УДК 533.9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАЗМЕННОГО ЭЛЕКТРОРАЗРЯДНОГО ИСТОЧНИКА МЯГКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ МИКРОРЕНТГЕНОГРАФИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В. А. Веретенников, А. Е. Гурей, К. Т. Караев, В. Е. Левашов, Т. А. Никольская, О. Г. Семенов, А. А. Тихомиров

Разработаны схема контактной рентгеновской микроскопии и методы размещения объектов на поверхности полимерного детектора изображений (резист), экспонирования и последующего их удаления без повреждения резиста. Получены изображения внутренней структуры асцитных клеток мыши, а также лимфоцитов крови человека и кролика с пространственным разрешением $\sim 0,1$ *мкм.*

Использование рентгеновского излучения [1] в микроскопии биологических объектов позволяет существенно повысить разрешение по сравнению с оптическим микроскопом. Взаимодействие мягкого рентгеновского излучения (МРИ) с веществом сильно зависит от атомного номера элементов, входящих в его состав, и спектрального состава МРИ, что обеспечивает возможность образования естественного контраста в определенных спектральных областях вследствие избирательного поглощения. Возможно получение изображений мутных и непрозрачных в оптическом диапазоне объектов. С другой стороны, ограничения электронной микроскопии биообъектов принципиальны и обусловлены характером взаимодействия электронов с веществом: биообъекты необходимо специально подготавливать – делать срезы, обезвоживать, покрывать металлом для контрастирования, размещать в высоком вакууме.

Для рентгеновской микроскопии целесообразно использовать излучение в области 2,3 – 4,4 *нм* между краями поглощения углерода и кислорода, где обеспечивается высокий

естественный контраст между белками и водой [1], причем весьма важно использовать импульсный источник МРИ ($\tau \ll 10^{-6}\,с$), позволяющий получить мгновенные рентгенограммы живых биологических микрообъектов.

Настоящая работа посвящена исследованию возможности использования для рентгеновской микроскопии микропинчевого (электроразрядного) источника, в котором излучающим объектом является плотная ($n_e \geq 10^{21}\,см^{-3}$), высокотемпературная ($T_e \sim 1\,кэВ$) плазма с характерным размером $\leq 100\,мкм$, образующаяся в результате сильного локального сжатия разряда в металлических парах электродов. На базе микропинчевого разряда в ФИАН разработан излучатель МРИ для практических применений ИРМ-1, имеющий следующие основные физико-технические данные:

КПД преобразования электрической энергии батареи в рентгеновское излучение, %	≥ 2
Энергия излучения, $Дж/имп$:	
в диапазоне $1 < \lambda < 2\,нм$	10
в диапазоне $1 < \lambda < 10\,нм$	25
Длительность импульса, $с$	$\leq 10^{-7}$
Частота следования импульсов	от однократного до $10\,имп/сек$
Угловое распределение излучения	изотропное
Эффективный размер источника в серии, $мм$	≤ 1
Потребляемая мощность, $кВт$	15
Питание, $В$	380 (трехфазное)
Габариты, $м^3$	1,6 x 0,8 x 1,6

В схеме так называемой контактной микроскопии при расстоянии 30 $см$ между излучающей плазмой и детектором и размещении биообъекта на расстоянии 10 – 30 $мкм$ от поверхности детектора достигается разрешение $\sim 0,1\,мкм$, причем плотность энергии на детекторе составляет $\sim 2\,МДж/см^2$ за один импульс, что достаточно для экспонирования специальных полимерных детекторов, чувствительных к рентгеновскому излучению и обеспечивающих достаточно высокое пространственное разрешение $\sim 0,1\,мкм$.

Источник компактен, высокоэффективен, не требует редких или дефицитных материалов, прост в эксплуатации, радиационно безопасен. Благодаря высокой импульсной яркости, использование микропинчевого источника МРИ позволяет развить методы

рентгеновской микроскопии биологических и медицинских объектов (клеток, срезов органов) с субмикронным разрешением без предварительной обработки (окрашивание, сушка и т.д.) и существенно сократить время получения информации по сравнению с традиционными методами микроскопии.

Для проведения предварительных экспериментов в качестве детектора использовался стандартный электронный резист ЭЛН-200 чувствительностью 50 $МДж/см^2$ при толщине 0,5 – 0,7 *мкм* [2]. При этом экспонирование производилось за несколько десятков импульсов, что не позволяло получать рентгенограммы живых (движущихся) микрообъектов, но дало возможность провести все необходимые испытания метода на зафиксированных микрообъектах.

Основными достоинствами контактной схемы являются высокая разрешающая способность (до 0,1 *мкм*), большая глубина резкости (десятки *мкм*), нечувствительность к частицам пыли на поверхности резиста, высокий естественный контраст, простота получения изображений и подготовки образцов.

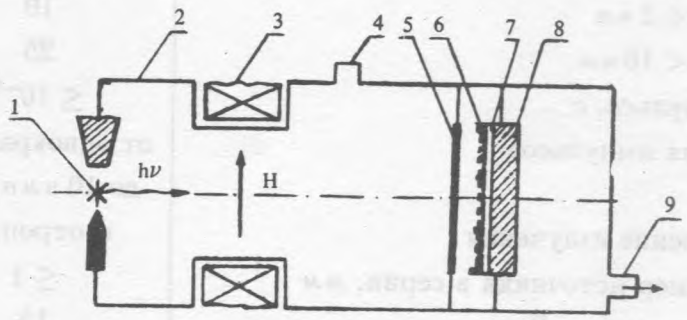

Рис. 1. *Схема эксперимента по рентгеновской микроскопии биологических объектов. 1 – источник МРИ, 2 – камера экспонирования биообъектов, 3 – постоянные магниты (H = 4 Тл), 4 – дифференциальная откачка, 5 – набор сменных фильтров, 6 – биообъект, 7 – резист, 8 – подложка, 9 – напуск воздуха.*

Схема эксперимента представлена на рис. 1. Камера экспонирования биообъектов с помощью фланцевого соединения пристыковывались к разрядной камере [3]. Образцы для экспонирования приготовлялись следующим образом. Раствор резиста в хлорбензоле наносился на вращающуюся стеклянную подложку. После образования пленки (0,5 *мкм*) резист высушивался. Для получения резких изображений изучаемый объект располагался возможно ближе к резисту. (При наличии зазора между резистом и объектом величина размытия оценивается как $\delta \times \varphi$, где φ – угловой размер источника, который составлял примерно 0,01.) Затем приготовленный образец экспонировался в течение 50

– 100 разрядов. Поверхность резиста с объектом защищалась от разлетающейся плазмы полиамидным фильтром толщиной 0,5 *мкм* прозрачным для области (10 – 100) Å. После облучения изучаемый объект удалялся с резиста и резист травился в специальном растворе. Из-за разной оптической плотности изучаемого объекта различные участки резиста поглощали различные дозы излучения. В результате того, что слабо облученные участки резиста лучше растворяются при травлении, на поверхности резиста образовывался рельеф, в котором впадины соответствуют более оптически плотным участкам объекта. Этот рельеф исследовался с помощью электронного сканирующего микроскопа.

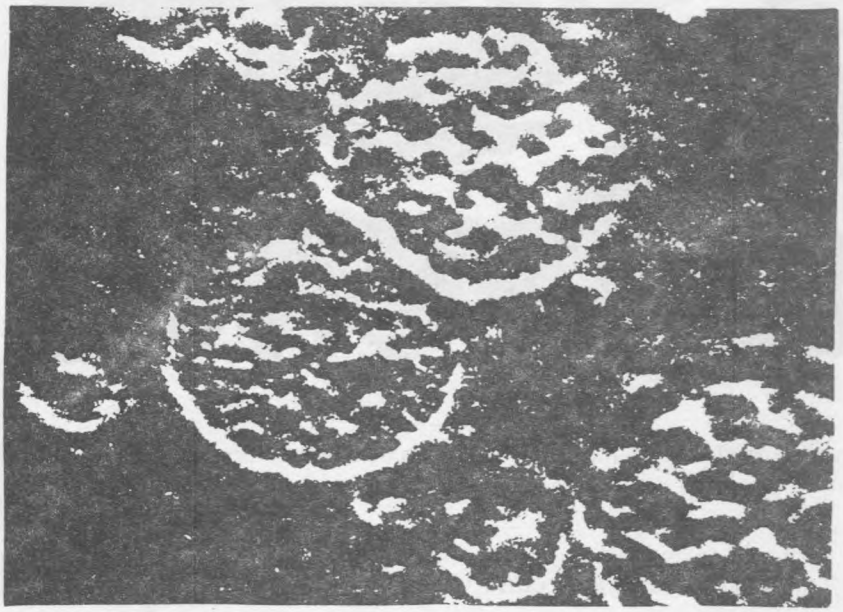

Рис. 2. *Изображение асцитной клетки и эритроцитов мыши (мазок).*

При отработке методики получения изображения мы использовали два способа нанесения объекта на резист. Вначале для проведения экспериментов мы брали хорошо изученные и крупные по размерам (10×20 *мкм*) асцитные клетки мыши. На резист наносилась жидкость, содержащая эти клетки (мазок). После высыхания образец экспонировался, а затем перед травлением эти клетки смывались с поверхности резиста раствором ПАВ в воде. Пример получившихся отпечатков асцитных клеток показан на рис. 2. Здесь видны 2 типа клеток. Один – более гладкие, другие – с рельефом. Изучение большого числа клеток на разных образцах дает основание полагать, что

медных сеточек, используемых в электронной микроскопии, с нанесенными на них срезами клеток, 2) непосредственное помещение на резист срезов толщиной 0,7 – 0,8 *мкм*, которые можно снять с резиста без его повреждения. Рентгенограмма отдельной клетки лимфоцита крови человека показана с большим увеличением на рис. 3 (фотография N 3454). По-видимому, рельеф, полученный на резисте, отражает рентгенооптическую плотность хроматина ядер лимфоцитов. Наиболее плотными оказались центральные участки ядер. В дальнейшем мы предполагаем провести эксперименты, которые позволили бы выяснить, реализуется ли разрешающая способность резиста при используемой технологии травления и связана ли сглаженность получающихся отпечатков с наблюдаемыми объектами.

Подводя итоги, отметим, что рассмотренный метод и полученные МР изображения могут оказаться важными для рядя биологических задач: для изучения высших уровней организации хроматина интерфазных ядер и отдельных хромосом, для оценки структурных и элементных нарушений в эритроцитах при разных патологиях красной крови. Особый интерес представляет применение МР микроскопии для изучения влажных и живых объектов, однако конструирование объектных камер для живых объектов представляет отдельную задачу. В то же время, МР микроскопия представляет собой единственный в своем роде метод, который позволит изучать живые биологические объекты на уровне субклеточных структур.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Рентгеновская оптика и микроскопия. М., Мир, 1987, стр. 350 – 382.

[2] Веретенников В. А., Леонов Ю. С., Мишачев В. И., Семенов О. Г., Письма в ЖТФ, **11**, 19, 1200 (1985).

[3] Веретенников В. А., Полухин С. Н., Семенов О. Г., Сидельников Ю. В., Физика плазмы, **7**, 1199 (1981).

Поступила в редакцию 24 мая 1994 г.