反射式激光共聚焦显微镜性能变尺度评价方法

王方雨[1,2],孙 强[1],戴 明[1],刘昕辉[3],王 成[4],金夕雅[5]

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所,吉林 长春 130033;
2. 中国科学院大学,北京 100049; 3. 吉林大学 机械科学与工程学院,吉林 长春 130000;
4. 吉林亚泰中科医疗器械工程技术研究院股份有限公司,吉林 长春 130000;
5. 吉林大学 中日联谊医院,吉林 长春 130000)

摘 要:为了更好地实现无创、实时、动态的皮肤层析成像,提高成像信噪比,需要对反射式激光共聚焦系统性能进行全面的评价。在此引入结构函数进行变尺度波前评价。首先对结构函数的基本数学性质进行了推导,着重分析了不同尺度的波像差在结构函数中的体现;之后,利用数值仿真对 Zernike 多项式进行了分析,验证了结构函数对低阶像差的表征能力。由于显微镜在使用时必然需要穿过皮肤组织,故在检测过程也需要考虑人体组织的影响,分析了其对系统信噪比的影响;最后,对实际显微镜系统的波前进行了分析,得到系统标校后的信噪比为 95.7 dB,验证了方法的正确性与可行性。通过变尺度评价方法,可以对无创成像系统进行更加全面的评价,并可以有效地指导类似设备的检测装调工作。

关键词:波像差; 功率谱密度; 共聚焦显微镜; 结构函数

中图分类号:TH751 **文献标志码**:A **DOI**:10.3788/IRLA201948.0317001

Study on performance variable scale evaluation method of reflection laser confocal microscopy

Wang Fangyu[1,2], Sun Qiang[1], Dai Ming[1], Liu Xinhui[3], Wang Cheng[4], Jin Xiya[5]

(1. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. College of Mechanical Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130000, China;
4. Jilin Yataizhongke Medical Equipment Engineering Technology Research Institute Company Limited by Shares, Changchun 130000, China;
5. China-Japan Friendship Hospital of Jilin University, Changchun 130000, China)

Abstract: In order to better realize non-invasive, real-time and dynamic skin tomographic imaging and improve the imaging signal-to-noise ratio (SNR), the performance of the reflective laser confocal system was evaluated comprehensively. Structure function as variable metric for wave front was introduced, and the basic mathematical properties was analyzed. The wave aberration of different scales in the structure function was analyzed emphatically. After that, the numerical simulation for low order aberration presented by Zernike polynomials was investigated. The ability of structure function to characterize low

收稿日期:2018-10-05; **修订日期**:2018-11-03

基金项目:吉林省重点科技研发项目(20180201013GX)

作者简介:王方雨(1985-),男,助理研究员,博士生,主要从事光电仪器研发方面的研究。Email:270305453@qq.com

导师简介:戴明(1965-),男,研究员,博士生导师,主要从事光学仪器设计方面的研究。Email:daim@ciomp.ac.cn

order aberrations was verified. Because confocal microscopy was required to pass through the skin, it was important to think about the effects of human tissue in the pre-test process and analyze its effects on the system′s SNR; Finally, the wavefront of the actual skin lens system was analyzed, and a SNR of 95.7 dB was obtained after system calibration, and the correctness and feasibility of the method were verified. By means of the variable scale evaluation method, the non-invasive imaging system can be evaluated more comprehensively and it can effectively guide the detection and adjustment of similar equipment.

Key words: wavefront error; power spectral density; confocal microscopy; structure function

0 引 言

由于外界环境因素与自身基因与生活习惯的影响,皮肤疾病的发生越来越普遍。当细胞形态、结构和功能发生变化,可能会发生如黑色素瘤、基底细胞癌等恶性皮肤疾病。皮肤组织病理学是诸多皮肤疾病诊断的权威标准,但存在需要活检取材的缺点,导致检测留有瘢痕[1-3]。与此同时,病理切片制作也需要大量的人力与时间成本、且制成切片后的组织细胞已经失去了原始的生理状态信息。近年来发展的皮肤镜,可以针对皮损表面进行检查,但对于深层皮肤结构却无能为力。皮肤超声虽然能对深层皮肤结构进行检测,但其图像分辨率较低,不能根据成像图来判断皮肤肿瘤的良恶性以及确定皮损的范围。

利用近红外激光实现医学无损伤诊断是目前光学工程领域的研究热点之一。基于皮肤组织内微结构对光的折射特性不同的特点,可得到明暗程度不等的灰度图像[4-7]。皮肤镜是普通相机成像的,没有深度成像,而反射式激光共聚焦显微镜是可深度成像。

利用共聚焦显微镜进行病理检测时,本质上讲,与大气内的观测设备类似,由于毛细血管与皮肤等所带来的像差与大气湍流所带来的像差在统计学上十分接近。为了更好地对反射式激光共聚焦显微镜的性能进行评价,在此引入自适应光学中的结构函数,对系统的误差进行分析分配。在此拟采用结构函数进行变尺度波前评价,以全面评价共聚焦显微镜的性能。

传统评价指标均方根(Root Mean Square,RMS)可以得到最基本的光学特征。该种评价方法却存在诸多不足:两个具有相同的表面高度均方根的光学表面,也可能具有不同的尺度的能量分布。仅依靠波前均方根是不能有效地表征其全频域的特征,故一种变尺度评价方法就显得十分必要。功率谱的评价方法是上个世纪末 NIF 所提出的,已经有了较为成熟的标准(ISO 10110)。但是,功率谱只能评价某一方向的波前起伏,对于超光滑表面来说,可以取某个方向作为评价的标准。但是对于共聚焦显微镜而言,由于成本限制以及组织的影响,其面形不必达到亚纳米级,而主要发挥作用的是较大尺度上的各项异性[8-10]。另一方面,在低频的部分,功率谱的方法由于缺乏平均来降低噪声,故其评价的效果也会受到影响。结构函数是 Fried 在 1965 年所提出来的,用以描述不同尺度下的大气湍流。从统计学本质上讲,结构函数表示的是不同尺度上的二阶中心矩[11]。

文中对于不同频域分布共聚焦显微镜误差对应的结构函数表征进行论述,分别从低阶像差,不同截止频率的组织微结构,以及高斯白噪声等角度对于变尺度评价方法进行研究。为皮肤无创成像设备的制造、装调、检测打下基础。

1 基本推导

设存在一随机过程$\{X(t),t\in T\}$,对于任意$t\in T$,$X(t)$的一阶矩$E[X(t)]$及二阶矩$E[X^2(t)]$都存在,则称$\{X(t),t\in T\}$为二阶矩过程。下面将对于结构函数$D_{\text{wav}}(\tau_x,\tau_y)$的数学表达进行分析,如公式(1)所示:

$$\begin{aligned}D_{\text{wav}}(\tau_x,\tau_y)=&\langle[W(x+\tau_x,y+\tau_y)\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)-\\&W(x,y)\Phi(x,y)]^2\rangle_{x,y}=\langle[W(x+\tau_x,y+\tau_y)\\&\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)]^2\rangle_{x,y}+\langle[W(x,y)\Phi(x,y)]^2\rangle_{x,y}-\\&2\langle W(x+\tau_x,y+\tau_y)\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)W(x,y)\Phi(x,y)\rangle_{x,y}\end{aligned}\tag{1}$$

式中:$W(x,y)$为窗函数;$\Phi(x,y)$为波前数据;x,y为两个正交方向上的位置参数;τ_x,τ_y为两个正交方向上的移动参数。

由公式(1)可以得出,结构函数主要分为两个部分:一部分由数据本身的 RMS 决定,另一部分由数

据之间的相关性决定。下面,将分析数据的相关性与结构函数之间的关系。

首先,考虑相关性最低的白噪声序列,按照白噪声序列的定义,任何两个数据都是独立同分布的,故在任意尺度上的 RMS 值都应该为一个定值。进而假设检测的数据含有白噪声 δ,对于面形检测数据进行结构函数分析,利用公式(1)可得结构函数如公式(2)所示:

$$\begin{aligned}D_{\text{wav}}(\tau_x,\tau_y)=&\langle[W(x+\tau_x,y+\tau_y)\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)-\\&W(x,y)\Phi(x,y)]^2+\delta(x,y)\rangle_{x,y}+\sigma^2=\\&\langle[W(x+\tau_x,y+\tau_y)\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)]^2\rangle_{x,y}+\\&\langle[W(x,y)\Phi(x,y)]^2\rangle_{x,y}+\sigma^2-2\langle W(x+\tau_x,y+\tau_y)\\&\Phi(x+\tau_x,y+\tau_y)W(x,y)\Phi(x,y)\rangle_{x,y}\end{aligned}\tag{2}$$

式中:$W(x,y)$为窗函数;$\Phi(x,y)$为波前数据。由公式(2)可得:当波前仅含有高斯白噪声时,得到的结构函数线只会产生整体的移动,对于白噪声本身,其结构函数接近于一个阶跃函数,之后的起伏相对较小,如图 1 所示。根据图 1 可得,对于理想平面波前,由于其评价尺度可以认为是无穷大,其结构函数为零。

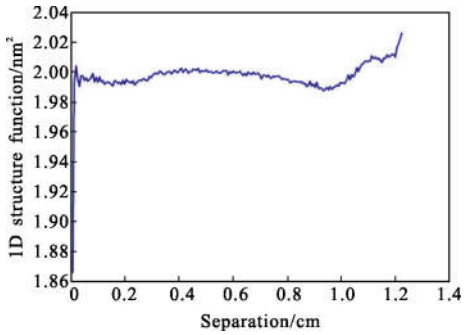

图 1 白噪声的结构函数

Fig.1 Structure function of white noise

2 数值仿真

对于介于无限长的相关长度与完全不相关之间的波像差,其理论表达式过于复杂,故采用数值模拟的方法进行分析。

首先分析用 Zernike 多项式所代表的低阶像差,图 2 中虚线部分表示的是离焦项。可见在口径一般的尺度下,系统的数据相关性有一个起伏,可以理解为边缘与中间的数据点的相关性最小。进一步考虑,如果局部有类似于离焦的突起,也可以通过结构函数上的极值点获得“印透峰”尺寸,完成变尺度评价。一般来说以 RMS 作为评判标准的系统,其误差合成方法如公式(3)所示:

$$\text{RMS}_T^2=\Sigma\,\text{RMS}_i^2\tag{3}$$

式中:RMS_T 表示系统总的 RMS;RMS_i 表示各部件的 RMS。结合公式(3),由于高频误差与低阶误差的相关性较低,故忽略交叉项,结构函数也服从类似的合成方法,如公式(4)所示:

$$\sigma_{\text{slo_}T}^2=\Sigma\,\sigma_{\text{slo_}i}^2\tag{4}$$

式中:$\sigma_{\text{slo_}T}$ 表示系统总的结构函数,而 $\sigma_{\text{slo_}i}$ 表示各部件的结构函数。故图 2 中结果显现出相加的效果,即可以通过简单的加减运算,获得合成后的结构函数。

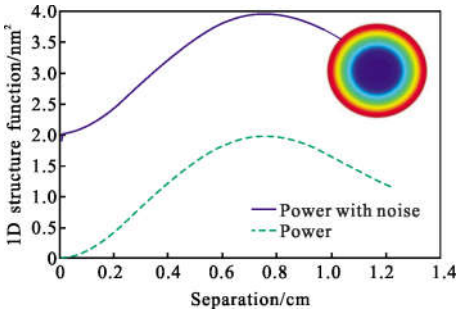

图 2 离焦项的结构函数

Fig.2 Structure function of power

从皮肤的结构上来看,皮肤色素一般形成于皮肤表面以下 100 μm 左右的皮肤基底层中,同时也是皮肤癌症的发源层。所以,要实现皮肤病变的早期诊断,须通过皮肤组织实现在体深度三维功能成像。由于共聚焦显微镜在使用时必然需要穿过皮肤组织,在前期的检测过程中,如果忽视人体组织的影响,必然会对系统性能的估计造成影响。根据冻结湍流假设,假设由人体组织所引入的像差为二维宽平稳过程,从功率谱的角度考虑,可通过不同的功率谱反演得到模拟波前验证变尺度的评价方法。

在此需要架设不同皮肤组织的相关长度与波前的质量。组织的相关长度由不同的截止频率对应人体组织影响的强度,由功率谱幅值 A 决定。在考虑功率谱参数时,既可以利用 Kolmogorov 谱,由统计规律给出;也可以根据实际的情况的稳态增益与截止频率如公式(5)所示:

$$\Phi(x,y)=\frac{A}{\Delta x\Delta y}\text{IFFT}[\text{e}^{i\phi(m,n)}\sqrt{S\times\text{PSD}(m,n)}]\tag{5}$$

式中：$\Delta x\Delta y$ 为两个方向的取样间隔；$\phi(m,n)$为服从正态分布的相位矩阵；S 为孔径面积。不同相关长度皮肤组织的结构函数如图 3 所示。可见，不同的组织所对应的特征尺度不同，在检测的过程中，应该将系统在这些尺度上的误差提前进行抑制，以保证足够的动态范围。

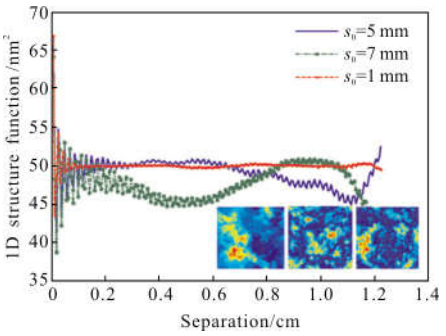

图 3 数值仿真波前结构函数

Fig.3 Structure function of numeral wavefront

结构函数作为共聚焦显微镜的二阶统计矩，可以很好地表征误差的统计学特征。

$$\langle\exp(aW)\rangle=\exp\left[a\langle W\rangle+\frac{1}{2}a^2\langle|W-\langle W\rangle|^2\rangle\right] \tag{6}$$

式中：W 为波前数据；a 为系数，为了简化计算，令$\vec{r}+\gamma\vec{f}=(x+\tau_x,y+\tau_y)$。$\vec{r}$为位置向量，$\vec{f}$为移动方向向量；$\gamma$ 为移动步长。

自相关系数可以表征随机过程的自身的统计学特性，为了评估不同尺度下共聚焦显微镜的成像质量，需要对各个尺度下的系相关系数进行计算，根据定义得到的自相关系数如公式(7)所示：

$$\begin{aligned}\langle C_{\rm col}\rangle=\langle\exp(&\iint_{A(f_x,f_y)}\exp iW(\vec{r})\Phi(\vec{r})\exp iW(\vec{r}+\gamma\vec{f})\\&\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})\mathrm{d}\vec{r}-\langle W(\vec{r})\Phi(\vec{r})\rangle^2)\rangle=\\&\exp\left[-\frac{1}{2}\langle|W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})|^2\rangle\right]\end{aligned} \tag{7}$$

式中：$W(\vec{r})$为窗函数；$\Phi(\vec{r})$为波前数据。利用波前结构函数的定义，重新表达公式(1)如公式(8)所示：

$$D_{\rm wav}(\gamma\vec{f})=\langle|W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})|^2\rangle \tag{8}$$

结合公式(7)与公式(8)，可以得到所得数值仿真图像波前，在不同的评价尺度下，其相关系数如公式(9)所示：

$$\langle C_{\rm col}(\gamma\vec{f})\rangle=\exp\left(-\frac{1}{2}D_{\rm wav}(\gamma\vec{f})\right) \tag{9}$$

由于皮肤组织内微结构(如黑素、含氧血红蛋白及细胞器等)对光的折射率等光学特性的不同，而呈现明暗程度不等的图像。不同评价尺度下的相关性如图 4 所示。同一组织结构相关性是要远远好于组织与背景间的。通过对波前的相关性进行研究，可以估计得到评价不同组织合理的尺度。

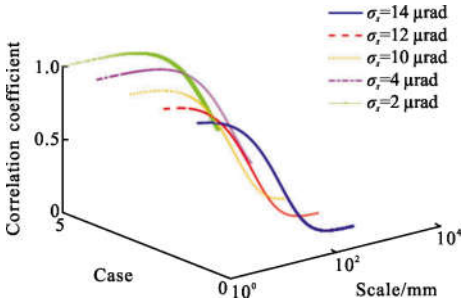

图 4 不同评价尺度下的相关性

Fig.4 Correlation between different evaluation scales

信噪比是共聚焦显微镜检测重要的评价指标。影响信噪比的主要因素为积分时间与本身波前的质量，系统采用了多次平均采样技术，由于激光穿透一定组织深度后的反射信号较弱，较强扰动下，系统信噪比如公式(10)所示：

$$\mathrm{SNR}=\frac{\langle|W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})|\rangle}{\sqrt{\mathrm{Var}[W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})]^2}} \tag{10}$$

$$\langle|W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})|\rangle^2=\begin{cases}\gamma^2\sigma_{\rm slo}^2 & \gamma<r_0\\ [[\gamma^2(\gamma/R)^{-\frac{5}{3}}+r_0^2-r_0^2(r_0/R)^{-\frac{5}{3}}]]\sigma_{\rm slo}^2 & \gamma\geqslant r_0\end{cases} \tag{11}$$

式中：R 为波前半径，设为 100 mm。

$$\mathrm{Var}[W(\vec{r})\Phi(\vec{r})-W(\vec{r}+\gamma\vec{f})\Phi(\vec{r}+\gamma\vec{f})]=\begin{cases}D_{\rm wav}(\gamma\vec{f})-\gamma^2\sigma_{\rm slo}^2 & \gamma<r_0\\ D_{\rm wav}(\gamma\vec{f})-[\gamma^2(\gamma/R)^{-\frac{5}{3}}+r_0^2-r_0^2(r_0/R)^{-\frac{5}{3}}]\sigma_{\rm slo}^2 & \gamma\geqslant r_0\end{cases} \tag{12}$$

其中，波前高差的期望可以与斜率均方根产生联系，r_0 为皮肤组织的相关长度，用于表征不同的组织，而所获得波前的斜率均方根用以表达不同的检测条件，当检测条件较差时，所得到波前的斜率均方根也会相应增加。信噪比趋势如图 5 所示，可以根据不同

检测条件与不同皮肤组织即所检测对象的特征，合理地评价共聚焦显微镜性能。

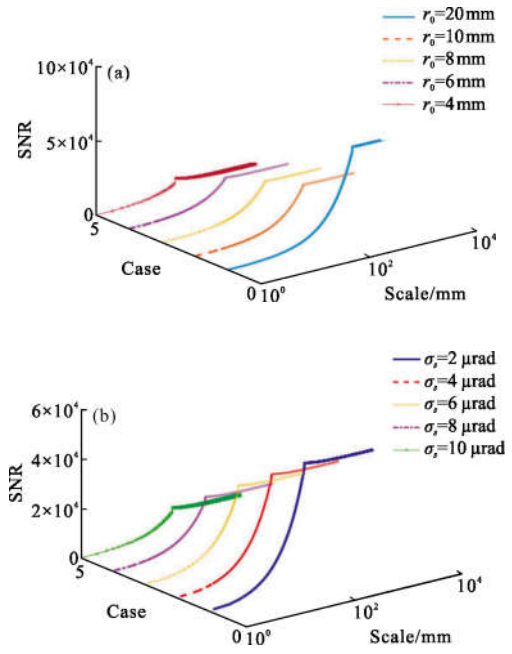

图 5 (a)不同检测条件下的检测信噪比；(b)不同皮肤组织下的检测信噪比

Fig.5 (a) Detection of SNR under different detection conditions; (b) Detection of SNR under different skin tissues

3 实验验证

系统主要包括激光器、扫描偏摆镜单元、扫描透镜、物镜、Z 轴驱动器、雪崩二极管、针孔、控制器等部件。激光器的工作波长为 830 nm；扫描偏摆镜单元包括 x、y 两个扫描偏摆镜，x 扫描偏摆镜为共振镜。实际系统的结构如图 6 所示。

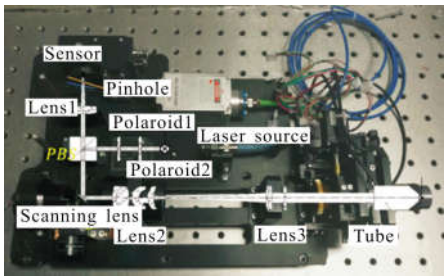

图 6 共聚焦显微镜实际系统的结构

Fig.6 Structure of confocal microscopy

在出射镜头前安放平面反射镜，以此评价系统本身所存在的误差。其结构函数如图 7 所示。由图 7 可以得出，在 6 mm 左右具有一个较为明显的起伏，同时，系统在原点的上升不明显，可以说明系统的波像差是以低阶起伏为主导。

将低阶 Zernike 项去掉之后的面形数据与结构函数如图 8 所示。由该结构函数可得，还有一个4 mm 量级的起伏，12 mm 处的起伏为数据边界引起的变化。理想的结果应该没有明显的突起，而在原点处有一个类似于台阶的特征，根据之前的分析，为系统的噪声所导致的，计算得到系统标校后的信噪比为 95.7 dB。

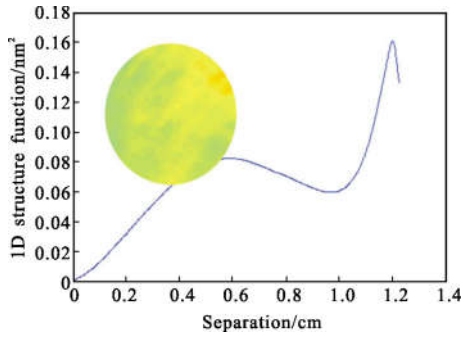

图 7 波前的结构函数

Fig.7 Structure function of the wavefront

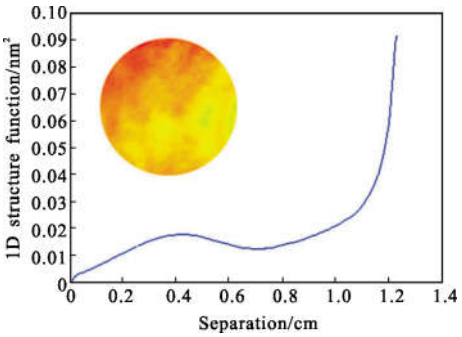

图 8 系统高阶面形及其结构函数

Fig.8 High order surface figure and the structure function of the system

4 结 论

皮肤科临床的发展需要无创、原位、实时、动态的检测方法，对可疑皮损进行重复检查，提供客观量化的评价指标。常规评估皮肤反射式共聚焦显微镜成像质量主要通过对分辨率板进行成像，测量成像的分辨率和信噪比等指标，文中采用一种新的评价成像质量方法，引入自适应光学中的结构函数概念，对于不同频域分布共聚焦显微镜误差对应的结构函

数表征进行论述,分别从低阶像差,不同截止频率的组织微结构, 以及高斯白噪声等角度对于变尺度评价方法进行研究。另一方面,由于结构函数的平方特性,其合成与分离也有着先天的优势,在系统装调的过程中,可以通过装调判断系统的特征起伏。在共聚焦显微镜的使用过程中, 可以在后续处理中去除系统误差的影响。

参考文献:

[1] Nikolakis G, Makrantonaki E, Zouboulis C C, et al. Skin mirrors human aging [J]. ***Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation***, 2013, 16(1): 13-28.

[2] Helmchen C, Palzer C, Munte T F, et al. Itch relief by mirror scratching. A psychophysical study [J]. ***PLOS ONE***, 2013, 8(12): e82756.

[3] Shi Qingxuan, Wang Bin, Wang Peng, et al. Comparison and analysis for seismic performance of RC shear wall with flanges under biaxial loading [J]. ***Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)***, 2013, 41(4): 712-716. (in Chinese)

[4] Shi Yali, Tao Xian, Zhou Xinda, et al. An online laser-induced flaw inspection device for optical elements [J]. ***Infrared and Laser Engineering***, 2018, 47(4): 0417003. (in Chinese)

[5] Wang Yuchun, Sun Heyi, Tang Wenyan, et al. Angle subdivision approach algorithm for conicoid profile error evaluation [J]. ***Optics and Precision Engineering***, 2014, 22 (6): 1606-1612. (in Chinese)

[6] Ross Zhelem. Specification of optical surface accuracy using the structure function[C]//SPIE, 2011, 8083: 808310.

[7] Shi Tu, Yang Yongying, Zhang Lei, et al. Surface testing methods of aspheric optical elements [J]. ***Chinese Optics***, 2014, 7(1): 26-46. (in Chinese)

[8] Xie Jin, Liu Xuran, Wu Keke, et al. Adaptive-orientation measurement and micro-machining accuracy of micro-ground pyramid-structured smooth surface [J]. ***Optics and Precision Engineering***, 2014, 22(2): 376-382. (in Chinese)

[9] Wang Xiaokun. Fabrication and testing of large aperture off-axis SIC aspheric mirror [J]. ***Laser & Optoelectrics Process***, 2011, 49(1): 011201. (in Chinese)

[10] Liu Na, Shen Zhengxiang, Ma Bin, et al. Figure error approximate Wolter-I X-ray type telescope[J]. ***Infrared and Laser Engineering***, 2018, 47(4): 0417001. (in Chinese)

[11] Xu Yang, Tang Feng, Wang Xiangchao, et al. Measurement error analysis of absolute flatness test[J]. ***Chinese Journal of Lasers***, 2011, 38(10): 1008009. (in Chinese)