

О рентгеновской микроскопии в области «углеродного окна»

И.А.Артюков, А.В.Виноградов, Ю.С.Касьянов, С.В.Савельев

При исследовании биообъектов предлагается использовать рентгеновское излучение, лежащее в области углеродного окна ($4.4 \text{ нм} < \lambda < 5 \text{ нм}$), с целью повышения контраста изображения.

Ключевые слова: рентгеновская микроскопия, биообъекты, мягкое рентгеновское излучение.

Микроскопия в мягком рентгеновском (МР) диапазоне (длина волны $\lambda > 1 \text{ нм}$, энергия квантов $E < 1 \text{ кэВ}$) начала развиваться в 70-е годы в связи с прогрессом в разработке специализированных синхротронов, а также плазменных источников, создаваемых лазерами и микропинчевыми разрядами [1–3]. В 80-е годы эти работы получили новое развитие благодаря появлению рентгеновских зонных пластинок (линз Френеля), которые являются продуктом нанотехнологии в современном понимании этого термина [3, 4]. При этом главное внимание уделялось так называемому диапазону водяного окна ($2.3 \text{ нм} < \lambda < 4.4 \text{ нм}$), в котором достигается максимальный контраст белков и других углеродсодержащих соединений с водой [5, 6]. Большинство экспериментов было выполнено на длине волны $\lambda = 2.4 \text{ нм}$, соответствующей минимуму поглощения воды – основного компонента влажных (нелиофилизированных) биологических тканей.

Однако, кроме получения максимального контраста рентгеновских изображений влажных биообъектов, существует ряд задач, решение которых также является исключительно важным для биологических и медицинских приложений. Во-первых, это наблюдение и идентификация клеточных структур и органических соединений без внесения дополнительных окрашивающих химических веществ. Во-вторых, применение методов рентгеновской микроскопии для изучения образцов, обезвоженных и фиксированных методами, которые широко используются в биологических и медицинских исследованиях. В этом случае толщина образца как для МР микроскопии в области водяного окна, так и для просвечивающей электронной микроскопии ограничена глубиной проникновения излучения, обычно не превышающей нескольких десятых долей микрометра. Наконец, весьма важной является задача получения максимального градиента контраста в разнородных тканях образца.

Во всех отмеченных выше случаях спектральный диапазон $4.4 \text{ нм} < \lambda < 5 \text{ нм}$, следующий сразу за K -скачком

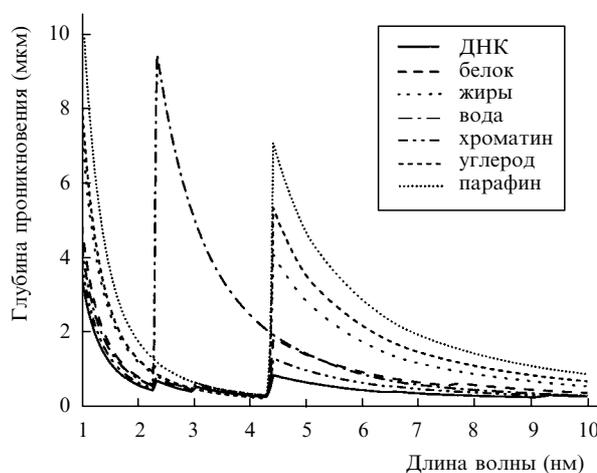


Рис.1. Спектральная зависимость глубины проникновения, на которой интенсивность уменьшается в e раз, мягкого рентгеновского излучения для различных органических соединений и воды (по данным таблиц Б.Хенке [7]).

поглощения углерода, представляется более привлекательным, чем водяное окно. Прежде всего отметим, что область длин волн $4.4 \text{ нм} < \lambda < 5 \text{ нм}$, которую естественно назвать углеродным окном, характеризуется наибольшей глубиной проникновения излучения в углеродсодержащие соединения во всем диапазоне $1.5 \text{ нм} < \lambda < 100 \text{ нм}$. Кроме того, как видно из рис.1, различие коэффициентов поглощения клеточных структур и веществ (органелл) в углеродном окне в 5–6 раз больше, чем в водяном. В то же время и глубина проникновения излучения в органические соединения примерно на порядок выше. Это означает, что в области углеродного окна можно изучать гораздо более толстые срезы фиксированных, высушенных и помещенных в парафин биообъектов.

Анализ рис.1 (см. также [7]) показывает, что область углеродного окна является чрезвычайно удобной для абсорбционной микроскопии биообъектов толщиной до 30 мкм (при пропускании свыше 2 %). Большое различие в коэффициентах поглощения разных элементов создает основу для дифференциального контраста, а низкое поглощение парафина и формальдегида позволяет использовать эти вещества для фиксации структуры образца методами, освоенными в видимой и электронной микроскопии.

И.А.Артюков, А.В.Виноградов. Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 53

Ю.С.Касьянов. Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38

С.В.Савельев. НИИ морфологии человека РАМН, Россия, 117418 Москва, ул.Циурпы, 3

Поступило в редакцию 10 июня 2004 г.

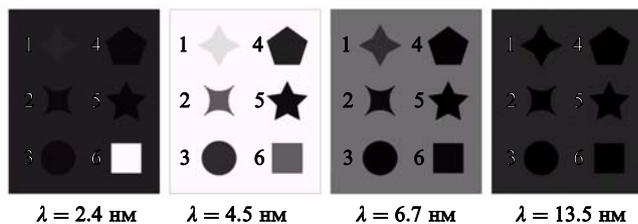


Рис.2. Моделирование картин контраста биообразцов и воды в парафине толщиной 3 мкм на разных длинах волн (1 – жиры, 2 – белки, 3 – хроматин, 4 – нуклеосомы, 5 – ДНК, 6 – вода). Экспозиция на длине волны $\lambda = 13.5$ нм увеличена в 100 раз, динамический диапазон – 8 бит.

На рис.2 иллюстрируется изменение поглощения и контраста органических соединений при использовании МР излучения разных длин волн в образце толщиной 3 мкм. Из рис. 1 и 2 видно, что в области углеродного окна ($\lambda \sim 4.5$ нм) существенно повышается прозрачность многих биологических соединений (жиров, белков, хроматина), а также парафина, используемого в качестве среды для хранения биологических блоков при гистологической обработке. Отметим, что пропускание воды в углеродном окне остается достаточно высоким ($\sim 20\%$), что сохраняет возможность исследования влажных биологических тканей.

Таким образом, МР микроскопия в углеродном окне является методом исследования «толстых» (до 30 мкм) углеродсодержащих материалов, позволяющим дифференциально различать органические структуры. Сочетание созданных ранее рентгенооптических систем норма-

льного падения [8–10] с высокоотражающей многослойной оптикой на длине волны ~ 4.5 нм [11] может стать основой рентгеновских микроскопов следующего поколения, предназначенных для решения новых задач в биологии и медицине.

Авторы благодарны Б.А.Брюнеткину, Ю.А.Успенскому и Р.М.Фещенко за обсуждение работы.

1. Malozzi P.J., Epstein H.M., Jung R.G., Applebaum D.C., Fairand B.P., Gallagher W.J., Uecker R.L., Muckerheide M.C. *J. Appl. Phys.*, **45**, 1891 (1974).
2. Ананьин О.Б., Быковский Ю.А., Канцырев В.Л., Козырев Ю.П. *Письма в ЖТФ*, **1**, 366 (1975).
3. Schmahl G., Rudolph D. (Eds). *X-ray Microscopy* (Berlin: Springer-Verlag, 1984).
4. Michette A.G. *Optical Systems for Soft X Rays* (New York: Plenum Press, 1986).
5. Attwood D. *Soft X-Rays & Extreme Ultraviolet Radiation: Principles & Applications* (Cambridge: Cambridge University Press, 1999).
6. Maser J., Osanna A., Wang Y., Jacobsen C., Kirz J., Spector S., Winn B., Tennant D. *J. of Microscopy*, **197**, 68 (2000).
7. Henke B.L., Gullikson E.M., Davis J.C. *Atomic Data and Nucl. Data Tables*, **54**, 181 (1993).
8. Artyukov I.A., Fedorenko A.I., Kondratenko V.V., Yulin S.A., Vinogradov A.V. *Opt. Commun.*, **102**, 401 (1993).
9. Artioukov I.A., Vinogradov A.V., Asadchikov V.E., Kas'yanov Yu.S., Serov R.V., Fedorenko A.I., Kondratenko V.V., Yulin S.A. *Opt. Lett.*, **20**, 2451 (1995).
10. Артюков И.А., Асадчиков В.Е., Виноградов А.В., Касьянов Ю.С., Кондратенко В.В., Серов Р.В., Федоренко А.И., Юлин С.А. *Квантовая электроника*, **22**, 951 (1995).
11. *Рентгеновская оптика-2004. Материалы совещания* (Н.Новгород: изд-е Института физики микроструктур РАН, 2004, с.98).