

小鼠视网膜光学相干层析成像系统的研制

董荣耀¹, 马艳红¹, 宋天琦¹, 周明亮¹, 王帅², 张鹏飞^{1*}¹大连理工大学光电工程与仪器科学学院, 辽宁 大连 116024;²大连医科大学附属第二医院眼科, 辽宁 大连 116027

摘要 光学相干层析成像(OCT)是一种高速、高分辨率的生物医学成像技术,可实现微米级分辨率和毫米级深度成像。宽带光谱仪是其核心器件,直接决定了系统的轴向分辨率。面向小鼠视网膜高精度成像需求,笔者设计了一套基于自制光谱仪的OCT系统,并提出了一种基于系统性能指标(轴向分辨率和灵敏度下降)的光谱仪标定方法。通过理论计算和仿真,确定了光学器件的参数,并搭建了包括透镜、光栅和线扫描相机等硬件的系统。利用实验数据和光谱仪标定方法对光谱仪性能进行评估,结果表明:系统的有效成像深度可达2.5 mm,轴向分辨率优于3 μm,成像速率为100 kHz,成像范围内的灵敏度下降了23 dB,达到了OCT的应用需求。最后,将所搭建的光谱仪应用于小鼠视网膜成像实验,获得了良好的小鼠视网膜断层图像,并基于断层图像对两种不同小鼠视网膜各层的厚度进行了对比研究。

关键词 医用光学; 光学相干层析成像; 光谱仪; 标定; 视网膜成像

中图分类号 TH773

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230944

1 引言

光学成像是视网膜疾病检查的主要手段之一,它可以提供高精度的视网膜结构图像,为多种视网膜疾病的诊断和治疗提供可靠的依据^[1-2]。光学相干层析成像(OCT)是一种非接触、无创伤的活体生物组织成像技术,具有实时显示、高分辨率、大扫描深度等特点。OCT的概念最早由麻省理工学院的Fujimoto团队于1991年提出^[3],他们利用宽带光源的低相干特性,基于迈克耳孙干涉仪对来自生物组织的背向散射光进行微弱光信号的提取,并对干涉图样进行解算,得到了生物组织的微观二维或三维结构图像^[4]。该技术是基于时间域的低相干干涉测量,因而通常也被称为“时域OCT”(TD-OCT)^[5-7]。1995年,奥地利维也纳大学的Fercher团队提出了频域OCT(FD-OCT)的概念^[8-10],其通过一次采集即可获得检测范围内的全部深度信息,极大地提高了OCT系统的成像速度,并能够提供更高的分辨率与信噪比。

频域OCT又可以分为谱域OCT(SD-OCT)和扫频OCT(SS-OCT)^[11]。Choma等^[12]的研究证明SD-OCT和SS-OCT相比TD-OCT具有更高的灵敏度,进一步推动了SD-OCT和SS-OCT在医学和生物学领域的应用发展^[13]。虽然SS-OCT的成像速度优于SD-OCT,但受限于扫频光源的带宽,SS-OCT在轴向

分辨率上并没有SD-OCT高,因此在对轴向分辨率要求较高的场合,SD-OCT依旧是首选^[14-19]。随着新的宽带光源以及相应宽带光谱仪等关键器件的使用,SD-OCT能够获得更好的样品特性以及更高的灵敏度和分辨率^[20-26]。

光谱仪是一种用于将成分复杂的光分解为光谱线的光学仪器。20世纪80年代,Roland成功研制了满足光谱仪所需的光栅,促进了光谱定量分析的发展^[27]。基于光栅的这种分光特性,光谱仪在SD-OCT成像中得到了广泛应用^[28-33]。光谱仪是SD-OCT的重要组成部分,主要用于分解不同光谱分量的干涉光。由于OCT成像系统的整体性能取决于光源以及所使用的光学器件,如SD-OCT系统的轴向分辨率和成像深度与光源的中心波长、带宽有关,同时成像深度还会受到CCD相机像素数的影响,而光谱仪中各类器件的选用对于探测器获取到的光谱信号质量又起着关键作用,因此光谱仪的设计尤为重要。

在全球范围内,小鼠占实验动物数量的90%以上,是研究人类疾病的有效模型。在与视觉相关的研究中,小鼠模型得到了广泛应用,但由于其眼球尺寸较小,视网膜层厚度较薄,对光谱仪分辨率提出了较高要求^[34-35]。目前已有较为成熟的商用OCT光谱仪产品,例如Wasatch Photonics公司的Cobra-S 800系列、BaySpec公司的DeepView系列、Lbsen Photonics公司

收稿日期: 2023-06-21; 修回日期: 2023-07-20; 录用日期: 2023-08-11; 网络首发日期: 2023-08-25

基金项目: 国家自然科学基金(62175024)、大连理工大学引进人才科研启动项目(DUT21RC(3)001)

通信作者: *pfzhang@dlut.edu.cn

的 Eagle OCT-S 系列,光源带宽可达 140 nm 以上,成像深度可达 2.6 mm 以上,可以满足多种不同带宽光源的基本需求。美国的 Phenix 是世界上领先的小动物视网膜成像设备供应商,它们的 Micron 系列 OCT 成像系统利用宽带光源实现了很高的轴向成像分辨率(1.8 μm),但是为了控制成本,其采用了速度很慢的线阵 CCD 相机,成像速率只有 13 kHz;Leica 的 Envisu R 系列 OCT 可以对小鼠、大鼠、兔子等不同小动物的视网膜成像,与 Micron 系列类似,其提供了高达 1.6 μm 的组织内分辨率,但成像速率最高只有 32 kHz;OcuScience 的 iVivo[®] LAB OCT 能够对小动物成像提供 3 μm 的轴向分辨率和 80 kHz 的成像速率;南京博视医疗科技有限公司研发的 Saris 型号的小动物成像设备可以提供 3.9 μm 的组织内轴向分辨率和 100 kHz 的成像速率。

尽管商用光谱仪和商用系统提供了很多选择,但是商用系统价格昂贵,而且无法针对特定的光源和动物视网膜进行优化。因此,自主开发光谱仪和系统是一个较好的解决方案。国内外越来越多的实验室采用自主研发的方式进行系统开发,以更好地进行特定目的的实验,如:加州大学 Davis 分校的 Eyepod 实验室针对小鼠视网膜开发了相应的 OCT 系统,该系统具有 3.6 μm 的组织内轴向分辨率和 100 kHz 的成像速率,能够进行 OCT 结构成像和功能成像^[1]。Illinois 大学 Chicago 分校的 Son 等^[36]使用近红外超辐射发光二极管作为光源(中心波长为 850 nm,带宽为 100 nm),搭建了谱域 OCT 血管成像系统,该系统的轴向分辨率为 3.0 μm ,成像速率最大为 57 kHz。他们用闪烁光(窄带 LED 灯,波长为 505 nm)刺激小鼠视网膜,采用搭建的系统观察了闪烁光刺激引起的视网膜各层的血流运动情况。Boston 大学的 Song 等^[37]使用超连续谱光源为 OCT 系统提供两个波段——540~600 nm 的可见光波段和 800~875 nm 的近红外波段,该系统的成像速率为 50 kHz,在可见光波段的轴向分辨率为 2.7 μm ,在近红外波段的轴向分辨率为 5.6 μm 。Alabama 大学 Birmingham 分校的 Zhang 等^[38]搭建的 OCT 成像系统的中心波长为 846 nm,带宽为 104 nm,成像速率为 5 kHz,组织内轴向分辨率为 2.3 μm 。

为了提高 OCT 的成像分辨率,可以使用超连续谱光源,它可以输出波长为 450~1700 nm 的连续光,用滤光片可自主截取所需波段的光。为了得到更高的分辨率,笔者选取 800~950 nm 波段的光作为成像光源,系统在组织内的轴分辨率达到了 2 μm 左右。同时,为了使其匹配更合适的光谱仪,笔者采用了自主研发的方式,同时为了控制成本,选用了 USB3.0 版本的 e2v 相机。该相机与 Camera Link 版本的 e2v 相机相比成本降低了一半,但它们在 12 位数据获取模式下的最高成像速率差别不大,均可达 120 kHz。本文旨在针对小

鼠视网膜成像中对高轴向分辨率的要求,设计一台面向小鼠视网膜 OCT 成像的高速、宽带光谱仪。通过理论计算和仿真分析实现了光路中各光学元件参数的优化,并完成了光谱仪的标定和 OCT 硬件系统的搭建。实验结果表明,系统的实际轴向分辨率可达 2.72 μm (空气中),有效成像深度为 2.5 mm,成像范围内的灵敏度下降了 23 dB。此外,使用自主搭建的光谱仪成功获取了小鼠视网膜的断层图像,图像质量良好,分层清晰可见,可用于对小鼠视网膜各层厚度的定量分析。

2 方 法

2.1 SD-OCT 系统

笔者搭建的 SD-OCT 系统的原理图如图 1(a)所示。光源采用超连续谱光纤激光器(SuperK Extreme EXU-6 OCT),其输出光通过多波段带通滤光片组后为后续 OCT 成像提供波长范围在 800~950 nm 的激发光。激光器输出的低相干光被 90:10 光纤耦合器分成两束,并经偏振控制器 PC 分别进入样品臂和参考臂,样品臂的光功率为 90%,参考臂的光功率为 10%。样品臂上的光通过二维振镜 G-X/Y(Thorlabs, GVS002)后在小鼠视网膜上产生扫描光束,光束在瞳孔面上的直径约为 0.93 mm,功率约为 600 μW 。由于样品光在进入视网膜后有一定的穿透深度,而且视网膜组织内部并非均匀介质,样品光经过散射后仅有少部分回到光纤耦合器。参考臂光束通过一系列透镜射向参考镜 M2 后,被反射并沿原路返回。这样,两束分别来自待测样品和参考镜的反射、散射光在光纤耦合器中叠加形成干涉,干涉光谱由光谱仪接收。计算机对采集到的干涉信号进行处理,最终得到样品的断层图像。笔者在系统光路中使用了两种透镜,分别是焦距为 19.1 mm 的透镜(Edmund, #49-785)和焦距为 50.8 mm 的透镜(Edmund, #49-792)。如图 1 所示, L1、L1'、L5、L5'、L6、L6' 是焦距为 19.1 mm 的透镜, L2、L2'、L3、L3'、L4、L4' 是焦距为 50.8 mm 的透镜。

图 1(b)是用 SolidWorks 绘制的系统三维结构图,图 1(c)是系统样品臂的光路 Zemax 仿真图。当入瞳直径设置为 4.98 mm 时,光线落在瞳孔面上的轨迹是直径为 0.97 mm 的圆,而且不同扫描角度对应的轨迹中心差值上下不超过 0.15 mm,左右不超过 0.28 mm,满足系统对光学性能的基本要求。

2.2 光谱仪设计

图 2(a)所示光谱仪包含准直透镜 L7、平面反射镜 M、透射光栅 G(Wasatch Photonics, 1200 line/mm)、会聚透镜 L8~L9、线阵 CCD 相机(e2v, OCTOPLUS, UB2210-BB2-130)等器件。干涉光经过准直透镜 L7 后转变为平行光束,然后被反射镜 M 反射进入透射光栅 G,不同波长的光被衍射成不同的角度,从而实现分光。分散后的光束经过会聚透镜 L8~L9 后在

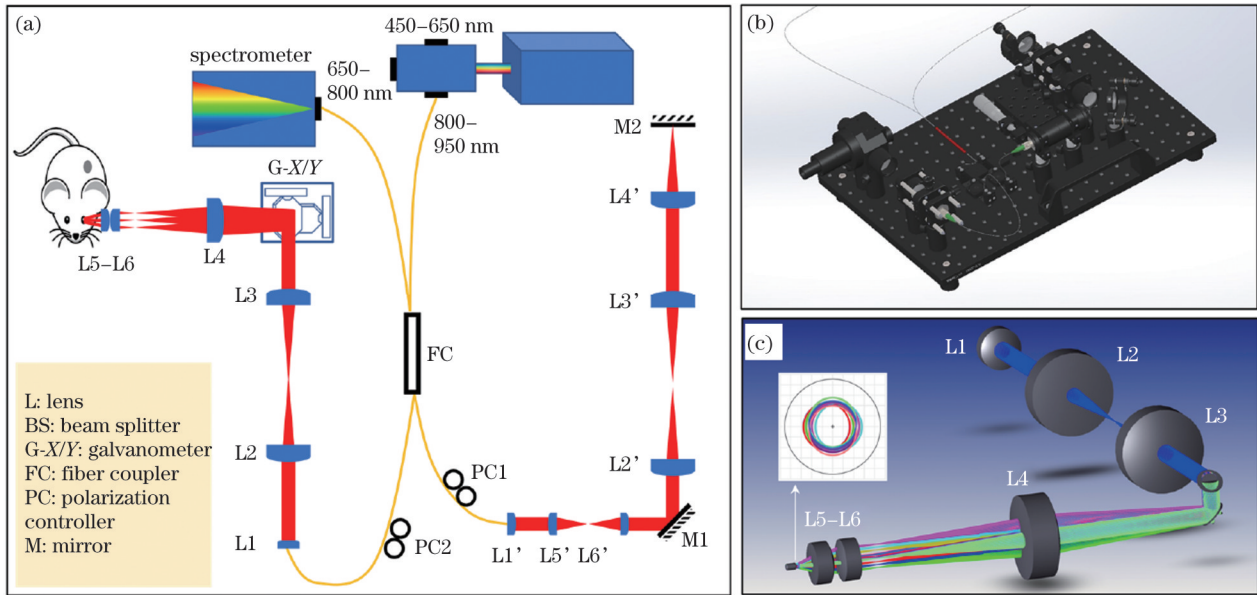


图 1 SD-OCT 系统图。(a)原理图;(b)SolidWorks 三维结构图;(c)样品臂光路 Zemax 仿真图

Fig. 1 SD-OCT system diagrams. (a) Schematic; (b) SolidWorks 3D structure diagram; (c) Zemax simulation diagram of the optical path of the sample arm

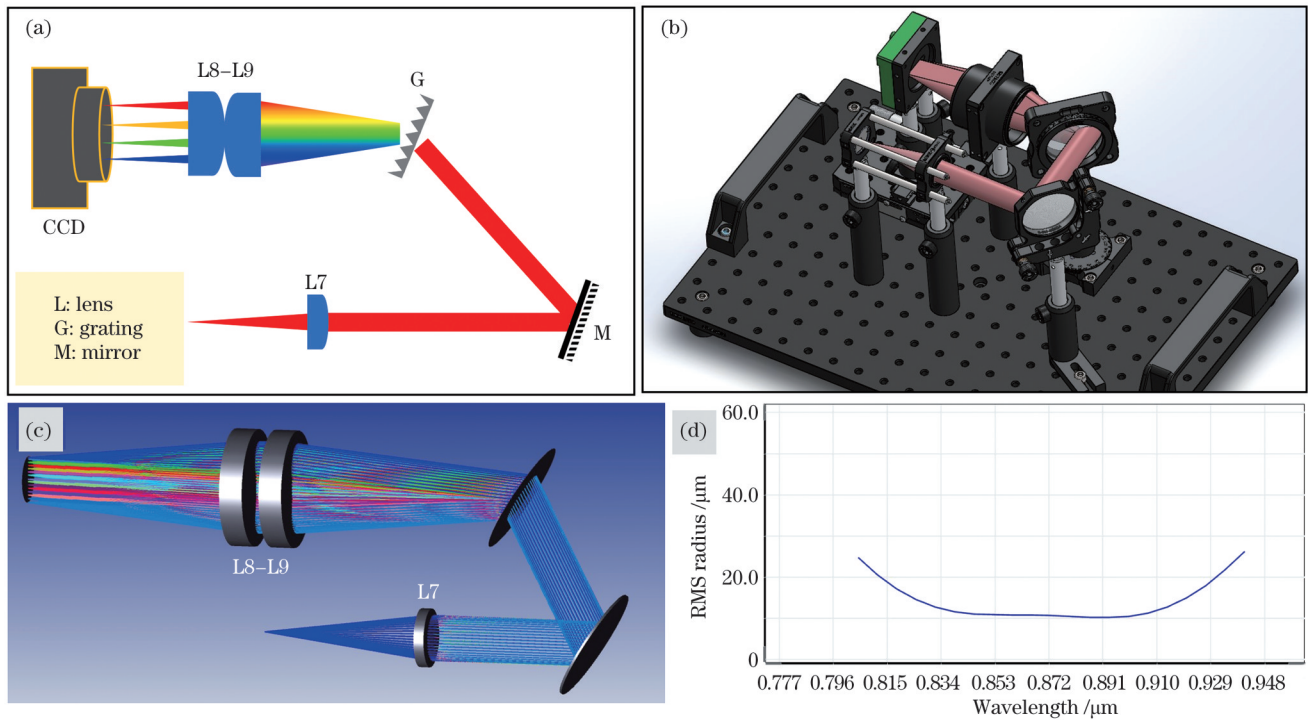


图 2 光谱仪图。(a)光谱仪原理图;(b)光谱仪 SolidWorks 三维结构图;(c)光谱仪光路 Zemax 仿真图;(d)不同波长光束的 RMS 半径
Fig. 2 Spectrometer diagrams. (a) Spectrometer schematic; (b) SolidWorks 3D structure diagram of the spectrometer; (c) Zemax simulation diagram of the optical path of the spectrometer; (d) RMS radius for different wavelength of beams

探测器的不同位置聚焦。通过对探测器不同位置处的光强进行分析,就能够获得所需的光谱信息。图 2(b)是对应的系统的三维结构设计图,图 2(c)是光路 Zemax 仿真图。如图 2(d)所示,光束在探测面上的均方根(RMS)半径在 20 μm 以内,系统像差较小。

在光谱仪设计中,需要根据所选器件的特性来计

算相关参数。光谱仪的设计流程如图 3 所示。笔者选用的光谱仪结构为 Littrow 结构,其入射角和衍射角的绝对值相等。为了获得最佳效果,系统的放大倍率应接近 1,这意味着输入狭缝将 1:1 成像到探测器阵列上。通过计算相关性能指标可以评估设计是否合理。实验测得的光源的实际波长范围为 805~941.4 nm,中心波长 λ_c 为 873.2 nm。

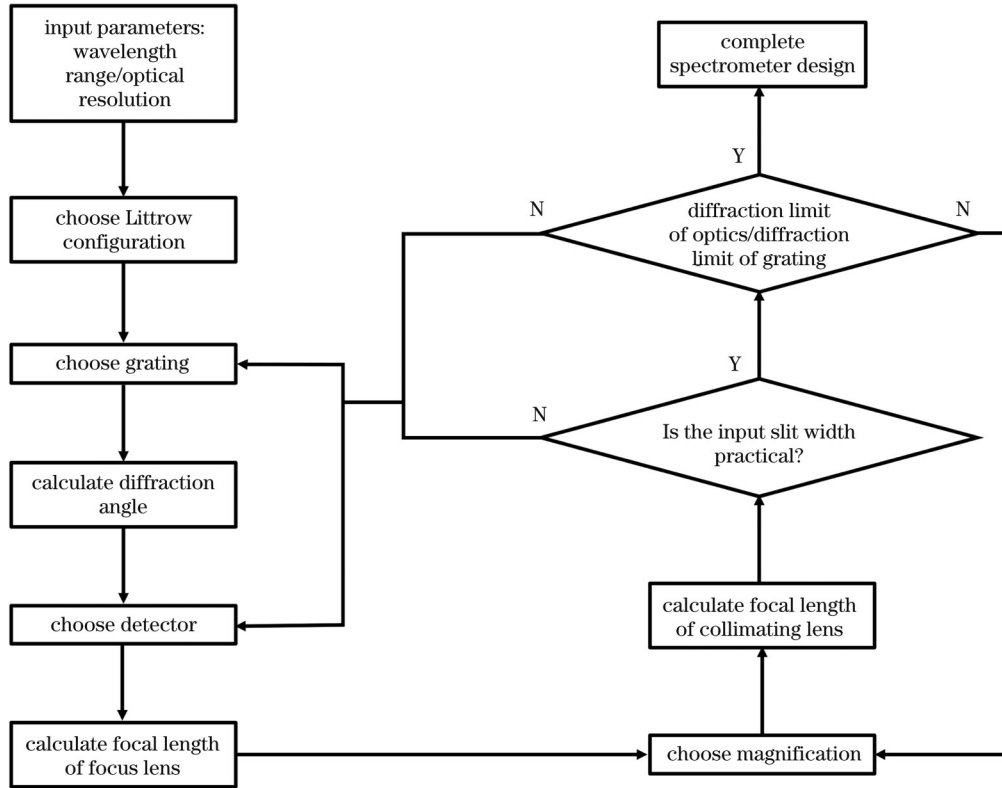


图 3 光谱仪设计流程图
Fig. 3 Spectrometer design flowchart

假设在此光路中,光栅的入射角和衍射角分别为 α 和 β ,且 $\alpha = -\beta$, g 为光栅的槽密度,则上述物理量满足关系式

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{\lambda_c g}{2}\right). \quad (1)$$

由于本文采用的光栅槽密度为 1200 line/mm,由式(1)计算可得 $\alpha = -\beta = 31.59^\circ$ 。

此外,选用的相机的采集频率最高为 120 kHz(位深为 12 bit),线扫描像素数为 2048,而且像素单元的宽和高分别为 $10\ \mu\text{m}$ 和 $200\ \mu\text{m}$,由此可得探测器的宽度 L_D 为 20.48 mm。根据公式

$$f_F = \frac{L_D \cos(\beta)}{g\Delta\lambda}, \quad (2)$$

计算得到会聚透镜的焦距 f_F 为 106.50 mm,其中 $\Delta\lambda$ 是光源的带宽。由于无法找到符合焦距要求的透镜,也为了更好地改善会聚性能,笔者使用两个商用透镜进行组合。标准透镜的焦距 f_1 和 f_2 均为 200 mm,改变透镜间的距离 d 可以达到设计要求。计算公式为

$$f_F = \frac{f_1 f_2}{f_1 + f_2 - d}, \quad (3)$$

可得 d 为 24.4 mm。这里,会聚透镜的焦距 f_F 在光路中体现为两个透镜组成的光学系统的主点到相机(系统焦点)的距离。

在该成像系统中,放大倍率是由会聚透镜与准直

透镜的焦距之比确定的。当放大倍率 M 选择为 1.048 时,准直透镜的焦距 f_C 为 101.6 mm。

由光源发出的光经狭缝进入光谱仪,在设计过程中,狭缝的宽度 w_{slit} 满足方程

$$w_{\text{slit}} = \frac{g\delta_s f_C}{\cos(\alpha)}, \quad (4)$$

式中: δ_s 为光谱分辨率。由于系统狭缝的宽度 w_{slit} 即单模光纤的直径约为 $5\ \mu\text{m}$,将其代入式(4)可得系统的光谱分辨率 δ_s 为 0.035 nm。根据光学衍射极限公式

$$\Delta_{\text{opt}} = 1.028 \frac{\lambda_c M \Delta\lambda}{2L_D \tan(\theta_{\text{NA}})}, \quad (5)$$

和光栅衍射极限公式

$$\Delta_{\text{gra}} = 0.84 \frac{\lambda_c \cos(\alpha)}{2g f_C \tan(\theta_{\text{NA}})}, \quad (6)$$

可以计算出该系统的光学衍射极限和光栅衍射极限分别为 0.023 nm 和 0.0035 nm。其中 θ_{NA} 是光纤端面的最大接收角。根据衍射极限的定义,系统的最小分辨率不会比衍射极限小,因此笔者设计的光谱仪满足分辨率要求,设计的光谱仪结构和参数合理。最终的设计参数如表 1 所示。

3 实验和结果

3.1 光谱仪标定实验

与实际的 OCT 成像过程不同,在对光谱仪进行系

表 1 光谱仪的设计参数

Table 1 Design parameters of the spectrometer

Parameter	Value
Bandwidth $\Delta\lambda$ / nm	136
Angle of incidence α / ($^\circ$)	31.59
Diffraction angle β / ($^\circ$)	31.59
Grating groove density g / (line \cdot mm $^{-1}$)	1200
Detector width L_D / mm	20.48
Focal length focus f_F / mm	106.50
Focal length collimator f_C / mm	101.6
Spectral resolution δ_s / nm	0.035

统搭建和波长标定的实验中,样品臂中的样品可用反射镜代替。由两个反射镜反射形成的干涉条纹经光谱仪成像,用于系统校准和性能分析。

在进行数据采集之前,必须确保 SD-OCT 系统正常运行。使用反射镜代替样品臂中的样品,并将相机的数据采集模式设置为内部触发模式(最大曝光时间和可编程线周期),将数据获取频率设置为 100 kHz。数据宽为 2048,高为 100。由于系统标定时的获取数据过程不涉及扫描,因此扫描振镜保持在原始位置。测试平台两臂之间的光程差范围为 0~2.5 mm,光程差每变化 0.25 mm 进行一次采集,共采集了 9 组数据。

对于在不同光程差下获得的数据,首先基于软件对波长进行标定,以确定波长在像素上的分布情况,随

后确定色散补偿参数,对数据进行色散补偿。不同光程差下获得的干涉信号还需要去除直流分量,即信号中的每个数据减去平均值。去除直流项后,为防止频谱泄漏,选择矩形窗对数据进行加窗处理。最后,对处理后的数据进行傅里叶变换,得到频谱强度信息。观察数据的频谱强度,并适当调整波长标定和色散补偿参数,以优化频谱的显示效果。

3.2 光谱仪标定和性能分析

光谱数据中的波长 λ 和线扫描 CCD 相机的像素点 n ($n=1, 2, \dots, 2048$) 具有近似线性的函数对应关系。为了使测量结果更为精确,这里采用二次多项式对 λ - n 数据进行拟合,拟合公式为

$$\lambda(n) = \beta_0 + \beta_1 n + \beta_2 n^2, \quad (7)$$

式中: β_0 、 β_1 和 β_2 为多项式系数。设测试台样品臂和参考臂的光程差为 z , 则可计算得到二者的相位差为 $\Delta\varphi = 2\pi z / \lambda = kz$, 其中 $k = 2\pi / \lambda$ 。因此,在 k 空间进行傅里叶变换可以直接得到不同光程差对应的强度信息。为了确保不同深度下成像信号的强度均匀且合理,需要反复调节 β_0 、 β_1 、 β_2 和色散补偿参数。

如果系统的色散不匹配,则参考臂与样品臂之间会存在相位差 $\theta(k)$ 。设 $I(k)$ 为干涉光谱的互相关信号,其表达式为

$$I(k) = \text{Re} \left\{ S(k) \exp(i2k\Delta z) \exp[i\theta(k)] \right\} = \frac{1}{2} S(k) \left\{ \exp[i\theta(k)] + \exp\{-i[\theta(k) + 2k\Delta z]\} \right\}, \quad (8)$$

其中, $S(k)$ 表示光源的功率谱密度, Δz 表示光程差。使用泰勒公式将相位差 $\theta(k)$ 展开到第三阶,即

$$\theta(k) = \theta k_0 + \frac{\partial\theta}{\partial k} \Big|_{k_0} (k - k_0) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2\theta}{\partial k^2} \Big|_{k_0} (k - k_0)^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3\theta}{\partial k^3} \Big|_{k_0} (k - k_0)^3, \quad (9)$$

其中 k_0 表示中心波数。由式(9)可以观察到展开式中的第二项和第三项导致了系统的色散匹配。因此,可以通过设置两个参数 a_2 和 a_3 来进行色散补偿。

图 4 给出了软件标定的具体流程,即:1) 获取光谱数据;2) 进行波长标定;3) 进行色散补偿;4) 依次进行去除直流项、加窗、补零、傅里叶变换操作;5) 观察曲线各峰峰形是否尖锐,如不尖锐则重复步骤 2)~4) 或者重复步骤 3)~4);6) 在曲线每个峰值处使用高斯函数拟合,得到系统的轴向分辨率和灵敏度变化曲线;7) 判断轴向分辨率曲线是否平坦,如不平坦则重复步骤 2)~6) 或者重复步骤 3)~6)。最终的标定结果如图 5 所示,当波长标定系数为 $\beta_0=967.24$ 、 $\beta_1=-0.09227$ 、 $\beta_2=1.4884 \times 10^{-8}$, 色散补偿系数为 $a_2=6.566 \times 10^{-8}$ 、 $a_3=3.02 \times 10^{-11}$ 时,不同光程差下的信号强度均比较大。

光谱仪的量化分析结果如图 5 所示。其中,图 5(a) 是光谱仪直接测得的光源光谱曲线,图 5(b) 是 k 值线

性化曲线,图 5(c) 是经过处理之后不同光程差对应的的光谱数据。可以看到经过傅里叶变换的数据峰值在 127 dB~104 dB 范围内,通过提取傅里叶变换后的数据峰值可以观察到光谱强度随探测深度的增加而降低。此外,峰值所在位置对应成像深度,二者存在明显的线性相关关系。随着光程差逐渐增大,即随着探测深度逐渐增大,光谱的成像质量变差,主要表现为探测光强幅值降低导致的信噪比降低,并且光谱宽度逐渐变大。提取图 5(c) 中峰值所在位置,并将其与位移平台的实际移动距离相关联,得到了 A-scan 中 CCD 相机像素与空间距离的对应关系,如图 5(d) 所示,由此可以计算出系统的相机像素与空间距离的拟合系数为 2.65 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 。系统轴向分辨率的定义为 $\delta_z = 0.44\lambda_0^2 / \Delta\lambda$, 其中 λ_0 为中心波长, $\Delta\lambda$ 为光源带宽,将所用光源的中心波长 873.2 nm、带宽 136 nm 代入上述公式可得系统的理论轴向分辨率为 2.47 μm (在空气中)。再进一步对图 5(c) 所示光谱数据进行高

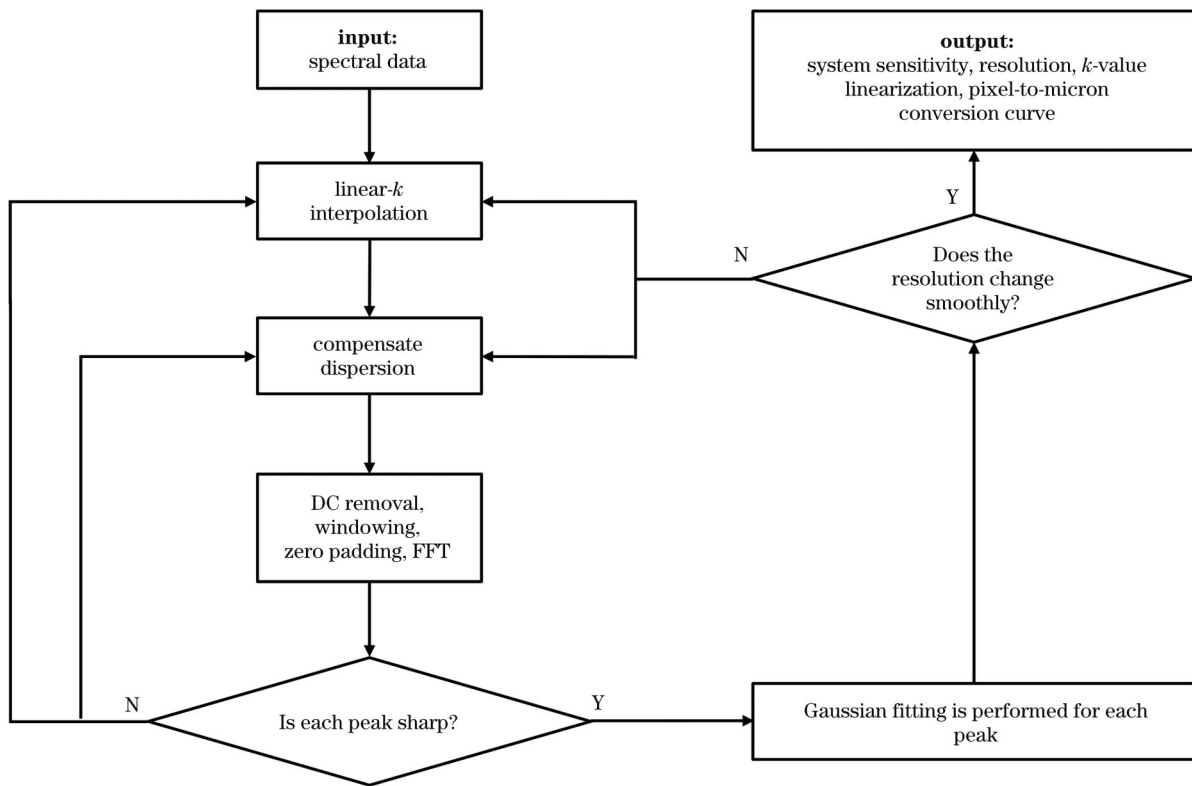


图 4 软件标定流程图

Fig. 4 Software calibration flowchart

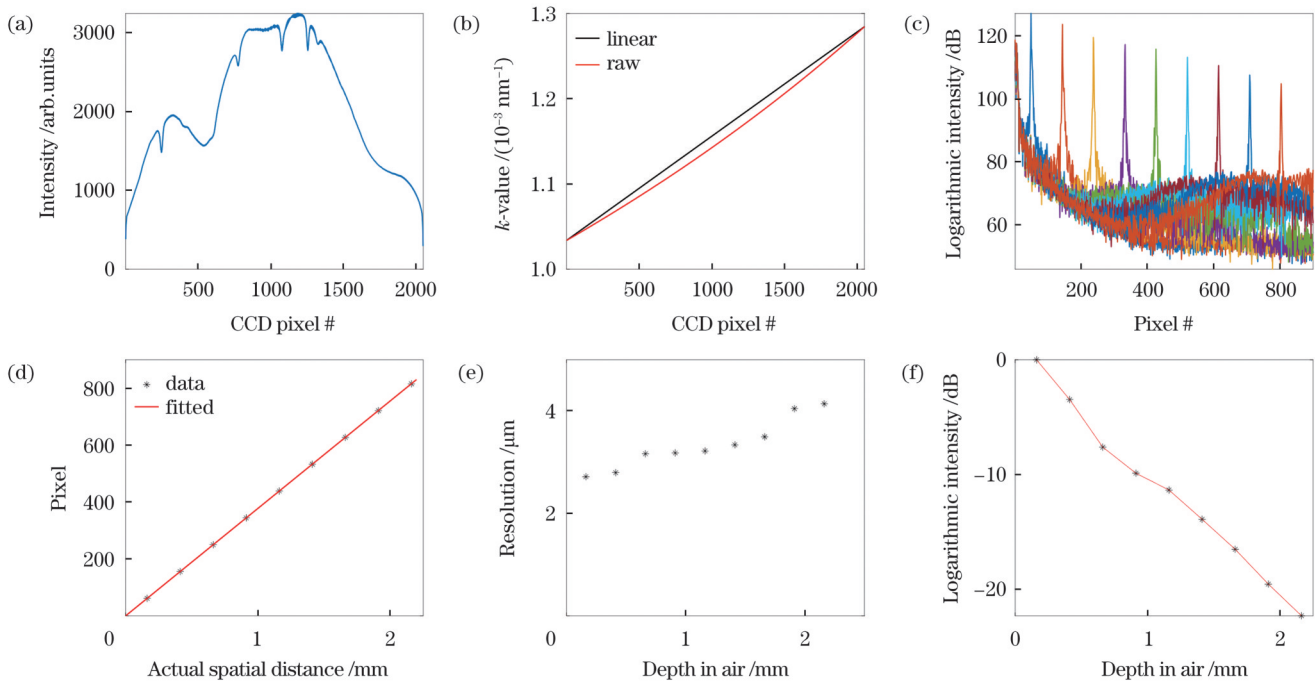


图 5 光谱仪性能分析。(a)光源光谱曲线；(b) k 值线性化曲线；(c)傅里叶变换之后的频谱数据；(d)像素和实际空间距离的关系；(e)轴向分辨率变化曲线；(f)灵敏度变化曲线

Fig. 5 Performance analysis of the spectrometer. (a) Light source spectral curve; (b) k -value linearization curve; (c) spectral data after Fourier transform; (d) the relationship between pixels and actual spatial distance; (e) axial resolution change curve; (f) sensitivity change curve

斯拟合,并将拟合得到的半峰全宽值与根据图 5(d) 得到的相机像素和空间距离的拟合系数相乘,可得到

系统在空气中的轴向分辨率最大为 $4.14 \mu\text{m}$, 最小为 $2.72 \mu\text{m}$ 。在成像范围内,轴向分辨率的变化相对比

较稳定,如图 5(e)所示,并且实际得到的最小轴向分辨率与理论轴向分辨率只相差了 $0.25\ \mu\text{m}$ 。将图 5(c)中的数据峰值用折线相连^[39-40]还可以得到灵敏度下降曲线,如图 5(f)所示,可以看出在成像范围内灵敏度下降了 23 dB。系统成像深度的定义为 $z_{\text{max}} = 0.25N\lambda_0^2/\Delta\lambda$,其中 N 为 CCD 像素数,本文所用的 CCD 像素数为 2048,因此可得本文光谱仪的成像深度为 2.87 mm。考虑到小鼠视网膜的厚度只有约 $250\ \mu\text{m}$,故而只需要一半的采样深度即可满足小鼠视网膜成像要求,预期该光谱仪在成像中可以达到良好的效果并且其成像深度符合要求。

3.3 小鼠成像实验

为了检验笔者搭建的光谱仪在小鼠视网膜成像中的实际应用效果,选用 10 只健康的 4 月龄雌性小鼠进行 OCT 成像实验,其中 5 只为小黑鼠(C57BL/6),5 只为小白鼠(BALB/c)。实验过程中对动物的处理均按照《辽宁省实验动物管理办法》进行,实验操作符合大连理工大学生物与医学伦理委员会制定的标准。

首先,采用 4%(体积分数)异氟烷对小鼠进行诱导麻醉,之后将小鼠头部固定在“咬合棒”上,如图 6(a)所示,利用“咬合棒”上的麻醉面罩将 1.5%~2%(体积分数)异氟烷输送至小鼠鼻腔处进行持续麻醉;然后调整小鼠位姿,在小鼠角膜上滴加托吡卡胺(质量分数为 1%)滴眼液进行散瞳,并使用体温维持计维持小鼠正常体温;最后,利用 OCT 系统在同一位置上采集 1000 张 B-scan 图像,每个 B-scan 由 1083 个 A-scan 组成,A-scan 频率为 100 kHz。采用 ImageJ 对获取的图像数据进行时间上的对准、平均以及对对比度增强,输出如图 6(b)、(c)所示的小鼠视网膜断层图像。从该图像中可以清晰地看到视网膜的各层组织结构,包括视网膜神经纤维层(RNFL)、内丛状层(IPL)、内核层(INL)、外丛状层(OPL)、外核层(ONL)、外界膜(ELM)、感光细胞内节(IS)、感光细胞外节(OS)、视网膜色素上皮层(RPE)、脉络膜等。将图像沿水平方向作平均可得到视网膜各层的线轮廓图,如图 6(d)所示。

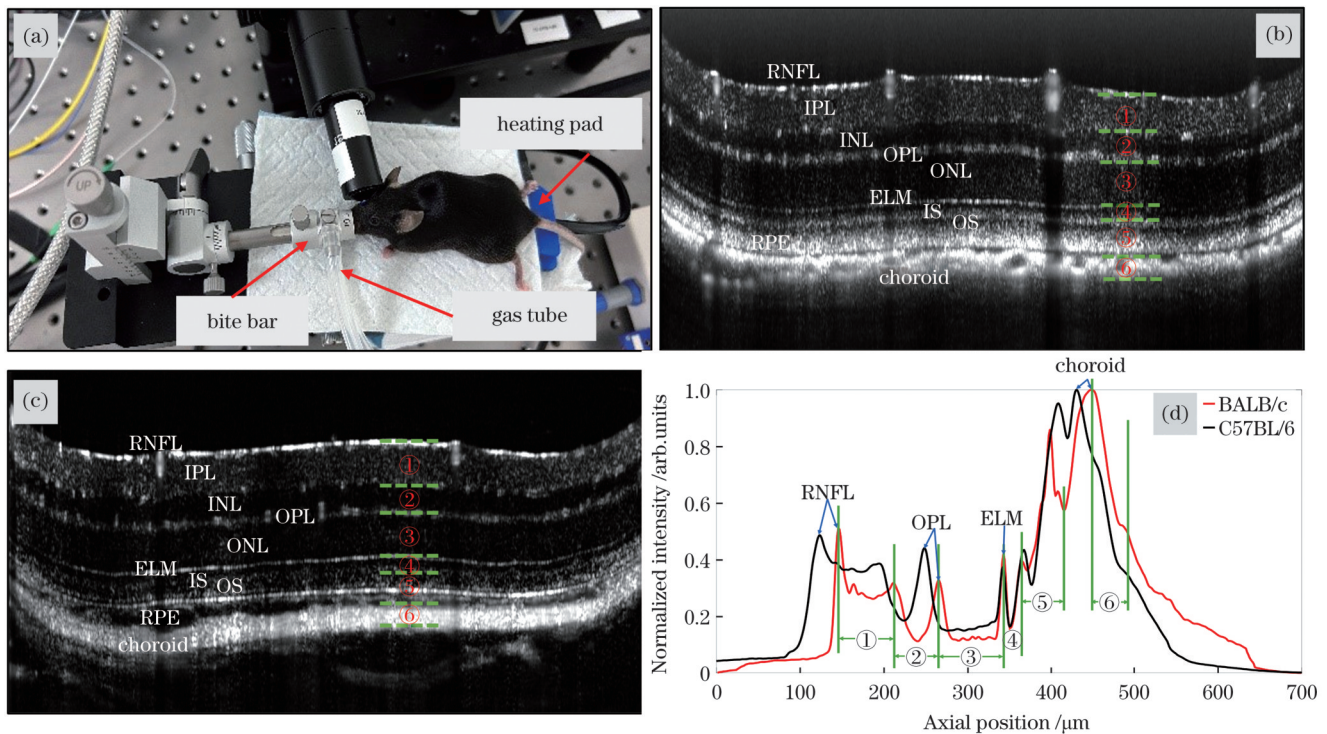


图 6 小鼠成像实验。(a)小鼠成像实验准备;(b)小黑鼠视网膜 OCT 图像;(c)小白鼠视网膜 OCT 图像;(d)OCT 图像各层的线轮廓图
Fig. 6 Mouse imaging experiments. (a) Preparation of mouse imaging experiments; (b) OCT image of the black mouse retina; (c) OCT image of the white mouse retina; (d) profile of each layer of the retinal OCT image

在线轮廓图的基础上进一步测量各层组织的厚度,其中①表示 IPL,②表示 INL,③表示 ONL,④表示 IS,⑤表示脉络膜血管层(IS/OS-CC),⑥表示脉络膜,测量结果如表 2 所示,小黑鼠和小白鼠各 10 组数据。对结果进行统计分析可以得出,小黑鼠的 IPL、ONL、IS 和脉络膜较厚,而小白鼠的 INL 和 IS/OS-CC 较厚。

综上所述,笔者成功搭建了基于自制宽带光谱仪

的 SD-OCT 系统,并采用该系统获取了小鼠视网膜的断层图像,图像质量良好,各层清晰可见,可用于对小鼠视网膜各层组织结构的定量分析,能够满足小鼠视网膜 OCT 成像的应用需求。

4 结 论

笔者针对基础研究中小鼠视网膜高精度成像的

表 2 小鼠视网膜各层的厚度(平均值±标准差)

Table 2 Thickness of each layer of mouse retina (mean ± standard deviation)

Layer of the retina	Thickness / μm	
	Black mouse	White mouse
IPL	70.08±2.24	65.58±2.28
INL	51.97±2.79	53.27±1.96
ONL	89.22±2.39	80.03±3.91
IS	25.01±1.65	21.73±1.12
IS/OS-CC	53.15±1.93	56.85±4.15
Choroid	38.97±8.63	28.87±8.19

需求,设计并搭建了一台基于宽带光谱仪的SD-OCT系统。笔者详细介绍了该光谱仪的设计流程,确定了所需的光学元件以及需要考虑的焦距、入射角度、入射宽度等参数,并对相关光路进行了Zemax仿真。同时,笔者也介绍了光谱数据的处理流程,并基于系统性能指标成功地对光谱仪进行了标定。在目前的光谱仪标定方法中,最常用的是使用已知光谱特性的标准光源(例如汞灯)对光谱仪进行校准,而笔者则基于OCT通用算法提出了一种实践上可行的光谱仪标定方法,通过同步优化多个深度位置采集到的镜面反射峰值和半峰全宽,在不需标准光源的情况下实现了对光谱仪参数的标定。该标定方法简单、易用。在实验数据的分析中,笔者利用光谱数据的点扩散函数进行高斯拟合,计算出的轴向分辨率最小为 $2.72\ \mu\text{m}$ (空气中),实际得到的最小轴向分辨率与理论轴向分辨率只相差 $0.25\ \mu\text{m}$ 。所搭建的SD-OCT的成像速率为 $100\ \text{kHz}$,成像深度最大为 $2.87\ \text{mm}$,在标定实验光程差($2.5\ \text{mm}$)内轴向分辨率的变化相对稳定,灵敏度下降了 $23\ \text{dB}$ 。最后,将光谱仪应用于小鼠SD-OCT视网膜成像实验,获得了高分辨率的OCT断层图像,并且成像范围内的图像质量较高,能够满足小鼠视网膜成像的需求。

参 考 文 献

- [1] Zhang P F, Zam A, Jian Y F, et al. *In vivo* wide-field multispectral scanning laser ophthalmoscopy-optical coherence tomography mouse retinal imager: longitudinal imaging of ganglion cells, microglia, and Müller glia, and mapping of the mouse retinal and choroidal vasculature[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(12): 126005.
- [2] 张鹏飞, 张廷玮, 宋维业, 等. 从小鼠视网膜多种成像方式探讨眼科光学成像技术进展[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207003. Zhang P F, Zhang T W, Song W Y, et al. Review of advances in ophthalmic optical imaging technologies from several mouse retinal imaging methods[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207003.
- [3] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [4] Schuman J S, Hee M R, Arya A V, et al. Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis[J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 1995, 6(2): 89-95.
- [5] Chinn S R, Swanson E A, Fujimoto J G. Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source[J]. *Optics Letters*, 1997, 22(5): 340-342.
- [6] Fujimoto J G. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution *in vivo* imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1361-1367.
- [7] Huang D, Hagag A, Gao S, et al. Optical coherence tomography angiography: technical principles and clinical applications in ophthalmology[J]. *Taiwan Journal of Ophthalmology*, 2017, 7(3): 115-129.
- [8] Baumgartner A, Hitzemberger C K, Sattmann H, et al. Signal and resolution enhancements in dual beam optical coherence tomography of the human eye[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 1998, 3(1): 45-54.
- [9] Fercher A F. Optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 1996, 1(2): 157-173.
- [10] Fercher A F. Optical coherence tomography-development, principles, applications[J]. *Zeitschrift Für Medizinische Physik*, 2010, 20(4): 251-276.
- [11] Izatt J A, Choma M A. Theory of optical coherence tomography [M]//Drexler W, Fujimoto J G. *Optical coherence tomography: technology and applications*. Heidelberg: Springer, 2008: 47-72.
- [12] Choma M A, Sarunic M V, Yang C H, et al. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography[J]. *Optics Express*, 2003, 11(18): 2183-2189.
- [13] Rubinoff I, Soetikno B, Miller D A, et al. Spectrally dependent roll-off in visible-light optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(9): 2680-2683.
- [14] Lee K M, Lee E J, Kim T W, et al. Comparison of the abilities of SD-OCT and SS-OCT in evaluating the thickness of the macular inner retinal layer for glaucoma diagnosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147964.
- [15] Loureiro M M, Vianna J R, Danthurebandara V M, et al. Visibility of optic nerve head structures with spectral-domain and swept-source optical coherence tomography[J]. *Journal of Glaucoma*, 2017, 26(9): 792-797.
- [16] Christoph M, Jan L, Sonja K, et al. Systematic ultrastructural comparison of swept-source and full-depth spectral domain optical coherence tomography imaging of diabetic macular oedema[J]. *The British Journal of Ophthalmology*, 2020, 104(6): 868-873.
- [17] Pinilla I, Sanchez-Cano A, Insa G, et al. Choroidal differences between spectral and swept-source domain technologies[J]. *Current Eye Research*, 2021, 46(2): 239-247.
- [18] Takusagawa H L, Hoguet A, Junk A K, et al. Swept-source OCT for evaluating the lamina cribrosa: a report by the american academy of ophthalmology[J]. *Ophthalmology*, 2019, 126(9): 1315-1323.
- [19] 屈慧, 汪毅, 姜世良, 等. 纯随机相位板散斑去相关光学相干层析成像[J]. *光学学报*, 2023, 43(1): 0111002. Qu H, Wang Y, Lou S L, et al. Speckle decorrelation optical coherence tomography using pure random phase plate[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(1): 0111002.
- [20] Carrasco-Zevallos O M, Qian R B, Gahm N, et al. Long working distance OCT with a compact $2f$ retinal scanning configuration for pediatric imaging[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(21): 4891-4894.
- [21] Cho Y J, Lee D H, Kim M. Optical coherence tomography findings predictive of response to treatment in diabetic macular edema[J]. *Journal of International Medical Research*, 2018, 46(11): 4455-4464.
- [22] Dag Seker E, Erbahceci Timur I E. COVID-19: more than a respiratory virus, an optical coherence tomography study[J]. *International Ophthalmology*, 2021, 41(11): 3815-3824.
- [23] Denk N, Maloca P M, Steiner G, et al. Retinal features in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) assessed by using scanning laser ophthalmoscopy and spectral domain optical coherence tomography[J]. *Comparative Medicine*, 2020, 70(2): 145-151.
- [24] Duggan E, Smith C A, Hooper M L, et al. Colocalization of optical coherence tomography angiography with histology in the

- mouse retina[J]. *Microvascular Research*, 2020, 132: 104055.
- [25] Sakono T, Terasaki H, Sonoda S, et al. Comparison of multicolor scanning laser ophthalmoscopy and optical coherence tomography angiography for detection of microaneurysms in diabetic retinopathy[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 17017.
- [26] Song W Y, Zhou L B, Zhang S, et al. Fiber-based visible and near infrared optical coherence tomography (vnOCT) enables quantitative elastic light scattering spectroscopy in human retina[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(7): 3464-3480.
- [27] 张佳伦. 大视场自由曲面成像光谱仪光学系统设计方法研究[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2022.
Zhang J L. Research on design method of optical system of large field of view imaging spectrometer with freeform surface[D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2022.
- [28] Lan G P, Li G Q. Design of a k -space spectrometer for ultra-broad waveband spectral domain optical coherence tomography[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42353.
- [29] Rubinoff I, Miller D A, Kuranov R, et al. High-speed balanced-detection visible-light optical coherence tomography in the human retina using subpixel spectrometer calibration[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2022, 41(7): 1724-1734.
- [30] 孙创伟, 忽满利, 高爱华, 等. 基于成像光谱仪的频域 OCT 的实验研究[J]. *光电工程*, 2009, 36(9): 76-81.
Sun C W, Hu M L, Gao A H, et al. Frequency-domain OCT based on the imaging spectrometer[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2009, 36(9): 76-81.
- [31] 王毅. 谱域 OCT 多通道光栅光谱仪研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2016.
Wang Y. Study on spectral domain OCT multi-channel grating spectrometer[D]. Hangzhou: China University of Metrology, 2016.
- [32] 于磊. 成像光谱仪的发展与应用(特邀)[J]. *红外与激光工程*, 2022, 51(1): 20210940.
- Yu L. Development and application of imaging spectrometer (Invited) [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2022, 51(1): 20210940.
- [33] 朱书缘, 吴朋翰, 鲁贞贞, 等. 应用光谱重建理论的傅里叶变换光谱仪[J]. *激光与光电子学进展*, 2023, 60(9): 0912003.
Zhu S Y, Wu P H, Lu Z Z, et al. Fourier transform spectrometer using spectral reconstruction theory[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2023, 60(9): 0912003.
- [34] Song G, Steelman Z A, Finkelstein S, et al. Multimodal coherent imaging of retinal biomarkers of Alzheimer's disease in a mouse model[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7912.
- [35] Yang S Z, Liu L W, Chang Y X, et al. *In vivo* mice brain microcirculation monitoring based on contrast-enhanced SD-OCT [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2019, 12(1): 1950001.
- [36] Son T, Wang B Q, Thapa D, et al. Optical coherence tomography angiography of stimulus evoked hemodynamic responses in individual retinal layers[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(8): 3151-3162.
- [37] Song W Y, Fu S P, Song S S, et al. Longitudinal detection of retinal alterations by visible and near-infrared optical coherence tomography in a dexamethasone-induced ocular hypertension mouse model[J]. *Neurophotonics*, 2019, 6(4): 041103.
- [38] Zhang Q X, Lu R W, Messinger J D, et al. *In vivo* optical coherence tomography of light-driven melanosome translocation in retinal pigment epithelium[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2644.
- [39] Miao Y S, Song J, Hsu D, et al. Numerical calibration method for a multiple spectrometer-based OCT system[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(3): 1685-1701.
- [40] Wan M M, Liang S S, Li X Y, et al. Balanced detection spectral-domain optical coherence tomography with a single line-scan camera[J]. *Optics Express*, 2022, 30(2): 2578-2584.

Development of an Optical Coherence Tomography System for Mouse Retina Imaging

Dong Rongyao¹, Ma Yanhong¹, Song Tianqi¹, Zhou Mingliang¹, Wang Shuai², Zhang Pengfei^{1*}

¹*School of Optoelectronic Engineering and Instrumentation Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China;*

²*Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning, China*

Abstract

Objective Optical coherence tomography (OCT) is a widely used imaging technique in retina research, with the spectrometer being a crucial component that determines the performance of spectral domain OCT (SD-OCT). While there are commercial spectrometers and systems available with a variety of options, they are often expensive and not customizable for specific light sources and applications. Thus, independently developing spectrometers and OCT systems could provide a better alternative. The calibration of a spectrometer is typically complex because it requires a standard light source, such as a mercury lamp, that must meet the specific requirements for calibration, including accurate spectral characteristics. Additionally, use of such a light source demands certain technical and operational expertise. Therefore, this paper proposes a practical calibration method for an OCT spectrometer based on a common OCT algorithm. As a result, the need for a standard light source is eliminated, and hence OCT spectrometer calibration is simpler and easier.

Methods In this study, an SD-OCT system was built, incorporating a supercontinuum laser as the laser source. The corresponding wavelength range is 800–950 nm using filters. The low coherent light emitted by the laser is split into two beams through a fiber coupler. Each beam enters the sample arm and the reference arm, respectively. In the sample arm, the light passes through a two-dimensional galvanometer, generating a scanning beam on the mouse retina in this work. The power of the beam at the mouse pupil was approximately 600 μ W, with the beam diameter of 0.93 mm. To minimize chromatic aberrations, the lenses used in both the

sample arm and reference arm were paired appropriately. The reflected beams from the sample arm and the reference arm combine and interfere on a custom-built spectrometer. The spectrometer includes a transmission grating, a line CCD camera, and other optical devices. For spectrometer calibration, a mirror is placed at the retina plane, reflecting light back to the spectrometer similar to the reference arm setup. To achieve accurate calibration and performance analysis, the optical power from both arms was adjusted using irises to achieve similar intensity. The interference fringes at different imaging depths are then captured by the camera, facilitating subsequent calibration procedures. The calibration process involves synchronously optimizing the peak value and full width at half maximum of specular reflections collected at these depth positions via manual tuning of difference parameters. Finally, OCT imaging experiments on ten mice were conducted to validate the performance of the spectrometer.

Results and Discussions The quantitative analysis results of the spectrometer are presented in Fig. 5. Figure 5(a) shows the spectral curve of the light source directly measured by the spectrometer. In Fig. 5(b), the k -value linearization curve is displayed. The spectral data obtained after Fourier transform is shown in Fig. 5(c), with the peak range of 127 dB–104 dB. To determine the corresponding relationship between CCD camera pixels and spatial distance in A-scan, the position of the peak in Fig. 5(c) was extracted and correlated with the actual moving distance of the displacement platform. The calculated relationship between pixels and actual spatial distance was determined as 2.65 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ in the air, as depicted in Fig. 5(d). The spectral data in Fig. 5(c) was further Gaussian fitted and multiplied by the above obtained relationship to determine the maximum and minimum axial resolutions in the air of the system, which are 4.14 and 2.72 μm , respectively. The axial resolution change curve remains relatively stable within the imaging range, as demonstrated in Fig. 5(e). Additionally, the sensitivity change curve [Fig. 5(f)] was realized by connecting the data peaks in Fig. 5(c) with a polygonal line. To evaluate the practical application of the spectrometer in mouse retina imaging, 1000 B-scan images were collected at the same position using the OCT system. Each B-scan comprised 1083 A-scans, with the A-scan rate of 100 kHz. The acquired image data were then aligned, averaged, and contrast-enhanced using ImageJ. The mouse retina OCT images are presented in Figs. 6(b) and 6(c). To analyze the retina's structure, the profile of each retinal layer was obtained by averaging the image in the horizontal direction, as depicted in Fig. 6(d). Based on this profile, the thickness of each layer of tissue was measured. The comparison results for the thickness of each layer of the mouse retina are detailed in Table 2, demonstrating the successful implementation and performance of the spectrometer in mouse retina imaging. As a result, valuable insights are provided regarding the retinal structure, with potential application in further research investigations.

Conclusions To address the demand for high-resolution imaging of the mouse retina in basic science research, a specific SD-OCT system was designed and constructed. The system is based on a customized broadband spectrometer. Herein, the design process of the spectrometer is introduced comprehensively, and an alternate optimization approach to its calibration is proposed based on a few key performance metrics. A notable advantage of this calibration approach is that accurate calibration of a spectrometer is achieved without relying on a standard light source. This streamlined process significantly simplifies the calibration procedure, making it more efficient and cost-effective. Overall, the method offers a practical and convenient solution for optimizing OCT systems. In conclusion, the SD-OCT system presented in this paper, with the custom broadband spectrometer and novel calibration approach, is a practical and convenient tool for achieving high-resolution imaging of the mouse retina in basic science research.

Key words medical optics; optical coherence tomography; spectrometer; calibration; retinal imaging