

01
Исследования микроскопической рентгеновской томографии

© К.П. Гайкович, И.В. Малышев, Д.Г. Реунов, Н.И. Чхало

Институт физики микроструктур РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия
e-mail: gaikovich@mail.ru

Поступило в Редакцию 9 апреля 2024 г.
В окончательной редакции 9 апреля 2024 г.
Принято к публикации 9 апреля 2024 г.

В результате развития теории геометрооптического подхода в рентгеновской томографии, численного моделирования и оптимизации на основе экспериментальных данных разработан алгоритм рентгеновской томографии, реализующий разрешающую способность $0.14\ \mu\text{m}$, превосходящую разрешение, достижимое в оптических системах. Метод применен в томографическом анализе клеток ландыша, где обнаружены многочисленные мелкие ($0.001\text{--}0.003\ \mu\text{m}^{-1}$) неоднородности поглощения в виде колец толщиной $1\text{--}2$ пикселя ($0.14\text{--}0.28\ \mu\text{m}$) — предположительно, сечения оболочек сфероидных тел. Обнаруженная сплюснутость колец в вертикальном сечении позволила сделать вывод о форме этих тел. Чтобы отличить наименьшие детали в реконструкции клеток от артефактов, было выполнено численное моделирование с использованием сопоставимых по поглощению и размерам тестовых объектов, которые встраивались в полученную ранее реконструкцию клетки. Результаты подтвердили указанную выше разрешающую способность при высокой чувствительности к вариациям коэффициента поглощения.

Ключевые слова: рентгеновская микроскопия, коэффициент поглощения, обратная задача, численное моделирование, томография клеток растений.

DOI: 10.61011/JTF.2024.07.58332.114-24

Введение

Метод рентгеновской микроскопической томографии на основе рентгеновского микроскопа был предложен в [1], где для решения обратной задачи томографии был разработан и успешно применен метод, в котором эта задача решалась на основе трехмерного интегрального уравнения типа свертки, где в качестве ядра использовалось вычисленное распределение зондирующего поля. В [2] для решения этой задачи был применен геометрооптический подход, и на основе формализма преобразования Радона в явном виде было получено интегральное уравнение обратной задачи томографии. Результаты исследования в численном моделировании алгоритма решения этого уравнения представлены в [2]. В настоящей работе продолжается теоретическое исследование данного подхода и его приложения для более детального анализа клеток растений, востребованного в биологии и медицине [3].

Оптическая микроскопия, работающая в видимом свете, не позволяет напрямую исследовать наноструктуру живых клеток с деталями менее дифракционного разрешения [4]. Различные методы повышения разрешения оптической микроскопии, например, во флуоресцентной STED-микроскопии (Stimulated Emission Depletion Microscopy) [5] позволяют существенно превысить дифракционный предел и добиться разрешения на уровне десятков нанометров. Однако, как и в случае классической флуоресцентной микроскопии, метод позволяет

видеть только подкрашенные органеллы в отрыве от окружения, что затрудняет понимание протекающих в клетках процессов. Электронная микроскопия обладает высоким, вплоть до нанометров, пространственным разрешением [6]. Однако для проведения таких исследований исследуемые образцы приходится замораживать и резать на пленки толщиной в $100\text{--}500\ \text{nm}$, т.е. данный метод является разрушающим и не может быть применен для изучения целых клеток [7]. Атомно-силовая и сканирующая туннельная микроскопии позволяют изучать лишь поверхность образцов.

Предлагаемый в настоящей работе подход основан на использовании разработанного в ИФМ РАН рентгеновского микроскопа на длину волны $13.84\ \text{nm}$ [1]. Мягкая рентгеновская микроскопия (МР-микроскопия) более 30 лет развивается в спектральной области „окна прозрачности воды“, длины волн $2.3\text{--}4.4\ \text{nm}$ [8–12], а также в ЭУФ-области (глубокий ультрафиолет) на длинах волн $13.4\text{--}13.8\ \text{nm}$ [13–20]. Основными преимуществами рентгеновской микроскопической диагностики в „водном окне“ являются:

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

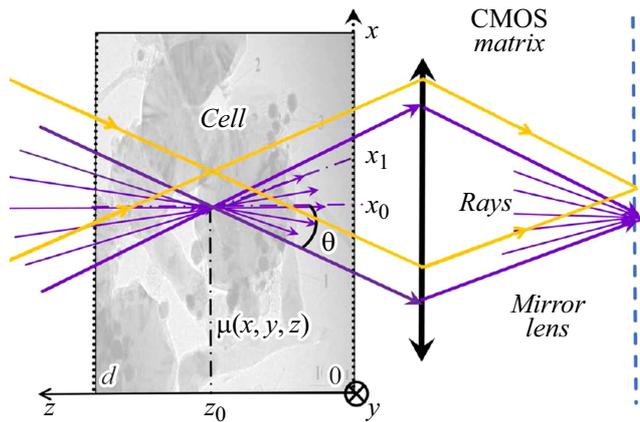


Рис. 1. Схема лучей рассматриваемого рентгеновского микроскопа, проходящих через сечение образца, находящегося в фокальной плоскости объектива, на цифровую матрицу на основе технологии КМОП.

- относительно высокое пропускание и практически отсутствующее рассеяние излучения позволяет исследовать клетки и срезы тканей толщиной до 10–15 μm в их естественном, потенциально в живом состоянии;
- существенно упрощается пробоподготовка образцов по сравнению с названными выше методами.

1. Теория

В настоящей работе задача томографии (определения трехмерного распределения неоднородностей коэффициента поглощения исследуемых объектов) рассматривается на основе уравнений, полученных в [2] в приближении геометрической оптики. На рис. 1 приведена упрощенная схема лучей в микроскопе для модели, в которой пренебрегается незначительным изменением их углов в пределах пятна фокуса внутри клетки.

Сигнал (интенсивность) в каждой точке измерительной матрицы формируется всеми лучами в конусе, прошедшими через соответствующий фокус x_0, y_0, z_0 и выходящими из камеры в точках $x_1, y_1, z_1 = 0$ в измерительной камере (рис. 1). Одновременно зеркальный объектив строит изображение среза образца, попавшего в фокальную плоскость объектива. Для трехмерной реконструкции изображения образца он сдвигается вдоль оси z (оптической оси объектива), и на камере регистрируется серия x – y снимков образца, так называемый z -стек. Размерность сетки сканирования в z -плоскости (размер пикселя) определяется масштабом поперечного дифракционного расплывания излучения в фокусе. Согласно уравнению переноса излучения в поглощающей среде, вклад каждого луча в интенсивность определяется оптической толщиной поглощения — интегралом вдоль пути луча от коэффициента погло-

щения

$$\tau = \int_L \mu(x, y, z) dl$$

на прямой, проходящей через точки x_0, y_0, z_0 и $x_1, y_1, z_1 = 0$ между плоскостями $z = 0$ и $z = d$:

$$J(x_1, y_1, z_1 = 0, x_0, y_0, z_0) = J_0 \exp\left(-\int_L \mu(x, y, z) dl\right). \quad (1)$$

К аналогичному уравнению приводят также наиболее известные методы медицинской томографии КТ (компьютерной томографии) и МРТ (магниторезонансной томографии). В основе этих методов лежит теория преобразований Радона, предложенная им в [21], а позднее развитая для приложений в компьютерной рентгеновской томографии на основе теории некорректных обратных задач А.Н. Тихоновым с учениками [22–25]. В рассматриваемой задаче в отличие от КТ и МРТ отсутствует возможность просвечивания зондируемого объекта со всех сторон, для геометрии рассматриваемого метода микроскопической томографии формулы соответствующих преобразований Радона были получены в [2]. Приведем краткое описание развитой теории.

Используя параметрическое представление оптической толщины [2]:

$$\begin{aligned} \tau(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0) &= \\ &= \sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + (z_0 - z_1)^2} \\ &\times \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \mu[x_1 + (x_0 - x_1)\lambda, y_1 + (y_0 - y_1)\lambda, z_1 + (z_0 - z_1)\lambda] d\lambda, \end{aligned} \quad (2)$$

путем замены переменной $z_0\lambda \rightarrow z$, уравнение (1) может быть представлено в декартовых координатах:

$$\begin{aligned} J(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0) &= J_0 \\ &\times \exp\left(-\sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + z_0^2/z_0} \int_0^d \mu[x_1 \right. \\ &\left. + (x_0 - x_1)z/z_0, y_1 + (y_0 - y_1)z/z_0, z] dz\right). \end{aligned} \quad (3)$$

Далее, выполняя интегрирование по всем лучам в конусе, выходящим через плоскость $z = 0$, и полагая для лучей в области фокусировки $J_0 = \text{const}$, получаем решение прямой задачи (преобразование Радона в рассматриваемой геометрии измерений) — относительную интенсивность $I(x_0, y_0, z_0)/I_0[\mu = 0]$ в точке матрицы, соответствующую положению фокуса в точке

(x_0, y_0, z_0) [2]:

$$\begin{aligned} \frac{I(x_0, y_0, z_0)}{I_0[\mu = 0]} &= \int_{x_0 - z_0 \operatorname{tg} \theta}^{x_0 + z_0 \operatorname{tg} \theta} dx_1 \int_{-\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}}^{\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}} dy_1 \\ &\times \exp\left(\frac{\sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + z_0^2}}{z_0} \int_0^d \mu \left[x_1 \right. \right. \\ &+ \left. \left. \frac{(x_0 - x_1)z}{z_0}, y_1 + \frac{(y_0 - y_1)z}{z_0}, z \right] dz\right) \int_{x_0 - z_0 \operatorname{tg} \theta}^{x_0 + z_0 \operatorname{tg} \theta} dx_1 \\ &\times 2\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}. \end{aligned} \quad (4)$$

Учитывая примененное в алгоритме решения [2] дополнительное условие малости оптической толщины поглощения $\tau \ll 1$, получаем выражение для относительной убыли интенсивности:

$$\begin{aligned} \delta I(x_0, y_0, z_0) &= [I_0 - I]/I_0 \\ &= \int_{x_0 - z_0 \operatorname{tg} \theta}^{x_0 + z_0 \operatorname{tg} \theta} dx_1 \int_{-\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}}^{\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}} dy_1 \\ &\times \sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + z_0^2}/z_0 \int_0^d \mu \left[x_1 + (x_0 - x_1)/z_0 \right. \\ &+ \left. y_1 + (y_0 - y_1)z/z_0, z \right] dz \int_{x_0 - z_0 \operatorname{tg} \theta}^{x_0 + z_0 \operatorname{tg} \theta} dx_1 \\ &\times 2\sqrt{(z_0 \operatorname{tg} \theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}, \end{aligned} \quad (5)$$

где подынтегральную функцию μ в интеграле по z можно представить в виде двойного интеграла по x и y :

$$\begin{aligned} \delta I(x_0, y_0, z_0) &= \iint dx_1 dy_1 \int_0^d \iint dx dy \mu(x, y, z) \\ &\times K(x_0 - x_1, y_0 - y_1, z_0) \delta[x - x_1, (x_0 - x_1)z/z_0] \\ &\times \delta[y - y_1, (y_0 - y_1)z/z_0] dz, \end{aligned} \quad (6)$$

а вместо пределов интегрирования и множителей в (6) введена функция K , описывающая все точки внутри светового конуса на рис. 1. Далее можно изменить порядок интегрирования и сделать замену переменных $\tilde{x}_1 = x_1(z_0 - z)/z_0$, $\tilde{y}_1 = (y_0 - y_1)z/z_0$ в (6), а потом, выполнив интегрирование с δ -функцией по \tilde{x} , \tilde{y} , получить

искомое интегральное уравнение томографии типа трехмерной свертки с ядром K , заданном в явном виде:

$$\begin{aligned} \delta I(x_0, y_0, z_0) &= [I_0 - I]/I_0 = \int_0^d \iint \mu(x, y, z) \\ &\times K(x_0 - x, y_0 - y, z_0 - z) dx dy dz, \end{aligned} \quad (7)$$

$K(x_0 - x, y_0 - y, z_0 - z) =$

$$\left\{ \begin{aligned} &= \frac{1}{\pi(\operatorname{tg} \theta)^2(z_0 - z)^2} \sqrt{\left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2 + \left(\frac{y_0 - y}{z_0 - z}\right)^2 + 1} \\ &\text{при } \left| \frac{x_0 - x}{z_0 - z} \right| < \operatorname{tg} \theta, \left| \frac{y_0 - y}{z_0 - z} \right| < \sqrt{(\operatorname{tg} \theta)^2 - \left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2}, \\ &= 0 \text{ при } \left| \frac{x_0 - x}{z_0 - z} \right| > \operatorname{tg} \theta, \left| \frac{y_0 - y}{z_0 - z} \right| > \sqrt{(\operatorname{tg} \theta)^2 - \left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2} \end{aligned} \right\}, \quad (8)$$

где в ядро уравнения K включены также условия нахождения излучения в конусе. Трехмерное преобразование Фурье (7) приводит к простому уравнению для спектров в k -пространстве

$$\delta I(k_x, k_y, k_z) = 8\pi^3 \mu(k_x, k_y, k_z) K(k_x, k_y, k_z), \quad (9)$$

и формуле искомого обратного преобразования Радона для данного метода томографии:

$$\begin{aligned} \mu(x, y, z) &= \frac{1}{8\pi^3} \iiint \delta I(k_x, k_y, k_z) / K(k_x, k_y, k_z) \\ &\times \exp(ik_x x + ik_y y + ik_z z) dk_x dk_y dk_z, \end{aligned} \quad (10)$$

где для краткости в фурье-преобразованиях используются те же обозначения, что и в преобразуемых параметрах, так что они различаются только своими аргументами.

Проблемой алгоритма (7) оказалась особенность функции ядра K в (8) в пикселе фокуса, размер которого ($0.14 \mu\text{m}$) был выбран в [1] на основе вычисленного масштаба поперечного дифракционного расплывания поля в фокусе. При этом значение ядра (8) в этом пикселе оказывается неопределенным параметром, оптимальный выбор которого нуждался в дополнительных исследованиях. В численных исследованиях [2] значение ядра в фокусе было выбрано путем усреднения его значений в соседних пикселях. С его использованием алгоритм был оптимизирован, и результаты выполненного численного моделирования представлены в [2]. Поскольку в общем случае решение обратных задач типа свертки для входных данных с погрешностью является некорректной задачей (случайные ошибки могут иметь более широкий пространственный спектр, чем спектр ядра, что приводит к неограниченному усилению мелкомасштабных компонент в решении), для регуляризации этой задачи в алгоритме численного моделирования [2] применялся метод А.Н. Тихонова [22].

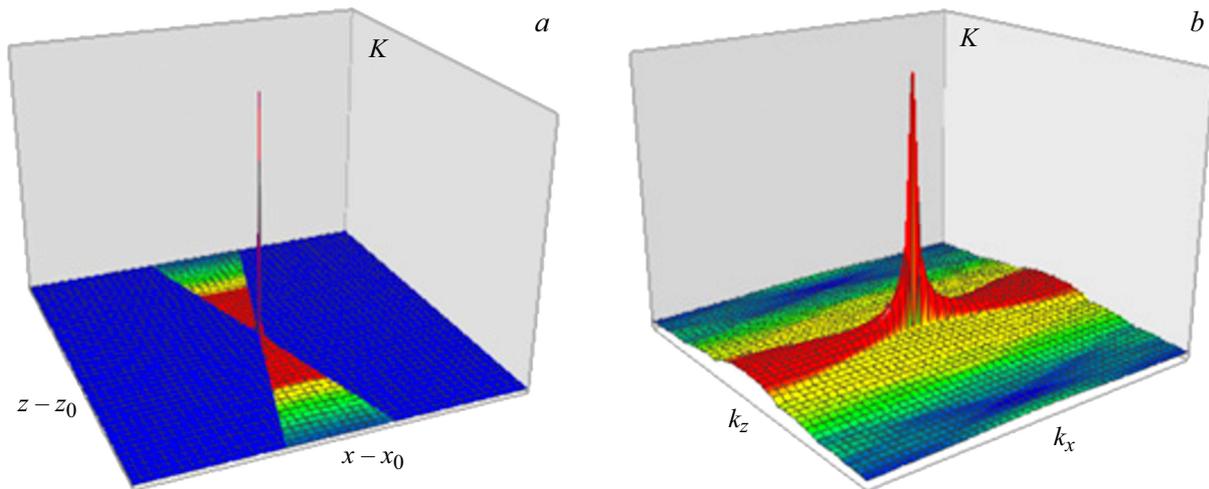


Рис. 2. *a* — безразмерное ядро K уравнения (6) в сечении $y = y_0$; *b* — модуль фурье-спектра ядра K в (8) в k -пространстве в сечении $k_y = 0$ при $\theta = 15.65^\circ$.

2. Результаты теоретических и экспериментальных исследований

В 2023 г. исследования были продолжены как в численном моделировании, так и на основе выполненных результатов экспериментов с тестовым образцом известной геометрической формы и с большими объектами со сложной внутренней структурой (клетками ландыша). При применении метода к анализу этих сложных объектов оказалось, что разработанный в [2] алгоритм не обеспечивает ожидаемой разрешающей способности. Проблемой алгоритма (10) оказался выбор неопределенного значения функции ядра K в его особенности в пикселе фокуса, размер которого был определен вычисленным в [1] масштабом дифракционного расплывания поля. Поскольку это расплывание не описывается в рамках используемого геометрооптического приближения, в численных исследованиях [2] значение в фокусе было выбрано путем осреднения его значений в соседних пикселях.

В выполненных исследованиях значение K в фокусе варьировалось и определялось максимизацией наблюдаемого разрешения мелких деталей в реконструкции исследуемых объектов и верификацией достигнутого разрешения в численном моделировании при контроле соответствия оптической толщины реконструкции измеренному ослаблению сигнала. Оказалось, что при такой оптимизации высота пика ядра (рис. 2, *a*) в фокусе возрастает, алгоритм (10) уже не требует регуляризации, а результаты томографии демонстрируют существенно большее разрешение.

На рис. 2, *b* видно, что пик ядра образует пьедестал в его k -спектре в (10), что обеспечивает увеличение разрешения метода вплоть до наименьших масштабов, соответствующих размеру одного пикселя. То есть более

высокий пик проявляет себя как дискретная δ -функция, отображающая расходимость функции ядра.

Было выполнено численное моделирование модифицированного алгоритма для тестовых объектов с заданной геометрической структурой (однородных по коэффициенту поглощения параллелепипедов и неоднородных, моделируемых гауссовыми распределениями) по замкнутой схеме:

а) из (7), (8) вычислялось распределение принимаемого сигнала в зависимости от положения фокуса в области зондирования;

б) формировались „данные измерений“: к вычисленным значениям принимаемого сигнала с использованием датчика случайных чисел добавлялась „погрешность измерений“ с нулевым средним значением и заданным уровнем среднеквадратичного отклонения σI ;

в) решалась обратная задача (9), (10), и полученное решение сравнивалось с заданным модельным распределением.

Была исследована зависимость разрешающей способности и точности алгоритма томографии в зависимости от уровня случайных ошибок данных. На рис. 3 представлена реконструкция сплошного тестового объекта с резкими границами (куба $20 \times 20 \times 20$ пикселей) в безразмерном формате при различном уровне относительно случайной погрешности.

Результаты моделирования на рис. 3 демонстрируют значительное улучшение качества восстановления по сравнению с результатами [2]. Имеет место точное восстановление формы объекта, и при этом в алгоритме отсутствует усиление погрешности, типичное для некорректных задач, — погрешность реконструкции пропорциональна уровню ошибки.

При моделировании реконструкции в условиях постоянного уровня измерительного шума выяснилось, что из-за несимметричности ядра уравнения (7) в измерениях

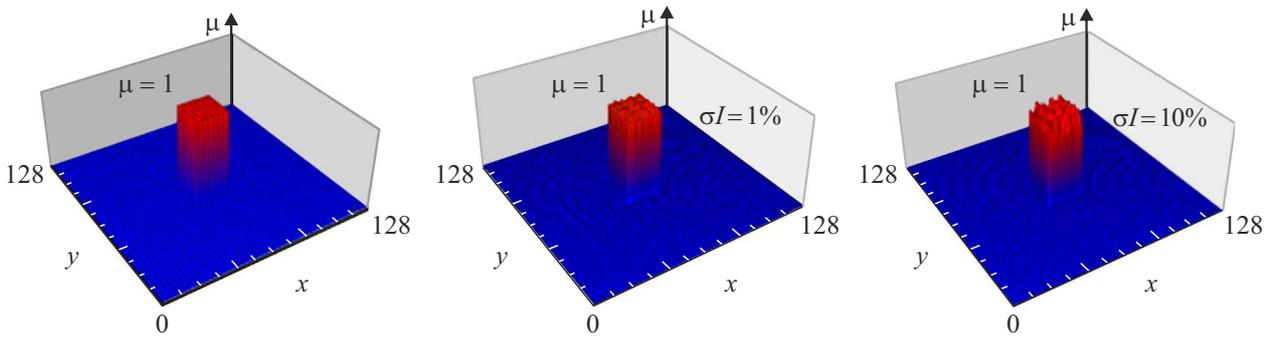


Рис. 3. Численное моделирование томографической реконструкции. Слева — исходное распределение в горизонтальном сечении $\mu(x, y, z = 64)$; в центре — реконструкция при уровне случайной погрешности $\sigma I = 1\%$; справа — при уровне 10% .

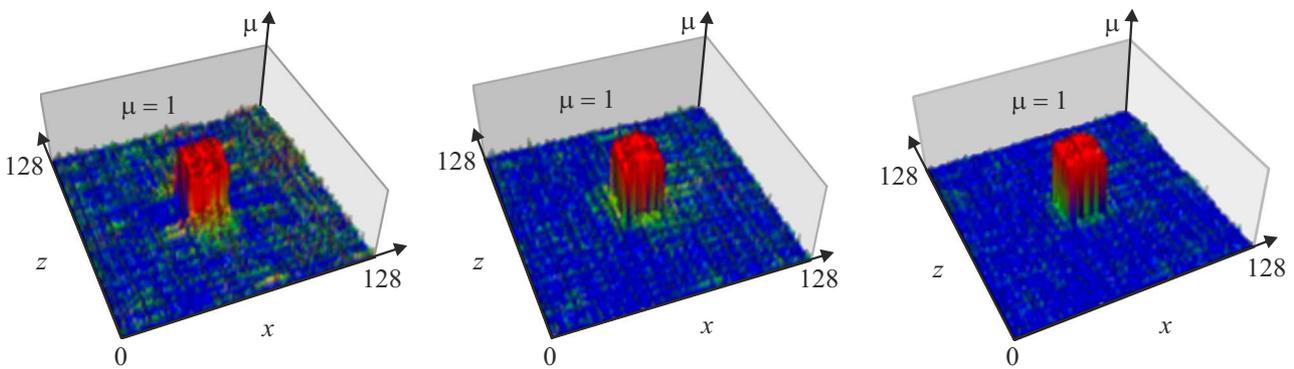


Рис. 4. Слева — реконструкция по измерениям в одной проекции в вертикальном сечении $\mu(x, y = 64, z)$; в центре — в двух проекциях; справа — в трех проекциях при уровне 10% .

уровень погрешности реконструкции в вертикальных сечениях несколько выше, чем в горизонтальных. В экспериментах этот эффект усиливался из-за погрешностей вертикального позиционирования. Для устранения этого фактора и уменьшения уровня погрешности реконструкции в дальнейших исследованиях был предложен метод совмещения данных реконструкции по данным измерения объекта в двух или трех взаимно перпендикулярных проекциях. Для случая реконструкции по трем проекциям формула реконструкции имеет вид:

$$\mu(x, y, z) = [\mu_z(x, y, z) + \mu_y(z, x, y) + \mu_x(y, z, x)]/3. \quad (11)$$

На рис. 4 представлено моделирование при постоянном уровне измерительного шума 15% ($\sigma I = 0.15\delta I_{\max}$) по измерениям в одной, двух и трех проекциях.

На рис. 4 можно видеть, что усреднение реконструкций в двух проекциях заметно уменьшает погрешность, а по трем проекциям (11) — радикально уменьшает ошибки томографической диагностики.

Было выполнено исследование алгоритма для сплошных и распределенных поглощающих объектов с более сложной внутренней структурой. На рис. 5 представлены результаты моделирования томографической реконструкции куба $\mu = 1$ с полостью и с отверстием, а также распределения коэффициента поглощения с

полостью на основе разности двух гауссовых функций (горизонтальные сечения через центр объектов в тех же координатах с разрешением 120×128 пикселей, что и на рис. 3).

На рисунке можно видеть точное воспроизведение резких границ формы сплошных объектов и распределения, моделируемое гауссовыми функциями, включая детали с размерами 2–4 пикселя. Пропорциональная зависимость погрешности реконструкции от величины моделируемых случайных погрешностей соответствует свойствам решения корректно поставленных задач. Здесь можно заметить, что решения некорректных обратных задач, основанных на интегральных уравнениях первого рода со слабыми особенностями, часто имеют корректное точное решение — как, например, преобразования Абеля, используемые в решении ряда задач физической диагностики [26].

Однако в рассматриваемой в настоящей работе задаче мы не имеем дело с точным решением прямой задачи — в нем используется геометрикооптическое приближение малого поглощения. Поэтому корректное решение задачи, получаемое в численном моделировании по описанной выше замкнутой схеме, не позволяет сделать выводы об эффективности его применения в реальной диагностике. В настоящей работе такие исследования

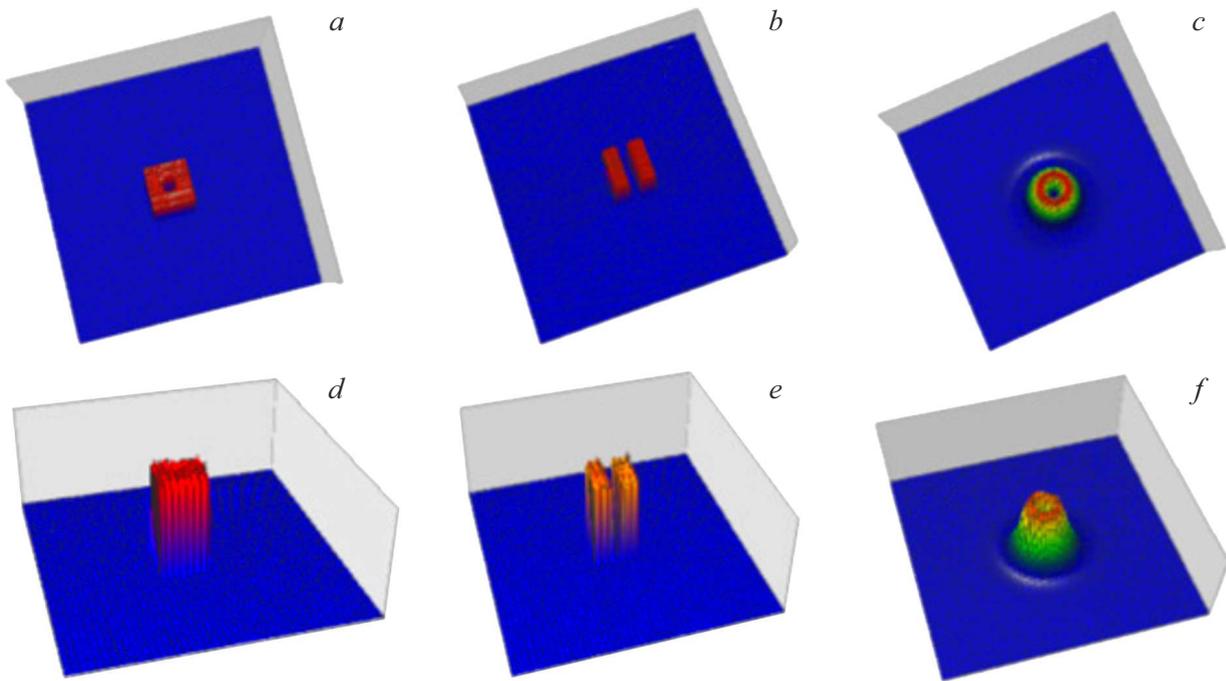


Рис. 5. Моделирование реконструкции различных объектов (томографические сечения в горизонтальной плоскости $x-y$ через центр объектов по вертикальной координате z): a, d — куб $20 \times 20 \times 20$ пикселей с полостью $4 \times 4 \times 4$ пикселей; b, e — куб $20 \times 20 \times 20$ пикселей с отверстием $4 \times 20 \times 4$ пикселей через центр $x-z$ плоскости; c, f — распределение коэффициента поглощения с внутренней полостью $\mu(x, y, z) = \exp\left[-\frac{(x-x_c)^2+(y-y_c)^2+(z-z_c)^2}{\sigma_1^2}\right] - \exp\left[-\frac{(x-x_c)^2+(y-y_c)^2+(z-z_c)^2}{\sigma_2^2}\right]$, где положение центра $x_c = y_c = z_c = 64$ пиксель, а стандартные отклонения $\sigma_1 = 4$ пикселя, $\sigma_2 = 2$ пикселя. Реконструкции $a-c$ получены при уровне моделируемой случайной ошибке 1%, а реконструкции $d-f$ — при ошибке 10%.

были проведены на реальных объектах с весьма сложной многомасштабной внутренней структурой — высушенных растительных клеток стебля ландыша.

Исследования растительных клеток были выполнены с дискретизацией $256 \times 256 \times 256$ пикселей. На рис. 6 представлены распределения измеренного сигнала в горизонтальной плоскости через центр объекта по высоте при его положении на уровне фокуса. Использовано псевдотрехмерное представление в оттенках серого (выбор представления результатов здесь и далее основан на наиболее точном воспроизведении деталей изображения).

На рис. 7, 8 представлены результаты томографической реконструкции распределения коэффициента поглощения клеток, показанного на рис. 6, в горизонтальном и вертикальных сечениях. Уровень белого соответствует величине $\mu = 0.05 \mu\text{m}^{-1}$.

Томограммы на рис. 7, 8 демонстрируют сложную внутреннюю структуру распределения коэффициента поглощения в клетках стебля ландыша, которая содержит информацию, недоступную для других существующих методов диагностики и несомненно представляет интерес для биологов. Структуры клеток на изображениях включают локализованные элементы различных масштабов. Особенно интересны кольцевые образования — начиная от самых мелких до отчетливо различных

колец — таких, как в центральной области на рис. 7, b . Предположительно эти кольца являются сечениями сферических тел в клетке. Высокое разрешение метода позволило более детально проанализировать области относительной прозрачности клеток, где самые мелкие образования различимы наиболее отчетливо, и, кроме того, использовать этот анализ для настройки алгоритма реконструкции (9).

Как было указано выше, настройка алгоритма на основе численного моделирования не обеспечивает успешной диагностики реальных объектов. В численном анализе моделируемые данные измерений рассчитываются на основе того же интегрального соотношения, которое используется и при решении обратной задачи, поэтому в такой замкнутой схеме можно оптимизировать выбор значения ядра (7) в фокусе, добиваясь наилучшего соответствия реконструкции заданному распределению поглощения. При этом оказалось, что точная реконструкция получается в широком интервале значений пика. Но при использовании алгоритма в реальной задаче томографии клеток оказалось, что результат томографии существенно зависит от выбора значения пика ядра, поскольку этот выбор определяет степень близости используемого геометрооптического приближения к реальной взаимосвязи принимаемого сигнала с распределением коэффициента поглощения. Поэтому

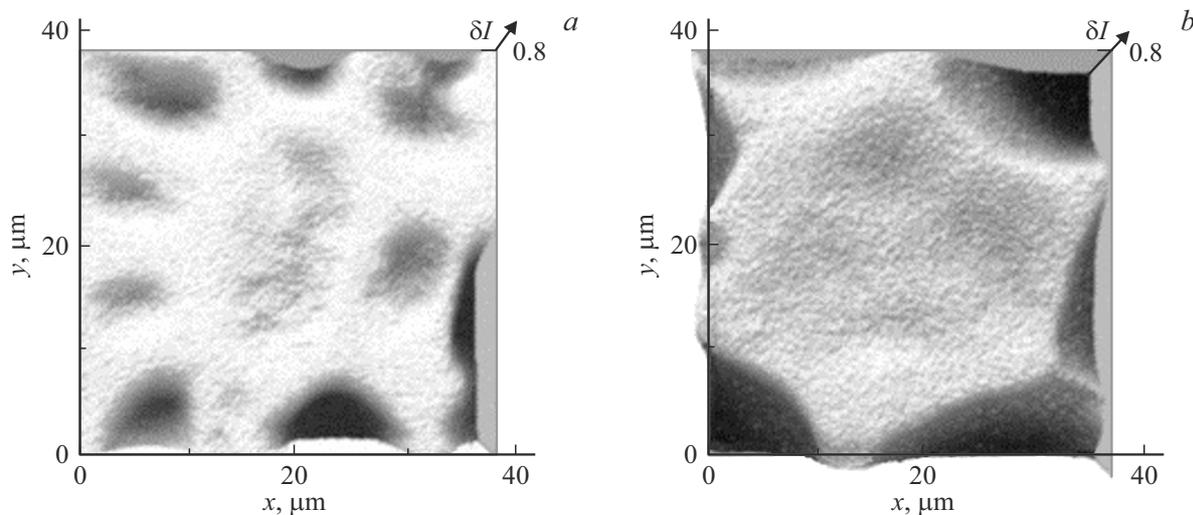


Рис. 6. Распределение сигнала от двух клеток ландыша в горизонтальной плоскости через середину объекта по высоте при ее положении на уровне фокуса по вертикали.

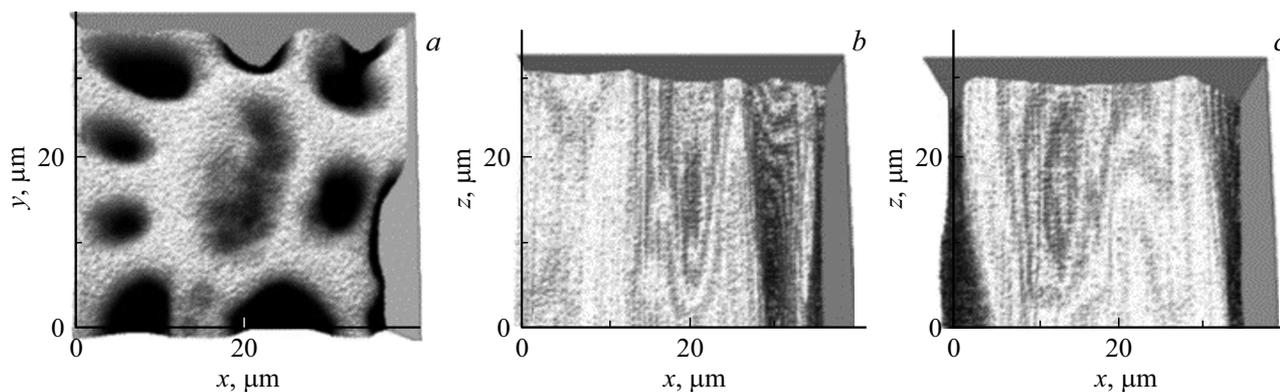


Рис. 7. Результаты томографического анализа клетки ландыша (рис. 6, *a*): *a* — горизонтальное сечение в плоскости $z = 15 \mu\text{m}$; *b, c* — вертикальные сечения в плоскостях $x = 18 \mu\text{m}$ и $y = 18 \mu\text{m}$ соответственно.

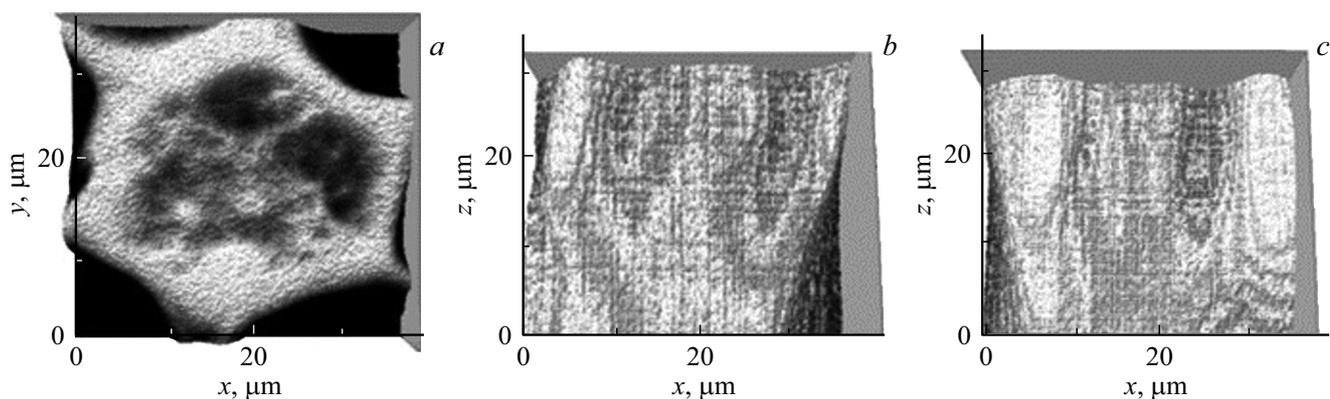


Рис. 8. Результаты томографического анализа клетки ландыша (рис. 6, *b*): *a* — горизонтальное сечение в плоскости $z = 23 \mu\text{m}$; *b, c* — вертикальные сечения в плоскостях $x = 18 \mu\text{m}$ и $y = 18 \mu\text{m}$ соответственно.

в настоящей работе значение пика выбиралось таким образом, чтобы реализовать наибольшую разрешающую способность самых мелких деталей в структуре рекон-

струкции клеток. При этом проверялось соответствие наибольшей оптической толщины клетки, оцениваемое по измеренному сигналу, оптической толщине, рассчи-

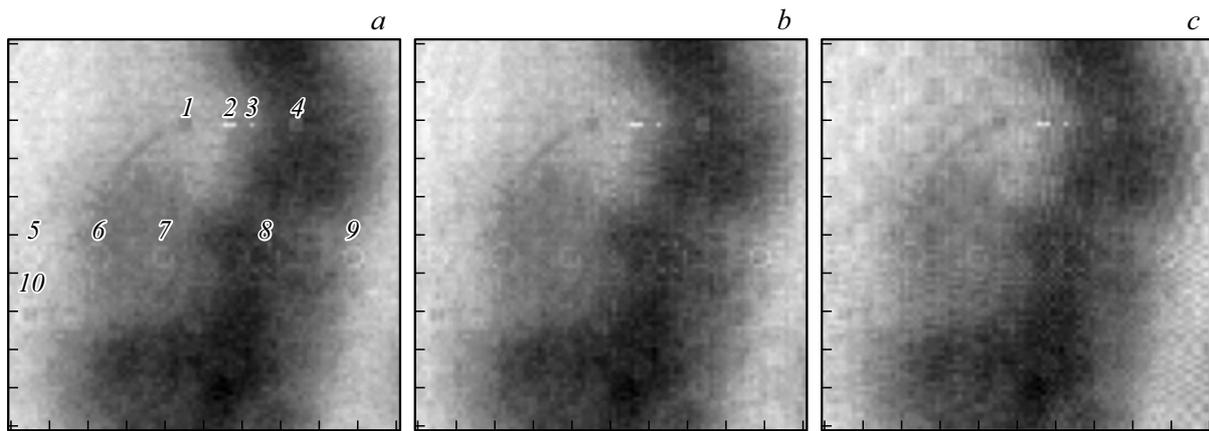


Рис. 9. *a* — область $12 \times 12 \mu\text{m}$ в центральной части клетки (рис. 7, *a*) в горизонтальном сечении, на котором можно видеть сечения вставленных неоднородностей: 1, 4 — прозрачный и поглощающий кубы $3 \times 3 \times 3$ пикселей; 2 — плоский объект $3 \times 1 \times 3$ пикселей; 3 — одиночный пиксель; 5–9 — оболочки $3D$ -сфероидов с радиусами $R = 2$ –4 пикселей и толщиной $dR = 1$ пиксель с поглощением 0.001 – $0.002 \mu\text{m}^{-1}$; 10 — шар с радиусом $R = 4$ пикселя с прозрачной полостью и оболочкой толщиной $dR = 2$ пикселя; *b* — то же горизонтальное сечение реконструкции $3D$ -распределения со вставленными неоднородностями при уровне погрешности 1%; *c* — сечение реконструкции при погрешности 2%.

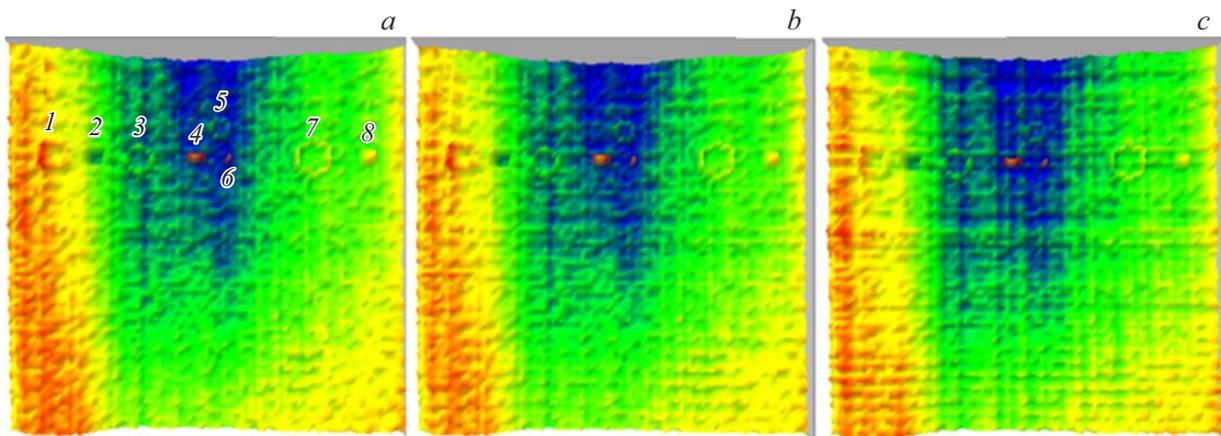


Рис. 10. *a* — область $12 \times 12 \mu\text{m}$ в центральной части клетки на рис. 7, *b* в вертикальном сечении, на котором можно видеть сечения вставленных неоднородностей: 1 — сфероид с радиусом $R = 4$ пикселя и толщиной $dR = 2$ пикселя; 2 — прозрачный куб $3 \times 3 \times 3$ пикселя; 3 — сферическая оболочка $R = 3$ пикселя, $dR = 1$ пиксель; 4 — плоский объект $3 \times 1 \times 3$ пикселя; 5 — сферическая оболочка $R = 2$ пикселя, $dR = 1$ пиксель; 6 — одиночный пиксель; 7 — оболочка сфероида $R = 4$ пикселя, $dR = 1$ пиксель; 8 — куб $3 \times 3 \times 3$ пикселя. *b* — то же вертикальное сечение реконструкции $3D$ -распределения со вставленными неоднородностями при уровне погрешности 1%; *c* — сечение реконструкции при погрешности 2%.

тываемой по наибольшему коэффициенту поглощения в реконструкции.

В косвенных методах диагностики, основанных на решении обратных задач, описываемых интегральными уравнениями, всегда возникает необходимость проверять полученное решение на наличие артефактов, которые могут имитировать наименьшие детали в реконструкции. Поэтому, чтобы отличить наименьшие детали в реконструкции клеток от артефактов, было выполнено численное моделирование с использованием сопоставимых по поглощению и размерам тестовых объектов, которые встраивались в полученную ранее реконструкцию клетки, и далее по описанной выше схеме численного

моделирования вычислялось $3D$ -распределение сигнала, добавлялась случайная погрешность и восстанавливалась $3D$ -томограмма распределения со встроенными неоднородностями. В таком моделировании уже имеется возможность сравнения восстановленного распределения с исходным, и тем самым открывается возможность оптимизации алгоритма.

На рис. 9, 10 представлены результаты томографической реконструкции выделенных областей относительной прозрачности в клетке, показанной на рис. 7, и моделирования реконструкции этих же областей со вставленными в них трехмерными, двумерными и точеч-

ными неоднородностями при различных уровнях относительной случайной ошибки.

В томографическом сечении на рис. 9, *a* видны многочисленные мелкие неоднородности поглощения ($0.001\text{--}0.003\ \mu\text{m}^{-1}$) — кольца (предположительно сечения оболочек сферических тел) толщиной 1–2 пикселя, а также (в левой части) крупномасштабная область с завитком толщиной 1–2 пикселя. В изображении также видны сечения 10 вставленных неоднородностей, включая сферические с поглощением $0.001\text{--}0.002\ \mu\text{m}^{-1}$, сравнимым с поглощением в естественных неоднородностях наблюдаемых колец. Можно видеть, что моделируемые сферические действительно представляются в сечении кольцами, а некоторые из них удачно имитируют находящиеся рядом естественные кольцевые объекты.

В сечении реконструированного с погрешностью 1% распределения с неоднородностями, показанного на рис. 9, *b*, все вставленные неоднородности отчетливо различимы, включая плоскую неоднородность толщиной в 1 пиксель и единичный пиксель. Результат доказывает, что наблюдаемые мелкие неоднородности реальны, а кольца соответствуют сечениям сферических, а разрешающая способность настроенного алгоритма составляет 1 пиксель ($0.14\ \mu\text{m}$). Это позволяет различить в области относительной прозрачности неоднородности, превышающие уровень шума на $0.001\text{--}0.002\ \mu\text{m}^{-1}$, что характеризует достигнутую в данном эксперименте точность определения коэффициента поглощения.

В сечении реконструированного с погрешностью 2% распределения поглощения на рис. 9, *c* вставленные неоднородности еще можно различить при сравнении данной реконструкции с исходной, но эффект шума уже сопоставим с ними по величине.

На рис. 10 представлены результаты аналогичного исследования области относительной прозрачности $12 \times 12\ \mu\text{m}$ в вертикальном сечении на рис. 7, *b*. Для наиболее точного воспроизведения деталей изображения использовано псевдотрехмерное представление в оттенках цвета. Уровень красного соответствует величине $\mu = 0.05\ \mu\text{m}^{-1}$.

На рис. 10, *a* видны многочисленные кольца толщиной 1–2 пикселя с поглощением $0.001\text{--}0.003\ \mu\text{m}^{-1}$, а также сечения 8 вставленных 3D-неоднородностей. Можно заметить, что большинство колец сплюснуто по вертикали, что указывает на форму сферических тел как близкую к сплюснутому по вертикали эллипсу.

В сечении реконструированного с погрешностью 1% распределения с неоднородностями, показанного на рис. 10, *b*, все вставленные неоднородности отчетливо различимы, включая плоскую неоднородность толщиной в 1 пиксель и единичный пиксель. Результат подтверждает реальность наблюдаемых мелких кольцевых неоднородностей, доказанную результатами моделирования на рис. 9, *b*, а также разрешающую способность и чувствительность метода реконструкции. Также он обосновывает реалистичность вывода о сплюснутой форме

сферических тел из сравнения формы колец на рис. 9 с их формой на рис. 10.

В сечении реконструированного с погрешностью 2% распределения поглощения на рис. 10, *c* вставленные неоднородности еще можно различить при сравнении данной реконструкции с исходной на рис. 10, *a*, но некоторые из них практически сливаются с фоном.

Заключение

Основные результаты выполненных исследований:

1. На основании развития теории геометрической оптики в рентгеновской томографии, численного моделирования и оптимизации по результатам экспериментальных данных разработан алгоритм рентгеновской томографии, реализующий разрешающую способность $0.14\ \mu\text{m}$, превосходящую разрешение оптических методов.

2. С использованием этого алгоритма выполнен томографический анализ клеток ландыша, в котором обнаружены многочисленные мелкие ($0.001\text{--}0.003\ \mu\text{m}^{-1}$) неоднородности поглощения в виде колец толщиной 1–2 пикселя ($0.14\text{--}0.28\ \mu\text{m}$) — предположительно, сечения оболочек сферических тел. Обнаружено также, что в вертикальных томографических сечениях эти кольца несколько сплющены, что позволяет сделать вывод о форме этих сферических тел.

3. Чтобы отличить наименьшие детали в реконструкции клеток от артефактов, было выполнено численное моделирование с использованием сопоставимых по поглощению и размерам тестовых объектов, которые встраивались в полученную ранее реконструкцию клетки, вычислялось 3D-распределение сигнала полученной структуры, добавлялась случайная погрешность и восстанавливалась 3D-томограмма распределения со встроенными неоднородностями. Сравнение восстановленного распределения с исходным доказало, что разрешающая способность настроенного алгоритма составляет 1 пиксель ($0.14\ \mu\text{m}$) при чувствительности к вариациям коэффициента поглощения $0.001\text{--}0.002\ \mu\text{m}^{-1}$.

Приведенные результаты продемонстрировали возможности применения разработанного метода рентгеновской томографии для количественной диагностики поглощающих клеточных структур с разрешением, превосходящим уровень, достижимый в оптических системах. Но отметим, что в реконструкциях метода могут присутствовать погрешности, связанные с отклонениями от использованного приближения малого поглощения, однако это плавные погрешности, не влияющие на разрешающую способность наиболее интересных мелких деталей. В дальнейших исследованиях планируется исследовать этот аспект более подробно и возможно найти способ соответствующего обобщения геометрической оптики рентгеновской томографии.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-62-00068).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] I.V. Malyshev, D.G. Reunov, N.I. Chkhalo. *Opt. Expr.*, **30** (26), 47567 (2022). DOI: 10.1364/OE.475032
- [2] К.П. Гайкович, И.В. Малышев, Д.Г. Реунов, Н.И. Чхало. *ЖТФ*, **93** (7), 867 (2023). DOI: 10.21883/JTF.2023.07.55739.106-23
- [3] E. Hanssen, C. Knoechel, M. Dearnley, M.W.A. Dixon, M. Le Gros, C. Larabell, L. Tilley. *J. Structural Biology*, **177** (2), 224 (2012). DOI: 10.1016/j.jsb.2011.09.003
- [4] D. Sage, L. Donati, F. Soulez, D.G. Schmit, A. Seitz, R. Guet, C. Vonesch, M. Unser. *Methods*, **115**, 28 (2017). DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.12.015
- [5] G. Vicidomini, P. Bianchini, A. Diaspro. *Nat. Methods*, **15**, 173 (2018).
- [6] V. Lučić, A. Rigort, W. Baumeister. *J. Cell Biol.*, **202** (3), 407 (2013).
- [7] K.E. Leigh, P.P. Navarro, S. Scaramuzza, W. Chen, Yi. Zhang, D. Castano-Diez, M. Kudryashev. *Methods Cell Biol.*, **152**, 217 (2019). DOI: 10.1016/bs.mcb.2019.04.003
- [8] P.A.C. Takman, H. Stollberg, G.A. Johansson, A. Holmberg, M. Lindblom, H.M. Hertz. *J. Microscopy*, **226**, 175 (2007).
- [9] C.A. Larabell, M.A. Le Gros. *Molecular Biology Cell*, **15**, 9572 (2004).
- [10] D. Weib, G. Schneider, B. Niemann, P. Guttmann, D. Rudolph, G. Schmah. *Ultramicroscopy*, **84**, 185 (2000).
- [11] M. Bertilson, O. von Hofsten, U. Vogt, A. Holmberg, E. Athanasia, Christakou, H.M. Hertz. *Opt. Lett.*, **36** (14), 2728 (2011).
- [12] M. Bertilson, O. von Hofsten, U. Vogt, A. Holmberg, H.M. Hertz. *Opt. Expr.*, **17** (13), 11057 (2009).
- [13] M. Toyoda, K. Yamasoe, T. Hatano, M. Yanagihara, A. Tokimasa, T. Harada, T. Watanabe, H. Kinoshita. *Appl. Phys. Express*, **5** (11), 112501 (2012).
- [14] L. Juschkin, R. Freiburger, K. Bergmann. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **186**, 012030 (2009).
- [15] A. Torrisi, P. Wachulak, Ł. Wegrzyn'ski, T. Fok, A. Bartnik, T. Parkman, Š. Vondrová, J. Tturňová, B.J. Jankiewicz, B. Bartosiewicz, H. Fiedorowicz. *J. Microscopy*, **265** (2), 1 (2016). DOI: 10.1111/jmi.12494
- [16] P.W. Wachulak, A. Torrisi, A. Bartnik, Ł. Wegrzyn'ski, T. Fok, H. Fiedorowicz. *Appl. Phys. B*, **123**, 25 (2017).
- [17] 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).
- [18] 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. *Quantum Electronicsthis*, **51** (8), 700 (2021).
- [19] И.В. Малышев, А.Е. Пестов, В.Н. Полковников, Н.Н. Салашенко, М.Н. Торопов, Н.И. Чхало. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, **1**, 3 (2019).
- [20] N.I. Chkhalo, M.N. Drozdov, E.B. Klunokov, S.V. Kuzin, A.Ya. Lopatin, V.I. Luchin, N.N. Salashchenko, N.N. Tsybin, S.Yu. Zuev. *Appl. Optics*, **55** (17), 4683 (2016).
- [21] J. Radon. *Akad. Wiss.*, **69**, 262 (1917).
- [22] А.Н. Тихонов, В.Я. Арсенин. *Методы решения некорректных задач* (Наука, М., 1986)
- [23] А.Н. Тихонов, В.Я. Арсенин, А.А. Тимонов. *Математические задачи компьютерной томографии* (Наука, М., 1987)
- [24] А.Н. Тихонов, А.В. Гончарский, И.В. Кочкиков, Э.И. Рау, Д.О. Савин, Г.В. Спивак, В.В. Степанов. *ДАН СССР*, **289** (5), 1104 (1986).
- [25] А.Н. Тихонов, П.Н. Бочикашвили, А.В. Гончарский, А.Н. Матвиенко, Е.И. Рау, Д.О. Савин, В.В. Степанов. *ДАН СССР*, **296** (5), 1095 (1987).
- [26] К.Р. Gaikovich. *Inverse Problems in Physical Diagnostics* (Nova Science Publishers Inc., NY., 2004)