

Локальная дифракционная томография биологических микрообъектов

© Г.Г. Левин¹, А.А. Самойленко^{1¶}, И.В. Горяинова¹, Г.В. Максимов²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия

² МГУ им М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

e-mail: ¶ asamoilenko@vniiofi.ru

Поступила в редакцию 20.06.2025 г.

В окончательной редакции 20.06.2025 г.

Принята к публикации 15.08.2025 г.

Разработана методика использования локальной томографии для исследования морфологии и динамики клеток и субклеточных структур, распространение оптического излучения в которых описывается уравнениями дифракционной томографии. Доказано, что преимущество локальной томографии заключается в том, что возможно быстрое вычисление искомого распределения в интересующей точке или области объекта без проведения полной реконструкции всего сечения, а также исследование биологических клеток, размер которых превышает поле зрения томографа. Разработан алгоритм обнаружения координат локальных изменений плотности внутри объекта. Методами математического моделирования проведен анализ чувствительности локальных алгоритмов к изменениям внутри модели клетки, параметры которой были выбраны близкими к характеристикам нативной клетки. Особое внимание было уделено сравнению локальных алгоритмов обратного проецирования (Радон) и обратного распространения (Деваней) для дифракционных проекций. Исследована чувствительность алгоритмов к фазовым шумам прибора и микросмещению объекта для различных моментов времени наблюдения. Приведены результаты экспериментальной апробации алгоритмов на примере набора локальных дифференциальных томограмм, полученных при исследовании изменений Retzius-нейрона пиявки под воздействием нейромедиатора — глутамата. Измерения проводились на дифференциальном томографе в течении 10 min. Анализ результатов показал, что разработанная методика позволяет исследовать локальные изменения внутри клетки.

Ключевые слова: дифракционная томография, локальные алгоритмы, живая клетка, динамическое изменение плотности.

DOI: 10.61011/OS.2025.09.61766.8278-25

Введение

Неинвазивное исследование внутриклеточной динамики морфологии субклеточных структур представляет большой интерес как при исследовании функции клеток, так и при анализе воздействия различных веществ на клетку. В настоящее время явно не хватает адекватных подходов и методик, позволяющих проводить неинвазивное исследование без изменений функции живой клетки, т. е. проводить измерения состояния в условиях *in vivo* и *in vitro* на живых и функционирующих биологических объектах. В то же время не решена проблема непосредственного наблюдения за субклеточными системами и состоянием клетки, проблема комплексного исследования динамического изменения отдельной клетки и ее структур. Очевидно, что изучение пространственно-временных изменений клетки с помощью неинвазивных методик позволит выявить механизмы как изменения состояния клетки, так и процесса доставки лекарственных препаратов в клетки и отдельные клеточные органеллы.

В настоящее время методы вычислительной томографии широко используются в оптической фазовой микро-

скопии для формирования методологии неинвазивного измерения пространственного распределения показателя преломления внутри прозрачных объектов, например живых клеток [1–6]. Очевидно, что для исследования трехмерных изменений цитоплазмы клетки можно использовать именно томографическое направление фазовой и абсорбционной микроскопии. Это обусловлено тем, что получение проекционных данных объекта осуществляется за счет зондирования плоским параллельным пучком света по различным угловым направлениям. В традиционной томографии диаметр пучка должен быть больше размера объекта. Однако на практике часто размер зондирующего пучка меньше области, занимаемой объектом. В микроскопии живых клеток это может быть обусловлено следующими причинами.

1. Необходимость исследования с высоким разрешением (увеличением) субклеточных органелл клетки, при котором размер клетки становится больше поля зрения микроскопа.

2. Морфология и состав биомолекул клеток специфичен, так что внешняя тонкая оболочка (плазматическая мембрана и цитоскелет) имеет больший показатель

преломления, чем цитоплазма. Сказанное приводит к тому, что при оптическом зондировании свет на краях клетки претерпевает дифракцию и/или рефракцию. Этот эффект можно устранить, если зондировать только центральную часть клетки и использовать пучок света, диаметр которого меньше поперечного размера клетки.

3. Необходимость ограничения области исследования и зондирования клетки при изучении динамики отдельных внутренних органелл клетки с целью сокращения времени съема данных, уменьшения фотодиструкции структур клетки и условий функционирования клетки в целом.

Мы считаем, что для всех приведенных выше задачах размер проекций должен быть меньше размера объекта. Можно выделить два основных ограничения, которые возникают при реконструкции томограмм подобных объектов. Во-первых, особенности оптической схемы многоракурсного зондирования препарата клеток и клеточных структур дает возможность зондирования объекта в ограниченном угле обзора [7], во-вторых, такой объект, как, например, нервная клетка или совокупность клеток, превышающих область зондирования, приводит к проблеме неполных проекций. Эти ограничения делают задачу реконструкции томограмм, используя обратное преобразование Радона или инверсию дифракционных проекций, существенно некорректной и приводят к многочисленным артефактам в восстановленном изображении, для компенсации которых надо ухудшать пространственное разрешение.

Необходимость реконструкции томограмм по ограниченным по пространству проекциям привела к разработке новых алгоритмов и появлению так называемой локальной томографии, которая позволяет восстанавливать томограммы только тех областей объекта, которые представляют интерес (Region-of-interest, ROI) [8,9]. Локальная томография (или как ее иногда называют ROI-томография) дает возможность независимого и быстрого вычисления искомого распределения в интересующей точке или области без проведения полной реконструкции.

Очевидно, что изображения, которые получаются в локальной томографии, являются только некоторым приближением реальных распределений плотности внутри исследуемых объектов и требуют подтверждения результатов с помощью других методов (флуоресцентная микроскопия, раман-спектроскопия и т.д.). При этом связь между распределением, формируемым в локальной томографии, и истинным хорошо известна (см., например, [10]). Основным достоинством локальной томографии является ее чувствительность к изменениям внутренней структуры, что вытекает из реализации операций обратного проецирования и суммирования многоракурсных проекций. Поэтому представляет интерес использовать методы локальной томографии для анализа изменений, которые происходят в клеточной структуре, не проводя ее полной трехмерной реконструкции.

Как известно, для живых клеток характерны несколько эффектов, которые приводят к изменению ее фазового изображения. Во-первых, локальные колебания мембраны, называемые также фликкер, или динамические флуктуации мембраны. Во-вторых, движение органелл внутри клетки (циклозис), в третьих, изменения, связанные с синтезом и распадом белка, которые приводят к флуктуации плотности внутри клетки. В результате указанных процессов происходят изменения фазы прошедшего через объект волнового фронта света. Важно, что локальная томография позволяет выявить локальные изменения внутренней структуры клетки, в частности дифференцировать изменения в фазовом изображении изменение формы клетки от изменения плотности как цитоплазмы, так и субклеточных структур. Также при этом возможно анализировать и характер шума, выделяя определенные частоты колебаний фазы и оценивая с их помощью динамические процессы, протекающие в клетках.

Ранее мы выявили особенности локальной томографии, основанной на инверсии Радона, и возможности ее применения для исследования внутренней структуры биологических объектов [10]. Однако известно, что инверсия Радона справедлива только для случая, когда распространение излучения через объект описывается либо уравнением прямой, либо кривой второго порядка. Возможно также применение инверсного преобразования для случая однократного рассеяния в приближении Борна или Рытова для уравнения эйконала [11,12]. В настоящее время для исследования методами оптической томографии живой клетки используются также методы дифракционной томографии, основанной на данном приближении. Важно, что возможность применения локальной дифракционной томографии (ЛДТ) биологических объектов практически не обсуждалась.

Целью настоящей работы было развитие методов ЛДТ и исследование их чувствительности к малым изменениям внутренней структуры объектов, для обеспечения измерений локальных структурно-морфологических и динамических характеристик изолированных функционирующих клеток и клеточных структур. Предложен алгоритм определения координат области изменения плотности внутри микрообъекта, а также особое внимание было уделено сравнению дифракционной и радоновской локальных инверсий применительно к дифракционным проекциям.

Уравнения ЛДТ

Для определения основных уравнений ЛДТ ограничимся двумерным случаем. Пусть распределение показателя преломления внутри объекта описывается функцией $f(x, y)$.

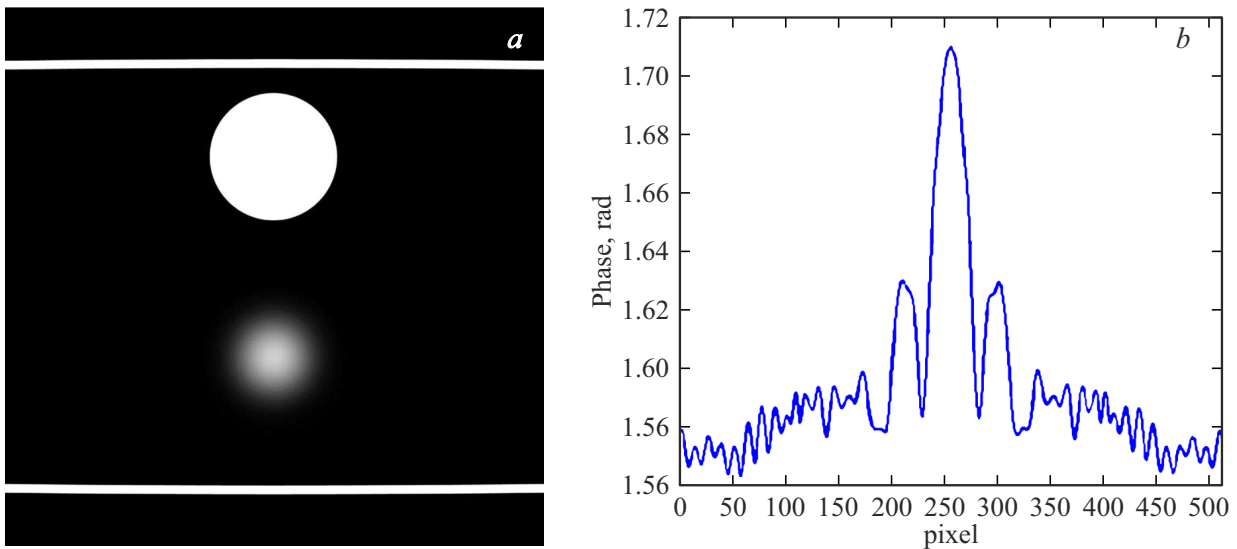


Рис. 1. Модель сечения клетки. (а) Дифракционная проекция модели, полученная под углом зондирования $\phi = 0$. (б) Проекция вычислена по формуле (1).

Следуя работе [12], запишем уравнение дифракционной проекции в следующем виде:

$$f_D^v(p) \int_{-\infty}^{\infty} \frac{k_0}{\sqrt{k_0^2 - k^2}} \times \exp \left[-i \left[kp + \left(\sqrt{k_0^2 - k^2} - k_0 \right) (q - l) \right] \right] \times dx dy \exp[ikp] dk, \quad (1)$$

где $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$, ϕ — угол зондирования, $p = x \sin \phi + y \sin \phi$, $q = -x \sin \phi + y \cos \phi$, l — расстояние от плоскости регистрации до центра объекта, k — координата в частотной области.

Данное уравнение использовалось для моделирования процесса получения дифракционных проекций.

В качестве объекта взята математическая модель клетки, размер которой превышает поле зрения микроскопа. Изображение её представлено на рис. 1, а.

Размер изображения 256×256 пикселей ($20 \times 20 \mu\text{m}$). Объект имитирует клетку, отделённую от внешней среды плоской мембраной, с ядром и включением переменной плотности. Иммерсия и жидкая внутриклеточная среда обладают равными показателями преломления. Мембрана и ядро отличаются от показателя преломления внутриклеточной среды на величину Δn , равную 0.1.

Расчёт проведён в относительных величинах, поэтому показатель преломления иммерсии и внутриклеточной среды принимается равным нулю: $n_{\text{im}} = n_{\text{icm}} = 0$, а показатели преломления клеточных структур (мембрана, ядро, включение) равными $n_{\text{cell}} = n_{\text{icm}} + \Delta n = 0.1$.

Форма объекта. Для имитации протяженной клетки, размер которой превышает поле зрения микрообъектива,

мембрана представляет из себя две параллельные линии на расстоянии $21 \mu\text{m}$ толщиной $1 \mu\text{m}$ и с показателем преломления n_{cell} , равным 0.1. Ядро из себя представляет круг, расположенный в верхней части клетки, диаметром $4.8 \mu\text{m}$ и с равномерно распределённым по всей площади круга показателем преломления n_{cell} , равным в каждой точке внутри данного круга 0.1. Включение переменной плотности представляет из себя неоднородность, расположенную в нижней части клетки, с показателем преломления, распределённым внутри круга диаметром 30 пикселей, по закону Гаусса:

$$A \exp - \frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{\sigma^2},$$

где A — максимальное значение гауссианы, равное показателю преломления $n_{\text{cell}} = 0.1$; x_0, y_0 — координаты центра гауссианы, σ — параметр, определяющий ширину гауссианы, $\sigma = 2.5 \mu\text{m}$.

Объект освещается плоской волной с различных направлений.

На рис. 1, б представлена центральная проекция ($\phi = 0$), вычисленная от модельного объекта.

Используя описанную модель, формировался набор дифракционных проекций для различных углов зондирования.

Алгоритм ЛДТ основан на уравнениях обратного распространения [12]. В случае ограниченных проекций мы не имеем возможности осуществлять их фильтрацию, необходимую для восстановления томограмм как в случае дифракционной томографии, так и в случае радоновской томографии [10]. Поэтому формирование дифракционного суммарного изображения из ограничен-

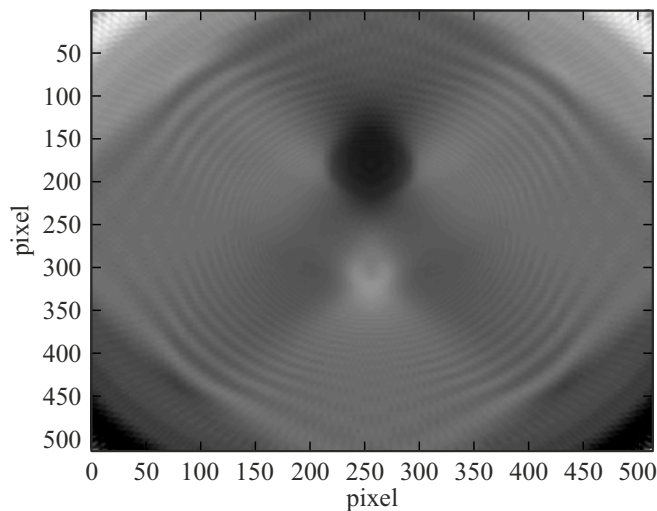


Рис. 2. Восстановленное изображение модели клетки (распределение фазы). Использовался алгоритм ЛДТ при ограниченном угле зондирования ($\phi = \pm 37.5^\circ$) и апподизированным проекциям.

ных проекций можно описать выражением

$$f_D^V(p, q) = \int_{-A}^A f_D^V(p') G(p - p', q - l) dp',$$

$$G(p, q) = \frac{1}{2\pi} \int_{-k}^k dk \exp i \left[kp + \left(\sqrt{k_0^2 - k^2} - k \right) q \right], \quad (2)$$

$$F_D(x, y) =$$

$$\int_{-\varphi_0}^{\varphi_0} f_D(x \sin \varphi + y \cos \varphi; -x \sin \varphi + y \cos \varphi, \varphi) d\varphi. \quad (3)$$

В дальнейшем проводится сравнение изображений, полученных методом реконструкции локальной томографии по дифракционным проекциям для деванеевской (дифракционной) и радоновской (прямолинейной) формулам обращения. Для радоновской локальной томографии формула обращения имеет вид

$$F_R(x, y) = \int_{-\varphi_0}^{\varphi_0} f_D(x \sin \varphi + y \cos \varphi) d\varphi. \quad (4)$$

Анализ чувствительности метода ЛДТ. Моделирование

Применение метода локальной томографии как в дифракционном варианте, так и в радоновском приближении в условиях ограниченного угла обзора и неполных проекций не позволяет восстанавливать томограммы

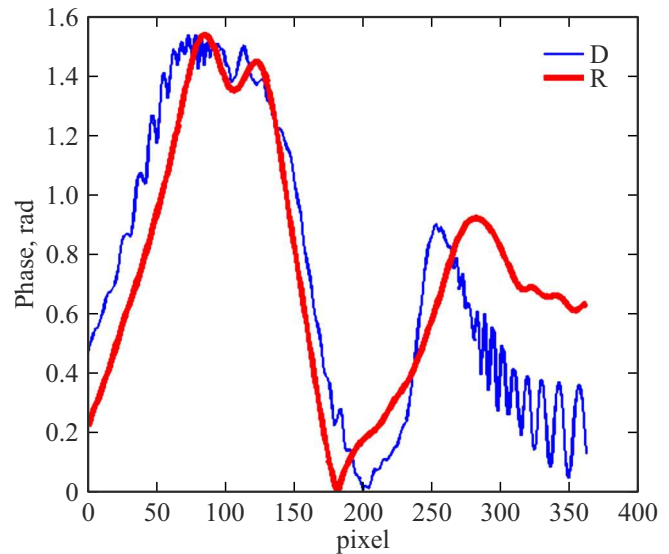


Рис. 3. Распределения восстановленной фазы, соответствующие плотности внутри клетки (в относительных единицах) и вычисленные по дифракционным проекциям от модели по алгоритму обратного проецирования (толстая линия, красная кривая) и алгоритму обратного распространения (тонкая линия, синяя кривая).

приемлемого качества. Поэтому в данном случае необходимо ограничить задачу и сформировать алгоритм исследования локальной внутренней динамики клетки, т.е. осуществить поиск координат областей внутри клетки, в которых происходят изменения, наблюдаемые на её фазовом изображении, т.е. в дифракционной проекции.

Для исследования влияния ограничения размера проекций на качество локального восстановления приводилось компьютерное моделирование для модели клетки, описанной в предыдущем разделе. При этом размер проекции искусственно ограничивался. Установлено, что ограничение размера проекций при локальной реконструкции с использованием алгоритма обратного распространения по формулам (2) и (3) приводит к сильным артефактам из-за разрыва функции на краю проекции. Компенсация краевого эффекта производилась следующим образом: все значения проекции выше линии „обрезания“ заменялись на среднее, вычисленное вдоль выбранной линии. Аналогично для нижней границы обрезания. Результат восстановления изображения по такой уменьшенной в два раза синогамме приведён на рис. 2.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что существенное изменение изображения начинается в случае уменьшения размера проекции, когда обратные проекции не перекрывали исследуемую область изменений объекта. Поэтому в дальнейшем при анализе чувствительности процесса локального восстановления к изменению объекта мы ограничились „обрезанием“

проекций, при котором как обратное проецирование, так и обратное распространение полностью перекрывали выбранную область внутри объекта для всех проекций. В нашем случае это была область внутри модели клетки, в который расположена неоднородность, описываемая функцией Гаусса.

Необходимо отметить, что при исследовании динамики изменений клетки важно исключить влияние внешних факторов на состояние объекта и соответственно на интерференционную картину (вибрация и периодические смещения оптических элементов, собственный фазовый шум). Существенное влияние также оказывает микро-смещение объекта в процессе наблюдений, так как это не позволяет достоверно определить причину изменения фазовых изображений (проекций) во времени, что важно, например, при изменении состава среды инкубации клетки.

При анализе чувствительности ЛДТ представляют интерес сравнения результатов применения алгоритмов обратного распространения и обратного проецирования дифракционных проекций, так как подобное сравнение позволит выявить особенности каждого из алгоритмов и определить области их применения.

При исследовании изменений внутри клетки в первую очередь необходимо выбрать область изменений, т.е. определить координаты области изменения показателя преломления (плотности) внутри неё по глубине (вдоль выбранного направления) в течение времени наблюдений.

Нами был предложен и реализован следующий алгоритм [13], который мы рассмотрим на примере алгоритма обратного проецирования.

По фазовому изображению, полученному под углом $\varphi_0 = 0$ в момент времени t_1 , выбирают область (x_1, y_1) на фазовом изображении клетки, в которой определяют флуктуации формы либо показателя преломления с координатами (z, x_1, y_1) . Затем, при вычислении распределения фазы поля вдоль оси z с использованием алгоритма обратного распространения использовались формулы (3) и (4).

На рис. 3 представлены распределения восстановленной фазы, соответствующее плотности внутри клетки (в относительных единицах), вычисленные по дифракционным проекциям от модели по алгоритму обратного проецирования (R) — красная кривая и алгоритму обратного распространения (D) — синяя кривая. Из графика следует, что использование выбранного нами алгоритма обратного распространения при ограничении проекций и угла обзора приводит к возникновению незначительных дифракционных осцилляций в восстановленном изображении (они также заметны на двумерном изображении рис. 2). Максимумы включений внутри модели также смещены друг относительно друга на несколько пикселей. Координата максимума распределения ближе к истинному положению неоднородности в дифракционном изображении, и оно обладает лучшей разрешающей способностью.

Для определения изменения плотности внутри клетки используется следующий подход: вычисляют сумму фаз с теми же координатами (z, x_1, y_1) в момент времени t_2 , получая функцию $f_2(z)$. Значение z , при котором достигается глобальный экстремум разности $f_1(z) - f_2(z)$, соответствует координате z внутри или на поверхности клетки, в которой происходит изменение. Обработывая по данному алгоритму всю совокупность n измерений, можно определить изменение во времени суммы фаз, которое зависит только от деформации формы мембраны либо от флуктуации плотности в данной области клетки.

Фазовый шум прибора на разности двух изображений в разные моменты времени не будет зависеть от координаты z , так как будет скомпенсирован при вычитании и, таким образом, не скажется на координате глобального максимума, однако приведет к постоянному смещению всего распределения $f_1(z) - f_n(z)$. Эта постоянная составляющая легко может быть учтена при анализе динамики изменений объекта.

Для исследования чувствительности к изменениям исходного объекта различных методов восстановления было проведено следующее моделирование. В исходном объекте изменялась амплитуда гауссовой функции на 2, 5, 10 и 15% от начальной величины. В ряде работ [14–16] было показано, что именно на такую величину изменяется показатель преломления белка в процессе конформации. Затем от объекта вычислялись дифракционные проекции по разработанному алгоритму. Каждая из вычисленных проекций „обрезалась“ в два раза, и края апподизировались по алгоритму, описанному выше. Затем методами обратного проецирования и обратного распространения формировались локальные распределения фазы вдоль выбранного направления, параллельного оси z . Полученные два набора по четыре распределения, соответствующие различным значениям амплитуды гауссианы, служили исходными данными для определения координат области изменения плотности внутри модели клетки. Из каждого из этих распределений вычиталось первое с минимальной амплитудой гауссианы.

На рис. 4, *a* приведены графики, соответствующие восстановлению разности распределения фазы вдоль оси z методом обратного распространения (D), для случая изменения угла зондирования в диапазоне $\pm 37.5^\circ$ и шага между направлениями зондирования 4° . Такие параметры зондирования были выбраны потому, что они соответствуют характеристикам томографа, который мы использовали в наших экспериментальных исследованиях нервных клеток большого размера [17].

На рис. 4, *b* представлены аналогичные распределения, полученные методом обратного проецирования (R). На профилях фазы координаты максимума неоднородности не совпадают между собой при различных алгоритмах вычислений (рис. 3), на распределении разности фаз координаты максимумов изменений практически совпали между собой и с координатами неоднородности (рис. 4, *a* и 4, *b*). Использование алгоритма обратного

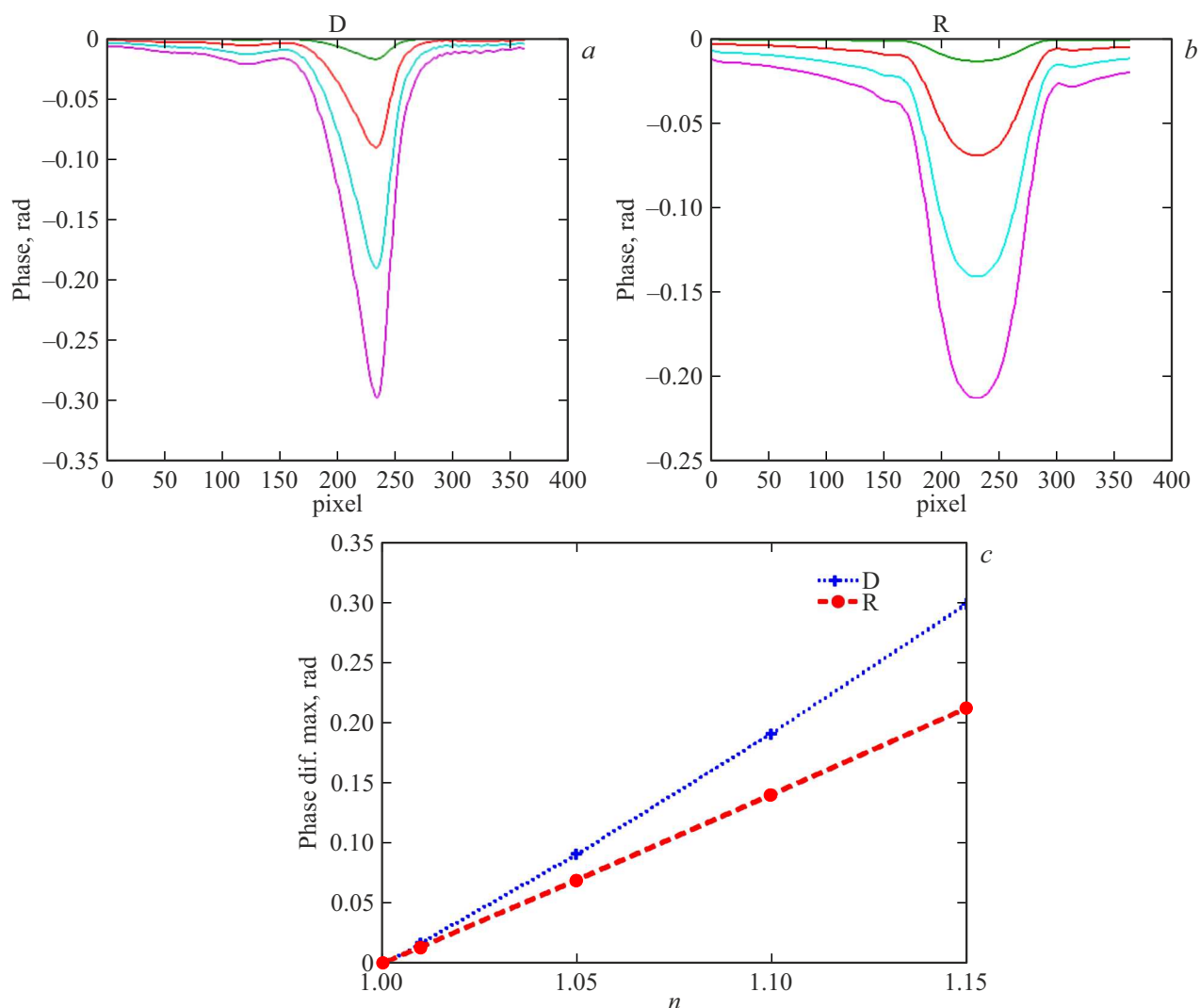


Рис. 4. Разности распределения фазы вдоль оси z , вычисленные методом обратного распространения (D) для различных значений амплитуды гауссовой функции модели клетки (a). Разности распределения фазы вдоль оси z , вычисленные методом обратного проецирования (R) для различных значений амплитуды гауссовой функции модели клетки (b). Графики зависимостей максимумов распределений разности фазы вдоль оси z от изменений амплитуды гауссовой функции модели клетки (c).

распространения дает более высокое разрешение вдоль оси z и позволяет более точно определить положение изменяющейся неоднородности. Заметим, что небольшие изменения угла зондирования и числа проекций не приводят к каким-либо существенным изменениям результатов моделирования.

Представленные кривые описывают не саму восстановленную фазу, а её вариацию при изменении амплитуды неоднородности на модели. Для количественной оценки изменений были построены графики зависимостей максимумов распределений на рис. 4, a и 4, b от параметра n , который соответствует изменению амплитуды гауссианы на модели. По оси ординат на картинке ниже отложены значения фазы, нормированные на высоту гауссианы, по оси абсцисс — значения параметра n . Параметр n , равный 1, соответствует исходной (минимальной) амплитуде гауссианы. Значение

1.15 соответствует увеличению на 15%. Из графика следует, что зависимость линейна для обоих алгоритмов, но обратное распространение более чувствительно к изменению объекта.

Предложенный алгоритм позволяет компенсировать собственные фазовые шумы прибора, но при этом влияние собственного движения живого микрообъекта на изменение фазового изображения остается. Движения микрообъекта, превышающие разрешающий интервал микрообъектива, заметны на фазовом изображении и могут быть компенсированы при последующей обработке. Малые колебания объекта в пределах разрешающей способности могут сказаться на сравнении результатов измерений в разные моменты времени. Для нашей модели такие микросмещения соответствуют 1–5 пикселям в изображении проекций.

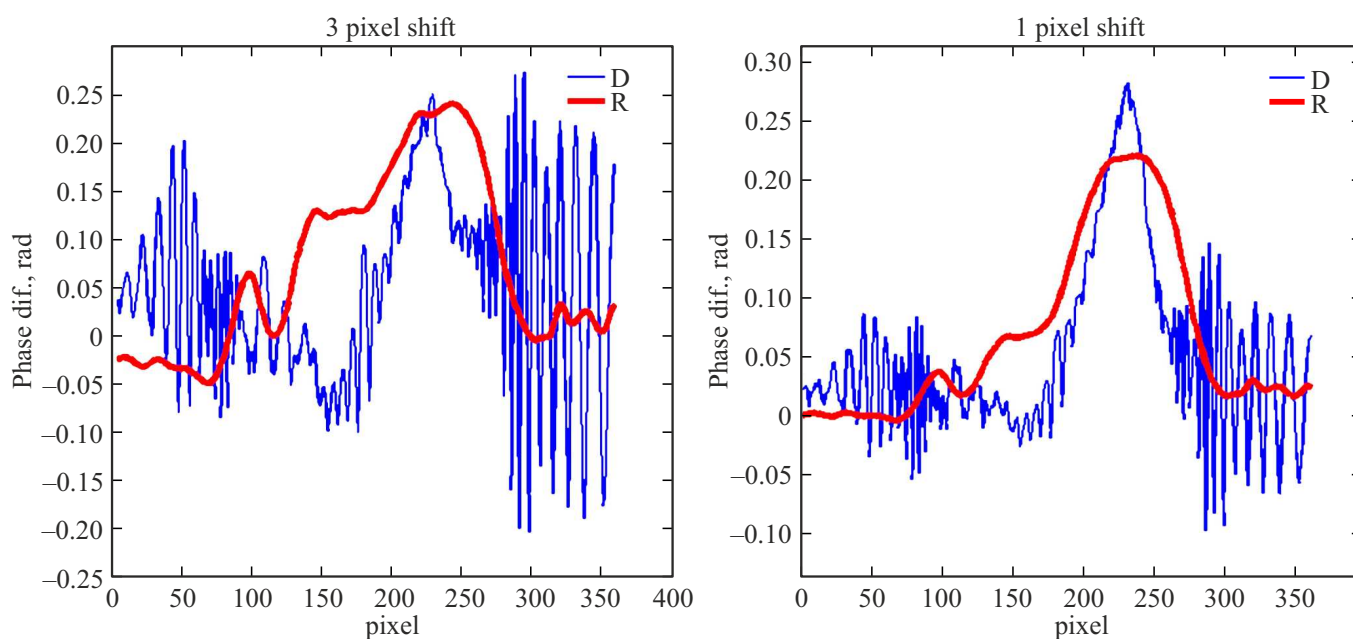


Рис. 5. Разность двух распределений восстановленных фаз вдоль оси z , проходящей через максимум неоднородности, при различных значениях амплитуды гауссовой функции модели клетки при смещении объекта между вычислениями на 3 пиксела в пространстве объектов. Красная (толстая) линия — обратное проецирование (R), синяя (тонкая) линия — обратное распространение (D) (a). Разность двух распределений восстановленных фаз вдоль оси z , проходящей через максимум неоднородности, при различных значениях амплитуды гауссовой функции модели клетки при смещении объекта между вычислениями на 1 пиксел в пространстве объектов. Красная (толстая) линия — обратное проецирование (R), синяя (тонкая) линия — обратное распространение (D) (b).

На рис. 6 представлена разность двух распределений восстановленных фаз вдоль оси z , проходящей через максимум неоднородности, при различных значениях амплитуды гауссианы.

Полученные результаты предлагаемой модели свидетельствует о том, что реконструкция с использованием обратного проецирования мало чувствительна к малым смещениям объекта. На рис. 6, a смещение второго кадра составило один пиксел, на рис. 6, b смещение составило 3 пиксела. При использовании алгоритма обратного распространения возникают множество ложных максимумов, вызванных смещением дифракционных лепестков в восстановленном изображении. Это позволяет предложить способ поиска координат изменения структуры клетки, основанный на совместной обработке изображений, сформированных различными локальными алгоритмами реконструкции.

Экспериментальная апробация метода ЛДТ

В данной серии экспериментов исследовали возможность применения алгоритмов, описанных в предыдущем разделе к анализу реального живого микрообъекта — нейрона. В качестве объекта исследования использовали Retzius-нейроны пиявки [17]. Пиявка в течение 60 min

находилась в среде с 5-гидрокситриптофаном (предшественник серотонина), далее нейрон пиявки выделяли и инкубировали в среде, содержащей 115 mmol NaCl, 4 mmol KCl, 1.8 mmol MgCl₂, 1 mmol CaCl₂, 10 mmol Tris, 10 mmol глюкозы. Так как размер клетки превышал поле зрения микротомографа, то выбранный размер проекции был меньше объекта. Толщина клетки не превышала 5–7 μm . В ходе эксперимента сначала регистрировали проекции нейрона в контроле, а затем в опыте после инъекции в раствор нейромедиатора — глутамата. Были проведены следующие серии экспериментов: контрольное измерение (без добавления глутамата), измерение с добавлением глутамата в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ mmol/l и глутамата 10^{-2} mmol/l к клетке. Изменения томограмм были обнаружены в примембранной области и приядерной области клетки (так как там локализованы кластеры везикул, содержащих серотонин) только при добавлении глутамата 10^{-2} mmol/l. Измерения проводились после того, как к образцу было добавлено действующее вещество высокой концентрации. Проводилось восстановление томограмм из экспериментальных данных, полученных на нейроне. Так как толщина клетки маленькая и фазовый набег небольшой, то для лучшей визуализации использовались дифференциальные проекции: в течение 10 min было зарегистрированы данные для 37 томограмм по 100

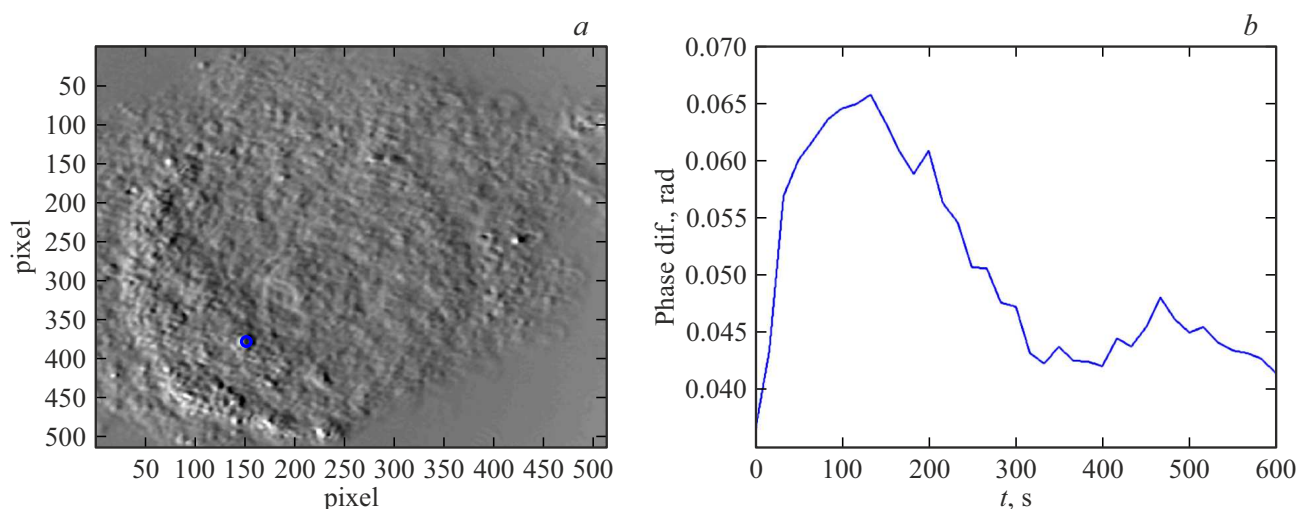


Рис. 6. Дифференциальная проекция, полученная при $\varphi = 0$ для первой томограммы Retzius-нейрона пиявки. Точка интереса в придерной области клетки, где наблюдались изменения, отмечена на ней кружком (а). Зависимость от времени изменения фазы на дифференциальной проекции клетки, полученной при $\varphi = 0$ в выбранной точке интереса (b).

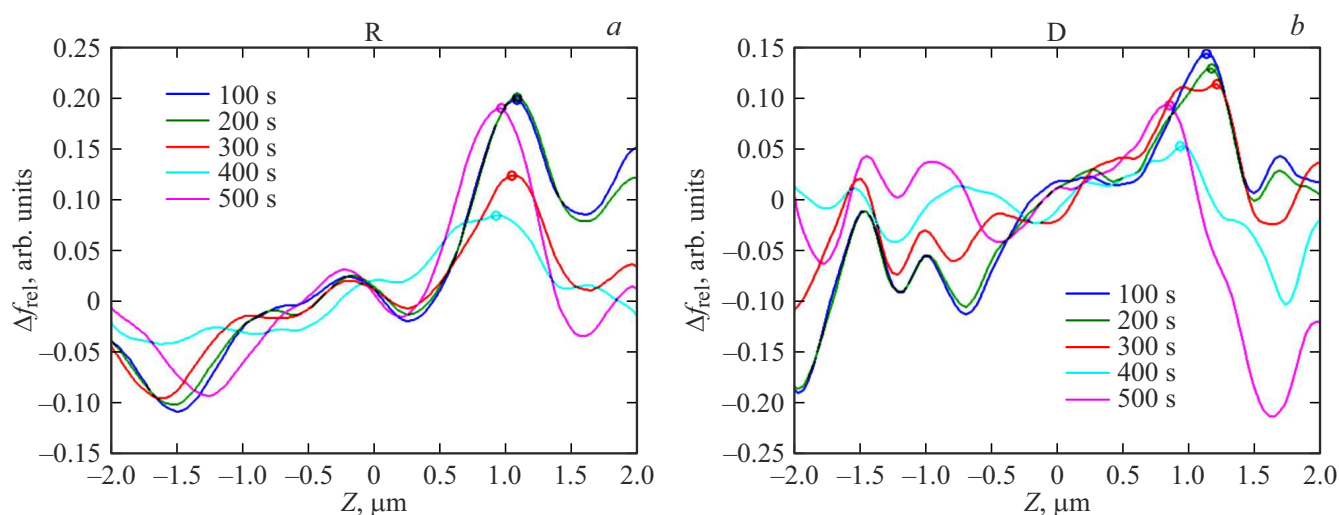


Рис. 7. (а) Графики, соответствующие восстановлению разности распределения фазы вдоль оси z в точке интереса методом обратного проецирования (R) для пяти разных моментов времени. (b) Аналогичные графики, полученные методом обратного распространения (D).

проекций, которые были получены в диапазоне углов от -32° до 32° .

Для проведения экспериментальных исследований использовался оптический фазовый микротомограф, разработанный во ВНИИОФИ. Его схема и конструктивные особенности подробно описаны в [18,19]. Основой его является микроскоп проходящего типа с интерферометром бокового сдвига, который позволяет формировать дифференциальные проекции. В качестве источника низкокогерентного излучения использовался точечный светодиод LED (рис.3) фирмы Kyosemi Co., Япония, модель KED080RAXH, центральная длина волны излучения 652 nm, полуширина спектра излучения 10 nm, мощность излучения 0.6 mW при токе 25 mA с излу-

чающей площадкой около $80 \mu\text{m}$. Излучение светодиода коллимировалось объективом с фокусным расстоянием 12 mm. Образец освещали параллельным лучом света (под разными углами) через широко апертурный объектив ($100\times$, NA 1.30, иммерсионный, UPlanFLN100X02, Olympus). Для углового зондирования объекта применяли сканер в виде одноосного гальванического зеркала GVS011 (ThorLabs, США). Угловой диапазон сканирования в данном эксперименте составлял от -32° до 32° . Изображение строилось таким же объективом, какой использовался для освещения. Фазовые изображения восстанавливались методом интерферометрии фазовых шагов.

Полученная серия томограмм была обработана по описанному в предыдущих разделах алгоритму. На рис. 6 представлена дифференциальная проекция, полученная при $\varphi = 0$ для первой томограммы. На ней выбиралась точка интереса в приядерной области клетки, где наблюдались изменения, она отмечена на рис. 6, *a* кружком. На рис. 6, *b* представлена зависимость от времени изменения фазы на проекции, полученной при $\varphi = 0$, в выбранной точке интереса. Затем для каждой томограммы восстанавливалось распределение плотности вдоль линии параллельной оптической оси (ось z), содержащей точку интереса.

Реконструкция распределения проводилась в области фокусировки микрообъектива при регистрации проекций ($l = 0$, формула (1)). Анализ томограмм показал, что полезную информацию несёт только центральный слой толщиной в несколько микрон. Поэтому были выбраны зависимости плотности от времени (номера томограммы) только для z в диапазоне от -2 до $+2 \mu\text{m}$. При этом для удобства сравнения и компенсации фазового шума микротомографа, который неизбежен в течении десятиминутного эксперимента, была проделана следующая процедура преобразования полученных распределений. Обозначим восстановленные зависимости показателя преломления от z в точке интереса x_{ROI} , y_{ROI} как $f_{R,D}^{\text{ROI}}(z, t)$. Нижние индексы R и D обозначают соответствующие алгоритмы — по Радону или по Де-ванею. Поскольку нормировка значений, полученных по разным алгоритмам, представляет собой нетривиальную задачу, для удобства сравнения результатов была проведена процедура масштабирования данных по следующим формулам:

$$\begin{aligned} f_R(z, t) &= f_R^{\text{ROI}}(z, t), \\ f_D(z, t) &= a f_D^{\text{ROI}}(z, t) + b. \end{aligned} \quad (5)$$

Здесь коэффициенты a , b в (5) вычислялись по формуле

$$\min_{a,b} \sum_z (f_R^{\text{ROI}}(z, 0) - a f_D^{\text{ROI}}(z, 0) - b)^2.$$

В дальнейшем проводился анализ не самих восстановленных значений, а их изменений во времени. Для этого были вычислены величины, которые представляют собой изменения значений относительно начального момента времени $t = 0$, нормированные на распределение по z в начальный момент времени:

$$\Delta f_{R,D}(z, t) = \frac{f_{R,D}(z, t) - f_{R,D}(z, 0)}{f_{R,D}(z, 0)}.$$

На получившихся зависимостях отчётливо выделялись участки по z , на которых нет никаких особенностей, и участки, на которых во времени происходят изменения. Кроме того, на графиках присутствовала медленно меняющаяся во времени постоянная составляющая, которую следует отнести к низкочастотному фазовому шуму прибора. Поэтому для удобства сравнения из всех зависимостей $\Delta f_{R,D}(z, t)$ были вычтены постоянные составляющие, которые вычислялись как средние по

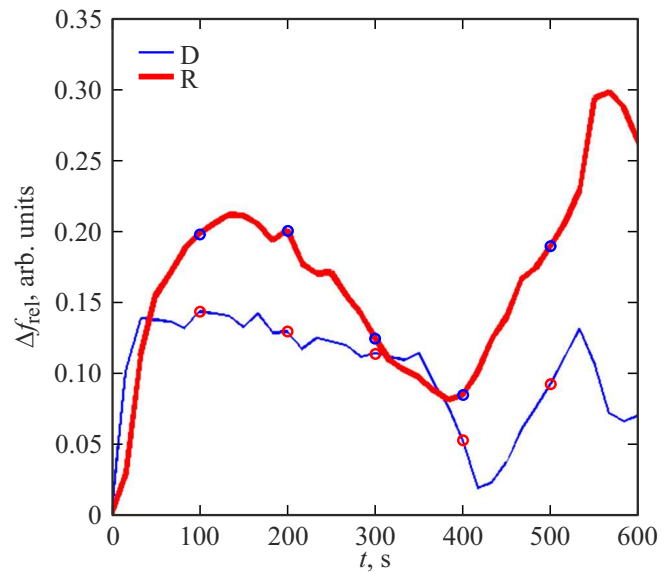


Рис. 8. Изменение плотности Δf_{rel} в относительных единицах в зависимости от времени. Значения f брались в точке $z = 1 \mu\text{m}$ от линии фокусировки. Красная (толстая) линия — обратное проецирование (R), синяя (тонкая) линия — обратное распространение (D).

участкам z без особенностей. Для восстановления по Радону этот диапазон составил от -1.5 до $0.5 \mu\text{m}$, а для восстановления по Де-ванею — от 0.5 до $0.5 \mu\text{m}$. Полученные зависимости для нескольких значений t приведены на рисунках ниже.

На рис. 7, *a* приведены графики, соответствующие восстановлению разности распределения фазы вдоль оси z методом обратного проецирования (R) для пяти разных моментов времени. На рис. 7, *b* аналогичные графики, полученные методом обратного распространения (D).

Отметим, что результат обработки экспериментальных данных совпадает с результатами моделирования (рис. 4, *a*, 4, *b* и рис. 5). Изменения во времени разности фаз как в случае обратного проецирования (рис. 7, *a*), так и в случае обратного распространения имеют одинаковую тенденцию (в зависимости от состояния клетки). Очевидно, что в течении 10 min стимуляции рецепторов клетки под действием медиатора (глутамата) кластеры микровезикул в цитоплазме клетки смещаются в направлении из клетки, что практически не сопровождается изменениями фазового изображения. Поэтому на графике зависимости разности фаз от z возникают вторичные максимумы. Разность фаз на рис. 7, *a* более сглаженная и с минимальным количеством вторичных максимумов. На рис. 7, *b* много максимумов, вызванных микросмещениями объекта, поэтому выделить точку, в которой происходят максимальные изменения достаточно сложно. На рис. 7, *a* мы выбрали точку на оси z , в которой проходили максимальные изменения разности фаз, соответствующие изменению плотности внутри клетки, на рис. 8 представлено изменение плотности ΔI

в зависимости от времени. Значения брались в точке $Z = 1 \mu\text{m}$ от линии фокусировки.

Отметим, что вид обеих кривых мало отличается друг от друга, как было и при моделировании (рис. 4, *c*), свидетельствуя, что результаты восстановления изменений плотности внутри клетки в выбранной точке с использованием алгоритмов обратного распространения и обратного проецирования практически совпадают. Сравнение с изменением во времени измеренной фазы в точке интереса, выбранной на проекции, полученной при $\varphi = 0$ (рис. 6, *b*), показывает, что локальное изменение плотности внутри клетки под действием глутамата на глубине $1 \mu\text{m}$ от плоскости фокусировки практически полностью определяет трансформацию её фазового изображения. Таким образом, предложенный алгоритм позволяет определить координаты органеллы внутри клетки, наиболее чувствительной к внешнему воздействию.

Заключение

Настоящее исследование посвящено разработке нового метода анализа внутриклеточной динамики биологических объектов, размер которых превышает поле зрения микротомографа и реконструкция внутренней структуры которых невозможна. Эта задача очень актуальна для исследования динамики больших единичных клеток, а также клеточных структур, так как позволяет анализировать, какие органеллы клеток наиболее чувствительны к воздействию внешних раздражителей.

При этом учитывалось, что распространение оптического излучения в такого рода структурах описывается не уравнением эйконала, а дифракционным уравнением по крайней мере в борновском приближении. Поэтому задача локализации области изменения структуры внутри клетки потребовала, с одной стороны, разработки метода ЛДТ и его исследования методами математического моделирования и, с другой стороны, разработки алгоритма определения координат этой области.

Математическое моделирование процесса локальной реконструкции и экспериментальная апробация показали, что разработанные нами алгоритмы обработки дифракционных проекций позволяют определять координаты локальных изменений плотности внутри клетки даже в том случае, когда её размер существенно превышает поле зрения микрообъектива. При этом необходимо отметить, что повышенная чувствительность реконструкции к микросмещениям объекта между экспозициями не позволяет определять координаты области изменений плотности внутри клетки при помощи алгоритма обратного распространения (Деваней). В то же время локальное восстановление по алгоритму обратного проецирования (Радон) успешно решает эту задачу. Моделирование показало, что локальное проецирование (Радон)

и локальное распространение (Деваней) достоверно выявляют качественную зависимость локальных изменений в точке интереса реконструированного распределения от изменения показателя преломления внутри модели. Однако количественные соотношения существенно зависят от числа проекций, угла зондирования и размера области зондирования.

Предложенные алгоритмы были использованы при обработке проекционных данных реального объекта — Retzius-нейрона пиявки, который находился под воздействием нейромедиатора. Экспериментальные результаты показали хорошее совпадение с результатами моделирования. При этом надо отметить, что алгоритм обратного проецирования (Радон) дифференциальных проекций, которые измерялись в нашем томографе, позволяет более уверенно определять область изменения плотности внутри клетки. Это вызвано, по-видимому, микросмещениями объекта, что приводит к усилению дифракционных эффектов, возникающих при использовании алгоритма обратного распространения (Деваней). Эксперименты показали, что динамика процесса изменений плотности определяется локальными алгоритмами достаточно надежно, однако остается открытым вопрос определения их количественных соотношений. Решение этого вопроса потребует привлечения априорной информации о процессах, происходящих в клетке.

Список литературы

- [1] Г.Н. Вишняков, Г.Г. Левин. *Опт. и спектр.*, **85** (1), 82 (1998). [G.N. Vishnyakov, G.G. Levin. *Opt. Spectrosc.*, **85**, 73 (1998)].
- [2] C.G. Pack. *Biophysics and Physicobiology*, **18**, 244 (2021).
- [3] K. Kim K. et al. *Optics express*, **21** (26), 32269 (2013).
- [4] G. Kim et al. *Scientific Reports*, **8** (1), 9192 (2018).
- [5] C. Zuo et al. *Optics and Lasers in Engineering*, **128**, 106003 (2020).
- [6] A.J. Lee et al. *Biomedical Optics Express*, **12** (11), 6928 (2021).
- [7] G.N. Vishnyakov, G.G. Levin, V.L. Minaev, V.V. Pickalov, A.V. Likhachev. *Microscopy and Analysis*, **18** (1), 19 (2004).
- [8] R. Clackdoyle, M. Defrise. *IEEE Signal Processing Magazine*, **27** (4), 60(2010).
- [9] A.G. Ramm, A.I. Katsevich. *The Radon Transform and Local Tomography*, 1st ed. (CRC Press, Boca Raton, 1996).
- [10] Г.Н. Вишняков, Г.Г. Левин, В.Л. Минаев, Н.А. Некрасов. *Опт. и спектр.*, **121** (6), 1020 (2016).
- [11] E. Wolf. *Opt. Commun.*, **1** (4), 153 (1969).
- [12] A.J. Devaney. *Ultrasonic Imaging*, **4** (4), 1982, 336 (1982). DOI: 10.1016/0161-7346(82)90017-7
- [13] Г.Г. Левин. *Способ определения координат изменения структуры клетки по фазовым изображениям*, патент RU 2761480 C1 (заявка 15.02.2021; опубл. 08.12.2021).
- [14] Б.А. Фихман. *Микробиологическая рефрактометрия* (Медицина, М., 1967).
- [15] В.Я. Бродский, Н.В. Нечаева. *Ритм синтеза белка* (Наука, М., 1988).
- [16] A. Kuš et al. *J. Biomed. Optics*, **19** (4), 046009 (2014).

- [17] Г.Г. Левин, А.А. Самойленко., Т.А. Казакова, Т.А. Маракуца, Г.В. Максимов. Биопфизика, **68** (1), 57 (2023).
- [18] G.N. Vishnyakov, G.G. Levin, V.L. Minaev, M.I. Latushko, N.A. Nekrasov, V.V. Pickalov. Optics Letters, **41** (13), 3037 (2016). DOI: 10.1364/OL.41.003037
- [19] Г.Н. Вишняков, Г.Г. Левин, В.Л. Минаев, М.М. Ермаков. Опт. и спектр., **125** (12), 864 (2018).