

Зөөлөн Рентген туяаны проекцлогч микроскопоор авсан биологийн объектын зургийг итерацын аргаар шинжлэх судалгаа

Б.Дүүрэнбуян^{1,2,*}, Ж.Эрдэнэтогтох¹, Ж.Ванчинхүү², Т.Шийна³, А.Ито⁴

¹ ШУА, Физик, технологийн хурээлэн, Материал судлалын салбар

² МУИС, Шинжлэх ухааны сургууль, Физикийн тэнхим

³ Япон улс, Чиба Их Сургууль

⁴ Япон улс, Токай Их Сургууль

Зөөлөн Рентген туяаны проекцлогч микроскопыг ашиглан эс болон биомолекулын ерөнхий хэлбэр, дүрсийн зургийг авах боломжтой. Гэхдээ цахилгаан соронзон долгионы дифракцын улмаас объектын хэлбэр хэмжээг нарийвчлан тодорхойлоход хүндрэл учирдаг. Уг асуудлыг шийдэхээр бид дифракц бүхий зургийг шинжилж, дифракцыг арилгадаг итерацын аргыг боловсруулаад байна. Энэхүү ажлаараа бид уг итерацын аргын чадвар, үр дүнг судлах зорилгоор латекс бөөм, хромосом, хела эсийн зурагт шинжилгээ хийлээ. Латекс бөөмийн бүх өсгөлттэй тохиолдлын зургууд болон хромосом, хела эсийн нам өсгөлттэй зургууд дээрх шинжилгээ амжилттай хийгдлээ.

Түлхүүр үгс: Латекс бөөм, Хромосом, Хела эс, Френелийн дифракц, Фурье хувиргалт

PACS numbers: 02.30.Nw, 42.25.-p, 42.25.Fx, 42.25.Kb, 42.30.kq

ОРШИЛ

Электрон микроскоп өндөр ялгах чадвартай, оптик гүн ихтэй тул объектын олон дахин томорсон тод дүрсийг өгдөг. Гэвч энэ багажид хэрэглэдэг хурдассан электроны урсгал судалж байгаа объектыг мөргөх үедээ уг объектын гадаргууд гүн эвдрэл үүсгэж болдог. Үүний зэрэгцээ энэ аргад судалж байгаа объектыг тусгай вакуум орчин дотор оруулах бөгөөд уг объект өөрөө дамжуулагч чанартай, эсвэл түүнийг сайн дамжуулагчаар бүрэх шаардлагатай байдаг. Ийм учраас биологийн материалууд, эд зэрэг эмзэг материал, объектыг энэ аргаар судлахад нэн бэрхшээлтэй байдаг.

Рентген цацраг өндөр энергитэй, богино долгионы урттай учраас маш нэвтрэх чадвартай бөгөөд түүнийг дээр дурдсан эмзэг объектын бүтцийг судлахад ашиглах боломжтой. Микроскопын ялгах чадвар долгионы уртад урвуу пропорционал байх тул богино долгионы урттай цацрагийн өгч буй дүрс маш жижиг объектын хувьд ч илүү тод, сайн ялгагдаж харагдахуйц байх нь ойлгомжтой. Гэхдээ давтамж ихсэх тусам цахилгаан соронзон долгионы энерги ихсэж эвдлэх чадвар нь нэмэгдэх тул хэт өндөр давтамжтай (тухайлбал, хатуу рентген) цацрагаар объектыг судлах нь тохиромжгүй байдаг. Харин энэ судалгаанд зөөлөн рентген туяа илүү тохиромжтой байдаг.

Зөөлөн рентген туяаны 2.478-2.879нм мужид биологийн объектыг бүрдүүлэгч үндсэн материал болох ус шингээлтгүй байна. Харин биологийн объектын үндсэн материал болох хүчилтөрөгч, нүүрстөрөгч азот зэрэг элементүүд зөөлөн рентген туяаны мужид хүчтэй шингээлттэй байдаг. Эдгээр үндэслэлээр сүүлийн жилүүдэд бага энергитэй зөөлөн рентген туяаг ашиглаж биологийн объектын дүрсийг өндөр өсгөлт, тод ялгаралтайгаар гарган авч шинжлэх арга зүйг боловсруулах болон энэ технологийг хөгжүүлэх судалгаа эрчимтэй хийгдэж байна.

Үүний гол төлөөлөгч бол биомолекул болон эсийн шинжилгээний зориулалттай Япон улсын эрдэмтдийн хөгжүүлж буй зөөлөн Рентген туяаны микроскоп төхөөрөмж [1, 2] юм. Энэхүү төхөөрөмжөөр эс болон биомолекулын ерөнхий хэлбэр, дүрсийн зургийг авах боломжтой хэдий ч объектын хэмжээ багасахад (объектын жижиг хэсэгт ч адил) долгионы дифракцын улмаас объектын дүрс цагиргуудаар хүрээлэгдэж дүрсийн ялгарал муудаж эхэлдэг. Үүний дүнд объектын дүрс жинхэнэ дүрс хэлбэрээс өөр дүрс төрхтэй болсон байх бөгөөд энэ нь объектын үнэн дүрс, хэлбэр хэмжээг нь нарийвчлан тодорхойлоход хүндрэл учруулдаг [3]. Энэ асуудлыг шийдвэрлэхийн тулд дифракцын

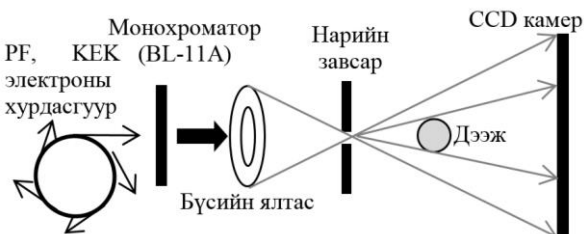
* Electronic address: Duurenbuyanb@mas.ac.mn

улмаас бий болж байгаа нэмэлт дүрсүүдийг шинжилж, объектын жинхэнэ дүрсийг дифракцын шугамаас алдаагүй зөв ялгаж тооцоолох шаардлагатай юм. Энэ зорилгоор бид Френелийн долгион тархалтын тэгшитгэлийг Фурье хувиргалтаар тооцоолж объектын дүрсийг дифракцын шугамаас ялгаж шинжлэх аргыг (цаашид итерацын арга гэх) боловсруулаад байна [4].

Энэхүү өгүүлэлд итерацын аргын чадвар, үр дүнг үнэлэх зорилгоор зөөлөн Рентген туяаны проекцлогч микроскопоор авсан хромосом болон хела эсийн зургийг шинжилж туршсан явц үр дүнг авч үзэх болно. Мөн стандарт дээж болох үйлдвэрт хэлбэр хэмжээг нарийвчлан бүтээсэн латекс бөөмийн зургийг аван, шинжилгээний үр дүнтэй харьцуулав.

МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

Бид энэхүү судалгааны ажлаар биологийн судалгаа, шинжилгээний үндсэн объект болох эс болон молекулын зураг авах туршилтыг гүйцэтгэв. Үүний тулд хүний лимфоцит эсээс центрифугийн аргаар хромосомыг нь ялгаж бэлтгэв. Харин эсийн туршилтад амьдрах чадвар өндөртэй хела эсийг ашиглав. Мөн судалгааны үр дүнг бататгах зорилгоор стандарт дээж болгож 10μм-ийн голчтой, зөв бөмбөрцөг хэлбэртэй латекс бөөмийг ашиглав. Латекс бөөм нь элементийн найрлагаараа биологийн объектод нэгэн ижил бөгөөд харьцангуй өндөр нягттай тул илүү өндөр контрасттай зураг гарган авах боломжтой. Мөн бөөмийн хэлбэр хэмжээг өндөр нарийвчлалтайгаар тохируулж үйлдвэрлэсэн тул зургийн шинжилгээний үр дүнг бататгахад нэн тохиромжтой юм.



Зураг 1. Японы Атомын Энергийн Агентлагийн “PF, KEK” хурдасгуурт суурилсан Рентген микроскопын бүтэц.

Рентген микроскоп нь Японы Атомын Энергийн Агентлагийн “PF, KEK” хурдасгуурт суурилсан бөгөөд уг хурдасгуурын BL-11A бөөмийн шугамаас ирэх 700 эВ энергитэй рентген туяаг

үүсгүүр болгон ашигласан [5]. Объектуудын өсгөлтийг 47-658 мужид тохируулж нийт 19 зураг авав. “PF, KEK” хурдасгуурт суурилсан Рентген микроскопын ерөнхий схемийг Зураг 1-д үзүүлэв.

Үүний дараа Рентген микроскопоор авсан зургуудыг итерацын аргаар шинжилж зурагт буусан объектын хэлбэр дүрсийг дифракцын шугамаас ялгаж тооцоолов. Итерацын арга нь Френелийн долгион тархалтын тэгшитгэлийг ашиглаж объектын гадаргаас камерын дэлгэц хүртэл Рентген туяа тархах тархалт болон урвуу тархалтыг тооцоолох аргаар дэлгэц дээр интерференцийн шугам үүсэх үзэгдлийг тооцож, шинжилнэ. Тэгшитгэл нь Фурье хувиргалтын хэлбэрт орших тул итерацын тооцоонд шууд болон урвуу Фурье хувиргалтыг ашиглах боломжтой. Шууд (тэгшитгэл 1) болон урвуу (тэгшитгэл 2) тархалтын нэг хэмжээт тэгшитгэлийг доор харуулав.

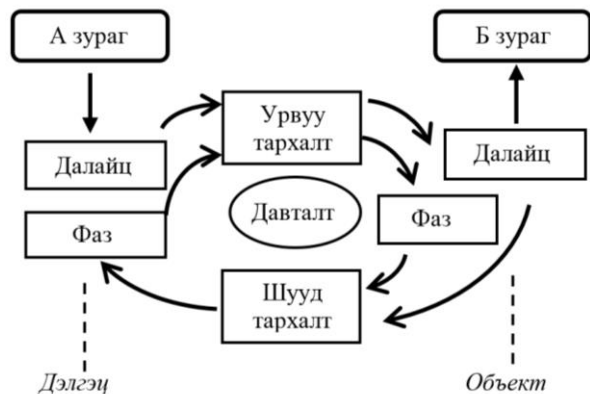
$$F(mT) = \sum_{n=0}^{N-1} f(nT_0) \exp\left\{\frac{i\pi}{\lambda R}(mT - nT_0)^2\right\} \quad (1)$$

$$f(nT_0) = \sum_{m=0}^{N-1} F(mT) \exp\left\{-\frac{i\pi}{\lambda R}(mT - nT_0)^2\right\} \quad (2)$$

Энд F-камерын дэлгэц дэх долгионы төлөвийн функц f-объектын гадаргуу дээрх долгионы төлөвийн функц, λ-долгионы урт, R-объект болон камерын дэлгэц хоорондох зай, N-нийт түүврийн тоо (N ≥ зургийн пикселийн тоо), T₀-объектын гадаргуу дээрх түүврийн интервал, T-камерын дэлгэц дээрх түүврийн интервал буюу зургийн пикселийн өргөн, n болон m-ээрэг бүхэл тоо.

Мөн огторгуйн дурын нэг байрлал дахь долгионы далайц болон фазын мэдээллийг мэдэж байвал өөр байрлалд үүсэх долгионы төлөвийг хялбархан тооцох боломжтой. Тиймээс итерацын аргаар тооцоо хийхдээ камераар авсан зураг буюу камерын дэлгэцийн байрлалд үүссэн Рентген туяаны далайцын түгэлтийг ашиглан объектын камер талаас харагдах гадаргуу дээрх Рентген туяаны далайцын түгэлтийг тооцоолно. Объектын гадаргуугийн хувьд Рентген туяаны дифракц үүсч амжаагүй байх тул объектын бодит дүрс, хэмжээг тооцож мэдэх боломжтой. Уг тооцоонд шаардлагатай фазын түгэлтийн мэдээлэл байхгүй тул эхлээд бөмбөлөг долгионы

фазыг ашиглан Френелийн шууд болон урвуу долгион тархалтын тэгшитгэлийг олон дахин давтаж тооцоолох аргаар фазын түгэлтийг ойролцоолж тооцно. Тооцооны алгоритмыг Зураг 2-т үзүүлэв.



Зураг 2: Итерацын аргаар Рентген микроскопын зураг алгоритм. А зураг: Рентген микроскопоор авсан зураг (дифракцын шугам агуулна), Б-зураг: Итерацын аргаар шинжилсэн зураг (дифракцын шугамгүй), Шууд тархалт: Тэгшитгэл-(1), Урвуу тархалт: Тэгшитгэл-(2).

Итерацын аргаар зургуудыг шинжилсний дараа дараах шалгуур үзүүлэлтийн дагуу тооцоо амжилттай болсон эсэхийг үнэлэв. Үүнд:

1. Дифракцын шугам бүрэн арилсан эсэх
2. Объектын ерөнхий хэлбэр гажаагүй эсэх
3. Объектын хэмжээ бодит хэмжээтэй тохирсон эсэх (латекс бөөмийн хувьд).

ҮР ДҮН БА ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭГ

Итерацын аргаар латекс бөөм, хромосом, хела эсийн зургууд дээр шинжилгээ хийж гарсан үр дүнг хүснэгт 1-д нэгтгэлээ. Зураг амжилттай эсвэл амжилтгүй шинжлэгдсэнийг харьцуулан тусгай тэмдэглэгээгээр тэмдэглэв.

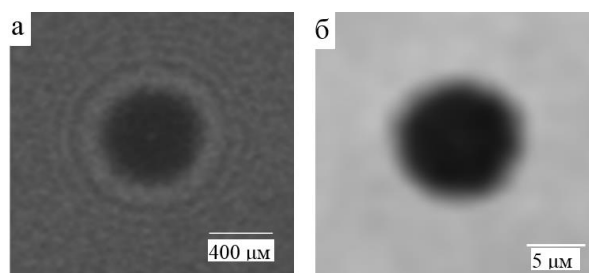
Хүснэгт 1. Итерацын аргаар шинжилсэн латекс бөөм, хромосом, хела эсийн шинжилгээний нэгдсэн мэдээлэл.

№	Объект	Өсгөлт	Үр дүн
1	Латекс бөөм	47	○
2		66	○
3		165	○
4		219	○
5		329	○
6		658	○
7	Хромосом	82	○
8		110	○
9		165	X
10		219	X
11		329	X
12		658	X

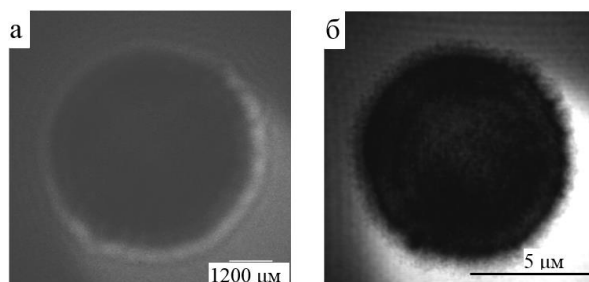
13	Хела эс	47	○
14		66	○
15		110	○
16		165	○
17		219	○
18		329	○
19		658	X

Тайлбар: 0-оор амжилттай болсон шинжилгээг тэмдэглэв, X-ээр амжилтгүй болсон шинжилгээг тэмдэглэв.

Латекс бөөмийн бүх зургийг итерацын аргаар амжилттай шинжилж дифракцийн шугамгүй үеийн объектын зургуудыг гаргалаа. Шинжилгээний дараа бөөмийг хэмжихэд ерөнхий хэмжээ өөрчлөгдөөгүй бөгөөд хэлбэр гажаагүй байсан ба дифракцын шугам бүрэн арилсан байв. Нийт шинжилсэн зургуудаас хамгийн бага болон хамгийн их өсгөлттэй зургуудыг жишээ болгон сонгож шинжилгээний өмнөх, дараах зургуудыг харьцуулан Зураг 3, 4-д үзүүлэв.



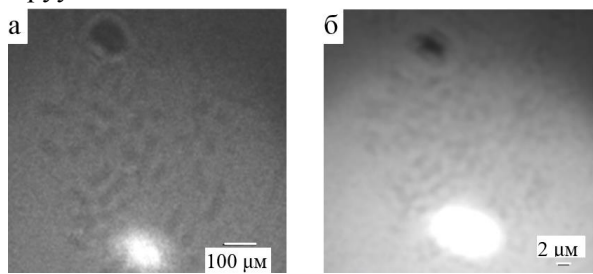
Зураг 3. 47 дахин өсгөлттэй 10 μm –ийн хэмжээтэй латекс бөөм. а) Рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.



Зураг 4: 658 дахин өсгөлттэй 10 μm –ийн хэмжээтэй латекс бөөм. а) Рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.

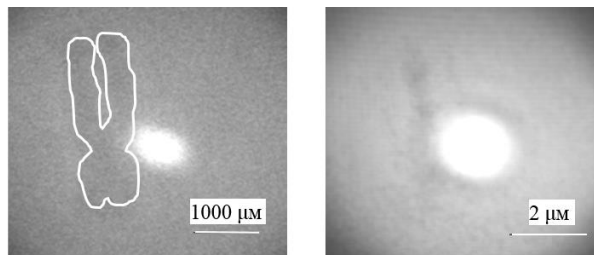
Харин хромосом болон хела эсийн нам өсгөлттэй зургуудын хувьд шинжилгээ амжилттай хийгдсэн бол өндөр өсгөлттэй зургууд дээр амжилттай болоогүй. Нийт шинжилсэн хромосом болон хела эсийн зургуудаас хамгийн бага, хамгийн их өсгөлттэй зургуудыг жишээ болгон сонгож шинжилгээний

өмнөх, дараах зургуудыг харьцуулан Зураг 5-8-д харуулав.

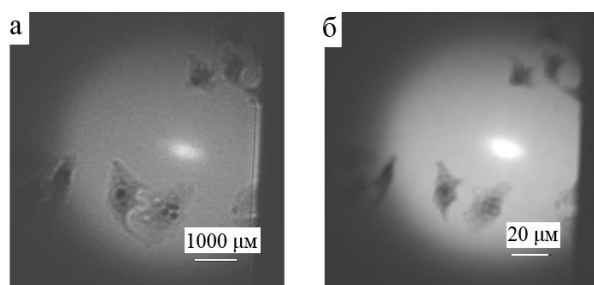


Зураг 5: 82 дахин өсгөлттэй хромосом. а) Рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.

Зураг 5-д харуулсан ёсоор бага өсгөлттэй хромосомын рентген микроскопын зурагт объект бүдэг хэдий ч харьцангуй тод дифракцийн шугам үүссэн харагдаж байна. Энэ тохиолдолд хийсэн шинжилгээнүүд амжилттай болж дифракцын шугам арилсан. Харин Зураг 6-д харагдаж байгаачлан өндөр өсгөлттэй хромосомын зурагт объектын контраст хэт багассаны улмаас дифракцийн шугам ажиглагдахгүй байна. Иймээс програм объектын дүрсийг бүрэн таньж чадалгүй хромосомын зарим хэсэг устаж алга болсон гэж таамаглаж байна.

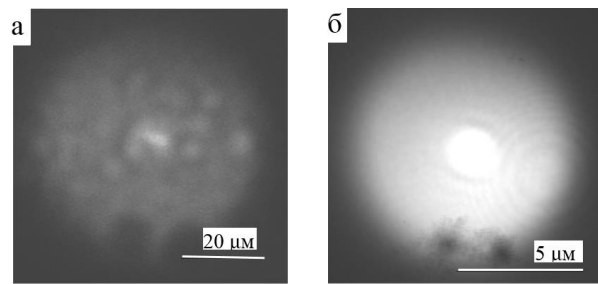


Зураг 6: 658 дахин өсгөлттэй хромосом. а) рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.



Зураг 7: 66 дахин өсгөлттэй хела эс. а) Рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.

Хела эсийн рентген микроскопоор авсан хамгийн өндөр өсгөлттэй зургаас бусад бүх тохиолдолд объектын контраст их, дифракцын шугамууд тод ялгарч Зураг 7-д харагдаж байгаатай ижил амжилттай шинжлэгдэв.



Зураг 8: 658 дахин өсгөлттэй хела эс. а) Рентген микроскопоор авсан өсгөлттэй зураг, б) итерацын аргаар шинжилсэн дифракцын шугамгүй үеийн зураг.

Харин Зураг 8-д харуулсан ёсоор хамгийн өндөр өсгөлттэй буюу 658 дахин өсгөлттэй зургийн хувьд объектын контраст бага бөгөөд зурагт дифракцын шугам үүсээгүй байна. Энэ тохиолдолд шинжилгээ амжилтгүй болж байв. Бид өндөр өсгөлттэй хромосом болон хела эсийн зургийг авах үед зургуудын контраст бага, дифракцын шугам тод ялгарч харагдахгүй бөгөөд итерацын шинжилгээ амжилтгүй болж байгаа нь дараах 2 шалтгаанаас үүдэлтэй гэж таамаглаж байна. Үүнд:

1. Итерац тооцоонд цэгэн үүсгэгчээс гарах бөмбөлөг долгионы тархалтыг загварчилж тооцно. Гэтэл Рентген микроскопын туршилтад 0.5μм-ийн голчтой нүхээр нэвтэрсэн Рентген туяаг үүсгүүр болгон ашиглаж байгаа. Тиймээс өндөр өсгөлттэй зураг авах үед объект үүсгүүрт илүү ойртох тул объектоос харахад үүсгүүрийн цэгэн чанар алдагдаж, объект дээр ирэх долгионы бөмбөлөг чанар алдагдана. Үүний дүнд Итерац тооцоо болон бодит туршилтын нөхцөл зөрж шинжилгээ амжилтгүй болоход нөлөөлөх магадлалтай.
2. Өндөр өсгөлттэй зургийн үед объект үүсгүүрт ойр байрлах тул объект дээр тусах Рентген туяа болон үүсгүүрээр сарнисан шуумны эрчим өндөр байна. Тиймээс Рентген туяаны объектыг нэвтрэх хэмжээ болон объект дээр сарнисан шуумны хэмжээ өсч зургийн контраст буурахад хүргэж байна. Үүний улмаас програм объектыг бүрэн таньж чадахгүйд хүрэх магадлалтай.

ДҮГНЭЛТ

Энэ судалгааны ажлаар бид итерацын аргын чадвар, үр дүнг үнэлэх зорилгыг тавьж латекс бөөм, хромосом, хела эсийн зургууд дээр шинжилгээ хийв. Нийт Рентген микроскопоор

авсан 19 зураг дээр шинжилгээ хийж гарсан үр дүнгээс доорх дүгнэлтэд хүрлээ. Үүнд:

1. Хела эс, хромосомын бага өсгөлттэй зургууд болон латекс бөөмийн зургуудад үүссэн дифракцын шугам нүдэнд ажиглагдахуйц өндөр контрасттай байсан ба эдгээр зургуудын хувьд итерацын шинжилгээ амжилттай болж байв.
2. Хромосом болон хела эсийн өндөр өсгөлттэй зургуудын хувьд контраст хэт бага бөгөөд итерац шинжилгээ амжилтгүй болсон. Үүний гол шалтгаан нь объект үүсгүүрт ойртоход үүсгүүрийн цэгэн чанар алдагдах болон объектоор нэвтэрч сарнисан долгионы хэмжээ өссөний улмаас зургийн контраст буурч итерац шинжилгээний үр дүнг бууруулсан гэж дүгнэж байна.

АШИГЛАСАН МАТЕРИАЛ

- [1] K. Shinohara et al., Discrimination of DNA and RNA distribution in a mammalian cell by scanning transmission soft X-ray microscopy, *J. X-Ray Sci. Technol.* 26: 1-8, 2018.
- [2] A. Ito et al., Soft X-ray microscopy and spectromicroscopy of cells, *Radioisotopes* 47: 789-798, 1998.
- [3] T. Shiina et al., Fresnel diffraction correction by phase-considered iteration procedure in soft X-ray projection microscopy, *Journal of Physics: Conference Series (IOP)* 186: 12059-3, 2009.
- [4] E. Jamsranjav et al., Effectiveness of Noise Removal for Image Correction in Soft X-ray Projection Microscopy, *Radioisotopes* 66: 137-148, 2017.
- [5] PF Home page (BL-11A Soft X-ray Grazing Incidence Monochromator Station): <http://pfwww.kek.jp/sxspec/sx/bl11a/40223.html>.