

Микроскопия с высоким разрешением клеток и тканей в глубине образца*

Х.Шнекенбургер, В.Рихтер, М.Геллери, С.Ритц, Р. Ваз Пандольфо, Ф.Шок, Дж. фон Хазе, У.Бирк, С.Кремер

Сообщается о методах, экспериментальных установках и перспективах микроскопической трехмерной визуализации в глубине образцов клеток или тканей, приводятся предварительные биофизические, а также клинически значимые примеры.

Ключевые слова: 3D микроскопия, флуоресценция, сверхвысокое разрешение, SIM, световой лист, аксиальная томография, распределенные апертуры.

1. Введение

Оптическая микроскопия – хорошо зарекомендовавший себя метод с прекрасными перспективами для экспериментов на живых клетках, но с ограничениями, касающимися разрешения, глубины фокуса и рассеяния света. Разрешение d_{\min} хорошо описывается критерием Аббе или Рэлея. Если критерий Аббе, $d_{\min} \geq \lambda/2A_N$ (где λ – длина волны света, A_N – числовая апертура объектива микроскопа), получается из рассмотрения дифракции когерентного светового пучка, то критерий Рэлея, $d_{\min} = 0.61\lambda/A_N$, следует из функции дифракции некогерентно светящегося пятна (диск Эйри). По обоим критериям при большой числовой апертуре ($A_N \geq 1.30$) достигается поперечное разрешение около 200 нм, а при умеренных апертурах ($A_N \leq 0.60$), например при изображении предметов большего размера более удаленными объективами, – около 400–500 нм.

Оптическая микроскопия в среде с показателем преломления n обеспечивает глубину фокуса $L = n\lambda/A_N^2$, что составляет примерно от 400 нм до нескольких микрометров. При малых числовых апертурах, требующихся для реализации больших рабочих расстояний (PP), глубина фокуса может возрасти до многих микрометров (например, $L = 91$ мкм при $A_N = 0.1$, $\lambda = 600$ нм, $n = 1.515$).

* Перевод с англ. В.Л.Дербова.

H.Schneckenburger, V.Richter. Institute of Applied Research, Aalen University, Aalen, Germany; e-mail: herbert.schneckenburger@hs-aalen.de
M.Gelleri, S.Ritz. Institute of Molecular Biology, Mainz, Germany
R.Vaz Pandolfo. Institute of Molecular Biology, Mainz, Germany; Institute of Physiology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany
F.Schock, J. von Hase. Kirchhoff Institute for Physics (KIP), and Institute of Pharmacy & Molecular Biotechnology, University of Heidelberg, Germany
U.Birk. Institute for Photonics and ICT, University of Applied Sciences (FHGR) Chur, Switzerland
C.Cremer. Institute of Molecular Biology, Mainz, Germany; Kirchhoff Institute for Physics (KIP), and Institute of Pharmacy & Molecular Biotechnology, University of Heidelberg, Germany

Поступила в редакцию 27 ноября 2019 г.

Независимо от числовой апертуры спад измеряемой интенсивности с удалением от фокальной плоскости недостаточен для подавления изображения разных слоев объекта, наложенных друг на друга. По этой причине резкие изображения получаются только от тонких слоев, а получение изображения трехмерного образца требует специальных методик. Трехмерное разрешение стало возможным с появлением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM), в которой фокус лазерного пучка, сканирующего образец, отображается на точечной диафрагме перед приемником, а вся внефокальная информация подавляется [1, 2]. Смещающая образец шаг за шагом в вертикальном направлении, получают изображения множества плоскостей, комбинация которых дает трехмерное изображение. В другом варианте образец освещается тонким плоским пучком (световым листом) в фокальной плоскости линзы приемника (Light-Sheet Based Microscopy, LSFM). Такие световые листы генерируются либо цилиндрической линзой путем сканирования лазерного пучка, либо, в более общей постановке, методами адаптивной оптики [3, 4]. Трехмерное изображение можно получить путем перемещения светового листа в вертикальном направлении с одновременным сдвигом детектирующей линзы либо, в некоторых случаях, перемещением самого образца по плоскости изображения. В отличие от CLSM, только тонкий слой объекта, от которого принимается сигнал, освещен, что существенно снижает полную экспозицию при трехмерном имиджинге. Это благоприятствует применению LSFM в экспериментах, продолжающихся длительное время. Экспериментальные установки для LSFM разнообразны – от автономных микроскопов до миниатюризированных модулей, которые могут быть адаптированы к различным типам коммерческих микроскопов и использоваться в сочетании с другими экспериментальными методиками [5, 6].

Главной проблемой получения изображений глуболежащих слоев ансамбля клеток или образца биоткани является рассеяние света и, в меньшей степени, его поглощение, которые ограничивают типичную глубину проникновения до 100 мкм и менее. По этой причине заметную важность для визуализации глуболежащих слоев кожи, мозга и других органов приобрел метод оптического про-

светления за счет выравнивания показателей преломления рассеивающих элементов ткани и окружающей их водной среды [7–9]. Однако техника оптического просветления несовместима с получением изображений живых клеток, что делает необходимыми альтернативные методы оптической микроскопии.

2. Методы и применения трехмерной микроскопии глубоких слоев

2.1. Конфокальная микроскопия

В последние годы получила дальнейшее развитие конфокальная микроскопия. В частности, благодаря таким методам, как микроскопия сканирования диска Эйри (Airy Scan Microscopy) [10] и родственная ей микроскопия сканирования изображений (Image Scanning Microscopy) [11], а также ресканирующая конфокальная микроскопия (Rescanning Confocal Microscopy) [12], разрешение было улучшено примерно в 1.7 раза. Длинноволновый (красный или ближний инфракрасный) свет с меньшими коэффициентами рассеяния и поглощения позволяет получать изображения на глубине в 2–3 раза большей, чем видимый свет, т.е. до 200–300 мкм. Это также верно и для двухфотонной или многофотонной микроскопии [13, 14]. Здесь пикосекундные или фемтосекундные лазерные импульсы фокусируются в малое пятно, возбуждая флуоресценцию только в этом пятне и позволяя детектировать исключительно ее. Таким образом разные плоскости образца можно сканировать без необходимости в точечной диафрагме перед детектором.

2.2. Микроскопия со структурированным освещением (Structured Illumination Microscopy, SIM)

Трехмерное сканирование объекта сфокусированным лазерным пучком – не единственная возможность полу-

чить 3D изображения с высоким разрешением с помощью флуоресцентной микроскопии. Вместо этого для имиджинга или сканирования объекта можно использовать протяженное распределение возбуждающего света. В соответствии с типом усиления структурной информации были описаны различные подходы к микроскопии структурированного освещения, такие как микроскопия поля стоячей волны (Standing Wave Field Microscopy, SWFM) [15], пространственно-модулированное освещение (Spatially Modulated Illumination, SMI) [16] и микроскопия с паттерновозбуждением/структурированным освещением (Patterned Excitation/Structured Illumination Microscopy, PEM/SIM) [17–19]. В то время как для получения трехмерного изображения SMI позволяет рассчитывать изображения от определенных плоскостей образца, задача SIM – увеличить пространственные частоты и, таким образом, отсеку оптической передаточной функции (Optical Transfer Function, OTF) микроскопа, чтобы улучшить пространственное разрешение. В линейном режиме (при низкой интенсивности) SIM обычно обеспечивает поперечное разрешение около 100 нм и аксиальное разрешение около 200 нм при использовании объективов с большой числовой апертурой. С точки зрения оптической теории, разрешение может быть примерно вдвое больше. Согласно приведенным выше формулам (с учетом фактора двукратного увеличения), объектив с большим рабочим расстоянием ($PP = 2$ см, $A_N = 0.42$) обеспечил бы поперечное разрешение около 360 нм и аксиальное разрешение около 2.2 мкм ($\lambda = 500$ нм, $n = 1.515$). Важными достоинствами SIM для визуализации на глубине являются низкая интенсивность освещения при получении изображений *in vivo*, возможность применения любого флуоресцентного красителя из числа используемых в обычной флуоресцентной микроскопии (включая многоцветные схемы) и сочетаемость с другими методами, например LSFМ или томографией (μ -tom, см. ниже). В режиме нелинейного возбуждения [20] SIM позволяет увеличивать разрешение даже «неограниченно».

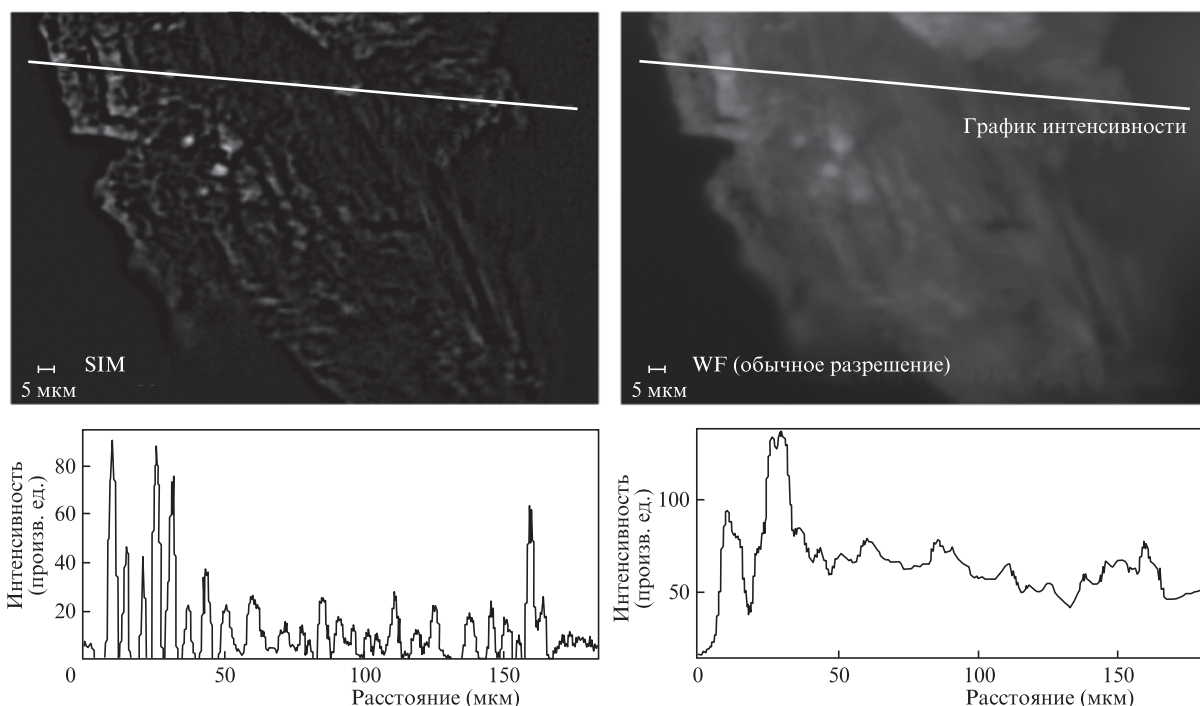


Рис.1. Увеличение разрешения и контраста SIM с большим PP; краситель *Cedrus deodora*, автофлуоресценция, внизу – профили интенсивности, $\lambda_{ex} = 671$ нм, объектив микроскопа $10\times/0.25$.

Использование инновационного пятнистого распределения освещения вместо решетки из линий (Lattice SIM) [21] позволяет преодолеть некоторые ограничения классической схемы SIM, касающиеся получения изображений с повышенным контрастом и робастностью к обработке.

Как пример использования SIM для улучшения контраста и разрешения при больших (~ 1 мм) PP, на рис.1 (слева) дано SIM-изображение автофлуоресцирующей растительной структуры, полученное с помощью объектива с малой апертурой ($A_N = 0.25$). По сравнению с широкопольной (wide-field, WF) микроскопией (рис.1, справа), наименьшие размеры разрешаемых структур сокращаются примерно с 10 мкм до 2 мкм.

2.3. Флуоресцентная микроскопия с освещением плоским пучком света (LSFM)

Одним из достоинств LSFM является то, что освещение объекта обычно осуществляется пучком с малой числовой апертурой, т.е. главным образом в прямом направлении возбуждающего лазерного пучка. Из-за анизотропии коэффициента рассеяния рассеянный свет также распространяется преимущественно вперед, позволяя достигать большей глубины проникновения, чем при широкоапертурном освещении. Таким образом достигается глубина 100–200 мкм в непросветленных образцах и более 0.5 мм – в просветленных (рис.2). Однако с увеличением проходимого светом пути интенсивность и качество изображения снижаются, а в некоторых случаях нерегулярность оптического рассеяния приводит к возникновению полосатой структуры.

Микроскопия с освещением плоским пучком света (LSFM) и SIM были недавно скомбинированы с целью улучшения поперечного разрешения и увеличения глубины визуализации внутри образца [23, 24], что позволило достичь глубин проникновения до 100 мкм.

В настоящее время реализуется следующая концепция: структурированное освещение создается посредством интерференции первых дифракционных порядков пространственного модулятора света (SLM), создающей синусоидальное распределение интенсивности освещения в перемещаемой плоскости образца [25, 26]. Световой лист создается в той же плоскости миниатюрным модулем, описанным в [5]. Следовательно, интенсивность флуоресценции, возбуждаемой структурированным светом, усиливается по сравнению с интенсивностью света, рассеянного в другие плоскости (он может быть подавлен элек-

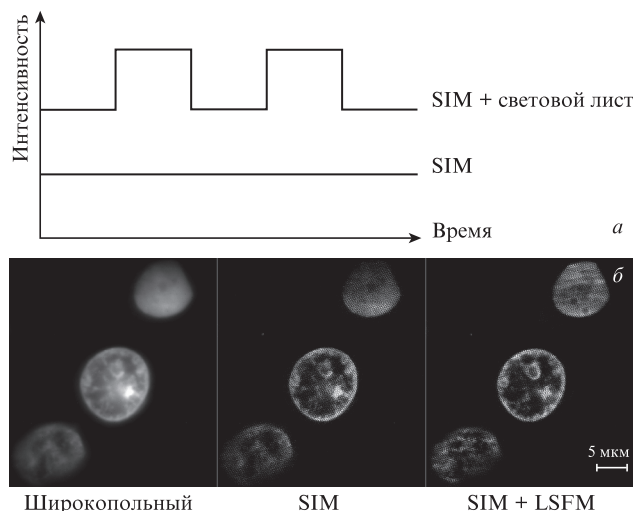


Рис.3. Принцип сочетания методов возбуждения (модулированный световой лист и SIM) (а) и флуоресцентное обнаружение клеток рака груди MCF-7, инкубированных с красителем CellTox (1 мкл/500 мкл, $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_d \geq 515$ нм) (б).

тронными средствами). Более сложный подход подразумевает наложение светового листа, модулированного по интенсивности, и непрерывного сигнала SIM, как показано на рис.3,а. Детектирование осуществляется камерой с модуляцией на частоте 1 МГц (FLIM-камера, PCO AG (Kelheim, Германия; <https://www.pco.de/de/flim-kamera/pcoflim/>), изначально разработанной для отображения времен жизни флуоресценции. Сигнал SIM детектируется только внутри выбранного светового листа, а сигнал от наружной области отбраковывается. На рис.3,б демонстрируется пример монослоя клеток рака груди MCF-7, инкубированных с флуоресцентным красителем CellTox (1 мкл/500 мкл) и освещаемых по схеме широкопольной микроскопии (слева), SIM (в середине) и SIM в сочетании с модулированной LSFM (справа). Если SIM обеспечивает ожидаемое увеличение поперечного и аксиального разрешения, то SIM + LSFM демонстрирует более ясные структуры, в частности для клеток в нижней левой и верхней правой частях изображения в силу дискриминации рассеянного света. Это оказывается важным, т.к. контраст оптической решетки, генерируемой SLM, весьма мал. Хотя рис.3,б записан внутри образца на глубине только 12 мкм, для более толстых образцов, например клеточных сфероидов, можно получать изображения со значительно больших глубин.

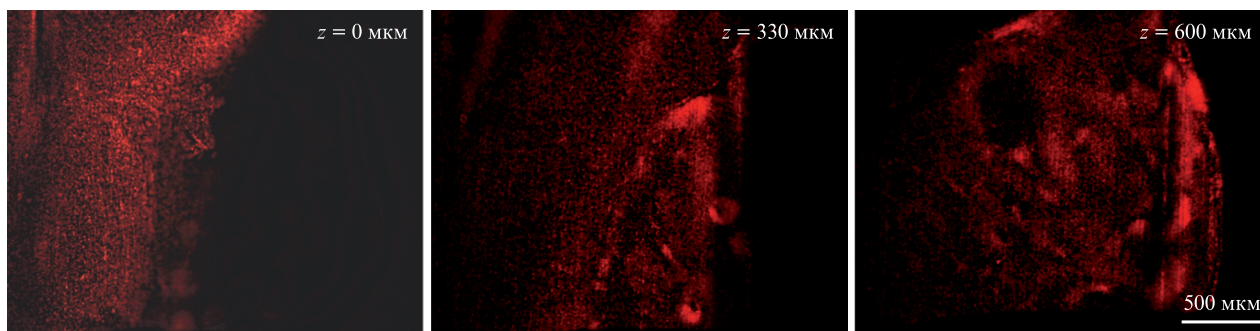


Рис.2. Флуоресцентная микроскопия с освещением плоским пучком. Изображение среза мозга мыши толщиной 1 мм, прокрашенного красителем Sytox Orange (краситель, используемый в исследовании ДНК) и просветленного методом CUBIC [22]. Пакет изображений записан в 61 плоскости, расположенных перпендикулярно оси z на расстоянии 10 мкм друг от друга. Показаны некоторые изображения из пакета, снятые на глубинах 0, 330 и 600 мкм.

2.4. Аксиальная томография

Следующий вариант для микроскопии в глубине образца – оптическая томография [27–30], при которой образец наблюдается и измеряется с разных сторон. Для этого нужны специальные поворотные держатели образца, например стеклянные капилляры, в которые погружаются образцы. Капилляр цилиндрической формы оказывается идеальным для этой цели; в некоторых случаях его вставляют во внешний капилляр прямоугольного сечения, оптически связанный с первым [29], как показано на рис.4. В дополнение к большому объему наблюдения при вращении образца, можно извлечь пользу из того, что большинство интересных частей образца можно рассмотреть в латеральной плоскости, где разрешение всегда выше, чем в аксиальном направлении. Все сказанное приводит к высокому и изотропному разрешению во всех трех измерениях. Недавние применения аксиальной томографии простираются от микроорганизмов [29] до отдельных клеток с улучшенным субклеточным разрешением [30]. На рис.5 показан пример автофлуоресцентных измерений *Cedrus deodora* в комбинации с микроскопией структурированного освещения (SIM).

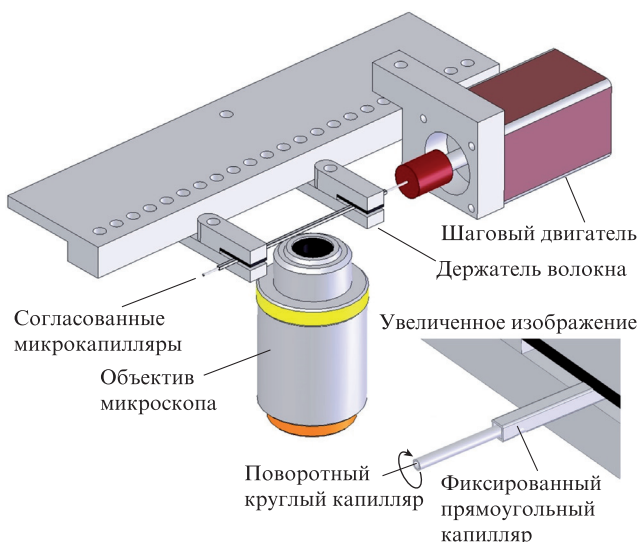


Рис.4. Держатель образца для аксиальной томографии с использованием одинарных или двойных микрокапилляров в инвертированном микроскопе (заимствовано из [29] с изменениями).

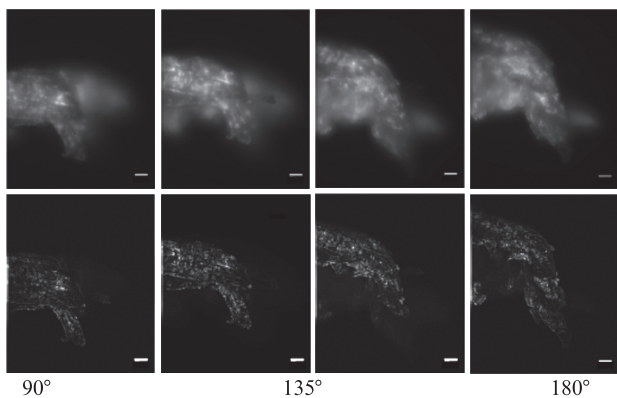


Рис.5. Комбинация широкопольной (WF) микроскопии (верхний ряд) и SIM (нижний ряд) с аксиальной томографией при больших рабочих расстояниях ($A_N = 0.25$, $PP = 1$ мм); *Cedrus deodora*, $\lambda_{ex} = 671$ нм; масштабный отрезок равен 10 мкм.

2.5. Микроскопия с распределенной апертурой (Distributed Aperture Microscopy, DAM)

Поскольку аксиальное разрешение в случае как CLSM, так и SIM квадратично зависит от A_N , трехмерное разрешение биологического объекта (например, клетки) размером порядка сотен нанометров возможно только при больших A_N , т.е. на сравнительно малых PP. Например, для получения трехмерного разрешения $(x, y, z) \leq 300$ нм в методе SIM потребуется числовая апертура около 1.1, что соответствует рабочему расстоянию ~ 200 мкм. Это исключает рассмотрение объектов большого размера, таких как клеточные сфериды, эмбрионы или ткани, которые требуют визуализировать с таким высоким трехмерным разрешением.

Данные ограничения, однако, можно исключить при использовании осветительного устройства с множеством коллимированных лазерных пучков (Distributed Aperture Illumination, DAI) конструктивно направленных на данную область объекта (Distributed Aperture Microscopy, DAM [31]). В дополнение к режимам точечного сканирования (включая микроскопию уменьшения вынужденного испускания, Stimulated Emission Depletion, STED, [32]) DAM также можно применять для осуществления паттерн-режимов сканирования, таких как структурированное освещение (SIM) и микроскопия с освещением плоским пучком света (световым листом) (LSM), оптическая проекционная микроскопия или аксиальная томография. Решающее дополнительное достоинство DAM в этом отношении – возможность такого программирования DAI, чтобы переключение между различными режимами визуализации производилось очень быстро.

На рис.6 схематически иллюстрируется реализация концепции многопучкового освещения DAI. Точечные источники $(i = 1, 2, 3, \dots, N)$, испускающие коллимированные пучки света, располагаются в определенных положениях $r_i = (x_i, y_i, z_i)$ вокруг оптической оси фокусирующей системы DAM. Используется следующая система координат. Геометрический центр области, куда направлены все пучки, определяет начало координат $O = (0, 0, 0)$ (показан красным). Оптическая ось z определяется положением начала координат и геометрическим центром всех источни-

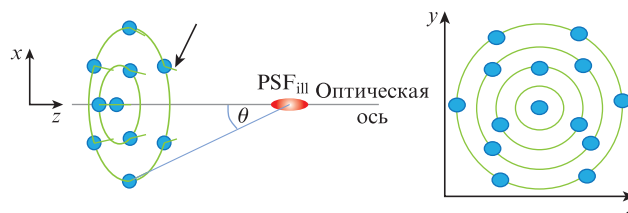


Рис.6. Схема расположения источников света в микроскопе с распределенной апертурой (DAM). Голубые диски – отдельные источники $S_1, S_2, \dots, S_K, \dots, S_N$ когерентного коллимированного света в положениях (x_K, y_K, z_K) с определенными соотношениями фаз и поляризаций, испускающие свет в определенных направлениях (короткие зеленые отрезки, один отмечен белой стрелкой); красное пятно отображает общее фокальное распределение освещения (т.е. фокальный объем, или объем наблюдения в пятне освещения), созданное конструктивной интерференцией коллимированных волн. Все вместе источники покрывают телесный угол $\Omega = 2\pi(1 - \cos\vartheta)$, соответствующий числовой апертуре обычного объектива с половиной угла раскрытия ϑ . (Опубликовано Бирк и др. в *Scientific Reports* [31] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution (CC-BY) [33].) Цветной вариант рис.6 помещен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

ков. Пространственное расположение (т.е. места нахождения всех источников света) можно менять, покрывая некоторый телесный угол Ω вокруг начала координат. Источники излучают свет в виде коллимированных пучков, направленных к началу координат. Оптическая длина пути от всех источников до начала координат одинакова (с точностью до сдвига фазы на 2π), что обеспечивает конструктивную интерференцию и, следовательно, максимальность поля в начале координат. Результирующее распределение интенсивности вокруг начала координат можно рассматривать как «фокальное пятно». В такой конфигурации плоскость, перпендикулярную оптической оси и проходящую через начало координат, можно называть фокальной плоскостью, а распределение интенсивности освещения в этой плоскости – поперечным фокальным распределением интенсивности. В отличие от осветительных устройств на основе объективов, пространственным положением, фазой и состоянием поляризации каждого из пучков можно управлять по отдельности.

На рис.7 представлены результаты детальных численных расчетов того, как фокус объектива с большой апертурой приблизительно воспроизводится распределенным набором таких согласованных по фазе лазерных пучков. С помощью соответствующего массива нескольких коллимированных лазерных пучков можно создать фокус освещения с размером на уровне половины максимума (FWHM) около 160 нм во всех направлениях ($\lambda = 488$ нм, $n = 1.518$) в однородной прозрачной среде.

Поскольку каждый из когерентных световых пучков коллимирован, расстояние до источников, в принципе,

произвольно. Его можно менять в широких пределах (например, до 5 см и более), что эквивалентно созданию общего «фокального пятна» для сканирующей визуализации. Это «фокальное пятно» может быть сделано значительно меньшим, чем при использовании объектива с малой апертурой, обеспечивающего такое же рабочее расстояние. Следовательно, на таком же большом рабочем расстоянии разрешение будет больше, чем в линзовой системе. Аналогично увеличению разрешения при использовании множества источников освещения, с той же целью можно использовать множество объектных «источников» [34].

Концепция освещения с распределенной апертурой DAI может также применяться в различных вариантах микроскопии сверхвысокого разрешения (см. обзоры [35, 36]). Например, паттерны DAI можно генерировать таким образом, что кроме пучка, фокусировка которого ограничена дифракционным пределом, возможно получение фокуса обеднения, аналогичного получаемому в микроскопе, либо можно создать соответствующим образом структурированный световой паттерн для схемы микроскопической локализации MINFLUX [37]. Результаты численных расчетов представлены на рис.8. Если такое STED-распределение интенсивности, основанное на DAI, применить в предварительно возбужденном ансамбле флуорофоров, то концепция истощения флуоресценции вблизи начала координат может быть реализована при произвольно больших рабочих расстояниях без необходимости в интенсивностях освещения, значительно превышающих обычно используемые, например, в коммерческих систе-

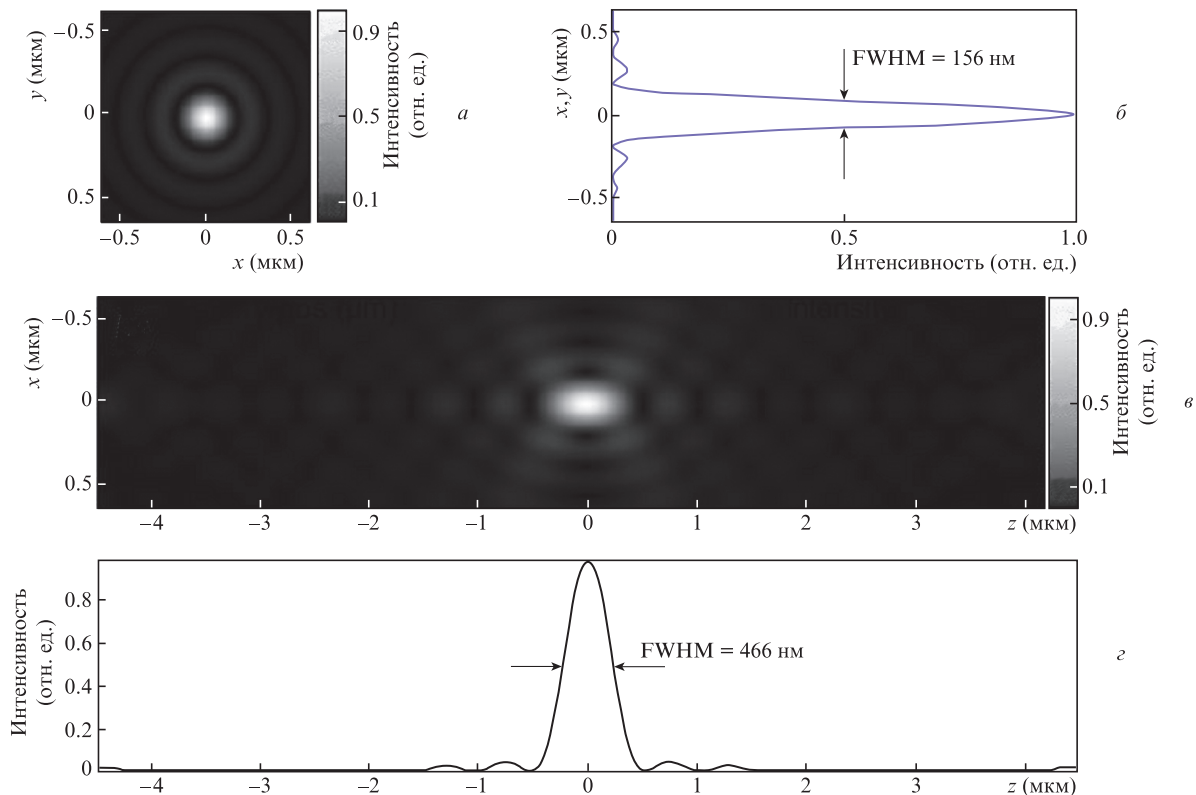


Рис.7. Фокальное пятно от источников, покрывающих телесный угол $\Omega = 1.25\pi$. Распределение интенсивности рассчитано для 6580 источников, распределенных по $\Omega = 2\pi(1 - \cos\vartheta) = 1.25\pi$ (соответствует объективу с $A_N = 1.4$). В расчетах задан показатель преломления в области фокуса $n = 1.518$. Представлены: поперечное распределение фокальной интенсивности $F(x, y)$ (а); профиль поперечного распределения интенсивности вдоль оси x или y (б); сечение фокального x - z -распределения интенсивности (в) и соответствующий аксиальный профиль $F_{x=y=0}(z)$ (г). В принципе, источники света могут располагаться на произвольных расстояниях от фокальной области. (Опубликовано Бирк и др. в *Scientific Reports* [31] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution (CC-BY) [33].)

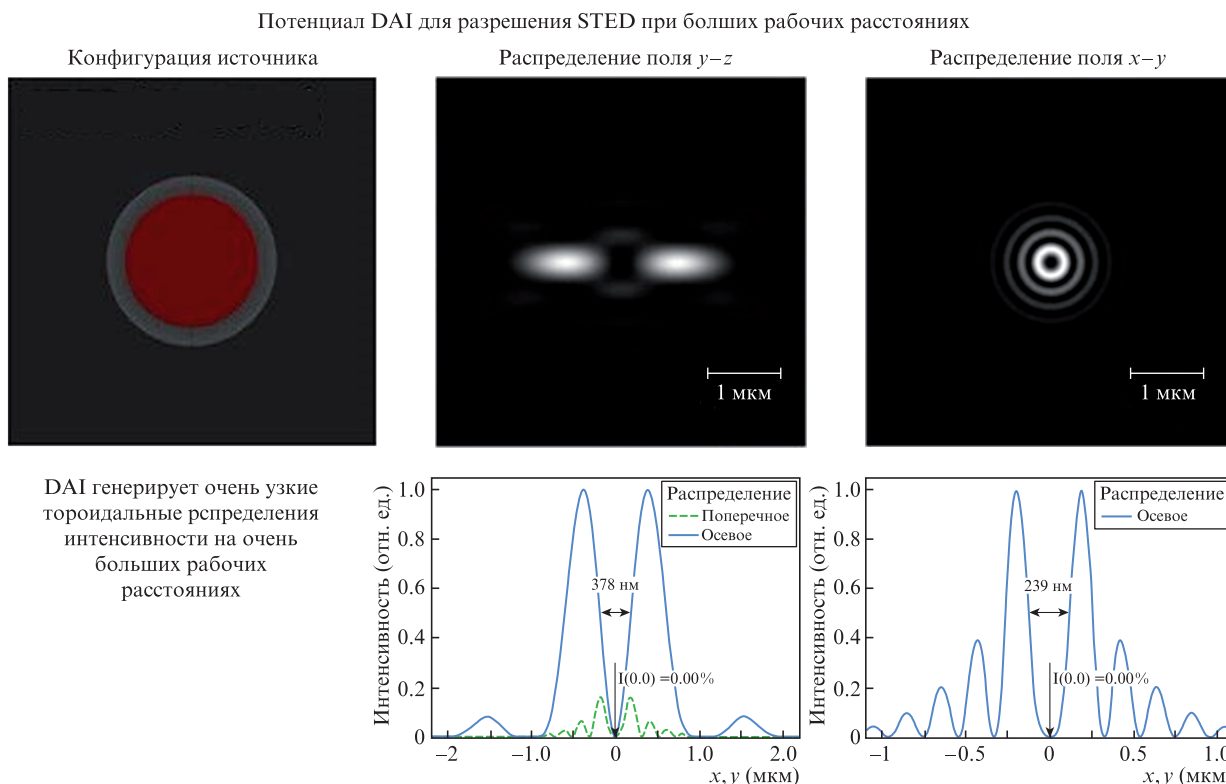


Рис.8. Реализация режима ослабления вынужденного излучения STED/MINFLUX. Слева: z -проекция расположения $N = 6576$ когерентных источников света (например, стеклянных волокон с малой числовой апертурой), направленных в начало координат. Источники распределены внутри телесного угла $\Omega = 2\pi(1 - \cos\theta) = 1.25\pi$ (это соответствует объективу с $A_N = 1.4$). В центре: сечение $y-z$ -распределения интенсивности вокруг начала координат, заданная ширина пучка STED (слева – 378 нм, справа – 293 нм) относится к FWHM соответствующих минимумов ($z; x, y$). Справа: сечение $x-y$ -распределения интенсивности вблизи начала координат. Для освещения типа STED половина источников в центре задержана по фазе на π . В принципе, источники света для STED могут находиться на сколь угодно больших расстояниях от фокальной области. Тороидальную структуру, используемую при больших интенсивностях освещения для STED, можно использовать в режиме слабой освещенности MINFLUX для повышения оптического разрешения до нанометрового масштаба [38]. (Опубликовано Бирк и др. в *Scientific Reports* [31] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution (CC-BY) [33].)

мах STED. Таким образом можно реализовать разрешение STED до нескольких десятков нанометров при рабочих расстояниях в несколько сантиметров. В режиме MINFLUX появляется реальная возможность улучшить разрешение до ~ 1 нм при таких же больших рабочих расстояниях.

3. Обсуждение результатов

Исследование областей в глубине образца является главной задачей трехмерной микроскопии клеток и тканей. В этой связи необходимость селекции избранных слоев и подавление сигнала от остальных частей образца, например посредством конфокальной сканирующей лазерной микроскопии или микроскопии с освещением плоскими пучками света, не вызывает сомнений. Фокусировка в глубь образца требует увеличения рабочих расстояний при малой или средней апертуре объективов. Это ограничивает разрешение и увеличивает глубину фокуса, как показано выше. Однако в этом случае можно использовать методики сверхвысокого разрешения, например с применением структурированного освещения (SIM).

Обычно глубина проникновения света в образцы клеток или тканей ограничена большим коэффициентом рассеяния и умеренным коэффициентом поглощения, которые можно понизить методами оптического просветления при биопсии или в модельных образцах (см., напр., рис.2), но не в живых клетках или тканях. Однако как поглоще-

ние, так и рассеяние уменьшаются в длинноволновой области, поэтому красители, поглощающие красное или ближнее инфракрасное излучение [39, 40], как и многофотонное возбуждение, находят все большее применение.

Дальнейшие применения включают в себя детектирование с фазовой модуляцией (см. рис.3) или технику апконверсии для уменьшения влияния светорассеяния. В последнем случае [41] ап-конверсия инфракрасного ультракороткого лазерного (стробирующего) импульса и прохождение второго (сигнального) импульса через образец происходят внутри нелинейного кристалла. Поскольку второй импульс из-за рассеяния света уширяется, суммарная частота генерируется только тогда, когда оба импульса перекрываются во времени, т. е. на переднем фронте сигнала, отвечающем наименее рассеянным («баллистическим») фотонам. Данный метод применяется для получения изображений с разных точек наблюдения в рамках метода оптической проекционной томографии с временной синхронизацией (Time-Gated Optical Projection Tomography). Кроме того, для визуализации на глубине используется самоинтерференционный 3D метод на основе микроскопии сверхлокализации [42].

По мере продвижения в глубь образца возрастает роль геометрических и хроматических aberrаций. Эти aberrации, по крайней мере частично, могут быть исправлены адаптивной оптикой, т. е. деформируемыми зеркалами или пространственными модуляторами света [43]. В связи с этим адаптивная оптика, как и продвинутые алгоритмы

реконструкции (см., напр., [44]), могут повысить качество изображения более глубоких слоев образца.

Микроскопия с распределенной апертурой (DAM) предоставляет совершенно новые возможности для трехмерного и глубинного имиджинга. В настоящее время возможности применения этих методик сильно ограничены из-за очень малого рабочего расстояния в «обычной» широкоапертурной микроскопии сверхвысокого разрешения. Однако DAM позволяет создавать очень маленький диаметр фокусировки для точечного сканирования объекта на сколь угодно больших рабочих расстояниях и эффективно обнаруживать генерируемый сигнал (например, флуоресценцию или рассеяние). Более того, на существенно большем рабочем расстоянии, чем при использовании обычных систем на основе объективов, можно применять STED/MINIFLUX. Во всех этих случаях требуется большее рабочее расстояние и высокое разрешение. Примерами биомедицинских приложений являются 3D микроскопия малых модельных организмов, клеточных сфероидов в биологии развития, исследование рака и фармакология, нейронные «микромозги» и ткани мозга в нейробиологии либо цельные органы, сделанные достаточно прозрачными путем просветления тканей.

Проблема экстинкции света на неоднородностях – это прежде всего проблема вариабельности длины оптического пути, зависящей от стартовой точки светового кванта. В принципе, DAM позволяет независимо установить фазовые соотношения отдельных когерентных пучков. Это позволит корректировать локальные неоднородности показателя преломления образца.

Авторы благодарят за сотрудничество проф. Неико Лухманн и д-ра Anne Sinning из Института физиологии, а также проф. Beat Lutz из Института физиологической химии Университетского медицинского центра г. Майнц. Фазоразрешающая FLIM камера была предоставлена PCO AG (Kelheim, Германия).

- Pawley J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Boston, MA, USA: Springer, 1990); doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2.
- Webb R.H. *Rep. Progr. Phys.*, **59**, 427 (1996).
- Pampaloni F., Chang B.-J., Stelzer E.H.K. *Cell Tissue Res.*, **362** (1), 265 (2015); doi.org/10.1007/s00441-015-2144-5.
- Santi P.A. *J. Histochem. Cytochem.*, **59** (2), 129 (2011); doi.org/10.1369/0022155410394857.
- Bruns T., Bauer M., Bruns S., Meyer H., Kubin D., Schneckenburger H. *J. Microsc.*, **264** (3), 261 (2016); doi.org/10.1111/jmi.12439.
- Staier F. et al. *Rev. Sci. Instrum.*, **82** (9), 093701 (2011); doi: 10.1063/1.3632115.
- Сдобнов А.Ю., Ладеманн Ю., Дарвин М.Е., Тучин В.В. *Ученые биологической химии*, **59**, 295 (2019).
- Feng W., Zhang C., Yu T., Zhu D. *Biomed. Opt. Express.*, **10** (6), 2996 (2019); doi: 10.1364/BOE.10.002996.
- Costa E.C., Silva D.N., Moreira A.F., Correia I.J. *Biotechnol Bioeng.*, in press (2019); doi: 10.1002/bit.27105.
- Huff J. *Nature Meth.*, **12** (12), (2015); doi: 10.1038/nmeth.f.388.
- Müller C.B., Enderlein J. *Phys. Rev. Lett.*, **104** (19), 198101 (2010); doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.1981.
- de Luca G.M.R., Breedijk R.M.P., Brandt R.A.J., Zeelenberg C.H.C., de Jong B.E., Timmermans W., Nahidi Azar L., Hoebe R.A., Stallinga S., Manders E.M.M. *Biomed. Opt. Express*, **4** (11), 2644 (2013); doi.org/10.1364/BOE.4.002644.
- Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. *Science*, **248** (4951), 73 (1990); doi: 10.1126/science.2321027.
- König K. *J. Microsc.*, **200** (Pt 2), 83 (2000); doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x.
- Bailey B., Farkas D.L., Taylor D.L., Lanni F. *Nature*, **366** (6450), 44 (1993).
- Baddeley D., Batram C., Weiland Y., Cremer C., Birk U.J. *Nat. Protoc.*, **2** (10), 2640 (2007); doi: 10.1038/nprot.2007.399.
- Heintzmann R., Cremer C. *Proc. SPIE*, **3568** (1999); doi: 10.1117/12.336833.
- Gustafsson M.G.L. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 627 (1999); doi: 10.1016/s0959-440x(99)00016-0.
- Gustafsson M.G.L. *J. Microsc.*, **198**, 82 (2000); doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- Heintzmann R., Jovin T., Cremer C. *J. Opt. Soc. Am. A*, **19**, 1599 (2002); doi: 10.1364/JOSAA.19.001599.
- Betzig E. *Opt. Express*, **13** (8), 3021 (2005); doi: 10.1364/OPEX.13.003021.
- Sasaki E.A., Kazuki T., Perrin D., Yukinaga H., Kuno A., Ueda H.R. *Nature Protocols*, **10** (11), 1709 (2015); doi: 10.1038/nprot.2015.085.
- Chang B.J., Perez Meza V.D., Stelzer E.H.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114** (19), 4869 (2017); doi: 10.1073/pnas.1609278114.
- Chen B.C., Legant W.R., Wang K., Shao L., Milkie D.E., Davidson M.W., Janetopoulos C., Wu X.S., Hammer J.A., Liu Z. et al. *Science*, **346** (6208), 1257998 (2014); doi: 10.1126/science.1257998.
- Förster R., Lu-Walther H.-W., Jost A., Kielhorn M., Wicker K., Heintzmann R. *Opt. Express*, **22** (17), 20663 (2014); doi: 10.1364/OE.22.020663.
- Richter V., Piper M., Wagner M., Schneckenburger H. *Appl. Sci.*, **9** (6), 1188 (2019); doi: 10.3390/app9061188.
- Brad J., Rinke B., Schneider B., Edelmann P., Krieger H., Hausmann M., Cremer C. *Microscopy & Analysis*, **11**, 9 (1996).
- Heintzmann R., Cremer C. *J. Microsc.*, **206** (1), 7 (2002).
- Bruns T., Schickinger S., Schneckenburger H. *J. Microsc.*, **260** (1) 30 (2015); doi: 10.1111/jmi.12263.
- Richter V., Bruns S., Bruns T., Weber P., Wagner M., Cremer C., Schneckenburger H. *J. Biomed. Opt.*, **22** (9) 91505 (2017); doi: 10.1117/1.JBO.22.9.091505.
- Birk U., von Hase J., Cremer C. *Sci. Reports*, **7** (1), 3685 (2017); doi: 10.1038/s41598-017-03743-4.
- Hell S.W., Wichmann J. *Opt. Lett.*, **19** (11), 780 (1994); doi: 10.1364/OL.19.000780. doi.org/10.1364/OL.19.000780.
- Creative Commons – Attribution International – CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- Baddeley D. et al. *J. Microscopy*, **237** (1), 70 (2010); doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03304.x.
- Cremer C., Masters B.R. *Europ. Phys. J. H*, **38** (3), 281 (2013); doi: 10.1140/epjh/e2012-20060-1.
- Cremer C., Szcurek A., Schock F., Gourram A., Birk U. *Methods*, **123**, 11 (2017); doi: 10.1016/j.ymeth.2017.03.019.
- Balzarotti F. et al. *Science*, **355** (6325), 606 (2017); doi: 10.1126/science.aak9913.
- Best G. et al. US Patent 9, 874, 737 B2, filed May 7, 2014 (granted Jan 23, 2018).
- Ring H.C., Israelsen N.M., Bang O., Haedersdal M., Mogensen M. *J. Biophoton.*, **12**(6), e201800462 (2019); doi: 10.1002/jbio.201800462.
- Grzybowski M. et al. *Angew. Chem. Int.*, **57** (32), 10137 (2018); doi: 10.1002/anie.201804731.
- Fieramonti L., Bassi A., Foglia E.A., Pistocchi A., D'Andrea C., Valentini G., Cubeddu R., De Silvestri S., Cerullo G., Cotelli F. *PLoS ONE*, **7** (11), e50744 (2012); doi: 10.1371/journal.pone.0050744.
- Bon P., Linares-Lopez J., Feyeux M., Alessandri K., Lounis B., Nassy P., Cognet L. *Nat Meth.*, **15** (6), 449 (2018); doi: 10.1038/s41592-018-0005-3.
- Booth M., Andrade D., Burke D., Patton B., Zurauskas M. *Microscopy*, **64** (4), 251 (2015); doi: 10.1093/jmicro/dfv033.
- Birk U. *Genes*, **10** (7), 493 (2019); doi: 10.3390/genes10070493.