

СИСТЕМА ОСВЕЩЕНИЯ ОБЪЕКТА ДЛЯ МИКРОСКОПИИ С СУБДИФРАКЦИОННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

С.А. Ассельборн, Е.С. Зацепин, Д.С. Исаков, А.М. Герасимов, Д.Г. Пихуля, Ю.В. Микляев

*Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация
E-mail: aborn@mail.ru*

Аннотация. Разработана система освещения объекта лазерным источником с подавлением когерентности для оптической микроскопии. Освещение объекта выполнено по методу темного поля. Данная система позволяет визуализировать детали (наночастицы) с размерами менее 50 нм. Это необходимо для повышения разрешения ранее предложенного метода сверхразрешения оптической микроскопии NORM (наноскопии), основанном на обработке в реальном времени видеопотока, регистрирующего броуновское движение наночастиц над поверхностью объекта. Реализован метод определения вертикальной координаты наночастиц при помощи астигматического изображения. Получены трехмерные картины распределения координат наночастиц в суспензии над наблюдаемым объектом. Разрешение по вертикали составило менее 200 нм, в плоскости объекта (по обоим латеральным координатам) – менее 100 нм.

Ключевые слова: микроскопия, наноскопия; ближнепольная микроскопия; сверхразрешение; наночастицы; анализ траекторий частиц; видеообработка.

Введение

В последние годы разработано несколько методов сверхразрешения в оптической микроскопии. Разрешающая способность традиционной оптической микроскопии ограничена дифракционным пределом разрешения, составляющим около половины длины волны наблюдаемого излучения [1]. В видимой области спектра этот предел составляет около 200 нм. Наиболее подробно исследованным и часто используемым способом получения оптических изображений с субволновым разрешением является сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия (СБОМ) [2, 3]. При помощи СБОМ можно считывать распределение интенсивности света, спектр излучения на поверхности образца с разрешением, гораздо более высоким, чем это позволяет критерий Релея. Однако, сканирующий принцип и необходимость контроля положения зонда вблизи поверхности образца с точностью, выше 50 нм, делают получение изображений этим методом довольно медленным, стоимость микроскопа – высокой, а также накладывают дополнительные требования на свойства образа.

С другой стороны, в последнее время разработано несколько методик получения изображений с высоким разрешением, основанных на оптических принципах, но позволяющих получать информацию не о распределении интенсивности оптических полей, а о распределении красителя (люминофора) в образце, имеющих особое значение для наблюдения биологических объектов.

Метод STED [4] основан на сканировании образца пучком лазера на двух длинах волн и использовании специального красителя, люминесценция которого возбуждается излучением одной длины волны и подавляется излучением на другой длине волны. Другой подход получения сверхразрешения в люминесцентной микроскопии основан на таком возбуждении люминесценции, когда в каждый отдельный момент времени имеет место люминесценция случайно распределенных отдельных молекул красителя, изолированных друг от друга на расстояние, большее предела разрешения оптического микроскопа, в который они наблюдаются [5–7].

Третий подход (SIM) [8] в некотором смысле подобен принципу конфокальной микроскопии [9]. Этот метод основан на освещении образца последовательностью интерференционных картин. Использование нелинейных свойств люминофора в этом методе позволяет добиться повышения

разрешающей способности. Так, в работе [10] сообщалось о достижении разрешающей способности 50 нм в режиме насыщения люминесценции.

Для преобразования ближнепольного изображения в распространяющиеся волны было предложено и реализовано несколько вариантов так называемых дальнепольных суперлинз (far-field superlenses – FSL) и гиперлинз. Часть из них основана на возбуждении эванесцентными волнами волн поверхностных плазмонов [11]. Другой класс таких суперлинз основан на субволновой фокусировке и увеличении изображения при помощи диэлектрических линз и сфер с радиусом кривизны около нескольких микрометров [12, 13]. Изображение получается при очень малом фокусном расстоянии с субволновым разрешением. При таком способе получения изображения область наблюдения является очень малой или состоящей из множества отдельных небольших участков размером не более нескольких микрометров.

Последние результаты в области оптического сверхразрешения связаны с дальнейшим развитием уже существующих методов. Так, в области люминесцентной локализационной микроскопии получены результаты по быстрому сканированию образца за счет использования высокочувствительных камер и уменьшению поля зрения [14], а также оптимизации алгоритмов [15, 16]. Развитие этой техники идет также в направлении получения трехмерных изображений [17] и в получении двухцветных изображений объектов, различные элементы которых поглощают различные красители [18]. Новые результаты в зондовой микроскопии связаны с использованием нелинейных эффектов [19, 20] и комбинационного рассеяния [21, 22].

Метод сверхразрешения, рассмотренный в данной статье, основан на подходе, ранее предложенном авторами [23], позволят получать изображения с разрешением, аналогичным методу сканирующей ближнепольной микроскопии, равным 50–100 нм. В отличие от люминесцентной микроскопии изображения объектов получают не в виде картины распределения красителя, а в виде распределения оптических свойств самого объекта. Отличительной особенностью метода является возможность получения большого поля зрения и сравнительно большой глубины резкости при высоком разрешении. Также возможно получение изображений подвижных объектов, поскольку в данном методе, в отличие от люминесцентной микроскопии, используется динамичная картина движущихся наночастиц. По сравнению с зондовой микроскопией данный метод может обеспечить более высокую скорость сканирования, обусловленную тем, что в роли зондов одновременно используется большое количество наночастиц. Также метод допускает получение трехмерных изображений объектов.

В предложенном нами методе наночастицы, взвешенные в слое жидкости на поверхности объекта, наблюдаются в оптический микроскоп. Определяется координата каждой частицы и интенсивность рассеиваемого ей света. В результате, вычисляется интенсивность света в месте нахождения частицы. Разрешение метода, ограничено, в основном, только размерами частиц, которые могут регистрироваться оптическим микроскопом, и может достигать 10–20 нм. На текущем этапе нами выполнялось сканирование поверхности образца частицами со средним размером менее 120 нм.

Получение изображения в данном методе состоит из следующей последовательности действий:

1. Нанесение суспензии наночастиц на поверхность объекта, в результате суспензия находится между поверхностью объекта и покровным стеклом.
2. Регистрация картины броуновского движения наночастиц с помощью микроскопа и ПЗС камеры.
3. Обработка получаемого видеопотока при помощи специально разрабатываемой программы трассировки частиц, вычисление координат частиц (с субволновой точностью) и определение соответствующей им интенсивности рассеяния.
4. Обработка данных на выходе программы трассировки частиц, и расчет распределения интенсивности ближнего поля с субволновой точностью. Фурье-фильтрация полученного изображения.

Для регистрации броуновского движения наночастиц в суспензии требуется оптическая схема, которая в отличие от обычного оптического микроскопа позволит использовать различные виды источников освещения (в том числе лазерные) как в режиме отраженного, так и в режиме проходящего света.

В ходе работы были получены суспензии частиц золота и диоксида титана в воде. Для предотвращения агрегации частиц и адгезии на поверхность объекта использовался сурфактант. На рис. 1 и 2 показаны распределения частиц по размерам, полученным методом динамического рассеяния на анализаторе размера частиц Microtrac «Nanotrac Ultra» производства компании Microtrac Inc..

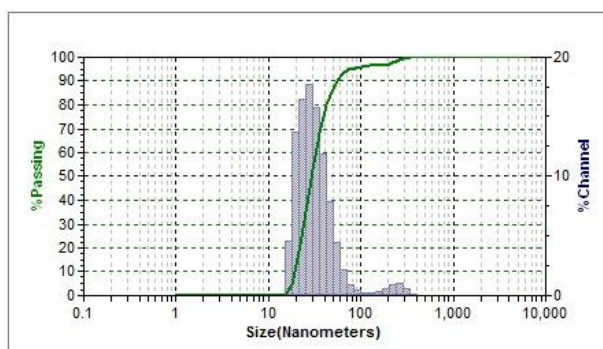


Рис. 1. Гистограмма распределения размеров золотых наночастиц в водной суспензии

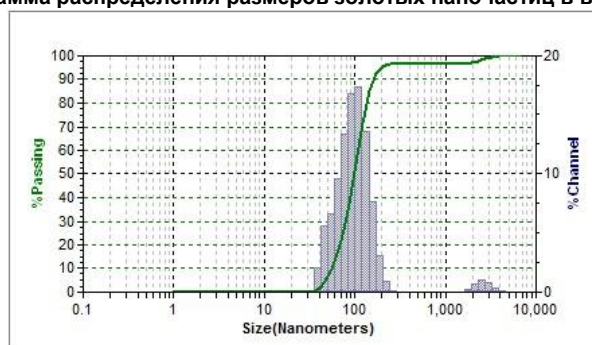


Рис. 2. Гистограмма распределения размеров наночастиц диоксида титана в водной суспензии

На данном этапе исследований была выполнена разработка алгоритма обработки видео, позволяющих получать изображения с субдифракционным разрешением до 50 нм. Исследована функциональность метода на различных тестовых объектах.

Для увеличения яркости изображения наночастиц с размерами меньше 90 нм в качестве источника освещения использовался непрерывный лазер с устройством для подавления когерентности. Регистрация броуновского движения проводилась с помощью стандартной черно-белой ПЗС камеры повышенной чувствительности, так и с помощью сверхвысокочувствительной камеры на основе EMCCD детектора (Andor iXon Ultra).

На рис. 3 показаны изображения наночастиц золота со средним размером 29 нм, полученные при помощи лазерной подсветки.

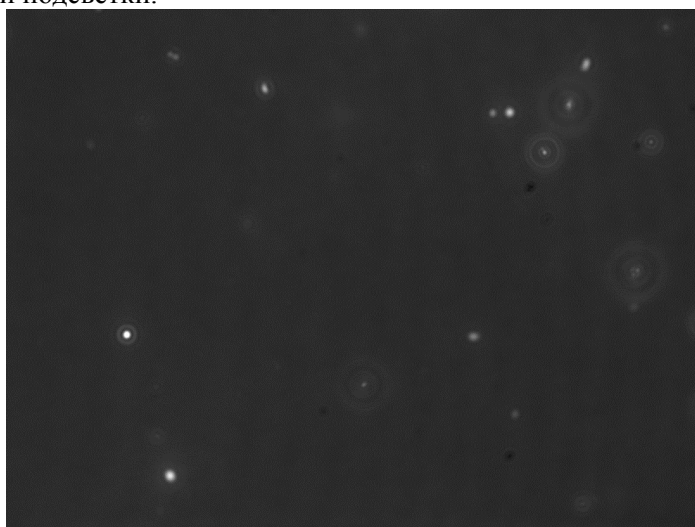


Рис. 3. Снимок наночастиц золота со средним размером 29 нм, полученный в темном поле при помощи лазерной подсветки. Числовая апертура объектива $NA = 0,75$

Для обработки видеоряда была разработана программа трассировки частиц. В этой программе использован алгоритм, позволяющий, в первую очередь, обеспечить высокую скорость вычислений, в том числе за счет использования встроенного набора инструкций процессора, и, во вторую очередь, обеспечивающий приемлемую точность локализации наночастиц. Для этой цели наиболее хорошо подходит метод аппроксимации изображения наночастицы гауссовой поверхностью [24]. Последовательность обработки видеоряда программой можно описать следующим образом: выделение динамической составляющей (удаление статической составляющей изображения), подавление шумов и подготовка изображений видеоряда к распознаванию частиц, поиск и распознавание частиц (корреляционным методом), определение координат центров частиц с субпиксельной точностью (методом аппроксимации с гауссовой поверхностью), определение яркости частиц, компенсация пространственного дрейфа изображения в видеоряде.

После получения изображения на основе данных трассировки частиц, полученное изображение обрабатывается методом Фурье-фильтрации. Для построения Фурье-фильтра использованы измерения амплитудно-частотной характеристики данного метода получения изображений.

Схема экспериментальной установки для получения изображения наночастиц в проходящем свете при использовании лазерной подсветки представлена на рис. 4. Данная экспериментальная установка разработана на основе модульного микроскопа. В схеме используется лазер на длине волны 532 нм и сверхвысокочувствительная камера Andor iXon Ultra. Фото установки показано на рис. 5.

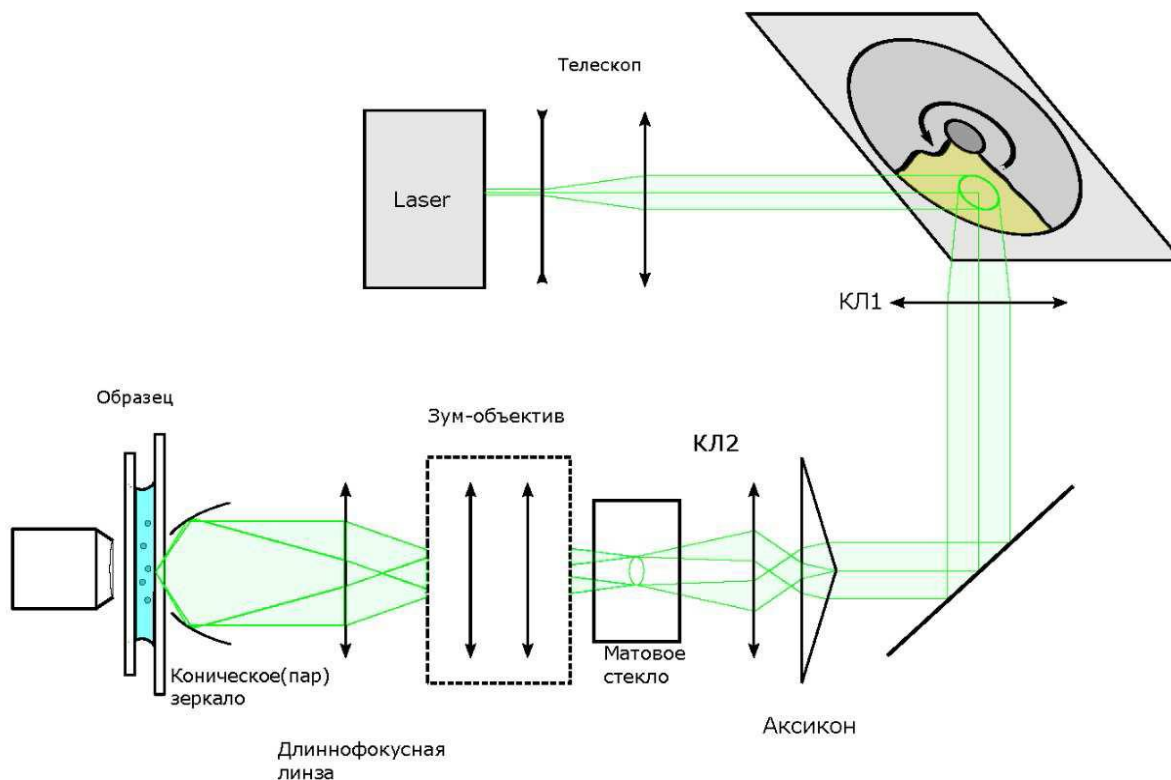


Рис. 4. Схема лазерного освещения объекта.
КЛ1 и КЛ2 – коллимирующие линзы

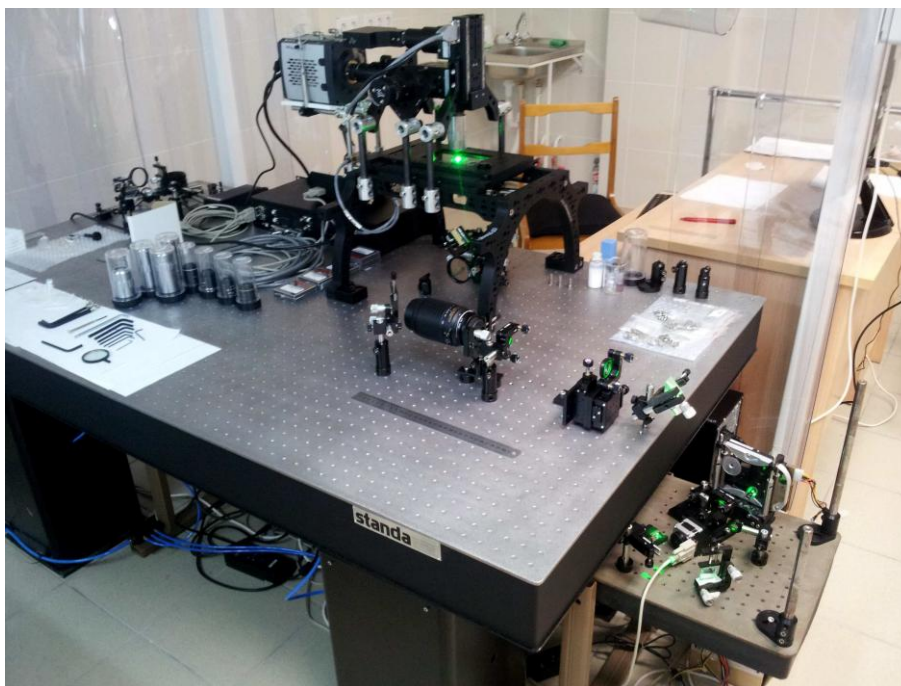


Рис. 5. Фотография установки микроскопии со сверхразрешением на основе модульного микроскопа с лазерной подсветкой и высокочувствительной камерой Andor iXon Ultra. В правом нижнем углу фото диффузор – устройство для подавления пространственной когерентности в системе лазерного освещения объекта

При помощи данной установки были получены изображения тестовых объектов, показанные на рис. 6, 7. Тестовый объект на рис. 6 представлял собой полоски хрома толщиной около 50 нм на кварцевой подложке, тестовый объект на рис. 7 – ряд отверстий диаметром 100 нм в пленке титана на кварцевой подложке.

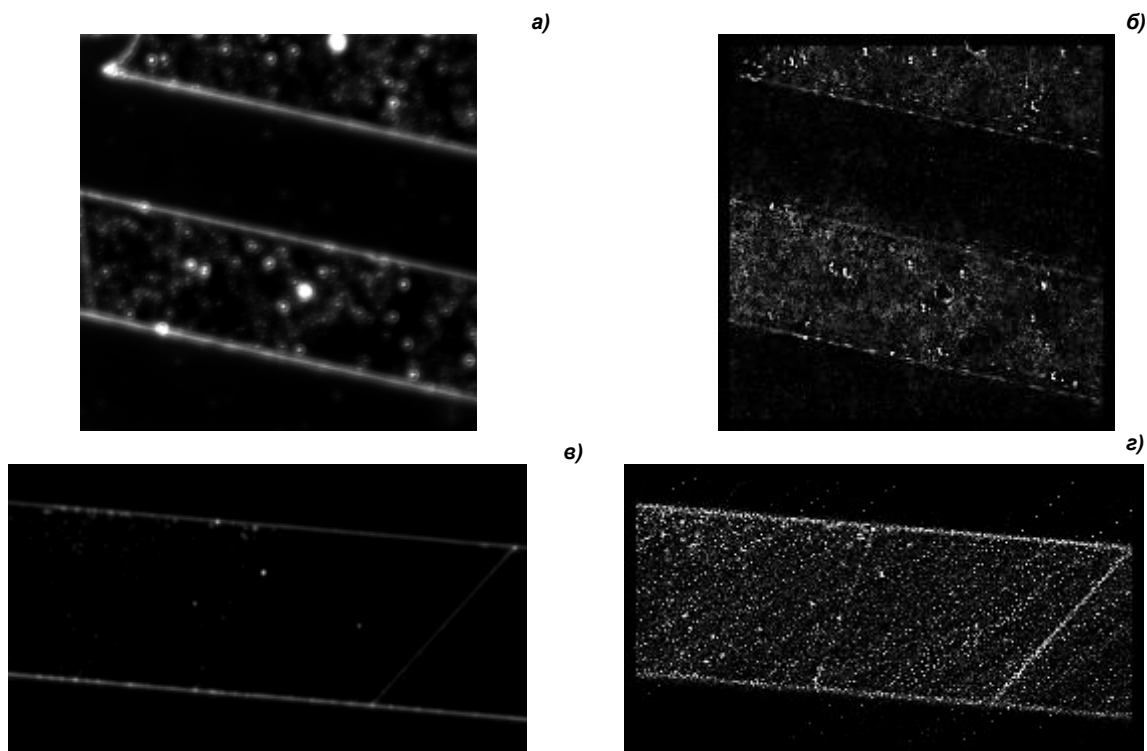
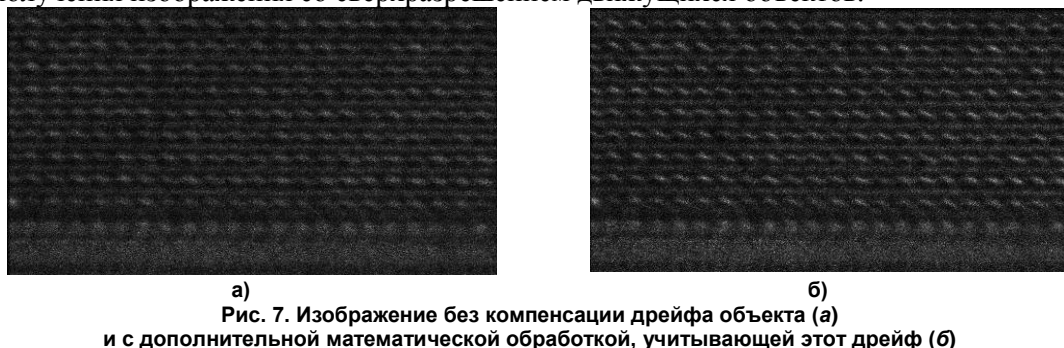


Рис. 6. Изображение объекта, видимое в объектив микроскопа а), в), и построенное по трассировке наночастиц б), г)

Как можно видеть из сравнения фото в) и г), сканирование наночастицами позволяет не только повысить четкость изображения, но и выявить новые детали изображения.

На рис. 7 показано сравнение изображений тестового объекта с дополнительной математической обработкой видеоряда, позволяющей компенсировать дрейф изображения в процессе съемки (рис. 7, а) – без компенсации, рис. 7, б) – с компенсацией). Дело в том, что с учетом высокого разрешения получаемого изображения даже небольшие перемещения объекта под микроскопом приводят к снижению разрешения. В данном случае такая обработка демонстрирует возможность получения изображения со сверхразрешением движущихся объектов.



Кроме алгоритма определения координаты наночастицы на плоскости с субдифракционной точностью, в данной работе был разработан алгоритм, позволяющий определять положение наночастиц в объеме (все три координаты). Данный подход основан на обработке изображения наночастиц при их наблюдении в микроскоп с введенным астигматизмом. Использовалась схема микроскопа, показанная на рис. 8.

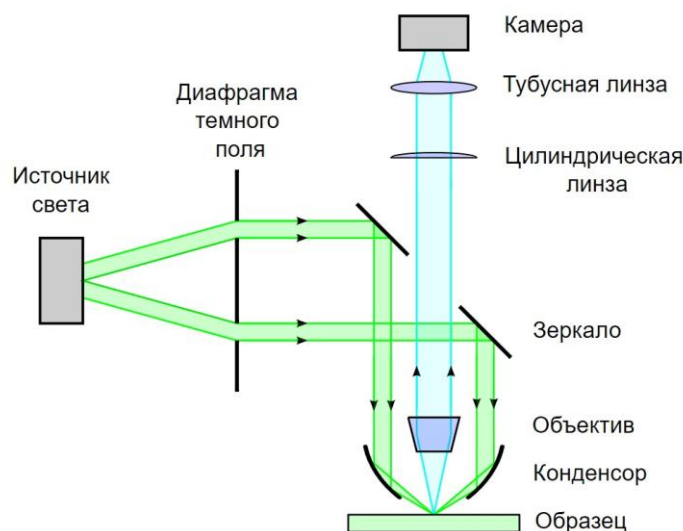


Рис. 8. Схема модифицированного микроскопа для получения астигматического изображения наночастиц. В микроскоп дополнительно помещалась цилиндрическая линза с фокусным расстоянием 2 м непосредственно перед тубусной линзой с фокусным расстоянием 180 мм

Дополнительная цилиндрическая линза, помещенная между объективом и тубусной линзой, приводила к формированию астигматического изображения наночастиц, эксцентриситет которого определялся вертикальным положением наночастицы. Снимок суспензии наночастиц, нанесенной непосредственно на плоскую поверхность (после испарения жидкости) показан на рис. 9.

Определение эксцентриситета изображения наночастицы в каждый момент времени позволило вычислить все три координаты наночастицы. Данный подход позволяет выделить частицы, расположенные в непосредственной близости от поверхности объекта и на основе этого повысить контраст получаемого двумерного изображения. Это обусловлено тем, что таким образом можно учитывать только вклад частиц, находящихся в области ближнего поля.

Кроме того, данный способ позволяет определять трехмерный рельеф поверхности объекта. На данном этапе нами были проведены исследования для случая плоской поверхности (границы допустимой области для частиц). Было проведено сканирование наночастицами при различных наклонах поверхности объекта и вертикальном смещении поверхности объекта.

Результаты расчетов координат частиц показаны на рис. 10.

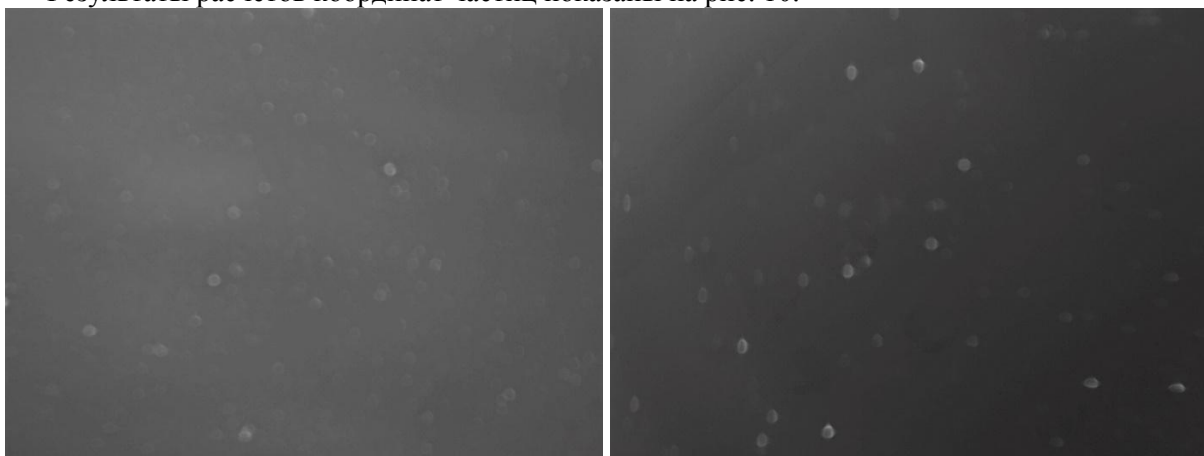


Рис. 9. Наночастицы на плоской поверхности, полученный при астигматизме изображения на микроскопе Olympus BX51 с объективом 20x, NA=0,4 и фокусном расстоянии цилиндрической линзы, равном 2 м. Во втором случае поверхность наклонена относительно вертикальной оси. Левая сторона поверхности расположена ближе, а правая – дальше от объектива. Это приводит к тому, что эксцентриситет изображений частиц отличается в левой и правой стороне снимка

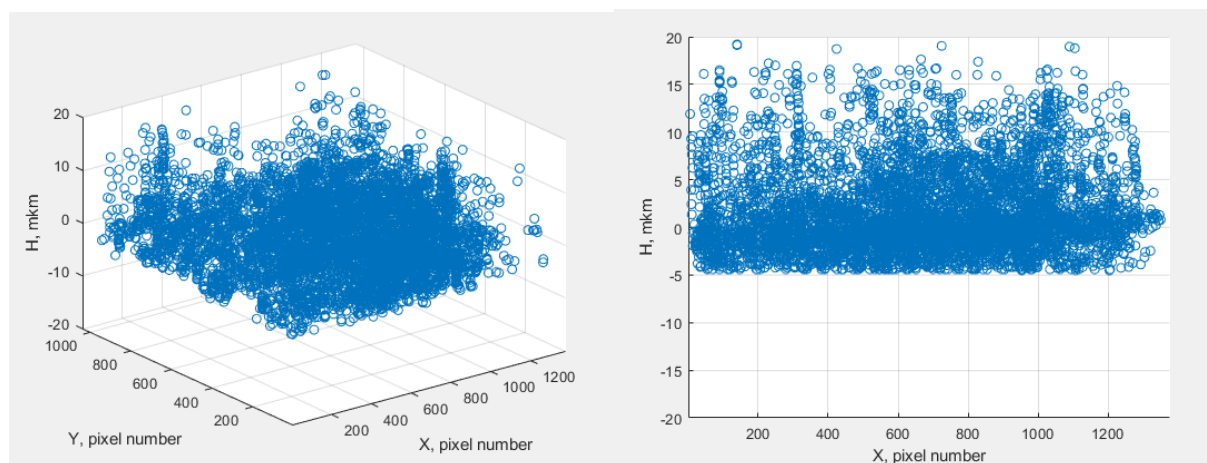


Рис. 10. Распределение координат частиц в объеме суспензии. Вертикальная координата горизонтальной поверхности объекта равна 5 мкм. Количество зарегистрированных частиц равно 6 000

Точность измерений вертикальной координаты определялась по величине разброса при исследовании изображений частиц после испарения жидкости и вертикальном смещении объекта. Точность определения вертикальной координаты составила около 200 нм при диапазоне измерений, равном 30 мкм.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что использование лазерной подсветки и высокочувствительной камеры в методе сканирования ближнего поля при помощи наночастиц позволяет получать двумерные изображения с разрешением около 50 нм и с точностью 200 нм по вертикали определять рельеф объекта. Кроме построения рельефа объекта данная информация может быть использована для дискриминации частиц по высоте или удаленности от поверхности объекта и получения более четкого изображения.

Исследование поддержано Грантом РФФИ по проекту № 20-42-740008.

Литература

1. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung / E. Abbe // Archiv für mikroskopische Anatomie. – 1873. – Vol. 9, no. 1. – P. 413–468.
2. Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometric Scale / E. Betzig, J.K. Trautman, T.D. Harris *et al.* // Science. – 1991. – Vol. 251, no. 5000. – P. 1468–1470.
3. High-Resolution Near-Field Raman Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes / A. Hartschuh, E.J. Sanchez, X.S. Xie, L. Novotny // Physical Review Letters. – 2003. – Vol. 90, Iss. 9. – P. 095503.

4. Hell, S.W. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy / S.W. Hell, J. Wichmann // *Optics letters*. – 1994. – Vol. 19, no. 11. – P. 780–782.
5. Пат. 2305270 Российская Федерация, Способ флуоресцентной наноскопии / А.А. Климов. – № 2005115052; заявл. 18.05.2005; опубл. 27.11.2006.
6. Hess, S.T. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy / S.T. Hess, T.P.K. Girirajan, M.D. Mason // *Biophysical journal*. – 2006. – Vol. 91, Iss. 11. – P. 4258–4272.
7. Rust, M.J. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) / M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang // *Nature methods*. – 2006. – Vol. 3, no. 10. – P. 793–796.
8. Gustafsson, M.G.L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two using Structured Illumination Microscopy / M.G.L. Gustafsson // *Journal of microscopy*. – 2000. – Vol. 198, no. 2. – P. 82–87.
9. US Patent No. 3013467, 1957 / S. Namiki, Y. Ikegaya // *Biological & pharmaceutical bulletin*. – 2009. – Vol. 32, no. 1. – P. 1–9.
10. Gustafsson M.G.L. Nonlinear Structured-Illumination Microscopy: Wide-Field Fluorescence Imaging with Theoretically Unlimited Resolution / M.G.L. Gustafsson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102, no. 37. – P. 13081–13086.
11. Jacob, Z. Optical Hyperlens: Far-Field Imaging Beyond the Diffraction Limit / Z. Jacob, L.V. Alekseyev, E. Narimanov // *Optics express*. – 2006. – Vol. 14, no. 18. – P. 8247–8256.
12. Near-field Focusing and Magnification Through Self-Assembled Nanoscale Spherical Lenses / J. Lee, B. Hong, W. Kim *et al.* // *Nature*. – 2009. – Vol. 460, no. 7254. – P. 498–501.
13. Optical Virtual Imaging at 50 nm Lateral Resolution with a White-Light Nanoscope / Z. Wang, W. Guo, L. Li // *Nature communication*. – 2011. – Vol. 2. – Article number: 218.
14. Fast, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of Live Cells / S.A. Jones, S.H. Shim, J. He, X. Zhuang // *Nature methods*. – 2011. – Vol. 8, no. 6. – P. 499–508.
15. Small A., Stahlheber S. Fluorophore Localization Algorithms for Super-Resolution Microscopy // *Nature methods*. – 2014. – Vol. 11, no. 3. – P. 267–279.
16. rapidSTORM: Accurate, Fast Open-Source Software for Localization Microscopy / S. Wolter, A. Löschberger, T. Holm *et al.* // *Nature methods*. – 2012. – Vol. 9, no. 11. – P. 1040–1041.
17. Elucidation of Synaptonemal Complex Organization by Super-Resolution Imaging with Isotropic Resolution / K. Schücker, T. Holm, C. Franke *et al.* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112, no. 7. – P. 2029–2033.
18. Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy / Nikić I., Plass T., Schraidt O. *et al.* // *Angewandte Chemie international edition*. – 2014. – Vol. 53, no. 8. – P. 2245–2249.
19. Mapping Local Field Enhancements at Nanostructured Metal Surfaces by Second-Harmonic Generation Induced in the Near Field / I. Nikić, T. Plass, O. Schraidt *et al.* // *Journal of microscopy*. – 2008. – Vol. 229, no. 2. – P. 233–239.
20. Nonlinear Optical Imaging of Single Plasmonic Nanoparticles with 30 nm Resolution / A. Horneber, K. Braun, J. Rogalski *et al.* // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17, no. 33. – P. 21288–21293.
21. Willets, K.A. Super-Resolution Imaging of SERS Hot Spots / K.A. Willets // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – Vol. 43, no. 11. – P. 3854–3864.
22. Label-Free Nanometer-Resolution Imaging of Biological Architectures Through Surface Enhanced Raman Scattering / S. Ayas, G. Cinar, A.D. Ozkan *et al.* // *Scientific reports*. – 2013. – Vol. 3, no. 1. – P. 1–8.
23. Пат. 2,319,948 Российская Федерация. Способ получения изображения повышенной разрешающей способности / Ю.В. Микляев, С.А. Ассельборн; U.S. Patent No. 2009,0116,024 (Priority date 7 April 2006).
24. Cheezum, M.K. Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles / M.K. Cheezum, W.F. Walker, W.H. Guilford // *Biophysical Journal*. – 2001. – Vol. 81. – P. 2378–2388.

Поступила в редакцию 20 апреля 2022 г.

Сведения об авторах

Ассельборн Сергей Александрович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, лаборатория сенсорики, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация, e-mail: aborn@mail.ru, asselbornsa@susu.ru.

Зацепин Евгений Сергеевич – лаборант-исследователь, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация.

Исаков Денис Сергеевич – научный сотрудник, лаборатория сенсорики, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация.

Герасимов Александр Михайлович – кандидат физико-математических наук, доцент, кафедра «Оптоинформатика», старший научный сотрудник лаборатории сенсорики, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация.

Пихуля Денис Григорьевич – кандидат физико-математических наук, доцент, кафедра «Оптоинформатика», старший научный сотрудник лаборатории сенсорики, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация, e-mail: pikhuliadg@susu.ru.

Микляев Юрий Владимирович – доктор физико-математических наук, профессор, кафедра «Физика наноразмерных систем», ведущий научный сотрудник, лаборатория сенсорики, Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Российская Федерация, e-mail: mikliaevyv@susu.ru.

Bulletin of the South Ural State University
Series "Mathematics. Mechanics. Physics"
2022, vol. 14, no. 3, pp. 68–78

DOI: 10.14529/mmph220308

ILLUMINATION SYSTEM FOR SUB-DIFFRACTION RESOLUTION MICROSCOPY

S.A. Asselborn, E.S. Zatsepin, D.S. Isakov, A.M. Gerasimov, D.G. Pikhulya, Yu.V. Miklyaev
South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation
E-mail: aborn@mail.ru

Abstract. Illumination scheme for superresolution microscopy is developed. The scheme accomplishes dark field illumination with a laser light source including spatial coherence suppression. The scheme allows to observe nanoparticles with a size smaller than 50 nm. This is necessary to get higher resolution in the previously proposed method of superresolution microscopy (Near field Optical Random Microscopy – NORM). This method is based on real-time video processing of a nanoparticles Brownian motion those are located near the object surface. The method of vertical coordinate measurement is demonstrated. This method is based on astigmatic nanoparticle imaging. Three-dimensional distributions of suspended nanoparticles are obtained. Vertical resolution better than 200 nm and lateral resolution better than 100 nm are demonstrated.

Keywords: *microscopy; nanoscopy; near-field microscopy; super-resolution; nanoparticles; particle trajectory analysis; video processing.*

References

1. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1873, Vol. 9, no. 1, pp. 413–468. DOI: 10.1007/BF02956173
2. Betzig E., Trautman J.K., Harris T.D., Weiner J.S., Kostelak R.L. Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometric Scale. *Science*, 1991, Vol. 251, no. 5000, pp. 1468–1470. DOI: 10.1126/science.251.5000.1468
3. Hartschuh A., Sanchez E.J., Xie X.S., Novotny L. High-Resolution Near-Field Raman Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters*, 2003, Vol. 90, Iss. 9, p. 095503. DOI: 10.1103/PhysRevLett.90.095503
4. Hell S.W., Wichmann J. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Optics letters*, 1994, Vol. 19, no. 11, pp. 780–782. DOI: 10.1364/OL.19.000780

5. Klimov A.A. *Sposob fluorestsentnoy nanoskopii* (The Method of Fluorescent Nanoscopy) pat. 2305270 Ros. Federatsiya. no. 2005115052; zayavl. 18.05.2005; opubl. 27.11.2006. (pat. 2305270 Russian Federation. No. 2005115052; declared on 05/18/2005; published on 11/27/2006).
6. Hess S.T., Girirajan T.P.K., Mason M.D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 2006, Vol. 91, Iss. 11, pp. 4258–4272. DOI: 10.1529/biophysj.106.091116
7. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 2006, Vol. 3, no. 10, pp. 793–796. DOI: 10.1038/nmeth929
8. Gustafsson M.G.L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*, 2000, Vol. 198, no. 2, pp. 82–87. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
9. Namiki S., Ikegaya Y. US Patent No. 3013467 US Patent No. 3013467, 1957. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2009, Vol. 32, no. 1, pp. 1–9.
10. Gustafsson M.G.L. Nonlinear Structured-Illumination Microscopy: Wide-Field Fluorescence Imaging with Theoretically Unlimited Resolution. *Proc. National Academy of Sciences*, 2005, Vol. 102, no. 37, pp. 13081–13086. DOI: 10.1073/pnas.0406877102
11. Jacob Z., Alekseyev L.V., Narimanov E. Optical Hyperlens: Far-Field Imaging Beyond the Diffraction Limit. *Optics express*, 2006, Vol. 14, no. 18, pp. 8247–8256. DOI: 10.1364/oe.14.008247
12. Lee J., Hong B., Kim W. *et al.* Near-Field Focusing and Magnification through Self-Assembled Nanoscale Spherical Lenses. *Nature*, 2009, Vol. 460, no. 7254, pp. 498–501. DOI: 10.1038/nature08173
13. Wang Z., Guo W., Li L., Luk'yanchuk B., Khan A., Liu Z., Chen Z., Hong M. Optical Virtual Imaging at 50 nm Lateral Resolution with a White-Light Nanoscope. *Nat Commun.* 2011, Vol. 2, Article number: 218. DOI: 10.1038/ncomms1211
14. Jones S.A., Shim S.H., He J., Zhuang X. Fast, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of Live Cells. *Nature methods*, 2011, Vol. 8, no. 6, pp. 499–508. DOI: 10.1038/nmeth.1605
15. Small A., Stahlheber S. Fluorophore Localization Algorithms for Super-Resolution Microscopy. *Nat Methods*, 2014, Vol. 11, no. 3, pp. 267–279. DOI: 10.1038/nmeth.2844
16. Wolter S., Löschberger A., Holm T. *et al.* rapidSTORM: Accurate, Fast Open-Source Software for Localization Microscopy. *Nat Methods*, 2012, Vol. 9, no. 11, 1040–1041. DOI: 10.1038/nmeth.2224
17. Schücker K., Holm T., Franke C., Sauer M., Benavente R. Elucidation of Synaptonemal Complex Organization by Super-Resolution Imaging with Isotropic Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 7, pp. 2029–2033. DOI: 10.1073/pnas.1414814112
18. Nikić I., Plass T., Schraidt O., Szymański J., Briggs J.A., Schultz C., Lemke E.A. Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, Vol. 53, no. 8, pp. 2245–2249. DOI: 10.1002/anie.201309847
19. Celebrano M., Zavelani-Rossi M., Polli D., Cerullo G., Biagioni P., Finazzi M., Duò L., Labardi M., Allegrini M., Grand J., Adam P.M. Mapping Local Field Enhancements at Nanostructured Metal Surfaces by Second-Harmonic Generation Induced in the Near Field. *J. Microsc.*, 2008, Vol. 229(Pt 2), pp. 233–239. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2008.01892.x
20. Horneber A., Braun K., Rogalski J., Leiderer P., Meixner A.J., Zhang D. Nonlinear Optical Imaging of Single Plasmonic Nanoparticles with 30 nm Resolution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, Vol. 17, no. 33, pp. 21288–21293. DOI: 10.1039/c4cp05342g
21. Willets K.A. Super-Resolution Imaging of SERS Hot Spots. *Chemical Society Reviews*, 2014, Vol. 43, no. 11, pp. 3854–3864. DOI: 10.1039/c3cs60334b
22. Ayas S., Cinar G., Ozkan A.D., Soran Z., Ekiz O., Kocaay D., Tomak A., Toren P., Kaya Y., Tunc I., Zareie H., Tekinay T., Tekinay A.B., Guler M.O., Dana A. Label-Free Nanometer-Resolution Imaging of Biological Architectures through Surface Enhanced Raman Scattering. *Scientific reports*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 1–8. DOI: 10.1038/srep02624
23. Mikliaev J.V., Asselborn S.A. *A Method for Obtaining an Image of Increased Resolution*. RU Patent No. 2,319,948; U.S. Patent No. 2009,0116,024 (Priority date 7 April 2006).
24. Cheezum M.K., Walker W.F., Guilford W.H. Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles. *Biophysical Journal*, 2001, Vol.81, pp. 2378–2388.

Received April 20, 2022

Information about the authors

Asselborn Sergey Aleksandrovich is Cand. Sc. (Physics and Mathematics), Senior Staff Scientist, Laboratory of Sensorics, e-mail: aborn@mail.ru, asselbornsa@susu.ru.

Zatsepin Evgeniy Sergeevich is Laboratory Assistant-Researcher, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Isakov Denis Sergeevich is Researcher, Laboratory of Sensorics, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Gerasimov Aleksandr Mikhaylovich is Cand. Sc. (Physics and Mathematics), Associate Professor, Department of “Optoinformatics”, Senior Staff Scientist, Laboratory of Sensorics, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Pikhulya Denis Grigor'evich is Cand. Sc. (Physics and Mathematics), Associate Professor, Department of “Optoinformatics”, Senior Staff Scientist, Laboratory of Sensorics, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation, e-mail: pikhuliadg@susu.ru.

Miklyaev Yuriy Vladimirovich is Dr. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Department of Physics of Nanoscale Systems, Leading Researcher, Laboratory of Sensorics, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation, e-mail: mikliaevyv@susu.ru.