

非接触光声成像研究进展及其在生物医学上的应用

李娇^{1, 2*}, 李帅¹, 陈冀景¹, 路彤¹, 高峰^{1, 2}

¹天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072;

²天津市生物医学检测技术与仪器重点实验室, 天津 300072

摘要 光声成像是一种以超声为媒介的功能性光学成像方法,近年来得到了迅速发展。非接触光声成像技术旨在无耦合液条件下实现高灵敏、大带宽的光声信号接收以及高质量的图像重建,它在继承传统光声成像技术优势的基础上,提升了探测性能,并扩展了应用领域。本文综述了非接触光声成像的研究现状及其在生物医学领域的应用,概述了目前非接触光声成像技术的物理机理及成像系统的结构,介绍了该技术在无标记术中组织学成像、眼科成像和皮肤光学活检中的特色应用,最后总结了非接触光声成像技术的特点以及未来面临的挑战。

关键词 医用光学; 光声成像; 非接触; 功能成像; 多模态; 生物医学

中图分类号 Q631

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.1918005

1 引言

光声成像(PAI)是一种基于光声效应、以超声为媒介的功能性光学成像方法。在光声成像过程中,组织吸收激发光后发生热膨胀,进而产生代表光吸收强弱的光声(超声)信号,利用超声探测器接收该信号后重建就可以得到初始压强分布(代表组织中的光吸收分布)^[1-4]。光声成像以无标记、功能性、高深空比(深度分辨率与空间分辨率之比)、多对比度和多尺度等优点,在生物医学成像领域得到了广泛应用,包括但不限于对大脑^[5-7]、眼睛^[8-9]、肿瘤^[10-13]、神经^[14-15]、皮肤^[16]、组织^[17-18]、细胞^[19-20]等的结构性、功能性多光谱成像,在成像过程中利用了核酸^[18]、血红蛋白^[12-13]、脂质^[14-15]、蛋白质^[19-20]、水^[21]等天然的内源性造影剂。

由于光声信号在空气中的衰减较大,难以传播^[22],在成像时往往要将样品和超声换能器置于与组织声阻抗相匹配的耦合液中,以便高质量地接收微弱的光声信号。但这种接触式的系统结构会不可避免地面以下问题:1)受伤的皮肤在光声成像中

有被感染的风险^[23];2)在眼科成像时,持久的接触会引起患者不适;3)术中成像不宜使用接触式的成像方法^[24],同时,超声换能器较大的晶面和体积会影响系统的设计和性能^[25]。非接触的新型光声探测方式可以在非接触的条件下实现高灵敏、大带宽的光声信号接收,已成为当前光声成像的重要发展方向之一。

本文综述了非接触光声成像技术的发展现状及其在生物医学领域应用的最新研究进展。首先简述了光声成像的工作原理和实现方式,然后分类阐述了非接触光声成像的研究进展,最后介绍了非接触光声成像在无标记术中组织学成像、眼科成像和皮肤光学活检中的特色应用。

2 光声成像的物理机理

2.1 光声成像原理

光声效应早在 1880 年就被 Bell 发现,但直到 21 世纪才逐渐应用于生物医学成像领域。在光声成像中,常使用高能脉冲激光照射被测物体,物体吸收激发光的能量后,将部分或全部能量转化为热能,

收稿日期: 2021-06-16; 修回日期: 2021-07-14; 录用日期: 2021-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(81771880, 81401453, 81671728, 81871393, 81971656)、天津市自然科学基金(19JCQNJC12800)

通信作者: *jiaoli@tju.edu.cn

并产生瞬时的受热膨胀,由此产生了超声波。超声传感器接收到超声波后,利用重建算法^[26-27]就可以得到物体内部的初始压强分布。该压强分布在一定程度上代表了不同组织吸光能力的强弱。(1)式给出了初始压强分布的计算公式^[1],组织的吸收系数越大,或者光通量越高,产生的光声信号越强。

$$P_0 = \Gamma \eta_{th} \mu_a F, \quad (1)$$

式中: P_0 为初始声压; Γ 为格律乃森(Grüneisen)系数; η_{th} 为物体吸收的能量转化成热能的百分比; μ_a 为吸收系数; F 为光通量。

2.2 光声成像的特点及分类

光声成像具有多对比度、多功能性、多尺度等特点。不同发色团具有不同的吸收光谱,且具有特定的光学吸收峰。如,核酸在 266 nm 处具有极大的吸收系数,血红蛋白在 532~1064 nm 范围内具有较高的吸收系数^[13],脂质在 1210 nm 处有吸收峰^[15]。根据生物组织中不同发色团的选择性光谱吸收差异,用不同波段的激发光对组织进行成像,即为多对比度成像。例如,血红蛋白包括脱氧血红蛋白和氧合血红蛋白,且这两种血红蛋白的相对含量与生物体的生理状态密切相关,利用多波长光谱解混的方法得到它们的血氧饱和度分布图像^[4],就可以达到功能性成像的目的。

基于不同尺度的成像需求,光声成像可以分为光声宏观成像(PAMa)、光声介观成像(PAMe)、光声显微成像(PAM)^[18]。在光声宏观成像中,宽场光激发出的光声信号被换能器阵列接收,通过重建算法^[26]可以反演出光声的初始压强。光声宏观成像的重点在于“计算”,其分辨率在百微米量级,深度可达厘米量级^[5]。在光声显微成像中,常使用紧密聚焦的激光束或紧密聚焦的超声换能器逐点扫描样品,成像的重点在于“聚焦”。光声显微成像的分辨率在 10 μm 以内,深度一般小于 1 mm^[2]。光声介观成像处于宏观成像和显微成像之间,常采用高频换能器,以达到优于光声宏观成像分辨率(<100 μm)以及优于光声显微成像深度(>1 mm)的目的^[3]。目前,以上三种成像模式在成像过程中常使用耦合液进行声耦合,因此在一定程度上限制了系统的设计、性能和应用。

3 非接触光声成像技术

非接触光声成像旨在用光学或空气耦合的探测方法取代压电换能器,实现无耦合液的遥感成像,由此会带来许多优势,如:系统更易实现多模态,成像

质量更高,应用领域更广。目前,非接触光声成像可以分为基于空气耦合的非接触光声成像和基于全光探测的非接触光声成像。

3.1 空气耦合式非接触光声成像

实现空气耦合的主要困难在于超声在空气中迅速衰减以及组织-空气折射率不匹配导致大量反射^[22]。1 MHz 的光声信号在空气中的衰减系数约为 1.6 dB/cm,且信号频率越高,衰减越严重。尽管如此,适当增大脉冲激发光的能量密度、降低光声信号的频率和接收器的中心频率可以实现空气耦合^[28]。Deán-Ben 等^[22]使用自制的空气耦合聚焦型压电换能器搭建了空气耦合声学分辨率成像系统,如图 1(a)所示,在 20 mJ/cm² 的激发能量密度内,采用该系统得到的墨水仿体的成像结果如图 2(a)所示。在该系统中,换能器的中心频率为 800 kHz,系统的分辨率取决于换能器的声学焦点尺寸,为毫米量级。该系统已被应用于激光手术切口深度的非接触监测中^[29]。为提高分辨率,Ma 等^[23]搭建了光学分辨的空气耦合非接触光声成像系统,该系统采用中心频率为 400 kHz 的空气耦合平面型超声换能器,且在扫描过程中保持不动。Ma 等采用聚焦光扫描的方式获得了横向分辨率可达 6.2 μm 的兔耳烧伤/正常皮肤血管对比图,如图 2(b)所示。为了实现高的信噪比,他们使用了较高的激发光能量密度(18 mJ/cm²)。空气耦合式非接触光声成像的信噪比和轴向分辨率都存在一定局限性,且所需激发光的能量密度较大,成像效率较低,但是在某些特定应用中,如非接触的皮肤烧伤检测方面^[23],若能适当增大换能器的灵敏度,该方式将会有更大的发展潜力。

基于光声腔共振增强的空气耦合光声探测方式可以实现微弱频域光声信号的非接触检测和放大^[30-31],该方式的实现方式如图 1(a)所示。该方式的检测装置包含一个光声共振腔和一个低频麦克风。激发光采用强度调制的连续激光,且调制频率与光声共振腔的共振频率重合就可以实现频域光声信号的共振增强。Sim 等^[32]利用自行设计的光声共振腔,在 47.5 kHz 的共振频率下实现了皮肤表面显微结构的扫描成像,如图 2(c)所示,并通过选取分泌物较少的区域进行光声光谱测量,提高了葡萄糖浓度无创测量的准确度。

无论是脉冲激发光还是连续激发光,基于空气耦合的非接触光声成像都存在信噪比低等缺陷,因此,在探测器设计和更高信噪比的放大方式等方面

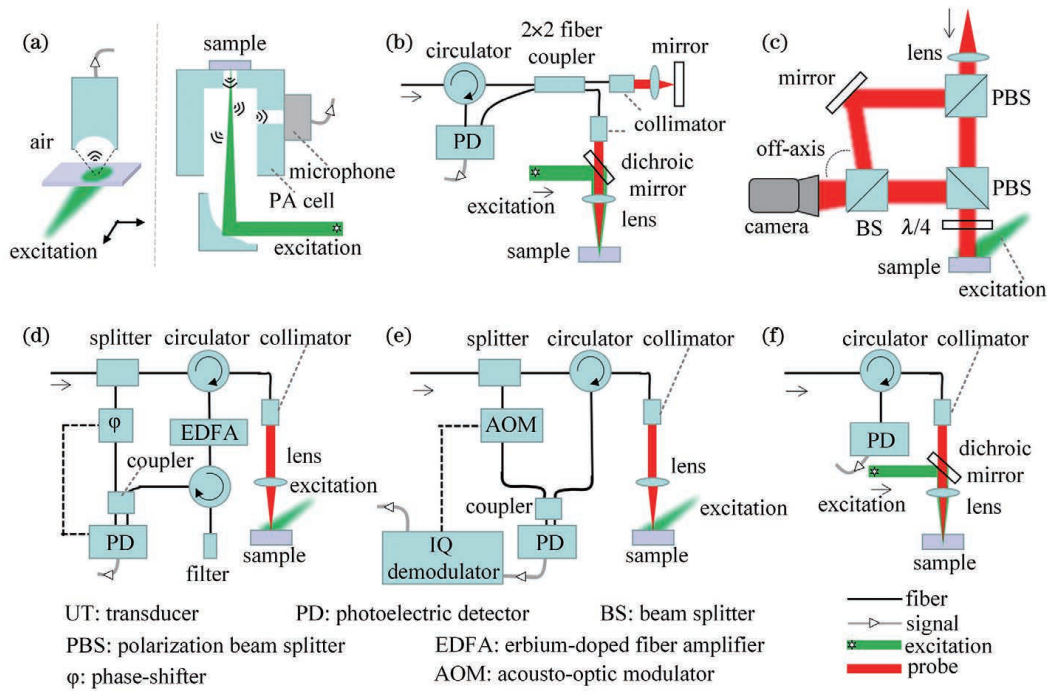


图 1 非接触光声成像的典型实现方式。(a)空气耦合式;(b)迈克耳孙零差干涉式;(c)激光散斑式;(d)马赫-曾德尔零差干涉式;(e)马赫-曾德尔外差干涉式;(f)非相干式

Fig. 1 Schematics of non-contact photoacoustic imaging. (a) Air-coupled type; (b) homodyne Michelson interferometer type; (c) speckle pattern type; (d) homodyne Mach-Zehnder interferometer type; (e) heterodyne Mach-Zehnder interferometer type; (f) non-interferometric type

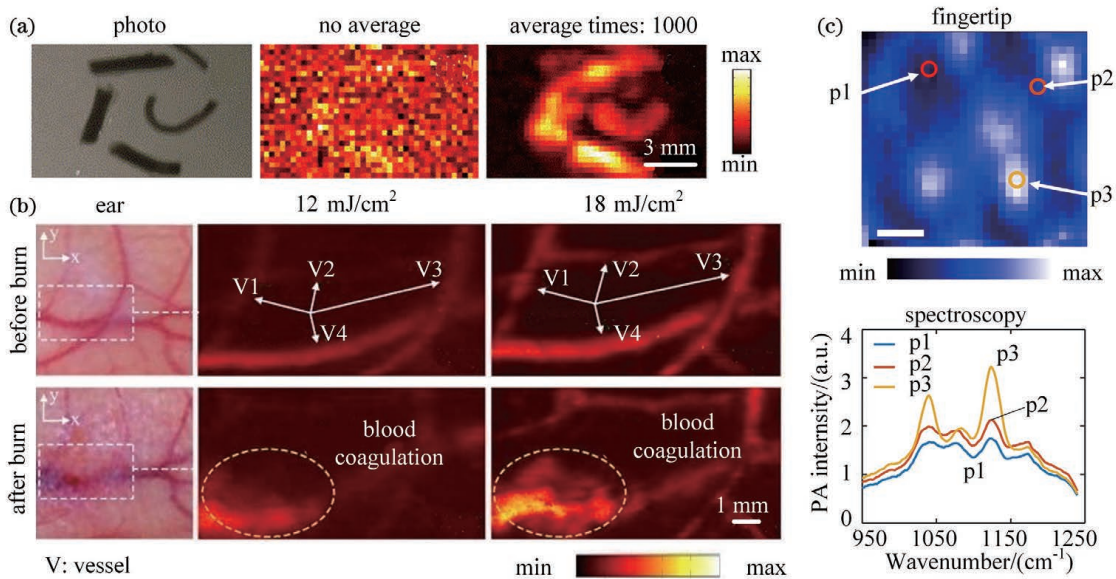


图 2 空气耦合的非接触光声成像结果。(a)声学分辨模式下墨水的成像结果^[22];(b)光学分辨模式下兔耳血管烧伤前后的活体成像^[23];(c)手指皮肤光声成像及不同点位的光声光谱^[32]

Fig. 2 Air-coupled non-contact photoacoustic (PA) imaging. (a) Imaging of ink in acoustic-resolution mode^[22]; (b) *in vivo* PA imaging of vessels in rabbit's ear before and after burn^[23]; (c) PA image of finger skin and spectra of different spots^[32]

还需要进一步进行研究。

3.2 光学相干式非接触光声成像

光学干涉具有非常高的灵敏度,常用来测量纳

米量级的位移,已有相关研究采用光学手段来测量声压导致的微小位移,如 Fabry-Perot 干涉测振等^[25,33-34]。这些光学探测超声的手段具有高灵敏

度、大带宽和小体积的特点,但仍需要使用耦合液。在无耦合液的相干光学光声信号检测中,需要将探测光直接照射在被测样品表面(或内部),以避免耦合剂的使用^[35-38]。这些非接触的探测方法可以分为零差干涉式、外差干涉式和激光散斑式。

3.2.1 零差干涉式

零差干涉式非接触光声探测常使用迈克耳孙和马赫-曾德尔干涉仪,探测光聚焦于样品表面,激发光聚焦于样品内部。激发光激发样品内部,产生初始声压,声信号传播至样品表面导致表面发生微小位移($<100\text{ nm}$ ^[39]),由此改变了干涉仪的光程差,干涉光强发生波动。通过采集干涉光强,求解出物体表面微小位移随时间的变化,就能够计算出声压强度的变化。(2)式描述了光强变化随位移的变化规律,(3)式描述了位移与压强的关系。综合(2)、(3)式就可以得到干涉光强与声压之间的关系,从而实现干涉测振的目的^[40]。

$$\delta(I) = -2kA \sin(2k\Delta z)\delta_\epsilon(t), \quad (2)$$

$$p(t) = \frac{Z}{2} \frac{\partial \epsilon(t)}{\partial t}, \quad (3)$$

式中: $\delta(I)$ 为光强的变化量; k 为波数; A 为振幅; Δz 为光程差; $\delta_\epsilon(t)$ 为随时间变化的表面微小位移; $p(t)$ 为随时间变化的声压值; Z 为声阻抗。

3.2.1.1 迈克耳孙干涉式

基于迈克耳孙干涉仪(MI)的光声成像原理如图 1(b)所示。迈克耳孙干涉仪使用中心波长为 1310 nm 或 1550 nm 的超辐射二极管光源,并采用全光纤结构,以简化探测系统的结构。迈克耳孙干涉仪包含一个光学环形器、一个 2×2 光学耦合器和一个光电探测器^[41]。样品吸收激发光的能量后产生光声信号,光声信号向外传播至样品表面,此时干涉仪的探测光聚焦于样品表面(或样品表面的液滴中),传至表面的声压以微小位移的形式扰动探测光路,产生瞬时相位差,从而调制干涉光强。通过光电探测器获取干涉光强,并利用(2)式和(3)式就可以解算出表面压强随时间的变化,从而达到替代压电超声换能器的目的。

2011 年,Wang 等^[36]使用低相干 1310 nm 探测光源的迈克耳孙干涉仪实现了非接触光声成像,在无平均的情况下得到了小鼠耳朵血管的成像结果,如图 3(a)所示,成像分辨率可达 $30\text{ }\mu\text{m}$ 。在实验中,Wang 等将矿物油滴于生物体表面(油层厚 2 mm),以提高灵敏度以及消除散斑的影响,但同时导致了系统的准非接触。低相干光源能够避免生物

组织的层间干涉,同时更有利于光声显微成像和光学相干层析成像结合,实现多模态显微成像。采用光学干涉测量声压时,需要将相位差锁定在正交工作点(Q-point)处,以达到相对固定的最大灵敏度^[42]。Liu 等^[43]提出了参考臂相位主动调制的方法,他们将参考臂中的反射镜安装在快速振动的压电驱动器上,同时仅在干涉信号过零点时才进行光声激发和信号采集,如此解决了干涉仪灵敏度快速锁定的难题,但成像速度依旧会受到影响,同时增加的其他外部主动扰动增大了系统的复杂性。Park 等^[44]使用 3×3 光纤耦合器代替图 1(b)中的 2×2 光纤耦合器,利用 3×3 光纤耦合器固有的 120° 相位延迟,以及两个光电探测器获取的带有相位延迟端口的两路干涉信号,通过正交解算得到了不受正交工作点限制的光声信号,即:获得的光声信号在相干长度内的任意位置上均有相同的干涉灵敏度。Chen 等^[45]将基于迈克耳孙干涉仪的光声显微成像系统与光学相干层析成像(OCT)系统相结合,开发了全光集成的双模态非接触光声显微成像系统,其中光声成像、OCT 成像的横向分辨率分别为 $13\text{ }\mu\text{m}$ 和 $12.5\text{ }\mu\text{m}$,轴向分辨率分别为 $20\text{ }\mu\text{m}$ 和 $18.4\text{ }\mu\text{m}$ 。图 3(b)所示为小鼠耳朵的双模态成像结果。随后,Chen 等展开了一系列功能性成像应用的研究。Qiao 等^[46]开发了基于迈克耳孙干涉仪的光声流速成像方法;根据光声多普勒频带增宽理论,他们在仿体实验中实现了 $0 \sim 5.5\text{ mm/s}$ 横向流速和断面流速的测量。图 3(c)所示为小鼠耳朵血流成像结果,该结果表明 Qiao 等所提方法可以用于体血管血流速度分布的成像上。此外,基于迈克耳孙干涉仪的光声显微成像技术已被应用于龋齿检测^[47]和多参数的皮肤光学活检中^[48-49]。

低相干光源的相干长度较短,约为几十微米。系统的探测灵敏度会随着参考光和探测光之间光程差的增大而减小,当光程差超过相干长度后,干涉信号变为零。因此,实验要求待测组织表面非常平整,且环境振动噪声需要尽可能小。综上,将相位差稳定在相干长度上具有一定难度^[50],因此,在系统设计中需要稳定系统扫描过程中的光程差,或者采用长相干光源的迈克耳孙干涉光声检测方法。在实验中,Lu 等^[50]将 527 nm 的激发光作为光声激发源,0.1 nm 线宽的 1310 nm 激光二极管作为探测源(17 mm 相干长度)。探测-激发光通过消色差透镜共聚焦,且探测光的焦点位于激发光焦点上方的液滴-空气界面处。激发光仅在平衡探测器过零点(此

时光程差处于正交工作点)时出光,此时干涉信号的灵敏度最大。图 3(d)所示为振镜扫描的小鼠耳朵的在体成像结果,此成像结果说明了样品表面的液滴对干涉式光声成像信噪比的重要性,但这是准非接触的,而且实验中使用的激发光的能量密度为 26 mJ/cm^2 ,已超出美国国家标准学会(ANSI)的标准(20 mJ/cm^2)。采用光学方法探测光声信号时对样品平整度的要求较高,表面起伏较大的样品会导致探测光和激发光离焦,从而导致图像强度不均匀。Hu 等^[51]使用激发-探测的双贝塞尔光束,在保持 $2.4 \mu\text{m}$ 横向分辨率的条件下,将景深从 $55 \mu\text{m}$ 扩展为 $635 \mu\text{m}$;同时,他们结合长相干探测光的优势,完成了对不平表面的斑马鱼的全光光声成像,成像结果如图 3(e)所示。结果表明,长相干探测光结合双贝塞尔探测-激发光可以在降低样品平整度要求

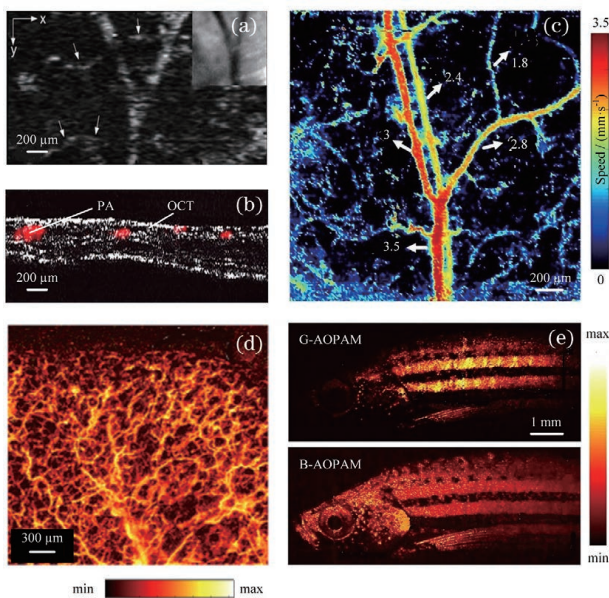


图 3 迈克耳孙零差干涉式非接触光声成像结果。(a)小鼠耳朵的成像结果^[36]; (b)小鼠耳朵的双模态活体成像结果^[45]; (c)小鼠耳朵血流速度的成像结果^[46]; (d)使用长相干探测光对小鼠耳朵的成像结果^[50]; (e)使用普通长相干探测光(上)和双非衍射贝塞尔光(下)对斑马鱼的成像结果^[51]

Fig. 3 Non-contact PA imaging with homodyne Michelson interferometer. (a) PA imaging of a mouse ear^[36]; (b) dual-modal imaging of a mouse ear^[45]; (c) blood flow velocity imaging of a mouse ear^[46]; (d) PA imaging of a mouse ear with a long coherence length laser^[50]; (e) PA imaging of a zebrafish with Gaussian beam (above) and dual non-diffracting Bessel beam (below)^[51]

的同时,获得具有更大景深的成像结果。

3.2.1.2 马赫-曾德尔干涉式

基于马赫-曾德尔干涉仪(M-ZI)的光声信号的探测原理与迈克耳孙干涉式原理基本一致。Hochreiner 等^[52]在马赫-曾德尔干涉仪的基础上结合光放大技术,搭建了一套非接触光声介观成像系统。如图 1(d)所示,与基于迈克耳孙干涉仪的非接触光声显微成像不同,马赫-曾德尔干涉仪可以结合掺铒光纤放大器将微弱的 1550 nm 长相干探测光的反射光(仅为入射功率的 1%)进行光放大,从而提高信噪比。此外,该系统还利用了复杂的反馈调相的方式,以保证系统工作在灵敏度最高的正交工作点。Hochreiner 等在宽场激发光固定不动的情况下步进扫描探测光,将位于样品-空气界面的探测光焦点作为理想的“点探头”,采用傅里叶合成孔径重建算法得到了初始压强分布。图 4(a)显示了 740 nm 激发光下油墨灌注的硅胶管的成像结果,激发光的能量密度为 10.5 mJ/cm^2 ,小于 ANSI 规定的最大容许辐照量(MPE)。该系统无需使用辅助液滴,探测光直接聚焦在样品表面,因而实现了完全非接触;但是,在实验约 $10 \mu\text{m}$ 直径的焦点包含有 8 mW 的探测功率,超出了 MPE 的极限。随后,研究人员将该系统与 OCT 成像系统集成成为多模态光声成像系统^[53-54],图 4(b)为 710 nm 激发光下染有黑色墨水的树叶骨架的双模成像结果,实验中使用的能量密度为 5 mJ/cm^2 ,探测光功率为 5 mW 。图 4(c)为 760 nm 激发光对鸡皮下埋入的黑白猪鬃毛的双模成像结果(激发光能量密度为 4 mJ/cm^2 ,探测光功率为 11 mW ,探测光斑直径为 $20 \mu\text{m}$),结果显示,基于吸收的光声成像仅对黑色毛发敏感,而基于散射的 OCT 对黑白毛发均具有敏感性。当采用 532 nm 激发光进行成像实验时, 40 mJ/cm^2 的能量密度超出了 MPE。基于光学干涉的光声检测有很大的相位敏感性(需要保持在正交相位点),同时需要精确调整探测光聚焦于组织-空气界面,因而增大了操作的复杂性。Wang 等^[55]基于 3×3 光纤耦合器开发了一种共聚焦、长相干、完全非接触的干涉式测量光强的方法;他们将探测光和激发光完全共焦同时置于样品表面以下,通过测量压强引起的探测光的反射光强变化,得到了光声压强信号。此外,Wang 等利用 3×3 光纤耦合器 120° 的固有相位差以及测得的相邻三端口的光强,解算出了焦点处反射光的光强变化;结果表明,光强变化与初始相位无关,且无相位噪声,而且该方法具有比其他零

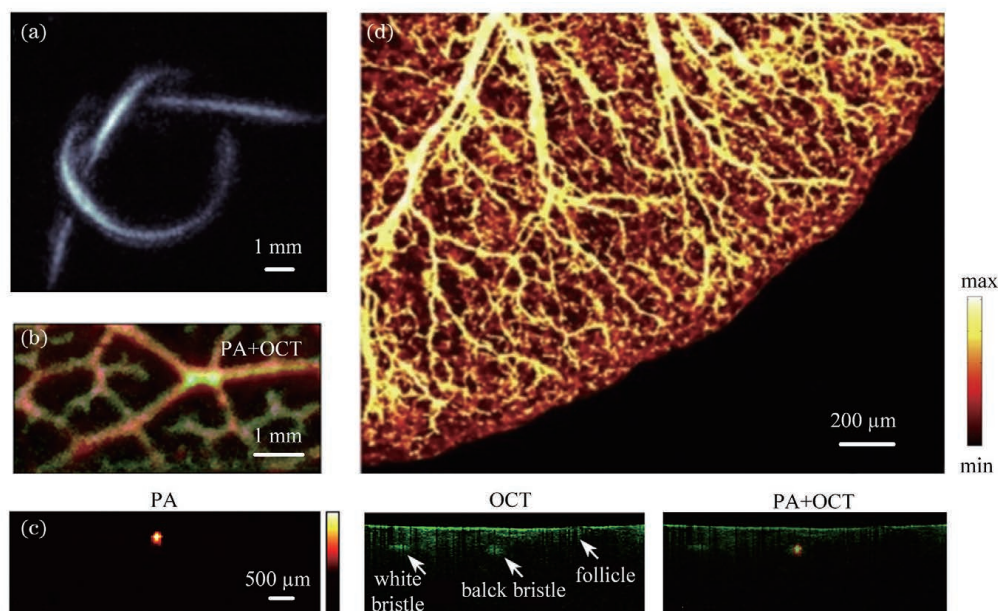


图 4 马赫-曾德尔零差干涉式非接触光声成像结果。(a)墨水管道仿体的光声成像^[52]；(b)树叶骨架仿体的双模态成像^[53]；(c)黑白猪鬃毛的双模态成像^[53]；(d)小鼠耳朵的光声成像^[55]

Fig. 4 Non-contact PA imaging with homodyne Mach-Zehnder interferometer. (a) PA imaging of ink tube^[52]; (b) dual-modal imaging of a skeleton leaf^[53]; (c) dual-modal imaging of black/white bristle^[53]; (d) PA imaging of a mouse ear^[55]

差干涉方法^[36]更高的信噪比。图 4(d)为 Wang 等设计的系统对小鼠耳朵的完全无接触活体成像结果,其中 1310 nm 探测光的功率为 3 mW,527 nm 激发光在表面的能量密度为 14 mJ/cm²,符合 ANSI 标准。

迈克耳孙干涉式和马赫-曾德尔干涉式光声成像的主要区别在于其光路结构。迈克耳孙干涉式系统的结构相对简单,能够通过快速振动的参考镜调整相位差和锁定正交点,但需要液滴的辅助,以增大反射光强和信噪比。马赫-曾德尔干涉式系统具有更易拓展的光路结构,可以引入掺铒光纤放大器(EDFA)对粗糙表面的反射光进行光放大,也可以借助 3×3 光纤耦合器进一步提高系统的性能,且无需液滴的辅助;但探测光聚焦于样品表面会产生过大的能量密度。零差干涉式是目前干涉式非接触光声成像的主要手段之一,能够在(准)非接触的条件下,得到高分辨率的仿体、在体光声图像,但普遍存在以下两个关键问题:

1) 光滑表面的限制。生物体的表面通常是粗糙的,若直接将探测光聚焦于样品表面,则反射光强会大幅衰减^[36,50]。若同时增大探测光的初始功率,则紧密聚焦会导致能量密度超出 MPE 的规定值^[52-54]。此外,粗糙的表面会带来不必要的散斑干涉^[36,41,55]。目前可行的办法是将探测光聚焦于附加液滴表面,但这样会构成准非接触,且需要精准调节

激发光和探测光的相对位置。另一种办法是直接将探测光与激发光共聚焦,以干涉的方法解算出光强的变化,但无法获得轴向的时域光声信息^[55]。

2) 相位噪声限制。基于干涉的方法大都具有相位敏感性,且需要工作在相干长度内的正交工作点上^[42]。主动调整^[43]、反馈调相^[52]的方法已被应用于正交工作点的锁定,但这样势必会增大系统的复杂性。目前,仅 Park 等^[44]与 Wang 等^[55]提出的方法可以消除正交工作点的相位敏感问题。低相干探测光源易受环境噪声的干扰,长相干探测光源能克服这一问题,但其产生分层干涉的可能性较大。

因此,可以使用脉冲光而不是连续光作为探测光,这样可在缩短照射时间的同时增大探测功率。将光放大技术与正交解算方法结合,能在实现完全非接触的同时,消除相位敏感性,同时也可获得轴向的光声信息。使用双贝塞尔光束的方法^[51]可在降低样品平整度要求的同时,实现更大景深的光声成像。

3.2.2 外差干涉式

图 1(e)所示为外差式干涉仪的典型配置,该仪器的关键在于参考光路的频移装置(如声光调制器)以及后续的解调系统。(4)式描述了 IQ 解调器输出信号与位移之间的关系。结合(3)式可以得到样品表面声压随时间的变化^[37]。

$$\epsilon(t) = \frac{\lambda}{4\pi} \left[\arctan \frac{Q(t)}{I(t)} + \phi_0 \right], \quad (4)$$

式中： $\epsilon(t)$ 为随时间变化的微小位移； λ 为探测光波长； $I(t)$ 为同相信号； $Q(t)$ 为正交信号； ϕ_0 为初相位。

Eom 等^[56]搭建了基于外差式干涉的非接触光声成像系统，采用扩散激发光照射整个成像区域，声光调制器工作在 80 MHz，探测光使用 1550 nm 的长相干激光源，光源功率为 1 mW。图 5(a)为黑色聚乙烯纤维仿体和鸡胚绒毛尿囊膜的成像结果，实验中使用的激光能量密度为 10 mJ/cm²，符合 ANSI 标准。系统的横向、轴向分辨率分别为 100 μ m 和 30 μ m。随后，Eom 等^[57]又设计了双模态 PA-OCT

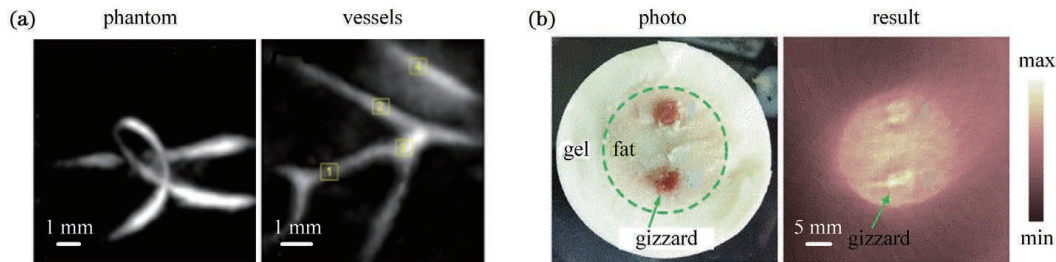


图 5 马赫-曾德尔外差干涉式非接触光声成像结果。(a)黑色聚乙烯纤维仿体和鸡胚绒毛尿囊膜的重建图像^[56]；(b)鸡胚仿体截面图及其 360°扫描下的重建图像^[58]

Fig. 5 Non-contact PA imaging with heterodyne Mach-Zehnder interferometer. (a) Reconstructed images of black polyethylene terephthalate fibers and chicken chorioallantoic membrane^[56]；(b) cross section of the chicken gizzards and reconstructed image with 360° scan^[58]

3.2.3 激光散斑式

当一束相干光照射在粗糙表面时，其背向散射光相互干涉，形成激光散斑^[59]。图 1(c)所示为基于激光散斑的非接触光声成像的典型配置^[38-39,60]。扩束后的探测光分为参考光路和探测光路。探测光路照射粗糙样品表面，形成激光散斑；散斑图案随后与带有微小倾角(离轴)的参考光相叠加后，被高速相机拍摄。如果样品表面某点由于光声信号扰动而产生轴向形变，就会导致散斑图案相移，此时采用空间相移法^[61]或傅里叶变换对高速相机拍摄的离轴干涉图案进行处理就可以得到绝对相移(位移)值。Horstmann 等^[39]最早使用该配置，在无需扫描的情况下得到了 2 mm 厚猪皮表面的位移扰动图像，并通过延迟叠加算法获得了仿体的三维重建图。虽然仅进行了仿体实验且成像质量欠佳，但实验结果证明该方法的位移灵敏度较高，可达 ± 1 nm。随后 Buj 等^[38]对该配置进行了一系列改进，将采样频率提高到 40 MHz，并将激发光的重复频率提高到 1 kHz，以提高成像质量和成像速度。图 6(a)为埋

成像系统。Tian 等^[58]使用商用外差干涉仪完成了光声信号的获取以及光声图像的重建。他们在实验中使用的声光调制器使参考光发生了 40 MHz 的稳定频移。在 532 nm 激发光下，Tian 等采用商用外差干涉仪对圆柱形琼脂包埋的脂肪、鸡胗进行了 360°环形扫描光声信号的非接触采集，最后得到了如图 5(b)所示的重建结果。他们在实验中使用的激光能量密度为 18 mJ/cm²，满足 ANSI 的要求，但探测光的功率为 10 mW，在 300 次的平均采集模式下超出了 MPE 的限制。外差式干涉目前多被用于仿体成像，且要求被测表面光滑，或须要将液滴置于粗糙的被测组织表面，因此是一种准非接触的光声成像方法。

在 2 mm 猪皮下的充满黑色染料的 U 型硅胶管的三维重建结果。值得注意的是，虽然该系统不需要进行空间扫描，但却需要工作在三脉冲模式下，以弥补相机帧率的限制。Benyamin 等^[62]将散斑衬比分析方法应用于光声信号检测中，利用相机的长曝光特性来降低对相机帧率的要求。由光声波产生的微小机械位移会降低激光散斑的衬比度，光声信号越强，帧衬比度越小。利用脉冲激发光对充满墨水的硅胶管进行扫描，在每个扫描位点上，使用 59 μ s 长曝光、低帧率的 CMOS 相机拍摄 780 nm 连续光照射样品表面后产生的散斑图案，计算衬比度并将其作为该点的光声强度，以达到非接触成像的目的，如图 6(b)所示。在远场近似的条件下，由光声波产生的样品表面的微小倾斜会对散斑图案造成可观的位移，通过帧与帧之间的相关分析可以量化光声波造成的表面倾斜^[63]。Lengenfelder 等^[64-65]利用该原理使用 823500 Hz 频率的相机得到了散斑遥感光声信号，随后 Shabairou 等^[66]使用多模光纤来传递散斑光信号，并使用光场流算法进行散斑分析，使得基

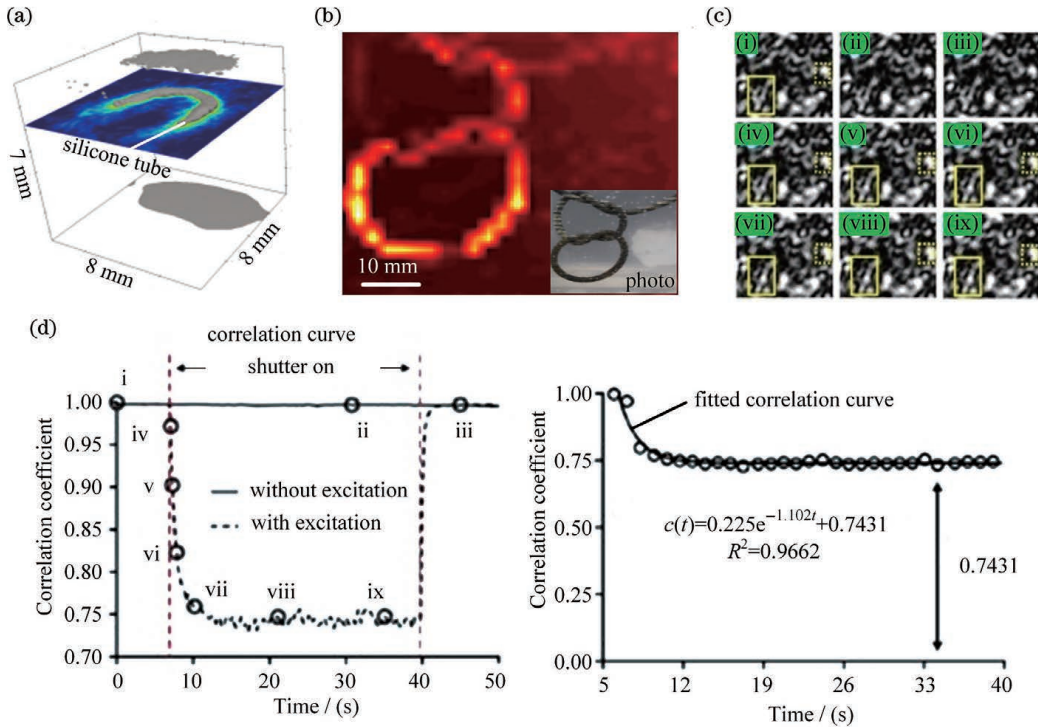


图 6 激光散斑式非接触光声成像。(a) 墨水管的三维重建结果^[38]；(b) 基于散斑衬比度的油墨管成像结果^[62]；(c) 不同时刻的散斑图案^[67]；(d) 不同时刻的散斑图案对应的相关系数及其指数拟合曲线^[67]

Fig. 6 Non-contact PA imaging using laser speckle pattern. (a) Three-dimensional reconstructed image of ink tube^[38] ; (b) PA image of an ink tube based on speckle contrast^[62] ; (c) speckle patterns at different time^[67] ; (d) correlation coefficients of the speckle patterns as a function of time and its exponential fitted curve^[67]

于散斑分析的光声内窥成像成为可能,但是该方法依旧会受到相机帧率的限制。Li 等^[67]在不同强度的弱激发光照射下,研究了散斑的时间相关性,图 6(c)所示为不同时刻的散斑图案。样品经重复频率为 100 Hz 的激发光激发后,帧与帧之间的相关性下降,通过指数函数拟合可以定量光声强度,如图 6(d)所示。

与外差、零差干涉式非接触光声成像相比,基于激光散斑的非接触光声成像具有更小的相位噪声敏感性,而且其中的某些方法还无需参考光路,简单的探测光路配置就能感知粗糙反射面的细微变化^[62-67]。但目前的方法和实验多集中在原理可行性验证阶段,且所用的激发光能量密度普遍较高。更高帧率和灵敏度的相机可以提高成像速度和信号质量,这也是人们研究基于激光散斑的非接触光声成像的关键因素^[60,66]。

3.3 非相干式非接触光声成像

基于光学相干的光声探测方法大部分需要系统工作在正交工作点,以保证高灵敏度,但这也导致了系统的复杂性和不稳定性。2017 年, Hajireza 等^[68]首次提出了一种基于弹光效应的光声遥感(PARS)

显微技术,该技术使用非相干光进行非接触的光声探测,因此对相位不敏感。如图 1(f)所示,激发光和探测光工作在完全共聚焦模式下,位于焦点处的吸收物质(如血红蛋白)吸收激发光后产生约百兆帕的初始声压 P_0 ,由于弹光效应,光声初始压强的瞬变会引起该吸收体折射率的突变[如(5)式所示],因此可以产生显著的反射强度时变[如(6)式所示]。图 1(f)中,探测部分通过偏振分束镜和四分之一波片组合的方式产生圆偏振光并实现反射光强的检测。图 7(a)为采用 PARS 显微技术对鸡胚绒毛尿囊膜成像的结果。该方法可以从原理上避免一切相位噪声,具有极高的分辨率以及比传统接触式光声显微成像更高的信噪比^[68]。

$$\delta n = \frac{\eta n_0(x)^3 p(x,t)}{2\rho v_a^2}, \quad (5)$$

$$\Delta R = \left| \frac{n_1 + \delta n - n_2}{n_1 + \delta n + n_2} \right|^2 - R, \quad (6)$$

式中: δn 为折射率的变化量; η 为弹光系数; $n_0(x)$ 为空间变化的静态折射率分布; $p(x,t)$ 为时空变化的压强分布; ρ 为密度; v_a 为声速; ΔR 为反射系数的变化量; n 为折射率; n_1 和 n_2 分别为构成界面的

两种介质的折射率; R 为反射系数。

目前,PARS 技术在分辨率、信噪比、成像深度、成像速度、成像对比度和多模态等方面都取得了重大进展。在非接触机理方面,研究人员建立了一系列物理模型,得到了基于弹光效应的非接触光声信号的仿真结果^[69-71]。在成像分辨率方面,PARS 具有全光探测的优势,能在反射模式下使用比传统接触式光声显微成像倍率更高的物镜,能将 532 nm 激发光的系统分辨率提高至 $0.67 \mu\text{m}$ ^[72]。在图像信噪比方面,PARS 具有比传统接触式光声显微成像更高的信噪比^[68]。在成像深度方面,利用 1310 nm 探测光穿透深度大的特点开发的 PARS 的深度显微模式,突破了传统可见光显微成像的深度极限,能够在模拟组织的散射介质中提供 2.5 mm 深度的光学分辨率图像^[72]。在成像速度方面,高速振镜配合 600 kHz 高重复频率激光器可以实现 25 Hz 的成像频率,成像面积约为 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ^[68,73]。马赛克光机联合扫描策略可以在 26 s

内完成 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 的大视场高分辨率成像^[74]。在成像对比度方面,PARS 成像涵盖紫外^[75-76]、蓝光^[77]、绿光^[78]、近红外^[79]等激发波长,并且人们已经开发出基于弹光效应的非接触光声光谱系统^[80],如图 7(b)所示,并利用该系统得到了离体乳腺组织的高光谱光声图像。在功能性成像中,如图 7(c)所示,通过双波长可成像血氧饱和度^[72]。Bell 等^[78]提出了宽激励解混算法,该算法能够实时成像血氧饱和度。Zhou 等^[81]搭建了 PARS 与荧光显微结合的双模态成像系统,并利用该系统实现了对注射有罗丹明 B 的斑马鱼幼体的光声-荧光互补成像。在成像应用中,基于紫外的 PARS 系统已经能够对人体乳腺、肠胃、大脑、皮肤等离体组织^[82-85]以及细胞^[86-87]进行多对比度的非标记组织学成像,成像结果可与苏木精-伊红(H&E)染色成像相媲美。虽然该技术在各方面均取得了瞩目的结果,但该方法也存在一定的局限性:由于是共聚焦配置,无法得到代表深度的 Aline 信号,因此无法实现声学切片。

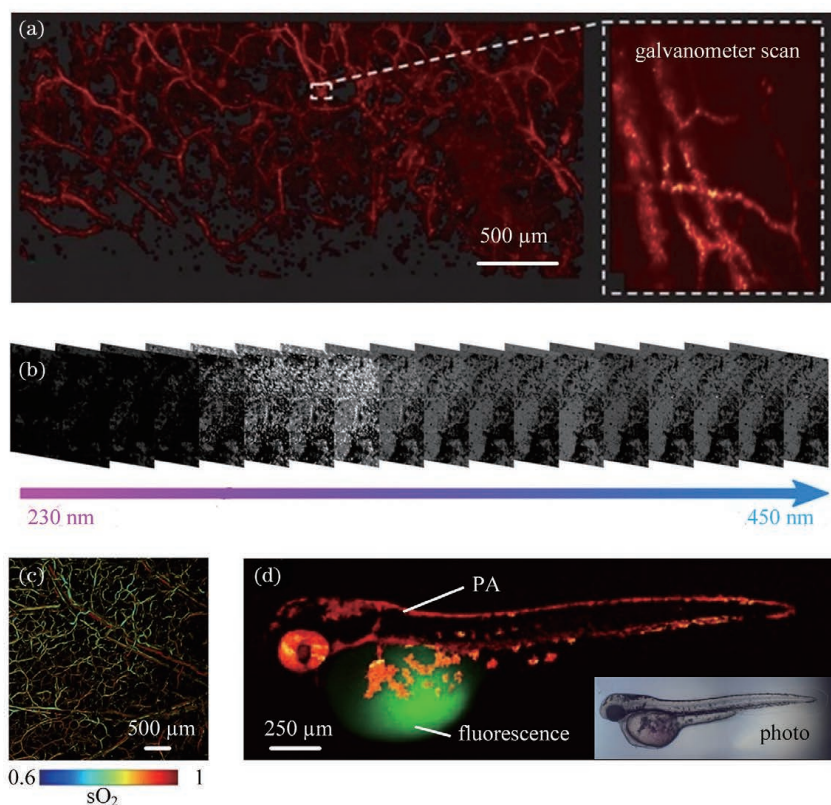


图 7 非相干的非接触光声成像结果。(a)小鼠耳朵的成像结果^[68]; (b)甲醛固定、石蜡包埋的人乳腺组织切片的高光谱成像结果^[80]; (c)双波长下血氧饱和度的成像结果^[72]; (d)注射有罗丹明 B 溶液的斑马鱼幼体的双模态成像结果^[81]

Fig. 7 Non-interferometric non-contact PA imaging. (a) PA imaging of a mouse ear^[68]; (b) hyperspectral PA imaging acquired on an unstained formalin-fixed paraffin-embedded human breast tissue slide^[80]; (c) imaging of oxyhemoglobin saturation with dual-wavelength^[72]; (d) dual-modal imaging of the zebrafish larva microinjected with a rhodamine B solution^[81]

4 非接触光声成像技术的特色应用

4.1 无标记组织学成像

在肿瘤切除手术中,通常依靠成像手段来评估原位切缘。H&E 染色或冷冻组织切片是目前常用的病理可视化方式,但是前者一般需要长达两周的时间代价,而后的成像质量相对较差^[75]。核酸在 266 nm 处存在特异性吸收峰,因此紫外激发的光声显微镜有望实现术中无标记组织学成像^[17-18],但是传统的接触式显微镜无法适应术中非接触的要求,且无法在反射式成像配置下使用高倍物镜^[17]。2019 年,Haven 等^[87]首次将 266 nm 激发波段用于 PARS,通过离轴抛物面镜实现激发-探测光的消色差共聚焦,横向分辨率达到了 0.69 μm ,成功得到了 HeLa 活细胞、带有肿瘤细胞的 CAM 切片的非接触、无标记、高分辨率紫外光声显微图像。随后,他们将该系统在反射模式下的分辨率提高到了 0.39 μm ^[86]。研究人员采用 PARS 首次对甲醛固定及石蜡包埋的乳腺组织切片(块)、胰腺组织切片、扁桃体组织切片和大脑胶质瘤等人体离体组

织进行了无标记组织学成像^[75],还对 PARS 组织学图像的核面积、核间距和核圆度进行了定量研究,以分析细胞的变异性。为了获得更加丰富的信息,可将 PARS 与多激发波长结合,实现核酸、血红蛋白以及细胞色素的同时成像^[82]。图 8 所示为 FFPE(formalin-fixed paraffin embedded)的人乳腺组织块的 PARS 反射式成像结果。PARS 在 0.425 μm 分辨率下实现了 17 mm \times 17 mm 的大视野细胞核成像,如图 8(a)所示,其中的基质结缔/胶原组织、脂肪组织和纤维腺组织清晰可见,如图 8(b)所示。使用双色激发模式(250 nm 和 420 nm)可以得到与 H&E 染色非常接近的成像结果,浸润性导管癌(IDC)组织在 PARS 图像中清晰可见,如图 8(c)~(f)所示。值得注意的是,PARS 图像无需染色和切片就能够直接对组织块的平整面进行亚微米分辨率的非接触、反射式扫描成像,而且能够得到与 H&E 染色高度一致的结果,这使得外科手术医师能够在术中获得实时的可视化反馈。PARS 式光声显微成像技术向术中临床迈出了重要一步。

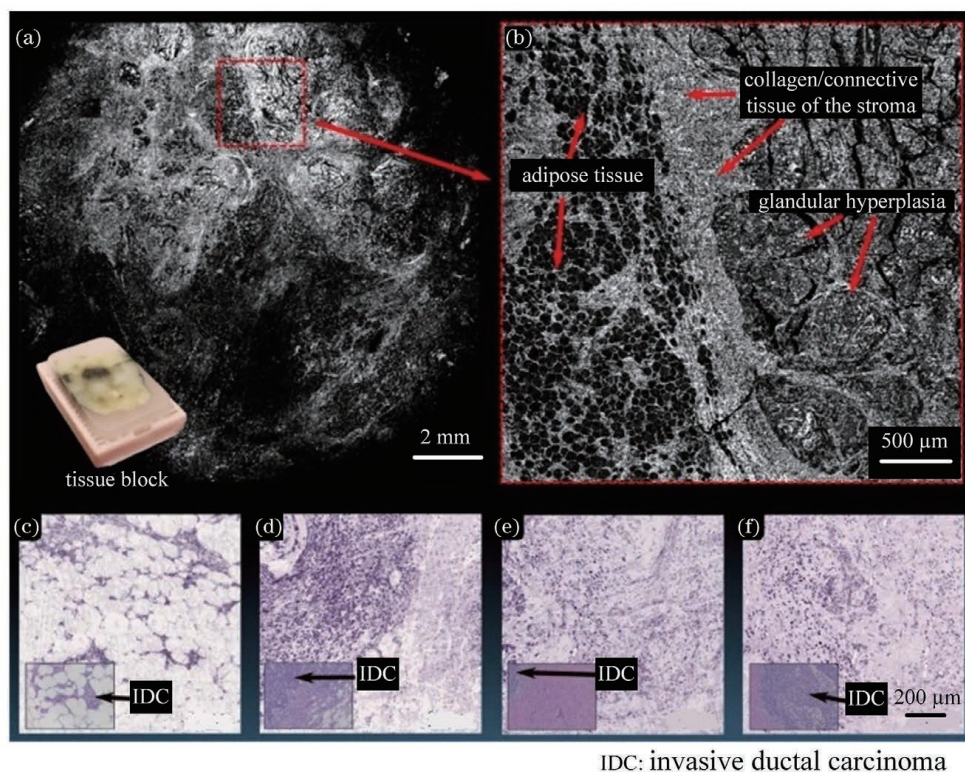


图 8 人乳腺组织块的 PARS 成像^[82]。(a)(b)266 nm 激发光下的大视野 PARS 成像以及虚线框区域的更高分辨率成像;(c)~(f)组织块的双色(250 nm 和 420 nm)PARS 成像结果,左下角插图均为 H&E 染色图像

Fig. 8 PARS imaging performed on tissue blocks of human breast^[82]. (a)(b) PARS large field of view imaging with 266 nm excitation and higher resolution imaging of dashed box; (c)~(f) PARS imaging of tissue blocks with 250 nm and 420 nm excitation, bottom left inserts are H&E-stained images

4.2 眼部成像

眼部疾病的早期诊断有助于对病理生理的认识,而且对准确监测和有效治疗具有重要意义。由于光声成像对血管结构、血氧饱和度有着独特的对比度,因此光声眼镜已被用于眼组织中血红蛋白和黑色素的可视化^[88]、眼内血氧饱和度的定量测量^[89]、氧消耗代谢率的测量上^[90]。由于接触式光声成像中耦合液的存在,眼部光声成像存在一定的局限性,如增大感染风险和造成不适等,而非接触光声成像可以克服这些不足,在眼部成像中充分发挥光声成像的独特优势。Hosseinaee 等^[91]首次将 PARS-OCT 双模态成像系统应用于活体眼部成像中,利用互相补充的光学吸收信息与光学散射信息,

得到了小鼠眼部组织功能性结构的成像结果。图 9 所示为使用数值孔径为 0.4 的物镜对眼组织的双模态成像结果。图 9(a)为 OCT 的三维成像结果,其中 B-scan 结果如图 9(b)所示,虚线框中为虹膜组织,箭头所指凸起为虹膜组织的管脉系统。图 9(c)为 OCT 的单层 C-scan 图像,虚线框中的大血管结构隐约可见。对应的 PARS 血管的成像结果如图 9(d)所示。结果显示,PARS 成像技术能无创、同步和准确地测量眼组织的功能和结构细节。在未来可进一步扩展系统的视野范围,实现对兔子和大鼠眼部成像,同时可引入血流速度成像,以测量氧代谢率。综上,非接触方法具有成为眼科医生诊断和治疗眼病新手段的潜力。

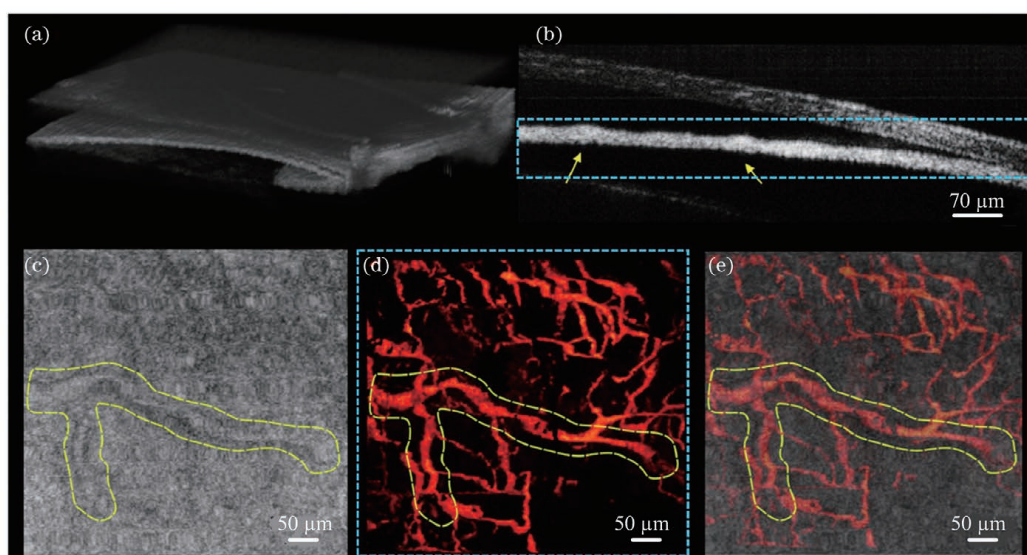


图 9 小鼠眼部组织的 PARS-OCT 双模态活体成像^[91]。(a)眼睛的 OCT 三维体积成像;(b)虹膜血管(箭头所指)的 OCT 截面成像结果;(c)~(e)虹膜血管的 OCT、PARS 成像以及二者的叠加成像结果

Fig. 9 *In-vivo* imaging of the ocular tissue with dual-modal PARS-OCT^[91]. (a) Three-dimensional volume OCT imaging of the eye; (b) OCT cross-section imaging of the iris vasculature (yellow arrows); (c)~(e) OCT and PARS images of the iris vasculature and their overlay image

4.3 皮肤非接触光学活检

非接触光声成像可以避免与被测组织接触,因此在受伤皮肤成像的应用方面具有广阔的前景^[23,48-49]。华南师范大学的 Zhou 等^[48-49]将迈克耳孙干涉仪作为全光非接触的光声探测装置,并结合 OCT 系统,搭建了全光集成的光声、OCT 双模态成像系统(AOPA/OCT),并将该系统应用到皮肤肿瘤生长过程中的血管形态、血流时空异质性、组织微结构变化以及病理生理相关性分析中^[45,48-49]。他们通过在小鼠耳朵皮下接种 B14F10 黑色素瘤和 TE 354. T 基底细胞癌细胞构建了肿瘤模型,图 10 为黑色素瘤生长过程中的 AOPA/OCT 图像以及

组织学成像对比。随着黑色素瘤的生长,血管纹路在不同时间点有明显改变(如 AOPA 光学吸收强度图所示),血流速度明显增大(如 AOPA 血流速度图像所示),以便为癌细胞提供充足的营养和氧气。图 10(i)~(l)所示的 OCT 图像表明,垂冰状的凸起结构逐渐明显,与 H&E 染色切片中致密的癌细胞核分布对应。同时,Zhou 等使用 AOPA/OCT 对血管形态、血流时空异质性进行了一系列相关统计分析。Zhou 等提出的基于迈克耳孙干涉的非接触光声成像方法能为皮肤科医生提供与组织学相关的解剖和功能信息,具有发展成为一种临床治疗、诊断新工具潜力。

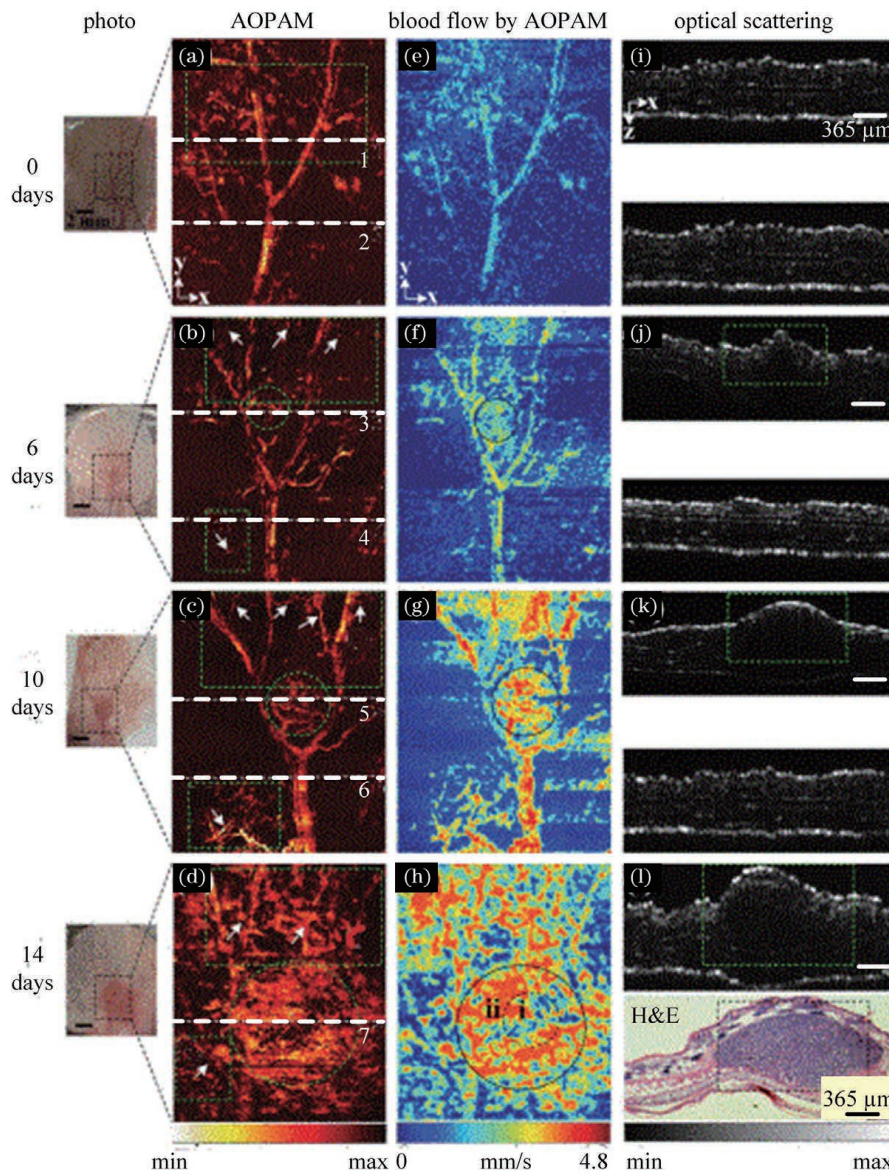


图 10 黑色素瘤生长过程的非接触双模成像^[48]。(a)~(d)非接触光声图像;(e)~(h)血流速度图像;(i)~(l)白色虚线 1~7 对应的 OCT 图像,H&E 为(l)对应的 H&E 染色的组织学图像

Fig. 10 Non-contact dual-modal imaging of melanoma progression^[48]. (a)–(d) Non-contact PA images; (e)–(h) blood flow images; (i)–(l) OCT images corresponding to the white dotted lines 1–7 in (a)–(d), H&E is hematoxylin and eosin-stained histologic image corresponding to OCT image in (l)

非接触光声成像的性能总结如表 1 所示。空气耦合式非接触光声成像具有直接、简单的探测方式,已被应用于激光手术监测^[29]、皮肤烧伤^[23]和血糖监测^[32],但其轴向分辨率和灵敏度较差。零差干涉式非接触光声成像能在分辨率、灵敏度等方面达到传统接触式光声成像的水平,并已被成功应用于皮肤光学活检^[48]。目前,零差干涉式非接触光声成像普遍需要辅助液滴,以增强信噪比,同时避免对样品表面施加过大的能量密度。外差干涉式非接触光声成像在宏观成像中应用得较多,但聚焦于表面的探测光的能量密度过高^[58]。光学散斑式非接触光声

成像具有系统结构简单的特点,且对样品表面的粗糙度要求不高^[62-67],有望实现内窥式光声遥感,但光学散斑式系统的成像速度和信号质量受限于相机的帧率。非相干式的 PARS 技术能完全避免相位噪声,且具有很高的探测灵敏度和成像分辨率,已被成功应用于非标记、非接触的组织学成像^[82]和眼科成像^[91]中,但该方式的探测信号无法体现深度方向的信息。总的来说,非接触光声成像在横向/轴向分辨率、成像深度、成像速度、成像模态、成像对比度、成像信噪比等方面取得了巨大进步,在组织学成像、皮肤光学活检、眼科成像等方面具有独特应用。

表 1 非接触光声成像的性能总结

Table 1 Summary of non-contact PA imaging performance

Method	Fluence		Scale		Image		Application	
	Excitation	Probe	Micro	Macro	Resolution	Sensitivity		
Air-coupled	Transducer ^[19-20]	Approach		✓	✓	6 μm/1 mm	Not good	Laser surgery
		ANSI						burn injury
	Resonance ^[27,29]	Below		✓		2.1 μm/90 μm	Not good	Spectrometry
		ANSI						
	Homodyne ^[45,51]	Below	Below	✓	✓	<10 μm/20 μm	Great	Optical biopsy
		ANSI	ANSI					
Interference	Heterodyne ^[53,55]	Approach	Beyond		✓	100 μm/1 mm	Good	—
		ANSI	ANSI					
	Speckle ^[35,63]	Approach	Below		✓	Unknow	Good	Endoscopy
		ANSI	ANSI					
Non-interference	PARS ^[72,88]	Below	Below	✓		<10 μm	Great	Histology eye
		ANSI	ANSI					

5 结束语

本文综述了近年来快速发展的非接触光声成像的典型实现方式、工作原理、最新技术进展,以及该技术在生物医学领域中的应用。经过最近几年的发展,基于不同原理的非接触成像方式各有所长,以适应不同的应用需求。目前,非接触光声成像仍面临诸多挑战。首先,已发展的各式非接触检测方法还具有一定的局限性,在成像时空分辨率、探测灵敏度、探测深度和探测信息丰富度等方面无法兼得,尚无兼具所有最优性能的探测方法。其次,干涉式系统通常受到相位噪声的影响,且该影响随着深层组织初始压强的减小而越发显著,因此宽场光激发的干涉式非接触光声成像技术还无法得到与压电超声探头相媲美的成像结果,非接触的光声宏观成像还需要进一步发展。此外,空气耦合式探测技术需要突破超声探测灵敏度的限制,研究的重点就是发展新型高灵敏度空气耦合超声探测设备(例如光学麦克风),代替传统压电超声换能器。

光学相干式和光学非相干式探测技术需要突破无法兼具探测信号鲁棒性和轴向深度信息的局限。光学相干式探测技术需要提高探测灵敏度并减小相位噪声,而光学非相干式探测技术需要有效获取轴向深度信息,故两项技术交叉结合(例如相干门控光声遥感技术^[71])有望解决目前无法兼具探测信号鲁棒性和轴向深度信息的难题。最后,目前的非接触光声成像大多用于临床前的研究,如何根据技术特点进行临床和实际应用转化是研究人员重点探索的

方向。空气耦合式非接触光声成像以简单、稳定的系统构架在术中成像、人类皮肤成像中具有巨大潜力,相干式非接触光声成像以较高的空间分辨率在术中光学活检中有很大的发展空间,非相干式非接触光声成像以完全非接触和高分辨率的特点在眼科功能成像中具有巨大优势,同时也是非接触光声成像发展的重点。随着科学技术的不断发展,非接触方式有望代替传统的接触方式,使光声成像成为更具吸引力的生物医学成像手段。

参 考 文 献

- [1] Wang L V, Yao J J. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences [J]. Nature Methods, 2016, 13(8): 627-638.
- [2] Long X Y, Tian C. Biomedical photoacoustic microscopy: advances in technology and applications [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207016.
- [3] Omar M, Aguirre J, Ntziachristos V. Optoacoustic mesoscopy for biomedicine [J]. Nature Biomedical Engineering, 2019, 3(5): 354-370.
- [4] Liu Q, Jin T, Chen Q, et al. Research progress of miniaturized photoacoustic imaging technology in biomedical field [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207019.
刘强, 金天, 陈倩, 等. 小型化光声成像技术在生物医学领域的研究进展 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207019.
- [5] Na S, Russin J J, Lin L, et al. Massively parallel functional photoacoustic computed tomography of the human brain [J]. Nature Biomedical Engineering,

- 2021: 1-9.
- [6] Wang X H, Luo Y, Chen Y W, et al. A skull-removed chronic cranial window for ultrasound and photoacoustic imaging of the rodent brain[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2021, 15: 673740.
- [7] Li Y, Li L, Zhu L R, et al. Snapshot photoacoustic topography through an ergodic relay for high-throughput imaging of optical absorption[J]. *Nature Photonics*, 2020, 14(3): 164-170.
- [8] Nguyen V P, Li Y, Zhang W, et al. High-resolution multimodal photoacoustic microscopy and optical coherence tomography image-guided laser induced branch retinal vein occlusion in living rabbits [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 10560.
- [9] Tian C, Zhang W, Mordovanakis A, et al. Noninvasive chorioretinal imaging in living rabbits using integrated photoacoustic microscopy and optical coherence tomography[J]. *Optics Express*, 2017, 25(14): 15947-15955.
- [10] Lu T, Gao F, Song S Z, et al. Tumor-specific imaging of small animals based on multi-angle optoacoustic mesoscopy imaging method[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207032.
路彤, 高峰, 宋少泽, 等. 基于多角度光声介观成像方法的小动物肿瘤特异性成像[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207032.
- [11] Wu H Q, Wang H Y, Xie W M, et al. Potential applications of photoacoustic imaging in early cancer diagnosis and treatment[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(7): 070001.
吴华钦, 王昊宇, 谢文明, 等. 光声成像技术在早期癌症检测治疗中的潜在应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(7): 070001.
- [12] Li J, Chekkoury A, Prakash J, et al. Spatial heterogeneity of oxygenation and haemodynamics in breast cancer resolved *in vivo* by conical multispectral optoacoustic mesoscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 57.
- [13] Liu C, Chen J B, Zhang Y C, et al. Five-wavelength optical-resolution photoacoustic microscopy of blood and lymphatic vessels [J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(1): 016002.
- [14] Li R, Phillips E, Wang P, et al. Label-free *in vivo* imaging of peripheral nerve by multispectral photoacoustic tomography[J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, 9(1/2): 124-128.
- [15] Matthews T P, Zhang C, Yao D K, et al. Label-free photoacoustic microscopy of peripheral nerves [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 016004.
- [16] Deán-Ben X L, Razansky D. Optoacoustic imaging of the skin[J/OL]. *Experimental Dermatology*, 2021: exd. 14386 (2021-05-13) [2021-06-16]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/exd.14386>.
- [17] Li X, Kang L, Zhang Y, et al. High-speed label-free ultraviolet photoacoustic microscopy for histology-like imaging of unprocessed biological tissues[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(19): 5401-5404.
- [18] Yao D K, Maslov K, Shung K K, et al. *In vivo* label-free photoacoustic microscopy of cell nuclei by excitation of DNA and RNA [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(24): 4139-4141.
- [19] Shi J, Wong T T W, He Y, et al. High-resolution, high-contrast mid-infrared imaging of fresh biological samples with ultraviolet-localized photoacoustic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13: 609-615.
- [20] Pleitez M A, Khan A A, Soldà A, et al. Label-free metabolic imaging by mid-infrared optoacoustic microscopy in living cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(3): 293-296.
- [21] Li J, Yao Y X, Jiang L W, et al. Time-domain terahertz optoacoustics: manipulable water sensing and dampening [J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(2): 026003.
- [22] Deán-Ben X L, Pang G A, Montero de Espinosa F, et al. Non-contact optoacoustic imaging with focused air-coupled transducers[J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 107(5): 051105.
- [23] Ma H G, Xiong K D, Wu J W, et al. Noncontact photoacoustic angiography with an air-coupled ultrasonic transducer for evaluation of burn injury [J]. *Applied Physics Letters*, 2019, 114(13): 133701.
- [24] Ntziachristos V, Yoo J S, van Dam G M. Current concepts and future perspectives on surgical optical imaging in cancer[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(6): 066024.
- [25] Chen Y W, Chen B H, Yu T F, et al. Photoacoustic mouse brain imaging using an optical Fabry-Pérot interferometric ultrasound sensor [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2021, 15: 672788.
- [26] Xu M H, Wang L V. Universal back-projection algorithm for photoacoustic computed tomography [J]. *Physical Review E*, 2005, 71: 016706.
- [27] Deán-Ben X L, Razansky D. Optoacoustic image formation approaches: a clinical perspective [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2019, 64(18): 18TR01.
- [28] Kolkman R G M, Blomme E, Cool T, et al. Feasibility of noncontact piezoelectric detection of photoacoustic signals in tissue-mimicking phantoms

- [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(5): 055011.
- [29] Landa F J, Deán-Ben X L, Montero de Espinosa F, et al. Noncontact monitoring of incision depth in laser surgery with air-coupled ultrasound transducers[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(12): 2704-2707.
- [30] Sathiyamoorthy K, Strohm E M, Kolios M C. Low-power noncontact photoacoustic microscope for bioimaging applications[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(4): 046001.
- [31] Sathiyamoorthy K, Kolios M C. Experimental design and numerical investigation of a photoacoustic sensor for a low-power, continuous-wave, laser-based frequency-domain photoacoustic microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2019, 24(12): 121912.
- [32] Sim J Y, Ahn C G, Jeong E J, et al. *In vivo* microscopic photoacoustic spectroscopy for non-invasive glucose monitoring invulnerable to skin secretion products[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1059.
- [33] Zhu X Y, Huang Z Y, Li Z Y, et al. Resolution-matched reflection mode photoacoustic microscopy and optical coherence tomography dual modality system[J]. *Photoacoustics*, 2020, 19: 100188.
- [34] Lin X W, Liang Y Z, Jin L, et al. Dual-polarized fiber laser sensor for photoacoustic microscopy[J]. *Sensors*, 2019, 19(21): 4632.
- [35] George D, Lloyd H, Silverman R H, et al. A frequency-domain non-contact photoacoustic microscope based on an adaptive interferometer[J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(6): e201700278.
- [36] Wang Y, Li C H, Wang R K. Noncontact photoacoustic imaging achieved by using a low-coherence interferometer as the acoustic detector[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(20): 3975-3977.
- [37] Park S J, Eom J, Kim Y H, et al. Noncontact photoacoustic imaging based on all-fiber heterodyne interferometer[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(16): 4903-4906.
- [38] Buj C, Horstmann J, Münter M, et al. Speckle-based off-axis holographic detection for non-contact photoacoustic tomography[J]. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 2015, 1(1): 356-360.
- [39] Horstmann J, Spahr H, Buj C, et al. Full-field speckle interferometry for non-contact photoacoustic tomography[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2015, 60(10): 4045-4058.
- [40] Park S, Rim S, Kim Y, et al. Noncontact photoacoustic imaging based on optical quadrature detection with a multiport interferometer[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(10): 2590-2593.
- [41] Chen Z J, Yang S H, Wang Y, et al. Noncontact broadband all-optical photoacoustic microscopy based on a low-coherence interferometer[J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 106(4): 043701.
- [42] Speirs R W, Bishop A I. Photoacoustic tomography using a Michelson interferometer with quadrature phase detection[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 103(5): 053501.
- [43] Liu J, Tang Z L, Tang H C, et al. Noncontact photoacoustic tomography imaging using a low-coherence interferometer with rapid detection of phase modulation[J]. *Proceedings of SPIE*, 2014, 9230: 92301P.
- [44] Park S, Rim S, Kim Y, et al. Noncontact photoacoustic imaging based on optical quadrature detection with a multiport interferometer[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(10): 2590-2593.
- [45] Chen Z J, Yang S H, Wang Y, et al. All-optically integrated photo-acoustic microscopy and optical coherence tomography based on a single Michelson detector[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(12): 2838-2841.
- [46] Qiao W, Chen Z J, Zhou W T, et al. All-optical photoacoustic Doppler transverse blood flow imaging[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(11): 2442-2445.
- [47] Sampathkumar A, Hughes D A, Longbottom C, et al. All-optical photoacoustic imaging and detection of early-stage dental caries[J]. *Proceedings of SPIE*, 2015, 9306: 93060E.
- [48] Zhou W T, Chen Z J, Zhou Q, et al. Optical biopsy of melanoma and basal cell carcinoma progression by noncontact photoacoustic and optical coherence tomography: *in vivo* multi-parametric characterizing tumor microenvironment[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2020, 39(6): 1967-1974.
- [49] Zhou W T, Chen Z J, Yang S H, et al. Optical biopsy approach to basal cell carcinoma and melanoma based on all-optically integrated photoacoustic and optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(11): 2145-2148.
- [50] Lu J, Gao Y Z, Ma Z H, et al. *In vivo* photoacoustic imaging of blood vessels using a homodyne interferometer with zero-crossing triggering[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(3): 036002.
- [51] Hu Y C, Chen Z J, Xiang L Z, et al. Extended depth-of-field all-optical photoacoustic microscopy with a dual non-diffracting Bessel beam[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(7): 1634-1637.
- [52] Hochreiner A, Bauer-Marschallinger J, Burgholzer P, et al. Non-contact photoacoustic imaging using a

- fiber based interferometer with optical amplification [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(11): 2322-2331.
- [53] Berer T, Leiss-Holzinger E, Hochreiner A, et al. Multimodal noncontact photoacoustic and optical coherence tomography imaging using wavelength-division multiplexing[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(4): 046013.
- [54] Leiss-Holzinger E, Bauer-Marschallinger J, Hochreiner A, et al. Dual modality noncontact photoacoustic and spectral domain OCT imaging[J]. *Ultrason Imaging*, 2016, 38(1): 19-31.
- [55] Wang Y, Hu Y X, Peng B Y, et al. Complete-noncontact photoacoustic microscopy by detection of initial pressures using a 3×3 coupler-based fiber-optic interferometer[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(1): 505-516.
- [56] Eom J, Park S J, Lee B H. Noncontact photoacoustic tomography of *in vivo* chicken chorioallantoic membrane based on all-fiber heterodyne interferometry[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(10): 106007.
- [57] Eom J, Shin J, Park S, et al. An all-fiber-optic combined system of noncontact photoacoustic tomography and optical coherence tomography [J]. *Sensors*, 2016, 16(5): 734.
- [58] Tian C, Feng T, Wang C, et al. Non-contact photoacoustic imaging using a commercial heterodyne interferometer[J]. *IEEE Sensors Journal*, 2016, 16(23): 8381-8388.
- [59] Boas D A, Dunn A K. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(1): 011109.
- [60] Buj C, Münter M, Schmarbeck B, et al. Noncontact holographic detection for photoacoustic tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(10): 106007.
- [61] Knoche S, Kemper B, Wernicke G, et al. Modulation analysis in spatial phase shifting electronic speckle pattern interferometry and application for automated data selection on biological specimens[J]. *Optics Communications*, 2007, 270(1): 68-78.
- [62] Benyamin M, Genish H, Califa R, et al. Non-contact photoacoustic imaging using laser speckle contrast analysis[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(12): 3110-3113.
- [63] Zalevsky Z, Beiderman Y, Margalit I, et al. Simultaneous remote extraction of multiple speech sources and heart beats from secondary speckles pattern[J]. *Optics Express*, 2009, 17(24): 21566-21580.
- [64] Lengenfelder B, Mehari F, Hohmann M, et al. Contact-free endoscopic photoacoustic sensing using speckle analysis[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(12): e201900130.
- [65] Lengenfelder B, Mehari F, Hohmann M, et al. Remote photoacoustic sensing using speckle-analysis [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1057.
- [66] Shabairou N, Lengenfelder B, Hohmann M, et al. All-optical, an ultra-thin endoscopic photoacoustic sensor using multi-mode fiber[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 9142.
- [67] Li H H, Cao F, Zhou Y Y, et al. Interferometry-free noncontact photoacoustic detection method based on speckle correlation change[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(22): 5481-5484.
- [68] Hajireza P, Shi W, Bell K L, et al. Non-interferometric photoacoustic remote sensing microscopy[J]. *Light, Science & Applications*, 2017, 6(6): e16278.
- [69] Bell K L, Hajireza P, Shi W, et al. Temporal evolution of low-coherence reflectometry signals in photoacoustic remote sensing microscopy[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(18): 5172-5181.
- [70] Bell K L, Hajireza P, Zemp R. Scattering cross-sectional modulation in photoacoustic remote sensing microscopy[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(1): 146-149.
- [71] Bell K L, Hajireza P, Zemp R J. Coherence-gated photoacoustic remote sensing microscopy[J]. *Optics Express*, 2018, 26(18): 23689-23704.
- [72] Reza P H, Bell K L, Shi W, et al. Deep non-contact photoacoustic initial pressure imaging [J]. *Optica*, 2018, 5(7): 814-820.
- [73] Abbasi S, Bell K L, Ecclestone B, et al. Live feedback and 3D photoacoustic remote sensing [J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2020, 11(3): 1033-1045.
- [74] Abbasi S, Bell K L, Haji Reza P. Rapid high-resolution mosaic acquisition for photoacoustic remote sensing[J]. *Sensors*, 2020, 20(4): 1027.
- [75] Abbasi S, Le M, Sonier B, et al. All-optical reflection-mode microscopic histology of unstained human tissues[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 13392.
- [76] Abbasi S, Le M, Sonier B, et al. Chromophore selective multi-wavelength photoacoustic remote sensing of unstained human tissues [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(11): 5461-5469.
- [77] Ecclestone B R, Bell K L, Abbasi S, et al. Improving maximal safe brain tumor resection with photoacoustic remote sensing microscopy[J].

- Scientific Reports, 2020, 10: 17211.
- [78] Bell K L, Haji Reza P, Zemp R J. Real-time functional photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Optics Letters, 2019, 44(14): 3466-3469.
- [79] Kedarisetti P, Haven N J M, Restall B S, et al. Label-free lipid contrast imaging using non-contact near-infrared photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Optics Letters, 2020, 45(16): 4559-4562.
- [80] Bell K L, Haji Reza P. Non-contact reflection-mode optical absorption spectroscopy using photoacoustic remote sensing [J]. Optics Letters, 2020, 45(13): 3427-3430.
- [81] Zhou J S, Wang W, Jing L L, et al. Dual-modal imaging with non-contact photoacoustic microscopy and fluorescence microscopy [J]. Optics Letters, 2021, 46(5): 997-1000.
- [82] Bell K L, Abbasi S, Dinakaran D, et al. Reflection-mode virtual histology using photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 19121.
- [83] Ecclestone B R, Abbasi S, Bell K L, et al. Towards virtual biopsies of gastrointestinal tissues using photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery, 2020, 11(3): 1070-1077.
- [84] Restall B S, Haven N J M, Kedarisetti P, et al. *In vivo* combined virtual histology and vascular imaging with dual-wavelength photoacoustic remote sensing microscopy [J]. OSA Continuum, 2020, 3(10): 2680-2689.
- [85] Ecclestone B R, Dinakaran D, Reza P H. Single acquisition label-free histology-like imaging with dual-contrast photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Journal of Biomedical Optics, 2021, 26(5): 056007.
- [86] Haven N J M, Kedarisetti P, Restall B S, et al. Reflective objective-based ultraviolet photoacoustic remote sensing virtual histopathology [J]. Optics Letters, 2020, 45(2): 535-538.
- [87] Haven N J M, Bell K L, Kedarisetti P, et al. Ultraviolet photoacoustic remote sensing microscopy [J]. Optics Letters, 2019, 44(14): 3586-3589.
- [88] Shu X, Li H, Dong B Q, et al. Quantifying melanin concentration in retinal pigment epithelium using broadband photoacoustic microscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(6): 2851-2865.
- [89] Chen S Y, Yi J, Zhang H F. Measuring oxygen saturation in retinal and choroidal circulations in rats using visible light optical coherence tomography angiography [J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(8): 2840-2853.
- [90] Song W, Wei Q, Liu W Z, et al. A combined method to quantify the retinal metabolic rate of oxygen using photoacoustic ophthalmoscopy and optical coherence tomography [J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6525.
- [91] Hosseinaee Z, Nima A, Pellegrino N, et al. Functional and structural ophthalmic imaging using noncontact multimodal photoacoustic remote sensing microscopy and optical coherence tomography [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 11466.

Progress and Biomedical Application of Non-Contact Photoacoustic Imaging

Li Jiao^{1,2*}, Li Shuai¹, Chen Jijing¹, Lu Tong¹, Gao Feng^{1,2}

¹ College of Precision Instruments and Opto-Electronic Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² Tianjin Key Laboratory of Biomedical Detecting Techniques and Instruments, Tianjin 300072, China

Abstract

Significance Optical imaging of biological tissue has become a powerful tool for biologists and clinicians. Photoacoustic imaging (PAI) is an acoustic-mediated optical imaging method that uses the photoacoustic effect to offer a highly sensitive and abundant optical contrast over a wide spatial and spectral range. PAI has achieved remarkable success in blood oxygen saturation imaging, brain vasculature functional imaging, histology-like tissue imaging, and so on. In most PAI systems, piezoelectric transducers (PZT) and coupled water are essential. However, these contact-configurations limit the application fields of PAI. Furthermore, PZT is bulky for system design, and it can degrade imaging performance.

Non-contact PAI is one of the most important directions of PAI, having the potential to realize better imaging performance and a wider range of applications without water coupling. Non-contact PAI is especially suitable for PA

ophthalmic imaging, intraoperative margin diagnosis, and burn diagnostics, which can avoid infection and discomfort. Meanwhile, the all-optical non-contact PA detection method can obtain a wider bandwidth and angular coverage. Minute-sized optical detection configuration makes for unblocked excitation and the multimodal design. Hence, it is of great significance to introduce and summarize the recent research in non-contact PAI and get an insight onto the characteristic application of the non-contact PAI technique in biomedical imaging.

Progress Various non-contact methods on interference and noninterference have been developed to implement a non-contact PAI. Air-coupled PAI based on a special low-frequency transducer has played a significant role in non-contact PAI. Low frequency contributes to less attenuation of PA waves. Deán-Ben *et al.* from Technical University Munich proposed an air-coupled PAI system using a homemade transducer with 800 kHz center frequency, which realized acoustic-resolution imaging [Fig. 2 (a)]. Ma *et al.* from South China Normal University proposed an optical-resolution imaging system. Burned rabbit's skin imaging [Fig. 2(b)] has been implemented to show that the non-contact PAI technique can be valuable in the adjuvant diagnosis and observation of burns. A frequency-domain PA detection based on a PA cell can realize non-contact imaging and spectral measurement [Fig. 2 (c)].

All-optical methods were also used to achieve a higher sensitivity for non-contact PAI, including interferometric and noninterferometric method. Interferometric methods can be divided into homodyne, heterodyne, and speckle modes. We use the interferometer to detect the phase difference, which is the result of the pressure. In homodyne mode, Wang *et al.* from the University of Washington reported a non-contact PAM (PA microscopy) system in which a low-coherence interferometer was utilized. Yang Sihua's team from South China Normal University proposed a PA-optical coherence tomography (PA-OCT) dual-modal system, which could provide complementary anatomical and functional information for imaging of biological tissues [Fig. 3(b)]. Based on the all-optical PA doppler effect, blood flow imaging was proposed to significantly broaden the scope of applications for obtaining the blood flow velocity of the microvasculature in biomedicine [Fig. 3(c)]. To adapt to the uneven surface, Hu *et al.* reported an extended depth-of-field non-contact PAM system using a dual nondiffracting Bessel beam. This system could image nonfat tissues with a high resolution ($2.4 \mu\text{m}$) and large depth-of-field ($635 \mu\text{m}$) [Fig. 3(e)], cooperated with a long coherence source. Furthermore, a 3×3 fiber coupler was used to eliminate phase noise and maintain phase stabilization. Wang *et al.* from Northeastern University demonstrated a 3×3 coupler-based fiber-optic interferometric system to detect local initial PA pressure. This method is fully non-contact and convenient for *in vivo* imaging [Fig. 4(d)]. In heterodyne mode, an acousto-optic modulator and IQ demodulator are needed for PA detection. Moreover, Eom *et al.* presented three-dimensional *in vivo* PA images of the blood vasculature of a chicken chorioallantois membrane obtained using a fiber-based non-contact PA tomography system [Fig. 5(a)]. Tian *et al.* proposed a non-contact PAI system using circular scan geometry, suggesting that the heterodyne interferometer could be potentially used in biomedical imaging. In speckle mode, the system configuration is simple, and it does not even need the reference light. Buj *et al.* developed a fast innovative holographic off-axis non-contact detection method for PAI, successfully imaging tissue phantoms with an embedded complex absorber structure, which imitated vascular networks [Fig. 6(a)]. Some methods based on correlation analysis of speckle were also utilized for imaging.

For the noninterferometric method, photoacoustic remote sensing (PARS) was first introduced by Hajireza *et al.* in 2017. In PARS, elasto-optical refractive index changes due to the transients of the PA initial pressure producing a significant time-varying reflection of a probe beam. Based on this mechanism, PA images can be obtained without any coherence noise (Fig. 7). The reason is that PARS has better sensitivity than traditional PAM in all-optical nature. PARS has been utilized for blood oxygen saturation imaging, virtual histology imaging, and ophthalmic imaging.

Furthermore, non-contact PAI has shown broad applications in the life sciences, especially in intraoperative margin diagnosis, ophthalmic imaging, and optical biopsy of cancer cells. Various tissue blocks were imaged by PARS with 266 nm excitation, and the results were highly consistent with H&E stained images (Fig. 8). A non-contact ophthalmic PA-OCT imaging could provide complementary structural and functional information of the eye (Fig. 9). Moreover, Zhou *et al.* demonstrated a preclinical device, all-optically integrated PA and OCT (AOPA/OCT), which can simultaneously provide label-free biomarkers of vascular patterns, temporal and spatial heterogeneity of blood flow, and tissue micro-structure changes during tumor growth with pathophysiological correlations in mice models (Fig. 10). However, these methods and systems have their advantages and disadvantages (Table 1).

Conclusions and Prospects Air-coupled, interferometric, and noninterferometric methods provide new ideas and technical strategies for non-contact PAI. Therefore, a clinical transformation that uses different technical characteristics is the focus of the exploration. As technology continues to evolve, non-contact methods are expected to replace traditional contact methods, making PAI a more attractive tool for biomedical applications.

Key words medical optical; photoacoustic imaging; non-contact; functional imaging; multimodality; biomedicine

OCIS codes 170.5120; 170.3880; 110.5120