre D., Scheffel A. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11228.
47. Kahil K., Varsano N., Sorrentino A., Pereiro E., Rez P., Weiner S., Addadi L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 9. P. 30957–30965.
48. Bonany M., Pérez-Berná A.J., Dučić T., Pereiro E., Martín-Gómez H., Mas-Moruno C., van Rijjt S., Zhao Z., Espanol M., Ginebra M.P. // *Biomater. Adv.* 2022. V. 142. P. 213148.
49. Chichón F.J., Rodríguez M.J., Pereiro E., Chiappi M., Perdiguero B., Guttmann P., Werner S., Rehbein S., Schneider G., Esteban M., et al. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 202–211.
50. Kördel M., Svenda M., Reddy H.K.N., Fogelqvist E., Arsana K.G.Y., Hamawandi B., Toprak M.S., Hertz H.M., Sellberg J.A. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 5025.
51. Phillips P., Parkhurst J.M., Kounatidis I., Okolo C., Fish T.M., Naismith J.H., Walsh M.A., Harkiolaki M., Dumoux M. // *Life (Basel).* 2021. V. 11. № 8. P. 842.
52. Hale V.L., Watermeyer J.M., Hackett F., Vizcay-Barrena G., van Ooij C., Thomas J.A., Spink M.C., Harkiolaki M., Duke E., Fleck R.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 13. P. 3439–3444.
53. Lobato-Márquez D., Conesa J.J., López-Jiménez A.T., Divine M.E., Pruneda J.N., Mostowy S. // *J. Cell Sci.* 2023. V. 136. № 7. P. jcs261139.
54. Weirich C.S., Erzberger J.P., Barral Y. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 6. P. 478–489.
55. Turk-Kubo K.A., Loconte V., Vanslebrouck B., Mak W.K.E., Ekman A., Chen J.H., Takano Y., Horiguchi T., Nishimura T., Adachi M., et al. // *Microsc. Microanal.* 2023. V. 29. № 29 Suppl. 1. P. 1165.
56. Le Gros M.A., Clowney E.J., Magklara A., Yen A., Markenscoff-Papadimitriou E., Colquitt B., Myllys M., Kellis M., Lomvardas S., Larabell C.A. // *Cell Rep.* 2016. V. 17. № 8. P. 2125–2136.
57. Bian Q., Belmont A.S. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. № 3. P. 359–366.
58. Polishchuk E.V., Polishchuk R.S., Luini A. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 931. P. 413–422.
59. Hampton C.M., Strauss J.D., Ke Z., Dillard R.S., Hammonds J.E., Alonas E., Desai T.M., Marin M., Storms R.E., Leon F., et al. // *Nat. Protoc.* 2017. V. 12. № 1. P. 150–167.
60. Berger C., Premaraj N., Ravelli R.B.G., Knoops K., López-Iglesias C., Peters P.J. // *Nat. Methods.* 2023. V. 20. № 4. P. 499–511.
61. Schneider G., Guttmann P., Rehbein S., Werner S., Follath R. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 212–223.
62. Schermelleh L., Heintzmann R., Leonhardt H. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 190. № 2. P. 165–175.
63. Varsano N., Dadosh T., Kapishnikov S., Pereiro E., Shimoni E., Jin X., Kruth H.S., Leiserowitz L., Addadi L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. № 45. P. 14931–14940.
64. Varsano N., Beghi F., Elad N., Pereiro E., Dadosh T., Pinkas I., Perez-Berna A.J., Jin X., Kruth H.S., Leiserowitz L., Addadi L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 30. P. 7662–7669.
65. Faoro R., Bassu M., Mejia Y.X., Stephan T., Dudani N., Boeker C., Jakobs S., Burg T.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 6. P. 1204–1209.
66. Kounatidis I., Stanifer M.L., Phillips M.A., Paul-Gilloteaux P., Heiligenstein X., Wang H., Okolo C.A., Fish T.M., Spink M.C., Stuart D.I., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 2. P. 515–530. e17.
67. Phillips M.A., Harkiolaki M., Susano Pinto D.M., Parton R.M., Palanca A., Garcia-Moreno M., Kounatidis I., Sedat J.W., Stuart D.I., Castello A., et al. // *Optica.* 2020. V. 7. № 7. P. 802–812.
68. Koronfel M., Kounatidis I., Mwangangi D.M., Vyas N., Okolo C., Jadhav A., Fish T., Chotchuang P., Schulte A., Robinson R.C., et al. // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2021. V. 77. № 12. P. 1479–1485.
69. Malyshev I.V., Reunov D.G., Chkhhalo N.I., Toropov M.N., Pestov A.E., Polkovnikov V.N., Tsybin N.N., Lopatin A.Y., Chernyshev A.K., Mikhailenko M.S., et al. // *Opt. Express.* 2022. V. 30. № 26. P. 47567–47586.
70. Чхало Н.И., Малышев И.В., Пестов А.Е., Полковников В.Н., Салащенко Н.Н., Топоров М.Н. // *Успехи физ. наук.* 2020. Т. 190. № 1. С. 74–91.
71. Малышев И.В., Пестов А.Е., Полковников В.Н., Реунов Д.Г., Торопов М.Н., Чхало Н.И., Ракшун Я.В., Хомяков Ю.В., Чернов В.А., Щелоков И.А. // *Поверхность. Рентг. синхр. и нейтр. исследования.* 2023. Т. 5. С. 3–15.
72. Shaw P. // *Histochem. J.* 1994. V. 26. № 9. P. 687–694.
73. Malyshev I.V., Chkhhalo N.I. // *Ultramicroscopy.* 2019. V. 202. P. 76–86.
74. Gureyev T.E., Quiney H.M., Allen L.J. // *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 2022. V. 39. № 5. P. 936–947.
75. Kong H., Zhang J., Li J., Wang J., Shin H.J., Tai R., Yan Q., Xia K., Hu J., Wang L., et al. // *Natl. Sci. Rev.* 2020. V. 7. № 7. P. 1218–1227.
76. Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O’Shea C.C. // *Science.* 2017. V. 357. № 6349. P. eaag0025.
77. Fogelqvist E., Kördel M., Carannante V., Önfelt B., Hertz H.M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 13433.