

文章编号: 0258-7025(2006)12-1699-05

# 飞秒激光对离体兔巩膜的光离解作用

姜发纲<sup>1</sup>, 杨晓波<sup>1</sup>, 戴能利<sup>2</sup>, 陆培祥<sup>2</sup>, 龙 华<sup>2</sup>, 崔 凌<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科, 湖北 武汉 430022)  
(<sup>2</sup> 华中科技大学激光技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘要** 为探索飞秒激光在兔眼巩膜上产生光离解作用的可行性,并寻找适当的激光切割方式及相关参数,将不同脉冲能量的飞秒激光(800 nm/50 fs)聚焦后作用于离体兔眼巩膜。通过计算机控制的三维平台的定向移动,飞秒激光能够在兔眼巩膜上完成打孔、蛇形扫描和线性切割三种方式的光离解作用。应用光学显微镜和扫描电镜(SEM)观察激光作用后巩膜的形态学变化,并用Nd:YAG激光作为对比。实验结果表明,飞秒激光经过显微物镜(NA:0.2)聚焦后,当其功率密度达到或超过 $9.55 \times 10^{14}$  W/cm<sup>2</sup>,脉冲能量在37.5~125 μJ变化时,激光以0.1 mm/s的速度线性扫描巩膜能形成深度为30~70 μm的沟道;当激光的功率密度减小至 $7.96 \times 10^{14}$  W/cm<sup>2</sup>,脉冲能量小于31.25 μJ/pulse时,在相同条件下却不能产生光离解作用。与Nd:YAG激光相比,飞秒激光在兔眼巩膜上切割瘘道的内壁更加光滑整齐,对周围的组织损伤更小。飞秒激光对离体兔眼巩膜高精度和微创的光离解作用,预示了它在未来青光眼治疗中有潜在的应用价值。

**关键词** 医学光学与生物技术;飞秒激光;光离解作用;巩膜

中图分类号 Q 631;R 779.63 文献标识码 A

## Femtosecond Laser Photodisruption in the Rabbit Sclera

JIANG Fa-gang<sup>1</sup>, YANG Xiao-bo<sup>1</sup>, DAI Neng-li<sup>2</sup>,

LU Pei-xiang<sup>2</sup>, LONG Hua<sup>2</sup>, CUI Ling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China  
<sup>2</sup>State Key Laboratory of Laser Technology,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

**Abstract** In order to explore the possibility of photodisruption in rabbit sclera by femtosecond laser and to seek the appropriate ways of incision and relevant parameters, femtosecond laser (800 nm/50 fs) with different pulse energies was applied to irritate rabbit sclera in vitro. By moving a three-axis, computer-controlled translation stage to which the sample was attached, femtosecond laser could achieve three types of incisions, including transscleral channel, snake pattern and linear cutting. The irritated sclera was observed by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). In comparison with femtosecond laser, Nd:YAG laser was used as control. It was shown that through a 0.2 numerical aperture (NA) objective lens, femtosecond laser with the power intensity larger than  $9.55 \times 10^{14}$  W/cm<sup>2</sup> and the pulse energies ranging from 37.5 to 125 μJ could achieve cuttings with the depth from 30 to 70 μm after linearly scanning on the sclera at the speed of 0.1 mm/s. Whereas, it failed to make any photodisruption if laser power intensity was below  $7.96 \times 10^{14}$  W/cm<sup>2</sup> or the pulse energy was less than 31.25 μJ under the same condition. Comparing with Nd:YAG laser, the inner wall of channel was smoother and the damage to surrounding tissues was slighter by femtosecond laser. The high precision and minimal damage to surrounding tissues with femtosecond laser predicted its potential use in the treatment of glaucoma.

**Key words** medical optics and biotechnology; femtosecond laser; photodisruption; sclera

收稿日期:2006-02-16;收到修改稿日期:2006-07-11

作者简介:姜发纲(1964—),男,湖北随州人,华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科教授,博士生导师,主要从事青光眼、眼眶肿瘤和眼外伤的研究。E-mail:fgjiang@hotmail.com

## 1 引 言

脉宽在纳秒或皮秒范围的 Nd:YAG 激光, Er:YAG 激光以及准分子激光应用于巩膜造瘘术, 往往由于脉冲能量过大、激光作用时间过长而引起巩膜及其周围组织明显的热损伤和机械损伤, 导致术后纤维组织增生, 瘢痕组织形成堵塞滤过口, 造成手术的失败<sup>[1]</sup>。飞秒激光是过去二十年间由激光科学发展起来的最强有力的新工具之一, 可以产生极高的瞬间功率密度, 并且在极短的时间范围内把能量沉积到作用物质。由于其作用时间远远小于电子向晶格的热弛豫时间, 因此飞秒激光作用物质的热效应区域极小, 使得其在生物治疗领域有明显优势<sup>[2,3]</sup>。但是, 飞秒激光在眼科中的应用研究还相对较少, 目前主要用于屈光手术中制作精美的角膜瓣<sup>[4]</sup>。

在本实验中, 应用飞秒激光切割巩膜, 探讨飞秒激光在离体水合兔巩膜上产生光离解作用的可行性、可能的激光作用方式以及相关的激光参数, 为飞秒激光在巩膜造瘘术方面的应用研究做准备。

## 2 材料和方法

实验装置如图 1 所示, Ti:sapphire 激光系统输出激光的脉冲宽度为  $50 \pm 5$  fs, 中心波长为 800 nm, 重复频率为 1 kHz, 单脉冲能量可通过偏振片 (P. R. A. F.) 在 0~2 mJ 连续可调。经过数值孔径 (NA) 为 0.2 的显微物镜聚焦后, 激光作用到巩膜组织表面, 光斑尺寸  $10 \mu\text{m}$ 。通过 CCD 成像技术观察飞秒激光对巩膜组织的切割过程<sup>[5]</sup>。经耳缘静脉快速推注过量 20% 乌拉坦处死白兔。新鲜摘除兔眼球, 切取角膜缘后约  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  大小、完整厚度的巩膜标本。清洁巩膜表面后, 将巩膜片置于生理盐水中使其保持接近于生理条件的水合状态备用<sup>[6]</sup>。

如图 2 所示, 水合巩膜片被固定在两块清洁的

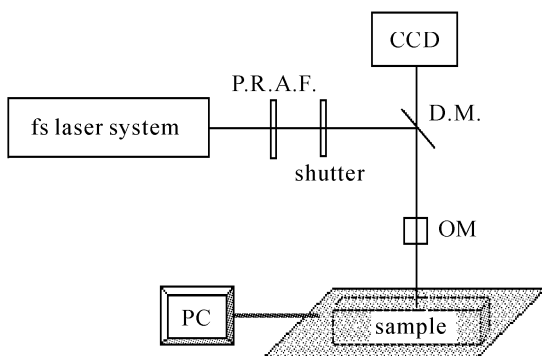


图 1 飞秒激光实验装置

Fig. 1 Femtosecond laser processing system

显微镜载玻片之间, 每块载玻片厚约 1 mm。标本被置于计算机控制的三维平台上<sup>[7]</sup>。通过控制平台在水平方向上的移动速度来改变光斑在巩膜片上移动的速度。激光作用后的巩膜经固定、脱水等处理后在光学显微镜或扫描电镜 (SEM) 下观察组织的形态学变化。

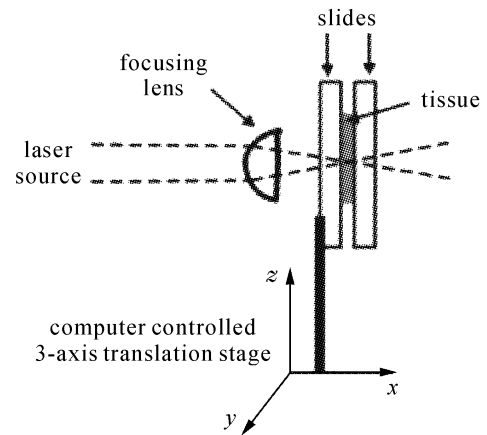


图 2 三维控制平台和巩膜标本的放置

Fig. 2 Three-axis translation stage and the sample arrangement

用 U-3310 型分光光度计测试兔眼离体水合巩膜在可见光和近红外区的透光率。

应用 800 nm/50 fs/1 kHz 的飞秒激光线性切割水合巩膜的内表面, 激光焦点位于巩膜表面下  $100 \mu\text{m}$ 。线性切割能量在  $6.25 \sim 31.25 \mu\text{J}/\text{pulse}$  的范围内变化, 激光在巩膜表面的最大功率密度为  $7.96 \times 10^{14} \text{ W}/\text{cm}^2$ 。共切割 11 条直线, 激光在每条直线上只扫描一次。线性切割的长度设为 2 mm, 光斑移动速度为  $v = 0.1 \text{ mm}/\text{s}$ 。

增大激光脉冲能量, 使其功率密度达到和超过  $9.55 \times 10^{14} \text{ W}/\text{cm}^2$ 。激光焦点位于巩膜表面下  $500 \mu\text{m}$ 。共切割 11 条直线, 切割第一条直线的能量设为  $125 \mu\text{J}/\text{pulse}$ , 以后每切割一条直线能量递减  $12.5 \mu\text{J}$ , 直到切割第 8 条直线时激光能量减小为  $37.5 \mu\text{J}/\text{pulse}$ , 激光在每条线上均只扫描一次。切割最后 3 条直线时, 激光能量固定为  $75 \mu\text{J}/\text{pulse}$ , 激光扫描的次数依次为 2 次, 3 次和 4 次。切口长度均设为 2 mm。光斑移动速度  $v = 0.1 \text{ mm}/\text{s}$ 。

应用脉冲能量  $200 \mu\text{J}$  的飞秒激光在巩膜内表面上打孔<sup>[8]</sup>。激光焦点位于巩膜表面下  $200 \mu\text{m}$ , 作用时间 4 ms。

应用脉冲能量  $300 \mu\text{J}$  的飞秒激光蛇形扫描巩膜内表面, 激光焦点位于巩膜表面下  $200 \mu\text{m}$ , 光斑的移动速度为  $50 \mu\text{m}/\text{s}$ 。

用脉冲能量  $450 \mu\text{J}$  的飞秒激光进行兔眼巩膜的全层造瘘<sup>[9]</sup>, 光斑在巩膜表面的移动速度为  $0.13 \text{ mm/s}$ 。另外, 应用脉冲能量  $10 \text{ mJ}$  的 Nd:YAG 激光进行巩膜的全层造瘘作为对照。标本制成 hematoxylin and eosin (H&E) 染色切片, 用于光镜观察。

### 3 实验结果

#### 3.1 离体水合巩膜的透光率

图 3 表明, 可见光区和近红外区水合巩膜对激光的透过率随着波长的增加而增大, 但总的来说一直处于较低的水平。水合巩膜在  $800 \text{ nm}$  波长处的透过率仅约为  $0.68\%$ , 说明该波长的激光通过水合巩膜时, 大部分能量被散射和吸收。

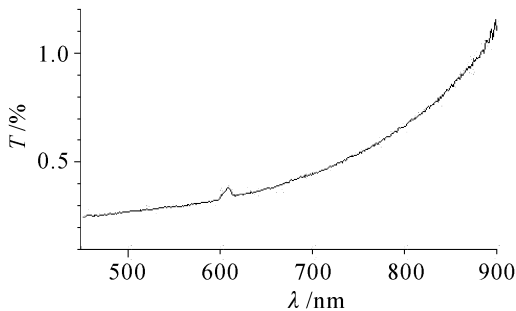


图 3 离体水合巩膜在可见光区和近红外区的透光率

Fig. 3 Transmission spectrum of hydrated sclera in vitro at the range of visible light and near infrared

#### 3.2 飞秒激光在水合巩膜上的线性切割

扫描电镜下观察  $6.25 \sim 31.25 \mu\text{J/pulse}$  飞秒激光线性扫描后巩膜的纵切面, 可见巩膜内表面光滑完整, 内表面及其下层组织未发生任何可见的形态学改变。实验结果表明当飞秒激光作用于巩膜的功率密度小于  $7.96 \times 10^{14} \text{ W/cm}^2$  时, 尚不能达到引起组织光离解所需的损伤阈值, 巩膜组织不会产生任何光离解效应。

图 4(a) 显示在增大脉冲能量后, 飞秒激光在巩膜上产生的光离解效应。线性切割所用的脉冲能量如图中所示。激光在每条切口上均只扫描一次。切口深度从左向右依次为  $70 \mu\text{m}$ ,  $65 \mu\text{m}$ ,  $55 \mu\text{m}$ ,  $50 \mu\text{m}$  和  $45 \mu\text{m}$ 。

图 4(b) 中四条切口的深度由左向右依次为  $30 \mu\text{m}$ ,  $45 \mu\text{m}$ ,  $65 \mu\text{m}$  和  $130 \mu\text{m}$  (全层巩膜切割), 切割每条切口所用的能量和激光扫描次数如图中所示。实验结果表明在脉冲能量一定时, 切口深度随着激光扫描次数的增加而增加, 并在以固定能量

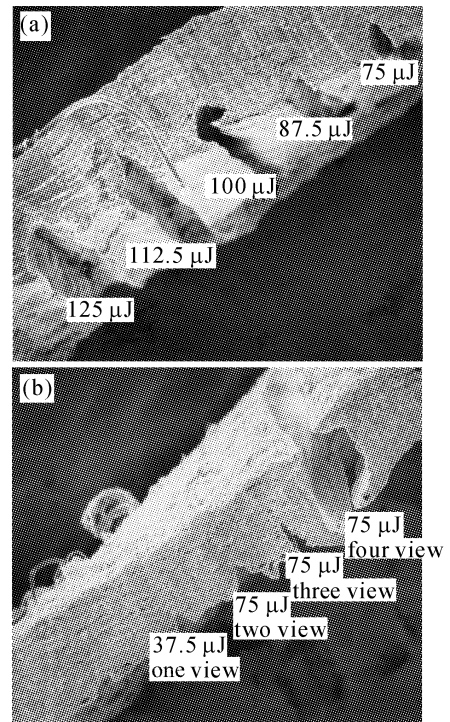


图 4 增大脉冲能量后飞秒激光切割巩膜组织的纵切面  
Fig. 4 SEM of longitudinal section of hydrated sclera after ablated by femtosecond laser with larger pulse energies

(a)  $121\times$ ; (b)  $100\times$

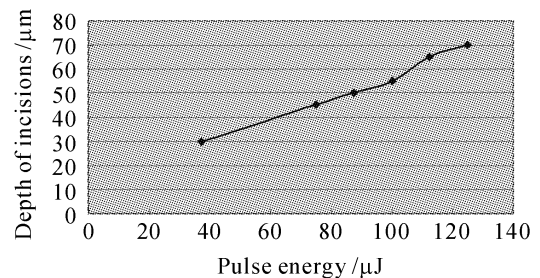


图 5 激光能量对切口深度的影响

Fig. 5 Effects of pulse energy on the depth of incisions

$75 \mu\text{J/pulse}$  四次扫描后完成巩膜的全层切割。

根据激光单次扫描时脉冲能量与切口深度的关系, 绘制出如图 5 所示的散点图。在其他参数不变的情况下, 当飞秒激光的脉冲能量在  $37.5 \sim 125 \mu\text{J}$  范围内变化时, 激光切口的深度与脉冲能量呈近似线性关系。

从图 4 扫描电镜图中, 可以看到飞秒激光切割沟道的内壁光滑整齐, 沟道周围的组织基本保持原有的形态结构, 未出现明显的热损伤和机械损伤。

#### 3.3 飞秒激光在水合巩膜上隧道的开凿

图 6 为飞秒激光在离体水合巩膜上打孔的扫描电镜图, 可以看到, 隧道呈规则的管状, 内壁光滑。隧道开口处和隧道内只产生极少量的组织碎片, 隧

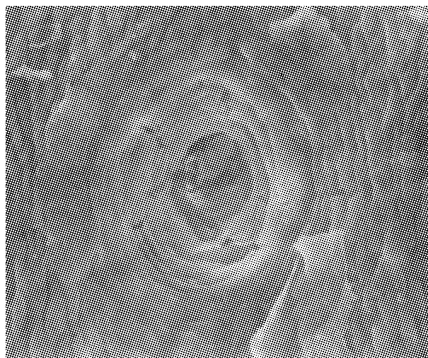


图 6 飞秒激光在离体水合巩膜上打孔的扫描电镜图(1000×)

Fig. 6 SEM of femtosecond laser created channel in hydrated sclera in vitro (1000×)

道通畅。隧道周围组织的损伤不明显。

### 3.4 飞秒激光对水合巩膜的蛇形切割

图 7(a)显示飞秒激光蛇形扫描巩膜后完成的 200 μm×200 μm 大小的方形蚀除。图 7(b)显示激光蛇形扫描的模式图。通过改变激光的脉冲能量或光斑的移动速度,飞秒激光可以蚀除不同厚度的巩膜组织,使巩膜受到不同程度的削薄。

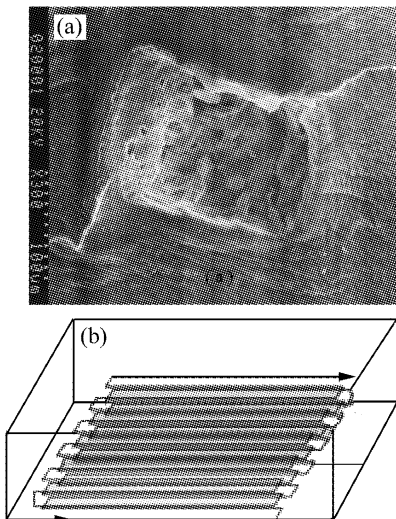


图 7 飞秒激光蛇形切割巩膜的扫描电镜图(300×)(a)和飞秒激光的扫描模式图(b)

Fig. 7 SEM of femtosecond laser created snake pattern (300×) (a) and raster pattern of the laser (b) focus in hydrated sclera in vitro

### 3.5 飞秒激光和 Nd:YAG 激光在离体兔眼球上巩膜造瘘的比较

图 8(a),(b)分别显示飞秒激光和 Nd:YAG 激光在离体兔眼球上完成巩膜全层造瘘的光学显微镜图像。每 220 至 250 个 Nd:YAG 激光脉冲可以完成巩膜的全层造瘘。

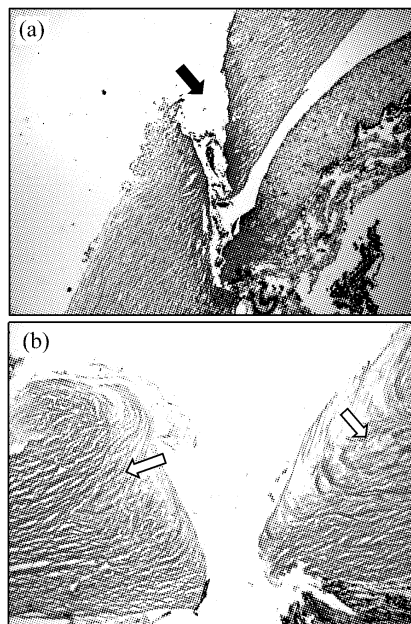


图 8 飞秒激光(100×)(a)和 Nd:YAG 激光(200×)(b)巩膜造瘘的光学显微镜图像

Fig. 8 Light microscopy of sclera fistula created by femtosecond laser (100×) (a) and by Nd:YAG laser (200×) (b)

光学显微镜下可见,飞秒激光切割形成的瘘道内壁(图 8(a)中黑箭头所示)光滑整齐,瘘道周围的巩膜组织几乎未发生损伤,依然保持其正常致密的胶原纤维结构。而 Nd:YAG 激光切割瘘道的周围组织呈毛边状,损伤明显,胶原纤维排列疏松紊乱,失去正常致密的形态结构(图 8(b)中白箭头所示)。

## 4 结 论

### 4.1 飞秒激光切割生物组织的作用原理

飞秒激光对生物组织的蚀除机制依赖于光离解效应。当飞秒激光照射到组织的功率密度达到或超过组织的损伤阈值时,首先会产生多光子吸收,使被辐射组织原子中的电子在吸收足够的光子能量后跃迁到更高能级态,随着高能级电子的不断积累,最终形成等离子体微爆,诱导组织的光离解效应,实现组织的碎裂和去除<sup>[10]</sup>。

由于飞秒激光超短的脉冲持续时间,实验应用脉冲能量在微焦耳量级(10<sup>-6</sup> J)的脉冲激光,经过聚焦后也能达到极高的瞬间功率密度(10<sup>14</sup> W/cm<sup>2</sup>)。当把这种超高功率密度的飞秒激光作用于靶组织时,利用飞秒激光的光离解效应,可以在巩膜、角膜、牙齿等多种生物材料上完成具有高精度性和微创性的手术切口<sup>[10]</sup>。

## 4.2 巩膜的透光性对光离解作用的影响

与透明的角膜不同, 巩膜在生理状态下呈瓷白色, 含有丰富的水和蛋白质。这些性质决定了生理状态下的巩膜组织对光的透过率不会太高。Sacks 等通过对巩膜脱水<sup>[7]</sup>和增加激光的波长来增大巩膜对光谱的透过率。并且应用 1700 nm 波长的飞秒激光在离体人水合巩膜片上完成了不损伤表层组织的表面下切割, 这种切割方式能够有效避免切口上层组织的损伤, 最大限度地减少术后表面瘢痕的形成<sup>[6]</sup>。

由于离体水合巩膜对 800 nm 波长激光的透过率太低, 激光在巩膜表面下不能被有效聚焦, 因此飞秒激光要在巩膜表面下产生光离解效应就需要较高的能量。此时激光在通过的表层组织中的能量已经超过引起组织光离解所需的能量阈值。因此在应用 800 nm 高能量飞秒激光完成巩膜表面下组织切割的同时, 也会引起表层组织的光学分解。

## 4.3 飞秒激光在巩膜造瘘术中的应用价值

在该实验中飞秒激光能够很容易地在巩膜上产生多种形式、不同深度的切口, 预示着飞秒激光在临床上可用于削薄或击穿巩膜, 达到有控制地引流房水和降低眼压的目的。脉宽在纳秒或皮秒范围的光离解激光器(如 Nd:YAG 激光)应用于巩膜造瘘术所需的脉冲能量通常为数十甚至上百毫焦耳<sup>[11]</sup>。与之相比, 飞秒激光切割巩膜所需的能量更小(100~400  $\mu\text{J}$ ), 作用时间更短, 瘘道的形态更加规则, 对周围组织的创伤也更小。这些特点都有利于减少激光术后瘢痕的形成和保持滤过道的滤过通畅, 提高手术的成功率。

## 参 考 文 献

- 1 Sami Toyran, Yaoming Liu, Sima Singha *et al.*. Femtosecond laser photodisruption of human trabecular meshwork; an in vitro study [J]. *Exp. Eye Res.*, 2005, **81**(3):298~305
- 2 Xing Qirong, Mao Fanglin, Lang Liying *et al.*. Experiment research on femtosecond laser cell micromanipulation system [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(6):728  
邢岐荣, 毛方林, 郎利影 等. 飞秒激光细胞显微操作系统的实验研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(6):728
- 3 Alfred Vogel, Vasan Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues [J]. *Chem. Rev.*, 2003, **103**(2):577~644
- 4 Perry S. Binder. Flap dimensions created with the IntraLase FS laser [J]. *J. Cataract Refract Surg.*, 2004, **30**(1):26~32
- 5 Xiaofeng Wang, Tianqing Jia, Xiaoxi Li *et al.*. Ablation and ultrafast dynamics of zinc selenide under femtosecond laser irradiation [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2005, **3**(10):615~617
- 6 Zachary S. Sacks, Ronald M. Kurtz, Tibor Juhasz *et al.*. Subsurface photodisruption in human sclera; wavelength dependence [J]. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*, 2003, **34**(2):104~113
- 7 Zachary S. Sacks, Ronald M. Kurtz, Tibor Juhasz. High precision subsurface photodisruption in human sclera [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2002, **7**(3):442~450
- 8 Chen Hongxin, Jia Tianqing, Huang Min *et al.*. Visible-infrared femtosecond laser-induced optical breakdown of 6H SiC [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(3):468~470  
陈洪新, 贾天卿, 黄敏 等. 飞秒激光的波长对 SiC 材料烧蚀的影响[J]. *光学学报*, 2006, **26**(3):468~470
- 9 B. K. A. Ngoi, D. X. Hou, L. H. K. Koh. Femtosecond laser for glaucoma treatment; a study on ablation energy in pig iris [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2005, **19**:218~222
- 10 M. H. Niemz. *Laser-Tissue Interactions Fundamentals and Applications* [M]. Third Edition. Beijing: Science Press, 2005. 92~132  
M. H. 尼姆兹. *激光与生物组织的相互作用原理及应用*[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2005. 92~132
- 11 Zhou Wei, Yang Guohua. Laser sclerostomy treatments for glaucoma [J]. *Ophthalmological Section of Foreign Medical Sciences*, 1997, **21**(3):141~145  
周炜, 杨国华. 激光巩膜造口术治疗青光眼[J]. *国外医学眼科学分册*, 1997, **21**(3):141~145