

随机散射介质内非侵入式深度聚焦技术研究

田冰心*, 韩军, 刘丙才

西安工业大学光电工程学院, 陕西 西安 710021

摘要 散射介质内目标探测和成像技术在生物医学领域具有广泛应用,但目前的探测方法仍存在外部激发光的使用效率低或者聚焦位置不确定等问题。为此,提出一种利用区域方差反馈的波前整形技术实现散射介质内非侵入式深度可选择聚焦。该技术利用目标散斑的区域方差作为波前整形的反馈信号,通过空间光调制器对输入波前进行相位调制,使散射介质内的激发散斑聚焦到单个目标点上。结果表明,区域方差的波前整形算法不仅能够实现散射介质内目标的深度聚焦,还可根据区域选择将外部输入激光聚焦在确定的目标位置上。这种可选择聚焦技术为生物组织内多目标成像提供一种新的技术途径。

关键词 散射; 区域方差; 深度聚焦; 非侵入式; 散射介质; 波前整形

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1029001

Research on Non-Invasive Deep Focusing in Random Scattering Medium

Tian Bingxin*, Han Jun, Liu Bingcai

School of Optoelectronic Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an 710021, Shaanxi, China

Abstract Detection and imaging technology in a scattering medium is widely used in the biomedical field. However, the current technology still has some problems, such as low efficiency of external excitation or uncertain focus position. Thus, this paper proposed region variance feedback using the wavefront shaping method to realize non-invasive focusing deep in a scattering medium. Here, the region variance of the target speckle was used as the feedback of the wavefront shaping, and the excitation speckle in the scattering medium was focused on a single target by phase modulating with a spatial light modulator. The results show that the region variance method using the wavefront shaping realizes deep focusing on a single target in the scattering medium and selectively focuses on the determined target position according to the region selection. This selective focusing technology provides a new way for multiple targets imaging in biological tissue.

Key words scattering; region variance; deep focusing; non-invasive; scattering medium; wavefront shaping

1 引言

在生物组织内进行深度探测和成像是生物医学领域一项重要的技术手段,然而由于生物组织的不规则介质特性(散射特性),当光透过组织传播时,会受到多重散射的作用产生不规则的散斑,导

致传播深度以及成像分辨率受到很大的限制。传统的点扫描和宽场成像技术可用于散射介质内成像,但探测深度不够^[1-2],因此在强散射的情况下无法探测到目标信号。随着计算成像技术的发展,出现了多种新型散射聚焦和成像技术,如波前整形技术^[3]、光学传输矩阵技术^[4]以及散斑相关技术^[5]。其

收稿日期: 2021-08-05; 修回日期: 2021-08-12; 录用日期: 2021-08-18

基金项目: 基础科研项目(JCKY2018426C002)

通信作者: tbingxin2012@126.com

中,波前整形技术可以在透过散射介质的任意位置聚焦,因此逐渐成为了散射介质内深度聚焦的有效方法之一^[6-7]。波前整形是一种利用从目标点获得的反馈信号对输入光波前进行调制的技术,其实现方式和反馈信号模式多种多样。2007年,荷兰 Twente 大学的 Vellekoop 等^[8]首次利用激发光作为反馈信号,对激发光波前进行调制,从而使激发光能够透过散射介质后聚焦。此后,基于波前整形技术的多种聚焦方式逐渐被研究,并应用在散射成像中^[9-10]。为了实现非侵入式散射介质内聚焦,Katz 等^[11]提出利用双光子显微成像技术,通过获取来自目标点的非线性信号作为波前整形的反馈信息对输入波前进行调制,从而实现散射介质内非侵入深度聚焦和成像,但获取非线性信号的实验过程复杂且对噪声敏感。另外,用于线性荧光显微镜中的线性聚焦技术^[12-13],以及利用散斑相关作为反馈信号的非侵入式聚焦技术^[14]等也是基于波前整形实现非侵入式散射介质内聚焦的有效手段之一。2019年,法国 Boniface 等^[15]提出利用荧光散斑方差的波前整形实现非侵入式复杂散射介质内深度聚焦。这种算法利用线性反馈机制,操作简单,且可以在优化后使输入激光聚焦到单个目标上,然而由于初始输入相位是随机的,使得焦点位置具有不确定性。

为了实现随机散射介质内非侵入式可选择性深度聚焦,本文提出一种基于区域方差的波前整形技术,利用目标信号的区域方差作为波前整形的反馈信号,通过空间光调制器(SLM)的相位调制,优化输入激光的波前,使激光在进入散射介质后选择性地聚焦在散射介质内单个目标位置上。与现有的技术相比,基于区域方差的波前整形技术不仅可以在一次优化后实现散射介质内目标的深度聚焦,还可以解决随机初始输入带来的聚焦位置的不确定性问题,实现稳定、可选择的聚焦。为在生物组织内进行多目标成像提供一种新的技术途径。

2 基本原理

本文方法基于波前整形技术,利用来自随机散射介质内目标信号的直接反馈,通过 SLM 对外部输入激光的波前进行相位调制。当输入激光进入散射介质后会形成激发散斑,照射散射介质内的目标。目标被激发后,经过散射介质射出,并形成目标散斑被探测器接收。利用目标散斑的区域方差

作为波前整形的反馈信号,通过 SLM 的相位调制功能对激发散斑进行优化,从而实现散射介质内非侵入式深度聚焦。

随机散射介质内非侵入式深度聚焦技术原理如图 1 所示。在图 1(a)中,外部输入激光通过分束器(BS)进入 SLM,经过 SLM 的相位调制后产生一个新的波前。新的波前通过 $4f$ 透镜系统(两个透镜 L1 和 L2 组成),被显微物镜 Obj. 1 投射到样本中。进入样本的光在散射介质的多重散射作用下形成激发散斑,照射荧光目标。产生的荧光信号在反向路径中经散射介质的扩散,生成荧光散斑,并经过二向色镜(DM)后被探测器 CAM1 接收。图 1(b)为荧光散斑。本文方法利用荧光散斑信息建立系统反馈信号,通过空间光调制器的相位调制功能,优化外部入射激光的波前,使散射介质内的激发散斑聚焦在单个荧光粒子上。为了观察激发散斑在散射介质内的聚焦情况,安装监控相机 CAM2,并通过显微物镜 Obj. 2 获取散射介质内部的激发散斑。当优化结束时,观察激发散斑是否聚焦在荧光粒子

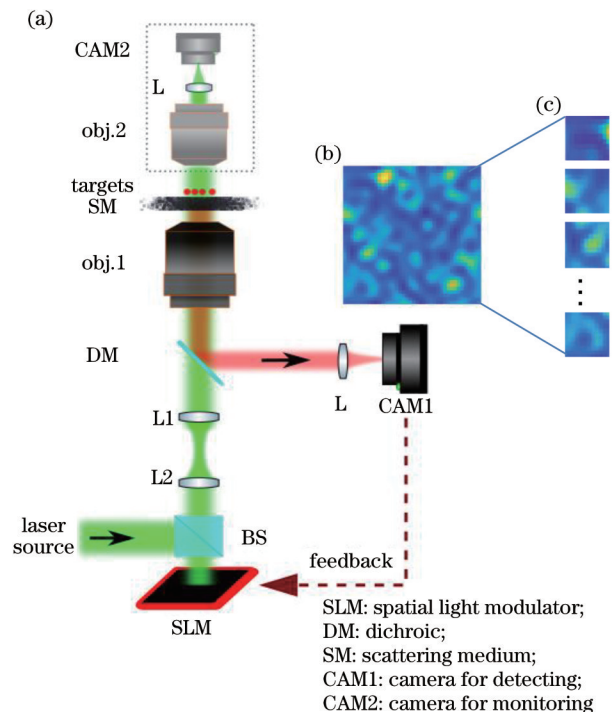


图 1 随机散射介质内非侵入式深度聚焦技术原理。(a)随机散射介质内非侵入式深度聚焦原理图;(b)目标散斑;(c)目标子散斑

Fig. 1 Principle of non-invasive deep focusing in random scattering medium. (a) Schematic diagram of non-invasive deep focusing in random scattering medium; (b) target speckle; (c) target sub-speckles

上。若激发散斑可选择性地聚焦于单个荧光粒子,则验证本文方法有效。在整个优化过程中,激发散斑只作为过程监控,不参与优化。

从随机散射介质内非侵入式深度聚焦技术原理中可以看出,样本中的荧光粒子作为目标被激发后,经随机散射介质的扩散作用而产生的目标散斑被探测器接收(目标散斑也是荧光散斑)。与一般光源相比,荧光作为时间和空间上的非相干光,单个粒子产生的散斑是来自不同偏振态和光谱带的散斑的非相干叠加^[16-17],因此,单个粒子的散射是相互独立的,即散斑信息不相关^[18]。在荧光实验中,被测目标通常为—组荧光目标,探测器接收到的散斑来自每一个荧光粒子产生的散斑非相干叠加。基于此,当 N 个荧光粒子同时被激发时,探测器上接收到的荧光散斑总强度 I_{target} 是由每一个粒子的散斑强度线性叠加组成,即

$$I_{\text{target}} = \sum_{i=1}^N I_{\text{target}}^i, \quad (1)$$

式中: I_{target}^i 为第 i 个荧光粒子的散斑强度。

由于荧光是线性激发的,荧光散斑强度与激发光强度呈线性关系,即 $I_{\text{target}} \propto I_{\text{exc}}$ 。也就是说,激发光的强度越大,探测器接收到的荧光信号越强。另一方面,由于荧光散斑的整体对比度 C 与被激发荧光粒子数目 N 直接相关,即 $C = 1/\sqrt{N}$ ^[18],则被激发荧光粒子数目越小,荧光散斑的对比度越强。由此可以推断,当外部输入激光强度保持不变时,若激发散斑能够聚焦在一个荧光粒子上,则探测器中获取的荧光信号最强,且荧光散斑对比度最好。因此,本文利用 $C(I_{\text{target}}) \times I_{\text{target}}$ 作为波前整形的反馈信号对激发散斑进行优化。又因为 $C(I_{\text{target}}) \times I_{\text{target}}$ 恰好是散斑的标准差 $\sigma(I_{\text{target}})$ 的计算模型^[13],所以反馈信号可以表示为散斑的方差 $V_{\text{var}} = \sigma^2$ 。其中,散斑对比度 $C(I_{\text{target}})$ 由散斑标准差和强度的比值给出,即 $C = \sigma(I_{\text{target}})/I_{\text{target}}$ 。当目标散斑方差值 V_{var} 达到最大时,目标散斑的强度和对比度都达到最优,此时散射介质内的激发散斑能够聚焦在单个荧光粒子上。

在散斑方差计算过程中,散斑空间区域决定了方差的计算结果。本文利用分区域的方差算法,将目标散斑分成大小相等的子散斑,子散斑不重叠,如图 1(c)所示。通过对每一个子散斑做方差运算,得到目标散斑的区域方差。利用区域方差作为波前整形技术中的反馈信号优化输入光的波前,从而

实现散射介质内目标可选择性聚焦。子散斑的区域方差可以表示为

$$V_{\text{var}}(x_i, y_i) = \left| C(x_i, y_i) \times I_{\text{target}}(x_i, y_i) \right|^2, \quad (2)$$

式中: (x_i, y_i) 表示子散斑空间中心位置。

对于一个均匀的散射介质,当多个荧光粒子被激发后,假设每一个荧光粒子的激发效率相同,那么探测器上接收到的目标散斑是来自所有粒子的散斑以相等贡献(权重)叠加而成,因此利用波前整形技术对整个散斑的优化结果是随机的,且随机性取决于 SLM 的初始输入相位。然而,不同位置的荧光粒子经过散射介质后形成的荧光散斑不仅形状不同,在空间位置上也有一定的平移,使得在目标散斑不同位置的子散斑中,不同荧光粒子的散斑所占的权重不同。因此理论上讲,即使输入不同的初始相位,子散斑的优化结果仍然是确定的,且优化后的激发散斑聚焦在权重值最大的荧光粒子上。同时,由于不同位置的子散斑对应的是不同的权重组成,因此利用不同位置子散斑的区域方差作为反馈信号优化输入波前,可以使激发散斑选择性地聚焦在不同的荧光粒子上。

3 仿真结果

根据图 1(a),利用 Matlab 建立数字模型对随机散射介质内非侵入式深度聚焦技术进行仿真分析。仿真过程中,利用激光作为光源,在激光光斑上叠加随机相位后形成输入光斑。携带有随机相位信息的输入光斑通过夫琅禾费传输后产生随机散斑,用于激发荧光目标。被激发的荧光信号反向传输经过散射介质后形成荧光散斑,并被探测器 CAM1 接收。利用 $4f$ 系统中两透镜的焦距调节光束的大小,从而匹配显微物镜的参数。仿真过程中的基本参数如表 1 所示。

利用探测器接收到的目标散斑计算子散斑区域方差作为波前整形反馈信号,并通过 SLM 的相位

表 1 主要仿真参数

Table 1 Primary simulation parameters

Parameter	Value
Wavelength of laser source /nm	532
Magnification of Obj. 1	20
Numerical aperture of Obj. 1	1.0
Number of scattering layers	8
Distance between scattering layers /mm	50
Focal distance of tube lens /mm	180

调制功能对输入光波前进行优化。调制过程中,利用连续序列(CAS)算法^[19],对SLM上的每一个网格进行相位优化。对每一次迭代,将SLM上待优化的网格相位从0,离散地增加到 2π ,中间选取5个相位阶,由探测器CAM1记录每一次迭代后的目标散斑并计算区域方差,找到使区域方差最强的相位,将其加载到SLM对应的网格上。在下次迭代开

始之前,保留这一相位,并计算新的最优相位加载到SLM上。依次优化SLM上的每一个网格,最终获得整个SLM的最优相位模式。每一次迭代后,会产生一个新的波前进入散射介质内,形成不同分布的激发散斑。在迭代结束后,激发散斑聚焦在散射介质内确定的目标粒子上。优化结果如图2和图3所示。

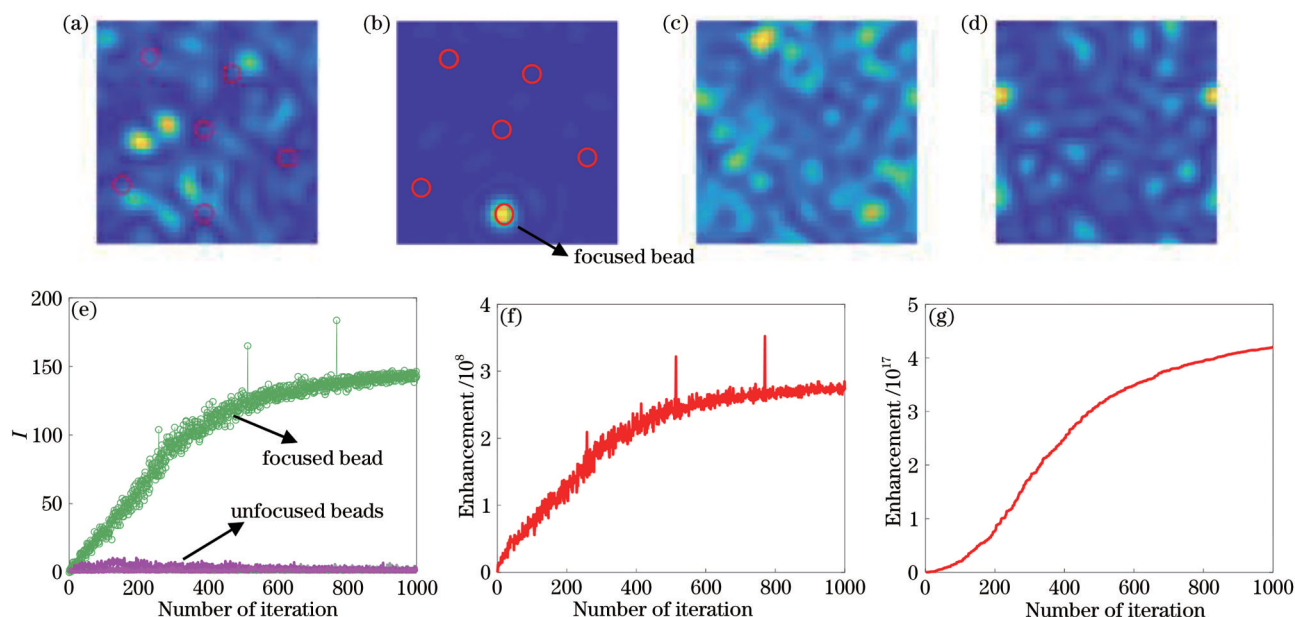


图2 区域散斑方差波前整形优化结果。(a)优化前CAM2中的激发散斑;(b)优化后CAM2中的激发散斑;(c)优化前CAM1中目标散斑;(d)优化后CAM1中目标散斑;(e)目标粒子上的激发散斑强度变化;(f)目标散斑强度变化;(g)区域方差变化
Fig. 2 Results of wave-front shaping based on region speckle variance. (a) Excitation speckle on CAM2 of non-optimized; (b) excitation speckle on CAM2 of optimized; (c) fluorescent speckle on CAM1 of non-optimized; (d) fluorescent speckle on CAM1 of optimized; (e) variation of intensity of excitation speckle on targets; (f) variation of intensity of target speckle; (g) variation of region variance

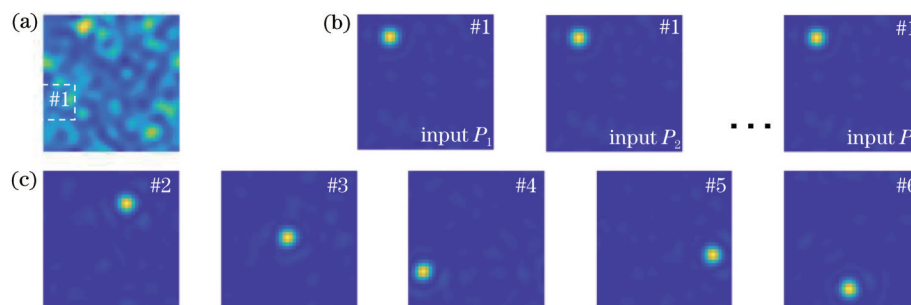


图3 区域散斑方差的可选择聚焦。(a)目标散斑;(b)目标子散斑#1的区域方差优化后的激发散斑;(c)不同子散斑的区域方差优化后的激发散斑
Fig. 3 Selection focusing based on region speckle variance. (a) Target speckle; (b) excitation speckle after area variance optimization of target sub-speckle #1; (c) excitation speckle after area variance optimization of different sub-speckles

图2为区域散斑方差波前整形的优化结果。图2(a)表示优化初始时由监控相机观察到的散射介质内激发散斑,红色圆圈表示目标粒子的位置,粒子尺寸与相机中像素尺寸相同;可以看出,在优

化开始前,外部输入激光进入散射介质后会形成随机分布的激发散斑,照射在每一个目标粒子上。此时,由探测相机获得的目标散斑是由所有目标粒子发出的散斑的非相干叠加。如图2(c)所示,目标散

斑来自 6 个荧光粒子,因此是一个低对比度散斑 ($C \approx 0.4$)。利用这个低对比度散斑的区域方差作为反馈信号,通过迭代算法优化散斑相位。随着迭代次数的增加,区域方差值不断增大,如图 2(g) 所示。在 1000 次迭代后,方差值达到最大,优化停止,观察优化后激发散斑,如图 2(b) 所示,可以看出,激发散斑在目标平面(有 6 个荧光粒子作为目标)仅收敛于一个聚焦位置,且聚焦在单个荧光粒子上,而其余荧光粒子上没有散斑照明。此时的荧光散斑,如图 2(d) 所示,仅来自被聚焦的荧光粒子,因此具有最优的对比度 ($C \approx 0.8$) 和最大的散斑强度[图 2(f)]。另外,从图 2(e) 可以看出,除了被聚焦的荧光粒子外,激发散斑分布在其他荧光粒子上的强度值趋于 0,进一步说明激发散斑充分聚焦在单个目标粒子上。

从原理上来讲,区域方差优化算法不仅能够保证聚焦位置的稳定性,还可以通过区域选择聚焦在不同的目标位置上。为了验证这一特性,对不同位置的子散斑的区域方差进行优化,优化结果如图 3 所示。图 3(a) 表示目标散斑,利用区域选择,在散斑中选择一个区域 #1 生成子散斑,大小为 10×10 。利用子散斑区域方差作为反馈信号进行优化,在进行一次优化后得到激发散斑的单个聚焦点,聚焦位置如图 3(b) 所示。输入不同的初始相位 P_1 、 P_2 和 P_k 分别进行优化,发现聚焦位置不改变,如图 3(b) 中 input P_1 、input P_2 和 input P_k 所示。利用同样的方式,选择目标散斑的不同子散斑区域 #2、#3、#4、#5、#6 进行优化,可将激发散斑聚焦在对应的目标位置上,如图 3(c) 所示。由于在一次实验中,其子散斑区域与聚焦点的位置是一一对应的,因此,可以通过对子散斑区域的选择使激发散斑聚焦于一个确定的目标上。

综上所述,基于目标散斑区域方差的波前整形技术,不仅能够一次优化后使输入光在散射介质内聚焦在单个目标上,还能在输入不同随机初始相位的多次优化中,保证聚焦位置的稳定性以及可选择性。

4 分析与讨论

正如原理介绍中所讨论的,基于方差的优化算法不仅利用了强度信息,同时还考虑了荧光散斑的对比度 C 。由于对比度 C 是目标数量的函数,当优化后激光散斑聚焦在单个荧光粒子上时,荧光散斑对比度会达到最大值。通过 1000 次迭代后,记录过程中荧光散斑对比度 C 的变化如图 4 所示。对基于

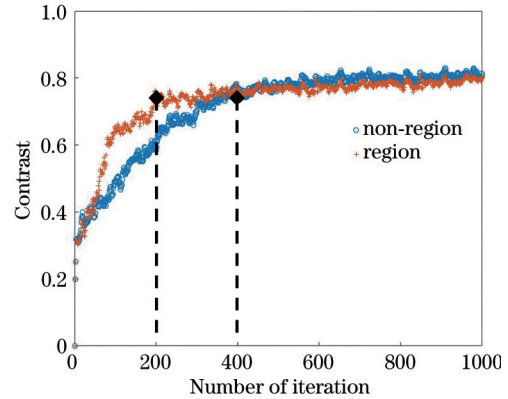


图 4 散斑对比度的演变过程

Fig. 4 Evolution of speckle contrast

区域选择的优化算法,散斑对比度在约前 200 次迭代中不断增加,随后趋于稳定。这说明在前 200 次迭代中,散斑对比度起到优化的主要作用,为了使散斑对比度达到最优,激发散斑逐渐收敛于单个聚焦点,在约 200 次迭代时,散斑对比度不再增加,此时,对比度的优化达到收敛。对比非区域选择的方差优化算法,在约 400 次迭代时对对比度达到收敛。由此可知,基于区域选择的方差优化算法,能够快速实现对对比度的优化,从而提高算法的整体优化速度。

虽然区域方差优化算法在对比度的优化速度上有一定的提高,但在优化算法开始时,仍然要求散斑具有一定可测量的对比度值。对于荧光目标来说,荧光信号相对较强,即使叠加多个散斑,仍然具有可测量的对比度值^[19]。因此在荧光成像过程中,方差优化是稳定可行的。但对于例如拉曼粒子在内的具有很大背景噪声的目标,由于散斑淹没在噪声中,优化初始时无法提取对比度信息,因此在运用此方法时需要采用滤波或者提取光谱信息等手段将初始对比度增加到可测量范围内,再进行区域方差优化。

5 结论

本研究基于波前整形技术,利用区域方差反馈的优化算法实现了散射介质内非侵入式深度聚焦。利用来自目标粒子的散斑区域方差作为波前整形的反馈信号,通过 SLM 的相位调制对外部输入激光的波前进行优化,从而使激发散斑可选择性地聚焦在单个目标粒子上。通过仿真实验分析,基于区域方差的波前整形技术不仅可以在优化后实现散射介质内目标点的深度聚焦,同时还可以解决随机相位初始输入带来的聚焦位置的不确定性问题,实现稳定、可选择的聚焦。对比非区域方差优化算法可以看出,区域方差

优化算法能够使散斑对比度收敛速度提高,从而加速整个优化过程。因此可以通过多次优化,快速地对多个目标依次进行聚焦,为将来在生物组织内进行多目标成像提供了一种新的技术途径。

另外,只要保证优化算法在足够的信号背景对比度的基础上进行,基于区域方差的波前整形优化算法对于不同的散射情况均可以达到较好的聚焦效果。同时,由于优化后可以得到一个对比度最大、强度最大的散斑,因此该方法可用于自激拉曼的深度探测技术中,特别是在拉曼信号增强方面,基于方差的优化方法具有突出的优势。由此可知,该技术可用于复杂散射介质内无标签深度成像,有望在生物医学中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Hofer M, Soeller C, Brasselet S, et al. Wide field fluorescence epi-microscopy behind a scattering medium enabled by speckle correlations[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 9866-9881.
- [2] 李修建, 唐武盛, 衣文军, 等. 宽视场远距离光学散射成像技术研究进展[J]. *中国激光*, 2021, 48(4): 0401012.
Li X J, Tang W S, Yi W J, et al. Review of optical scattering imaging technology with wide field of view and long distance[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(4): 0401012.
- [3] Vellekoop I M, Mosk A P. Focusing coherent light through opaque strongly scattering media[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(16): 2309-2311.
- [4] 斯科, 汤黎明, 杜吉超, 等. 基于二值化传输矩阵透过散射介质的光聚焦[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207038.
Si K, Tang L M, Du J C, et al. Light focusing through scattering medium based on binary transmission matrix[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207038.
- [5] 王歆, 刘红林, 胡晨昱, 等. 基于多波长照明的透过散射介质成像[J]. *光学学报*, 2020, 40(16): 1611002.
Wang X, Liu H L, Hu C Y, et al. Transmissive imaging through scattering media based on multi-wavelength illumination[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(16): 1611002.
- [6] 龚昌妹. 随机散射光学系统的聚焦与图像恢复算法研究[D]. 西安: 西安电子科技大学, 2017.
Gong C M. Research on focusing and image recovery algorithm for random scattering optical system[D]. Xi'an: Xidian University, 2017.
- [7] 耿荣荣. 基于波前反馈整形技术的散射介质聚焦研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
Geng R R. Research on focusing of scattering media based on wavefront feedback shaping technology[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018.
- [8] Vellekoop I M, Mosk A P. Focusing coherent light through opaque strongly scattering media[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(16): 2309-2311.
- [9] Mosk A P, Lagendijk A, Leroose G, et al. Controlling waves in space and time for imaging and focusing in complex media[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(5): 283-292.
- [10] Katz O, Small E, Silberberg Y. Looking around corners and through thin turbid layers in real time with scattered incoherent light[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(8): 549-553.
- [11] Katz O, Small E, Guan Y F, et al. Noninvasive nonlinear focusing and imaging through strongly scattering turbid layers[J]. *Optica*, 2014, 1(3): 170-174.
- [12] Daniel A, Oron D, Silberberg Y. Light focusing through scattering media via linear fluorescence variance maximization, and its application for fluorescence imaging[J]. *Optics Express*, 2019, 27(15): 21778-21786.
- [13] Ghielmetti G, Aegerter C M. Direct imaging of fluorescent structures behind turbid layers[J]. *Optics Express*, 2014, 22(2): 1981-1989.
- [14] Hofer M, Soeller C, Brasselet S, et al. Wide field fluorescence epi-microscopy behind a scattering medium enabled by speckle correlations[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 9866-9881.
- [15] Boniface A, Blochet B, Dong J, et al. Noninvasive light focusing in scattering media using speckle variance optimization[J]. *Optica*, 2019, 6(11): 1381-1385.
- [16] Goodman J W. Some fundamental properties of speckle[J]. *Journal of the Optical Society of America*, 1976, 66(11): 1145-1150.
- [17] Boas D A, Dunn A K. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(1): 011109.
- [18] Vellekoop I M, Mosk A P. Phase control algorithms for focusing light through turbid media[J]. *Optics Communications*, 2008, 281(11): 3071-3080.
- [19] Moretti C, Gigan S. Readout of fluorescence functional signals through highly scattering tissue[J]. *Nature Photonics*, 2020, 14(6): 361-364.