

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.01.02

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2021.01.02>

全视场光学相干层析技术的角膜高分辨率成像

肖鹏¹, Viacheslav Mazlin², 袁进¹

(1. 中山大学中山眼科中心, 广州 510060; 2. 朗之万研究所, 法国 巴黎)

[摘要] 目的: 针对活体共聚焦显微镜(in vivo confocal microscopy, IVCN)和传统光学相干层析技术(optical coherence tomography, OCT)在人眼角膜成像各自存在成像视野小或无法细胞成像的限制, 开发具有高分辨率的非接触全视场光学相干层析系统(full-field optical coherence tomography, FFOCT), 实现活体人眼角膜细胞结构FFOCT成像。方法: FFOCT系统采用高数值孔径干燥显微物镜及高速面阵相机, 使用双相位调制图像处理方法, 实现系统高速高分辨率非接触成像。利用系统对健康人眼进行角膜各深度层的活体FFOCT成像验证其可行性。结果: 本研究团队研发了FFOCT的新型活体人眼角膜高分辨率成像系统, 实现理论平面成像分辨率 $1.7 \mu\text{m}$, 成像视野 $1.26 \text{ mm} \times 1.26 \text{ mm}$, 成像速率达275帧/s。利用该系统对正常活体人眼角膜成像实验, 在非接触情况下获取了角膜各主要结构层的高分辨率结构影像。结论: FFOCT高分辨率活体人眼角膜成像系统兼具了传统OCT的非接触、大成像视野及IVCM的细胞级别平面分辨率的优势, 将为角膜疾病的研究及临床诊疗提供全新的成像分析技术。

[关键词] 光学相干层析技术; 高分辨率; 角膜成像

High-resolution corneal imaging with full-field optical coherence tomography

XIAO Peng¹, Viacheslav Mazlin², YUAN Jin¹

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Institute Langevin, Paris, France)

Abstract **Objective:** Due to the limitations of small imaging field of view of in vivo confocal microscopy (IVCM) or the incapability of cellular imaging of traditional optical coherence tomography (OCT) in human corneal imaging, this study was designed to develop a novel high-resolution in vivo human corneal imaging system based on full-field OCT (FFOCT). **Methods:** The FFOCT system utilized a high numerical aperture air immersion microscope objective and a high-speed area array CMOS camera with two-phase modulation image processing algorithm to achieve high-speed high-resolution non-contact imaging of human cornea. To verify its feasibility, in vivo cornea

收稿日期 (Date of reception): 2020-07-01

通信作者 (Corresponding author): 肖鹏, Email: xiaopengaddis@hotmail.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81901788); 广州市科技计划项目 (202002030412)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81901788) and Guangzhou Science and Technology Program (202002030412), China.

imaging at different depth was performed on a healthy human subject. **Results:** The FFOCT system achieved a theoretical lateral imaging resolution of 1.7 μm , an imaging field of view of 1.26 mm \times 1.26 mm, and an imaging rate of 275 Hz/s. High-resolution FFOCT images of the main structural layers of cornea were achieved by imaging a healthy human cornea in vivo with this system in a non-contact way. **Conclusion:** The FFOCT human corneal imaging system combines the advantages of the non-contactness and the large imaging field of view of traditional OCT with the cellular lateral resolution of IVCN, potentially providing a new imaging system for the research and clinical diagnosis and treatment of corneal diseases.

Keywords optical coherence tomography; high-resolution; corneal imaging

角膜是位于眼球最前端的光学透明组织,是清晰视觉形成的前提与基础。角膜疾病是全球主要的致盲性眼病,每年造成150万~200万人失明,且90%以上的受影响人口生活在发展中国家^[1-3]。角膜疾病严重影响人民群众的眼健康和生活质量,是涉及民生的重大公共卫生问题和社会问题。角膜成像技术通过提供角膜的结构和功能图像,能够帮助临床医生获取更全面的疾病信息,在角膜疾病的诊断和治疗中具有无可取代的作用。发展高分辨率活体角膜成像技术,对角膜细胞结构进行更精准有效的分析,是眼科学及影像学交叉领域的重要研究问题。

目前,应用在临床活体角膜检测的传统成像技术主要有裂隙灯生物显微镜(slit lamp biomicroscopy, SLB),活体共聚焦显微镜(in vivo confocal microscopy, IVCN)和光学相干层析技术(optical coherence tomography, OCT)等。SLB是角膜临床活体检测时最常使用的非接触性成像设备,通过调节焦点和光源宽窄,形成“光学切面”,能用于观察表浅及深层的角膜病变。但是受制于光学成像原理和放大倍率,SLB的成像分辨率有限,无法观测到角膜的细胞结构^[4]。IVCN是一种逐点扫描并利用空间针孔调制来去除样品非焦点平面的散射光以提高光学分辨率和视觉对比度的临床角膜活体成像方法,它具有的微米级别高平面分辨率足以观察角膜组织中的单个细胞甚至细胞核^[5-7]。然而,受设备扫描速率和眼球运动的限制,IVCN在活体角膜高分辨率成像中的成像视野非常有限,一般不超过400 $\mu\text{m}\times$ 400 μm 。OCT是20世纪90年代初发展起来的一种新型断层成像技术^[8-9]。它利用不同组织结构对光的反射率不同,使用近红外弱相干光照射待测组织,依据光的相干性产生干涉来获得组织的断层图像,从而获得组织的内部结构形态。OCT具有非接触性、

快速成像、高探测灵敏度等特点,在角膜疾病的基础研究、临床诊断、鉴别诊断和疗效跟踪观察^[10-14]等方面被广泛应用。然而,由于传统OCT是通过检测沿光轴景深各点反射的信号来获取图像,为保证足够的成像深度,OCT一般采用数值孔径较小的显微物镜,因此传统OCT在提供具有高轴向分辨率的横断面图像的同时,无法提供具有高平面分辨率的细胞平面(en face)结构图像^[9]。

全视场光学相干层析技术(full-field optical coherence tomography, FFOCT)是OCT的一种变体。FFOCT使用宽带空间非相干光源(LED等),通过光学相干切片功能检测给定深度相干平面的反射信号,利用面阵相机(CCD/CMOS camera)直接获得大视野的二维平面图像,通过对样本沿深度进行扫描获取三维图像^[15-16]。FFOCT成像技术结合了传统OCT的非接触三维成像、大成像视野和高轴向分辨率的优势以及IVCN的高平面分辨率的特点。随着技术的发展和原始仪器的改进,FFOCT已经显示出了超越很多飞秒激光系统的分辨能力^[17]。前期研究^[18]结果证明:由于使用了空间非相干光源,FFOCT的空间分辨率不受几何相差的影响,而只降低系统的成像信噪比。随着现代医学及影像技术的发展,眼科学基础研究和角膜疾病的临床诊疗对角膜成像技术的需求正从传统形态结构成像向高分辨率结构及功能成像过渡。将FFOCT应用到活体角膜成像中,将能实现角膜的非接触性、大成像视野、高分辨率细胞成像,提供更丰富、更全面的高分辨率角膜结构和功能的信息,使医生在角膜疾病的精确诊断、精准治疗及深入的病因病理研究方面的追求得以更好的实现。

本研究针对当前角膜成像的重大需求及高分辨率活体成像技术发展趋势,创新性设计并构建活体角膜成像高分辨率FFOCT系统,采用

高数值孔径显微物镜及高速面阵相机, 实现细胞级别成像分辨率及大成像视野。通过对健康人眼活体角膜进行高分辨率FFOCT成像, 验证其临床应用价值, 为开发新一代活体高分辨率角膜成像平台奠定基础。

1 对象与方法

1.1 对象

为验证FFOCT系统在活体人眼角膜成像中的质量, 我们使用设备对1位27岁健康男性志愿受试者的角膜进行了活体角膜FFOCT成像实验。受试者自愿签署知情同意书, 所有程序符合赫尔辛基宣言(1983年)。本研究内容已获得法国人事保护委员会CPP(Comité de Protection de Personnes) Sud-Est III de Bron和国家药品和健康产品安全局ANSM(Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé)批准(批准号: 2019-A00942-55)。FFOCT成像实验前, 对受试者进行了包括裂隙灯观察、眼压测量等常规的眼科检查。FFOCT成像时, 受试者将下颌固定于颌托上, 上额紧贴颌托, 非成像眼注视视标, 保持稳定。通过调节设备高度及成像位置, 分别对受试者角膜中央各深度进行FFOCT图像采集。相机采集频率设定为550 fps, 每个成像深度通过双相位调制模式采集10张FFOCT图像。完成采集后, 10张FFOCT图像通过ImageJ的图像配准插件^[19]进行眼动导致的平面抖动配准、叠加平均后获得最终的活体角膜FFOCT图像。为了和所采集FFOCT影像作对比, 我们利用接触式IVCM设备(HRT II with Rostock cornea module; Heidelberg Engineering, GmbH)采集了受试者角膜中央不同深度的IVCM影像。

1.2 方法

1.2.1 FFOCT 活体人眼角膜成像系统光学设计

如图1所示, FFOCT活体人眼角膜高分辨率成像系统是基于林尼克干涉仪的显微镜成像系统。系统设计使用中心波长为850 nm发光二极管(Light-emitting Diode, LED, M850LP1, Thorlabs, USA)作为空间非相干宽带光源。LED的光穿过非球面聚光透镜后由立方体分光器以50:50的相等分光比分别照入FFOCT系统的样本臂(Sample arm)和参考臂(Reference arm)。在样本臂

和参考臂中, 光均通过相同的显微镜物镜分别聚集在人眼角膜和反射镜上。使用数值孔径NA=0.3的干燥显微物镜(Olympus, Japan), 在非接触成像方式下提供1.7 μm 的理论横向分辨率(瑞利标准, Rayleigh Criterion)。参考臂反射镜安装在压电制动器(piezoelectric transducer, PZT)上。系统样本臂中从人眼角膜不同深度向后散射的光信号和参考臂中反射镜反射的光信号由立体分光器重新组合通过相机聚焦透镜($f=250$, Thorlabs, USA)最后由大满阱容的CMOS面阵相机(Q-2A750-CXP, Adimec, Netherlands)检测成像。

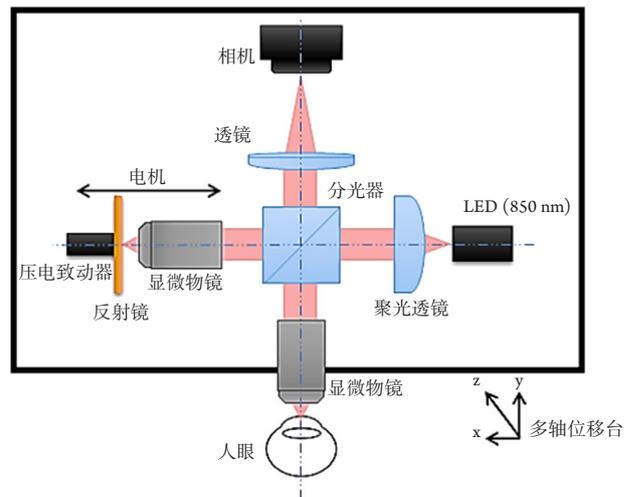


图1 FFOCT活体人眼角膜高分辨率成像系统光路设计图

Figure 1 Schematic of the in vivo human corneal imaging FFOCT system

1.2.2 FFOCT 系统光照安全评估

FFOCT系统将采用的是近红外光源, 中心波长为850 nm。由于视网膜对近红外光波的敏感度低, 患者可以轻松地观察到光照但不会造成对视网膜的光化学损伤(Photochemical damage)。针对我们系统所设计使用的光源和照明模式, 基于眼科设备光照安全标准(美标ANSI Z80.36-2016), 即使考虑长时间的连续照明模式下, 在眼底产生的视网膜照射量也远远低于标准所规定的最大允许照射量(maximum permissible exposures, MPEs):

$$E_{\text{retinal exposure}} = \sum_{380}^{1400} E_{\lambda} \times R(\lambda) \times \Delta\lambda = 49 \text{ mW/cm}^2 < 700 \text{ mW/cm}^2 = \text{MPE} \quad [1]$$

同样对于角膜的照射量及时考虑连续照明的

模式,也是低于标准所规定的MPEs的:

$$E_{\text{corneal exposure}} = \sum_{380}^{1200} E_{\lambda} \times \Delta\lambda = 2.6 \text{ W/cm}^2 < 4 \text{ W/cm}^2 = \text{MPE} \quad [2]$$

而为了提高患者在实验过程中的舒适性,系统采用的照明模式为均匀的脉冲调制模式。在相机运行频率550 fps的情况下,最终平均10张平面图来获得最终FFOCT图像,脉冲时间34 ms,暂停时间1 000 ms的调制模式。大大降低光照对角膜及视网膜的照射量,增加系统的光照安全性。

1.2.3 双相位调制 FFOCT 活体角膜图像处理

在FFOCT系统中使用的宽带空间非相干光源保证了系统的干涉仅仅发生于角膜中来自相干平面内的散射光信号。如图2所示,为了提取相干平面内的干涉信号并剔除不需要的非相干部分,系统采用了双相位调制(two-phase modulation)方案,利用位于参考臂反射镜后PZT对参考臂光程引入相位差等于 π 的光程步进调制,同时CMOS相机进行

同步图像采集原始图像 I_1, I_2 :

$$I_1 = \frac{I_0}{4} [R_{\text{inc}} + R_{\text{ref}} + 2\sqrt{R_{\text{sam}} \cdot R_{\text{ref}}} \cos(\varnothing + 0)] \quad [3]$$

$$I_2 = \frac{I_0}{4} [R_{\text{inc}} + R_{\text{ref}} + 2\sqrt{R_{\text{sam}} \cdot R_{\text{ref}}} \cos(\varnothing + \pi)] \quad [4]$$

$$I_1 - I_2 = I_0 \sqrt{R_{\text{sam}} \cdot R_{\text{ref}}} \cos \varnothing \quad [5]$$

通过对2个相机采集原始图像进行相减,由于 R_{ref} 是镜面反射为均一值, \varnothing 是随机值,所以取绝对值可以直接获得单张FFOCT的平面图像。

为提高图像质量,在同一成像深度采集处理多张平面图像,并对图像进行平均处理以获得更好的最终FFOCT图。在活体角膜成像中,为了提高系统成像幅频,改善眼动对成像质量的影响,高速CMOS相机的采样幅频为550 fps。对眼球运动造成多张图像之间的成像位置的微小差异,采用图像组的互相关处理,完成多张图像的位置的配准,最终进行平均叠加以提高FFOCT图像的信噪比。

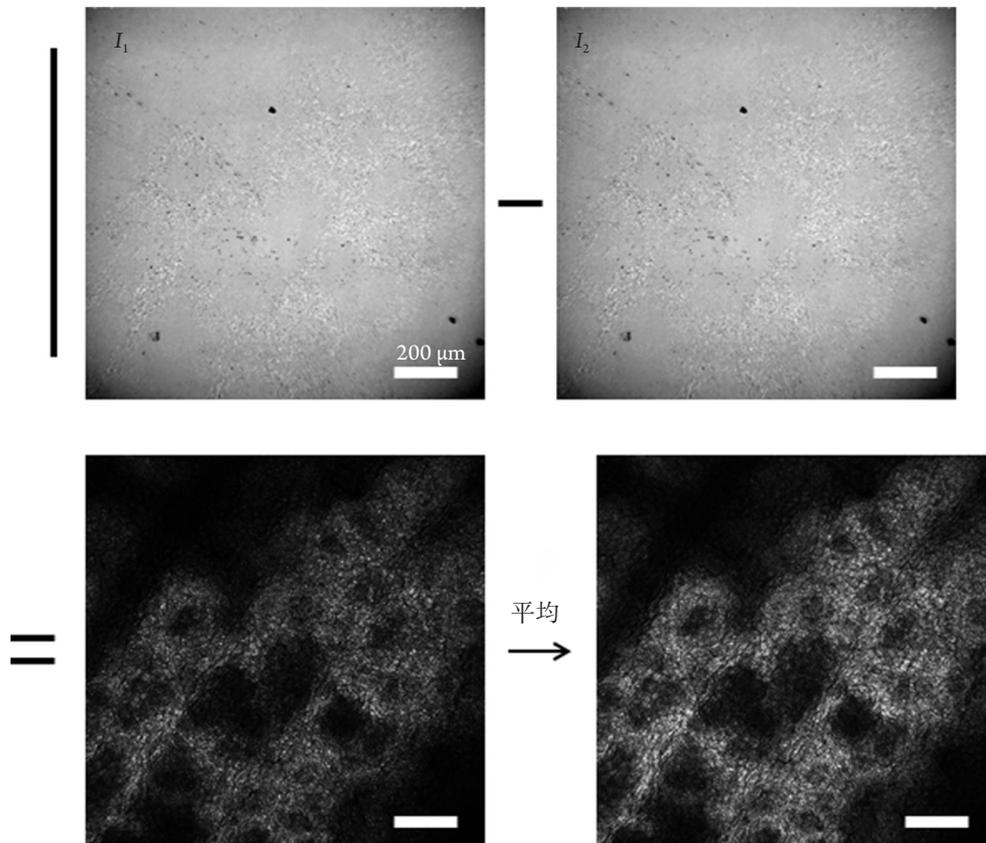


图2 FFOCT双相位调制图像处理原理图

Figure 2 FFOCT two-phase modulation image processing principle

2 结果

FFOCT活体角膜图像能清楚分辨包括泪膜、角膜上皮层、基底下神经丛神经纤维、角膜基质层基质细胞及神经、角膜内皮层内皮细胞等正常角膜结构(图3)。FFOCT上层角膜影像中,基底下神经纤维表现为高反射线型,同其在IVCM中的影像表现相似(图3A);FFOCT可以分辨出角膜上皮层结构,但是,由于泪膜及基底下神经丛

结构的高反射信号干扰,FFOCT影像暂无法区分角膜上皮鳞状细胞、翼状细胞及基底细胞结构。FFOCT在中层角膜的影像清晰的显现出角膜基质层的基质细胞结构及基质层神经节连接多跟神经纤维(图3B)。FFOCT深层角膜影像中,可见深层角膜基质细胞结构及角膜内皮高反射信号;从放大区域的FFOCT角膜内皮影像中,可以清楚分辨健康角膜六边形内皮细胞结构的紧密排布(图3C)。

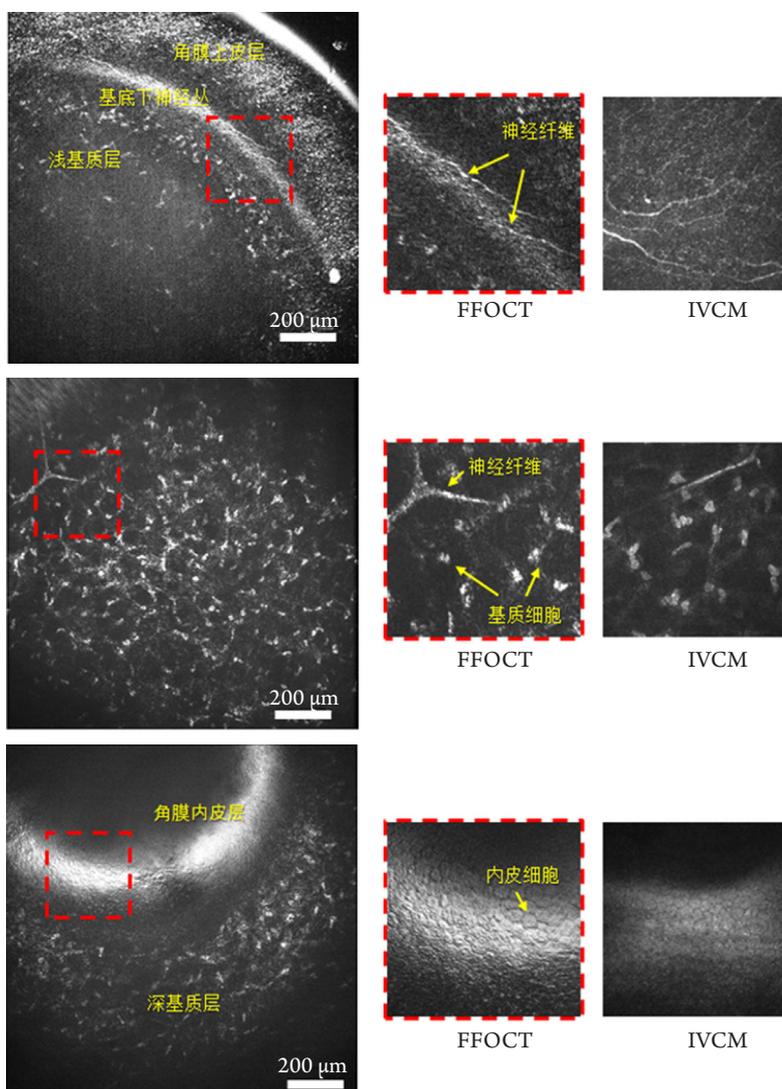


图3 FFOCT活体健康人眼角膜图像

Figure 3 FFOCT image of in vivo healthy human cornea

(A)上层角膜FFOCT图像;(B)中层角膜FFOCT图像;(C)深层角膜FFOCT图像。FFOCT成像视野: 1.26 mm × 1.26 mm; IVCM成像视野: 400 μm × 400 μm。

(A) FFOCT image of anterior cornea; (B) FFOCT image of middle cornea; (C) FFOCT image of posterior cornea. Field of view of FFOCT: 1.26 mm × 1.26 mm; field of view of IVCM: 400 μm × 400 μm.

3 讨论

本文创新性设计并构建了基于FFOCT的高分辨活体人眼角膜成像系统, 并对健康人眼角膜进行了成像实验验证其性能。针对FFOCT系统成像速度及成像质量对样本运动的敏感性问题的, 采用高数值孔径干燥显微物镜及高速面阵相机, 提高系统成像速度, 改善活体成像时眼动对成像质量影响, 实现非接触成像方式下获取活体人眼角膜的细胞级别平面分辨率FFOCT影像。FFOCT活体人眼角膜成像系统的平面分辨率为 $1.7\ \mu\text{m}$, 和目前临床使用的角膜细胞结构成像技术IVCM相当。但是与IVCM相对局限的成像视野($400\ \mu\text{m}\times 400\ \mu\text{m}$)相比, FFOCT的成像视野达到 $1.26\ \text{mm}\times 1.26\ \text{mm}$, 能够一次性获得更大范围内的角膜高分辨率结构信息。此外, FFOCT的非接触成像方式, 相比IVCM接触性的成像方式且成像前需对病患进行眼表麻醉, 降低了成像过程中角膜感染以及角膜上皮损伤的风险, 在一些特殊场景, 如角膜疾病检测和术后评估中具有一定的优势。针对后期大范围的临床应用验证, 该FFOCT高分辨率活体人眼角膜成像系统仍需要进一步优化成像采集模式, 减少单张图像所需叠加次数, 提升成像速度以期实现精准的三维成像, 在提供高分辨率平面信息的同时, 增加高分辨率纵向结构信息。

参考文献

- Oliva MS, Schottman T, Gulati M. Turning the tide of corneal blindness[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2012, 60(5): 423.
- Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(5): 614-618.
- Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*[M]. Oxford: Gulf Professional Publishing, 2005.
- Ye Y, Jiang H, Zhang H, et al. Resolution of slit-lamp microscopy photography using various cameras[J]. *Eye Contact Lens*, 2013, 39(3): 205-213.
- Villani E, Baudouin C, Efron N, et al. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside[J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(3): 213-231.
- Hau SC, Dart JK, Vesaluoma M, et al. Diagnostic accuracy of microbial keratitis with in vivo scanning laser confocal microscopy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(8): 982-987.
- Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea—a major review[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37(1): 100-117.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- Drexler W, Fujimoto JG. *Optical coherence tomography: technology and applications*[M]. Springer Science & Business Media, 2008.
- Ramos JL, Li Y, Huang D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography—a review[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37(1): 81-89.
- Wang J, Abou Shousha M, Perez VL, et al. Ultra-high resolution optical coherence tomography for imaging the anterior segment of the eye[J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2011, 42(4): S15-S27.
- Bizheva K, Tan B, MacLellan B, et al. Sub-micrometer axial resolution OCT for in-vivo imaging of the cellular structure of healthy and keratoconic human corneas[J]. *Biomed Optics Express*, 2017, 8(2): 800-812.
- Yadav R, Kottaiyan R, Ahmad K, et al. Epithelium and Bowman's layer thickness and light scatter in keratoconic cornea evaluated using ultrahigh resolution optical coherence tomography[J]. *J Biomed Opt*, 2012, 17(11): 116010.
- Dorairaj SK, Stewart MW. Clinical applications of AS-OCT for corneal disease[J]. *Focus*, 2014, 102(3):195-207.
- Beaurepaire E, Boccaro AC, Lebec M, et al. Full-field optical coherence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1998, 23(4): 244-246.
- Dubois A. *Handbook of full-field optical coherence microscopy: Technology and applications*[M]. Singapore: CRC Press, 2016.
- Ghoulali W, Grieve K, Bellefqih S, et al. Full-field optical coherence tomography of human donor and pathological corneas[J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(5): 526-534.
- Xiao P, Fink M, Boccaro AC. Full-field spatially incoherent illumination interferometry: a spatial resolution almost insensitive to aberrations[J]. *Opt Lett*, 2016, 41(17): 3920-3923.
- Template matching and slice alignment—ImageJ Plugins[EB/OL]. [2016-06-15]. <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin>.

本文引用: 肖鹏, Viacheslav Mazlin, 袁进. 全视场光学相干层析技术的角膜高分辨率成像[J]. 眼科学报, 2021, 36(1): 17-22. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.01.02
Cite this article as: XIAO Peng, Viacheslav Mazlin, YUAN Jin. High-resolution corneal imaging with full-field optical coherence tomography[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2021, 36(1): 17-22. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.01.02