

基于自适应光学的视网膜单细胞光学相干层析成像技术

屈军乐¹, Ravi S JONNAL², Karen E THORN², Donald T MILLER²

(1. 深圳大学光电子学研究所, 深圳 518060; 2. Indiana University School of Optometry, Bloomington, IN 47405, USA)

摘要:介绍了一种基于 CCD 相机的并行光学相干层析成像技术, 将所建立的层析成像系统和自适应光学视网膜相机结合。利用一维光学相干层析系统对人眼视网膜进行追踪并控制相干门在视网膜内的位置, 利用基于 CCD 相机的二维光学相干层析成像系统记录视网膜的干涉图像。用眼模型和牛眼视网膜组织对系统进行了测试, 通过将 4 幅干涉图像的获取时间控制在 7 ms 以内来减少视网膜运动对成像的影响; 系统的轴向点扩展函数和灵敏度分别达到 10 μm 和 76 dB。实验结果表明, 所建立的基于自适应光学的视网膜光学相干层析成像系统的空间分辨率和灵敏度远远高于其它基于自适应光学的视网膜成像技术。

关键词: 光学相干层析; 视网膜成像; 自适应光学; 激光扫描共聚焦检眼镜; 迈克尔逊干涉仪; 眼睛; 视网膜
中图分类号: Q63

1 引言

视网膜是位于眼球内后表面的一层非常薄和纤细的组织, 在人们的视觉中起着非常重要的作用。它的厚度只有大约几百微米, 分布着大量不同种类的细胞。这些细胞经常会受到诸如糖尿病性视网膜病、青光眼、黄斑变性和色素性视网膜炎等严重致盲性疾病的侵害。要通过人眼的瞳孔观察视网膜的健康状态非常困难, 因为由角膜和晶状体组成的人眼的光学系统存在像差, 使在视网膜上所成的图像模糊; 另外, 视网膜的各层细胞都产生反射光, 而且非常弱 (<50 dB), 所得到的视网膜图像一般是多层反射光的叠加。为了能对视网膜进行高空间分辨的单细胞成像, 从而对各类视网膜类疾病进行早期诊断, 人们一直寻求发展具有高空间分辨率和灵敏度的视网膜成像技术。最近, Liang 等^[1]将自适应光学 (adaptive optics, AO) 技术和传统的泛光照明视网膜成像 (flood-illumination retinal imaging) 技术结合, 通过自适应光学校正人眼光学系统的像差, 使得系统的横向点扩展函数达到 2 μm 左右, 极大地提高了成像质量, 首次得到了视网膜的单细胞 (锥状细胞) 图像。但这种方法没有层析成像功能, 一般只能得到视网膜上紧靠光反射最强的视网膜色素上皮细胞 (retina pigmented epithelium, RPE) 层的锥状感光细胞的图像。将自适应光学和激光扫描共聚焦检眼镜 (confocal scanning laser ophthalmoscope, cSLO) 结合^[2], 显

著地提高了系统的灵敏度和轴向空间分辨率 (~ 60 μm), 但是和自适应光学视网膜相机所具有的横向空间分辨率和成像质量比起来, 灵敏度和轴向空间分辨率还远远不够。

光学相干层析 (optical coherence tomography, OCT) 是一种新的无损光学成像技术, 它可以给出生物组织的高空间分辨层析图像^[3-8]。OCT 是基于对样品背散射光和参考臂的反射光进行干涉互相关测量, 利用相干门来选择最小散射光进行层析成像。其轴向空间分辨率取决于所采用的低相干光源的相干长度, 相干长度越短, 分辨率越高。本文提出将具有高横向空间分辨率的自适应光学技术和具有高轴向空间分辨率的光学相干层析技术结合, 以充分发挥二者在空间分辨上的优势。OCT 的实现方式很多, 大多数是采用扫描的方法。本文介绍一种基于 CCD 相机的并行光学相干层析成像系统 (parallel optical coherence tomography, POCT), 通过将该 POCT 系统和自适应光学系统结合, 可以实现三维高空间分辨的视网膜成像。初步实验结果表明, 所建立的 AO-OCT 视网膜相机的空间分辨率高于二者单独的空间分辨率。采用并行工作方式的另一个好处是通过将 4 幅视网膜干涉图像的曝

收稿日期: 2003-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (60138010)

通讯作者: 屈军乐, 电话: (0755) 26538592,

E-mail: jlqu@szu.edu.cn

光时间控制在 7 ms 以内, 可以显著减小由于视网膜运动对成像质量的影响。

2 方法和材料

我们所建立的 POCT 系统基于一个迈克尔逊干涉仪, 系统结构如图 1 所示。该系统

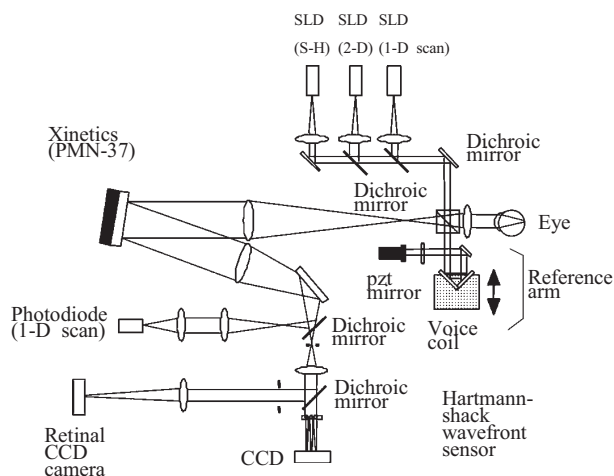


Fig.1 Schematic of the AO-OCT retina camera. It consists of a flood-illuminated *en face* OCT system (CCD-based) for optical sectioning the retina at 10 μm axial resolution; a 1-D OCT axial scanner for tracking the axial position of the subject's retina; and an AO system for measuring and compensating the aberrations of the eye

采用一个中心波长为 679 nm 的超辐射二极管 (superluminescent diode, SLD) 作为光源, 用磁心和压电陶瓷来控制参考臂的光程, 用一个 12 位的科研级 CCD 相机来记录视网膜的干涉图像。实验采用 4 步移相重建的方法^[9], 可以在 7 ms 内得到视网膜的 4 幅干涉图像, 其中曝光时间 1 ms, 每两幅图像曝光时间的间隔为 1 ms, 用于对参考镜进行 1/8 波长的移位, 这相当于对干涉仪移相 $\pi/2$ 。所得到的四幅图像可以用下面的公式表示:

$$I_1 = I_{\text{ref}} + I_{\text{retina}} + 2\sqrt{I_{\text{ref}} I_{\text{cone}}} \cos(\phi_{\text{cone}} - \phi_{\text{ref}}) \quad (1)$$

$$I_2 = I_{\text{ref}} + I_{\text{retina}} + 2\sqrt{I_{\text{ref}} I_{\text{cone}}} \cos(\phi_{\text{cone}} - \phi_{\text{ref}} + \pi/2) \quad (2)$$

$$I_3 = I_{\text{ref}} + I_{\text{retina}} + 2\sqrt{I_{\text{ref}} I_{\text{cone}}} \cos(\phi_{\text{cone}} - \phi_{\text{ref}} + \pi) \quad (3)$$

$$I_4 = I_{\text{ref}} + I_{\text{retina}} + 2\sqrt{I_{\text{ref}} I_{\text{cone}}} \cos(\phi_{\text{cone}} - \phi_{\text{ref}} + 3\pi/2) \quad (4)$$

其中 I_{ref} 是参考臂的光强度, I_{retina} 是视网膜反

射光的强度, ϕ_{cone} 和 ϕ_{ref} 分别是视网膜锥状感光细胞层和参考镜反射光的相位。这里假设相干门控制在锥状感光细胞层。视网膜层析图像重建公式由下式给出^[10]:

$$I_{\text{cone}} = \frac{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2}{4(I_1 + I_2 + I_3 + I_4)} \quad (5)$$

所采用的 CCD 相机的像素数是 1024×530, 而曝光区域是 256×530, 通过软件来控制 CCD 相机沿 1024 像素方向快速移动所获得的图像可以使整个 4 幅图像的获取时间控制在 7 ms 以内, 图像在 CCD 芯片上的移动速度为几百微秒。得到 4 幅干涉图像后, 可以以较慢的速度读出。由于采用同一个 CCD 区域来获取全部 4 幅图像, 从而避免了光学系统和 CCD 的非线性效应对不同图像产生的影响。

一维 OCT 系统用来追踪视网膜并控制相干门的位置 (SLD 波长为 $\lambda=856$ nm)。图 1 也给出了自适应光学系统, 它的光源是一个波长为 788 nm 的 SLD。

为了标定 POCT 系统的轴向空间分辨率, 用一个镜子作为待测样品。磁心带动参考镜每移动一次, 就记录 4 幅干涉图像。用这个平面镜和一组中性滤光片来测量 POCT 系统的动态范围和灵敏度, 其中, 所用的中性滤光片用来模拟眼睛对光的衰减 (~ 40 dB)。为了进一步评估系统的性能, 尤其是所采用的 4 步移相的方法, 采用了一个表面有脏物的镜子作为待测样品, 这样做的好处是利用高对比度的条纹可以判断参考镜是否按照要求精确位移了 1/8 波长, 另外, 对镜子表面上脏物颗粒的成像有助于反映系统的细节分辨能力, 也就是空间分辨率。最后, 用一个眼模型对整个 POCT 系统进行了测试, 这个眼模型的光学系统采用一个直径为 8 mm、焦距为 17 mm 的消色差透镜, 力求在主要的光学参数上 (瞳孔、焦距等) 模拟人眼。眼模型的视网膜是一块新宰杀的牛的眼视网膜, 在这个视网膜组织后面还带有巩膜。对眼模型的实验结果有助于评价一维和二维 OCT 系统的性能, 也能够反映在没有 (人眼) 视网膜运动的情况下系统的工作情况。

3 结果和讨论

图 2 是二维 OCT 系统的轴向点扩展函数, 它是通过移动相干门相对待测样品 (镜子) 的位置得

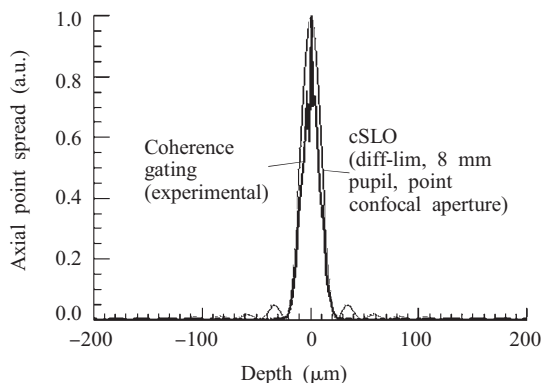


Fig.2 Comparison of the axial point spread function of the parallel coherence gated retina camera (experimental) and the theoretical best point spread function of the cSLO

到的，轴向空间分辨率和灵敏度分别为 $10\ \mu\text{m}$ 和 $76\ \text{dB}$ 。作为比较，图中也画出了激光扫描共聚焦检眼镜 (cSLO) 的轴向点扩展函数的理论曲线。该系统的轴向分辨率与共聚焦的理论分辨率相当，但灵敏度和动态范围要高得多。而且 OCT 系统的点扩展函数的旁瓣要小得多，有助于分辨更小的细节和光反射更弱的组织。

一维 OCT 系统用来追踪视网膜的运动，图 3 是在 10 s 内对眼模型和人眼视网膜的轴向位置追踪结果的测量比较，它们的 RMS 值分别是 0.7 和 $10\ \mu\text{m}$ ，对于一般的人，其视网膜的追踪精度 RMS 大约在 $10\sim 30\ \mu\text{m}$ ，基本可以满足对视网膜的层析成像要求。为了验证 POCT 系统的性能，用一个表面有脏物的镜子对系统进行了测试。图 4

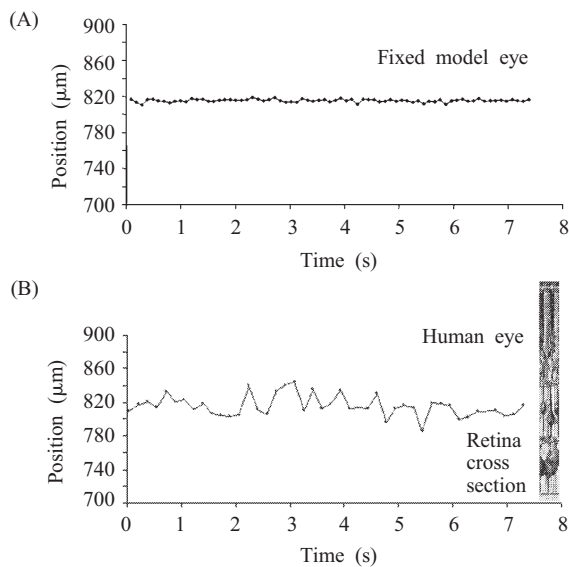


Fig.3 Axial position of the retina in a model eye (A) and a human subject (B)

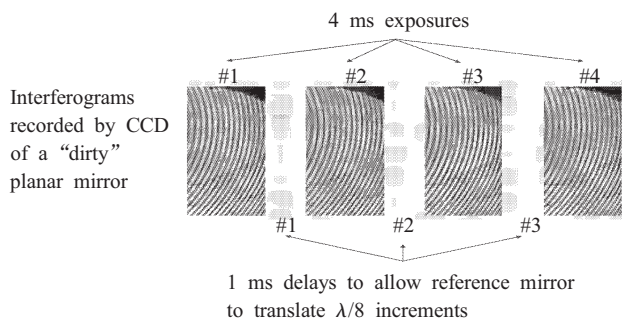


Fig.4 A temporal sequence of four interferograms collected of a soiled planar mirror inserted in the object channel of the 2-D OCT system

是当相干门控制在镜子的表面时所得到的 4 幅条纹图像。可以看出，图像条纹的对比度非常高，表明参考镜在 $1\ \text{ms}$ 的延迟时间内准确地移到指定的位置，并且没有晃动。通过用软件的方法自动测量条纹的位置，可以判断参考镜精确地移动了 $1/8$ 波长。

图 5B 是用图 4 所示的 4 幅条纹图像重建的镜子的图像，为了比较，图 5A 给出了镜子的实际图像，它是通过将参考臂的光挡住而得到的。可以看出，这两幅图像非常相似。但由于 OCT 图像是待测镜子表面大约 $10\ \mu\text{m}$ 内信息的重建，因此两幅图像之间还是有一些细微的差异，因为镜子表面上脏物的大小有可能大于相干长度。从图 5B 还可以看出，待测镜子相对于参考镜有一个微小的倾角。

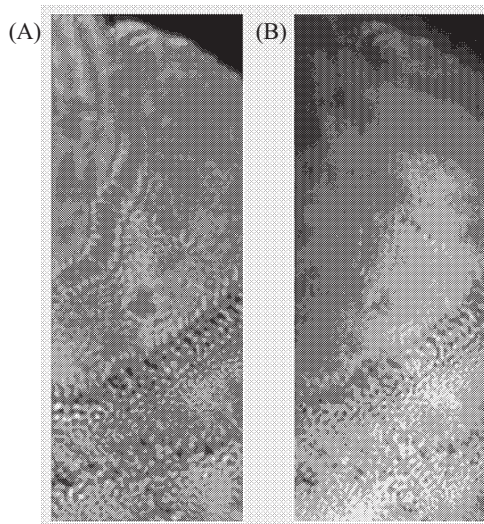


Fig.5 Reconstruction of the soiled planar mirror (B) using the four interferograms shown in Figure 4. For comparison purposes, a conventional flood illumination of this same patch of mirror (A) is also shown, realized by blocking the reference channel of OCT system

最后用离体的牛眼视网膜对 POCT 系统进行了测试。在图 1 所示的光学系统中，在样品臂放了一个以牛眼眼底作为视网膜的眼模型，对视网膜上的一个很小的含有两条血管的区域进行聚焦成像。在这个实验中没有使用自适应光学系统进行象差校正，而是在实验中将 AO 系统打开，使变形镜变平以消除 AO 系统对 OCT 系统的影响。实验中将一

维和二维 OCT 系统耦合，在每一次图像重建前，用一维 OCT 系统确定牛眼视网膜表面的位置。图 6 是牛眼视网膜的实验结果。(A)是将参考光挡住得到的视网膜图像，图像的左边是两条几乎平行分布的位于视网膜表面的血管，不过由于散斑噪声的影响，图上的血管很难看得到。(B)是同一块组织在不同横向位置的层析图像 (XZ)，相邻两幅图

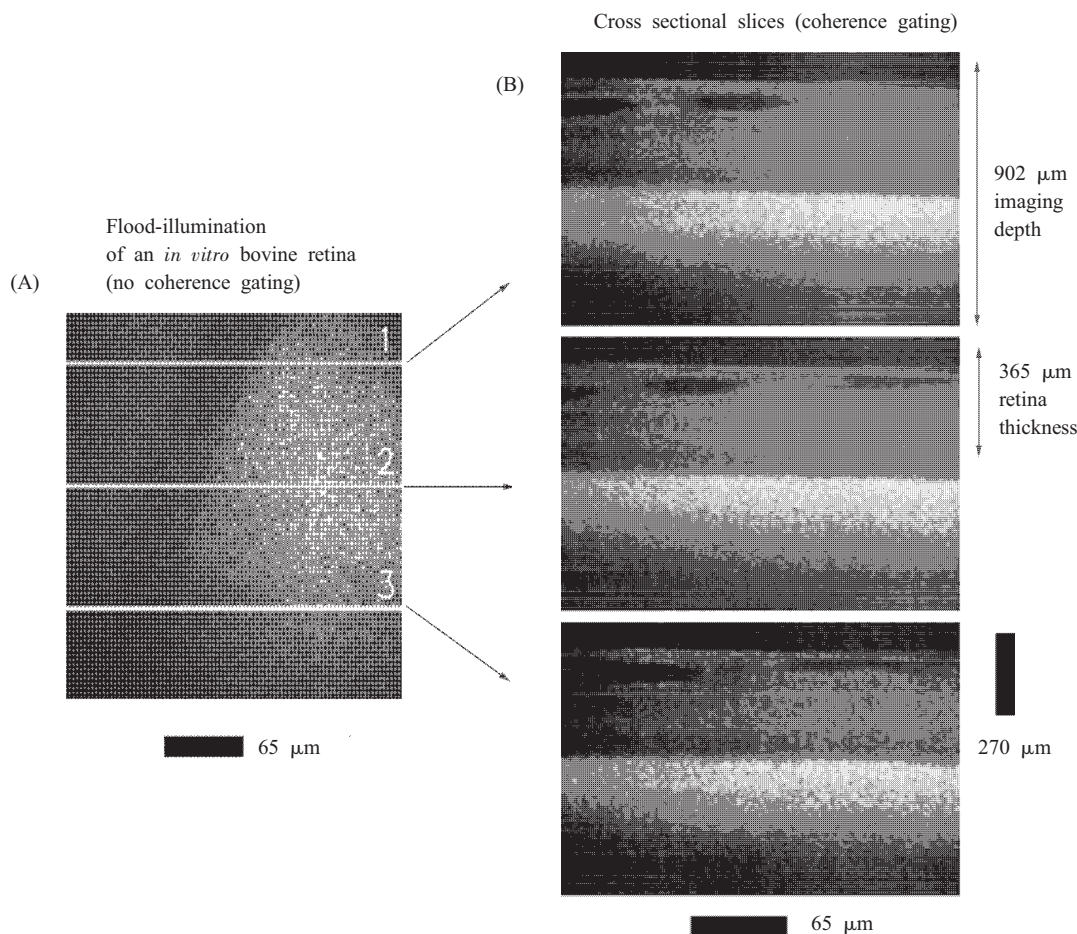


Fig.6 (A) Conventional flood illuminated image of a bovine retina; (B) Cross sections through the stack of coherence gated *en face* images

像的间距是 4.5 μm，总的成像厚度达到 902 μm。从层析图像上可以清楚地看到位于视网膜表面的两条血管的横断面。层析图像上中间较暗的区域是视网膜，其厚度大约是 365 μm。最底下很亮的区域是 RPE 层和脉络膜层，它们对光表现出强散射。实验结果表明，二维并行 OCT 视网膜相机具有很高的灵敏度，可以分辨出视网膜上几个很重要的功能细胞层的结构信息。

4 结 论

我们建立了一套基于 CCD 相机的并行光学相干层析成像系统。通过将该系统 and 自适应光学视网

膜相机结合，可以实现对活体人眼进行高空间分辨率成像。该系统可以在 7 ms 的时间内得到全部 4 幅视网膜的干涉图像，从而减小了由于眼球运动所造成的图像模糊。相机的轴向点扩展宽度和灵敏度分别为 10 μm 和 76 dB，这些性能指标要优于基于自适应光学的激光扫描共聚焦检眼镜。在 10 s 的时间内，对人眼轴向位置的追踪定位精度 RMS 值在 10~30 μm。用牛眼视网膜所进行的实验结果表明，系统的灵敏度很高，可以分辨出在眼科学上很重要的几个视网膜功能细胞层和脉络膜层。由于眼球的运动对图像的重建影响较大，因此正在改进现有的实验手段和相应的图像重建算法；另外，由于散斑噪声的影响，导致对图像的精确聚焦很难，我

们也在研究一种基于多模光纤的光源。这些工作将会进一步提高系统的性能, 实现人眼视网膜的三维高空间分辨成像。

参考文献:

- [1] Liang J, Williams DR, Miller DT. Supernormal vision and high resolution retinal imaging through adaptive optics. *J Opt Soc Am A*, 1997,14:2884~2892
- [2] Roorda A, Romero-Borja F, Donnelly III WJ, Queener H. Adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Optics Express*, 2002,10:405~412
- [3] Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography. *Science*, 1991, 254:1178~1181
- [4] Tearney GJ, Bouma BE, Fujimoto JG. High-speed phase- and group-delay scanning with a grating-based phase control delay line. *Opt Lett*, 1997,22:1811~1813
- [5] Izatt JA, Kulkarni MD, Yazdanfar S, Barton JK, Welch AJ. *In vivo* bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography. *Opt Lett*, 1997,22:1439~1441
- [6] Chen Z, Milner TE, Dave D, Nelson JS. Optical Doppler tomographic imaging of fluid flow velocity in highly scattering media. *Opt Lett*, 1997,22:64~66
- [7] Dubois A, Vabre L, Boccara AC, Beaulieu E. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Appl Opt*, 2002,41:805~812
- [8] Ducros M, Laubscher M, Karamata B, Bourquin S, Lasser T, Salathé RP. Parallel optical coherence tomography in scattering samples using a two-dimensional smart-pixel detector array. *Opt Comm*, 2002,202:29~35
- [9] Sirohi RS, Chau FS. Optical methods of measurement. New York: Marcel Dekker, 1999. 33~43
- [10] Gasvik KJ. Optical Metrology. New York: John Wiley & Sons, 1995. 257~260

SINGLE CELL IMAGING OF THE LIVING HUMAN RETINA USING ADAPTIVE OPTICS AND OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY

QU Jun-le¹, Ravi S JONNAL², Karen E THORN², Donald T MILLER²

(1. Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. Indiana University School of Optometry, Bloomington, IN 47405, USA)

Abstract: An *en face* coherence gated camera for optically sectioning the *in vivo* human retina was constructed. Coherence gating is generated by a free-space Michelson interferometer employing a superluminescent diode for illuminating the retinal tissue, voice coil and piezo-electric translators for controlling the optical path length of the reference channel, and a scientific-grade CCD camera for recording 2-D retinal interferograms. A conventional 1-D OCT is incorporated for tracking the axial motion of the retina and controlling the gating position. *En face* slices of test objects and retinal tissue were obtained using a four-step ($\lambda/4$) phase shift method. Ultrafast acquisition of four interferograms in less than 7 ms has been achieved to mitigate eye motion blur. The axial width of the point spread function and the sensitivity of the camera were measured near 10 μm and 76 dB, respectively, which is substantially better than current flood-illuminated and confocal scanning laser ophthalmoscopes equipped with adaptive optics.

Key Words: Coherence gating; Optical coherence tomography; Retina imaging; adaptive optics; Confocal scanning laser ophthalmoscope; Michelson interferometer; Eye; Retina