Письма в ЖЭТФ, том 114, вып. 8, с. 520 – 525

Лазерная микроскопия рассеивающих сред на основе регуляризируемого минимально диффузного восстановления изображений

М. С. Почечуев[+], *И. В. Федотов*[+*], *Е. А. Степанов*[+], *М. С. Андреева*[+], *А. Б. Федотов*[+*], *А. М. Желтиков*[+*×1)]

[+] *Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия*

[*] *Российский квантовый центр, 143025 Сколково, Россия*

[×] *Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX 77843, USA*

Поступила в редакцию 20 сентября 2021 г.
После переработки 21 сентября 2021 г.
Принята к публикации 21 сентября 2021 г.

Представлена физическая реализация регуляризируемого по Тихонову решения обратной задачи рассеяния с использованием подстраиваемого непосредственно по ходу эксперимента базиса спеклов, обеспечивающего минимизацию обусловленной процедурой регуляризации диффузии изображений. На этой основе реализуется устойчивое, минимально диффузное восстановление изображений в схеме микроскопии рассеивающих сред с субмикронным пространственным разрешением.

DOI: 10.31857/S1234567821200039

Рассеяние является ключевым фактором, ограничивающим использование оптических методов для решения широкого класса задач, связанных с дистанционным зондированием атмосферы, астрономическими наблюдениями, исследованием фундаментальных физических процессов в твердом теле, диагностикой плазмы, микроскопией биологических систем, лазерной биомедициной, а также оптической кардио- и нейростимуляцией [1–6]. Разработанные в последние годы новые подходы в оптике рассеивающих сред, основанные на использовании методов статистической оптики, оптики сверхкоротких импульсов, нелинейной оптики и адаптивной оптики, позволяют значительно продвинуться в решении задач этого класса [7–10]. Ввиду того, что применимость методов прямого переноса изображений в условиях сильно рассеивающих сред оказывается ограниченной, многие из активно развиваемых в последние годы подходов обращаются, в том или ином виде, к восстановлению изображений путем решения обратной задачи рассеяния [8, 11–13]. Трудности, возникающие при практической реализации таких походов, носят фундаментальный характер и обусловлены тем, что обратная задача рассеяния относится к классу некорректно поставленных [14].

Целью настоящей работы является физическая реализация регуляризируемого по Тихонову решения обратной задачи рассеяния с использованием адаптивно настраиваемого базиса спеклов как основа для лазерной микроскопии рассеивающих сред, обеспечивающей устойчивое восстановление изображений микрообъектов на фоне картины рассеяния с субмикронным пространственным разрешением. Ключевые идеи нашего эксперимента иллюстрируются на рис. 1 и 2. В качестве источника излучения используется непрерывный лазер на основе кристалла Nd : YAG с диодной накачкой и удвоением частоты. Излучение с длиной волны 532 нм мощностью 5 мВт, генерируемое этим лазерным источником, фокусируется с помощью сканирующей линзы (SL на рис. 1) объектива микроскопа с увеличением 10× и числовой апертурой 0.25 (MO1 на рис. 1) для широкопольного освещения поверхности рассеивающей пластины, изготовленной из матового стекла (D на рис. 1). Изображение формируемой при этом спекл-картины с помощью аналогичного объектива (MO2 на рис. 1) из плоскости Σ (рис. 1) на ПЗС-камеру, установленную в плоскости Σ', для анализа распределения интенсивности светового поля $a_i(x, y)$ этой картины. В плоскости Σ затем размещается прозрачный слайд, на который нанесены микрокристаллы алмаза с NV-центрами окраски (рис. 1, 2), а ПЗС-камера располагается в плоскости Σ', оптически сопряженной с плоскостью Σ $4f$-системой L–MO2 (рис. 1). Возбуждение NV-центров лазерным излучением с длиной волны 532 нм вызывает излу-

1)e-mail: zheltikov@physics.msu.ru

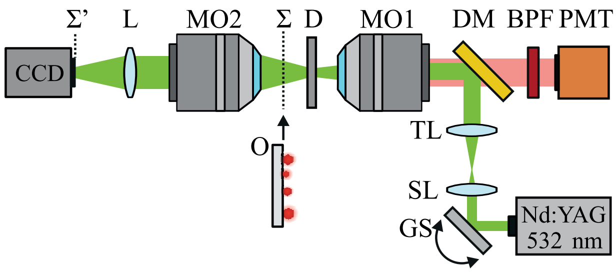

Рис. 1. (Цветной онлайн) Лазерная микроскопия рассеивающих сред на основе регуляризируемого минимально диффузного восстановления изображений: Nd : YAG 532 нм – непрерывный лазер накачки на основе кристалла Nd : YAG с диодной накачкой и удвоением частоты; GS – гальваносканер; SL – сканирующая линза; TL – тубусная линза; DM – дихроичное зеркало; BPF – полосовой фильтр; PMT – фотоэлектронный умножитель; MO1, MO2 – микроскопные объективы; D – рассеивающая пластина; Σ – плоскость образца и изображения; L – линза; Σ′ – плоскость, оптически сопряженная с Σ $4f$-системой L–MO2, и находящаяся на матрице ПЗС-камеры

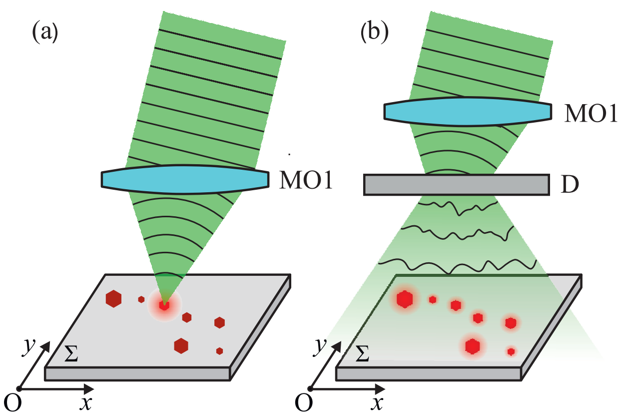

Рис. 2. (Цветной онлайн) Лазерная микроскопия на основе прямого переноса изображений (a) и на основе анализа изображения на фоне картины рассеяния (b)

чение, максимум спектра которого, соответствующий фононному крылу NV-дефекта в решетке алмаза [15, 16], приходится на длину волны 670 нм (рис. 3).

На рисунке 4a представлено изображение области размером 10 × 10 мкм на поверхности предметного стекла с нанесенными микрокристаллами алмаза, полученное методом прямого переноса изображения предметной плоскости на видеокамеру (рис. 1) без внесения в лазерный луч матового стекла или иных рассеивающих элементов (рис. 1). В условиях сильного рассеяния, моделируемого в наших экспериментах внесением в лазерный луч матового стекла D (рис. 1, 2), получение изображения системы люминесцентных микрочастиц с помощью прямых методов микроскопии оказывается невозможным, так как изображение не может быть выделено на фоне картины рассеяния. Возникает необходимость восстановления изображения на основе решения обратной задачи рассеяния.

В реализованной нами экспериментальной схеме эта задача решается путем освещения системы люминесцентных микрокристаллов полем спеклов (рис. 1, 2), формируемым рассеивающим элементом (матовое стекло D, рис. 1), и регистрации интегрального сигнала люминесценции фотоприемником PMT, установленным за плоскостью Σ (рис. 1). Новые схемы лазерной микроскопии, основанные на использовании структурированных световых пучков и лазерных спеклов, активно развиваются в последние годы [17–19]. В схеме микроскопии, реализованной в наших экспериментах, система люминесцентных микрокристаллов алмаза с распределением $\rho(x,y)$, освещаемая полем спеклов с распределением интенсивности $a_i(x,y)$, приводит к интегральному сигналу люминесценции $b_i = \int_\Sigma a_i(x,y)\rho(x,y)dxdy$. Полагая, что каждый из микрокристаллов алмаза, центры окраски которого возбуждаются лазерным излучением, может быть приближенно описан как точечный излучатель, представим пространственное распределение люминесцентных центров в виде $\rho(x,y) = \sum_{j=1}^{M}\rho_j\delta(x-x_j, y-y_j)$, где (x_j,y_j) – координаты j-го излучающего микрокристалла в плоскости Σ. Выражение для интегрального сигнала люминесценции при этом принимает вид $b_i = \sum_{j=1}^{N}\rho_j a_{ij}$, где $a_{ij} = a_j(x_i,y_i)$.

Изменяя угол наклона лазерного излучения относительно поверхности матового стекла с помощью автоматически управляемой быстрой гальванометрической сканирующей системы, встроенной в схему конфокальной микроскопии (рис. 1), получаем новую спекл-картину с распределением интенсивности $a_k(x,y)$. Используя эту спекл-картину для освещения той же системы алмазов с NV-центров, получаем интегральный сигнал люминесценции $b_k = \sum_{j=1}^{N}\rho_j a_{kj}$, где $a_{kj} = a_j(x_k,y_k)$. Имея N спекл-картин, каждая из которых имеет свое распределение интенсивности $a_i(x,y)$, $i = 1,...,N$, и используя их для освещения системы алмазов с NV-центрами с распределением $\rho(x,y)$, получаем вектор $\mathbf{B} = \{b_1,...,b_N\}$, i-ая составляющая которого является интегральным сигналом люминесценции системы NV-центров, освещаемой i-й спекл-картиной.

Если бы все распределения интенсивности $a_{ij} = a_j(x_i,y_i)$ были известны точно, то распределение люминесцентных центров в плоскости Σ, $\boldsymbol{\rho} =$

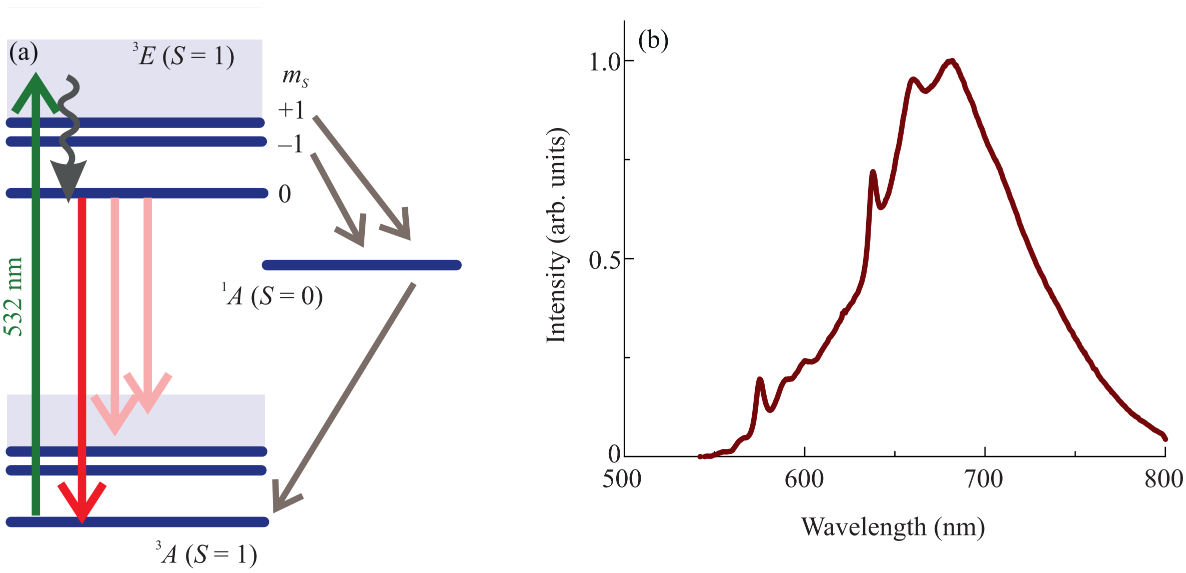

Рис. 3. (Цветной онлайн) Схема возбуждения (a) и спектр излучения (b) NV-центров в алмазе

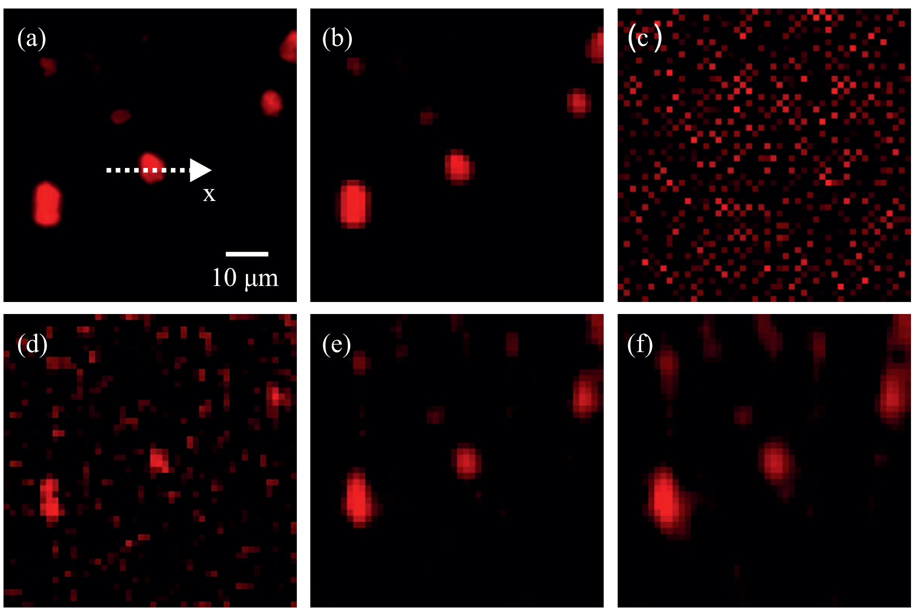

Рис. 4. (Цветной онлайн) (a) – Изображение системы люминесцентных микрочастиц алмаза, полученное путем прямого переноса и (b) его пикселированный вариант с общим числом пикселей, равным $N_x * N_y = 50 * 50 = 2500$. Изображения системы люминесцентных микрочастиц алмаза, восстановленные путем решения обратной задачи с параметром регуляризации $\alpha = 0$ (c), 1 (d), 5 (e), 10 (f)

$= \{\rho_1, ..., \rho_N\}$, можно было бы найти путем решения системы линейных уравнений $A\boldsymbol{\rho} = \mathbf{B}$, где A – матрица, элементами которой являются интенсивности a_{ij}. Однако, так как вместо матрицы A точных значений интенсивности известна лишь матрица $\mathcal{A}$, элементами которой являются приближенные значения a_{ij}, решение уравнения $\mathcal{A}\boldsymbol{\rho} = \mathbf{B}$ оказывается некорректно поставленной задачей.

Регуляризация решения этой задачи может быть выполнена с помощью процедуры регуляризации Тихонова [20], т.е. путем минимизации функционала $G_\alpha = \|\mathcal{A}\boldsymbol{\rho} - \mathbf{B}\|^2 + \alpha\|L\boldsymbol{\rho}\|^2$, где α – параметр регуляризации, L – регуляризирующая матрица. Регуляризованное решение $\boldsymbol{\rho}_\alpha$ может быть найдено из соответствующего функционалу G_α уравнения Эйлера–Лагранжа [14, 21, 22] $(\mathcal{A}^*\mathcal{A} + \alpha L^* L)\boldsymbol{\rho}_\alpha = \mathcal{A}^* B$. В операторной форме $\mathcal{A}$ и L в выражении для G_α понимаются как операторы, действующие в гилбертовом пространстве $\boldsymbol{\rho}$. На практике, однако, компоненты вектора $\mathbf{B}$ также неизвестны. Вместо них известны лишь их приближенные значения, образующие вектор $\boldsymbol{\mathcal{B}}$, так что $\|\mathbf{B}-\boldsymbol{\mathcal{B}}\| \leq \sigma$. В реализованной нами экспериментальной схеме компонетами вектора $\boldsymbol{\mathcal{B}}$ являются интегральные значения интенсивности, измеренные с конечной точностью с помощью различных спекл-картин. Обобщение процедуры регуляризации Тихонова на этот случай приводит к уравнению [21, 22] $(\mathcal{A}^*\mathcal{A}+\alpha L^* L)\boldsymbol{\rho}_{\boldsymbol{\alpha}}^{\boldsymbol{\rho}} = \mathcal{A}^*\boldsymbol{\mathcal{B}}$. Искомый вектор $\boldsymbol{\rho}_{\boldsymbol{\alpha}}^{\boldsymbol{\rho}}$ при этом оказывается зависящим как от погрешности измерения σ, так и от выбора параметра регуляризации α.

В условиях микроскопии рассеивающих сред, когда устойчивости решения обратной задачи необходимо достичь при минимальных возможных потерях пространственного разрешения, выбор параметра регуляризации α оказывается непростой задачей. При слишком малых α изображения оказываются сильно зашумленными. В некоторых достаточно обширных областях, меняющихся по условиям экспериментов параметров, восстановление изображения при этом может терять устойчивость. При слишком больших значениях α операция фильтра $(\mathcal{A}^*\mathcal{A}+\alpha L^* L)^{-1}\mathcal{A}^*\boldsymbol{\mathcal{B}} = \boldsymbol{\rho}_{\boldsymbol{\alpha}}^{\boldsymbol{\sigma}}$ приводит к потере важных пространственных деталей изображений, размытию границ, неприемлемому ухудшению пространственного разрешения. Все эти эффекты, приводящие к потере качества изображения, отражают диффузионный характер преобразования $\rho(x,y)$, диктуемый процедурой регуляризации решения обратной задачи [14, 22]. Для частного случая регуляризации по Тихонову регуляризованное решение обратной задачи рассеяния может быть описано изотропным уравнением диффузии [22] с коэффициентом диффузии, пропорциональным параметру регуляризации α.

Теория регуляризации решения обратной задачи рассеяния не предлагает удовлетворительных с точки зрения микроскопии рассеивающих сред рецептов выбора параметра регуляризации α по наперед заданному значению погрешности измерения σ. Наилучшим решением на практике является выбор α непосредственно в процессе эксперимента на основе одного из апостериорных критериев [21]. Примером такого подхода является широко используемый в практике машинного восстановления изображений метод апостериорного выбора параметра регуляризации α на основе критерия Морозова [23], который для случая $L = I$, где I – оператор тождественного преобразования, представляемый единичной матрицей, имеет вид $\|\mathcal{A}\boldsymbol{\rho}_{\boldsymbol{\alpha}}^{\boldsymbol{\sigma}} - \boldsymbol{\mathcal{B}}\| = \sigma$. Оптимальный выбор параметра регуляризации α, таким образом, может быть осуществлен лишь на основе уже имеющегося массива экспериментальных данных, позволяющего определить матрицу оператора $\mathcal{A}$ и вектор $\boldsymbol{\mathcal{B}}$.

Ключевое преимущество реализованной в данной работе схеме микроскопии заключается в обеспечиваемой автоматической системой гальванометрического сканирования (рис. 1, 2) возможности быстрой подстройки размерности N базиса спеклов, используемого для восстановления распределения люминесцентных центров $\rho(x,y)$ в предметной плоскости. Возможность подстройки N непосредственно по ходу эксперимента позволяет за счет некоторого увеличения времени восстановления изображения уменьшить погрешность измерения σ, которая при больших N оказывается пропорциональной $1/N^{1/2}$. При меньших погрешностях измерения σ снижаются требования к параметру регуляризации α, который может быть при этом уменьшен без потери устойчивости процедуры восстановления изображения. Уменьшение α, в свою очередь, приводит к уменьшению диффузии изображения в процессе регуляризации.

На рисунках 4c–f представлены изображения системы люминесцентных микрочастиц алмаза, восстановленные путем решения обратной задачи. Размерность базиса спеклов для этих измерений, $N = 2500$, выбрана на основе анализа обширного массива восстановленных изображений. Цель этого анализа заключалась в выяснении баланса между устойчивостью процедуры восстановления изображения на фоне картины рассеяния с одной стороны и степенью диффузии изображения в процессе регуляризации, приводящей к потере пространственного разрешения и размытию границ изображений с другой стороны.

На рисунке 4c представлен результат нерегуляризованного решения обратной задачи рассеяния ($\alpha = 0$) для характерного массива данных, позволяющего определить матрицу оператора $\mathcal{A}$ и вектор $\boldsymbol{\mathcal{B}}$ для реализованной схемы микроскопии. Как видно из рис. 4c, в отсутствие регуляризации решение полностью теряет устойчивость.

На рисунке 4d приведено изображение системы люминесцентных микроскристаллов алмаза, полученное путем решения обратной задачи рассеяния с параметром регуляризации $\alpha = 1$. Изображение этой же системы микрокристаллов, полученное в схеме прямого переноса изображения без внесения в лазерный луч рассеивающей пластины (рис. 2a), представлено на рис. 4a. Для корректности сравнения результатов, получаемых методом прямого переноса изображения и изображений, восстанавлива-

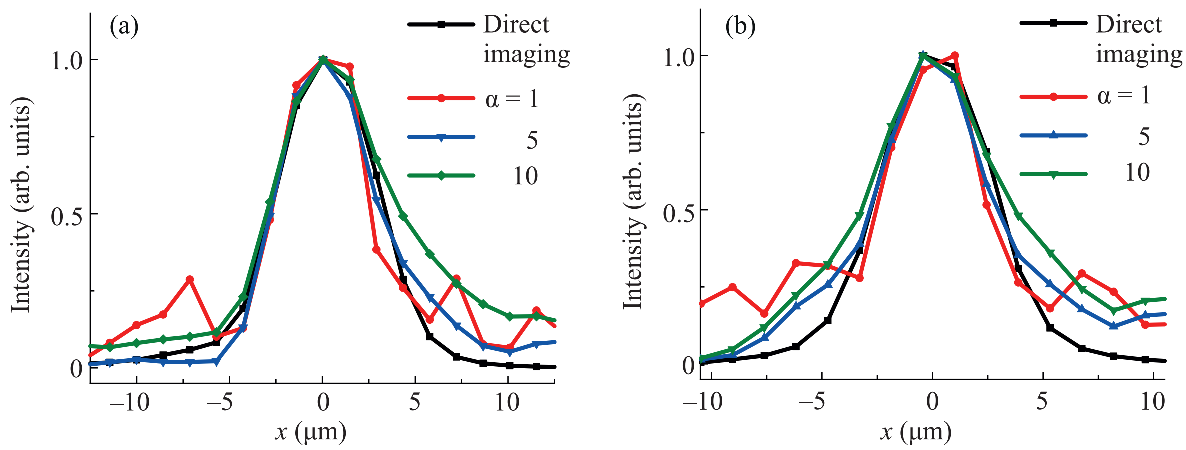

Рис. 5. (Цветной онлайн) Профили интенсивности на изображениях микроалмазов 1 (a) и 2 (b), построенные вдоль оси, показанной на рис. 4a. Изображения восстановлены путем решения обратной задачи с параметром регуляризации $\alpha = 1$ (красная линия), 5 (синяя линия), 10 (зеленая линия). Черная линия соответствует изображениям, полученным прямым методом

емых на основе решения обратной задачи рассеяния, на рис. 4b приведено пикселированное изображение этой же группы микроскристаллов алмаза, полученное в схеме прямого переноса изображения (рис. 2a). Количество пикселей на этом изображении, $N_x * N_y = 50 * 50 = 2500$, выбрано равным числу независимых спекл-картин, $N = 2500$, используемых в качестве базиса для восстановления изображений на фоне рассеяния (рис. 4c–f).

Как показывает сравнение рис. 4b и d, регуляризация с параметром $\alpha = 1$ оказывается недостаточной для адекватного подавления шумов. Уровень зашумленности получаемых в результате такой регуляризации изображений оказываются настолько высоким, что различить на этих изображениях можно лишь наиболее интенсивные из люминесцентных микрокристаллов. Увеличение параметра регуляризации до $\alpha = 10$ (рис. 4f) позволяет полностью подавить шумы. При этом оказывается возможным надежно зарегистрировать большое число люминесцентных микрокристаллов, которые хорошо различимы и на изображениях, полученных прямыми методами (рис. 4a, b) и которые были полностью скрыты за шумами на изображениях, восстановленных с параметром регуляризации $\alpha = 1$.

Сравнение рис. 4b и f, а также рис. 5a, b позволяет выявить характерные проявления обусловленной процедурой регуляризации диффузии изображений – значительную потерю пространственного разрешения и сильное размытие границ микрокристаллов на изображении, полученном путем решения обратной задачи. Уменьшение параметра регуляризации до $\alpha = 5$ позволяет существенно ослабить проявления диффузии изображений без потери устойчивости решения. Восстановленные на основе анализа картины рассеяния изображения люминесцентных микрокристаллов при этом оказываются практически идентичными изображениям, получаемыми прямыми методами (рис. 4b).

Таким образом, реализованная в настоящей работе экспериментальная схема регуляризируемого по Тихонову решения обратной задачи рассеяния представляет собой мощный ресурс лазерной микроскопии рассеивающих сред. Разработанная методика обеспечивает возможность быстрой автоматической подстройки размерности спекл-базиса для минимизации, обусловленной процедурой регуляризации диффузии изображений. На этой основе реализуется устойчивое, минимально диффузное восстановление изображений в схеме микроскопии рассеивающих сред с субмикронным пространственным разрешением.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 19-02-00473, 18-29-20031, 19-29-12062), Российского научного фонда (проект 20-12-00088), а также Министерства науки и высшего образования РФ (госконтракт 075-15-2020-801 от 9 октября 2020).

1. A. Ishimaru, *Wave Propagation and Scattering in Random Media*, Academic, N.Y. (1978).
2. S. Chandrasekhar, *Radiative Transfer*, Dover, N.Y. (1960).
3. L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov, Phys.-Uspekhi **58**, 345 (2015).

4. M. S. Pochechuev, M. A. Solotenkov, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov, J. Biophotonics **13**, e202000081 (2020).
5. Y. G. Ermakova, A. A. Lanin, I. V. Fedotov et al. (Collaboration), Nat. Commun. **8**, 15362 (2017).
6. А. В. Митрофанов, Д. А. Сидоров-Бирюков, А. А. Воронин, М. В. Рожко, П. Б. Глек, М. М. Назаров, Е. Е. Серебрянников, А. Б. Федотов, А. М. Желтиков, Письма в ЖЭТФ **113**, 304 (2021).
7. S. Popoff, G. Lerosey, M. Fink, A. Boccara, and S. Gigan, Nat. Commun. **1**, 81 (2010).
8. A. Mosk, A. Lagendijk, G. Lerosey, and M. Fink, Nat. Photon **6**, 283 (2012).
9. C. Moretti and S. Gigan, Nature Photonics **14**, 361 (2020).
10. D. Bouchet, S. Rotter, and A. P. Mosk, Nature Phys. **17**, 564 (2021).
11. G. Lerosey, J. de Rosny, A. Tourin, A. Derode, G. Montaldo, and M. Fink, Phys. Rev. Lett. **92**, 193904 (2004).
12. Z. Yaqoob, D. Psaltis, M. S. Feld, and C. Yang, Nature Photon. **2**, 110 (2008).
13. M. Pascucci, S. Ganesan, A. Tripathi, O. Katz, V. Emiliani, and M. Guillon, Nat. Commun. **10**, 1327 (2019).
14. А. Н. Тихонов, В. Я. Арсенин, *Методы решения некорректных задач*, Наука, М. (1979).
15. M. W. Doherty, N. B. Manson, P. Delaney, F. Jelezko, J. Wrachtrup, and L. C. L. Hollenberg, Phys. Rep. **528**, 1 (2013).
16. М. А. Смирнов, М. М. Миннегалиев, И. В. Федотов, С. А. Моисеев, А. М. Желтиков, Письма ЖЭТФ **113**, 3 (2021).
17. D. Li, L. Shao, B.-C. Chen, X. Zhang, M. Zhang, B. Moses, D. E. Milkie, J. R. Beach, J. A. Hammer III, M. Pasham, T. Kirchhausen, M. A. Baird, M. W. Davidson, P. Xu, and E. Betzig, Science **349**, aab3500 (2015).
18. Y. Wu and H. Shroff, Nat. Methods **15**, 1011 (2018).
19. A. Classen, X. Liu, A. M. Zheltikov, and G. S. Agarwal, Opt. Lett. **46**, 1554 (2021)
20. А. Н. Тихонов, Докл. АН СССР **151**, 501 (1963).
21. M. T. Nair, M. Hegland, and R. A. Anderssen, Math. Comput. **66**, 193 (1997).
22. G. W. Groetsch, *The Theory of Tikhonov Regularization for Fredholm Equations*, Pitman, Boston (1984).
23. В. А. Морозов, Докл. АН СССР **175**, 1225 (1967).