

光声显微成像技术在眼科的应用进展

刘 楚,张正威

引用:刘楚,张正威. 光声显微成像技术在眼科的应用进展. 国际眼科杂志, 2025,25(4):606-610.

基金项目:江苏省科技厅社会发展面上研发项目(No. BE2022699);江苏省卫健委老年医学面上项目(No. LKM2022043);无锡市卫生健康委中青年拔尖人才资助计划(No. BJ2023037)

作者单位:(214002)中国江苏省无锡市,江南大学附属中心医院无锡市第二人民医院

作者简介:刘楚,江南大学在读硕士研究生,住院医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:张正威,男,毕业于上海交通大学,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:人工智能及多模影像在眼底病中的研究与应用. zwzhang2452@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-08-23 修回日期:2025-02-25

摘要

光声显微成像(PAM)是一种融合光学与声学的新兴的非侵入性活体组织成像技术,能够高分辨率和高对比度地呈现眼部各组织结构和功能信息,可应用于角膜新生血管、黄斑变性、糖尿病视网膜病变等多种眼部疾病研究。PAM的多波长光源成像特性使其在早期病变筛查和动态生理监测中具有重要应用价值。在干细胞追踪中,PAM利用造影剂标记实现移植细胞的动态监测。此外,与光相干断层扫描(OCT)等多模态成像技术联合使用,能够提升眼部病变的检测精度和诊断能力。然而,PAM在成像速度和造影剂安全性等方面仍需优化。文章综述了PAM的基本原理与发展历程,探讨了其在部分眼部疾病中的应用,并分析了从动物实验到临床应用的挑战及优化方向。PAM有望在眼科诊断与治疗中发挥更重要的作用。

关键词:光声显微成像;眼部疾病;诊断;评估;应用

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.4.15

Advances in the application of photoacoustic microscopy imaging in ophthalmology

Liu Chu, Zhang Zhengwei

Foundation items: Social Development Project of Jiangsu Provincial Department of Science and Technology (No. BE2022699); Elderly Health Research Project of Jiangsu Commission of Health (No. LKM2022043); Top Talent Support Program for Young and Middle-aged People of Wuxi Municipal Health Commission (No. BJ2023037)

Jiangnan University Medical Center; Wuxi No.2 People's Hospital, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhang Zhengwei. Jiangnan University Medical

Center; Wuxi No. 2 People's Hospital, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China. zwzhang2452@jiangnan.edu.cn
Received: 2024-08-23 Accepted: 2025-02-25

Abstract

• Photoacoustic microscopy (PAM) is an emerging, non-invasive, *in vivo* imaging modality that merges optical and acoustic principles. It offers high-resolution and high-contrast visualization of various ocular tissue structures and functional information, making it suitable for studying a wide range of ophthalmic diseases such as corneal neovascularization, macular degeneration, and diabetic retinopathy. The multi-wavelength illumination capability of PAM makes it particularly valuable for early disease screening and dynamic physiological monitoring. In stem cell tracking, PAM enables the dynamic monitoring of transplanted cells through contrast agent labeling. Moreover, when combined with multimodal imaging techniques like optical coherence tomography (OCT), PAM can enhance the detection accuracy and diagnostic capacity for ocular diseases. However, PAM still requires optimization in terms of imaging speed and contrast agent safety. This review summarizes the fundamental principles and development of PAM, explores its applications in specific ophthalmic diseases, and analyzes the challenges and optimization directions from animal experiments to clinical applications. PAM holds great promise for playing a more significant role in ophthalmic diagnosis and treatment.

• KEYWORDS: photoacoustic microscopy; ocular disease; diagnosis; evaluation; application

Citation: Liu C, Zhang ZW. Advances in the application of photoacoustic microscopy imaging in ophthalmology. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025,25(4):606-610.

0 引言

1880年,Bell首次发现将经调制的光或脉冲光照射一个吸收体时会发生光热转换,热弹性效应使吸收体介质产生超声波,并将其命名为光声效应^[1]。但由于条件限制,此后几十年,光声效应几乎没有很大的进展。光声效应产生的声信号称为光声信号,其强度和频谱与组织的光学、热学及弹性特性相关。光声成像通过检测这些信号,能获得组织的结构与生化信息,用于诊断疾病和评估组织^[2]。随着激光、超声、计算机技术的发展,光声成像(photoacoustic imaging, PAI)技术逐渐被广泛应用于生物医学领域,并产生许多分支。其中光声显微成像(photoacoustic microscopy, PAM)技术通过结合光和超声的优势,具备高敏感性和对比度,能够在宏观和微观尺度上

提供高分辨率的结构信息^[3],还能通过多波长成像检测组织的功能性特征,如氧饱和度和血红蛋白浓度。当前,PAM能够在细胞器、细胞、组织、器官到小动物全身多尺度上进行成像,从而揭示组织的解剖、功能、分子和代谢信息等^[4]。本文就PAM技术在眼部疾病中的研究和应用的进展做一综述。

1 光声成像原理简介

20世纪70年代初,科学家们开始探索将激光光源与超声成像技术相结合,以实现深层组织进行高分辨率成像的可能性^[5]。近年来,光声成像作为一种非电离、非侵入性的三维成像方法,因其微米级分辨率和毫米级穿透深度而日益受到关注^[6]。该技术利用短脉冲激光照射生物组织,组织吸收激光能量转化为热能,导致局部快速升温 and 热弹性膨胀,进而产生光声波。超声传感器获取并记录激光声信号,信号经过滤波、低噪声放大和数字化处理后,最终转换成二维或三维图像(图1)。

随着光声成像技术的进步,实现了从PAI到PAM的升级。PAM利用光学激发和声学检测,主要有两种成像方式:光分辨PAM(optical-resolution photoacoustic microscopy,OR-PAM)和声分辨PAM(acoustic-resolution photoacoustic microscopy,AR-PAM)。OR-PAM利用显微物镜将激光聚焦,可以在样品上产生较超声传感器声束聚焦更小的激光光斑,实现更高的横向分辨率^[7]。最初,OR-PAM的横向分辨率约为5 μm,成像深度约为1 mm。目前的横向分辨率已经提高到220 nm左右,可以成像单个红细胞。非线性无标记光声纳米显微镜进一步突破了OR-PAM的成像极限,实现了约88 nm的横向分辨率和亚微米级别的轴向分辨率^[8]。此外,对样品切片石蜡包埋后用苏木精和伊红染色,脱氧核苷转移酶标记能进一步提高横向分辨率,以便更好地成像视网膜血管和脉络膜血管^[9]。PAM通过利用造影剂在特定波长光下的光激发,并结合超声波的检测,形成了一种独特的成像手段。该技术不仅能够提供高分辨率的解剖结构信息,如血管分布和组织层次,还能通过多波长成像获取功能信息,如组织的氧饱和度、血流动力学变化和代谢状态。PAM的双重优势使其在探测复杂生物组织的微结构和功能特征时表现出更强的灵敏度和适应性,尤其在早期病变筛查和动态生理监测中具有重要应用价值。PAM利用分子靶向造影剂在眼科领域的应用具有巨大潜力。这些造影剂主要分为两类:有机造影剂如吲哚菁绿(indocyanine green,ICG)和无机造影剂如金纳米颗粒(gold nanoparticles,GNPs)^[10-11]。它们能够增强眼部不同结构的对比度,帮助鉴别眼部病变。外源性造影剂的研发不仅填补了内源性造影剂吸收强度不足的缺陷,还能通过精确设计实现靶向成像、多模式成像,以及诊疗一体化。Nguyen等^[12]的研究发现,RGD肽(arginine-glycine-aspartate,由精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸,这三种氨基酸组成的序列多肽)功能化的金纳米颗粒(GNR-RGD)在体内外表现出良好的生物相容性和光稳定性。这种靶向性造影剂为PAM提供了出色的成像工具,有利于提升眼部新生血管或者眼部缺血组织的成像^[6]。

酸、天冬氨酸,这三种氨基酸组成的序列多肽)功能化的金纳米颗粒(GNR-RGD)在体内外表现出良好的生物相容性和光稳定性。这种靶向性造影剂为PAM提供了出色的成像工具,有利于提升眼部新生血管或者眼部缺血组织的成像^[6]。

2 PAM联合其他技术进行多模态成像

为了进一步优化光声成像技术,可以与其他光学成像模式集成,构建多模态成像系统。将光声成像技术与光相干断层扫描(optical coherence tomography,OCT)结合,能够针对光吸收和光散射特性进行分析,进一步提供眼底组织的结构和功能信息。这两种成像模式互补特性良好,为眼科疾病的诊断和病理学分析提供更有效的手段。在系统搭建方面,这两种成像模式有着相似的扫描方式和采集模式。多模态成像结合了OCT成像提供的视网膜组织和结构信息,能够准确监测脉络膜新生血管(choroidal neovascularization,CNV)的发生和发展情况。与现有OCT成像系统固定的某一单波长光源相比,PAM能够利用多种波长的激光光源对CNV进行成像,这种多波长的特性使得PAM在检测新生血管早期的微小病灶时更敏感,能够更早发现病变,从而更加有利于早期新生血管病灶的探测。与常规光声系统相比,双模态成像展示了更丰富的血管结构,提供了更多的额外信息,有助于提高诊断的准确性。Jiao等^[13]和Song等^[14]报道了一种集成的PAM和OCT系统,可以更好地成像视网膜血管、脉络膜血管和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)。最近,Nguyen等^[15]使用高分辨率的多模态PAM和OCT成像,用于检测视网膜和脉络膜血管阻塞,以高特异性和灵敏度纵向检测视网膜血管的动态变化。Nguyen等^[16]的另一项研究结合PAM和OCT技术,利用链状金纳米粒子标记人类视网膜色素上皮干细胞,在活体兔眼中成功进行了长达3 mo的非侵入式追踪,实时地观察细胞治疗在复杂体内环境中的生理变化。

3 PAM在眼科研究中的应用

3.1 角膜新生血管 血红蛋白对光有强烈的吸收作用,并能产生光声信号,因此光声成像尤其适用于眼部的微血管成像^[17],如角膜新生血管。Liu等^[18]采用单波长OR-PAM首次成功在碱烧伤小鼠角膜新生血管眼模型中观察到从角巩膜缘侵入角膜的新生血管网。除了直接成像,通过比较脱氧血红蛋白和氧合血红蛋白的光声信号,可以使用公式计算出血液中的氧饱和度,监测新生血管的进展^[19]。在治疗方面,Chu等^[20]提出了一种光声成像引导纳米药物治疗角膜新生血管的方法,与传统给药方式相比,提高了给药的效率。

3.2 年龄相关性黄斑变性 年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,ARMD)可分为两类:干性(退行性)ARMD和湿性(新生血管性)ARMD。在湿性ARMD

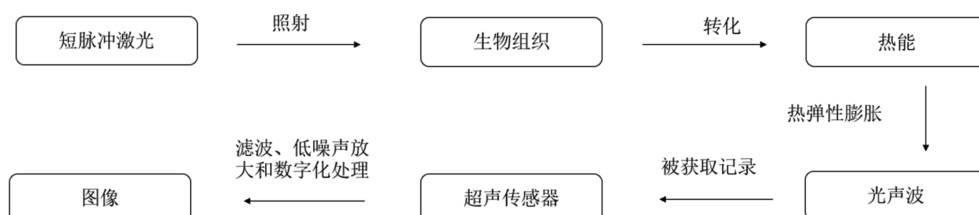


图1 光声成像原理示意图。

中,来自脉络膜的新生血管突破 Bruch 膜并在视网膜下层生长,称为 CNV^[21]。由于新生血管脆弱,容易出血和渗漏,导致液体和血液在视网膜下腔中积聚,最终导致不可逆的视力丧失^[22]。提高对 CNV 发病机制的认识对于 ARMD 的预防和治疗至关重要。光相干断层扫描血管成像(optical coherence tomography angiography, OCTA)可以高分辨率成像微血管网,但最小可检测流速受限于连续 B 扫描之间的时间间隔,只能检测到一定范围内的血流速度,存在上限和下限,因此无法捕获到低于或高于该阈值的血流信号^[23],可能错过一些血流过慢或者过快的血管病变^[9]。因此,需要继续探索可以更敏感识别 CNV 的成像方法。PAM 能够以更高的灵敏度探测微弱的血流变化,无论是在低流速还是高流速的情况下均能提供更全面的血流信息,这使得 PAM 在评估微血管病变方面更具优势。Xiao 等^[24]使用 PAM 能以高分辨率观察大鼠 CNV,虽然可以直观地看到眼内血管图像,但是难以区分早期新生血管与相邻血管。为了进一步提高早期 CNV 的鉴别能力,最新的研究引入了造影剂,如 GNP 和吲哚菁绿^[25],显著提高了早期发现 CNV 的敏感性和特异性。这对于湿性 ARMD 的早期诊治具有重要的意义。Nguyen 等^[21]通过在色素兔中使用激光诱导 CNV,展示了纵向多模态成像的应用。该研究使用 PAM 与 OCT 结合联用造影剂的成像技术来监测 CNV 的进展,并与其他传统成像方式对比,能够更加精确地区分 CNV 与正常脉络膜血管。造影剂吲哚菁绿使得 CNV 的光声(photoacoustic, PA)信号增加了 59 倍,显著提高了成像的对比度和分辨率。由此可见,造影剂增强的 PAM 成像可以在临床相关的 CNV 动物模型中精确地成像和评估新生血管的形成。多模态成像技术的发展为 CNV 的早期诊断和监测提供了新的工具。未来,随着多模态成像技术的进一步优化,其在临床应用中的价值将更加显著。例如,结合人工智能技术,可以实现 CNV 的自动检测和定量分析,从而提高诊断的准确性和效率。

3.3 视网膜静脉阻塞 临床上有多种成像方法可用于评估视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)、视网膜毛细血管无灌注和视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV),如荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography, FFA)和吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography, ICGA)^[26]。视网膜毛细血管缺血是视网膜缺氧的间接指标,通常由 FFA 评估。但 FFA 只能检测到 50%–60% 的视网膜毛细血管无灌注,区分缺血性和非缺血性视网膜静脉阻塞的能力有限^[27]。Nguyen 等^[26]发现 PAM 联合 OCT 成像系统具有分辨单个微血管的显著能力,PAM 可以无创、无标记地观察单个 RNV。Nguyen 等^[9]还发现通过联合使用 PAM 和 OCT,可以观察和评估在兔眼中由激光诱导局部血流中断形成的 RNV。OCT 侧重于高分辨率的组织结构成像,能够精确定位病变的层次结构,而 PAM 则能够提供功能信息如血氧饱和度、血流量等,实现定量监测。因此,这一光谱成像系统可有效且安全地检测和描述视网膜新生血管疾病^[9]。

3.4 糖尿病视网膜病变 眼部疾病功能性变化常先于结构性变化,检测这些改变有助于了解发病机制、早期诊断和及时治疗眼科疾病^[28]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)与异常的视网膜氧饱和度水平有关^[28]。因此,视网膜氧饱和度的精确测量对于 DR 的诊断和监测

有一定的价值。既往使用如扫描激光检眼镜和 OCT 等方法来评估视网膜氧饱和度^[29],但由于这些方法属于间接测量光吸收,其测量结果的准确性受到各种因素的影响,如血管粗细的变化、颜色和管壁厚度^[30]。例如,已有研究表明,不同的氧饱和度会引起血管直径的变化,这可能会进一步改变来自血管的背向散射光的量,从而影响氧饱和度的测量。虽然测量视网膜血氧饱和度的金标准是使用眼内电极直接测量氧气张力,但是这种方法的侵入性限制了其临床应用,仅可在外科手术过程中使用^[31]。PAM 具有在生物组织中以高分辨率绘制直接光吸收特性图的独特能力,该模式有可能克服当前眼部成像方法在功能性研究中的局限性。Hosseinaee 等^[29]提出了光声遥感(photoacoustic remote sensing, PARS)应用于视网膜内部结构成像,并估算视网膜血管中的氧饱和度。PARS 是一种基于光声信号全光探测的新型成像技术,能够进行血管成像并确定血氧含量。由于氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白产生不同的声学信号,PARS 有可能成为量化视网膜氧饱和度的更准确的工具。此外,在视网膜的微观解剖和微血管成像中 OCT 可以引导 PARS 成像光束,尤其是监测 DR 病变早期的发生与发展。

3.5 眼部恶性肿瘤 光声成像利用体内不同组分吸收性质的不同,譬如黑色素浓度会影响组织的光吸收能力,从而改变超声信号的强度。换言之,检测器探测到的(二维或三维)超声强度空间分布,实际上反映了成像物体内与光吸收相关的病理学信息。由于黑色素瘤细胞产生的黑色素具有较宽的吸收光谱,因此在近红外激光的基本波长,如 1 064 nm 处,OR-PAM 能够以较高的灵敏度检测黑色素瘤细胞^[32]。虽然黑色素在早期黑色素瘤中具有足够的光学对比度,但由于光线穿透深部结构的限制,对晚期黑色素瘤的对比度显得不足。外源性造影剂可以增加 PAM 信号,但外源性造影剂需要经过一系列检测证明是安全的,才能应用于临床^[33]。另一方面, Tserevelakis 等^[34]展示了一个混合显微系统的开发和应用,该系统集成了自发荧光(autofluorescence, AF)和 PA 无标记对比模式,用于区分活检中的眼部肿瘤的良恶性。在结膜痣和葡萄膜黑色素瘤组织切片中进行混合成像,以获取每种分子背景的定量数据。AF 和 PA 信号在空间上相关联,建立了一个新的恶性肿瘤指标,用于监测原发性黑色素瘤。该研究可以用于开发混合对比度检眼镜,估计 AF 和最大振幅投影(maximum amplitude projection, MAP) PA 图像之间的 Pearson 相关系数,良性肿瘤正相关,恶性肿瘤负相关,实现眼部恶性肿瘤的早期诊断。所提出的混合成像方法的优点有高空间分辨率、无标记对比度、技术简易性以及与特定分子背景相关的定量数据提取,可以显著提升当前眼科诊断工具的能力。

3.6 追踪干细胞 干细胞疗法(stem cell therapy, SCT)能够治疗由几种视网膜变性疾病引起的视力丧失。2011 年人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)衍生的 RPE 细胞首次在人体中进行了试验^[35]。试验证明人类诱导的多能干细胞(human-induced pluripotent stem cells, hiPSC)分化成 RPE 细胞具有治疗黄斑变性的巨大潜力,其通过替换 ARMD 和视网膜色素变性中死亡或退化的 RPE 细胞来恢复视力。如何有效传递和移植是获得最佳疗效的关键。大量的研究证明移植的干细胞可以替代疾

病中丢失的细胞。Nguyen 等^[36-38]开发了一种由 PAM 和谱域 OCT (spectrum domain OCT, SD-OCT) 组成的非侵入性快速双模态成像系统。使用低相干干涉测量法, OCT 能够检测反向散射光子, 而 PAM 提供高分辨率和高对比度成像, 并具有较深的穿透深度, 从而实现对于干细胞的有效实时纵向跟踪。最近, Nguyen 等^[16]使用定制的非侵入性 PAM 和 OCT 多模态成像系统对用链状金纳米颗粒 (chainlike gold nanoparticle, CGNP) 标记的 ARPE-19 干细胞进行了纵向跟踪, 即使在最低的细胞浓度下, 当对 CGNP 标记的 ARPE-19 干细胞进行成像时, PAM 和 OCT 对比度也增加了 7 倍。这表明所用的造影剂足够敏感, 可以有效追踪干细胞的迁移。GNPs 结合 PAM 技术已经能够追踪移植 RPE 细胞, 并有望实现全面监测移植 RPE 细胞在宿主体内的功能和行为, 这对于推动干细胞再生治疗领域的进一步发展具有重要意义。然而实验所使用的新西兰白兔因其白化特性和独特的眼部色素分布, 与人类存在显著差异^[39]。这种差异可能影响实验结果向人体的推广。因此, 未来的研究可考虑采用更广泛的动物模型或增加与眼部色素相关的因素。

4 问题与展望

4.1 问题 激光和超声能量的安全性是首要考虑的问题。Delori 等^[40]和 Organisciak 等^[41]的研究表明, 高强度的激发激光可能会导致热声损伤或光化学损伤。目前的 PAM-OCT 系统是利用可见激发波长来靶向血液中的氧合和脱氧血红蛋白。然而, 激光的安全阈值在可见光范围比在近红外光谱范围更严格。

多模态成像系统需要不同类型的激发光源, 例如 Tian 等^[42]在其研究中采用了两种不同的激光光源, 这需要进行协调对准和同步操作, 可能会花费较多时间。为了解决这一问题, Liu 等^[43]采用单一超快激光源同时进行 PAM 和 OCT 成像。

光声成像中的另一个关键问题是确保超声波在换能器与目标组织之间的有效耦合, 以增强 PAM 信号的检测效果。尤其是在进行眼部成像 (如视网膜和角膜检查) 时, 这一问题尤为重要。眼组织的特殊解剖结构和高灵敏度使得有效的声耦合更加具有挑战性。当前的研究广泛采用水基液体和超声凝胶作为声耦合介质, 这有助于在眼部成像中提高检测到的声信号幅度。然而, 眼部成像面临的额外问题还包括保持角膜的透明性以及避免在耦合过程中引入气泡或杂质, 这些因素都会显著影响成像质量。此外, 在视网膜检查中, 信号耦合的效率与眼球运动及组织层次的复杂性密切相关, 需要通过精确定位和稳定扫描来确保成像效果。因此, 解决这些耦合问题对实现高分辨率、稳定的视网膜和角膜成像至关重要^[44-46]。

为提高早期新生血管的成像, 需要在静脉注入造影剂。因此, 有必要对体内外源性造影剂的代谢和长期安全性进行深入研究。外源性纳米粒子被静脉注射后会被免疫系统识别和捕获, 并在网状内皮系统、肝脏和脾脏中大量积聚。Mitchell 等^[47]报道了尺寸小于 10 nm 的 GNP 会被肾脏快速消除。通过改变 GNPs 的外形如改成超微型链状金纳米粒子簇 (ultraminiature chain-like gold nanoparticle clusters, UCGNC) 可以解决这个问题。UCGNC 能够产生更强的光声信号, 具有易于控制的表面功能化且合成方法为安全环保的脉冲激光烧蚀。

4.2 展望 PAM 相较于 OCT 具有多重优势: (1) PAM 几乎无伪影干扰, 而目前最先进的扫频源光学相干断层扫描血管成像 (swept-source optical coherence tomography angiography, SS-OCTA) 虽然通过算法改进了成像质量, 但仍难以完全消除伪影, 且对患者屈光介质状态要求较高^[48]。(2) PAM 能与新型纳米造影剂结合, 进一步改善成像。

总的来说, PAM 的可扩展性如联合其他技术进行多模态成像和利用不同造影剂使其成为一项极具前景的技术, 在生物医学领域中具有广泛的应用潜力, 其应用范围可覆盖人体器官检查至单个细胞成像。尤为突出的是, PAM 的功能性成像能够定量获取血红蛋白浓度、氧代谢率、血流速度及血氧饱和度等疾病关键参数^[49], 为精准诊疗提供重要依据。然而, 现有的 PAM 系统仍需在动态实时成像等方面进一步优化, 尤其是对血管结构实时评估。

还需进一步改进的方面包括如何在不牺牲成像灵敏度和成像范围的情况下提高光声成像的速度以及如何使 PAM 系统小型化、集成化和便携化。尽管本综述强调了 PAM 的优点, 但该技术尚未在大规模临床研究中用作诊断辅助工具, 目前 PAM 的研究局限于动物实验和临床前研究。通过提高成像深度和分辨率、推进造影剂和分子探针的研发、实现多模态协同成像及动态实时监测, PAM 有望在灵敏度、特异性和临床适用性等方面实现跨越式发展。相信随着技术的优化和发展, PAM 可广泛应用于临床, 这一成像技术将在眼科临床实践中发挥更为重要的作用。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 刘楚论文选题与修改, 初稿撰写; 张正威选题指导, 论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] 张建辉, 陈宁波, 王柏权, 等. 光声显微成像技术的研究进展. 数据采集与处理, 2019, 34(5): 771-788.
- [2] 张睿, 杨萌, 姜玉新. 光声成像技术及其临床应用. 协和医学杂志, 2019, 10(4): 381-386.
- [3] Samanta D, Paul S, Paramanick A, et al. High-resolution imaging of the whole eye with photoacoustic microscopy. Opt Lett, 2023, 48(13): 3443-3446.
- [4] Tian C, Qian W, Shao X, et al. Plasmonic nanoparticles with quantitatively controlled bioconjugation for photoacoustic imaging of live cancer cells. Adv Sci (Weinh), 2016, 3(12): 1600237.
- [5] Barbosa RCS, Mendes PM. A comprehensive review on photoacoustic-based devices for biomedical applications. Sensors (Basel), 2022, 22(23): 9541.
- [6] Nguyen VP, Zhe J, Hu J, et al. Molecular and cellular imaging of the eye. Biomed Opt Express, 2024, 15(1): 360-386.
- [7] 龙晓云, 田超. 生物医学光声显微成像: 技术和应用进展. 中国激光, 2020, 47(2): 207-221.
- [8] Zhang HF, Puliafito CA, Jiao SL. Photoacoustic ophthalmoscopy for *in vivo* retinal imaging: current status and prospects. Ophthalmic Surg Lasers Imaging, 2011, 42(0): S106-S115.
- [9] Nguyen VP, Li YX, Zhang W, et al. Multi-wavelength, en-face photoacoustic microscopy and optical coherence tomography imaging for early and selective detection of laser induced retinal vein occlusion. Biomed Opt Express, 2018, 9(12): 5915-5938.
- [10] Nguyen VP, Qian W, Zhe J, et al. Renally clearable ultraminiature

chain-like gold nanoparticle clusters for multimodal molecular imaging of choroidal neovascularization. *Adv Mater*, 2023,35(31):e2302069.

[11] Nguyen VP, Hu J, Zhe J, et al. Advanced nanomaterials for imaging of eye diseases. *ADMET DMPK*, 2024,12(2):269-298.

[12] Nguyen VP, Li YX, Henry J, et al. Gold nanorod enhanced photoacoustic microscopy and optical coherence tomography of choroidal neovascularization. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13 (34): 40214-40228.

[13] Jiao S, Jiang M, Hu J, et al. Photoacoustic ophthalmoscopy for *in vivo* retinal imaging. *Opt Express*, 2010,18(4):3967-3972.

[14] Song W, Wei Q, Liu T, et al. Integrating photoacoustic ophthalmoscopy with scanning laser ophthalmoscopy, optical coherence tomography, and fluorescein angiography for a multimodal retinal imaging platform. *J Biomed Opt*, 2012,17(6):061206.

[15] Nguyen VP, Zhu TY, Henry J, et al. Multimodal *in vivo* imaging of retinal and choroidal vascular occlusion. *Photonics*, 2022,9(3):201.

[16] Nguyen VP, Fan W, Zhu T, et al. Long-term, noninvasive *in vivo* tracking of progenitor cells using multimodality photoacoustic, optical coherence tomography, and fluorescence imaging. *ACS Nano*, 2021, 15(8):13289-13306.

[17] Faber DJ, Mik EG, Aalders MC, et al. Light absorption of (oxy-) hemoglobin assessed by spectroscopic optical coherence tomography. *Opt Lett*, 2003,28(16):1436-1438.

[18] Liu WZ, Schultz KM, Zhang K, et al. *In vivo* corneal neovascularization imaging by optical - resolution photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 2014,2(2):81-86.

[19] Song W, Wei Q, Liu WZ, et al. A combined method to quantify the retinal metabolic rate of oxygen using photoacoustic ophthalmoscopy and optical coherence tomography. *Sci Rep*, 2014,4:6525.

[20] Chu CC, Yu JW, Ren E, et al. Multimodal photoacoustic imaging-guided regression of corneal neovascularization; a non-invasive and safe strategy. *Adv Sci (Weinh)*, 2020,7(14):2000346.

[21] Nguyen VP, Henry J, Zhe J, et al. Multimodal imaging of laser-induced choroidal neovascularization in pigmented rabbits. *Sci Rep*, 2023,13(1):8396.

[22] Faes L, Bijon J, Bacci T, et al. Review of type 3 macular neovascularization in age-related macular degeneration; no DRAMA (Deep Retinal Age-related Microvascular Anomalies). *Eye*, 2024.

[23] 张逸非, 都婉红, 赵梅生, 等. OCTA 检测高度近视患者视网膜脉络膜厚度及血流变化的研究进展. *国际眼科杂志*, 2023,23(4):597-601.

[24] Xiao MC, Dai CX, Li L, et al. Evaluation of retinal pigment epithelium and choroidal neovascularization in rats using laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy. *Ophthalmic Res*, 2020,63(3):271-283.

[25] Park S, Nguyen VP, Wang X, et al. Gold Nanoparticles for Retinal Molecular Optical Imaging. *Int J Mol Sci*, 2024,25(17):9315.

[26] Nguyen VP, Li YX, Zhang W, et al. High-resolution multimodal photoacoustic microscopy and optical coherence tomography image-guided laser induced branch retinal vein occlusion in living rabbits. *Sci Rep*, 2019,9(1):10560.

[27] Uddin MI, Jayagopal A, McCollum GW, et al. *In vivo* imaging of retinal hypoxia using HYPOX-4-dependent fluorescence in a mouse model of laser-induced retinal vein occlusion (RVO). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017,58(9):3818-3824.

[28] Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 2012,366(13):1227-1239.

[29] Hosseinaee Z, Nima Abbasi, Pellegrino N, et al. Functional and structural ophthalmic imaging using noncontact multimodal photoacoustic remote sensing microscopy and optical coherence tomography. *Sci Rep*, 2021,11(1):11466.

[30] Hammer M, Vilser W, Riemer T, et al. Retinal vessel oximetry-

calibration, compensation for vessel diameter and fundus pigmentation, and reproducibility. *J Biomed Opt*, 2008,13(5):054015.

[31] Chen SY, Shu X, Nesper PL, et al. Retinal oximetry in humans using visible-light optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*, 2017,8(3):1415-1429.

[32] Hirasawa T, Tachi K, Ishikawa T, et al. Photoacoustic microscopy for real-time monitoring of near-infrared optical absorbers inside biological tissue. *J Biomed Opt*, 2024,29(Suppl 1):S11527.

[33] Fakhoury JW, Lara JB, Manwar R, et al. Photoacoustic imaging for cutaneous melanoma assessment: a comprehensive review. *J Biomed Opt*, 2024,29(suppl 1):S11518.

[34] Tserevelakis GJ, Mavrakis KG, Pantazopoulou D, et al. Hybrid autofluorescence and photoacoustic label-free microscopy for the investigation and identification of malignancies in ocular biopsies. *Opt Lett*, 2020,45(20):5748-5751.

[35] Falkner-Radler CI, Krebs I, Glittenberg C, et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation; outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol*, 2011,95(3):370-375.

[36] Nguyen VP, Li YX, Qian W, et al. Contrast agent enhanced multimodal photoacoustic microscopy and optical coherence tomography for imaging of rabbit choroidal and retinal vessels *in vivo*. *Sci Rep*, 2019, 9(1):5945.

[37] Tian C, Zhang W, Nguyen VP, et al. Integrated photoacoustic microscopy, optical coherence tomography, and fluorescence microscopy for multimodal chorioretinal imaging. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*, 2018, 10494:104945U.

[38] Dhada KS, Hernandez DS, Suggs LJ. *In vivo* photoacoustic tracking of mesenchymal stem cell viability. *ACS Nano*, 2019, 13 (7): 7791-7799.

[39] Nguyen VP, Karoukis AJ, Qian W, et al. Multimodal imaging-guided stem cell ocular treatment. *ACS Nano*, 2024, 18 (23): 14893-14906.

[40] Delori FC, Webb RH, Sliney DH, et al. Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 2007,24(5):1250-1265.

[41] Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res*, 2010,29(2):113-134.

[42] Tian C, Zhang W, Nguyen VP, et al. Novel photoacoustic microscopy and optical coherence tomography dual-modality chorioretinal imaging in living rabbit eyes. *J Vis Exp*, 2018(132):57135.

[43] Liu XJ, Liu T, Wen R, et al. Optical coherence photoacoustic microscopy for *in vivo* multimodal retinal imaging. *Opt Lett*, 2015,40(7):1370-1373.

[44] Tian C, Zhang W, Mordovanakis A, et al. Noninvasive chorioretinal imaging in living rabbits using integrated photoacoustic microscopy and optical coherence tomography. *Opt Express*, 2017, 25(14):15947-15955.

[45] Nguyen VP, Oh J, Park S, et al. Feasibility of photoacoustic evaluations on dual-thermal treatment of *ex vivo* bladder tumors. *J Biophotonics*, 2017,10(4):577-588.

[46] Xie DY, Li Q, Gao QX, et al. *In vivo* blind-deconvolution photoacoustic ophthalmoscopy with total variation regularization. *J Biophotonics*, 2018,11(9):e201700360.

[47] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(2):101-124.

[48] 王曦, 黄潇颖, 周言, 等. 扫频源光学相干断层扫描血管成像在眼科临床中的应用进展. *国际眼科杂志*, 2024,24(2):255-259.

[49] Yao JJ, Maslov KI, Zhang Y, et al. Label-free oxygen-metabolic photoacoustic microscopy *in vivo*. *J Biomed Opt*, 2011,16(7):076003.