รหัสโครงการ SUT1-107-55-12-43

รายงานการวิจัย

การถ่ายภาพตัดขวางสามมิติด้วยแสงเลเซอร์
(3D Optical Coherence Tomography)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-107-55-12-43

รายงานการวิจัย

การถ่ายภาพตัดขวางสามมิติด้วยแสงเลเซอร์
(3D Optical Coherence Tomography)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อ.ดร. พนมศักดิ์ มีมนต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟตอนนิกส์

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ศาสตราจารย์ ดร. ยูโวโน วิดจายา
2. อ.ดร. สุกัญญา เตชะไตรภพ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 57

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ทีมวิจัย

สิงหาคม 2557

บทคัดย่อภาษาไทย

ระบบการถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงเลเซอร์ที่เรียกว่า Optical Coherence Tomography หรือ OCT เป็นเทคโนโลยีการถ่ายภาพสามมิติความเร็วสูง ที่ให้ความละเอียดในการถ่ายภาพสูงในระดับไมโครมิเตอร์ (น้อยกว่า 10 ไมครอน) ซึ่งในปัจจุบัน OCT ได้รับการพิสูจน์และเป็นที่ยอมรับโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากทั่วโลกแล้วว่า เป็นเทคโนโลยีที่สามารถใช้ประโยชน์ในการถ่ายภาพเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยทางการแพทย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการจักษุแพทย์ ซึ่ง OCT ได้ถูกนำไปใช้ในการถ่ายภาพสามมิติของจอประสาทตา เพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคเกี่ยวกับตาหลายๆ ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้ในระยะเริ่มต้น (early detection) เช่น โรคต้อหิน และโรคตาเสื่อมในผู้ป่วยเบาหวานและในผู้สูงอายุ เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้มักจะไม่แสดงอาการที่ชัดเจนและยากต่อการตรวจพบได้ในระยะเริ่มต้น ซึ่งเป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายได้หากมีการตรวจพบอย่างทันท่วงที ในทางกลับกันหากปล่อยให้ลุกลาม ก็จะนำไปสู่ภาวะตาบอดอย่างถาวรได้

โครงการนี้มุ่งหวังที่จะพัฒนาระบบถ่ายภาพสามมิติ OCT ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีสมรรถนะทั้งในด้านความเร็วและความละเอียดในการถ่ายภาพที่สูง ในขณะเดียวกันก็จะมุ่งเน้นการออกแบบระบบให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ ระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นจะสามารถนำไปใช้ในการสนับสนุนงานวิจัยทางชีวการแพทย์ และงานวิจัยทางด้านการศึกษาคุณสมบัติเชิงแสงของวัสดุ รวมถึงงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต อีกทั้งยังสามารถใช้ระบบต้นแบบที่ได้ในการฝึกอบรมและให้ความรู้ทางเทคนิคแก่นักศึกษาและนักวิจัยในสาขาต่างๆ ที่สนใจ เช่น ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้านชีวภาพ ด้านการเกษตร ด้านเคมี ด้านการศึกษาคุณสมบัติของวัสดุ รวมถึงด้านวิศวกรรมการออกแบบระบบและซอฟแวร์ประมวลผล เป็นต้น เพื่อเป็นการกระจายองค์ความรู้ไปสู่วงกว้าง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาที่พอเพียงและยั่งยืนทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของชาติต่อไปในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Optical coherence tomography or OCT is an emerging technology that is capable of non-invasive and non-destructive three dimensional imaging of samples at high resolution and high speed. To date, OCT has found many applications, including biomedical, biology, agriculture, and material metrology. Especially, OCT has been intensively used in the field of ophthalmology to monitoring and diagnosis of retinal pathology in its early stages, in which it can be properly treated. In many developed countries in North America, Europe, and Asia, OCT becomes a common diagnostic tool in both hospital and clinic levels.

This project aims to develop an OCT prototype and develop knowledge on design, implementation, and characterization of a high performance OCT system. The system will be designed and built for better performance than most commercial OCT system but at much lower. The developed prototype will be available for other researchers, aiming for but not limited to biomedical research fields, to conduct experiments and/or collect data for their research in the form of collaboration with the development team. The laboratory will also be used to train students and other researchers in related fields. We believe that this kind of research and practice will lead to self-sufficient and sustainable science and technology development of the country.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญรูปภาพ ..... จ
บทที่ 1. บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2. วิธีดำเนินการวิจัย 4
2.1 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) 4
2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย 5
บทที่ 3. ผลการดำเนินงานวิจัย 8
3.1 การออกแบบระบบ 8
3.2 ระบบต้นแบบในระดับปฏิบัติการ 9
3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบ 11
3.3.1 ความระเอียดของการถ่ายภาพในแนวราบ (Lateral Resolution) 11
3.3.2 การสอบเทียบสเกลตามแนวลึก (Depth scale calibration method) 13
3.3.3 ความระเอียดของการถ่ายภาพในแนวลึก (Depth Resolution) 14
3.3.4 ความลึกสูงสุดของการถ่ายภาพ (Imaging Depth) 14
3.4 ตัวอย่างภาพทางชีวภาพที่ถ่ายโดยระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น 15
3.5 การเผยแพร่ผลงานวิจัยของโครงการ 17
บทที่ 4. สรุปผลการวิจัย 19
4.1 สรุปรวมผลงานวิจัย 19
4.2 ผลผลิตของงานวิจัย 20
4.3 การศึกษาวิจัยเพิ่มเติม 20
บรรณานุกรม 22
ประวัตินักวิจัย 24
ภาคผนวก ก เอกสารการเผยแพร่ผลงาน 26

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 3.1 ภาพแสดงระบบโดยรวมของต้นแบบที่พัฒนาขึ้น 8
รูปที่ 3.2 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 1 9
รูปที่ 3.3 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 2 10
รูปที่ 3.4 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 3 11
รูปที่ 3.5 ผลการทดสอบค่าความละเอียดโดยวิธี MTF measurement: (a) ภาพถ่ายจริงของ 1951 USAF test target. (b) ภาพถ่ายสามมิติของ Test target (c-e) ภาพของ Test target โดยมุมมองจากด้านบนซึ่งถูกนำไปใช้ในการหาค่าและพล็อตกราฟ MTF ใน (f). 12
รูปที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการวัดค่าแต่ละจุดบน MTF curve 12
รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของ PSF กับระยะทางที่กระจกเคลื่อนที่ไป 13
รูปที่ 3.8 การหาค่า depth resolution 14
รูปที่ 3.9 กราฟแสดง SNR dropped off ของระบบซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ความลึกสูงสุดของการถ่ายภาพได้ 15
รูปที่ 3.10 ภาพสามมิติของเปลือกนอกของหอมหัวใหญ่ 15
รูปที่ 3.11 ภาพเซลล์หัวหอมที่ระดับความลึกต่างๆ จากผิวนอก 16
รูปที่ 3.12 สามมิติของแผ่นแตงกวา 16
รูปที่ 3.13 ภาพตัดขวางของเซลล์แตงโมที่ระดับความลึกต่างกันที่ถ่ายโดยระบบต้นแบบ 17

บทที่ 1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ระบบการถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงเลเซอร์ที่เรียกว่า Optical Coherence Tomography หรือ OCT [1] เป็นเทคโนโลยีการถ่ายภาพสามมิติความเร็วสูง ที่สามารถนำไปใช้ในการถ่ายภาพตัดขวางของตัวอย่าง (sample) ชนิดต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อชีวภาพ (biological tissues) และวัสดุโปร่งแสงอื่นๆ (optical transparent materials) ระบบ OCT สามารถให้ความละเอียดในการถ่ายภาพสูงในระดับไมโครมิเตอร์ (น้อยกว่า 10 ไมครอน) และที่สำคัญคือ เป็นระบบที่ถ่ายภาพโดยใช้แสงอินฟราเรดช่วงสั้น (near infrared หรือ NIR) ซึ่งนอกจากจะสามารถถ่ายภาพตัดขวางโดยไม่ต้องทำลายวัตถุตัวอย่าง (non-destructive) แล้ว ยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใดๆ ต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (non-invasive) อีกด้วย [2, 3]

จนถึงปัจจุบัน OCT ได้รับการพิสูจน์และเป็นที่ยอมรับโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากทั่วโลกแล้วว่า เป็นเทคโนโลยีที่สามารถใช้ประโยชน์ในการถ่ายภาพเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยทางการแพทย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการจักษุแพทย์ ซึ่ง OCT ได้ถูกนำไปใช้ในการถ่ายภาพสามมิติของจอประสาทตา เพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคเกี่ยวกับตาหลายๆ ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้ในระยะเริ่มต้น (early detection) เช่น โรคต้อหิน และโรคตาเสื่อมในผู้ป่วยเบาหวานและในผู้สูงอายุ เป็นต้น [3-6] ซึ่งโรคเหล่านี้มักจะไม่แสดงอาการที่ชัดเจนและยากต่อการตรวจพบได้ในระยะเริ่มต้น ซึ่งเป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายได้หากมีการตรวจพบอย่างทันท่วงที ในทางกลับกันหากปล่อยให้ลุกลาม ก็จะนำไปสู่ภาวะตาบอดอย่างถาวรได้

ในประเทศที่พัฒนาแล้ว อย่าง อเมริกา ยุโรป และญี่ปุ่น มีการใช้งานเครื่อง OCT กันอย่างกว้างขวางทั้งในระดับโรงพยาบาล และในระดับคลินิก เพื่อการวินิจฉัย ตรวจติดตาม และป้องกันการลุกลามของความผิดปกติที่เกิดกับตาโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ ในประเทศไทยเรานั้น ก็มีจักษุคลินิกหลายๆ แห่ง ที่เล็งเห็นความสำคัญและได้นำเอา OCT เข้ามาใช้ในการประกอบการตรวจติดตามความผิดปกติของจอประสาทตา หากแต่ยังจำกัดอยู่ในวงแคบ เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีใหม่ ซึ่งต้องอาศัยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญในการใช้งานตลอดถึงการตีความผลจากภาพที่ได้ อีกทั้ง OCT ยังเป็นเทคโนโลยีที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีต้นทุนที่สูง ทั้งในแง่ของต้นทุนในระยะสั้น เช่น ราคาต่อเครื่อง โดยมีราคาเริ่มต้นโดยประมาณอยู่ที่ 4-5 ล้านบาทขึ้นไป และต้นทุนในระยะยาว เช่น การบำรุงรักษา และการปรับปรุงหรือปรับเปลี่ยนให้ทันสมัย ซึ่งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้ในการออกแบบและสร้างระบบ OCT ที่มีประสิทธิภาพ และมีการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้ไปสู่วงกว้าง เพื่อส่งเสริมให้มีการพัฒนาที่ต่อเนื่องและสอดรับกับเทคโนโลยีที่เปลี่ยนไปอย่างรวดเร็วอยู่ตลอดเวลา การพัฒนาระบบ OCT ขึ้นใช้เอง นอกจากจะทำให้สามารถเค้นเอาสมรรถภาพสูงสุดของเครื่องออกมาใช้แล้ว ยังให้ความยืดหยุ่นในการดัดแปลงและต่อเติมในภายหลัง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและฟังก์ชันในการทำงานของเครื่องให้ดียิ่งๆ ขึ้นไป

โครงการนี้มุ่งหวังที่จะพัฒนาระบบถ่ายภาพสามมิติ OCT ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีสมรรถนะทั้งในด้านความเร็วและความละเอียดในการถ่ายภาพที่สูงกว่าระบบ OCT เชิงพาณิชย์ หรือ commercial OCT ที่มีการผลิตออกมาขายโดยทั่วไป ในขณะเดียวกันก็จะมุ่งเน้นการออกแบบระบบให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ ซึ่งคาดว่าจะอยู่ที่ประมาณไม่เกิน 1 ล้านบาท ทั้งนี้ทางทีมวิจัยมุ่งหวังที่จะให้ระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น มีฟังชันก์การทำงานและประสิทธิภาพทัดเทียมกับระบบ OCT ที่ใช้ในวงการวิจัยในต่างประเทศ ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการสนับสนุนงานวิจัยทางชีวการแพทย์ และงานวิจัยทางด้านการศึกษาคุณสมบัติเชิงแสงของวัสดุ รวมถึงงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต โดยสามารถให้เป็นไปในลักษณะของความร่วมมือระหว่างทีมผู้ใช้งาน (User) และทีมพัฒนาต้นแบบ (Developer) เพื่อส่งเสริมให้ระบบที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพที่สูงยิ่งๆ ขึ้นไป อีกทั้งยังสามารถใช้ระบบต้นแบบที่ได้ในการฝึกอบรมและให้ความรู้ทางเทคนิคแก่นักศึกษาและนักวิจัยในสาขาต่างๆ ที่สนใจ เช่น ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้านชีวภาพ ด้านการเกษตร ด้านเคมี ด้านการศึกษาคุณสมบัติของวัสดุ รวมถึงด้านวิศวกรรมการออกแบบระบบและซอฟแวร์ประมวลผล เป็นต้น เพื่อเป็นการกระจายองค์ความรู้ไปสู่วงกว้าง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาที่พอเพียงและยั่งยืนทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของชาติต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อพัฒนาระบบถ่ายภาพตัดขวางสามมิติ ด้วยแสงเลเซอร์ชนิด OCT ที่มีประสิทธิภาพสูงในราคาต้นทุนที่ต่ำ
2) เพื่อเป็นการให้ความรู้และฝึกฝนทักษะแก่นักศึกษาในการออกแบบและสร้างระบบเชิงแสง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานจริงได้
3) เพื่อนำระบบต้นแบบที่ได้ไปใช้ในงานวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ เพื่อการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ และการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุด้วยระบบ OCT ต่อไป
4) เพื่อนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปใช้เป็นสื่อในการฝึกอบรมและให้ความรู้เกี่ยวกับระบบการถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงเลเซอร์แก่นักศึกษาและบุคคลภายนอกที่สนใจ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้ เน้นที่การออกแบบและสร้างต้นแบบระบบถ่ายภาพตัดขวางด้วยแสงอินฟราเรดที่เรียกว่า Optical Coherence Tomography หรือ OCT ที่สามารถถ่ายภาพตัดขวางแบบสามมิติด้วยความเร็วสูง ของวัสดุตัวอย่างทั่วๆไปได้ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นระบบถ่ายภาพสามมิติ OCT ในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งมีความยืดหยุ่นในการปรับเปลี่ยนตามการใช้งานที่แตกต่างกันออกไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นโครงการงานวิจัยนี้คือ ต้นแบบระบบถ่ายภาพแบบสามมิติด้วยแสงอินฟราเรด ซึ่งสามารถถ่ายภาพตัวอย่างทางชีวภาพได้ที่ความเร็วสูงกว่า 50 ภาพต่อวินาที มีความละเอียดของการถ่ายภาพในระดับ 10 ไมโครมิเตอร์ และสามารถถ่ายภาพแบบสามมิติได้ภายในเวลาไม่ถึง 30 วินาที ซึ่งปัจจุบันระบบต้นแบบดังกล่าวตั้งอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการเชิงแสงของสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟตอนนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งในปัจจุบัน ได้เริ่มเปิดโอกาสให้นักวิจัยในสาขาวิชาต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้เข้ามาศึกษาดูงานและประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพบ้างแล้ว

นอกจากนี้ ผลของงานวิจัยครั้งนี้ได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมเชิงวิชาการระดับนานาชาติแล้ว 1 ครั้ง ในงานประชุมเชิงวิชาการระดับประเทศ 1 ครั้ง รวมถึงมีการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบบทความเต็มแล้ว 2 บทความ (รายละเอียดดังภาคภนวก ก) อีกทั้ง ผลของงานวิจัยครั้งนี้จะได้ถูกนำไปศึกษาต่อเพื่อเพิ่มองค์ความรู้ในแง่มุมอื่นๆ รวมถึงการปรับปรุงระบบต้นแบบให้มีประสิทธิภาพยิ่งๆ ขึ้นไปในอนาคต

บทที่ 2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature)

Optical Coherence Tomography (OCT) ถือได้ว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ถูกคิดค้นขึ้นในปี ค.ศ. 1991 โดยทีมนักวิจัยของ MIT ซึ่งนำทีมโดย James Fujimoto [1] OCT เป็นเทคนิคของการถ่ายภาพตัดขวาง (tomography) โดยอาศัยคุณสมบัติ low temporal coherence ของคลื่นแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นแบบกว้าง (broadband light source) [7] ในปัจจุบัน OCT ได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ด้านการแพทย์[8-10] ด้านชีววิทยา[11-13] ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [14] และด้านการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุ [15, 16] เป็นต้น

หลักการทำงานของ OCT สามารถอธิบายโดยสังเขปได้ดังนี้ แสงจาก broadband laser จะถูกลำเลียงเข้าสู่ระบบการแทรกสอดของแสง ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็นระบบแทรกสอดแบบไมเคลสัน (Michelson interferometer) ในระบบแทรกสอดแสงไมเคลสัน แสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นแสงอ้างอิง (reference beam) ซึ่งจะถูกสะท้อนกลับด้วยกระจก (reference mirror) และลำเลียงต่อไปยังอุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มแสง (photodetector) ที่เอาท์พุตของระบบแทรกสอด แสงส่วนที่สองจะถูกโฟกัสด้วยเลนส์ไปยังตัวอย่างที่ต้องการถ่ายภาพ ซึ่งเลนส์ตัวเดียวกันนี้ก็จะทำหน้าที่ในการรับสัญญาณที่สะท้อนกลับมาจากตัวอย่าง (backscattering light) ซึ่งเกิดจากความไม่สม่ำเสมอของค่าดัชนีหักเหของแสงที่ตำแหน่งต่างๆ ในชิ้นตัวอย่าง (refractive index variation) แสงสะท้อนจากตัวอย่างจะถูกแทรกสอดกับแสงอ้างอิง โดยการเลื่อนตำแหน่งของกระจกใน reference arm เป็นระยะทางที่ต้องการวัด ภาพตัดขวางของตัวอย่างสร้างจากแอมปลิจูดที่แตกต่างกันของการสะท้อนที่ความลึกต่างๆ จากผิวของตัวอย่าง [17] ระบบ OCT ที่มีการสแกนของ reference beam แบบนี้ เรียกว่า Time Domain OCT (TD-OCT) ซึ่งมีข้อจำกัดในด้านของความเร็วในการถ่ายภาพ

ในเวลาต่อมา ได้มีการนำเอาความรู้เกี่ยวกับการแทรกสอดในโดเมนความถี่ [18] มาประยุกต์ใช้กับ OCT เรียกว่า Frequency Domain OCT (FD-OCT) หรือ Spectral Domain OCT (SD-OCT) [19] FD-OCT บันทึกค่าสัญญาณ spectral interference ที่เอาต์พุทของ interferometer ซึ่งมีจุดเด่นก็คือ ความไวต่อสัญญาณ และความเร็วของการวัด เนื่องจากไม่ต้องมีการสแกนของ reference beam อีกต่อไป [20-22] FD-OCT สร้างภาพตัดขวางของตัวอย่างโดยการฉายแสงเลเซอร์ชนิด broadband ให้ไปตกกระทบลงบนผิวตัวอย่าง (sample) แล้ววัดสัญญาณ spectral interference ระหว่างสัญญาณที่สะท้อนมาจากตัวอย่างและแสงอ้างอิง ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้สเปคโตรมิเตอร์เชิงแสง (optical spectrometer) ซึ่งเมื่อนำไปผ่านการแปลงแบบฟูริเยร์แล้วจะได้สัญญาณเชิงเส้นในโดเมนพื้นที่ (spatial domain) ที่เทียบได้กับความสามารถในการสะท้อนที่ระดับความลึกต่างๆ (depth-resolved reflectivity profile) ภายใต้พื้นผิวของตัวอย่าง เมื่อ

ประกอบกับการสแกนลำแสงในแนวขนานกับพื้นผิวตัวอย่าง (lateral scan) แล้ว ก็จะสามารถสร้างภาพตัดขวางในแบบ 2 มิติ และสามมิติได้ [17]

ระบบ OCT ที่จะพัฒนาขึ้นมาในโครงการนี้ เป็นระบบที่มีหลักการทำงานแบบ FD-OCT ซึ่งเป็นระบบที่สร้างภาพตัดขวางของตัวอย่างโดยการฉายแสง broadband laser ที่ความยาวคลื่นในช่วง near infrared (NIR) โดยใช้ระบบแทรกสอดแสงในใยแก้วแบบไมเคลสัน (fiber-based Michelson interferometer) และการตรวจจับสัญญาณ spectral interference ด้วย grating based optical spectrometer โดยมุ่งออกแบบให้มีทั้งความเร็วและความละเอียดในการถ่ายภาพที่สูง ในต้นทุนการสร้างที่ต่ำเมื่อเทียบกับระบบเชิงพานิชในปัจจุบัน ซึ่งระบบต้นแบบที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการให้ความรู้แก่นักศึกษาและนักวิจัยสาขาอื่นๆ ที่สนใจ การประยุกต์ใช้ระบบถ่ายภาพ 3 มิติ ที่ความละเอียดขนาดไมครอน เพื่องานวิจัยด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

ในส่วนของโครงการย่อยนี้ เน้นที่การออกแบบและสร้างระบบถ่ายภาพสามมิติแบบ OCT ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยระบบที่สร้างขึ้นเป็นในลักษณะของการนำชิ้นส่วนย่อยต่างๆ มาประกอบขึ้นเป็นอุปกรณ์แต่ละส่วนของระบบ โดยแบ่งได้เป็น 6 ส่วนหลักๆ ได้แก่

1) แหล่งกำเนิดแสง (Light source)
2) ระบบแทรกสอดแสง (Interferometer)
3) ระบบหัวถ่ายภาพ (Sample probe)
4) ระบบชดเชยการกระจายเชิงความถี่ของแสง (Dispersion compensator)
5) ระบบแบบตรวจจับสัญญาณ spectral interference
6) ระบบคอมพิวเตอร์และซอฟแวร์เพื่อการประมวลผลข้อมูล

ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละส่วนดังต่อไปนี้

1) <u>แหล่งกำเนิดแสง (Light source)</u>

แหล่งกำเนิดแสงที่เลือกใช้ในโครงการนี้เป็นชนิด superluminescent diode หรือ SLD ซึ่งมีต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับ broadband laser ชนิดอื่นๆ และยังคงให้ประสิทธิภาพที่เพียงพอต่อการถ่ายภาพ OCT โดยได้ออกแบบระบบและกำหนดคุณสมบัติของแหล่งกำเนิดแสงให้สามารถถ่ายภาพตัดขวาง 3 มิติ ที่มีความละเอียดเชิงลึก (depth resolution) อยู่ที่ประมาณน้อยกว่า 10 ไมโครมิเตอร์

2) ระบบแทรกสอดแสง (Interferometer)

ระบบแทรกสอดแสงที่เลือกใช้เป็นระบบแทรกสอดแบบไมเคลสันในใยแก้วนำแสง โดยใช้ Fiber coupler แบบสองอินพุตสองเอาต์พุต (2x2) ทำหน้าที่เป็น beam splitter แสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกลำเลียงเข้าที่ปลายด้านหนึ่งของอินพุต จากนั้นก็จะถูกแยกออกเป็นสองส่วนที่เอาต์พุต แสงส่วนหนึ่งจะถูกลำเลียงไปยัง Reference arm ของระบบ และอีกส่วนที่เหลือจะถูกลำเลียงไปยังระบบหัวถ่ายภาพ 3 มิติที่ Sample arm ทั้งนี้ ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบที่อัตราส่วนการแบ่งลำแสงสองค่า คือ 50/50 และ 90/10 เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการถ่ายภาพของตัวอย่างชนิดต่างๆ กัน ซึ่งพบว่าระบบทำงานได้ดีที่อัตราส่วนการแบ่งลำแสง 50/50

จุดสำคัญของการออกแบบและสร้างระบบแทรกสอดแสงในใยแก้วนำแสงคือการออกแบบให้ระยะทางที่แสงเดินทางในใยแก้วนำแสงของ Sample arm และ Reference arm ต่างกันให้น้อยที่สุดเพื่อลด dispersion mismatch ในระบบซึ่งส่งผลกระทบต่อความละเอียดในการถ่ายภาพ อีกทั้งต้องมีการควบคุมโพลาไรเซชันของแสงเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการแทรกสอดสูงที่สุด ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความไวในการตรวจจับสัญญาณของระบบ (system sensitivity)

3) ระบบหัวถ่ายภาพ (Sample probe)

ระบบหัวถ่ายภาพ ประกอบไปด้วย ไฟเบอร์คอลลิเมเตอร์ (fiber collimator) ระบบสแกนลำแสงสองมิติ และเลนส์สำหรับการโฟกัสลำแสงไปที่ตัวอย่าง (focusing optics) โดยเลือกใช้ระบบสแกนลำแสง แบบ galvanometer mirror ซึ่งควบคุมการทำงานด้วยระบบคอมพิวเตอร์ โดยการป้อนสัญญาณรูปคลื่นที่ต้องการให้แก่ ระบบสแกนลำแสง ผ่านอุปกรณ์แปลงสัญญาณจากดิจิตอลไปเป็นอนาล็อก (Analog-to-Digital Converter หรือ ADC) ซึ่งหัวใจสำคัญของการออกแบบหัวถ่ายภาพคือการจัดวางลำแสง (alignment) เพื่อลดความบิดเบี้ยวของรูปแบบของการสแกนลำแสง (distortion) อีกทั้งต้องมีการควบคุมความเร็วของการสแกนลำแสงให้สอดคล้องกับความเร็วในการบันทึกสัญญาณ (synchronization) โดยเน้นการออกแบบให้ระบบสามารถทำงานที่ความเร็วในการถ่ายภาพสูงสุดและให้มีความผิดเพี้ยนของรูปแบบการสแกนน้อยที่สุด

4) ระบบชดเชยการกระจายเชิงความถี่ของแสง (Dispersion compensator)

Dispersion mismatch ในระบบถ่ายภาพแบบ OCT แม้เพียงน้อยนิด ก็อาจส่งผลให้ความละเอียดของการถ่ายภาพลดลงอย่างมาก ระบบชดเชย dispersion จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ระบบชดเชย dispersion โดยมากจะถูกสร้างไว้ที่ Reference arm ของระบบแทรกสอดแสง ในโครงการนี้ ได้ออกแบบและสร้างระบบชดเชย dispersion แบบ Fourier domain optical delay-line (FDODL) ซึ่งใช้หลักการของ optical Fourier transform ในการชดเชย dispersion mismatch ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระบบ ซึ่ง FDODL มีจุดเด่นในเรื่องของความยืดหยุ่นในการปรับเปลี่ยนและใช้งาน

5) ระบบแบบตรวจจับสัญญาณ spectral interference

ความเร็วในการตรวจจับและบันทึกสัญญาณ Spectral interference เป็นส่วนที่จะกำหนดความเร็วในการถ่ายภาพของระบบ FD-OCT ที่จะสร้างขึ้น ในโครงการนี้เราใช้ระบบสเปคโตรมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นในอีกโครงการหนึ่ง ภายใต้ชุดโครงการเดียวกันนี้ เป็นตัวบันทึกสัญญาณ

6) ระบบคอมพิวเตอร์และซอฟแวร์เพื่อการประมวลผลข้อมูล

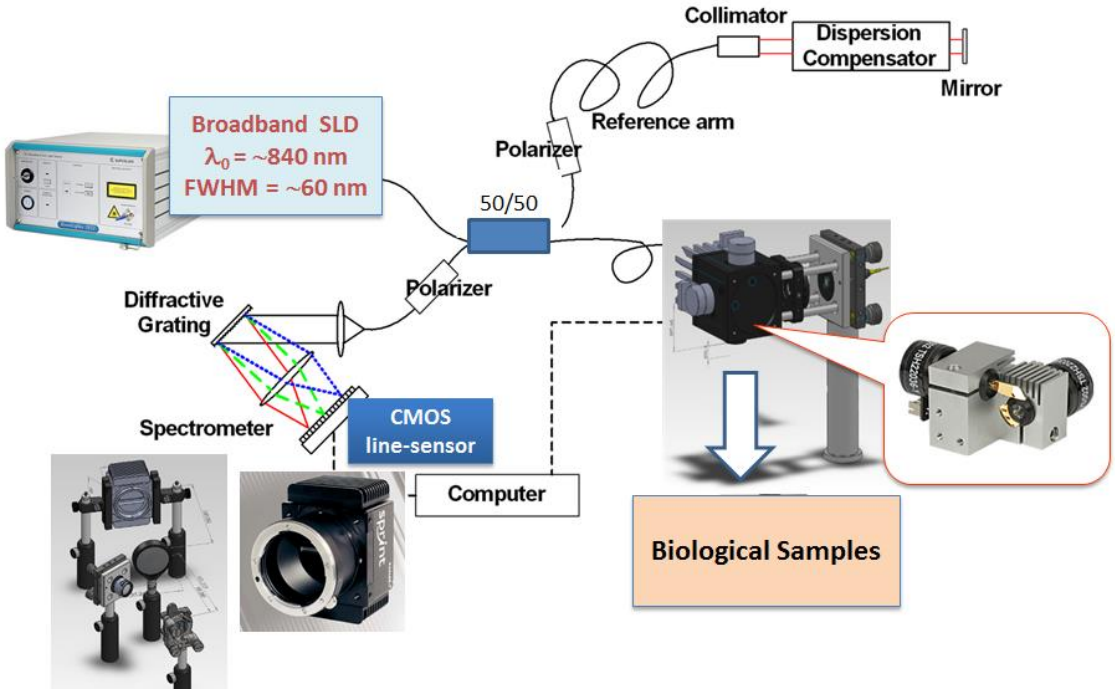
ด้วยระบบการถ่ายภาพ 3 มิติ ที่ความเร็วสูง จำเป็นต้องมีการบันทึกและส่งถ่ายข้อมูลจำนวนมากจากสเปคโตรมิเตอร์ไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อการประมวลผล คอมพิวเตอร์ที่ใช้จึงต้องมีหน่วยความจำที่เพียงพอในการประมวลผลข้อมูล ทั้งนี้ระบบซอฟท์แวร์ที่ใช้ในการควบคุมการเก็บข้อมูลและการประมวลผลสัญญาณตลอดจนระบบ Graphic User Interface สำหรับระบบต้นแบบได้ถูกพัฒนาขึ้นภายใต้ระบบโปรแกรม Labview

ทั้งนี้ เมื่อสร้างระบบต้นแบบเสร็จสิ้นสมบูรณ์แล้ว ทีมวิจัยได้ตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของระบบ โดยรวมได้แก่ ความละเอียดในการถ่ายภาพ ความเร็วของการถ่ายภาพ และความลึกสูงสุดของการถ่ายภาพของระบบต้นแบบ โดยออกแบบการทดลองและเก็บข้อมูลให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล นอกจากนี้แล้ว ยังได้ทดลองใช้ระบบในการถ่ายภาพสามมิติของตัวอย่างทางชีวภาพต่างๆ อีกด้วย

บทที่ 3. ผลการดำเนินงานวิจัย

3.1 การออกแบบระบบ

ระบบต้นแบบโดยรวมได้ถูกออกแบบภายใต้หลักการของระบบแทรกสอดแบบไมเคลสันโดยใช้ระบบใยแก้วนำแสงเป็นระบบลำเลียงแสงดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยเน้นออกแบบระบบให้มีความคล่องตัว ทันสมัย มีเสถียรภาพต่อแรงสั่นสะเทือนสูง และพยายามให้มีต้นทุนที่ต่ำที่สุด โดยต้องการให้ได้ระบบที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าในต้นทุนที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเครื่องเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้แหล่งกำเนิดแสงที่เลือกใช้เป็นแบบ Superluminescent Diode หรือ SLD ของบริษัท Superlum, Inc., Ireland ซึ่งให้แสงช่วงกว้างระหว่าง 800-900 นาโนมิเตอร์ โดยมีความยาวคลื่นเฉลี่ย 840 นาโนมิเตอร์ อุปกรณ์แบ่งลำแสงเป็น Fiber coupler ของบริษัท Thorlabs, USA ซึ่งเป็นแบบ 4 พอร์ตที่แบ่งลำแสงแบบ 50/50 ทั้งไปและกลับ ระบบสแกนลำแสงเพื่อการถ่ายภาพสามมิติถูกออกแบบโดยใช้ระบบ Dual-mirror galvanormeter beam steering หรือเรียกสั้นๆ ว่า Galvo-mirror ของบริษัท Thorlabs, USA ซึ่งมีข้อดีในด้านของการกวาดลำแสงที่ความเร็วสูงในระดับมากกว่า 100 รอบต่อวินาที ในส่วนของระบบตรวจจับสัญญาณนั้น ได้ประยุกต์ใช้เสปกโตรมิเตอร์ความเร็วสูงที่พัฒนาขึ้นในโครงการย่อยที่ 2 ภายใต้ชุดโครงการเดียวกันนี้



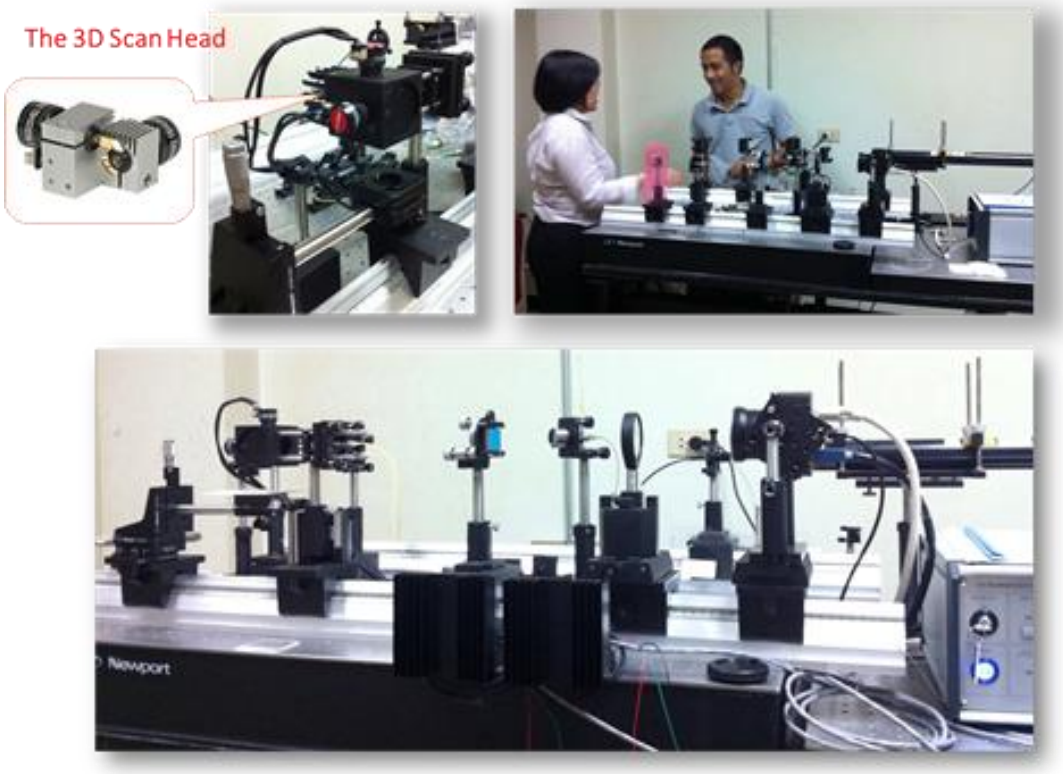
รูปที่ 3.1 ภาพแสดงระบบโดยรวมของต้นแบบที่พัฒนาขึ้น

3.2 ระบบต้นแบบในระดับปฏิบัติการ

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงในการบริหารงบวิจัย ทีมวิจัยได้แบ่งการพัฒนาระบบต้นแบบออกเป็น 3 ระยะด้วยกัน ดังนี้

ระยะที่ 1 (มิ.ย. 55 – ก.พ. 56)

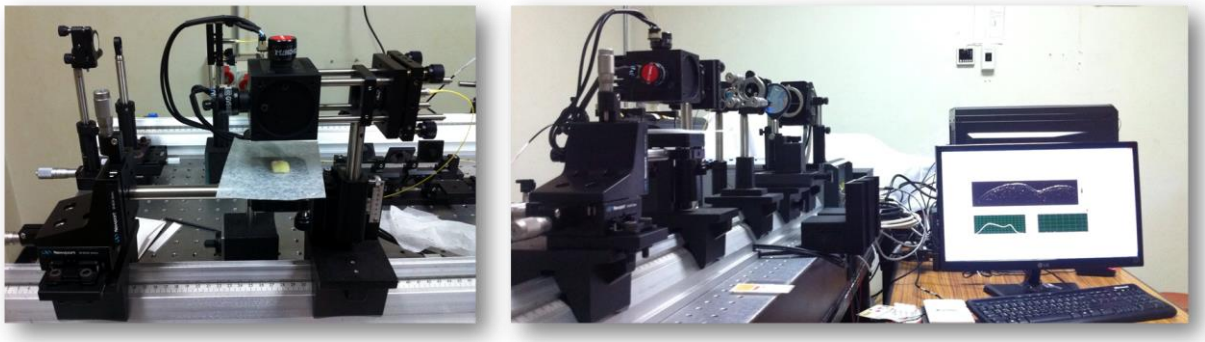
การดำเนินงานในระยะแรกนี้ เน้นการวางโครงสร้างหลักๆ ของระบบ ซึ่งได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง ระบบแทรกสอดแสง ระบบหัวถ่ายภาพแบบ 1 มิติ (ไม่มีการแสกนลำแสง) และระบบตรวจวัดสัญญาณแสงแบบ 1 มิติ (ตรวจวัดสัญญาณการแทรกสอดได้ทีละ 1 สเปกตรัม) ทั้งนี้เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของระบบในเบื้องต้น และเพื่อเป็นการฝึกฝนนักศึกษาผู้ร่วมวิจัยให้คุ้นเคยกับการจัดวาง และปรับเปลี่ยนระบบเชิงแสง ให้มากที่สุด ซึ่งมีผลการดำเนินงานดังแสดงใน รูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 1

ระยะที่ 2 (มี.ค. 56 – ต.ค. 56)

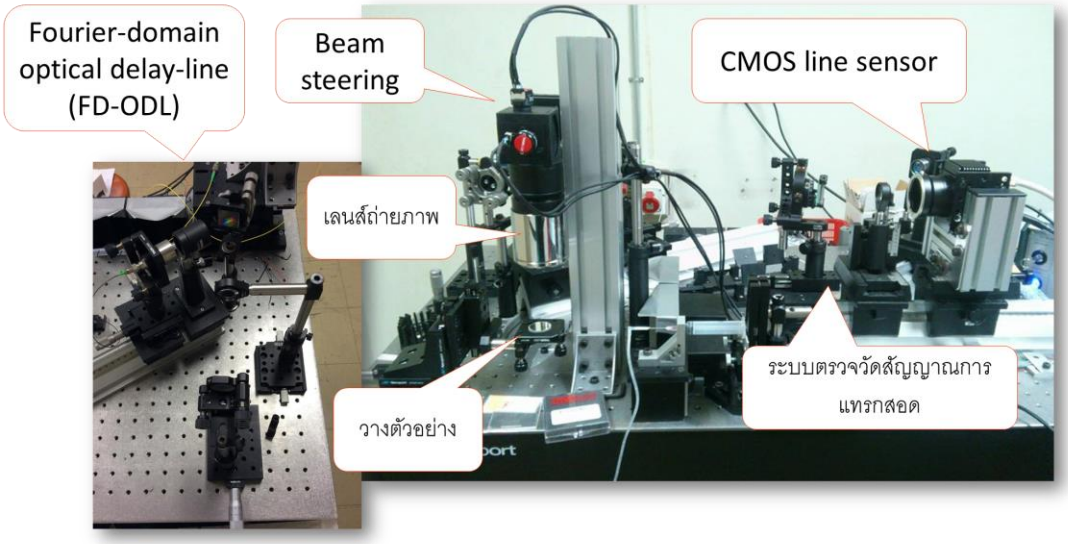
ในระยะที่ 2 ระบบหัวถ่ายภาพได้ถูกปรับปรุงให้สามารถถ่ายภาพตัดขวางแบบ 2 มิติได้ โดยสามารถถ่ายภาพได้ขนาดใหญ่ที่สุดคือ 10 mm x 10 mm ซึ่งในเฟสนี้ ทีมวิจัยได้เริ่มพัฒนาซอร์ฟแวร์เพื่อการติดต่อกับผู้ใช้ (Graphic User Interface, GUI) รวมถึงพัฒนาโปรแกรมใน Labview เพื่อควบคุมการถ่ายภาพและประมวลผลข้อมูลภาพตัดขวางแบบ 2 มิติ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งในขั้นตอนนี้ ระบบสามารถถ่ายภาพตัดขวางได้แบบทีละ 1 ภาพ ด้วยความเร็วประมาณ 3 ภาพต่อวินาที มีความละเอียดของภาพที่ถ่ายได้อยู่ที่ประมาณ 20 ไมโครมิเตอร์



รูปที่ 3.3 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 2

ระยะที่ 3 (พ.ย. 56 – มิ.ย. 57)

ในระยะสุดท้ายของการพัฒนาต้นแบบนี้ ทีมวิจัยได้ปรับปรุงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้านความละเอียดของการถ่ายภาพของระบบโดยการเปลี่ยนเลนส์ถ่ายภาพ ซึ่งหัวถ่ายภาพที่ได้สามารถถ่ายภาพได้มุมมองกว้างกว่าเดิมกว่าสามเท่า นั่นคือเป็น 30 mm x 30 mm และให้ Lateral resolution ที่ 15 ไมครอน ในส่วนของความละเอียดเชิงลึก (depth resolution) ก็ได้รับการปรับปรุงโดยการออกแบบและสร้างระบบชดเชย dispersion แบบ Fourier domain optical delay line (FD-ODL) ไว้ที่ Reference arm ของระบบ ซึ่งทำให้ได้ Depth resolution ที่ดีขึ้นจากเดิมอยู่ที่ 20 ไมครอน มาเป็น 10 ไมครอน ซึ่งนับว่าดีขึ้นจากเดิมเป็นเท่าตัว นอกจากนี้แล้ว ระบบควบคุมการถ่ายภาพก็ได้ถูกพัฒนาให้มีความเร็วเพิ่มขึ้น จนสามารถถ่ายภาพแบบ 2 มิติได้ที่ความเร็วประมาณ 50 ภาพต่อวินาที อีกทั้ง ได้เพิ่มขีดความสามารถของระบบสแกนลำแสงและระบบบันทึกสัญญาณเพื่อการถ่ายภาพแบบ 3 มิติได้อีกด้วย โดยใช้เวลาในการเก็บข้อมูล 3 มิติ 1 ชุด ในเวลาเพียง 10 วินาที



รูปที่ 3.4 ระบบต้นแบบระดับห้องปฏิบัติการระยะที่ 3

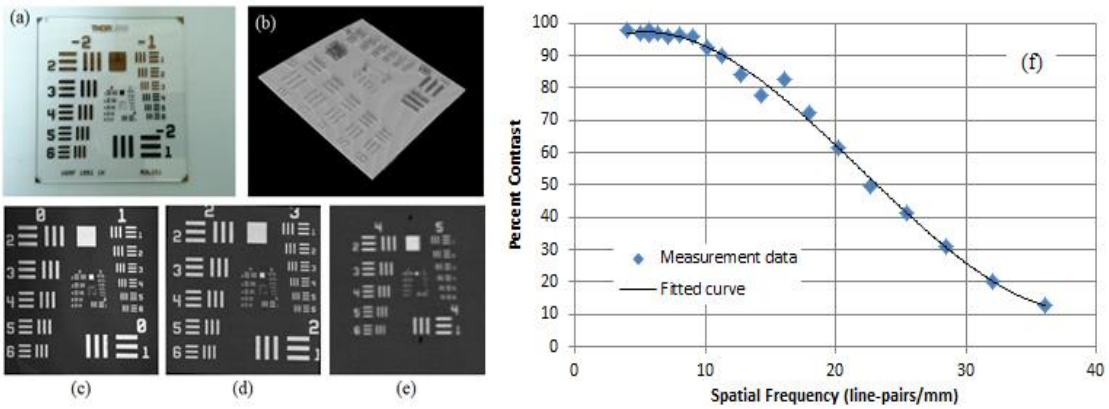
3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบ

3.3.1 ความระเอียดของการถ่ายภาพในแนวราบ (Lateral Resolution)

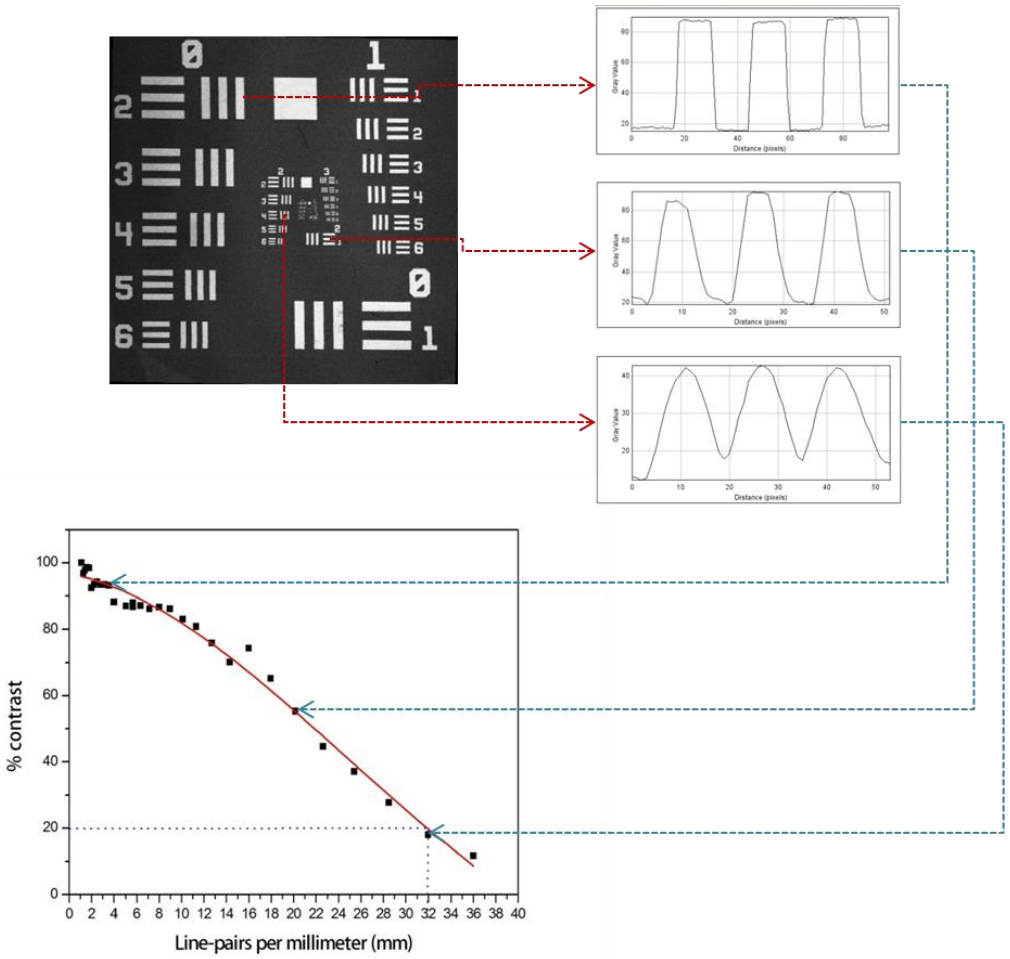
การหาค่า lateral resolution สามารถหาได้จากการถ่ายภาพ target (Positive 1951 USAF Test Target) ซึ่งจากรูปที่ 3.5(a) Resolution target จะแบ่งออกเป็น Group Number และ Element ซึ่ง Group Number จะมีค่าระหว่าง -2 ถึง 7 โดยเลขที่มีค่าน้อยจะเป็น Group ที่ใหญ่ที่สุด และ Group Number จะเป็นตัวเลขกำกับชุดของ Element ที่มีค่า 1 ถึง 6 โดยตัวเลขยิ่งมาก ขนาดความกว้างของ line pair (หมายถึงแถบขาวดำ) จะเล็กลง และขนาด lp/mm จะมากขึ้น ซึ่งเมื่อได้ภาพถ่ายของ resolution target แล้ว ทีมวิจัยได้ทำการวัดค่า gray value ของแถบมืด และแถบสว่าง ซึ่งจะได้ค่าดังในรูปที่ 3.6 จากความสัมพันธ์ของ gray value และตำแหน่งของแถบมืดสว่าง สามารถทำการคำนวณค่า %contrast ได้ ดังสมการ

$$\%contrast = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \times 100$$

จากนั้นนำค่า %contrast ของแถบมืดสว่าง แต่ล่ะความถี่ มาพลอตกราฟ MTF ได้ความสัมพันธ์ดังกราฟแสดงในรูปที่ 3.5(f)



รูปที่ 3.5 ผลการทดสอบค่าความละเอียดโดยวิธี MTF measurement: (a) ภาพถ่ายจริงของ 1951 USAF test target. (b) ภาพถ่ายสามมิติของ Test target (c-e) ภาพของ Test target โดยมุมมองจากด้านบนซึ่งถูกนำไปใช้ในการหาค่าและพล็อตกราฟ MTF ใน (f).



รูปที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการวัดค่าแต่ละจุดบน MTF curve

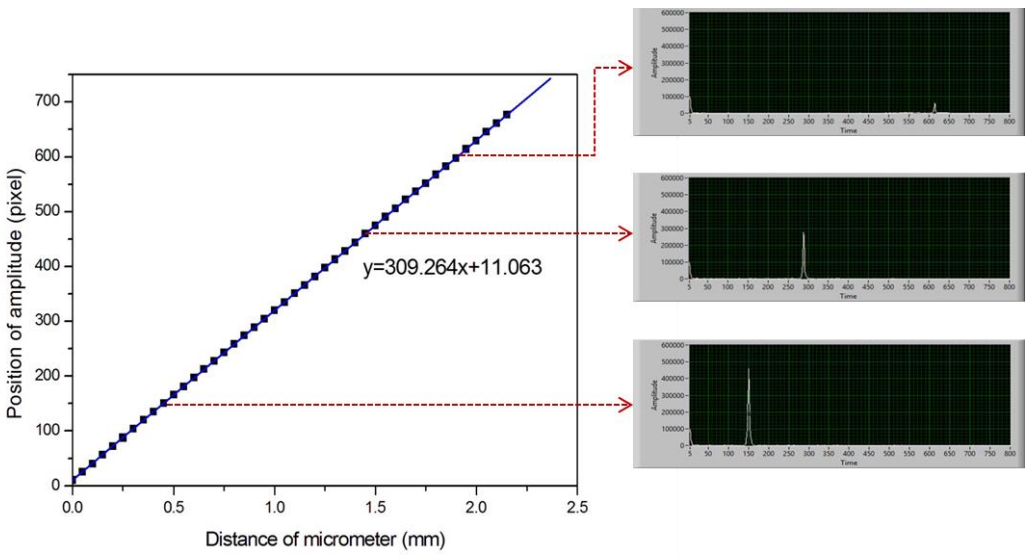
ทั้งนี้ ในการพิจารณา lateral resolution จะพิจารณาที่ 20% contrast ซึ่งจากข้อมูลที่ได้ คือค่า line-pairs per millimeter มีค่าเท่ากับ 32 line-pairs ดังนั้นค่า lateral resolution จะมีค่าเท่ากับ

$$lateral\ resolution = \frac{1mm}{2 \times 32\ line} = 15.6\ \mu m$$

3.3.2 การสอบเทียบสเกลตามแนวลึก (Depth scale calibration method)

การหาขนาดของ depth pixel สามารถทำได้โดยการวัดตำแหน่งของ PSF ของสเปกตรัมที่ได้จากการทำ Fast Fourier Transform (FFT) ของสัญญาณแทรกสอดเชิงสเปกตรัม ที่บันทึกจากระยะความลึกที่แตกต่างกันโดยให้มีการกำหนดระยะความลึกได้อย่างแม่นยำจากการปรับไมโครมิเตอร์ จากนั้นทำการพลอตกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ตำแหน่งของ PSF และระยะจากไมโครมิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 3.7 ทั้งนี้จากกราฟความสัมพันธ์สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่าง แกนตั้ง (จำนวนพิกเซล) กับแกนนอน (ระยะทางตามแนวลึก) ได้ดังสมการ $y = 309.264x + 11.063$ ดังนั้น จึงสามารถหาขนาดของ pixel จากค่าความชันของกราฟได้ดังนี้

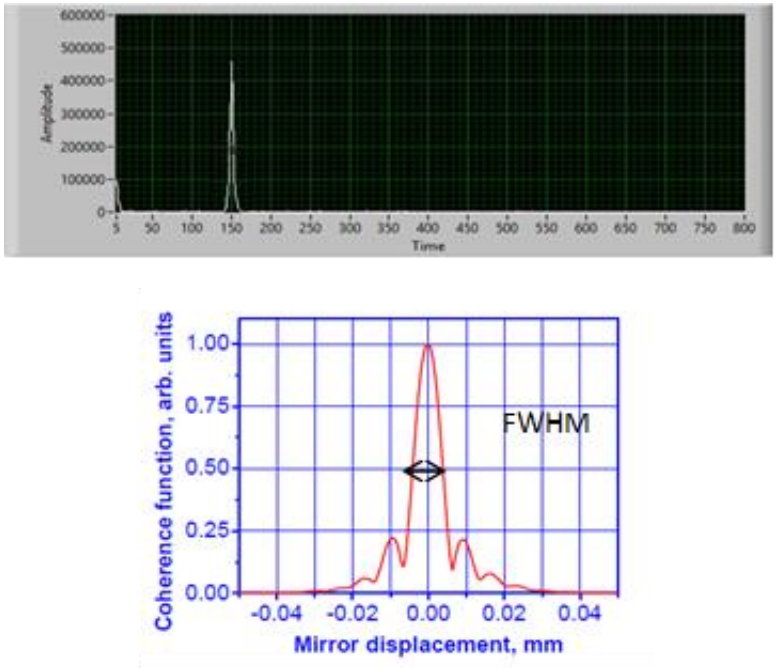
$$depth\ scale(pixel) = \frac{1}{309.264(\frac{pixel}{mm})} \approx 3\ \mu m/pixel$$



รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของ PSF กับระยะทางที่กระจกเคลื่อนที่ไป

3.3.3 ความระเอียดของการถ่ายภาพในแนวลึก (Depth Resolution)

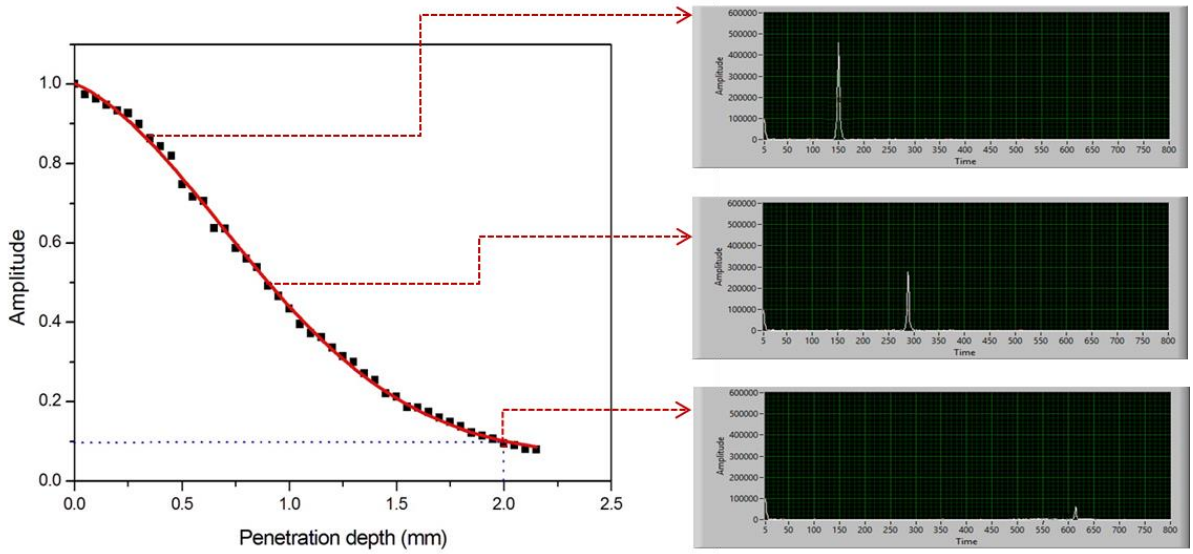
การหาค่า depth resolution สามารถพิจารณาได้จากค่า FWHM ของ PSF ที่ได้จากการวัดดังแสดงในรูปที่ 3.8 ซึ่งในการทดลองสามารถวัดค่า FWHM ได้เท่ากับ 4.7 pixel ดังนั้น จากค่า depth scale ที่วัดได้ข้างต้น จึงสามารถคำนวณหาค่า depth resolution ของระบบต้นแบบได้เป็น 4.7 pixel * 3 μm/pixel นั่นคือ จะได้ค่า depth resolution ระบบต้นแบบ 14.1 μm ในอากาศ หรือประมาณ 10 μm ในตัวอย่างชีวภาพ



รูปที่ 3.8 การหาค่า depth resolution

3.3.4 ความลึกสูงสุดของการถ่ายภาพ (Imaging Depth)

การหาค่าความลึกของการถ่ายภาพ สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของ PSF และระยะความลึก (จากการเลื่อนตำแหน่งของกระจกในส่วนอ้างอิง) ซึ่งจากความสัมพันธ์ในกราฟ จะสามารถหาค่าวามลึกของการถ่ายภาพได้จากการพิจารณาความสูงของ PSF ที่มีค่าลดลง 10 dB หรือ 10 เท่าของความสูงมากสุดของ PSF (เนื่องจากถ้าน้อยกว่า 10 dB จะไม่สามารถแยกระหว่างสัญญาณที่ต้องการและสัญญาณรบกวนได้) ซึ่งจากการความสัมพันธ์สามารถหาค่าความลึกของการถ่ายภาพได้เท่ากับ 2 mm (ในอากาศ)

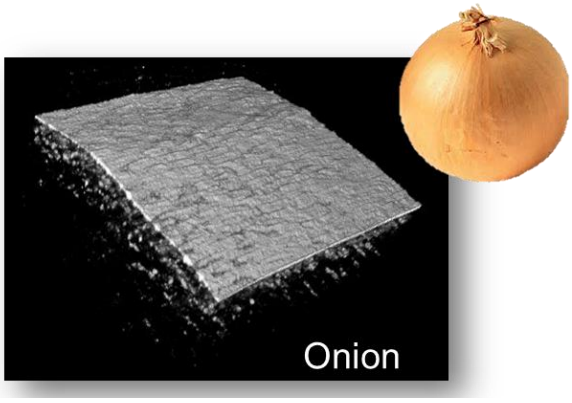


รูปที่ 3.9 กราฟแสดง SNR dropped off ของระบบซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ความลึกสูงสุดของการถ่ายภาพได้

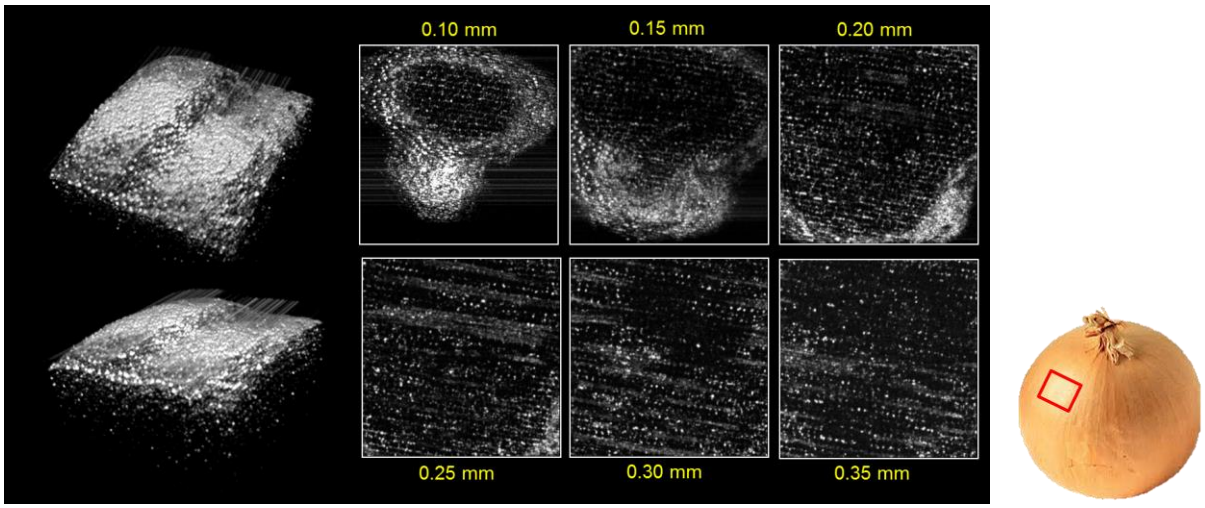
3.4 ตัวอย่างภาพทางชีวภาพที่ถ่ายโดยระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น

จุดเด่นของระบบถ่ายภาพตัดขวางสามมิติแบบ OCT คือ ความสามารถในการถ่ายภาพโดยไม่มีการสัมผัส และไม่ต้องมีการเตรียมสไลด์ รวมถึงไม่มีการใช้สารเคมีอันตรายใดๆ อีกทั้งยังใช้แสงอินฟราเรดช่วงสั้นซึ่งไม่ก่ออันตรายหรือผลข้างเคียงใดๆ กับชิ้นตัวอย่าง จึงเหมาะอย่างยิ่งต่อการถ่ายภาพตัดขวางของตัวอย่างทางชีวภาพ หรือแม้แต่ตัวอย่างที่ยังมีชีวิตอยู่

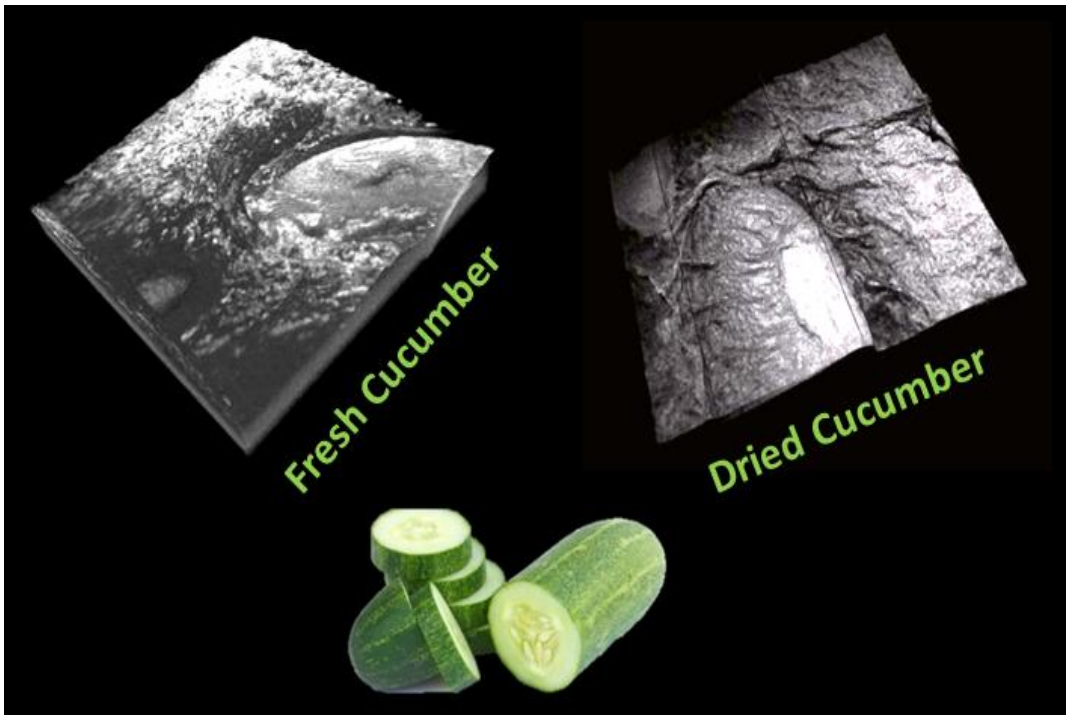
ข้อมูลภาพสามมิติที่เก็บได้โดยระบบต้นแบบ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการประมวลผลเพื่อแปลงเป็นภาพในโปรแกรม Labview ที่พัฒนาขึ้นเอง แล้วบันทึกภาพเป็นชนิด JPEG เก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ จากนั้น การวิเคราะห์ภาพที่ได้จะอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูปชื่อ ImageJ ซึ่งเปิดให้ใช้งานฟรีโดย NIH ของสหรัฐอเมริกา ซึ่งในโปรแกรมดังกล่าว ผู้ใช้สามารถดูภาพเป็นแบบ 3 มิติได้ ดังแสดงในภาพตัวอย่าง (รูปที่ 3.10-3.13)



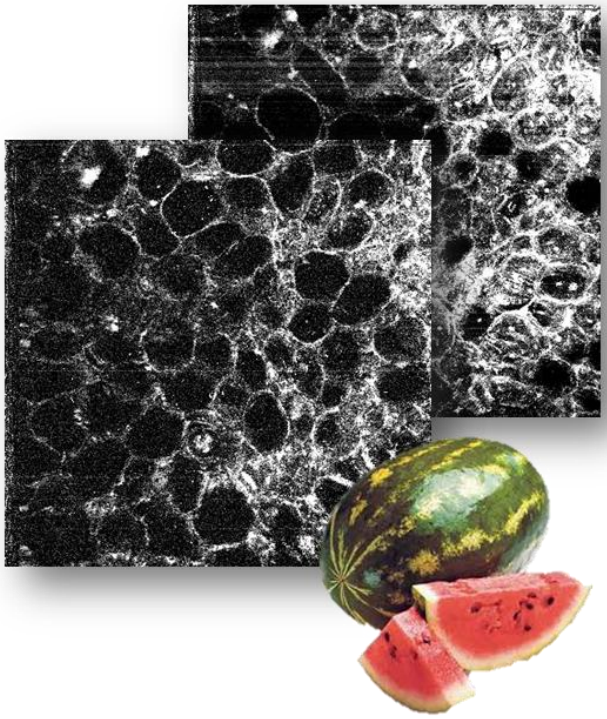
รูปที่ 3.10 ภาพสามมิติของเปลือกนอกของหอมหัวใหญ่



รูปที่ 3.11 ภาพเซลล์หัวหอมที่ระดับความลึกต่างๆ จากผิวนอก



รูปที่ 3.12 สามมิติของแผ่นแตงกวา



รูปที่ 3.13 ภาพตัดขวางของเซลล์แตงโมที่ระดับความลึกต่างกันที่ถ่ายโดยระบบต้นแบบ

3.5 การเผยแพร่ผลงานวิจัยของโครงการ

การนำเสนอผลงานในการประชุมเชิงวิชาการต่างๆ

1) นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมเชิงวิชาการระดับนานาชาติ SPIE Photonics West 2014 ในหัวข้อ “Simplified methods of design, implementation, and characterization of a spectrometer-based FD-OCT” ณ เมือง San Francisco ประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างวันที่ 1-6 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557
2) นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมเชิงวิชาการ Siam Physics Congress 2013 (SPC2013) ในหัวข้อ Spectral Domain Optical Tomography Techniques for Nondestructive Metrology of Layered Materials” ณ จ. เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 21-23 มีนาคม พ.ศ. 2556

ผลงานตีพิมพ์ใน Full-Paper Conference Proceeding (ดูรายละเอียดผลงานในภาค ผนวก ก)

1) Panomsak Meemon ; Kunakorn Palawong and Pornthep Pongchalee "Simplified methods of design, implementation, and characterization of a spectrometer-based FD-OCT", *Proc. SPIE* **8949**: *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXI*, 89491J (March 12, 2014); doi:10.1117/12.2036517;
http://dx.doi.org/10.1117/12.2036517

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารเชิงวิชาการ (ดูรายละเอียดผลงานในภาค ผนวก ก)

1) Panomsak Meemon "Development of High Speed 3D Tomographic Microscope for Non-invasive Monitoring of Biological Samples", *INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING* **6**, 26-31 (2013).

บทที่ 4. สรุปผลการวิจัย

4.1 สรุปรวมผลงานวิจัย

ในปัจจุบัน ระบบถ่ายภาพเชิงแสงสามมิติชนิด OCT ได้เข้ามามีบทบาทในงานวิจัยทางด้านชีววิทยาและชีวการแพทย์มากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจติดตามและวินิจฉัยความผิดปกติได้ในระยะต้นๆ ในประเทศไทยเรานั้น ยังขาดผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้อยู่มาก รวมถึงการขาดแคลนเครื่อง OCT ที่มีประสิทธิภาพในระดับงานวิจัย โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักคือ การพัฒนาต้นแบบระบบถ่ายภาพสามมิติเชิงแสงในระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีประสิทธิภาพสูงเทียบเท่าในระดับสากล แต่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าเครื่องที่มีขายในท้องตลาดกว่าสามเท่าตัว โดยการวิจัยเป็นไปในลักษณะของการพัฒนาองค์ความรู้ตั้งแต่การออกแบบระบบเชิงแสง ไปจนถึงการลงมือสร้างระบบในระดับห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการเชิงแสงของสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟตอนนิกส์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และยังรวมถึงการออกแบบวิธีการทดลองและเก็บข้อมูลเพื่อการตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบโดยรวม รวมถึงการทดลองใช้งานระบบเบื้องต้น ในการถ่ายภาพตัดขวางสามมิติของตัวอย่างทางชีวภาพชนิดต่างๆ

ทั้งนี้ ระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น สามารถถ่ายภาพในมุมมองสามมิติได้ที่ความละเอียดเชิงความลึก (depth resolution) ในระดับ 10 ไมโครมิเตอร์ (เทียบเท่ากับ 1/100 ของมิลลิมิเตอร์) และความละเอียดในแนวระนาบ (lateral resolution) เท่ากับ 15 ไมโครมิเตอร์ ซึ่งถือเป็นความละเอียดที่ทัดเทียมกับระบบ OCT ในระดับเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตาม ระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีความเร็วในการถ่ายภาพสามมิติที่เหนือกว่าระบบเชิงพาณิชย์กว่าเท่าตัว นั่นคือสามารถถ่ายภาพสามมิติที่ความเร็วสูงสุดถึง 50 ภาพต่อวินาที ซึ่งสามารถถ่ายภาพสามมิติของตัวอย่างชีวภาพขนาด 30 mm x 30 mm x 2 mm ได้ภายในเวลาประมาณ 10 วินาทีเท่านั้น

ระบบต้นแบบที่ได้ ยังสามารถพัฒนาต่อไปได้อีกในด้านของความละเอียด ความเร็ว และฟังก์ชันการใช้งานในอนาคต ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำต้นแบบที่ได้ไปประยุกต์ในการศึกษาวิจัยทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องได้อาทิ ทางชีววิทยา ทางเทคโนโลยีเกษตรทั้งพืชและสัตว์ และทางการแพทย์ เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันได้เริ่มเปิดโอกาสให้นักวิจัยจากสาขาอื่นๆ ทั้งในและนอกมหาวิทยาลัยได้เข้าชมและนำตัวอย่างมาทดลองถ่ายบ้างแล้ว อย่างไรก็ตาม OCT ยังถือว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ในประเทศไทย การตีความสัญญาณภาพและการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ยังต้องอาศัยการฝึกฝนและเรียนรู้ร่วมกันระหว่างทีมวิจัยผู้พัฒนาระบบและทีมนักวิจัยจากภายนอกในสาขาวิชาอื่นๆ ที่ต้องการใช้งานระบบต่อไป ทั้งนี้ OCT มีข้อได้เปรียบเทคนิคการถ่ายภาพอื่นๆ ในแง่ของความสะดวก รวดเร็วของการถ่ายภาพ มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน และสามารถถ่ายภาพสามมิติของตัวอย่างที่มีชีวิตได้โดยไม่เกิดอันตรายหรือผลข้างเคียง (Non-destructive and non-invasive) จึง

เหมาะที่ใช้ในงานที่ต้องการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หรือการติดตามและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อชีวภาพในสภาวะต่างๆ กันได้

4.2 ผลผลิตของงานวิจัย

1) ต้นแบบระบบถ่ายภาพตัดขวางแบบสามมิติความเร็วสูงชนิด OCT ในระดับห้องปฏิบัติการทดลอง จำนวน 1 ระบบ ที่มีความสามารถในการถ่ายภาพได้ละเอียดระดับ 10 ไมครอน ด้วยความเร็วในการถ่ายภาพที่เร็วกว่า 50 ภาพ ต่อวินาที
2) นักศึกษาผู้มีส่วนร่วมได้มีการพัฒนาองค์ความรู้และทักษะในการออกแบบและสร้างระบบเชิงแสงในระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 2 คน ได้แก่
   - นายคุณากร พละวงศ์ รหัส D5510146 นักศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟตอนนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   - นายพรเทพ ป้องชาลี รหัส B5422012 นักศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาวิชาวิศวกรรมโทรคมนาคม สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3) นำเสนอระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นในการประชุมเชิงวิชาการทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติ รวมทั้งสิ้นจำนวน 2 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเปิดช่องทางให้นักวิจัยในสาขาอื่นที่สนใจ ได้เข้ามามีส่วนร่วมในการใช้งานและพัฒนาระบบต่อไป
4) ผลงานการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ 1 บทความ
5) ผลงานการตีพิมพ์แบบบทความเต็ม (Full paper) ใน conference proceeding ระดับนานาชาติที่ปรากฏในฐานข้อมูลสากลของ Scopus จำนวน 1 บทความ

4.3 การศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

ทีมวิจัยมีแผนงานที่จะพัฒนาระบบต้นแบบที่ได้จากโครงการนี้ต่อไป โดยเน้นการพัฒนาระบบให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น รวมถึงการแสวงหาความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ของการประยุกต์ใช้ระบบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นในการสนับสนุนงานวิจัยทางด้านการถ่ายภาพและวิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพ การถ่ายภาพทางชีวการแพทย์ งานวิจัยทางเทคโนโลยีเกษตร รวมถึงการวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุด้วย ซึ่งมีแผนงานที่วางไว้โดยสังเขป ดังนี้

1) ทดลองใช้ระบบต้นแบบถ่ายภาพสามมิติที่พัฒนาขึ้นในการถ่ายภาพตัวอย่างทางชีวภาพ โดยเน้นสร้างความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยอื่นๆ โดยเริ่มจากงานวิจัยด้านการวิเคราะห์และตรวจติดตามโครงสร้างของเนื้อเยื่อทางชีวภาพต่างๆ ซึ่งจะรวมถึงการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ของการถ่ายภาพ และการประมวลผลสัญญาณภาพสามมิติที่ถ่ายโดยระบบต้นแบบ เป็นต้น

2) พัฒนาเทคนิคการประมวลสัญญาณที่วัดได้โดยระบบต้นแบบ เพื่อการวิเคราะห์คุณลักษณะของการไหลในระบบท่อนำส่งระดับไมโครมิเตอร์ ซึ่งคาดว่าจะสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจติดตามความผิดปกติของระบบเส้นเลือดฝอยได้
3) พัฒนาต่อเนื่องระบบหัวถ่ายภาพของต้นแบบ OCT เพื่อพัฒนาไปสู่ระบบที่สามารถถ่ายภาพจอประสาทตาแบบสามมิติที่ความเร็วสูงได้ ซึ่งคาดว่าจะสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจติดตามความผิดปกติของจอประสาทตาได้ต่อไป อีกทั้ง ยังมีประโยชน์ต่องานวิจัยขั้นสูงของการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับจอประสาทตาเสื่อมต่างๆ ได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography.* Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-1181.
2. Aguirre, A.D., et al., *High-resolution optical coherence microscopy for high-speed, in vivo cellular imaging.* Optics letters, 2003. **28**(21): p. 2064-2066.
3. White, B., et al., *In vivo dynamic human retinal blood flow imaging using ultra-high-speed spectral domain optical coherence tomography.* Optics Express, 2003. **11**(25): p. 3490-3497.
4. Wojtkowski, M., et al., *Full range complex spectral optical coherence tomography technique in eye imaging.* Optics Letters, 2002. **27**(16): p. 1415-1417.
5. Leitgeb, R., et al., *Real-time assessment of retinal blood flow with ultrafast acquisition by color Doppler Fourier domain optical coherence tomography.* Optics Express, 2003. **11**(23): p. 3116-3121.
6. Cense, B., et al., *Ultrahigh-resolution high-speed retinal imaging using spectral-domain optical coherence tomography.* Optics Express, 2004. **12**(11): p. 2435-2447.
7. Fercher, A.F., K. Mengedoht, and W. Werner, *Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light.* Optics Letters, 1988. **13**(3): p. 186-188.
8. Lee, E.C., et al., *In vivo optical frequency domain imaging of human retina and choroid.* Optics Express, 2006. **14**(10): p. 4403-4411.
9. Nelson, J.S., et al., *Imaging blood flow in human port-wine stain in situ and in real time using optical Doppler tomography.* Archives of dermatology, 2001. **137**(6): p. 741.
10. Lim, H., et al., *High-speed imaging of human retina in vivo with swept-source optical coherence tomography.* Optics Express, 2006. **14**(26): p. 12902-12908.
11. De Boer, J.F., et al., *Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography.* Optics Letters, 1997. **22**(12): p. 934-936.
12. Schmitt, J.M., S.L. Lee, and K.M. Yung, *An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue.* Optics Communications, 1997. **142**(4-6): p. 203-207.

13. Mariampillai, A., et al., *Doppler optical cardiogram gated 2D color flow imaging at 1000 fps and 4D in vivo visualization of embryonic heart at 45 fps on a swept source OCT system.* Optics Express, 2007. **15**(4): p. 1627-1638.
14. Ko, H.J., et al., *Optical coherence elastography of engineered and developing tissue.* Tissue Engineering, 2006. **12**(1): p. 63-73.
15. Kim, S., et al., *Simultaneous measurement of refractive index and thickness by combining low-coherence interferometry and confocal optics.* Optics Express, 2008. **16**(8): p. 5516-5526.
16. Lee, B., et al., *Simultaneous Measurements of Refractive Index and Thickness by Spectral-Domain Low Coherence Interferometry Having Dual Sample Probes.* Photonics Technology Letters, IEEE, 2011(99): p. 1-1.
17. Bouma, B.E. and G.J. Tearney, *Handbook of optical coherence tomography*. 2002: Marcel Dekker, Inc.
18. Born, M. and E. Wolf, *Principles of Optics, seventh expanded edition*. Cambridge, England. 1999: Cambridge University Press.
19. Fercher, A.F., et al., *Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry.* Optics Communications, 1995. **117**(1-2): p. 43-48.
20. Choma, M., et al., *Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography.* Optics Express, 2003. **11**(18): p. 2183-2189.
21. De Boer, J.F., et al., *Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography.* Optics Letters, 2003. **28**(21): p. 2067-2069.
22. Leitgeb, R., C. Hitzenberger, and A. Fercher, *Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography.* Optics Express, 2003. **11**(8): p. 889-894.
23. Lee, K.S., K.P. Thompson, and J.P. Rolland, *Broadband astigmatism-corrected Czerny–Turner spectrometer.* Optics Express, 2010. **18**(22): p. 23378-23384.
24. Schmoll, T., C. Kolbitsch, and R.A. Leitgeb, *Ultra-high-speed volumetric tomography of human retinal blood flow.* Optics Express, 2009. **17**(5): p. 4166-4176.
25. Potsaid, B., et al., *Ultrahigh speed Spectral/Fourier domain OCT ophthalmic imaging at 70,000 to 312,500 axial scans per second.* Optics Express, 2008. **16**(19): p. 15149-15169.

ประวัตินักวิจัย

ดร.พนมศักดิ์ มีมนต์ (Panomsak Meemon) เป็นอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (สาขาวิศวกรรมไฟฟ้า) จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2543 จากนั้นในปี พ.ศ. 2547 ได้รับทุนรัฐบาลซึ่งจัดสรรโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาโท (Master of Science) และปริญญาเอก (Ph.D.) ในสาขาวิชา Optics จาก College of Optics and Photonics, University of Central Florida, USA ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2553 หลังจบการศึกษาระดับปริญญาเอกแล้วได้ทำงานเป็นนักวิจัยที่ Optical Diagnostics and Applications Laboratory, Institute of Optics, University of Rochester, USA เป็นเวลา 1 ปี ก่อนมารับตำแหน่งเป็นอาจารย์ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2554 จนถึงปัจจุบัน สาขางานวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษคือ การออกแบบระบบเชิงแสง โดยเน้นการพัฒนาระบบถ่ายภาพสามมิติด้วยแสงอินฟราเรดและการประยุกต์ในเชิงชีวการแพทย์และชีววิทยา

สถานที่ติดต่อ: อาคารวิชาการ 2 ชั้น 5 ห้อง C2-537 สาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 224 544 หรือ Email: panomsak@sut.ac.th

ศาสตราจารย์ ดร. โจโวโน วิดจายา (Joewono Widjaja) เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์) จาก Satya Wacana Christian University, Indonesia (1986) และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท (Master of Engineering) และปริญญาเอก (Doctor of Engineering) ในสาขาวิชาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ จาก Hokkaido University, Japan ในปี พ.ศ. 2534 และ 2537 ตามลำดับ สาขางานวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษคือ การประมวลผลสัญญาณเชิงแสง ดิจิตอลโฮโลแกรม และมาตรวิทยาเชิงแสง

สถานที่ติดต่อ: อาคารวิชาการ 2 ชั้น 5 ห้อง C2-542 สาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ **111** ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 224 194 หรือ Email: widjaja@sut.ac.th

ดร.สุกัญญา เตชะไตรภพ (Sukanya Tachatriphop) เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต และปริญญามหาบัณฑิต (สาขาวิชาฟิสิกส์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ใน พ.ศ. 2535 และ 2538 ตามลำดับ จากนั้น ได้ไปศึกษาต่อในระดับปริญญาโท (Master of Science) และปริญญาเอก (Ph.D.) ในสาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า (ElectroPhysics: Laser Technology and Photonics) ณ University of Maryland at College Park, USA และสำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2540 และ 2545 ตามลำดับ สาขางานวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษคือ การประยุกต์ใช้เลเซอร์ในงานอุตสาหกรรม

สถานที่ติดต่อ: อาคารวิชาการ 2 ชั้น 5 ห้อง C2-541 สาขาวิชาเทคโนโลยีเลเซอร์และโฟโตนิกส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 224 543 หรือ Email: tsukanya@sut.ac.th

ภาคผนวก ก เอกสารการเผยแพร่ผลงาน

Simplified methods of design, implementation, and characterization of a spectrometer-based FD-OCT

Panomsak Meemon*, Kunakorn Palawong, and Pornthep Pongchalee
School of Laser Technology and Photonics, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 30000
*Corresponding author: panomsak@sut.ac.th

ABSTRACT

In this work, we report simple optical design of a high speed and high spectral resolution spectrometer based on the first order calculation. The spectrometer was design and optimized for high speed detection of spectral interference signal to be used as a detection unit of our developed Frequency Domain Optical Coherence Tomography (FD-OCT). We then detailed the hardware implementation of both the spectrometer and the FD-OCT system in our laboratory at Suranaree University of Technology, Thailand, by utilizing only off-the-shelf optical components. The spectrometer is capable of capturing of the spectral interference fringes at up to the camera limit of 130,000 spectra per second, enabling cross-sectional microscopic imaging of biological sample of more than 100 frames per second (for a 1000 depth scans per frame). In addition, we reported several simple yet robust techniques for characterization of the system performance in the context of FD-OCT 3D imaging, such as an effective lateral resolution, depth scale calibration, and depth penetration limit. The development of this high speed and high resolution spectrometer is part of our ultimate goal to develop a prototype of a research-grade FD-OCT system that provides better imaging speed and resolution in comparing to available commercial OCT systems at relatively lower cost. The design of low-cost, high performance FD-OCT system would make the technology widely accessible to other researchers in the field of biomedical research and related areas in Thailand in the next few years.

Keywords: optical coherence tomography, spectrometer design, characterization, MTF measurement, calibration

1. INTRODUCTION

Optical coherence tomography (OCT) [1] is a multidimensional ranging techniques that based on low-coherence interferometry (LCI). OCT takes advantage of the short coherence length of broadband light sources, which is in the order of microns, to achieve precise depth sectioning over about 1-2 mm depth in biological samples. OCT reconstructs sample structure from interference between a reference light and backscattered light from the sample and hence is capable of detection of even small fraction of backscattered light down to 10^{-6} [2]. One technique in particular that push forward the advancement of OCT is the so called frequency domain optical coherence tomography (FD-OCT) [3]. FD-OCT records spectral interference fringes at the output of an interferometer, mostly Michelson interferometer, and then Fourier transforms to obtain depth-resolved reflectivity profile along the incident beam path (i.e. axial scan, or A-scan) beneath the surface of a semi-transparent sample. In addition, two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) image can be obtained by scanning of the laser beam across the sample's surface (B-scan) allows nondestructive 2D and 3D reconstruction of sample microstructure. The main advantage is that FD-OCT obtained the whole depth profile at once. Therefore, its imaging speed is dramatically improved over the conventional Time-Domain OCT.

However, there are several challenges in FD-OCT. First, the technique possesses an auto correlation noise and complex conjugate image (or mirror image) [4, 5]. Because of the existence of the mirror image, only half of the number of pixels of the detected spectral interference signal carries unique information. Second, the motion of the sample causes blur effect so called the 'fringe washout' or 'fringe averaging' [6]. The fringe washout may limit the imaging depth of the FD-OCT system. To avoid the fringe washout, a short exposure time is demanded, which may limit the system sensitivity and image contrast. Third, for a given source bandwidth, the axial depth range (i.e. the maximum imaging depth) is determined by the spectral resolution of the system. Therefore, it is obvious that the optimization of the spectral detection unit in FD-OCT, e.g. spectrometer, is critical to obtain a high performance FD-OCT system.

In this paper, we report the development of a spectrometer-based FD-OCT system at Suranaree University of Technology, Thailand. The spectrometer was design and optimized for high spectral resolution and high speed detection of spectral interference signal aiming for 3D imaging of biological samples. Moreover, we detail the hardware

Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXI, edited by Thomas G. Brown, Carol J. Cogswell, Tony Wilson, Proc. of SPIE Vol. 8949, 89491J
© 2014 SPIE · CCC code: 1605-7422/14/$18 · doi: 10.1117/12.2036517

implementation of the system in our laboratory by utilizing only off-the-shelf optical components. The current spectrometer setup was used for high speed capturing of the spectral interference fringes at up to the camera limit of 1300,000 spectra per second, enabling cross-sectional microscopic imaging of biological sample of more than 100 frames per second (for up to 1000 depth scans per frame). In addition, we report several simple yet robust techniques for characterization of the system performance through the FD-OCT imaging. Finally, several example of 3D imaging of biological samples will be demonstrated.

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1 Spectrometer Design and Implementation

In this work, we chose a broadband super-luminescent diode (SLD) at around 800 nm wavelength region as a light source. The 800 wavelength region has advantage of providing high axial resolution at relative narrower spectral bandwidth as compared with those around 1000 nm and 1300 nm [4]. The spectrometer was designed to cover the full spectral width of an SLD light source (S-840-B-I-20, Superlum, Inc., Ireland), having a central wavelength of 840 nm and a full spectral range of about 90 nm with about 50 nm full width at half maximum (FWHM). A detector was a CMOS-based line-array sensor (spL4096-70km, Basler Vision Technologies, Germany). The line sensor consists of 4,096 elements (pixels), having a size of 10 μm × 10 μm per pixel. In this design, we aimed for the maximum imaging depth of up to 1.5 mm in tissue (i.e about 2.0 mm in air). The required effective spectral resolution for the aimed imaging depth in biological sample was computed to be about 0.063 nm as computed by using

$$z_{max} = \frac{1}{4n_g}\frac{\lambda_0^2}{\delta\lambda}$$

where n_g is the group refractive index of a sample (e.g. about 1.3 - 1.4 for most biological samples), $\delta\lambda$ is an effective spectral resolution or spectral line-width, which is determined by either the pixel size of the sensor or an optical resolution of the focusing optics of the spectrometer, whichever is larger [4, 7].

To achieve high spectral resolution, a reflective grating with a groove density of 1200 lines/mm, corresponding with a grating spacing of 0.83 μm, was chosen for the targeted spectral width of the light source. An angular dispersion was approximately about 0.1 radian or approximately 6 degrees. A commercially available large beam collimator (F810APC-842, Thorlabs) was used, which produced an incident foot-print of size about 8 mm on the grating surface. For these given parameters at hand, the focusing lens was chosen by considering a diffraction limit focus spot at the detector, i.e. $\Delta x = 1.22\lambda F/D$. Base on this approach, the focus spot of less than 10 μm (i.e. a size of 1 pixel of the sensor) will require a lens focal length of shorter than 78 mm. This will lead to a dispersion of the focal point, i.e. the separation distance between the focus spot of the shortest and longest wavelengths of the source spectrum, of approximately 7 mm, which covers about 700 pixels of the CMOS line-sensor and gives a theoretical spectral resolution of 0.06 nm. Nevertheless, without losing the spectral resolution, the number of the illuminated sensor pixels was double and hence doubling the required focal length of the spectrometer lens to about 150 mm. The use of a long focal length and hence low numerical aperture (NA) focusing lens would lead to less aberration on its focusing spot and loosen alignment constraint. The spectral resolution of an implemented spectrometer was expected to be broader than the theoretical value, accounting for aberration of the lens. The effective spectral resolution of the spectrometer governs the sensitivity fall-off characteristics of FD-OCT [8, 9].

2.2 FD-OCT Implementation

The system layout of the implemented spectrometer-based FD-OCT is shown in Fig. 1. The light source is a super luminescent diode (SLD) that emits a broad spectral light, expanding from 800 – 900 nm output wavelength. A 2x2 fiber coupler was used as a beam splitter (i.e. 50/50 power split ratio) in a fiber-based Michelson interferometer configuration. One port of the coupler was delivered a portion of light to the reference arm, consisting of an achromatic collimator, a dispersion compensator, and a silver coated mirror. The reference beam was then coupled back to the same fiber port and delivered to the detector. The other port of the coupler was connected to the sample arm optics, consisting of a collimator, a two axes galvanometer beam steering, an objective lens, and a sample holder. The backscattered light from a sample was then collected back by the same objective lens, coupled back to the fiber port, and delivered to the detector. At an output port of the coupler that connected to the spectrometer, interferences between light reflected from the

reference and sample arms occurred within the fiber. In FD-OCT, the interference was detected in frequency domain, i.e. measurement of spectral interference signal. In this system, the detector was a custom built spectrometer that was detailed in the previous section. A 3D data acquisition is achieved by a dual mirror galvanometer beam steering, which is synchronized with data capturing from the CMOS camera through a high-speed frame grabber device (PCIe-1433, National Instruments). The overall imaging speed is currently 20 frame/second for a frame size of 500 spectra/frame (i.e. about 10,000 spectra/second). The operated speed is currently limited by hardware synchronization, which will be further optimized to achieve maximum speed as provided by the camera.

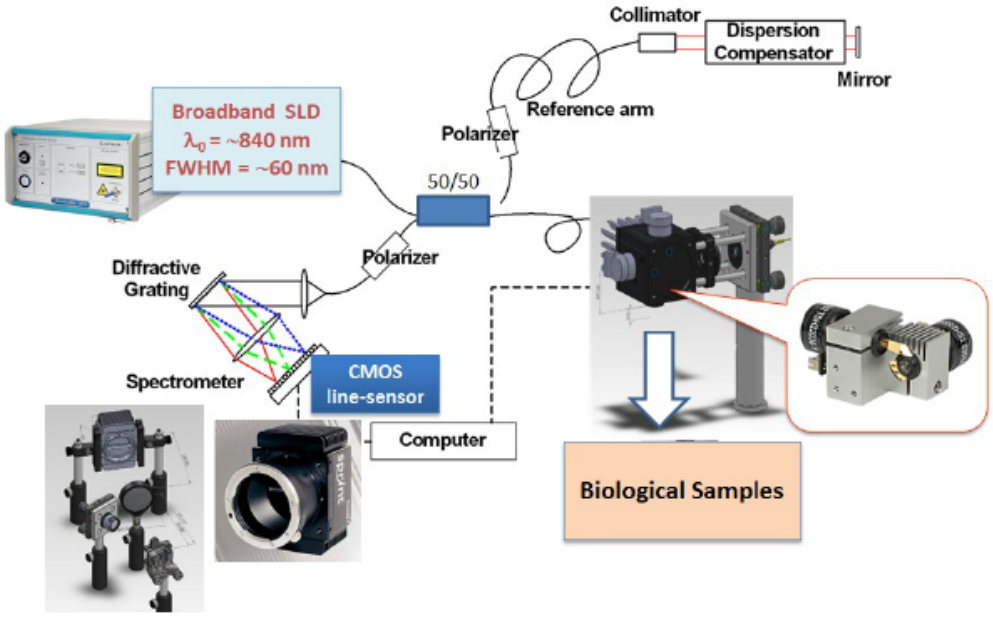


Fig. 1: The system layout of the implemented FD-OCT.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Lateral Resolution Verification

The lateral resolution of OCT is governed by an imaging optics in the sample arm and can be independently chosen and optimized to suit different applications. In the presented setup, a low numerical aperture (NA) objective lens (LSM05-BB, Thorlabs) with wide scanning field-of-view (FOV) and long depth-of-focus (DOF) was used. The objective has an effective focal length of 110 mm, a maximum lateral FOV of about 29 mm, the DOF of 1.2 mm, and a lateral resolution at the $1/e^2$ beam diameter at the focal plane of 19 um by specification. Nevertheless, an effective lateral resolution of the system can be varied, depending on the incident collimated beam size, the position of the beam along the lateral dimension and the depth (i.e. defocus effect). To quantify the effective lateral resolution, we performed a 3D imaging of a positive type 1951 USAF resolution test target as shown in Fig. 2 (a,b). From the 3D data obtained by using the implemented FD-OCT system, an *en face* image at the location of the focal plane was reconstructed using ImageJ software (NIH, USA) as shown in Fig 2(c-e). We then computed the percent contrast of several selected elements of groups number 0-5, i.e. spatial frequency up to 36 line-pairs/mm. The plot of the percent contrast versus the spatial frequency is shown in Fig. 2(f). The lateral resolution of the objective lens was computed by using a spatial frequency where the percent contrast drops by 20% of the maximum [10], which was 32 line-pairs/mm, corresponding with the lateral resolution at the focal plane of about 15.6 μm. It should be noted that this method is simple yet robust for quantification of lateral resolution of OCT system across its lateral field of view and across different depths, which will be investigated in the future.

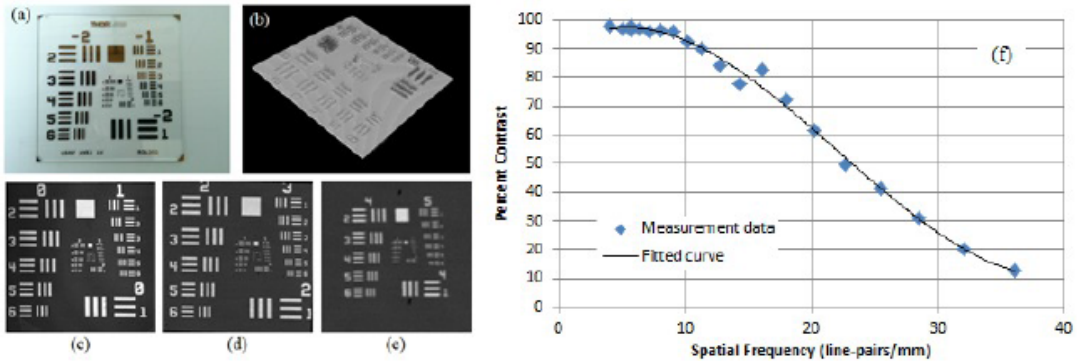


Fig. 2: Experimental results for the MTF measurement: (a) a photograph of the 1951 USAF test target. (b) 3D volumetric rendering of the target. (c-e) En face images of the target reconstructed at the focal plane of the objective at three different FOVs that cover all the groups needed to produce the MTF curve as shown in (e).

3.2 Depth Resolution and Imaging Depth Verification

Governing by an ability to resolve a spectral interference at higher frequency that corresponds with reflection from deeper scattering sites, an imaging depth range of FD-OCT will be most likely limited by an effective spectral resolution of the detection unit of the system. For imaging of weak scattering mediums such as biological samples, The depth penetration limit is usually represent by the depth range where the interference peak drops by about 10 dB as compared with the maximum interference near the location of zero optical path delay.

To verify an imaging depth limit of our system, we first performed an experiment to determine a depth scale of the system, i.e. the actual distance in air of a single depth pixel. First, a perfect reflector was place at the focal plane of the sample objective. Then, the reference mirror was place on a high precision linear translation stage equipped with a micrometer scale and discretely translated to about 20 different positions, i.e. for every 100 μm. At each position of the reference mirror, we captured a spectral interference, which then was Fourier transformed to obtain a depth profile. The location in number of depth pixels of the maximum amplitude of the depth profile was then extracted and plotted as shown in Fig. 3(a). The slope of the plot indicates a physical size of a single depth pixel of the system, which was approximately 0.0032 mm or 3.2 μm. Knowing the depth scale of the system, an axial resolution of the system was measured from the full width at half maximum (FWHM) of the depth profile to be about 8 μm. The axial resolution of the implemented system was still larger than the theoretical value of 6.2 μm [4]. The further optimization of both the spectrometer and the dispersion compensator need to be investigated to reach or approach the theoretical limit depth resolution.

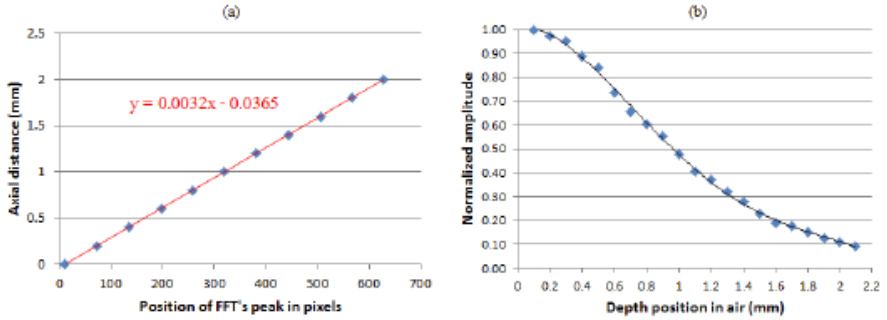


Fig. 3: Experimental results for (a) depth scale calibration of the system, showing a plot between the measure peaks positions in number of pixels versus the axial distance in micrometer as set by the motorized linear translation stage and (b) A plot of normalized peak amplitude versus depth positionin air, showing an amplitude fall-off characteristics of the system.

Furthermore, using the same set of data obtained in the depth scale calibration, the value of the maximum interference at each depth location was extracted. The plot between the maximum amplitude (y-axis) versus the depth position (x-axis) is shown in Fig. 3(b). The 10 dB amplitude roll-off is located at about 2 mm axial position in air, which serves as the depth penetration limit of the system. To obtain a deeper depth penetration, the spectrometer will need to be redesigned, e.g. larger collimate beam and/or higher NA focusing lens, which will be further investigated.

3.3 Imaging of Biological Samples

To verify the imaging performance of the system, we acquired 3D images of different biological samples using the developed FD-OCT system as shown in Fig. 4. The data acquisition and processing were performed using a custom developed Labview program. An imaging lateral FOV was set to about 20 mm × 20 mm, consisting of 1000 × 1000 depth scans per volume. The 3D volumetric rendering was performed by using Voxx software developed by the School of Medicine at Indiana University and the en face reconstruction from 3D OCT data was performed by using ImageJ software.

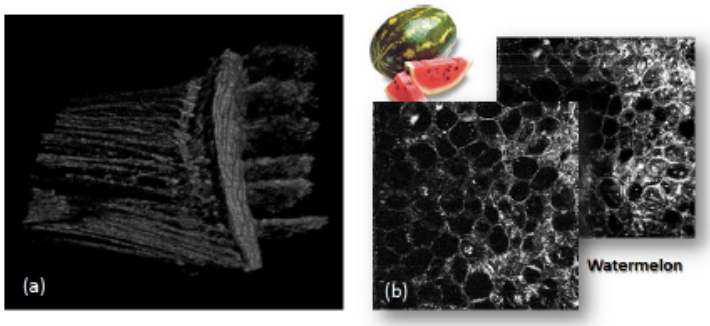


Fig. 4: Some early results of 3D images obtained by the implemented system: (a) 3D volumetric imaging of a fish gill. (b) *En face* reconstruction at different depth of a section of a watermelon.

4. SUMMARY

In summary, we reported the design, implementation, and characterization techniques of a high performance spectrometer, operating at near-infrared wavelength region, that was design and optimized for high speed detection of spectral interference signal for 3D FD-OCT applications. Several performances of the implemented FD-OCT system were assessed, such as lateral resolution, axial resolution, and depth of imaging. In addition, examples of 3D imaging of biological samples were demonstrated. The spectrometer is capable of capturing of the spectral interference fringes at up to the camera limit of 130,000 spectra per second, enabling cross-sectional microscopic imaging of biological sample of more than 100 frames per second. However, when using as the detection unit of the implemented FD-OCT, the spectral capturing speed is currently limited to about 20,000 spectra per second or about 20 frames per second, which is limited only by a triggering speed of the waveform generator used to control the galvanometer beam steering.

As part of our future works, an effective imaging speed, particularly for 3D imaging, will be improved by optimization of the scanning device and scanning protocol [11]. Furthermore, the improvement of spectral resolution of the implemented spectrometer and hence the imaging depth range of the FD-OCT by using a custom larger beam collimator for the spectrometer will be investigated. The development of this high speed and high resolution NIR spectrometer is part of our goal to develop a prototype of a research-grade FD-OCT system that provides better imaging speed and resolution in comparing to available commercial OCT systems at relatively lower cost. The design of a low-cost high performance FD-OCT system would make the technology widely accessible to other researchers in the field of biomedical research and related areas in Thailand in the next few years.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Suranaree University of Technology and the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission.

REFERENCES

1. D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography," Science **254**, 1178-1181 (1991).
2. J. P. Rolland, J. O'Daniel, C. Akcay, T. DeLemos, K. S. Lee, K. I. Cheong, E. Clarkson, R. Chakrabarti, and R. Ferris, "Task-based optimization and performance assessment in optical coherence imaging," JOSA A **22**, 1132-1142 (2005).
3. A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. Y. El-Zaiat, "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry," Optics Communications **117**, 43-48 (1995).
4. B. E. Bouma and G. J. Tearney, *Handbook of optical coherence tomography* (Marcel Dekker, Inc., 2002).
5. P. Meemon, K. S. Lee, and J. P. Rolland, "Doppler imaging with dual-detection full-range frequency domain optical coherence tomography," Biomedical Optics Express **1**, 537-552 (2010).
6. S. Yun, G. Tearney, J. De Boer, and B. Bouma, "Motion artifacts in optical coherence tomography with frequency-domain ranging," Optics Express **12**, 2977 (2004).
7. L. V. Wang and H. I. Wu, *Biomedical Optics: Principles and Imaging* (Wiley-Interscience, 2007).
8. M. Choma, M. Sarunic, C. Yang, and J. Izatt, "Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography," Optics Express **11**, 2183-2189 (2003).
9. J. F. De Boer, B. Cense, B. H. Park, M. C. Pierce, G. J. Tearney, and B. E. Bouma, "Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography," Optics Letters **28**, 2067-2069 (2003).
10. S. Murali, P. Meemon, K.-S. Lee, W. P. Kuhn, K. P. Thompson, and J. P. Rolland, "Assessment of a liquid lens enabled in vivooptical coherence microscope," Applied Optics **49**, D145-D156 (2010).
11. V. F. Duma, K. Lee, P. Meemon, and J. P. Rolland, "Experimental investigations of the scanning functions of galvanometer-based scanners with applications in OCT," Applied Optics **50**, 5735-5749 (2011).

Development of High Speed 3D Tomographic Microscope for Non-invasive Monitoring of Biological Samples

P. Meemon [1,2],

ABSTRACT

System design and implementation of a Fourier Domain Optical Coherence Tomography (FD-OCT) for microscopic flow monitoring is presented. The system is capable of capturing flow characteristics underneath the surface of biological samples at micrometer resolution. The high speed imaging capability allows for *in vivo* 3D mapping of micro-structure of biological tissues as well as their microvasculature system. An image resolution of 10 microns over 1 mm depth from the sample surface and across a 10 mm × 10 mm lateral field-of-view is possible. The capability of the developed system for monitoring of flow activity within the heart of an African frog tadpole is demonstrate. In addition, a progress in development of a high speed FD-OCT based on our custom built high speed spectrometer is presented.

Keywords: Carotid pulse, Push pull effect, Piezoelectric sensor, Tilt table, Biological Engineering

1. INTRODUCTION

To date, optical imaging technology plays an important role in medical diagnostics and treatments. It also has applications in guiding the biopsy and surgery. The main advantages of optical imaging are its high-resolution high-speed and noninvasive capability. A non-invasive, reliable and affordable cost optical imaging system with the capability of detecting early stage of pathology would be a valuable tool to use for screening or detecting pathology. Optical coherence tomography (OCT)[1] is an emerging technology that is capable of noninvasive high-speed high-resolution cross-sectional imaging of biological tissues [2]. OCT is based on low-coherence interferometry (LCI) that takes advantage of the short coherence length of broadband light sources, which is in the order of microns, to achieve precise depth sectioning in scattering media. Analogous to ultrasound imaging, OCT illuminates biological sample with broadband near infrared light beam and measured the amplitude and depth location of the backscattered light and uses it to construct a cross-sectional image that reveals structure beneath the sample surface [3]. To date, OCT has been proven and recognized by physicians as a potential tool for medical diagnostics and research. Particularly in the field of ophthalmology, OCT has been established for early detection of many retinal pathologies such as glaucoma, diabetes, and age related macular degeneration [4-6].

Since the invention of the OCT, there are various implementations of OCT techniques. One technique in particular that push forward the advancement of OCT is the Fourier-domain optical coherence tomography (FD-OCT) [7]. The fundamental principle of FD-OCT is based on coherence theory in the frequency domain [8]. FD-OCT captures spectral interference at the output of an interferometer, e.g. Michelson interferometer, and then Fourier transform to obtain depth-resolved reflectivity profile along the incident beam path beneath the surface of the sample under test. Sequentially, performing 2D scanning of the laser beam across the sample's surface allows nondestructive 3D reconstruction of sample microstructure. The main advantage over the time domain counterpart is that FD-OCT obtained the whole depth profile at once without scanning of the optical path length of the reference beam. Hence its imaging speed is dramatically improved.

Besides structural imaging, OCT is also capable of functional imaging such as bidirectional flow velocity mapping. Analogous to the flow measurement technique in Doppler ultrasonography, Doppler OCT (DOCT) is capable of *in vivo* detection of flow activity embedded beneath the surface of a fairly thick biological sample in high resolution and wide velocity dynamic range. DOCT allows visualization of tissue structure and blood flow activity that provides important information for clinical diagnostics. For example, vessel flow property is an early indicator of many retinal pathologies such as glaucoma, diabetes, and age related macular degeneration [6]. Moreover, detailed knowledge of *in vivo* blood flow under the skin surface is useful for burn-depth determination and port wine stains treatment [9]. Combining Doppler detection with FD-OCT enables imaging of microscopic flow, such as *in vivo* blood flow in capillary network, at high speed, which is particularly useful for real time flow monitoring purpose [10-12].

Manuscript received on May 28, 2013 ; revised on November 10, 2013.

[1] School of Laser Technology and Photonics, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Thailand, email: panomsak@sut.ac.th

[2] The Institute of Optics, University of Rochester, Rochester, NY 14627, USA

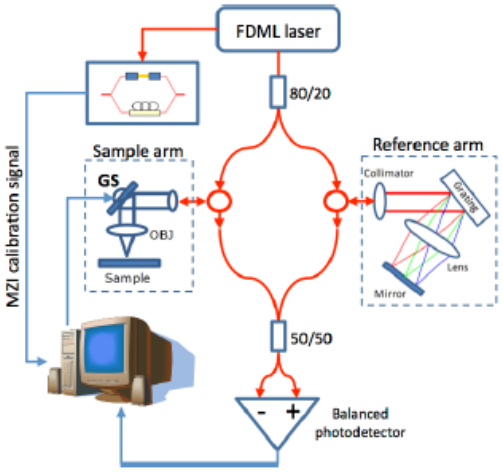


Fig.1:: System layout.

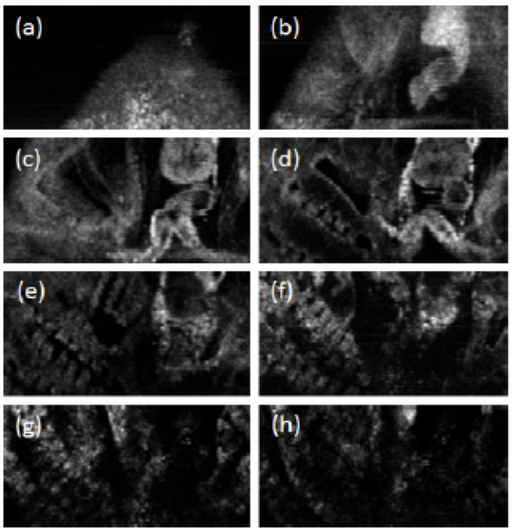


Fig.2:: Series of en face images of an African frog tadpole reconstructed from a 3D OCT dataset at every 100 μm depth locations from the sample surface.

2. MATHEMATICAL DESCRIPTION OF FD-OCT

FD-OCT is built on a concept of the detection of interference pattern of low-coherence light beam in spectral domain. A commonly used detection system is a high resolution and high speed spectrometer. Considering a system as shown in Fig. 1 for instance, a complex spectral electric field in the reference arm can be expressed as

$$\hat{E}_R(k) = \hat{K}_R \hat{E}_0(k) r_R \, exp(ikl_R) \qquad (1)$$

where the caret denotes a function in the frequency domain, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ is the wave propagation number, $\hat{E}_0(k)$ represents the spectral electric field emitted from the light source, K_R is a real number representing total losses in the reference path, l_R is a round-trip optical path length along the reference arm, and r_R is the reflectivity of the reference reflector [13].

In the sample arm of the system, the spectral electric field is a collection of many backscattering events happening at various depths of the sample that can be modeled as

$$\hat{E}_S(k) = K_S \hat{E}_0(k) \int_{-\infty}^{+\infty} r(l_S) \, exp(ikl_S) dl_S \qquad (2)$$

where K_S is a real number representing total losses in the sample path, l_S is a round-trip optical path length along the sample arm, and $r_S(l_S)$ represents the sample reflectivity profile along the depth as a function of l_S [14]. Therefore, the spectral intensity as detected at the output of an interferometer is a superposition of the two signals that can be expressed as

$$\begin{aligned} \hat{I}_D(k) &= \left|\hat{E}_R(k) + \hat{E}_S(k)\right|^2 \\ &= \left|\hat{E}_0(k)\right|^2 \cdot \\ &\left(\begin{array}{c} |K_R r_R|^2 \\ +2K_R K_S r_R \int_{-\infty}^{\infty} r_S(l_s) cos(k(l_S - l_R)) dl_S \\ + \left| K_S \int_{-\infty}^{\infty} r_S(l_S) e^{ikl_S} dl_S \right|^2 \end{array} \right) \end{aligned} \qquad (3)$$

The 1^{st} term is regarded as a DC-signal that can be removed through the direct subtraction method. The 3^{rd} term is an autocorrelation, which is regarded as noise. Nevertheless, when imaging most biological samples, the backscattering signal from the sample is usually much smaller than the reference signal (i.e. $r_S \ll r_R$) and hence the autocorrelation term is negligible. By defining the optical path length difference $l_D = l_S - l_R$, the overall constant factor $K = 2K_R K_S r_R$, and ignoring the DC and autocorrelation terms (1^{st} and 3^{rd} terms), the spectral interference signal can be reduced as

$$\hat{I}_{int}(k) = K \cdot \hat{S}(k) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} r_S(l_D) cos(kl_D) dl_D \qquad (4)$$

where $\hat{S}(k) = \left|\hat{E}_0(k)\right|^2$ represents the power spectral density of the light source and $r_S(l_D)$ is the sample reflectivity profile as a function of the optical path length difference. Equ. (4) represents the spectral interference pattern as detected by the spectrometer. Without losing any general description, Equ. (4) can

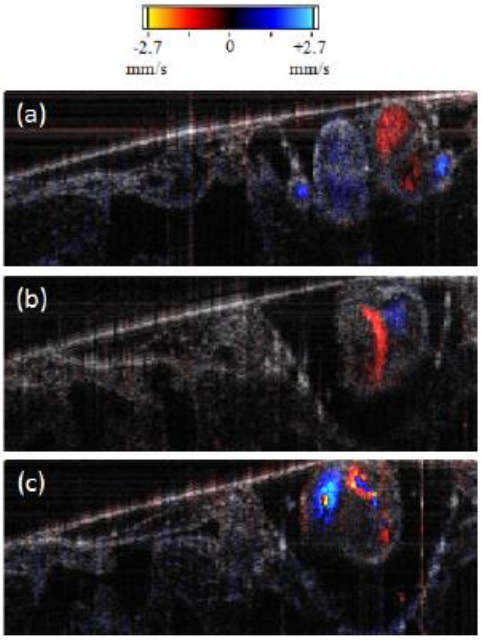


Fig.3:: Doppler color map of flow activity inside the heart chamber of an African frog tadpole superimposed with the structural map of the sample. The flow velocity corresponds with different color is designated by the color bar.

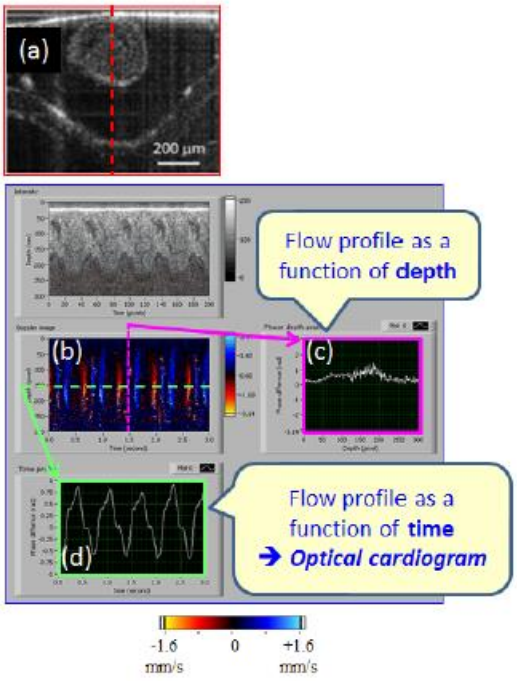


Fig.4:: Graphic User Interface of the M-mode Doppler shows measurement of flow profile as a function of time, which can be served as optical cardiogram.

be rewritten in a complex form as

$$\hat{I}_{int}(k) = K \cdot \hat{S}(k) \cdot \left[\int_{-\infty}^{\infty} r_S(l_D)\ exp(ikl_D) dl_D \right] \tag{5}$$

Equ. (5) is now in the form of the Fourier transformation and can be written as

$$\hat{I}_{int}(k) = K \cdot \hat{S}(k) \cdot [\Im\{r_S(I_D)\}]. \tag{6}$$

Consequently, the inverse Fourier transform of Equ. (6) yields OCT signal as

$$I_{OCT}(I_D) = K \cdot \Im^{-1}\{\hat{S}(k)\} \star r_S(l_D). \tag{7}$$

Equ. (7) states that the sample reflectivity profile along depth, i.e. $r_S(l_D)$, can be reconstructed by the inverse Fourier transform of the measured spectral interference signal. The term $\Im\{\hat{S}(k)\}$ is known as the temporal coherence of the light source [8], which also serves as an axial point spread function of the FD-OCT system [3]. Combining this concept with the lateral scanning, 2D and 3D OCT images can be constructed.

3. SYSTEM AND METHOD

An OCT system used for collecting data in our early development of OCT-based flow imaging is a swept-source based FD-OCT system that is custom designed and built at the Optical Diagnostics and Applications Laboratory (ODALAb) at the Institute of Optics, University of Rochester [10, 11, 13, 15]. The system is built on a fiber-based Mach-Zehnder interferometer as shown in Fig. 1 [11, 16]. Light from the laser is split by a 80/20 fiber coupler and then delivered to a sample and reference arms of the interferometer. Light in the sample arm is focused into a sample through the objective lens. Backscattered light from the sample is then collected and recombined with light from the reference arm at the 50/50 coupler.

The 3D scanning scheme is implemented using a dual axis galvanometer beam steering (VM500, GSI Lumonics). The spectral interference at the output of the interferometer is recorded while scanning the sample beam across the 2D surface of the sample. The captured interference signal is then streamed to the computer memory for processing. The data processing involved signal pretreatment and then Fourier transform to obtain depth profile, representing sample microstructure along the beam path. From the capturing FD-OCT dataset, flow information, such as location, velocity, direction, and profile, can be extracted through the detection of Doppler phase shift of two interference signals obtained at the same location [10, 11].

Two modes of operation of Doppler imaging are normally performed in DOCT. One is a *brightness mode* or B-Mode Doppler, in which multiple axial scans (A-scans) are collected while performing a lateral scan (B-scan). An intensity map generated in

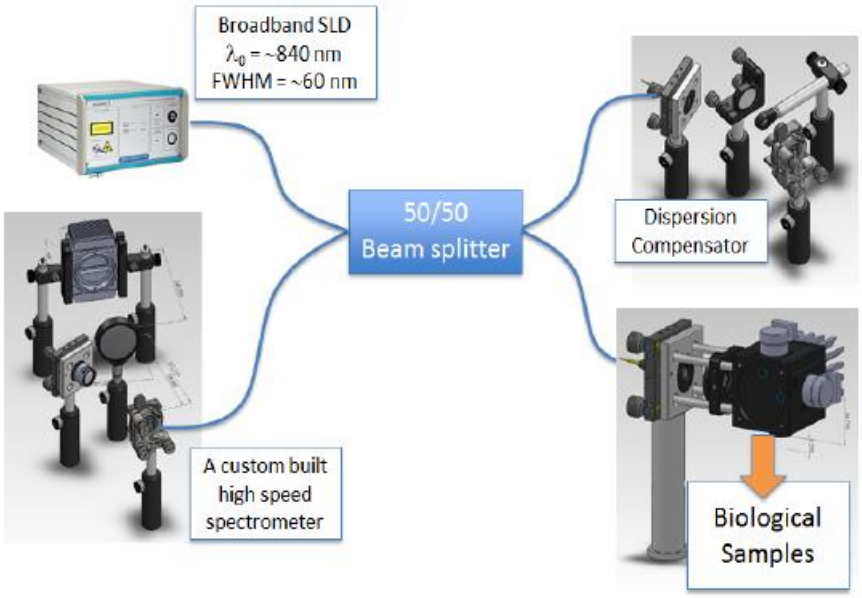


Fig.5:: The system layout of the new spectrometer-based FD-OCT at Suranaree University of Technology.

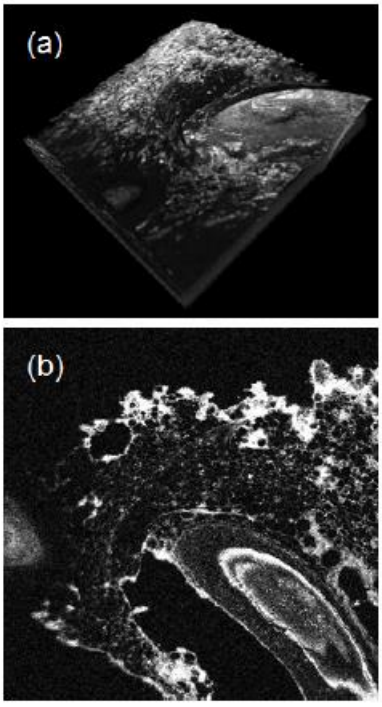


Fig.6:: 3D images of a cucumber section taken by the developed spectrometer-based FD-OCT at its current stage. (a) Volumetric rendering of the 3D dataset obtained with the system. (b) An example of en face reconstruction from the same 3D dataset, showing cellular level structure of the sample.

B-mode represents the cross-sectional image of the sample structure. Corresponding to the structural map, the magnitude of the local phase shift is represented in 2D color mapping. Therefore, B-Mode Doppler is useful for locating the flow location inside the mainly static structure.

The other is a *motion mode* or M-Mode Doppler, in which multiple A-scans are collected at a fixed position of the sample beam. M-Mode Doppler generates a 2D map of Doppler signal, in which one axis is a depth profile and the other axis represents the time evolution of the flow. M-Mode Doppler is useful when the location of the flow is known, and one wants to monitor the flow changes as a function of time.

4. RESULTS

The results demonstrated in this paper are progress results over the past three years of the development of OCT-based flow detection system at the ODALab at the University of Rochester. The first dataset demonstrates the capability of the system to optically and noninvasively perform depth-sectioning the sample at microns resolution. With the developed FD-OCT system, we acquired a 3D dataset of an African frog tadpole over a lateral scanning field-of-view (FOV) of 4 mm $\times$ 2 mm. The imaging FOV along the depth is about 1 mm. From the 3D OCT dataset, a series of *en face* images of the sample was reconstructed as shown in Fig. 2(a-h). Each *en face* image represents sample structure analogous to that observed under a light microscope. However, unlike a conventional microscope, OCT is capable of virtual depth-sectioning of living sample, i.e. microscopy-like image at different depth of up to 2 mm from the

sample surface, nondestructively.

The second dataset demonstrates the performance of the system in detection of microscopic flow information. In FD-OCT, the phase information is immediately obtained after the Fourier transform, allowing the ease of determination of the amount of Doppler phase shift. One commonly used algorithm is the technique of modified Kasai autocorrelation [11, 17].

Fig. 3(a-c) shows Doppler signal, representing flow activity at different states of the contraction of the heart chamber of an African frog tadpole captured by our developed method [11]. The Doppler phase shift was displayed in colors map, ranging from -2.7 mm/s to +2.7 mm/s, as designated by the color bar. The plus and minus signs represent flow in opposite direction, and hence red and blue regions in Fig.3(a-c) represent flow activity in opposite directions (i.e. inflow and outflow). It should be noted that, with high speed imaging capability, the system is capable of real time acquisition and display of flow activity at currently about 3-4 frame/s.

Moreover, in a similar manner with ultrasound Doppler, M-mode Doppler OCT was performed by fixing the lateral position of the sample beam as shown in Fig. 4(a) and acquiring multiple depth scans over time and then computing the Doppler phase shift between consecutive scans as shown in Fig. 4(b). From the M-mode Doppler map in Fig. 4(b), a flow profile as a function of depth (Fig. 4c) and a flow profile as a function of time (Fig. 4d) were extracted. The flow profile as a function of time as shown in Fig. 4(d) can be used as optical cardiogram for monitoring flow activity of *in vivo* biological samples.

5. DEVELOPMENT OF NEW FD-OCT SYSTEM

As part of a plan to improve Doppler flow imaging using FD-OCT, particularly for real time flow monitoring purpose, we are developing a new FD-OCT system at Suranaree University of Technology. The new system is a spectrometer-based FD-OCT as shown in Fig. 5. The light source is a super luminescent diode (SLD) that emits a broad spectral light, expanding from 800 900 nm output wavelength. An interferometer is a fiber-based Michelson interferometer with 50/50 split ratio. The detector is a custom built spectrometer that was designed and built in our laboratory, utilizing a high speed CMOS line camera with data capturing speed of over 70,000 lines/second. A 3D data acquisition is achieved by a dual mirror galvanometer beam steering, which is synchronized with data capturing from the CMOS camera through a PCI express interface high speed frame grabber device. The overall imaging speed is currently 20 frame/second for a frame size of 500 spectra/frame (i.e. about 10,000 spectra/second). The operated speed is currently limited by hardware synchronization, which will be further optimized to achieve maximum speed as provided by the camera. Both lateral and axial resolutions of the system are currently about 20 microns. A scanning field of view is up to 10 mm $\times$ 10 mm and about 2 mm imaging depth.

Fig. 6 shows an early result on 3D microscopic imaging of biological sample, which is a cucumber section, using the developed spectrometer-based FD-OCT. An imaging FOV was about 10 mm $\times$ 10 mm, consisting 500 $\times$ 500 depth scans. Even though, the new system is currently operated at 80% of its full performance, the microscopic structure at cellular level is readily observed. Further improvement in term of imaging speed and resolution is under investigation. Fig. 6(a) shows volumetric rendering of the 3D dataset acquired by the new system, demonstrating its capability for 3D visualization at microscopic level. Fig. 6(b) is an *en face* reconstruction from the same 3D dataset, showing structural information at certain depth beneath the sample surface without actual sectioning. The *en face* reconstruction provides an image similar to that can be obtained by a confocal microscope. However, with high resolution depth sectioning capability of OCT, multiple *en face* reconstructions at different depths can be digitally obtained at the depth resolution of less than 10 microns.

6. SUMMARY

OCT technology, particularly FD-OCT, has been proven to be a useful tool for not only *in vivo* visualization of microstructure of biological sample but also for *in vivo* monitoring of flow activity within the sample. Flow activity serves as valuable information in diagnosis of the functionality and abnormality of *in vivo* biological tissue since most pathological development is related to the change in blood circulation system. The technique demonstrated here is only one of the methods of OCT-based flow imaging techniques. Over the past several years, there are many techniques have been developed. Combining of multiple technique will allow for faster, more sensitive, and more precise detection of flow activity in living tissue, enabling a path for early diagnosis of many pathological development. In addition, we reported the progress of the development of our new spectrometer-based FD-OCT system. The developing system has potential for high speed Doppler flow imaging that will be particularly useful for application that requires real time monitoring of blood flow, such as monitoring a circulation system in biological samples.

Most typical commercial OCT FD-OCT systems are currently operated at imaging speed of 20 30 frames per second, which is still far from ideal for a snap-shot of 3D imaging. In this work, the proposed FD-OCT was designed to be capable of high resolution 3D imaging at high speed data acquisition of up to 200 frames per second, enabling by a high speed and high throughput line-scan CMOS sensor technology. Nevertheless, the first implemented prototype is currently operated at acquisition speed of

about 20 frames per second for up to 1000 depth scans per frame, which is limited by the triggering speed of the scanning waveform generator for driving the 3D scanning unit at the sample arm of the prototype. This speed will be improved in the future by using a higher performance device for the waveform generator to control the 3D sample scanning. At its maximum potential speed, the prototype is expected be able to capture a single 3D dataset within about 3 seconds.

7. ACKNOWLEDGEMENT

The development of the new high-speed spectrometer-based FD-OCT is supported by Suranaree University of Technology and the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission. The development of the swept-source based FD-OCT and the preliminary experiment on Doppler flow imaging was performed at the Optical Diagnostics & Applications laboratory (ODAlab) at the institute of Optics, University of Rochester under the funding support of the NYSTAR Foundation (USA).

References

[1] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography.", *Science 254*, 1178-1181 (1991).

[2] K. S. Lee, K. P. Thompson, P. Meemon, and J. P. Rolland, "Cellular resolution optical coherence microscopy with high acquisition speed for in-vivo human skin volumetric imaging.", *Optics letters 36*, 2221-2223 (2011).

[3] B. E. Bouma and G. J. Tearney, "Handbook of optical coherence tomography.", *Marcel Dekker, Inc.*, 2002.

[4] W. Drexler and J. G. Fujimoto, "State-of-the-art retinal optical coherence tomography.", *Progress in retinal and eye research 27*, 45-88 (2008).

[5] V. J. Srinivasan, M. Wojtkowski, A. J. Witkin, J. S. Duker, T. H. Ko, M. Carvalho, J. S. Schuman, A. Kowalczyk, and J. G. Fujimoto, "High-definition and 3-dimensional imaging of macular pathologies with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography.", *Ophthalmology 113*, 2054-2065. e2053 (2006).

[6] Y. Wang, A. Fawzi, O. Tan, J. Gil-Flamer, and D. Huang, "Retinal blood flow detection in diabetic patients by Doppler Fourier domain optical coherence tomography.", *Optics Express 17*, 4061-4073 (2009).

[7] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. Y. El-Zaiat, "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry.", *Optics Communications 117*, 43-48 (1995).

[8] M. Born and E. Wolf, "Principles of Optics, seventh expanded edition.", *Cambridge University*, England, 1999).

[9] J. S. Nelson, K. M. Kelly, Y. Zhao, and Z. Chen, "Imaging blood flow in human port-wine stain in situ and in real time using optical Doppler tomography.", *Archives of dermatology 137*, 741, 2001.

[10] P. Meemon, K. S. Lee, and J. P. Rolland, "Doppler imaging with dual-detection full-range frequency domain optical coherence tomography.", *Biomedical Optics Express 1*, 537-552 (2010).

[11] P. Meemon and J. P. Rolland, "Swept-source based, single-shot, multi-detectable velocity range Doppler optical coherence tomography.", *Biomedical Optics Express 1*, 955-966 (2010).

[12] A. Mariampillai, B. A. Standish, N. R. Munce, C. Randall, G. Liu, J. Y. Jiang, A. E. Cable, I. A. Vitkin, and V. X. D. Yang, "Doppler optical cardiogram gated 2D color flow imaging at 1000 fps and 4D in vivo visualization of embryonic heart at 45 fps on a swept source OCT system.", *Optics Express 15*, 1627-1638 (2007).

[13] P. Meemon, "Development of Optical Coherence Tomography for Tissue Diagnostics.", *Dissertation University of Central Florida, Orlando, 2010.*

[14] L. V. Wang and H. I. Wu, " Biomedical Optics: Principles and Imaging.", *Wiley-Interscience, 2007.*

[15] 15. K. S. Lee, P. Meemon, W. Dallas, K. Hsu, and J. P. Rolland, "Dual detection full range frequency domain optical coherence tomography.", *Optics letters 35*, 1058-1060, 2010.

[16] V. F. Duma, K. Lee, P. Meemon, and J. P. Rolland, "Experimental investigations of the scanning functions of galvanometer-based scanners with applications in OCT.", *Appl. Opt. 50*, 5735-5749, 2011.

[17] C. Kasai, K. Namekawa, A. Koyano, and R. Omoto, "Real-time two-dimensional blood flow imaging using an autocorrelation technique.", *IEEE Trans. Sonics Ultrason 32*, 458464, 1985.