

О рентгеновском контрасте биологической наномикроскопии

И.А.Артюков, А.В.Виноградов, Н.Л.Попов

С целью проведения наномикроскопических исследований проанализирован абсорбционный контраст гистологических и цитологических препаратов при использовании монохроматического излучения в спектральной области 90 – 600 эВ (14 – 2 нм). Рассмотрены два типа биологических объектов: необработанные и фиксированные в парафине, и определены оптимальные длины волн при изучении образцов толщиной 0.5 – 10 мкм с пространственным разрешением 100 – 20 нм. С учётом эффективности рентгеновской оптики дана оценка числа фотонов источника, которое требуется для получения одного изображения. Показано, что наибольший интерес для исследования фиксированных объектов представляет спектральная область 7 – 14 нм, в которой на основе быстро развивающихся компактных источников некогерентного и когерентного излучения и эффективной оптики могут быть созданы микроскопы для научных и клинических исследований.

Ключевые слова: наномикроскопия, спектральный диапазон 2 – 14 нм, биологический объект, экспозиционная доза.

1. Введение

За последние два десятилетия рентгеновская микроскопия продемонстрировала впечатляющий прогресс благодаря развитию отражающих и дифракционных рентгенооптических элементов. Пространственное разрешение увеличилось по крайней мере в 100 раз и составляет порядка 10 нм во всём диапазоне от 100 эВ до 10 кэВ [1]. Эти рекордные результаты получены на самых совершенных перестраиваемых источниках рентгеновского излучения – синхротронах третьего поколения, число которых не достигает двух десятков [2]. Одновременно появились серийные рентгеновские микроскопы, позволяющие вести исследования наноматериалов с пространственным разрешением до 50 нм [3, 4], однако работать они могут на одной длине волны или на небольшом числе длин волн, ограниченном возможностями рентгеновских трубок. В связи с этим одной из самых актуальных задач, как и прежде, остаётся развитие компактных, желательнее перестраиваемых источников излучения, доступных небольшим лабораториям и научным группам, для которых тем самым откроется возможность воспользоваться достижениями рентгеновской оптики, а также методами микроскопии, разработанными и опробованными на синхротронах третьего поколения [5, 6]. Выполнение этой задачи является одной из практических целей совершенствования лабораторных рентгеновских лазеров, генераторов коротковолновых гармоник ИК лазеров, некогерентных лазерно-плазменных рентгеновских источников и томсоновских лазерно-электронных генераторов [7].

В настоящей работе рассматривается спектральный диапазон 90 – 600 эВ, в котором уже имеется и используется ряд компактных источников рентгеновского излучения. Более того, это область резкого изменения сечения фотопоглощения живого вещества. В частности, в ней находятся скачки фотопоглощения элементов O, C, N и S, входящих в состав основных аминокислот и других биологических материалов. Наиболее удобным для микроскопии в этой области спектра считается диапазон водяного окна – спектральный интервал между скачками фотопоглощения кислорода и углерода (284 – 543 эВ). В нём обеспечивается наибольшая разность фотопоглощения этих элементов, т. е. наибольший контраст изображения биологических молекул, содержащих, в основном, углерод, на фоне воды, составляющей основу живой ткани [8, 9]. Причём в отличие от других современных методов гистологического анализа необходимый для исследования образца контраст в рентгеновской микроскопии достигается без использования специальных красителей и контрастирующих веществ за счёт резонансного спектра фотопоглощения.

В работе [10] для исследования обезвоженных и фиксированных в парафине образцов было предложено использовать углеродное окно, примыкающее к водяному окну со стороны низких энергий. Несмотря на уменьшение контраста биологических молекул в этом случае, использование более мягкого, чем водяное окно, спектрального диапазона представляет интерес благодаря упомянутому выше быстрому развитию монохроматических когерентных и некогерентных источников монохроматического излучения. При этом следует иметь в виду два обстоятельства. С одной стороны, постоянно расширяется число длин волн, освоенных компактными монохроматическими источниками (лабораторные лазеры, генераторы гармоник, лазерная плазма) с энергией кванта вплоть до 100 эВ. С другой стороны, дальнейшее продвижение в коротковолновый диапазон наталкивается на значительные трудности.

И.А.Артюков, А.В.Виноградов, Н.Л.Попов. Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 53; e-mail: iart@sci.lebedev.ru, vinograd@sci.lebedev.ru, npopov@mail.ru

Поступила в редакцию 18 июня 2017 г.

В настоящей работе мы исследуем в диапазоне 90 – 600 эВ контраст биологических объектов, фиксированных с целью сохранения пространственной структуры. Фиксация достигается путём обезвоживания и замены воды на парафин [11]. Цель исследования – установить наиболее благоприятные длины волн источников для микроскопии фиксированных в парафине биологических объектов, а также оценить число рентгеновских фотонов источника, необходимое для получения одного изображения.

2. Модель для определения пространственного разрешения и экспозиционной дозы

Пусть биообъект с характерным размером δ заключён в слое фиксирующего материала толщиной L (рис.1). Качество изображения, получаемого в монохроматическом пучке, характеризуется величиной контрастного отношения CNR. Оно равно отношению средней разности числа фотонов в пучках, прошедших через слой, минуя

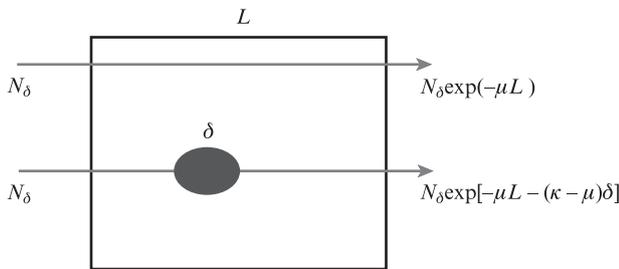


Рис.1. Биообъект с характерным размером δ в слое фиксирующего материала толщиной L (остальные обозначения см. в тексте).

объект и через него, к корню из дисперсии этой разности. Полагая, что число падающих на образец фотонов подчиняется пуассоновской статистике, находим:

$$CNR = \frac{N_\delta \exp(-\mu L) - N_\delta \exp[-\mu L - (\kappa - \mu)\delta]}{\sqrt{N_\delta \exp(-\mu L) + N_\delta \exp[-\mu L - (\kappa - \mu)\delta]}} = \sqrt{N_\delta \exp(-\mu L)} \frac{1 - \exp[-(\kappa - \mu)\delta]}{\sqrt{1 + \exp[-(\kappa - \mu)\delta]}} \quad (1)$$

где N_δ – число фотонов, падающих на площадку δ на поверхности образца, а $\kappa(\lambda)$ и $\mu(\lambda)$ – коэффициенты поглощения обезвоженного объекта и фиксирующего материала, зависящие от длины волны источника λ . Для них мы будем использовать значения, приведённые в [12, 13].

Из (1) следует требование на полное число фотонов $N = M^2 N_\delta$, необходимое для получения одного изображения, содержащего M^2 пикселей, т.е., по существу, условие на энергетику источника:

$$N \geq [(CNR)^2 M^2 \exp(\mu L) \frac{1 + \exp[-(\kappa - \mu)\delta]}{\{1 - \exp[-(\kappa - \mu)\delta]\}^2}] \quad (2)$$

Формула (1), строго говоря, справедлива лишь для идеального приёмника излучения, поэтому при переходе от (1) к (2) появился знак \geq .

Соотношение (2) выражает условие получения изображений в микроскопии при использовании абсорбционного контраста. Оно связывает полное число фотонов с пространственным разрешением и имеет простой смысл. Первый множитель даёт нижнюю оценку для N и соответствует полному поглощению в исследуемом объекте $(\kappa - \mu)\delta \gg 1$. Эта оптимистическая оценка определяется только пропусканием фиксирующего материала и числом пикселей.

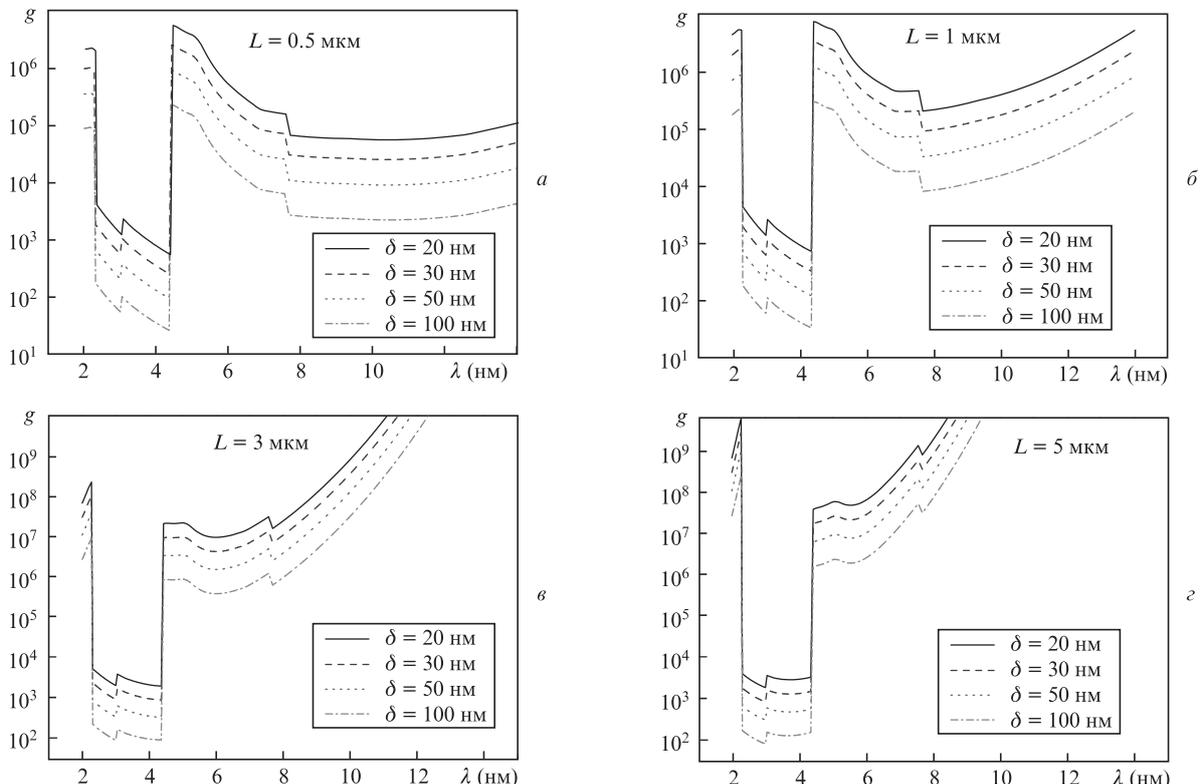


Рис.2. Зависимость величины g от длины волны для белковых структур в воде при толщине среза $L = 0.5$ (а), 1 (б), 3 (в) и 5 мкм (г) и различном пространственном разрешении.

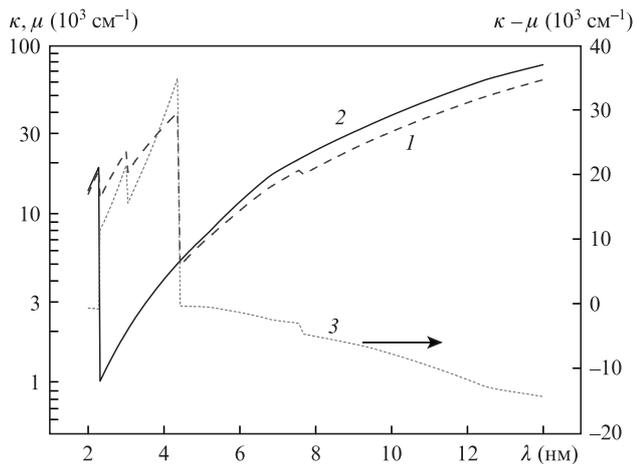


Рис.3. Спектральные зависимости коэффициентов поглощения белка (1) и воды (2), а также их разности (3) от длины волны.

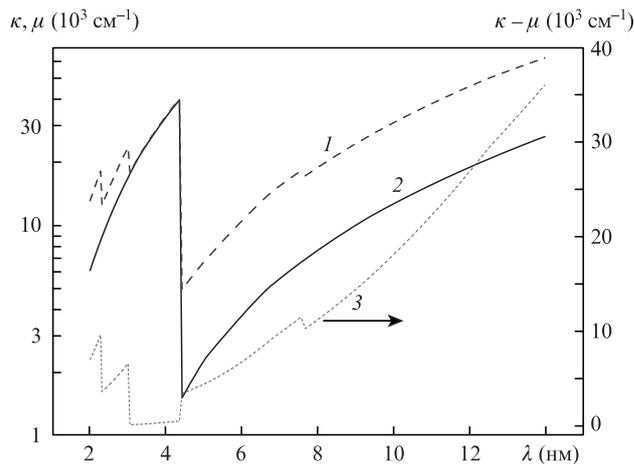


Рис.5. Спектральные зависимости коэффициентов поглощения белка (1) и парафина (2), а также их разности (3) от длины волны.

Второй множитель показывает, во сколько раз возрастает требуемое число фотонов N из-за неполного поглощения в объекте. Соотношение (2) поясняет также смысл величины $(\text{CNR})^2$ – это число фотонов, требующееся для регистрации одного ($M = 1$) элемента δ при полном поглощении ($(\kappa - \mu)\delta \gg 1$) и отсутствии фона ($\mu L \ll 1$).

Для анализа условия получения изображения (2) при различных длинах волн удобно записать его в виде $N = Gg$, где

$$G = (\text{CNR})^2 M^2, \tag{3}$$

$$g(\kappa, \mu, L, \delta) = \exp(\mu L) \frac{1 + \exp[-(\kappa - \mu)\delta]}{\{1 - \exp[-(\kappa - \mu)\delta]\}^2}.$$

Величина $g(\kappa, \mu, L, \delta)$ определяет зависимость N как от оптических свойств, так и от геометрии образца.

На рис.2 показаны значения $g(\kappa, \mu, L, \delta)$ для белковых структур, фиксированных в H_2O , при пространственном разрешении $\delta = 20, 30, 50$ и 100 нм и толщинах образца $L = 0.5, 1, 3$ и 5 мкм. Коэффициент поглощения белка определялся из значения средней плотности 1.35 г/см^3 [14] при весовых долях элементов H, C, N, O и S, приведённых в [12] (с.371). Соответствующие кривые $\mu(\lambda)$ и $\kappa(\lambda)$ для воды и белка приведены на рис.3.

На рис.4 и 5 приведены аналогичные данные для тех же белковых структур, фиксированных в парафине $\text{C}_{20}\text{H}_{42}$, с плотностью 0.9 г/см^3 .

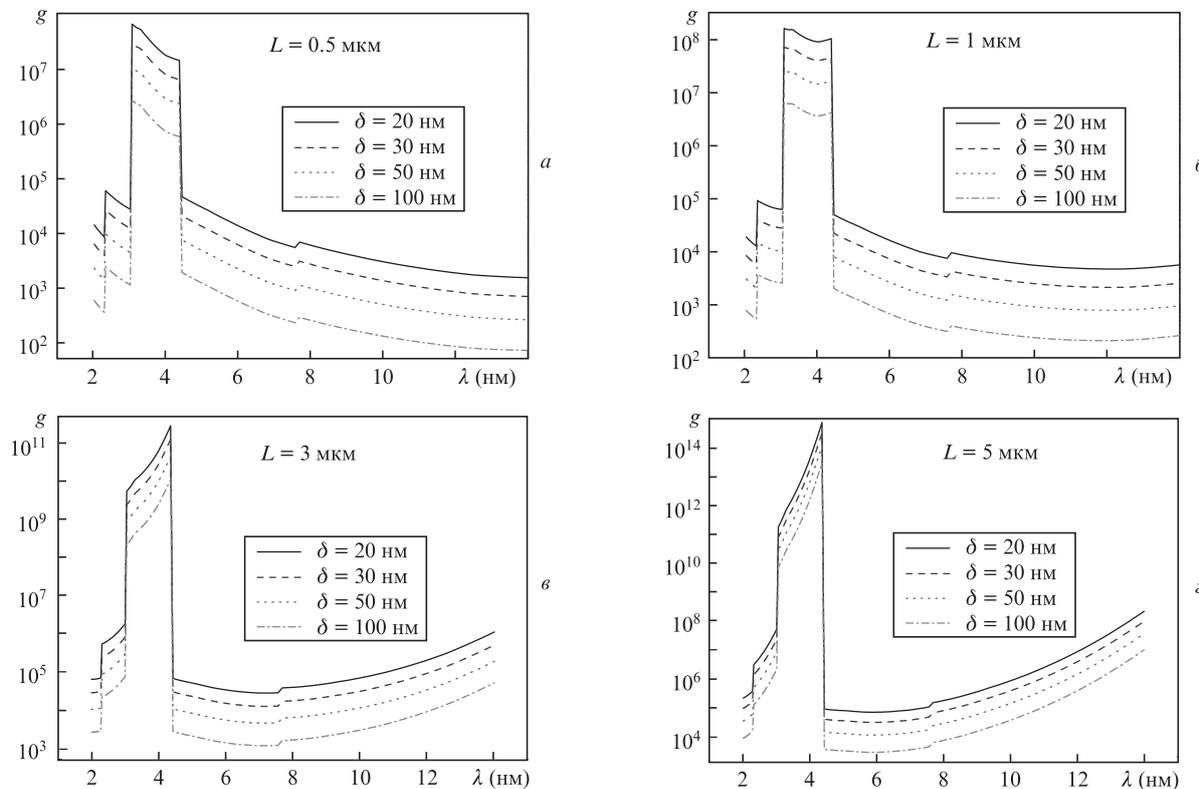


Рис.4. Зависимость величины g от длины волны для белковых структур в парафине при толщине среза $L = 0.5$ (а), 1 (б), 3 (в) и 5 мкм (г) и различном пространственном разрешении.

Табл.1. Оптимальные диапазоны длин волн λ и числа фотонов N , требующиеся для получения одного изображения биологического объекта, фиксированного в парафине, с пространственным разрешением $\delta = 50$ нм (см. (3) и рис.2, 4).

Толщина среза L (мкм)	Параметр			
	λ (нм)	G	g	N
0.5	7–14	3.6×10^7	$10^3 - 3 \times 10^2$	$3.6 \times 10^{10} - 10^{10}$
1	7–14	3.6×10^7	$2 \times 10^3 - 10^3$	$7.2 \times 10^{10} - 3.6 \times 10^{10}$
3	5–10	3.6×10^7	$4 \times 10^3 - 10^4$	$1.5 \times 10^{11} - 3.6 \times 10^{11}$
5	4.4–10	3.6×10^7	$10^4 - 10^5$	$3.6 \times 10^{11} - 3.6 \times 10^{12}$

3. Обсуждение результатов расчёта

Результаты, приведённые на рис.2 и 4, позволяют установить требования к монохроматическим источникам излучения в диапазоне длин волн 2 – 14 нм для применений в диагностике биологических структур, фиксированных в парафине, с пространственным разрешением 100 – 20 нм при толщине среза 10 – 0.5 мкм. Отметим, что указанные параметры не достижимы одновременно как для оптической, так и для электронной микроскопии.

Табл.1 демонстрирует пример использования данных рис. 4 для биологического объекта, фиксированного в парафине. В ней приведены оптимальные для микроскопии диапазоны длин волн λ , в которых число фотонов N , необходимое для получения одного изображения с пространственным разрешением $\delta = 50$ нм, минимально. При вычислении G согласно (3) число пикселей полагалось равным 1.6×10^5 , а контрастное отношение $CNR = 15$.

До сих пор мы не учитывали наличие увеличивающей изображение оптики. Её роль – согласовать поперечное разрешение, которое мы также полагаем равным δ , с размером пикселя. Принимая во внимание, что эффективность зонных пластинок около 10% (см. [15]), это даст дополнительный фактор не более 10^2 . Таким образом, для получения одного изображения полная энергия источника на поверхности образцов различной толщины (табл.1) лежит в диапазоне 0.02 – 10 мДж.

4. Выводы

1. Для получения изображений биологических срезов в парафине толщиной 0.5 – 3 мкм с разрешением 50 нм следует использовать монохроматические источники излучения в диапазоне длин волн 7 – 14 нм. Число фотонов, необходимое для получения одного изображения, не превышает $3.6 \times 10^{12} - 3.6 \times 10^{13}$. При энергии фотона 100 эВ это соответствует полной энергии источника на образце

от 60 до 600 мкДж, что может быть обеспечено как излучением лазерной плазмы, так и лабораторными рентгеновскими лазерами [16]. Подобные параметры – пространственное разрешение и толщина объектов – одновременно не могут быть достигнуты методами оптической и электронной микроскопии.

2. Результаты расчётов, проведённых в работе, подтверждают целесообразность разработки компактных и доступных рентгеновских источников в спектральном диапазоне от углеродного скачка фотопоглощения (4.4–14 нм) для микроскопии биообъектов, фиксированных в парафине. При этом следует иметь в виду широкое распространение «парафиновой» технологии фиксации в биологии и медицине – как в научных исследованиях, так и на практике, а также резкое уменьшение контраста подобных объектов при переходе в спектральную область водяного окна.

Авторы благодарны Д.Атвуду, К.Менони и Дж.Рокке за обсуждение работы. Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные и прикладные проблемы фотоники и физика новых оптических материалов».

1. Attwood D., Sakdinawat A. *X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications* (Cambridge: Cambridge University Press, 2017).
2. Watanabe M., Sato S., Munro I., Lodha G.S. *A Guide to Synchrotron Radiation Science* (New Deli, Chennai, Mumbai, Kolkata: Narosa, 2016).
3. Epting W.K., Gelb J., Litster S. *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 555 (2011).
4. <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/x-ray-microscopy/xradia-810-ultra.html>.
5. Sakdinawat A., Attwood D. *Nat. Photonics*, **4**, 840 (2010).
6. Jacobsen C. *AIP Conf. Proc.*, **1696**, 020035 (2016).
7. Assoufid L., Arp U., Naulleau P., Biedron S., Graves W. *Opt. Photonics News*, **26**, 40 (2015).
8. Schmahl G., Rudolph D. *X-ray Microscopy* (Berlin: Springer-Verlag, 1984, Springer Series in Optical Sciences, Vol. 43).
9. Michette A.G. *Optical Systems for Soft X Rays* (New York: Plenum Press, 1986).
10. Артюков И.А., Виноградов А.В., Касьянов Ю.С., Савельев С.В. *Квантовая электроника*, **34** (8), 691 (2004) [*Quantum Electron.*, **34** (8), 691 (2004)].
11. Макги Дж. О'Д., Херриет Э.Р., Гаттер К.С. и др. *Молекулярная клиническая диагностика. Методы* (М.: Мир, 1999).
12. Attwood D. *Soft X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications* (Cambridge: Cambridge University Press, 1999).
13. http://henke.lbl.gov/optical_constants/
14. Fischer H., Polikarpov I., Craievich A.F. *Protein Sci.*, **13** (10), 2825 (2004).
15. <https://www.appliednt.com/x-ray-zone-plates/3П>.
16. Rocca J.J. et al. *SPIE Optics + Optoelectronics* (Prague, 2017).