

УДК 616-076+57.086(568.6)

О.І.Олар,

О.Ю.Микитюк,

В.І.Федів

Буковинський державний медичний
університет, м. ЧернівціСУЧАСНІ МЕТОДИ МІКРОСКОПІЇ В
БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ**Ключові слова:** мікроскопія,
біологія, медицина.**Резюме.** Розглянуто сучасні методи оптичної мікроскопії: флуоресцентну мікроскопію і флуоресцентну наноскопію та їх різновиди, фотоакустичну та атомно-силову мікроскопію. Ці методи створюють нові можливості для біології і практичної медицини.

Мікроскопія була і залишається важливим методом аналізу мікросвіту з того часу, коли А. Левенгук вперше описав амеби та інші мікроорганізми. "Складний мікроскоп", тобто, мікроскоп з більш ніж однією лінзою, був винайдений до того, як з'явилися перші повідомлення про існування живих мікроорганізмів. З того часу мікроскоп зазнав численних удосконалень. З них найбільш значущими є: винахід електронного мікроскопа (1931 р.), метод фазового контрасту (1935 р.), винаходи конфокального мікроскопа (1955 р.), атомно-силового мікроскопа (АСМ) (1986 р.), флуоресцентного мікроскопа (2006 р.) та їх похідних.

Розвиток та вдосконалення передових технологій мікроскопії продиктовані неоднорідністю мікросвіту *in vivo*. Сьогодні ці технології вже дають можливість розрізняти субпопуляції і аналізувати окремі клітини та диференціювати їх. А це в свою чергу забезпечує більш ефективний і прямий спосіб лікування більшості бактеріальних і грибкових інфекцій та відкриває перспективи застосування удосконалених методів у біотехнології [8].

Оптична мікроскопія є переважним методом медико-біологічних досліджень. Але вона має одне суттєве обмеження: не може відображати об'єкти розміром меншим, ніж 200 нм. Оптична мікроскопія дозволяє аналізувати клітинні структури, проте для детального дослідження процесів, що відбуваються на субклітинному рівні, її можливостей недостатньо, оскільки розміри рибосом, ядерних пор, клітинних філаментів та інших надмолекулярних структур не перевищують 150 нм, а товщина біомембрани порядку 10 нм.

За останнє десятиріччя відбувся злам стереотипів про розмір зображень, які можна бачити в мікроскопі: технічні можливості оптичної мікроскопії дозволяють отримати просторове розділення

порядку 50-70 нм.

Тканини та клітинні структури, які, в основному, є прозорими, не вирізняються контрастом при їх мікроскопії *in vivo*. Для їх ідентифікації потрібне забарвлення різними флуорофорами. З огляду на це переваги має **флуоресцентна мікроскопія** [22], а саме: можливість прижиттєвого вивчення об'єктів та спостереження процесів у реальному часі; можливість мічення тканин, клітин, органел та окремих молекул; наявність різноманіття флуоресцентних барвників дозволяє вивчати одночасно декілька мішеней.

Декілька нових підходів, розроблених в останні роки для флуоресцентної мікроскопії, дозволили досягти розділення ~ 10 нм. Методи об'єднали терміном **флуоресцентна наноскопія**. Системи флуоресцентної наноскопії базуються на [31]: покращенні фокусування за рахунок створення нових оптичних схем і застосування об'єктивів з високою кутовою апертурою (4- π , I5M і I5S мікроскопія); використанні явища повного внутрішнього відбивання (TIRFM); контрольоване "вмикання" і "вимикання" флуоресцентних молекул і послідовне їх детектування (STED, GSD, SPEM (SSIM), RESOLFT, (F) PALM, STORM, PAINT).

Наноскопічні методи у біології та медицині дозволяють безпосередньо вивчати взаємодії між білками, ДНК і РНК, тому можуть зіграти істотну роль у розвитку геноміки та протеоміки, у вивченні фізіології клітини, в розумінні патофізіологічних механізмів, пов'язаних з порушенням утворення складних білкових комплексів та ін.

Розглянемо детальніше сучасні прийоми флуоресцентної мікроскопії.

Конфокальна мікроскопія (КМ). Первинна ідея КМ запатентована 1961 р. М. Мінськи, який у середині 1950-х років зрозумів необхідність прижиттєвих досліджень нефіксованих препаратів

нейронної сітки тканин мозку, що максимально відтворюють дійсні процеси в цих тканинах. Ця ідея отримала практичне втілення в 1979 р. з розробкою датським фізиком Ф. Бракендорфом лазерного скануючого конфокального мікроскопа й формулюванням К. Шепардом основ теорії формування зображень. У 1985 р. було продемонстровано можливість використання КМ для дослідження флуоресцентних препаратів. Упродовж 1990-х рр. відбулося стрімке вдосконалення волоконної оптики, винайдення нових фізичних та хімічних методів просвітлення лінз, тонких діелектричних покриттів, детекторів із низьким рівнем шуму, а "коеволюція" конфокальних мікроскопів та флуоресцентних барвників призвела до появи і вдосконалення чисельних синтетичних молекулярних маркерів та барвників природного походження [1]. Тому КМ - це сучасний інструмент для візуалізації та дослідження внутрішньо- і позаклітинних структур та аналізу клітинних процесів у біологічних та біомедичних дослідженнях. Метод КМ дозволяє отримувати "оптичні зрізи" живих та фіксованих препаратів завтовшки до 100 мкм з інтервалом 0,3-0,5 мкм.

Звичайна КМ має в своїй основі люмінесцентний мікроскоп. Освітлювальна діафрагма конденсора встановлена в його передньому фокусі. Задній фокус конденсора співпадає з переднім фокусом об'єктива, а в задньому фокусі об'єктива встановлена "конфокальна" діафрагма фотоприймача. Всією системою формування і збереження зображень, обробки результатів керують комп'ютери. У сучасній скануючій КМ освітлення зразка здійснюється трьома-п'ятьма лазерними системами, які контролюються акустично-оптичними фільтрами для точного регулювання довжини хвилі та інтенсивності лазерного випромінювання. Завдяки наявності фотопомножувачів із квантовою ефективністю в ультрафіолетовому діапазоні спектра, такі мікроскопи дають можливість досліджень у діапазоні 400-759 нм [3, 5].

Характерними ознаками, що вирізняють лазерну скануючу конфокальну мікроскопію (**CLSM**) з-поміж інших різновидів світлової мікроскопії, є її покращена просторова роздільна здатність та отримання тривимірного зображення об'єкта (так звана 3D-реконструкція) [3].

Сучасна КМ широко використовується у клітинній біології. Типова задача КМ - дослідження цитоскелету, ядра, хромосом і навіть локалізації в них генів. При дослідженні локалізації білків у клітинах їх попередньо мітять різними флуорохромами. КМ дозволяє диференціювати їх

навіть якщо вони знаходяться один під одним. Вивчаються також динамічні процеси в живих клітинах, напр. рух іонів кальцію та інших речовин через клітинні мембрани.

У 1990 р. У. Вебб зі співробітниками запропонували методику мультифотонної мікроскопії **TPLSM (two-photon laser-scanning microscopy)**, подібну до конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Мультифотонна мікроскопія заснована на можливості двофотонного або трифотонного збудження флуоресценції. Наприклад, флуорофор, що поглинає зазвичай ультрафіолетове випромінювання (? 350 нм), може бути збуджений двома червоними фотонами (? 700 нм), якщо вони досягли флуорофора одночасно. Тому необхідна висока щільність фотонів для виникнення флуоресценції, яка досягається в фокусі і збудження флуоресценції відбувається в фокальній площині. Переваги **TPLSM** полягають у зниженні рівня фотопшкоджень. З допомогою чотиривимірної **TPLSM** вдалося спостерігати зростання та відведення аксонів, а також міграцію цілих клітин.

Новими перспективними напрямками також є такі методики [5]:

FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching (відновлення флуоресценції після фотопалювання) - використовують для дослідження рухливості біоорганічних молекул шляхом ініціації фотохімічного розкладання флуорохрома в зоні опромінення й наступного його роз'єднання з молекулами. Після випалювання молекули з флуорохромом з неопроміненої зони внаслідок дифузії рухаються в опромінену зону зразка. За часом наростання в ній флуоресценції можна судити про рухливість молекул.

FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer (флуоресцентний резонансний перенос енергії) - використовується для визначення відстані між молекулами різних типів, їх оточення і взаємодії. Молекули мітять двома флуорохромами з таким спектром випромінювання донора, який перекривається зі спектром поглинання акцептора. Енергія від донора до акцептора передається на малих відстанях (кілька нм) у результаті резонансу між енергетичними рівнями, а його ймовірність залежить від відстаней між молекулами. Потім акцептор випромінює енергію в видимій ділянці спектра, яка реєструється конфокальним мікроскопом.

TIRF - Total Internal Reflection Fluorescence або мікроскопія згасаючого поля - є різновидом флуоресцентної мікроскопії, при якій збуджуюче випромінювання обмежене малою областю на границі зразка та покривного скла або посуду для

культивування. TIRF мікроскопія заснована на явищі повного внутрішнього відбивання, яке відбувається при проходженні світла з високозаломлюючого середовища (напр., скло) у низькозаломлююче середовище (напр. клітина, вода). Оскільки інтенсивність хвилі в результаті повного внутрішнього відбивання експоненціально зменшується при віддаленні від поверхні (на межі розділу клітина-субстрат), лише флуоресцентні молекули розміром кількох сотень нанометрів можуть ефективно збуджуватися при мінімальних експозиціях клітин, що залишилися [12]. Ця техніка забезпечує висококонтрастні флуоресцентні зображення з низьким рівнем шумів і є ідеальною для візуалізації й спектроскопії флуоресценції окремих молекул.

TIRF мікроскопія дозволяє отримувати нанометрові зображення окремих молекул та найменших структур. Метод може використовуватися для дослідження везикул, переміщення окремих білків у клітинах, поглинання білків крові біоматеріалами, адгезії клітин до різних поверхонь, а також динаміки вивільнення нейромедіаторів (збудження флуорофорів відбувається на глибині меншій ніж 100 нм). Він використовується і для характеристики груп наночастинок, переносу електронів у мітохондріальних і фотосинтетичних мембранах, а також сил, які діють на поверхню під час переміщення клітин. Метод TIRF можна використовувати в поєднанні з методами FRAP і FRET для отримання інформації про молекулярну динаміку і молекулярну взаємодію [26].

FLIM - Fluorescence Lifetime Imaging мікроскопія - заснована на вимірюванні часу життя флуоресценції в кожній точці просторового зображення. Вона дозволяє не тільки оцінювати взаємодію між білками, але й аналізувати локальне оточення флуорофорів, напр., рН середовища або концентрації різних іонів, кисню та ін. [4]. Зараз активно розробляються методи мікроскопії з використанням флуоресцентних білків як молекулярних маркерів, які дозволяють спостерігати в реальному часі динамічні зміни локалізації і концентрації тисяч білків у різних частинах однієї, окремо взятої, клітини. З цією метою створені бібліотеки клітинних клонів, кожен з яких флуоресцентно мічений за яким-небудь визначеним білком у ссавців, в тому числі й людини [15].

Мікроскопія надвисокої роздільної здатності (прийоми мікроскопії, що перевищують поріг дифракційного розділення). Внаслідок явища дифракції точкові зображення флуорофорів, при використанні флуоресцентних

методик мікроскопії, отримуються в вигляді плями. Проте дифракція жодним чином не є перешкодою для більш точного визначення координат флуорофора за умови, що він знаходиться в оточенні інших джерел флуоресценції. У даний час існує ряд методів, які подолали закон Аббе. Наприклад, фізичний он-лайн прийом обчислювальної реконструкції за декількома почерговими зображеннями. Послідовна реєстрація зображень молекули в деякому стані та фіксація її координати дає можливість реконструкції зображення з наддифракційним розділенням. Один із способів визначення точного розташування флуоресціюючих молекул у певній точці - переведення флуорофору біля цієї точки в темновий стан [18].

Такі підходи реалізовані в групі методів зі схожими концепціями - **RESOLFT** (**RE**versible **Saturable Optical Fluorescence Transitions**).

Ймовірно, найбільш видатною технологією високого розділення є технологія **STED** (**ST**imulated **Emission Depletion**) - метод виснаження спонтанного випромінювання [11, 13, 31]. Техніку STED-мікроскопії запропонували біля десяти років тому німецькі вчені з інституту ім. М. Планка, здійснивши серйозний прорив у покращенні роздільної здатності мікроскопа. Техніка передбачає використання флуоресцентного мікроскопа за умови, що досліджувана молекула при освітленні зовнішнім джерелом випромінює світло визначеної довжини хвилі внаслідок обробки спеціальним барвником. Результуюче зображення спостерігається через конфокальний мікроскоп, в якому для отримання світла від зразка використовується дуже малий отвір. Зображення формується з елементарних світлових плям, мінімальний розмір яких не може перевищувати дифракційної границі. Для зменшення ефективної ширини світлової плями було запропоновано вторинне освітлення лазерним променем визначеної частоти з визначеним просторовим розподілом інтенсивності пучка. Після цього відбувається послідовне сканування всього зразка [17].

Ідея випадкової послідовної активації флуорофорів лежить в основі методів **STORM** (**ST**ochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy), **PALM** (**P**hoto**A**ctivated **L**ocalization **M**icroscopy) і **FPALM** (**F**luorescence **P**hoto**A**ctivation **L**ocalization **M**icroscopy), розроблених трьома незалежними лабораторіями [17].

STORM базується на послідовному збудженні флуорофору в зразку з наступною реконструкцією зображення високого розділення з серії (іноді сотні або тисячі) зображень одного і того ж поля зору [32, 35]. Метод STORM використовує пос-

лідовне збудження молекул флуорофорів, що забарвлюють об'єкт, таким чином, щоб кожна молекула була представлена в якості однієї дифракційної плями. Даний підхід робить можливим визначення локалізації кожної флуоресцентної молекули з наноскопічною точністю. Змінюючи положення освітлюваної області можна зареєструвати "карту" розташування флуоресцентних молекул. Цифрова обробка зображень дає можливість отримання необмеженого розділення, але механічні обмеження дають ефективне розділення в діапазоні від 20 нм [32].

PALM є самостійно розробленим методом з аналогічним принципом, що й STORM [11, 20]. Характерна особливість цього методу полягає в тому, що для покращення розділення з апаратного забезпечення потрібне стандартне мікроскопічне обладнання та недорогий лазер. Хоча для роботи з зображеннями потрібне сучасне програмне забезпечення, STORM і PALM були використані для 3D та багатоколірної візуалізації [10, 27, 34-36].

Ще одним цікавим методом є мікроскопія структурованого освітлення - SIM (Structured Illumination Microscopy). У площині, спряженій із фокальною, розміщується ґратка, що створює певний розподіл освітлення. Індукована флуоресценція повторює розподіл освітлення, при цьому флуоресценція об'єктів, розташованих у фокальній площині, сильно змінюється при переміщенні цього зразка. Флуоресценція об'єктів, розташованих не в фокусі, від зсуву ґратки практично не залежить. Подальша комп'ютерна обробка дозволяє відсікти флуоресценцію від інших оптичних шарів, а також покращати розділення вздовж осі. У HR-SIM (High Resolution SIM) на зразок проектується освітлення, що характеризується високою періодичністю. При взаємодії з невідомою структурою об'єкта, утворюється зображення з періодом вищим, ніж у двох початково взаємодіючих зразків ґратки та досліджуваного об'єкта (ефект Муара). Неодноразово змінюючи положення решітки та аналізуючи різні зображення з муаровим ефектом, можна відтворити вихідну структуру об'єкта, недоступну звичайній мікроскопії через дифракційну межу [25]. Нещодавно показано використання SIM для візуалізації повільного руху клітин [33].

Завдяки роботам німецьких фізиків Хелла, Стелзера та ін. був винайдений метод **4- π конфокальної мікроскопії**. Ідея методу полягає в наступному. Як відомо, роздільна здатність мікроскопа залежить насамперед від довжини хвилі світла і числової апертури об'єктива, яка теоретично може дорівнювати 1,5. Зараз вже

створені об'єктиви з числовою апертурою 1,45, тобто досягнута конструктивна межа. Тому винахідники вирішили застосувати два об'єктиви, розташовані на одній осі, але з протилежних сторін препарату. Оскільки теоретично кут захоплення світла двома об'єктивами може становити при цьому 4π , мікроскоп назвали 4- π .

За допомогою системи дзеркал і призм світло поділяється на два потоки і прямує в об'єктиви, фокуси яких співпадають. Змінюючи довжину одного плеча такого інтерферометра, можна домогтися того, щоб фази двох світлових хвиль в області фокуса також співпадали. Утворюється стояча хвиля, що призводить до підвищення аксіальної роздільної здатності.

4 π -STED-мікроскоп є результатом об'єднання STED- і 4- π мікроскопії. Німецьким дослідникам за рахунок суміщення цих двох методик вдалося досягти розділення порядку 30 нм [11]. Флуоресцентний зразок поміщають у загальний фокус двох протилежних лінз, але збудження і детектування виконуються за допомогою одного об'єктива. Збудження зразка здійснюється фемтосекундним імпульсом у зеленій ділянці спектру. Слідом за ним діє пікосекундний імпульс у червоній ділянці спектру. Під дією фотонів з такою енергією виникає вимушене випромінювання, при цьому молекули із збудженого стану переходять на коливальні підрівні основного стану з подальшою релаксацією, що перешкоджає переходу в збуджений стан надалі, оскільки енергії кванта пікосекундного лазера для цього недостатньо. У результаті, після закінчення пікосекундного імпульсу, люмінесценція спостерігалася тільки з невеликої ділянки початкової плями збудження, що має форму "смужки" товщиною порядку 30 - 40 нм. Таким чином, було досягнуте найкраще на сьогоднішній момент для "звичайної" оптичної мікроскопії розділення - $\lambda/23$ [11].

Фотоакустична мікроскопія (Photo-Acoustic Microscopy - PAM) є гібридом у техніці візуалізації зображень *in vivo*, що акустично виявляє оптичний контраст через фотоакустичний ефект. На відміну від чистих оптичних мікроскопічних методів, PAM використовує слабе акустичне розсіювання в тканині й, таким чином, виходить за межі оптичної дифузії (~1 мм у м'яких тканинах). Завдяки відмінній масштабованості, PAM може забезпечити зображення з високою роздільною здатністю в необхідних максимальних глибинах зображень до декількох міліметрів. Порівняно з розсіюючою КМ та оптичною когерентною томографією, PAM створює контраст внаслідок поглинання світла

замість його розсіювання. Крім того, у РАМ можливість візуалізації більша, ніж у основних методів флуоресцентної мікроскопії [37]. Метод РАМ продемонстрував широке біомедичне застосування уже з моменту створення [14, 19-21, 23, 24, 30, 37].

Атомно-силова мікроскопія. У 1986 р. був винайдений атомно-силовий мікроскоп, який дозволяє одержувати зображення поверхні зразків із роздільною здатністю порядку декількох нанометрів та проводити маніпуляції з наноскопічними об'єктами. За допомогою атомно-силового мікроскопа одержують зображення як фізичних об'єктів (поверхні твердих тіл), так і біологічних, хімічних об'єктів (вірусів і бактерій, атомів і молекул). Також за допомогою атомно-силового мікроскопа можна вивчати взаємодію двох об'єктів: вимірювати сили тертя, пружності, адгезії, переміщувати окремі атоми, осаджувати чи видаляти їх з деякої поверхні [8,28].

Сканування поверхні в атомно-силовому мікроскопі відбувається за допомогою кантилевера - тонкого щупа, розміщеного на кінці консольної балки. Високоточне переміщення поверхні під щупом забезпечують п'єзоелектричні елементи, які змінюють свою довжину залежно від прикладеної напруги. Якщо поверхня, над якою рухається щуп, нерівна, то щуп підіймається та опускається, і ці малі вертикальні переміщення детектуються за допомогою лазерного променя, який падає на верхню поверхню консольної балки з прикріпленим дзеркалом. Незважаючи на те, що вертикальні переміщення дзеркала малі, відбитий від нього промінь відхиляється на значний кут, який вимірюють за допомогою матричного фотодетектора. Отриманий сигнал аналізується за допомогою електроніки й перетворюється в зображення поверхні [2].

Японські дослідники з Національного інституту науки і техніки (JAIST) перетворили атомний силовий мікроскоп в хірургічний інструмент, за допомогою якого можна прооперувати одну єдину клітину, не завдавши їй жодних ушкоджень. Вони використали іонний промінь, щоб загострити стандартний кремнієвий наконечник силового мікроскопа і перетворити його в голку довжиною 8 мкм і шириною 200 нм. Коли вчені вставили таку голку в людську ембріональну клітину, на стінці клітини залишився "прокол" всього в 1 мкм. Мембрана клітини швидко повернулася до первісної форми, а голка була просунута в ядро клітини. Дослідники стверджують, що з такою точністю твердий матеріал був вставлений в ядро живої клітини вперше.

Нова технологія дозволяє вводити молекули в

певні ділянки клітин. Зокрема, ланцюжки ДНК могли б бути вставлені безпосередньо в ядро, щоб перевірити нові методи генної терапії. Також стає можливим контроль над хімічним складом клітин у режимі реального часу [6].

Таким чином, сучасні методи оптичної мікроскопії відтворюють вихідну структуру об'єкта, недоступну звичайній мікроскопії через дифракційну межу. Їх границя роздільної здатності досягає 20 нм. Фотоакустична мікроскопія характеризується кращими можливостями візуалізації, ніж основні методи флуоресцентної мікроскопії. Атомно-силова мікроскопія дозволяє досліджувати поверхню об'єктів із роздільною здатністю до кількох нанометрів, що дає нові можливості для вивчення біомолекул, контролю хімічного складу клітин і тому є важливою для практичної медицини.

Література. 1. Конфокальна мікроскопія в центрі користування унікальними приладами при інституті харчової біотехнології та геноміки НАНУ / Я.Б. Блюм, Я.О. Шеремет, Ю.А. Красиленко [та ін.] // Наука та інновації. - 2009. - Т. 5, № 2. - С. 82-91. 2. Приборы и методы зондовой микроскопии / Е.Г. Дедкова, А.А. Чуприк, И.И. Бобринский и др. - Москва. - 2011. - 160 с. 3. Педан А.Д. Дослідження рельєфу поверхні біологічних мікрооб'єктів в ультрафіолетовому сканувальному телевізійно-оптичному мікроскопі / А.Д. Педан, Б.І. Любинецька // Вісник Національного університету Львівська політехніка. - 2011. - Радіоелектроніка та телекомунікації, № 705. - С. 84-90. 4. Терентьев А.А. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки. Белок-белковые взаимодействия / А.А. Терентьев, Н.Т. Молдогазиева, К.В. Шайтан // Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. - С. 429-480. 5. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии / Г.И. Штейн - СПб: ИИЦ РАН, 2007. - 77 с. 6. A molecular delivery system by using AFM and nanoneedle / S. W. Hana, C. Nakamura, I. Obataya [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. - 2005. Vol. 20. - P. 2120-2125. 7. Chatterjee A. Tweaking biological switches through a better understanding of bistability behavior / A. Chatterjee, Y.N. Kaznessis, W.S. Hu // Curr. Opin. Biotechnol. - 2008. - Vol.19, Is.5. - P. 475-481. 8. Clear-cut observation of PNA invasion using nanomechanical DNA origami devices / T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda [et al.] // Chemical Communications. - 2012. - Vol. 48. - P. 11361-11363. 9. Developing Photoactivated Localization Microscopy (PALM) / G.H. Patterson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz [et al.] // 4th IEEE international symposium on biomedical imaging: from nano to macro, ISBI 2007. - P. 940-943. 10. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes / H. Shroff, C.G. Galbraith, J.A. Galbraith [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2007. - Vol. 104. - P. 20308-20313. 11. Dyba M. Phase filter enhanced STED-4pi fluorescence microscopy: theory and experiment / M. Dyba, J. Keller, S.W. Hell // New J. Phys. - 2005. - Vol. 7. - P. 134. 12. Fish K.N. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy / K.N. Fish // Curr. Protoc. Cytom. - 2009. - Chapter 12. - Unit 12.18. 13. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission / T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - Vol. 97. - P. 8206-8210. 14. Functional transcranial brain imaging by optical resolution photoacoustic microscopy / S. Hu, K. Maslov, V.Tsytarev [et al.] // J. Biomed. Opt. - 2009. - Vol. 14. - P. 040503. 15. Generation of a fluorescently labeled endogenous protein library in living human cells / A. Sigal, T. Danon, A. Cohen [et al.] // Nat. Protoc. - 2007. - Vol. 2. - P. 1515-1527. 16. Hell S.W. Far-Field Optical Nanoscopy / S.W. Hell // Science. - 2007. - Vol. 316. - P. 1153-1158. 17. Hell S.W. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy / S.W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs // Curr. Opin. Neurobiol. - 2004. - Vol. 14. - P. 599-609.

18. Hess S.T. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy / S.T. Hess, T.P.K. Girirajan, M.D. Mason // *Biophys. J.* - 2006. - Vol. 91. - P. 4258-4272. 19. Hu S. In vivo functional chronic imaging of a small animal model using optical-resolution photoacoustic microscopy / S. Hu, K. Maslov, L.V. Wang // *Med. Phys.* - 2009. - Vol. 36. - P. 2320-2323. 20. Hu S. Neurovascular photoacoustic tomography / S.Hu, L.V. Wang // *Front. Neuroenerg.* 2, doi:10.3389/fnene.2010.00010 (2010). 21. Hu S. Noninvasive label-free imaging of microhemodynamics by optical-resolution photoacoustic microscopy / S. Hu, K. Maslov, L.V. Wang // *Opt. Express.* - 2009. - Vol. 17. - P. 7688-7693. 22. Huang B. Super-Resolution Fluorescence Microscopy / B. Huang, M. Bates, X. Zhuang // *Ann. Rev. Biochem.* - 2009. - Vol.78. - P. 993-1016. 23. Intravital imaging of amyloid plaques in a transgenic mouse model using optical-resolution photoacoustic microscopy / S. Hu, P. Yan, K. Maslov [et al.] // *Opt. Lett.* - 2009. - Vol. 34. - P. 3899-3901. 24. Label-free photoacoustic ophthalmic angiography / Hu S., Rao B., Maslov K. [et al.] // *Opt. Lett.* - 2010. - Vol. 35. - P. 1-3. 25. Langhorst M.F.L. Structure brings clarity: Structured illumination microscopy in cell biology / M.F.L. Langhorst, J. Schaffer, B. Goetze // *Biotechnol. J.* - 2009. - Vol. 4. - P. 858-865. 26. Mattheyses A. L. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist / A.L. Mattheyses, S.M. Simon, J.Z. Rappoport // *Journal of Cell Science.* - 2010. - Vol. 123. - P. 3621-3628. 27. Multilayer three-dimensional super resolution imaging of thick biological samples / A. Vaziri, J. Tang, H. Shroff [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2008. - Vol. 105. - P. 20221-20226. 28. Nanomechanical DNA origami 'single-molecule beacons' directly imaged by atomic force microscopy / A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki [et al.] // *Nature Communications.* - 2011. - Vol. 2, DOI: 10.1038/ncomms1452. 29. Peters R. From fluorescence nanoscopy to nanoscopic medicine / R. Peters // *Nanomedicine.* - Vol. 3. - 2008. - P. 1-4. 30. Photoacoustic ophthalmology for in vivo retinal imaging / S.L. Jiao, M.S. Jiang, J.M. Hu [et al.] // *Opt. Express.* - 2010. - Vol. 18. - P. 3967-3972. 31. Resolution scaling in STED microscopy / B. Harke, J. Keller, C.K. Ullal [et al.] // *Opt. Express.* - 2008. - Vol. 16, Is.1. - P. 4154-4162. 32. Rust M.J. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) / M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang // *Nat. Methods.* - 2006. - Vol. 3. - P. 793-796. 33. Structured illumination microscopy of living cell / L. Hirvonen, K. Wicker, O. Mandula [et al.] // *Eur. Biophys. J.* - 2009. - Vol. 38. - P. 807-812. 34. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy / L. Schermelleh, P.M. Carlton, S. Haase [et al.] // *Science.* - 2008. - Vol. 320. - P. 1332-1336. 35. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples / M.F. Juetter, T.J. Gould, M.D. Lessard [et al.] // *Nat. Methods.* - 2008. - Vol. 5. - P. 527-529. 36. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy / B. Huang, W. Wang, M. Bates [et al.] // *Science.* - 2008. - Vol. 319. - P. 810-813. 37. Yao J. Photoacoustic microscopy / J. Yao, L. V. Wang // *Laser & Photonics Reviews.* - 2013. - Vol. 7, Is. 5. - P. 758-778.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Е.И.Олар, О.Ю.Микитюк, В.И.Федив

Резюме. Рассмотрены современные методы оптической микроскопии: флуоресцентная микроскопия и флуоресцентная наноскопия и их разновидности, фотоакустическая и атомно-силовая микроскопия. Эти методы создают новые возможности для биологии и практической медицины.

Ключевые слова: микроскопия, биология, медицина.

MODERN MICROSCOPY TECHNIQUES IN BIOLOGY AND MEDICINE

O.I.Olar, O.Yu.Mykytiuk, V.I.Fediv

Abstract. The article describes modern methods of optical, photoacoustic and atomic-force microscopy. These methods create new opportunities for practical biology and medicine.

Optical microscopy can not display objects smaller than 200 nm. Therefore, optical microscopy capabilities are insufficient for the investigation of the processes occurring on subcellular level. Modern optical microscopy techniques have been developed over the last decade. It is possible to obtain the spatial separation of the order of 50-70 nm. These include fluorescence microscopy, that allows to explore the structures that are transparent and do not differ in their contrast microscopy in vivo. Fluorescent nanoscopy allows achieving resolution of ~ 10 nm and to overcome diffraction of optical resolution barrier. Nanoscopic methods in biology and medicine may be important in the development of genomics and proteomics, in studying cell physiology, in pathophysiological mechanisms associated with impaired formation of complex protein complexes understanding, etc.

Basic modern fluorescence microscopy techniques: 1) confocal microscopy (CM), that allows to receive "optical slices" of live and fixed preparations to 100 microns thick, intervals of 0.3-0.5 microns; 2) laser scanning confocal microscopy (LSM), allowing to obtain three-dimensional image of the object; 3) multiphoton microscopy (TPLSM), the benefits of which are to reduce the photodamage level; 4) fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), that is used to study the mobility of biological molecules; 5) fluorescence resonance energy transfer (FRET) is used to determine the distance between the molecules of different types, its environment and interaction; 6) total internal reflection fluorescence (TIRF) provides visualization and fluorescence spectroscopy of single molecules, provides information on the molecular dynamics and molecular interaction; 7) microscopy based on the measurement of the fluorescence lifetime at each point spatial image (FLIM) allows to evaluate the interaction between proteins and analyze the local environment of the fluorophores.

High resolution microscopy techniques, that overcame Abbe law (RESOLFT, STED), as well as methods of sequential activation of fluorophores (STORM, FPALM), structured illumination microscopy (SIM) and the method of 4- π confocal microscopy are reviewed.

Photoacoustic microscopy (RAM) acoustically detects optical contrast through the photoacoustic effect and has a widely biomedical application. Atomic-force microscopy allows obtaining images of the surfaces of solids, as well as biological and chemical entities (viruses and bacteria, atoms and molecules). The interaction between two objects, individual atoms moving, its sedimentation or removing from the surface, the chemical composition of cells control can be studied using atomic-force microscope.

Keywords: microscopy, biology and medicine.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №2 (48).-P.212-217.

Надійшла до редакції 16.05.2014

Рецензент – проф. І.Ю. Олійник

© О.І. Олар, О.Ю. Микитюк, В.І. Федів, 2014