

Институт физики микроструктур РАН
- филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
"Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им.
А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук"

На правах рукописи

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной
работы (диссертации)

«ВЫСОКОАПЕРТУРНЫЙ МИКРОСКОП НА ОСНОВЕ МНОГОСЛОЙНЫХ РЕНТГЕНОВСКИХ ЗЕРКАЛ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ»

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических
кадров в аспирантуре

Научная специальность: 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной
физики

Выполнил аспирант: Реунов Дмитрий Георгиевич

Научный руководитель: доктор физ.-мат. наук:

Чхало Николай Иванович

дата: ____ июня 2023 г.

Нижний Новгород - 2023 г.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Первые оптические составные микроскопы начали появляться в конце шестнадцатого века. Но только когда установили теоретическую основу световой микроскопии в конце 19-го века, оптику можно было повторно настроить и достичь предела дифракции. С тех пор оптический микроскоп является одним из наиболее важных инструментов в научной лаборатории, но стремление изучать даже более мелкие структуры, чем позволяет видимый свет, привело к разработке различных методов с высоким разрешением. Электронная микроскопия была изобретена и быстро превратилась в важный инструмент для исследований в области биологии и материаловедения. Если рассматривать биологическое и медицинское приложение электронной микроскопии, то существует проблема при подготовке образцов, нарушается его целостность.

Можно выделить несколько причин роста популярности мягкой рентгеновской (МР) микроскопии. Во-первых, преобладание процессов фотопоглощения над процессами рассеяния в веществе при энергиях кванта <10 кэВ, включая избирательное поглощение МР излучения отдельными химическими элементами. Большая по сравнению с электронной микроскопией, глубина проникновения излучения в вещество и малость длины волны делают МР микроскопию уникальным методом нанодиагностики конденсированного вещества. Для МР микроскопии на длинах волн 2.3-4.4 нм в «окне прозрачности воды» достаточно высокое отличие в коэффициентах поглощения углерода и воды, что позволяет увидеть углеродосодержащие структуры в жидкости, а низкое рассеяние позволят проникать на большую глубину [1].

Однако практически все современные рентгеновские микроскопы находятся на источниках синхротронного излучения [2-5]. Эти источники хороши тем, что обладают высокой интенсивностью в сравнение с лабораторными источниками мягкого рентгеновского излучения. Основная проблема синхротронных источников заключается в их доступности и отсутствие оперативности при проведении исследований. Для получения доступа требуется рассмотрение заявок, которые приводят к задержкам в проведении экспериментов и не всегда могут быть удовлетворены. Поэтому стоит актуальная проблема в создании лабораторного микроскопа.

На сегодняшний день есть несколько лабораторных рентгеновских микроскопов на «окно прозрачности воды» [6-10]. Для восстановления трехмерного строения образцов эти микроскопы, как и их синхротронные аналоги, имеют возможность угловой томографии. Однако этот метод томографии имеет ряд ограничений и сложностей. Как пример, для

калибровки координат в пространстве отдельных изображений из серии и последующей реконструкции и получения трехмерного изображения, в образец необходимо вносить реперы, например, золотые наночастицы [11]. Помимо сложности процедуры внесения этих реперов в образец (клетку), необходимо понимать, что тем самым происходит его модификация.

Как альтернатив методу угловой томографии, является аксиальная (z-) томография, которая активно применяется во флуоресцентной микроскопии [12-19]. Суть флуоресцентной микроскопии состоит в получении набора фокальных срезов объекта исследования и последующая трехмерная реконструкция с учетом аппаратной функции прибора [20]. Однако флуоресцентная микроскопия для исследования трехмерной структуры обладает двумя серьезными ограничениями: 1) флуоресцентный сигнал наблюдается только из тех областей, где есть краситель, тем самым исследуется не весь объект, а только его часть; 2) использование красителя уже приводит к изменению структуры образца; 3) плохое трехмерное разрешение ввиду дифракционного ограничения из-за использования источников излучения видимого спектрального диапазона. Однако в современной рентгеновской микроскопии на сегодняшний день отсутствует такая возможность, так как в качестве изображающей оптики используются зонные пластины Френеля, которые имеют глубину фокуса более 1 мкм ($\lambda=2.48$ нм).

Эту проблему можно решить с использованием высокоапертурной многослойной зеркальной оптики, которая при нормальном падении обеспечивает глубину фокуса менее 100 нм. Таким образом, развитие методики аксиальной рентгеновской томографии для исследования биологических объектов на основе многослойной оптики нормального падения является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Современные методы супер-разрешающей оптической микроскопии позволяют получать изображения с разрешением порядка 20 нм. Потенциально эти методы позволяют наблюдать не только статические объекты, но и динамические биологические процессы в клетке, но есть и недостатки, которые заключаются во времени экспозиции кадра. Эти времена занимают достаточно большой промежуток, который больше чем времена наблюдаемых процессов. Но прогресс не стоит на месте и можно предположить, что в скором времени разрешающая способность во времени возрастет.

Есть существенные недостатки флуоресцентных методов: 1) необходимость окрашивания исследуемых объектов специальными люминесцентными маркерами. При этом происходит наблюдение только той области, где есть этот маркер. 2) подкрашивание

образцов приводит к его модифицированию, то есть объект будет не в нативном состоянии.

В пространственных масштабах общую картину о структуре объекта с нанометровым разрешением дает электронная микроскопия. Однако этот метод требует контрастирования образца, резки на тонкие слайсы, изучение каждого среза и последующая сложная процедура сшивки для получения объемных изображений. Кроме того об изучении “ живых ” клеток этим методом речи вообще не идет.

Этот разрыв можно заполнить микроскопом, который работает в области мягкого рентгеновского излучения. Он позволит получать изображения с объемным разрешением в десятки нанометров без специальных процедур подготовки образцов. Так как в области длин 2.3-4.4 нм наблюдается естественный абсорбционный контраст. Углерода содержащие структуры поглощают излучения, а вода пропускает. Это дает возможность для исследования объекта, который находится в нативном состоянии, а в идеальной ситуации – живым. Но физические принципы и конструктивные особенности рентгеновского микроскопа ставят ряд научных и практических задач, которые необходимо решить, прежде чем рентгеновская микроскопия займет свое место в арсенале клеточной биологии. Нерешенными проблемами остаются низкая эффективность оптической схемы микроскопа, значительная сложность проведения томографических исследований, низкое 3D разрешение, которое составляет порядка 100 нм у лабораторных приборов. Это обусловлено применением зонных пластинок Френеля для построения изображения, которые обладают низкой угловой апертурой и дифракционной интенсивностью, хроматическими аберрациями, малыми фокусными расстояниями и большой глубиной фокуса.

Цель диссертационной работы

Целью диссертационной работы является разработка лабораторного рентгеновского микроскопа на базе многослойной оптики нормального падения и развитие методов подготовки и исследования объемного строения, биологических образцов.

Задачи диссертационной работы

Для достижения целей диссертационной работы решались следующие задачи:

1. Разработка мягкого рентгеновского микроскопа и его составных элементов. Разработка экспериментальных методик и изучение основных характеристик микроскопа.

2. Развитие модели аксиальной томографии в мягком рентгеновском диапазоне для восстановления объемного строения образцов по абсорбционным изображениям различных фокальных срезов.
3. Разработка методов подготовки влажных, стабилизированных и замороженных биологических образцов для томографических исследований в мягком рентгеновском микроскопе.
4. Разработка экспериментальных методик и практическая реализация мягкой рентгеновской микроскопии для исследования биологических образцов. Сравнение результатов измерений с данными, полученными методами конфокальной оптической и электронной микроскопии.

Научная новизна работы

Полученные в рамках диссертационной работы результаты обладают научной новизной. Полнопольный светосильный рентгеновский микроскоп на основе многослойных рентгеновских зеркал нормального падения, лазерно-плазменного источника рентгеновского излучения и цифровой регистрацией изображений был создан впервые. Впервые в мягком рентгеновском диапазоне была реализована методика аксиальной томографии для восстановления объемного строения образцов. Предложенный комбинированный фильтр шумов. Эта комбинация позволяет найти локальные скачки или провалы сигнала, которые в дальнейшем будут заменены на медианные значения окрестности точки на изображении. В результате чего, медианный фильтр применен не на все изображение, а только там, где есть резкие перепады интенсивности, поэтому не размывает изображение как целое, что делают другие фильтры. Для предварительной обработки рентгеновских изображений продемонстрировал преимущества по сравнению с традиционными фильтрами.

Практическая значимость работы

Практическая значимость диссертационной работы заключается в следующем. Создан уникальный прибор – лабораторный микроскоп с рабочей длиной волны 13.88 нм для исследования биологических образцов. Разработана методика аксиальной томографии, позволяющая исследовать объемное строение образцов с латеральным разрешением 140 нм и аксиальным – 420 нм. Разрешение ограничено размером пикселя регистрирующей матрицы. Проведены исследования ряда биообразцов. Сравнение результатов измерений с конфокальной оптической микроскопией показало существенное преимущество по разрешающей способности рентгеновского микроскопа. По сравнению с

электронной микроскопией латеральное разрешение хуже, однако, рентгеновская микроскопия позволяет исследовать объемное строение без разрезки образцов на тонкие пластинки. Полученные в диссертационной работе результаты станут основой для дальнейшего развития лабораторной мягкой рентгеновской микроскопии в сторону повышения разрешающей способности и укорочения рабочей длины волны микроскопа. Таким образом, важнейшим результатом диссертационной работы стала демонстрация реальных перспектив использования лабораторной мягкой рентгеновской микроскопии в ряду традиционных методов изучения биологических образцов с нанометровым разрешением.

Методология и методы исследования

В работе использованы апробированные методики, развитые и применяемые в ИФМ РАН, г. Нижний Новгород, Россия и НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, Москва, Россия. Так же использовалось открытое программное обеспечение DeconvolutionLab2.

Литография при помощи лазерного сканирующего УФ-литографа Heidelberg instruments μ pg 101.

Интерферометрия на микроинтерферометре белого света TalySurf CCI 2000.

Ионное травление при помощи технологического источника ускоренных ионов КЛАН-103М.

Тестирование методом резазурин-теста с реагентом CellTiter-Blue® Cell Viability Assay.

Криосрезы толщиной 3-4 мкм получали с помощью криостата Leica 1850CM UV.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полнопольный светосильный рентгеновский микроскоп на основе многослойных рентгеновских зеркал нормального падения, лазерно-плазменного источника рентгеновского излучения и цифровой регистрацией изображений на длину волны 13.84 нм обладает рекордной числовой апертурой $NA = 0.27$, увеличением 47 крат, позволяет исследовать объемное строение образцов с латеральным разрешением 140 нм и аксиальным – 420 нм.
2. Теоретическая модель формирования изображения в светосильном микроскопе позволяет восстанавливать объемное строение исследуемых объектов по серии рентгеновских изображений при движении образца вдоль оптической оси микроскопа.

3. Метод изготовления Si_3N_4 мембран обеспечивает пропускание 44% на рабочей длине волны микроскопа 13.84 нм, стойкость к внешнему воздействию при транспортировке, нанесению образцов и вакуумной откачке, и биосовместимость с образцами.
4. Комбинированный фильтр, используемый на предварительной стадии обработки рентгеновских изображений для удаления шумов, заметно улучшает контраст изображений и не приводит к потере разрешающей способности.
5. Сравнение результатов измерений биообразцов, полученных с помощью разработанного рентгеновского микроскопа, конфокального оптического и электронного микроскопов показало существенное преимущество разрешающей способности рентгеновского микроскопа над конфокальной микроскопией. По сравнению с электронной микроскопией латеральное разрешение хуже, однако, рентгеновская микроскопия позволяет исследовать объемное строение без разрезки образцов на тонкие пластинки. За время эксперимента накопленная доза не наносит радиационных повреждений исследуемым образцам.

Публикации по теме

По представленным на защиту материалам автором опубликовано 23 работы. Опубликовано 12 статей в научных журналах [A1-A11] и 11 статей в сборниках конференций и тезисов докладов [T1-T11].

Личное участие автора

Основные результаты диссертационной работы были получены автором лично, либо в составе коллектива, но при определяющем его участии. В частности, автор принимал участие в постановке научных задач. При его определяющем участии была проведена сборка, юстировка, настройка и запуск в работу всех узлов, а также исследование основных характеристик микроскопа. Математическая модель формирования изображения была разработана совместно с Гайковичем К.П. Фильтр и программа для удаления шумов с изображений, методика изготовления и исследование характеристик Si_3N_4 мембран, подготовка образцов были разработаны диссертантом лично. Исследование образцов, анализ и обобщение полученных результатов были выполнены совместно с Малышевым И.В.

Апробация результатов

Все результаты диссертационной работы были представлены в реферируемых научных и специализированных изданиях и докладывались на научных конференциях. Апробация содержащихся в данной диссертационной работе результатов проводилась на следующих научных конференциях, симпозиумах и совещаниях:

Результаты поглощения излучения импульсного Nd: YAG лазера при лазерном пробое в сверхзвуковых газовых струях докладывались на XXIV Международном симпозиуме «Наноп физика и наноэлектроника» 2020.

Результаты по основным характеристикам микроскопа и возможности модернизации источника излучения для “окна прозрачности воды” докладывались на XXV Международном симпозиуме «Наноп физика и наноэлектроника» 2021 и на Объединенной конференции «Электронно-лучевые технологии и рентгеновская оптика в микроэлектронике» КЭЛТ 2021.

Отработка методики удаления шума и демонстрация разрешения с трехмерной реконструкцией объемных изображений докладывалось на XXVI Международном симпозиуме «Наноп физика и наноэлектроника» 2022.

Представление теоретической модели формирования изображения и изготовление подложек для биологических образцов, с последующим изучением их трехмерной структуры докладывалось на XXVII Международном симпозиуме «Наноп физика и наноэлектроника» 2023.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы, изложена на 122 страницах, содержит 65 рисунков и 3 таблиц.

Содержание работы по главам

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, содержится постановка цели и задач исследования. Обсуждаются научная новизна и практическая значимость диссертационной работы, формулируются основные положения, выносимые на защиту, а также личный вклад автора диссертации в полученные результаты. Описывается структура и объем диссертации, краткое содержание работ по главам диссертационной работы, указываются количество публикаций в научных журналах и в трудах конференций, а также приводится список конференций, на которых были доложены результаты диссертационной работы.

В первой главе отображено современное состояние микроскопии мягкого рентгеновского диапазона. Рассмотрены возможности современных приборов. Так же были разобраны основные элементы микроскопа – источник излучения и оптика. Показаны возможности каждого элемента и их применимость их для целостного прибора. Обсуждается актуальность развития лабораторной мягкой рентгеновской микроскопии.

Во второй главе рассмотрена конструкция микроскопа и его элементы в отдельности. Продемонстрирована рентгенооптическая система и показаны ее aberrации, которые влияют на конечную функцию рассеяния точки микроскопа. Описаны двухзеркальный проекционных объектив Шварцшильда, методика его настройки непосредственно в микроскопе и результаты исследований его характеристик. Изучены параметры лазерно-плазменного источника рентгеновского излучения, оптимизированы конструкция сопла и условия работы, обеспечивающие максимальную эффективность преобразования мощности лазерного излучения в рентгеновское излучение на нужной длине волны.

При разработке микроскопа была выбрана рабочая длина волны 13.84 нм. Эта длина волны выбрана по нескольким причинам: 1) есть высокоинтенсивные источники излучения; 2) зеркальная многослойная рентгеновская оптика обладает высоким коэффициентом отражения > 60%; 3) отработка методики аксиальной томографии с целью дальнейшего продвижения в направлении укорочения рабочей длины волны, к “углеродному” и далее “водному” окнам прозрачности.

Табл. 1. Параметры микроскопа

Параметры	Значение
Предельный вакуум	$6 \cdot 10^{-5}$ Торр
Рабочий вакуум	$3 \cdot 10^{-3}$ Торр
Интенсивность источника излучения на длине волны 13,84 нм	$3 \cdot 10^{12}$ фотонов/ (линия \cdot импульс $\cdot 4\pi$ -стерадиан)
Увеличение	$\times 47$
Поле зрения	290x290 мкм
Перемещение вдоль оптической оси (z-скан)	30 мкм
Латеральное разрешение	140 нм
Аксиальное разрешение	420 нм
Время экспозиции одного кадра	1 - 10 с

Принципиальная оптическая схема микроскопа указана на рис.1. Основными системами являются: лазерно-плазменный источник мягкого рентгеновского излучения, коллектор, объектив Шварцшильда, полосовой фильтр и детектор.

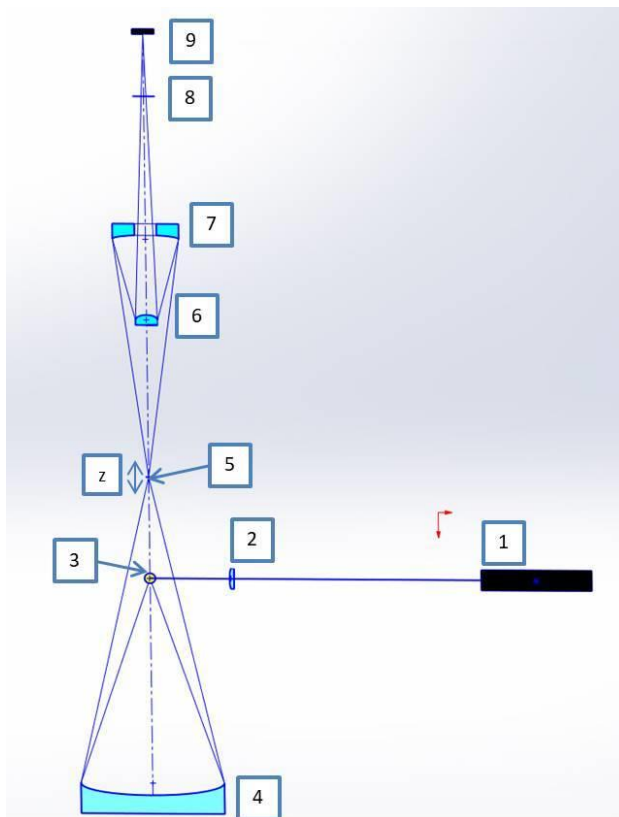


Рис.1. Принципиальная схема микроскопа. 1 – Nd: YAG лазер; 2 – линза для фокусировки лазерного излучения на газовой мишени; 3 – лазерно-плазменный источник; 4 – коллектор; 5 – фокальная плоскость объектива, где находится образец и перемещается вдоль z ; 6,7 – выпуклое и вогнутое зеркала объектива Шварцшильда; 8 – рентгеновский фильтр; 9 – матрица детектора.

Принцип работы микроскопа заключается в следующем. Излучение Nd:YAG лазера (EXPLA NL-300, длина волны 1.06 мкм, энергия 0.5 Дж, длительность импульса 4 нс, частота повторений 10 Гц), работающего в режиме внешней синхронизации, собирается при помощи фокусирующей линзы на газовой мишени от импульсного газового клапана. Энергия лазерного излучения контролируется при помощи термоэлектрического колориметра, который принимает на себя около 8% отраженной мощности излучения. Далее излучение от лазерно-плазменной мишени собирается при помощи асферического зеркала коллектора на образце. Часть излучения поглощается в объекте, далее прошедшее излучение собирается при помощи объектива Шварцшильда с числовой апертурой $NA=0.27$ и передается на матрицу детектора. Перед детектором установлен полосовой фильтр для длины волны 13.84 нм, чтобы отсечь паразитное (длинноволновое) излучение.

Образец установлен на держателе, который в свою очередь установлен на пьезокерамическом актуаторе с максимальным расширением до 30 мкм и шагом около 1 нм. Это позволяет перемещать образец относительно фокальной плоскости микроскопа вдоль оптической оси. Такая кинематическая схема позволяет осуществить аксиальную томографию и, тем самым реконструировать трехмерную структуру образца. На рис.2 представлена общая фотография разработанного в рамках диссертации рентгеновского микроскопа со всеми его ключевыми элементами.

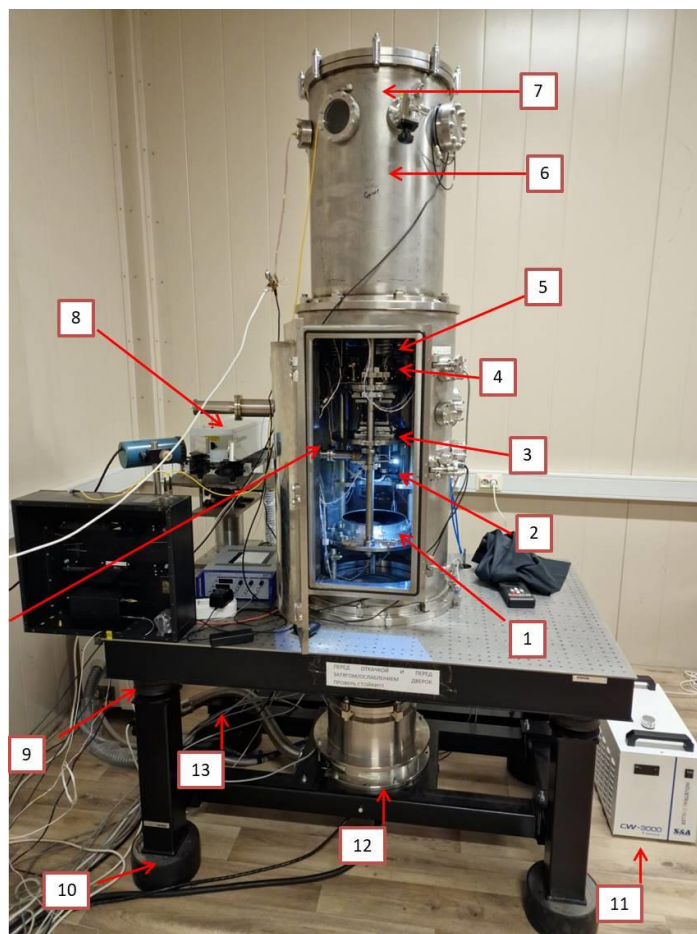


Рис.2. Основной вид микроскопа. 1 – коллектор; 2 – лазерно-плазменный источник; 3 – 3D столик образца с пьезо-толкателем; 4 – двухзеркальный объектив Шварцшильда; 5 – пружинный подвес; 6 - фильтр; 7 – матрица детектора излучения; 8 – Nd:YAG лазер; 9 – пневмо опоры; 10 – резиновые опоры; 11 – чиллер водяного охлаждения для матрице детектора; 12 – турбомолекулярный насос; 13 - выход на форвакуумный насос.

В третьей главе построена в приближении геометрической оптики теоретическая модель формирования изображения в светосильном мягком рентгеновском микроскопе. Найдена зависимость между регистрируемыми на детекторе изображениями системы фокальных срезов и 3D распределением показателя поглощения образца. Выполнены

численные расчеты для высоко-апертурного зеркального объектива с числовой апертурой $NA \approx 0.27$ и с глубиной фокуса, близкой к дифракционно ограниченной. Получено решение обратной задачи томографии реконструкции 3D распределения коэффициента поглощения по изображениям системы фокальных срезов.

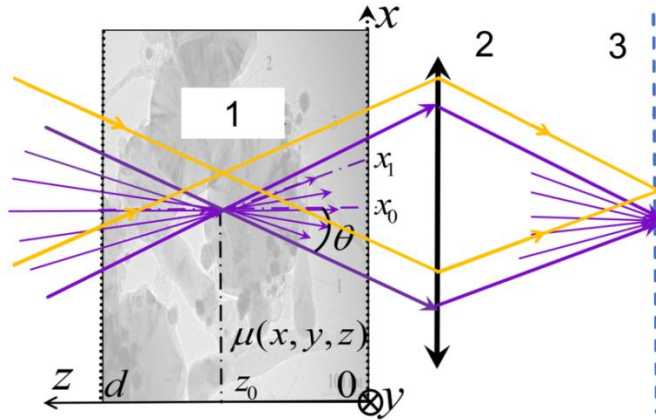


Рис.3. Схема лучей рассматриваемого рентгеновского микроскопа, проходящих через сечение образца (1), находящееся в фокальной плоскости объектива (2) и приходящих на КМОП-детектор (3).

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 образца в точках $x_1, y_1, z_1=0$ рис.3. Одновременно зеркальный объектив строит изображение среза образца, попавшего в фокальную плоскость объектива ($z = z_0$). Вклад каждого луча в интенсивность определяется оптической толщиной поглощения – интегралом вдоль пути луча (преобразованием Радона) от коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ на прямой, проходящей через точки x_0, y_0, z_0 и $x_1, y_1, z_1 = 0$ между плоскостями $z = 0$ и $z = d$:

$$\tau(x_1, y_1, z_1=0, x_0, y_0, z_0) = \int_L \mu(x, y, z) dl, \quad (1)$$

Чтобы представить уравнение (1) в декартовых координатах, используем его параметрическое представление и используя уравнение прямой, в трехмерной системе координат получаем и подставляя пределы интегрирования:

$$\tau(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0) = \sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + (z_0 - z_1)^2} \times \int_{z_1/(z_1+z_0-z_1)}^{d/(z_1+z_0-z_1)} \mu[x_1 + (x_0 - x_1)\lambda, y_1 + (y_0 - y_1)\lambda, z_1 + (z_0 - z_1)\lambda] d\lambda. \quad (2)$$

Используя уравнение переноса излучения в поглощающей среде, получаем выражение для относительной (по отношению к среде без поглощения) интенсивности в точке x_1, y_1, z_1 , для луча, прошедшего через фокус x_0, y_0, z_0 :

$$J_0(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0) / J(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0)[\mu = 0] = e^{-\sqrt{(x_0-x_1)^2+(y_0-y_1)^2+z_0^2} \int_0^{d/z_0} \mu[x_1+(x_0-x_1)\lambda, y_1+(y_0-y_1)\lambda, z_0\lambda] d\lambda} \quad (3)$$

Делая замену переменной $z_0\lambda \rightarrow z$, получаем это выражение в декартовых координатах:

$$J(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0) / J_0(x_1, y_1, z_1, x_0, y_0, z_0)[\mu = 0] = e^{-\sqrt{(x_0-x_1)^2+(y_0-y_1)^2+z_0^2}/z_0 \int_0^d \mu[x_1+(x_0-x_1)z/z_0, y_1+(y_0-y_1)z/z_0, z] dz} \quad (4)$$

Далее, выполняя интегрирование по всем лучам в конусе, выходящим через плоскость $z = 0$, получаем решение прямой задачи – 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) :

$$I(x_0, y_0, z_0) / I_0[\mu = 0] = \int_{x_0-z_0tg\theta}^{x_0+z_0tg\theta} dx_1 \int_{-\sqrt{(z_0tg\theta)^2-(x_0-x_1)^2}}^{\sqrt{(z_0tg\theta)^2-(x_0-x_1)^2}} dy_1 \times e^{-\sqrt{(x_0-x_1)^2+(y_0-y_1)^2+z_0^2}/z_0 \int_0^d \mu[x_1+(x_0-x_1)z/z_0, y_1+(y_0-y_1)z/z_0, z] dz} / \int_{x_0-z_0tg\theta}^{x_0+z_0tg\theta} dx_1 2\sqrt{(z_0tg\theta)^2-(x_0-x_1)^2}, \quad (5)$$

Для решения обратной задачи томографии используем дополнительное условие малости оптической толщины поглощения $\tau \ll 1$. Тогда для относительной убыли интенсивности получаем выражение:

$$\delta I(x_0, y_0, z_0) = [I_0 - I] / I_0 = \iint dx_1 dy_1 \int_{x_0-z_0tg\theta}^{x_0+z_0tg\theta} dx_1 \int_{-\sqrt{(z_0tg\theta)^2-(x_0-x_1)^2}}^{\sqrt{(z_0tg\theta)^2-(x_0-x_1)^2}} dy_1 \sqrt{(x_0-x_1)^2+(y_0-y_1)^2+z_0^2} / z_0 \times \int_0^d \mu[x_1+(x_0-x_1)z/z_0, y_1+(y_0-y_1)z/z_0, z] dz, \quad (6)$$

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

$$\delta I(x_0, y_0, z_0) = \iint dx_1 dy_1 \int_0^d \iint dx dy \mu(x, y, z) F(x_0 - x_1, y_0 - y_1, z_0) \times \delta[x - x_1 - (x_0 - x_1)z / z_0] \delta[y - y_1 - (y_0 - y_1)z / z_0] dz, \quad (7)$$

а вместо пределов интегрирования и множителей перед интегралом по z в (6) введена функция

$$F(x_0 - x_1, y_0 - y_1, z_0) = \left\{ \begin{array}{l} = \sqrt{(x_0 - x_1)^2 + (y_0 - y_1)^2 + z_0^2} / (2z_0 \int_{-z_0tg\theta}^{z_0tg\theta} \sqrt{(z_0tg\theta)^2 - \xi^2} d\xi), \\ |x_0 - x_1| > z_0tg\theta, |y_0 - y_1| > \sqrt{(z_0tg\theta)^2 - (x_0 - x_1)^2} \\ = 0, |x_0 - x_1| > z_0tg\theta, |y_0 - y_1| > \sqrt{(z_0tg\theta)^2 - (x_0 - x_1)^2}, \end{array} \right. \quad (8)$$

описывающая все точки внутри двойного светового конуса на рис.3. Изменяя порядок интегрирования и делая замену переменных $\tilde{x}_1 = x_1(z_0 - z)/z_0$, $\tilde{y}_1 = (y_0 - y)(z_0 - z)/z_0$ в (7), выполняем интегрирование с δ -функцией по \tilde{x}_1, \tilde{y}_1 и получаем уравнение типа двумерной свертки по x, y :

$$\delta I(x_0, y_0, z_0) = \int_0^d dz \iint \mu(x, y, z) F\left[(x_0 - x) \frac{z_0}{z_0 - z}, (y_0 - y) \frac{z_0}{z_0 - z}, z_0\right] \left(\frac{z_0}{z_0 - z}\right)^2 dx dy, \quad (9)$$

которое двумерным Фурье-преобразованием по x_0 и y_0 сводится к одномерному интегральному уравнению в k -пространстве:

$$\delta I(k_x, k_y, z_0) = 4\pi^2 \int_0^d \mu(k_x, k_y, z) K(k_x, k_y, z_0, z) dz, \quad (10)$$

которое должно решаться для каждой пары k_x, k_y компонент пространственного спектра. Тогда обратное преобразование Фурье полученного решения $\mu(k_x, k_y, z)$ дает и решение $\mu(x, y, z)$ поставленной задачи томографии в декартовых координатах:

$$\mu(x, y, z) = \iint \mu(k_x, k_y, z) \exp(-ik_x x - ik_y y) dk_x dk_y, \quad (11)$$

Ядро уравнения (10) можно определить из эксперимента с тонким (по z) тестовым объектом с известным поперечным k -спектром, например однородного параллелепипеда с известным коэффициентом поглощения μ_0 :

$$K(k_x, k_y, z_0, z) = \delta I(k_x, k_y, z_0) / 4\pi^2 \mu_0(z) \Delta z, \quad (12)$$

Если взять интеграл в функции F в (8), то (9) сводится к уравнению типа свертки по всем трем координатам:

$$\delta I(x_0, y_0, z_0) = \int_0^d \iint \mu(x, y, z) K(x_0 - x, y_0 - y, z_0 - z) dx dy dz, \quad (13)$$

где

$$K(x_0 - x, y_0 - y, z_0 - z) = \left\{ \begin{array}{l} = \frac{2}{\pi (tg\theta)^2 (z_0 - z)} \sqrt{\left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2 + \left(\frac{y_0 - y}{z_0 - z}\right)^2 + 1}, \left| \frac{x_0 - x}{z_0 - z} \right| < tg\theta, \left| \frac{y_0 - y}{z_0 - z} \right| < \sqrt{(tg\theta)^2 - \left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2} \\ = 0, \left| \frac{x_0 - x}{z_0 - z} \right| > tg\theta, \left| \frac{y_0 - y}{z_0 - z} \right| > \sqrt{(tg\theta)^2 - \left(\frac{x_0 - x}{z_0 - z}\right)^2}. \end{array} \right. \quad (14)$$

Трехмерное преобразование Фурье приводит (13) к простому уравнению для спектров в k -пространстве и формуле искомого обратного преобразования Радона для данного метода томографии:

$$\mu(x, y, z) = \frac{1}{8\pi^3} \iiint \delta I(k_x, k_y, k_z) / K(k_x, k_y, k_z) e^{ik_x x + ik_y y + ik_z z} dk_x dk_y dk_z, \quad (15)$$

Моделирование показало, что для небольших моделируемых объектов (внутри 20-пиксельного объема), вполне достаточно 80-пиксельного сканирования по z . Исследовались как сплошные объекты, так и распределенные неоднородности коэффициента поглощения. Ширина полосы анализа по координатам в k -пространстве составляла $\Delta k_{x,y,z} = 1.35\pi$.

На рис.4 представлены результаты моделирования сплошной неоднородности в форме куба размерами $8 \times 8 \times 8$ пикселей камеры детектора.

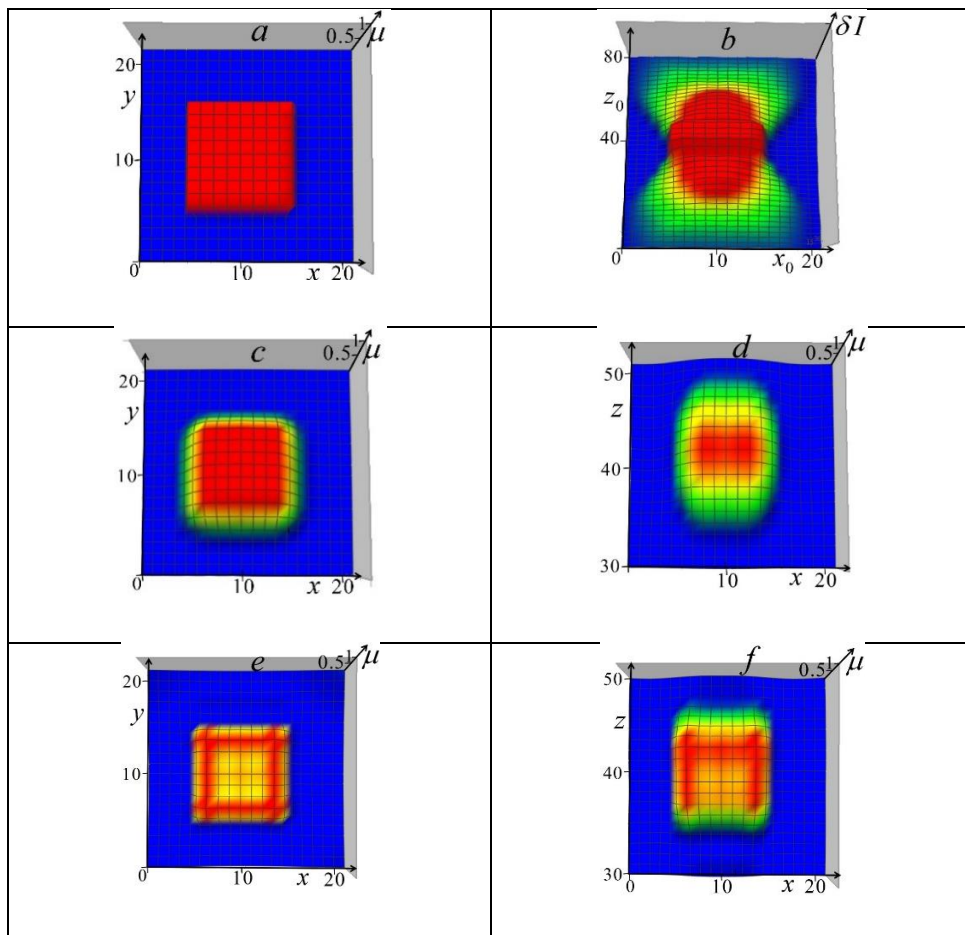


Рис.4. *a* – исходное распределение сплошной неоднородности коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ в горизонтальном сечении $z = 0$ (в вертикальном сечении объект – это тоже квадрат); *b* – распределение «измеряемого сигнала» $\delta I(x_0, y_0, z_0)$ с добавленной погрешностью со среднеквадратичным отклонением $\sigma = 5\%$ в вертикальном сечении $y_0 =$

0; c – восстановленное распределение коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ в горизонтальном сечении $z = 0$; d – восстановленное распределение коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ в вертикальном сечении $y = 0$; e – восстановленное при уменьшенном значении параметра регуляризации α распределение коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ в горизонтальном сечении $z = 0$; f – восстановленное при уменьшенном значении α распределение коэффициента поглощения $\mu(x, y, z)$ в вертикальном сечении $y = 0$. Синий цвет соответствует $\mu=0$, а красный цвет $\mu=1$.

Приведенные выше результаты моделирования прямого и реконструированного трёхмерного изображения подтверждают работоспособность и достаточную эффективность разработанного алгоритма аксиальной рентгеновской томографии в высокоапертурной мягкой рентгеновской микроскопии.

В четвертой главе описываются результаты применения разработанного в диссертации зеркального микроскопа мягкого рентгеновского излучения для изучения биологических образцов. Описываются методика изготовления и основные характеристики свободно висящих мембран Si_3N_4 . указывается на их биосовместимость с исследуемыми образцами и устойчивость к внешним воздействиям. Значительное внимание уделено причинам возникновения шума на регистрируемых изображениях и разработанной для их устранения методике их фильтрации. Отмечается, что применение этой методике не приводит к потере разрешения. Приводятся результаты измерений при помощи калибровочного стандарта латерального и аксиального разрешения. Получены двумерные и трехмерные структуры биологических объектов и проведено сравнение результатов измерений с конфокальной оптической и электронной микроскопией. Формулируется вывод о достоинствах развитого в диссертации метода мягкой рентгеновской микроскопии с аксиальной томографией.

В рамках диссертационной работы была разработана методика изготовления свободно висящих мембран Si_3N_4 различных размеров для применения их в качестве держателей биологических образцов для микроскопии мягкого рентгеновского излучения. Эта методика является развитием известной технологии, но с применением отечественного оборудования и материалов. Разработанная технология станет основой, в том числе и при создании кювет для исследований живых биологических образцов методом микроскопии мягкого рентгеновского излучения.

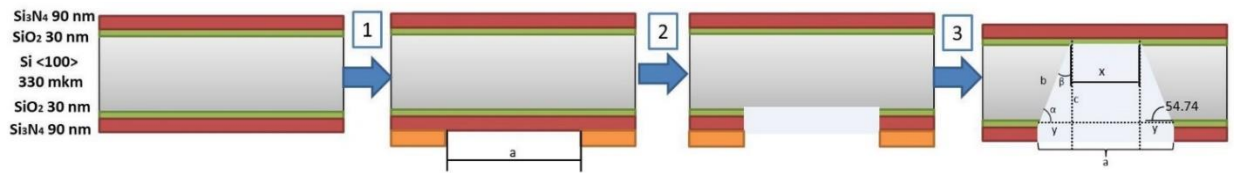


Рис.5. Схема изготовления мембран Si₃N₄. 1-нанесение на подложку фотошаблона и создание технологического рисунка. 2- удаление слоев Si₃N₄ и SiO₂ ионным травлением, для последующего химического травления. 3-смыв фоторезиста и химическое травление оставшегося слоя Si в два этапа.

При получении изображения любыми методами всегда регистрируются шумы, которые связаны с тем или иным физическим процессом в оптической системе или в детекторе. Поэтому проблема шумоподавления является актуальной. Поскольку идеального многозадачного фильтра не существует, то в арсенале исследователей имеется обширное количество алгоритмов [21-31], которые работают с тем или иным видом шума, и реализуют определенный вид фильтрации.

Предложенный в диссертационной работе фильтр является комбинацией двух фильтров: порогового и медианного. Работает он следующим образом: сначала создают копию $K(x, y)$ исходного изображения $I(x, y)$, к которой применяют стандартный медианный фильтр. Далее каждый элемент исходного изображения $I(x, y)$ рассматривают последовательно и сравнивают значение текущего пикселя с соседними, и если разница по модулю превышает пороговое значение Δ , заданное вручную, то значение исходного пикселя, заменяется на значение из размытой копии исходного изображения. Таким образом, не происходит размытия всего изображения, а только локальное изменение одного пикселя там, где обнаружен резкий всплеск или падение интенсивности сигнала.

$$Result = \begin{cases} I(x, y), & |I(x + 1, y) - I(x, y)| < \Delta \\ K(x, y) = med\{M(x, y)\}, & |I(x + 1, y) - I(x, y)| > \Delta \end{cases}, \quad (16)$$

Далее проводили процедуру деконволюции стека изображений для каждого типа фильтрации. Деконволюцию выполняли по методу Ричардсона–Люси [32-33] в программном пакете DeconvolutionLab2 [20] в программе ImageJ [34].

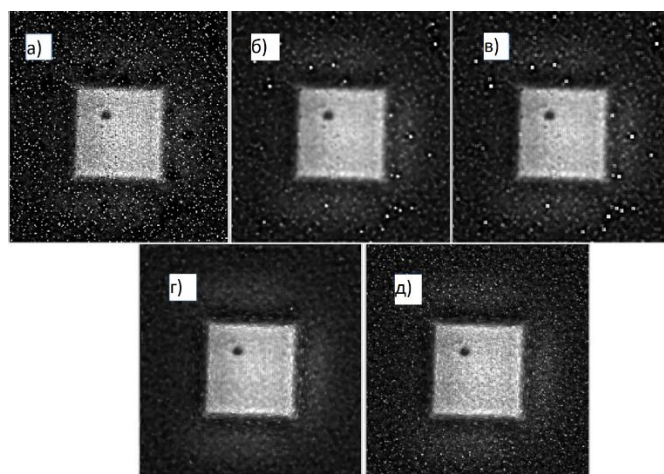


Рис.6. Изображения после деконволюции с предварительной фильтрацией шумов: а-исходное изображение, б- Гауссов фильтр, в- фильтр среднего значения, г-медианный фильтр, д- комбинированный фильтр.

Как видно из рис.6, если не делать фильтрацию изображения, то после деконволюции происходит значительное усиление шумов. Аналогично для фильтра Гаусса и “среднего”. При деконволюции изображения, полученного после применения медианного и предложенного в настоящей работе фильтра, уровень шумов становится меньше.

Теперь необходимо провести оценку, насколько первоначальное размытие фильтров ухудшило разрешение после деконволюции. Для этого построим одно и то же сечение (вставка на рис.7, сечение линия сечения отмечена стрелкой) для всех изображений и оценим разрешение по уровню сигнала 30–70% относительно его максимума. Результат приведен в табл.2.

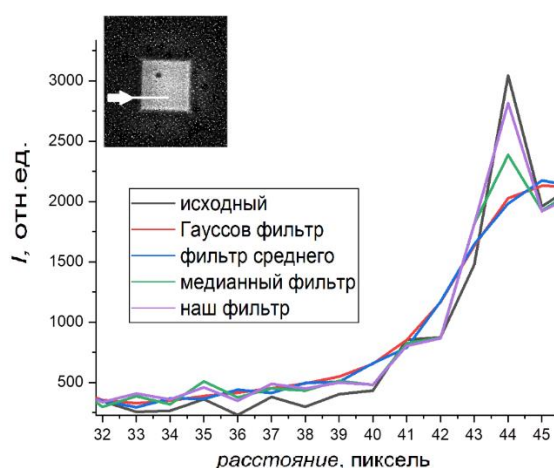


Рис.7. Профили сечений изображения края окна, полученных после применения различных методов фильтрации и последующей деконволюции.

Табл.2. Определение разрешения для разных типов фильтров

Метод	Исходное	Гауссов фильтр	Фильтр среднего	Медианный фильтр	Комбинированный метод
Разрешение по уровню сигнала 30-70% (кол. пикселей)	1	3	3	2	1

В качестве тестового образца для определения латерального разрешения ЭУФ-микроскопа был выбран калибровочный стандарт, используемый в электронной и рентгеновской микроскопии с минимальным размером тестового элемента 25 нм [35]. Для его трехмерной реконструкции и учета влияния внефокусных срезов был снят стек изображения при разном положении стандарта относительно фокальной плоскости объектива. Дальнейшая пост обработка заключается в удалении шума по предложенному алгоритму в предыдущей главе и в следующей математической обработке для удовлетворения закона Бера-Ламберта для абсорбционной задачи $-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$. После этих манипуляций можно производить трехмерную реконструкцию изображения для повышения контраста и учета внефокусных сечений.

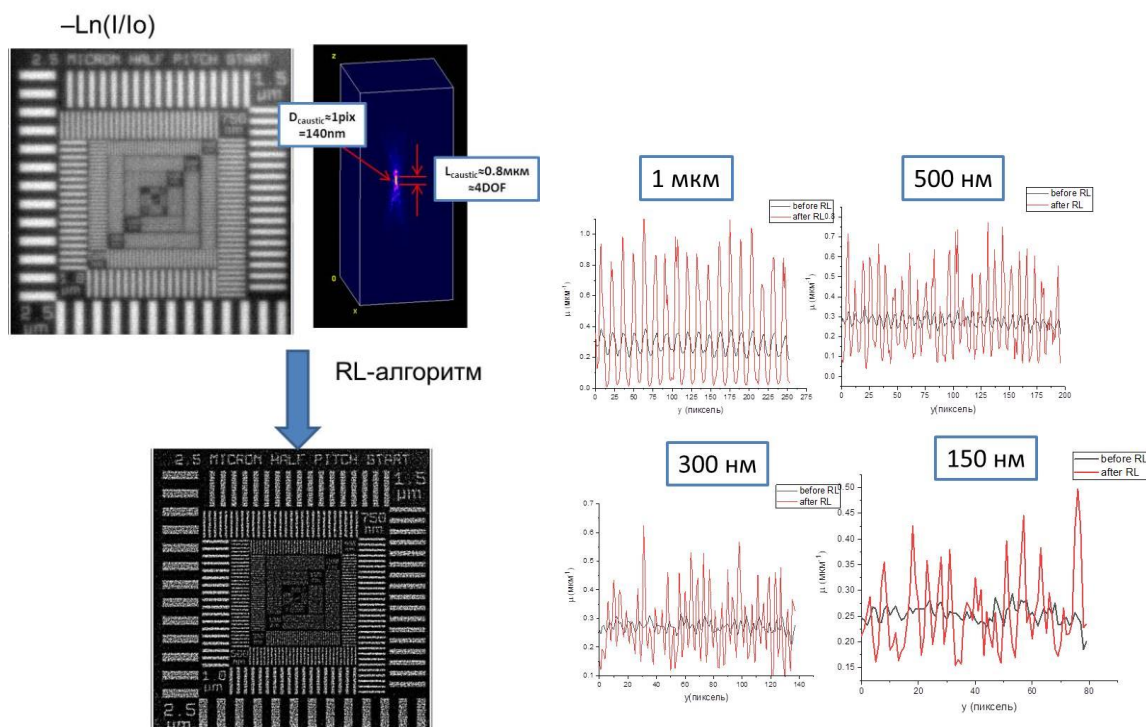


Рис.8. Схематичное изображение трехмерной реконструкции с учетом ФРТ микроскопа слева и профили тестовых линий разного размера справа.

На рис.8 (слева) показан результат трехмерной реконструкции с учетом ФРТ микроскопа. Можно отметить повышение контраста изображения и отсутствие размытия результата, которое определяется влиянием внефокусных срезов.

Как можно видеть после применения алгоритма трехмерной реконструкции (красный профиль) значительно увеличился контраст, что и является результатом реконструкции. Так же можно отметить, что так же разрешаются минимальные видимые полосы размером 150 нм, что соответствует одному пикселю проекции изображения на детектор матрице. Теоретическое значение составляет 140 нм.

В качестве биологических образцов приведем полученные результаты для среза стебля ландыша, клеток мозга мыши, среза легкого, тонкого среза сетчатки глаза, бактерий и клеточной культуры NT1080.

Начнем рассмотрения со среза стебля ландыша (конволярия). Срез представляет собой поперечный срез толщиной ~ 40 мкм и имеет пористую структуру. Полученное изображение на длине волны 13.84 нм представлено на рис.9.

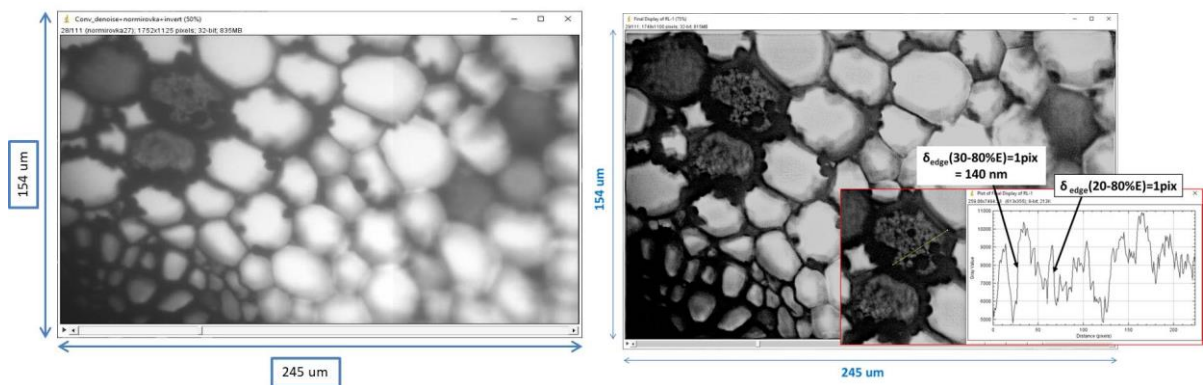


Рис.9. Изображение стебля ландыша на рабочей длине волны микроскопа до реконструкции слева и после реконструкции справа.

Как видно из рис.4.17. улучшился контраст изображения и отсутствует размытие, которое вносят внефокусные сечения. На вставке показана область с клеткой, внутри которой отчетливо видно наличие каких-то включений, а желтой линией показано сечение, соответствующее профилю изображения, приведенному в нижнем правом углу рисунка. Можно видеть, что на профиле виден резкий контраст перепада интенсивности, который составляет 140-150 нм по уровню сигнала 20-80%, что соответствует разрешению микроскопа, которое было определено ранее.

Так же можно посмотреть сечение вдоль оптической оси микроскопа и посмотреть стенки пор. Выделим интересующую нас область и построим сечение. Результат показан на рис.10. На сечение отчетливо видны границы стенок пор структуры. Так же мы можем построить профиль сечения изображения (показано желтой линией) и видим, что по перепаду интенсивности 20-80% размер стенки составляет 420-560 нм.

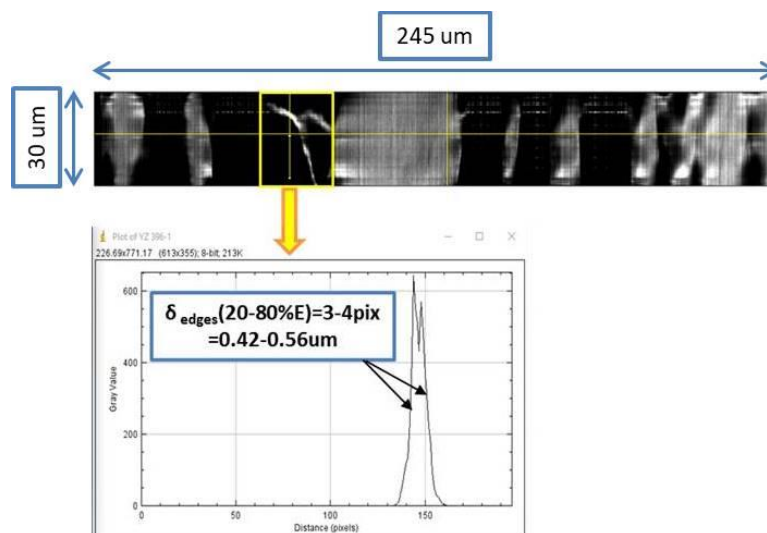


Рис.10. Сечение изображения среза ландыша вдоль оси z.

Из полученных результатов мы можем построить трехмерную модель этого образа и посмотреть его различные сечения.

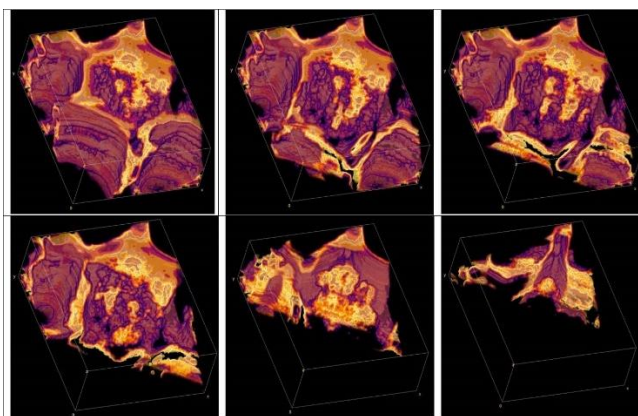


Рис.11. Серия вертикальных диагональных срезов отдельной клетки. Размер области 30x30x30 мкм³.

Еще одним интересным объектом для наблюдения был тонкий срез легкого толщиной ~ 6 мкм. Сравнивая полученные результаты на видимом свете и на длине волны 13.84 нм, можно увидеть более тонкую структуру образца, помеченную красным кругом рис.12., которая не наблюдается на видимом свете в конфокальном микроскопе. Это связано с меньшей рабочей длиной волны и тем, что коэффициент поглощения для ЭУФ более высокий, чем для видимого света при одинаковой толщине.

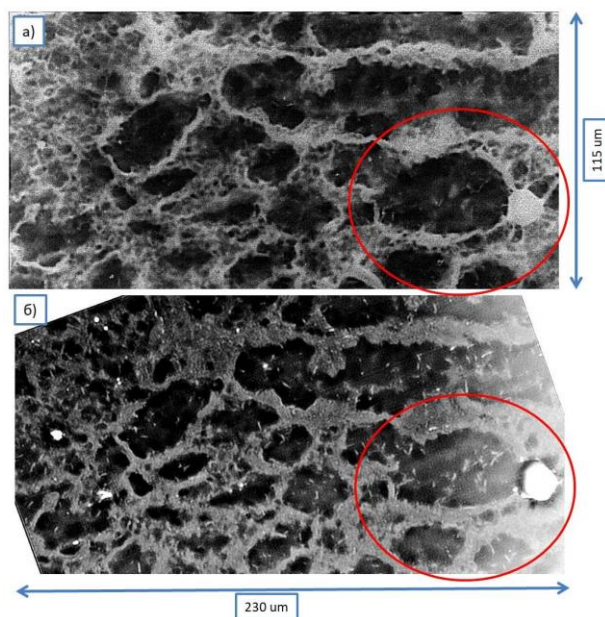


Рис.12. Изображения среза легкого толщиной ~ 6 мкм а) ЭУФ изображение после реконструкции, б) изображение, полученное на видимом свете.

В заключении

В рамках диссертационной работы были получены следующие важнейшие результаты.

1. Впервые в мире разработан и изготовлен высокоапертурный ЭУФ-микроскоп на основе многослойных зеркал нормального падения с возможностью аксиальной томографии для исследования объемного строения биологических образцов. Рабочая длина волны микроскопа 13.84 нм, числовая апертура объектива $NA = 0.27$, увеличение $\times 47$ крат, латеральное разрешение 140 нм (определяется размером пикселя цифровой видеокамеры), аксиальное разрешение 420 нм.
2. Для случая умеренного, на уровне десятков процентов, поглощения излучения в образце разработана теоретическая модель формирования изображения в светосильном ЭУФ (рентгеновском) микроскопе для трехмерной реконструкции строения биологических образцов с использованием метода аксиальной томографии.
3. Предложена новая методика фильтрации изображений, для удаления шумов, которая заметно улучшает контраст изображений и не приводит к потере разрешающей способности.
4. Разработана методика изготовления и найден оптимальный вариант держателей биообразцов на основе окошка с Si_3N_4 мембраной в монокристаллической подложке кремния с пропусканием на рабочей длине волны 13,84 нм около 44%. Мембраны стойкие к внешнему воздействию при транспортировке, перепадам температур, вакуумной откачке и размещению на них исследуемых образцов. Максимальный размер окошка составляет $1.5 \times 1.5 \text{ мм}^2$. Установлено, что они обладают хорошими, на уровне классических покровных стекол, биосовместимостью и адгезией клеточных структур. Так же они

подойдут и для исследований в спектральной области “окна прозрачности воды”, где их пропускание составит 50-70% в зависимости от рабочей длины волны микроскопа.

5. Получены изображения различных биологических объектов и установлено, что за время эксперимента накопленная доза не наносит радиационных повреждений биобразцов. Продемонстрировано преимущество в разрешающей способности ЭУФ-микроскопа по сравнению с конфокальной оптической микроскопией.

Список публикаций автора

A1. Glyavina M.M. Morphological analysis of microglia in early postischemic period in the mouse local cerebral ischemia / M.M. Glyavina, P.A. Loginov, V.V. Dudenkova, O.M. Shirokova, D.G. Reunov, A.O. Karpova, N.N. Prodanets, N.A. Korobkov, M.A. Zhuchenko, I.V. Mukhina // EPJ Web of Conferences, -V.195, -P.10004

A2. Rodimova, S.A. Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions / S. A. Rodimova, A. V. Meleshina, E. P. Kalabusheva, E. B. Dashinimae, D. G. Reunov, H. G. Torgomyan, E. A. Vorotelyak, E. V. Zagaynova // Methods Appl Fluoresc. 2019 Sep 9;7(4):044002. doi: 10.1088/2050-6120/ab3b3d.

A3. Kuznetsova, D.S. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology / D. S. Kuznetsova, S. A. Rodimova, A. Gulin, D. Reunov, N. Bobrov, A. V. Polozova, A. Vasin, V. I. Shcheslavskiy, N. Vdovina, V. E. Zagaynova, E. V. Zagaynova // Journal of Biomedical Optics, Vol. 25, Issue 1, 014508 (December 2019).

A4. Meleshina, A. Probing metabolic alteration of differentiating induced pluripotent stem cells using label-free FLIM / A. Meleshina, S. Rodimova, E. Dashinimae, A. Artyuhov, N. Mescheryakova, A. Kashina, E. Kryukov, V. Elagin, D. Reunov, E. Vorotelyak, E. Zagaynova // Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XVIII, Proceedings Volume 11243, 112431D (2020) <https://doi.org/10.1117/12.2544821>

A5. Elagin, V. Multiparametric optical bioimaging reveals the fate of epoxy crosslinked biomeses in the mouse subcutaneous implantation model / V. Elagin, D. Kuznetsova, E. Grebenik, D. A. Zolotov, L. Istranov, T. Zharikova, E. Istranova, A. Polozova, D. Reunov, A. Kurkov, A. Shekhter, E. R. Gafarova, V. Asadchikov, S. M. Borisov, R. I. Dmitriev, E. Zagaynova, P. Timashev // Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8, 107, (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00107>

A6. Нечай, А.Н. Эффективность генерации излучения в полосе 8–14 нм ионами криптона при импульсном лазерном возбуждении / А. Н. Нечай, С. А. Гарахин, А. Я. Лопатин, В. Н.

Полковников, Д. Г. Реунов, Н. Н. Салашенко, М. Н. Торопов, Н. И. Чхало, Н. Н. Цыбин // Квантовая электроника, – 2020, – 50:4, – С.408–413

A7. Chkhalo, N.I. X-ray Optical Scheme for Station “Nanoscope” for Biological Research in the Water Window / I. V. Malyshev, A. E. Pestov, V. N. Polkovnikov, D. G. Reunov, N. N. Salashchenko, M. N. Toropov, V. A. Chernov, Ia. V. Rakshun, K. V. Zolotarev, I. A. Shchelokov // AIP Conference Proceedings 2299, 060005 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0031702>

A8. IV Malyshev High-aperture EUV microscope using multilayer mirrors and a 3D reconstruction algorithm based on z-tomography / IV Malyshev, DG Reunov, NI Chkhalo, MN Toropov, AE Pestov, VN Polkovnikov, NN Tsybin, A Ya Lopatin, AK Chernyshev, MS Mikhailenko, RM Smertin, RS Pleshkov, OM Shirokova // Optics Express, – 2022, – V.30, – N.26, – P. 47567-47586

A9. Реунов, Д.Г. Сравнение методов удаления шума на изображении, полученном в зеркальном микроскопе на длине волны 13.84 нм / Д. Г. Реунов, И. В. Малышев, Н. И. Чхало // ПОВЕРХНОСТЬ. РЕНТГЕНОВСКИЕ, СИНХРОТРОННЫЕ И НЕЙТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, – 2022, – № 12, – С.80–85

A10. Реунов, Д.Г. Определение размера лазерно-плазменного источника ЭУФ-излучения для микроскопа / Д. Г. Реунов, И. В. Малышев, А. А. Перекалов, А. Н. Нечай, Н. И. Чхало // ПОВЕРХНОСТЬ. РЕНТГЕНОВСКИЕ, СИНХРОТРОННЫЕ И НЕЙТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, – 2023, – № 7, – С.1–6. DOI: 10.31857/S1028096023070154

A11. Малышев, И.В. ПРОЕКТ СКАНИРУЮЩЕГО И ПРОЕКЦИОННОГО МИКРОСКОПОВ ДЛЯ СТАНЦИИ “НАНОСКОПИЯ” ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В “ОКНЕ ПРОЗРАЧНОСТИ ВОДЫ” / И. В. Малышев, А. Е. Пестов, В. Н. Полковников, Д. Г. Реунов, М. Н. Торопов, Н. И. Чхало, Я. В. Ракшун, Ю. В. Хомяков, В. А. Чернов, И. А. Щелоков // ПОВЕРХНОСТЬ. РЕНТГЕНОВСКИЕ, СИНХРОТРОННЫЕ И НЕЙТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, – 2023, – № 5, – С.3–15

Материалы конференций и тезисы докладов с участием автора

T1. Реунов, Д.Г. Поглощения излучения импульсного Nd: YAG лазера при лазерном пробое в сверхзвуковых газовых струях тезисы / Салашенко Н.Н., Нечай А.Н., Реунов

Д.Г // Материалы XXIV Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2020, – Т.2, –С.903-904

Т2. Реунов, Д.Г. Аттестация характеристик широкопольного мягкого рентгеновского микроскопа / Д.Г. Реунов, И.В. Малышев, Н.Н. Салащенко, М.Н. Торопов, Н.И. Чхало // Материалы XXV Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2021, – Т.1, – С.441-442

Т3. Малышев, И.В. Высокоапертурный зеркальный рентгеновский микроскоп на длину волны 13.88 нм / И.В. Малышев, Д.Г. Реунов, Н.И. Чхало, А.Е. Пестов, М.Н. Торопов, Е.С. Антюшин, Д.С. Дмитриев, В.Н. Полковников, И.Г. Забродин, И.А. Каськов, М.С. Михайленко, А.Н. Нечай, А.А. Перекалов, Р.С. Плешков, Н.Н. Салащенко // Материалы XXV Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2021, – Т.1, – С.421-422

Т4. Нечай, А.Н. Исследование эмиссии МР и ЭУФ излучения из плазмы, формируемой на жидкоструйных мишенях / И.Г. Забродин, А.Н. Нечай, А.А. Перекалов, Д.Г. Реунов, Н.Н. Салащенко, Н.И. Чхало // Материалы XXV Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2021, – Т.1, – С.401-402

Т5. Малышев, И.В. Проект станции “Наноскопия в окне прозрачности воды “ для синхротрона СКИФ / Малышев Н.И. Чхало, Д.Г. Реунов, Я.В. Ракшун, В.А. Чернов, И.А. Щелков // Объединенная конференция «Электронно-лучевые технологии и рентгеновская оптика в микроэлектронике» КЭЛТ 2021.

Т6. Реунов, Д.Г. Высокора разрешающий зеркальный рентгеновский микроскоп на длину волны 13.88 нм / Реунов, И.В. Малышев, Н.Н. Салащенко, М.Н. Торопов Н.И. Чхало // Объединенная конференция «Электронно-лучевые технологии и рентгеновская оптика в микроэлектронике» КЭЛТ 2021.

Т7. Реунов, Д.Г. Удаление шума с изображений, полученных на зеркальном мягко рентгеновском микроскопе на длине волны 13,88 нм / Д.Г. Реунов, И.В. Малышев, Н.И. Чхало // Материалы XXVI Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2022, –Т.1, –С.592-593

Т8. Малышев, И.В. Зеркальный ЭУФ-микроскоп на 13.9нм. Демонстрация разрешения и z-томографии / И.В. Малышев, Д.Г. Реунов, Н.И. Чхало, А.Е. Пестов, М.Н. Торопов, Е.С. Антюшин, Д.С. Дмитриев, В.Н. Полковников, И.Г. Забродин, И.А. Каськов, М.С. Михайленко, А.Н. Нечай, А.А. Перекалов, Р.С. Плешков, Н.Н. Салащенко // Материалы XXVI Международного симпозиума «Нанофизика и нанoeлектроника», – 2022, – Т.1, – С.562-563

Т9. Гайкович, К.П. Теория ЭУФ и МР микроскопической аксиальной томографии на основе обратного преобразования Радона / К. П. Гайкович, И. В. Малышев, Д. Г. Реунов // Материалы XXVII Международного симпозиума «Нанопизика и наноэлектроника», – 2023, – Т.2, – С.837-838

Т10. Малышев, И.В. Изучение биологических образцов на зеркальном ЭУФ-микроскопе / И. В. Малышев, Д. Г. Реунов, Н. И. Чхало, Е. П. Казаков, С. В. Лаврушкина, С. А. Голышёв // Материалы XXVII Международного симпозиума «Нанопизика и наноэлектроника», – 2023, –Т.2, – С.870-871

Т11. Реунов, Д.Г. Методика изготовления Si₃N₄-мембран в качестве подложек для мягкой рентгеновской микроскопии / Д. Г. Реунов, Н. С. Гусев, М. С. Михайленко, Д. В. Петрова, И. В. Малышев, Н. И. Чхало // Материалы XXVII Международного симпозиума «Нанопизика и наноэлектроника», – 2023, – Т.2, – С.902-903

Литература

1. Selin, M. 3D X-ray microscopy: image formation, tomography and instrumentation / Mårten Selin // KTH, School of Engineering Sciences (SCI), Applied Physics, Biomedical and X-ray Physics, KTH Royal Institute of Technology, p. viii, 75, 2016
2. Kapishnikov, S. Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in plasmodium falciparum / S. Kapishnikov, A. Weiner, E. Shimoni, P. Guttmann, G. Schneider, N. Dahan-Pasternak, R. Dzikowski, L. Leiserowitz, M. Elbaum// Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Т. 109. – №. 28. – С. 11188-11193.
3. Cruz-Adalia, A. T cells kill bacteria captured by transinfection from dendritic cells and confer protection in mice / A. Cruz-Adalia, G. Ramirez-Santiago, C. Calabria-Linares, M. Torres-Torresano, L. Feo, M. Galán-Díez, E. Fernández-Ruiz, E. Pereiro, P. Guttmann, M. Chiappi, G. Schneider, J. L. Carrascosa, F. J. Chichón, G. Martínez Del Hoyo, F. Sánchez-Madrid, and E. Veiga // Cell Host & Microbe. – 2014. – Т. 15. – №. 5. – С. 611-622.
4. Le Gros, M. A. Soft x-ray tomography reveals gradual chromatin compaction and reorganization during neurogenesis in vivo / M. A. Le Gros, E. J. Clowney, A. Magklara, A. Yen, E. Markenscoff-Papadimitriou, B. Colquitt, C. A. Larabell, // Cell reports. – 2016. – Т. 17. – №. 8. – С. 2125-2136.
5. Harkiolaki, M. Cryo-soft x-ray tomography: using soft x-rays to explore the ultrastructure of whole cells / M. Harkiolaki, M. C. Darrow, M. C. Spink, E. Kosior, K. Dent, E. Duke, // Emerging topics in life sciences. – 2018. – Т. 2. – №. 1. – С. 81-92.

6. Kordel, M. Laboratory water-window x-ray microscopy / M. Kordel, A. Dehlinger, C. Seim, U. Vogt, E. Fogelqvist, J. A. S., H. Stiel // *Optica*. – 2020. – T. 7. – №. 6. – С. 658-674.
7. Schmahl, G. A Laboratory X-Ray Microscope with a Plasma X-Ray Source / G. Schmahl, B. Niemann, D. Rudolph, M. Diehl, J. Thieme, W. Neff, R. Holz, R. Lebert, F. Richter, G. Herziger // *X-Ray Microscopy III: Proceedings of the Third International Conference, London, September 3–7, 1990*. – Springer Berlin Heidelberg, 1992. – С. 66-69.
8. Berglund, M. Compact water-window transmission x-ray microscopy, M. Berglund, L. Rymell, M. Peuker, T. Wilhein, H. M. Hertz, // *Journal of microscopy*. – 2000. – T. 197. – №. 3. – С. 268-273.
9. Fogelqvist, E. Laboratory cryo x-ray microscopy for 3D cell imaging / E. Fogelqvist, M. Kördel, V. Carannante, B. Önfelt, H. M. Hertz // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – С. 1-8.
10. Legall, H. Compact x-ray microscope for the water window based on a high brightness laser plasma source / H. Legall, G. Blobel, H. Stiel, W. Sandner, C. Seim, P. Takman, D. H.Martz, M. Selin, U. Vogt, H. M. Hertz, D. Esser, H. Sipma, J. Luttmann, M. Höfer, H. D. Hoffmann, S. Yulin, T. Feigl, S. Rehbein, P. Guttman, G. Schneider, U. Wiesemann, M. Wirtz, W. Dietsch // *Optics express*. – 2012. – T. 20. – №. 16. – С. 18362-18369.
11. Parkinson, D. Y. Automatic alignment and reconstruction of images for soft X-ray tomography / D. Y. Parkinson, C. Knoechel, C. Yang, C. A. Larabell, M. A. Le Gros // *Journal of structural biology*. – 2012. – T. 177. – №. 2. – С. 259-266.
12. Shaw P. Deconvolution in 3-D optical microscopy // *The Histochemical Journal*. – 1994. – T. 26. – С. 687-694.
13. Minden, J. S. Direct cell lineage analysis in *Drosophila melanogaster* by time-lapse, three-dimensional optical microscopy of living embryos / J. S. Minden, D. A. Agard, J. W. Sedat, B. M. Alberts // *The Journal of Cell Biology*. – 1989. – T. 109. – №. 2. – С. 505-516.
14. Shaw P. J. Three-dimensional optical microscopy using tilted views // *Journal of microscopy*. – 1990. – T. 158. – №. 2. – С. 165-172.
15. Glyavina, M.M. Morphological analysis of microglia in early postischemic period in the mouse local cerebral ischemia / M.M. Glyavina, P.A. Loginov, V.V. Dudenkova, O.M. Shirokova, D.G. Reunov, A.O. Karpova, N.N. Prodanets, N.A. Korobkov, M.A. Zhuchenko, I.V. Mukhina // *EPJ Web of Conferences*. – EDP Sciences, 2018. – T. 195. – С. 10004.

16. Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions Svetlana A Rodimova^{1,2} , Aleksandra V Meleshina¹, Ekaterina P Kalabusheva^{3,4}, Erdem B Dashinimaev^{3,4}, Dmitry G Reunov¹, Hayk G Torgomyan¹, Ekaterina A Vorotelyak^{3,4,5} and Elena V Zagaynova^{1,2}Published 9 September 2019 • © 2019 IOP Publishing Ltd Methods and Applications in Fluorescence, Volume 7, Number 4 Special Issue on Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM): from Fundamentals to Applications Citation Svetlana A Rodimova et al 2019 Methods Appl. Fluoresc. 7 044002 DOI 10.1088/2050-6120/ab3b3d
17. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology Daria S. Kuznetsova, Svetlana A. Rodimova, Alexander Gulin, Dmitry Reunov, Nikolai Bobrov, Anastasia V. Polozova, Alexander Vasin, Vladislav I. Shcheslavskiy, Natalia Vdovina, Vladimir E. Zagainov, Elena V. Zagaynova Journal of Biomedical Optics, Vol. 25, Issue 1, 014508 (December 2019). <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.1.014508>
18. Probing metabolic alteration of differentiating induced pluripotent stem cells using label-free FLIM A. Meleshina, S. Rodimova, E. Dashinimaev, A. Artyuhov, N. Mescheryakova, A. Kashina, E. Kryukov, V. Elagin, D. Reunov, E. Vorotelyak, E. Zagaynova Proceedings Volume 11243, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XVIII; 112431D (2020) <https://doi.org/10.1117/12.2544821>
Event: SPIE BiOS, 2020, San Francisco, California, United States
19. Vadim Elagin, Daria Kuznetsova, Ekaterina Grebenik, Denis A Zolotov, Leonid Istranov, Tatiana Zharikova, Elena Istranova, Anastasia Polozova, Dmitry Reunov, Alexandr Kurkov, Anatoly Shekhter, Elvira R Gafarova, Victor Asadchikov, Sergey M Borisov, Ruslan I Dmitriev, Elena Zagaynova, Peter Timashev (2020). Multiparametric optical bioimaging reveals the fate of epoxy crosslinked biomeses in the mouse subcutaneous implantation model. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8, 107. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00107>
20. Sage, D., Donati, L., Soulez, F., Fortun, D., Schmit, G., Seitz, A., ... & Unser, M. (2017). DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. Methods, 115, 28-41.
21. Wei Z., Wang J., Nichol H., Wiebe S., Chapman D. // Micron. 2012. V. 43. № 2–3. P. 170. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.009>
22. Devi T.G., Patil N. // Int. Conf. Innovative Trends in Information Technol. 2020. P. 1. <https://doi.org/10.1109/ICITIIT49094.2020.9071556>

23. Kushwaha H.S., Tanwar S., Rathore K.S., Srivastava S. // Second Int. Conf. Adv. Comput. Comm. Technol. 2012. P. 276. <https://doi.org/10.1109/ACCT.2012.41>
24. Roels J., Aelterman J., De Vylder J., Luong H., Saeys Y., Lippens S., Philips W. // Adv. Visual Computing. 2014. V. 8887. P. 31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14249-4_4
25. Thanh D.N.H., Dvoenko S.D. // Pattern Recognit. Image Anal. 2016. V. 26. P. 285. <https://doi.org/10.1134/S1054661816020231>
26. Bovik A., Huang T., Munson D. // IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing. 1985. V. 33. № 5. P. 1253. <https://doi.org/10.1109/TASSP.1985.1164690>
27. Nodes T., Gallagher N. // IEEE Transactions on Communications 1984. V. 32. № 5. P. 532. <https://doi.org/10.1109/TCOM.1984.1096099>
28. Bovik A. // IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing. 1987. V. 35. № 4. P. 493. <https://doi.org/10.1109/TASSP.1987.1165153>
29. Florencio D.A.F., Schafer R.W. // Proc. SPIE 2308, Visual Communications and Image Processing. 1994. <https://doi.org/10.1117/12.185969>
30. Ilke T. // Int. J. Electronics Comm. 2013. V. 67. № 9. P. 771. <https://doi.org/10.1016/j.aeue.2013.03.006>
31. Wang G., Li D., Pan W., Zang Z. // Signal Processing. 2010. V. 90. № 12. P. 3213. <https://doi.org/10.1016/j.sigpro.2010.05.026>
32. W.H. Richardson, Bayesian-based iterative method of image restoration, J. Optical Soc. Am. 62 (1972) 55–59. L.B. Lucy, An iterative technique for the rectification of observed distributions, Astrophys. J. 79 (6) (1974) 745–754.
33. Lucy L.B. // Astrophys. J. 1974. V. 79. № 6. P. 745. <https://doi.org/10.1086/111605>
34. ImageJ. <https://imagej.nih.gov/ij/index.htm>
35. <https://www.appliednt.com/>