

## 多光子成像中的生物组织光损伤

梁晓轩<sup>1\*</sup>, Alfred Vogel<sup>1</sup>, 张镇西<sup>2</sup><sup>1</sup>德国吕贝克大学生物医学光学研究所, 德国 吕贝克 23562;<sup>2</sup>西安交通大学生命学院生物医学光子学与传感研究所, 陕西 西安 710049

**摘要** 多光子激发荧光成像技术因低侵入性、强穿透力、高信噪比和高空间分辨率在生物医学光学领域得到广泛的应用,同时也成为最重要的研究工具之一。在多光子成像中过量的光子密度或激光功率会引起生物组织光损伤。光损伤决定了成像所能使用的激光功率的上限。光损伤强度与激光、组织光学参数有关,其背后的作用机制可分为光化学作用和光热作用。重点论述了光损伤的基本原理和形成机制,阐述了光损伤分析数学模型。讨论和分析了不同组织、不同波长下光损伤的一些研究进展。总结了光损伤规律:无色素组织双光子成像中光损伤以光化学作用为主,色素组织双光子成像中光损伤以光热作用为主,三光子深层组织成像中光损伤很可能来自光化学和光热协同作用。展望了降低光损伤和优化成像参数的可行策略。

**关键词** 生物光学; 多光子激发荧光成像; 光损伤; 光毒性; 光化学作用; 光热作用

中图分类号 O437; Q631 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221231

## 1 引言

多光子激发荧光成像技术是基于非线性吸收原理开发而来的一种具有低侵入性、强穿透力、高信噪比和高空间分辨率的成像技术<sup>[1-8]</sup>。多光子成像技术主要包括双光子激发荧光(2PEF)及三光子激发荧光(3PEF)显微成像技术。前者起步较早、发展成熟,在细胞或浅层组织近红外一区成像中使用广泛<sup>[7,9-10]</sup>。随着近年来光纤飞秒激光器的迅速发展,后者在深层组织近红外二区成像中得到越来越广泛的应用<sup>[3-5,11]</sup>。多光子成像技术自问世以来便在肠道疾病<sup>[12-13]</sup>、癌症病理<sup>[10]</sup>、神经疾病<sup>[14]</sup>及脑功能成像<sup>[5]</sup>等方面取得了一系列研究成果,成为生物医学研究的有力工具<sup>[15]</sup>。

多光子生物成像的发明、发展和应用过程有近百年的历史。1931年德裔女物理学家 Göppert-Mayer<sup>[16]</sup>在她的博士论文中提出了双光子吸收的概念。为纪念她在双光子领域的贡献,双光子吸收截面的单位被命名为 GM( $1\text{ GM}=10^{-50}\text{ cm}^4\cdot\text{s}\cdot\text{photon}^{-1}$ )。由于荧光团双光子吸收截面很小( $10^{-2}\sim 10^2\text{ GM}$ )<sup>[8,17]</sup>,因此需要很高的辐照度( $>1\text{ GW}/\text{cm}^2$ )才能得到足够强度的双光子激发。直到1960年 Maiman 发明激光后双光子现象才被科学家们通过实验观察到<sup>[18]</sup>,而直到1990年 Denk 等<sup>[1]</sup>发明 2PEF 后才开始广泛应用在生物组织成像中。

多光子荧光显微技术基本原理如下。处于基态的

荧光团或荧光探针分子/原子在高光子密度入射光激发下同时吸收多个光子后跃迁到激发态,经过弛豫过程跃迁到亚激发态,最后自发辐射回到基态,释放出频率略小于多倍入射光频率的荧光光子<sup>[3]</sup>。为实现高光子密度,多光子成像中常使用飞秒激光脉冲序列以及紧聚焦条件。具体参数为:激光脉冲平均功率 10~100 mW,短脉宽(50~5000 fs),近红外波长(700~1300 nm),高重复率(一般为 80~120 MHz),高数值孔径( $NA>1.0$ ),以及高辐照度( $1\sim 1000\text{ GW}/\text{cm}^2$ )。为获得二维或三维图像,激光光束会在面上或体内逐点扫描,每个像素点驻留一段时间(一般数微秒)以形成有信息的图像<sup>[19]</sup>。关于多光子成像的基本原理、检测方法、成像系统和应用进展等可参阅其他综述<sup>[3-4,10]</sup>。

在 2PEF 发明后不久,科学家们就发现过量的光子密度或激光功率会引起生物组织光损伤<sup>[20-22]</sup>(以下简称“光损伤”),有时也叫光毒性<sup>[23]</sup>、光氧化<sup>[20]</sup>或光压力<sup>[21]</sup>。光损伤现象很普遍,在细胞、离体组织以及在体组织的多光子成像中都能观察到<sup>[12,20-21,24]</sup>。此外,在二次谐波成像<sup>[25]</sup>、拉曼成像<sup>[26]</sup>等其他非线性光学成像中也能观察到光损伤现象。

信噪比决定了多光子成像中所能使用激光功率的下限,而光损伤决定了所能使用激光功率的上限。特别是在在体、无标记成像中,由于内源性荧光团吸收横截面积很小( $\approx 10^{-2}\text{ GM}$ )<sup>[17]</sup>,激光功率在无损成像以及光损伤之间的可调谐范围很窄,仅约 1.5 倍<sup>[12]</sup>。因

收稿日期: 2022-09-13; 修回日期: 2022-10-13; 录用日期: 2022-10-18; 网络首发日期: 2022-11-04

基金项目: 中德合作交流项目(M-0063)、国家自然科学基金(61727823, 61875159)

通信作者: \*x.liang@uni-luebeck.de

此,一个合理的激光功率既要保证能获得足够信息的荧光图像,又要保证细胞或生物组织在长时间照射后依然保持正常功能和活性。降低光损伤和优化成像参数是多光子成像中的一大挑战,光损伤研究对优化成像参数至关重要<sup>[5,27]</sup>。

光损伤强度与很多因素有关,如激光功率、脉冲重复频率、脉宽、波长、照射时间、物镜数值孔径、组织光学参数等。根据激光波长和组织光学参数的不同,其背后的作用机制可以分为光化学作用和光热作用。本文围绕多光子成像中生物组织的光损伤,论述光损伤基本原理和形成机制,阐述光损伤分析数学模型,讨论和分析不同组织、不同波长下光损伤的研究进展,总结光损伤规律,提出降低光损伤和优化成像参数的可行策略。

## 2 光损伤基本原理

### 2.1 光损伤直观概念

在双光子荧光显微镜中所产生的荧光光子密度  $n_{\text{ph}}$  与激发光的辐照度  $I$  和荧光团的双光子吸收横截面  $\sigma_{2\text{PA}}$  的比例关系为

$$n_{\text{ph}} \propto \sigma_{2\text{PA}} I^2. \quad (1)$$

由于  $I$  与激光脉冲能量  $E_L$  和激光脉宽  $\tau_L$  的比例关系为

$$I \propto \frac{E_L}{\tau_L}, \quad (2)$$

因此,在激光脉冲能量一定的情况下,激光脉宽越小,辐照度越大,所产生的荧光强度越强。这是大部分 2PEF 采用飞秒激光源的主要原因。

然而,随着激光能量的提升,荧光强度虽然得到提升,但是生物组织中的水开始被电离,对多光子成像产生很大影响。生物组织中的水含量约为 70%,而水在常态下是一种电离能约为 6.5 eV 的透明宽禁带电介质<sup>[28-29]</sup>。随着激光辐照度的增大,液态水共价电子通过多光子吸收效应激发到导带形成自由电子。自由电子密度  $n_e$  与激发光的辐照度  $I$  和水的多光子吸收横截面  $\sigma_{\text{MPA}}$  的比例关系为

$$n_e \propto \sigma_{\text{MPA}} I^k, \quad (3)$$

式中:  $k$  为多光子阶数。对 800 nm 的激发光(光子能量 1.55 eV)而言,需连续吸收 5 个光子的能量才能将水中价带电子激发到导带,即  $k=5$ 。

当激光辐照度增大到一定程度时,焦平面的荧光团以及水会同时产生非线性吸收,进而引发生物组织光损伤现象。Voronin 等<sup>[25-26]</sup>于 2010 年提出了多光子成像电离“惩罚”的概念,指出在过度增大激光能量时水的电离会不利于多光子成像,如图 1 所示。图 1 中虚线所示为绿色荧光蛋白在 800 nm 激发光照射下产生的荧光光子密度随激光辐照度变化关系,在双对数坐标系下斜率为 2。实线所示为液态水在相同波长激光照射下产生的自由电子密度随激光辐照度变化关系,在双对数坐标系下斜率为 5。由于非线性吸收阶数不

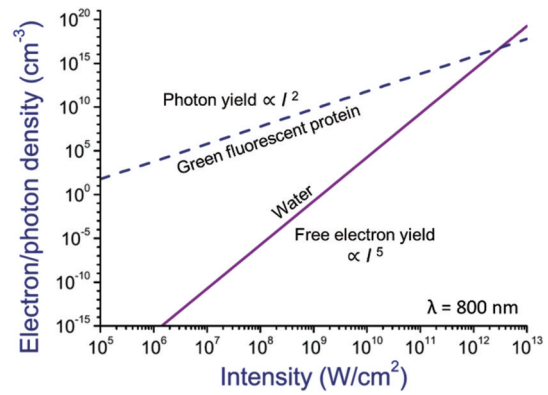


图 1 多光子生物成像中的电离“惩罚”<sup>[25]</sup>。计算参数:绿色荧光蛋白双光子吸收横截面  $\sigma_{2\text{PA}}=6.5 \text{ GM}$ , 溶液浓度 0.1 mmol/L, 荧光量子产率  $\eta=1$ , 水电离能  $U_0=6.5 \text{ eV}$ , 激光波长 800 nm, 激光脉宽 100 fs

Fig. 1 Ionization penalty in multiphoton bioimaging<sup>[25]</sup>. Simulation parameters are as follows: two-photon absorption cross section of green fluorescent protein  $\sigma_{2\text{PA}}=6.5 \text{ GM}$ , 0.1 mmol/L solution, quantum efficiency  $\eta=1$ , ionization potential of water  $U_0=6.5 \text{ eV}$ , laser wavelength  $\lambda=800 \text{ nm}$ , and laser pulse width  $\tau_L=100 \text{ fs}$

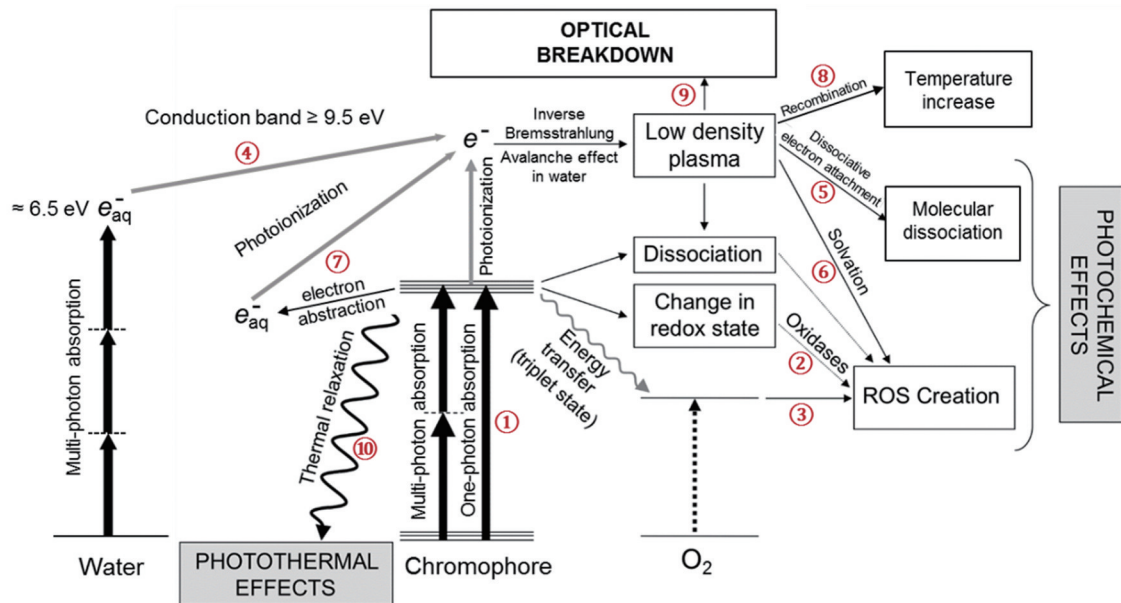
一样,双光子荧光在较小辐照度下就可以产生,但是荧光光子密度随激光辐照度增长相对缓慢;相对而言,水中自由电子激发是五光子吸收,需要较高辐照度才能产生,但是自由电子密度随激光辐照度增长相对较快。两条曲线在辐照度约为  $2 \times 10^{12} \text{ W/cm}^2$  处相交,此时每产生一个荧光光子就会产生一个自由电子。由于自由电子可以破坏生物分子如蛋白质、DNA 等的化学键,造成生物分子损伤<sup>[29-31]</sup>,因此 Voronin 等<sup>[25]</sup>将  $n_e/n_{\text{ph}}=1$  时对应的辐照度定义为光损伤发生的阈值,为光损伤提供了一个直观易懂的概念。

### 2.2 光损伤机理

光损伤机理颇为复杂,整体而言可以分为光化学作用和光热作用。具体而言如图 2 所示,可以分为三类:光氧化引起的化学作用(以下简称光氧化作用),低密度等离子体介导的光化学作用(以下简称等离子体光化学作用),以及发色团线性吸收引起的光热作用(以下简称光热作用)。

光氧化作用主要来自内源/外源性荧光发色团在类 UV-A 激发下产生的化学作用。这里类 UV-A 激发指单光子或双光子吸收后对应的总光子能量位于 320~400 nm 紫外波段即 UV-A 波段的单光子或双光子激发,如图 2 中路径①所示。细胞内有一些发色团既是荧光发色团又是内源性光敏剂,如还原型辅酶 I 或 II[NAD(P)H]、黄素、醌、卟啉和黑色素<sup>[19-20,32]</sup>。这些发色团在适量激发光照射下会产生荧光,在过量光照下会产生光氧化。由于 NAD(P)H 和 黄素多存储在线粒体中,因此 UV-A 激发光化学作用常发生在线粒体内或细胞呼吸链中<sup>[33]</sup>。具体而言,内源性光敏剂在类 UV-A 激发后可以导致活性氧(ROS)的形成,如过



图 2 多光子成像中生物组织光损伤机理示意图<sup>[35]</sup>Fig. 2 Illustration of mechanisms leading to photodamage in multiphoton imaging<sup>[35]</sup>

氧化氢、羟基自由基、过氧化氮和单线态氧<sup>[32]</sup>。这一过程可以通过两种不同的途径发生：I型和II型光氧化过程<sup>[21]</sup>。在第一类反应中，受激光敏剂可以直接与DNA、RNA、蛋白质和脂类等生物大分子底物反应，影响许多不同的细胞功能。此外，在有氧气的情况下，受激光敏剂可以与氧分子反应，形成ROS，如图2中路径②所示。在第二类反应中，受激光敏剂与氧分子之间可以直接发生能量转移并产生单线态氧( $^1O_2$ )，如图2中路径③所示。ROS和 $^1O_2$ 可与DNA或其他细胞结构如膜(脂质)和蛋白质相互作用。所有这些不同类型的损害都可能妨碍细胞的代谢过程，如蛋白质合成和细胞周期的进展，或诱发突变和细胞死亡。该过程与光动力学原理相似<sup>[34]</sup>，有时也称为光动力型化学作用<sup>[22]</sup>。

在双光子成像中，光氧化作用主要影响波长 $\leq 760$  nm的波段，随着激发波长的增大光氧化作用迅速减弱<sup>[20]</sup>。其实，类UV-B(280~320 nm)及类UV-C(200~280 nm)激发光对DNA(吸收峰位于260 nm)有更强烈的光化学作用，可以生成环丁烷嘧啶二聚体(CPD)和嘧啶-嘧啶酮(6-4)光产物(6-4PP)，直接引起DNA损伤<sup>[32,36]</sup>。然而多光子成像中使用的激发波长往往大于700 nm，不在类UV-B及类UV-C激发峰位，一般不会诱发类UV-B及类UV-C光化学作用，因此在本综述中不考虑这一光化学路径。

很长时间以来光氧化作用被认为是光损伤的主要机制<sup>[15,20,22]</sup>，然而近来研究表明等离子体光化学作用在光损伤中扮演着越来越重要的角色<sup>[37-38]</sup>。该作用机制不受波长限制。当激光辐照度增大到一定程度时，焦平面内水分子也会产生非线性吸收。传统上认为液态水是一种无形态宽禁带半导体<sup>[28]</sup>，其电离能约

为6.5 eV<sup>[39]</sup>。最新研究表明液态水的禁带宽度至少为9.5 eV<sup>[40]</sup>，在禁带中有由特殊构型的预陷阱构成的中间能级，能级高度约6.5 eV<sup>[40]</sup>。价带电子通过多光子吸收被激发到中间能级，形成溶剂化电子。溶剂化电子单光子吸收系数很高<sup>[41]</sup>，可以通过上激发至导带形成自由电子。自由电子在与水分子碰撞的过程中通过反向轫致辐射吸收效应获得动能<sup>[29]</sup>。当自由电子动能达到临界值时，自由电子可以与共价电子发生碰撞电离产生两个低能量自由电子<sup>[42]</sup>。这些电子继续反向轫致辐射吸收和碰撞电离的过程，形成电子雪崩效应，进而产生低密度等离子体，如图2中路径④所示。低密度等离子体可以通过两种方式诱发光化学损伤。其一，自由电子通过解离电子附着作用(DEA)造成DNA单链、双链或者碱基损伤，引起突变和细胞凋亡<sup>[30,43]</sup>，如图2中路径⑤所示。最新研究表明预溶电子也能通过DEA作用对DNA造成损伤<sup>[44]</sup>。自由电子还可以通过DEA作用造成蛋白质中氨基酸和多肽解离，引起蛋白质失活<sup>[31]</sup>。其二，自由电子水合或者通过DEA作用使水分子解离时可以产生大量羟基自由基( $\cdot OH$ )<sup>[45-47]</sup>，如图2中路径⑥所示。 $\cdot OH$ 是一种活性氧，可以与DNA、脂质膜和蛋白质反应，妨碍细胞的代谢过程或诱发突变和细胞死亡。有学者利用等离子体光化学损伤特点开展等离子体介导分子改性研究<sup>[48]</sup>及激光癌症疗法<sup>[49]</sup>。

自由电子不仅仅来源于水，光氧化作用中的受激态光敏剂也可能在激发后释放电子到水中形成溶剂化电子，后者通过上激发至导带形成自由电子，如图2中路径⑦所示。因此，光氧化作用与等离子体化学作用往往是紧密关联的<sup>[38]</sup>。

低密度等离子体会与空穴发生复合作用，其能量

会以非辐射方式的热量形式释放出来,引起焦点处温度升高,可能引起光热作用,如图 2 中路径⑧所示。当激光能量继续增大并且等离子体密度超过阈值  $2 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$  时,会发生光致击穿效应<sup>[50-51]</sup>,伴随空化气泡和冲击波等机械效应<sup>[52]</sup>,如图 2 中路径⑨所示。在多光子成像中,由于激光能量往往远低于光致击穿阈值,因此一般不考虑组织的光机械损伤,除非特意利用高能激光进行细胞微手术<sup>[14,53-54]</sup>。

在无色素组织中光化学作用可能是引起光损伤的主要原因,而在光吸收很强的色素组织中光热作用可能更容易造成光损伤。发色团在吸收光子能量后可以通过热弛豫方式释放出来,热量吸收的多少由发色团线性吸收系数决定,如图 2 中路径⑩所示。在 2PEF 中(波长 700~950 nm),光在无色素组织(不含黑色素)内的耗散以散射为主,线性吸收引起的能量沉积很小<sup>[5]</sup>。相对而言,在含有黑色素的色素组织中,如皮肤、视网膜,由于黑色素的吸收系数非常高<sup>[55]</sup>,色素组织很可能在线性吸收后温度大幅上升。过高的温度可以引起组织的光热作用,导致蛋白质变性<sup>[56]</sup>之类的损伤,或引起热机械效应如空泡形成<sup>[57-58]</sup>、热弹性压力波<sup>[59]</sup>。

### 3 光损伤分析数学模型

#### 3.1 激光诱导自由电子能量谱及累积辐射剂量

光氧化作用与等离子体光化学作用有一定的相似性,都会产生活性氧。不同之处在于等离子体光化学作用中既有·OH引起的氧化作用,也有自由电子引起的还原作用。有研究表明后者可能强于前者<sup>[44]</sup>。为评估光化学作用,可以通过数学模型模拟飞秒激光在水中产生的自由电子能量谱<sup>[60]</sup>。

能量谱含有两个重要参数:自由电子数量密度  $n_{\text{total}} (\text{cm}^{-3})$  及自由电子平均动能  $\epsilon_{\text{avg}} (\text{eV})$ 。前者描述了单个激光脉冲引起的聚焦区域内自由电子的数量,后者描述了自由电子对生物分子化学键潜在的解离能力。自由电子动能越高,其潜在的化学键解离能力越强,造成的光损伤越强。当自由电子动能小于 5 eV 时可以引起 DNA 单链断裂<sup>[61]</sup>,而自由电子动能大于 5 eV 时可有效地引起 DNA 双链断裂(DSB)和涉及多碱基损伤的非 DSB 集群损伤<sup>[30,43]</sup>,当自由电子动能大于 6 eV 时甚至可解离水分子并产生具有一定动能的·OH<sup>[46]</sup>。

激光诱导水中自由电子能量谱可以通过优化后的多速率方程<sup>[50,60]</sup>描述为

$$\begin{cases} \dot{n}_0 = \dot{n}_{\text{SF1}} \cdot \frac{n_{\text{val}}}{n_{\text{bound}}} - W_{\text{lpt}} \cdot n_0 + \sum_{j'=1}^{k_{\text{crit}}} \left[ \alpha_{\text{imp}} \cdot n_{j'} \cdot \frac{n_{\text{val}}}{n_{\text{bound}}} \cdot \Theta(\epsilon_{j'} - E_{\text{crit}}) \cdot r(\epsilon_{\text{resd},j'} - \epsilon_0) \right] \\ \vdots \\ \dot{n}_j = W_{\text{lpt}} \cdot (n_{j-1} - n_j) + \sum_{j'=j+1}^{k_{\text{crit}}} \left[ \alpha_{\text{imp}} \cdot n_{j'} \cdot \frac{n_{\text{val}}}{n_{\text{bound}}} \cdot \Theta(\epsilon_{j'} - E_{\text{crit}}) \cdot r(\epsilon_{\text{resd},j'} - \epsilon_j) \right] - \\ \quad \alpha_{\text{imp}} \cdot n_j \cdot \frac{n_{\text{val}}}{n_{\text{bound}}} \cdot \Theta(\epsilon_j - E_{\text{crit}}), \quad j = 1, \dots, (k_{\text{crit}} - 1) \\ \vdots \\ \dot{n}_{k_{\text{crit}}} = W_{\text{lpt}} \cdot n_{k_{\text{crit}}-1} - \alpha_{\text{imp}} \cdot n_{k_{\text{crit}}} \cdot \frac{n_{\text{val}}}{n_{\text{bound}}} \cdot \Theta(\epsilon_{k_{\text{crit}}} - E_{\text{crit}}) \end{cases}, \quad (4)$$

$$n_{\text{total}} = \sum_{j=0}^{k_{\text{crit}}} n_j, \quad \epsilon_{\text{avg}} = \frac{\sum_{j=0}^{k_{\text{crit}}} n_j \times \epsilon_j}{n_{\text{total}}} \quad (5)$$

式中: $\dot{n}_{\text{SF1}}$ 代表强场电离速率<sup>[62]</sup>;  $j=0, \dots, k_{\text{crit}}$ 代表导电自由电子所处的不同能级,其中最高能级  $k_{\text{crit}} = \left\lceil \frac{(3/2)E_{\text{gap}}}{\hbar\omega} + 1 \right\rceil$ ,  $E_{\text{gap}} = 9.5 \text{ eV}$  为液态水禁带宽度;  $E_{\text{crit}} \approx 3/2 E_{\text{gap}}$  为临界能级;  $n_0, \dots, n_{k_{\text{crit}}}$  为不同能级上电子的数量密度;  $n_{\text{total}}$  为导电总电子密度;  $n_{\text{bound}} = 6.68 \times 10^{22} \text{ cm}^{-3}$  为平衡态共价带电子密度;  $n_{\text{val}} = n_{\text{bound}} - n_{\text{total}}$  为瞬态共价带电子密度; 不同能级对应的电子动能  $\epsilon_j = j \times \hbar\omega$ ;  $\alpha_{\text{imp}}$  为碰撞电离率,  $\alpha_{\text{imp}} = 10^{15} \text{ s}^{-1}$ ;  $W_{\text{lpt}}$  为导电内电子激发速率;  $\Theta(\cdot)$  为碰撞电离门函数;  $r(\cdot)$  为剩余能分配函数<sup>[50,60]</sup>。

式(5)描述了自由电子数量密度和电子平均动能。

由于化学反应取决于反应物(如自由电子、·OH)的浓度和反应时间,因此不论是光氧化作用还是等离

子体光化学作用都与激光累积辐射剂量  $H$  有关。后者可以用辐照量表示为<sup>[37]</sup>

$$H = E_L \times N_p / A, \quad (6)$$

式中: $N_p$ 为激光驻留时间内总激光脉冲数;  $A$  为光斑面积。

Vogel等<sup>[38]</sup>最新研究表明累积辐射剂量  $H (\text{J}/\text{cm}^2)$  随激光辐照度  $I (\text{W}/\text{cm}^2)$  上升呈指数下降。当  $I = 4 \times 10^{11} \text{ W}/\text{cm}^2$  时引起光损伤的阈值  $H$  为  $2.3 \times 10^4 \text{ J}/\text{cm}^2$ , 当  $I$  上升至  $1.0 \times 10^{12} \text{ W}/\text{cm}^2$  时, 阈值  $H$  下降至  $4.8 \times 10^3 \text{ J}/\text{cm}^2$ 。当自由电子数量密度大于“种子”电子密度 ( $n_{\text{total}} > \rho_{1\text{eV}}$ ) 以及激光累积辐射剂量大于阈值剂量 ( $H > H_{\text{th}}$ ) 时, 可以判定光化学作用为主导作用机制。

#### 3.2 多光子成像中能量沉积和热积累

多光子成像中线性和非线性能量沉积可以引起聚焦区域温度上升,如图 3(a)所示。如果热扩散时间远



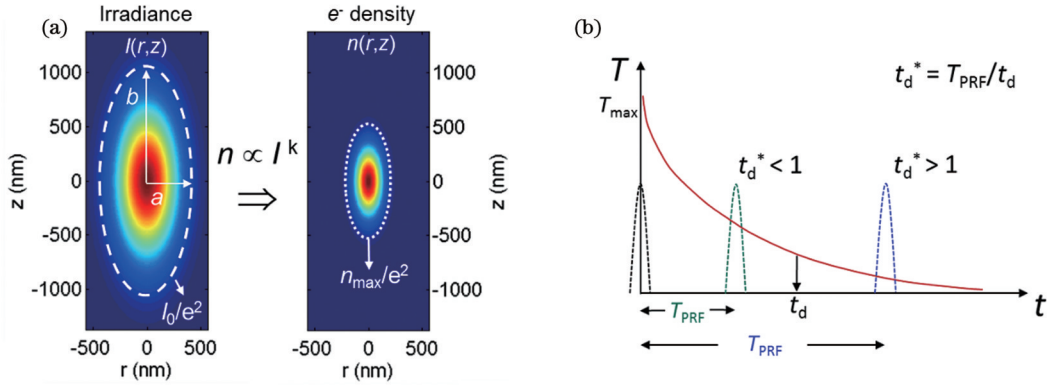


图 3 多光子成像中能量沉积以及热积累。(a)左侧:多光子成像中激光辐照度空间分布;右侧:激光诱导水中低密度等离子体空间分布<sup>[29]</sup>。由于非线性吸收,等离子体区域(点线)小于辐照度区域(虚线)。(b)热积累示意图。如果热扩散时间 $t_d$ 大于脉冲重复周期 $T_{PRF}$ ,将产生热积累效应,反之则热积累微弱<sup>[29,63]</sup>

Fig. 3 Energy deposition and heat accumulation in multiphoton imaging. (a) Left: spatial distribution of irradiance in multiphoton imaging; right: spatial distribution of laser induced low-density plasma at focus<sup>[29]</sup>. Due to nonlinearity, plasma region (dotted line) is much smaller than irradiance region (dashed line). (b) Illustration of heat accumulation. Heat accumulates if typical heat diffusion time  $t_d$  is longer than repetition period  $T_{PRF}$ , otherwise heat hardly accumulates<sup>[29,63]</sup>

大于激光脉冲重复周期,会产生热积累,引起温度进一步升高,如图 3(b)所示。过高的温度可能会引起光热作用,造成光热损伤。为评估光热作用,可以通过数学模型模拟激光在生物组织中引起的能量沉积和热积累。

在多光子成像中激光辐照度可以看成近似椭球体空间分布<sup>[29]</sup>,椭球体短半轴  $a$  和长半轴  $b$  分别表示为

$$a = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad b = \frac{(3 - 2\cos\alpha - \cos 2\alpha)^{1/2}}{1 - \cos\alpha} a, \quad (7)$$

式中: $NA$  为物镜数值孔径; $\lambda$  为波长; $\alpha$  为物镜半角孔径。

线性吸收引起的焦点处温度升高可近似描述为

$$\Delta T_{lin} = \frac{E_l \times \exp(-\mu_a l)}{C_p \rho_w V}, \quad (8)$$

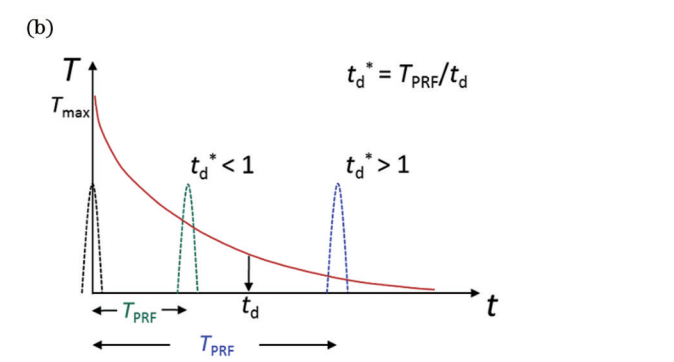
式中: $\mu_a$  为生物组织线性吸收系数; $l$  为有效吸收长度,可以近似为  $l=2a$ ;  $C_p$ 、 $\rho_w$  分别为水的比热容和密度; $V$  为辐照度椭球体体积。

如果想获得深层浑浊组织中线性吸收的精确值,可以通过蒙特卡罗模型结合热扩散方程获得<sup>[11]</sup>。

由于非线性吸收,等离子体区域小于辐照度区域,如图 3(a)所示。学者们常将等离子体区域仅出现一个自由电子对应的电子密度定义为“种子”电子密度  $\rho_{1e/vol}$ <sup>[29]</sup>。在紧聚焦条件下,等离子体区域体积约在  $10^{-13} \text{ cm}^3$  量级,因此  $\rho_{1e/vol} \approx 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ 。低密度等离子体与空穴发生复合作用后,引起的等离子体区域温度增加(以下简称温增)可描述为

$$\Delta T_{plasma} = \frac{n_{total} \times (\epsilon_{avg} + E_{gap})}{C_p \rho_w}, \quad (9)$$

式中: $\epsilon_{avg}$  和  $E_{gap}$  分别描述自由电子的动能和势能。



因此,单个激光脉冲引起的总温增为  $\Delta T = \Delta T_{lin} + \Delta T_{plasma}$ 。然而,在多光子成像中常使用高重复频率的飞秒激光脉冲序列扫描细胞或生物组织,热积累效应引起的峰值温增可能远大于  $\Delta T$ 。例如,钛宝石飞秒激光振荡器常使用 80 MHz 重复频率,其对应的脉冲重复周期  $T_{PRF}$  为 12.5 ns。由于多光子成像中常使用大数值孔径物镜,可假设热源形状近似为球形。球形热源的特征热扩散时间为

$$t_d = d_s^2 / (8\kappa), \quad (10)$$

式中: $\kappa = 1.38 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  是室温下水的热扩散率; $d_s$  为热源直径。对于  $NA = 1.1$ 、 $\lambda = 930 \text{ nm}$  及等效热源直径  $d_s = 0.53 \mu\text{m}$  而言,对应的热扩散时间  $t_d = 63 \text{ ns}$ , 远大于脉冲重复周期。因此热量确实会累积,累积峰值温增约是单脉冲引起温增的 15 倍<sup>[37]</sup>。

为精确计算热积累需要求解瞬态时空域热扩散方程<sup>[64]</sup>:

$$\frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \nabla^2 T = f(x, y, z, t), \quad (11)$$

式中: $(x, y, z)$  和  $t$  分别为空间、时间变量; $T$  为温度变量; $f$  为激励热源。

在多光子成像中能量沉积可以近似为椭球体形状,因此  $f$  可以表示为<sup>[29]</sup>

$$f(x, y, z, t) = T_0 \exp\left[-2\left(\frac{x^2 + y^2}{a^2} + \frac{z^2}{b^2}\right)\right] \rho(t), \quad (12)$$

式中: $\rho(t)$  为能量沉积速率<sup>[29]</sup>,

$$\rho(t) = \frac{1}{\tau_L} \Pi(t), \quad \Pi(t) = \begin{cases} 1, & mT_{PRF} \leq t \leq mT_{PRF} + \tau_L \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}, \quad (13)$$

式中: $\tau_L$  为飞秒激光脉冲宽度; $m$  为脉冲数变量。

由式(11)~式(13)可通过格林函数<sup>[64]</sup>解得时空域累积温增为

$$T(x, y, z, t) = \frac{T_0}{\tau_L} \sum_{m=0}^{N_p-1} \int_0^{\min(t-mT_{PRF}, \tau_L)} \frac{ae^{\frac{-2x^2}{a^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}}}{\sqrt{a^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}} \frac{ae^{\frac{-2y^2}{a^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}}}{\sqrt{a^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}} \frac{be^{\frac{-2z^2}{b^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}}}{\sqrt{b^2+8\kappa(t-mT_{PRF}-t')}} dt' \quad (14)$$

## 4 研究进展

### 4.1 无色素组织双光子成像中光化学介导光损伤

在活体组织多光子成像中,上皮组织由于其可及性而成为了经常研究的对象。在上皮组织中,研究的热点之一是肠道黏膜的上皮组织,这是由于肠道免疫应答对理解炎症性肠病<sup>[65]</sup>的发生和发展具有很高的研究价值。肠道由于其巨大的表面积(人类肠道表面积约为 400 m<sup>2</sup>)构成了身体和环境之间最突出的界限。肠壁一方面作为外部和内部环境之间的屏障,另一方面将营养物质从外部吸收到机体。这两种基本功能主要由肠黏膜上皮细胞完成。为防止病原体和其他外来物质进入机体,免疫系统的众多细胞不断地在上皮细胞和底层组织层(即所谓的固有层)内驻留和移动。当免疫细胞和相关抗原接触后可以引发特定的免疫反应。为深入了解这个高度复杂的动态系统,需要一种具有亚细胞分辨率的在体、时移、三维成像方式,以便对各种类型的细胞进行无损区分和动态追踪。

Orzekowsky-Schroeder 等<sup>[12]</sup>采用 2PEF 对活体小鼠肠道上皮组织进行成像,如图 4(a)所示。他们首先

将麻醉小鼠放在 37 °C 的恒温台上,然后打开麻醉小鼠腹腔,在不影响血液供应的情况下,准备好一段独立的肠道供在体成像,如图 4(b)所示。图 4(c)展示了肠道绒毛单层柱状上皮细胞示意图,其中的黄色虚线表示图 4(d)~图 4(f)所使用的成像平面,成像深度为 1.6 μm。为实现无标记成像,激光激发波长选择为 730 nm,对应于 NADH 激发峰位,探测光谱覆盖 380~540 nm,对应 NADH 发射光谱。激光脉宽  $\tau_L=100$  fs,重复频率  $f_{PRF}=80$  MHz。为实现高辐照度,采用紧聚焦条件,物镜 NA=1.2,成像大小 512 pixel×512 pixel,对应视野 150 μm×150 μm。激光在每个像素点驻留时间约为 30 μs,单帧图像成像时间约为 7 s。

在激光平均功率为  $P_{avg}=20$  mW 时可实现类似图 4(d)所示的无损成像,连续观察时间长达 8 h。从图中可以清晰地观察到上皮细胞边界及其发出的自发荧光,这些荧光主要来自线粒体中的 NADH。黑色所示的细胞为杯状细胞,它是一种黏液分泌细胞,其主要功能是合成并分泌黏蛋白,形成黏膜屏障以保护上皮细胞。因为此类细胞含有的线粒体比上皮细胞少,所以在荧光图片中呈黑色。

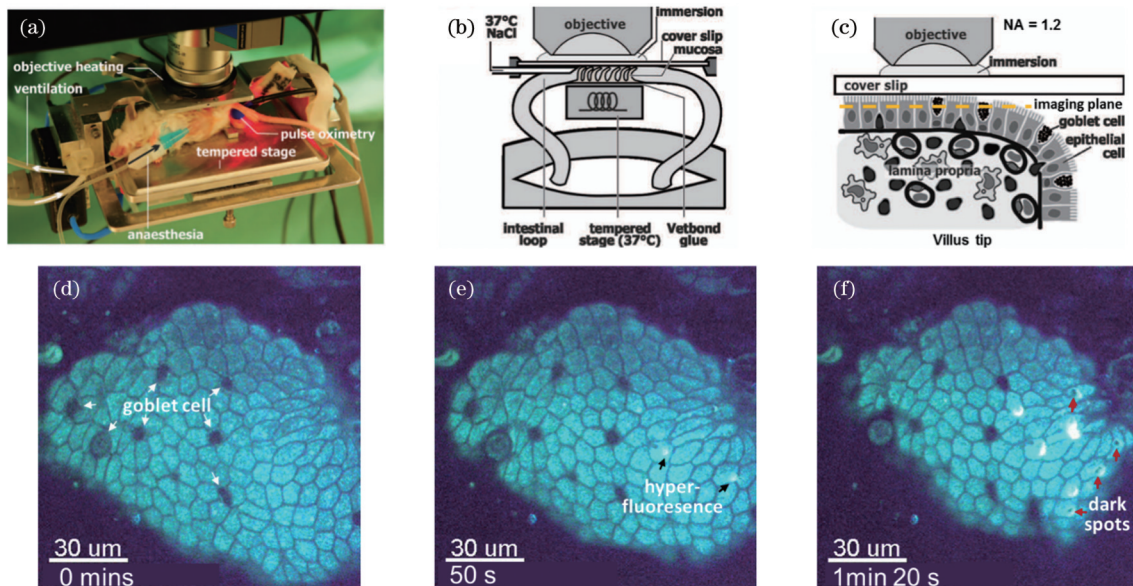


图 4 小鼠肠道黏膜在体双光子成像及光损伤<sup>[12]</sup>。(a)恒温台上麻醉小鼠;(b)肠道在体成像示意图;(c)肠道绒毛上皮细胞示意图,黄色虚线表示(d)~(f)所使用的成像平面,深度为 1.6 μm;(d)首帧肠道绒毛的横断面自体荧光图像;(e)重复扫描 7 次后自体荧光图像中出现超荧光;(f)重复扫描 12 次后自体荧光图像中出现黑斑

Fig. 4 *In-vivo* 2PEF of murine intestinal mucosa and photodamage<sup>[12]</sup>. (a) Anaesthetized mouse on homothermic table; (b) illustration of isolated intestinal loop that was prepared *in situ* without disturbing blood supply; (c) schematic diagram of intestinal mucosa [yellow dashed line indicates imaging plane at depth of 1.6 μm for (d)–(f)]; (d) first scan of cross-sectional autofluorescence image of intestinal villus *in vivo*; (e) hyperfluorescence appeared after 7 times repeated scanning; (f) dark spots appeared after 12 times repeated scanning



当激光平均功率增大至 38 mW 时(约为无损成像功率 2 倍)可以明显观察到光损伤。如图 4(e)中箭头所示,对同一视野区域重复扫描 7 次后,观察到某些上皮细胞中出现明亮的超荧光,其荧光强度约为无损成像时荧光强度的 40 倍。此时每个像素点约受到了 7500 个激光脉冲的照射。超荧光一旦开始其荧光强度迅速增加,之后超荧光区域迅速演变为黑斑,如图 4(f)中箭头所示。这些黑斑可能是自由电子分裂 NADH 等生物分子后形成的分子碎片气泡引起的。

当超荧光开始时可同时观察到小肠绒毛机械性收缩,这是表明损伤出现的另一个证据<sup>[12]</sup>。

使用相似的激光参数和平均功率,学者们在小鼠脑组织双光子成像中也观察到了光损伤。为探测神经元功能,Cheng 等<sup>[14]</sup>采用 2PEF 透过颅窗对小鼠脑皮层进行在体成像,如图 5 所示。小鼠采用 Thy1-YFP 转基因小鼠,它们在运动和感觉神经元以及中枢神经元亚群中高水平地表达黄色荧光蛋白(YFP)。这个品系为轴突提供了一个强大而特异的重要标记,如图 5(d)

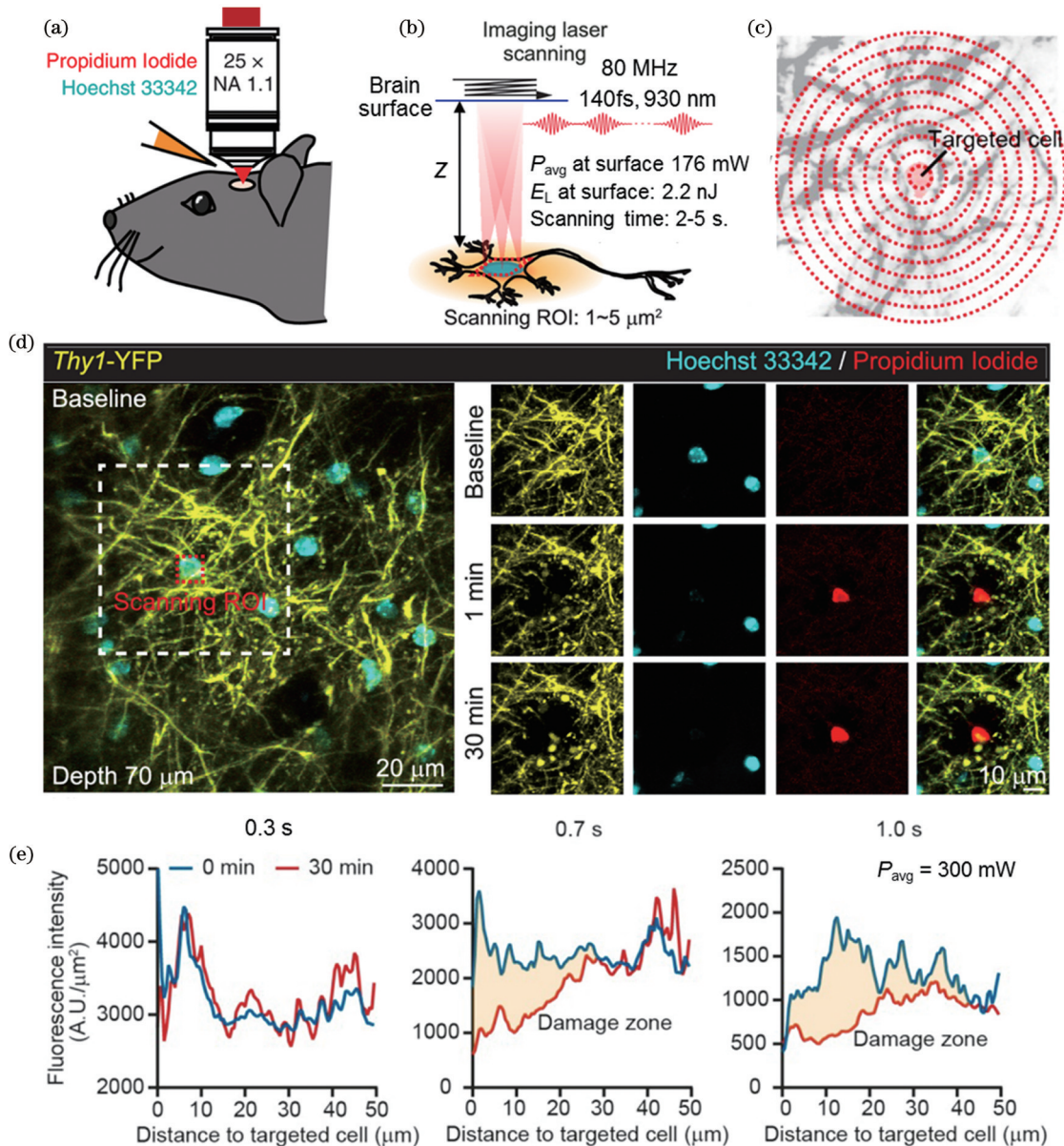


图 5 小鼠脑组织双光子成像及光损伤<sup>[14,66]</sup>。(a)荧光染料在体标记示意图;(b)双光子激光脉冲扫描神经元细胞核示意图;(c)定点照射时目标细胞周围树突荧光强度变化示意图;(d)双光子激光扫描目标细胞后周围受损的神经元结构, $P_{avg}=176 \text{ mW}$ ,扫描时间 2 s;(e)不同曝光时间下定点照射目标细胞后周围神经元荧光强度下降区域, $P_{avg}=300 \text{ mW}$

Fig. 5 2PEF imaging of living murine cortex and photodamage<sup>[14,66]</sup>. (a) Schematic of *in-vivo* labeling of live and dead cell fluorescent dyes; (b) schematic of two-photon laser scanning of neuron cell nucleus; (c) schematic for evaluating changes in fluorescence intensity of dendrites around target cell for fixed-spot irradiation; (d) two-photon imaging laser scanning damaged neuronal structures surrounding target cell at  $P_{avg}=176 \text{ mW}$  and for scanning time of 2 s; (e) reduction in fluorescence intensity of YFP-expressing neurites around target cell after fixed-spot imaging laser irradiation with different exposure time at  $P_{avg}=300 \text{ mW}$



中黄色标记所示。实验中采用细胞膜可透荧光探针 Hoechst 标记活细胞,用细胞膜不可透荧光探针碘化丙啶(PI)标记死细胞,这两种荧光探针在激光照射前标记到小鼠脑皮层中,如图 5(a)所示。

所用激光参数为波长  $\lambda=930$  nm,脉宽  $\tau_l=140$  fs,重复频率  $f_{\text{PRF}}=80$  MHz,所用物镜  $NA=1.1$ 。如图 5(b)所示,激光聚焦在小鼠脑皮层下  $70 \mu\text{m}$  处的神经元细胞核上,扫描区域  $1\sim 5 \mu\text{m}^2$ ,整个区域的扫描时间为  $2\sim 5$  s,对应每个像素点激光驻留时间约  $0.1$  s。照射到脑表面的激光平均功率为  $P_{\text{avg}}=176$  mW,由于散射影响,激光功率随聚焦深度增加呈指数下降。经矫正,脑皮层下  $70 \mu\text{m}$  焦点处的实际功率为  $P_z=79$  mW,该功率约为无损成像功率的 4 倍。对应的单脉冲能量  $E_z=0.99$  nJ,峰值辐照度  $I_z=2.61 \times 10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>[37]。

由图 5(d)可观察到在激光扫描前神经元细胞核

仅被荧光探针 Hoechst 标记,表示细胞完好。然而在激光照射  $1\sim 30$  min 后该细胞核同时被荧光探针 PI 和 Hoechst 标记,表示该神经元细胞已凋亡。与此同时还观察到周围被 YFP 标记的轴突荧光强度下降,表明轴突出现附带损伤。为量化附带损伤范围,Cheng 等[14,66]采用固定点照射神经元细胞核,如图 5(c)和图 5(e)所示。焦点处激光功率  $P_z=135$  mW,约为无损成像功率的 7 倍。他们观察到不同照射时间下附带损伤范围不一, $0.3$  s 时无明显附带损伤, $0.7$  s 时附带损伤半径约  $25 \mu\text{m}$ , $1.0$  s 时附带损伤半径约为  $45 \mu\text{m}$ 。Cheng 等[14,66]将这种附带损伤归因为光热损伤,然而这与热扩散时间和扩散范围相冲突[37],也与精确热扩散模型模拟结果相矛盾[5]。为理解上皮细胞和脑组织等无色素组织中的光损伤机理,Liang 等[37]利用光损伤数学模型开展了如图 6 所示的数值仿真实验。

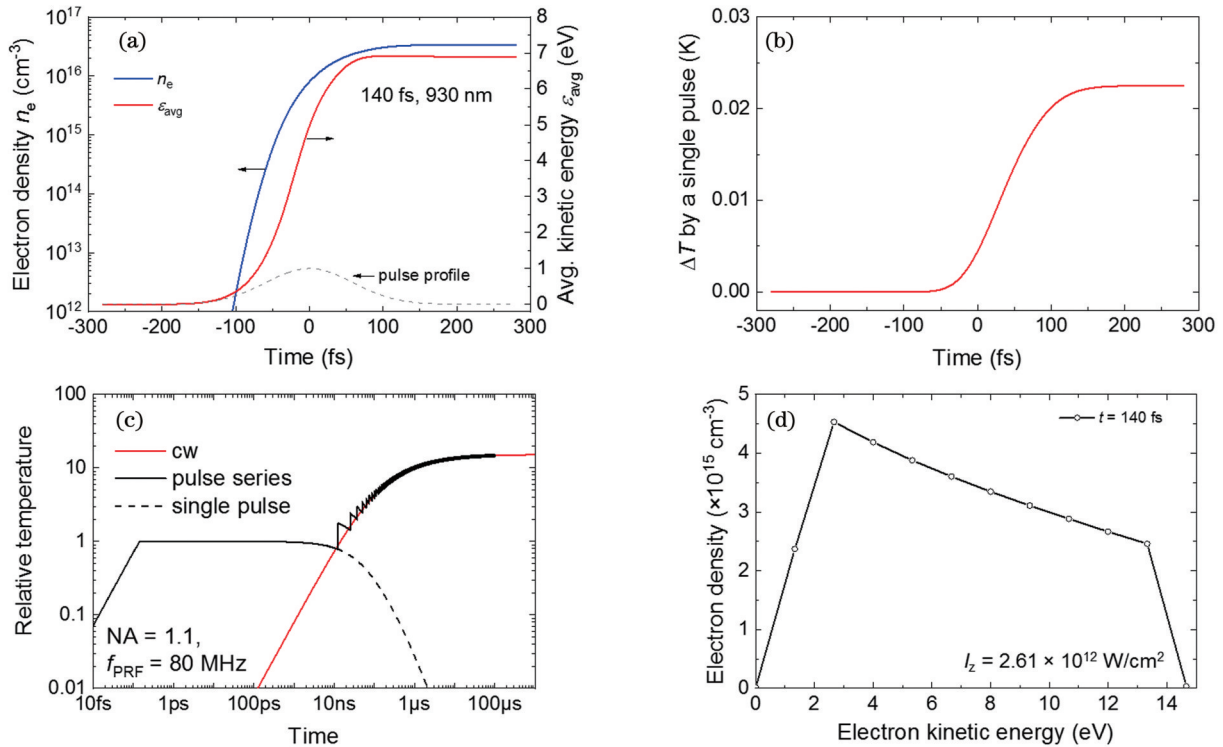


图 6 单脉冲非线性能量沉积以及多脉冲热累积仿真实验[37]。(a)自由电子密度及电子平均动能时域演化曲线;(b)焦点处水温时域演化曲线;(c)  $NA=1.1$ 、 $80$  MHz 重复频率下多脉冲热累积时域演变曲线;(d)激光诱导水中自由电子能量谱。仿真参数为脉宽  $\tau_l=140$  fs,波长  $\lambda=930$  nm,峰值辐照度  $I_0=2.61 \times 10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>,激光重复频率  $f_{\text{PRF}}=80$  MHz。(a)、(b)和(d)由式(4)、式(5)、式(9)计算而来,(c)由式(14)计算得到

Fig. 6 Nonlinear energy deposition by single laser pulse and heat accumulation by laser pulse series[37]. (a) Temporal evolution of electron number density  $n_e$  and average kinetic energy  $\epsilon_{\text{avg}}$ ; (b) temporal evolution of temperature increase of water at focus by single pulse; (c) heat accumulation by pulse series for  $NA=1.1$  at  $80$  MHz; (d) electron energy spectrum at end of pulse. Simulation parameters are  $\tau_l=140$  fs,  $\lambda=930$  nm,  $I_0=2.61 \times 10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>,  $f_{\text{PRF}}=80$  MHz. (a), (b) and (d) are obtained by Eqs. (4), (5) and (9), and (c) by Eq. (14)

如图 6(a)所示,通过计算自由电子动力学曲线和自由电子能量谱,发现单个激光脉冲产生的自由电子密度为  $n_e=3.4 \times 10^{16}$  cm<sup>-3</sup>,比光击穿阈值  $n_{\text{th}} \approx 2.0 \times 10^{20}$  cm<sup>-3</sup>小四个数量级,自由电子的平均动能为  $\epsilon_{\text{avg}} \approx 7$  eV。如图 6(b)所示,单个脉冲引起的非线性温增为

$T_{\text{single}}=0.022$  K。考虑多光子成像中的热累积效应, $100 \mu\text{s}$  时的累积温增约为单个脉冲温增的 15 倍,如图 6(c)所示,最后得到累积非线性温增仅为  $0.3$  K。

在浅层脑组织双光子成像中性吸收引起的温增同样很低。根据水对  $930$  nm 波长的吸收系数( $\mu_a \approx$

$0.01 \text{ mm}^{-1}$ )和水的比热[ $4.186 \text{ J}/(\text{g}\cdot\text{K})$ ],利用能量守恒和忽略热扩散的简单计算[式(8)]表明,在紧聚焦条件  $NA \approx 1.0$  时,单个  $1 \text{ nJ}$  的激光脉冲在焦点处引起的温增不到  $0.01 \text{ K}$ ,飞秒脉冲序列引起的累积温增不到  $0.2 \text{ K}$ 。因此,总的温增太低,不会引起 YFP 蛋白的热变性或神经元细胞死亡<sup>[56]</sup>,热损伤不能解释图 5 中观察到的现象。这与 Podgorski 等<sup>[67]</sup>的研究结果是一致的,他们的研究表明  $920 \text{ nm}$ ,  $120 \text{ fs}$  的激光在平均功率高于  $250 \text{ mW}$  时才可能观察到足够的线性温增以及伴随的脑组织热损伤。

相反,图 6 的仿真实验表明光损伤是由光化学作用介导的。由于单个激光脉冲产生的自由电子密度为  $n_e = 3.4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ ,在紧聚焦条件下等离子体区域[图 3(a)]体积一般在  $10^{-13} \text{ cm}^3$  量级,因此,单个脉冲可在等离子体区域产生至少 3000 个电子,其平均动能约  $7 \text{ eV}$ ,能量谱从  $2 \text{ eV}$  延伸到  $14 \text{ eV}$ [图 6(d)]。由于激光驻留时间( $\approx 0.1 \text{ s}$ )内有上百万个激光脉冲照射在聚焦区域,累积的自由电子总数是巨大的,它们可以引起等离子体光化学作用。虽然自由电子的寿命为皮秒级,平均移动距离为纳米级<sup>[68-69]</sup>,但一些 ROS(如  $\text{H}_2\text{O}_2$ )的寿命要长得多<sup>[70]</sup>,而且由于其体积小、扩散性高,在  $0.1 \sim 1 \text{ s}$  内它们可以在  $25 \mu\text{m}$  的距离内传播开并引起损伤<sup>[37]</sup>。

在图 5 所示的神经元成像中,激发波长为  $930 \text{ nm}$ ,远离 NADH 激发峰位,而且激光扫描目标主要为细胞核,其含有的线粒体少、NADH 浓度低,因此光损伤可以主要归因于等离子体光化学,光氧化作用可能相对微弱。然而,在图 4 所示的上皮细胞中,激发波长为  $730 \text{ nm}$ ,对应 NADH 激发峰位,而且激光扫描了整个细胞包括线粒体,因此光损伤很可能由光氧化和等离子体光化学协同效应引起。无论哪种情况,可以看到在无色素组织双光子成像中的光损伤主要由光化学作用介导。

#### 4.2 色素组织双光子成像中热诱导光损伤

生物组织中还有一类富含黑色素的色素组织,如皮肤和视网膜,它们在多光子成像中受到越来越多的关注,特别是对视网膜的功能性成像对于早期眼盲筛查具有重大意义<sup>[57,71]</sup>。2PEF 特别适合视网膜成像<sup>[72]</sup>,因为视网膜中内源性荧光团(如视黄酯和视黄醇)的激发峰位小于  $400 \text{ nm}$ ,而眼睛组织如巩膜、角膜、晶状体对  $400 \text{ nm}$  以下的紫外光吸收强烈,对近红外光高度透明<sup>[73]</sup>。因此,基于近红外光的 2PEF 既能穿透眼睛组织到达视网膜深层组织,又能激发内源性荧光团。视黄酯和视黄醇是视觉光转导循环(简称视觉循环)中不可或缺的物质,通过荧光寿命成像(FILIM)检测它们的荧光寿命变化,可以监测视觉循环中间生化产物的代谢和转化情况,为视网膜退行性疾病和老化提供客观的判断依据<sup>[57]</sup>。

如图 7(a)所示,视网膜位于眼球壁的最内层,其

厚度不到  $0.5 \text{ mm}$ ,解剖学上可分为 10 层。最底下两层分别是感光层(包括视杆细胞及视锥细胞)和视网膜色素上皮层(RPE),前者将光信号转换成电信号,通过视神经送到大脑处理为视觉,后者靠近脉络膜为视网膜提供营养和支持功能。RPE 内含有很高浓度的黑色素,黑色素有强吸光的特点,故其可防止光线反射到整个眼球,对清晰视觉极为重要。这两层组织在生化代谢上通过视觉循环紧密连接。正是由于黑色素的广谱强吸光性,导致对视网膜双光子成像时很容易引起光损伤。

Palczewska 等<sup>[57]</sup>在 2020 年开展了小鼠视网膜 2PEF 实验,在光损伤实验中采用小鼠视网膜冷冻切片。他们使用的激光参数为脉宽  $\tau_L = 75 \text{ fs}$ ,波长  $\lambda = 750 \text{ nm}$ ,重复频率  $80 \text{ MHz}$  和  $8 \text{ MHz}$ ,每个像素点激光驻留时间  $t_d = 3.2 \mu\text{s}$ ,物镜数值孔径  $NA = 1.0$ 。使用  $80 \text{ MHz}$ 、 $1.6 \text{ mW}$  激光脉冲对视网膜切片进行双光子成像,可清楚观察到光感受器外段(OS)、RPE 和脉络膜等视网膜结构,如图 7(b)所示,其中粉色箭头表示 RPE 和脉络膜边界。该功率仅约为小肠绒毛上皮细胞无损成像(图 4)所用功率的  $1/12$ 。当激光功率增加到  $3.5 \text{ mW}$  时观察到明亮荧光点,表明出现一定程度的光损伤,如图 7(c)中白色箭头所示。在扫描  $7.2 \text{ s}$  后明亮荧光点数量增多、亮度增强,同时还观察到明显气泡或组织损伤的部位,表示有强烈光损伤,如图 7(d)中红色箭头所示。值得注意的是 Masters 等<sup>[58]</sup>利用 2PEF 对皮肤黑色素成像时也观察到黑色素周围形成气泡。在  $3.5 \text{ mW}$  激光扫描停止后明亮荧光点并没有立刻消失,如图 7(e)中黄色箭头所示。

为探索降低光损伤的办法,Palczewska 等<sup>[57]</sup>将激光重复频率下调到  $8 \text{ MHz}$ ,激光功率设置为  $1.8 \text{ mW}$ 。虽然平均功率下降了约一半,但单个脉冲能量上升了 5 倍。此时未观察到光损伤现象而荧光强度也并未衰减,如图 7(g)和图 7(h)所示。

为何在  $80 \text{ MHz}$  照射下会产生明亮荧光点并在黑色素周围形成气泡?为理解背后机理,Palczewska 等<sup>[57]</sup>开展了数值仿真实验。如图 8 所示,他们分别计算了不同重复频率( $80 \text{ MHz}$  和  $8 \text{ MHz}$ )、不同激光功率下激光脉冲序列引起的等离子体效应和光热效应。图 8(a)展示了单个激光脉冲引起的自由电子密度及电子平均动能,其中虚线表示“种子”电子密度  $\rho_{1e/vol}$ ,黄色区域和红色区域分别表示  $80 \text{ MHz}$  和  $8 \text{ MHz}$  激光脉冲对应的平均功率。在相同  $P_{avg}$  下, $8 \text{ MHz}$  单脉冲能量以及峰值辐照度是对应的  $80 \text{ MHz}$  时数值的十倍。对  $80 \text{ MHz}$ 、 $3.5 \text{ mW}$  激光脉冲而言,自由电子密度比“种子”电子密度小 2 个数量级,非线性吸收引起的累积温增也远小于  $1 \text{ K}$ ,如图 8(b)所示。此外,不论对  $8 \text{ MHz}$  还是  $80 \text{ MHz}$  激光脉冲而言,激光累积辐射剂量  $H$  不足  $2 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,远小于阈值辐射剂量  $H_{th} \approx 10^4 \text{ J}/\text{cm}^2$ 。因此,视网膜中光损伤可以排除等离子体介导的光化



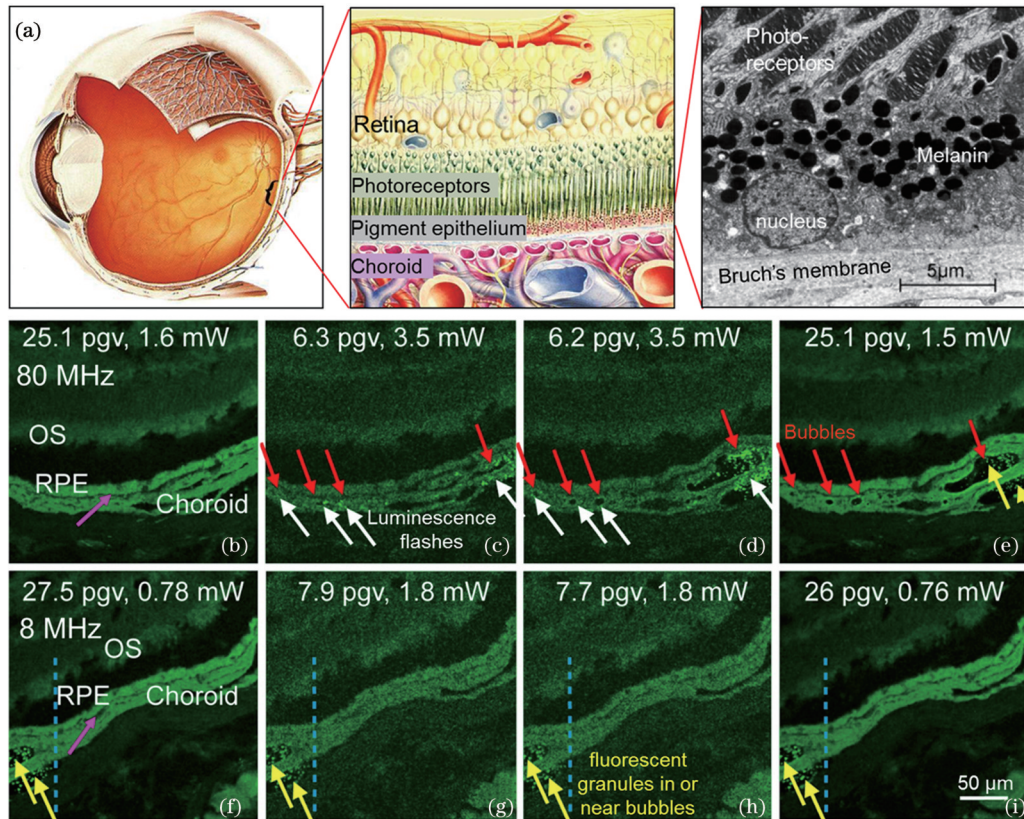


图7 色素型 Rpe65<sup>-/-</sup>小鼠视网膜冷冻切片双光子荧光成像及光损伤。(a)视网膜亚结构示意图<sup>[55]</sup>;(b)~(e)在 80 MHz 下连续获得的视网膜冷冻切片 2PEF 图像<sup>[57]</sup>;(f)~(i)在 8 MHz 下连续获得的 2PEF 图像<sup>[57]</sup>,蓝色虚线左边区域表示(e)中被 80 MHz 激光扫描区域。激光和物镜参数:脉宽为 75 fs,波长为 750 nm, NA=1.0

Fig. 7 Two-photon excited fluorescence imaging of retinal cryosections from pigmented Rpe65<sup>-/-</sup> mice and photodamage. (a) Schematic of retinal substructures<sup>[55]</sup>. (b)~(e) 2PEF images of retinal obtained consecutively at 80 MHz<sup>[57]</sup>; (f)~(i) 2PEF images of retinal obtained consecutively at 8 MHz<sup>[57]</sup>. Regions to the left of blue dashed lines in (f)~(i) indicate portion of the sample that was exposed to 80 MHz light (e). Laser and objective parameters are  $\lambda=750$  nm, pulse duration  $\tau_L=75$  fs and NA=1.0

学效应。

Palczewska 等<sup>[57]</sup>又计算了黑色素体通过线性吸收引起的光热效应。图 8(c)所示为计算框架示意图,假设单个黑色素体颗粒位于激光光斑中心,半径为  $R_m=300$  nm。黑色素吸收光谱很广,吸收系数  $\mu_a$  随  $\lambda$  增大而下降,在 750 nm 波长下  $\mu_a=3000$  cm<sup>-1</sup><sup>[57]</sup>, 相较而言水在这个波长的吸收系数  $\mu_a<0.1$  cm<sup>-1</sup>。图 8(d)展示了单个激光脉冲引起的黑色素体温增随  $P_{avg}$  变化曲线。80 MHz、3.5 mW 的单个激光脉冲引起的温增为 8.9 K,而 8 MHz、1.8 mW 的单个脉冲引起的温增为 45.6 K。瞬时温增会在液体中形成热弹性压力波<sup>[63]</sup>,其强度虽不足以撕裂黑色素体,但可以降低空泡形成的温度阈值。有实验报道黑色素组织中空泡形成温度阈值为 112 °C<sup>[74]</sup>。

虽然 80 MHz 下单脉冲引起的温增小,但是脉冲序列引起的累积温增效应很强,高达 11.5 倍,如图 8(e)和图 8(g)所示,最后累积温增为 102 K。考虑室温为 20 °C,最后累积温度为 122 °C,大于此前报道的黑色素组织中空泡形成的温度阈值。相对而言 8 MHz 脉冲序列引起的累积温增效应微弱,只有 1.75 倍,

如图 8(f)和图 8(h)所示,最后累积温增为 79.8 K,累积温度不足 100 °C,不足以形成空泡。因此,图 7(c)~图 7(e)红色箭头所示的黑色素周围的气泡是由光热作用引起的,而白色箭头所示的明亮荧光点可能是由热化学<sup>[56]</sup>和光氧化协同作用引起的<sup>[57]</sup>。视网膜这类色素组织进行 2PEF 时光损伤主要归因于光热作用。因为光损伤机制不一样,所以在相似激光参数下(80 MHz, 100 fs, 750 nm)视网膜这类色素组织光损伤平均功率(3.5 mW)要远低于无色素组织无损成像功率(20 mW)。

图 7 也同时证实了降低光损伤的一个有效策略——降低激光重复频率  $f_{PRF}$ , 因为  $P_{avg}$  一定时荧光强度与  $f_{PRF}$  成反比。Boguslawski 等<sup>[71]</sup>于 2022 年将 2PEF 与激光扫描眼底镜(SLO)结合,在人眼中开展了在体视网膜成像实验。他们使用了更小的重复频率 6 MHz 和更小的激光功率  $P_{avg}=0.3$  mW。由于人眼数值孔径仅为 0.2,导致焦斑面积增大,峰值辐照度下降,因此需要更长激光驻留时间 20  $\mu$ s,而且采用 30 帧图片叠加的方法降噪。通过这些方法得到的激光辐射剂量为 0.04 J/cm<sup>2</sup>,远低于阈值剂量 50 J/cm<sup>2</sup>,首次实现了在



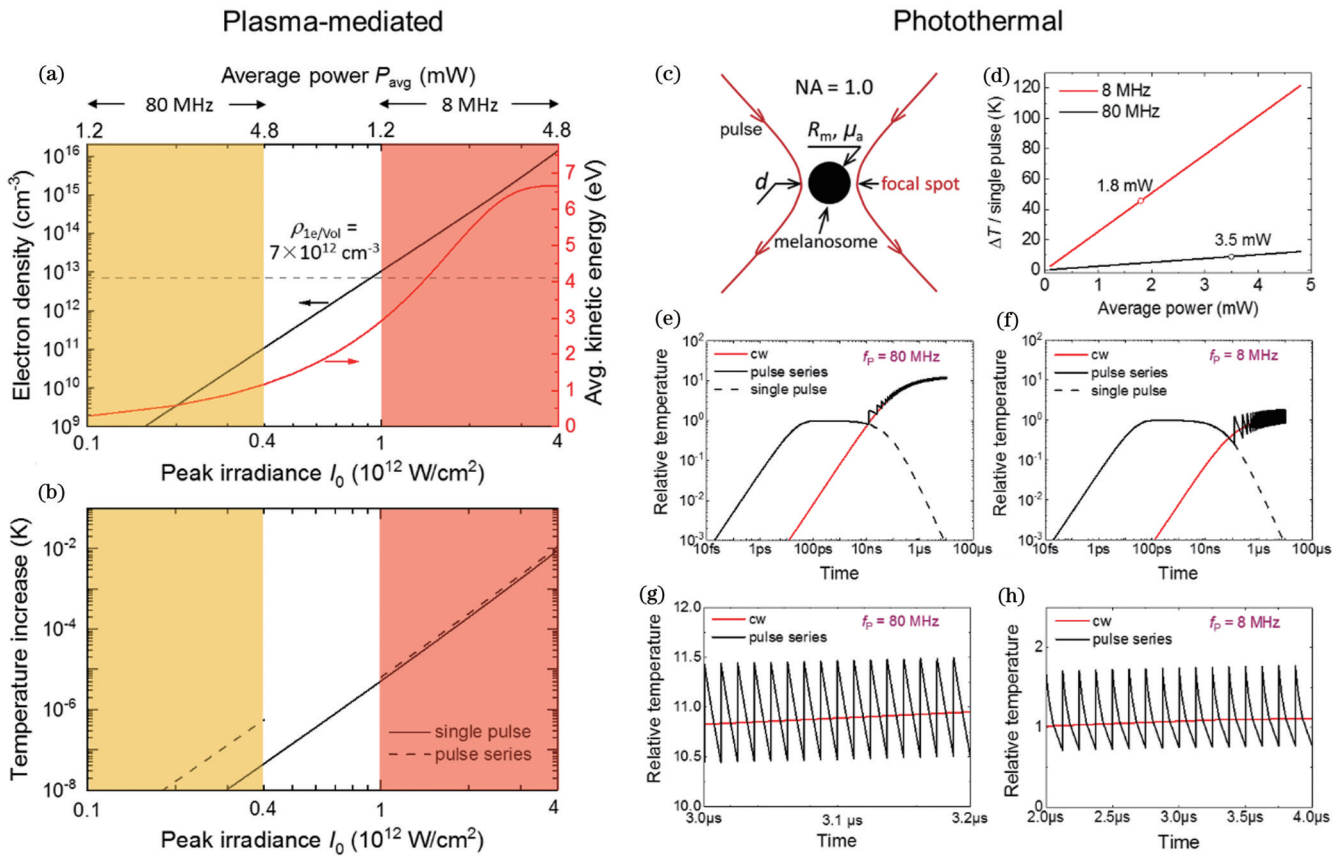


图 8 激光等离子体效应及光热作用仿真实验结果<sup>[57]</sup>。(a)自由电子密度及电子平均动能随激光功率  $P_{\text{avg}}$  和辐照度  $I_0$  演化曲线；(b)非线性吸收引起的峰值温增随  $I_0$  演化曲线；(c)位于激光光斑中心的黑色素体颗粒的线性吸收示意图；(d)脉冲重复频率为 8 MHz 和 80 MHz 的单个激光脉冲照射黑色素体后温增与激光平均功率变化曲线；(e)、(f)80 MHz 和 8 MHz 重复频率下多脉冲热量积累时域演变曲线；(g)、(h)对应(e)、(f)的局部放大图。(a)、(b)由式(4)、式(5)、式(9)计算而来，(d)由式(8)计算而来，(e)~(h)由式(14)计算得到

Fig. 8 Simulation results of plasma-mediated and photothermal effects<sup>[57]</sup>. (a) Electron number density and average kinetic energy after single pulse as function of peak irradiance  $I_0$ ; (b) peak temperature rise due to nonlinear absorption after single pulse and after pulse series as function of  $I_0$ ; (c) schematic of linear absorption of melanosome particle located at laser spot center; (d) temperature increase of melanosome after single pulse as function of average power for repetition rates of 8 MHz and 80 MHz; (e), (f) heat accumulation by pulse series at 80 MHz and at 8 MHz, respectively; (g), (h) enlarged views of (e) and (f). (a) and (b) are obtained by Eqs. (4), (5) and (9), (d) is simulated by Eq. (8), and (e)~(h) are calculated using Eq. (14)

体人眼 2PEF-SLO 成像<sup>[71]</sup>。

### 4.3 三光子深层脑组织成像中光损伤

在神经科学领域,多光子成像因单细胞成像精度已成为最强大和最广泛的研究工具之一,可以长时在体监测脑组织的神经网络活动,对探究神经功能、研究神经性疾病有重要科学价值<sup>[75]</sup>。多光子神经科学研究中的脑组织主要指小鼠脑组织,因为该模式动物有成熟的基因编码钙指示剂和相关的转基因小鼠系,可以标记多个大脑区域的大量神经网络,如图 5(d)所示<sup>[75]</sup>。在深层脑组织成像中 3PEF 比 2PEF 有优势,因为 3PEF 的穿透深度更大(散射更少)、对比度更高(非线性的阶数更高)。如图 9(a)所示,脑组织中光学耗散以散射为主,散射强度随  $\lambda$  增大而降低,有效衰减长度(EAL)随  $\lambda$  增大而变大,其中峰值点对应的波长  $1.3 \mu\text{m}$  常用在 3PEF 成像中,对应的 EAL 为  $310 \mu\text{m}$ ,约为波长  $920 \text{ nm}$  时 EAL 的 2 倍。

由于 3PEF 非线性阶数更高,在脑组织表面成像时 3PEF 需要比 2PEF 多 5~10 倍的能量,如图 9(b)所示。随着对脑组织成像深度  $z$  的增加,光强随  $z$  指数衰减。对 3PEF 而言,在  $1 \text{ mm}$  成像深度仅有约 1% 的激光能量到达焦点。为保持深度  $z$  处 3PEF 信号恒定,脑表面激光能量需随  $z$  指数增加,如图 9(b)所示。曲线斜率正好对应脑组织有效衰减长度,3 段斜率分别代表小鼠脑皮质层、白质和皮层下组织的有效衰减长度。2PEF 与 3PEF 曲线在  $z \approx 700 \mu\text{m}$  交叉,两者在这一深度产生同等强度的荧光信号,超过这个深度后 3PEF 比 2PEF 信号更强、更有优势。

由于光强随深度呈指数衰减的特点,对深度超过  $1 \text{ mm}$  的深层脑组织 3PEF 成像时往往需要使用  $100 \text{ mW}$  以上的高功率激光,这会诱发脑组织光损伤。有研究<sup>[67,76]</sup>表明该损伤来自于光热损失,而且损伤开始于  $40 \sim 44 \text{ }^\circ\text{C}$  之间的温度。图 9(c)所示为 Wang 等<sup>[11]</sup>用波

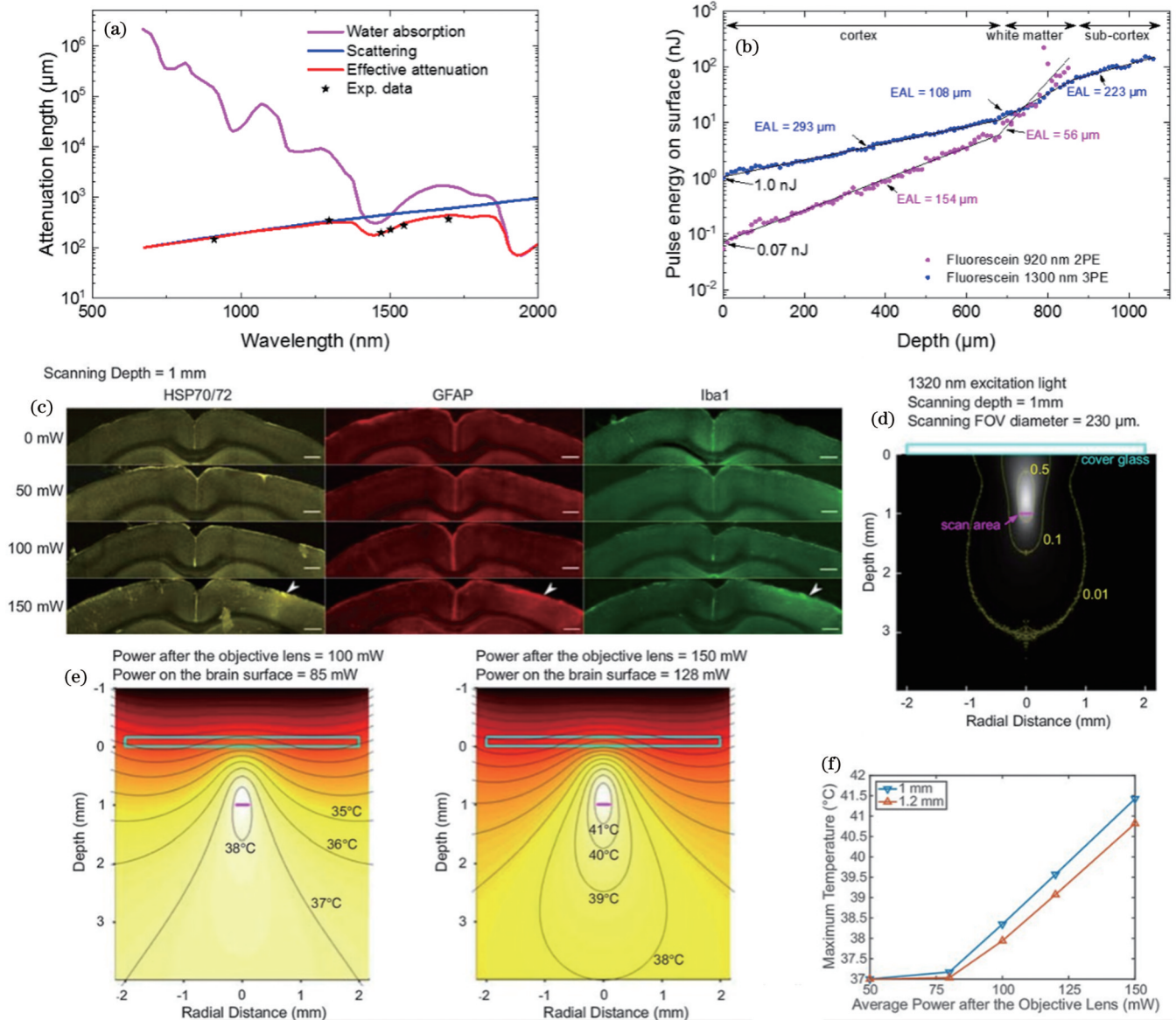


图9 1320 nm波长的三光子荧光显微镜连续扫描引起的脑组织加热和热损伤。(a)光在脑组织中的有效衰减长度<sup>[5,77]</sup>;(b)不同成像深度产生相同的2PEF和3PEF信号强度所需的脑表面脉冲能量<sup>[11]</sup>;(c)波长1320 nm、平均功率为150 mW的激光连续扫描小鼠脑部20 min后免疫标记切片<sup>[11]</sup>,光损伤位置由白色箭头表示,比例尺为0.5 mm;(d)由蒙特卡罗模拟得到的1320 nm激发光在脑组织中的光强分布,激发光聚焦在脑表面下1 mm处<sup>[11]</sup>;(e)以100 mW和150 mW的平均功率连续扫描60 s后,在1320 nm照射下脑组织温度图<sup>[11]</sup>;(f)聚焦深度为1 mm和1.2 mm时的最大温度与成像功率关系曲线<sup>[11]</sup>

Fig. 9 Brain heating and thermal damage induced by continuous scanning of 1320 nm three-photon microscopy. (a) Attenuation length of light in mouse brain cortex<sup>[5,77]</sup>; (b) pulse energy required at brain surface to generate same signal strength for 2PEF and 3PEF at different imaging depths<sup>[11]</sup>; (c) immunostaining results revealing brain heating effects by 1320 nm 3PEF after 20 min continuous scanning with 150 mW average power at 1 mm imaging depth<sup>[11]</sup>, in which damage is indicated by white arrowheads and scale bar represents 0.5 mm; (d) Monte-Carlo simulation of light intensity of 1320 nm excitation light focused at 1 mm below brain surface<sup>[11]</sup>; (e) temperature maps under 1320 nm illumination after 60 s of continuous scanning with 100 mW and 150 mW average power<sup>[11]</sup>; (f) maximum temperature versus imaging power for 1 mm and 1.2 mm focal depth<sup>[11]</sup>

长1320 nm、平均功率为0~150 mW的激光聚焦在1 mm小鼠深层脑部,连续扫描20 min后获得的免疫标记切片。利用免疫组化法分别检测了热休克蛋白(HSP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和Iba1的荧光变化,发现在0~100 mW激光照射时脑组织免疫荧光没有明显变化,但在150 mW时观察到脑组织边缘位置荧光明显增强,表示很可能出现了一定程度的光热损伤,如

图9(c)中白色箭头所示。在激光平均功率增大时损伤范围更加明显<sup>[67]</sup>。随后他们采用蒙特卡罗模型计算了聚焦深度为1 mm时光在脑组织中的分布,如图9(d)所示。结合热扩散方程并考虑水在1320 nm波长处的吸收系数 $\mu_a=0.14 \text{ mm}^{-1}$ ,得到温度分布图,如图9(e)所示。Podgorski等<sup>[67]</sup>的研究表明免疫荧光明显增强部位与蒙特卡罗模型模拟的温增的空间分布吻



合。图 9(f)展示了聚焦深度为 1 mm 和 1.2 mm 时脑组织中最高温度随激光功率的变化。在激光功率为 150 mW 时,脑组织中最高温度可达 41 °C。在长时间扫描时这一温度诱导的热化学作用<sup>[56]</sup>可能引起蛋白质变性及脑组织热损伤。

相较而言,图 5 采用双光子激发(波长 930 nm)对脑组织浅层成像( $z=70 \mu\text{m}$ )。对于这一波长,水的吸收系数仅为  $0.01 \text{ mm}^{-1}$ ,远低于 1320 nm 处的  $0.14 \text{ mm}^{-1}$ 。Wang 等<sup>[5]</sup>采用蒙特卡罗模型结合热扩散方程计算波长 930 nm、平均功率  $P_{\text{avg}}=170 \text{ mW}$ 、聚焦深度  $70 \mu\text{m}$  时脑皮层最大线性温增不到 1 K。模拟结果表明与室温接触的玻璃颅窗对浅层脑组织起到很大的散热作用<sup>[5]</sup>。在没有激光照射的情况下,植入玻璃颅窗后,脑表面温度可低至 32.4 °C。只有当激发光产生的热量超过颅窗的冷却能力时,脑组织峰值温度才开始上升到 37 °C 的生理温度以上。对波长 930 nm 的双光子激发而言,这个临界功率约为 150 mW,而对波长 1320 nm 的三光子激发而言,该临界功率降为 50 mW。此外,Wang 等<sup>[5]</sup>模拟的扫描视野为  $230 \mu\text{m}$ ,而图 5 中扫描视野仅为  $1\sim 2 \mu\text{m}$ ,热源体积越小散射越快。因此,双光子浅层脑组织成像光损伤主要归因于光化学作用,光损伤部位主要位于脑皮层。三光子深层脑组织成像光损伤可能来源于热损伤,损伤部位可能涉及脑皮层、白质及皮层下组织<sup>[67]</sup>。

概括而言,在脑组织多光子成像中热作用与非线性等离子体作用都可能引起光损伤,其主要作用机制取决于成像参数。Wang 等<sup>[5]</sup>综述表明,热损伤主要取决于激光平均功率、成像视野和成像深度,而且热损伤影响整个被照射组织区域。相对而言非线性等离子体

损伤是由焦点处的峰值辐照度引起的,它与脉冲能量、焦点大小以及脉宽有关。因此,在浅层脑组织成像时,由于激光平均功率很低,焦点处高脉冲辐照度及伴随的等离子体化学作用是引起光损伤的主要因素;随着成像深度的增加,所使用激光的平均功率呈指数增大,热效应逐渐增强,深层脑组织成像中光热损伤风险增大。

在三光子深层脑组织成像中光热作用是不是组织损伤的唯一机制?类似双光子浅层脑组织中开展的等离子体仿真实验<sup>[37]</sup>,我们利用光损伤模型对图 9 所示的 150 mW、1 mm 聚焦深度的三光子深层脑组织开展数值仿真实验。由于玻璃颅窗的影响,透过颅窗后脑表面激光功率降为  $P_{\text{surf}}=128 \text{ mW}$ ,又由于光的散射和吸收,仅有约 1% 的光到达深度为 1 mm 的焦点位置,得到焦点处激光能量仅约  $E_z=1.15 \text{ nJ}$ ,远低于脑组织中光致击穿能量  $10 \text{ nJ}$ <sup>[11]</sup>,但非常接近图 5 中 930 nm 激光在焦点处的单脉冲能量  $E_z=0.99 \text{ nJ}$ 。

图 10 所示为 60 fs, 1320 nm 激光在水中诱导产生等离子体的仿真实验结果。计算结果表明单个激光脉冲引起的自由电子密度为  $5.7 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}$ , 约比“种子”电子密度  $6.3 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3}$  大一个数量级,即单个激光脉冲在聚焦区域产生约 10 个自由电子,而且每个自由电子的平均动能高达 7 eV。由于激光重复频率为 1 MHz,每秒有  $10^6$  个激光脉冲产生,又由于对脑组织成像时间长达 60 s,因此在聚焦区域产生的累积自由电子数高达数亿个,很可能对焦点区域的脑组织产生等离子体化学作用,引起光损伤。因此,在深层脑组织三光子成像中光损伤很可能来源于光热和等离子体化学协同作用。

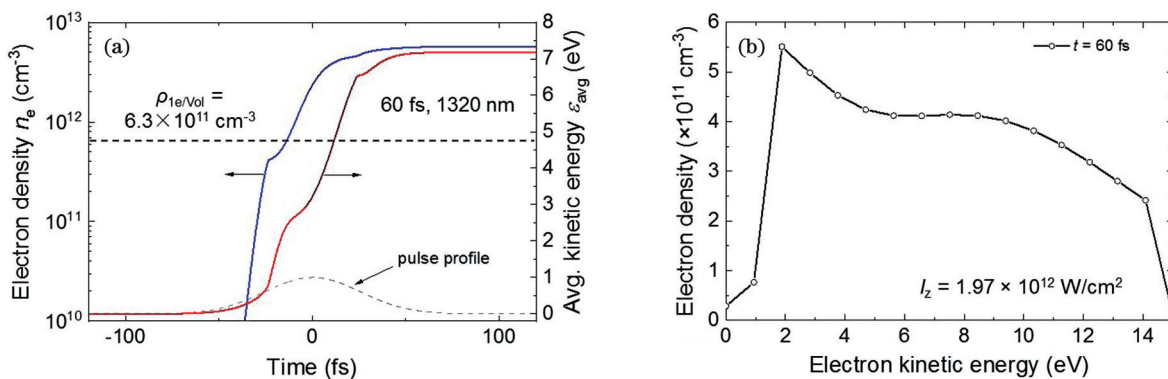


图 10 激光诱导等离子体仿真实验结果。(a)自由电子密度  $n_e$  及电子平均动能  $\epsilon_{\text{avg}}$  时域演化曲线,虚线所示为“种子”电子密度;(b)导带电子能量谱。仿真参数与文献<sup>[11]</sup>的 150 mW 实验一致,脉宽  $\tau_L=60 \text{ fs}$ ,波长  $\lambda=1320 \text{ nm}$ , $NA=0.75$ ,激光功率  $P_{\text{avg}}=150 \text{ mW}$ ,透过颅窗后脑表面激光功率  $P_{\text{surf}}=128 \text{ mW}$ , $f_{\text{PRF}}=1 \text{ MHz}$ ,焦点处激光能量  $1.15 \text{ nJ}$ ,焦点处峰值辐照度  $I_z=1.97 \times 10^{12} \text{ W/cm}^2$ 。由式(4)和式(5)计算而来

Fig. 10 Simulation results of plasma-mediated effects. (a) Temporal evolution of electron number density  $n_e$  and average kinetic energy  $\epsilon_{\text{avg}}$ . Dashed line indicates seed electron density. (b) Electron energy spectrum at the end of pulse. Simulation parameters are same as those in 150 mW experiments in Ref. [11]:  $\tau_L=60 \text{ fs}$ ,  $\lambda=1320 \text{ nm}$ ,  $NA=0.75$ ,  $P_{\text{avg}}=150 \text{ mW}$ , average power at brain surface  $P_{\text{surf}}=128 \text{ mW}$ ,  $f_{\text{PRF}}=1 \text{ MHz}$ , pulse energy at focus  $E_z=1.15 \text{ nJ}$ ,  $I_z=1.97 \times 10^{12} \text{ W/cm}^2$ . Obtained by Eqs. (4) and (5)



## 5 总结和展望

通过对不同组织、不同波长下光损伤的讨论和分析,可以总结出光损伤的一般性规律:在无色素组织双光子成像中光损伤以光化学作用为主,在色素组织双光子成像中以光热作用为主,在三光子深层组织成像中光损伤很可能来自于光化学和光热协同作用。

降低光损伤和优化成像参数是多光子成像面临的一大挑战。针对不同光损伤类型有不同优化策略。由于光化学作用是基于非线性吸收机制,与激发光峰值辐照度密切相关,因此降低单脉冲激光能量  $E_L$  可以降低光化学损伤。相对而言,光热作用是基于线性吸收的,与平均功率  $P_{avg}$  直接有关,降低  $P_{avg}$  可降低光热损伤。由于  $E_L = P_{avg} / f_{PRF}$ ,因此在  $f_{PRF}$  恒定时降低  $P_{avg}$  可以同时降低光化学和光热损伤。然而,双光子荧光光子密度  $n_{ph} \propto P_{avg}^2 / f_{PRF}$  (三光子类似),降低  $P_{avg}$  会导致荧光信号呈二次函数下降,从而增加成像时间,提高时间成本。因此好的成像策略需要在相互制约的激光参数之间寻找到最佳平衡点,既要保证成像时没有光损伤,又要保证足够高的荧光强度和成像速度。

为实现这一优化目标,需要进行两项研究:(1)通过实验及数学模型获得不同细胞、组织的光损伤阈值,建立光损伤阈值数据库;(2)设计成像参数优化策略。从近来的发展来看,学者们优化的参数主要是  $f_{PRF}$  和  $P_{avg}$ ,而很少考虑脉宽  $\tau_L$  和激发波长  $\lambda$ 。虽然荧光光子密度与脉宽成反比,越短的脉宽会带来越高的荧光强度,但脉宽大小很难通过成像系统的控制面板一键设定。此外,虽然激发波长可以一键设定,但是波长受制于荧光团激发峰位,调节范围很有限。目前可行的优化模型多采用传统优化策略,具体而言是在  $(f_{PRF}, E_L)$  二维参数空间绘制出潜在的成像参数范围以及光损伤阈值范围,后者划定了前者的上限。在成像范围内  $E_L$  与  $P_{avg}$  同时为最大值时代表了在无损伤前提下可以获得最高荧光强度和成像速度,其对应的  $(f_{PRF}, P_{avg})$  参数组合为最优组合。该优化策略可以预测不同深度组织的最佳成像参数。

随着机器学习的蓬勃发展,近年来学者们逐渐开始将机器学习应用于超分辨率光学显微镜的优化研究中。后续将光损伤阈值数据库、传统优化模型及机器学习相结合可能成为实现在线、自动、多组织、多深度成像参数优化的一个新发展方向。

## 参 考 文 献

- Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76..
- Denk W, Piston D W, Webb W W. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy[M] // Pawley J B. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston: Springer, 1995: 445-458.
- 李少强, 耿俊娴, 李艳萍, 等. 多光子成像技术的生物医学应用新进展[J]. *物理学报*, 2020, 69(22): 228702.
- Li S Q, Geng J X, Li Y P, et al. New advances in biomedical applications of multiphoton imaging technology[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(22): 228702.
- 王少伟, 雷铭. 近红外二区激发多光子荧光成像[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617002.
- Wang S W, Lei M. Near infrared-II excited multiphoton fluorescence imaging[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617002.
- Wang T Y, Xu C. Three-photon neuronal imaging in deep mouse brain[J]. *Optica*, 2020, 7(8): 947-960.
- Masters B R, So P T C. *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy*[M]. Oxford: Oxford University Press, 2008.
- So P T C, Dong C Y, Masters B R, et al. Two-photon excitation fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, 2: 399-429.
- Xu C, Zipfel W, Shear J B, et al. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(20): 10763-10768.
- Qu X C, Wang J, Zhang Z X, et al. Imaging of cancer cells by multiphoton microscopy using gold nanoparticles and fluorescent dyes[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(3): 031217.
- 李慧, 夏先园, 陈廷爱, 等. 双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207010.
- Li H, Xia X Y, Chen T A, et al. Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207010.
- Wang T Y, Wu C Y, Ouzounov D G, et al. Quantitative analysis of 1300-nm three-photon calcium imaging in the mouse brain[J]. *eLife*, 2020, 9: e53205.
- Orzekowsky-Schroeder R B, Martensen B, Vogel A, et al. *In vivo* spectral imaging of different cell types in the small intestine by two-photon excited autofluorescence[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(11): 116025.
- Orzekowsky-Schroeder R, Klinger A, Freidank S, et al. Probing the immune and healing response of murine intestinal mucosa by time-lapse 2-photon microscopy of laser-induced lesions with real-time dosimetry[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3521-3540.
- Cheng Z Y, Han Y Y, Wei B W, et al. Probing neuronal functions with precise and targeted laser ablation in the living cortex[J]. *Optica*, 2021, 8(12): 1559-1572.
- König K. Multiphoton microscopy in life sciences[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 200(2): 83-104.
- Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen [J]. *Annalen Der Physik*, 1931, 401(3): 273-294.
- Lakowicz J R. *Multiphoton excitation and microscopy*[M] // *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston: Springer, 2006: 607-621.
- Kaiser W, Garrett C G B. Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$  [J]. *Physical Review Letters*, 1961, 7(6): 229-231.
- Débarre D, Olivier N, Supatto W, et al. Mitigating phototoxicity during multiphoton microscopy of live drosophila embryos in the 1.0-1.2  $\mu\text{m}$  wavelength range[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104250.
- König K, Liang H, Berns M W, et al. Cell damage by near-IR microbeams[J]. *Nature*, 1995, 377(6544): 20-21.
- König K, So P T, Mantulin W W, et al. Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress[J]. *Journal of Microscopy*, 1996, 183(3): 197-204.
- König K. Cell damage during multi-photon microscopy[M] // Pawley J B. *Handbook of biological confocal microscopy*. Boston: Springer, 2006: 680-689.
- Icha J, Weber M, Waters J C, et al. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it[J]. *BioEssays*, 2017, 39(8): 1700003.
- Galli R, Uckermann O, Andresen E F, et al. Intrinsic indicator of photodamage during label-free multiphoton microscopy of cells and

- tissues[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110295.
- [25] Voronin A A, Zheltikov A M. Ionization penalty in nonlinear optical bioimaging[J]. *Physical Review E*, 2010, 81(5): 051918.
- [26] Voronin A A, Fedotov I V, Doronina-Amitonova L V, et al. Ionization penalty in nonlinear Raman neuroimaging[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(4): 508-510.
- [27] Durand A, Wiesner T, Gardner M A, et al. A machine learning approach for online automated optimization of super-resolution optical microscopy[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5247.
- [28] Williams F, Varma S P, Hillenius S. Liquid water as a lone-pair amorphous semiconductor[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1976, 64(4): 1549-1554.
- [29] Vogel A, Noack J, Hüttman G, et al. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues[J]. *Applied Physics B*, 2005, 81(8): 1015-1047.
- [30] Alizadeh E, Orlando T M, Sanche L. Biomolecular damage induced by ionizing radiation: the direct and indirect effects of low-energy electrons on DNA[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2015, 66: 379-398.
- [31] Abdoul-Carime H, Sanche L. Alteration of protein constituents induced by low-energy (<35 eV) electrons: II. Dissociative electron attachment to amino acids containing cyclic groups[J]. *Radiation Research*, 2003, 160(1): 86-94.
- [32] Cortat B, Garcia C C M, Quinet A, et al. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2013, 12(8): 1483-1495.
- [33] Kolenc O I, Quinn K P. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2019, 30(6): 875-889.
- [34] 李步洪, 陈天龙, 林立, 等. 光动力疗法基础研究及临床应用的新进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507101.  
Li B H, Chen T L, Lin L, et al. Recent progress in photodynamic therapy: from fundamental research to clinical applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507101.
- [35] Linz N, Freidank S, Liang X X, et al. Experimental and theoretical investigations of the mechanisms of free-electron-mediated modification of biomolecules in nonlinear microscopy[EB/OL]. [2022-06-05]. [https://community.apan.org/cfs-file/\\_key/telligent-evolution-components-attachments/13-8035-00-00-23-50-15/0900-\\_2D00\\_-Vogel\\_5F00\\_public.pdf](https://community.apan.org/cfs-file/_key/telligent-evolution-components-attachments/13-8035-00-00-23-50-15/0900-_2D00_-Vogel_5F00_public.pdf).
- [36] Schmalz M F, Wieser I, Schindler F, et al. Highly standardized multicolor femtosecond fiber system for selective microphotomanipulation of deoxyribonucleic acid and chromatin[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(12): 2877-2880.
- [37] Liang X-X, Vogel A. Probing neuronal functions with precise and targeted laser ablation in the living cortex: comment[J]. *Optica*, 2022, 9(8): 868-871.
- [38] Vogel A, Liang X X, Freidank S, et al. Free-electron and thermally mediated pathways of photodamage in nonlinear microscopy[J]. *Proceedings of SPIE*, 2021, 11648: 1164806.
- [39] Kennedy P K. A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media. Part 1. Theory[J]. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 1995, 31(12): 2241-2249.
- [40] Linz N, Freidank S, Liang X X, et al. Wavelength dependence of nanosecond infrared laser-induced breakdown in water: evidence for multiphoton initiation via an intermediate state[J]. *Physical Review B*, 2015, 91(13): 134114.
- [41] Thaller A, Laenen R, Laubereau A. Femtosecond spectroscopy of the hydrated electron: novel features in the infrared[J]. *Chemical Physics Letters*, 2004, 398(4/5/6): 459-465.
- [42] Balling P, Schou J. Femtosecond-laser ablation dynamics of dielectrics: basics and applications for thin films[J]. *Reports on Progress in Physics*, 2013, 76(3): 036502.
- [43] Dong Y F, Gao Y X, Liu W H, et al. Clustered DNA damage induced by 2-20 eV electrons and transient anions: general mechanism and correlation to cell death[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2019, 10(11): 2985-2990.
- [44] Nguyen J, Ma Y H, Luo T, et al. Direct observation of ultrafast electron-transfer reactions unravels high effectiveness of reductive DNA damage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(29): 11778-11783.
- [45] Cobut V, Jay-Gerin J P, Frongillo Y, et al. On the dissociative electron attachment as a potential source of molecular hydrogen in irradiated liquid water[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 1996, 47(2): 247-250.
- [46] Fedor J, Cicman P, Coupier B, et al. Fragmentation of transient water anions following low-energy electron capture by H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O[J]. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, 2006, 39(18): 3935-3944.
- [47] Elles C G, Shkrob I A, Crowell R A, et al. Excited state dynamics of liquid water: insight from the dissociation reaction following two-photon excitation[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(16): 164503.
- [48] Belmouaddine H, Madugundu G S, Wagner J R, et al. DNA base modifications mediated by femtosecond laser-induced cold low-density plasma in aqueous solutions[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2019, 10(11): 2753-2760.
- [49] Meesat R, Belmouaddine H, Allard J F, et al. Cancer radiotherapy based on femtosecond IR laser-beam filamentation yielding ultra-high dose rates and zero entrance dose[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(38): E2508-E2513.
- [50] 梁晓轩. 飞秒-纳秒激光水中光致击穿阈值、导带电子能量谱及空化气泡机理研究[D]. 西安: 西安交通大学, 2019.  
Liang X X. Study on optical breakdown thresholds, conduction band electron energy spectra and cavitation bubbles in water induced by femto-nanosecond laser pulses[D]. Xi'an: Xi'an Jiaotong University, 2019.
- [51] Linz N, Freidank S, Liang X X, et al. Wavelength dependence of femtosecond laser-induced breakdown in water and implications for laser surgery[J]. *Physical Review B*, 2016, 94(2): 024113.
- [52] Liang X X, Linz N, Freidank S, et al. Comprehensive analysis of spherical bubble oscillations and shock wave emission in laser-induced cavitation[J]. *Journal of Fluid Mechanics*, 2022, 940: A5.
- [53] 梁晓轩, 王晶, 张镇西. 纳米尺度激光聚焦光穿孔技术[J]. *西安交通大学学报*, 2012, 46(10): 107-115.  
Liang X X, Wang J, Zhang Z X. Nano-scale photoporation by tightly focused lasers: a survey[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2012, 46(10): 107-115.
- [54] 顾清, 王佳壮, 杜晓凡, 等. 金纳米颗粒介导的细胞光穿孔表征方法[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207021.  
Gu Q, Wang J Z, Du X F, et al. Cell optoporation characterization method for gold-nanoparticle mediation[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207021.
- [55] Brinkmann R, Hüttmann G, Rögner J, et al. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2000, 27(5): 451-464.
- [56] Simanovskii D M, Mackanos M A, Irani A R, et al. Cellular tolerance to pulsed hyperthermia[J]. *Physical Review E*, 2006, 74(1): 011915.
- [57] Palczewska G, Boguslawski J, Stremplewski P, et al. Noninvasive two-photon optical biopsy of retinal fluorophores[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(36): 22532-22543.
- [58] Masters B R, So P T C, Buehler C, et al. Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(6): 1265-1270.
- [59] Zhigilei L V, Garrison B J. Microscopic simulation of short-pulse laser damage of melanin particles[J]. *Proceedings of SPIE*, 1998, 3254: 135-143.
- [60] Liang X X, Zhang Z X, Vogel A. Multi-rate-equation modeling of

- the energy spectrum of laser-induced conduction band electrons in water[J]. *Optics Express*, 2019, 27(4): 4672-4693.
- [61] Simons J. How do low-energy (0.1-2 eV) electrons cause DNA-strand breaks?[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2006, 39(10): 772-779.
- [62] Keldysh L. Ionization in the field of a strong electromagnetic wave [J]. *Soviet Physics JETP*, 1965, 20(5): 1307-1314.
- [63] Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues[J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(2): 577-644.
- [64] Carslaw H S, Jaeger J C. *Conduction of heat in solids*[M]. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1959.
- [65] Baumgart D C, Carding S R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology[J]. *The Lancet*, 2007, 369(9573): 1627-1640.
- [66] Cheng Z Y, Lin J N, Han Y Y, et al. Probing neuronal functions with precise and targeted laser ablation in the living cortex: reply [J]. *Optica*, 2022, 9(8): 872-873.
- [67] Podgorski K, Ranganathan G. Brain heating induced by near-infrared lasers during multiphoton microscopy[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2016, 116(3): 1012-1023.
- [68] Meesungnoen J, Jay-Gerin J P, Filali-Mouhim A, et al. Low-energy electron penetration range in liquid water[J]. *Radiation Research*, 2002, 158(5): 657-660.
- [69] Kai T, Yokoya A, Ukai M, et al. Dynamics of low-energy electrons in liquid water with consideration of Coulomb interaction with positively charged water molecules induced by electron collision[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2014, 102: 16-22.
- [70] Nikogosyan D N, Oraevsky A A, Rupasov V I. Two-photon ionization and dissociation of liquid water by powerful laser UV radiation[J]. *Chemical Physics*, 1983, 77(1): 131-143.
- [71] Boguslawski J, Palczewska G, Tomczewski S, et al. *In vivo* imaging of the human eye using a 2-photon-excited fluorescence scanning laser ophthalmoscope[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(2): e154218.
- [72] Palczewska G, Stremplewski P, Suh S, et al. Two-photon imaging of the mammalian retina with ultrafast pulsing laser[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(17): e121555.
- [73] Boettner E, Wolter J. Transmission of the ocular media[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1962, 1: 776-783.
- [74] Jacques S L, McAuliffe D J. The melanosome: threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1991, 53(6): 769-775.
- [75] Lecoq J, Orlova N, Grewe B F. Wide. Fast. Deep: recent advances in multiphoton microscopy of *in vivo* neuronal activity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2019, 39(46): 9042-9052.
- [76] Picot A, Dominguez S, Liu C, et al. Temperature rise under two-photon optogenetic brain stimulation[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(5): 1243-1253.
- [77] Wang M R, Wu C Y, Sinefeld D, et al. Comparing the effective attenuation lengths for long wavelength *in vivo* imaging of the mouse brain[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(8): 3534-3543.

## Photodamage of Biotissue in Multiphoton Imaging

Liang Xiao-Xuan<sup>1\*</sup>, Alfred Vogel<sup>1</sup>, Zhang Zhenxi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biomedical Optics, University of Luebeck, Luebeck 23562, Germany;*

<sup>2</sup>*Institute of Biomedical Photonics and Sensing, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China*

### Abstract

**Significance** Multiphoton excitation fluorescence imaging is widely used in the field of biomedical optics and has become one of the most important research tools due to its low invasiveness, strong penetration, high signal-to-noise ratio and high spatial resolution. Photodamage in biological tissues can be caused if excessive photon density or laser power is applied during imaging.

While signal-to-noise ratio determines the lower limit of laser power that can be used in multiphoton imaging, photodamage delineates its upper boarders. For *in-vivo* label-free imaging, due to the small cross section of endogenous fluorophores ( $\approx 10^{-2}$  GM), the tunability range of laser power between nondestructive imaging and photodamage is very narrow. Therefore, a reasonable laser power is required to ensure that multiphoton imaging with sufficient information can be obtained, and that the cells or biological tissues remain functionally active after long time irradiation. Reducing photodamage and optimizing imaging parameters is one of the major challenges in multiphoton imaging. Photodamage studies are essential to the optimization of imaging parameters.

**Progress** Photodamage can be intuitively understood by the concept of ionization penalty in multiphoton bioimaging (Fig. 1). Ionization penalty occurs at irradiance of about  $2 \times 10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>, where, for a single fluorescence photon emitted from fluorophores, a free electron is produced from water. The chemicals arising from ionization of water molecules can be detrimental to biomolecules and tissues.

The underlying mechanisms behind photodamage can be generally divided into photochemical and photothermal effects, as illustrated in Fig. 2. For photochemical effects, they can be further divided into UV-A like photo-oxidation effect and plasma-mediated chemical effect that is wavelength-independent.

The severity of photodamage is related to the laser parameters and optical parameters of biotissue. To evaluate the cause of photodamage, the state-of-the-art numerical tools are summarized, including a refined multi-rate-equation model to simulate free electron energy spectrum [Eqs. (4) and (5)], linear and nonlinear heating leading to temperature rise by a single laser pulse [Eqs. (8) and (9)], and heat accumulation by pulse series [Eqs. (11)–(14)].

Recent research progresses of photodamage in different tissues and at different wavelengths are analyzed. For two-photon imaging of non-pigmented tissues such as murine intestinal mucosa (Fig. 4), nondestructive imaging can be achieved at average



power  $P_{\text{avg}} \approx 20$  mW, with typical laser parameters of repetition rate  $f_{\text{PRF}} \approx 80$  MHz, wavelength  $\lambda \approx 800$  nm and pulse duration  $\tau_L \approx 100$  fs. Photodamage occurs when  $\geq 2$  times imaging power at focus is used. In contrast, for pigmented tissue such as murine retina (Fig. 7), photodamage occurs at average power as low as 3.5 mW with  $f_{\text{PRF}} \approx 80$  MHz. Simulation results show that photodamage in non-pigmented tissue is mediated with laser-induced low density plasmas (Fig. 6), whereas photodamage in pigmented retina is mainly driven by heating (Fig. 8).

For three-photon imaging of deep murine brain tissue ( $\approx 1$  mm) using typical laser parameters  $\lambda \approx 1.3$   $\mu\text{m}$ ,  $f_{\text{PRF}} \approx 1$  MHz, a non-zero chance of photodamage is observed for laser power  $P_{\text{avg}} \geq 150$  mW (Fig. 9). Immunostaining as well as Monte-Carlo simulation results indicate that linear absorption and heating are likely to cause the photodamage. However, multi-rate-equation modeling shows that laser-induced plasma-mediated effects may be involved as well (Fig. 10).

**Conclusions and Prospects** In this review, we analyze photodamage in pigmented and non-pigmented tissues in multiphoton imaging. We come to the conclusion that photochemical effects are dominant in two-photon imaging of pigment-free tissues, while photothermal effects play a leading role in two-photon imaging of pigmented tissues. For three-photon imaging of deep murine brain tissue, photodamage is likely to arise from synergistic photochemical and photothermal effects.

Fully using the photon budget without photodamage is still a big challenge in multiphoton imaging. Traditional optimization model is time-demanding. Recently, with the booming development of machine learning, it has been applied to the optimization research of super-resolution optical microscopy. Subsequent combination of photodamage threshold database and machine learning can be a new direction to achieve online, automatic optimization of imaging parameters for multiphoton imaging.

**Key words** bio-optics; multiphoton excitation fluorescence imaging; photodamage; phototoxicity; photochemical effects; photothermal effects