无波前传感器自适应光学在生物成像中的应用

董冰*, 武楚晗, 任虹禧

北京理工大学光电学院, 北京 100081

*联系人, E-mail: bdong@bit.edu.cn

收稿日期: 2016-11-25; 接受日期: 2016-12-28; 网络出版日期: 2017-05-27

国家自然科学基金(编号: 61505008)资助

摘要 获取生物体的高质量图像对生命科学研究至关重要, 但成像光学系统和生物体本身都含有像差, 导致成像分辨率和对比度下降. 由于不同生物体引入的像差不同且可能随时间变化, 因此无法通过传统的光学设计手段进行补偿. 发端于天文成像观测的自适应光学技术具有克服动态像差影响的能力, 因此也可以用于生物成像中提高成像质量. 传统自适应光学一般用波前传感器(如夏克-哈特曼传感器)测量波前误差, 而近年来发展的无波前传感器自适应光学技术则省去了专用的波前传感器, 不但简化了系统结构, 降低了成本, 还可以克服传统自适应光学的一些限制, 具有良好的应用前景. 本文在介绍无波前传感器自适应光学原理的基础上, 重点讨论该技术在眼底成像和荧光显微成像方面的应用并对未来的发展提出展望.

关键词 自适应光学, 无波前传感器, 眼底成像, 荧光显微成像

PACS: 95.75.Qr, 87.85.Pq, 42.66.Ew, 87.64.M-, 87.64.mk, 87.64.kv

1 引言

高分辨率成像是人类长期追求的目标, 但传统光学技术无法解决动态波前扰动对像质的影响问题. 1953年, 美国天文学家Babcock^[1]提出实时校正动态波前畸变的概念和工作原理. 其核心是在光学系统中引入一个表面形状可变的光学元件(波前校正器)和一个波前误差传感器, 用波前传感器测量不断变化的波前误差, 由控制系统控制波前校正器对波前误差进行校正. 如果这一过程足够快, 就可以用不断变化的波前校正量来校正不断变化的波前误差, 这就是自适应光学(Adaptive Optics, AO)的基本思想. 经过数十年的发

展, 自适应光学已经在天文观测、激光光束净化、生物成像等领域得到广泛应用.

自适应光学系统一般采用专用的波前传感器(如夏克-哈特曼传感器)测量波前误差, 然后控制波前校正器(如变形镜)对波前误差进行补偿. 传统自适应光学技术虽然行之有效, 但受系统结构复杂性和工作原理本身的制约, 应用范围有一定的局限性, 例如以下几个方面. (1) 系统结构比较复杂, 在一些对系统可靠性或成本有严格要求的场合难以应用. (2) 自适应光学系统一般基于相位共轭原理对波前的相位误差进行补偿, 并未补偿波前的振幅变化. 当波前振幅的变化较大即存在强闪烁时, 自适应光学系统的校正效果

引用格式: 董冰, 武楚晗, 任虹禧. 无波前传感器自适应光学在生物成像中的应用. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2017, 47: 084205
Dong B, Wu C H, Ren H X. Application of wavefront sensorless adaptive optics in biological imaging (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2017, 47: 084205, doi: [10.1360/SSPMA2016-00489](https://doi.org/10.1360/SSPMA2016-00489)

可能无法满足要求. 例如在自由空间光通信、定向能武器等涉及激光在近水平大气中传输的应用中就必须考虑闪烁造成的影响^[2]. (3) 当被观测目标亮度较弱时, 需要平衡波前测量光路和成像光路对信噪比的要求. (4) 波前测量光路和成像光路之间存在非共光路误差(Non-Common-Path Error), 系统的校正精度受到标定精度的制约^[3].

由于传统自适应光学存在上述问题, 一种被称为无波前传感器自适应光学(Wavefront Sensorless Adaptive Optics, WSLAO)的新技术开始引起人们的重视并得到广泛应用. 无波前传感器自适应光学的概念源自1974年Muller等人^[4]提出的像清晰化技术, 但早期的像清晰化方法因校正实时性较差而未能实用化. 20世纪90年代后期开始, 随着硬件技术的革新和新的优化控制算法的提出, 无波前传感器自适应光学技术开始蓬勃发展. 本文在介绍无波前传感器自适应光学原理的基础上, 重点探讨该技术在眼底成像和荧光显微成像中的应用.

2 无波前传感器自适应光学原理

无波前传感器自适应光学系统结构如图1所示. 观测目标(点目标或扩展目标)发出的光受到扰动后在光瞳处将偏离理想平面波. 扰动源既可以来自外部, 也可以来自光学系统本身.

无波前传感器自适应光学系统省去了专用的波前传感器, 直接由成像探测器的光强信息建立像质评价函数, 然后基于特定的优化算法控制波前校正器寻找评价函数的极值, 当评价函数达到极值时认为波前误差得到了校正.

无波前传感器自适应光学的优化算法可分为无模型(Model-Free)和基于模型(Model-Based)两类, 下面分别进行阐述.

图1 无波前传感器自适应光学系统

Figure 1 Wavefront sensorless adaptive optics system.

2.1 无模型优化算法

无模型优化算法无需预知待优化变量与评价函数之间的具体数学关系, 通过控制校正器在光学系统中引入随机的波前变化并计算评价函数的改变量, 根据评价函数的变化对待优化变量进行重新估计, 最终按一定的搜索路径通过多次迭代使评价函数趋于极值. 常用的评价函数有像清晰度函数、斯特列尔比、光斑均方根半径、环围能量等. 待优化变量一般为变形镜各个致动单元的控制电压.

无模型优化算法主要包括遗传算法(Genetic Algorithm, GA)^[5]、模拟退火算法(Simulated Annealing, SA)^[6]、随机并行梯度下降法(Stochastic Parallel Gradient Descent, SPGD)^[7]、信赖域法(Trust Region, TR)^[8]等. 上述算法在引入随机扰动的方式上各不相同, 收敛速度也有很大差异, 研究表明收敛速度 $TR > SA > SPGD > GA$ ^[8,9]. 实际应用中需要根据波前误差变化的时间特性、待优化变量个数、是否要求全局最优以及算法实现的难易程度等选择合适的算法. SA和GA算法一般认为可以达到全局最优, 而SPGD和TR算法则无法保证收敛到全局极值. 在一些应用中可以将两种算法混合使用以兼顾收敛速度和全局最优^[10,11]. 无模型优化算法需要的迭代次数与待优化变量个数有关. 例如SPGD算法收敛所需的迭代次数近似与致动器单元个数 N 的平方根成正比. 此外, 无模型优化算法中参数(增益系数、步长等)的选取也至关重要, 当参数选取不当时算法甚至无法收敛.

2.2 基于模型的优化算法

基于模型的优化算法, 即通过理论分析建立待优化变量与目标函数之间的数学模型, 基于该数学模型可以将待优化变量的多次迭代搜索过程简化为确定性的求解过程, 算法的收敛速度相比无模型优化算法大幅提高, 一般迭代2~3次即可收敛.

2006年, Booth^[12]针对点目标提出基于Zernike模式的优化算法, 校正 N 阶Zernike模式只需对远场针孔内的光强进行 $N+1$ 次测量, 但该算法仅对小像差(RMS<1 rad)适用. 其探测信号强度 J 与Zernike系数向量 c 之间的关系为

$$J = \gamma(1 - |c|^2), \quad (1)$$

其中 γ 与入射光强成正比. 当 $c = 0$ 时, J 有极大值.

利用Lukosz模式系数与远场光斑均方半径之间的关系, Booth^[13]进一步提出基于Lukosz模式的适用于大像差的校正算法. 与Zernike模式不同, Lukosz模式具有导数正交特性, 即有

$$\int_0^{2\pi} \int_0^1 \nabla L_j \cdot \nabla L_{j'} \rho d\rho d\theta = \pi \delta_{jj'}. \quad (2)$$

考虑在像面上半径为 R 区域内的光强分布, 系统的评价函数可定义为

$$M = \int_0^1 \int_0^{2\pi} I(\rho, \theta) (1 - \rho^2 / R^2) \rho d\rho d\theta = 1 - \frac{\mu}{R^2} |q|^2, \quad (3)$$

其中 $I(\rho, \theta)$ 为像面的归一化光强分布, μ 为与光学系统有关的常数. q 为Lukosz模式系数向量, 当 $|q|$ 趋于零时, 函数 M 有极大值.

2007年, Débarre等人^[14]针对扩展目标提出基于Lukosz模式的优化校正方法, 校正 N 阶Lukosz模式至少需要采集 $2N+1$ 幅像面图像. 评价函数为图像功率谱密度 S 在低频区域的积分和:

$$g(M_1, M_2) = \int_0^{2\pi} \int_{M_1}^{M_2} S(\mathbf{m}) m d\mathbf{m} d\xi, \quad (4)$$

其中 M_1 和 M_2 为归一化空间频率范围, ξ 是空间频率方向角. 评价函数与Lukosz模式系数 a_i 的关系为

$$g = q_0 - q_1 \sum_{i=4}^N a_i^2. \quad (5)$$

公式(1), (3), (5)给出了评价函数与构成波前误差的模式系数之间的关系. 在此基础上利用变形镜引入大小已知的模式偏置并计算评价函数, 然后构建方程组求解模式系数. 实际应用中还可以采用变形镜本征模式替代Zernike和Lukosz模式以避免模式拟合误差, 提高校正精度^[10,15]. 算法参数的优化及校正精度分析可参考文献^[16].

3 眼底成像应用

高分辨率眼底成像对眼底疾病和其他多种疾病的研究、诊断和治疗具有重要意义, 但人眼像差的存在严重制约了眼底成像的分辨率. 人眼像差的个体差异较大且随时间变化, 难以通过传统光学设计方法进行校正. 1997年, Liang等人^[17]首次将自适应光学技术用于眼底相机中校正人眼像差. 实验采用夏克-哈特

曼传感器测量像差, 用37单元压电变形镜进行校正, 获得了单细胞级的视网膜高分辨率图像. 目前自适应光学技术已经被应用于多种眼底成像设备, 包括眼底相机(Fundus Camera)、共焦扫描激光检眼镜(Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope, cSLO)、光学相干层析(Optical Coherence Tomography, OCT)等^[18,19]. 目前用于眼底成像设备的自适应光学系统大部分是包含夏克-哈特曼传感器和变形镜的闭环控制系统. 近年来, 为了简化系统结构、降低成本, 研究人员开始将无波前传感器自适应光学用于眼底成像设备中, 该技术的成熟将有利于自适应光学技术在临床眼科成像中的推广应用.

2006年, Zommer等人^[20]提出基于SA算法的无波前传感器自适应光学用于人眼视网膜成像, 并且和SPGD算法进行了仿真和实验比较. 实验采用人工眼模型和59单元薄膜变形镜, 评价函数为像清晰度函数 $\sum I^2$. 为了加快算法收敛速度, 将变量搜索空间由各个致动器的电压改为变形镜的59个本征模式系数. 使用SA算法以致动器电压进行搜索时需要500次迭代达到收敛, 而以变形镜本征模式进行搜索时需要400次迭代. 实验中SA算法相比SPGD算法获得了更高的评价函数值, 但这一结果并不意味着SA算法最终得到的图像质量更高. 实际上SPGD算法获得的图像质量反而高于SA, 原因在于论文采用的评价函数对倾斜误差不敏感, 引入波前倾斜有时虽然可以增加到达像面的光能量, 但这时图像内容已经改变, 因此并不一定对应着图像质量的提高. 作者考虑采用不依赖于图像内容的频率域评价函数解决这一问题, 但未对此进行深入研究.

2011年, Hofer等人^[21]将基于SPGD的自适应光学技术用于共焦扫描激光检眼镜, 并且和传统基于夏克-哈特曼传感器的自适应光学系统进行了比较, 系统光路如图2所示. 系统包含一个52单元的电磁驱动型变形镜(Woofers)和一个140单元MEMS变形镜(Tweeters), 分别用于校正低阶和高阶像差. 52单元变形镜在校正低阶像差(主要是离焦)后保持不变, 待优化变形镜为140单元变形镜. 人眼反射光的20%进入夏克-哈特曼波前传感器(SHWFS), 其余经过一个75 μm 的针孔后进入光电倍增管(PMT). SPGD算法的评价函数为图像平均亮度. 所谓“平均”是指利用两个振镜(HS, VS)对 $1.5^\circ \times 1.5^\circ$ 视场范围内的视网膜区域进行扫描成像后计算平均亮度, 成像周期为40 ms. 对5位受试者的视网膜

图2 (网络版彩图)自适应光学用于共焦扫描激光检眼镜^[21]
Figure 2 (Color online) Adaptive optics used in cSLO [21].

成像实验结果表明: 对于自然眼, 两种系统的校正效果相当; 对于散瞳后的人眼, 以图像平均亮度评价时, 传统AO的校正效果优于WSLAO, 但以图像功率谱评价时, WSLAO的校正效果优于传统AO, 即WSLAO在较低的平均图像亮度下获得了较高的图像对比度。

OCT在眼科成像中应用广泛, 其轴向分辨率取决于光源的相干长度, 横向分辨率取决于聚焦光斑的尺寸, 因此易受像差的影响, 采用自适应光学技术可使其横向分辨率恢复到衍射受限水平。由于参考臂的像差不影响横向分辨率, 自适应光学系统一般位于样品臂。2013年, Bonora等人^[22]搭建了基于无波前传感器自适应光学的频域OCT成像系统, 如图3所示。变形镜(DM)为9致动器薄膜变形镜, 主要校正低阶像差。系统待优化变量为离焦、像散、慧差、球差等6个低阶模式系数, 评价函数为像面光强平方和, 算法采用样条插值依次搜索使评价函数最大化的模式系数。对分辨率板进行了初步的成像实验研究, 经30–40次迭代后算法收敛, 相比SPGD算法的数百次迭代, 其校正效率大幅提高。

基于类似的方法, Jian等人^[23]采用37单元分块式变形镜(Iris AO, PTT111)搭建了AO-OCT成像系统并对鼠眼进行了成像。系统A扫描速率为90 kHz, 对除平移和倾斜以外的18项Zernike像差依次进行了优化校正, 耗时约65 s。在此基础上, Wong等人^[24]进一步研制了可用于活体人眼视网膜成像的AO-OCT系统, 如图4所示。为匹配人眼动态像差对校正速度的要求, 该系统在软件和硬件上都进行了改进。采用高速GPU处理器(NVIDIA Quadro K6000)实现了200 kHz的A扫描速率,

图3 (网络版彩图)无波前传感器自适应光学用于OCT^[22]
Figure 3 (Color online) WSLAO used in OCT [22].

图4 (网络版彩图)用于人眼视网膜成像的AO-OCT^[24]
Figure 4 (Color online) AO-OCT used for human retinal imaging [24].

采样体积为 $1024 \times 200 \times 80$ 像元。采用模式法校正除平移和倾斜外的14项Zernike像差, 耗时6–12 s, 校正后在偏心率最小为 1° 时仍可分辨视锥细胞。

除了可以简化系统结构, 降低成本, WSLAO用于眼底成像还具有以下优势: (1) 对于某些眼科病患, 如白内障, 由于眼内透明度差, 散射光较强, 信噪比低, 不适合用夏克-哈特曼传感器测量波前误差, 采用WSLAO可以缓解这一问题。 (2) 为避免后向反射对成像质量以及夏克-哈特曼传感器测量精度的影响, 人眼成像光学系统常采用反射式光路(图2), 这需要进行严格的光学设计和装调来减小离轴像差, 系统体积大, 结构也比较复杂。采用WSLAO之后, 可采用透镜搭建光学系统(图4), 初始像差可大大减小, 结构也比较紧凑^[23,24]。近年来发展的自适应透镜(Adaptive Lens)则可以更加方便地集成到现有眼底成像系统中校正像差^[25,26]。

将WSLAO用于活体人眼视网膜成像的一个困难

是在算法的迭代过程中, 人眼的不自觉运动和眨眼会导致评价函数的虚假变化, 影响算法的收敛. 这一方面需要对算法进行优化, 加快其收敛速度, 同时可以在算法设计上排除这些干扰, 例如在评价函数值发生突变时摒弃该值; 另一方面需要选用速度更快的硬件, 提高探测器的帧率和运算单元的速度.

4 荧光显微成像应用

显微镜是生命科学研究中最重要的工具之一, 研究人员希望其具备高三维空间分辨率, 高时间分辨率, 非侵入式成像等特点. 在衍射受限条件下显微镜的横向分辨率 Res_{xy} 和轴向分辨率 Res_z 分别为

$$Res_{xy} = \frac{\lambda}{2NA},$$

$$Res_z = \frac{\lambda}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2}\right)}, \quad (6)$$

其中 NA 为数值孔径, n 为成像介质折射率, λ 为波长. 当系统存在像差时会导致聚焦光斑展宽, 成像分辨率、亮度及对比度下降. 显微镜的误差源包括两方面: 一是显微镜光学系统自身的设计和装调误差; 二是由样品折射率的不均匀性引起的误差, 一般随着成像深度的增加而增大, 且样品内不同位置的像差差别较大(等晕区小). 上述两部分误差都可以由自适应光学系统补偿^[27].

荧光显微成像一般包含激发光(去程光)和发射光(回程光)两部分, 是否需要校正取决于该光束是否对成像分辨率产生影响, 即与显微镜的成像机理有关. 例如, 传统宽视场显微镜仅需对回程光进行校正; 双光子荧光显微镜仅需对去程光进行校正; 采用共焦针孔的共聚焦显微镜需要对去程光和回程光都进行校正.

有波前传感和无波前传感自适应光学都可以用于显微成像. 基于波前传感的自适应光学系统一般采用夏克-哈特曼传感器测量波前误差, 但应用时有一定限制. 对于共聚焦荧光显微镜, 荧光强度与激发光强度成正比, 在整个照明光锥内都会产生荧光, 在夏克-哈特曼传感器上无法简单区分光波的来源, 即存在测量的模糊性(Ambiguity)问题. 解决这一问题的方法是在样品中植入荧光微珠或者利用荧光蛋白作为参考源(导星), 同时在夏克-哈特曼传感器前放置针孔滤除

焦点以外的光波^[28,29]. 对于双光子荧光显微镜, 由于仅在激光聚焦的很小范围内(λ^3 量级)有荧光产生, 因此不存在测量模糊性问题, 使用夏克-哈特曼传感器可以获得良好的效果^[30,31].

无波前传感器自适应光学直接将焦面探测器的信息用于校正, 对于共聚焦显微镜来说, 探测器前的共焦针孔可以避免模糊性问题. 在选择具体的无波前传感算法时, 一个必须考虑的因素是生物样品在长时间曝光下会引起光损伤和光漂白, 必须用尽可能少的曝光次数完成波前校正, 因此目前多数研究者采用了收敛速度较快的基于模型的无波前传感算法.

2002年, Booth等人^[32]将无波前传感器自适应光学用于共聚焦显微镜, 如图5所示. 由于在雪崩光电探测器(APD)前存在共焦针孔, 直接避免了焦外光波对像差估计的影响. 系统采用薄膜变形镜依次引入大小相同、方向相反的Zernike模式偏置并计算两种偏置下探测器的信号之差 ΔW . 这里的信号是指对样品进行扫描后计算平均信号强度. 在小像差范围内, ΔW 与Zernike模式系数成线性关系, 根据事先计算的灵敏度矩阵可以对波前误差的Zernike模式系数进行估计. 论文对荧光染色的鼠小肠进行观测, 对7项Zernike模式进行了两轮校正, 每一轮包括14次扫描成像, 校正后图像的横向和轴向分辨率都得到提高.

双光子荧光显微镜相比单光子共聚焦显微镜有很多优势: (1) 荧光强度与激发光强度的平方成正比, 激发荧光仅在焦点附近很小范围内, 因此不需要共焦针孔即可实现三维成像; (2) 激发光为近红外光, 降低了对生物组织的伤害, 延长了观测时间; (3) 对样品穿透性好, 可以对深层组织进行观测. 基于夏克-哈特曼传感器的直接探测方法可以用于双光子荧光显微镜, 而无波前传感器自适应光学也被证明是一种简单可行的技术途径^[33]. 如图6所示, 系统采用850 nm掺钛蓝宝石锁模脉冲激光器作为激发光, 140单元MEMS变形镜为校正器, 焦面探测器为光子计数型光电倍增管(PMT). 算法对 N 阶模式校正需要 $2N+1$ 次测量. 这里并未直接采用Zernike模式表达波前, 而是对Zernike模式进行了旋转变换以消除模式间的串扰, 变换后的模式(图6(b))对评价函数的影响是相互独立的, 有利于提高算法的收敛速度. 类似的方法也被用于结构光照明显微镜, 但评价函数不再是总能量, 而是图像清晰度(即光强平方和)^[34].

图5 WSLAO用于共聚焦显微镜^[32]

Figure 5 WSLAO used for confocal microscope [32].

图6 WSLAO用于双光子显微镜^[34]. (a) 实验光路; (b) 校正的像差模式

Figure 6 WSLAO used for two-photon microscope [34]. (a) Experimental setup; (b) aberration modes for correction.

2012年, Bourgenot等人^[35]将基于模型的无波前传感器自适应光学技术用于光片(Light Sheet)显微镜. 光片显微镜的照明光路与成像光路垂直, 每次仅照亮样品的一个薄层(几微米). 与共焦扫描显微镜相比, 光片显微镜为宽视场成像, 成像速度快, 光毒性小. 实验对含有绿色荧光蛋白标记的斑马鱼样品(体外)进行了观测和校正. 样品被放置在盛水的玻璃试管中, 折射率的失配会引起的照明光束和成像光束离焦, 柱面玻璃试管则会引起像散. 算法采用Zernike模式表征波前误差, 对各阶模式依次校正. 在校正初期采用均方根对比度作为评价函数(公式(7)), 每阶模式偏置采样3幅图像. 校正后期采用图像的功率谱密度在高频区域内的

总和作为评价函数(公式(8)), 每阶模式偏置采样7幅图像. 采用洛伦兹曲线拟合评价函数并找出评价函数最大值对应的模式系数.

$$\text{Metric1} = \sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{N_p} (I(x, y) - \langle I \rangle)^2}, \quad (7)$$

其中 $\langle \rangle$ 表示求平均, N_p 表示成像区内像素数.

$$\text{Metric2} = \frac{\sum_{N_p} |F[I(x, y)]|_{\text{masked}}}{\sum_{N_p} |F[I(x, y)]|_{\text{unmasked}}}, \quad (8)$$

其中 F 表示傅里叶变换, masked 表示将低频区域内的值置零.

传统显微镜无法突破阿贝衍射极限, 分辨率只能达到200 nm左右, 但随着荧光分子开关的出现和成像方法的不断创新, 目前已经有多种形式的超分辨率荧光显微镜问世, 包括单分子成像定位显微镜(包括PALM、STORM等技术途径)、受激发射损耗显微镜(Stimulated Emission Depletion, STED)和结构光照明显微镜等^[36]. 自适应光学技术同样可以用于超分辨率荧光显微镜克服像差的影响^[37], 下面以STED显微镜为例进行介绍.

STED显微镜是在共聚焦荧光显微镜的基础上, 将另外一束波长较长的环形激光(中心强度趋于零)与激发光叠加, 使激发光斑外围的荧光分子通过受激辐射回到基态, 仅留下圆环中心(小于衍射极限尺寸)的自发辐射荧光用于成像. 用STED显微镜可以对活体细胞内的变化进行观察, 分辨率可达50 nm左右. STED显微镜中的激发光、损耗光和发射光都受像差的影响, 而损耗光对像质的影响最大. 2012年, Gould等人^[38]采用无波前传感器自适应光学技术实现了对深层生物组织的三维STED成像, 系统结构如图7所示. 液晶空间光调制器SLM1和SLM2分别位于损耗光路和激发光路校正像差, 但未对发射光进行校正, SLM1还同时用于加载 $\lambda/2$ 相位板产生环形光束.

在校正模式的选择上没有直接采用Zernike模式, 因为在STED成像方式下, Zernike模式间的正交性被破坏, 高阶模式中也会包含低阶误差. 实验发现引入慧差会导致耗散光中心横向移动^[39], 而引入球差会导致耗散光中心沿轴向移动. 通过对不同模式下光斑的移动量进行补偿可以得到一组“无移位(Displacement

图7 (网络版彩图)WSLAO用于STED显微镜^[38]

Figure 7 (Color online) WSLAO used for STED microscope ^[38].

Free) Zernike模式. 激发光路采用光亮度作为评价函数, 耗散光路则采用包含亮度和对比度在内的复合评价函数. 实验透过55 μm厚的甘油层对100 nm的荧光珠进行成像, 先对激发光校正, 再对耗散光校正, 校正后信号峰值能量提高5倍, 分辨率提高3.2倍. 2016年, 该研究组对系统进行了改进, 采用液晶空间光调制器加变形镜的方案, 对激发光、损耗光和发射光全部进行了校正^[40].

除了2.2节介绍的基于模型的无波前传感器自适应光学校正方法, Ji等人^[41]还提出了一种称为瞳面分割(Pupil Segmentation)的间接传感方法用于双光子荧光显微镜, 实验系统如图8所示.

该方法也不需要单独的波前传感器, 但其工作原理与夏克-哈特曼传感器相仿, 核心思想是将瞳面分为多个子区域, 每个子区域用一细光束探测波前局部斜率. 图8中的液晶空间光调制器(SLM)同时用于波前传感和校正. 首先照明整个光瞳产生参考图像, 然后将SLM加载二值相位使得瞳面仅有一个子区域被照明, 其余光波被视场光阑(FS)滤除. 通过计算质心或相关, 可以得出子区域内图像和参考图像的相对平移量, 即得到了波前局部斜率, 再通过波前重构算法可以获得波前相位分布. 该方法的校正精度取决于瞳面上划分的子区域个数, 但增加子区域也意味着增加曝光次数, 校正速度变慢.

综上, 无波前传感器自适应光学用于荧光显微成像虽然取得了进展, 但仍面临一些困难: (1) 用于深层

图8 (网络版彩图)基于瞳面分割法的双光子显微镜^[41]

Figure 8 (Color online) Two-photon microscope based on Pupil Segmentation ^[41].

组织成像时, 随着成像深度的增加, 由散射造成的波前误差将非常复杂, 高频成分较多, 目前的研究主要限于对低阶模式的校正, 对强散射介质引起误差的校正可以参阅文献^[42,43]; (2) 由于像差随空间位置变化很快, 自适应光学校正的视场范围较小, 可考虑采用共轭自适应光学(Conjugate AO)^[44]或多层共轭自适应光学(MCAO)^[45]校正扩大校正视场; (3) 用于超分辨率显微镜时, 显微镜的成像机理差异较大, 需要仔细分析波前像差对成像分辨率的影响, 提出合理的评价函数和校正策略.

5 小结

21世纪以来, 自适应光学技术用于生物医学成像取得了丰硕的成果, 使系统的成像质量不再受制于生物体本身的像差. 眼底成像和荧光显微成像是目前两个最主要的应用方向, 而两者本身也有共通之处, 例如共聚焦显微镜和共焦扫描检眼镜在本质上是相同的, 后者的人眼相当于物镜, 视网膜相当于观测样品.

传统自适应光学和无波前传感器自适应光学各有优缺点, 在生物医学成像应用中都可占有一席之地, 可根据具体的应用背景和技术要求选择使用. 无波前传感器自适应光学在应用时需注意校正模式和评价函数的选取、校正的动态范围和精度、算法的全局收敛性、迭代参数的优化等问题, 应结合具体的算法和应用进行分析.

参考文献

- 1 Babcock H W. Adaptive optics revisited. *Science*, 1990, 249: 253–257

- 2 Weyrauch T, Vorontsov M A. Atmospheric compensation with a speckle beacon in strong scintillation conditions: Directed energy and laser communication applications. *Appl Opt*, 2005, 44: 6388–6401
- 3 Ren D, Dong B, Zhu Y, et al. Correction of non-common-path error for extreme adaptive optics. *Publicat Astron Soc Pac*, 2012, 124: 247–253
- 4 Muller R A, Buffington A. Real-time correction of atmospherically degraded telescope images through image sharpening. *J Opt Soc Am*, 1974, 64: 1200–1210
- 5 Yang P, Liu Y, Yang W, et al. An adaptive laser beam shaping technique based on a genetic algorithm. *Chin Opt Lett*, 2007, 5: 497–500
- 6 El-Agmy R, Bulte H, Greenaway A H, et al. Adaptive beam profile control using a simulated annealing algorithm. *Opt Express*, 2005, 13: 6085–6091
- 7 Vorontsov M A, Carhart G W, Ricklin J C. Adaptive phase-distortion correction based on parallel gradient-descent optimization. *Opt Lett*, 1997, 22: 907–909
- 8 Yang Q, Zhao J, Wang M, et al. Wavefront sensorless adaptive optics based on the trust region method. *Opt Lett*, 2015, 40: 1235–1237
- 9 Yang H, Li X. Comparison of several stochastic parallel optimization algorithms for adaptive optics system without a wavefront sensor. *Opt Laser Tech*, 2011, 43: 630–635
- 10 Dong B, Yu J. Hybrid approach used for extended image-based wavefront sensor-less adaptive optics. *Chin Opt Lett*, 2015, 13: 041101–41105
- 11 Sun X, Dong B. Co-phasing error correction for segmented primary mirror based on hybrid optimization algorithm (in Chinese). *Acta Opt Sin*, 2015, 35: 1111003 [孙雪, 董冰. 基于混合优化算法的分块镜共相位误差校正. *光学学报*, 2015, 35: 1111003]
- 12 Booth M J. Wave front sensor-less adaptive optics: A model-based approach using sphere packings. *Opt Express*, 2006, 14: 1339–1352
- 13 Booth M J. Wavefront sensorless adaptive optics for large aberrations. *Opt Lett*, 2007, 32: 5–7
- 14 Débarre D, Booth M J, Wilson T. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies. *Opt Express*, 2007, 15: 8176–8190
- 15 Dong B, Wang R. Laser beam cleanup using improved model-based wavefront sensorless adaptive optics. *Chin Opt Lett*, 2016, 14: 031406–31409
- 16 Facomprez A, Beaurepaire E, Débarre D. Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics. *Opt Express*, 2012, 20: 2598–2612
- 17 Liang J, Williams D R, Miller D T. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. *J Opt Soc Am A*, 1997, 14: 2884–2892
- 18 Roorda A, Duncan J L. Adaptive optics ophthalmoscopy. *Annu Rev Vis Sci*, 2015, 1: 19–50
- 19 Xiao F, Dai Y, Zhao J L, et al. High-resolution retinal imaging system with dual deformable mirrors (in Chinese). *Acta Opt Sin*, 2015, 35: 0501004 [肖飞, 戴云, 赵军磊, 等. 双变形镜人眼视网膜高分辨率显微成像系统. *光学学报*, 2015, 35: 0501004]
- 20 Zommer S, Ribak E N, Lipson S G, et al. Simulated annealing in ocular adaptive optics. *Opt Lett*, 2006, 31: 939–941
- 21 Hofer H, Sredar N, Queener H, et al. Wavefront sensorless adaptive optics ophthalmoscopy in the human eye. *Opt Express*, 2011, 19: 14160–14171
- 22 Bonora S, Zawadzki R J. Wavefront sensorless modal deformable mirror correction in adaptive optics: Optical coherence tomography. *Opt Lett*, 2013, 38: 4801–4804
- 23 Jian Y, Xu J, Gradowski M A, et al. Wavefront sensorless adaptive optics optical coherence tomography for in vivo retinal imaging in mice. *Biomed Opt Express*, 2014, 5: 547–559
- 24 Wong K S K, Jian Y, Cua M, et al. In vivo imaging of human photoreceptor mosaic with wavefront sensorless adaptive optics optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*, 2015, 6: 580–590
- 25 Bonora S, Jian Y, Zhang P, et al. Wavefront correction and high-resolution in vivo OCT imaging with an objective integrated multi-actuator adaptive lens. *Opt Express*, 2015, 23: 21931–21941
- 26 Jian Y, Lee S, Ju M J, et al. Lens-based wavefront sensorless adaptive optics swept source OCT. *Sci Rep*, 2016, 6: 27620
- 27 Mao H, Tao L, Chen L Y. Application and development of adaptive optics to three-dimensional in vivo deep tissue fluorescent microscopy (in Chinese). *Infrared Laser Eng*, 2016, 45: 0602001 [毛珩, Tao Louis, 陈良怡. 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和发展. *红外与激光工程*, 2016, 45: 0602001]
- 28 Tao X, Fernandez B, Azucena O, et al. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing. *Opt Lett*, 2011, 36: 1062–1064
- 29 Tao X, Azucena O, Fu M, et al. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars. *Opt Lett*, 2011, 36: 3389–3391
- 30 Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes. *Nat Meth*, 2014, 11: 625–628
- 31 Wang K, Sun W, Richie C T, et al. Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 7276
- 32 Booth M J, Neil M A A, Juskaitis R, et al. Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 5788–5792
- 33 Débarre D, Botcherby E J, Watanabe T, et al. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Opt Lett*, 2009, 34: 2495–2497
- 34 Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy. *Opt Express*, 2008, 16: 9290–9305

- 35 Bourgenot C, Saunter C D, Taylor J M, et al. 3D adaptive optics in a light sheet microscope. *Opt Express*, 2012, 20: 13252–13261
- 36 Hell S W, Sahl S J, Bates M, et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *J Phys D-Appl Phys*, 2015, 48: 443001
- 37 Booth M, Andrade D, Burke D, et al. Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy. *Microscopy (Tokyo)*, 2015, 64: 251–261
- 38 Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens. *Opt Express*, 2012, 20: 20998–21009
- 39 Antonello J, Kromann E B, Burke D, et al. Coma aberrations in combined two- and three-dimensional STED nanoscopy. *Opt Lett*, 2016, 41: 3631–3634
- 40 Patton B R, Burke D, Oswald D, et al. Three-dimensional STED microscopy of aberrating tissue using dual adaptive optics. *Opt Express*, 2016, 24: 8862–8876
- 41 Ji N, Milkie D E, Betzig E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. *Nat Meth*, 2010, 7: 141–147
- 42 Yang Q, Cao L C, Jin G F. Progress in optical focusing techniques aiming to suppress scattering effect in biomedical tissues (in Chinese). *Chin J Lasers*, 2015, 42: 0901001 [杨强, 曹良才, 金国藩. 可抑制生物组织散射效应的光学聚焦技术研究进展. *中国激光*, 2015, 42: 0901001]
- 43 Tang J, Germain R N, Cui M. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109: 8434–8439
- 44 Mertz J, Paudel H, Bifano T G. Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications. *Appl Opt*, 2015, 54: 3498–3506, arXiv: [1501.02685](https://arxiv.org/abs/1501.02685)
- 45 Wu T, Cui M. Numerical study of multi-conjugate large area wavefront correction for deep tissue microscopy. *Opt Express*, 2015, 23: 7463–7470

Application of wavefront sensorless adaptive optics in biological imaging

DONG Bing^{*}, WU ChuHan & REN HongXi

School of Optoelectronics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Obtaining high-quality images of organisms is critical to life sciences research, but imaging optical system and organism itself contain aberrations, leading to reduced resolution and contrast. Since aberrations introduced by different organisms are different and may change with time, they cannot be compensated by conventional optical design methods. Adaptive optics, originating in astronomical imaging observations, has the ability to overcome the effects of dynamic aberrations, and can therefore be used to improve imaging quality in biological imaging. Conventional adaptive optics typically has a wavefront sensor (such as Shack-Hartmann sensor) to measure wavefront errors. Recently developed wavefront sensorless adaptive optics (WSLAO) has got rid of dedicated wavefront sensors, so the system structure can be simplified and the cost is reduced. WSLAO can also overcome some limitations of traditional adaptive optics and has good application prospects. In this paper, the working principle of WSLAO is given at first. Then the applications of this technology in fundus imaging and fluorescence microscopy are discussed and the future development trend is proposed.

adaptive optics, wavefront sensorless, fundus imaging, fluorescent microscopy

PACS: 95.75.Qr, 87.85.Pq, 42.66.Ew, 87.64.M-, 87.64.mk, 87.64.kv

doi: [10.1360/SSPMA2016-00489](https://doi.org/10.1360/SSPMA2016-00489)