

## 动态散射光测量在全场光学相干层析技术中的应用

田浩颖, 汤丰锐, 高万荣, 朱越\*

南京理工大学电子工程与光电技术学院, 江苏 南京 210094

**摘要** 全场光学相干层析术(FF-OCT)探测生物组织亚细胞水平折射率扰动的本征信号,为无标记成像提供了丰富的显微结构信息。动态全场光学相干层析技术(D-FFOCT)结合全场 OCT 低相干层析成像与动态散射光测量原理,可为细胞或组织提供亚细胞动态对比度。介绍了近年来 D-FFOCT 技术的发展,讨论了基于 D-FFOCT 的多模态成像技术,分析了成像系统的空间分辨率、信噪比和成像深度。针对目前 D-FFOCT 干涉信号易受扰动而产生图像伪影缺陷的问题,分析比较了运用高速相机、瞬时移相法、基于希尔伯特变换的算法和基于奇异值分解的图像滤波算法等消除伪影的方法,概述了 D-FFOCT 在基础生物学、精准医疗领域和药物研究方面的研究,并展望该技术在这些领域的发展前景和未来研究方向。

**关键词** 生物光学; 无标记成像; 全场光学相干断层扫描技术; 动态散射光测量; 图像伪影; 精准医疗

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202249.0507007

### 1 引言

光学相干层析技术(OCT)是一种无标记、非侵入、高分辨率的断层成像技术<sup>[1-3]</sup>。全场光学相干层析技术(FF-OCT)在传统 OCT 的基础上,使用一对大数值孔径显微物镜和宽带光源,将系统成像分辨率提高至亚微米量级<sup>[4]</sup>,成为了一种重要的生物医学成像手段。然而生物组织不同结构的后向散射能力具有差异,FF-OCT 的层析能力不足以使样本的单个细胞总是清晰可见,因此一种具有特殊分辨能力的成像技术是不同小组研究的目标之一。传统的荧光显微镜利用荧光染料或荧光抗体染色后能够对这类物质进行定性或定量的研究,也有一些成像技术使用造影剂来增强观测效果,但这些方法都会对生物样本产生影响。在使用 OCT 进行成像时,如果能够利用细胞的动态特性将细胞与周围的强散射介质进行区分,对生物样本影响较小,将成为一种重要的生物医学成像技术。

动态全场光学相干层析术(D-FFOCT)就是一

种基于 FF-OCT 分析细胞动态特性的方法。传统的 FF-OCT 利用正弦调制法获取不同深度的信息进行调制,放大了信号的深度信息,在调制后又将不同的结果平均,削弱了信号的时间信息,这使得传统 FF-OCT 对静态信息敏感。不通过移相对传统 FF-OCT 深度信息进行调制,而是将 FF-OCT 定步长移相调制的时间依赖特性运用于提取组织内微循环等细胞活动的时间信号,从而使其对动态信息敏感。巴黎文理研究大学的 Apelian 等<sup>[5-6]</sup>提出的结合 FF-OCT 和动态散射光测量的新技术就是 D-FFOCT。D-FFOCT 能够分析细胞的动态特性,在成像时提供动态对比度。该技术仅通过细胞自身随时间的代谢即可产生动态信号,可以看作是一套分析 FF-OCT 信号时间波动的数学工具。在处理由 D-FFOCT 获取的图像时,可以通过计算给定像素或一组像素时间信号的傅里叶变换来分辨频域信息,然后对不同频带的信号进行积分,并分别用 RGB 颜色空间的不同信道表示不同频带的动态信号,也可以使用色相饱和度(HSV)色彩空间来表示一些信

收稿日期: 2021-09-23; 修回日期: 2021-11-10; 录用日期: 2021-11-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(62005123)、江苏省自然科学基金青年基金(BK20190455)、教育部中央高校基本科研业务费(30919011226)、南京理工大学科研启动经费(AE89991/076)

通信作者: \*zhuyue@njjust.edu.cn

息,如用图像的亮度表示局部波动幅度,用图像颜色表示波动速度,方便对 D-FFOCT 采集到的图像进行处理和计算,另外在轴向上移动样品可以重构出样品的三维信号<sup>[7]</sup>。D-FFOCT 对动态信息的特殊分辨能力与细胞类型的分辨以及物质的定性定量研究有着重要的意义。

发展具有更高性能的 D-FFOCT 将会解决在生物和医学领域遗留的各种问题,有利于推动病理研究、诊断、胚胎学等技术的发展。但使用 D-FFOCT 技术进行成像时,如何去掉因干涉信号相位变化产生的图像伪影成为了 D-FFOCT 发展中的一个重要的问题。一方面,D-FFOCT 成像系统采用光路相对复杂的 Linnik 干涉结构,干涉信号的相位受系统微小振动的影响较大。在实验室中,研究人员可以充分固定系统,使系统的振动达到最小值,然而在实际应用中,外界条件引起的系统振动不可忽略。另一方面,D-FFOCT 信号全部来自组织的自身运动,在对活体组织进行光学成像时,样本组织自身的运动也有可能因为成像速度过慢而改变干涉信号的相位。在对解决伪影问题的研究中,高速相机、瞬时移相法,以及一些改进的解调算法已经被运用到相关实验中,本文将会重点总结。

为了实现 D-FFOCT 在生物医学成像领域的应用,许多工作组运用了多模态成像装置,这类装置可以同时从多个模态中获取图像,互补单模态系统进行成像时的缺陷<sup>[8-9]</sup>。基于 D-FFOCT 的多模态成像装置被称为动态多模态全场光学相干层析成像装置,是一种识别活体组织中特定细胞类型的方法。与基于造影剂成像的组织学观测技术相比,D-FFOCT 无需使用造影剂,不会改变生物样本的结构特征。与基于 OCT 的动态散射光技术相比,D-FFOCT 有极高的三维空间分辨率,有利于获取更多样品的信息以分析动态特性<sup>[10]</sup>。与其他 FF-OCT 的多模态装置相比,D-FFOCT 没有增加任何复杂性,是一种能够在 FF-OCT 的结构中揭示动态信息的方法。

D-FFOCT 是现如今研究细胞动态特性方法中的前沿技术,在基础生物学和精准医疗领域有着巨大的应用潜力。不过,该技术目前也有着一些不足之处:1)D-FFOCT 由于移动散射体横截面积较小,导致信噪比不高和成像深度较浅,使用累加的方法从原始信号计算动态图像信号可以提升信噪比,增强动态图像信号从而提升穿透深度,但是不能从根本上解决 D-FFOCT 系统穿透深度小的问题,这是

目前亟待解决的问题之一;2)基于奇异值分解(SVD)的图像滤波算法可有效解决图像的伪影,缺点是计算量较大,但目前可通过使用 GPU 加速计算。随着这些问题的解决,D-FFOCT 将会得到更好的发展。

## 2 D-FFOCT 原理介绍

### 2.1 D-FFOCT 基本原理

FF-OCT 成像过程中,假设低相干光源发出的照明光为平面波,每一成像区域贡献给面阵探测器上的光强信号  $I(x, y, z)$  为

$$I(x, y, z) = I_0(x, y, z) + \alpha(x, y, z) \cos[\phi(x, y, z)], \quad (1)$$

$$\alpha(x, y, z) = r_s(x, y, z) \times r_R \times \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} s(\omega) \exp(-i\omega t) d\omega \right], \quad (2)$$

$$\phi(x, y, z) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z, \quad (3)$$

式中, $x, y$  表示面阵 CCD 上接收信号的像素点位置, $z$  表示两臂光程差, $I_0$  是参考臂和样品臂的非相干光, $\alpha$  为干涉信号的振幅,由组织内散射体的大小、折射率、数量等特性以及光源单色性决定, $\phi$  为相位,由成像组织散射体的空间分布决定,当散射体进行运动时,相位会发生变化,参考臂的反射系数  $r_R$  可以视作常数,在特定成像区域样品臂的反射系数  $r_s$  也可视作常数, $\int_{-\infty}^{+\infty} s(\omega) \exp(-i\omega t) d\omega$  表示光源的自相干函数,仅与光源的自相干函数和 CCD 的曝光时间有关<sup>[11]</sup>。

动态全场 OCT 基于传统的全场 OCT,所需成像图层的每一个散射体的后向散射光和参考臂反射光都会发生干涉。不同的是,在传统全场 OCT 中,一般通过参考臂的相移量改变相干光的相位来进行相位调制。而在动态全场 OCT 中,仅需通过样品中粒子的运动即可进行相应的调制。

在上述传统 OCT 干涉信号(1)式中,叠加与时间相关的后向散射光干涉信号  $I(x, y, z, t)$  可表示为

$$I(x, y, z, t) = I_0(x, y, z) + \alpha(x, y, z, t) \cos[\phi(x, y, z, t)]. \quad (4)$$

为了简便分析,可以和动态光散射光学相干层析(DLS-OCT)的理论推导一样,从单个粒子的运动入手<sup>[10]</sup>。在非相干光  $I_0$ 、振幅  $\alpha$  和相位  $\phi$  中,会受到时间影响的有  $\alpha$ 、 $\phi$ 。在成像区域内,当有粒子

离开或有新粒子增加时,区域内粒子数量的变化将会导致干涉信号振幅  $\alpha$  的变化,当散射粒子做轴向运动时,干涉信号的相位  $\phi$  会发生变化。动态信号对轴向的敏感度(相位变化)大于对横向的敏感度(振幅变化)<sup>[6]</sup>。

存在相对运动的散射体运动产生的干涉信号与单个粒子非常相似。其中,干涉信号相位变化  $\phi(t)$  可以分为全局运动分量  $\Delta(t)$  和各个散射体的相对位移分量  $\delta(t)$  两个部分,表示为

$$\phi(t) = \frac{2\pi}{\lambda} [\Delta(t) + \delta(t)], \quad (5)$$

式中,  $\Delta(t)$  是散射体整体沿垂直轴移动的位移产生的相位变化,  $\delta(t)$  是散射体之间相对运动产生的相位变化。一般情况下,  $\Delta(t)$  产生的相位变化没有  $\delta(t)$  产生的相位变化剧烈。则干涉信号  $I(x, y, z, t)$  表示为

$$I(x, y, z, t) = I_0(x, y, z) + \alpha(x, y, z, t) \cos \left\{ \frac{2\pi}{\lambda} [\Delta(t) + \delta(t)] \right\}. \quad (6)$$

在给定时间  $t$  内, D-FFOCT 对待测生物样品特定深度的那一层进行成像, 轴向移动样本可以对深度方向进行扫描成像, 通过拼接不同深度的扫描层信息可以重构三维图像。

## 2.2 动态多模态全场光学相干层析成像装置

由于 D-FFOCT 与传统 FF-OCT 在成像装置结构上的相似性, 大多数 D-FFOCT 都被运用在一种结合了两者的多模态成像装置上, 这是一种常见的运用 D-FFOCT 的成像方法——动态多模态全场相干光学层析成像。它可以将多种成像技术结合在单一的光学装置中, 克服单个模态成像质量的缺陷, 在这个系统中, D-FFOCT 用以辅助 FF-OCT 获取样本的功能性信息。

成像方式决定了获取生物组织信号的差异。D-FFOCT 是一种仅仅对样本的分辨率范围内的运动信息进行提取的技术, 由特定算法处理后能够得到样本的运动信息, 对运动信息占主要贡献的是线粒体等细胞器。但这种方法不能获取样品的静态信息, 且由于其独特的工作原理, 它在单独使用时的成像信息与传统的成像技术获取的信息性质差异很大, 很难在实际研究中直接应用。FF-OCT 是一种针对特定深度的成像技术<sup>[2]</sup>, 有着亚微米的分辨率, 无需对样本进行物理切片, 是一种对静态信息有着良好分辨率的成像技术, 亚微米分辨率意味着能够对生物组织的细胞层面进行成像。但这种方法也有

一定的局限性, 就是缺乏一定的特异性, 层析能力不足以使细胞内部的一些亚微观结构清晰可见, 且动态的信息会造成信噪比的降低。荧光显微镜是一种利用荧光标记对需要观察的部分进行染色并光学成像的技术, 能够通过荧光基团的特异性标记, 识别细胞内不同分子或细胞器, 并应用于活体细胞实时成像<sup>[12-14]</sup>。但其特异性标记的要求意味着仅可能观测到细胞的部分信息, 通常很难理解标记的目标结构在周围组织背景下的定位或者与邻近生物结构的相互作用。

动态多模态全场光学相干层析成像技术能够将上述或其他各种成像方法结合, 弥补单个模态系统进行成像时的不足, 从而获取更多的样本信息。D-FFOCT 与传统 FF-OCT 有很强的互补性, 两者结合的多模态成像装置能够在获取静态信息的基础上获取动态信息, 在计算机中, 使用 HSV 色彩空间在 FF-OCT 的图像基础上来表示 D-FFOCT 的成像信息, 图像亮度表示局部波动幅度, 图像颜色表示波动速度。D-FFOCT 可以与任何其他基于 FF-OCT 的双模态系统相关联, 提供三种不同模式的对比, 如 Scholler 等<sup>[7]</sup> 在相关文章中研究了一种将 D-FFOCT、FFOCT 和荧光结合的装置, 将 D-FFOCT 和荧光通道结合起来, 如图 1 所示。该系统在全场 OCT 的基础上对死亡细胞的细胞核染色, 并利用 D-FFOCT 对视野范围的细胞进行动态分析。在 OCT 的框架上, 通过 D-FFOCT 与荧光所得信息的对比, 验证了 D-FFOCT 的数据与细胞活性的关系。除此之外, 还有多种多模态系统, 如将 FF-OCT 与谱域光学相干层析成像 (SD-OCT) 结合的装置等<sup>[15]</sup>, 这些包含 FF-OCT 的双模态系统使用时都可

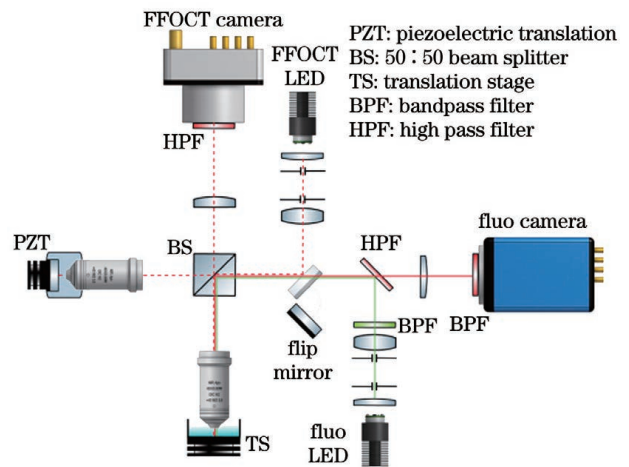


图 1 动态多模态成像装置图<sup>[7]</sup>

Fig. 1 Picture of dynamic multi-model imaging device PZT

以与 D-FFOCT 结合。

多模态成像在 D-FFOCT 之前便已经出现,且已经有了很长时间的应⤵。为了对样本同一区域的信息提取更加充分,2012 年,法国的 Makhlof 等<sup>[16]</sup>将 OCT、光学相干显微术(OCM)、荧光显微镜相结合,得到互补的形态和功能信息,缺点是 OCT 和 OCM 的扫描特性不允许与传统的宽视场荧光显微镜完全集成,这篇文章提出了全场光学相干显微镜(FF-OCM)并将其与荧光成像技术结合到一个仪器之中,不需要光栅扫描就可以得到整个视场的图像。高数值孔径物镜也可以用来提高两种方法的横向分辨率和结构化照明显微术(SIM)的轴向分辨率。同年,ENS 生物研究所的 Wang 等<sup>[17]</sup>提出了将 FF-OCT 与其他 OCT 系统相结合的方法,用来动态补偿如角膜和视网膜评估的眼球运动。2014 年,俄罗斯的 Zaitsev 等<sup>[18]</sup>讨论了用 OCT 获取极化敏感图像、弹性成像的物理原理,概述了常规方法并进行了分析比较。2016 年,Dubois<sup>[19]</sup>编辑的《全场光学相干显微镜手册》出版了一些 FF-OCT 的多模态系统。2017 年,法国的 Thouvenin 等<sup>[8]</sup>介绍了静态 FF-OCT 与静态 SIM 相结合、D-FFOCT 与静态 SIM 相结合、D-FFOCT 与动态荧光相结合的三种多模态系统,同时分析了这些系统,并预估可能应用的领域。同年,Thouvenin 等<sup>[8]</sup>又对三个基于 FF-OCT 的多模态组合进行对比,分析这些多模态系统如何提高 FFOCT 的诊断性能。

在这些装置中,多模态系统的结构无疑会增加成本与复杂性。在前文中已经提出了 OCT 和 OCM 不兼容传统宽视场荧光显微镜的缺陷,结构的可行性是多模态系统的构建中需要考虑的问题。然而 D-FFOCT 与传统 FF-OCT 的成像装置结构几乎完全一致,使得这两种技术组成的多模态装置不用附加其他结构,因此 D-FFOCT 的应用方式通常为多模态系统<sup>[9]</sup>,这种多模态系统不仅能够获取更多的信息,而且相较于传统 FF-OCT 没有增加系统成本和复杂性。

### 3 性能参数

D-FFOCT 结合了 FF-OCT 与动态散射光测量,主要的性能指标有轴向分辨率、横向分辨率、成像深度、系统灵敏度和图像对比度等。

#### 3.1 轴向分辨率

样品不同深度的组织在受到光照射后都会发生后向散射。传统组织学成像使用传统显微镜,对所

有接收光线进行成像,需要组织学切片以对样品特定深度的组织进行成像。FF-OCT 使用低相干光源,通过相干门过滤掉组织在成像物镜焦面深度之外的散射光或反射光。FF-OCT 技术的轴向分辨率与相干门的宽窄相关,若 OCT 系统光源为高斯线型光源,则轴向分辨率  $\delta_z$  可以表示为

$$\delta_z = 0.44 \frac{\lambda_0^2}{n \Delta\lambda}, \quad (7)$$

式中, $\lambda_0$  表示系统光源的中心波长, $n$  表示待测样品本身的折射率, $\Delta\lambda$  表示光源功率谱函数的半峰全宽。使用超宽带光源的全场 OCT 轴向分辨率的数值通常会小于计算值<sup>[20]</sup>。

在生物医学成像领域,组织细胞一般为  $10 \mu\text{m}$  量级,故轴向分辨率小于  $10 \mu\text{m}$  就可以获得较高质量的图像。1998 年,巴黎工业物理化学学校的 Beaufrepaire 等<sup>[21]</sup>第一次提出了全场 OCT 技术,由于使用了宽带光源,系统的轴向分辨率便已达  $8 \mu\text{m}$ 。由于现代光源技术的不断发展,FF-OCT 的轴向分辨率也在不断地提高。2002 年,法国国家科技研究中心的 Vabre 等<sup>[22]</sup>使用卤素灯,将轴向分辨率提高到了  $1.2 \mu\text{m}$ 。2004 年,Dubois 等<sup>[23]</sup>采用宽带卤钨灯作为系统的光源,轴向分辨率达到了  $1 \mu\text{m}$  以下。浙江大学的杨亚良<sup>[24]</sup>研究小组利用中心波长  $580 \text{ nm}$ 、带宽  $230 \text{ nm}$  的白光光源对硬币进行成像,在使用带通滤波器的情况下获得了  $1.35 \mu\text{m} \times 5.3 \mu\text{m}$ (横向  $\times$  纵向)的分辨率。清华大学的薛平<sup>[25]</sup>研究小组与郑京镐<sup>[26]</sup>研究小组利用中心波长  $600 \text{ nm}$ 、带宽  $180 \text{ nm}$  的光源和水浸显微物镜,获得高达  $0.7 \mu\text{m}$  的三维分辨率,分别对小鼠胚胎和小鼠卵母细胞进行了活体成像。南京理工大学的高万荣和朱越等<sup>[27]</sup>也搭建了具有较高分辨率的系统,高万荣<sup>[28]</sup>使用中心波长  $550 \text{ nm}$ 、带宽  $200 \text{ nm}$  的卤钨灯获得了  $1 \mu\text{m}$  的高轴向分辨率,朱越使用同一种光源,利用大数值孔径显微物镜和 5 步移相算法,获得了  $0.7 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ (横向  $\times$  纵向)的分辨率。

#### 3.2 横向分辨率

在 OCT 系统中,横纵分辨率是相互独立的性能指标。全场 OCT 系统的横向分辨率  $\delta_x$  可以表示为

$$\delta_x = \frac{\lambda_0}{2NA}, \quad (8)$$

式中, $NA$  表示显微物镜的数值孔径,FF-OCT 系统的横向分辨率主要与  $NA$  相关<sup>[29]</sup>。

早期全场 OCT 系统使用较高数值孔径的水浸

显微物镜,横向分辨率达到了  $2\ \mu\text{m}$ <sup>[21]</sup>。由于现代光学器件技术的不断提高,显微物镜的数值孔径不断提高,FF-OCT 的横向分辨率达到了亚微米量级。然而,显微物镜的数值孔径与焦深成反比,显微物镜的大数值孔径会限制焦深,导致成像时视场(FOV)范围减少。FF-OCT 系统中,面阵 CCD 可以一次性探测样品 X-Y 平面的结构,较好地解决了这个问题。2018 年,南京理工大学的周亚文<sup>[30]</sup>使用 NA 为 0.5 的显微物镜成像,理论横向分辨率为  $0.7\ \mu\text{m}$ 。

### 3.3 成像深度

FF-OCT 系统的成像深度主要由系统使用光源的波段、待测样品本身的散射特性和系统的动态范围决定。通常,FF-OCT 系统的成像深度可以达到几百微米<sup>[3]</sup>。然而,相较于传统 FF-OCT, D-FFOCT 由于移动散射体的横截面积较小,导致信号水平较弱,成像深度相较于标准静态 FF-OCT 小 10 倍<sup>[31]</sup>。对此,法国巴黎文理研究大学的 Scholler<sup>[31]</sup>提出了一种算法来计算基于累积和的局部动态水平,增强信号的非平稳部分,将信噪比  $R_{\text{SN}}$  提升了 3 倍,并且首次在  $80\ \mu\text{m}$  的成像深度使用 D-FFOCT 对小鼠肝脏进行成像。截止本文成稿前,关于 D-FFOCT 的成像深度仍处于研究之中,D-FFOCT 对人体内组织细胞成像仍具有一定的困难。未来可以继续研究提升系统成像深度的方法,或与其他技术组成多模态系统,突破成像深度的限制,实现对人体各个组织细胞成像。

### 3.4 系统灵敏度和图像对比度

FF-OCT 系统中,灵敏度指系统可探测最小信号的强度,是影响图像对比度和成像深度的重要参数。假设系统中 CCD 面阵探测器接近饱和,则灵敏度  $R_{\text{min}}$  可以表示为<sup>[32]</sup>

$$R_{\text{min}} = \frac{(R_{\text{ref}} + 2R_{\text{inc}})^2}{2N\xi_{\text{sat}}R_{\text{ref}}}, \quad (9)$$

式中, $R_{\text{ref}}$  表示参考镜的反射率, $R_{\text{inc}}$  表示 CCD 接收的总光强中背景光所占的比例, $\xi_{\text{sat}}$  表示 CCD 的全井容量, $N$  表示图像张数。系统灵敏度主要与图像堆叠张数、CCD 的全景容量和背景光所占比例有关。

增加图像的堆叠数可以提高系统灵敏度,然而也增加了系统的采集时间,限制了系统的实时性。另一种提高系统灵敏度的途径是增加 CCD 的全景容量,需在不影响生物组织样品的前提下增加光源的功率。第三种途径是减小背景光所占比例,可以

使用水浸物镜匹配生物组织与介质的折射率,减少背景光中主要来自样品组织与介质空气界面的反射光。

通常情况 FF-OCT 系统灵敏度弱于频域 OCT,探测灵敏度范围主要在  $-55\sim-80\ \text{dB}$ <sup>[3,21,32-33]</sup>。不同小组在研究高速实时成像的 FF-OCT 系统时,由于相机动态范围的限制,得到的灵敏度并不理想,这点将在第四小节详细说明。

FF-OCT 系统的图像对比度是基于生物组织局部散射能力的差异,南京理工大学的高万荣<sup>[34]</sup>指出影响对比度的主要因素有光在组织上覆层的多次散射、计算断层图像中的参与背景强度和物镜的数值孔径。FF-OCT 的层析能力在分离强散射间质干扰中的弱散射细胞结构信息有一定的困难,D-FFOCT 可以为 FF-OCT 成像提供额外的对比度。

## 4 去除正面断层图像伪影

FF-OCT 系统相较于传统组织学成像、超声成像、核磁共振成像等成像技术而言,有着极高的空间分辨率,同时具有非侵入式、无创、对生物体低损伤等特点,使其在生物医学成像上得到了很大的应用。然而,FF-OCT 系统的层析能力不足以区分强散射间质干扰下的弱散射细胞的相关特性,利用细胞自身的动态特性进行研究的 D-FFOCT 可以较好地解决这个问题。但 D-FFOCT 系统基于 Linnik 干涉结构<sup>[35]</sup>,系统在复杂的光路下对振动敏感度较高,干涉信号的相位会受到轻微振动的影响。同时,在对活体样品进行成像时,如果成像速度较慢,样品组织的自身运动也会对干涉信号的相位造成影响。这都将会导致结果产生伪影,影响样品组织信息的获取与分析,甚至导致临床诊断结果不准确<sup>[36]</sup>。图像伪影是生物医学成像中较为重要的问题之一,会在一定程度上影响图像质量,继而影响在精准医疗领域应用时的诊疗结果。为了尽量避免干涉信号的流失,在图像采集时间内样品轴向移动的距离基本上不可超过中心波长的四分之一,最大轴向速度不可超过  $1\sim 10\ \mu\text{m}/\text{s}$ <sup>[37]</sup>。在过去的十多年间,不同研究小组主要从两个角度去除正面断层伪影问题,分别为加快系统成像速度和改进系统算法。

在早期的各种应用场景中,加快系统成像速度是研究的主要方向,不同研究小组主要研究高速实时成像的 FF-OCT 系统,以达到消除伪影的目的。FF-OCT 的图像采集速度主要由探测阵列的图像采集速度和参考臂的移相速度决定。法国国家科学研

究中心的 Grieve 等<sup>[38]</sup>在由 300 W 氙弧光源和 Linnik 干涉结构构成的 FF-OCT 系统上,使用一个以 250 Hz 对参考臂进行振荡的压电平移台和一台能够快速捕捉图像(500 Hz)的 CMOS 相机,在参考臂振荡的一个周期内可以采集两幅相位相反的图像,对这两幅图像进行处理可以获得需要的样品信号,该系统可以以 4 ms 为采集周期提取样品图像。法国国家科学研究中心的 Moneron 等<sup>[32]</sup>使用科勒照明系统和氙弧闪光光源搭建了一个 FF-OCT 系统,在系统的探测器阵列上选择了一对同步的 CCD 相机捕捉经过偏振分束器分割出的两幅相对干涉图像,将每幅图像的采集时间控制在 10  $\mu$ s。日本山形大学的 Hrebesh 等<sup>[39]</sup>基于 Linnik 型偏振迈克尔逊干涉仪和四正交步进移相器搭建了用于实时成像动态生物样本的紧凑型单次全场时域 OCT,以 5 fps 的帧速率显示双头肌跳动时的内部结构。以上小组在消除伪影问题上的研究方向主要在运用高速相机和探测阵列搭建高速实时成像的全场 OCT 系统,然而因为相机的图像采集速度越快,它的动态范围越小,装备高速相机的光学成像系统的探测灵敏度并不是十分理想<sup>[38]</sup>。提高探测阵列的成像采集速度,不能仅通过减少 CCD 的曝光时间,还需要考虑系统使用的光源强度不能影响生物组织,并且要能够填满像素全井容量。这需要研究人员在相机曝光时间和使用光源的功率上做出选择。除上述加快照片采集速度的方法外,还可以改变参考臂的移相方式来加快成像速度,若参考臂的移相过程是瞬时而非连续的,那么横向伪影便可以被除去<sup>[3]</sup>,因此不同研究小组也在研究瞬时移相技术。在瞬时移相技术被成功运用到 FF-OCT 系统上之前,利用光纤耦合器固有的相移和能量的守恒,时域光学相干层析技术(TD-OCT)与频域光学相干层析技术(FD-OCT)都已经实现了非偏振的瞬时相移<sup>[40]</sup>。巴黎第十一大学的 Sacchet 等<sup>[37]</sup>在 Linnik 结构的光学成像系

统基础上,使用了高全井容量的相机和自行开发的新型脉冲照明光源搭建了一个新型的光学成像系统。该系统的新型脉冲光源相较于传统卤素灯产生的连续光,可以在有效波长范围内提供更高的照明亮度,减少曝光时间并达到瞬时移相,并且通过非偏振光学器件抑制由样本运动产生的侵入信号。然而,结合瞬时移相技术的光学成像系统虽然能良好地减少横向移动产生的图像伪影,增加系统的检测灵敏度,却大大增加了系统的成本和标定难度。这让其他小组意识到加快系统成像速度并非研究的唯一方向。

除对生物样品进行高速实时成像外,光学成像系统算法上的改进可以解决由于移相速度慢或因为相位受到影响产生的图像伪影,也是一个很重要的研究方向。来自奥地利林茨大学的 Schausberger<sup>[41]</sup>为了打破用于观测样本动态变化的单镜头/双通道或双镜头的方法具有一定的方向性的局限性,在 FF-OCM 的解调过程中提出了利用里斯变换的各向同性的解调方法。由于里斯变换具有旋转不变性,因此可以以各向同性的方式起作用,仅需要一幅图像便可以恢复测量样品反射率的相关信息。韩国光州科学技术院的 Na 等<sup>[42]</sup>提出了一种基于数学希尔伯特(Hilbert)变换的图像恢复技术,仅需使用两幅相移图像即可完成图像的解调及恢复,减少了系统的图像采集时间。利用 Hilbert 变换,可以得到去除调制信号后的正交图像,理论上不会存在残留条纹,使系统的相移误差有较大的容错性。南京理工大学的杨凡凡等<sup>[43]</sup>利用 MATLAB 软件对几种主要的 Hilbert 变换(一维 Hilbert 变换及总体 Hilbert 变换、方向 Hilbert 变换、单象 Hilbert 变换和二象 Hilbert 变换四种二维 Hilbert 变换)进行成像质量仿真模拟,在理论和软件仿真上得到二维 Hilbert 变换相较于一维 Hilbert 变换的对比度可提高 10% 的结论。南京理工大学的朱越就传统压

表 1 消除伪影的方法

Table 1 Ways to eliminate artifacts

Direction of research	Specific method
Acceleration of imaging speed	Use of high-speed cameras
	Instantaneous phase shifting
Algorithm improvement	Riesz transform-based algorithms
	Hilbert transform-based image restoration technology
	Single-step phase-shifting demodulation algorithm based on Hilbert transform
	Singular value decomposition-based image filtering algorithms

电陶瓷(PZT)移相仅针对光源中心波长准确以及四步移相法需要依次移相  $\pi/2$  的问题,设计了基于偏振移相全场 OCT 系统与对应的解调信号算法。在 Linnik 干涉结构的基础上,在参考臂上增加了消色差四分之一波片和消色差线偏振片,解决了不使用传统 PZT 进行移相而产生的问题。使用基于 Hilbert 变换的单步移相解调算法,一对共轭的相同 CCD 仅进行一次图像的采集即可对待测样品的信号进行解调。并通过实验验证该系统解调后得到的图像相较于传统的四步移相法解调得到的图像无条纹残影<sup>[3]</sup>。法国巴黎文理研究大学的 Scholler<sup>[31]</sup>提出了一种基于 SVD 的图像滤波算法,从与细胞内运动相关的局部波动中滤除待测生物样本的轴向位移。与声学中用于多普勒采集的 SVD 时空滤波算法不同,该算法在计算动态图像之前重建初始空间中的信号,可以有效地去除伪影,降噪后图像的质量和对比度都有了很大提高。

## 5 D-FFOCT 应用

OCT 技术的发展为活体生物组织的复杂结构成像提供了可能性,FF-OCT 极高的横向分辨率和轴向分辨率等参数以及非侵入特性使得它在基础生物学和精准医疗领域有巨大的研究前景,FF-OCT 发展时间较晚,相较于时域或频域 OCT,它的投入还并不高,应用也不广泛,但有巨大的潜力。基于 FF-OCT 的 D-FFOCT 作为一种非侵入成像技术,有着亚微米级的空间分辨率和毫秒级的时间分辨率,可以通过一系列算法产生与细胞器运动性相关的彩色图像,是一种通过功能信息识别活组织中特定细胞类型从而拥有特异性成像特性的方法<sup>[7]</sup>。它与 FF-OCT 的互补特性给二者结合的成像系统提供具有更高性能的多种模态成像对比度,使得 FF-OCT 在某些领域中如基础生物学和精准医疗领域的研究取得了许多成果。

在基础生物学和精准医疗领域,D-FFOCT 对成像有如下的贡献:1)传统的 FF-OCT 缺乏功能对比,只能表明细胞的存在,而不能显示细胞健康或动态信息。而由于对 D-FFOCT 的主要贡献来自线粒体、高尔基体等细胞器<sup>[7]</sup>,利用 D-FFOCT 能够观察到来自这种大型细胞器的亚细胞层面的动态,从而研究每个生物阶段不同细胞的活性、代谢和功能。2)与荧光成像等基于染色剂的特异性成像方法对比,D-FFOCT 的特异性成像有着不使用外源性标记和没有破坏性的特点。它不会在成像之后对样本

造成损伤,因此可以被应用于观察同一生物体不同时期的发育过程。例如在多个时间点上成像相同剖面的细胞,跟踪同一器官在不同发展阶段的演变。3)与传统成像方法对比,D-FFOCT 的时间分辨率较高,能够更细节地分析在传统方法中记录的各个器官的发育过程,或者使用某种药物后极短时间内细胞的功能性变化。

### 5.1 D-FFOCT 在基础生物学领域的发展

OCT 被广泛应用于无标记的组织深度显微结构成像。在应用范围领域,OCT 在发展初期被应用于显示视网膜微观结构,或被用于肺部成像以获得更多肺泡力学和动力学信息。经过多年的发展,如今基于内窥镜的光学相干断层扫描(EOCT)能实现管状器官和腔内生物组织结构的微米级亚表面活体成像<sup>[41]</sup>。突破成像分辨率是 OCT 技术发展的另一重要方向,例如自适应光学研究使得 OCT 的横向分辨率由传统的  $15\sim 20\ \mu\text{m}$  发展到  $2\sim 3\ \mu\text{m}$ <sup>[41]</sup>,无需横向扫描的 FF-OCT 采用显微物镜获得更高的横向分辨率<sup>[4]</sup>。为了实现人类器官功能性成像,有小组利用 FF-OCT 的特异性成像特性显示了大脑样本中的髓鞘轴突等结构,以及肝脏的胶原纤维和血管壁,甚至细胞核等细胞的一些内部结构<sup>[8]</sup>。在这些研究基础上,D-FFOCT 能够获取细胞的动态信息,在高度后向散射结构中表现出色<sup>[9]</sup>。纵览这个发展过程,更高的分辨率、更多的结构对比机制和更广的应用范围是 OCT 技术一直在追寻的目标,也是基础生物学对成像技术发展的要求。本节主要针对 D-FFOCT 的结构对比和应用范围的发展进行了展开说明。

FF-OCT 技术在生物医学研究中包含两个基本特征,结构成像和功能分析。通过集成辅助研究工具,例如额外的光谱波段、荧光成像工具或偏光敏感光学等,可以克服非特异性后向散射的限制,聚焦于一些选定的研究领域,获取更多的结构对比<sup>[44]</sup>。在 Thouvenin 等<sup>[9]</sup>撰写的一篇关于多模态成像装置的综述中,也介绍了测量组织力学、动力学和分子含量的三种组合,其中在第五节中提到了利用 D-FFOCT 揭示信号时间波动信息的方法。这些揭示不同结构对比的方法为基础生物学研究领域提供了更多的得力工具。

利用 D-FFOCT 研究基础生物学特征的研究已经有了诸多尝试。法国的 Apelian 等<sup>[6]</sup>在论文中描述了一种内源性方法,利用 FF-OCT 测量信号的时间依赖性揭示新鲜离体组织中的亚细胞代谢对比,

这是 D-FFOCT 首次被提出。这种方法可以用来识别生物发育过程中不同状态各器官的毫秒级动态,作者利用这种方法对大鼠肝脏进行了成像,并对数据进行了分析。法国的 Leroux 等<sup>[45]</sup>利用 D-FFOCT 研究分析了主要来自细胞质的多细胞聚集的动态信号,证明了肌动球蛋白收缩性的整体消失能够增加细胞内成分的运动,说明 D-FFOCT 是一种分析细胞内各个结构作用的优良工具。法国的 Thouvenin 等<sup>[8]</sup>利用上文所述的多模态 D-FFOCT 系统,对受精五天后的斑马鱼幼虫、猕猴视网膜外植体和解剖所得的大鼠跳动的心脏进行成像。Scholler 等<sup>[7]</sup>利用基于 D-FFOCT 的多模态系统对人类诱导多能干细胞衍生的视网膜类器官进行非侵入性成像研究,可以识别活组织中特定细胞类型。南京理工大学的周亚文<sup>[11]</sup>利用 D-FFOCT 对手指皮肤进行成像,是 D-FFOCT 活体成像的尝试。这些实验的开展为 D-FFOCT 的发展积累了大量样本和经验。随着样本增多,设备改进,D-FFOCT 会获得更高的通用性,成为一种普遍研究工具。

相对 EOCT 等技术,D-FFOCT 的应用范围并不乐观,利用 D-FFOCT 对体内器官的研究目前是一个难以攻克的问题。当使用 FF-OCT 探究基础生物学领域的问题时,穿透深度曾一度成为研究者的研究方向。传统的 FF-OCT 仅能勉强满足生物学的需要,而 D-FFOCT 由于衰减更高,穿透深度更低(一般为 50~200  $\mu\text{m}$ ),很难实现类似于光纤式频域 OCT 那样进入生物体内进行成像。而对生物进行解剖又难以满足长时间保持器官活性的要求,因此 D-FFOCT 的应用主要针对于类器官。在过去的十年里,体外疾病建模领域出现了爆炸式增长,尤其是类器官的发展。这些源自干细胞的自培养组织提供了一个独特的系统用以研究器官发育、体内平衡以及疾病机制。由于类器官根据固有的发育程序发育,因此产生的组织形态以相当的保真度再现了器官结构。此外,这些组织可以来自人体干细胞这一事实允许研究独特的人类发育过程和疾病<sup>[46]</sup>。以这种类器官作为样本,D-FFOCT 为工具,可以推进生物发育阶段的研究更上一个台阶。

在应用范围领域,D-FFOCT 也被期望用于活体生物医学成像。在对活体动物器官如视网膜等成像时,生物体的运动如眼动等对成像质量有很大影响<sup>[47]</sup>。为了解决这一问题,法国的 Scholler<sup>[31]</sup>在 2019 年应用了一种利用 D-FFOCT 对活体小鼠肝脏成像并利用 SVD 滤波算法去除主要来自心跳和

呼吸的噪声的方法,这种方法有效改善了成像质量。之后 Scholler<sup>[48]</sup>的小组又提出了一种轴向亚微米平面锁定程序,利用 D-FFOCT,以延时方式在数小时内对同一样本平面成像,并应用于猕猴角膜上缓慢伤口愈合的研究。用于校正轴向漂移的自动平面锁定成像系统意味着能够长时间重复获取特定平面的像。由于在样品稳定性和延时采集方面的改进,利用 D-FFOCT 有望开展对长达数小时的器官发育过程、体外条件随时间变化的动态行为等研究。

目前的 FF-OCT 技术对器官的成像大多依赖于类器官的辅助。随着 FF-OCT 的小型化以及光纤通信的发展,以及穿透深度、信噪比等问题的克服,D-FFOCT 有望发展成为一种与如今的光纤式 OCT 有着相同成像范围,不受限制地对活体生物的任何部位进行成像,却拥有更高分辨率和更多结构对比的工具。

## 5.2 D-FFOCT 在精准医疗领域的发展

细胞的形状或密度等数据是组织病理学的重要标志。利用各种不同的数据能够分析出器官的健康与否或者疾病的种类,然而并非所有的数据都是容易收集的。例如,胶原纤维较厚的组织通常表现为高度分散的结构,传统的内源性技术很难在这种条件下获得细胞成像。而外源性造影剂如染料、荧光团或纳米颗粒有时被限制使用,特别是在活体在体成像时。作为一种活体成像方法,FF-OCT 技术在精准医疗领域具有广泛的应用潜力,可在培养的三维组织模型或小型动物样本上研究病理和药物的作用,癌症治疗后的免疫细胞密度、肿瘤边缘的识别都有它的身影。它在结合 D-FFOCT 和三维组织模型之后,成为了研究人员用来理解导致疾病的基本亚细胞过程的全新方法。目前,在肿瘤学、胚胎学、心脏病学和眼科领域已经开发出了多种基于 FF-OCT 的多模态生物医学成像应用<sup>[9]</sup>。作为一种基于 FF-OCT 信号的时间依赖性的新方法,D-FFOCT 所能够揭示的数据可以在精准医疗领域,如医疗诊断和药物研究中发挥作用。

与研究生物学特征相似,已经有了不同研究小组利用 D-FFOCT 研究病理学与医疗相关的特征,见表 2。2016 年,法国的 Apelian 等<sup>[6]</sup>利用 D-FFOCT 对小鼠小肠健康组织与癌变组织和大鼠脾脏健康组织与癌变组织进行了成像对比,证明了 D-FFOCT 可以辅助癌症的检测。同年,法国的 Leroux 等<sup>[45]</sup>利用 D-FFOCT 研究分析了主要来自细胞质的多细胞聚集的动态信号,使用一种破坏肌



动球蛋白收缩性的药物证明了肌动球蛋白收缩性的整体消失能够增加细胞内成分的运动,证明 D-FFOCT 可以运用于药物作用的研究。2017 年, Apelian 等<sup>[49]</sup>利用 D-FFOCT 提取癌症诊断相关信

息,获得了微米分辨率的图像。2019 年, Scholler 等<sup>[48]</sup>将 D-FFOCT 应用于猕猴角膜上缓慢伤口愈合的图像,成像结果与文献描述相差无几,他们基于此提出了 D-FFOCT 在体内对人眼进行成像的设

表 2 D-FFOCT 在精准医疗领域的研究

Table 2 Research of D-FFOCT in precision medicine

Time	Authors	Sample	Process	Application	Parameter
2016	Apelian C, Harms F, Thouvenin O, et al.	Cancerous cells in mouse intestine		Diagnose cancer	Axial resolution: 1 $\mu\text{m}$ , imaging depth: 50–100 $\mu\text{m}$
		Rat liver cells	Introduced an inhibitor of the metabolic chain	Study pathological	
2016	Leroux C E, Bertillot F, Thouvenin O, et al.	Multicellular aggregates spheroids	Introduced a selective inhibitor of class-II myosins (blebbistatin)	Observe drug effect, diagnose cancer	Depth resolution: 1 $\mu\text{m}$ , isotropic resolution: 1 $\mu\text{m}^3$ (at the central 625 nm wavelength), imaging depth: 60 $\mu\text{m}$
2017	Apelian C, Gastaud C, Boccara A C.	Mouse intestinal cancer		Diagnose cancer	Depth resolution: 1 $\mu\text{m}$
2017	Thouvenin O, Apelian C, Nahas A, et al.	A thick coronal section of fresh <i>ex vivo</i> rat brain		Reveal individual neuron shapes and sizes	Imaging depth: 100–200 $\mu\text{m}$
		<i>Ex vivo</i> subcutaneous pancreatic tumor		Diagnose cancer	
		Fresh rat liver		Established more accurate angiogram and lymphogram	
2019	Scholler J, Mazlin V, Thouvenin O, et al.	Macaque cornea	Creating a wound in the epithelial layer	Following <i>in vitro</i> sample evolution over long periods of time	Transverse resolution: 0.4 $\mu\text{m}$ , axial resolution: 1 $\mu\text{m}$ , field of view: 390 $\mu\text{m} \times 390 \mu\text{m}$
2020	Scholler J, Groux K, Goureau O, et al.	Retinal organoids		Pathological study	Camera frame rate: 100 Hz, transverse resolution: 0.5 $\mu\text{m}$ , axial resolution: 1.7 $\mu\text{m}$ , field of view: 320 $\mu\text{m} \times 320 \mu\text{m}$
2020	Yang H P, Zhang S W, Liu P, et al.	Breast and lymph node specimens		Differentiate benign and malignant cells	Axial resolution: 1 $\mu\text{m}$ , imaging depth: 10 $\mu\text{m}$
2020	El-Sadek I A, Miyazawa A, Shen T W, et al.	Breast adenocarcinoma (MCF7 cell line) spheroids	Use anti-cancer agent (paclitaxel)	Diagnose cancer, drug response evaluation	Axial resolution: 14 $\mu\text{m}$ , lateral resolution: 19 $\mu\text{m}$

想,未来 D-FFOCT 可能会对术后恢复的研究做出贡献。2020 年, Scholler 等<sup>[7]</sup>对人类诱导多能干细胞衍生的视网膜类器官进行活体成像研究,可以运用于视网膜及视网膜疾病研究。同年,北京大学人民医院也已经开始探讨 FF-OCT 的动态成像技术用于乳腺癌样本评估的可行性。D-FFOCT 在乳腺癌和癌细胞扩散的诊断中具有较高的准确率,相较于常规组织学切片方法具有较大优势<sup>[50]</sup>。同年,日本的 El-Sadek 等<sup>[51]</sup>基于扫频光学相干层析术(SSOCT)的三种主观观察和客观定量方法,“对数 OCT 强度方差(LIV)”对波动幅度敏感,“早期和晚期 OCT 相关衰减速度(OCDS<sub>e</sub> and OCDS<sub>i</sub>)”分别对动态快慢速率敏感,可视化和量化了人乳腺癌球体的轴向坏死过程和抗癌药物反应,虽然不是基于 FF-OCT 的系统,但该应用给 D-FFOCT 也带来了一定的启发。这些实验体现了 D-FFOCT 在医疗领域的各项用途,例如对药物作用的研究,对病理学的研究以及对疾病的检测等。

在 Thouvenin<sup>[9]</sup>的综述中提到,目前 D-FFOCT 可以揭示的特征有如下几种。1)区分细胞和局部水肿。局部水肿因其较差的动态特性,在 D-FFOCT 中显示为黑色。2)获得更清晰的细胞轮廓。如 FF-OCT 仅能推断神经元的位置,而 D-FFOCT 能较好地显示单个神经元的形状和大小。3)检测大细胞中的细胞核。在横向分辨率为 1  $\mu\text{m}$  分辨率的 D-FFOCT 中,细胞核主要呈黑色。又因为肿瘤细胞中核与胞浆的比例较高,使得 D-FFOCT 可以辅助癌症的检测。4)检测红细胞和免疫细胞。红细胞强烈的膜波动和免疫细胞不断改变形状的特性使得它们在 D-FFOCT 中有良好的分辨率。5)建立更精确的血管造影和淋巴造影。FF-OCT 通常可以检测毛细血管,但不能区分血管和淋巴管,而 D-FFOCT 则提供了额外信息。此外,D-FFOCT 还可以辅助 FF-OCT 观察隐藏在纤维下的细胞,纤维的高度后向散射结构经常隐藏其中的细胞,但它通常静止的特性使得 D-FFOCT 对被隐藏细胞的分辨率不会因此降低,从而可以捕捉到细胞内的信号。

随着 D-FFOCT 的发展,该技术将被广泛应用于精准医疗领域,帮助检测各种疾病、辅助手术的进行或者成为一种研究药物作用的重要工具。随着样本的增加,D-FFOCT 有望检测更多的疾病种类,并在搭配机器学习算法等工具改进分析速度后,成为一种应用更广泛、速度更快、使用更便捷的影像方法。

## 6 结论与展望

全场光学相干层析术可为无标记组织提供一种亚细胞水平的层析成像方法。然而,在强散射介质干扰下,弱散射细胞内折射率扰动产生的强度对比度不明显。但基于低相干层析成像技术提取待测物本征信号的特性使得活体生物组织动态信号提取成为可能。结合 FF-OCT 和动态散射光测量的新技术 D-FFOCT,通过细胞自身随时间的代谢活动即可产生动态信号,该动态层析图不仅具有各向同性的三维亚微米分辨率,而且不需要使用可能改变生物样品特性的造影剂。本文描述了 D-FFOCT 的原理、多模态成像装置和相关重要的性能参数,其中讨论了基于 Linnik 干涉结构的 D-FFOCT 光学系统受到的轻微振动以及光学系统对于活体样品成像速度较慢都会导致干涉信号的相位发生改变,最终在图像上形成伪影,降低动态对比度的问题。着重分析了去除图像伪影的方法,随着相干理论的发展,相位提取算法的改进,光电子器件的变革,假以时日,一旦这些问题得以解决,在全场光学相干层析术的基础上,动态本征信号提取技术简单易实现的优势将会显现出来,D-FFOCT 技术将在基础生物学和精准医疗等领域迎来广阔的发展空间。

## 参 考 文 献

- [1] Huang D, Swanson E A, Lin C P, et al. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [2] Zheng J G. Investigation of full-field OCT and morphological study of early mouse embryo development[D]. Beijing: Tsinghua University, 2013. 郑京镛. 全场 OCT 及其对小鼠早期胚胎发育的形态学研究[D]. 北京: 清华大学, 2013.
- [3] Zhu Y. Research on key technology in full-field optical coherence tomography[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2018. 朱越. 全场光学相干层析术关键技术研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2018.
- [4] Dubois A, Vabre L, Boccara A C, et al. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope[J]. *Applied Optics*, 2002, 41(4): 805-812.
- [5] Apelian C, Harms F, Thouvenin O, et al. Subcellular metabolic contrast in living tissue using dynamic full field OCT (D-FFOCT) (Conference Presentation)[J]. *Proceedings of SPIE*, 2016, 9707: 97070T.

- [6] Apelian C, Harms F, Thouvenin O, et al. Dynamic full field optical coherence tomography: subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(4): 1511-1524.
- [7] Scholler J, Groux K, Goureau O, et al. Dynamic full-field optical coherence tomography: 3D live-imaging of retinal organoids[J]. *Light, Science & Applications*, 2020, 9: 140.
- [8] Thouvenin O, Fink M, Boccara C. Dynamic multimodal full-field optical coherence tomography and fluorescence structured illumination microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(2): 26004.
- [9] Thouvenin O, Apelian C, Nahas A, et al. Full-field optical coherence tomography as a diagnosis tool: recent progress with multimodal imaging[J]. *Applied Sciences*, 2017, 7(3): 236.
- [10] Lee J, Wu W C, Jiang J Y, et al. Dynamic light scattering optical coherence tomography[J]. *Optics Express*, 2012, 20(20): 22262-22277.
- [11] Zhou Y W. Research on diagnostic application and dynamic imaging method of full field optical coherence tomography[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2019.  
周亚文. 全场光学相干层析术的诊断应用及其动态成像方法研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2019.
- [12] Wu M R. Research on microscopic imaging system of structured light fluorescence illumination[D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2014.  
吴美瑞. 结构光荧光照明显微成像系统研究[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2014.
- [13] Xiao K, Tian L J, Wang Z Y. Fast super-resolution fluorescence microscopy imaging with low signal-to-noise ratio based on deep learning [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(10): 1007002.  
肖康, 田立君, 王中阳. 基于深度学习的低信噪比下的快速超分辨荧光显微成像[J]. *中国激光*, 2020, 47(10): 1007002.
- [14] Liu Z, Luo Z W, Wang Z Y, et al. Super-resolution fluorescence microscopy image reconstruction algorithm based on structured illumination [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(3): 0307001.  
刘智, 罗泽伟, 王正印, 等. 基于结构照明的超分辨荧光显微成像重建算法[J]. *中国激光*, 2021, 48(3): 0307001.
- [15] Mazlin V, Xiao P, Scholler J, et al. Real-time non-contact cellular imaging and angiography of human cornea and limbus with common-path full-field/SD OCT[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1868.
- [16] Makhlof H, Perronet K, Dupuis G, et al. Simultaneous optically sectioned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(10): 1613-1615.
- [17] Wang J, Léger J F, Binding J, et al. Measuring aberrations in the rat brain by coherence-gated wavefront sensing using a Linnik interferometer[J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(10): 2510-2525.
- [18] Zaitsev V Y, Gelikonov V M, Matveev L A, et al. Recent trends in multimodal optical coherence tomography. I. polarization-sensitive OCT and conventional approaches to OCT elastography[J]. *Radiophysics and Quantum Electronics*, 2014, 57(1): 52-66.
- [19] Dubois A. Handbook of full-field optical coherence microscopy: technology and applications[M]. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2016.
- [20] Fercher A F, Hitzberger C K, Sticker M, et al. A thermal light source technique for optical coherence tomography[J]. *Optics Communications*, 2000, 185(1/2/3): 57-64.
- [21] Beaulieu E, Boccara A C, Lebec M, et al. Full-field optical coherence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1998, 23(4): 244-246.
- [22] Vabre L, Dubois A, Boccara A C. Thermal-light full-field optical coherence tomography [J]. *Optics Letters*, 2002, 27(7): 530-532.
- [23] Dubois A, Moneron G, Grieve K, et al. Three-dimensional cellular-level imaging using full-field optical coherence tomography[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2004, 49(7): 1227-1234.
- [24] Yang Y L. Full-field optical coherence tomography [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.  
杨亚良. 全场光学相干层析成像研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [25] Zheng J G, Chen T Y, Wang C M, et al. Label-free subcellular 3D live imaging of preimplantation mouse embryos with full-field optical coherence tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(7): 070503.
- [26] Zheng J G, Huo T C, Tian N, et al. Noninvasive three-dimensional live imaging methodology for the spindles at meiosis and mitosis[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(5): 050505.
- [27] Zhu Y, Gao W R, Zhou Y, et al. Rapid and high-resolution imaging of human liver specimens by full-

- field optical coherence tomography [J]. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20(11): 116010.
- [28] Zhu Y, Gao W R. High-resolution full-field optical coherence tomography for biological tissue[J]. Chinese Journal of Lasers, 2014, 41(8): 0804002. 朱越, 高万荣. 全场高分辨生物组织光学层析成像 [J]. 中国激光, 2014, 41(8): 0804002.
- [29] Drexler W, Fujimoto J G. Optical coherence tomography: technology and applications[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2015.
- [30] Zhou Y W, Gao W R, Xu X Y. Imaging of human kidney and colon tissues with full-field optical coherence tomography[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(6): 0607002. 周亚文, 高万荣, 徐新宇. 人体结肠与肾脏组织全场光学断层成像研究 [J]. 中国激光, 2018, 45(6): 0607002.
- [31] Scholler J. Motion artifact removal and signal enhancement to achieve *in vivo* dynamic full field OCT[J]. Optics Express, 2019, 27(14): 19562-19572.
- [32] Moneron G, Boccara A C, Dubois A. Stroboscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography [J]. Optics Letters, 2005, 30(11): 1351-1353.
- [33] Dubois A, Moneron G, de Boccara C. Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2  $\mu\text{m}$  wavelength region[J]. Optics Communications, 2006, 266(2): 738-743.
- [34] Gao W R. Image contrast reduction mechanism in full-field optical coherence tomography[J]. Journal of Microscopy, 2016, 261(3): 199-216.
- [35] de Martino A, Carrara D, Drevillon B, et al. Full-field OCT with thermal light [J]. Proceedings of SPIE, 2001, 4431: 38-42.
- [36] Yun S H, Tearney G J, de Boer J F, et al. Motion artifacts in optical coherence tomography with frequency-domain ranging[J]. Optics Express, 2004, 12(13): 2977-2998.
- [37] Sacchet D, Brzezinski M, Moreau J, et al. Motion artifact suppression in full-field optical coherence tomography[J]. Applied Optics, 2010, 49(9): 1480-1488.
- [38] Grieve K, Dubois A, Simonutti M, et al. *In vivo* anterior segment imaging in the rat eye with high speed white light full-field optical coherence tomography [J]. Optics Express, 2005, 13(16): 6286-6295.
- [39] Hrebesh M S, Dabu R, Sato M. *In vivo* imaging of dynamic biological specimen by real-time single-shot full-field optical coherence tomography [J]. Optics Communications, 2009, 282(4): 674-683.
- [40] Choma M A, Yang C, Izatt J A. Instantaneous quadrature low-coherence interferometry with  $3 \times 3$  fiber-optic couplers [J]. Optics Letters, 2003, 28(22): 2162-2164.
- [41] Schausberger S E, Heise B, Bernstein S, et al. Full-field optical coherence microscopy with Riesz transform-based demodulation for dynamic imaging [J]. Optics Letters, 2012, 37(23): 4937-4939.
- [42] Na J, Choi W J, Choi E S, et al. Image restoration method based on Hilbert transform for full-field optical coherence tomography [J]. Applied Optics, 2008, 47(3): 459-466.
- [43] Yang F F, Gao W R, Zhu Y. Hilbert transform in full-field optical coherence tomography[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2016, 53(11): 111102. 杨凡凡, 高万荣, 朱越. 全场光学相干层析成像 Hilbert 变换方法 [J]. 激光与光电子学进展, 2016, 53(11): 111102.
- [44] Walther J, Gaertner M, Cimalla P, et al. Optical coherence tomography in biomedical research [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(9): 2721-2743.
- [45] Leroux C E, Bertillot F, Thouvenin O, et al. Intracellular dynamics measurements with full field optical coherence tomography suggest hindering effect of actomyosin contractility on organelle transport[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(11): 4501-4513.
- [46] Lancaster M A, Huch M. Disease modelling in human organoids[J]. Disease Models & Mechanisms, 2019, 12(7): dmm039347.
- [47] Zhang P F, Zhang T W, Song W Y, et al. Review of advances in ophthalmic optical imaging technologies from several mouse retinal imaging methods [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207003. 张鹏飞, 张廷玮, 宋维业, 等. 从小鼠视网膜多种成像方式探讨眼科光学成像技术进展 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207003.
- [48] Scholler J, Mazlin V, Thouvenin O, et al. Probing dynamic processes in the eye at multiple spatial and temporal scales with multimodal full field OCT [J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(2): 731-746.
- [49] Apelian C, Gastaud C, Boccara A C. Extracting relevant information for cancer diagnosis from dynamic full field OCT through image processing and learning [J]. Proceedings of SPIE, 2017, 10053: 100531H.
- [50] Yang H P, Zhang S W, Liu P, et al. Use of high-resolution full-field optical coherence tomography and

dynamic cell imaging for rapid intraoperative diagnosis during breast cancer surgery [J]. *Cancer*, 2020, 126(16): 3847-3856.

[51] El-Sadek I A, Miyazawa A, Shen T W, et al.

Optical coherence tomography-based tissue dynamics imaging for longitudinal and drug response evaluation of tumor spheroids [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(11): 6231.

## Review on Dynamic Scattered Light Measurement in Full-Field Optical Coherence Tomography

Tian Haoying, Tang Fengrui, Gao Wanrong, Zhu Yue\*

*School of Electronic and Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094, China*

### Abstract

**Significance** Optical coherence tomography (OCT) is a label-free, non-invasive, and high-resolution coherent imaging technology coupled in many fields, such as biology, medicine, and materials. It can obtain cross-sections in subcellular resolution and accumulate microstructures in three-dimensional space with high-isotropic spatial resolution. Arising from the early 90s, during its development, higher resolution, more contrasts on specific structures, and wider range of applications are its main development directions. Based on time-domain OCT, the full-field OCT (FF-OCT) employs an identical pair of high numerical aperture microscopic objectives and a low-cost and broadband white light source to improve the imaging resolution of the system to the submicron level.

It is known that different structures of biological tissues, such as nuclei and cell media, have different backscattering capabilities of light. FF-OCT detects and extracts intrinsic signals related to refractive index variance of biological tissues at the subcellular level. However, the performance of FF-OCT can be tricky when the interference of strongly scattering media reduces image contrast during single-cell imaging, and it will lose behavioral information during metabolism activities.

Recently, a dynamic FF-OCT (D-FFOCT) shows the ability to visualize metabolic contrast in mouse organoid, which bring a new imaging mechanism to deal with those problems. The idea combines the principles of FF-OCT and dynamic scattered light measurement. It can detect subcellular dynamic activities for cells or tissues. The special distinguishing ability of D-FFOCT makes it possible to differentiate the types and functions of cells. Since D-FFOCT was first proposed, some scientific studies have been reported. Therefore, it is necessary to summarize the existing research to extract the principle key points and attract more attention for related researchers.

**Progress** First, the current D-FFOCT technology development is described, and the tradeoff between functions and performance is elaborated. D-FFOCT was first proposed by Clement Apelian et al. (2016). It can generate dynamic signals through the metabolic movements of the cells over time. Additionally, it is a set of mathematical tools for analyzing the time fluctuations of FF-OCT signals. There are some bottlenecks to be solved. The weak signal generated by the sample fluctuations and the tradeoff between imaging depth and resolution, the imaging depth is very shallow because it is difficult to image cells *in vivo*. However, the operations require fixation and mechanical sectioning, making the progress of dynamic phenomena complicated and time-consuming during surgery.

Then, the basic principle and performance of D-FFOCT are illustrated as follows. 1) The D-FFOCT system inherited from conventional FF-OCT has a similar imaging device structure, making it easy to design and naturally form multimodal imaging modality. 2) The multimodal imaging technique of the D-FFOCT system is introduced as well as corresponding advantages. 3) The evaluation parameters of the system performance, such as spatial resolution, system sensitivity, image contrast, signal-to-noise ratio, and imaging depth of the imaging system, are interpreted. The latest development status of these parameters is also summarized.

Additionally, several attempts have been made to improve the performance of D-FFOCT. To address the current defects of D-FFOCT based on image artifacts caused by the susceptibility of the interference signal to perturbation, several methods, such as the use of high-speed cameras, instantaneous phase-shift method, Hilbert transform-based algorithm, and singular value decomposition-based image filtering algorithm to eliminate artifacts are analyzed and

summarized in Table 1. Cell culture studies and automatic planar locking systems are introduced to gain a wider range of applications, and *in vivo* time-lapse imaging studies of organs by D-FFOCT are prospected.

Finally, we absorb and outline the essence to discuss the research progress of D-FFOCT in basic biology, precision medicine, and drug research. According to the purpose of using D-FFOCT, applications in the medical field can be classified as diagnosing cancer, studying pathology, and observing the efficacy of drugs. We also summarize high-contrast imaging mechanisms in D-FFOCT images and foresee the development prospects and future research directions of D-FFOCT technology in these fields. The main applications and parameters are summarized in Table 2.

**Conclusions and Prospects** We review several techniques of D-FFOCT suitable for metabolic activity visualization mechanisms in fundamental biology, precision medicine, and drug research. With advanced theories, ingenious algorithms, and latest optoelectronic devices, D-FFOCT may become a widely used, faster, and more convenient image method with an augmented label-free higher resolution and multi-contrast.

**Key words** biotechnology; label-free imaging; full-field optical coherence tomography; dynamic scattered light measurement; motion artifact; precision medicine