09

Особенности люминесцентной томографии апконверсионных люминофоров с дискретным распределением

© Л.А. Нуртдинова,[1] А.В. Леонтьев,[1] Е.О. Митюшкин,[1] Д.А. Бизяев,[1] Н.И. Нургазизов,[1] А.П. Чукланов,[1] П.А. Косач,[2] Д.Г. Зверев,[2] В.Г. Никифоров[1]

[1]Федеральный исследовательский центр „Казанский научный центр РАН“,
420029 Казань, Россия
[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Россия
e-mail: niazn@mail.ru

Поступило в Редакцию 21 апреля 2025 г.
В окончательной редакции 21 апреля 2025 г.
Принято к публикации 21 апреля 2025 г.

Проведены тестовые измерения модельной дискретной структуры на конфокальном оптическом микроскопе методами люминесцентной томографии. Данная тестовая структура, представляющая собой выраженное дискретное распределение агломератов апконверсионных люминофоров, была создана с помощью атомно-силовой микроскопии. В роли люминофоров выбраны частицы $NaYF_4$:Yb(18 %), Er(2 %), синтезированные гидротермальным методом. Они обладают люминесценцией в видимом диапазоне при лазерном возбуждении на длине волны вблизи 980 nm, что, в частности, обусловливает интерес их применения в задачах по биовизуализации. С помощью конфокального оптического микроскопа проведена регистрация люминесцентного сигнала в зависимости от трехмерных координат образца. Применение алгоритмов постобработки полученных данных показало, что в случае дискретно расположенных объектов необходима деконволюция с учетом функции точечного рассеяния, которая позволяет нивелировать артефакты изображения и кратно повысить точность определения размеров люминесцирующих объектов.

Ключевые слова: конфокальная микроскопия, деконволюция изображения, люминесцентная томография, атомно-силовая микроскопия, апконверсионные люминофоры, фторидные частицы.

DOI: 10.61011/JTF.2025.10.61338.67-25

Введение

Визуализация клеточных и субклеточных структур внутри биоткани становится одним из базовых методов исследования, диагностики и терапии в биомедицине. И важнейшим направлением в этой области является развитие методов визуализации объектов под поверхностью в глубине образца. С этой целью разработаны томографические методы высокого разрешения, такие как оптическая когерентная томография [1], конфокальная микроскопия [2], хроматическая конфокальная микроскопия [3] и т. д.

Наиболее доступная техника конфокального оптического микроскопа (КОМ) позволяет регистрировать излучение с площади образца менее $1\,\mu m^2$. Для решения биологических задач перспективным является использование апконверсионных нанозондов. Они способны поглощать излучение в области прозрачности биологических тканей, а именно в ближнем ИК диапазоне, и излучать видимый свет. Апконверсионные нанозонды широко используются для визуализации различных процессов (например, транспорт лекарств), что также представляет возможности для получения изображения методами конфокальной оптической микроскопии [4–9]. При этом в силу специфики распространения нанозондов в биотканях следует ожидать сильно неоднородное или даже выраженное дискретное распределение люминесцентных зондов по объему. Заметим, что традиционный режим конфокального микроскопа, когда происходит регистрация отраженного от поверхности излучения, в подавляющем большинстве случаев применяется, когда источник сигнала непрерывен в пространстве. Однако регистрация сигнала в средах с дискретным распределением нанолюминофоров может сопровождаться появлением артефактов, которые сильно исказят картину их реального расположения. Это обусловливает настоятельную необходимость оценки величины артефактов, а также разработки методов их минимизации или полного устранения.

Для решения поставленной задачи среды с неизвестным распределением люминесцентных зондов (например, биоткани) не подходят. Требуется образец с заранее известным точным расположением люминесцирующих объектов с заданными характеристиками и возможностью вариации их размеров и положения для нужд эксперимента. Для создания такого образца можно использовать методы атомно-силовой микроскопии, которая позволяет характеризовать и манипулировать микро- и нанообъектами с нанометровой точностью. В настоящей работе предложена методика создания тестовой структуры на основе апконверсионных частиц $NaYF_4$:Yb, Er, способных ярко люминесцировать в ви-

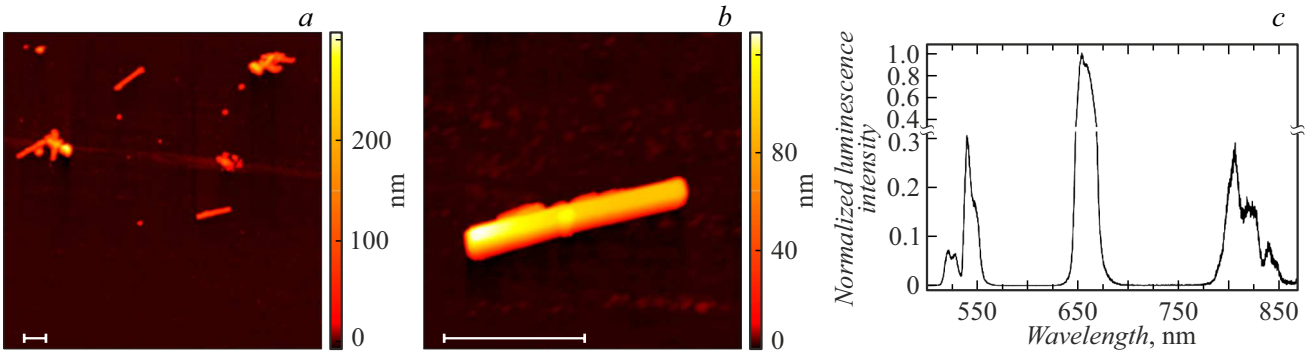

Рис. 1. АСМ изображение стеклянной подложки с осажденными на нее частицами $NaYF_4$:Yb, Er (*a*) и укрупненное АСМ изображение одиночной частицы (*b*). Размер масштабного отрезка 1 μm. Спектры апконверсионной люминесценции частиц при лазерном возбуждении на длине волны 980 nm (*c*).

димой области спектра при лазерном возбуждении на длине волны вблизи 980 nm. Проведено томографическое исследование такой структуры методами конфокальной микроскопии и оценена точность получаемых данных о координатах и размерах люминесцирующих объектов.

1. Подготовка образцов и методика проведения измерений

1.1. Синтез апконверсионных частиц $NaYF_4$:Yb(18 %), Er(2 %)

Синтез частиц $NaYF_4$:Yb(18 %), Er(2 %) был проведен гидротермальным методом, который подробно изложен, например, в [10–12]. Согласно полученным АСМ изображениям (рис. 1, *a*, *b*), синтезированные частицы имели цилиндрическую форму с характерными размерами около $1 \times 0.12\,\mu$m. Спектр люминесценции, измеренный с помощью КОМ (рис. 1, *c*), соответствует апконверсионной эмиссии ионов Er^{3+} при лазерном возбуждении на длине волны 974 nm [11,12].

1.2. Атомно-силовой микроскоп

Для создания на поверхности подложки тестовой структуры и ее последующей характеризации использовался сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) Solver Bio (NT-MDT, Россия), который работал в режиме атомно-силового микроскопа (АСМ). За счет использования для сканирования образца схемы с перемещением зонда СЗМ был оборудован оптическим инвертированным микроскопом Биолам П2-1, расположенным с обратной стороны подложки относительно измерительной головки. Это позволило при использовании прозрачных подложек многократно находить рабочую область (используя метки-царапины) и позиционировать над ней АСМ зонд с погрешностью менее 5 μm для создания и исследования тестовой структуры. При этом доступное поле сканирования АСМ составляло около $100 \times 100\,\mu$m, и дальнейшее точное позиционирование АСМ зонда могло осуществляться программой управления СЗМ. Так же оптический микроскоп позволял контролировать перемещения АСМ зонда во время сканирования и при необходимости корректировать размеры области сканирования и положение этой области в пределах максимального поля сканирования.

Для работы были использованы стандартные кремниевые зонды Tap150Al-G (Budgetsensors), резонансная частота около 150 kHz, силовая константа около 5 N/m. Данные зонды могут работать как в контактном режиме, когда сила взаимодействия с поверхностью достаточно большая, что позволяет перемещать частицы, так и в полуконтактном режиме, когда сила взаимодействия меньше на несколько порядков, что позволяет изучать полученные структуры. Создание и исследование полученной тестовой структуры проводилось при комнатной температуре и влажности.

1.3. Конфокальный оптический микроскоп

Основными компонентами системы КОМ являются объективы, конфокальные диафрагмы, детекторы светового излучения, сканирующие зеркала (гальвосканер), делительные пластины, настроенные на длины волн возбуждающего лазера и люминесцентного сигнала [13,14], а также спектрометр. В качестве источника возбуждения использовался одномодовый лазерный диод серии CM96Z200-74 с волоконной брегговской решеткой (II–VI Incorporated) с центральной длиной волны 974 nm, попадающий в полосу поглощения ионов Yb^{3+}. Фокусировка излучения на объект и сбор излучения с объекта осуществлялись с помощью объектива Olympus PlanN 10x/0.25. Максимальное латеральное разрешение микроскопа определялось диаметром пятна возбуждения в фокальной плоскости и составляло 1.1 μm. Регистрация излучения происходила в режиме счета фотонов при помощи кремниевого лавинного фотодиода PelkinElmer STCM-AQR-14-FC. Собранный сигнал визуализировался

и анализировался платформой Qudi [15]. Спектр люминесценции соответствовал линиям излучения ионов Er^{3+}, возбуждаемым через ионы Yb^{3+} по апконверсионной схеме [11,12]. Регистрация спектров люминесценции проводилась при помощи спектрометра на основе ПЗС камеры Starlight Xpress Trius SX-694.

1.4. Создание образца с контролируемым дискретным распределением люминесцентных областей

В качестве подложки для создания тестовой структуры использовалось покровное стекло толщиной 0.45 mm. Из стекла вырезалась область размером около 2×0.4 cm несимметричной формы со скошенным углом для быстрой идентификации рабочей стороны подложки. Далее на поверхности формировались метки в виде пересекающихся под прямым углом микроцарапин. Полученные пересечения микроцарапин легко обнаруживались визуально, что позволяло быстро находить необходимую область на подложке при создании и изучении физических свойств тестовой структуры различными методами [16].

Для создания тестовой структуры использовался предложенный ранее алгоритм импринтинга частиц с помощью АСМ [17], усовершенствованный для проведения более точных манипуляций. На подложку № 1 наносилась и высушивалась капля раствора с апконверсионными частицами. Затем с помощью оптического микроскопа выбиралась область вблизи пересечения микроцарапин, гарантированно содержащая большое количество частиц. Зонд АСМ, работающий в полуконтактном режиме, подводился к этой области, и проводилось сканирование участка поверхности размером около $90 \times 90\,\mu$m. При сканировании с помощью оптического микроскопа контролировались перемещения зонда и поведение пленки с апконверсионными частицами. Анализ полученного АСМ изображения позволял убедиться, что в данной области находится достаточное количество апконверсионных частиц, которые можно собрать на АСМ зонд для переноса на другую подложку. В этом случае АСМ изображение содержало большое количество шумов („брейков“), которые, по всей видимости, были обусловлены большими перепадами высот и взаимодействием АСМ зонда с вязкими остатками раствора.

После этого АСМ переводился в контактный режим (когда зонд не совершает вынужденных колебаний, и обратная связь поддерживает постоянным отклонение кантилевера) и запускался процесс сканирования достаточно большой области. Увеличение давления зонда на поверхность за счет перехода в контактный режим и большое поле сканирования позволяли наблюдать в оптический микроскоп как происходит утонение пленки с апконверсионными частицами в области сканирования и, в некоторых случаях, „прилипание“ частей этой пленки на АСМ зонд. Часть остатков пленки при этом оттеснялась к краю поля сканирования. Таким образом, в распоряжении оператора появлялся АСМ зонд, покрытый остатками раствора с апконверсионными частицами, которые могли быть использованы для создания необходимых структур на чистой подложке. Количество частиц, набранных на АСМ зонд, можно было изменять, изменяя площадь сканирования.

Так как количество частиц, набранных на зонд, было сложно контролировать, то создание тестовых структур проводилось в два этапа. На первом этапе все частицы, набранные на АСМ зонд, переносились на чистую подложку № 2 в заранее выбранную область. Зонд подводился к поверхности, АСМ переводился в полуконтактный режим, выбиралась амплитуда колебаний кантилевера, близкая к максимально возможной, и проводилась протяжка частоты возбуждающего генератора в большом диапазоне 0.05–2 MHz (при частоте собственных колебаний кантилевера с зондом около 0.15 MHz). За счет этого собранные на АСМ зонд агломераты переносились („стряхивались“) на подложку. Далее с помощью оптического микроскопа из этих агломератов выбирался одиночный агломерат необходимых размеров и формы, который снова, за счет его сканирования, переносился на АСМ зонд. В данном случае адгезия апконверсионных частиц к поверхности подложки была гораздо ниже, чем в случае осаждения из раствора. Поэтому перенести на АСМ зонд отдельный агломерат можно было и при работе в полуконтактном режиме. Помимо визуального контроля перехода агломерата с апконверсионными частицами на зонд с помощью оптического микроскопа, контроль осуществлялся по изменению (снижению) резонансной частоты колебаний кантилевера. После осаждения агломерата на поверхность подложки, резонансная частота возвращалась к начальному значению.

Одиночный агломерат с АСМ зонда осаждался в определенную точку подложки № 2, и таким образом последовательно формировалась необходимая тестовая структура. Оптические снимки, иллюстрирующие последовательность формирования структуры в виде креста из пяти точек-агломератов, представлены на рис. 2. На данных изображениях также наблюдается тень от кантилевера и микроцарапина, которая использовалась для поиска места создания структуры на подложке.

Для оценки размеров полученной тестовой структуры использовался АСМ, работающий в полуконтактном режиме. Для проведения таких измерений использовался новый зонд Tap150Al-G. Так как сила адгезии тестовой структуры к подложке была слабой и существовал риск смещения агломератов из их текущего положения или перенос их на зонд АСМ, то для увеличения адгезии на полученную тестовую структуру после проведения измерений на конфокальном микроскопе напылялся слой металла толщиной около 40 nm. Напыление проводилось на сверхвысоковакуумной установке MultiProbe P (Omicron) методом распыления твердотельной никелевой мишени электронным лучом. За счет большой высоты агломерата частиц и эффекта конволюции его

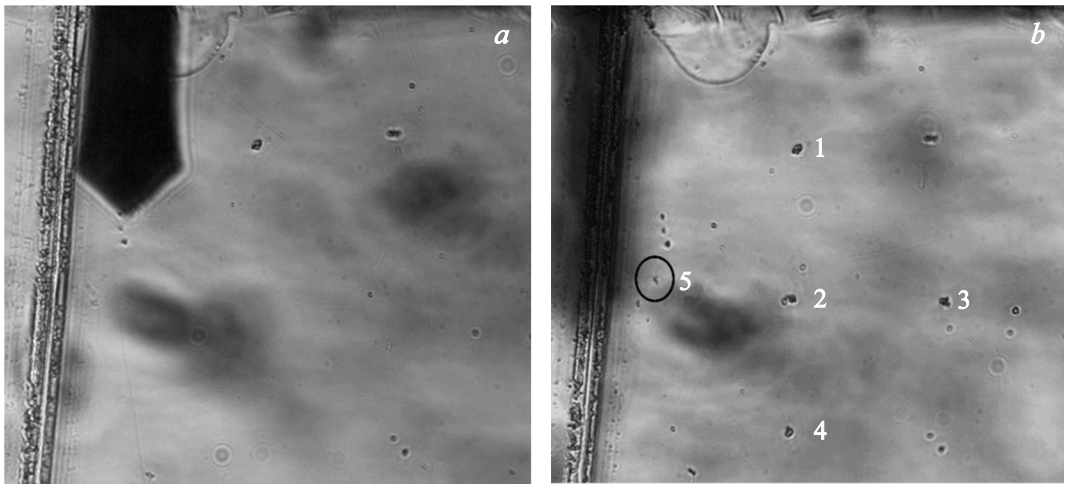

Рис. 2. Оптические изображения, полученные во время создания тестовой структуры в виде креста, состоящего из пяти агломератов апконверсионных частиц. Область с одной частицей (a), финальное изображение полученной структуры (b). Числами обозначен порядок осаждения частиц, агломерат 5 для наглядности отмечен овалом.

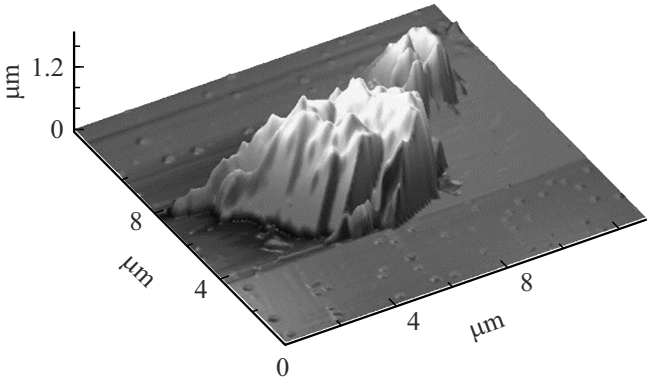

Рис. 3. Трехмерное АСМ изображение агломерата частиц, расположенного в центре созданной тестовой структуры в виде креста.

наблюдаемые с помощью АСМ латеральные размеры должны были быть существенно больше реальных. Однако на определение высоты исследуемой структуры эффект конволюции не влияет, и эти размеры были установлены с точностью около 10 nm. Трехмерное изображение одного из осажденных агломератов (центрального агломерата в структуре) приведено на рис. 3. Хорошо видно, что наблюдаемый наклон боковых стенок агломерата определяются формой используемого АСМ зонда, и поэтому АСМ изображения не использовались для определения латеральных размеров агломерата.

1.5. Получение трехмерного люминесцентного изображения образца при помощи КОМ

В результате сканирования собирался массив данных, представляющий собой зависимость интенсивности люминесценции от координат центра фокального пятна. Сканирование проводилось в плоскости (X, Y), перпендикулярной оптической оси, с помощью системы позиционирования на основе гальванометрического сканера Thorlabs GVS012, и по глубине образца Z (параллельно оптической оси) с помощью пьезосканера Newport NPO-140SG-D. Площадь сканируемой поверхности составляла 2.5×2.5 mm, диапазон сканирования по глубине составлял $100\,\mu$m. Шаг сканирования в условиях поставленной тестовой задачи был выбран равным $3.25\,\mu$m в плоскости (X, Y) и $2\,\mu$m вдоль оси Z. В результате получался набор оптических изображений, представляющих собой распределение интенсивности по координатам X и Y, с шагом по оси Z (схематично показано на рис. 4). Здесь и далее координата $Z = 0$ соответствует уровню поверхности подложки, на которой находится исследуемый образец.

Важно отметить, что принцип регистрации оптического сигнала дискретных источников света на конфокальном микроскопе имеет свои особенности. Представим, что точечный люминофор с координатой (X', Y') попадает в фокус луча возбуждения (рис. 5, a). На срезе с координатой Z' этому объекту будет соответствовать максимальная интенсивность его люминесценции. Любое отклонение по вертикали от координаты $Z' + \delta z$ приведет к уменьшению интенсивности. Однако если же теперь расположить точечный люминофор вблизи от фокального пятна возбуждения $(X' + \delta x, Y' + \delta y)$, то картина распределения интенсивности при вариации вертикальной координаты $Z' + \delta z$ полностью изменится: значению Z' будет соответствовать локальный минимум, а отклонение $Z' + \delta z$ приведет к росту сигнала из-за увеличения интенсивности облучения (рис. 5, b). В общем случае следует ожидать, что распределение интенсивности люминесценции вблизи точечного люминофора будет иметь более одного выраженного максимума, что

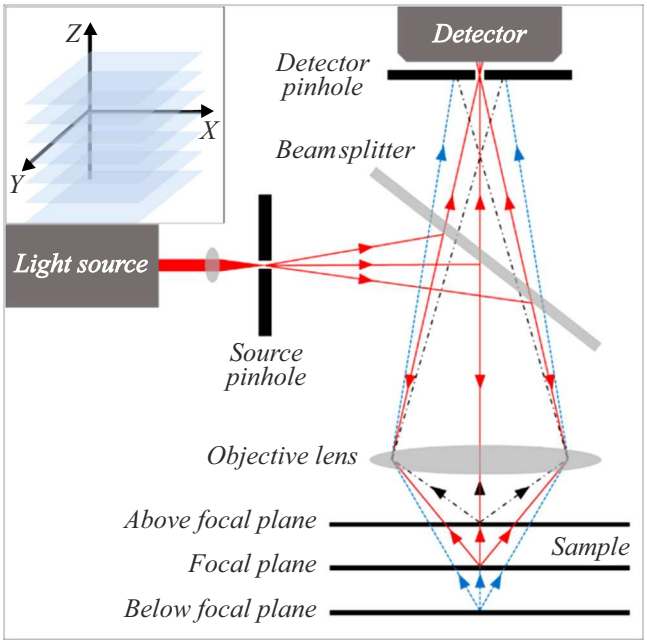

Рис. 4. Принципиальная схема КОМ. Вставка: схема получения трехмерного люминесцентного изображения объемного образца, представляющая собой набор плоских срезов в плоскости (X, Y) с шагом вдоль оси Z.

является источником артефакта при математическом анализе данных. Ситуация еще более осложнится, если ось Z сканирования будет слегка наклонена по отношению к оптической оси (рис. 5, c). Такой артефакт может иметь ярко выраженный максимум, который, однако, не соответствует истинному положению точечного люминофора.

Следующим важным моментом является разрешение получаемой люминесцентной картины Res, которое задается конфигурацией микроскопа. Параметры объектива оцениваются по формулам Аббе следующим образом:

$$Res(x, y) = \lambda/(2 \cdot \eta \cdot \sin\alpha), \tag{1}$$

$$Res(z) = 2 \cdot \lambda/(\eta \cdot \sin(\alpha))^2, \tag{2}$$

где λ — длина волны регистрируемого излучения, а $\eta \cdot \sin(\alpha)$ — числовая апертура объектива. Объектив выбирался из соображений соответствия области сканирования характерным размерам неоднородностей изучаемого образца. В результате для измерений использовался десятикратный объектив с числовой апертурой 0.25. Он, согласно критериям Аббе (1), (2), позволяет получить латеральное разрешение (в плоскости (X, Y)) $\sim 1\,\mu$m, и аксиальное разрешение (вдоль оси Z) $\sim 20\,\mu$m. Однако следует уточнить, что разрешение КОМ вдоль оси Z зависит также от других факторов, в том числе положения и размера конфокальной диафрагмы перед детектором. Теоретически диафрагма может кратно улучшить аксиальное разрешение [18]. Однако определение истинной разрешающей способности КОМ на практике оказывается затруднительным. В связи с этим возникает задача по созданию трехмерного люминесцентного изображения, адекватного реальному распределению дискретных люминофоров по образцу, и определению ошибки измерения положения по координате Z точечного люминофора. Важно добавить, что в рассматриваемой тестовой задаче с целью усложнения работы алгоритмов восстановления изображения итоговое разрешение КОМ было сознательно „испорчено“ достаточно большой величиной шага латерального сканирования $3.25\,\mu$m.

2. Полученные результаты и их обсуждение

2.1. Обработка массива данных, полученных КОМ

Для получения координат и размеров люминесцирующих объектов на поверхности тестовой структуры была проведена математическая обработка массива данных, представляющего собой интенсивность апконверсионного люминесцентного отклика при лазерном возбуждении

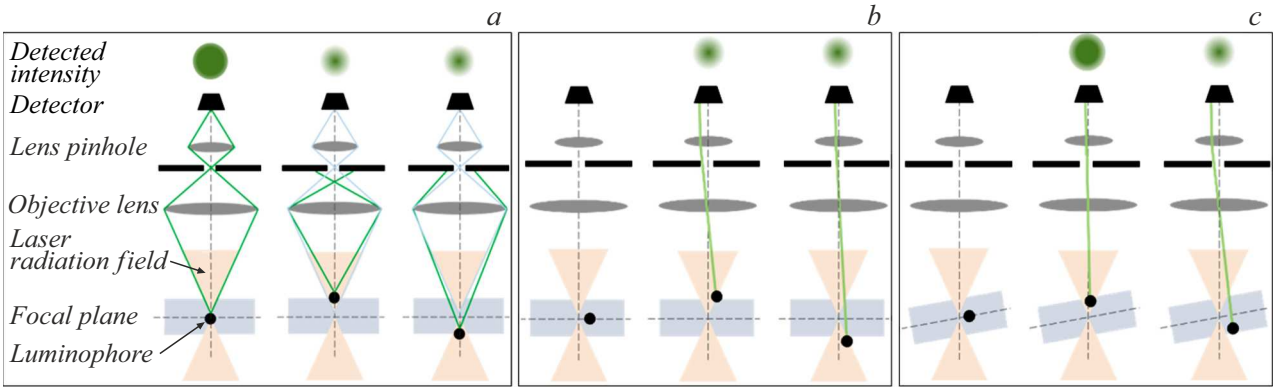

Рис. 5. Схема создания люминесцентного изображения дискретно распределенных светящихся объектов для случаев, когда объект в фокальной плоскости находится внутри перетяжки пучка возбуждения (a); объект в фокальной плоскости находится вне пучка возбуждения, но рядом с ним (b); образец с объектом расположены под углом к пучку возбуждения (c).

на длине волны 974 nm, I_{XYZ}. Переменные X, Y, Z задают координаты области сканирования: X и Y — координаты поверхности, Z — вертикальное положение фокальной плоскости КОМ.

2.2. Процедура на основе усреднения с заранее известными параметрами

Для быстрой оценки дискретного распределения апконверсионных частиц на поверхности подложки достаточно простого алгоритма обработки массива данных, который хорошо показал себя в случае непрерывного распределения люминофоров [19]. Заранее известное расположение апконверсионных частиц на поверхности позволяет определить интенсивность шумового сигнала в областях, не содержащих источников апконверсионной люминесценции I_0. Далее всем областям сканирования, для которых уровень сигнала оказывается ниже порогового $I_{XYZ} < I_0$, приписывается высота $H_{XY} = Z = 0\,\mu$m, соответствующая уровню поверхности подложки.

В значимых областях $I_{XYZ} > I_0$, где находятся источники люминесценции, положение высоты H_{XY} определяется следующим образом:

$$H_{XY} = \frac{\Sigma_Z Z \cdot I_{XYZ}^{\alpha}}{\Sigma_Z I_{XYZ}}. \quad (3)$$

Степенной параметр α введен для контроля контрастности анализируемого сигнала. Например, в нашем случае относительный разброс величин интенсивности люминесценции в значимых областях составил 4 порядка. Для уменьшения контрастности значение α было выбрано равным $\alpha = 0.3$. Для устранения высокочастотного шума можно провести „сглаживание“ по среднему значению в заданной области:

$$\overline{H}_{X_i,Y_j} = \frac{1}{(2k+1)^2} \sum_{i-k}^{i+k} \sum_{j-k}^{j+k} I_{X_i,Y_j}. \quad (4)$$

Для случая $k = 1$ результат обработки данных представлен на рис. 6. Видно, что такой простой подход

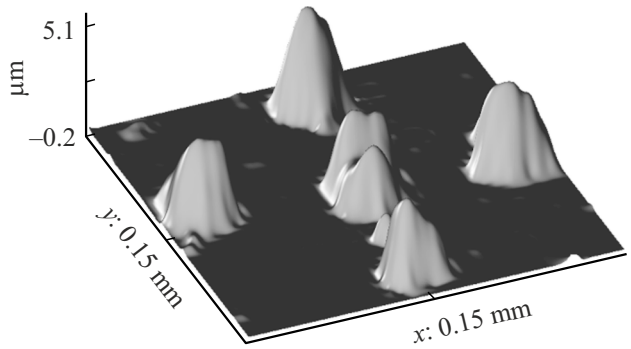

Рис. 6. Распределение агломератов апконверсионных люминофоров в тестовой структуре, полученное с помощью процедуры усреднения с заранее известными параметрами.

Таблица 1. Размеры частиц, определенные с помощью КОМ до и после применения процедуры деконволюции, и их сравнение с реальными размерами тестовой структуры

№ частицы	Размер		
	X, μm	Y, μm	Z, μm
Без использования процедуры деконволюции, $r^{(a)}$			
1	6.0	4.0	15.4
2	6.9	6.5	21.3
3	6.5	5.6	22.7
4	7.0	4.6	16.6
5	6.9	5.5	19.9
После применения процедуры деконволюции, $r^{(b)}$			
1	3.9	3.4	2.0
2	5.6	3.3	3.5
3	3.3	3.3	2.8
4	5.5	3.6	1.8
5	3.3	3.2	2.0
Истинные размеры, $r^{(0)}$			
1	0.9	2.2	0.79
2	2.4	1.1	1.18
3	1.4	1.1	1.44
4	2.0	2.5	2.51
5	1.8	1.8	1.86

в целом позволяет достаточно точно определить положение люминесцирующих объектов. Информация же о латеральных размерах и высотах не согласуется с истинными характеристиками. Например, частица 3 с размером $1.4 \times 1.1\,\mu$m (табл. 1) на восстановленной картинке (рис. 6) захватывает область $10 - 15\,\mu$m. Согласно рис. 6, точность определения высот объектов можно оценить в $5\,\mu$m.

2.3. Процедура деконволюции на основании функции рассеяния от точечного источника

Более точный анализ массива экспериментальных данных основывается на процедуре деконволюции полученного трехмерного изображения с применением алгоритма Ричардсона-Люси [20–23]. В этом методе изображение, получаемое с помощью конфокальной микроскопии, описывается следующей моделью:

$$g(X, Y, Z) = (f(X, Y, Z) \otimes p(X, Y, Z)) + n(X, Y, Z), \quad (5)$$

где f — исходное (идеальное) изображение, p — функция рассеяния точки (ФРТ), n — аддитивный шум, $\otimes$ — операция свертки (конволюция). Поскольку операция свертки в пространственной области эквивалентна поэлементному умножению в Фурье-пространстве, все вычисления удобно перенести в Фурье-пространство:

$$G(S_x, S_y, S_z) = F(S_x, S_y, S_z) \cdot P(S_x, S_y, S_z) + N(S_x, S_y, S_z), \quad (6)$$

где G, F, P и N — Фурье-образы функций g, f, p и n соответственно, (S_x, S_y, S_z) — координаты в Фурье-пространстве. Как видно из уравнения (6), данных по ФРТ $P(S_x, S_y, S_z)$ недостаточно для точного восстановления исходного изображения $F(S_x, S_y, S_z)$ из-за вклада неизвестной шумовой компоненты N. Попытка выполнить обратную свертку (деление в Фурье-пространстве) приводит к неопределенности в тех областях, где значения $P(S_x, S_y, S_z)$ близки к нулю.

Минимизировать влияние шума на процесс восстановления изображения позволяет итерационный метод деконволюции — алгоритм Ричардсона-Люси (алгоритм РЛ), который в математическом виде формулируется следующим образом:

$$\tilde{f}_{k+1} = \tilde{f}_k \left(\frac{g}{\tilde{f}_{k \otimes p} \otimes \hat{p}} \right), \quad (7)$$

где $\tilde{f}_k$ — восстановленное изображение на k-й итерации, $\hat{p}$ — транспонированная матрица ФРТ, определяемая как $\hat{p}(X, Y, Z) = p(-X, -Y, -Z)$. Алгоритм РЛ обладает сходимостью, т. е. при бесконечном числе итераций $k \to \infty$ восстановленное изображение стремится к истинному. Однако на практике точное восстановление невозможно из-за неточного значение ФРТ и наличия шума n, который искажает данные.

Для определения ФРТ нами было проведено трехмерное сканирование люминесцентного сигнала самого малого из достаточно ярких для регистрации люминесцирующих объектов. Соотношение сигнал/шум составило величину порядка 10^4, что позволило пренебречь шумовой составляющей в формуле (6). Таким образом, функция $p(X, Y, Z)$, рассчитанная с помощью выражения $P(S_x, S_y, S_z) = G(S_x, S_y, S_z)/F(S_x, S_y, S_z)$ и обратного преобразования Фурье, принимает вид, представленный на рис. 7. Используя полученную ФРТ и применяя алгоритм РЛ на основе итерационной формулы (7), было получено трехмерное распределение люминесцирующих объектов на тестовой структуре (рис. 8).

Истинные высоты люминесцирующих объектов были определены по данным АСМ (размер Z). Выше было отмечено, что определение латеральных размеров методом АСМ требует учета размеров используемого при сканировании зонда и соответствующей процедуры деконволюции. Поэтому для определения истинных латеральных размеров люминесцирующих объектов был использован КОМ с объективом 40× с разрешением $\sim 0.4\,\mu$m (размер X, Y). Данные табл. 1 позволяют сделать оценки

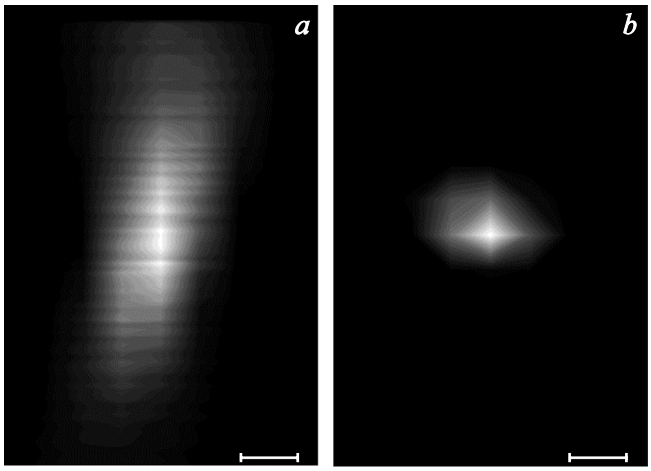

Рис. 7. Проекция функции рассеяния точки $p(X, Y, Z)$ на XZ-плоскость (a) и XY-плоскость (b). Функция вычислена на основании обработки данных по сканированию апконверсионной люминесценции одиночного люминофора на КОМ. Размер масштабного отрезка $5\,\mu$m. Градации серого пропорциональны амплитуде функции рассеяния точки.

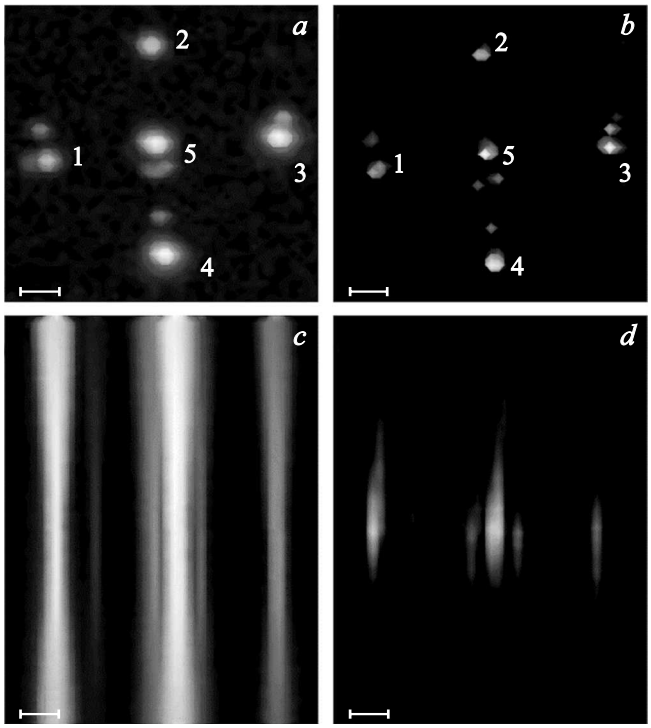

Рис. 8. Проекции массива данных $I_{X,Y,Z}$ (результат трехмерного сканирования интенсивности люминесценции тестовой структуры) на плоскость XY (a) и на плоскость XZ (c). Проекции изображения тестовой структуры $f_{X,Y,Z}$ (полученное с помощью процедуры деконволюции) на плоскость XY (b) и на плоскость XZ (d). Размер бара $20\,\mu$m. Градации серого пропорциональны относительным амплитудам функций $I_{X,Y,Z}$ и $f_{X,Y,Z}$.

Таблица 2. Погрешности измерения размеров люминесцентных объектов

ΔX, μm	ΔY, μm	ΔZ, μm
Без использования процедуры деконволюции, $\Delta r^{(a)}$		
6.6	5.3	23.1
С применением процедуры деконволюции, $\Delta r^{(b)}$		
3.9	2.7	2.4
Улучшение разрешающей способности, $\Delta r^{(a)}/\Delta r^{(b)}$		
$\Delta x^{(a)}/\Delta x^{(b)}$	$\Delta y^{(a)}/\Delta y^{(b)}$	$\Delta z^{(a)}/\Delta z^{(b)}$
1.7	1.9	9.6

погрешности измерения размеров нумерованных люминесцирующих объектов, которые представлены в табл. 2. Откуда видно, что применение процедуры деконволюции улучшает латеральное разрешение в 2 раза, а аксиальное вдоль оси Z — почти в 10 раз.

Заключение

Известно, что простые методы математической обработки, основанные на нахождении максимальных значений сигнала с последующей фильтрацией высокочастотного шума, дают хорошие результаты для случаев непрерывного распределения люминофоров по поверхности изучаемого объекта [19]. Проведенные исследования по люминесцентной томографии тестовой структуры с заданным выраженным дискретным распределением агломератов апконверсионных частиц $NaYF_4$:Yb, Er показали, что такой метод плохо подходит для восстановления реального изображения, даже в случае известного уровня шума. Согласно рис. 6, такой подход позволяет лишь оценить местоположения агломератов люминесцирующих частиц. Информация же о латеральных размерах и высотах не согласуется с истинными характеристиками. Для люминесцентной томографии дискретных сред оказывается принципиальным учет деконволюции при восстановлении изображения. Для этого требуется знание аппаратной функции рассеяния точки. Такая функция может быть получена путем трехмерного сканирования интенсивности люминесценции от условно точечного „одиночного“ люминофора, размеры которого меньше латерального разрешения используемого в эксперименте объектива. В этом случае становится возможным применение процедуры деконволюции с алгоритмом РЛ. Эксперименты с тестовой структурой показали, что данный способ обработки данных в два раза улучшил латеральное разрешение и на порядок аксиальное, что в итоге составило $\sim 3-4\,\mu$m. Учитывая средний размер биологических клеток порядка $10-50\,\mu$m, видно, что полученная разрешающая способность достаточна для проведения люминесцентной томографии внутриклеточного распределения апконверсионных биозондов.

Благодарности

Синтез апконверсионных наночастиц был осуществлен благодаря поддержке гранта РНФ № 23-42-10012 (https://rscf.ru/project/23-42-10012/); спектроскопические и АСМ исследования были проведены в рамках выполнения темы государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Постобработка результатов эксперимента, выполненная Зверевым Д.Г. и Косачом П.А., поддержана субсидией Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2024-0010).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, J.G. Fujimoto. Science, **254**, 1178 (1991). DOI: 10.1126/science.1957169

[2] S.W. Paddock. Bio Techniques, **27** (5), 992 (1999). DOI: 10.2144/99275ov01

[3] K. Shi, P. Li, S. Yin, Z. Liu. Optics Express, **12** (10), 2096 (2004). DOI: 10.1364/OPEX.12.002096

[4] B. Rosal, D. Jaque. Methods Appl. Fluorescence, **7** (2), 022001 (2019). DOI: 10.1088/2050-6120/ab029f

[5] H. Li, M. Tan, X. Wang, F. Li, Y. Zhang, L. Zhao, C. Yang, G. Chen. J. American Chem. Society, **142** (4), 2023 (2020). DOI: 10.1021/jacs.9b11641

[6] W. Jiang, J. Yi, X. Li, F. He, N. Niu, L. Chen. Biosensors, **12**, 1036 (2022). DOI: 10.3390/bios12111036

[7] G. Lee, Y.I. Park. Nanomaterials, **8** (7), 511 (2018). DOI: 10.3390/nano8070511

[8] H. Lv, J. Liu, Y. Wang, X. Xia, Y. Li, W. Hou, F. Li, L. Guo, X. Li. Frontiers in Chemistry, **10**, 996264 (2022). DOI: 10.3389/fchem.2022.996264

[9] Y. Han, Y. An, G. Jia, X. Wang, C. He, Y. Ding, Q. Tang. Nanoscale, **10**, 6511 (2018). DOI: 10.1039/C7NR09717D

[10] G. Ren, S. Zeng, J. Hao. J. Phys. Chem. C, **115**, 20141 (2011). DOI: 10.1021/jp2064529

[11] Е.О. Митюшкин, Д.К. Жарков, А.В. Леонтьев, Л.А. Нуртдинова, А.Г. Шмелев, В.Г. Никифоров. Известия РАН. Сер. физ., **87** (12), 1724 (2023). DOI: 10.31857/S0367676523702976

[12] Д.К. Жарков, О.Е. Митюшкин, А.В. Леонтьев, Л.А. Нуртдинова, А.Г. Шмелев, Н.М. Лядов, А.В. Пашкевич, А.П. Сайко, О.Х. Хасанов, В.Г. Никифоров. Известия РАН. Сер. физ., **87** (12), 1735 (2023). DOI: 10.31857/S036767652370299X

[13] A.D. Elliott. Current Protocols in Cytometry, **92** (1), e68 (2019). DOI: 10.1002/cpcy.68

[14] R.H. Webb. Rep. Prog. Phys., **59** (3), 427 (1996). DOI: 10.1088/0034-4885/59/3/003

[15] J.M. Binder, A. Stark, N. Tomek, J. Scheuer, F. Frank, K.D. Jahnke, C. Müller, S. Schmitt, M.H. Metsch, T. Unden, T. Gehring, A. Huck, U.L. Andersen, L.J. Rogers, F. Jelezko. SoftwareX, **6**, 85 (2017). DOI: 10.1016/j.softx.2017.02.001
[16] А.П. Чукланов, А.С. Морозова, Н.И. Нургазизов, Е.О. Митюшкин, Д.К. Жарков, А.В. Леонтьев, В.Г. Никифоров. ЖТФ, **93** (7), 1019 (2023). DOI: 10.21883/JTF.2023.07.55763.82-23
[17] A.P. Chuklanov, A.S. Morozova, Ye.O. Mityushkin, A.V. Leontyev, L.A. Nurtdinova, V.G. Nikiforov, N.I. Nurgagizov Bull. Russ. Academy Sciences: Physics, **88** (12), 1971 (2024). DOI: 10.1134/S1062873824708559
[18] T. Wilson. J. Microscopy, **244**, 113 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2818.2011.03549.x
[19] А.В. Леонтьев, Л.А. Нуртдинова, Е.О. Митюшкин, А.Г. Шмелёв, Д.К. Жарков, В.В. Андрианов, Л.Н. Муранова, Х.Л. Гайнутдинов, Р.Р. Заиров, А.Р. Хазиева, А.Р. Мустафина, В.Г. Никифоров. ЖТФ, **94** (9), 1576 (2024). DOI: 10.61011/JTF.2024.09.58680.83-24
[20] W.H. Richardson. J. Opt. Soc. Am., **62**, 55 (1972). DOI: 10.1364/JOSA.62.000055
[21] L.B. Lucy. Astronom. J. **79**, 745 (1974). DOI: 10.1086/111605
[22] N. Dey, L. Blanc-Feraud, C. Zimmer, Z. Kam, J.-C. Olivo-Marin, J. Zerubia. 2004 2nd IEEE Intern. Sympos. Biomed. Imaging: Nano to Macro (IEEE Cat No. 04EX821) (Arlington, VA, USA, 2004), v. 2, p. 1223–1226, DOI: 10.1109/ISBI.2004.1398765
[23] P.J. Shaw. *Comparison of Widefield/Deconvolution and Confocal Microscopy for Three-Dimensional Imaging* in: J. Pawley (eds) Handbook Of Biological Confocal Microscopy (Springer, Boston, MA. Handbook of Biological Confocal Microscopy, Third Edition, edited by J.B. Pawley, (Springer, Boston, MA, 2006)), DOI: 10.1007/978-0-387-45524-2_23