

ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ МІКРОСКОПІЇ ДЛЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Федів В.І., Микитюк О.Ю., Олар О.І., Бірюкова Т.В.

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

yfediv@ukr.net

Детальне вивчення структури клітини та її функцій на сучасному етапі відбувається завдяки, в тому числі, й створенню і застосуванню спеціальних методів мікроскопії. Виділимо окремі з цих методів і охарактеризуємо їх.

Мультифотонна мікроскопія базується на можливості двохфотонного або трьохфотонного збудження флуоресценції. У цьому випадку, наприклад, фотон великої енергії може бути замінений двома фотонами, сумарна енергія яких дорівнює енергії першого фотона. Ці два фотони повинні досягнути флуорофора одночасно. В цій методиці необхідно створити високу густину фотонів для збудження флуоресценції у фокальній площині мікроскопа. Переваги цього методу у зменшенні кількості фотопошкоджень у структурі досліджуваного зразка. Ця методика дозволила вивчати зростання та відведення аксонів, а також міграцію цілих клітин.

Для визначення відстані між різними молекулами, їх взаємодії та дослідження їх оточення, використовується так званий *резонансний перенос енергії*. Суть методу у наступному: молекули мітять двома різними флуорофорами з таким спектром випромінювання донора, який перекривається зі спектром випромінювання акцептора. Внаслідок резонансу між енергетичними рівнями (ймовірність процесу залежить від відстаней між молекулами) від донора до акцептора передається енергія на відстанях у декілька нанометрів. Далі акцептор випромінює енергію у видимій частині спектру. Ця енергія реєструється конфокальним мікроскопом.

Мікроскопія згасаючого поля є різновидом флуоресцентної мікроскопії, при якій збуджуюче випромінювання обмежене малою ділянкою на межі досліджуваного зразка і покривного скла. Тут основну роль відіграє повне внутрішнє відбивання, яке спостерігається при проходженні світла з середовища з вищим показником заломлення (напр., скло) у

середовище з нижчим показником заломлення (напр., клітина чи вода). У результаті повного внутрішнього відбивання інтенсивність світлової хвилі експоненціально зменшується на границі клітина–субстрат, тому лише флуоресцентні молекули, розміри яких порядку кількох сотень нанометрів, можуть ефективно збуджуватися при мінімальних експозиціях клітин, що залишилися. Ця методика є ефективною для флуоресценції окремих молекул і дозволяє отримувати зображення високої контрастності при дослідженні везикул, при вивченні рухів білків у клітинах, для вивчення явищ переносу електронів у мембранах мітохондрій і фотосинтетичних мембранах та ін. У комбінації з іншими методами дає інформацію про молекулярну динаміку та молекулярну взаємодію.

Мікроскопія надвисокої роздільної здатності належить до прийомів мікроскопії, що перевищують межу дифракційного розділу згідно з теорією Аббе. Дифракційна картина точкових флуорофорів має вигляд плями. Проте, визначення координати флуорофора можливе, якщо він оточений іншими джерелами флуоресценції. Подолати обмеження Аббе допомагає фізичний он-лайн прийом обчислювальної реконструкції з наддифракційним розділом за декількома послідовними зображеннями.

Додатковою технологією для отримання високої роздільної здатності є технологія під назвою *метод виснаження спонтанного випромінювання*. Ця методика передбачає використання флуоресцентного мікроскопа за умови, що досліджувана молекула обробляється спеціальним барвником і тому при дії світла від зовнішнього джерела випромінює світло певної довжини хвилі. Результуюче зображення вивчається через конфокальний мікроскоп, у якому світло від досліджуваного зразка проходить через дуже малий отвір і формується з елементарних світлових плям, мінімальний розмір яких не перевищує дифракційну межу. Для зменшення ширини світлової плями використовується вторинне освітлення лазерним променем певної частоти з запланованим просторовим розподілом інтенсивності пучка. Після чого відбувається послідовне сканування всього зразка.

Отже, сучасні методи мікроскопії дозволяють вивчати структуру об'єкта, яка є недоступною звичайній мікроскопії через дифракційну межу.