

基于 OCT 高精度定量的视网膜光生理功能成像技术

马艳红, 张鹏飞*

大连理工大学光电工程与仪器科学学院, 辽宁 大连 116024

摘要 视网膜光生理是视网膜在受到光刺激后产生的一系列生理反应,在一定程度上可以客观反映视网膜的功能。其中,视网膜光图技术(ORG)是一种新近发展起来的、可以精确量化视网膜光生理响应的功能成像技术,它通过光学相干层析成像(OCT)配合可见光刺激,结合峰值检测与散射强度分析,精确测量视网膜在受到光刺激后产生的形态和光学特性变化,而通过与自适应光学技术及相位分析技术相结合,可以达到微米级的横向分辨力、纳米级的轴向空间分辨力和毫秒级的时间分辨力,能够实现对视网膜单细胞级别的光生理功能成像。在硬件上,ORG只需要在 OCT 系统上增加一个光刺激单元,尽管目前尚处于技术开发与信号机理探索阶段,但在未来形成一系列的标准后,有望在眼科基础研究与临床诊断中获得广泛的应用。系统回溯了采用 OCT 进行视网膜光生理功能成像的历史,总结了 ORG 的最新进展,并讨论了未来 ORG 的几个潜在发展方向。

关键词 医用光学; 视网膜光图; 光学相干层析; 可见光刺激; 视网膜功能

中图分类号 TH773 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221304

1 引言

由于我国逐步进入老龄化社会,近视人口居高不下,以及人们对电脑、手机等电子设备过度依赖,视觉健康问题不可避免地遇到了新的挑战。如长期使用电子屏幕会导致眼睛疲劳干涩、视力下降,甚至有可能诱发干眼症、急性闭角型青光眼、近视性黄斑变性等疾病,给人们带来了极大的困扰;而随着年龄的增长,罹患年龄相关性黄斑变性(AMD)、青光眼、糖尿病性眼病等致盲性疾病的概率也在上升。以 AMD 为例,目前全球患病人数约为 1.9 亿,预计到 2040 年将达到 2.88 亿^[1];AMD 在我国的患病率也呈现逐年上升的趋势,现今已有超过 3000 万名患者^[2]。这类致盲性视网膜疾病通常发病隐匿,早期不易察觉,到中晚期才会有明显的视觉症状,但此时已经产生了难以逆转的视觉神经细胞损伤甚至凋亡,因此其早期诊断意义重大。而由于视网膜功能紊乱可早于组织结构异常,对视网膜进行高精度、定量功能检测以精确、客观地评价视网膜的功能改变,有利于发现视网膜病变早期的功能异常,从而为视网膜疾病的临床诊断提供一定的依据。

正常人眼所见场景和三种常见致盲性眼底病患者所见场景的对比如图 1 所示,从本质上来看,这些致盲性疾病均是由于视网膜细胞发生渐进性退化,最终感光细胞或者神经节细胞凋亡^[3],临床上较多见且难治,在世界范围内均为最主要的不可逆致盲性眼病。视网

膜疾病涉及从视网膜到脉络膜的多种细胞与结构。例如具有典型遗传性的视网膜色素变性(RP)^[4],其通常表现为视杆细胞及视锥细胞功能的相继丧失^[5]。还有后天受环境影响获得的,如 AMD^[6]、近视性黄斑变性(MMD)^[7]等,主要造成黄斑区视锥细胞受损,或青光眼^[8],主要影响神经节细胞和视神经纤维。此外,由于视网膜色素上皮细胞(RPE)具有清除感光细胞代谢物、抗光氧化、参与视循环等功能^[9],当 RPE 细胞内发生基因(如 RPE65)突变时,会扰乱视循环,导致视力受损^[10];而脉络膜及其毛细血管则主要向 RPE 和视觉细胞层提供氧气和营养物质,约占视网膜氧耗 90% 的氧气来自脉络膜循环,其对维持视网膜外层细胞的高代谢活动至关重要,若发生异常则直接影响邻近组织的功能^[11-13]。另外,介于 RPE 和脉络膜毛细血管(CC)之间充当营养和代谢物交换分子筛的玻璃膜^[14],其功能异常导致代谢物沉积是造成 AMD 玻璃膜疣产生的主要原因之一。

鉴于这些细胞与结构在视网膜疾病发生发展中的重要生理、病理作用,针对它们进行高精度、定量功能成像技术研究对精确、客观评价视网膜的功能具有重要的意义,不仅有利于疾病的早期筛查和诊断,也可以通过监测治疗过程中的功能信号改变来评价治疗效果。同时,与动物模型相结合,可以为进一步鉴别致病基因、阐明病理机制、开发新药物、探索新疗法^[15]等提供强有力的工具。其中,传统的功能检测手段,如暗适

收稿日期: 2022-10-08; 修回日期: 2022-11-22; 录用日期: 2022-11-25; 网络首发日期: 2022-12-05

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

通信作者: *pfzhang@dlut.edu.cn

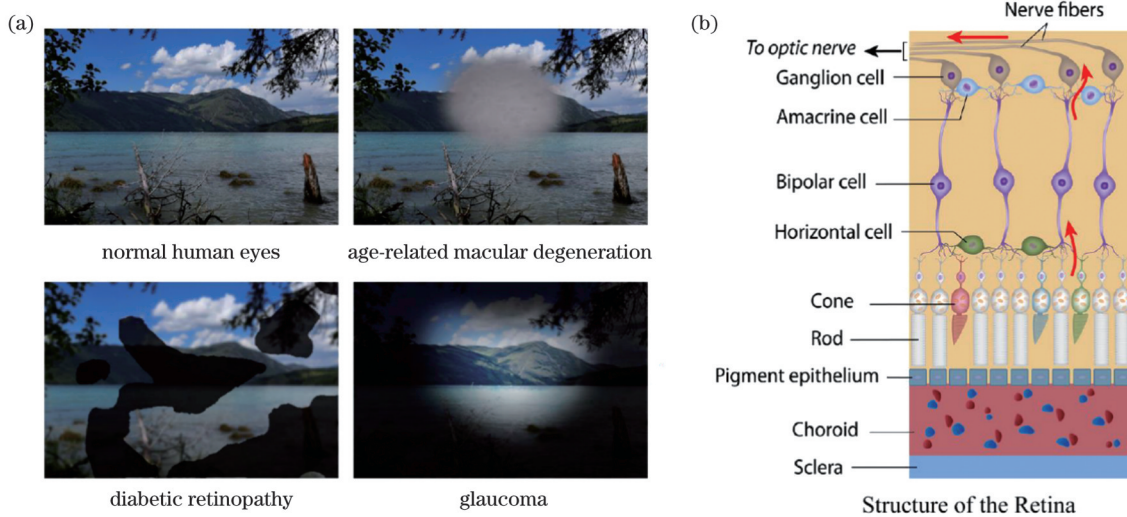


图 1 视网膜病变患者所见场景与视网膜结构。(a)正常视网膜与三种常见致盲性视网膜疾病的视觉表现;(b)视网膜的多层结构^[3]
Fig. 1 Visual fields of patients with retinopathy and structure of retina. (a) Visual manifestations of normal retina and three common blinding retinal diseases; (b) multilayered structure of retina^[3]

应与色觉检查、视力检查、视野检查等,均属于视觉心理物理学检查,需要从患者处得到关于可见光刺激的反馈,因此会受到测试者主观因素的影响。另外,如视网膜电图(ERG)^[16-19]可用于测量光刺激下的电活动,这是对视网膜功能响应的客观测量,但具有中度侵入性,需要在受试者角膜处放置电极;还有用于视网膜结构成像的眼底相机^[20]和激光扫描检眼镜(SLO)^[21]技术,其共同缺点是空间分辨率低,不利于发现早期微小区域的功能异常。而光学相干层析成像技术(OCT)由于其出色的截面断层成像功能,可实现视网膜三维结构的高分辨率成像,精准检出眼底病变结构^[22-23]。因此,开发基于OCT的功能成像技术,可以极大地提高视网膜功能检测的空间分辨率,实现高精度、定量功能检测,有望进一步提前视网膜疾病的可探测期,为基础研究和临床诊疗提供新的技术手段。

2 基于OCT的视网膜光生理功能成像技术

2.1 早期的研究工作

“功能”的定义有很多种,由于视网膜的主要作用是感受并获取可见光信息,因此本文中的“功能”是指视网膜“对可见光刺激的反应以及诱发的一系列响应”。由于OCT出色的空间分辨率及其在基础研究和临床诊疗中的广泛应用,研究人员很早就致力于使用OCT来捕捉神经细胞对可见光刺激的功能响应。2003年,Lazebnik等^[24]首次采用OCT检测离体加州海兔腹部神经纤维在电刺激后产生的散射信号变化,并将其归因于动作电位在神经元上的传导,在刺激过程中获得的OCT图像显示出局部可逆的散射增加和瞬态散射变化,表明了OCT对组织神经活动中光学变化的敏感性。随后,Yao等^[25]于2005年首次将该方法应

用到视网膜的研究中。通过使用基于电光相位调制器的无移动部件OCT系统,从可见光刺激下的离体蛙眼视网膜中观察到了与神经激活相关的近红外光散射变化。同样地,Bizheva等^[26]于2006年在离体兔眼视网膜上探测到了可见光刺激导致的视网膜多层OCT散射信号变化,原因是暗适应条件下视网膜在光刺激后产生的生理变化引起了组织反射率的局部变化,研究者将其称为视网膜“光生理学”,这种聚焦于数秒之内OCT散射信号的变化以及采用电学手段进行对比研究的方法为后续的研究带来了深刻的影响。同年,Srinivasan等^[27]在活体大鼠视网膜的研究中发现了视网膜在经过可见光刺激后的5s内存在10%~15%的反射强度增加,且主要发生在视觉细胞外段,并于2009年首次将该方法应用于人眼视网膜的功能成像中^[28],但获取的信噪比很低,这也是早期采用OCT进行视网膜功能成像普遍存在的问题。

寻找视网膜在光刺激后散射信号的变化是OCT光生理学功能成像早期研究工作的重点,并延续至今。这种在没有任何外源性生色团的参与下,由刺激诱发的组织固有光学特性的改变被称为内源性光学信号(IOS)^[29]。值得一提的是,Yao课题组多年来进行了大量关于IOS的研究^[30-33]。通过对OCT数据的动态差分处理,可以减少代谢和血液动力学变化对快速IOS成像的影响,以获得小动物视网膜在光刺激后数秒之内的散射信号变化信息,该方法之后被用于人眼成像^[34],并在近年来用于OCT血管造影(OCTA)以捕捉视网膜血流在可见光刺激下的改变信息^[35-36]。由于OCTA的信号强度与血流的流速呈非线性对应关系,与采用多普勒OCT研究血管直径和血流流量在光刺激前、后的变化相比^[37-38],OCTA的研究结果并不直观。同时,Yao课题组测量的是光刺激后图像的差分变化,本质上还是使用

OCT 测量感光细胞层的光学特性改变,但是其分析方法较难理解,且观察到的信号通常只有上升阶段,而无信号恢复阶段,难以与视觉信号的“激活→恢复”循环模式对应起来。除此之外, Schmolli 等^[39]开发了一种增强灵敏度的实验方法,将响应检测与预设的闪烁频率刺激相匹配,类似于外差检测,使得响应信号移出低频噪声区域,从而增强响应检测的特异性,但其结果并不明显,无法鉴别出功能信号。另外,采用 OCT 对人眼^[40-42]、鸡眼^[43-44]、大鼠^[45]、猕猴^[46]、树鼩神经节细胞^[47]甚至阿尔茨海默病患者^[48]等进行光生理功能成像的研究散见于各个研究机构。如前所述,这类检测方法通常只注重对散射信号的测量,虽然显示了光刺激功能 OCT 在视网膜生理或疾病检测中的应用前景,但是受 OCT 成像性能和数据分析方法的限制,信号重复性较差或者难以直观理解,因此并没有取得突破性的研究进展。

2.2 近年来的技术突破

随着 OCT 性能(分辨率、成像速度、数据分析方法等)的逐步提高以及活体成像技术的广泛应用,近年来在 OCT 视网膜光刺激功能成像领域出现了一系列的突破^[49]。

2016 年底, Hillmann 团队构建了一种高速全场 OCT(FF-OCT, 其 A-scan 频率可达 46.5 MHz, 三维扫描频率可达 167 Hz), 并结合数字波前校正、相位分析以及局部可见光刺激, 成功测量了人眼在不同强度光刺激下视锥细胞外段在 3 s 之内产生的光程差变化^[50]。结果表明, 在最初的数十毫秒内光程差呈现缩短而非增长的特性, 且当光刺激时间由 50 ms 增加到 3000 ms 时, 3 s 后光程增加了 400 nm 以上。除了与光刺激呈时间相关性之外, 该光程差还具有极强的局部性[仅在光刺激图案之内, 如图 2(a)~(c)所示], 因此极为有力

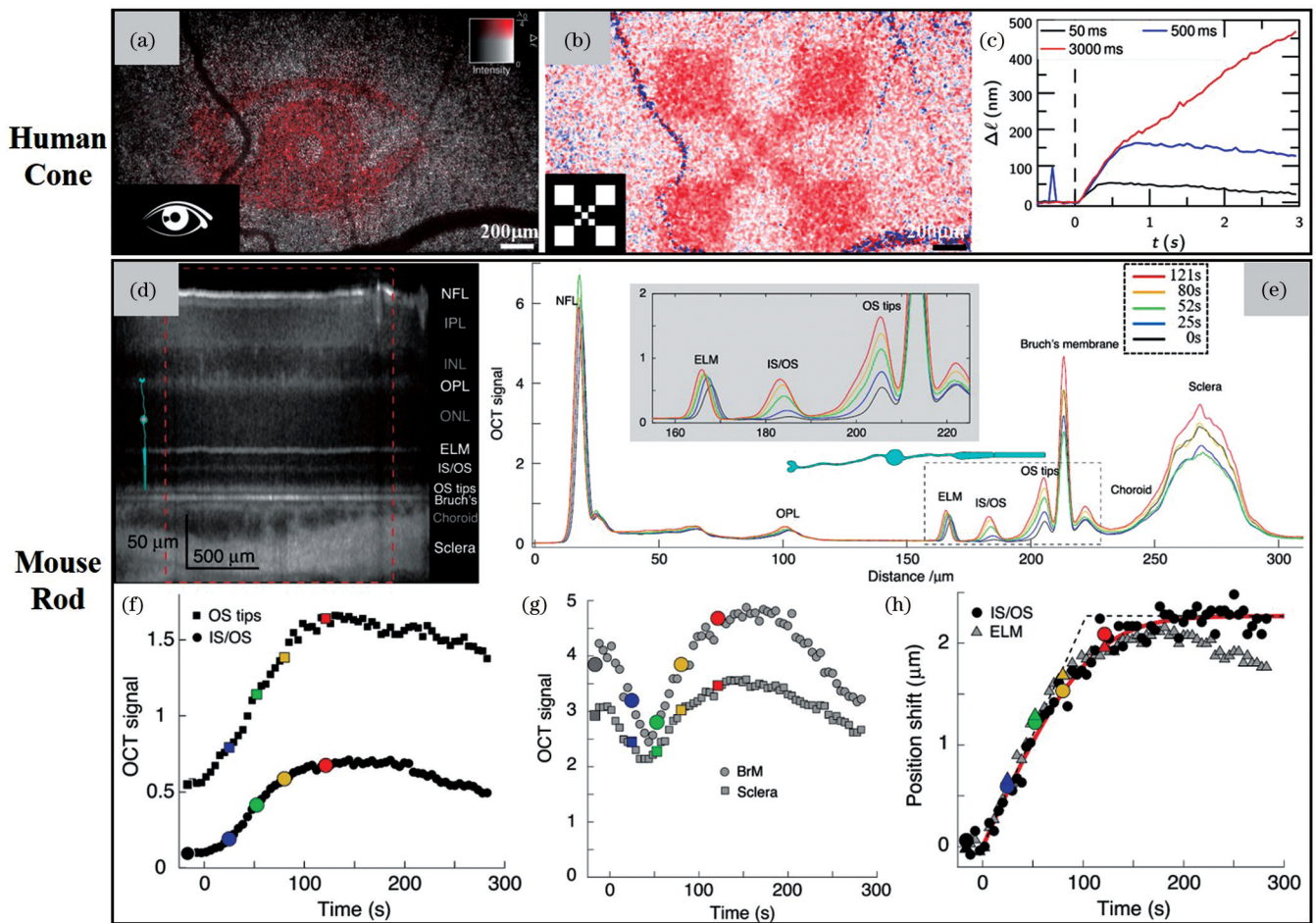


图 2 功能信号在人眼视锥细胞和小鼠视杆细胞中的表现形式。(a)光刺激诱导的视锥细胞外段光程差改变及其在视网膜上的投影,刺激图案显示在左下角^[50]; (b)方块状光刺激诱导的视锥细胞外段光程差改变及其(c)随刺激时间变化的测量结果^[50]; (d)暗适应小鼠视网膜的 OCT 图像^[51]; (e)经过光刺激之后 2 min 内小鼠视网膜轮廓图的变化^[51]; (f) 3~5 倍的视杆细胞外段散射增强^[51]; (g)玻璃膜和巩膜的散射强度变化^[51]; (h)外界膜和内/外段交接点处~2 μm 的位置变化^[51]

Fig. 2 Expressions of function signals in human cone and mouse rod photoreceptors. (a) Optical stimulus-induced cone outer segment optical path length change and its projection on retina enface with stimulus pattern shown in lower left inset^[50]; (b) square-shape stimulus-induced cone outer segment optical path length change and (c) temporal measurement results^[50]; (d) dark-adapted mouse retina OCT image^[51]; (e) changes of retinal contour in mice within 2 min after light stimulation^[51]; (f) 3–5 times scattering enhancement in rod outer segments^[51]; (g) scattering changes of Bruch’s membrane and sclera^[51]; (h) ~2 μm position changes of external limiting membrane and inner/outer segment junction^[51]

地证明了该信号的真实性。然而, Hillmann 团队的工作只发现了视锥细胞外段长度的改变, 并未报道光刺激导致的 OCT 散射信号变化, 且未对信号产生的机理进行研究。

2017 年初, Zhang 等^[51]利用 100 kHz 的常规谱域 OCT 观察暗适应小鼠视网膜在 5 min 长的时间窗口内对不同强度闪烁光刺激响应[图 2(d)~(h)], 刺激方式为单个闪光, 持续时间约为 0.7 s, 强度为 9.4 μW , 波长为 488 nm, 发现了包含视杆细胞外段在内的微米级厚度数层散射信号强度的变化, 并通过基因敲除小鼠证实了该响应信号来自视觉光转导过程。通过构建理论与仿真模型, 研究者给出了信号产生的生理学机理: 视杆细胞在接收到光刺激后会将附着在盘膜上的多种蛋白分子释放到细胞液中, 导致细胞内部溶液浓度的增加, 从而视杆细胞内外之间产生渗透压, 由此驱动细胞间质液体从细胞外部进入细胞内部, 引起视杆细胞长度的增长, 并产生相应的折射率改变, 由于 OCT 本质上测量的是折射率在界面上的差异, 因此 OCT 的散射强度发生变化。

可以看到, 对光刺激下视网膜光生理功能信号的测量大致可以分为两类: 一类是提取视网膜散射信号的变化, 另一类是对视觉细胞形态学的改变进行研究, 如视杆以及视锥细胞外段长度的变化。后者又可以分为基于相位的方法以及基于强度的方法。实质上, 这两种方法测量的是不同种类视觉细胞的响应, 在人眼上是视锥细胞, 而在小鼠上是视杆细胞, 它们的响应也有很大的不同。在人眼上只观察到了视锥细胞长度的变化, 意味着此前报道的人眼视网膜散射特性的变化规律有待完善, 而在小鼠上不仅观察到了视杆细胞长度的变化, 存在于视觉细胞、RPE、玻璃膜、脉络膜及其毛细血管等多个位置处的散射变化也更为丰富多样。此外, 这两类细胞对光刺激的响应速度也不同, 人眼视锥细胞的响应时间只有几秒钟, 而小鼠视杆细胞则长达数分钟。这除了与细胞种类的差异有关外, 还可能与物种之间的差异有关, 但由于使用 OCT 在人眼上观察视杆细胞以及在小鼠上观察视锥细胞都还是非常困难的, 因此需要进一步的工作来实现对这两类细胞功能信号机理的对比研究。

2.3 后续的研究进展

Lu 等^[52]使用超高分辨率谱域 OCT (UHR-OCT) 来获取不同时间点的多个视网膜宽视场(40°)数据, 观察了人眼视网膜在经过短暂(1~12 ms)光刺激后 30 min 内各层的恢复情况。实验结果表明, 视杆细胞在受到光刺激后, 其恢复过程中会产生亚微米级别的长度变化, 且变化速度与小鼠视杆细胞的变化较为接近, 比视锥细胞慢很多, 但未报道人眼视网膜上 OCT 散射信号的变化。

此后, Spahr 等^[53]继续开发并完善新型的相位分析方法, 结合散斑信号的特性, 对视锥细胞外段的光生理

学长度变化进行了更精确的测量, 并致力于寻找来自视网膜其他层的功能信号, 如神经节细胞层^[54]等, 结果显示在光刺激后神经节细胞层的改变相对于视觉细胞层更为微弱。而来自加州大学 Davis 分校的科研人员则将功能信号进一步应用在视网膜疾病的模型研究中, 使用转基因荧光标记小胶质免疫细胞的小鼠, 在对其进行视网膜光损伤造模后, 利用 OCT 光生理功能成像技术能够检测到小鼠视网膜在光损伤后视觉细胞层的功能恢复过程^[55]; 同时进一步开发了有关 RPE 和视杆细胞外段端点在视觉细胞光刺激下产生的层厚和散射响应功能信号的检测方法^[56], 测量了视杆细胞外段长度在昼夜周期中的改变, 间接反映了视杆细胞的生长速度和 RPE 对视锥细胞外段盘膜的吞噬消化能力, 由于其功能异常与 AMD 的产生直接相关, 该方法可用于 AMD 动物模型的研究。此外, 为了增大基于常规 OCT 功能成像的空间分辨率, 开发了基于三维数据获取与分块处理的技术, 实现了对小鼠视网膜功能信号空间特征的识别^[57]; 为了增强其对微弱信号的检测能力, 开发了基于常规 OCT 的相位分析方法, 实现了对视觉细胞外段长度变化等功能信号更高精度的检测, 检测信噪比提高了约 10 倍^[58]。

上述工作得到了自适应光学(AO)增强型 OCT 同行的关注与跟进, 利用 AO-OCT 在成像分辨率上的优势, 成功实现了对人眼单个视锥细胞级别的光生理信号测量。2019 年, Azimipour 等^[59]使用 1.6 MHz 的扫频 AO-OCT 成功检测到视锥细胞在光刺激后的长度改变, 并在此后持续推进相关工作, 实现了对人眼视杆细胞长度变化功能信号的测量^[60], 可以看出, 视杆细胞相较视锥细胞对光更为敏感, 对光刺激具有更强的响应, 但响应时间比视锥细胞更长。同时对比发现, 文献^[59]中的视杆细胞响应光刺激的时间尺度比文献^[52]的要短很多, 可能是光刺激强度的不同导致的, 但是响应信号的幅度只增大了约 3 倍, 显示出信号增长的非线性。与小鼠视杆细胞的结果对比^[51], 在视紫红质光漂白率约为 1% 的光刺激强度下, 人眼视杆细胞的响应速度提高了约 15 倍, 且未有 OCT 散射强度的变化, 揭示了不同物种之间同类细胞对光刺激的生理功能响应也可能存在较大差异。

2019 年, Zhang 等^[61]则利用 1 MHz 的频域 AO-OCT 对不同颜色光刺激下人眼视锥细胞的功能响应进行测量, 并进一步确认了视锥细胞外段在受到光刺激的最初 10 ms 内长度变短而非增长, 更重要的是, 利用视锥细胞对不同颜色光刺激响应的不同, 成功区分出人眼的三种视锥细胞, 如图 3 所示。此外, 该团队还进一步将这项技术应用到对视网膜色素变性(RP)病人的研究中^[62], 研究发现: 视锥细胞对光刺激的功能响应随着 RP 严重程度的增加而降低, 即使在视锥细胞密度正常的区域, 其反应也与对照组不同; 短波长敏感视锥细胞比中波长和长波长敏感视锥细胞更容易受到

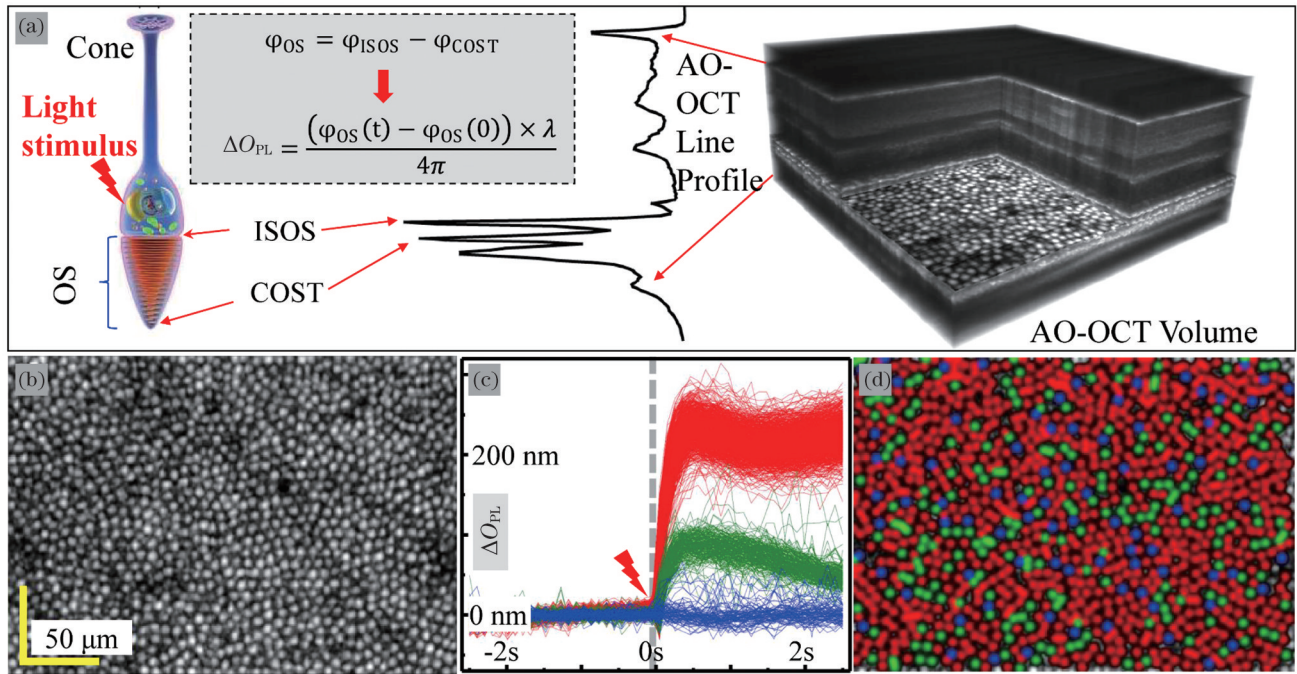


图3 采用AO-OCT对人眼视锥细胞实现nm级的视觉光生理测量^[61]。(a)利用AO-OCT相位信息检测暗适应视锥细胞在受到可见光刺激后外段长度的变化(ΔO_{PL});(b)视锥细胞图像;(c)视锥细胞对637 nm可见光刺激产生的响应;(d)根据 ΔO_{PL} 的强度视锥细胞被分为三类

Fig. 3 Nanoscale visual photophysiological measurements of individual cone cells in human eye by AO-OCT^[61]. (a) Detecting outer segment optical path length change (ΔO_{PL}) of dark-adapted cone cell stimulated with visible flash using phase information by AO-OCT; (b) *en face* intensity image of cone mosaic; (c) responses of cone cells to 637 nm visible light stimulus; (d) classifying cone cells into three types according to intensity of ΔO_{PL} .

RP的影响,且RP中视锥细胞对光刺激响应及其外段长度的减少比视锥细胞密度的变化更早出现。

2020年,Pandiyani等^[63]在自行研制的高速线扫描谱域AO-OCT上重复了文献^[59]和^[61]的工作,并通过实验验证了扫描速度在相位稳定测量中的作用。同时他们的研究也进一步确认了视锥细胞在受到光刺激之后的极短时间内(<5 ms)会呈现截然不同的反应(缩短数十纳米而非增长),表明了光生理学信号在不同时间尺度上的复杂性和多样性。研究者认为,视锥细胞外段的快速收缩是一种电活动的光学表现,是异构化后的快速电荷位移导致的光感受器盘膜内电位和表面张力变化引起的^[64],并与Boyle等^[65]进一步合作构建了相关模型,详细解释了视锥细胞外段早期缩短可能的产生机理。在该模型中,研究者将视觉细胞电位与电压依赖性膜张力的变形联系起来,其中视觉细胞电位是由光异构化后视蛋白的构象变化引起,导致电荷在盘膜上发生微小移动,同时膜两侧离子的横向排斥会影响盘膜的表面张力并造成其横向膨胀,进而导致外段的轴向收缩。在之后的研究中,Pandiyani等^[66]发现视锥细胞后续的慢速变化主要包含两种组分:实验显示其中一种组分与视锥细胞色素光漂白呈线性相关,并指出它是由视蛋白异构化触发的视锥细胞盘膜膨胀引起的;而对另一组分的光敏感性和动力学研究表明,其潜在机制是光转导产生的可溶性副产

物导致的渗透反应,这种副产物可能为G蛋白-磷酸二酯酶复合物中的蛋白信号调节因子9(RGS9)催化水解三磷酸鸟苷产生的磷酸盐。这些结果从机理上解释了视锥细胞光转导的功能信号来源,为进一步理解视锥细胞的光生理功能提供了参考。

另外,值得注意的是,Qian课题组致力于采用转基因或药物方式改变小鼠视网膜,针对外视网膜(从外界膜到RPE-脉络膜边界)在明、暗适应下的厚度变化,通过与常规野生小鼠作对照来进行疾病或者机理研究^[67]。将该方法应用到视网膜退行性病变的小鼠疾病模型中^[68],发现病变小鼠视网膜对光刺激的反应明显不同,而当采用视网膜具有较低线粒体呼吸基础水平的转基因小鼠时,其光刺激导致的视网膜外层厚度的增加较对照组要小很多。研究人员将这一改变归因于线粒体呼吸导致的局部水合作用的减少,由于转基因小鼠在光照下有更高的能量储备能力和更低的耗氧量,因此视网膜代谢中水的产量相对较低,从而视网膜层厚度的变化减小^[69-71];而在另一部分的研究中则发现,抗氧化剂可以消除光刺激导致的视网膜响应,这说明外视网膜厚度的增加同时还受到氧化应激反应的影响^[72-73]。除此之外,Messner等^[74]使用常规视场OCT观察到了光刺激导致的视网膜下空间体积的减少,值得一提的是,这与小鼠研究的结果截然相反。另外,Tomczewski等^[75]在最新的研究中,针对明适应而非暗

适应的人眼视网膜,测试了不同闪光频率、图案刺激下视网膜的功能响应,研究表明这种方式能够得到比暗适应下更高信噪比的功能信号,这为其在临床研究中的应用提供了有利条件。

在我国,关于使用 OCT 进行视网膜可见光刺激功能成像的研究鲜有报道。最为相近的是柴新禹和周传清课题组利用 OCT 测量猫的视网膜对电刺激的响应信号^[76-77]。另外,李鹏课题组在 OCTA 的技术开发方面进行了长期的研究,近期正在利用 OCTA 研究小鼠视网膜在闪烁光刺激下血流变化的功能信号,为评估视网膜光生理功能提供了血流变化维度的信息^[78-79]。

2.4 未来的发展方向

可以看出,基于 OCT 和可见光刺激的视网膜光生理学功能成像在近年来得到了极大的发展,学界逐步形成共识,将这种方法统称为视网膜光图(ORG)^[34,56-58,60,62-64,75,80-81],以便和测量光刺激后视网膜产生的电信号并已进入临床使用的视网膜电图(ERG)技术相对应。ORG 相对于 ERG 具有非接触、高空间分辨率的优点,未来可集成到临床 OCT 设备中,在对视网膜结构进行成像的同时,可以获取视网膜的功能信息,形成有益的补充,从而为疾病的诊断提供更全面的依据。ORG 未来的发展方向可能会有如下四个方面。

2.4.1 如何在保持大视场宏观成像的同时实现 ORG 的局部解析能力?

尽管基于高性能 AO-OCT 的功能成像技术可以极大地提高分辨率,在单个视觉细胞上实现纳米级别的长度信号提取,但是其成像视场范围通常很小(约为 1°),无法对视网膜的宏观变化进行检测,容易导致“只见树木不见森林”。而基于常规 OCT 系统的功能成像技术,可以测量视网膜的宏观响应(视场通常大于 50°),但往往需要对多幅图像进行空间平均处理以增大其信噪比,这造成了 OCT 的横向空间解析能力受限。因此,需要在保持大视场宏观成像的同时,开发 OCT 功能成像技术的局部解析能力,以实现视网膜病变早期局部功能异常的检出。

2.4.2 如何进一步增强 OCT 功能成像技术的灵敏度以检测到更微弱的功能信号?

视网膜疾病涉及多种细胞与结构,受限于现有技术的探测灵敏度,很多功能信号尚未被检测到。如在人眼成像中目前仅较为可靠地实现了对视锥和视杆细胞长度信号的提取;在小鼠视网膜中实现了对视杆细胞长度和散射信号的提取,但仍未检测到视锥细胞信号,因此无法开展与之相关的基础研究工作。此外,目前的研究鲜有涉及神经节细胞、RPE、玻璃膜和脉络膜等结构功能信号的报道,鉴于它们在视网膜疾病中的重要作用,需要增强 OCT 功能成像技术的灵敏度以提取出更丰富的功能信号、扩展技术适用的病

变范围。

2.4.3 如何快速、自动化地提取功能信号并探索视网膜病变早期的特征功能信号?

基于 OCT 的三维数据处理有计算量大的特点,这给利用 OCT 功能成像技术进行大规模、长时间序列研究带来了极大的挑战,因此需要研究 OCT 功能数据的快速、自动化处理方法和功能信号提取技术,以增强 OCT 功能成像技术的易用性。在此基础上,针对特定疾病的小鼠模型进行时间序列研究,或者针对临床视网膜病变高风险人群进行代偿期视网膜功能变化对比研究,以寻找对特定视网膜疾病具有高灵敏度的特异性功能信号。

2.4.4 实验方法的优化与实验标准化

由于采用的是不同刺激和不同成像方法,即使是同类细胞也可能获得不同的生理反应。例如,当刺激强度不同时,信号在强度或者持续时间上也有很大不同,这给对比不同小组之间的研究造成了一定的障碍。又如,激光点扫描光刺激可以进行精确的逐点刺激,基于液晶屏的宽场光刺激可以在视网膜上投射刺激图案,而基于 LED 的宽场光刺激则具有方式简单、成本低的优势,但是它们产生的刺激强度不易统一量化,这也是造成信号差异的一个原因。成像方法目前主要有四种,一种是常规谱域或者扫频 OCT,成像频率在 100 kHz 左右,速度较慢,但是与现有的临床 OCT 成像设备的速度相近,其分析方法与分析结果更具有向临床推广的潜力;二是基于经典自适应光学的点扫描 AO-OCT 系统,现有的报道中均采用 MHz 以上的谱域或扫频 OCT,结合 AO 的高精度成像能力,使得基于相位的单细胞数据分析成为可能,但是结构复杂、成本昂贵;其三是基于 FF-OCT 和计算 AO 的成像系统,相较于经典自适应光学的点扫描 AO-OCT 系统,其结构较为简单,同时成像速度更快,但是图像质量较低,成本更为昂贵;其四是基于经典自适应光学的线扫描 AO-OCT 系统,相较于点扫描和 FF-OCT 系统,其成像速度居中,对视觉细胞的成像质量接近点扫描系统的水平,但是同样具有结构复杂、成本昂贵的缺点。由于不同研究采用不同的系统和处理算法,成像质量和后续结果存在差异,因此需要建立标准化的实验流程和数据处理方法,这样同一设备不同时间的测量结果以及不同设备之间的检查结果具有更好的可比性。

同时,为了促进临床应用,需要进一步改进实验程序并缩短检查时间,包括缩短暗适应时间以减轻受试者的负担,探索不同的光刺激方式以更好地激发功能信号等,这方面 Tomczewski 等^[75]的研究给出了很好的示例。此外,视网膜功能检查方法有很多种,每种方法都有其优点和局限性,需要研究如何将 ORG 与现有检查方法所得到的数据进行信息融合,多模式评估视网膜的生理功能。

3 结束语

ORG 是一种全新的技术,其获取的光生理信号反映了视网膜组织的功能信息,弥补了常规 OCT 成像技术只能提供视网膜结构信息的不足。同时,人眼和动物视网膜的研究表明,视网膜对光刺激产生的响应涉及包括视杆细胞、视锥细胞、RPE、玻璃膜和脉络膜在内的多个结构的细微变化,这与多种视网膜疾病所影响的结构密切相关。因此,早期视网膜病变可能会对视网膜光生理功能信号在强度、变化速率等方面产生一定的影响,从而可以通过检测光生理功能信号的异常变化为早期病变检测提供新的诊断依据。

参 考 文 献

- [1] Wong W L, Su X Y, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis[J]. *The Lancet Global Health*, 2014, 2(2): e106-e116.
- [2] Song P G, Du Y H, Chan K Y, et al. The national and subnational prevalence and burden of age-related macular degeneration in China[J]. *Journal of Global Health*, 2017, 7(2): 020703.
- [3] Discovery Eye Foundation. Layers of the retina[EB/OL]. (2016-01-26)[2022-08-06]. <https://discoveryeye.org/layers-of-the-retina/>.
- [4] Verbakel S K, van Huet R A C, Boon C J F, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2018, 66: 157-186.
- [5] 罗学廷, 刘洋, 汪枫桦, 等. 基因治疗视网膜色素变性的机遇与挑战[J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(7): 1015-1022.
Luo X T, Liu Y, Wang F H, et al. Opportunities and challenges of gene therapy for retinitis pigmentosa[J]. *Scientia Sinica: Vitae*, 2022, 52(7): 1015-1022.
- [6] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration[J]. *The Lancet*, 2018, 392(10153): 1147-1159.
- [7] Fricke T R, Jong M, Naidoo K S, et al. Global prevalence of visual impairment associated with myopic macular degeneration and temporal trends from 2000 through 2050: systematic review, meta-analysis and modelling[J]. *The British Journal of Ophthalmology*, 2018, 102(7): 855-862.
- [8] Casson R J, Chidlow G, Wood J P M, et al. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts[J]. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2012, 40(4): 341-349.
- [9] Datta S, Cano M, Ebrahimi K, et al. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, 60: 201-218.
- [10] Apte R S. Gene therapy for retinal degeneration[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 5.
- [11] Biesemeier A, Taubitz T, Julien S, et al. Choriocapillaris breakdown precedes retinal degeneration in age-related macular degeneration[J]. *Neurobiology of Aging*, 2014, 35(11): 2562-2573.
- [12] Zhang S, Zhang G Y, Zhou X, et al. Changes in choroidal thickness and choroidal blood perfusion in Guinea pig myopia[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2019, 60(8): 3074-3083.
- [13] Wong C W, Phua V, Lee S Y, et al. Is choroidal or scleral thickness related to myopic macular degeneration? [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2017, 58(2): 907-913.
- [14] Tode J, Richert E, Koinzer S, et al. Thermal stimulation of the retina reduces bruch's membrane thickness in age related macular degeneration mouse models[J]. *Translational Vision Science & Technology*, 2018, 7(3): 2.
- [15] Collin G B, Gogna N, Chang B, et al. Mouse models of inherited retinal degeneration with photoreceptor cell loss[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 931.
- [16] Frishman L J. Origins of the electroretinogram[M]//Heckenlively J R, Arden G B. Principles and practice of clinical electrophysiology of vision. Cambridge: MIT Press, 2006: 139-183.
- [17] Brown K T. The electroretinogram: its components and their origins[J]. *Vision Research*, 1968, 8(6): 633-677.
- [18] Hood D C, Odel J G, Chen C S, et al. The multifocal electroretinogram[J]. *Journal of Neuro Ophthalmology*, 2003, 23(3): 225-235.
- [19] Berninger T A, Arden G B. The pattern electroretinogram[J]. *Eye*, 1988, 2(1): S257-S283.
- [20] Bernardes R, Serranho P, Lobo C. Digital ocular fundus imaging: a review[J]. *Ophthalmologica*, 2011, 226(4): 161-181.
- [21] 黎黎, 张悦, 李萌茜, 等. 激光技术在眼科的应用现状与进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507103.
Li L, Zhang Y, Li M X, et al. Current application and progress of laser technology in ophthalmology[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507103.
- [22] Láins I, Wang J C, Cui Y, et al. Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA)[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2021, 84: 100951.
- [23] 薛平. 高性能光学相干层析成像的研究[J]. *中国激光*, 2021, 48(15): 1517001.
Xue P. Development of high-performance optical coherence tomography[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(15): 1517001.
- [24] Lazebnik M, Marks D L, Potgieter K, et al. Functional optical coherence tomography for detecting neural activity through coherence scattering changes[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(14): 1218-1220.
- [25] Yao X C, Yamauchi A, Perry B, et al. Rapid optical coherence tomography and recording functional scattering changes from activated frog retina[J]. *Applied Optics*, 2005, 44(11): 2019-2023.
- [26] Bizheva K, Pflug R, Hermann B, et al. Optophysiology: depth-resolved probing of retinal physiology with functional ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(13): 5066-5071.
- [27] Srinivasan V J, Wojtkowski M, Fujimoto J G, et al. *In vivo* measurement of retinal physiology with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(15): 2308-2310.
- [28] Srinivasan V J, Chen Y, Duker J S, et al. *In vivo* functional imaging of intrinsic scattering changes in the human retina with high-speed ultrahigh resolution OCT[J]. *Optics Express*, 2009, 17(5): 3861-3877.
- [29] Yao X C, Wang B Q. Intrinsic optical signal imaging of retinal physiology: a review[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(9): 090901.
- [30] Wang B Q, Lu R W, Zhang Q X, et al. En face optical coherence tomography of transient light response at photoreceptor outer segments in living frog eyecup[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(22): 4526-4529.
- [31] Zhang Q X, Lu R W, Wang B Q, et al. Functional optical coherence tomography enables *in vivo* physiological assessment of retinal rod and cone photoreceptors[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9595.
- [32] Thapa D, Wang B Q, Lu Y M, et al. Enhancement of intrinsic optical signal recording with split spectrum optical coherence tomography[J]. *Journal of Modern Optics*, 2017, 64(17): 1800-1807.
- [33] Wang B Q, Lu Y M, Yao X C. *In vivo* optical coherence tomography of stimulus-evoked intrinsic optical signals in mouse retinas[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(9): 096010.
- [34] Son T, Kim T H, Ma G Y, et al. Functional intrinsic optical

- signal imaging for objective optoretinography of human photoreceptors[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2021, 246(6): 639-643.
- [35] Son T, Wang B Q, Thapa D, et al. Optical coherence tomography angiography of stimulus evoked hemodynamic responses in individual retinal layers[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(8): 3151-3162.
- [36] Son T, Alam M, Toslak D, et al. Functional optical coherence tomography of neurovascular coupling interactions in the retina[J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(12): e201800089.
- [37] Radhakrishnan H, Srinivasan V J. Multiparametric optical coherence tomography imaging of the inner retinal hemodynamic response to visual stimulation[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(8): 086010.
- [38] Leitgeb R A, Bachmann A H, Villiger M, et al. Measurement of retinal physiology using functional Fourier domain OCT concepts[J]. *Proceedings of SPIE*, 2007, 6426: 642609.
- [39] Schmoll T, Kolbitsch C, Leitgeb R A. *In vivo* functional retinal optical coherence tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(4): 041513.
- [40] Tumlinson A R, Hermann B, Hofer B, et al. Techniques for extraction of depth-resolved *in vivo* human retinal intrinsic optical signals with optical coherence tomography[J]. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 2009, 53(4): 315-326.
- [41] Messner A, dos Santos V A, Stegmann H, et al. Quantification of intrinsic optical signals in the outer human retina using optical coherence tomography[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2022, 1510(1): 145-157.
- [42] Mathis T, Vasseur V, Zuber K, et al. Light-induced modifications of the outer retinal hyperreflective layers on spectral-domain optical coherence tomography in humans: an experimental study[J]. *Acta Ophthalmologica*, 2021, 99(7): 765-772.
- [43] Moayed A A, Hariri S, Choh V, et al. *In vivo* imaging of intrinsic optical signals in chicken retina with functional optical coherence tomography[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(23): 4575-4577.
- [44] Moayed A A, Hariri S, Bizheva K, et al. Correlation of visually evoked intrinsic optical signals and electroretinograms recorded from chicken retina with a combined functional optical coherence tomography and electroretinography system[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(1): 016011.
- [45] Tan B Y, Mason E, MacLellan B, et al. Correlation of visually evoked functional and blood flow changes in the rat retina measured with a combined OCT+ERG system[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2017, 58(3): 1673-1681.
- [46] Suzuki W, Tsunoda K, Hanazono G, et al. Stimulus-induced changes of reflectivity detected by optical coherence tomography in macaque retina[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013, 54(9): 6345-6354.
- [47] Erchova I, Tumlinson A R, Fergusson J, et al. Optophysiological characterisation of inner retina responses with high-resolution optical coherence tomography[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1813.
- [48] Bissig D, Zhou C G, Le V, et al. Optical coherence tomography reveals light-dependent retinal responses in Alzheimer's disease[J]. *NeuroImage*, 2020, 219: 117022.
- [49] Hunter J J, Merigan W H, Schallek J B. Imaging retinal activity in the living eye[J]. *Annual Review of Vision Science*, 2019, 5: 15-45.
- [50] Hillmann D, Spahr H, Pfäffle C, et al. *In vivo* optical imaging of physiological responses to photostimulation in human photoreceptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(46): 13138-13143.
- [51] Zhang P F, Zawadzki R J, Goswami M, et al. *In vivo* optophysiology reveals that G-protein activation triggers osmotic swelling and increased light scattering of rod photoreceptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(14): E2937-E2946.
- [52] Lu C D, Lee B K, Schottenhamml J, et al. Photoreceptor layer thickness changes during dark adaptation observed with ultrahigh-resolution optical coherence tomography[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2017, 58(11): 4632-4643.
- [53] Spahr H, Pfäffle C, Burhan S, et al. Phase-sensitive interferometry of decorrelated speckle patterns[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11748.
- [54] Pfäffle C, Spahr H, Kutzner L, et al. Simultaneous functional imaging of neuronal and photoreceptor layers in living human retina[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(23): 5671-5674.
- [55] Miller E B, Zhang P F, Ching K, et al. *In vivo* imaging reveals transient microglia recruitment and functional recovery of photoreceptor signaling after injury[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(33): 16603-16612.
- [56] Zhang P F, Shibata B, Peinado G, et al. Measurement of diurnal variation in rod outer segment length *in vivo* in mice with the OCT optoretinogram[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, 61(3): 9.
- [57] Zhang L J, Dong R Y, Zawadzki R J, et al. Volumetric data analysis enabled spatially resolved optoretinogram to measure the functional signals in the living retina[J]. *Journal of Biophotonics*, 2022, 15(3): e202100252.
- [58] Pijewska E, Zhang P F, Meina M, et al. Extraction of phase-based optoretinograms (ORG) from serial B-scans acquired over tens of seconds by mouse retinal raster scanning OCT system[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(12): 7849-7871.
- [59] Azimpour M, Migacz J V, Zawadzki R J, et al. Functional retinal imaging using adaptive optics swept-source OCT at 1.6 MHz[J]. *Optica*, 2019, 6(3): 300-303.
- [60] Azimpour M, Valente D, Vienola K V, et al. Optoretinogram: optical measurement of human cone and rod photoreceptor responses to light[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(17): 4658-4661.
- [61] Zhang F R, Kurokawa K, Lassoued A, et al. Cone photoreceptor classification in the living human eye from photostimulation-induced phase dynamics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(16): 7951-7956.
- [62] Lassoued A, Zhang F R, Kurokawa K, et al. Cone photoreceptor dysfunction in retinitis pigmentosa revealed by optoretinography[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(47): 2107444118.
- [63] Pandiyan V P, Jiang X Y, Maloney-Bertelli A, et al. High-speed adaptive optics line-scan OCT for cellular-resolution optoretinography[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(9): 5274-5296.
- [64] Pandiyan V P, Maloney-Bertelli A, Kuchenbecker J A, et al. The optoretinogram reveals the primary steps of phototransduction in the living human eye[J]. *Science Advances*, 2020, 6(37): eabc1124.
- [65] Boyle K C, Chen Z C, Ling T, et al. Mechanisms of light-induced deformations in photoreceptors[J]. *Biophysical Journal*, 2020, 119(8): 1481-1488.
- [66] Pandiyan V P, Nguyen P T, Pugh E N, Jr, et al. Human cone elongation responses can be explained by photoactivated cone opsin and membrane swelling and osmotic response to phosphate produced by RGS9-catalyzed GTPase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(39): e2202485119.
- [67] Li Y C, Fariss R N, Qian J W, et al. Light-induced thickening of photoreceptor outer segment layer detected by ultra-high resolution OCT imaging[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(9): OCT105-OCT111.
- [68] Li Y C, Zhang Y K, Chen S, et al. Light-dependent OCT structure changes in photoreceptor degenerative rd 10 mouse retina[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018, 59(2): 1084-1094.

- [69] Berkowitz B A, Podolsky R H, Qian H H, et al. Mitochondrial respiration in outer retina contributes to light-evoked increase in hydration *in vivo*[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018, 59(15): 5957-5964.
- [70] Gao S S, Li Y C, Bissig D, et al. Functional regulation of an outer retina hyporeflexive band on optical coherence tomography images [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 10260.
- [71] Berkowitz B A, Podolsky R H, Childers K L, et al. Functional changes within the rod inner segment ellipsoid in wildtype mice: an optical coherence tomography and electron microscopy study[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2022, 63(8): 8.
- [72] Berkowitz B A, Podolsky R H, Lins-Childers K M, et al. Outer retinal oxidative stress measured *in vivo* using QUEnch-assiSTed (QUEST) OCT[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2019, 60(5): 1566-1570.
- [73] Berkowitz B A, Podolsky R H, Childers K L, et al. Rod photoreceptor neuroprotection in dark-reared Pde6brd10 mice[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, 61(13): 14.
- [74] Messner A, Werkmeister R M, Seidel G, et al. Light-induced changes of the subretinal space of the temporal retina observed via optical coherence tomography[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 13632.
- [75] Tomczewski S, Węgrzyn P, Borycki D, et al. Light-adapted flicker optoretinograms captured with a spatio-temporal optical coherence-tomography (STOC-T) system[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2186-2201.
- [76] Sun P C, Li Q, Li H, et al. Depth-resolved physiological response of retina to transcorneal electrical stimulation measured with optical coherence tomography[J]. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 2019, 27(5): 905-915.
- [77] Su X F, Zheng H, Li Q, et al. Retinal neurovascular responses to transcorneal electrical stimulation measured with optical coherence tomography[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2020, 245(4): 289-300.
- [78] Deng X F, Liu K Y, Zhu T P, et al. Dynamic inverse SNR-decorrelation OCT angiography with GPU acceleration[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(6): 3615-3628.
- [79] 张子艺, 俞晨阳, 乔依琳, 等. 显微集成术中光学相干断层血流造影术[J]. *中国激光*, 2022, 49(15): 1507301.
Zhang Z Y, Yu C Y, Qiao Y L, et al. Intraoperative optical coherence tomography angiography with micro integration[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(15): 1507301.
- [80] Kim T H, Ma G Y, Son T, et al. Functional optical coherence tomography for intrinsic signal optoretinography: recent developments and deployment challenges[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 864824.
- [81] Kim T H, Wang B Q, Lu Y M, et al. Functional optical coherence tomography enables *in vivo* optoretinography of photoreceptor dysfunction due to retinal degeneration[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(9): 5306-5320.

High-Accuracy Quantitative Functional Imaging Technique for Retinal Opto-Physiology with Optical Coherence Tomography

Ma Yanhong, Zhang Pengfei*

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

Abstract

Significance Retinal opto-physiology is the physiological response of the retina to a visible light stimulus, reflecting the function of the retina to a certain extent. Optoretinography, also termed optoretinogram (ORG), is a newly developed functional imaging technique for precisely quantifying the opto-physiological response of the retina. It uses optical coherence tomography combined with controllable light stimulus, to accurately measure retinal morphology and optical property changes in response to a light stimulus by detecting the peak position and scattering intensity alternations in optical coherence tomography (OCT) images. Moreover, ORG can achieve microscale lateral resolution, nanoscale axial resolution, and millisecond temporal resolution by combining adaptive optics and phase analysis techniques, and be used to measure opto-physiological functions of the retina at the cellular level. To perform ORG, only an optical stimulus unit is required to be added to the existing OCT system. Currently, it is still in the stage of technology development and mechanism exploration. Once standards are established, ORG may be used in broad ophthalmic research and clinical practice. In this study, the history of OCT functional imaging development for probing the retinal opto-physiological signal is systematically reviewed, the latest progress in ORG technology is summarized, and several future directions of ORG technology are discussed.

Progress Because of the excellent spatial resolution of OCT and its extensive use in basic research, clinical diagnosis, and treatment, researchers have been committed to capturing the functional response of nerve cells to a visible light stimulus using OCT. Early studies of OCT photo-physiological functional imaging focused on finding the changes in retinal scattering signals after light stimulation. With the gradual improvement of OCT performance (such as resolution and imaging speed) and the wide application of *in vivo* imaging technology, a series of breakthroughs have been made in the field of OCT retinal functional imaging in recent years. The optical path difference changes of cone outer segment in living human retina after a light stimulus [Fig. 2(a)–(c)] were successfully measured using high-speed full-field OCT combined with phase analysis technology. Subsequently, Zhang et al. used OCT to observe the function signals of mouse retina in response to the light stimulation with different intensities. They reported the changes in the thickness of the rod outer segment at a micron level and changes in scattering signal intensities of several retinal layers [Fig. 2(d)–(h)]. Moreover, they confirmed that the response signals came from the visual photo-transduction process using gene knockout mice. Furthermore, due to the advantages of adaptive optics enhanced OCT (AO-OCT) in imaging resolution, researchers have

successfully measured the photo-physiological signal at the level of a single cone cell in the human eye. For example, Zhang et al. measured the functional response of human cone cells after light stimulation using AO-OCT in 2019 and successfully distinguished three types of cone cells in the human eyes via different cone cell responses to different color stimuli (Fig. 3). In the recent studies, several experimental groups have conducted the diseases or mechanism research on the retina from a physiological perspective. Qian et al. changed the mouse retina through transgenic or drug methods to carry out controlled experiments with conventional wild mice. They found that changes in the thickness of the mouse's external retina after light stimulation were affected by the base level of mitochondrial respiration and oxidative stress reaction. This suggests the favorable conditions for the clinical application of OCT-based photo-physiological functional imaging.

Conclusions and Prospects The method based on OCT retinal opto-physiological functional imaging and visible light stimulation is collectively called optoretinogram. ORG is a new technology in which the obtained opto-physiological signals can reflect the function of retinal tissue. This addresses the limitation of conventional OCT imaging technology which can only provide details of the retinal structure. Moreover, studies of human and animal retina indicate that retinal responses to light stimulation involve subtle changes in several structures including the rod, cone, retinal pigment epithelium, Bruch's membrane, and choroid. All are closely related to the structures affected by various retinal diseases. Thus, to some extent, early retinopathy may affect the intensity and change rate of retinal opto-physiological function signal. Therefore, this can provide a new diagnostic basis for detection of early disease by measuring the abnormal changes in the opto-physiological function signal.

Future developments of ORG may include the following four aspects: 1) realizing the local analytical capability of ORG while maintaining wide-field macroscopic imaging; 2) further enhancement of the sensitivity of OCT to enable detection of weaker functional signals; 3) extracting the functional signal quickly and automatically and exploring the characteristic functional signal of early retinopathy; and 4) optimization and standardization of experimental methods.

Key words medical optics; optoretinography; optical coherence tomography; visible light stimulus; retinal function