

基于 Grüneisen 弛豫非线性光声效应的单波长浓度解析方法

王夏天^{1,2}, 吕圣苗², 解志华², 陈敬钦², 龚小竞^{2**}, 董立泉^{1,3*}

¹北京理工大学光电学院精密光电测试仪器及技术北京市重点实验室, 北京 100081;

²中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究中心, 深圳市分子影像学重点实验室, 广东省生物医学光学影像技术重点实验室, 中国科学院健康信息学重点实验室, 广东 深圳 518055;

³北京理工大学长三角研究院(嘉兴), 浙江 嘉兴 314019

摘要 光声分子影像技术在生物医学中具有广泛的应用。实现分子探针浓度的准确解析,对于相关疾病的研究具有重要意义。然而,活体探测时,来源于生物组织的信号与探针的信号混叠,增加了准确解析的难度。当前改善的方法:或需要使用多波长进行探测,导致解析速度慢而且过程复杂;或使用单波长的方法,但需要依托于一类特殊探针的开关功能,导致普适性不足。鉴于此,提出了一种基于 Grüneisen 弛豫非线性光声效应的单波长浓度解析方法,并分别对色素染料与罗丹明 6G 探针两类样品开展了解析实验。结果表明,本文提出的方法获得的解析结果比线性单波长方法的解析结果误差更小,并且具有较好的普适性,为光声分子影像的浓度解析方法提供了新的思路。

关键词 生物技术; 光声效应; Grüneisen 弛豫; 浓度解析; 分子影像

中图分类号 Q631 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/AOS231317

1 引言

光声效应描述的是物体吸收光束能量后受热弹性形变产生超声波的现象,其在光学探测对比度以及声学探测深度方面都有优势,目前在生物医学领域具有广泛的应用^[1-8]。其中,以外源性分子探针为探测对象的光声分子影像技术展现出旺盛的需求,目前已应用于多种疾病的诊疗研究,如易损斑块^[9-10]、乳腺癌^[11-12]、类风湿性关节炎^[13-14]、肿瘤微环境^[15-17]等。

对于病灶区域聚集的靶向分子探针,其浓度与疾病的程度通常存在显著的关联性,因此,解析探针的浓度对于评估药物对疾病的治疗效果具有重要的应用价值^[18-20]。但是,在活体环境下,实现探针浓度的准确解析具有挑战性。活体探测时,在探测区域不仅有探针(目标)产生光声信号,同时生物组织的内源性成分(背景,通常为血液中的血红蛋白^[21])也在贡献光声信号。由于目标成分和背景成分已经混合,因此探测到的单一信号中,两种信息的成分已经混叠,无法确定目标和背景各自的贡献,进而影响探针浓度解析的准确性。

通常情况下,光声分子影像技术是基于线性光声

效应实施的。为了提高在复杂环境下的浓度解析准确性,前人提出了多种改进方法,主要包含基于多波长激发的光谱解混方法^[22-24]以及单波长下基于可开关探针的背景差分方法^[25-28]。然而,多波长的切换导致获取信号过程复杂且解析速度慢^[29]。背景差分方法虽然只需要单一波长进行成像,但必须依赖探针的开关功能,而多数探针不具备这种特殊的性质,导致该技术的普适性不佳^[30]。

发展一种基于单波长激发且不依赖于特殊响应探针的浓度解析方法,是推进光声分子影像技术发展的迫切需求。基于 Grüneisen 弛豫效应的非线性光声探测方法有望突破这一难题。样品在热弛豫时间内被两个激光脉冲依次激发时,会产生 Grüneisen 弛豫效应(GR)。该过程会产生两个光声信号,第一个信号的幅值与样品的吸收系数呈线性函数关系,第二个信号的幅值与样品的吸收系数呈二次非线性函数关系^[31-32]。目前,GR 非线性效应已在提高成像对比度^[33-36]、分辨率^[37-38],以及温度监测准确率^[39]等方面得到了应用。但据我们了解,在浓度解析方面的研究尚未有报道。理论上,当 GR 非线性效应将信号幅值与吸收系数的

收稿日期: 2023-07-27; 修回日期: 2023-08-24; 录用日期: 2023-08-30; 网络首发日期: 2023-09-22

基金项目: 国家自然科学基金(61975226, 61705250, 82027803)、中国科学院健康信息学重点实验室(2011DP173015)、广东省自然科学基金(2021A1515011949)、广东省生物医学光学成像技术重点实验室(2021A1515011949)、深圳市科技创新委员会(JCYJ20220818101417039, ZDSY20130401165820357)

通信作者: *kylind@bit.edu.cn; **xj.gong@siat.ac.cn

对应关系由线性函数转变为非线性函数后,伴随幂次的提升,目标成分的信号幅值与背景的比值随之升高(等价于降低了背景成分对总体成分的贡献),这为单波长浓度解析提供了一种新颖的实现方式。

基于此,本文提出了一种基于 GR 非线性光声效应的浓度解析方法,设计并开展了验证性实验。首先开展的是基于红色与蓝色染料混合物的解析实验,使用仿体样品对该方法的原理进行验证。随后,选择罗丹明 6G 作为目标成分,血红蛋白作为背景成分进行解析,以模拟光声分子成像实验中,探针受到内源性成分干扰的场景,在贴近实际应用的浓度解析场景下,对该方法的可行性开展验证。本文提出的非线性方法能够有效降低背景成分对于浓度解析引起的干扰,并且计算过程简单,实验系统架构简单,具备在体测量的潜在应用价值。

2 基本原理

2.1 线性与 GR 非线性光声效应

单一成分的样品在首次吸收激光脉冲的能量后,产生线性光声效应,对应的初始声压 p_L ^[40]可表示为

$$p_L = \Gamma c \epsilon \eta F, \quad (1)$$

式中: Γ 是样品的 Grüneisen 系数; c 是样品的浓度; ϵ 是样品在单位浓度下的吸收系数; η 是样品的热转换效率; F 是激发光束的能量密度。

在亚微秒的热弛豫时间之内,样品再次吸收光脉冲能量,产生 GR 非线性光声效应,对应的信号由一个线性分量和一个非线性分量构成,对应的初始声压 p_H ^[31]为

$$p_H = p_L + p_N = \Gamma c \epsilon \eta F + b c^2 \epsilon^2 \eta^2 F^2, \quad (2)$$

式中: b 是非线性分量 p_N 的系数,和 Grüneisen 系数对温度的变化率有关。

本文提出的方法依托于式(2)中的非线性分量开展浓度解析,其数值通过式(2)与式(1)相减获得:

$$p_N = p_H - p_L = b c^2 \epsilon^2 \eta^2 F^2. \quad (3)$$

2.2 基于线性与 GR 非线性效应的浓度解析方法

待测浓度样品与基准浓度样品的线性声压,以及对应的解析方法可表示为

$$\begin{cases} p_{Lm} = \Gamma c_m \epsilon_m \eta F \\ p_{L0} = \Gamma c_0 \epsilon_m \eta F \end{cases}, \quad (4)$$

其中

$$c_m = \frac{p_{Lm}}{p_{L0}} c_0, \quad (5)$$

式中: ϵ_m 是待测样品在单位浓度下的吸收系数; p_{Lm} 是浓度为 c_m 的待测样品对应的线性声压; p_{L0} 是基准浓度为 c_0 的样品对应的线性声压。

待测浓度样品与基准浓度样品的非线性声压,以及对应的解析方法可表示为

$$\begin{cases} p_{Nm} = b c_m^2 \epsilon_m^2 \eta^2 F^2 \\ p_{N0} = b c_0^2 \epsilon_m^2 \eta^2 F^2 \end{cases}, \quad (6)$$

其中

$$c_m = \sqrt{\frac{p_{Nm}}{p_{N0}}} c_0, \quad (7)$$

式中: p_{Nm} 是浓度为 c_m 的待测样品对应的非线性声压; p_{N0} 是基准浓度为 c_0 的样品对应的非线性声压。

2.3 浓度解析误差分析

当存在背景成分时,线性声压 p'_{Lm} 的表达式及其解析结果为

$$p'_{Lm} = p_{Lm} + p_{Lb} = \Gamma c_m \epsilon_m \eta F + \Gamma c_b \epsilon_b \eta F, \quad (8)$$

$$c_{Lm} = \frac{p'_{Lm}}{p_{L0}} c_0 = \left(1 + \frac{c_b \epsilon_b}{c_m \epsilon_m} \right) c_m, \quad (9)$$

式中: c_b 和 ϵ_b 分别是背景成分的浓度和单位浓度下的吸收系数; p_{Lb} 为背景成分的线性光声信号。

非线性声压表达式及其解析结果为

$$p'_{Nm} = p_{Nm} + p_{Nb} = b c_m^2 \epsilon_m^2 \eta^2 F^2 + b c_b^2 \epsilon_b^2 \eta^2 F^2, \quad (10)$$

$$c_{Nm} = \sqrt{\frac{p'_{Nm}}{p_{N0}}} c_0 = \sqrt{1 + \frac{c_b^2 \epsilon_b^2}{c_m^2 \epsilon_m^2}} c_m, \quad (11)$$

式中: p_{Nb} 为背景成分的非线性光声信号。由式(9)和(11)可知,两种方法获得的解析结果为真实浓度 c_m 与各自误差系数的乘积。式(9)和(11)对应的误差系数可以由图 1(a)中的三角形表示。该三角形的两条直角边长度分别是 1 和 $c_b \epsilon_b / c_m \epsilon_m$,其和为线性解析方法对应的误差系数;根据勾股定理,该直角三角形的斜边长度为先对两条直角边进行平方和运算再进行平方根运算的结果,该结果正是非线性解析方法的误差系数。因为三角形的两边之和大于第三边,所以线性方法的误差系数永远大于非线性方法的误差系数。非线性方法的解析结果理论上比线性方法更接近于真实值。

随后,通过数值仿真计算进一步分析并比较线性与非线性方法的解析误差。首先,通过设置样品和背景成分的浓度与吸收系数,获得不同的线性信背比 R_{SB} ($R_{SB} = p_{Lm} / p_{Lb}$,表示目标和背景各自光声信号贡献的比值,等价于 $c_m \epsilon_m / c_b \epsilon_b$)。根据预设浓度 c_m ,由式(9)和(11)获得浓度值 c_{Lm} 和 c_{Nm} 。仿真计算结果如表 1 所示,对应的浓度解析结果的相对误差如图 1(b)所示。从图中可以得知,本文提出的方法能够显著减小解析误

表 1 浓度解析仿真结果

Table 1 Simulation results of concentration quantification

R_{SB}	$c_m /$ (mg·mL ⁻¹)	$c_{Lm} /$ (mg·mL ⁻¹)	$c_{Nm} /$ (mg·mL ⁻¹)
1.00	1.00	2.00	1.41
2.00	2.00	3.00	2.24
3.00	3.00	4.00	3.16
4.00	4.00	5.00	4.12
5.00	5.00	6.00	5.10

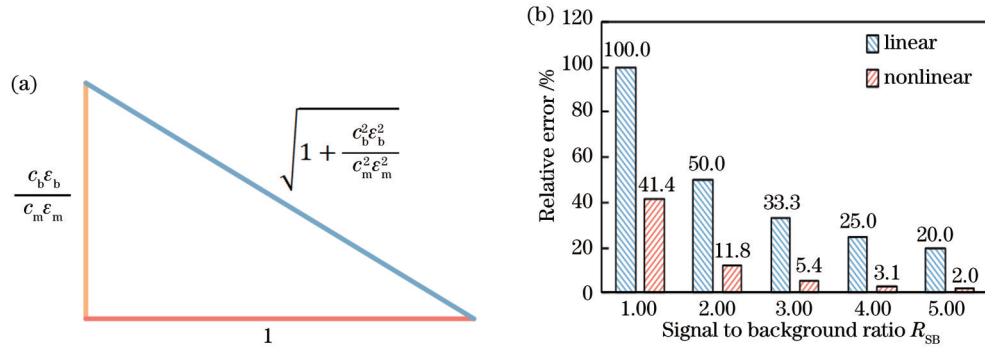


图 1 浓度解析结果的误差。(a)表示线性与非线性方法误差系数的三角形;(b)两种方法的浓度解析误差

Fig. 1 Error of concentration quantification results. (a) Triangle of error coefficients for linear and nonlinear methods; (b) concentration quantification error of two methods

差,即使在信背比 $R_{SB}=1$ 的极端条件下,非线性方法的相对误差比线性方法小 60%, 仍然存在明显的差异。

3 实验系统

实验系统的架构如图 2 所示。工作波长为 532 nm 的脉冲激光器输出的光束经过中性密度滤光片 (NDF, NDC-50C-4M, Thorlabs) 的衰减,入射至透镜 1 (LA1134-A, Thorlabs, 焦距 60 mm) 并聚焦,耦合进入 1×2 光纤分束器 (TM105FL1B, Thorlabs, 分束比 50:50) 的入射端口。分束器将入射光束分为两束,其中一束经过衰减器 (VOAMMF, Thorlabs) 之后入射至 2×2 光纤合束器 (TM105R5F2B, Thorlabs, 分束比

50:50),另一束经过光纤延时线(纤芯直径 $105 \mu\text{m}$, 数值孔径 0.22, 延时 268 ns) 入射到合束器。合束器的其中一个出射端口与光电二极管 (PD, DET10A, Thorlabs) 连接,用以监测激光脉冲的能量波动;另一个出射端口出射的光束经过透镜 2 (LA1576-A, Thorlabs, 焦距 12 mm) 准直,然后由显微物镜 (PLN10X, 焦距 20 mm) 聚焦于样品(密封在 PEBAX 材质的透明管中),激发的光声信号由换能器 (V376, Olympus, 中心频率 30 MHz) 接收,并由收发仪 (5073PR, Olympus) 进行放大。光声信号与激光脉冲信号输入到数据采集卡 (ATS9371, AlazarTech, 采样率 1 GSa/s)。系统工作时,样品和换能器共同浸没在自制的水槽中。

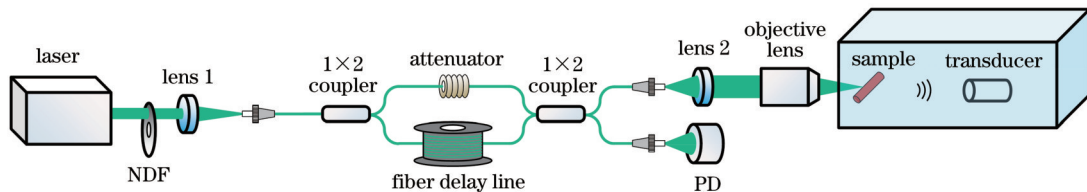


图 2 实验系统架构示意图

Fig. 2 Schematic of experiment system

4 样品制备

实验使用三种基于色素染料的样品:红色染料(原料:PCB pigment,颜色:紫红)、蓝色染料(原料:PCB pigment,颜色:宝蓝)、两种染料不同比例的混合物。其中:红色染料作为已知成分,质量浓度设置为 2、4、6、8、10 mg/mL;蓝色染料作为背景成分,质量浓度设置为 6 mg/mL。样品制备过程如下:1)称量 20、40、60、80、100 mg 的红色染料粉末,分别放入 5 个离心管;2)称量 60 mg 蓝色染料粉末,放入一个离心管;3)执行步骤 1),并在每个离心管中分别加入 60 mg 蓝色染料粉末;4)使用移液器在每个离心管中加入 10 mL 蒸馏水,并在漩涡振荡器中混匀 1 min;5)对上述 11 个离心管中的溶液取样,每种溶液分别装入一个 PEBAX

透明管,对两端进行密封。

基于分子探针样品的实验,使用的样品包含:罗丹明 6G (Rhodamine 6G)、血红蛋白 (Hemoglobin)、上述两种成分不同比例的混合物。其中:罗丹明 6G 作为已知成分,用于模拟靶向附集在病灶区域的探针,质量浓度设置为 1、2、4、6、8 mg/mL;血红蛋白用于模拟探针区域血液背景成分,参考人体血液中的血红蛋白含量,将其质量浓度设置为 150 mg/mL^[41]。样品制备过程与染料实验相同。

5 实验结果

5.1 基于染料仿体样品的浓度解析实验

首先,采集了单纯红色染料与蓝色染料溶液的光声信号,每个数据均为 25 个原始数据的平均值。为了

便于分析,本文提取每组线性信号的最大值,将其他信号相对该最大值进行归一化处理,非线性信号采用相同的处理方式,结果如表2所示。通过归一化运算,以约去式(1)和(3)中的信号*p*和浓度*c*以外的其他物理量,建立信号幅值-质量浓度的单一对应关系。表2中信背比 $R_{SB,red}$ 是将红色染料的线性信号幅值除以蓝色染料的线性信号幅值获得的。

对应的拟合结果如图3所示,从图中可知:样品浓度和线性信号幅值符合线性理论模型[式(1)展现的一次函数关系,拟合系数 $R^2=0.99$,均方根误差RMSE为0.02];样品浓度和非线性信号幅值符合非线性理论模型[式(3)展现的二次函数关系, $R^2=0.99$,RMSE为0.04]。并且,因为当信号值为1时对应的质量浓度为10 mg/mL,所以对于信号幅值与浓度的函数关系,理论上,线性和非线性信号分别对应 $y=0.1x$

表2 红色染料溶液与蓝色染料溶液的信号幅值
Table 2 Signal amplitudes of red dye solution and blue dye solution

Sample	Concentration / (mg·mL ⁻¹)	Normalized amplitude of signal		$R_{SB,red}$
		Linear	Nonlinear	
Red dye	2	0.20	0.02	1.11
	4	0.42	0.20	2.33
	6	0.64	0.42	3.56
	8	0.83	0.69	4.61
	10	1.00	1.00	5.56
Blue dye	6	0.18	0.04	—

和 $y=0.01x^2$ 。由实验结果可知,线性与非线性信号对应的拟合函数分别为 $y=0.1024x$ 和 $y=0.0104x^2$,拟合获得的多项式系数接近理论值。

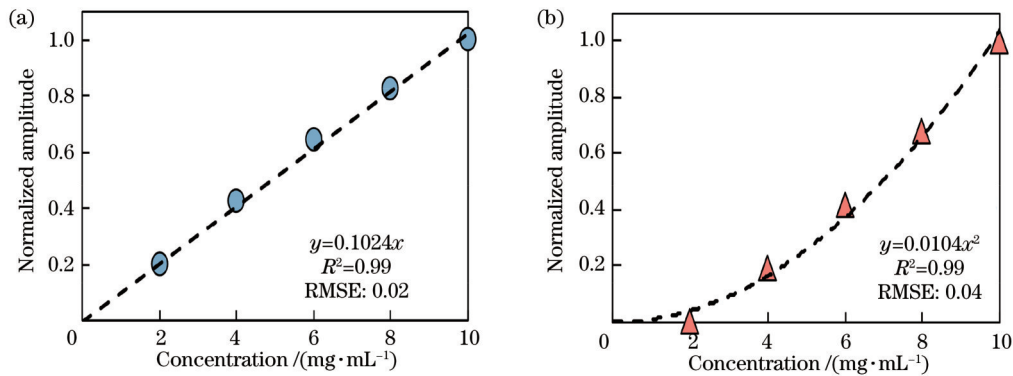


图3 红色染料的质量浓度-信号幅值散点图。(a)线性信号;(b)非线性信号

Fig. 3 Scatter diagrams of mass concentration-amplitude of red dye. (a) Linear signals; (b) nonlinear signals

随后,采集了两种染料混合溶液的光声信号,并根据式(5)与(7)进行浓度解析,结果如图4(a)所示。从图4(a)中可以得知,非线性方法的解析结果更接近于红色染料的真实浓度。两种方法解析结果的相对误差如图4(b)所示,从该实验结果可以看出,伴随信背比

的增大,两种方法的浓度解析误差都呈下降趋势,而非线性方法的相对误差明显小于线性方法。所有结果与前文中的理论分析以及图1(b)展示的趋势具有很好的一致性。

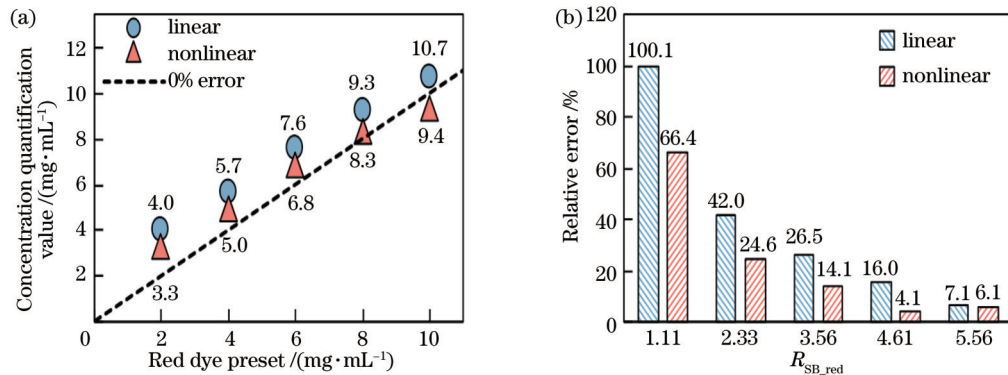


图4 红色染料的实验结果。(a)浓度解析结果;(b)相对误差(绝对值)

Fig. 4 Experimental results of red dye. (a) Results of concentration quantification; (b) relative error (absolute value)

5.2 基于分子探针的浓度解析实验

为了验证本方法在实际应用场景中的可行性,开

展了分子探针在血液中的浓度解析实验。首先,采集了单纯罗丹明6G溶液以及血红蛋白溶液的光声信号,

每个结果同样是 25 个原始数据的平均值, 并进行最大值归一化, 结果如表 3 所示。表 3 中信背比 $R_{SB, Rh6G}$ 是将罗丹明 6G 的线性信号幅值除以血红蛋白的线性信号幅值获得的。对应的拟合结果如图 5 所示。根据图 5, 样品浓度和线性、非线性信号幅值同样符合式(1)和(3)展现的一次与二次函数关系(对于线性信号, $R^2=0.99$, RMSE 为 0.02; 对于非线性信号, $R^2=0.98$,

RMSE 为 0.06)。并且, 根据 5.1 节的内容: 当信号值为 1 时对应的质量浓度为 8 mg/mL, 对于信号幅值与浓度的函数关系, 线性和非线性信号理论上分别对应 $y=0.125x$ 和 $y=0.0156x^2$ 。由实验结果可知, 线性与非线性效应的拟合模型分别为 $y=0.1245x$ 和 $y=0.0163x^2$, 拟合获得的多项式系数接近理论值。

表 3 罗丹明 6G 溶液与血红蛋白溶液的信号幅值

Table 3 Signal amplitudes of Rhodamine 6G solution and hemoglobin solution

Sample	Concentration / (mg·mL ⁻¹)	Normalized amplitude of signal		$R_{SB, Rh6G}$
		Linear	Nonlinear	
Rhodamine 6G	1	0.15	0.02	1.00
	2	0.23	0.13	1.53
	4	0.48	0.35	3.20
	6	0.76	0.62	5.07
	8	1.00	1.00	6.67
Hemoglobin	150	0.15	0.02	—

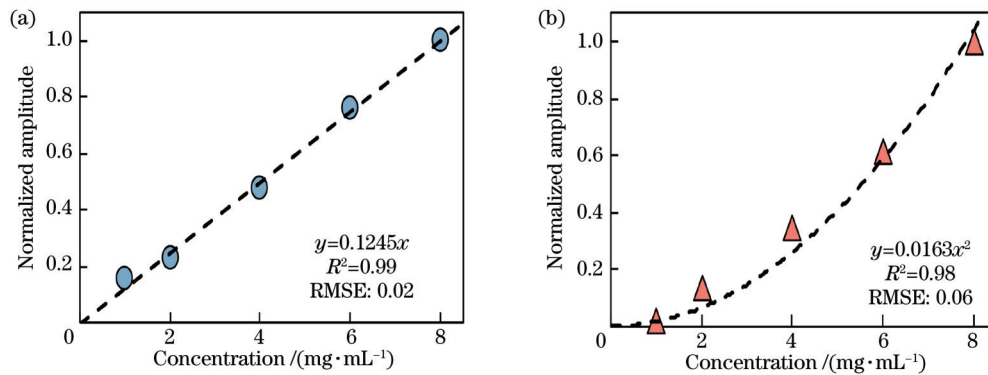


图 5 罗丹明 6G 的质量浓度-信号幅值散点图。(a)线性信号; (b)非线性信号

Fig. 5 Scatter diagrams of mass concentration-signal amplitude of Rhodamine 6G. (a) Linear signal; (b) nonlinear signal

随后, 采集罗丹明 6G 和血红蛋白混合溶液的光声信号, 并根据式(5)与(7)进行浓度解析, 结果如图 6 (a)所示。从图 6(a)中可以得知, 在罗丹明 6G 受到血红蛋白干扰的情形下, 非线性方法的解析结果更接近于罗丹明 6G 的真实浓度。两种方法的解析结果的相

对误差如图 6(b)所示, 从图 6(b)中可以得知, 和染料仿体样品的实验结果类似, 线性方法和非线性方法的解析误差均伴随信背比的增大而显著减小, 并且后者始终小于前者, 这与前文展示的理论分析结果具有较好的一致性。

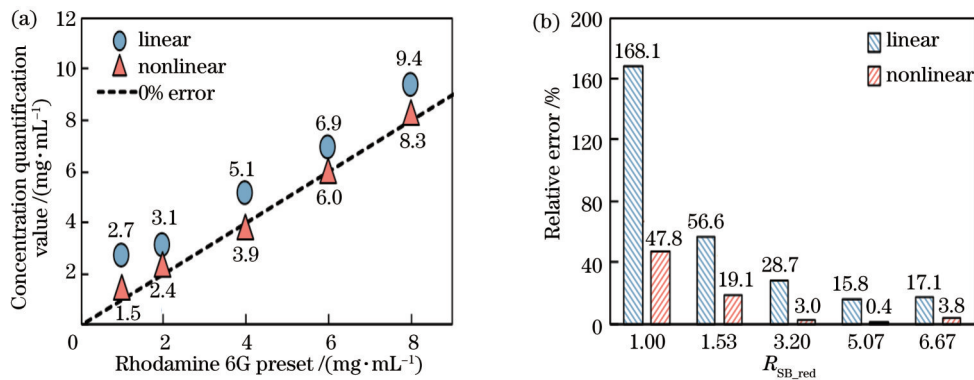


图 6 罗丹明 6G 的实验结果。(a)浓度解析结果; (b)相对误差(绝对值)

Fig. 6 Experimental results of Rhodamine 6G. (a) Results of concentration quantification; (b) relative error (absolute value)

6 分析与讨论

定量解析分子探针在病灶区域的浓度分布,对于实现病症的精准研究具有重要的价值。然而,生物组织中复杂的成分会对浓度解析结果造成干扰,基于线性光声效应进行浓度反演时,如果波长数为 1 或者少于总的成分数,感兴趣成分和背景成分的贡献无法分开计算,因此浓度反演的结果必然包含背景成分带来的误差。为了提升复杂成分下解析结果的准确性,前人提出了多种改进方法。其中,基于多波长激发的方法依赖于波长可调谐光源或者多个光源,且需要针对不同波长散射效应的差异实施补偿,方案的成本和复杂度高;基于单波长激发开关探针的方法依赖于探针的特殊响应,普适性不足,在应用过程中存在挑战。基于上述现状,本文提出基于单波长 GR 非线性光声信号幅值与样品吸收系数的关系反演浓度,并探索了该效应在浓度解析中的优势。

本文提出的基于 Grüneisen 弛豫非线性光声效应的浓度解析方法,虽然依然是在单波长下进行浓度解析,但是其理论计算结果表明,该方法相对线性方法能够更有效地抑制背景成分对解析结果引入的误差。考虑到不同成分的单位浓度吸收系数(ϵ_m 和 ϵ_b)不一样,浓度(c_m 和 c_b)关系不直接反映光声信号(p_{Lm} 和 p_{Lb} ,以及 p_{Nm} 和 p_{Nb})的关系,也就不能反映浓度解析时背景成分对感兴趣成分的影响。因此,本文用信背比来表示感兴趣成分和背景成分的相对信号贡献,并分析了不同信背比下,非线性方法与线性方法的浓度解析结果。与线性方法相比,非线性方法不仅在信背比 R_{sb} 相对较高的情况下具有较好的表现,而且在信背比较低($R_{sb}=1$)的极端情况下,依然能够使浓度解析误差得到显著减小,因此该方法在较宽的信背比分布范围内均具有良好的适用性。随后分别开展的染料仿体和分子探针实验,其解析结果与理论计算的预期结果具有较好的一致性,这表明该浓度解析方法稳定可靠,并验证了该方法的优势以及在不同场景下的适用性。

本文提出的非线性方法能够实现绝对浓度解析结果准确性的提升,适用于测量探针或药物在体内的代谢率^[42-44]等相对浓度变化的场合。在相对浓度测量的应用场景下,虽然式(9)和(11)发生了变化,不再包含和基准浓度样品有关的常数 c_0/p_{L0} 和 c_0^2/p_{N0} ,但是其误差系数仍然符合图 1(a)所示的三角形对应关系,因此非线性方法的优势依然存在。为此,本方法对于提升相对浓度解析结果的准确性、推动药代动力学的相关研究同样具有潜在的应用价值。

虽然通过联立式(8)和(10),可以直接计算出目标成分浓度的理论精确解 c_m ,但是该方法仅适用于含有一种干扰成分的情形。对于复杂成分构成的生物组织,造成干扰的成分通常不止一种,因此无法通过联立

方程的方式实现浓度解析。与之相对的,对于本文提出的方法,背景成分数目上升为 n 虽然会使图 1(a)中的三角形对应的空间维度随之上升到 $n-1$,但是斜边长度小于两条直角边的长度之和的结论依然成立。因此,本文提出的方法在理论上不会受到背景成分数目的限制,具有更广阔的适用范围。

普适性是方法获得广泛应用的关键条件。与基于可开关探针的背景差分方法相比,得益于 GR 效应的产生不依赖于样品,本文提出的方法具有较为广泛的普适性。在样品因吸收第一个脉冲光束能量引起的温升尚未消散的时间段内,吸收第二个脉冲光束能量就能够产生 GR 非线性效应,因此该效应的产生理论上不会受到探针类型的限制。基于此,本文提出的方法有望用于已在临床使用的多种探针或者药物,如吲哚菁绿(ICG)、亚甲基蓝等^[45-48],对于降低血液成分产生的干扰,实现卵巢、乳腺、肠道等疾病的精准研究具有重要的应用价值。

虽然本文提出的浓度解析方法的可行性与普适性获得了显著提升,但仍然存在一部分工作有待在后续阶段完成。第一,该方法实现浓度的解析依托于基准浓度与其非线性信号幅值的对应关系,该对应关系通常是在体外环境下通过标定获得,在体内应用的过程中,体内和体外的环境存在差异,导致基准质量浓度-信号幅值的对应关系发生变化,进而影响解析结果的准确性。为此,在后续的工作中将会研究相应的补偿方法,以提升其适用性。第二,对于体内的应用,光束在穿透生物组织的过程中会出现明显的散射,从而使信号激发区域的能量密度下降,最终信噪比的降低导致单次测量结果出现更大的波动。为此,后续将对数据平均次数以及激发能量进行优化调节,实现信噪比、探测速度和安全性三者关系的平衡。并且,将罗丹明 6G 荧光分子探针更换为吸收系数更大、光-声转化效率更高的光声分子探针,同样有助于实现信噪比的提升。第三,GR 非线性效应产生于线性效应之后,因此线性信号和非线性信号总是成对出现,在每次测量过程中,总能够采用线性和非线性解析方法获得两个浓度值。表 1 的仿真结果表明,信背比和两个浓度值存在某种关联,因此在后续的工作中计划对上述关联性开展深入探索,以实现信背比的半定量计算,进一步提升浓度解析结果的准确性。

7 结 论

提出了一种基于 GR 非线性效应的浓度解析方法,该方法不仅可以降低背景成分引起的干扰,使之相比线性单波长方法的解析结果更接近于浓度真实值,而且非线性效应的产生不依赖于样品,因此该方法具有较好的普适性。本文为光声分子影像技术的探针浓度解析提供了一种新颖的实施方式。

参 考 文 献

- [1] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458-1462.
- [2] Steinberg I, Huland D M, Vermesh O, et al. Photoacoustic clinical imaging[J]. *Photoacoustics*, 2019, 14: 77-98.
- [3] Lin L, Wang L V. The emerging role of photoacoustic imaging in clinical oncology[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022, 19(6): 365-384.
- [4] 秦泽政, 孙明健, 马一鸣, 等. 基于三维光声层析系统的信号智能去噪算法[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(8): 0811006. Qin Z Z, Sun M J, Ma Y M, et al. Intelligent denoising algorithm for signals based on three-dimensional photoacoustic tomography system[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(8): 0811006.
- [5] 沈康, 刘松德, 施钧辉, 等. 基于双域神经网络的稀疏视角光声图像重建[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507208. Shen K, Liu S D, Shi J H, et al. Dual-domain neural network for sparse-view photoacoustic image reconstruction[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507208.
- [6] 曾思略, 刘良检, 陈涛, 等. 声学分辨的双侧激发光声显微成像技术[J]. *中国激光*, 2022, 49(15): 1507201. Zeng S L, Liu L J, Chen T, et al. Acoustically resolved bilateral excitation photoacoustic microscopy imaging technology [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(15): 1507201.
- [7] 雷天成, 高蓉康, 刘成波. 合成孔径技术在光声成像中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617007. Lei T C, Gao R K, Liu C B. Application of synthetic aperture technology in photoacoustic imaging[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617007.
- [8] 万余洋, 雷鹏, 熊科迪, 等. 血管内光声-超声-光学相干层析-光声弹性多模态成像方法及系统[J]. *中国激光*, 2023, 50(3): 0307107. Wan Y Y, Lei P, Xiong K D, et al. Intravascular photoacoustic, ultrasonic, optical coherence tomography, and photoacoustic elastic multimodal imaging method and system[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2023, 50(3): 0307107.
- [9] Ge X X, Cui H T, Kong J, et al. A non-invasive nanoprobe for *in vivo* photoacoustic imaging of vulnerable atherosclerotic plaque[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(38): 2000037.
- [10] Ma Y, Xu L, Yin B L, et al. Ratiometric semiconducting polymer nanoparticle for reliable photoacoustic imaging of pneumonia-induced vulnerable atherosclerotic plaque *in vivo*[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(10): 4484-4493.
- [11] Pan D, Cai X, Yalaz C, et al. Photoacoustic sentinel lymph node imaging with self-assembled copper neodecanoate nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(2): 1260-1267.
- [12] Dai Y F, Yu X, Wei J S, et al. Metastatic status of sentinel lymph nodes in breast cancer determined with photoacoustic microscopy via dual-targeting nanoparticles[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 164.
- [13] Chen J Q, Qi J, Chen C, et al. Tocilizumab-conjugated polymer nanoparticles for NIR-II photoacoustic-imaging-guided therapy of rheumatoid arthritis[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(37): 2003399.
- [14] Chen J H, Zeng S L, Xue Q, et al. Photoacoustic image-guided biomimetic nanoparticles targeting rheumatoid arthritis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(43): e2213373119.
- [15] Liu Y B, Xu M Z, Dai Y L, et al. NIR-II dual-modal optical coherence tomography and photoacoustic imaging-guided dose-control cancer chemotherapy[J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2020, 2(5): 1964-1973.
- [16] Gong F, Yang N L, Wang Y, et al. Oxygen-deficient bimetallic oxide FeWOX nanosheets as peroxidase-like nanozyme for sensing cancer via photoacoustic imaging[J]. *Small*, 2020, 16(46): 2003496.
- [17] Wang S L, Zhang L L, Zhao J J, et al. A tumor microenvironment-induced absorption red-shifted polymer nanoparticle for simultaneously activated photoacoustic imaging and photothermal therapy[J]. *Science Advances*, 2021, 7(12): eabe3588.
- [18] Song J, Kim J, Hwang S, et al. "Smart" gold nanoparticles for photoacoustic imaging: an imaging contrast agent responsive to the cancer microenvironment and signal amplification via pH-induced aggregation[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(53): 8287-8290.
- [19] Lu X M, Zhao M, Chen P F, et al. Enhancing hydrophilicity of photoacoustic probes for effective ratiometric imaging of hydrogen peroxide[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(27): 4531-4538.
- [20] Ma G C, Gao X T, Jiang C, et al. pH-responsive nanoprobe for *in vivo* photoacoustic imaging of gastric acid[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(21): 13570-13575.
- [21] Choi W, Park B, Choi S, et al. Recent advances in contrast-enhanced photoacoustic imaging: overcoming the physical and practical challenges[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(11): 7379-7419.
- [22] Taruttis A, Ntziachristos V. Advances in real-time multispectral photoacoustic imaging and its applications[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(4): 219-227.
- [23] Roberts S, Seeger M, Jiang Y Y, et al. Calcium sensor for photoacoustic imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(8): 2718-2721.
- [24] Peters L, Weidenfeld I, Klemm U, et al. Phototrophic purple bacteria as photoacoustic *in vivo* reporters of macrophage activity [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1191.
- [25] Yao J J, Kaberniuk A A, Li L, et al. Multiscale photoacoustic tomography using reversibly switchable bacterial phytochrome as a near-infrared photochromic probe[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(1): 67-73.
- [26] Li L, Shemetov A A, Balaban M, et al. Small near-infrared photochromic protein for photoacoustic multi-contrast imaging and detection of protein interactions *in vivo*[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2734.
- [27] Mishra K, Stankevych M, Fuenzalida-Werner J P, et al. Multiplexed whole-animal imaging with reversibly switchable photoacoustic proteins[J]. *Science Advances*, 2020, 6(24): eaaz6293.
- [28] Ma C S, Kuang X, Chen M M, et al. Multiscale photoacoustic tomography using reversibly switchable thermochromics[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2023, 28(8): 082804.
- [29] Gao R K, Liu F, Liu W F, et al. Background-suppressed tumor-targeted photoacoustic imaging using bacterial carriers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(8): e2121982119.
- [30] Yao J J, Wang L V. Recent progress in photoacoustic molecular imaging[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 45: 104-112.
- [31] Wang L D, Zhang C, Wang L V. Grueneisen relaxation photoacoustic microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(17): 174301.
- [32] Tian C, Xie Z X, Fabiilli M L, et al. Dual-pulse nonlinear photoacoustic technique: a practical investigation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(8): 2923-2933.
- [33] Tian C, Xie Z X, Fabiilli M L, et al. Imaging and sensing based on dual-pulse nonlinear photoacoustic contrast: a preliminary study on fatty liver[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(10): 2253-2256.
- [34] Shi J H, 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(9): 609-615.

- [35] Lan H R, Duan T Y, Jiang D H, et al. Dual-contrast nonlinear photoacoustic sensing and imaging based on single high-repetition-rate pulsed laser[J]. *IEEE Sensors Journal*, 2019, 19(14): 5559-5565.
- [36] Shi J W, Li C, Mao H D, et al. Grüneisen-relaxation photoacoustic microscopy at 1.7 μm and its application in lipid imaging[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(12): 3268-3271.
- [37] Lai P X, Wang L D, Tay J W, et al. Photoacoustically guided wavefront shaping for enhanced optical focusing in scattering media[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(2): 126-132.
- [38] Liu X W, Wong T T W, Shi J H, et al. Label-free cell nuclear imaging by Grüneisen relaxation photoacoustic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(4): 947-950.
- [39] Zhou Y, Li M C, Liu W, et al. Thermal memory based photoacoustic imaging of temperature[J]. *Optica*, 2019, 6(2): 198-205.
- [40] Wang L V, Wu H I. *Biomedical optics: principles and imaging* [M]. Hoboken: Wiley-Interscience, 2007.
- [41] Robles F E, Chowdhury S, Wax A. Assessing hemoglobin concentration using spectroscopic optical coherence tomography for feasibility of tissue diagnostics[J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(1): 310-317.
- [42] Zhang H, Zeng S L, Wu Y Z, et al. Handheld photoacoustic imaging of indocyanine green clearance for real-time quantitative evaluation of liver reserve function[J]. *Biomedical Optics Express*, 2023, 14(7): 3610-3621.
- [43] Khadria A, Paavola C D, Maslov K, et al. Photoacoustic imaging reveals mechanisms of rapid-acting insulin formulations dynamics at the injection site[J]. *Molecular Metabolism*, 2022, 62: 101522.
- [44] Hwang Y, Yoon H, Choe K, et al. *In vivo* cellular-level real-time pharmacokinetic imaging of free-form and liposomal indocyanine green in liver[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(10): 4706.
- [45] Wood C A, Han S, Kim C S, et al. Clinically translatable quantitative molecular photoacoustic imaging with liposome-encapsulated ICG J-aggregates[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5410.
- [46] Yang Y, Huang J S, Wei W, et al. Switching the NIR upconversion of nanoparticles for the orthogonal activation of photoacoustic imaging and phototherapy[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3149.
- [47] Jeevarathinam A S, Lemaster J E, Chen F, et al. Photoacoustic imaging quantifies drug release from nanocarriers via redox chemistry of dye-labeled cargo[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(12): 4678-4683.
- [48] Xu X M, Wu H Y, Yang Y, et al. PLGA-coated methylene blue nanoparticles for photoacoustic imaging and photodynamic/photothermal cascaded precisely synergistic therapy of tumor[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(3): 1543-1549.

Concentration Quantification Method Based on Single-Wavelength Excitation via Grüneisen-Relaxation Nonlinear Photoacoustic Effect

Wang Xiatian^{1,2}, Lü Shengmiao², Xie Zhihua², Chen Jingqin², Gong Xiaojing^{2**}, Dong Liquan^{1,3*}

¹*Beijing Key Laboratory for Precision Optoelectronic Measurement Instrument and Technology, School of Optics and Photonics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;*

²*Research Center for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Key Laboratory for Molecular Imaging, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biomedical Optical Imaging Technology, CAS Key Laboratory of Health Informatics, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China;*

³*Yangtze Delta Region Academy of Beijing Institute of Technology (Jiaxing), Jiaxing 314019, Zhejiang, China*

Abstract

Objective Photoacoustic molecular imaging has been extensively applied to biomedical research. The accurate quantification of molecular probe concentrations has paramount importance in relevant disease investigation. Nevertheless, during *in-vivo* detection, the signals emitted by exogenous probes are often mixed with those originating from endogenous biological tissues, thereby diminishing the quantification accuracy of probe concentrations. Traditional photoacoustic molecular imaging relies on the linear photoacoustic effect, and some methods have been proposed to enhance the concentration quantification accuracy under complex environments. One approach is based on multi-wavelength detection, but multi-wavelength switching complicates the signal acquisition process and reduces the quantification speed. Another approach is proposed according to single-wavelength background subtraction, while it lacks universality due to reliance on employing molecular probes with switchable responses. Consequently, it becomes an urgent need to develop a concentration quantification method predicated on single-wavelength excitation that does not depend on specific probe responses to advance photoacoustic molecular imaging. The Grüneisen-relaxation nonlinear photoacoustic effect exhibits promising potential to meet this need. Unlike the linear relationship between signal amplitude and absorption coefficient in the linear photoacoustic effect, the Grüneisen-relaxation (GR) photoacoustic effect shows a quadratic nonlinearity between the two physical parameters. Based on this, we propose a method for quantifying concentrations using the Grüneisen-

relaxation nonlinear photoacoustic effect by single-wavelength excitation. This approach adopts the nonlinear relationship between the two physical parameters to improve the ratio between the target and background signals, effectively diminishing the background interference. Consequently, we present a novel and promising solution for improving the concentration quantification accuracy.

Methods To demonstrate the advantages of our method, we conduct theoretical numerical simulations followed by experimental validations to assess its feasibility. For the first experiment, we first construct a Grüneisen-relaxation nonlinear system. Subsequently, we perform an experiment using phantom samples comprising red dye (representing the target component) and blue dye (representing the background component). This initial experiment serves as a preliminary validation of the principle feasibility of our method. Then, we validate the feasibility of the method in a simulated scenario that is close to *in-vivo* photoacoustic molecular imaging. In the second experiment, we utilize a sample consisting of the molecular probe Rhodamine 6G (representing the target component) and hemoglobin (representing the background component) to simulate the scenario in which the probe encounters interference from endogenous components.

Results and Discussions The numerical simulation results from concentration quantification in different signal-to-background ratios (R_{SB}) are shown in (Table 1). The error coefficients of the linear and GR nonlinear methods can be visually represented as different sides of a triangle in Fig. 1(a). The sum of two perpendicular sides of the triangle corresponds to the error coefficient of the linear method, while the hypotenuse length represents the error coefficient of the nonlinear method. According to the triangle inequality, the sum of the lengths of any two sides of a triangle is always greater than the length of the third side. Therefore, the error coefficient of the linear method consistently exceeds that of the nonlinear method. Consequently, the quantification results obtained from the nonlinear method exhibit a closer approximation to the actual value of the target component compared to those obtained from the linear method. Fig. 1(b) illustrates the relative error of the concentration quantification results. Compared with the linear method, the nonlinear method not only performs well at high R_{SB} values but also significantly reduces the concentration quantization error at low R_{SB} ($R_{SB}=1$). Therefore, the method has good applicability over a wide range of R_{SB} values. For the experimental results, Figs. 4(a) and 6(a) show the concentration quantification outcomes for both pigment and molecular probes respectively. The relative errors of the quantification results for both methods are depicted in Figs. 4(b) and 6(b). The experimental results show a decrease in concentration quantification errors for both methods with the increasing R_{SB} . Additionally, the quantification results obtained from the nonlinear method are always closer to the actual concentration of the target component. The consistency between the experimental and theoretical results not only confirms the reliability of the proposed method but also validates its error suppression capability, affirming its robust applicability in diverse scenarios.

Conclusions We present a novel method to suppress background interference and improve the concentration quantification accuracy. Compared to conventional linear single-wavelength methods, the proposed method yields concentration quantification results closer to the target component concentration. Meanwhile, the relaxed generation conditions associated with the Grüneisen-relaxation nonlinear effect render this method highly versatile and applicable in various situations. We provide a novel approach to the concentration quantification of photoacoustic molecular imaging and lay a foundation for future applications.

Key words biotechnology; photoacoustics; Grüneisen relaxation; concentration quantification; molecular imaging