



## 一种基于相位矫正的光声泵浦成像拟合方法\*

谢卓君<sup>1)</sup> 钟洪文<sup>1)</sup> 刘闰香<sup>1)</sup> 王波<sup>1)</sup> 薛平<sup>2)</sup> 何滨<sup>2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 中南大学基础医学院生物医学工程系, 长沙 410083; (<sup>2)</sup> 清华大学物理系, 低维量子物理国家重点实验室, 北京 100084)

**摘要** **目的** 光声泵浦成像可以有效排除传统光声成像中血液背景信号的干扰, 实现深层组织内微弱的磷光分子及其三重态寿命的成像。然而, 光声泵浦成像中背景差分噪声常常导致磷光分子浓度和三重态寿命的拟合结果偏大。为此, 本文提出了一种新型的应用于光声泵浦成像中的三重态寿命拟合方法, 通过提取三重态差分信号和背景噪声的相位, 有效矫正背景噪声造成的拟合偏差。**方法** 通过数值仿真、仿体和活体实验, 分别验证了新提出算法的优势和可行性。**结果** 数值仿真中, 在噪声强度为信号幅值 10% 的条件下, 新方法可将拟合偏差从 48.5% 优化到 5% 左右, 并有更高的可决系数 (0.88 > 0.79), 极大地提高了拟合精度。仿体实验证明了光声泵浦成像对磷光分子高特异性成像的能力。活体实验验证了本文提出的新拟合方法在裸鼠肿瘤的光动力治疗中拟合磷光寿命以监测氧分压含量的可行性。**结论** 本工作对于光声泵浦成像在生物医学中的应用将起到重要的推进作用。

**关键词** 光声泵浦成像, 寿命拟合, 相位矫正, 氧分压

**中图分类号** R318, TP391.41

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0378

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240378

光声成像 (photoacoustic imaging, PAI) 是一种新型的生物医学成像方式<sup>[1]</sup>。相比于超声成像而言, 光声成像并非探测脉冲超声作用于物体后的回波信号, 而是经生物组织吸收脉冲激光后由于热膨胀产生的脉冲超声信号<sup>[2-3]</sup>。因此, 作为一种光学和超声的复合成像技术, 光声成像不仅继承了超声成像穿透能力强的优点, 还可以充分利用生物体内各分子吸收光谱的差异, 从而产生高特异性的光学对比度<sup>[4]</sup>, 有效弥补了常规超声成像在分子影像方面能力弱的缺陷。

由于光声成像通常所采用的近红外光能大部分被人体组织中的血红蛋白所吸收, 所以光声成像目前常用于血管网络成像<sup>[5-6]</sup>或组织血氧<sup>[7-8]</sup>的监测。此外, 各种小分子染料<sup>[9]</sup>、纳米粒子<sup>[10]</sup>、量子点<sup>[11-12]</sup>、基因编码探针<sup>[13]</sup>等也作为外源性对比剂应用到了光声成像中。然而, 由于血液背景的强大吸收, 这类对比剂通常需要很高的浓度才能有效检测, 严重限制了光声成像的分子影像能力<sup>[14-15]</sup>。为此, 急需发展新的光声成像方法来有效抑制血液背景的干扰, 实现特种目标分子的高灵敏高特异性探测。

光声泵浦成像<sup>[16]</sup>是一种针对磷光分子三重态泵浦探测的新型光声成像技术。在光声泵浦成像中, 由于生物体内大多分子的荧光寿命都非常短, 因此在探测光到达时已处于基态, 导致其泵浦前后光声差分信号为零。而相对地, 磷光分子被泵浦光激发进入具有长寿命的三重激发态 (T1) 后, 会被探测光进一步激发产生光声信号。因此, 通过对有无泵浦光激发条件下探测光产生的光声信号的差分, 就可以高特异性地获得生物体内磷光分子的分布。此外, 通过调节泵浦和探测光的时间延迟, 可以得到瞬态三重差分信号 (transient triplet differential, TTD) 的幅值衰减曲线, 从而拟合得到其寿命<sup>[17-18]</sup>。然后利用 Stern-Volmer 方程<sup>[19]</sup>, 就可以通过 T1 态的寿命计算得到氧分压, 从而实现与磷光分子浓度和光照强度无关的、生物体深层组织内定量的氧分压成像<sup>[20]</sup>。

\* 湖南省自然科学基金 (S2023JMSXM2215, 2022J30756) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 15822891700, E-mail: b-he19@tsinghua.org.cn

收稿日期: 2024-08-24, 接受日期: 2024-10-01

光声泵浦成像作为光声成像领域的前沿技术,已被应用于多种小分子的无背景光声成像及氧分压成像中,并在小动物实验中得到了初步的验证<sup>[20]</sup>。然而,当前对该成像技术的研究仍非常少。由于TTD信号较小,背景差分噪声的叠加会使得其背景信号幅值在拟合时较真实值偏高,以及磷光分子三重态寿命拟合值偏大。为此,本课题组提出了一种新型的光声泵浦成像拟合方法,通过提取三重态差分信号和背景噪声的相位,可以有效提高拟合结果的精度。该方法有望推动光声泵浦成像在生物医学中的进一步应用。

## 1 实验方法

### 1.1 光声泵浦成像原理与实验系统

光声泵浦成像典型的实验装置如图1a所示。系统采用了两台20 Hz的光参量振荡(optical parametric oscillat, OPO)纳秒脉冲激光器分别用作泵浦和探测光源,通过X型多模光纤束耦合后对样品进行照明。其中一台工作在650 nm(OPO 600, Innolas, 355 nm泵浦)作为泵浦光源,另一台工作在820 nm(OPO 600, Innolas, 355 nm泵浦)作为探测光源。泵浦光和探测光在样品表面的强度分别约为10和20 mJ/cm<sup>2</sup>。信号采集时,128通道的超声数据采集系统(Vantage 256, Verasonics, 62.5 MHz)发送时钟信号以外触发多通道数字延迟脉冲发生器(DG645, Stanford Research Systems)从而实现两台OPO激光器的控制。X型光纤的两端固定在128单元线性超声换

能器阵列两端(L11-5v, Verasonics, 中心频率7.8 MHz)引导光线到组织区域并进行光声探测。

本工作所用磷光分子为临床和生物医学研究中广泛应用的亚甲基蓝,其最大吸收峰在650 nm左右。当亚甲基蓝被泵浦光从基态S<sub>0</sub>激发到单重激发态S<sub>1</sub>后,其会通过系间窜越进入三重激发态T<sub>1</sub>(图1b)。由于自旋禁止,其从T<sub>1</sub>态到基态S<sub>0</sub>的跃迁具有微秒级的长磷光寿命。此时,820 nm的探测光可将T<sub>1</sub>态的磷光分子激发到第二三重激发态T<sub>2</sub>产生光声信号。由于生物组织背景也可以在泵浦光和探测光的作用下产生光声信号,需按以下公式,去除组织光声背景,从而获得磷光分子的TTD信号:

$$S_{\text{TTD},t} = S_{\text{pump} + \text{probe},t} - S_{\text{pump},t} - S_{\text{probe},t} \quad (1)$$

其中,  $S_{\text{pump} + \text{probe},t}$  为泵浦光和探测光同时存在条件下的光声信号,  $S_{\text{pump},t}$  和  $S_{\text{probe},t}$  分别为泵浦光和探测光单独存在时的光声信号。参数  $t$  为泵浦光和探测光之间的延迟时间,而采集卡采集时刻零点和探测光激发时间相同。亚甲基蓝三重态T<sub>1</sub>的寿命  $T$  对组织氧分压  $p\text{O}_2$  非常敏感,其关系可以用 Stern-Volmer 方程表示:

$$\frac{T_0}{T} = 1 + k_Q T_0 p\text{O}_2 \quad (2)$$

其中,  $T_0$  为氧分压为0时亚甲基蓝T<sub>1</sub>态的磷光寿命,大小为79.6 μs,  $k_Q$  为磷光猝灭常数,大小为0.003 6 μs<sup>-1</sup>mmHg<sup>-1</sup>。通过调节泵浦和探测光之间的延迟,可以获得一系列不同延迟时间  $t$  下的TTD信号强度  $A$ ,从而通过寿命指数衰减公式获得TTD信号的幅值和三重态寿命。

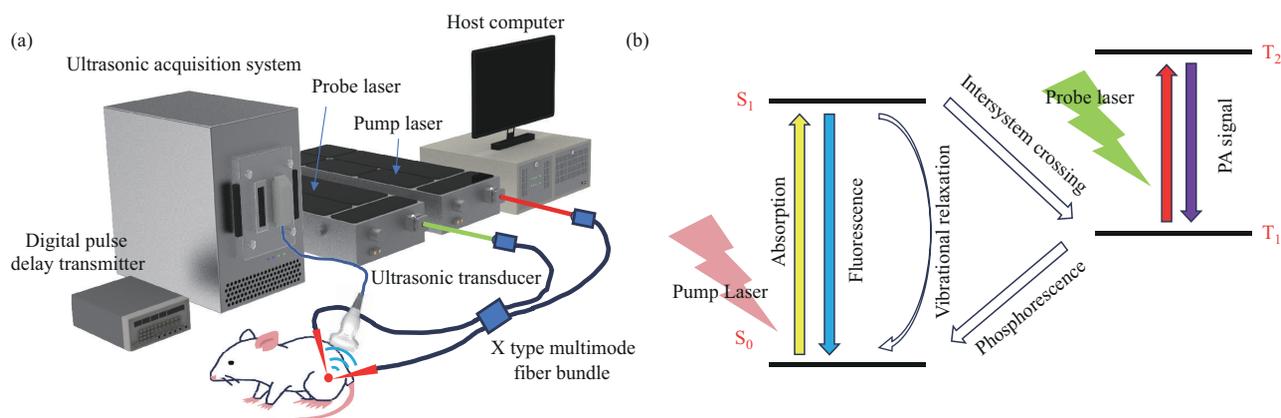


Fig. 1 Photoacoustic pump-probe imaging system

(a) System schematic diagram; (b) schematic diagram of photoacoustic pump-probe imaging and energy level diagram of methylene blue molecule.

## 1.2 三重态寿命拟合算法

在光声泵浦成像中, 光声信号经过采集和重建之后, TTD 图像上任意像素的值随时泵浦探测光的时间延迟  $t$  的指数衰减变化表示为:

$$P_{\text{TTD}}(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3)$$

其中, TTD 信号的幅值  $A$  一般取初始时刻信号所重建像素值的绝对值, 然后按照上式进行指数拟合。然而, 由于超声为波动信号, 经过 Hilbert 变换提取相位信息后, 获得的光声重建图像为复数。考虑背景噪声的条件下, 实际 TTD 信号的值会在真实值附近上下波动, 即:

$$P_{\text{TTD}}(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau} + i\varphi} + \delta \cdot e^{i\theta} \quad (4)$$

其中,  $A$  和  $\varphi$  分别为 TTD 信号的幅值和相位,  $\delta$  和  $\theta$  为背景噪声的幅值和相位,  $i$  为虚数单位。若按照常规的光声泵浦拟合方法, 对上式直接取绝对值后再拟合, 则会忽略超声信号的相位, 进而造成背景

$$\hat{\varphi} = \frac{1}{2} \text{angle} \left\{ \sum_{n=1}^N \left[ \text{imag} \left( P_{\text{TTD}}(t_n) \right)^2 - \text{real} \left( P_{\text{TTD}}(t_n) \right)^2 \right] \dots \right. \\ \left. + i \times \sum_{n=1}^N \left[ \text{imag} \left( P_{\text{TTD}}(t_n) \right) \times \text{real} \left( P_{\text{TTD}}(t_n) \right) \right] \right\} \quad (6)$$

其中,  $n$  为 TTD 信号采集时的延迟时间个数,  $\text{real}$  和  $\text{imag}$  分别表示光声数据的实部和虚部,  $\text{angle}$  表示求复数的角度。然后再将公式 (1) 变为:

$$P_{\text{TTD}}(t) e^{-i\varphi} = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + \delta \cdot e^{i(\theta - \varphi)} \quad (7)$$

再通过对上式的实数部分进行拟合, 获得 TTD 的幅值及寿命。本文基于 Marquardt-Tikhonov 正则化方法进行拟合, 并采用 GPU 并行化方法对该算法进行了加速。

## 1.3 数据模拟及实验设置

本文通过一维光声泵浦实验模拟, 对所提出的拟合算法与传统算法的结果进行了比较, 以说明新算法在拟合准确性上的优势。其中, 模拟中设有一个点目标, 探测器的中心频率设置为 7.5 MHz, 带宽为 80%, 采样率为 100 MHz, 模拟中假设背景差分噪声为空间上均匀分布的热噪声。泵浦探测光延迟时间  $t$  的取值为 0.05、0.25、0.5、1、1.5、2、4、8、16  $\mu\text{s}$ , 共 9 个数值, 与实验采集设置一致。

本文通过仿体和动物实验测试了所提出拟合算法的实际应用效果。其中, 仿体实验中同时对两根内径 2.5 mm, 外径 3 mm 的塑料管进行成像。其中一根装载有 10% 的血红蛋白, 右边一根装有 200 mmol/L 的亚甲基蓝溶液, 以此验证光声泵浦成像对血液背景的抑制效果。动物实验采用裸鼠腿部皮下肿瘤模型, 以验证对氧分压的成像效果。本

噪声幅值会直接叠加到 TTD 信号上, 使 TTD 值  $P_{\text{TTD}}$  较真实值偏大, 而非围绕其上下波动。因此, 传统光声泵浦拟合方法中 TTD 信号的拟合寿命值会相较于真实值偏大, 导致测量的氧分压信号不准确, 同时 TTD 拟合幅值也相较于真实值偏高。

由于光声泵浦成像中 TTD 信号较弱, 即使经过大量的采集平均, 背景差分噪声仍非常明显, 因此上述效应不可忽略。这不仅严重限制了光声泵浦的成像速度, 同时也严重影响了其对磷光分子浓度和氧分压检测的准确性。为此, 课题组提出了一种基于相位恢复的新型光声泵浦拟合方法<sup>[21]</sup>。该方法首先通过对 TTD 时间序列求最小化虚部平方和来获得 TTD 信号的相位  $\hat{\varphi}$ , 即:

$$\hat{\varphi} = \arg \min \sum_{n=1}^N \left\| \text{imag} \left( P_{\text{TTD}}(t_n) e^{-i\varphi} \right) \right\|^2 \quad (5)$$

对上式求解可得到公式 (6):

文采用 8 周龄左右的 BALB/c-Nude 裸鼠, 在其腿部皮下注射体积 0.1 ml, 数量约为  $3 \times 10^6$  的 HCT-116 结直肠癌肿瘤细胞, 培育 1~2 周后形成约 5~10 mm 直径大小的肿瘤。在光声泵浦成像前, 首先对动物进行麻醉固定, 然后在肿瘤内注射 0.1 ml 浓度为 5 mmol/L 的亚甲基蓝溶液, 待亚甲基蓝扩散 15 min 后再进行成像观测。本项目遵循的程序符合国家及提供实验动物单位制订的有关实验动物福利的规则和制度, 经中南大学基础医学院伦理委员会批准 (审批号: 2022-KT146)。

## 2 结 果

### 2.1 数值模拟实验

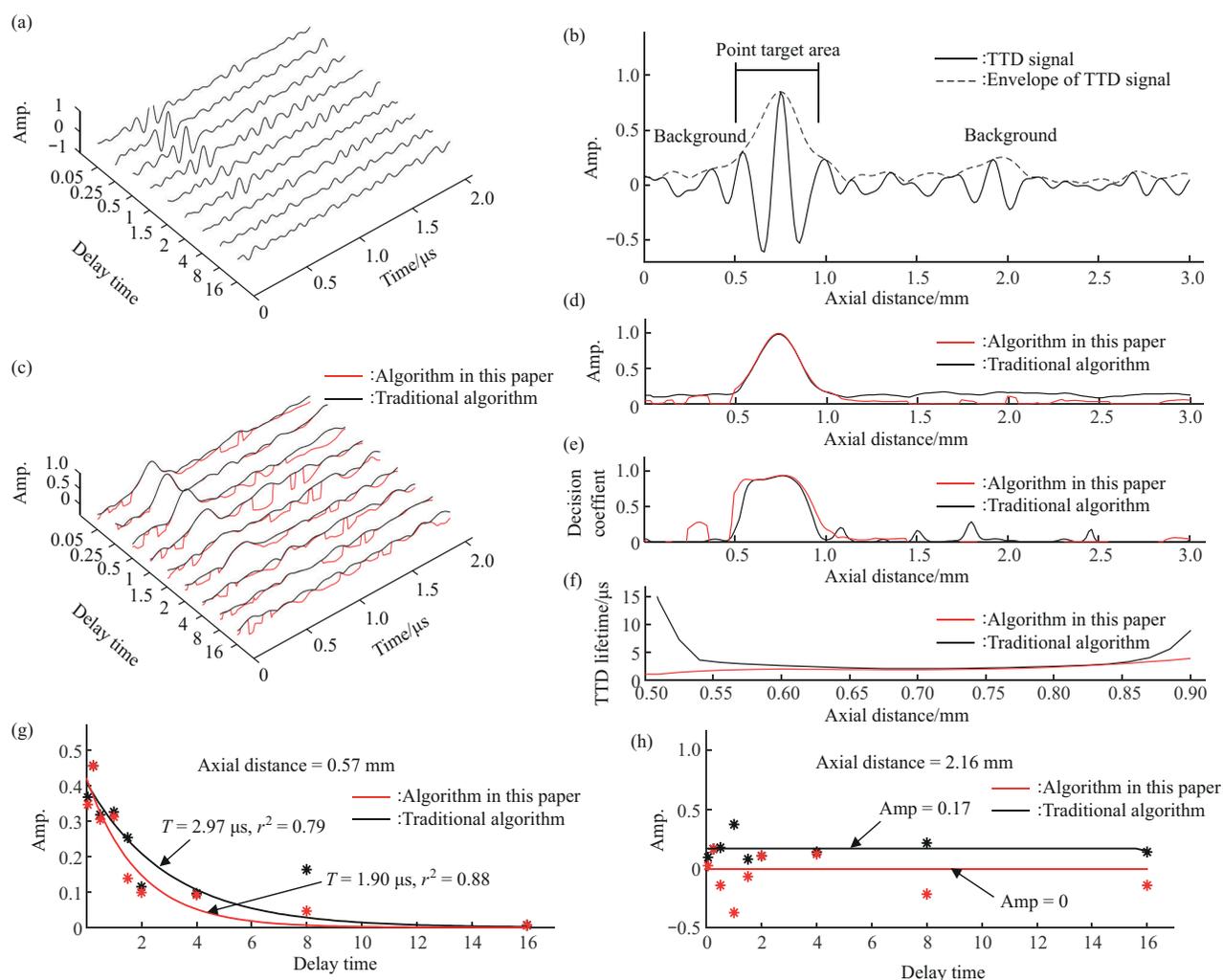
模拟通过公式 (1) 差分后得到 9 个不同泵浦探测延迟时间  $t$  下的 TTD 信号 (图 2a)。其中, 磷光分子点目标寿命为 2  $\mu\text{s}$ , 噪声相当于 TTD 信号幅值的 10%。图 2a 中第一个延迟时间的 TTD 信号如图 2b 所示, 其中实线为实际采集的实部信号, 虚线为信号经过 Hilbert 变换变为复数信号后, 取绝对值获得的包络信号。回波时间已经根据水中声速换算为了轴向距离, 因此代表了成像时不同深度位置上 TTD 信号的幅值。点目标中心在 0.76 mm 附近, 但由于轴向分辨率限制, 在 0.5~0.9 mm 都可视为目标区域, 其余为背景区域。从图 2a 中可以

看出，随着延迟时间的增大，点目标位置的TTD信号幅值有明显的衰减趋势，而背景噪声区域并无这种现象。

传统的光声泵浦拟合算法一般对包络信号按照公式(4)进行拟合，即拟合数据的值都大于0，而忽略TTD信号的相位(图2c中黑色实线)。而本文所提出的算法首先对TTD信号按照公式(5)和(6)寻找相位，并按照公式(7)进行相位矫正，然后取实部进行拟合，其拟合数据在背景区域在0附近上下波动(图2c中红色实线)。图2d, e为两种算法的TTD幅值和可决系数拟合结果。从其中可以看出，点目标位置处拟合幅值较高，可决系数较好。但是背景区域拟合幅值较低，且由于噪声的影响，可决系数较差。这是因为在更小的噪声影响下，采集到的光声信号的衰减趋势更能代表实际的

磷光寿命衰减情况，故此时拟合结果具有更高的可决系数。通过对拟合后的TTD幅值和可决系数的判断，可以确定目标所在的位置，然后根据图2f获得其三重态寿命。

图2g给出了在目标区域一点的拟合结果，其中原有算法给出的三重态寿命为2.97  $\mu\text{s}$ ，而本文所提出的算法结果为1.9  $\mu\text{s}$ ，与实际值2  $\mu\text{s}$ 更接近，将原有算法48.5%的偏差优化到了5%。同时新拟合算法的可决系数(0.88)也优于原有算法(0.79)。图2h为背景区域上一点的拟合结果，可以发现，由于原有算法无法排除噪声影响，造成拟合结果的整体幅值大于零，而本文算法的拟合结果则在零值附近。因此，相对于传统的光声泵浦拟合算法，本文所提出的新算法可以给出更准确的拟合结果。



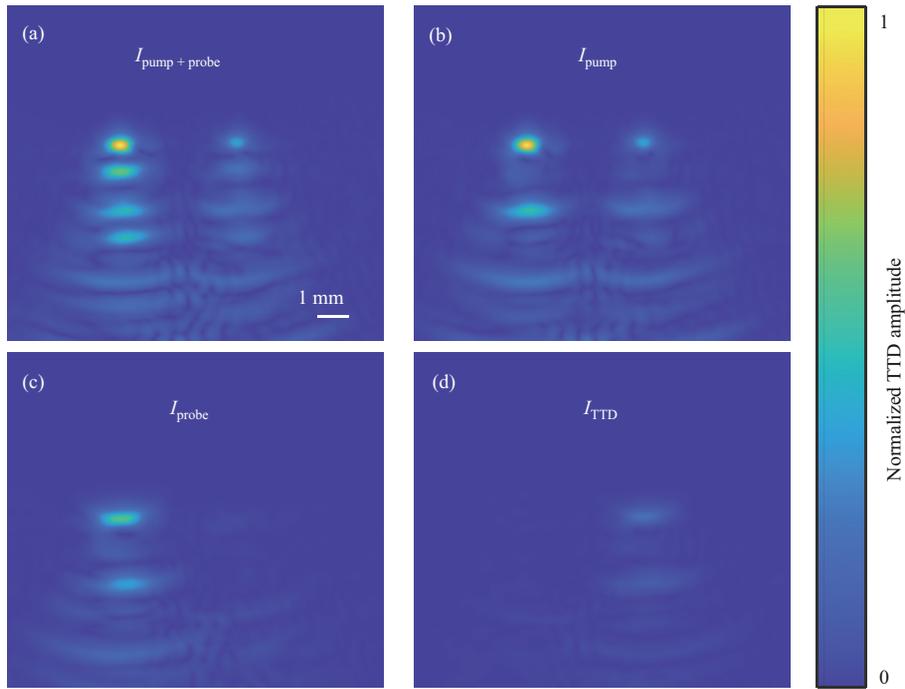
**Fig. 2** Fitting numerical simulation results of photoacoustic pump-probe imaging

(a) TTD signals under different time delay, (b) TTD signal at the first time delay (0.05  $\mu\text{s}$ ), (c) TTD data used in exponential fitting, (d) TTD amplitude fitting results, (e) coefficient of determination results, (f) triplet lifetime fitting results, (g) fitting result of a point in the target region, (h) fitting result of a point in the background region.

## 2.2 仿体实验

仿体实验的结果如图3所示。其中图3a-c分别为泵浦光和探测光同时存在 ( $I_{\text{pump+probe}}$ )、泵浦光单独存在 ( $I_{\text{pump}}$ ) 和探测光单独存在时 ( $I_{\text{probe}}$ ) 的幅值归一化的光声图像。图像左侧为10%牛血红蛋白, 右侧为200 mmol/L 亚甲基蓝。其中  $I_{\text{pump+probe}}$  图

像接近于  $I_{\text{pump}}$  图像和  $I_{\text{probe}}$  图像的叠加。经过光声信号差分, 可以有效地提取出只与亚甲基蓝染料相关的TTD信号, 而去除了血液背景信号 (图3d)。该结果证实了光声泵浦成像对荧光分子的高特异性成像的能力。



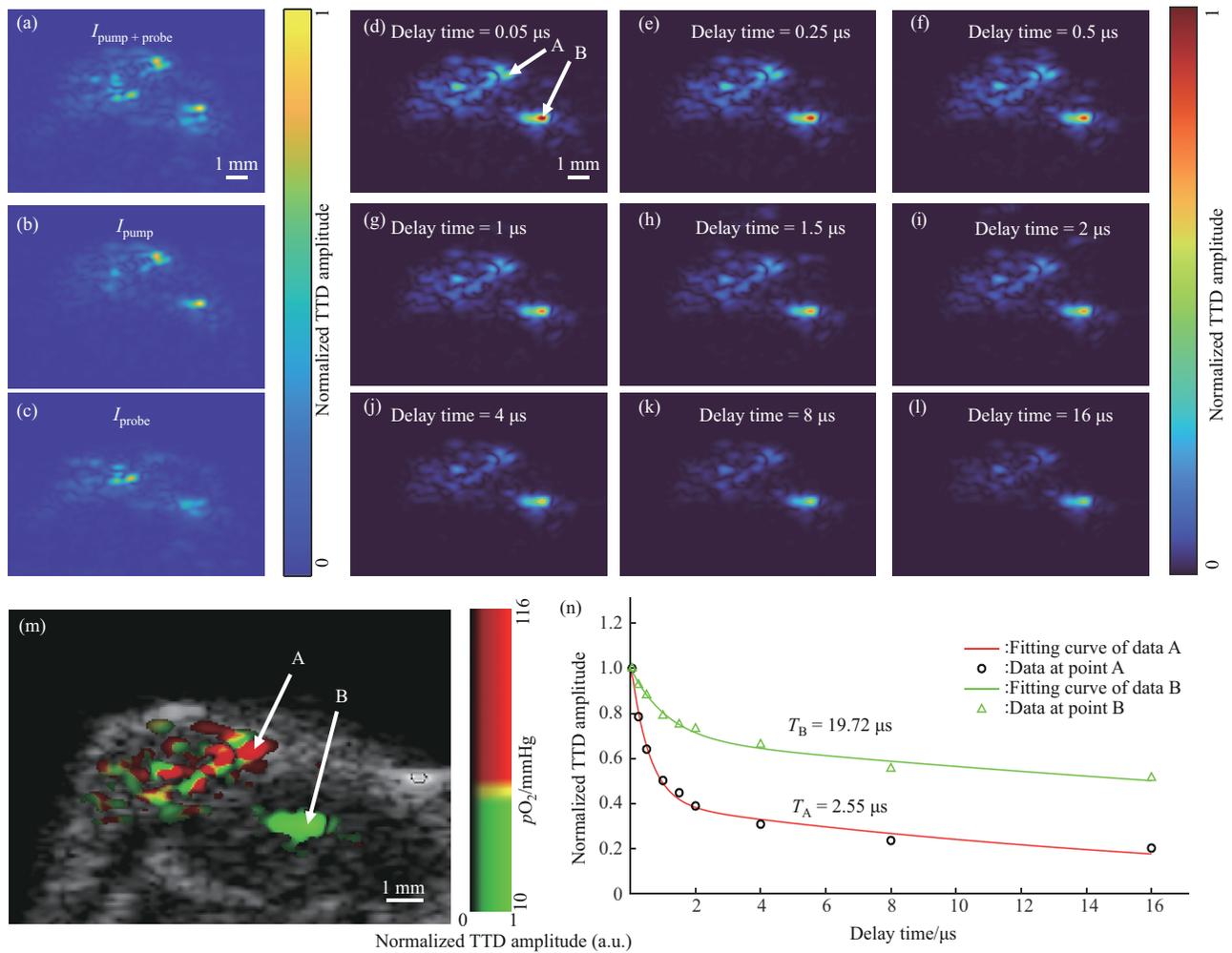
**Fig. 3 Phantom experiment results of photoacoustic pump-probe imaging**

(a) Photoacoustic images in the presence of both pump and probe light ( $I_{\text{pump+probe}}$ ); (b) photoacoustic images in the presence of pump light alone ( $I_{\text{pump}}$ ); (c) photoacoustic images in the presence of probe light alone ( $I_{\text{probe}}$ ); (d) TTD image after the difference of the above three photoacoustic signals ( $I_{\text{TTD}}$ ).

## 2.3 活体肿瘤成像实验

图4为光声泵浦成像的裸鼠肿瘤成像结果。其中, 图4a-c分别为  $I_{\text{pump+probe}}$ 、 $I_{\text{pump}}$  和  $I_{\text{probe}}$  光声图像。图4d-l为不同延时下的TTD差分信号经相位矫正后的图像。可以看到, 随着延时的增加, TTD信号幅值整体明显变弱。然而, 不同区域的TTD信号衰减速率不同。如图4d-l中所示A与B点附近区域, A点附近区域TTD信号的衰减显著快于B点, 可知A点附近亚甲基蓝分子三重态寿命相对更小, 因此该处组织氧分压更高。通过对不同延迟下的TTD图像进行逐像素指数拟合, 可得到TTD衰减寿命的分布。图4n显示了A和B点的TTD信号拟

合结果。其中, A点拟合后的三重态寿命为19.72  $\mu\text{s}$ , B点为2.55  $\mu\text{s}$ 。通过 Stern-Volmer 方程, 可将逐像素拟合得到的三重态寿命转化为组织氧分压 (图4m)。该图像素亮度表示TTD信号的幅度, 亮度越高代表被激发的亚甲基蓝浓度越大。而图像颜色表示氧分压的定量成像结果, 其中绿色代表低氧分压, 红色代表高氧分压。由于氧分压在生命活动中具有重要的医学意义, 本文所提出的光声泵浦成像拟合方法, 可以在厘米级的深度内实现组织氧分压的定量无损成像, 因此在生物医学中具有重要的应用前景。



**Fig. 4 Tumor imaging results of photoacoustic pump-probe imaging in nude mice**

(a-c) Photoacoustic images of  $I_{pump+probe}$ ,  $I_{pump}$ ,  $I_{probe}$  against mouse tumors, where the delay is 0.25  $\mu s$ ; (d-l) photoacoustic images reconstructed from TTD signals under different delays; (m) oxygen partial pressure quantitative imaging results; (n) normalized TTD attenuation of two representative pixels (hyperoxia and hypoxia) in panel (m), where the scatter is the experimental data and the curve is the fitting result.

### 3 讨 论

传统的光声成像主要依赖目标分子的特异性吸收进行成像。为了将目标分子与组织背景的吸收进行分离，一般采用多波长的成像方法。然而多波长成像方法中，由于不同波长的光在深层组织内的强度分布很难预测，因此无法进行精确的光强补偿。此外，多波长成像方法中，需要准确地知道所涉及的光吸收分子的种类，并合理选择光波长的分布。总之，建立准确和稳定数学模型具有非常大的挑战，需要非常丰富的理论和实验经验。重要的是，即使建立了相关的方程组，光随着组织深入逐渐地衰减，该方程组的求解会变得非常不稳定，因此很难得到准确的多波长求解结果。与之相对地，光声

泵浦成像可以直接通过信号差分获得目标分子的分布，并通过三重态信号的衰减寿命获得组织氧分压的变化，实现高特异性的分子和功能成像结果。

然而，光声泵浦成像仍处于早期发展阶段。由于差分信号幅值较小，即使经过百余次的信号平均，其背景噪声仍会造成显著的影响。因此，建立高效准确的光声泵浦拟合算法，合理地设计光声泵浦脉冲序列，以及发展相关的激光脉冲能量校正技术，从而能够有效地缩短光声泵浦成像的时间，并提高其精度，对其在生物医学中的实际应用具有重要的意义。从仿真结果看，本文所提出的基于TTD信号相位矫正的拟合算法，能够有效地克服传统拟合算法中背景TTD噪声的影响，提高拟合结果的准确性。同时，在仿体和动物活体实验中该

方法的可行性也得到了验证。

值得注意的是, 该方法是针对单像素点进行逐一计算相位的, 而在将来我们将着重考虑点与其附近点之间的相位的连续性, 以提供更加准确的拟合算法, 更有效地减弱背景噪声干扰。

## 4 结 论

本文提出了一种新型的光声泵浦成像拟合算法, 其首先提取 TTD 信号的相位信息并进行矫正, 然后再进行寿命拟合。相对于原有的直接对 TTD 信号幅值进行拟合的方法, 其能有效减小背景噪声信号的干扰, 纠正传统方法造成的三重态寿命偏高的问题, 并有效压制背景拟合信号幅值, 从而实现更准确的成像结果, 该方法将推动光声泵浦成像在生物学中的进一步应用。未来, 我们将提出考虑相位连续性的拟合算法, 以提供更高的准确性。

## 参 考 文 献

- [1] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs. *Science*, 2012, **335**(6075): 1458-1462
- [2] Wang L V, Yao J. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nat Methods*, 2016, **13**(8): 627-638
- [3] Wang L V, Wu H I. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. New York: John Wiley & Sons, 2007: 283
- [4] Yao J, Wang L V. Sensitivity of photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 2014, **2**(2): 87-101
- [5] Hoelen C G, de Mul F F, Pongers R, *et al.* Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue. *Opt Lett*, 1998, **23**(8): 648-650
- [6] Kolkman R G, Klaessens J H, Hondebrink E, *et al.* Photoacoustic determination of blood vessel diameter. *Phys Med Biol*, 2004, **49**(20): 4745-4756
- [7] Zhang H F, Maslov K, Sivaramakrishnan M, *et al.* Imaging of hemoglobin oxygen saturation variations in single vessels *in vivo* using photoacoustic microscopy. *Appl Phys Lett*, 2007, **90**(5): 053901
- [8] Chen Z, Yang S, Xing D. *In vivo* detection of hemoglobin oxygen saturation and carboxyhemoglobin saturation with multiwavelength photoacoustic microscopy. *Opt Lett*, 2012, **37**(16): 3414-3416
- [9] Li C, Liu C, Fan Y, *et al.* Recent development of near-infrared photoacoustic probes based on small-molecule organic dye. *RSC Chem Biol*, 2021, **2**(3): 743-758
- [10] Li W, Chen X. Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, **10**(2): 299-320
- [11] Shashkov E V, Everts M, Galanzha E I, *et al.* Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents. *Nano Lett*, 2008, **8**(11): 3953-3958
- [12] Guo T, Tang Q, Guo Y, *et al.* Boron quantum dots for photoacoustic imaging-guided photothermal therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(1): 306-311
- [13] Liu C, Gong X, Lin R, *et al.* Advances in imaging techniques and genetically encoded probes for photoacoustic imaging. *Theranostics*, 2016, **6**(13): 2414-2430
- [14] Wang B, Li L, Liu Y, *et al.* Semiconducting polymer dots for dual-wavelength differential background-suppressed photoacoustic imaging. *Adv Healthc Mater*, 2024, **13**(23): e2400517
- [15] John S, Hester S, Basij M, *et al.* Niche preclinical and clinical applications of photoacoustic imaging with endogenous contrast. *Photoacoustics*, 2023, **32**: 100533
- [16] Märk J, Schmitt F J, Theiss C, *et al.* Photoacoustic imaging of fluorophores using pump-probe excitation. *Biomed Opt Express*, 2015, **6**(7): 2522-2535
- [17] Ashkenazi S, Huang S W, Horvath T, *et al.* Photoacoustic probing of fluorophore excited state lifetime with application to oxygen sensing. *J Biomed Opt*, 2008, **13**(3): 034023
- [18] Morgounova E, Shao Q, Hackel B J, *et al.* Photoacoustic lifetime contrast between methylene blue monomers and self-quenched dimers as a model for dual-labeled activatable probes. *J Biomed Opt*, 2013, **18**(5): 56004
- [19] Vanderkooi J M, Wilson D F. A new method for measuring oxygen concentration in biological systems. *Adv Exp Med Biol*, 1986, **200**: 189-193
- [20] Wang B, Xie Y, He X, *et al.* Transient triplet differential-based photoacoustic lifetime imaging with an automatic interleaved data acquisition method for improved scanning speed and stability. *Opt Express*, 2022, **30**(21): 39129-39141
- [21] Xiao J, He X, Xie Z, *et al.* Dynamic monitoring of oxygen partial pressure in photodynamic therapy using pump-probe-based photoacoustic tomography. *Opt Lett*, 2024, **49**(5): 1369-1372

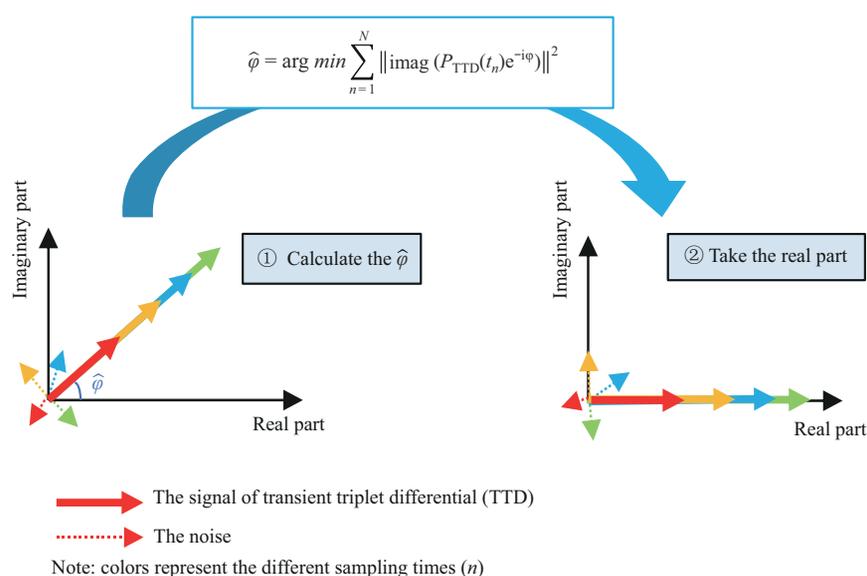
## A Fitting Method for Photoacoustic Pump-probe Imaging Based on Phase Correction\*

XIE Zhuo-Jun<sup>1)</sup>, ZHONG Hong-Wen<sup>1)</sup>, LIU Run-Xiang<sup>1)</sup>, WANG Bo<sup>1)</sup>, XUE Ping<sup>2)</sup>, HE Bin<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410083, China;

<sup>2)</sup>State Key Laboratory of Low-Dimensional Quantum Physics, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

### Graphical abstract



**Abstract Objective** Photoacoustic pump-probe imaging can effectively eliminate the interference of blood background signal in traditional photoacoustic imaging, and realize the imaging of weak phosphorescence molecules and their triplet lifetimes in deep tissues. However, background differential noise in photoacoustic pump-probe imaging often leads to large fitting results of phosphorescent molecule concentration and triplet lifetime. Therefore, this paper proposes a novel triplet lifetime fitting method for photoacoustic pump-probe imaging. By extracting the phase of the triplet differential signal and the background noise, the fitting bias caused by the background noise can be effectively corrected. **Methods** The advantages and feasibility of the proposed algorithm are verified by numerical simulation, phantom and *in vivo* experiments, respectively. **Results** In the numerical simulation, under the condition of noise intensity being 10% of the signal amplitude, the new method can optimize the fitting deviation from 48.5% to about 5%, and has a higher exclusion coefficient ( $0.88 > 0.79$ ), which greatly improves the fitting accuracy. The high specificity imaging ability of photoacoustic pump imaging for phosphorescent molecules has been demonstrated by phantom experiments. *In vivo* experiments have verified the feasibility of the new fitting method proposed in this paper for fitting phosphometric lifetime to monitor oxygen partial pressure content during photodynamic therapy of tumors in nude mice. **Conclusion** This work will play an important role in promoting the application of photoacoustic pump-probe imaging in biomedicine.

**Key words** photoacoustic pump-probe imaging, lifetime fitting, phase correction, oxygen partial pressure

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0378

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240378

\* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Hunan Province (S2023JMSXM2215, 2022J30756).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-15822891700, E-mail: b-he19@tsinghua.org.cn

Received: August 24, 2024 Accepted: October 1, 2024