

Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий

Аннотация

Разработано новое поколение лазерных интерференционных микроскопов МИМ, предназначенных для измерения геометрических параметров трехмерного микрорельефа поверхности объектов. Достигнуто разрешение до 0,1 нм по вертикали и 10...100 нм в плоскости объекта. Обсуждаются вопросы применения интерференционных методов микроскопии для получения количественных данных о морфологии и динамике биологических объектов.

Интерференционная микроскопия – хорошо известная техника, применяемая для комплексного анализа оптических и геометрических свойств широкого круга микро- и нанообъектов в различных областях науки и техники. Тот факт, что использование фазовых изображений позволяет превзойти классический предел разрешения, известен еще с 50-х годов прошлого века [1], однако уровень развития электроники и вычислительной техники долгое время не позволял в полной мере реализовать возможности фазовой микроскопии. В настоящее время разработано большое количество интерференционных микроскопов, характеристики которых во многом определяются областью их применения. Наиболее широко распространены оптические профилометры на основе интерферометров белого света. Они применяются в полупроводниковой промышленности для контроля качества топологии интегральных микросхем.

В последние годы наблюдается повышенный интерес к применению интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов. Основными преимуществами интерференционной микроскопии являются высокое пространственное разрешение, неинвазивный характер измерения, а также отсутствие специальных требований к среде измерения (вакуум, красители). В качестве альтернативы традиционным методам оптической и конфокальной микроскопии предлагаются методы микроскопии, основанные на современных алгоритмах обработки интерферограмм. К таким методам относятся когерентная фазовая микроскопия [2], оптическая когерентная микротомография [3], когерентная корреляционная интерферометрия [4] и цифровая голографическая микроскопия [5].

Основная проблема существующих методов интерференционной микроскопии заключается в отсутствии оптимального сочетания пространственного сверхразрешения и высокого быстродействия. Так, например, метод когерентной фазовой микроскопии позволяет достигать пространственного (латерального) разрешения до 100 нм, но время записи кадра размером 128 x 128 пикселей составляет 14 с, что ограничивает его применение при исследовании быстрых изменений морфологии биологических объектов. С другой стороны, метод цифровой голографической микроскопии позволяет получать изображения со скоростью до 200 кадр/с, но разрешение метода, определяющееся частотой интерференционных полос в поле зрения фотоприемника, редко превышает 200 нм, что, в свою очередь, не позволяет визуализировать некоторые органеллы и внутриклеточные структуры.

В настоящей статье предлагается новая модификация модуляционного интерференционного микроскопа (МИМ) для медико-биологических исследований, который позволяет регистрировать распределение оптических материальных параметров изучаемого микрообъекта (коэффициентов преломления, отражения, анизотропии, поляризации) и предусматривает одновременное

обеспечение высокого пространственного разрешения и быстродействия.

Метод модуляционной интерференционной микроскопии

В основу оригинального метода МИМ положен принцип измерения локальных фаз промодулированной объектом световой волны [6]-[8]. В результате теоретических исследований и экспериментов в период с 1994 по 2008 гг. был разработан новый подход к исследованиям микрообъектов, который заключается в том, что модуляция проводится по нескольким параметрам (амплитуда, фаза, поляризация и угол закоса лазера), но не менее чем по двум. Так, например, изменение плоскости поляризации лазерного излучения при последовательной записи фазовых портретов позволило зарегистрировать области оптической активности фотонных кристаллов [9]. Важный вклад в интерпретацию фазовых изображений вносит идея использования оптических топологических фаз в интерференционной микроскопии [10], [11]. Их величина зависит от геометрических и физических параметров изучаемого объекта, а свойство топологичности позволяет разделять вклад этих фаз в изображение объекта. Так, например, исследование объекта при круговой поляризации излучения лазера в ряде случаев позволяет оценить вклад фазы Рытова-Владимирского в изображение [12].

Оптическая схема лазерного канала представляет собой модификацию интерферометра Маха-Цандера с фазовым модулятором в опорном плече (рис. 1). Основное преимущество схемы Маха-Цандера состоит в возможности независимого управления поляризацией в объектном и опорном плечах интерферометра с последующим учетом поворота плоскости поляризации, вносимого измеряемым образцом. Кроме того, применение новых конструкторских решений позволило существенно повысить жесткость конструкции и, как следствие, существенно снизить уровень собственных шумов прибора.

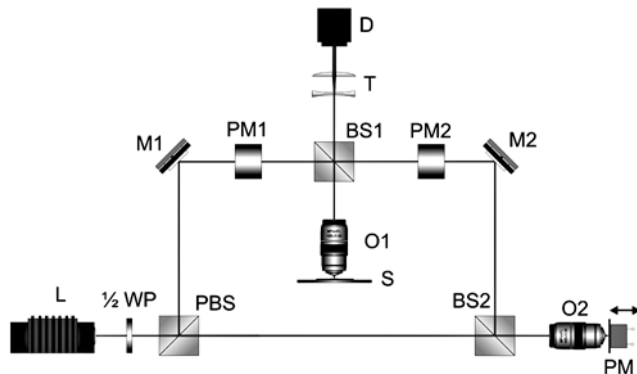


Рис. 1. Оптическая схема лазерного канала МИМ

Управление поляризацией осуществляется при помощи автоматизированных модуляторов поляризации

(PM), позволяющих не только вращать плоскости поляризации объектного и опорного лучей интерферометра, но и изменять тип поляризации (эллиптическая или круговая поляризация). Для анализа образцов, обладающих оптической активностью, перед CMOS-камерой D устанавливается анализатор.

В качестве источника когерентного излучения используется полупроводниковый лазер с длиной волны $\lambda = 405$ нм. Измеряемый объект размещается на столе S под микроскопом O1. Коллимированный пучок от лазера L проходит через полуволновую пластинку (1/2WP) и затем разделяется на поляризующем светоделителе PBS. Один из пучков (объектный) фокусируется объективом O1 на объект S и после отражения от зеркальной подложки через светоделитель BS1 и телескопическую систему T попадает на фотоприемник D. В качестве фотоприемника используется 12-битная CMOS-камера «Silicon Imaging», модель SI – 1280f.

Опорный пучок фокусируется объективом O2 на зеркало, закрепленное на пьезо-приводе PM, осуществляющее модуляцию оптической разности хода лучей в интерферометре, и после отражения от него также попадает на фотоприемник.

Введение в оптическую схему полуволновой пластинки и поляризационного светоделителя позволяет реализовать светоделитель с переменным коэффициентом деления интенсивности пучка. Это способствует достижению оптимального контраста интерференционной картины в зависимости от коэффициента отражения изучаемого объекта и, следовательно, позволяет рационально использовать динамический диапазон CMOS-камеры и тем самым уменьшить уровень шума в фазовых изображениях.

Вычисление набег фазы $\Delta\Phi(x, y)$ осуществляется модифицированным методом фазовых шагов [7].

Регистрируемую на фотоприемнике интерферограмму можно представить в виде

$$I(x, y) = I_1(x, y) + I_2(x, y) + 2\sqrt{I_1(x, y)I_2(x, y)} \cos[2\pi f_0 x + \Delta\Phi(x, y)], \quad (1)$$

где $I(x, y)$ – регистрируемое с помощью камеры распределение интенсивности интерференционной картины; $I_1(x, y)$, $I_2(x, y)$ – интенсивности предметного и опорного каналов; f_0 – частота полос; $\Delta\Phi(x, y)$ – фазовый набег (ОРХ) на исследуемом объекте, являющийся искомой величиной.

Обозначим

$$A(x, y) = I_1(x, y) + I_2(x, y);$$

$$B(x, y) = 2\sqrt{I_1(x, y)I_2(x, y)}$$

и перепишем уравнение (1) в виде

$$I(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos[2\pi f_0 x + \Delta\Phi(x, y)]. \quad (2)$$

Для нахождения функции $\Delta\Phi(x, y)$ требуется решить уравнение (4), т. е. перейти к решению четырех уравнений для различных значений фазового сдвига Nkd ($N = 0, 1, 2, 3$), где $k = 2\pi / \lambda$, λ – длина волны излучения.

$$I(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos[2\pi f_0 x + \Delta\Phi(x, y) + Nkd], \quad (3)$$

где параметры $A(x, y)$, $B(x, y)$, d и $\Delta\Phi(x, y)$ выступают как неизвестные.

Фазовый сдвиг d вносится с помощью закрепленного на пьезокерамике зеркала в опорном плече интерферометра.

В результате имеется система из 4-х уравнений:

$$\begin{cases} I_0(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos[\Delta\Phi(x, y)]; \\ I_1(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos[\Delta\Phi(x, y) + kd]; \\ I_2(x, y) = A(x, y) + B(x, y) \cos[\Delta\Phi(x, y) + 2kd]; \\ I_3(x, y, t) = A(x, y) + B(x, y) \cos[\Delta\Phi(x, y) + 3kd(t)]. \end{cases} \quad (4)$$

Искомая величина разности фаз определяется следующим образом:

$$\Delta\Phi(x, y) = \arctg \left[\frac{\sqrt{[(I_1 - I_2) + (I_0 - I_3(t_0))] \cdot [3(I_1 - I_2) - (I_0 - I_3(t_0))]} }{I_1 + I_2 - I_0 - I_3(t_0)} \right], \quad (5)$$

где $I_3(t_0)$ – мгновенное значение интенсивности, определяемое временем экспозиции фотоприемника.

При таком варианте расчета ошибка расчета разности фаз в точках изображения $I(x, y)$ с минимальной интенсивностью уменьшается за счет регистрации переменной составляющей интерференционного сигнала по аналогии с описанным выше методом временных интервалов. Точки стояния (сдвиг) d и закона перемещения $d(t)$ опорного зеркала также выбираются исходя из минимизации ошибки определения разности фаз.

Разрешение при фазовых измерениях определяется целым рядом характеристик как самого сигнала, так и измерительного прибора. Вертикальное (Z) разрешение определяется той точностью, с которой измеряется фаза промодулированной объектом волны, которая получается при сравнении его с опорной волной, так что задача сводится к определению фазы опорной волны. В МИМ разрешение по вертикали с использованием системы активной виброзащиты достигает 0,1 нм. Латеральное разрешение (в плоскости X, Y) объектно-зависимо, величина латерального разрешения меняется от 15 до 100 нм в зависимости от фазового контраста исследуемого объекта.

Предельные возможности микроскопа МИМ наглядно иллюстрируются изображением частицы оксида железа с диаметром 30 нм (рис. 2).

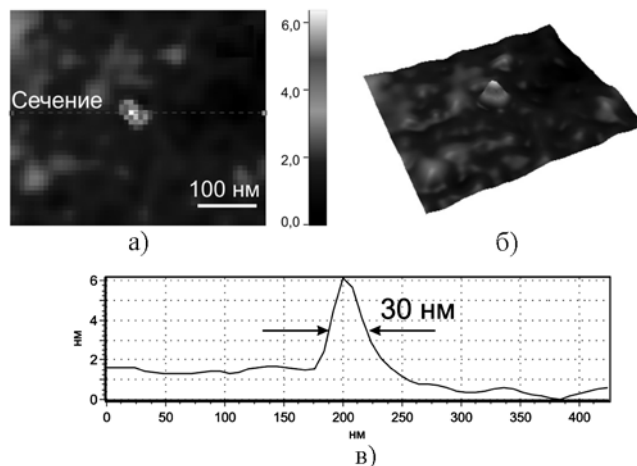


Рис. 2. Изображение наночастицы железа с диаметром 30 нм, полученное на лазерном модуляционном микроскопе МИМ

Результаты измерений

На основе метода МИМ была разработана методика исследования активации лимфоцитов. В работе [13] показано, что метод модуляционной интерференционной микроскопии позволяет выявлять изменения фазовых параметров клеток, связанные с их активацией. Лимфо-

циты в норме имеют фазовую толщину $\Delta h = (220 \pm 30)$ нм, диаметр $(6,5 \pm 0,3)$ мкм (см. рис. 3).

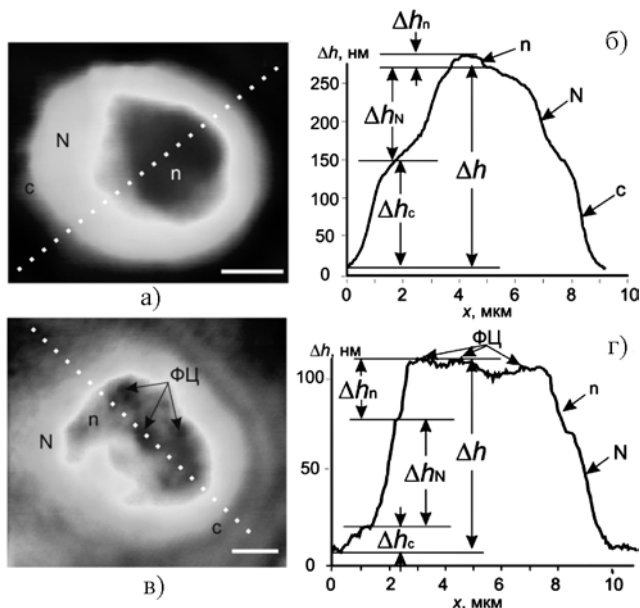


Рис. 3. Фазовые изображения и профили лимфоцита в норме (а), (б) и в активированном состоянии (в), (г)

При активации лимфоцитов фитогемаглютенином (ФГА) происходит уменьшение их фазовой толщины до величины $\Delta h = (110 \pm 30)$ нм при неизменном диаметре, а внутри ядрышка становятся видны многочисленные фибриллярные центры (ФЦ) (рис. 4в). Следовательно, фазовая толщина лимфоцита является универсальным количественным параметром, отражающим степень активации клетки. Результаты исследования успешно применяются в медицине диагностики отторжения трансплантата.

В работе, посвященной исследованию оксигенирования эритроцитов, показано, что отношение фазовых толщин (форм-фактор) $\mu = \Delta h_2 / \Delta h_1$ в различных участках профиля позволяет оценить степень оксигенирования.

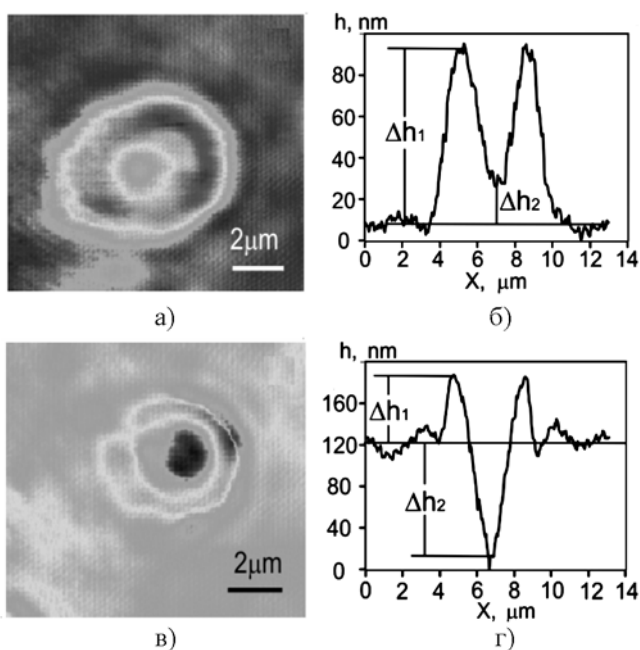


Рис. 4. Фазовые изображения (а), (в) и профили фазовой толщины (б), (г) нормального и оксигенированного эритроцитов соответственно

Для эритроцитов в норме максимум распределения μ располагался в районе 0,3, при оксигенировании клеток максимум распределения смещался в область отрицательных значений до $-1,0$, что свидетельствует о возникновении устойчивой газовой фракции, по свойствам напоминающей бабстонные кластеры, описанные в работе [14]. В качестве контрольных экспериментов проведены измерения эритроцитов при действии угарного газа. Эксперимент показал отсутствие газовой фракции даже после восстановления кислородом.

Обсуждение и выводы

В настоящее время ведется активная разработка методик применения МИМ для решения конкретных диагностических задач гематологии, трансплантологии, онкологии и гинекологии. Кроме того, ведется активная разработка приборно-методических комплексов на основе технологии МИМ, представляющих собой микроскопы МИМ с методиками исследования определенного типа биологических объектов, программным обеспечением и вспомогательным оборудованием для реализации методик. Наиболее перспективным направлением представляется разработка приборно-методического комплекса для исследования клеток крови и диагностики заболеваний, вызванных их патологией. Совместно с коллективом лаборатории компьютерной цитоморфометрии РНИМУ им. Пирогова разработаны методики исследования лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов для диагностики различных нарушений.

Предлагаемые лазерные микроскопы МИМ имеют ряд преимуществ перед традиционно используемыми методами микроскопии биологических объектов: во-первых, микроскопы МИМ позволяют исследовать немодифицированные биологические объекты с использованием привычных для оптической микроскопии методик пробоподготовки; во-вторых, МИМ обеспечивает оптимальное сочетание пространственного сверхразрешения и быстродействия; в-третьих, возможности управления поляризацией, реализованные в МИМ, открывают новые перспективы для исследования оптически анизотропных структур клетки.

Авторы выражают глубокую благодарность коллективу МОНИКИ кафедры биофизики биологического факультета МГУ за плодотворные обсуждения результатов измерений.

Работа выполнена при поддержке Правительства в рамках Постановления № 218.

Список литературы:

1. Bennet A.H., Osterberg H., Jupnik H., Richards O.W. – New York: John Wiley & Sons, Inc., and London: Chapman and Hall, Ltd., 1951.
2. Тычинский В.П. УФН, 177 535. 2007.
3. Вишняков Г.Н. и др. // Измерительная техника. 1999. № 1. С. 46.
4. Kaplonek W., Lukianowicz C. Recent Interferometry Applications in Topography and Astronomy. 2012. March 21.
5. Ikeda T., Popescu G., Dasari R.R., et al. // Optics Letters. 2005. Vol. 30 (10). PP. 1165-1168.
6. Андреев В.А., Индукаев К.В. // Journal of Russian Laser Research. 2001. Vol. 22. № 1.
7. Лопарев А.В., Игнатъев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А. // Измерительная техника. 2009. № 11. С. 60-64.
8. Патент РФ № 2181498 от 15.01.2001.

9. *Sinitkii A.S., Knot'ko A.V., Tretyakov Yu.D.* Solid State Ionics. 2004. Vol. 172. PP. 477-479.
10. *Андреев В.А., Индукаев К.В.* Amphora Labs Co. Ltd. / Bulletin of the Lebedev Physics Institute. 2000. № 5.
11. *Вишицкий С.И., Дебров В.Л., Дубовик В.М., Маковски Б.Л., Степановский Ю.П.* // УФН. 1990. Т. 160. № 6. С. 2.
12. *Andreev V.A., Indukaev K.V.* // Journal of Russian Laser Research. 2003. Vol. 24. № 3.
13. *Игнатьев П.С., Выиенская Т.В., Тычинский В.П., Василенко И.А.* // Альманах клинической медицины. 2008. Т. 4. С. 65-67.
14. *Bunkin N., Ninham B., Ignatiev P., Kozlov V., Shkirin A., Starosvetskij A.* // J. Biophotonics. 2010. PP. 1-15.

Павел Сергеевич Игнатьев,
 канд. физ.-мат. наук, ведущий инженер,
Константин Васильевич Индукаев,
 зам. директора по науке,
Павел Альбертович Осипов,
 генеральный директор,
ООО «Лаборатории АМФОРА»,
Игорь Константинович Сергеев,
 канд. техн. наук, доцент,
 начальник управления по развитию
 гражданского приборостроения,
 ОАО НПК «Оптические системы и технологии»,
 г. Москва,
 e-mail: ips@amphoralabs.ru

В.М. Горшкова, С.В. Савченко

Исследование возможностей использования ультразвука для введения анестезирующих средств под кожу

Аннотация

Проведен сравнительный анализ существующих на сегодняшний день технологий местной анестезии и предлагаемой новой технологии местной анестезии.

Получены результаты, констатирующие увеличение болевого порога на 50...75 % при применении для местной анестезии лидокаина при помощи ультразвука.

Разработана новая технология местной анестезии при помощи ультразвука.

При лечении различных заболеваний в педиатрии, дерматологии, косметологии и других областях, где требуется введение лекарственных веществ через кожу, как правило, применяют местную анестезию, так как пациенты испытывают выраженные болевые ощущения.

В настоящее время в медицинской практике существуют два способа местной анестезии:

- 1) инъекции различных анестетиков;
- 2) аппликации при помощи мазей, содержащих анестезирующие вещества.

Недостатки первого способа:

- а) выраженные болевые ощущения при введении лекарственного вещества [возможна индивидуальная переносимость инъекций (уколов)];
- б) при нарушении целостности кожного покрова возникает риск ятрогенного заражения пациентов ВИЧ, гепатитами, сифилисом и т. п.

Недостатки второго способа:

- а) длительное время введения лекарственного препарата ~50 мин;
- б) эффективность воздействия лекарства 3...5 мин.

Повышение порога болевой чувствительности составляет 10...20 %.

Таким образом, на сегодняшний день в медицинской практике отсутствуют атравматичные методы и технологии, позволяющие повысить порог болевой чувствительности и получить устойчивый длительный анестезирующий эффект.

В МГТУ им. Н.Э. Баумана в лаборатории ультразвука проводятся исследования по решению этой проблемы – введению лекарственных веществ при помощи ультразвука (фонофорез), производимому без нарушения целостности кожных покровов. Более 20 лет в МГТУ им. Н.Э. Баумана успешно занимаются исследованием фонофореза и созданием различных медицинских технологий с его применением в клинике.

В эстетической медицине часто применяют малоинвазивные вмешательства – мезотерапия, различные пил-

линги, введение безоболочных имплантов и других лекарственных препаратов через кожу (препараты токсина ботулизма типа «А» и др.). При этом пациенты испытывают выраженные болевые ощущения.

В связи с этим возникла проблема повышения болевого порога (или повышения порога болевой чувствительности) у пациентов, которым применяют малоинвазивные вмешательства.

Основной целью наших исследований является создание технологии местной анестезии, которая позволит уменьшить болевые ощущения и облегчить выполнение различных медицинских процедур и манипуляций, а также значительно снизить негативное отношение пациентов к ним во время и после их выполнения, включая период реабилитации.

Прежде всего известно биологическое действие УЗ на процессы, определяющие проницаемость биологических структур и транспорт их через мембраны. УЗ усиливает проницаемость кожи сосудов и клеточных мембран. При этом происходит интенсификация массопереноса веществ через них. В повышении проницаемости имеют значение возникающие при озвучивании механическое разрыхление соединительной ткани и деполимеризация гиалуроновой кислоты. В основе увеличения проницаемости биоструктур под действием УЗ лежат как ускорение активного транспорта, так и возрастание переноса веществ по градиенту концентрации. Перемещение лекарственного вещества в поле «УЗ – биологическая ткань» вытекает из физических свойств самого фактора УЗ. При прохождении УЗ-волн через лекарственное вещество колеблющиеся частицы среды, помимо переменного акустического давления, вызывают изменение давления в субстрате по отношению к давлению в окружающей его среде. Это радиационное (постоянное) давление. Переменное и радиационное акустическое давление влияют не только на морфофункциональное состояние мембран, но и на способность к перемещению и перераспределению жидкости и веществ между клетками и окружающей их средой.