

Корреляционная экстремальная ультрафиолетовая, ультрафиолетовая и оптическая микроскопия на базе зеркального микроскопа с аксиальной томографией

© И.В. Малышев,¹ Д.Г. Реунов,¹ Н.И. Чхало,¹ М.Н. Торопов,¹ А.Е. Пестов,¹ В.Н. Полковников,¹
А.К. Чернышев,¹ Р.С. Плешков,¹ Е.П. Казаков,^{2,3} С.В. Лаврушкина,² С.А. Голышев,²
А.Д. Поспелов,⁴ О.М. Широкова⁵

¹ Институт физики микроструктур РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия

² Научно-исследовательский институт Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия

³ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
110234 Москва, Россия

⁴ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603022 Нижний Новгород, Россия

⁵ Приволжский исследовательский медицинский университет,
603005 Нижний Новгород, Россия
e-mail: reuov_dima@ipmras.ru

Поступило в Редакцию 6 мая 2024 г.

В окончательной редакции 6 мая 2024 г.

Принято к публикации 6 мая 2024 г.

Рассмотрено применение зеркального экстремального ультрафиолетового микроскопа с 46-кратным разрешением до 140 nm для исследования образцов на трех длинах волн: 13.84, 200 и 535 nm. Возможность видеть одну область образца на разных длинах волн дает дополнительную информацию о его структуре. Выбор длины волны происходит за счет смены источников: светодиод или газовый лазерно-плазменный источник, а также ввода–вывода многослойного фильтра, отсекающего все, кроме 13.84 nm. Для трехмерной реконструкции проведено сканирование образца вдоль оптической оси на пьезоактуаторе. При реконструкции изображений по томографическим данным использована функция рассеяния точки, смоделированной на основе измеренных на интерферометре аберраций.

Ключевые слова: экстремальная ультрафиолетовая микроскопия, ультрафиолетовая микроскопия, аксиальная томография, электронная микроскопия, мягкая рентгеновская микроскопия.

DOI: 10.61011/JTF.2024.08.58558.156-24

Введение

Для детального изучения клеток в современной биологии и медицине требуется получать их изображение с нанометровым разрешением [1]. Оптическая микроскопия, работающая в видимом свете, не позволяет напрямую исследовать наноструктуру живых клеток с деталями менее 200 nm из-за дифракционного размытия [2]. Различные методы повышения разрешения оптической микроскопии за счет окрашивания органелл или белков [3] позволяют обойти дифракционный предел и добиться разрешения на уровне десятков нанометров. Однако окрашивание органелл в отрыве от окружения затрудняет понимание протекающих в клетках процессов.

Электронная микроскопия обладает высоким, вплоть до нанометров, пространственным разрешением [4]. Однако для проведения таких исследований образцы необходимо фиксировать химически или замораживанием и изготавливать срезы толщиной 100–500 nm, т. е. данный

метод является разрушающим и не может быть применен для изучения живых клеток [5]. Атомно-силовая и сканирующая туннельная микроскопия позволяют изучать лишь поверхность образцов.

С другой стороны, уже более тридцати лет развивается мягкая рентгеновская микроскопия (МР-микроскопия) в спектральной области „окна прозрачности воды“, длины волн 2.3–4.4 nm [6–10], „окна прозрачности углерода, длины волн 4.5–6 nm“ [11], а также в экстремальной ультрафиолетовой (ЭУФ) области на длинах волн 13.4–13.8 nm [12–16]. Основными преимуществами этого метода в „водном окне“ являются следующее:

- малая длина волны в дифракционном пределе обеспечивает нанометровое пространственное разрешение;
- естественный абсорбционный контраст (на порядок величины и более) между углеродсодержащими структурами и водой позволяет исследовать образцы без использования контрастирующих и/или флуоресцирующих веществ;

- относительно высокое пропускание и практически отсутствующее рассеяние излучения позволяет исследовать клетки и срезы тканей толщиной до 10–15 μm в их нативном, потенциально — в живом, состоянии;

- существенно упрощается пробоподготовка образцов по сравнению с существующими методами наноскопии.

Получены 3D-изображения замороженных клеток толщиной до 10–15 μm с объемным разрешением до 60 nm с синхротронными источниками [17–19] и до 100 nm — с лабораторными лазерно-плазменными источниками [20–22].

В ЭУФ диапазоне микроскопы также активно развиваются. С их помощью получают 2D-изображения высушенных клеток, а также масок для ЭУФ литографов [12,13]. Например, в [14] получено изображение кремниевой клетки *Chrisodidymus* с латеральным разрешением около 50 nm. В [15] получено изображение клеток фибробластов CT26 и диатомовых водорослей с латеральным разрешением около 100 nm. В [16] изучено строение среза мозга мыши с разрешением около 200 nm. В [23] получены изображения суперскрученной плазмидной ДНК.

На данный момент мягкая рентгеновская (МР) микроскопия проникает и укрепляет свои позиции в арсенале биологии и медицины. В [24] проводится анализ содержания гемоглобина на разных стадиях в эритроцитах, инфицированных малярийным плазмодием. В [20] изучаются В-клетки иммунной системы человека. В [25] изучается, как вирус SARS-CoV-2 влияет на клетки человека: сразу после заражения, затем через 6 h и через 24 h, при этом клетки химически фиксируются и замораживаются на разных стадиях развития вируса [26], чтобы они выдержали дозу 10^7 – 10^8 Gy.

Латеральное разрешение МР микроскопов может достигать 7–10 nm [27–29], при этом объемное разрешение, как показано выше, в несколько раз хуже. Основным фактором, ограничивающим 3D-разрешение в МР микроскопах на зонных пластинках Френеля, является большая глубина фокуса, которая вынуждает для восстановления объемного строения образцов использовать технически сложную угловую томографию. Ограниченное число угловых проекций (из-за увеличивающегося пути лучей через образец при скользких углах освещения, приводящее к ослаблению сигнала), а также децентровка образца при угловом сканировании также влияют на 3D-разрешение [20,25].

Использование вместо зонных пластинок Френеля многослойных рентгеновских зеркал нормального падения позволяет повысить числовую апертуру проекционных объективов. В этом случае глубина фокуса DOF (depth of focus) может быть уменьшена на порядок и для $NA = 0.3$, и длины волны $\lambda = 3$ nm составит

$$DOF \approx \lambda/NA^2 = 33 \text{ nm}. \quad (1)$$

С практической точки зрения это означает, что срез образца толщиной ± 33 nm даст наибольший вклад в формируемое изображение на детекторе. Поэтому, как

и в случае конфокальной микроскопии, можно перейти от угловой к z -томографии и восстановлению 3D-структуры по серии проекций вдоль оси образца [30].

При этом латеральное разрешение для некогерентного освещения δx составит

$$\delta x = 0.61\lambda/NA = 6 \text{ nm}, \quad (2)$$

что все еще существенно лучше, чем продольное разрешение. Однако и эта проблема z -томографии в дальнейшем может быть решена за счет z -съемки при двух-трех углах.

Главным препятствием на пути развития светосильной мягкой рентгеновской микроскопии на основе многослойных зеркал нормального падения являются сверхвысокие требования к шероховатости и точности формы подложек для зеркал. Согласно критерию Марешаля, для обеспечения дифракционного качества изображений СКО aberrаций проекционного объектива не должно превышать $\lambda/14$. В „водном окне“ это соответствует примерно 0.2 nm. Как показывают наши расчеты и практика, за счет учета функции рассеяния точки, восстановленной по данным измеренных aberrаций объектива, дифракционное качество изображения можно получить и при aberrациях на уровне $\lambda/4$, т.е. до 0.8 nm для длины волны 3.37 nm из „окна прозрачности воды“ и 1.1–1.5 nm для длины волны 4.5–6 nm из „окна прозрачности углерода“.

В настоящее время, прежде всего благодаря развитию ЭУФ литографии, имеется существенный прогресс в технологии изготовления высокоточных зеркал, в частности в компании ZEISS достигнуты точности изготовления подложек на уровне СКО = 0.1–0.2 nm [31]. Результаты авторов уступают этим результатам и составляют величину СКО на уровне 0.6–0.8 nm [32], что тем не менее достаточно для создания высокоразрешающего объектива для микроскопа. Данные о развитых методах изготовления и характеристики высокоточных подложек можно найти в [33], о ионно-пучковой асферизации и коррекции формы оптических подложек для зеркал — в [34]. Этот результат позволил нам изготовить и запустить в работу микроскоп на длину волны 13.84 nm с 46-кратным увеличением и изучить его разрешающую способность [35]. В настоящей работе кратко описывается микроскоп и приводятся результаты исследования образцов на трех длинах волн — 13.84, 200 и 535 nm. Корреляционный анализ изображений на разных длинах волн дает новую информацию об объекте.

1. Принцип работы микроскопа

В 2021 г. в ИФМ РАН создан лабораторный микроскоп с рабочей длиной волны 13.84 nm и увеличением $\times 46$ для исследования биологических образцов, в котором в качестве изображающей оптики используется объектив Шварцшильда [35]. Разработана методика аксиальной томографии, позволяющая исследовать объемное

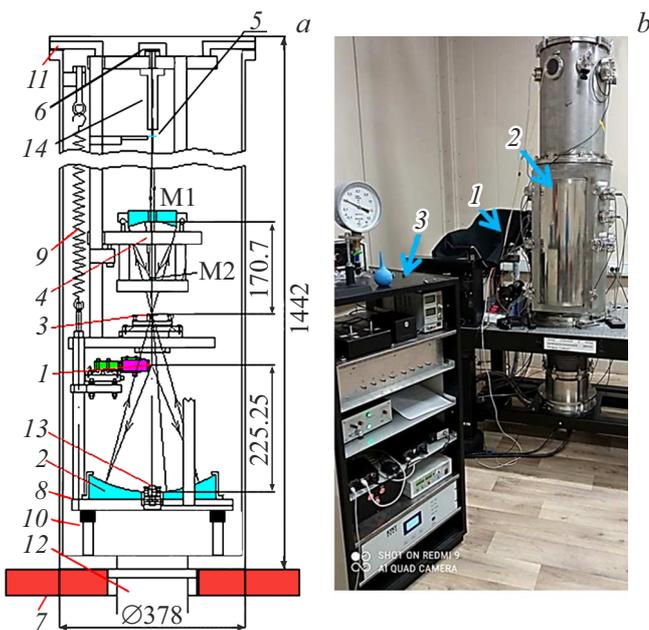


Рис. 1. *a* — схема микроскопа: 1 — источник (лазерно-плазменный, либо светодиод), 2 — зеркало-коллектор с многослойным покрытием, отражающим видимый свет и 13.84 нм, 3 — образец на столике со сканированием вдоль вертикальной оси (за счет пьезоактуатора с обратной связью), 4 — двухзеркальный объектив Шварцшильда 46 крат с асферическим первичным зеркалом и многослойным Mo/Si-покрытием, 5 — многослойный Mo/ZrSi₂-фильтр на кольце с управляемым движением на оптический пучок, 6 — матричный КМОП детектор, чувствительный к мягкому рентгеновскому диапазону и охлаждаемый элементом Пельтье с водяным контуром, 7 — оптический стол, 8 — этажерка для оптики, 9 — пружинный подвес для уменьшения влияния вибраций на оптику, 10 — ножки с резиновыми опорами, 11 — фиксаторы, предотвращающие качания этажерки, 12 — откачивающая воздух система, 13 — юстировочный лазер, 14 — бленда; *b* — фотография микроскопа: 1 — импульсный ИК лазер для генерации излучения в лазерно-плазменном источнике, 2 — вакуумная камера, 3 — приборная стойка.

строение образцов с латеральным разрешением 140 нм (1 пиксель) и аксиальным до 420 нм (3 пикселя). За счет замены зонной пластинки на зеркальный объектив микроскоп получил следующие преимущества:

1) возможность проводить аксиальную томографию образцов, которая не требует внесения в образец маркеров для выравнивания и подстройки при сдвигах образца вдоль оптической оси для получения объемного изображения;

2) есть возможность точного интерферометрического определения функции рассеяния точки (ФРТ) микроскопа, которая затем участвует в реконструкции изображения;

3) ахроматизм зеркал позволяет строить изображение в трех различных диапазонах: ЭУФ ($\lambda = 13.84$ нм), УФ ($\lambda_{mean} \approx 200$ нм) и в видимом спектре. Выбор

длины волны происходит за счет смены источников. При работе в воздушной среде используется светодиод белого света ($\lambda_{mean} = 535$ нм). При работе в вакууме используется излучение, генерируемое при облучении струи газа, выходящей из конусного сверхзвукового сопла 1 (рис. 1) [36,37], импульсным сфокусированным ИК лазером Ekspla NL303HT. Предусмотрен ввод-вывод многослойного Mo/ZrSi₂-фильтра 5 (рис. 1), отсекающего длинноволновое излучение ($T(\lambda = 20-1064$ нм) $< 0.1\%$, $T(\lambda = 10.6$ мкм) $< 0.1\%$) и пропускающего $\lambda = 12.5-18$ нм с коэффициентом пропускания $T > 45\%$ [38]. При этом объектив 4 используется один и тот же, поэтому положение образца 3 неизменно, а значит, можно однозначно сравнивать изображения одних и тех же областей образца на разных длинах волн.

Для получения трехмерных изображений в микроскопе осуществляется управляемый сдвиг образца на пьезокерамическом актуаторе CoreMorrow вдоль оптической оси на расстояние до 40 мкм с шагом до 1 нм. За счет большой числовой апертуры объектива (NA = 0.27) срез образца, находящийся в предметной плоскости, проецируется на матричный детектор GPixel 2020BSI PulSar довольно резко, что позволяет производить так называемую аксиальную, или *z*-томографию. За счет сдвига образца вдоль оптической оси получается набор изображений — серия срезов с разной глубиной залегания в толще образца. Время экспозиции одного кадра на 13.84 нм составило 1–7 с в зависимости от толщины и типа образца, для съемки серии кадров по толщине образца нам понадобилось 214 кадров с шагом вдоль *z* 0.14 мкм и время до 25 мин.

2. Измерение и учет функции рассеяния точки микроскопа

Для устранения влияния внефокусных слоев на изображения и для получения четких трехмерных изображений мы применяем деконволюционную реконструкцию изображения, описанную нами в [35]. Учет трехмерной ФРТ в таком микроскопе очень важен, поскольку даже нанометровая ошибка формы зеркал (по среднеквадратическому отклонению от расчетной формы) для столько коротких длин волн ($\lambda = 13.84$ нм) влияет на ФРТ. На регистрируемых на матрице изображениях это приводит к размытию изображения, но после решения обратной задачи (деконволюции), эффект размытия в значительной мере удается снизить.

Получение трехмерной ФРТ микроскопа с учетом реальной формы зеркал мы проводили в два этапа: регистрировали aberrации объектива, а затем на их основе в программе Zemax моделировали ФРТ. Мы использовали интерферометр с дифракционной волной сравнения (ИДВС) собственной разработки [39] на основе волоконного источника сферической волны с зауженной до субволновых размеров апертуры

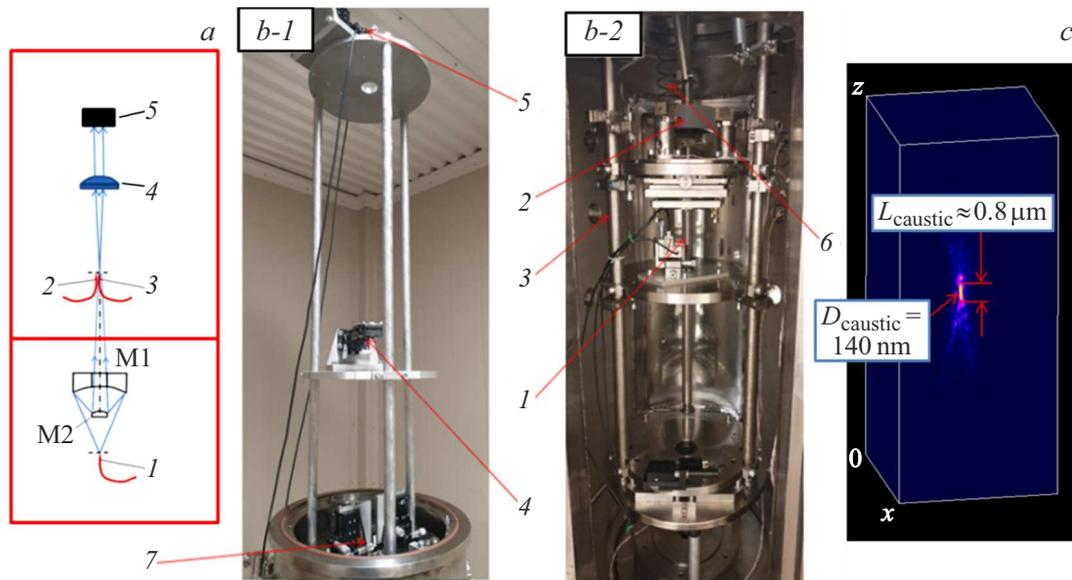


Рис. 2. Схема измерений aberrаций объектива Шварцшильда на ИДВС. *a* — 1 — одномодовый оптоволоконный источник сферической волны с субволновой выходной апертурой (ИСВ № 1), 2, 3 — сколы одномодового оптоволокна (ИСВ № 2 и № 3), 4 — линза, 5 — матричный детектор; *b* — 1, 2 — фотография встроенного в микроскоп интерферометра: 1 — ИСВ № 1, 2 — измеряемый объектив, 3 — оптическая этажерка микроскопа, 4 — линза для изображения первичного зеркала объектива с наложенной интерферограммой, 5 — матричный детектор, 6 — пружинный подвес для уменьшения влияния внешних вибраций на интерферограмму, 7 — сколы одномодового оптоволокна (ИСВ № 2 и № 3); *c* — объемная функция рассеяния точки микроскопом с учетом измеренных aberrаций объектива ($\lambda = 13.84 \text{ nm}$).

($d \approx 250 \text{ nm}$) и ангстремными aberrациями в числовой апертуре $NA = 0.27$ (совпадающей с NA объектива) [40]. Источник, установленный в предметную плоскость объектива 1 (рис. 2, *a*), запитывался светом He–Ne-лазера с длиной волны 632.8 nm , стабилизированным по фазе. Расходящийся сферический фронт источника отражался от зеркал объектива, набирая aberrации, вызванные остаточной ошибкой формы зеркал (после проведенной ионно-пучковой коррекции на $SKO_{\text{aberration}} = \lambda/5$ при $\lambda = 13.84 \text{ nm}$ [38]), и фокусировался в плоскости изображения объектива, куда ставился второй источник сферической волны 2 (рис. 2, *a*), когерентный с первым. Далее эти два пучка, рабочий и эталонный, проецировались линзой на матричный детектор. Линза строила четкое изображение зеркала M1 с наложенной на него интерферограммой. По изгибу интерференционных полос определяли aberrации объектива. Полученная ФРТ имеет вид двойного светового конуса и близка к дифракционно-ограниченной на длине волны 13.84 nm , потому что aberrации малы, на уровне $\lambda/5$. Каустика ФРТ имеет высоту $0.8 \mu\text{m}$ и диаметр около $0.14 \mu\text{m}$, т.е. каждая точка образца в латеральной плоскости размывается примерно на 1 пиксель, а в направлении вдоль оптической оси — на 8 пикселей. Это размывание изображений удастся значительно уменьшить, сделав трехмерную деконволюцию изображения с учетом особенностей ФРТ в программе ImageJ с плагином DeconvolutionLab2 [2].

3. Получение микроскопических изображений на разных длинах волн

Оценку разрешающей способности микроскопа производили на самой короткой длине волны — 13.84 nm , так как в этом случае дифракционное размытие минимально ($0.61\lambda/NA \approx 30 \text{ nm}$ для $NA = 0.27$) и гораздо меньше проекции $6.5\text{-микрометрового}$ пикселя детектора в плоскость образца ($6.5 \mu\text{m}/46$ (magnification) $\approx 140 \text{ nm}$).

Образцом служила суспензия полировального порошка CeO_2 с гранулами размером $0.3\text{--}0.6 \mu\text{m}$, а подложкой — пленка поливинил формальдегида с высоким пропусканием в ЭУФ диапазоне.

На изображении видно, что не вся пленка находится в фокусе объектива из-за ее провисаний. В области по диагонали кадра, попавшей в фокус, гранулы размером $0.3\text{--}0.6 \mu\text{m}$ (размер предварительно определили на электронном микроскопе) изображаются наиболее четко. Из сечения (рис. 3, *a*) видно, что $0.3 \mu\text{m}$ гранула изобразилась как $0.42\text{-микрометровая}$, а размывание по уровню $20\text{--}80\%$ сигнала составило 1 пиксель = $0.14 \mu\text{m}$.

На рис. 4 приведено полученное на ЭУФ трехмерное изображение фиксированной клетки из стебля ландыша. Это стандартный образец для флуоресцентной микроскопии, только с убранными покровными стеклами [41]. Можно видеть клеточную стенку и внутриклеточные структуры.

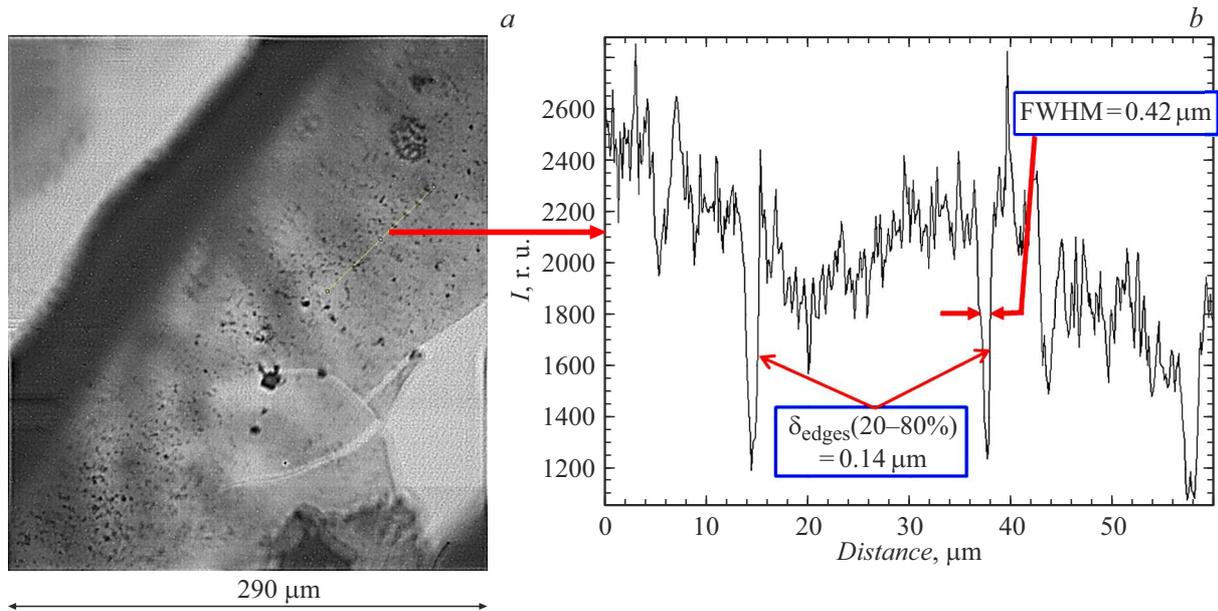


Рис. 3. *a* — изображение полировального порошка CeO_2 с гранулами размером $0.3\text{--}0.6\ \mu\text{m}$ на поливинил-формальдегидной пленке ($\lambda = 13.84\ \text{nm}$); *b* — сечение гранул в фокальной области.

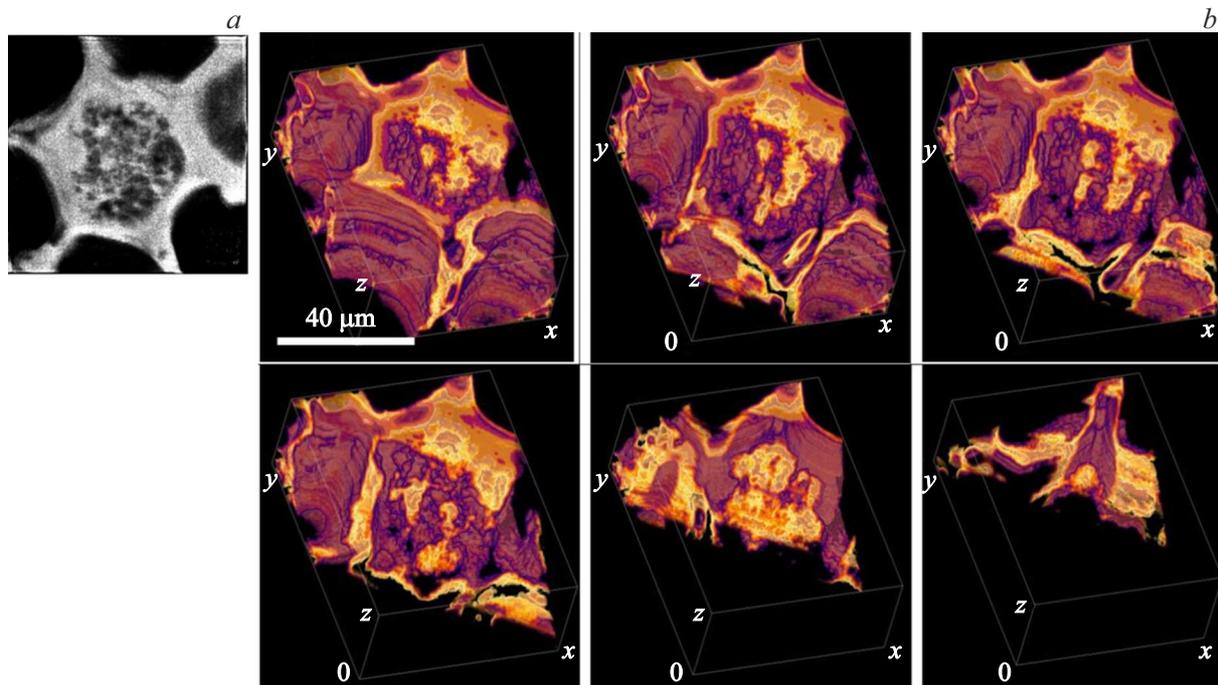


Рис. 4. Изображения клетки стебля ландыша, полученные на $\lambda = 13.84\ \text{nm}$: *a* — один из наблюдаемых срезов; *b* — серия диагональных срезов реконструированной объемной клетки.

Большое внимание было уделено корреляционной микроскопии, когда одну и ту же область изучали на разработанном микроскопе в трех диапазонах длин волн: с подсветкой фотодиодом в видимом свете ($\lambda_{\text{mean}} = 535\ \text{nm}$), с освещением излучением лазерно-плазменного источника (ЛПИ) без многослойного фильтра, когда образец главным образом освещается УФ

излучением со средней длиной волны $\lambda_{\text{mean}} \approx 200\ \text{nm}$ и с использованием фильтра ($\lambda = 13.84\ \text{nm}$). Затем эту область изучали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) марки EM-1400 (Jeol, Япония).

Были получены изображения среза бедренной кости мыши (рис. 5) и выделены наиболее интересные для сравнения участки (рис. 6). Разрешение на ЭУФ и

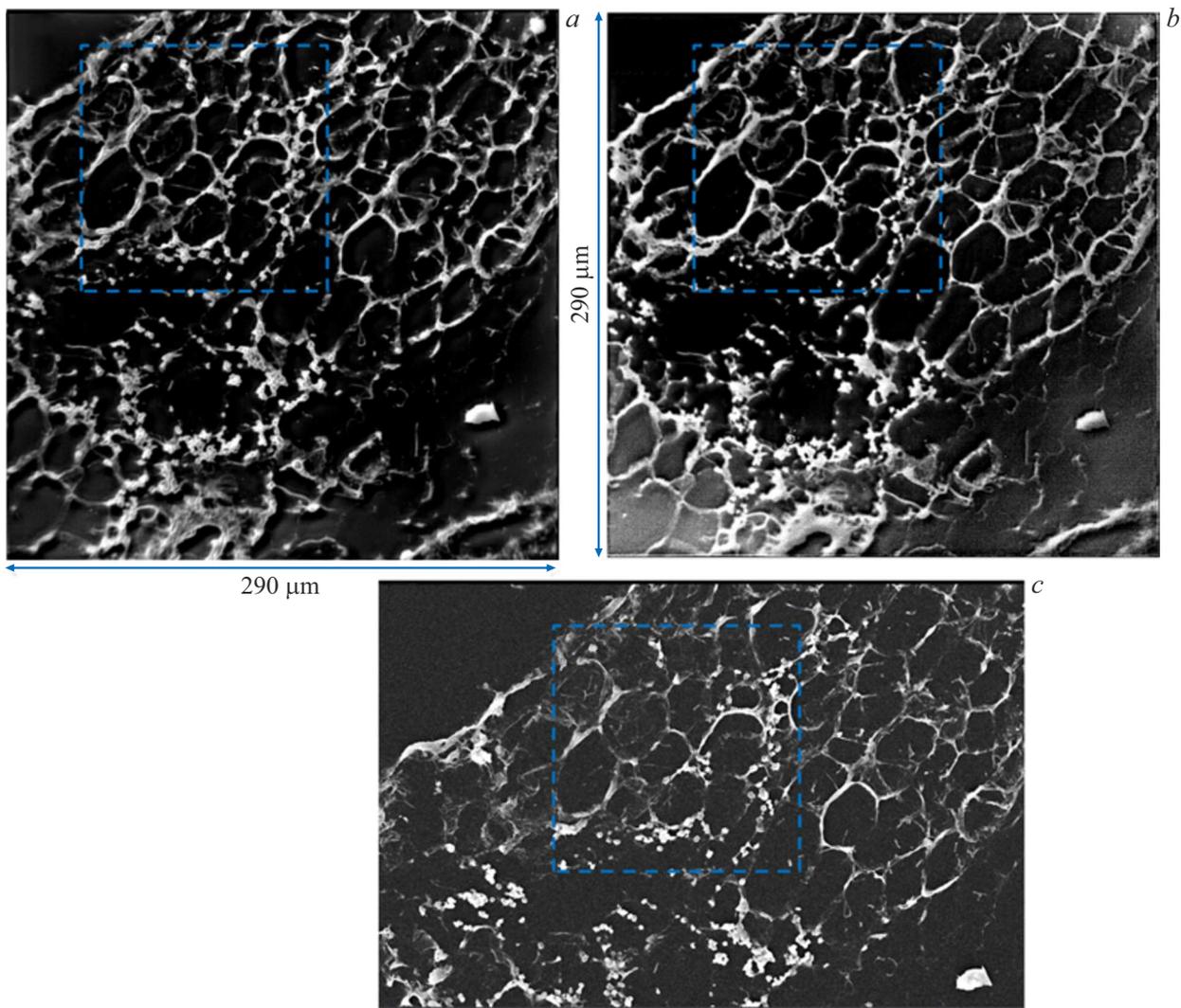


Рис. 5. Срез бедренной кости мыши на разных длинах волн: *a* — УФ, *b* — ЭУФ, *c* — СЭМ (синим пунктирным квадратом выделена область для сравнения). Цвет инвертирован для лучшего восприятия.

УФ сравнимо с разрешением на СЭМ для данного увеличения (46-кратного). В ЭУФ контраст на изображениях возникает за счет поглощения, в УФ — за счет поглощения и преломления на границах материи, на видимом свете — за счет преломления. В СЭМ изображение строится за счет детектирования вторичных электронов, генерируемых под воздействием сканирующего электронного луча. Эффективность эмиссии вторичных электронов тем больше, чем больше угол падения сканирующего луча на поверхность исследуемого объекта, иначе говоря, наклонные поверхности ярче горизонтальных, и, поэтому аксиально-тонкие и плоские структуры изображаются СЭМ не контрастно (рис. 5, *c* и 6, *c*), в отличие от их изображений на УФ и ЭУФ (рис. 5, *a, b* и 6, *a, b*). Аксиально-тонкие ($H150\text{--}300\text{ nm}$) области (выделены пунктиром на рис. 6) на ЭУФ отчетливо прорисовываются, а на УФ и СЭМ едва заметны. На ЭУФ (рис. 6, *b*) стенки кости на 20–50% уже, чем на УФ

(рис. 6, *a*), что связано с уменьшением дифракционного размытия изображений при уменьшении длины волны в 15 раз (с 200 до 13.84 nm). Про подготовку среза костей мыши изложено в Приложении.

На рис. 7 приведено изображение среза легкого крысы. На УФ изображении контраст получается в меньшей степени за счет поглощения света в материи, а в большей — за счет преломления. Лучи на границах структур преломляются и уходят в объектив под углом, в результате чего в УФ картинках границы структур выглядят темнее, чем их центры (рис. 7, *b*). В ЭУФ контраст только за счет поглощения, поэтому таких краевых артефактов нет (рис. 7, *a*). Поглощение на ЭУФ сильнее, чем на УФ, поэтому тонкие в аксиальном направлении структуры, которые в УФ видны серым, в ЭУФ окрашены черным. На видимом свете (рис. 7, *c*) мы видим дифракционное размытие, вызванное большой длиной волны и преобладание преломления над поглощением,

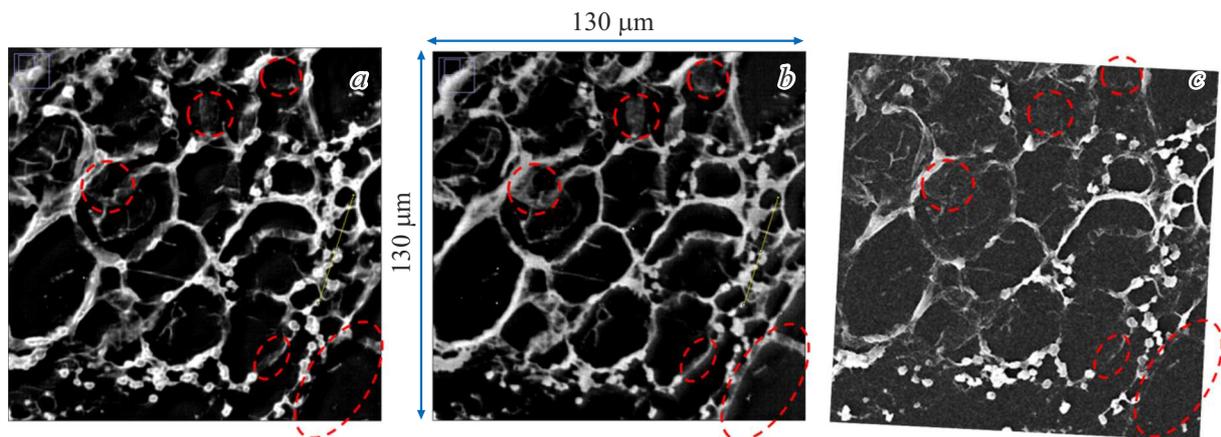


Рис. 6. Область для сравнения в срезе бедренной кости мыши на разных длинах волн: *a* — УФ, *b* — ЭУФ, *c* — СЭМ. Красными пунктирными кругами/овалами выделены зоны, в которых лучше видно различие этих методов визуализации.

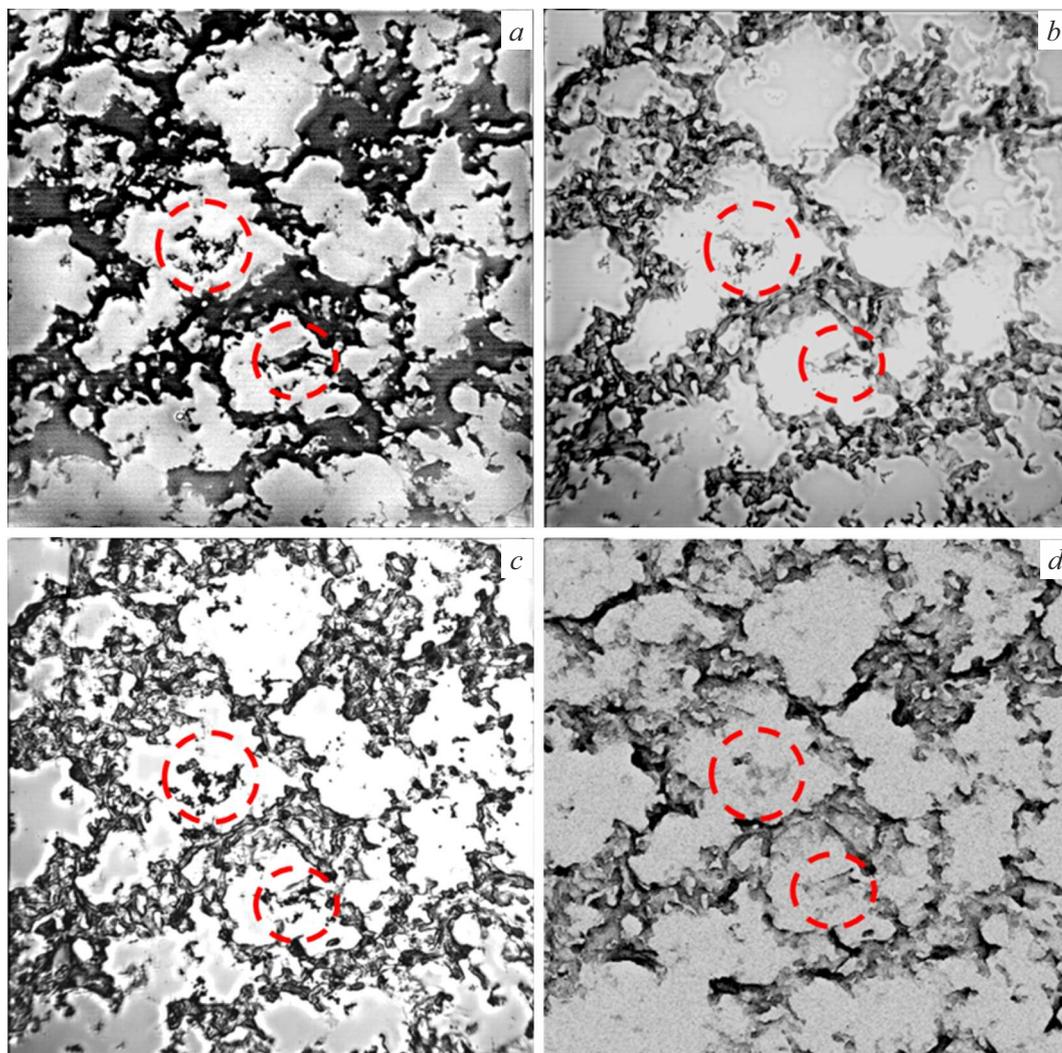


Рис. 7. Срез легкого крысы: *a* — ЭУФ изображение ($\lambda = 13.84 \text{ nm}$), *b* — УФ изображение ($\lambda_{\text{mean}} \approx 200 \text{ nm}$), *c* — на видимом свете ($\lambda_{\text{mean}} = 535 \text{ nm}$), *d* — СЭМ изображение. Толщина среза $15 \mu\text{m}$, поле зрения $130 \times 130 \mu\text{m}$.

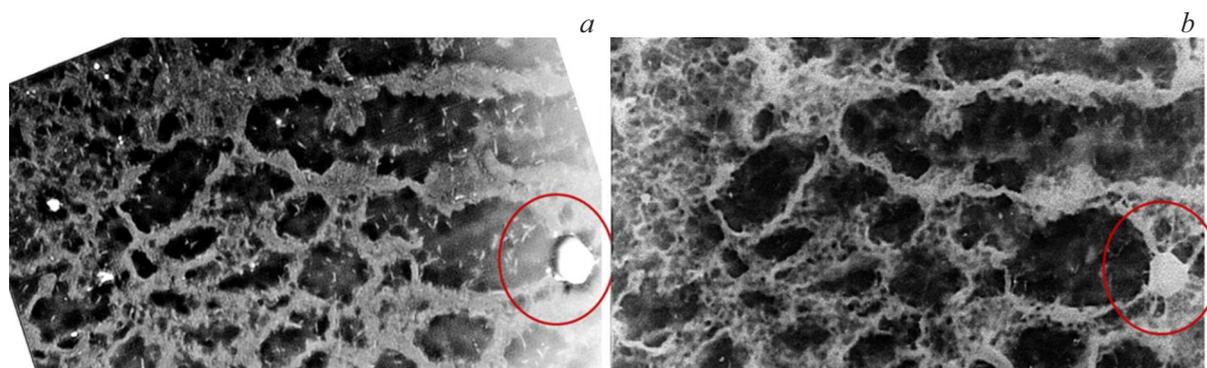


Рис. 8. Срез децеллюляризованного матрикса легкого мыши размером $230 \times 115 \times 6 \mu\text{m}$ на ЭУФ (a) и в этом же микроскопе на видимом свете (b).

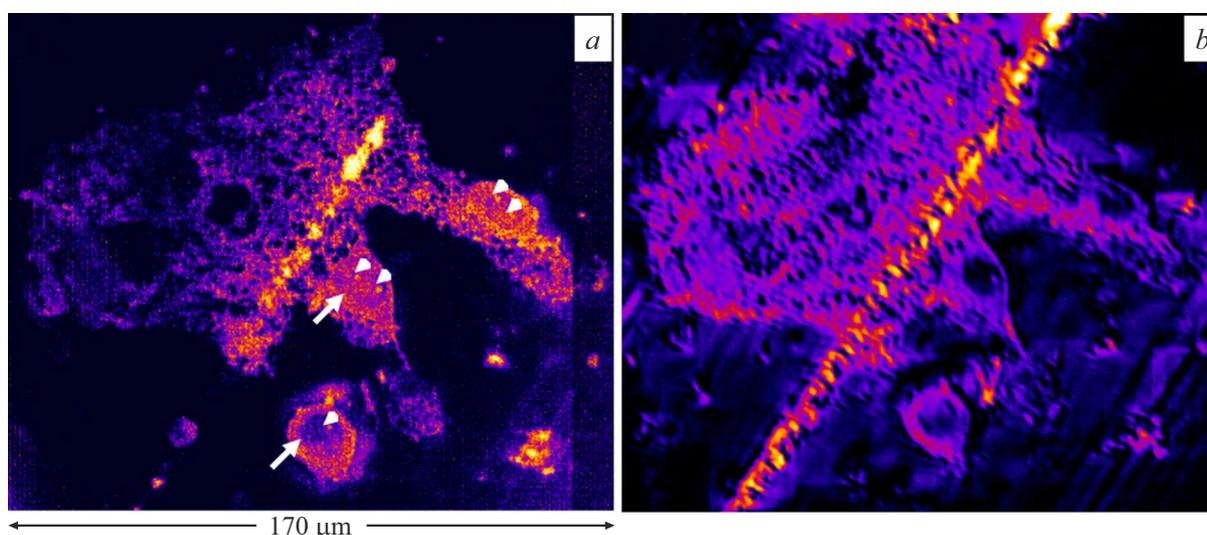


Рис. 9. Срез первичных клеток гиппокампа мыши толщиной $0.5 \mu\text{m}$, ткань заключена в прозрачную для ЭУФ излучения смолу на основе Эпон 812: a — на 13.84 nm от лазерно-плазменного источника, b — на видимом свете от светодиода/диодного источника. Стрелки — ядра, указатели — ядрышки. Яркая полоса — след от ножа.

и, как следствие, большие черные артефакты на края структур. Пробоподготовка описана в Приложении.

Разрешение на ЭУФ превосходит разрешение на видимом свете из-за более короткой длины волны, и, как следствие, меньшего размытия из-за дифракции, что хорошо видно на изображении ткани децеллюляризованного матрикса легкого мыши (рис. 8), где на 13.84 nm получено более четкое изображение, чем на видимом свете.

Пробоподготовка описана в Приложении.

Еще одним интересным объектом стал срез первичных клеток гиппокампа мыши на 18-й день развития *in vitro* (рис. 9). Культуры клеток предварительно фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом и тетраоксидом осмия, обезживали в возрастающей концентрации этанола и затем полимеризировали в смеси смол на основе Эпон 812. Срезы толщиной $0.5 \mu\text{m}$ получали на ультратоме Leica UC7. Протоколы подготовки проб приведены в Приложении. Получено изображение клеток

на ЭУФ и на видимом свете. На ЭУФ изображение гораздо более четкое, удалось увидеть форму клетки, ядро клетки, соотношение ядро/цитоплазма и клеточный матрикс.

Другой интересный эффект был обнаружен при изучении срезов сетчатки глаза мыши на ЭУФ микроскопе до и после нахождения образца под пучком электронов в просвечивающем электронном микроскопе (рис. 10). При облучении в электронном микроскопе легкие атомы, прочность связи которых с углеродом меньше, чем прочность углерод-углеродных связей (преимущественно кислорода и азота) выбиваются из препарата под действием электронного пучка. Тяжелые атомы металла осмия, химически связанные с углеродом (преимущественно по двойным связям остатков жирных кислот в липидных мембранах после процедуры окрашивания), остаются в препарате, поэтому места с высоким содержанием углерода и металла проявляются на изображении более контрастно.

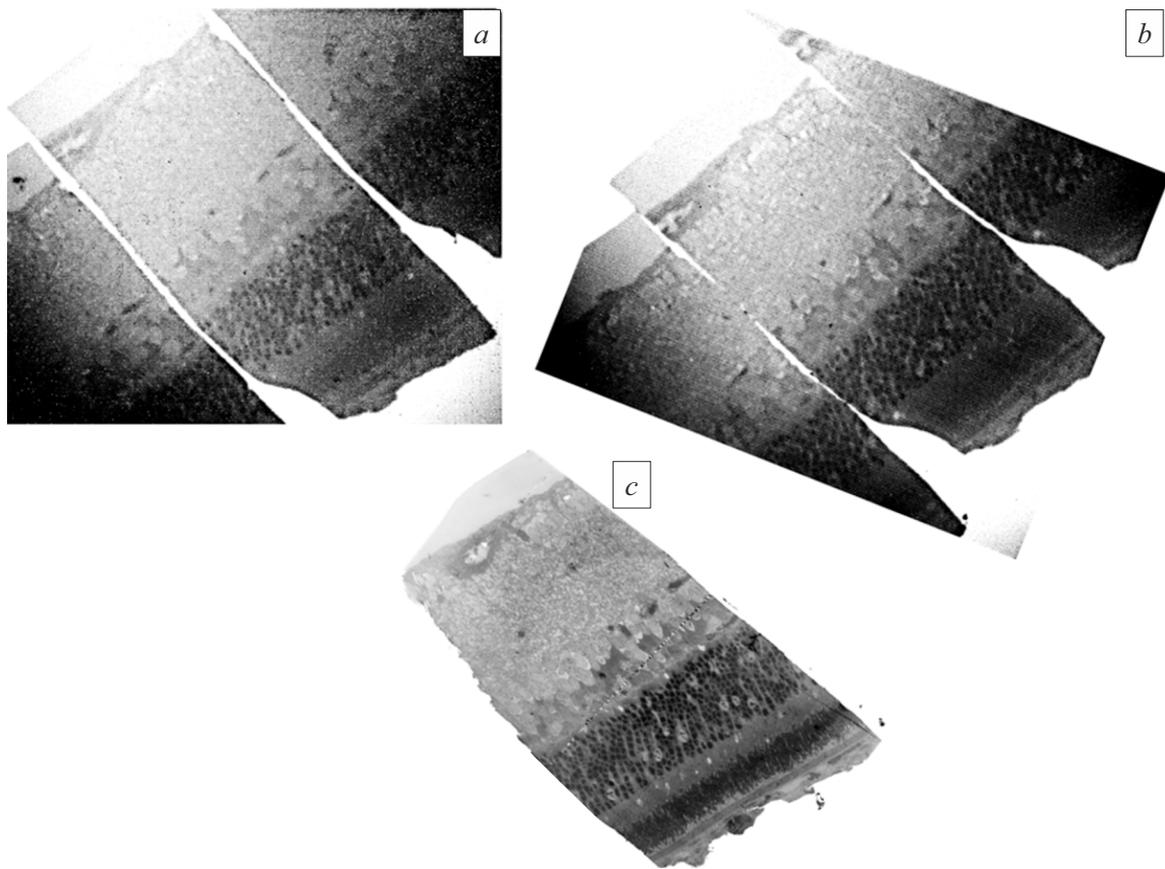


Рис. 10. ЭУФ изображение среза сетчатки глаза крысы: *a* — необлученного электронным микроскопом; *b* — облученного; *c* — ПЭМ изображение подобного среза. Толщина среза 200 nm , поле зрения $260 \times 220\text{ }\mu\text{m}$.

Для хорошего качества ЭУФ изображений образцы должны быть двух типов. Первый — ткани с ярко выраженной ячеистой структурой, с толщиной около $5\text{--}25\text{ }\mu\text{m}$. Для них получается контраст за счет скачков плотности вещества. Такие срезы нарезаются в парафине, а потом он удаляется. Второй — ткани без пор, нарезанные на слои толщиной $0.2\text{--}0.5\text{ }\mu\text{m}$, с контрастированными осмием мембранами, в прозрачной для ЭУФ смоле Ерон 812. Фиксация осмием нужна для повышения контраста углерода, с которым эффективно связывается осмий. Контраст повышается из-за уменьшения глубины проникновения ЭУФ излучения в металлический осмий.

Выводы

На разработанном зеркальном ЭУФ микроскопе с z -томографией реализована корреляционная микроскопия, когда одно поле на образце снимается на трех длинах волн: на 13.84 nm (ЭУФ), на 200 nm (УФ) и на 535 nm (видимый свет).

Показано преимущество разрешающей способности в ЭУФ-диапазоне над микроскопией видимого света и УФ диапазона. Основное преимущество ЭУФ по сравнению

с УФ, СЭМ и оптическими изображениями состоит в том, что контраст генерируется за счет поглощения, поэтому аксиально-тонкие особенности на ЭУФ видны отчетливо. Также по сравнению с УФ и видимым светом на ЭУФ разрешение почти не страдает от дифракционного размытия.

В целом видно, что метод z -томографии в ЭУФ микроскопии работает хорошо, но для получения лучшего разрешения требуется большее увеличение, поэтому сейчас ведутся работы по созданию 345-кратного ЭУФ микроскопа. Также ведутся работы по созданию объектива на более коротковолновый диапазон длин волн.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 22-62-00068 и с использованием оборудования ЦКП „Физика и технологии микро- и наноструктур“ при ИФМ РАН. Часть работы была выполнена с использованием оборудования, закупленного по программе развития МГУ ПНР5.13. Подготовка клеток мозга осуществлялась с участием Центра корреляционной микроскопии ПИМУ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] E. Hanssen, Ch. Knoechel, M. Dearnley, M.W.A. Dixon, M. Le Gros, C. Larabell, L. Tilley. *J. Struct. Biol.*, **177**, 224 (2012). DOI: 10.1016/j.jsb.2011.09.003
- [2] D. Sage, L. Donati, F. Soulez, D. Fortun, G. Schmit, A. Seitz, R. Guet, C. Vonesch, M. Unser. *Methods*, **115**, 28 (2017). DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.12.015
- [3] L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt. *J. Cell Biol.*, **190** (2), 165 (2020). DOI: 10.1083/jcb.201002018
- [4] V. Lučić, A. Rigort, W. Baumeister. *J. Cell Biol.*, **202** (3), 407 (2013). DOI: 10.1083/jcb.201304193
- [5] K. Leigh, P. Navarro, S. Scaramuzza, W. Chen, Y. Zhang, D. Castaño-Díez, M. Kudryashev. *Methods Cell Biol.*, **152**, 217 (2019).
- [6] M. Kördel, A. Dehlinger, C. Seim, U. Vogt, E. Fogelqvist, J.A. Sellberg, H. Stiel, H.M. Hertz. *Optica*, **7** (6), 658 (2020). DOI: 10.1364/OPTICA.393014
- [7] B. Rösner, F. Koch, F. Döring, V.A. Guzenko, M. Meyer, J.L. Ornelas, A. Späth, R.H. Fink, S. Stanescu, S. Swaraj, R. Belkhou, B. Watts, J. Raabe, C. David. *Microsc. Microanal.*, **24**, 272 (2018).
- [8] I. Kounatidis, M.L. Stanifer, M.A. Phillips, P. Paul-Gilloteaux, X. Heiligenstein, H. Wang, Ch.A. Okolo, Th.M. Fish, M.C. Spink, D.I. Stuart, I. Davis, S. Boulant, J.M. Grimes, I.M. Dobbie, M. Harkiolaki. *Cell.*, **182** (2), 515 (2020). DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.0511
- [9] A. Gianoncelli, V. Bonanni, G. Gariani, F. Guzzi, L. Pascolo, R. Borghes, F. Billé, G. Kourousias. *Appl. Sci.*, **11** (16), 7216 (2021). DOI: 10.3390/app11167216
- [10] T. Parkman, M. Nevrkla, A. Jančárek, J. Turňová, D. Pánek, M. Vrbová. *Appl. Sci.*, **10** (18), 6373 (2020). DOI: 10.3390/app10186373
- [11] И.А. Артюков, А.В. Виноградов, Е.А. Бугаев, А.Ю. Девизенко, В.В. Кондратенко, Ю.С. Касьянов. *ЖЭТФ*, **136** (5), 1009 (2009).
- [12] M. Toyoda, K. Yamasoe, T. Hatano, M. Yanagihara, A. Tokimasa, T. Harada, T. Watanabe, H. Kinoshita. *Appl. Phys. Express.*, **5** (11), 112501 (2012). DOI: 10.1143/APEX.5.112501
- [13] L. Juschkin, R. Freiburger, K. Bergmann. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **186**, 012030 (2009).
- [14] A. Torrisi, P. Wachulak, Ł. Węgrzyński, T. Fok, A. Bartnik, T. Parkman, Š. Vondrova, J. Turňová, B.J. Jankiewicz, B. Bartosewicz, H. Fiedorowicz. *J. Microscopy*, **00** (0), 1 (2016). DOI: 10.1111/jmi.12494A
- [15] P.W. Wachulak, A. Torrisi, A. Bartnik, Ł. Węgrzyński, T. Fok, H. Fiedorowicz. *Appl. Phys. B*, **123**, 25 (2017). DOI: 10.1007/s00340-016-6595-5
- [16] T. Ejima, F. Ishida, H. Murata, M. Toyoda, T. Harada, T. Tsuru, T. Hatano, M. Yanagihara, M. Yamamoto, H. Mizutani. *Opt. Express*, **18** (7), 7203 (2010). DOI: 10.1364/OE.18.007203
- [17] P.A.C. Takman, H. Stollberg, G.A. Johansson, A. Holmberg, M. Lindblom, H.M. Hertz. *J. Microscopy*, **226**, 175 (2007).
- [18] C.A. Larabell, M.A. Le Gros. *Molec. Biol. Cell*, **15**, 957 (2004).
- [19] D. Weib, G. Schneider, B. Niemann, P. Guttman, D. Rudolph, G. Schmah. *Ultramicrosc.*, **84**, 185 (2000).
- [20] M. Bertilson, O. von Hofsten, U. Vogt, A. Holmberg, A.E. Christakou, H.M. Hertz. *Opt. Lett.*, **36** (14), 2728 (2011). DOI: 10.1364/OL.36.002728
- [21] E. Fogelqvist, M. Kördel, V. Carannante, B. Önfelt, H.M. Hertz. *Sci. Rep.*, **7**, 13433 (2017).
- [22] H.M. Hertz, O. von Hofsten, M. Bertilson. *J. Str. Biol.*, **177** (2), 267 (2012).
- [23] P.W. Wachulak, A. Torrisi, A. Bartnik, L. Wegrzynski, T. Fok, H. Fiedorowicz. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **849**, 012050 (2017). DOI: 10.1088/1742-6596/849/1/012050
- [24] E. Hanssen, C. Knoechel, M. Dearnley. *J. Struct. Biol.*, **177**, 224 (2012).
- [25] V. Loconte, J.-H. Chen, M. Cortese, A. Ekman, M.A. Le Gros, C. Larabell, R. Bartenschlager, V. Weinhardt. *Cell Reports Methods*, **1** (7), 100117 (2021). DOI: 10.1016/j.crmeth.2021.100117
- [26] J.-H. Chen, B. Vanslebrouck, V. Loconte, A. Ekman, M. Cortese, R. Bartenschlager, G. McDermott, C.A. Larabell, M.A. Le Gros, V. Weinhardt. *STAR Protocols*, **3** (1), 101176 (2022). DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101176
- [27] B. Rösner, F. Koch, F. Döring, V.A. Guzenko, M. Meyer, J.L. Ornelas, A. Späth, R.H. Fink, S. Stanescu, S. Swaraj. *Microsc. Microanalysis*, **24**, 270 (2018). DOI: 10.1017/S1431927618013697
- [28] W. Chao, P. Fischer, T. Tylyszczak. *Opt. Express*, **20**, 9777 (2012).
- [29] V. De Andrade, V. Nikitin, M. Wojcik. *Adv. Mater.*, **33**, 2008653 (2021).
- [30] I.V. Malyshev, N.I. Chkhalo. *Ultramicroscopy*, **202**, 76 (2019).
- [31] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://www.euvlitho.com/2018/P22.pdf>
- [32] N.I. Chkhalo, I.V. Malyshev, A.E. Pestov, V.N. Polkovnikov, N.N. Salashchenko, M.N. Toropov, A.A. Soloviev. *Appl. Optics*, **55** (3), 619 (2016). DOI: 10.1364/AO.55.000619
- [33] Н.И. Чхало, И.В. Малышев, А.Е. Пестов, В.Н. Полковников, Н.Н. Салашченко, М.Н. Торопов. *УФН*, **190** (1), 74 (2020). DOI: 10.3367/UFN.2019.05.038601
- [34] N.I. Chkhalo, I.A. Kaskov, I.V. Malyshev. *Prec. Eng.*, **48**, 338 (2017).
- [35] I.V. Malyshev, D.G. Reunov, N.I. Chkhalo. *Opt. Express*, **30** (26), 47567 (2022).
- [36] А.Н. Нечай, А.А. Перекалов, Н.Н. Салашченко, Н.И. Чхало. *Опт. и спектр.*, **129** (2), 146 (2021).
- [37] А.В. Водошнянов, С.А. Гарахин, И.Г. Забродин, С.Ю. Зуев, А.Я. Лопатин, А.Н. Нечай, А.Е. Пестов, А.А. Перекалов, Р.С. Плешков, В.Н. Полковников, Н.Н. Салашченко, Р.М. Смертин, Б.А. Уласевич, Н.И. Чхало. *Квантовая электроника*, **51** (8), 700 (2021). [A.V. Vodop'yanov, S.A. Garakhin, I.G. Zabrodin, S.Yu. Zuev, A.Ya. Lopatin, A.N. Nechay, A.E. Pestov, A.A. Perekalov, R.S. Pleshkov, V.N. Polkovnikov, N.N. Salashchenko, R.M. Smertin, B.A. Ulasevich, N.I. Chkhalo. *Quantum Electron.*, **51**, 700 (2021). DOI: 10.1070/QEL17598]
- [38] N.I. Chkhalo, E.B. Klunov, A.Ya. Lopati et al. *Thin Solid Films*, **631**, 93 (2017).
- [39] M. Toropov, N. Chkhalo, I. Malyshev, N. Salashchenko. *Opt. Lett.*, **47** (14), 3459 (2022).
- [40] A.A. Akhsakhalyan, N.I. Chkhalo, N. Kumar, I.V. Malyshev et al. *Prec. Eng.*, **72**, 330 (2021).
- [41] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://www.optics-pro.com/botany/lieder-convallaria-maigloeckchen-rhizom-quer-konzentrische-leitbuendel/p.64540>
- [42] A.D. Pospelov, O.M. Kutova, Y.M. Efremov, A.A. Nekrasova, D.B. Trushina, S.D. Gefer, E.I. Cherkasova, L.B. Timofeeva, P.S. Timashev, A.V. Zvyagin, I.V. Balalaeva. *Cells*, **12**, 2030 (2023). DOI: 10.3390/cells12162030

Приложение

1. Пробоподготовка среза бедренной кости мыши

Кости помещали в 10%-ный нейтрализованный формалин (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия) на 48 h при комнатной температуре. Затем их промывали от избытка фиксатора под проточной водой в течение 20 min, а затем помещали для декальцинации в жидкость Ричмана-Гельфанда-Хилла (90%-ная муравьиная кислота, 38.8%-ная соляная кислота и дистиллированная вода) на 24 h. Конечная точка декальцинации была подтверждена стандартным гравиметрическим тестом. Затем образец был извлечен из кислотного раствора под проточной водой на 30 min и обезвожен в 5 повторностях модифицированного изопропилового спирта „Блик“ (производство „Бликмедикл“, Таганрог, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Кости были залиты в парафин, а срезы (по 2 среза на каждый образец) толщиной 8 μm были получены с использованием микротомы Eprexia HM 325 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Перед микроскопией образцы были депарафинизированы в ксилоле в течение 5 min.

2. Пробоподготовка среза легкого крысы

Образцы тканей легкого крысы (*Rattus norvegicus*, альбиноса, не линейной) фиксировали буферизованным формалином (4%), выдерживали в 15% процентном растворе сахарозы на фосфатном буфере (4 h) и далее в 30% растворе сахарозы на фосфатном буфере (8 h). Затем образцы помещали в форму для замораживания в криосреду для гистологических образцов Tissue-Tek O.C.T. Compound. Экспресс-замораживание проводили путем погружения формы в изопропиловый спирт с температурой -80°C , избегая попадания изопропилового спирта на поверхность образца. Срезы толщиной 3–15 μm при температуре -18°C получали с помощью криостата 1850CM UV (Leica, Германия). Срезы тканей монтировали на подложки из нитрида кремния, предварительно покрытые полилизинном, удаляли криосреду, обезвоживали образцы, проводя через серию спиртов повышающейся концентрации и безводный ацетон, а затем высушивали в критической точке (КТ) углекислоты. В этом состоянии препараты устойчивы в вакууме и пригодны для исследования в УФ/ЭУФ-режимах.

Для исследования с использованием СЭМ препараты, высушенные в КТ, дополнительно покрывали слоем золота с использованием установки ионного распыления для придания препаратам электропроводности и увеличения эффективности генерации вторичных электронов. Получение СЭМ изображений использовали с применением электронного микроскопа JSM-6380 (JEOL, Япония).

3. Пробоподготовка децеллюляризованного матрикса легкого мыши

Матрикс получали в соответствии с методом, описанным в [42]. Легкие мыши линии BALB/c последовательно икубировали в 0.5% растворе тритона X-100, затем в 0.5% растворе SDS, затем в 1% растворе дезоксихолата натрия. После окончания децеллюляризации образцы матриксов переносили в 10% нейтрализованный гистологический формалин на 24 h при комнатной температуре. Затем их промывали от избытка фиксатора под проточной водой в течение 20 min и обезвоживали в 5 повторности модифицированного изопропилового спирта „Блик“ (BlikMediklProduction, Таганрог, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Матрикс заливали в парафин и готовили срезы (2 среза на 1 образец) толщиной 7 μm с использованием микротомы Eprexia HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США). Перед микроскопией образцы были депарафинизированы в ксилоле в течение 5 min.

4. Протокол приготовления среза первичных клеток гиппокампа мыши

- Первичная фиксация в 2.5% глутаровом альдегиде в течение 2 h в какодилатном буфере 0.15 M с 2 mM CaCl₂).
- Промывка 5 \times 3 min в какодилатном буфере 0.15 M с 2 mM CaCl₂ (комнатная температура).
- Постфиксация: 1 h, на льду; свежеприготовленный 0.3 M какодилатный буфер с 1% водным раствором четырехокси осмия + 1.5% ферроцианида калия.
- Промывка: 5 \times 3 min; dd H₂O (double-distilled water).
- Обезвоживание: 2 \times 15 min, на льду: 50, 70, 90, 100, 100%, ацетон, dd H₂O.
- Заключение в смесь эпоксидных смол на основе Эпон 818 по рекомендациям производителя для получения „твердой“ смолы:
 - Эпон 818 „твердый“: ацетон (1:3) 2 h.
 - Эпон 818 „твердый“: ацетон (1:1) 2 h.
 - Эпон 818 „твердый“: ацетон (3:1) 2 h.
 - Эпон 818 „твердый“: 100% 37°C — 24 h.
 - Эпон 818 „твердый“: 100% 45°C — 24 h.
 - Эпон 818 „твердый“: 100% 60°C — 24 h.

5. Пробоподготовка среза сетчатки глаза крысы

Срезы тканей, заключенные в Эпон 812, готовили согласно протоколу пробоподготовки для ПЭМ. Вкратце, образцы тканей фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида на 100 mM растворе какодилата натрия, затем проводили стабилизацию липидных мембран 1% раствором четырехокси осмия на том же буфере, обезвоживали, проводя через серию спиртов повышающейся концентрации. На стадии 70% раствора этанола образцы импрегнировали 2%-ным уранил-ацетатом *en bloc* для придания дополнительной электронной плотности

белковому компоненту. После 96% этилового спирта образцы переводили в безводный ацетон и пропитывали смесью ацетона и эпоксидной смолы Эпон 812 (Spi-Pon 812, SPI Inc., США), постепенно повышая концентрацию смолы. После перевода в чистую смолу проводили полимеризацию смолы при 55–60°C. Из полученных заливок изготавливали срезы необходимой толщины, используя ультрамикротом Ultracut-E (Reichert-Jung, Австрия), оборудованный алмазным ножом Ultra 45 (Diatom, Швейцария). Срезы монтировали на подложки из нитрида кремния для УФ/ЭУФ исследований и на поливинил-формальдегидные пленки на стандартных медных сетках с одной ячейкой для корреляционных ЭМ/УФ/ЭУФ исследований. Для получения ПЭМ изображений использовали электронный микроскоп JEM-1400 (Jeol, Япония) с ускоряющим напряжением 80 kV.