

УДК 535.417

## ПОЛУЧЕНИЕ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ОПТИЧЕСКОЙ ДЛИНЫ ПУТИ И СТАТИСТИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФЛУОРОФОРОВ В ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

*В. В. Дуденкова \*, М. С. Муравьёва, А. И. Рыбников, Ю. Н. Захаров*

Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

В данной работе представлена идея совмещения голографической и локализационной флуоресцентной микроскопии. Разработаны пути по оптимизации оптической схемы и режимов записи изображений при совмещении таких интерферометрических и статистических методов. Данные разработки дают возможность исследовать динамику внутренней структуры клеток с поперечным и продольным сверхвысоким разрешением.

### ВВЕДЕНИЕ

Современная наука имеет в своём арсенале широкий ряд различных методов исследования микрообъектов. Однако при количественных исследованиях низкоконтрастных и прозрачных для видимого света образцов стандартные методы исследования не подходят. Например, метод тёмного поля и метод фазового контраста [1] дают лишь качественную картину, метод дифференциального интерференционного контраста можно использовать для количественных оценок, но только для областей объекта с высоким градиентом оптических характеристик [2].

Широкий класс объектов микроскопии составляют биологические препараты. В нейробиологии для исследования структуры и жизнедеятельности нервных клеток и нейронных сетей применяют тонкие срезы головного мозга и первичные нейронные культуры [3]. Сейчас для лабораторных исследований таких препаратов активно используются лазерные конфокальные сканирующие микроскопы (ЛКСМ), с помощью которых исследуют морфологическую структуру объекта и функциональные особенности. Для получения объёмного изображения в таких микроскопах используется  $z$ -сканирование: оптические срезы исследуемого образца, получаемые с помощью конфокальной диафрагмы, сканируются последовательно с перемещением вдоль оптической оси между кадрами, и путём программной обработки строится трёхмерное изображение. Но использование таких конфокальных микроскопов лишь незначительно улучшает поперечное разрешение, а продольное разрешение, хотя и значительно улучшается, ограничено дифракционным пределом. К тому же при исследовании быстрых процессов в живых объектах полученное таким образом изображение не совсем корректно отображает реальную картину, т. к. сканирование проходит довольно медленно, и объект за время такого сканирования изменяется.

Для регистрации динамических изменений в биологических культурах с более высоким разрешением обычно используются современные методы STED- или 4 $\pi$ -микроскопии (см. работы [4, 5] соответственно). Однако любой из перечисленных подходов не даёт универсальных оптимальных результатов, т. к. достигает улучшения отдельно либо продольного, либо поперечного разрешения. Трёхмерная STED-микроскопия [6] достигается усложнением и без того технически сложного метода. При одновременном улучшении разрешения во всех пространственных измерениях методами STORM [7–9], PALM [10] и др., необходим длительный сбор данных, подходящий

---

\* oranng@mail.ru

только для фиксированных образцов. К тому же для использования данных методик препарат перед исследованием необходимо прокрасить специальными красителями или при выращивании образца применить трансгенные технологии для экспрессии флуоресцентных белков. Это необходимо, поскольку весь принцип метода основан на возбуждении и гашении флуоресценции и её дальнейшей регистрации.

В то же время функциональные процессы в нейронных культурах [3] (используемых в качестве образцов в данной работе) сопровождаются настолько малыми морфологическими изменениями, что они не заметны при использовании оптических методик с обычным (дифракционным) разрешением. При этом они имеют специфический характер, который может быть расшифрован с помощью новых неинвазивных методов их исследования [11, 12].

Таким образом, исследование динамических процессов существующими методиками в оптически прозрачных низкоконтрастных объектах с разрешением, превосходящим дифракционный предел продольного и поперечного разрешения, возможно лишь для ограниченного класса образцов. Расширение подобных методов на новые классы объектов и процессов является актуальной задачей. Учитывая перечисленные выше ограничения оптической некогерентной микроскопии, перспективным представляется использование методов голографической микроскопии [13, 14].

Для улучшения продольного разрешения предлагается использовать интерферометрическое сравнение последовательных восстановленных изображений, которое обеспечивает чувствительность изменений оптической разности хода до единиц нанометров. Для увеличения поперечного разрешения использован статистический флуоресцентный метод (bleaching/blinking assisted localization microscopy, BaLM [15]), позволяющий точно локализовать излучающие молекулы красителей, в том числе и меняющих своё положение [16]. Это даёт поперечное сверхвысокое разрешение (разрешение, превосходящее дифракционный предел, в англоязычных источниках применяется термин *superresolution*) нестационарных объектов. Методика совмещения двух подходов для изучения нейронных диссоциированных культур, в которых при спонтанной и вызванной активности происходят быстрые структурные изменения, позволяет проследить сверхмалые интегральные изменения оптической длины пути и тонкую перестройку структуры распределения определённых молекул (белков).

## 1. ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ

Голография позволяет восстановить не только изменения интенсивности света, но и набег фазы при прохождении образца, а значит, с помощью одной голограммы в поперечной плоскости можно получить информацию о трёхмерной структуре объекта. По виду регистрирующей среды голография делится на цифровую и аналоговую. Основным достоинством цифровой голографии является быстрота регистрации и удобство обработки результатов в числовом виде. Таким образом, появляется возможность снимать киноголограммы (набор последовательных голограмм) с минимальной возможной задержкой между кадрами и после обработки визуализировать динамические изменения. К недостаткам цифровой голографии (по сравнению с аналоговой) можно отнести более низкую информационную ёмкость. С учётом известных преимуществ и недостатков цифровой и аналоговой голографии [17, 18], в данном случае использовалась цифровая регистрация. Скорость записи определяется светочувствительностью применяемой видеокамеры, т. е. временное разрешение можно оптимально подбирать с учётом специфики конкретного изучаемого образца.

Для значительного улучшения поперечного разрешения была использована BaLM-микроскопия, применимая для образцов, в которых исследуемые структуры являются флуоресцирующими по своей природе или содержат красители любого вида и способа маркировки. Основной

принцип этого метода основан на возбуждении флуоресценции и записи на цифровую матрицу последовательности кадров с регистрацией мерцания флуорофора. Затем цифровые изображения последовательно вычитаются друг из друга. После этой процедуры на разностных кадрах остаётся только информация лишь о фактах возникновения свечения и обесцвечивания (отбеливания) флуоресцирующих молекул, что даёт возможность определить локализацию отдельных молекул флуорофора. Разрешение таких разностных кадров будет также ограничено дифракционным пределом.

Дальнейшая обработка состоит в дилатации [19] разностного изображения для устранения провалов по интенсивности. Для пикселей, не подвергшихся дилатации, т. е. сохранивших свою изначальную интенсивность, считаем среднее значение интенсивности в окружности с радиусом в 3 пиксела. Полученное среднее значение сравнивается с некоторым пороговым значением, определяемым шумом исходных данных. Если среднее значение выше установленного порога, то это дифракционное пятно с помощью алгоритма Левенберга–Марквардта [20, 21] аппроксимируется двумерным распределением Гаусса. Координаты центра этой функции принимаются за искомое положение молекулы. С помощью фильтра Гаусса [22] координаты полученного центра преобразуются в новое изображение с разрешением уже большим, чем дифракционный предел. Ширина фильтра, соответствующая разрешению нового изображения, определяется главным образом шумами. По результатам численного моделирования координаты центра свечения (первоначально целочисленные номера пикселей) восстанавливаются с точностью до второго знака после запятой. При этом данный алгоритм оказывается устойчивым к аддитивным шумам с амплитудой до 40 % от максимальной амплитуды сигнала. В таких условиях разбиение на пиксели нового изображения (эффективное разрешение) выполняется в 10 раз большей плотностью, чем у исходного изображения.

При выполнении эксперимента мощность возбуждающего излучения необходимо подобрать таким образом, чтобы за время между двумя кадрами зажигались и гасли молекулы флуорофора, изображения которых не перекрываются за счёт дифракционного размытия, а находятся на расстоянии больше дифракционного предела. Кроме интенсивности возбуждения, на количество зажигающихся молекул влияют сечение поглощения, квантовый выход, время послесвечения и количество маркера на единицу объёма. Поэтому универсальные количественные оценки сделать невозможно, необходим расчёт каждого конкретного случая. Как правило, он нецелесообразен и мощность возбуждающего излучения подбирается эмпирически. Но сделанные для некоторых конкретных случаев оценки показывают, что оптимальная мощность возбуждения для наблюдения мерцаний в используемой конфигурации сопоставима с мощностью, используемой для регистрации изображений во флуоресцентной лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Например, для красителя «Alexa Fluor 555» («Invitrogen») эти величины на образце составляют 20 мкВт для BaLM-микроскопии и  $30 \div 300$  мкВт для ЛКСМ-микроскопии.

Поскольку процесс мерцания флуорофоров статистичен, при оптимальном количестве событий между экспозициями число кадров для построения детального изображения должно как минимум на порядок превосходить выигрыш в разрешении, а с учётом особенностей алгоритмов выделения и локализации — на полтора–два порядка. Именно такое количество кадров необходимо сделать для построения детального изображения. Стоит отметить, что экспозиция каждого кадра должна быть минимальной для регистрации единичных фактов мерцания флуоресцирующих молекул.

Существенным преимуществом предлагаемого метода является то, что алгоритм применим для любого флуорофора, удовлетворяющего условиям фотобиологической безопасности обычной флуоресцентной микроскопии. Такая методика может быть включена в большое количество исследований с применением флуоресцентных красителей, т. е. различными красителями можно

маркировать любые интересующие внутриклеточные структуры, например всевозможные рецепторы или тубулиновые микротрубочки. Сам по себе данный метод позволяет построить изображение со сверхвысоким разрешением, а его относительное быстродействие — исследовать динамику наноразмерных образований в живых культурах [16]. Поэтому при совмещении этих преимуществ с методом голографической микроскопии можно достичь сверхвысокого разрешения по всем трём координатам.

## 2. ОПТИЧЕСКАЯ СХЕМА

Реализация совмещения в одной оптической схеме голографической микроскопии с применением интерферометрического сравнения восстановленных изображений [17, 18, 23, 24] и метода BaLM-микроскопии была проведена на базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 510. Такая модификация обусловлена стремлением дополнить широкие возможности лабораторного микроскопа дополнительным способом сбора данных. Безусловно, данную оптическую установку можно собрать отдельно на оптическом столе или сделать дополнительным модулем любого стандартного оптического микроскопа. Однако оптимальным представляется применение этих доработок именно к флуоресцентному микроскопу, т. к. для метода BaLM необходим флуоресцирующий образец. Тогда такое совмещение требует небольших конструктивных изменений и даёт возможность получить изображения со сверхвысоким разрешением и параллельно использовать стандартные функции микроскопа, например отслеживать изменение интегрального количества кальция в исследуемом образце (это является весьма важной характеристикой живых образцов).

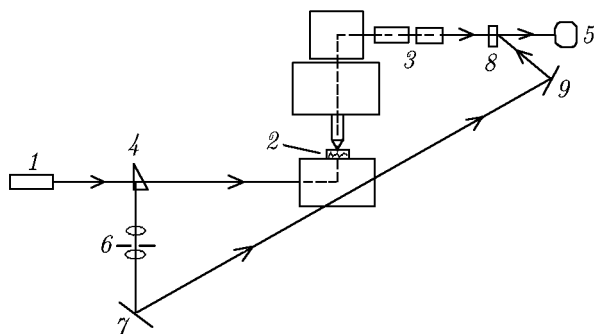


Рис. 1. Принципиальная схема записи голограмм в широкопольном режиме работы микроскопа: 1 — лазер, 2 — исследуемый образец, 3 — коллиматор из двух объективов, 4 — светоделитель, 5 — КМОП-камера, 6 — коллиматор из двух линз с диафрагмой, 7 — зеркало, 8 — оптический клин, 9 — зеркало

в качестве осветителя использовался гелий-неоновый лазер 1 с длиной волны 633 нм, который может быть заменён на лазер с любой другой длиной волны в зависимости от поставленных задач. С помощью светоделительной призмы 4 мы получаем два когерентных световых пучка. Один из них, предметный, проходя через оптический тракт микроскопа, освещает объект исследования 2, изображение которого проецируется на фоторегистратор 5. Другой пучок при помощи оптического клина направляется на регистрирующую среду 5 в качестве опорного пучка. Для того, чтобы при

Схема собрана на виброзащищённом основании («Newport RS 2000») базового микроскопа. На рис. 1 представлено принципиальное расположение оптических элементов для голографической записи. Использовалась внеосевая голографическая схема Лейта—Упатниекса для устранения перекрытия дифракционных порядков на этапе восстановления. На рис. 2 представлена схема для метода BaLM-микроскопии. Конструктивно элементы схемы подобраны таким образом, что для перехода от одного метода к другому требуются минимальные изменения.

Рассмотрим особенности голографической части схемы (см. рис. 1). Для голографии необходимо когерентное освещение, а для возбуждения флуоресценции в методе BaLM это не обязательно (например, подходит ксеноновая или ртутная лампа). Для компактности в обоих методах в качестве

сведении пучки имели одинаковые поперечные размеры, опорный пучок расширяется с помощью коллиматора с диафрагмой *б*, а предметный расширяется после прохождения микрообъектива. Также необходимо уравнивать интенсивности интерферирующих пучков. Предметный пучок ослабляется за счёт прохождения через исследуемый препарат, поэтому необходимо поставить соответствующий фильтр на опорный луч. При настройке схемы также соблюдалось равенство оптических путей предметного и опорного пучков. Для фоторегистрации голограмм использовалась цифровая камера на основе комплементарной структуры композит-металл-окись-проводник (КМОП-камера) VEC-545, имеющая матрицу с диагональю 0,4 дюйма и числом пикселей  $2592 \times 1944$  с размером 2,2 мкм.

При записи серии флуоресцентных изображений методом BaLM-микроскопии конструктивно используется та же схема. Для возбуждения флуоресценции в исследуемом образце можно использовать когерентный источник излучения, поэтому для возбуждения флуорофоров с полосой поглощения вблизи 633 нм используется тот же лазер *1*. Опорный пучок не нужен, поэтому он перекрывается (или удаляется светоделитель *4*, см. рис. 1). Пучок, освещающий образец, теперь возбуждает флуоресценцию в препарате. В такой конфигурации следует учесть, что вместе с интересующим нас эмиссионным излучением на регистрирующую цифровую матрицу также будет приходить и более интенсивное возбуждающее излучение. Для того, чтобы отсечь слишком интенсивное на этом этапе излучение накачки, необходимо после образца, но перед матрицей поставить интерференционный фильтр на длину волны возбуждающего лазера. В противном случае на фоне излучения, используемого для возбуждения, невозможно будет детектировать более слабое длинноволновое мерцание флуорофоров.

Рассмотрим основные технические параметры, влияющие на получаемое разрешение. Мы использовали внеосевую голографию, и здесь одним из важнейших параметров является угол схождения между опорным и предметными пучками. Для оптимизации угла схождения необходимо учитывать такой фактор, как число элементов матрицы, приходящихся на период полос голограммной структуры. Период полос по сравнению с размером пиксела регистрирующей цифровой матрицы должен быть таким, чтобы каждая полоса приходилась хотя бы на три регистрирующих пиксела, в противном случае будет снижаться качество восстановленного с голограммы изображения.

Угол схождения также влияет и на разделение дифракционных порядков при восстановлении голограммы. Цифровая голограмма обрабатывалась численным алгоритмом двумерного преобразования Фурье с фильтрацией в частотной плоскости. Для того, чтобы фильтрация не ограничивала разрешение восстановленного изображения, расхождение дифракционных порядков должно быть не меньше максимальной пространственной частоты спектра объекта. С учётом всех этих требований при использовании матрицы с размером пиксела 2,2 мкм оптимальным углом схождения получается угол  $4^\circ$ .

Поскольку в обоих методах для записи используется цифровая видеокамера, то качество исходных данных во многом определяется её техническими характеристиками. С точки зрения полноты получаемой информации о быстрых изменениях важнейшим параметром является количество кадров в единицу времени. Для BaLM-анализа количество кадров, записанных в секунду,

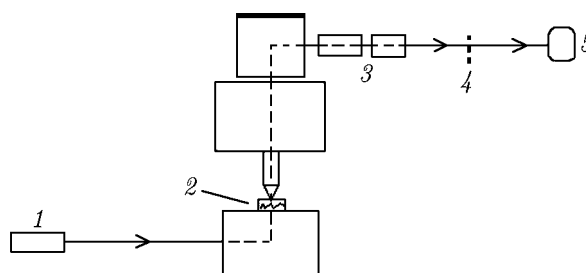


Рис. 2. Принципиальная схема записи данных при BaLM-микроскопии: *1* — лазер, *2* — исследуемый образец, *3* — коллиматор из двух объективов, *4* — светофильтр, *5* — КМОП-камера

также является важным параметром. Ведь молекулы флуорофора зажигаются и отбеливаются практически мгновенно, и крайне важно зарегистрировать как можно больше этих актов. Для ВаLM-метода разрешающая способность также является основополагающей, поскольку для повышения точности локализации молекул флуорофора необходимо более детальное изображение.

Оптимальным с точки зрения максимального поля зрения является случай, когда функция рассеяния точки (ФРТ) попадает на  $9 \div 16$  пикселей, поскольку в случае ВаLM-микроскопии требуется большее, чем при РАLM-микроскопии количество пикселей на ширину функции рассеяния точки [15]. Поскольку при увеличении количества активных пикселей скорость записи уменьшается, то необходимо выбирать оптимальное значение первого. В эксперименте использовалось  $2136 \times 1602$  активных пикселей матрицы, при этом на один пиксел приходилась область с размером около 117 нм. Частота кадров при этом составляла примерно 3,5 кадра в секунду. Моделирование показало, что для получения полной картины изображения необходимо порядка  $200 \div 500$  кадров, а значит, при использовании выбранных параметров записи удаётся отследить медленные изменения с характерным временем вариаций не менее 100 с. Однако скоростными камерами можно регистрировать быстрые процессы.

### 3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В качестве исследуемого образца использовался биологический препарат. Изучалась первичная диссоциированная культура нейронов гиппокампа мозга эмбриона мыши. В такой культуре клетки располагаются на подложке в виде монослоя. При использовании водоиммерсионного объектива с двадцатикратным увеличением в поле зрения цифровой камеры попадало сразу несколько нейронных клеток и их отростков. Образец был окрашен с помощью вторичных антител, маркированных флуорофором «Алекса 647» и ассоциированных к первичным антителам, специфичным к белку MAP2. Поскольку максимум спектра поглощения такого красителя приходится на длину волны 647 нм, то для возбуждения мы использовали гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Этот источник использовался в обеих конфигурациях схемы, т. к. когерентное лазерное излучение удовлетворяет как условиям записи голограммной структуры, так и может являться излучением накачки флуоресценции.

При использовании голографической схемы записи информации мы сняли последовательность голограмм исследуемой нейронной культуры. Для компенсации стационарных фазовых искажений, вносимых оптическими элементами схемы, использовали метод двух экспозиций, т. е. до или после исследования необходимо записывать голограмму с теми же опорным и предметным пучками, но без исследуемого объекта. Фактически для этого необходимо, чтобы на предметном столике микроскопа не находился препарат. Такая голограмма отображает набег фазы от всех оптических элементов схемы. После восстановления вычисляются интерферограммы восстановленных изображений киноголограммы объекта и голограммы без него. Для этого была создана программа восстановления цифровых голограмм, основанная на двумерном преобразовании Фурье с фильтрацией в частотной плоскости.

В результате мы получаем фазовые портреты — распределения фазы восстановленной объектной волны в поперечной плоскости. На рис. 3 приведён пример фазового портрета группы нейронов, и у одной из клеток можно наблюдать отросток — дендрит. Сравнивая результаты, соответствующие различным моментам времени, можно судить о том, происходят ли в этой клеточной культуре изменения.

Оценив форму клеток и их продольные размеры с высокой точностью, перейдём к изучению поперечного строения выбранного сечения клеточной культуры. Для этого закрываем опорный пучок в голографической схеме и ставим интерференционный фильтр на длину волны 633 нм

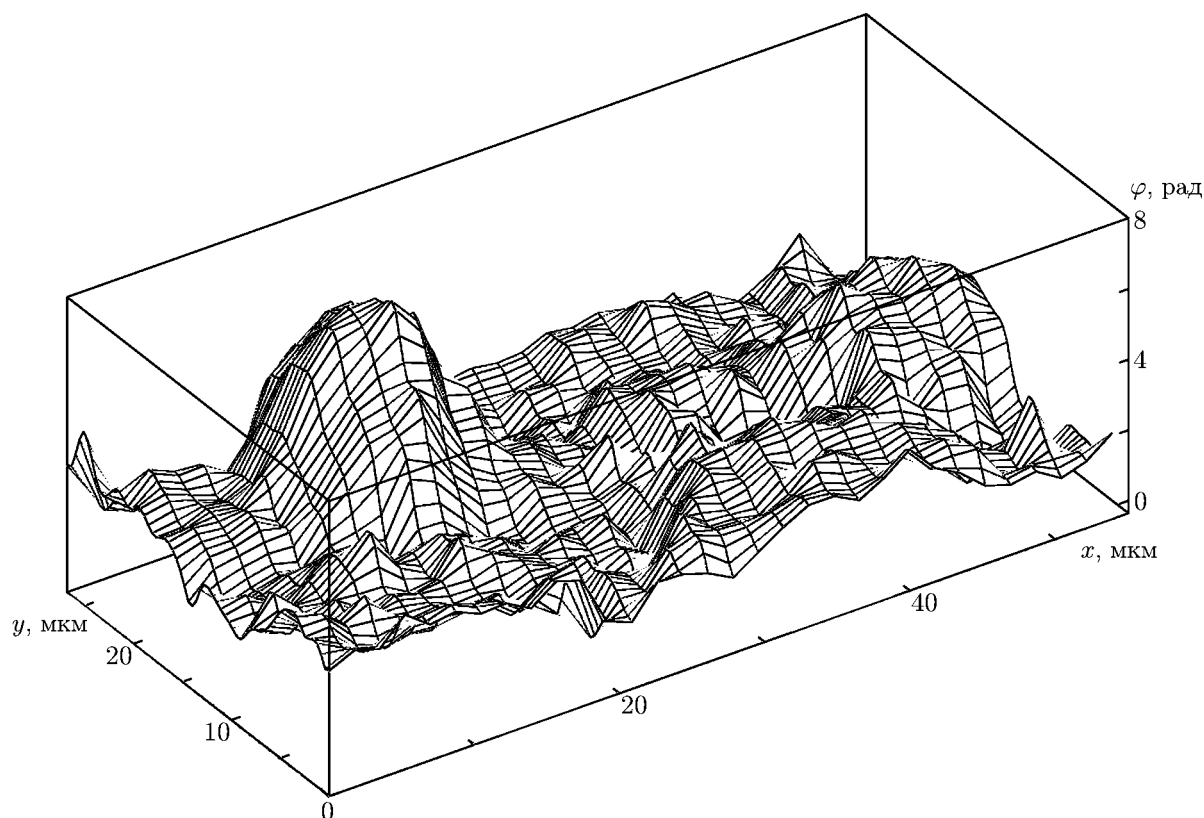


Рис. 3. Фазовый портрет культуры клеток гиппокампа мозга мыши ( $x$  и  $y$  — пространственные координаты,  $\varphi$  — набег фазы)

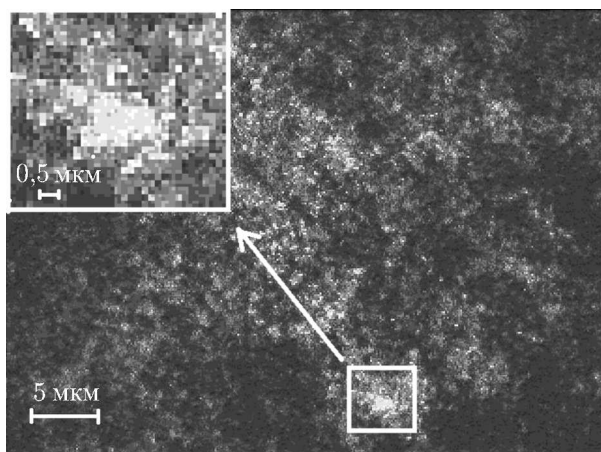


Рис. 4. Флуоресцентное изображение микротрубочек отростков нейрона с помощью антител, маркированных флуорофором «Алекса 647», прикрепленных к белку MAP2. Разрешение изображения ограничено дифракционным пределом

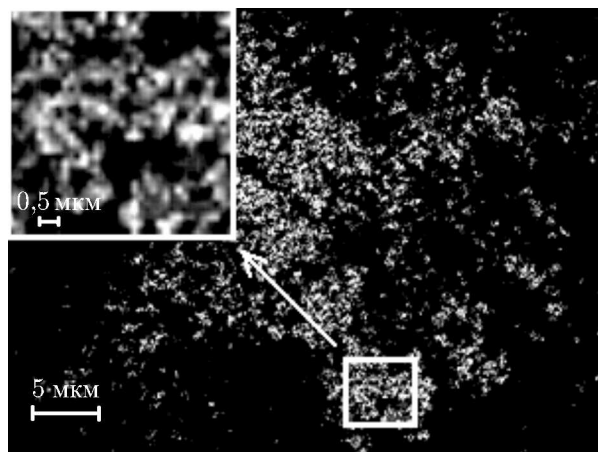


Рис. 5. Изображение сверхвысокого разрешения микротрубочек отростков нейрона, полученное цифровой обработкой серии флуоресцентных изображений

перед цифровой матрицей, чтобы отсечь прошедшее через образец возбуждающее излучение. Теперь снимаем серию изображений флуоресценции, возбуждённой в изучаемом образце. Одно из них приведено на рис. 4. На записанном видеофрагменте можно заметить мерцание флуорофо-

ров, т. е. их зажигание и гашение. Также видны области с постоянным излучением. Применяя анализ стохастического мерцания и отбеливания молекул флуорофора, получаем новое изображение поперечного строения культуры (см. рис. 5). Это флуоресцентное изображение микротрубочек дендрита нейрона с разрешением в 10 раз выше исходного, т. е. оно на порядок превосходит дифракционный предел.

В данной работе была разработана схема совмещения в одном приборе голографического и флуоресцентного методов изучения микроскопических фазовых объектов с учётом особенностей записи таких данных. Построена совмещённая схема на базе оптического микроскопа «Carl Zeiss LSM 510». Визуализация и измерение фазового набег объектного пучка в клетках и межклеточном пространстве голографическим методом дают информацию об их оптической длине пути (размерах и показателе преломления), т. е. информацию об изменениях морфологии и внутриклеточного состава. Также существенным преимуществом фазовых портретов является то, что они позволяют достичь нанометрового разрешения по оптической длине пути. Достигнутое в данной работе разрешение порядка 10 нм может быть улучшено при использовании видеокамеры с меньшими шумами и большим динамическим диапазоном по яркости. BaLM-микроскопия даёт возможность изучать сечения флуоресцентных нейронных культур со сверхвысоким разрешением, на порядок превосходящим дифракционный предел.

Таким образом, главное преимущество такого совмещения состоит в возможности изучения динамики внутренней структуры клеток с нанометровым разрешением. Такое совмещение позволяет отслеживать пространственное строение со сверхразрешением как в поперечной плоскости, так и вдоль оптической оси, чего невозможно добиться даже при работе на специальных выпускаемых промышленностью микроскопах. Также представляется перспективным достижение максимального и продольного, и поперечного разрешения одновременно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett A., Osterberg H., Jupnik H., Richards O. Phase microscopy: principles and applications. New York: John Wiley and Sons Inc., 1951. P. 320.
2. Shribac M. // Optics in the Life Science. Technical Digest, 14–18 April 2013, Waikoloa Beach, Hawaii, United States. Art. no. NW4B.3.
3. Гладков А. А., Ведунова М. В., Коротченко С. А. и др. // Вест. ННГУ им. Н. И. Лобачевского. 2011. Т. 2, № 2. С. 243.
4. Hell S. W., Wichmann J. // Opt. Lett. 1994. V. 19. P. 780.
5. Klar T. A., Jakobs S., Dyba M., et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 8 206.
6. Willing K. I., Harke B., Medda R., Hell S. W. // Nature Methods. 2007. V. 4, No. 11. P. 915.
7. Rust M. J., Bates M., Zhuang M. // Nature Methods. 2006. V. 3. P. 793.
8. Bates M., Huang B., Dempsey G. T., Zhuang X. // Science. 2007. V. 317. P. 1 749.
9. Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. // Science. 2008. V. 319. P. 810.
10. Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., et al. // Science. 2006. V. 313. P. 1 642.
11. Akkin T., Landowne D., Sivaprakasam A. // Frontiers in Neuroenergetics. 2010. V. 2, No. 22. P. 1.
12. LaPorta A., Kleinfeld D. // Cold Spring Harb Protoc. 2012. V. 3. P. 307.
13. Popescu G. Quantitative phase imaging of cells and tissues. McGraw-Hill, 2011. 362 p.
14. Shaked N. T., Zalevsky Z., Satterwhite L. Biomedical optical phase microscopy and nanoscopy. Elsevier, 2012. 412 p.
15. Burnette D. T., Sengupta P., Dai Y., Lippincott-Schwartz J., Kachar B. // Publ. Nat. Acad. Sci. 2011. V. 108, No. 52. P. 21 081.
16. Cox S., Rosten E., Monypenny J., et al. // Nature Methods. 2012. V. 9, No. 2. P. 195.

17. Дуденкова В. В., Муравьёва М. С., Рыбников А. И., Захаров Ю. Н. // Труды XVI Научной конф. по радиофизике, посвящённой 100-летию со дня рождения А. Н. Бархатова, 11–18 мая 2012 г., Нижний Новгород. С. 164.
18. Рыбников А. И., Дуденкова В. В., Муравьёва М. С., Захаров Ю. Н. // Опт. журн. 2013. Т. 80, № 7. С. 66.
19. Фисенко В. Т., Фисенко Т. Ю. Компьютерная обработка и распознавание изображений: Учеб. пособие. СПб.: СПбГУ ИТМО, 2008. 192 с.
20. Levenberg K. // Quart. Appl. Math. 1944. P. 164.
21. Marquardt D. // SIAM J. Appl. Math. 1963. V. 11. P. 431.
22. Быков Р. Е., Фрайер Р., Иванов К. В., Манцветов А. А. Цифровое преобразование изображений: Учеб. пособие для вузов. М.: Горячая линия — Телеком, 2003. 228 с.
23. Lobyntseva V. V., Zakharov Yu. N. // Phys. Wave Phenomena. 2011. V. 19, No. 1. P. 10.
24. Рыбников А. И., Дуденкова В. В., Муравьёва М. С. и др. // Сб. трудов Международной конф. «Фундаментальные проблемы оптики — 2012», 15–19 октября 2012 г., Санкт-Петербург. С. 525.

Поступила в редакцию 11 ноября 2013 г.; принята в печать 17 сентября 2014 г.

#### ACHIEVEMENT OF SUPERRESOLUTION IN MEASURING THE OPTICAL PATH LENGTH AND STATISTICAL LOCALIZATION OF FLUOROPHORES IN HOLOGRAPHIC AND FLUORESCENT MICROSCOPY

*V. V. Dudenkova, M. S. Muravyova, A. I. Rybnikov, and Yu. N. Zakharov*

We present the concept of combining the holographic and localization fluorescent microscopy. The ways to optimize the optical schemes and image recording regimes in the process of combining such interferometric and statistical methods have been developed, which makes it possible to study the dynamics of the internal cell structure with transverse and longitudinal superresolution.