

利用深度学习扩展双光子成像视场

李迟件^{1,2}, 姚靖^{2,3,4}, 高玉峰², 赖溥祥^{3,4}, 何悦之^{2***}, 齐苏敏^{1**}, 郑炜^{2*}¹曲阜师范大学网络空间安全学院, 山东 济宁 273100;²中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究中心, 广东 深圳 518055;³香港理工大学生物医学工程系, 香港 999077;⁴香港理工大学深圳研究院, 广东 深圳 518055

摘要 双光子成像技术已被广泛应用于活体肿瘤成像、神经功能成像以及大脑疾病研究等领域,但双光子成像视场较小(视场直径一般在 1 mm 以内),限制了其进一步应用。虽然通过特殊的光学设计或者自适应光学技术能够有效增大视场,但复杂的光路设计、高昂的器件成本以及繁琐的操作过程限制了这些技术的推广。提出了一种利用深度学习技术替代自适应光学技术扩展双光子成像视场的新思路,在低成本(无须特殊物镜,无须相位补偿装置)、易操作的前提下实现了大视场双光子成像。设计了一种适用于光学显微系统中扩展双光子成像视场的 nBRANet 网络框架,为使该网络框架可以更好地利用特征图信息,在该框架中引入残差模块和空间注意力机制,同时去除了数据归一化处理,以增加图像对比度信息。实验结果表明:所提深度学习方法可以有效地代替自适应光学技术,增强扩展视场中的精细结构特征,并恢复扩展视场的成像分辨率和信噪比,使双光子成像视场直径扩展到 3.46 mm,峰值信噪比超过 27 dB。深度学习方法具有成本低、操作简单、图像增强效果显著等特点,有望为跨区域脑成像或全脑成像提供一种经济实用的方案。

关键词 显微; 深度学习; 自适应光学; 大视场; 双光子成像

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221433

1 引言

双光子显微镜(TPM)具有成像分辨率高、深度大、三维层析能力强等成像特性,可为生物医学研究提供关键的高分辨三维信息,已被广泛应用于生物医学成像领域。然而,传统的双光子显微镜成像视场(FOV)有限,视场直径通常在 1 mm 以内^[1-3],限制了其在更广泛的生物医学研究中的应用,如,双光子显微镜不能动态监测哺乳动物大脑中的跨区域神经元活动和全脑的血细胞活动^[4-6]。因此,拓展双光子显微镜的成像视场一直是显微成像领域研究的难点和热点。

针对上述问题,研究人员尝试采用多种方法来提高双光子显微镜的成像视场,如:通过设计特殊的扫描中继系统^[7]来减小大角度扫描引起的离轴像差,从而极大地优化大视场双光子成像系统的成像性能。此外,成像物镜也是限制视场进一步增大^[8-10]的关键因素,通过自制高通量物镜^[11-12]可以实现更大的成像视场。以上方法都可以有效地扩展成像视场,但较高实现难度、较大成本的光学设计严重制约了这些方法在

生物医学研究领域的推广。近期,笔者团队^[13]提出了一种通过自适应光学(AO)技术^[14-18]增加成像物镜可用视场的新方法,该方法基于现有商业显微物镜在超过标定视场区域有信号但光学畸变严重这一特性,利用自适应光学技术分块补偿光学畸变,将商业物镜(XLPLN10XSVM, Olympus, 10×, NA=0.6)的有效成像视场直径从标定的 1.8 mm 扩展至 3.46 mm,同时在全视场内保持了高分辨率和高信噪比成像。但是该方法需要在光学系统中增加相位补偿器件(空间光调制器),这无疑增加了成像系统的光路复杂性与硬件成本,从而限制了该方法的进一步应用。

利用计算机进行图像分辨率和对比度的提升是一种有效的降低硬件成本的方法。近年来,深度学习技术在图像处理方面发展迅速,已在图像恢复、超分辨率成像^[19-23]、荧光显微图像重建^[24-31]等领域得到了广泛应用。2021年,Zheng等^[32]建立了前15项Zernike模式的系数与其对应的畸变模式之间的映射关系,通过卷积神经网络对光学像差引起的成像畸变进行了校正。2020年,Krishnan等^[33]提出了一种深度学习方法,该方

收稿日期: 2022-11-18; 修回日期: 2023-02-07; 录用日期: 2023-02-16; 网络首发日期: 2023-02-26

基金项目: 国家自然科学基金(81927803, 81930048)、香港 Research Grant Council (RGC) (15217721)、深圳市科技计划基础研究项目(RCJC20200714114433058, ZDSY20130401165820357)

通信作者: *zhengwei@siat.ac.cn; **qixm@qfnu.edu.cn; ***yz.he@siat.ac.cn

法通过联合 Zernike 系数估计、点扩散函数估计和盲解卷积训练的卷积神经网络(CNN)从 3 个相位差异图像中恢复无像差图像。2021 年, Hu 课题组^[34]采用一种结合像差先验知识的尺度循环像差校正网络(SRACNet)来增强荧光显微镜图像, 并提出了一种数据集生成策略, 改善了数据集问题, 实现了无须使用额外硬件的像差校正。以上研究主要利用深度学习结合自适应光学来提升成像分辨率, 极大地降低了自适应光学技术的难度和成本。目前, 利用深度学习技术代替自适应光学技术来扩展双光子成像视场的相关研究还未见公开报道。

本文提出了一种利用深度学习替代自适应光学相位补偿从而扩展双光子成像视场的新方法, 该方法是对本团队近期发展的基于自适应光学技术扩展物镜有效视场方法的一次新改进^[13]。该方法无须使用复杂的自适应光学元件进行像差校正, 而且利用深度学习替代本团队近期所提方法中用硬件实现的

自适应光学补偿, 不仅降低了系统成本, 实现了无须硬件自适应光学补偿的大视场成像, 还提高了系统的便捷性。在本实验中, 笔者设计了一种 nBRAnet 网络框架, 该框架可以高效、便捷地增强双光子扩展视场的分辨率。采用直径为 $1\ \mu\text{m}$ 的荧光小球、Thy1-GFP 小鼠脑切片、CX3CR1-GFP 小鼠脑切片等样品的成像结果对所提网络进行训练和测试。实验结果表明: 所提网络可以快速输出扩展视场的高分辨率图像, 无论是分辨率还是荧光强度, 都能恢复到近似无像差时的水平, 即接近硬件自适应光学校正之后的结果。

2 方法与原理

2.1 拓展成像视场的原理

通常, 商用物镜都有一个厂商标定的成像视场[如图 1(a)所示], 在该标定成像视场范围内, 物镜的像差可以忽略, 成像质量较好; 超过标定视场后[如图 1(a)

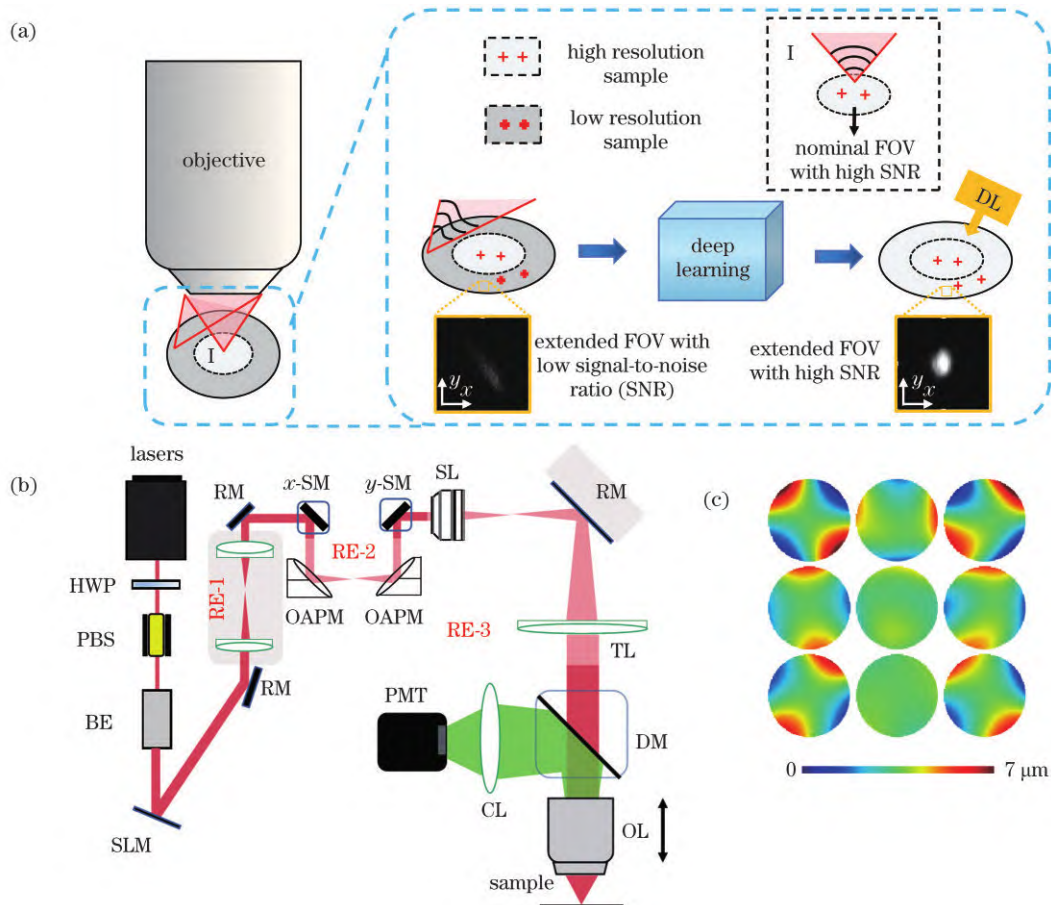


图 1 光学系统及成像原理。(a)深度学习扩展双光子显微镜可用视场的原理图;(b)大视场双光子显微镜系统示意图(HWP:半波片;PBS:偏振分光棱镜;PMT:光电倍增管;RM:反射镜;BE:扩束器;SLM:空间光调制器;OAPM:离轴抛物面反射镜;SM:扫描振镜;SL:扫描透镜;TL:管透镜;DM:二向色镜;OL:物镜;CL:收集透镜);(c)测量得到的 3×3 个子区域的波前面

Fig. 1 Optical systems and imaging principle. (a) Principle of extending field-of-view (FOV) of two-photon microscopy (TPM) using deep learning; (b) schematic of TPM system with large FOV (HWP: half wave plate; PBS: polarization splitting prism; PMT: photomultiplier; RM: reflective mirror; BE: beam expander; SLM: spatial light modulator; OAPM: off-axis parabolic mirror; SM: scan mirror; SL: scan lens; TL: tube lens; DM: dichroic mirror; OL: objective lens; CL: collective lens); (c) measured distort wavefronts of 3×3 subregions

扩展视场处],物镜的像差会急剧增大,双光子成像质量会严重劣化。所以,通常所说的物镜成像视场即为标定视场。笔者团队^[13]通过自适应光学方法使扩展视场的成像质量与信噪比均接近于标定视场区域,成功拓展了大视场物镜的可用视场。

扩展成像视场的原理如图 1(a)所示。本团队之前提出的基于自适应光学扩展物镜可用视场的方法通过自适应光学器件来测量扩展视场区域的大离轴像差并对其进行补偿。无论是光学像差的测量还是补偿,该方法均需要通过自适应光学器件来实现。本文所提方法通过采集扩展视场自适应光学校正前后的数据并使用本文所提改进网络框架进行训练,无须使用自适应光学相位补偿装置进行像差校正便可得到近似无像差的图像。在本工作中,自适应光学器件仅用来测量扩展视场区域物镜引起的大离轴像差以及采集训练数据。网络训练结束后,系统便不再需要使用自适应光学器件。

2.2 光学系统介绍与像差获取

本文使用的大视场双光子显微系统如图 1(b)所示。钛蓝宝石激光器(700~1000 nm 可调,Chameleon Ultra II, Coherent)出射的激光通过双胶合透镜扩束,然后由三组中继镜实现光学共轭。激光依次通过检流计、X 扫描振镜、Y 扫描振镜和物镜(XPLL N10XSVM P, Olympus),最终在样品面聚焦激发荧光。在样品面激发的荧光由同一个物镜收集,然后通过二向分光镜反射至收集透镜并由光电倍增管收集。使用 National Instruments 公司的数据采集卡(PCI-6110)进行系统的控制与同步。

采用间接波前检测中的模式法^[15]实现像差测量和校正。模式法的原理是:将波前畸变表示为一系列正交多项式之和,对每种模式像差进行单独校正。该方法常用 Zernike 多项式来表示基本像差模式,Zernike 多项式是定义在单位圆上且满足正交的多项式序列^[33]。表 1 列出了本文应用的 Zernike 多项式,其中 r 表示径向坐标, θ 表示角度坐标。

考虑到整个大视场中像差分布不均匀,因此将整个视场区域分为 3×3 个子区域,进行分区校正。对于每一个子区域,测量前已调整物镜的校正环,以最小化系统引入的球差。第 1 个 Zernike 模式(Piston)表示穿过光瞳的波前的平均值,对光斑没有影响;第 2 个和第 3 个 Zernike 模式(Tip 和 Til)引起了二维焦平面上的空间运动,但不影响分辨率或信号强度。所以,本文使用 Zernike 多项式的第 5~15 项进行像差计算。每个分区的各项最优系数的测量方法一致:从第 5 项开始依次测量每一项的最优系数,测量过程中将前一项的最优系数作为下一项系数测量的基准。考虑到扩展视场有较大的离轴像差,因此先单独确定每块区域中的像散对应的 Zernike 系数,即:将系数从 -20 改变为 20,间隔为 0.5,使用 SLM 连续加载对应的波前,并对激发荧

表 1 本文所用各项 Zernike 多项式

Table 1 Applied Zernike polynomials

Index (i)	m	n	Zernike polynomial Z_i	Name
1	2	2	$\sqrt{6} r^2 \cos(2\theta)$	1st, 45°, astigmatism
2	2	-2	$\sqrt{6} r^2 \sin(2\theta)$	1st, 0°, astigmatism
3	3	3	$2\sqrt{2} r^3 \cos(3\theta)$	Trefoil
4	3	1	$2\sqrt{2} (3r^2 - 2r) \cos \theta$	Coma X
5	3	-1	$2\sqrt{2} (3r^2 - 2r) \sin \theta$	Coma Y
6	3	-3	$2\sqrt{2} r^3 \sin(3\theta)$	Trefoil
7	4	4	$\sqrt{10} r^4 \cos(4\theta)$	Quadrafoil
8	4	2	$\sqrt{10} (4r^4 - 3r^2) \cos(2\theta)$	2nd, 45°, astigmatism
9	4	-2	$\sqrt{10} (4r^4 - 3r^2) \sin(2\theta)$	2nd, 0°, astigmatism
10	4	4	$\sqrt{10} r^4 \cos(4\theta)$	Quadrafoil

光均匀片产生的双光子图像进行采集,对每幅图的平均光强进行拟合和搜索,得到最大值对应的系数值即为所求的像散系数。对于该区域其他被应用的 Zernike 多项式,将系数从 -3 改变为 3,间隔为 0.5,同样通过采集双光子图像得到最佳系数。最终所有阶数的 Zernike 像差模式的线性叠加即为相应分区的整体像差。以上步骤重复测量三次后取平均,以保证测量准确度。每块分区对应的波前面如图 1(c)所示。

2.3 数据准备

数据支撑^[27]是深度学习中图像复原任务的最核心问题之一。数据集的匹配程度决定了神经网络的可靠性,为此本文作出了两方面改进:1) 提高信噪比。由于单次测量信噪比不足,所以对每组校正前后的图像各采集 3 张,并通过平均图像的灰度值来提高图像的信噪比。2) 匹配图像的三维位置。原始图像在自适应光学校正前后会有轻微的像素不匹配,因此,本文将自适应光学校正前的图像作为参照,通过配准算法对自适应光学校正后的图像进行 X 和 Y 方向的配准,将配准后的有效数据尺寸裁剪为 1000 pixel \times 1000 pixel。

本文中的训练数据集均由图 1(b)所示系统采集,包括荧光小球和离体生物样品在自适应光学校正前后的成像结果。荧光小球凝胶样品是通过将 1 μ L 荧光小球(F8852, Thermo Fisher)与 1 mL 体积分数为 1% 的琼脂糖水溶液混合制得的,单个小球的直径为 1 μ m。离体生物样品分别为 1 mm 厚的 Thy1-GFP 小鼠脑切片和 CX3CR1-GFP 小鼠脑切片。数据集的制备过程主要包括两部分:一是图像采集,通过手动调整水平位移台获取多组自适应光学校正前的显微图像,再通过自适应光学补偿得到对应的自适应光学校正后的图像;二是通过裁剪、平移等方法扩充数据集。实际采集荧光小球样品图像 50 张,图像尺寸为 1000 pixel \times 1000 pixel,扩充

后用于训练的数据集为 25600 张图像(每张训练图像的尺寸为 $32 \text{ pixel} \times 32 \text{ pixel}$); Thy1-GFP 样品与 CX3CR1-GFP 样品图像均采集 30 张, 图像尺寸为 $1000 \text{ pixel} \times 1000 \text{ pixel}$, 扩充后用于训练的数据集均为 16000 张尺寸为 $32 \text{ pixel} \times 32 \text{ pixel}$ 的图像。在本光学系统中, $1 \text{ pixel} = 0.2981 \mu\text{m}$ 。

2.4 nBRANet 网络结构

本实验采用的基于 U-Net 改进的 nBRANet 网络如图 2 所示。该网络采用 U 型对称结构, 保留了 U-Net 模型的多个跳跃连接结构, 同时, 利用 Attention Gate 通过跳跃连接传播特征, 目的是改善梯度消失的问题, 并重复利用编码过程中提取的特征。编码器模块共有 3 层, 每个编码层都是残差结构, 包括 2 个卷积运算和 2 个 ReLu 层。在下采样过程中采用最大池化方法取 2×2 区域的最大值, 以降低特征参数尺度(特征大小减半); 在解码器模块中, 通过 3 个上采样块逐步将特征映射恢复到与输入图像相同大小。每个上采样块包括一个上采样层、一个卷积运算和一个 ReLu 层。所有卷积层和反卷积层的卷积核大小均为 3×3 , 输出结果的最后一层是 1×1 卷积层。上采样和下采

样的滑动步长均为 2。除最后一层外, 其余每层均使用 ReLu 激活函数, 以防止过拟合。

考虑到网络深度会导致训练困难的问题, 本工作在 U-Net 网络框架^[35]的基础上引入残差结构^[36] [如图 2(b) 所示], 以缓解反向传播造成的梯度爆炸和梯度消失, 提高网络的精准度和精度。同时, 为了进一步增强网络性能, 引入了轻量级的空间注意力机制^[37] [如图 2(e) 所示], 在生成特征图时引用底层特征和高层特征, 使网络能选择性地强化有用的特征信息, 同时抑制无用的特征信息。CNN 网络的输入和输出有着十分相似的空间分布, 而网络结构中的批归一化(BN)^[38] 结构白化中间特征的方式, 完全破坏了原始空间的表征, 即破坏了图像原本的对比度信息。鉴于此, 通过荧光小球和生物样品的消融实验来验证 BN 结构对本工作的影响。实验结果如表 2 所示, 可见, 与保留 BN 结构相比, 在同等条件下, 移除 BN 结构后扩展视场输出图像的峰值信噪比(PSNR)更高。因此, 实验中移除了所有卷积块中的 BN 层, 以增强网络输出的图像质量。所构建的 nBRANet 体系结构如图 2 所示。相关代码已开源^[39]。

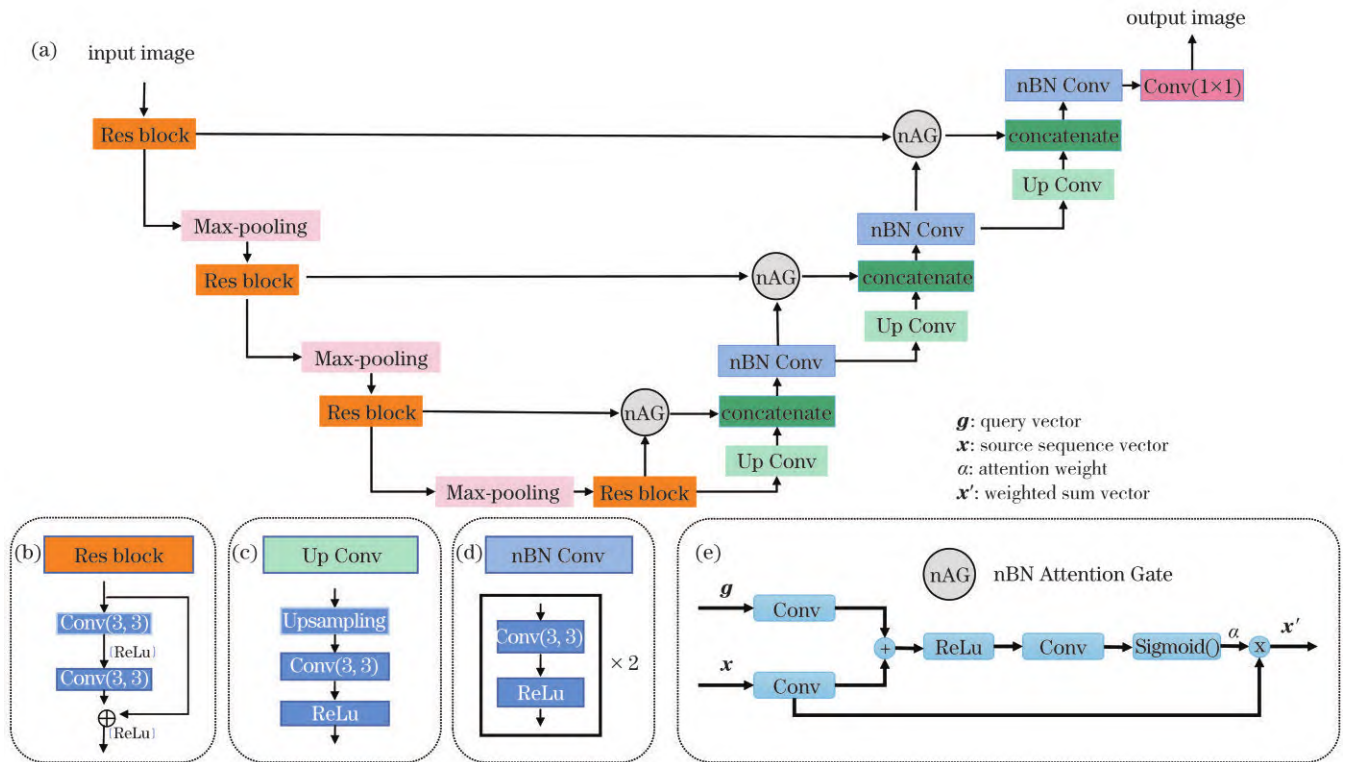


图 2 本文提出的 nBRANet 网络结构。(a)改进的 3 层网络结构;(b)残差结构示意图;(c)上采样结构块;(d)改进的卷积块;(e)改进的 Attention Gate 结构

Fig. 2 Proposed nBRANet network structure. (a) Improved three-layer network structure; (b) schematic of residual structure; (c) upsampling structure block; (d) improved convolution block structure; (e) improved Attention Gate structure

2.5 网络训练设置

神经网络的训练在 Windows 环境下进行, 采用 PyTorch(Python3.7)编写代码, 使用 MATLAB 代码处理图片。实验在桌面工作站(Intel Xeon E5-2620 v4

CPU, NVIDIA TITAN Xp)上进行。数据集由荧光小球和离体生物样品经自适应光学校正前后的显微图像构成, 网络模型输入图像和输出图像的尺寸均为 $1000 \text{ pixel} \times 1000 \text{ pixel}$ 。分别取数据集的 95% 和 5%

表 2 验证 BN 结构影响的消融实验的结果

Table 2 Results from ablation experiments for verifying BN structure's effect

Sample	BN or nBN	Epoch	Quantity of training set	PSNR /dB
Fluorescent beads	BN	150	25600	40.22
	nBN	150	25600	40.39
Thy1-GFP	BN	200	16000	26.93
	nBN	200	16000	27.79
CX3CR1-GFP	BN	200	16000	30.53
	nBN	200	16000	31.37

Notes: nBN denotes removing BN structure.

用作训练集和测试集。利用网络输出与标签之间的均方误差(MSE)作为损失函数来训练模型,同时利用反向传播算法 Adam 来优化网络,初始学习速率为 1×10^{-4} 。网络模型的参数总量为 3.558×10^7 。

3 结果与讨论

3.1 荧光小球实验结果

为了定量评估网络的输出结果,使用峰值信噪比(PSNR)作为评价指标。PSNR 是一种衡量图像质量的指标,常被用作图像降噪领域信号重建质量的重要指标,其值越高说明重建结果越好。

首先,使用荧光小球仿体样品验证深度学习方法可用于扩展双光子成像视场。图 3(a)为大视场双光子系统采集的视场为 $2.45 \text{ mm} \times 2.45 \text{ mm}$ 的全视场荧

光小球图像。图 3(a)中的 I 和 II 区域分别为物镜的标定视场与扩展视场的子区域,从中分别选取部分小球进行具体分析。图 3(b)~(d)分别为标定视场中子区域的自适应光学校正前后的结果以及网络输出结果,恢复后的图像的峰值信噪比由原来的 38.71 dB 提升到 40.45 dB。图 3(h)为 I 区域的强度对比。可以看出,通过网络学习,标定视场区域的分辨率可恢复到校正后的水平。图 3(e)~(g)分别为扩展视场中子区域的自适应光学校正前后的结果以及网络输出结果,恢复后的图像的峰值信噪比由原来的 33.26 dB 提升到 40.39 dB。图 3(i)为 II 区域的强度对比。由于扩展视场部分有较大的离轴像差,自适应光学校正前后的小球形状、荧光强度均具有较大差异。经本文所提网络学习、输出后,无论是分辨率还是荧光强度,都能恢复

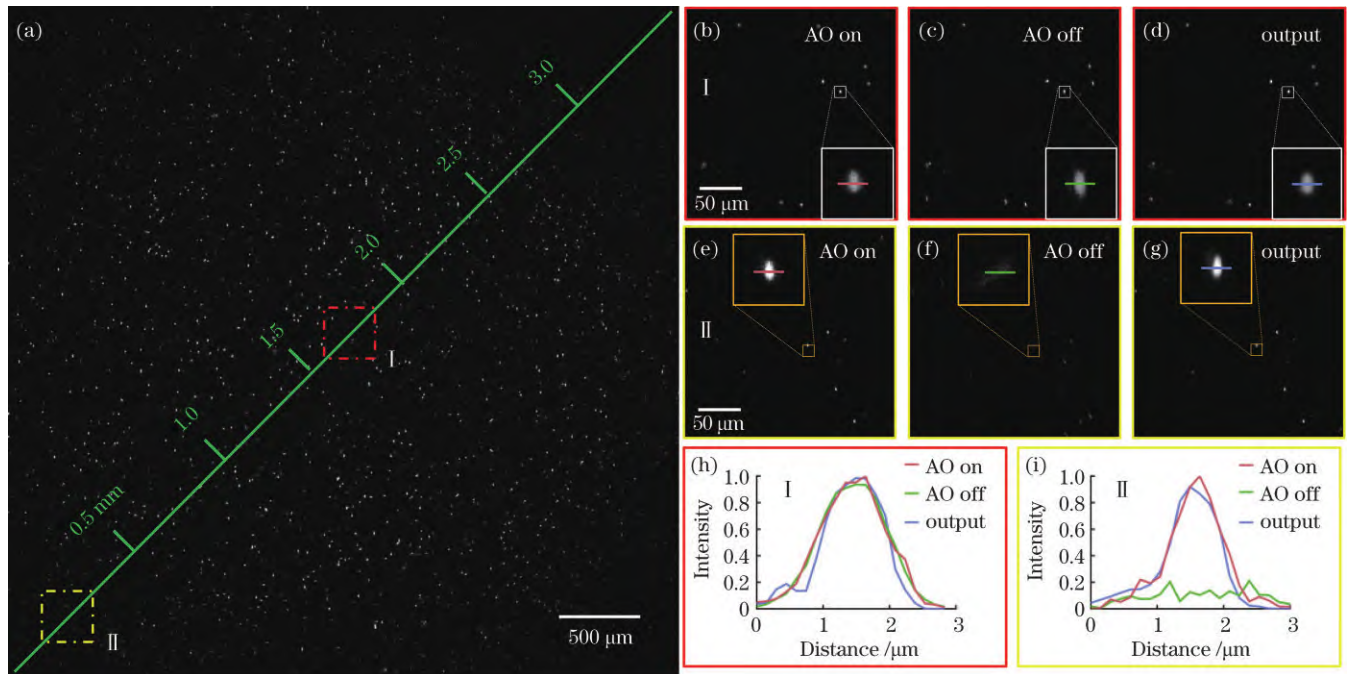


图 3 直径为 $1 \mu\text{m}$ 的荧光小球的大视场成像结果。(a)全视场荧光小球图像,视场尺寸为 $2.45 \text{ mm} \times 2.45 \text{ mm}$; (b)~(d)标定区域经自适应光学校正前后的图像以及网络模型学习得到的图像; (e)~(g)扩展区域经自适应光学校正前后的图像以及网络模型学习得到的图像; (h) I 区域的强度曲线; (i) II 区域的强度曲线

Fig. 3 Large FOV imaging of fluorescent beads with diameter of $1 \mu\text{m}$. (a) Image of fluorescent beads with the FOV of $2.45 \text{ mm} \times 2.45 \text{ mm}$; (b)~(d) images with and without adaptive optics (AO) correction as well as obtained by network model learning in nominal FOV; (e)~(g) images with and without AO correction as well as obtained by network model learning in extended FOV; (h) intensity profiles of region I; (i) intensity profiles of region II

到几乎无像差时的水平,即接近硬件自适应光学校正之后的水平。荧光小球的实验结果表明,无论是在像差较小的标定视场区域,还是在具有较大离轴像差的扩展视场区域,本文所提网络均能较好地校正畸变的图像。由此证明了深度学习技术可以替代硬件自适应光学像差校正技术扩展成像视场并实现畸变图像的校正。

3.2 生物样品实验结果

为了进一步评估深度学习对双光子显微镜视场扩展的可行性,将本文所提网络应用于不同离体生物样品的成像实验中。脑科学研究是大视场双光子显微镜应用的重要领域,所以优先选择 Thy1-GFP 小鼠脑片进

行成像分析。图 4(a)是使用双光子显微镜采集的视场尺寸为 $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$ 的 Thy1-GFP 小鼠的大脑图像。随机选取扩展视场的感兴趣区域(ROI 区域,尺寸为 $1000\text{ pixel} \times 1000\text{ pixel}$)放入模型中进行学习验证。图 4(b)~(d)分别为 Thy1-GFP 小鼠大脑图像扩展视场中的虚线框区域在自适应光学校正前后的图像以及网络输出图像,经算法恢复后的图像的峰值信噪比由原来的 23.76 dB 提升到 27.79 dB。图 4(e)为放大区域 1 中划线位置的强度对比,图 4(f)为放大区域 2 中划线位置的强度对比。结果表明,本文改进的网络框架可将 Thy1-GFP 样品扩展视场区域的分辨率和信噪比恢复至接近硬件自适应光学校正之后的结果。

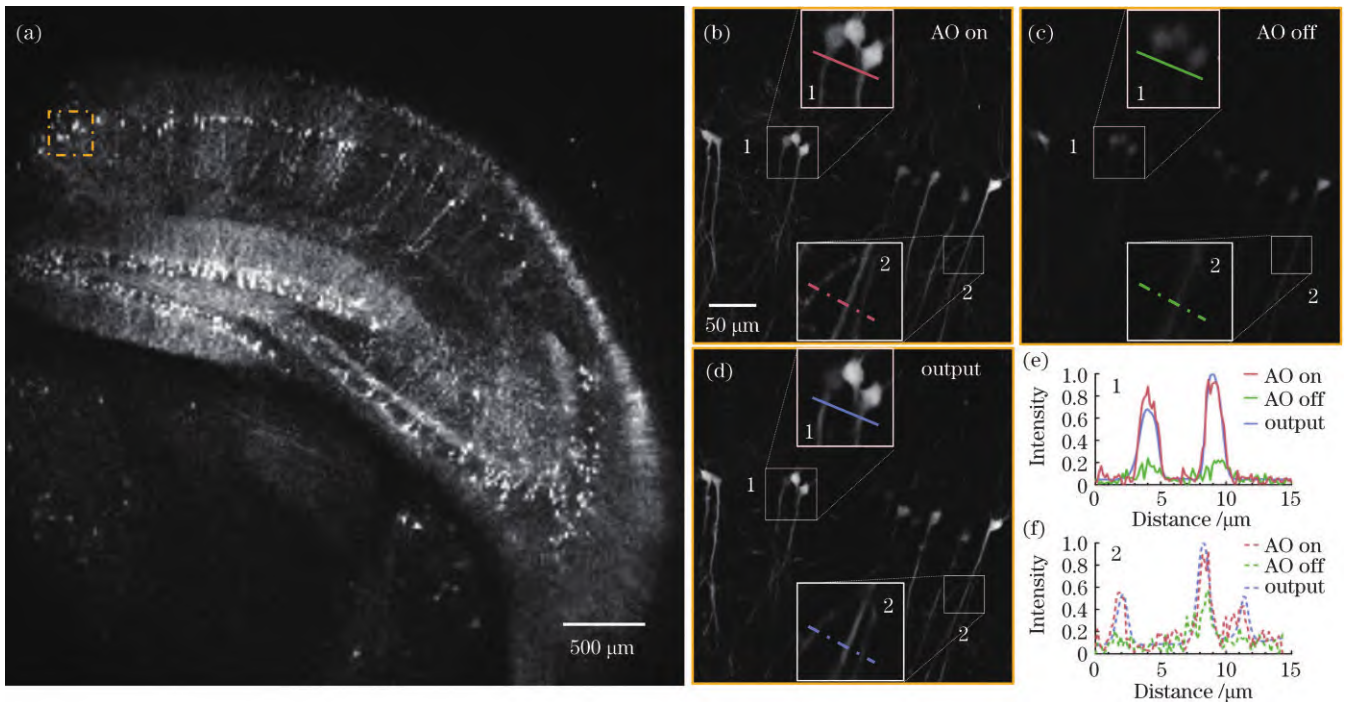


图 4 Thy1-GFP 小鼠大脑切片的大视场成像结果。(a)全视场图像,视场尺寸为 $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$; (b)虚线框区域扩展视场在自适应光学校正前的图像; (c)虚线框区域扩展视场在自适应光学校正后的图像; (d)深度学习模型的图像增强结果; (e)(f)划线区域的强度对比

Fig. 4 Large FOV imaging of brain slice of Thy1-GFP mouse. (a) Full FOV image with size of $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$; (b) image of extended FOV in dash box before AO correction; (c) image of extended FOV in dash box after AO correction; (d) enhanced image obtained by deep learning model; (e)(f) intensity comparison along solid and dash lines

为验证网络的通用性,使用 GFP 荧光标记的小胶质细胞进行进一步验证(Thy1-GFP 主要标记的是神经元细胞,CX3CR1-GFP 主要标记的是小胶质细胞,两者形态有较大差异)。图 5(a)是视场尺寸为 $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$ 的 CX3CR1-GFP 小鼠大脑小胶质细胞图像。随机选取扩展视场内的某一区域,如图 5(a)中虚线框区域所示,对比自适应光学校正前后图像以及网络输出图像的灰度值分布。图 5(b)、(c)为自适应光学校正前后的对比图,图 5(d)为网络输出结果,恢复后的图像的信噪比由原来的 26.72 dB 提升到 31.37 dB。图 5(e)~(g)分别为图 5(b)~(d)的灰度值直方图。CX3CR1-GFP 实验结果表明,本文改进的网络框架可

有效扩展物镜的可用视场,经过网络学习、输出后,无论是分辨率还是荧光强度都能近似地恢复到硬件自适应光学校正后无像差时的水平。

不同的生物样品实验结果表明,深度学习技术不仅可以有效地替代硬件自适应光学技术,增强双光子显微镜扩展视场中生物结构的特征,还可以大幅降低图像中的噪声,恢复成像分辨率。

3.3 网络评估

为展示本文改进网络框架的优势,将其与超深超分辨率模型(VDSR)^[40]、传统的 U-Net 模型进行比较。nBRANet、VDSR 和 U-Net 分别采用相同的数据集进行训练,不同网络模型的输出结果如图 6 所示。可见,

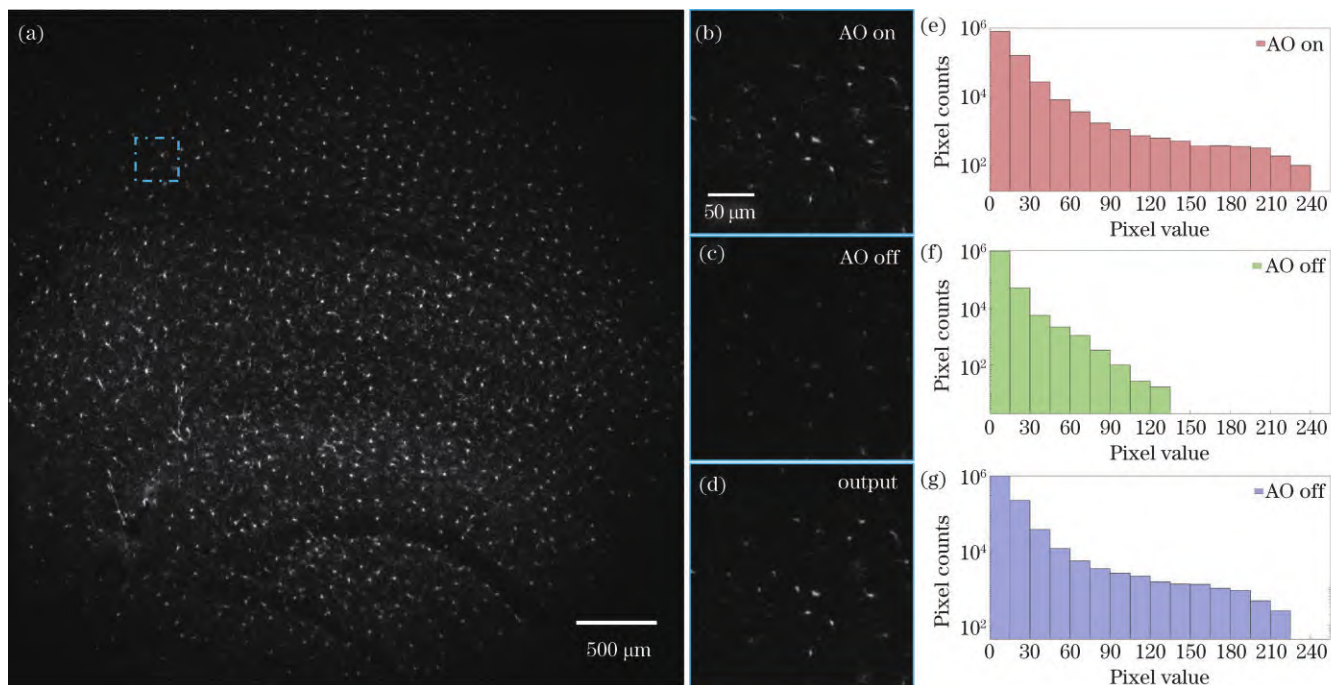


图 5 CX3CR1-GFP 小鼠大脑切片中小胶质细胞的大视场成像。(a)全视场图像,视场尺寸为 $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$; (b)虚线框区域扩展视场在自适应光学校正前的图像; (c)虚线框区域扩展视场在自适应光学校正后的图像; (d)所提深度学习模型的图像增强结果; (e)~(g)灰度值直方图,分别对应(b)~(d)

Fig. 5 Large FOV imaging of microglia in CX3CR1-GFP mouse brain slice. (a) Full FOV image with size of $2.45\text{ mm} \times 2.45\text{ mm}$; (b) image of extended FOV in dash box before AO correction; (c) image of extended FOV in dash box after AO correction; (d) enhanced image obtained by deep learning model; (e)~(g) histograms of gray values corresponding to Figs. (b)~(d), respectively

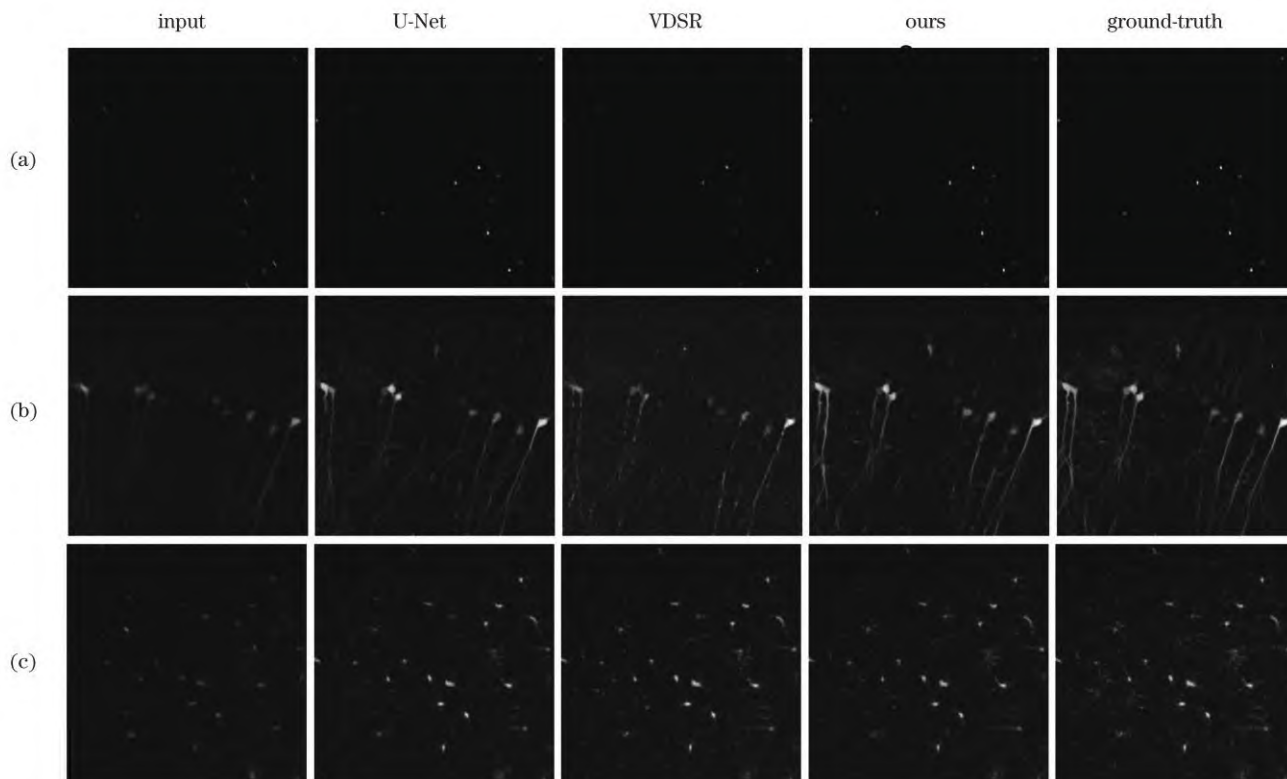


图 6 不同网络模型的输出结果。(a)荧光小球样品扩展视场的 ROI 区域; (b)Thy1-GFP 样品扩展视场的 ROI 区域; (c)CX3CR1-GFP 样品扩展视场的 ROI 区域

Fig. 6 Output results of different network models. (a) ROI area of extended FOV of fluorescent bead samples; (b) ROI area of extended FOV of Thy1-GFP sample; (c) ROI area of extended FOV of CX3CR1-GFP sample

VDSR 的实验结果中含有大量噪声,U-Net 的实验结果中丢失了一些细节信息。不同模型的性能评价指标

如表 3 所示,较高的 PSNR 值验证了 nBRAnet 网络框架的优势。

表 3 不同网络模型的实验结果评估

Table 3 Experimental results evaluation of different network models

Network	PSNR /dB			Time /s			Model size (parameter quantity)	GFLOPs
	Fluorescent beads	Thy1-GFP	CX3CR1-GFP	Fluorescent beads	Thy1-GFP	CX3CR1-GFP		
U-Net	39.26	26.96	30.99	3.10	2.99	2.97	3.453×10^7	833
VDSR	36.13	25.13	32.02	1.19	1.14	1.18	6.647×10^5	666
Ours	40.39	27.56	31.37	4.10	4.06	4.33	3.558×10^7	851

需要指出的是,在这项工作中,改进的模型在 U-Net 框架的基础上添加了残差结构和空间注意力结构,使得网络框架更加复杂,而且该模型去除了 BN 结构,减缓了网络的收敛速度,导致改进后的模型参数总量增加,在提升精度的同时牺牲了一定的时间。另外,训练数据集分别为自适应光学校正前后的二维图像,但在实际采样过程中,由于校正前的点扩散函数沿 z 轴方向的长度更长(相比于校正后),自适应光学校正前的图像叠加了其他 z 轴位置的信息,使得校正前后的图像不完全匹配。为解决这一问题,后续拟考虑使用三维数据代替二维数据。三维数据的优势在于其通过 z 轴多层采样后,网络的输入输出包含了更完整的样品特征,从而更好地还原了样品信息。此外,深度学习的泛化能力还有待于进一步加强。在实验过程中,笔者曾尝试将小球的训练模型应用在其他生物样品上,但网络输出的效果并不理想。这也是深度学习依赖数据驱动的限制性。这就要求采集的数据集除了清晰、特征明显外,还需要包含更多类型的样品图像,使其种类和特征能够覆盖将来潜在的测试样品,以此提高网络模型的性能和泛化能力。

此外,笔者除了在文内展示的 Thy1-GFP 大脑切片样品和 CX3CR1-GFP 大脑切片样品上进行了成像研究之外,还对多个样品进行了实验。不同样品经网络恢复后,其扩展视场区域的分辨率和荧光强度均得到较大提升,均能近似地恢复到硬件自适应光学校正后无像差时的水平。例如:植物细胞样品扩展视场的 ROI 区域经网络恢复后,图像的信噪比由原来的 15.75 dB 提升至 20.83 dB;不同小鼠的 Thy1-GFP 大脑切片样品扩展视场的 ROI 区域经网络恢复后,图像的信噪比由原来的 30.58 dB 提升至 35.45 dB。今后将继续尝试更多的生物样品。

4 结 论

本文提供了一种有效扩展双光子显微镜成像视场的新思路、新途径,即,利用深度学习来扩展商业物镜的可用视场。通过分析荧光小球实验、Thy1-GFP 小鼠脑内神经细胞实验和 CX3CR1-GFP 小鼠脑内小胶质细胞实验可知,经网络恢复后的扩展区域图像,无论

是分辨率还是荧光强度,均能恢复到接近硬件自适应光学校正后无像差时的水平。换言之,本文所提方法利用训练好的模型可以直接输出校正像差后的样品扩展视场的 ROI 区域图像,无须用硬件自适应元件进行像差校正,简化了操作,降低了系统的复杂度和成本,提高了成像分辨率及其拓展的通用性,具有较高的实用价值。

参 考 文 献

- [1] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1369-1377.
- [2] König K. Multiphoton microscopy in life sciences[J]. Journal of Microscopy, 2000, 200(2): 83-104.
- [3] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.
- [4] Bumstead J R, Park J J, Rosen I A, et al. Designing a large field-of-view two-photon microscope using optical invariant analysis[J]. Neurophotonics, 2018, 5(2): 025001.
- [5] Ji N, Freeman J, Smith S L. Technologies for imaging neural activity in large volumes[J]. Nature Neuroscience, 2016, 19(9): 1154-1164.
- [6] Yang W J, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity[J]. Nature Methods, 2017, 14(4): 349-359.
- [7] Tsai P S, Mateo C, Field J J, et al. Ultra-large field-of-view two-photon microscopy[J]. Optics Express, 2015, 23(11): 13833-13847.
- [8] Yu C H, Stirman J N, Yu Y Y, et al. Diesel2p mesoscope with dual independent scan engines for flexible capture of dynamics in distributed neural circuitry[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1-8.
- [9] Clough M, Chen I A, Park S W, et al. Flexible simultaneous mesoscale two-photon imaging of neural activity at high speeds[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1-7.
- [10] Demas J, Manley J, Tejera F, et al. High-speed, cortex-wide volumetric recording of neuroactivity at cellular resolution using light beads microscopy[J]. Nature Methods, 2021, 18(9): 1103-1111.
- [11] Sofroniew N J, Flickinger D, King J, et al. A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging[J]. eLife, 2016, 5: e14472.
- [12] Stirman J N, Smith I T, Kudenov M W, et al. Wide field-of-view, multi-region two-photon imaging of neuronal activity in the mammalian brain [J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 857-62.
- [13] Yao J, Gao Y F, Yin Y X, et al. Exploiting the potential of commercial objectives to extend the field of view of two-photon microscopy by adaptive optics[J]. Optics Letters, 2022, 47(4): 989-992.
- [14] 刘立新, 张美玲, 吴兆青, 等. 自适应光学在荧光显微镜中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(12): 120001.

- Liu L X, Zhang M L, Wu Z Q, et al. Application of adaptive optics in fluorescence microscope[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(12): 120001.
- [15] Booth M J, Neil M A A, Juskaitis R, et al. Adaptive aberration correction in a confocal microscope[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(9): 5788-5792.
- [16] Park J H, Kong L J, Zhou Y F, et al. Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(6): 581-583.
- [17] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 374-380.
- [18] Booth M J. Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image[J]. *Light: Science & Applications*, 2014, 3(4): e165.
- [19] Zhou H, Cai R Y, Quan T W, et al. 3D high resolution generative deep-learning network for fluorescence microscopy imaging[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(7): 1695-1698.
- [20] Zhang H, Fang C Y, Xie X L, et al. High-throughput, high-resolution deep learning microscopy based on registration-free generative adversarial network[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(3): 1044-1063.
- [21] Weigert M, Schmidt U, Boothe T, et al. Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(12): 1090-1097.
- [22] Cheng S F, Zhou Y Y, Chen J B, et al. High-resolution photoacoustic microscopy with deep penetration through learning[J]. *Photoacoustics*, 2022, 25: 100314.
- [23] Zhao H X, Ke Z W, Chen N B, et al. A new deep learning method for image deblurring in optical microscopic systems[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(3): e201960147.
- [24] Belthangady C, Royer L A. Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1215-1225.
- [25] 李浩宇, 曲丽颖, 华子杰, 等. 基于深度学习的荧光显微成像技术及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811007.
- Li H Y, Qu L Y, Hua Z J, et al. Deep learning based fluorescence microscopy imaging technologies and applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811007.
- [26] Liu J H, Huang X S, Chen L Y, et al. Deep learning - enhanced fluorescence microscopy via degeneration decoupling[J]. *Optics Express*, 2020, 28(10): 14859-14873.
- [27] 熊子涵, 宋良峰, 刘欣, 等. 基于深度学习的荧光显微性能提升(特邀)[J]. *红外与激光工程*, 2022, 51(11): 89-106.
- Xiong Z H, Song L F, Liu X, et al. Performance enhancement of fluorescence microscopy by using deep learning(invited)[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2022, 51(11): 89-106.
- [28] Shen B L, Liu S W, Li Y P, et al. Deep learning autofluorescence-harmonic microscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2022, 11(1): 1-14.
- [29] Wang Z Q, Zhu L X, Zhang H, et al. Real-time volumetric reconstruction of biological dynamics with light-field microscopy and deep learning[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(5): 551-556.
- [30] Wang W H, Zhao X, Jiang Z X, et al. Deep learning-based scattering removal of light field imaging[J]. *Chinese Optics Letters*, 2022, 20(4): 041101.
- [31] Saba A, Gigli C, Ayoub A B, et al. Physics-informed neural networks for diffraction tomography[J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(6): 066001.
- [32] Zheng Y, Chen J J, Wu C X, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy based on deep learning[J]. *Cytometry*, 2021, 99(6): 622-631.
- [33] Krishnan A, Belthangady C, Nyby C, et al. Optical aberration correction via phase diversity and deep learning[EB/OL]. [2022-10-11]. <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2020/04/06/2020.04.05.026567.full.pdf>.
- [34] Hu L J, Hu S W, Gong W, et al. Image enhancement for fluorescence microscopy based on deep learning with prior knowledge of aberration[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(9): 2055-2058.
- [35] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-Net: convolutional networks for biomedical image segmentation[M] //Navab N, Hornegger J, Wells W M, et al. Medical image computing and computer-assisted intervention-MICCAI 2015. Lecture notes in computer science. Cham: Springer, 2015: 234-241.
- [36] He K M, Zhang X Y, Ren S Q, et al. Deep residual learning for image recognition[C]//2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), June 27-30, 2016, Las Vegas, NV, USA. New York: IEEE Press, 2016: 770-778.
- [37] Oktay O, Schlemper J, Folgoc L L, et al. Attention U-Net: learning where to look for the pancreas[EB/OL]. (2018-04-11) [2022-11-05]. <https://arxiv.org/abs/1804.03999>.
- [38] Ioffe S, Szegedy C. Batch normalization: accelerating deep network training by reducing internal covariate shift[EB/OL]. (2015-02-11)[2022-11-08]. <https://arxiv.org/abs/1502.03167>.
- [39] nBRANet[EB/OL]. [2022-10-08]. <https://gitee.com/li-chijian/nBRANet>.
- [40] Kim J, Lee J K, Lee K M. Accurate image super-resolution using very deep convolutional networks[C]//2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), June 27-30, 2016, Las Vegas, NV, USA. New York: IEEE Press, 2016: 1646-1654.

Extending Field-of-View of Two-Photon Microscopy Using Deep Learning

Li Chijian^{1,2}, Yao Jing^{2,3,4}, Gao Yufeng², Lai Puxiang^{3,4}, He Yuezhi^{2***}, Qi Sumin^{1**}, Zheng Wei^{2*}

¹*School of Cyber Science and Engineering, Qufu Normal University, Jining 273100, Shandong, China;*

²*Research Center for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China;*

³*Department of Biomedical Engineering, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR 999077, China;*

⁴*Shenzhen Research Institute, The Hong Kong Polytechnic University, Shenzhen 518055, Guangdong, China*

Abstract

Objective Two-photon microscopy (TPM) imaging has been widely used in many fields, such as *in vivo* tumor imaging, neuroimaging, and brain disease research. However, the small field-of-view (FOV) in two-photon imaging (typically within diameter of 1 mm) limits its further application. Although the FOV can be extended through adaptive optics technology, the complex optical paths, additional device costs, and cumbersome operating procedures limit its promotion. In this study, we propose the use of deep learning technology instead of adaptive optics technology to expand the FOV of two-photon imaging. The large FOV of TPM can be

realized without additional hardware (such as a special objective lens or phase compensation device). In addition, a BN-free attention activation residual U-Net (nBRANet) network framework is designed for this imaging method, which can efficiently correct aberrations without requiring wavefront detection.

Methods Commercially available objectives have a nominal imaging FOV that has been calibrated by the manufacturer. Within the nominal FOV, the objective lens exhibits negligible aberrations. However, the aberrations increase dramatically beyond the nominal FOV. Therefore, the imaging FOV of the objective lens is limited to its nominal FOV. In this study, we improved the imaging quality of the FOV outside the nominal region by combining adaptive optics (AO) and deep learning. Aberrant and AO-corrected images were collected outside the nominal FOV. Thus, we obtained a paired dataset consisting of AO-corrected and uncorrected images. A supervised neural network was trained using the aberrated images as the input and the AO-corrected images as the output. After training, the images collected from regions outside the nominal FOV could be fed directly to the network. Aberration-corrected images were produced, and the imaging system could be used without AO hardware.

Results and Discussions The experimental test results include the imaging results of samples such as fluorescent beads with diameter of 1 μm and Thyl-GFP and CX3CR1-GFP mouse brain slices, and the results of the corresponding network output. The high peak signal-to-noise ratio (PSNR) values of the test output and ground truth demonstrate the feasibility of extending the FOV to TPM imaging using deep learning. At the same time, the intensity contrast between the nBRANet network output image and the ground truth on the horizontal line is compared in detail (Figs. 3, 4, and 5). The extended FOV of different samples is randomly selected for analysis, and a high degree of coincidence is observed in the intensity comparison. The experimental results show that after using the network, both the resolution and fluorescence intensity can be restored to a level where there is almost no aberration, which is close to the result after correcting using AO hardware. To demonstrate the advantages of the network framework designed in this study, the traditional U-Net structure and the very deep super-resolution (VDSR) model are used to compare with ours. When using the same training dataset to train different models, we find that the experimental results of the VDSR model contain a considerable amount of noise, whereas the experimental results of the U-Net network lose some details (Fig. 6). The high PSNR values clearly demonstrate the strength of our nBRANet network framework (Table 3).

Conclusions This study provides a novel method to effectively extend the FOV of TPM imaging by designing an nBRANet network framework. In other words, deep learning was used to enhance the acquired image and expand the nominal FOV for commercial objectives. The experimental results show that images from extended FOVs can be restored to their AO-corrected versions using the trained network. That is, deep learning technology could be used instead of AO hardware technology to expand the FOV of commercially available objectives. This simplifies the operation and reduces the system cost. An extended FOV obtained using deep learning can be employed for cross-regional or whole-brain imaging.

Key words microscopy; deep learning; adaptive optics; large field-of-view; two-photon microscopy