

УВИДЕТЬ НЕВИДИМОЕ: НОВЫЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКИЙ МИКРОСКОП Q-PHASE

Рассказывает председатель совета директоров и исполнительный директор холдинга TESCAN ORSAY **Ярослав Клима**



Холдинг TESCAN ORSAY – хорошо известная и бурно развивающаяся международная компания со штаб-квартирой в чешском Брно. Сегодня это один из мировых лидеров в области растровой электронной микроскопии*. Однако компания не ограничивается этой сферой, вторгаясь в другие области аналитического приборостроения. Так, весной 2015 года TESCAN представила совершенно новый продукт – мультимодальный голографический микроскоп Q-PHASE. Почему компания обратилась к нетрадиционной для себя области световой микроскопии, в чем особенности нового прибора, каковы планы в области традиционной электронной микроскопии? С этими вопросами мы обратились к **председателю совета директоров и исполнительному директору холдинга TESCAN ORSAY Ярославу Клима (Jaroslav Klima)**.

Господин Клима, компания TESCAN известна как один из ведущих создателей микроскопов на основе электронной и ионной оптики. Почему вы обратились к световой микроскопии? Ведь на этом рынке немало традиционных игроков.

Наш холдинг работает на очень высококонкурентном рынке научных приборов. TESCAN достиг немалых успехов в области растровых электронных микроскопов, в том числе – с колонной с фокусированным ионным лучом. Однако мы должны постоянно расширять портфель наших продуктов, чтобы противостоять давлению конкурентов. И одно из направлений для диверсификации – световая микроскопия.

Направление оптических микроскопов сегодня переживает

бум. Здесь было сделано несколько очень важных открытий. Наиболее известное – флуоресцентные микроскопы со сверхразрешением, способные преодолеть дифракционный предел (Нобелевская премия по химии 2014 года). Были созданы мультифотонные микроскопы, микроскопы светового листа, ближнепольные микроскопы, голографические микроскопы...

Естественно, мы не намерены конкурировать с такими фирмами, как Zeiss, Leica или Nicon в сфере стандартных световых микроскопов. Однако в новых направлениях световой оптики всегда найдется место для новой компании. Ведь с точки зрения рынка направление световой оптики заметно отличается от электронной микроскопии.

В области оптики заряженных частиц все важные открытия, по крайней мере за последние 20 лет, были сделаны в лабораториях всего пяти ведущих компаний. Тогда как в сфере световой микроскопии настоящие революционные открытия совершались небольшими университетскими командами. Затем эти группы создавали компании, стартапы, выводили на рынок принципиально новые решения. Поэтому пользователи световых микроскопов готовы воспринимать продукты даже от маленьких компаний, без долгой истории, что невозможно в традиционной для нас области электронной микроскопии.

Мультимодальный голографический микроскоп Q-PHASE – совершенно новый продукт на

* Аналитика, 2015, №2, С.12–27.

рынке. Его разработала группа профессора Радима Хмелика (Radim Chmelik) из Института прикладной физики Технологического университета Брно. Мы тесно сотрудничаем с этой командой, ряд ее специалистов стали нашими сотрудниками. Конструкция микроскопа, базовые решения защищены патентами в ряде стран, мы платим патентные взносы, а компания TESCAN получила эксклюзивную лицензию на производство на очень дружественных условиях. Примечательно, что в 2013 году мы даже удостоились специальной награды (Cooperation of the Year) за лучший совместный проект университетских исследователей и промышленных компаний (ежегодная премия, присуждаемая Ассоциацией зарубежных инвестиций, Американской торговой палатой в Чехии и Агентством технологий республики Чехия).

Такая кооперация очень выгодна обеим сторонам. Ведь мы обладаем рядом преимуществ перед небольшими фирмами, выросшими из университетских команд. TESCAN ORSAY – это крупный транснациональный холдинг, у нас есть определенный базовый капитал, глобальная сеть продаж и технической поддержки, опытные специалисты. Вкупе с совершенно инновационным продуктом, которым является Q-PHASE, эти возможности не могут не привести к успеху.

Конечно, непросто выйти на уже сложившийся рынок даже не с новыми продуктом, но с новым классом продуктов. Тем более что Q-PHASE – достаточно дорогой прибор. Необходимо убеждать пользователей, что новое решение принесет нечто, недостижимое иными методами. А это действительно так, поскольку Q-PHASE позволяет получать изображе-

ния объектов, недоступных для наблюдения любыми другими методами. И в полной мере это относится к клеточной биологии, где мы можем наблюдать все жизненные циклы клеток в естественных условиях. Многие аспекты жизни клеток были скрыты от исследователей непрозрачными средами, межклеточным матриксом и т.д. Для Q-PHASE это не проблема.

В чем особенность микроскопа Q-PHASE?

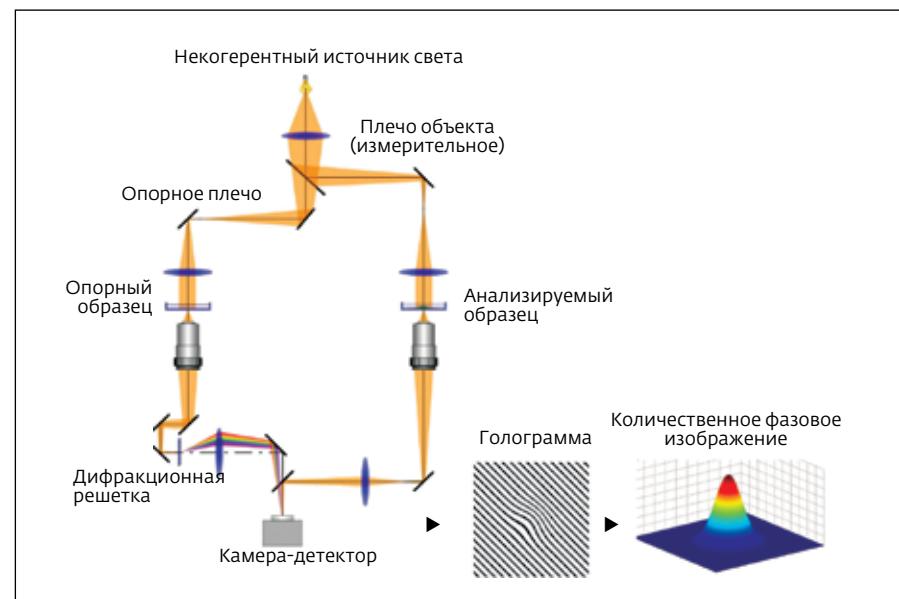
Метод голограммической микроскопии известен достаточно давно и активно используется в биологических и медицинских исследованиях. Что не удивительно, поскольку такая техника позволяет наблюдать прозрачные микрообъекты в естественной среде. Принцип действия голограммического микроскопа основан на измерении как амплитуд, так и фаз световых волн, формирующих изображение объекта. Оптически прозрачные объекты, обладающие различным коэффициентом преломления, приводят к различным фазовым сдвигам.



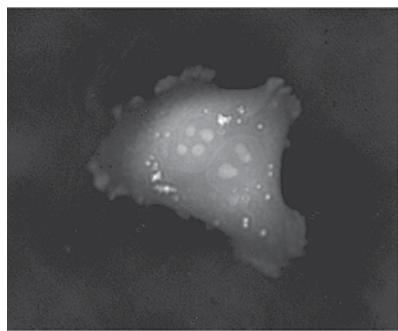
Мультимодальный голограммический микроскоп Q-PHASE с подключенным флуоресцентным модулем

В обычный микроскоп изменения фазы не видны, но за счет интерференционных измерений мы можем получить фазовый профиль объекта и сформировать его изображение.

Микроскоп Q-PHASE построен по схеме интерферометра Маха-



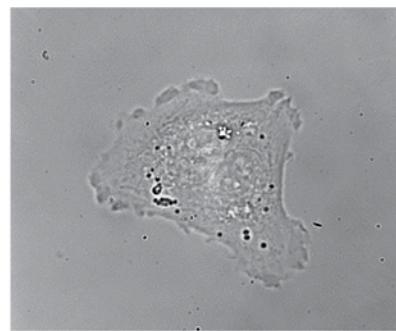
Оптическая схема голограммического микроскопа Q-PHASE



а)



б)



в)

Клетка злокачественной меланомы человека, наблюдаемая в различных режимах: а) основной для Q-PHASE режим количественных фазовых изображений, б) режим симуляции дифференциально-интерференционного контраста, в) светопольное изображение

Цандера. Конструкция включает два плеча оптической системы: плечо объекта и опорное плечо. Они почти идентичны и используют общую систему подсветки. Препарат помещается в плечо объекта, а образец сравнения (пустое стекло или чашка с культуральной жидкостью) - в опорное плечо системы. В опорном плече размещается дифракционная решетка. Лучи, прошедшие через оба плеча, интерферируют в плоскости изображения. Получившаяся интерференционная картинка фиксируется оптической камерой и передается в компьютер, где методом быстрого преобразования Фурье восстанавливается амплитуда и фаза световой волны в каждой точке. Полученную фазовую картину можно подвергать различным традиционным методам обработки изображений. Такой подход позволяет отделить изображение объекта от фона, наблюдать оптические прозрачные структуры даже в сильно рассеивающих свет мутных средах, например в межклеточных матрицах, среде коллагена и т.п.

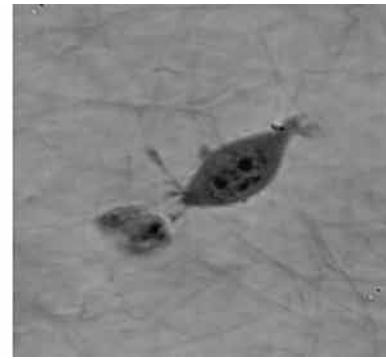
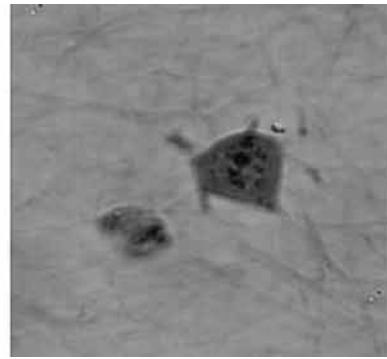
Безусловно, Q-PHASE - далеко не первый голографический

микроскоп на рынке. Однако он обладает рядом особенностей. Одна из наиболее важных - для подсветки используется некогерентный источник света, галогеновая лампа или светодиод. В отличие от монохроматических лазерных источников, мы работаем в спектральной полосе шириной порядка 10 нм в диапазоне 650 нм. Такой подход обладает рядом решающих преимуществ. Так, он предотвращает эффекты спеклов, возникающие при когерентных источниках подсветки. Мы полностью избавлены от эффекта гало и т.д. Кроме того, применение некогерентной мало-мощной подсветки важно для наблюдений за жизнедеятельностью клеток, поскольку исключается фототоксичное воздействие. Мощность светового излучения в Q-PHASE примерно на семь порядков ниже, чем в современных флуоресцентных микроскопах, что позволяет непрерывно наблюдать за живыми структурами в течение нескольких дней.

Другая особенность - в приборе реализован метод построения изображений на основе количественного фазового анализа. Его суть - световая волна, проходящая

через среды с различным показателем преломления и различной толщиной, испытывает различные фазовые сдвиги. Определяя фазу волны в каждой точке изображения, мы получаем информацию о структуре объекта. Такой подход позволяет оценить распределение сухой массы в клетках, изучать их морфологию, наблюдать за движением клеток и т.д. За счет высокого фазового контраста микроскоп чувствителен к чрезвычайно малым изменениям массы и позволяет визуализировать перемещения очень маленьких частиц массы, наблюдая невидимые до сих пор процессы метаболизма клеток, их взаимодействия друг с другом и т.д. Что немаловажно, Q-PHASE не требует применения красителей, это позволяет наблюдать клетки в их естественной среде.

Новый прибор не зря назван мультимодальным - он поддерживает работу в различных режимах получения изображений. В частности, дополнительно Q-PHASE может оснащаться флуоресцентным модулем с различными источниками подсветки. Он легко подключается к микроскопу и очень эффективен для



Движение клеток саркомы человека в коллагеновом геле. Кадры из видеоролика, снятого с помощью Q-PHASE

подтверждения корректности распознавания наблюдаемых объектов и процессов на основе детектирования их хорошо известных морфологических особенностей. При этом воздействие источника света может быть очень кратковременным, чтобы не повлиять на объект исследования. Используя флуоресцентный режим, микроскоп Q-PHASE способен обеспечить надежную идентификацию различных типов смерти клеток, межклеточные взаимодействия, другие процессы жизнедеятельности клеточных структур.

Помимо опционального флуоресцентного модуля, Q-PHASE поддерживает встроенные традиционные методы формирования изображений, такие как микроскопия светлого поля и симуляция дифференциального-интерференционного контраста. Их применение в еще большей степени позволяет расширить возможности прибора, в частности для морфологических исследований клеток.

Микроскопы Q-PHASE уже реально используются в исследовательских центрах?

Мы уже изготовили несколько микроскопов, которые установлены в ведущих исследовательских лабораториях разных стран

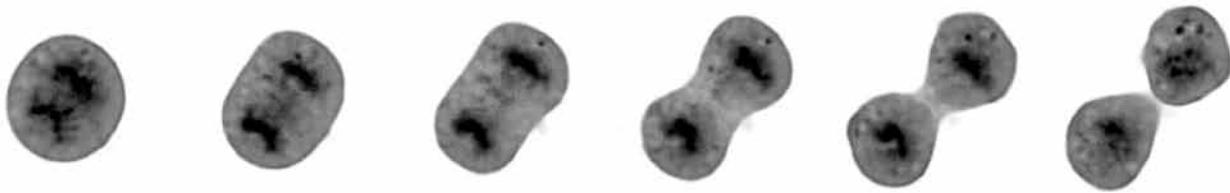
мира. Например, наши микроскопы используют в Институте исследований рака в Лондоне, Институте молекулярной клеточной биологии и генетики Макса Планка в Дрездене, в Шанхайском университете. Еще один микроскоп отправлен в США. И конечно, голографический микроскоп Q-PHASE установлен в Масариковом университете в Брно, в лаборатории исследований рака медицинского факультета. Группа молодых ученых этой лаборатории с помощью Q-PHASE уже добилась действительно выдающихся результатов и даже открыла новые явления в области микроскопии клеток.

Какие научные результаты уже достигнуты с помощью Q-PHASE?

Приведу несколько примеров. Поскольку голографический микроскоп позволяет наблюдать за клетками *in vitro*, можно более детально изучить все особенности не только их жизни, но и смерти. Причем анализ видов клеточной смерти способен дать очень много новой информации, сегодня некробиология клеток развивается очень бурно. Известно несколько видов смерти клеток. Один из них – апоптоз,

процесс программируемой клеточной смерти. В результате апоптоза клетка распадается на отдельные фрагменты, которые затем достаточно быстро поглощаются макрофагами либо соседними клетками. Однако есть и другой механизм смерти клеток – онкоз. В случае онкоза активные внутриклеточные структуры оказываются в межклеточной среде, например в крови. Это влечет серьезные негативные последствия для всего организма. Причем онкоз до определенной стадии обратим.

Изучение и идентификация типов клеточной смерти позволяют решать многие задачи медицинской диагностики, подбора лекарств и их доз, токсикологии и т.п. В частности, определение типа клеточной смерти необходимо для изучения реакции раковых клеток на воздействие цитостатиков. Необходимо удостовериться, что в процессе химиотерапии происходит именно апоптоз раковых клеток, но не онкоз. Однако до недавнего времени изучению процессов онкоза и морфологии клеточной смерти в целом не уделяли должного внимания, поскольку не было соответствующих инструментов. Q-PHASE существенно рас-



Митоз (деление) клетки саркомы крысы. Кадры из видеоролика, который снимался в течение 1 часа на микроскопе Q-PHASE

ширил возможности исследователей в этой области. Например, с его помощью удалось провести наблюдения реакции колоний раковых клеток, помещенных в оптически рассеивающую, мутную среду биологически активных фосфолипидов. Было показано, что в данном случае клетки гибнут именно вследствие апоптоза. И подобных исследований становится все больше.

Другой интересный результат связан с обнаружением нового механизма слияния клеток. Исследователи из лаборатории изучения рака медицинского факультета Масарикова университета Брно обнаружили, что раковые клетки способны объединяться с другими клетками, не повреждая их. Q-PHASE позволил наблюдать, как большая по размерам раковая клетка проникает внутрь меньшей. В результате получается клеточная структура с двумя ядрами – прежде это считалось невозможным. Как выяснилось, около 3% раковых клеток способны к такому проникновению. В результате скрытая раковая клетка оказывается резистентной к воздействию любых цитостатиков. А когда опасность исчезает, раковые клетки снова выходят наружу и начинают делиться. Это объясняет, почему после химиотерапии у вроде бы излечившегося

человека через несколько лет болезнь прогрессирует с новой силой. Сейчас мы не можем противодействовать этому явлению. Но знание механизма защиты раковых клеток позволяет предметно искать средства борьбы с ним.

Не сомневаюсь, благодаря Q-PHASE ученые смогут узнать немало нового о жизни и смерти клеток. Это позволит находить эффективные лекарства и методы борьбы против многих болезней, в том числе против рака.

Вы продолжаете развивать свои традиционные направления электронной микроскопии?

Q-PHASE – очень интересный продукт, но это лишь один из наших новых инструментов. Мы определенно готовимся к большему. Сейчас я не могу раскрыть все планы, но поверьте, исследованиям и разработкам мы уделяем очень серьезное внимание. В это направление инвестируется порядка 12% нашей прибыли. В дочерней компании TESCAN Brno, которая занята созданием электронных микроскопов, из 220 работников 90 – это ученые и инженеры, сосредоточенные на исследованиях и разработках.

TESCAN работает на очень конкурентном рынке научных инструментов. Ужесточение кон-

куренции приводит к сокращению числа игроков. Происходит аккумуляция не только капитала, но и возможностей в области исследований и разработок, в области производства, и даже в области сетей продаж. Чтобы противостоять такому давлению конкурентов, мы стремимся расти так быстро, как это только возможно. Однако рост за счет собственных ресурсов, каким бы впечатляющим он ни был, сегодня уже недостаточен. Поэтому для ускорения развития мы используем механизм слияний и поглощений.

В частности, мы работаем над созданием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ). Это очень крупный проект, о котором мы говорили полтора года назад. Надеюсь, в 2017 году мы сможем представить первые системы ПЭМ. В рамках данного направления летом 2015 года была приобретена американская компания AppFive. Эта фирма занимается созданием программных приложений и методик в области оптики заряженных частиц, в том числе для ПЭМ. В результате наши возможности существенно выросли. И это только один пример. Уверяю, другие не заставят себя ждать.

Спасибо за интересный рассказ.
С Я.Клима беседовал И.Шахнович