

УДК 616-076.4; 53.086

Ультроструктурная 3D-микроскопия для биомедицины.

Принципы, применение, перспективы

К. Е. Мочалов¹, Д. С. Коржов^{1,2}, А. В. Алтунина^{1,3}, О. И. Агапова⁴, В. А. Олейников^{1,2*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, 115409 Россия³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия⁴Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182 Россия

*E-mail: voleinik@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2023

Принята к печати 29.12.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.27323

РЕФЕРАТ Современные биомедицинские исследования зачастую требуют трехмерного микроскопического анализа ультроструктуры биологических объектов и материалов. Усовершенствование традиционных методов оптической, электронной и зондовой микроскопии, исходно позволяющих получать двумерные изображения и данные для целей реконструкции трехмерных структур, требует концептуальных технических и методических решений. В обзоре рассмотрены принципы и возможные приложения таких методик, как просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов; техники на основе сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): матричная томография, СЭМ с фокусированным ионным пучком и серийная СЭМ поверхности блока. Описаны техники 3D-анализа на базе современных методов оптической микроскопии сверхвысокого разрешения: стохастической оптической реконструкции и микроскопии с истощением стимулированного излучения, а также методы ультроструктурной 3D-микроскопии на базе сканирующей зондовой микроскопии и возможности их объединения с оптическими техниками. Проведен сравнительный анализ преимуществ и недостатков рассмотренных подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ультроструктурная 3D-микроскопия, электронная микроскопия, томография, оптическая микроскопия сверхвысокого разрешения, сканирующая зондовая микроскопия, биомедицинские исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭМ, EM – электронная микроскопия, Electron Microscopy; СЭМ, SEM – сканирующая электронная микроскопия, Scanning Electron Microscopy; ПЭМ, TEM – просвечивающая электронная микроскопия, Transmission Electron Microscopy; OM – оптическая микроскопия; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; STORM – микроскопия стохастической оптической реконструкции, STochastic Optical Reconstruction Microscopy; STED – микроскопия с истощением стимулированного излучения, Stimulated Emission Depletion; ssTEM – просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов, serial sectioning Transmission Electron Microscopy; АТ – матричная томография, Array Tomography; АТUM-SEM – сканирующий электронный микроскоп с автоматизированным ленточным сбором срезов ультрамикротоме, Automated Tape Collecting Ultramicrotome Scanning Electron Microscopy; SBF-SEM – последовательная сканирующая электронная микроскопия торцевых поверхностей, Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy; FIB-SEM – сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком, Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy; ЭТ – электронная томография; ЭКТ – электронная криотомография; STA – усреднение субтомограммы, Subtomogram Averaging; AE – альвеолоциты, Alveolar Epithelial cells; SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул, Single-Molecule Localization Microscopy; PBS – поляризационный светоделитель, Polarizing Beam Splitter; WS – монохроматор, Wave Selector; PM – фазовый модулятор, Phase Modulator; SMF – одномо-

довое оптическое волокно, Single Mode Fiber; DC – дихроичное зеркало, DiChroic mirror; DF – дихроичный фильтр, Dichroic Filter; EF – интерференционный фильтр, Extracting Filter; MMF – многомодовое волокно, Multi-Mode Fiber; APD – лавинный фотодиод, Avalanche Photodiode; EMCCD – устройство умножения электронов с зарядовой связью; PALM – фотоактивированная оптическая микроскопия, Photo-Activated Light Microscopy; PAINT – точечное накопление для отображения наноразмерной топографии, Point Accumulation For Imaging In Nanoscale Topography; MINFLUX – микроскопия с минимальными потоками фотонов, Minimal Photon Fluxes; СЗНТ – сканирующая зондовая нанотомография; ФРТ (PSF) – функция рассеяния точки, Point Spread Function.

ВВЕДЕНИЕ

Для проведения современных исследований биологических объектов и наноматериалов требуются совершенствование и развитие методов трехмерного наномасштабного анализа спектральных, морфологических и оптических свойств наноструктурированных образцов.

Традиционно для задач двумерной визуализации принято использовать методы, основанные на трех базовых микроскопических техниках: электронной микроскопии (ЭМ) [1], оптической микроскопии (ОМ) [2] и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) [3]. Стоит отметить, что данные подходы имеют весьма широкие области применений, но отличаются основными характеристиками и дают различные типы информации об исследуемых объектах. Так ЭМ и СЗМ позволяют получать изображения с пространственным разрешением в несколько нанометров, что дает возможность выявлять различные компоненты внутренней структуры клеток. Существенными недостатками данных методов являются малое поле зрения и невозможность получения информации о составе образца. В противовес этому применение в ОМ высокоспецифичного иммуоокрашивания (в том числе и многоцветного) дает возможность адресно реконструировать пространственное распределение интересующих объектов, например, мембранных белков, ответственных за какие-либо процессы межклеточного взаимодействия. При этом для ОМ во многих случаях сохраняется возможность работать с живыми тканями. Основным недостатком метода является ограниченное дифракционным пределом разрешение. Из критерия Аббе $d > \lambda/2n$ следует, что высокое пространственное разрешение достигается при малых длинах волн и большом коэффициенте преломления среды. При использовании конфокальной оптической микроскопии можно добиться аксиального (ось Z) разрешения до 500 нм и до 250 нм в латеральной (XY) плоскости. Тем не менее данное ограничение удается обходить за счет современной компьютерной обработки и использования многолучевого освещения, на чем основаны такие методы, как микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy,

STORM) [4] и микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion, STED) [5].

Следующим этапом в развитии вышеописанных методик является переход к трехмерному анализу, так как в большинстве случаев именно особенности трехмерной организации биологических объектов и материалов имеют определяющее влияние на их функциональную активность и биологические свойства. По этой причине в последнее время появилось множество работ, посвященных различным подходам к решению данной проблемы. Таким образом, целью данного обзора является рассмотрение последних достижений в области получения трехмерных изображений с наноразмерным разрешением.

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА БАЗЕ ЭМ

Основными методами электронной микроскопии являются сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ); каждый из этих методов был по-своему модифицирован для получения трехмерных изображений. Создание подобных изображений основано на получении множества 2D-изображений сечений образца и соединении их в единое 3D-изображение (рис. 1).

Наиболее развитые методы получения трехмерных изображений, использующие данный подход, представлены на рис. 2. К основным отличиям, влияющим на выбор подхода для конкретной задачи [6], относятся способ создания последовательности изображений срезов [7], анализируемый объем, а также максимальное пространственное разрешение.

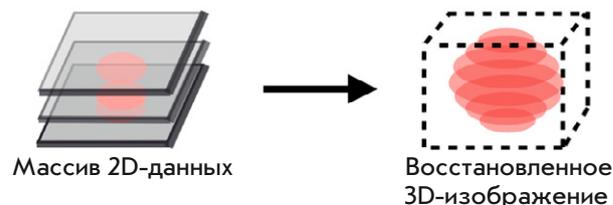


Рис. 1. Основной принцип получения трехмерных изображений

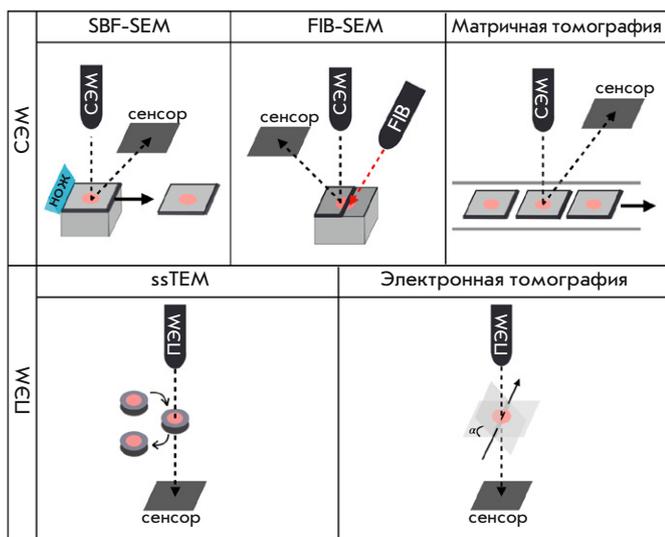


Рис. 2. Методы получения трехмерных изображений с использованием ПЭМ и СЭМ. Независимо от типа микроскопии первым шагом является пробоподготовка, заключающаяся в использовании полимерных сред для иммобилизации образца с последующим выполнением срезов. Среди методов фиксации образца наибольшую популярность получили заливка метакрилатом [8], криофиксация, замораживание с температурной заливкой, а также криосрезы Токаяши [9]. Следующий шаг – накопление массива 2D-изображений с помощью ПЭМ или СЭМ. Полученные изображения необходимо выравнивать по осям XY, а также устранять возможные повороты, что особенно важно для систем, в которых исследуются отдельные срезы (ssTEM и матричная томография). Далее из полученного массива выделяют область, которая должна быть на итоговом изображении. Последним шагом является создание полноценного 3D-изображения из полученных 2D-сегментов с помощью специализированного программного обеспечения

Первым из методов 3D-микроскопии на основе ЭМ была ПЭМ серийных срезов (serial sectioning TEM, ssTEM) [10], которая представляет собой ПЭМ с последовательным исследованием тонких срезов, полученных на ультрамикротоме. Главным достоинством ssTEM является возможность неограниченного исследования по глубине. В настоящее время метод доведен до предела своих возможностей и активно применяется во множестве исследований [11, 12]. Пример работы данного метода приведен на рис. 3.

Главный недостаток метода ssTEM – его трудоемкость [13] – необходимость по отдельности изготавливать и исследовать большое количество срезов, а также техническая сложность. Срезы имеют множество артефактов: механические загрязнения

ssTEM: стопки Гольджи

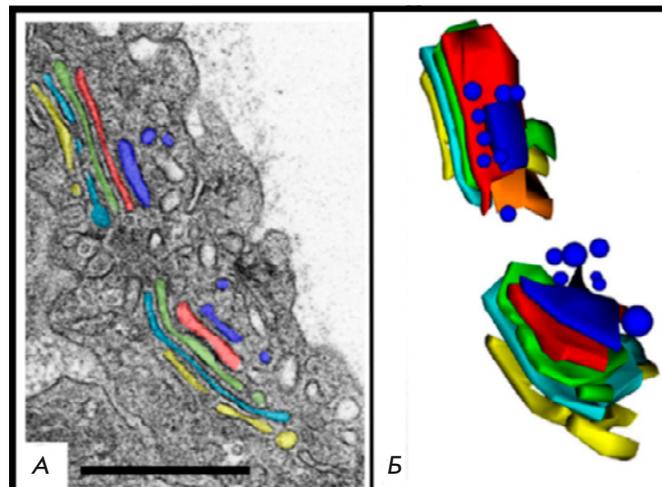


Рис. 3. ssTEM-изображение стопок Гольджи в клетке AE1 легкого мыши. Одна из ЭМ-микрофотографий серии с цветовой ручной сегментацией (А). 3D-модель стопок Гольджи, полученная в ПЭМ на основе девяти последовательных срезов с сегментированными вручную цистернами обеих стопок (Б). Масштабная линейка 500 нм. Рисунок взят из работы [6]

[14], дыры, трещины, сжатия [15], складки и неравномерную толщину среза или несущей пленки [16], что может помешать корректной обработке данных. Еще большей проблемой является возможность утраты части срезов из-за складок или повреждений [17, 18]. В таких случаях полученное изображение может быть некорректным и требует отдельных усилий по устранению потерь.

Метод матричной томографии (Array Tomography, AT) во многом аналогичен ssTEM, но использует СЭМ вместо ПЭМ. Подобное изменение позволило использовать в качестве подложки предметные стекла, кремниевые пластины, покровные стекла с проводящим покрытием [19, 20]. В отличие от сетки для ПЭМ такие подложки имеют в разы больший размер, а значит, позволяют собирать больше срезов. Пример работы метода представлен на рис. 4.

В качестве подложки также может выступать специальная лента, что позволяет в автоматизированном режиме получать тысячи срезов одного образца. Данный подход получил название сканирующей электронной микроскопии с автоматизированным ленточным сбором срезов ультрамикротомом (Automated Tape Collecting Ultramicrotome SEM, ATUM-SEM) [21] Для получения срезов используют ультрамикротом со специальным УМТ-ножом с ван-

Матричная томография: клетки AE2 в фиброзной паренхиме лёгкого мыши

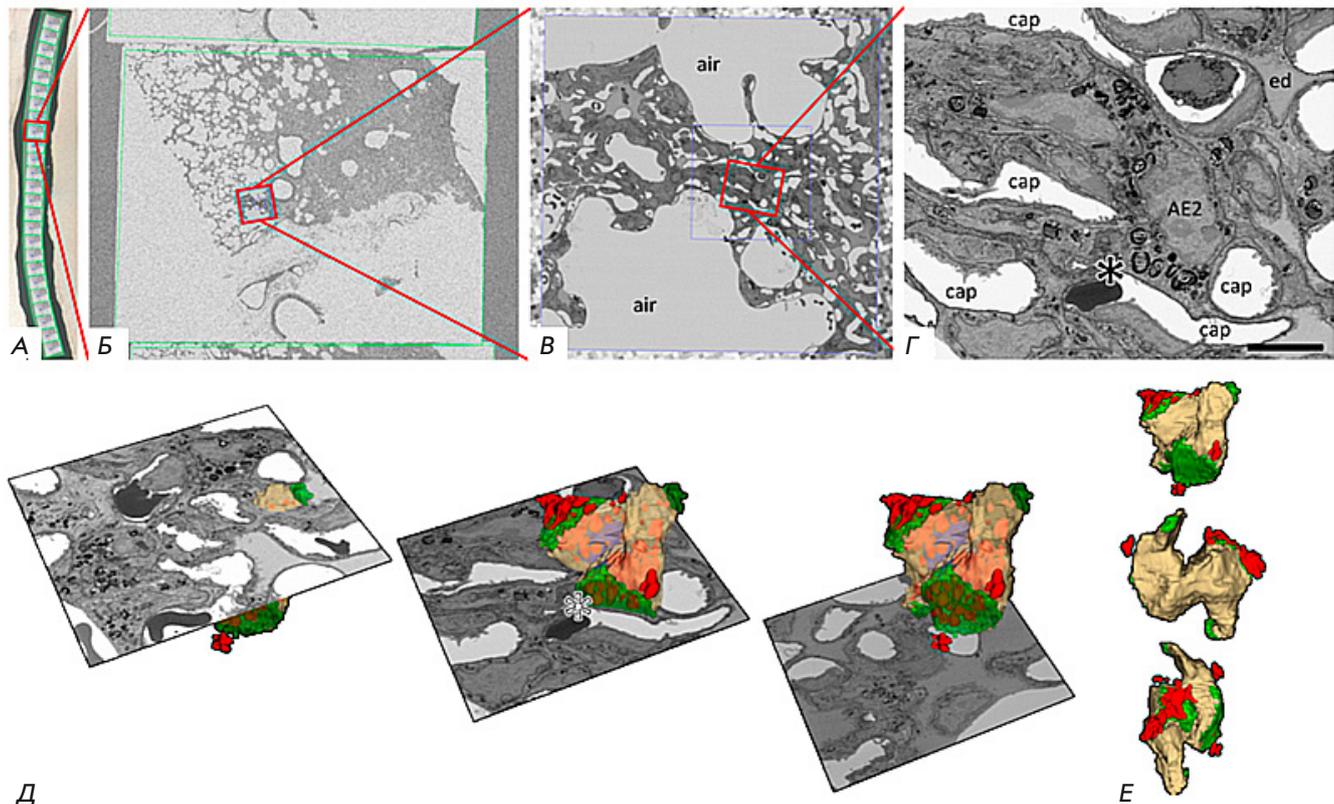


Рис. 4. АТ-изображение клетки AE2 в фиброзной паренхиме легкого мыши. А–Г – последовательное увеличение СЭМ-изображения от одного из срезов ленты (А). Звездочка на Г соответствует одной клетке AE2 в области фиброзной ткани – масштабная линейка 5 мкм. 3D-реконструкция клетки AE2 (Д). Показаны три отдельные плоскости сечения из последовательности записанных изображений. 3D-реконструкция клетки AE2 при разных углах поворота (Е). Рисунок взят из работы [6]

ночкой. Плавающие в воде фрагменты собираются движущейся лентой, которая при желании может сворачиваться в катушку. Далее ленту разрезают на части, прикрепляют к кремниевым пластинам и получают СЭМ-изображения [19]. Из преимуществ данной методики стоит отметить возможность применения постокрашивания, что позволяет получить дополнительное контрастирование [22]. Из всех методик ЭМ ATUM-SEM имеет самое большое поле зрения, ограниченное только шириной ножа ультрамикротомы. Недостатки данной методики в целом такие же, как и в случае ssTEM, однако они не так существенны из-за более крупных матриц и автоматизированного сбора срезов.

Получение СЭМ-изображений возможно не только со срезов, но и с поверхности оставшейся части образца, на чем и основана методика под уже достаточно устоявшимся в российской терминологии названием «последовательная сканирующая электронная микроскопия торцевых поверхностей»

(SBF-SEM, Serial Block-Face Scanning EM). Верхняя часть залитого смолой образца удаляется, а оставшаяся поверхность сканируется СЭМ. Применение данного подхода позволяет устранить такие проблемы, как выравнивание положения, искажения, сжатие и повреждение срезов. Проблему при этом представляет накопление заряда в изолирующей заливочной смоле, что ухудшает качество изображения. По этой причине требуется дополнительная металлизация. При использовании электронного пучка с высокой интенсивностью существует риск повреждения полимера, что также снижает разрешение и уменьшает пластичность, необходимую для качественного среза поверхности [23, 24]. В таком подходе также отсутствует возможность постокрашивания, что требует от исходного образца хорошего контраста и проводимости. Примером работы метода может служить рис. 5А.

Для среза поверхности возможно применение фокусированного ионного пучка. Данный подход

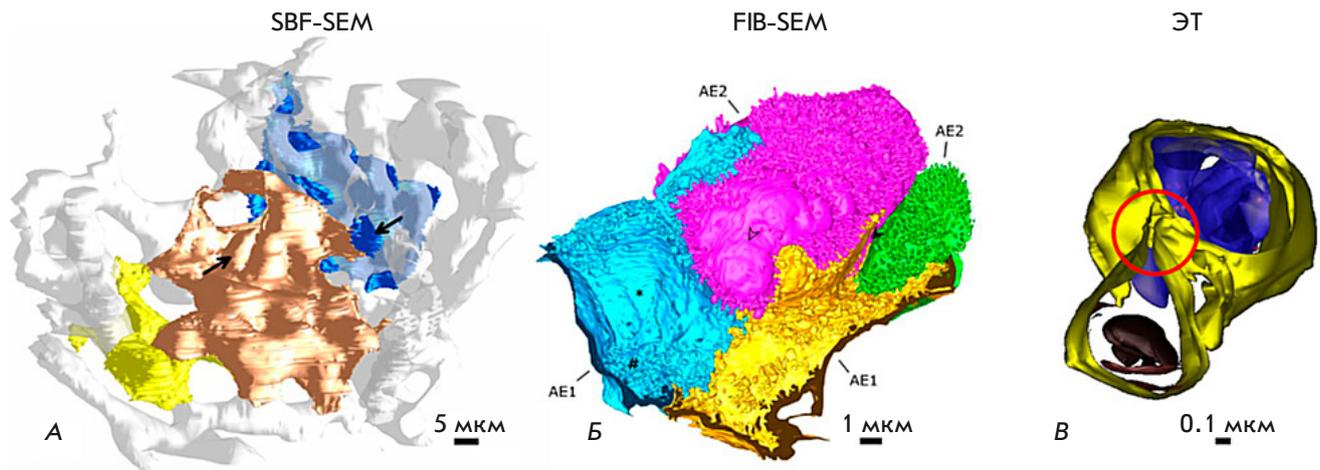


Рис. 5. 3D-реконструкции, полученные с помощью серийной сканирующей электронной микроскопии с блочной поверхностью (SBF-SEM), СЭМ с послойным травлением фокусированным ионным пучком (FIB-SEM) и электронной томографии (ЭТ). 3D-реконструкция альвеолоцитов типа 1 (AE1) человека (желтый, золотой, синий) и альвеолярно-капиллярной сети (белый) на основе набора данных SBF-SEM. Стрелки указывают положение ядер клеток AE1 (А). 3D-реконструкция практически всей клетки альвеолоцита типа 2 (AE2) человека (розовый) с частями соседних клеточных доменов AE1 (синий, желтый) и дополнительной клетки AE2 (зеленый) на основе набора данных FIB-SEM (Б). 3D-реконструкция пластинчатого тела (вверху) и аутофагосомы (внизу) внутри клетки AE2 (легкое мыши) на основе набора данных ЭТ (В). Различимы отдельные липидные мембраны, что в данном случае указывает на связь двух органелл (красный кружок). Рисунок взят из работы [6]

получил название СЭМ с фокусированным ионным пучком (FIB-SEM, Focused Ion Beam Scanning EM). Во всем остальном логика работы прибора аналогична SBF-SEM. Конструктивно FIB-SEM состоит из двух источников излучения – расположенная сверху электронная оптика для сканирующего пучка и ионная оптика сбоку для срезающего пучка. Оба пучка фокусируются в одной точке и таким образом происходит непрерывное сканирование всего объема образца [25]. В зависимости от тока ионного пучка существует возможность как точного среза малой области, так и грубое срезание больших слоев. Применение данного метода позволяет увеличить осевое разрешение с 20 нм для ультрамикротомографа до 5 нм для ионного пучка. За подобное увеличение осевого разрешения приходится расплачиваться латеральным, потому что перефокусировка возможна только в области нескольких десятков микрон. Еще одно преимущество ионного пучка – возможность разрезать более твердые и нестабильные материалы, а также образцы без внедрения смолы. FIB-SEM уже применялся для детализации субклеточных структур и показал высокую степень детализации изображений [26, 27]. Результат работы можно увидеть на *рис. 5Б*.

Еще один метод трехмерного анализа – электронная томография (ЭТ) [28]. В отличие от всех вышеописанных методов ЭТ создает не физические,

а виртуальные срезы образца. Методика пробоподготовки аналогична случаю ПЭМ и СЭМ и включает химическую или криофиксацию, окраску или пометку антителами [29]. Таким образом, исследование происходит как при комнатной температуре при заливке смолой, так и при криотемпературе в случае замороженных образцов. Ниже будет уделено отдельное внимание аспекту работы ЭТ при криогенных температурах, использование которых породило отдельную методику – электронную криотомографию (ЭКТ) [30]. Также имеется возможность исследования суспензий частиц размером менее сотен нанометров (например, вирусов, органелл, макромолекул) путем нанесения на углеродную пленку или слой замерзшей воды [31].

По принципу работы ЭТ аналогичен компьютерной томографии, где излучение направляется под различными углами и таким образом создаются виртуальные срезы. Отличием между ними является то, что в компьютерной томографии рентгеновская трубка с камерой вращаются вокруг образца, а в ЭТ образец поворачивается при неподвижной камере. Подобное конструктивное изменение приводит к тому, что изображение получается не с 360°, а только с 70° от нормали к образцу в исходном положении. Такое ограничение получило название «недостающий клин» [32], или в случае использования нескольких направлений наклона «недостаю-

щий конус» [33]. Разрешение, достигаемое при использовании данного метода, значительно выше, чем в других подходах к 3D-анализу с использованием ЭМ, но оно сильно зависит от таких параметров, как толщина объекта, ускоряющее напряжение, калибровка наклона гониометра и совмещение полученных изображений. Необходимость достижения минимального соотношения сигнал/шум, страдающего от неупругого рассеяния, накладывает ограничения на возможный размер образца. Так, в ЭТ традиционно применяют ускоряющие напряжения в 200–300 кВ, что позволяет исследовать образцы до 300 нм. Использование более толстых образцов при этом снижает возможное разрешение [34]. Частично обойти это ограничение можно либо за счет метода фильтрации энергии [35], либо за счет увеличения ускоряющего напряжения. Например, в работе [36] использование ускоряющего напряжения в 400 кВ позволило исследовать образец толщиной 1 мкм. Из-за подобных ограничений в размере исследуемой области данный метод лучше всего подходит для изучения субклеточных структур размером менее 100 нм, что продемонстрировано на *рис. 5В*. Приложение ЭТ к более толстым структурам возможно при изготовлении серии срезов с последующим их сложением как в предыдущих методах [27, 37]. Необходимо отметить, что, несмотря на вышеуказанные ограничения, метод ЭТ, в частности ЭКТ, обладает абсолютно рекордными показателями для всех видов 3D-микроскопии с точки зрения достигаемого пространственного разрешения. Так, с использованием процедуры усреднения субтомограммы (STA, subtomogram averaging), применение которой требует, однако, присутствия существенного для усреднения количества одинаковых наноразмерных объектов, например, белковых молекул, была достигнута рекордная величина пространственного разрешения 3D-реконструкции – 2.8 Å [30].

Тем не менее широкое внедрение методов ЭТ и ЭКТ существенно затрудняется их достаточной сложностью, поэтому они развиваются и применяются довольно небольшим количеством исследовательских групп [28, 30, 38–40].

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА ОСНОВЕ СВЕРХРАЗРЕШАЮЩИХ МЕТОДИК ОМ

Традиционно оптическая визуализация биологических структур осуществлялась с помощью конфокальной микроспектрометрии [41], а также таких ее модификаций, как 4Pi-микроскопия [42–44]. Основным недостатком всех этих методик является низкое пространственное разрешение. По этой причине за последние два десятилетия были раз-

работаны и адаптированы для трехмерного анализа различные методики оптической микроскопии сверхвысокого разрешения, среди которых наиболее выделяются микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) [4] и микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion, STED) [5]. Практическая важность данных методик заключается в возможности не только структурного анализа образца с нанометровым разрешением, но и возможности реконструкции пространственного распределения целевых объектов исследования за счет высокоспецифичного флуоресцентного иммуоокрашивания, являющегося неотъемлемым шагом в процессе пробоподготовки в любой из сверхразрешающих методик ОМ.

Первой методикой трехмерной микроскопии сверхвысокого разрешения является 3D-STORM [45]. Она относится к такому классу микроскопии, как микроскопия локализации одиночных молекул (SMLM). В основании данного класса методик лежит факт того, что определенные флуорофоры спонтанно «загораются» и «гаснут», что может быть выявлено при быстрой покадровой съемке. Таким образом на каждый кадр попадет излучение различных подмножеств флуоресцирующих молекул. Полученные изображения по-прежнему ограничены дифракционным пределом, однако положение отдельных молекул выявляется с высокой точностью на основании множества кадров специальным математическим аппаратом с использованием триангуляции Делоне [46]. Финальное 3D-изображение реконструируется с использованием данных статистической обработки тысяч локализаций.

Первой пространственно-локализованной с помощью STORM одиночной молекулой был миозин [47]. Для получения изображений молекулы (флуоресцентные зонды) были разрежены до такой степени, что их сигналы не перекрывались. Таким образом удалось с большой точностью найти положение каждого зонда. Совсем иной подход был выработан в работе [48], где применяли фотоперекрывающиеся циановые красители. Процесс измерения происходил следующим образом: излучение с низкой интенсивностью включало небольшое количество зондов, после чего записывалось изображение и вычислялось их положение; излучение с другой длиной волны отключало этот набор зондов и включало другой. Многократное повторение данной процедуры позволило сформировать полноценное трехмерное изображение образца. Пространственное разрешение, достигаемое таким методом, составляет от 20 до 30 нм. Вариацией STORM является методика

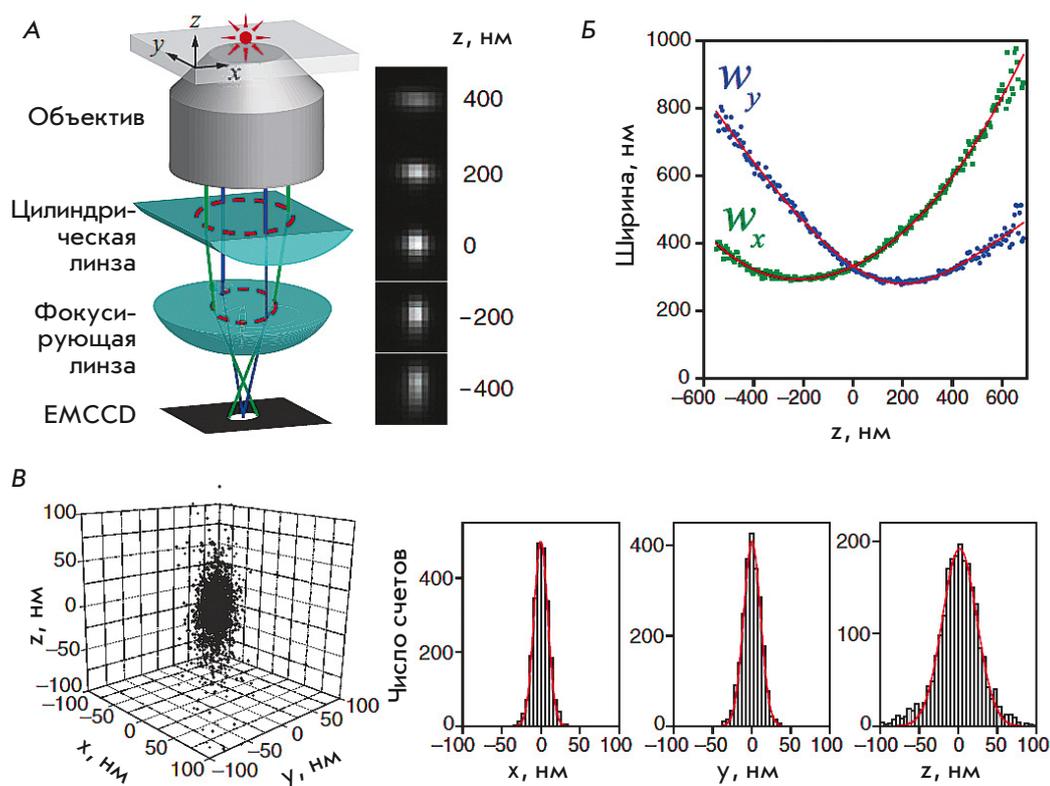


Рис. 6. Принцип методики 3D-STORM. (А) Оптическая схема определения аксиальной координаты излучающего объекта по анализу эллиптичности его изображения. На правой панели показаны изображения излучающего объекта в плоскостях X и Y в зависимости от аксиального положения. (Б) Примеры зависимостей эллиптичности изображения единичного флуорофора Alexa 647 для координат X и Y от фокусировки по оси Z . (В) Пример 3D-распределения локализаций одиночных излучающих объектов и соответствующие гистограммы распределения по направлениям X , Y и Z . Рисунок взят из работы [45]

PALM (Photo-Activated Light Microscopy), которая построена на аналогичном подходе, но вместо красителей используются фотоактивируемые белки [49]. Стоит отметить, что и в целом различия в методиках SMLM сводятся к используемым для специфического мечения флуорофорам. Так, например, в методе dSTORM (direct STORM) используются циановые красители (Cy5 и Alexa 647), переключаемые добавлением специального буфера, содержащего тиол и глюкозооксидазу [50], а широкий набор флуоресцентных меток для SMLM представлен в работах [51, 52]. Еще одна разновидность SMLM – метод PAINT (Point Accumulation For Imaging In Nanoscale Topography) использует диффундирующие красители, которые включаются только тогда, когда они временно прикреплены к целевой структуре [53, 54].

Разработка метода 3D-SMLM на базе STORM основана на учете астигматизма изображений, полученных с различной глубины образца [55]. Это достигается введением в оптическую схему специальной цилиндрической линзы с малым радиусом кривизны, благодаря чему фокальные плоскости для X - и Y -направлений отличаются. Глубина залегания флуорофора вычисляется из изменения эллиптичности пространственного распределения его излучения. Принцип работы данного подхода представлен на рис. 6. Так на рис. 6Б наглядно показано

различие в минимумах эллиптичности для координат X и Y и способ определения истинного положения образца на координате Z по пересечению зависимостей эллиптичности по X и Y . Также на рис. 6В приведен пример трехмерного распределения локализации одиночных молекул, в данном случае флуорофора Alexa 647. Экспериментально наблюдаемый кластер локализаций (пресечений кривых эллиптичности) одной и той же молекулы связан с ее многократной активацией/деактивацией. Таким образом, возникает необходимость локализации достаточно большого (в данном случае 145) количества кластеров, которые далее статистически выравниваются по центру масс для создания общего трехмерного распределения локализаций – левая панель на рис. 6В.

В качестве примера практического применения данной методики можно привести визуализацию клетки серии BS-C-1, окрашенной первичными и вторичными антителами, а также красителями Cy3 и Alexa 647 [56]. Результат такого подхода продемонстрирован на рис. 7.

В отличие от 3D-SMLM в случае трехмерной оптической визуализации методом STED исследуемая область освещается не целиком, а точно с помощью двух сфокусированных лазеров. Первый лазер сканирует поверхность аналогично обычному

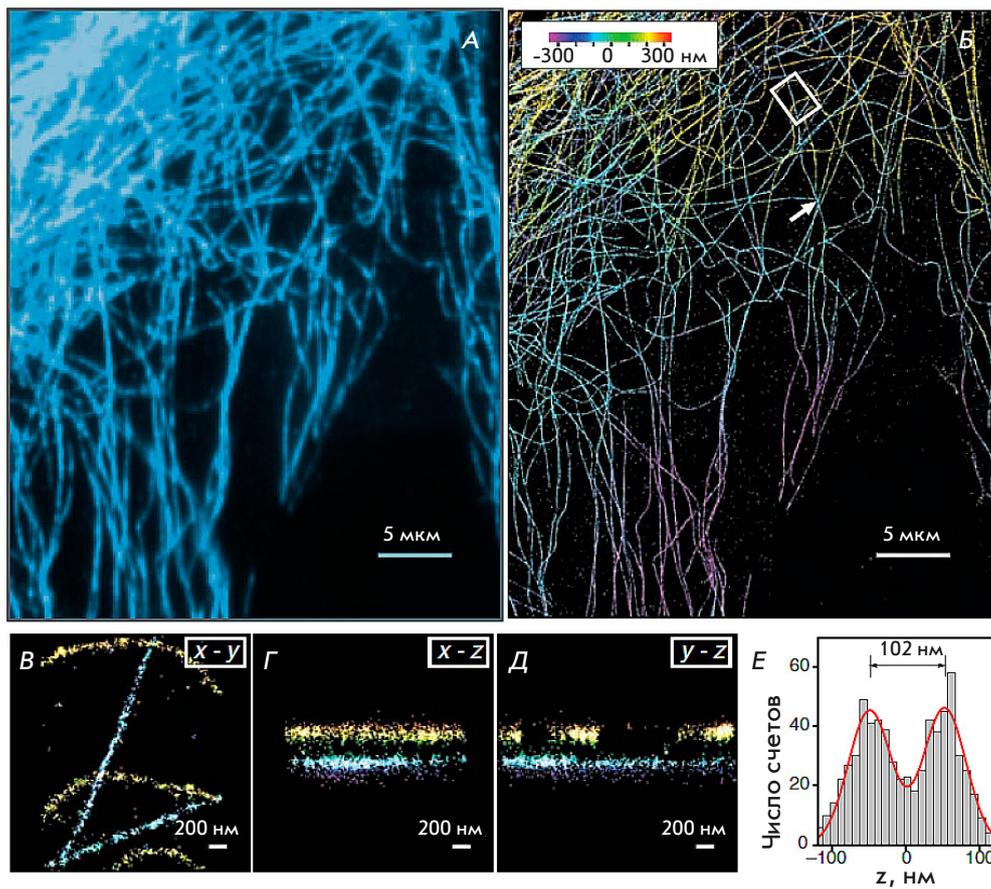


Рис. 7. Результаты, полученные с помощью методики 3D-STORM. (А) Широкопольное флуоресцентное изображение микротрубочек в клетке BS-C-1. (Б) Полученное в режиме 3D-STORM-изображение того же участка клетки BS-C-1, что и на панели (А). Данные об аксиальных координатах залегания представлены в шкале псевдоцвета. (В–Д) Поперечные сечения, соответствующие пяти нитям микротрубочек, в направлениях X-Y, X-Z и Y-Z в области клетки BS-C-1 – белый прямоугольник на (Б). (Е) Гистограмма Z-профиля двух микротрубочек, имеющих пересечение в проекции X-Y, построенная в области, указанной белой стрелкой, на панели (Б). Рисунок взят из работы [45]

конфокальному микроскопу, второй же имеет профиль пучка в фокальной плоскости в виде проекции тора и используется для подавления спонтанного излучения на краях исследуемой области с помощью вынужденного излучения. Разрешение в несколько десятков нанометров достигается за счет того, что регистрируемое излучение исходит ровно из центра пучка возбуждающего лазера [57]. Существенным фактором при этом является практически нулевая интенсивность в центре подавляющего пучка, иначе эффективность STED снижается за счет подавления излучения в исследуемой области [58]. В зависимости от распределения света в подавляющем пучке различают несколько типов STED: 1D-STED (направления X или Y) [59], 2D-STED (X и Y одновременно) [60], z-STED (вдоль оптической оси Z) и, наконец, 3D-STED

[61, 62]. Основной технической проблемой в случае 3D-STED является некогерентное объединение двух подавляющих лучей, один из которых имеет профиль, как у 2D-STED, а другой, как у z-STED. Такой подход позволяет также отдельно регулировать осевое и латеральное разрешение. Форма подавляющего луча задается созданием определенных фазовых паттернов. С этой целью используются пластины с фиксированной фазовой задержкой или пространственный модулятор света.

Традиционно в STED-микроскопии используют строго синхронизованные импульсные источники лазерного излучения, работающие по следующему принципу – после возбуждающего флуоресценцию импульса (около 80 пс, меньше времени жизни флуоресценции) следует суживающий пространственную область STED-импульс длительностью около

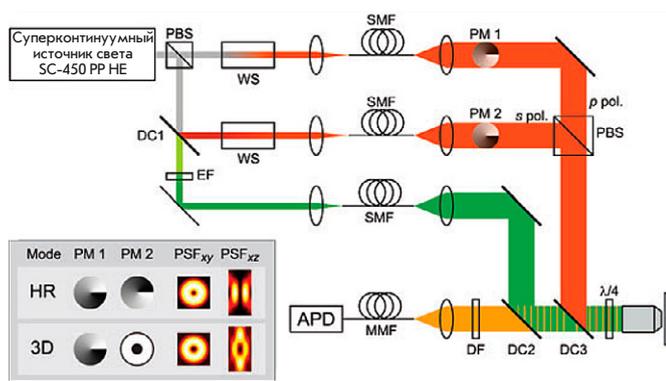


Рис. 8. Принципиальная схема установки для реализации методики 3D-STED с использованием суперконтинуумного лазера. Рисунок взят из работы [61]

250 пс. Однако расширение STED-микроскопии до видимого спектра потребовало использования сложной нелинейной оптики для формирования и синхронизации импульсов. Недавно [63] было показано, что STED-микроскопия может быть реализована с использованием непрерывных суперконтинуумных лазеров, что в значительной мере упрощает аппаратные комплексы для STED-микроскопии и может способствовать более широкому внедрению данной методики. Схема установки 3D-STED на суперконтинуумном лазере представлена на рис. 8.

Лазерное излучение делится поляризационным светоделителем (PBS) на два ортогонально (s и p) поляризованных луча. С помощью монохроматора (WS) из каждого луча выделяется необходимая длина волны, после чего происходит пространственная фильтрация пучка одномодовыми оптически волокнами (SMF). Далее профиль подавляющих пучков (выделены на рисунке красным) задается фазовыми пластинами (модуляторами) (PM1 и PM2), а итоговые лучи суммируются поляризационным светоделителем и подаются на вход объектива дихроичным зеркалом (DC3). В качестве возбуждающего излучения используется часть s поляризованного луча, прошедшая через дихроичное зеркало (DC1). Интерференционный (экстрагирующий) фильтр (EF) выделяет требуемую длину волны (выделена на рисунке зеленым), после чего пучок также подвергается пространственной фильтрации и подается на объектив дихроичным зеркалом (DC2). Четвертьволновая пластина перед объективом задает всем пришедшим лучам круговую поляризацию. Стоксов флуоресцентный сигнал (выделен на рисунке желтым) проходит оба дихроичных зеркала и фильтруется от возбуждающего излучения оптическим (дихроичным) НЧ-фильтром (DF), после чего фокусируется в многомодовое волокно (MMF),

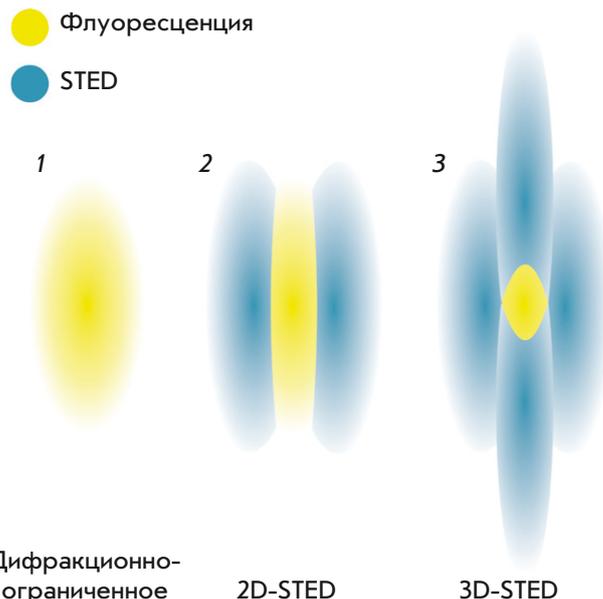


Рис. 9. Сужение эффективной области излучения за счет STED-подавления периферийного излучения. 1 – дифракционно-ограниченная флуоресцентная ФРТ, 2 – торообразный луч STED сужает диаметр флуоресцентной ФРТ, 3 – флуоресцентная ФРТ в случае 3D-STED

выступающее в роли конфокального отверстия, и регистрируется лавинным фотодиодом (APD). Сканирование происходит с помощью перемещения образца трехкоординатным пьезопозиционером. На рис. 8 также изображены функции рассеяния точки в нескольких направлениях, при использовании фазовых пластин для сверхвысокого латерального разрешения (HR) и получения 3D-изображений [64]. Сужение эффективной области излучения для 3D-STED подробнее показано на рис. 9.

Основными параметрами, влияющими на пространственное разрешение STED, являются интенсивность лазера и оптические aberrации. Для биологических образцов это значение составляет несколько десятков нанометров. В настоящее время ведутся работы по устранению aberrаций, возникающих при использовании длиннофокусных объективов и оптических окон, благодаря чему стали возможными безaberrационные 3D-изображения глубиной в десятки нанометров [65]. Пример работы 3D-STED представлен на рис. 10.

Важной особенностью метода является то, что наномасштабное разрешение достигается без математической обработки сигнала. Однако в последнее время ведутся работы по совмещению STED и SMLM, примером которых может служить методика 3D-MINFLUX (Minimal Photon Fluxes) с рекордным для флуоресцентной микроскопии разрешением в единицы нанометров [66, 67].

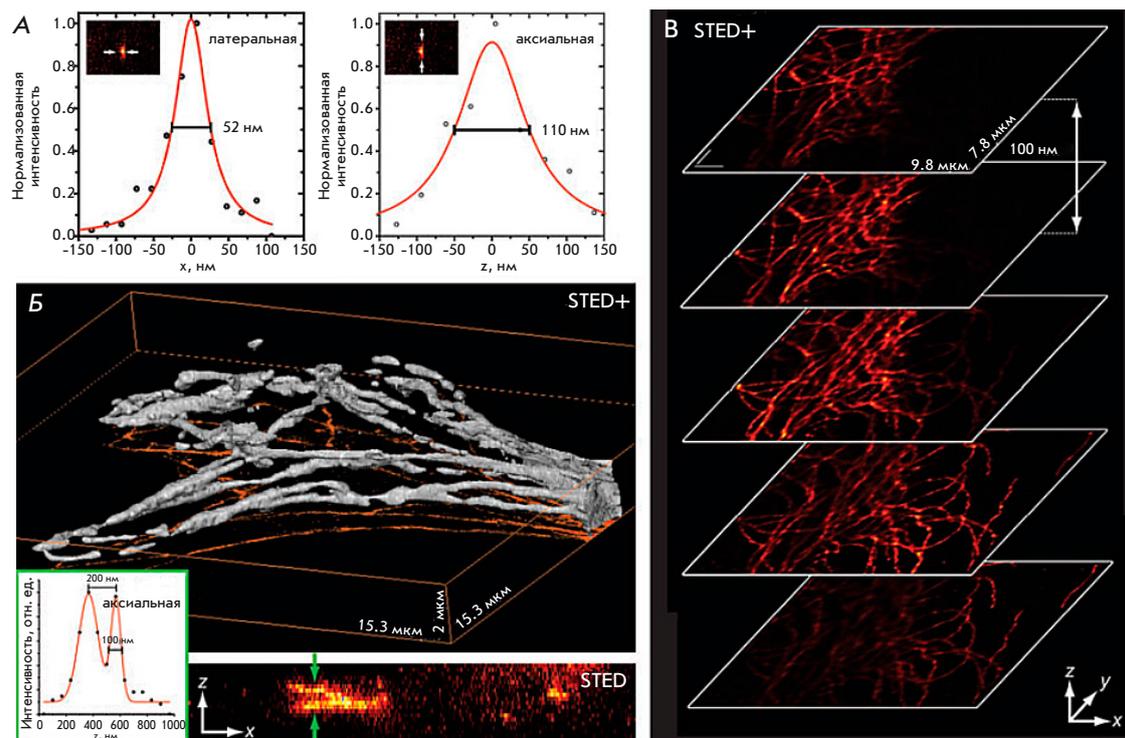


Рис. 10. Результаты, получаемые с использованием методики 3D-STED. (А) Значения пространственных разрешений флуоресцентных наночастиц диаметром 44 нм: 52 нм в X-направлении и 110 нм в аксиальном (Z) направлении. (Б) 3D-изображение флуоресцентно меченных микротрубочек: визуализация изоповерхности (вверху) и проекция максимальной интенсивности вдоль оси Y (внизу) – 30 срезов. На вставке показан профиль интенсивности в указанном месте. (В) Срезы, полученные с шагом 100 нм в направлении z. Рисунок взят из работы [61]

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА ОСНОВЕ СЗМ

Подход к трехмерному анализу с использованием сканирующей зондовой микроскопии во многом аналогичен другому описанному ранее методу картирования поверхности – сканирующей электронной микроскопии, и требует удаления просканированного нанослоя с поверхности материала. Принцип трехмерной реконструкции при этом такой же, как в FIB-SEM – объединение двумерных СЗМ-изображений в трехмерное. Важнейшее существенное отличие СЗМ от методов ЭМ состоит в среднем в несколько меньшем латеральном (XY) пространственном разрешении, определяемом радиусом кривизны зонда. Стандартные СЗМ-зонды имеют заявляемый производителем радиус кривизны около 10 нм, однако существует достаточно много специализированных зондов, например, с наращенными алмазными вискерами (<https://tipsnano.ru/catalog/afm-special/super-sharp/nsg10-dlc/>), имеющими радиус кривизны около 1 нм. Впервые СЗМ была применена для 3D-исследования микродоменов 3-блок-сополимера типа «полистирол-блок-бутадиен-блок-стирен» [68]. При этом для удаления слоев использовали контролируемое плазменное

травление, что позволило удалять по 7.5 нм материала. В итоге удалось реконструировать область с размерами $200 \times 160 \times 45$ нм. Существенным недостатком при этом была необходимость извлекать образец после проведения каждого сканирования, что исправили в ходе дальнейшего усовершенствования методики [69, 70]. Важной особенностью данного метода является то, что для получения последовательности 2D-изображений для последующей 3D-реконструкции нельзя использовать традиционную топографию в качестве зависящего от X и Y сигналов, поскольку в действительности традиционное атомно-силовое изображение уже представляет собой трехмерный объект. Поэтому для получения набора 2D-данных используются такие сигналы, как фаза, проводимость, магнитный отклик и т.п.

Данную методику использовали для реконструкции структуры полимерных композитов [71, 72], а также участка кости человека [70] в режимах получения фазового контраста, что и представлено на рис. 11. Изображение полученное после 19 сканирований в режиме фазового контраста с последующим травлением в соляной кислоте.

Среди недостатков метода наибольшую проблему представляет используемый процесс удаления

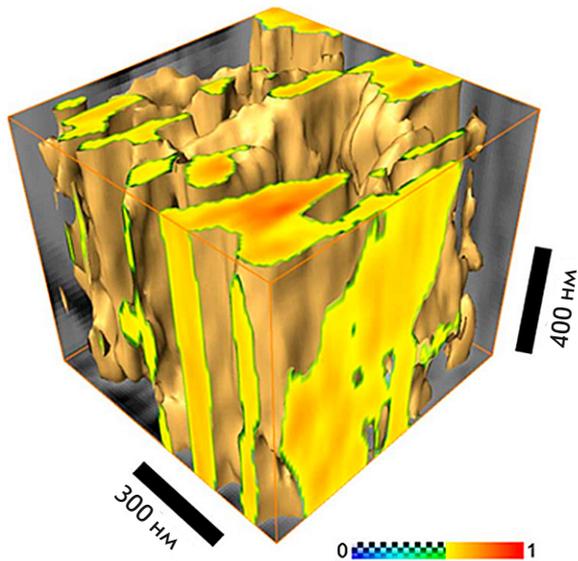


Рис. 11. Томографическая реконструкция участка человеческой кости, $256 \times 256 \times 19$ вокселей, пошаговое химическое травление 80 нм. Цветовая шкала является нормированной на единицу величины фазового сдвига колебаний СЗМ-зонда. Рисунок взят из работы [70]

материалов – травление, которое не позволяет исследовать пористые материалы, а также нанокомпозитов, различная скорость реакции компонентов которого приводит к искажениям при сканировании поверхности и, как следствие, к неправильной объемной реконструкции. Этот недостаток может

быть частично скомпенсирован применением специальных алгоритмов обработки данных [70], однако итоговое разрешение при этом будет отличаться для некоторых участков, что негативно сказывается на анализе результатов.

Иным подходом к 3D-СЗМ является использование ультрамикротомома [73, 74]. Минимальная толщина среза при этом зависит от возможностей используемого ультрамикротомома и для современных установок составляет 20 нм. При этом не играет роли, каким образом образец был иммобилизован – полимерной смолой или криозаморозкой.

Устройство для реализации СЗНТ продемонстрировано на рис. 12. Оно состоит из сканирующей головки СЗМ, прикрепленной специальными шарнирами к держателю ножа ультрамикротомома. Конструкция предусматривает два положения: для срезов (рис. 12, справа) и для измерений (рис. 12, слева). В первом сканирующая головка отведена от подвижной консоли ультрамикротомома, которая, в свою очередь, передвигается, производя срез. Во втором положении консоль возвращается в исходное состояние, подводится СЗМ и производится сканирование оставшейся части образца [73]. Подобный подход уже был описан ранее для СЭМ, он позволяет избежать таких механических нарушений сканируемого объекта, как сжатие, растяжение и деформация.

Полученные серии последовательных СЗМ-изображений используются для реконструкции и визуализации трехмерных наноструктур в объеме

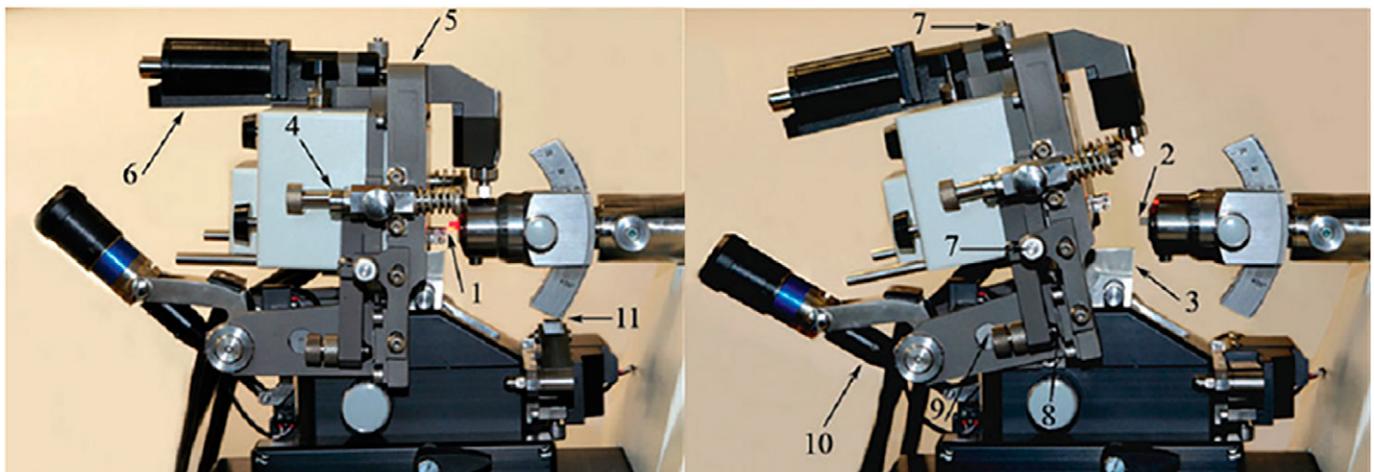


Рис. 12. Установка для реализации методики СЗНТ – Ntegra Tomo (НТ-МДТ, Россия). Левая панель – рабочее положение для проведения СЗМ-измерений. Правая панель – СЗМ-головка отведена для выполнения УМТ-среза. (1) держатель СЗМ-зонда; (2) исследуемый образец; (3) держатель УМТ-ножа; (4) опоры СЗМ-головки; (5) опорная платформа СЗМ-головки; (6) система моторизированного подвода СЗМ-головки; (7) микрометрические винты позиционера СЗМ-головки; (8) опорные пластины из поликорунда; (9) система шарнирного закрепления СЗМ-головки; (10) система моторизированного отвода СЗМ-головки для ее приведения в положение УМТ-среза; (11) ограничительная опора УМТ-консоли. Рисунок взят из работы [73]

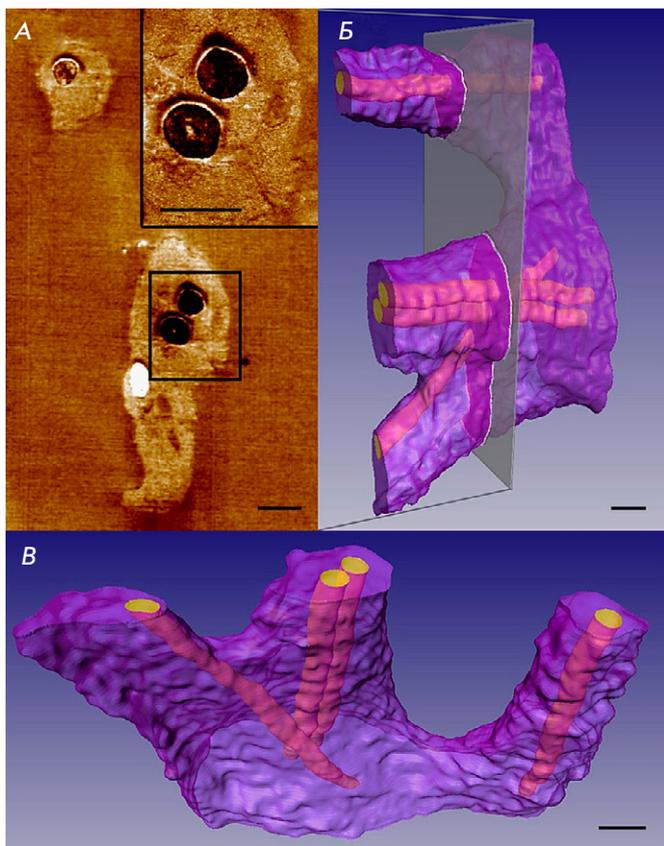


Рис. 13. Трехмерная СЗНТ-реконструкция кардиомиоцита, обволакивающего нановолокна. (А) Одно из топографических СЗМ-изображений (фазовый контраст), использованное для трехмерной реконструкции. На вставке увеличенная область, обозначенная прямоугольником, включающая в себя волокна и складку мембраны. (Б и В) Трехмерные модели кардиомиоцита (показан в двух ракурсах), обволакивающего нановолокна ($16.0 \times 16.0 \times 6.5$ мкм, 54 среза, толщина среза 120 нм). Выделенная плоскость на (Б) соответствует положению СЗМ-изображения на (А). Размерный отрезок 1 мкм. Измерения проведены в нормальных атмосферных условиях при комнатной температуре. Рисунок взят из работы [83]

исследуемых образцов. Использование различных измерительных методик СЗМ дает возможность получать информацию не только о морфологии, но и локальных электрических [75], механических [76] и многих других локальных свойствах. Методика позволяет выполнять реконструкцию трехмерного распределения наночастиц в объеме наноматериалов [75, 76] и трехмерной топологии нанопористых структур [77–80].

В частности, метод СЗНТ может эффективно применяться для трехмерной реконструкции микро- и нановолокнистых клеточных скаффолдов на основе биополимеров [81, 82] и определения их объемной

пористости, отношения площади поверхности к объему и других параметров трехмерной морфологии. Реконструкция трехмерных структур клеточно-инженерных конструкций позволяет исследовать топологию и численные морфологические параметры клеток и интерфейсов между клетками и скаффолдами, которые могут служить определяющими индикаторами состояния и биологической активности клеток [83, 84].

Так, например, при помощи метода СЗНТ выявлены характерные особенности взаимодействия неонатальных кардиомиоцитов крысы с полимерными нановолокнистыми матриксами: установлено, что кардиомиоциты, в отличие от фибробластов, в большинстве случаев полностью обволакивают нановолокна, что заметно увеличивает площадь зоны контакта клетки и волокон. На рис. 13 представлена полученная методом СЗНТ трехмерная реконструкция участка кардиомиоцита, обволакивающего подвешенные полилактидные нановолокна. Для получения данной трехмерной реконструкции было использовано 54 сегментированных СЗМ-изображения поверхности образца. Каждое изображение получено последовательно после очередного среза ультрамикротомом толщиной 120 нм [83].

Другим примером может служить изображенная на рис. 14 трехмерная структура фрагмента фибробласта (первичная культура фибробластов человека), контактирующего с несколькими волокнами микроволокнистого полиуретанового матрикса с образованием типичных выступов клеточной мембраны, частично обволакивающих волокна [84].

Исследование мягких биополимерных материалов и биологических объектов без заливки в эпоксидную среду требует их предварительной заморозки, для чего была разработана установка, объединяющая СЗМ и криокамеру ультрамикротомы [85]. Эта установка позволяет выполнять последовательные СЗМ-измерения на поверхности замороженных образцов непосредственно после выполнения среза алмазным ножом криоультрамикротомы в криокамере. В данном случае измерения выполняются в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов, установленных на кварцевых резонаторах и не требующих использования оптического дефлектометра, что важно для работы в условиях криокамеры. Примером работы такой установки служит изображенная на рис. 15 трехмерная крио-СЗНТ-реконструкция единичной микрочастицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, выполненная при температуре -120°C , так как выполнение срезов при более высоких температурах нарушает структуру гидрогелевых микроносителей [86, 87].

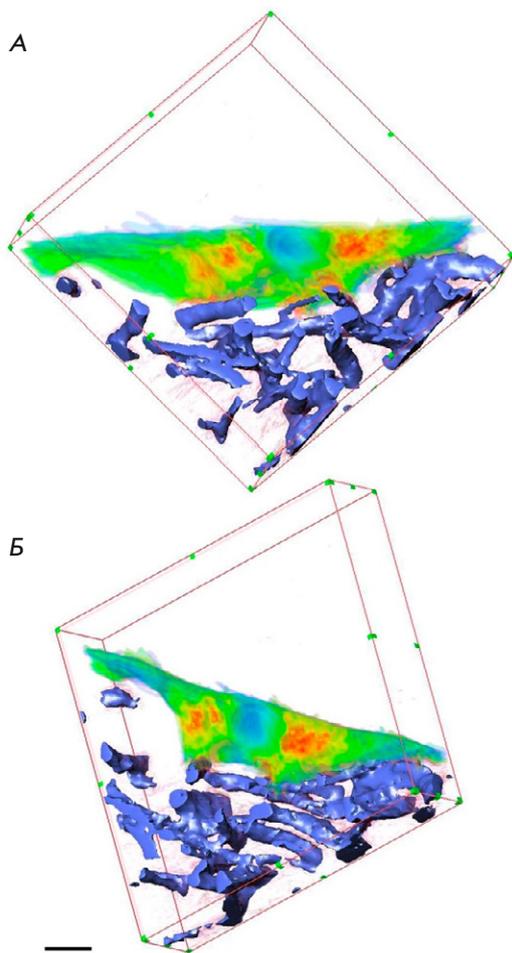


Рис. 14. Визуализация трехмерной СЗНТ-реконструкции фрагмента фибробласта (показан в зелено-красных цветах) и окружающих полиуретановых волокон (синий цвет), 23 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем $32.0 \times 32.0 \times 3.3$ мкм, размерный отрезок 3 мкм. Показан реконструированный фрагмент фибробласта в двух ракурсах (А и Б). Измерения проводили в режиме получения фазового контраста в нормальных атмосферных условиях при комнатной температуре. Рисунок взят из работы [84]

Подробный протокол получения образцов микро-частиц внеклеточного матрикса печени крысы приведен в [86]. Его использование обеспечило полное удаление клеток из внеклеточного матрикса, фрагменты которого измельчили в жидком азоте, что позволило получить микро-частицы внеклеточного матрикса с размерами в диапазоне 1–5 мкм. Далее полученные микро-частицы были ковалентно пришиты к альгинатным микросферам с размерами в диапазоне 200–300 мкм (рис. 15А).

Возможности анализа трехмерных наноструктур биологических объектов могут быть значительно расширены за счет объединения методик СЗНТ

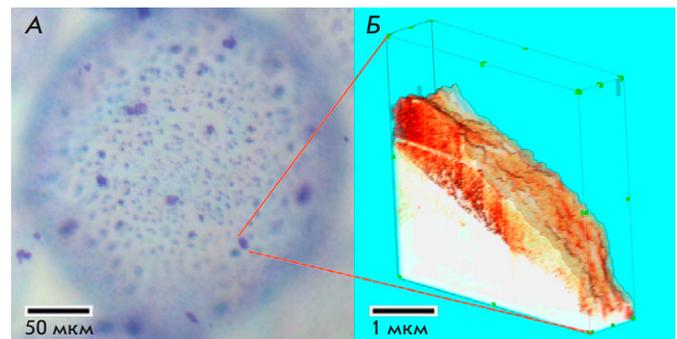


Рис. 15. Крио-СЗНТ-реконструкция единичной микро-частицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, выполненная при температуре -120°C : (А) Оптическая микроскопия, окраска Coomassie Brilliant Blue R-250; (Б) Трехмерная крио-СЗНТ-реконструкция единичной микро-частицы внеклеточного матрикса печени крысы, полученная из 13 последовательных крио-СЗМ-изображений поверхности микро-частицы на сферическом альгинатном микроносителе после последовательных крио-срезов толщиной 80 нм. Реконструированный объем $5.0 \times 5.0 \times 1.1$ мкм. Разрешение каждого 2D-СЗМ-скана 400×400 пикселей. Палитра псевдоцвета соответствует нормированной на единицу величине фазового сдвига колебаний СЗМ-зонда. Рисунок взят из работы [87]

и оптической микроскопии высокого разрешения, в частности флуоресцентной, в одну коррелятивную технологию оптическо-зондовой нанотомографии (ОЗНТ) [88–91], которая может быть реализована с использованием уникальной научной установки (<http://ckp-rf.ru/usu/486825/>).

На рис. 16 показаны пример коррелятивных флуоресцентных и СЗМ-изображений клетки MCF-7 и визуализация трехмерной реконструкции распределения доксорубина в клетке на основе полученных данных. На трехмерной реконструкции выделяется связная структура распределения, что может служить критерием успешности использованного 3D-метода. Разрешение полученной реконструкции по координате Z (аксиальному направлению) в данном случае соответствует толщине среза (120 нм) [92].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди рассмотренных в данном обзоре методов трехмерной реконструкции структуры невозможно выделить наилучший, так как каждый из них обладает своими существенными достоинствами и недостатками.

Основным преимуществом методов, основанных на электронной микроскопии, являются высочайшее

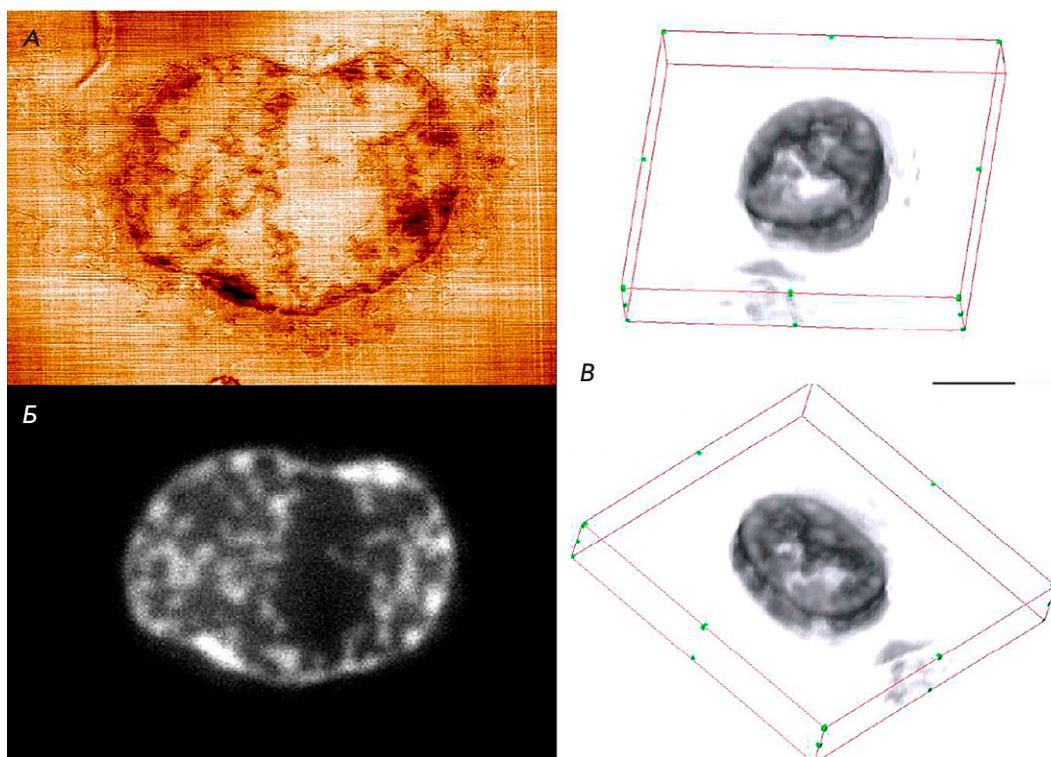


Рис. 16. Анализ образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с доксорубицином. (А) СЗМ-изображение топографии поверхности среза клетки MCF-7, размер скана 13.8×9.5 мкм, диапазон вариации высоты 33.5 нм; (Б) Флуоресцентное изображение среза той же области клетки MCF-7; (В) Трехмерная реконструкция распределения доксорубицина в объеме образца клетки MCF-7, $22.5 \times 18.7 \times 2.4$ мкм, толщина среза 120 нм, размерный отрезок 5 мкм, представлена визуализация в двух ракурсах. Рисунок взят из работы [92]

пространственное разрешение (менее 1 нм) и возможность получения изображений с большой глубиной за счет послойного сканирования, но применение в них вакуума, электронных и ионных пучков может повредить образец и изменить нативные структуры полимеров и белковых соединений. Более того, данные методы не дают никакой информации, кроме морфологии образца.

Оптические методы STORM и STED обладают меньшим пространственным разрешением в несколько нанометров, но дают возможность не только ультраструктурного анализа образца, но и проведения реконструкции пространственного распределения целевых объектов исследования за счет высокоспецифичного флуоресцентного иммуоокрашивания. При этом накладываются существенные ограничения на размеры исследуемой области. Стоит также отметить, что для получения качественных изображений требуется устранить aberrации, для чего необходимо применять сложные оптические системы.

Применение сканирующих зондовых микроскопов для трехмерной реконструкции позволяет подобно

ЭМ восстанавливать изображения образцов с большой протяженностью по глубине за счет удаления части материала, а также получать информацию о химическом строении, электрических и магнитных свойствах с помощью метода фазового контраста и специальных проводящих, магнитных или функционализированных зондов. При этом данная методика уступает электронной и оптической микроскопии в латеральном разрешении.

Использование коррелятивных измерительных методик СЗМ и флуоресцентной микроскопии высокого разрешения для трехмерной реконструкции ультраструктуры биологических объектов является перспективным направлением для повышения информативности получаемых трехмерных данных, в частности, трехмерных распределений флуоресцентных маркеров и наноразмерных морфологических особенностей. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 22-14-00168),
<https://rscf.ru/project/22-14-00168/>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franken L.E., Grünewald K., Boekema E.J., Stuart M.C.A. // *Small*. 2020. V. 16. № 14. P. e1906198.
2. Northover A.S., Keatley S., Elliot A.D., Hobbs R.P., Yang R., Lymbery A.J., Godfrey S.S., Wayne A.F., Thompson R.C.A. // *Syst. Parasitol.* 2019. V. 96. № 7. P. 553–563.
3. Bian K., Gerber C., Heinrich A., Müller D., Scheuring S., Jiang Y. // *Nat. Rev. Meth. Primers*. 2021. V. 1. № 1. P. 1–36. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>
4. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. // *Nat. Meth.* 2006. V. 3. № 10. P. 793–795.
5. Hell S.W., Wichmann J. // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. № 11. P. 780–782.
6. Schneider J.P., Hegermann J., Wrede C. // *Histochem. Cell Biol.* 2021. V. 155. № 2. P. 241–260.
7. Müller-Reichert T., Mancuso J., Lich B., McDonald K. // *Meth. Cell Biol.* 2010. V. 96. P. 331–361.
8. Borrett S., Hughes L. // *J. Microscopy*. 2016. V. 263. № 1. P. 3–9.
9. Bogers J., Nibbeling H., Deelder A., van Marck E. // *J. Histochem. Cytochem.* 1996. V. 44. № 1. P. 43–48.
10. Tokuyasu K.L. // *J. Cell Biol.* 1973. V. 57. P. 551–565.
11. Gay H., Anderson T.F. // *Science*. 1954. V. 120. № 3130. P. 1071–1073.
12. Miranda K., Girard-Dias W., Attias M., de Souza W., Ramos I. // *Mol. Reprod. Dev.* 2015. V. 82. P. 530–547.
13. Hegermann J., Wrede C., Fassbender S., Schliep R., Ochs M., Knudsen L., Mühlfeld C. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2019. V. 317. P. 778–784.
14. Kremer A., Lippens S., Bartunkova S., Asselbergh B., Blanpain C., Fendrych M., Goossens A., Holt M., Janssens S., Krols M. // *J. Microscopy*. 2015. V. 259. № 2. P. 80–96.
15. Harris K.M., Perry E., Bourne J., Feinberg M., Ostroff L., Hurlburt J. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 47. P. 12101–12103.
16. Peter G., Lee D. // *J. Biophys. Biochem.* 1958. V. 4. № 3. P. 345–349.
17. Aescht E., Büchl-Zimmermann S., Burmester A. *Romeis Mikroskopische Technik*. Berlin Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010. 551 p.
18. Saalfeld S., Fetter R., Cardona A., Tomancak P. // *Nat. Meth.* 2012. V. 9. № 7. P. 717–720.
19. Young S.L., Fram E.K., Craig B.L. // *Am. J. Anatomy*. 1985. P. 174–175.
20. Baena V., Schalek R.L., Lichtman J.W., Terasaki M. // *Meth. Cell Biol.* 2019. V. 152. P. 41–67.
21. Beike L., Wrede C., Hegermann J., Lopez-Rodriguez E., Kloth C., Gaudie J., Kolb M., Maus U.A., Ochs M., Knudsen L. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 6. P. 830–852.
22. Schalek R., Hayworth K., Kasthuri N., Morgan J.L., Berger D., Wilson A.M., Anger P., Aderhold D., Seung H.S., Lichtman J.W. // *Microscopy Microanalysis*. 2012. V. 18. P. 572–573.
23. Kasthuri N., Hayworth K., Berger D., Schalek R., Conchello J., Knowles-Barley S., Lee D., Vázquez-Reina A., Kaynig V., Jones T. // *Cell. Cell Press*. 2015. V. 162. № 3. P. 648–661.
24. Smith D., Starborg T. // *Tissue Cell*. 2019. V. 57. P. 111–122.
25. Titze B., Genoud C. // *Biol. Cell*. 2016. V. 108. № 11. P. 307–323.
26. Knott G., Rosset S., Cantoni M. // *J. Visual. Exp.* 2011. V. 53. e2588.
27. Schneider J.P., Wrede C., Mühlfeld C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. 1089.
28. Mühlfeld C., Wrede C., Molnár V., Rajces A., Brandenberger C. // *Histochem. Cell Biol.* 2021. V. 155. № 2. P. 261–269.
29. McIntosh R., Nicastro D., Mastronarde D. // *Trends Cell Biol.* 2005. V. 15. № 1. P. 43–51.
30. Ni T., Frosio T., Mendonça L., Sheng Y., Clare D., Himes B.A., Zhang P. // *Nat. Protoc.* 2022. V. 17. P. 421–444.
31. Al-Amoudi A., Chang J., Leforestier A., McDowall A., Salamin L., Norlén L., Richter K., Blanc N., Studer D., Dubochet J. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 18. P. 3583–3588.
32. Dubochet J., McDowall A.W.V. // *J. Microsc.* 1981. V. 124. № 3. P. 3–4.
33. Saghi Z., Midgley P.A. // *Ann. Rev. Materials Res.* 2012. V. 42. P. 59–79.
34. Neumüller J. // *Wien Med. Wochenschr.* 2018. V. 168. № 11–12. P. 322–329.
35. Ercius P., Alaidi O., Rames M.J., Ren G. // *Adv. Materials*. 2015. V. 27. № 38. P. 5638–5663.
36. Vanhecke D., Asano S., Kochovski Z., Fernandez-Busnadiego R., Schrod N., Baumeister W., Lučić V. // *J. Microsc.* 2011. V. 242. № 3. P. 221–227.
37. West J.B., Fu Z., Deerinck T.J., Mackey M.R., Obayashi J.T., Ellisman M.H. // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010. V. 170. № 2. P. 202–209.
38. Höög J.L., Schwartz C., Noon A.T., O’Toole E.T., Mastromarde D.N., McIntosh J.R., Antony C. // *Dev. Cell*. 2007. V. 12. № 3. P. 349–361.
39. Lučić V., Förster F., Baumeister W. // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. V. 74. P. 833–865.
40. Gan L., Jensen G.J. // *Quarterly Rev. Biophys.* 2012. V. 45. № 1. P. 27–56.
41. Frey T.G., Perkins G.A., Ellisman M.H. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. V. 35. № 1. P. 199–224.
42. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 11. P. 1369–1377.
43. Gugel H., Bewersdorf J., Jakobs S., Engelhardt J., Storz R., Hell S.W. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. № 6. P. 4146–4152.
44. Min Gu. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 1996. 352 p.
45. Huang B., Wenqin W., Bates M., Zhuang X. // *Science*. 2008. V. 319. № 5864. P. 807–810.
46. Скворцов А.В. *Триангуляция Делоне и ее применение*. Томск: Изд-во Томского университета, 2002. 128 с.
47. Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5628. P. 2061–2065.
48. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. // *Nat. Meth.* 2006. V. 3. № 10. P. 793–795.
49. Betzig E., Patterson G., Sougrat R., Lindwasser W., Olenych S., Bonifacino J., Davidson M., Lippincott-Schwartz J., Hess H. // *Science*. 2006. V. 313. № 5793. P. 1642–1645.
50. Heilemann M., van de Linde S., Schüttelpelz M., Kasper R., Seefeldt B., Mukherjee A., Tinnefeld P., Sauer M. // *Angewandte Chemie*. 2008. V. 47. № 33. P. 6172–6176.
51. Vogelsang J., Cordes T., Forthmann C., Steinhauer C., Tinnefeld P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 20. P. 8107–8112.
52. Cordes T., Strackharn M., Stahl S.W., Summerer W., Steinhauer C., Forthmann C., Puchner E.M., Vogelsang J., Gaub H.E., Tinnefeld P. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. № 2. P. 645–651.
53. Jungmann R., Avendaño M., Woehrstein J., Dai M., Shih W., Yin P. // *Nat. Meth.* 2014. V. 11. № 3. P. 313–318.
54. Sharonov A., Hochstrasser R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 50. P. 18911–18916.
55. Holtzer L., Meckel T., Schmidt T. // *Appl. Phys. Lett.* 2007. V. 90. № 5. 053902.
56. Bates M., Huang B., Dempsey G.T., Zhuang X. // *Science*. 2007. V. 317. P. 1749–1753.

57. Bianchini P, Peres C, Oneto M, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. // *Cell Tissue Res.* 2015. V. 360. № 1. P. 143–150.
58. Galiani S, Harke B, Vicidomini G, Lignani G, Benfenati F, Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Moneron G, Han K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 143. № 7. P. 3361–3371.
59. Klar T, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 15. P. 8206–8210.
60. Willig K, Keller J, Bossi M, Hell S. // *New J. Phys.* 2006. V. 8. № 6. 106.
61. Wildanger D, Medda R, Kastrup L, Hell S. // *J. Microsc.* 2009. V. 236. № 1. P. 35–43.
62. Harke B, Ullal C, Keller J, Hell S. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 5. P. 1309–1313.
63. Willig K, Harke B, Medda R, Hell S. // *Nat. Meth.* 2007. V. 4. № 11. P. 915–918.
64. Finzel L, Reuss M. // *Microsc. Today.* 2022. V. 30. № 4. P. 26–33.
65. Heine J, Wurm C.A., Keller-Findeisen J, Schönle A, Harke B, Reuss M, Winter F.R., Donnert G. // *Rev. Sci. Instr.* 2018. V. 89. № 5. P. 053701.
66. Gwosch C.C., Pape J.K., Balzarotti F, Hoess P, Ellenberg J, Ries J, Hell S.W. // *Nat. Meth.* 2020. V. 17. № 2. P. 217–224.
67. Schmidt R, Weihs T, Wurm C.A., Jansen I, Rehman J, Sahl S.J., Hell S.W. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 1478.
68. Magerle R. // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. № 13. P. 2749.
69. Hund M, Herold H. // *Rev. Sci. Instr.* 2007. V. 78. № 6. 063703.
70. Dietz C, Röper S, Scherdel S, Bernstein A, Rehse N, Magerle R. // *Rev. Sci. Instr.* 2007. V. 78. № 5. 053703.
71. Rehse N, Marr S, Scherdel S, Magerle R. // *Adv. Materials.* 2005. V. 17. № 18. P. 2203–2206.
72. Liedel C, Hund M, Olszowka V, Böker A. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 4. P. 995–1002.
73. Efimov A, Tonevitsky A, Dittrich M, Matsko N. // *J. Microsc.* 2007. V. 226. № 3. P. 207–216.
74. Efimov A, Agapov I, Agapova O, Oleinikov V, Mezin A, Molinari M, Nabiev I, Mochalov K. // *Rev. Sci. Instr.* 2017. V. 88. № 2. P. 023701.
75. Alekseev A, Efimov A, Lu K, Loos J. // *Adv. Materials.* 2009. V. 21. № 48. P. 4915–4919.
76. Alekseev A, Efimov A, Loos J, Matsko N, Syurik J. // *Eur. Polymer J.* 2014. V. 52. № 1. P. 154–165.
77. Mochalov K, Efimov A, Bobrovsky A, Agapov I, Chistyakov A, Oleinikov V, Sukhanova A, Nabiev I. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. P. 8953–8962.
78. Efimov A, Agapova O, Mochalov K, Agapov I. // *Physics Procedia.* 2015. V. 73. P. 173–176.
79. Efimov A, Moisenovich M, Bogush V, Agapov I. // *RSC Adv. Royal Soc. Chem.* 2014. V. 4. № 105. P. 60943–60947.
80. Ефимов А.Е., Агапов И.И. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014. В. 16. № 3. С. 109–116.
81. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Lyundup A, Agapova O, Agapov I. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 1561.
82. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Davydova L, Tenchurin T, Bogush V, Agapova O, Agapov I. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 1704.
83. Balashov V, Efimov A, Agapova O, Pogorelov A, Agapov I, Agladze K. // *Acta Biomater.* 2018. V. 68. P. 214–222.
84. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Parfenov V.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A., Agapov I.I. // *Express Polym. Lett.* 2019. V. 13. P. 632–641.
85. Efimov A.E., Gnaegi H, Schaller R, Grogger W, Hofer F, Matsko N. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 38. P. 9756–9760.
86. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Volkov A.D., Khamkhash L, Agapov I.I. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 8808–8815.
87. Ефимов А, Агапова О, Сафонова Л, Боброва М, Агапов И. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018. В. 19. № 4. С. 78–87.
88. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Mezin A.V., Molinari M, Nabiev I, Mochalov K.E. // *Rev. Sci. Instrum.* 2017. V. 88. P. 023701.
89. 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.
90. Efimov A.E., Bobrovsky A.Y., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Nabiev I.R., Mochalov K.E. // *Technical Physics Lett.* 2016. V. 42. № 2. P. 171–174.
91. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапов И.И., Готье С.В. // *Доклады РАН. Науки о жизни.* 2021. Т. 500. № 1. С. 483–487.
92. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мочалов К.Е., Соловьева Д.О., Гилева А.М., Марквичева Е.А., Яковлев Д.В., Люндуп А.В., Олейников В.А., Агапов И.И., Готье С.В. // *Доклады РАН. Науки о жизни.* 2023. Т. 509. № 1. С. 119–123.