

Влияние рассеяния на предельную глубину визуализации в методе двухфотонной флуоресцентной микроскопии

Е.А.Сергеева

На основе теоретической модели распространения сфокусированного пучка света в сильно рассеивающей среде обсуждаются различные факторы, ограничивающие возможности двухфотонной флуоресцентной микроскопии (ДФМ) для наблюдения глубинной структуры оптически толстых образцов биологических тканей. Выделены три основные причины ограничения глубины наблюдения методом ДФМ: 1) размытие пучка в результате многократного малоуглового рассеяния, приводящее к потере субмикронного поперечного разрешения; 2) избыточная засветка приповерхностной области объекта, возникающая при наблюдении глубоко расположенных структур в результате увеличения средней мощности источника для компенсации потерь из-за рассеяния; 3) снижение уровня полезного сигнала двухфотонной флуоресценции из-за экспоненциального ослабления мощности накачки. Влияние указанных факторов было рассмотрено в рамках малоуглового диффузионного приближения теории переноса излучения. Показано, что первые два ограничения определяют фундаментальный предел ДФМ, в то время как последнее ограничение является инструментальным пределом и представляется наиболее критичным в современных коммерческих установках лазерной сканирующей микроскопии для подавляющего большинства используемых флуорофоров.

Ключевые слова: двухфотонная флуоресцентная микроскопия, многократное рассеяние, теория переноса излучения, малоугловое диффузионное приближение.

1. Введение

Двухфотонная флуоресцентная микроскопия, впервые предложенная и реализованная в 1990 г. как модернизация лазерной сканирующей микроскопии [1], в настоящее время завоевала позиции одного из наиболее перспективных методов трехмерной визуализации структуры сильно рассеивающих объектов (преимущественно биологических тканей) с субмикронным разрешением [1–4]. Данный метод основан на нелинейном возбуждении флуорофора в исследуемом образце при поглощении двух фотонов излучения накачки в диапазоне 700–1000 нм и последующей эмиссии фотона флуоресценции в видимом диапазоне. В отличие от конфокальной лазерной микроскопии, ДФМ обладает большей глубиной визуализации в биотканях [3–6], при этом пространственное разрешение метода ДФМ сохраняется на уровне долей микрона, а контраст изображения остается высоким даже при максимально открытой конфокальной диафрагме ('pinhole'). Такие преимущества обеспечиваются за счет использования в качестве накачки излучения ближнего ИК диапазона, которое рассеивается в биотканях слабее, чем излучение видимого диапазона, а также за счет локализации двухфотонного возбуждения флуоресценции в фокальном объеме сильно сфокусированного пучка накачки, т. е. в области максимальной интенсивности. Для двухфотонного возбуждения флуорофоров в образцах биологической ткани используются фемтосекундные импульсные титан-сапфировые лазерные источ-

ники, перестраиваемые по длине волны в интервале 700–1000 нм, с длительностью импульса около 100 фс и частотой их следования около 100 МГц. При средней мощности излучения в фокальном объеме менее 10 мВт пиковая мощность в импульсе достигает единиц киловатт, что позволяет эффективно возбуждать как яркие химические флуоресцирующие метки, так и слабо флуоресцирующие эндогенные флуорофоровы [3, 7].

В то же время, по сравнению с другим широко распространенным методом визуализации структуры биотканей с микронным разрешением – оптической когерентной томографией (ОКТ), ДФМ отличается существенно меньшей предельной глубиной наблюдения. Известно, что глубина ОКТ-визуализации ограничена эффектами многократного малоуглового рассеяния излучения и нарастающим влиянием рассеяния на большие углы. Эти эффекты становятся существенными на глубинах, превышающих 10–15 длин свободного пробега фотона между актами однократного рассеяния, или одну транспортную длину [8, 9]. В спектральном диапазоне окна прозрачности ($\lambda = 600 - 1200$ нм) эта величина варьируется от нескольких сотен микрон в плотных биотканях и коже до единиц миллиметров в слизистых тканях [10]. Вместе с тем, максимальная глубина наблюдения стандартно окрашенных образцов методом ДФМ с помощью типичной коммерческой системы лазерной сканирующей микроскопии, оснащенной титан-сапфировым лазером, составляет не более 600 микрон [4, 5]. Это означает, что диффузное размытие сфокусированного пучка не является основным ограничением глубины наблюдения в ДФМ.

Другой помехой для получения изображений с большой глубины методом ДФМ может стать сильная засветка приповерхностной области. Мощность нерассеянного света в фокусе пучка накачки в мутной среде спадает

Е.А.Сергеева. Институт прикладной физики РАН, Россия 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: sea@ufr.appl.sci-nnov.ru

Поступила в редакцию 26 февраля 2010 г., после доработки – 8 апреля 2010 г.

по экспоненциальному закону Ламберта – Бера [11]. Для компенсации этих потерь мощность излучения накачки необходимо увеличивать таким образом, чтобы в фокусе она оставалась на уровне единиц мВт. При этом локальная интенсивность излучения накачки вдали от фокуса, но вблизи поверхности образца, может стать сравнимой с интенсивностью в фокусе и привести к наложению изображений, регистрируемых с разных глубин. В работе [12] высказано предположение, что приповерхностная засветка является основным фактором, ограничивающим глубину наблюдения в ДФМ. Однако ослабление полезного сигнала из-за экспоненциального спада его мощности может оказаться более существенным ограничением.

В предложенной работе проведен анализ всех вышеперечисленных факторов, ограничивающих глубину наблюдения структуры рассеивающих сред методом ДФМ. Для различных типов флуорофоров выделен определяющий фактор ограничения глубины визуализации и приведены ее численные оценки. Влияние многократного малоуглового рассеяния на форму сфокусированного пучка исследовано в рамках малоуглового диффузионного приближения теории рассеяния, которое применимо для пучков с угловой расходимостью, превышающей ширину малоугловой части фазовой функции рассеяния. Численные характеристики, используемые при расчетах, соответствуют параметрам современных коммерческих систем двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Расчет сигнала двухфотонной флуоресценции

Численной характеристикой, определяющей возможность нелинейного возбуждения флуорофора на длине волны λ_{ex} , является сечение двухфотонного поглощения $\Sigma_2(\lambda_{ex})$, измеряемое в $см^4 \cdot с / фот.$ [13]. В методиках расчета сигнала двухфотонной флуоресценции чаще фигурирует динамическое сечение двухфотонного поглощения Σ_2^* , равное произведению Σ_2 на квантовый выход двухфотонной флуоресценции. Спектры Σ_2^* в ближнем ИК диапазоне в настоящее время измерены для широкого ряда органических флуорофоров, используемых в ДФМ. Сечение двухфотонного поглощения варьируется от 10^{-3} GM ($1 GM = 10^{-50} см^4 \cdot с / фот.$) для эндогенных биологических флуорофоров (рибофлавин, NADH) до 10^4 GM для коллоидных квантовых точек [2, 14, 15]. В работе [13] было показано, что число фотонов флуоресценции u , испускаемых в единицу времени из фокального объема сфокусированного пучка фемтосекундного импульсного лазера, может быть вычислено по формуле

$$u = \frac{\alpha \Sigma_2^* P_{ex}^2}{2\tau F} C_0 \int_V I_{ex}^2(r) dr, \quad (1)$$

где P_{ex} – средняя мощность излучения накачки (как и u , измеряется в фот./с); τ – длительность импульса накачки; α – форм-фактор импульса (для прямоугольного импульса $\alpha = 1$, для импульса гауссовой формы $\alpha = 0.4$); F – частота следования импульсов; C_0 – концентрация флуорофора, усредненная по фокальному объему; I_{ex} – распределение интенсивности излучения вблизи фокуса в пучке накачки единичной мощности, удовлетворяющее

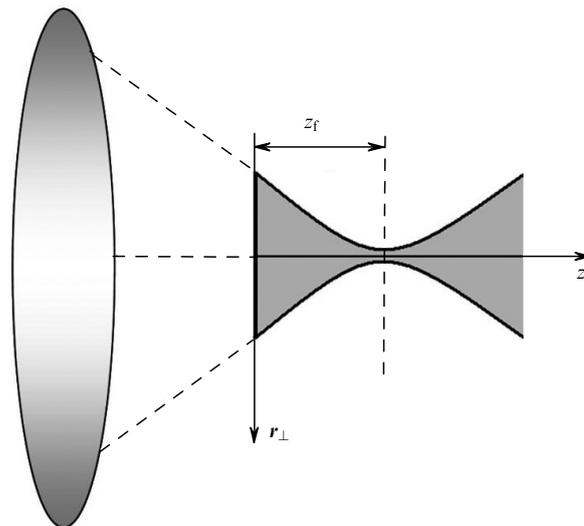


Рис.1. Геометрия сфокусированного пучка накачки.

условию нормировки $\int I_{ex}(r_{\perp}, z) d^2 r_{\perp} = 1$ (рис.1). Выражение (1) справедливо для нерассеивающей среды и без учета эффектов насыщения двухфотонного поглощения флуорофора. Если интенсивность в пучке, сфокусированном на глубине z_f , задана гауссовым распределением

$$I_{ex}(r) = \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{S_0(z)}\right) [\pi S_0(z)]^{-1}, \quad (2)$$

где

$$S_0(z) = \left(0.61 \frac{\lambda_{ex}}{NA}\right)^2 + \frac{(z - z_f)^2 NA^2}{(1.22\pi n)^2}$$

– квадрат характерной ширины гауссова пучка по уровню $1/e$ при различных уровнях z ; n – показатель преломления среды, а NA – числовая апертура фокусирующего объектива, то выражение (1) преобразуется к виду

$$u = \frac{\alpha \Sigma_2^* P_{ex}^2}{2\tau F} C_0 \frac{\pi n}{\lambda_{ex}}. \quad (3)$$

Сигнал двухфотонной флуоресценции, зарегистрированный фотоприемником, пропорционален произведению числа фотонов u на собирающую способность системы детектирования, которая зависит от числовой апертуры объектива, коэффициента пропускания оптических элементов и размера конфокальной диафрагмы приемника [16, 17]. Для описания сигнала двухфотонной флуоресценции, регистрируемой из рассеивающей среды с помощью полностью открытой конфокальной диафрагмы, достаточно рассмотреть влияние рассеяния только на эффективность возбуждения флуоресценции. С этой целью нужно уточнить выражения (2) и (3) с учетом ослабления интенсивности накачки из-за однократного рассеяния и влияния многократно рассеянных фотонов.

2.2. Ограничение глубины наблюдения вследствие размытия пучка накачки

В результате рассеяния происходит отклонение фотонов от исходных траекторий, вследствие чего на больших глубинах острая фокусировка пучка размывается. Аналитическое описание распространения сфокусированно-

го излучения в сильно рассеивающей среде может быть проведено в рамках теории переноса излучения [11]. В мягких биотканях, для которых характерно малоугловое рассеяние излучения ближнего ИК диапазона, интенсивность в рассеянном пучке может быть рассчитана в малоугловом диффузионном приближении теории переноса [18, 19]. Дисперсия $\langle \theta^2 \rangle$ малоугловой части фазовой функции рассеяния у биотканей обычно не превосходит 0.2 [10], а эффектами линейного поглощения на длинах, ограниченных единицами миллиметров, можно пренебречь. Для объективов с числовой апертурой NA, превышающей 0.5, ширина углового распределения фотонов превышает ширину переднего лепестка фазовой функции рассеяния биотканей, поэтому малоугловое диффузионное приближение может применяться даже на малых глубинах рассеяния. Мы воспользуемся уточненным малоугловым диффузионным приближением, согласно которому полная интенсивность в пучке подсветки на глубине z в рассеивающей среде с коэффициентом рассеяния μ_s складывается из интенсивности ослабленного нерассеянного света (баллистической компоненты) и рассеянной составляющей [20]:

$$I = e^{-\mu_s z} \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{S_0(z)}\right) [\pi S_0(z)]^{-1} + (1 - e^{-\mu_s z}) \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{S_s(z)}\right) [\pi S_s(z)]^{-1}. \quad (4)$$

Здесь S_s – дисперсия пространственного распределения рассеянного света, которая зависит от параметров пучка и среды следующим образом:

$$S_s(z) = S_0(z) + \frac{1}{3} \frac{\mu_s \langle \theta^2 \rangle z^3}{1 - e^{-\mu_s z}}. \quad (5)$$

Зависимости полной интенсивности излучения в фокусе, а также обеих ее компонент от глубины фокусировки z_f продемонстрированы на рис.2, а поперечное распределение составляющих интенсивности в окрестности фокуса –

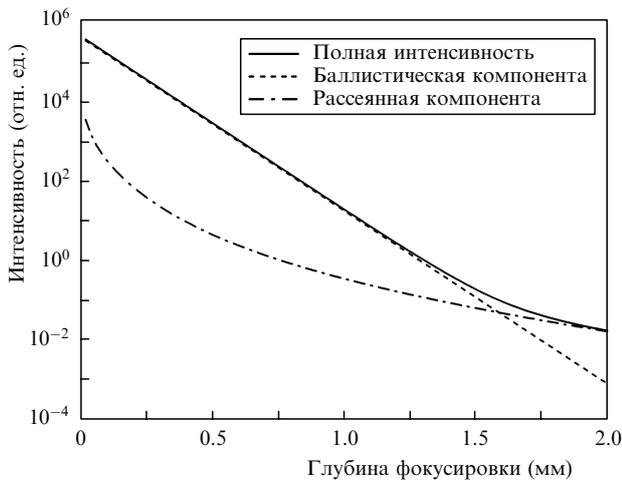


Рис.2. Зависимость компонент интенсивности излучения в перетяжке остро сфокусированного пучка накачки от глубины фокусировки в рассеивающей среде. Длина волны излучения накачки $\lambda_{ex} = 800$ нм, средний показатель преломления среды $n = 1.33$, числовая апертура фокусирующего объектива $NA = 0.8$, коэффициент рассеяния среды $\mu_s = 10 \text{ мм}^{-1}$, фактор анизотропии рассеяния $g = 0.95$.

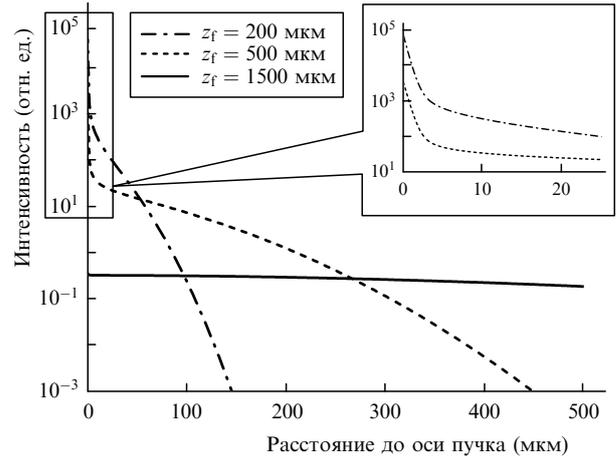


Рис.3. Поперечное распределение интенсивности в перетяжке остро сфокусированного пучка накачки на разных глубинах фокусировки в рассеивающей среде. Параметры среды и пучка те же, что на рис.2.

на рис.3. На малых глубинах фокусировки доминирует баллистическая компонента, но с увеличением глубины все большая доля энергии пучка трансформируется в рассеянную составляющую и при $\mu_s z_f > 10$ интенсивность в фокусе определяется в основном рассеянными фотонами. Пространственное разрешение метода ДФМ обусловлено шириной пучка в фокусе, и в области доминирования баллистической составляющей размер элемента поперечного разрешения совпадает с дифракционным пределом $0.61 \lambda_{ex}/NA$. Однако на глубинах с преобладанием рассеянной компоненты размер пучка в фокусе определяется главным образом поперечным распределением многократно рассеянных фотонов и существенно превосходит дифракционный предел (рис.3). Глубина наблюдения z_1 , на которой происходит потеря субмикронного разрешения метода ДФМ, может быть оценена как глубина, на которой интенсивности баллистической и рассеянной компонент в области фокуса сравнимы по величине; тогда

$$1 + \frac{NA^2}{1.1 \lambda_{ex}^2} \mu_s \langle \theta^2 \rangle z_1^3 \simeq e^{\mu_s z_1}. \quad (6)$$

Величина z_1 зависит как от параметров рассеивающей среды, так и от характеристик пучка накачки, однако трансцендентный вид уравнения (6) не позволяет получить эту зависимость в аналитическом виде. Графически зависимость z_1 от параметров рассеяния проанализирована в разд.3.

2.3. Ограничение глубины наблюдения, вызванное приповерхностной засветкой

Одним из главных преимуществ метода ДФМ по сравнению с конфокальной микроскопией считается отсутствие фонового сигнала даже при полностью открытой конфокальной диафрагме. В прозрачной среде уровень локальной интенсивности, необходимый для эффективного нелинейного возбуждения флуорофора, достигается только вблизи фокуса пучка. Однако при наблюдении на больших глубинах в сильно рассеивающей среде необходимо компенсировать потерю энергии в баллистической составляющей и повышать мощность в падающем пучке. При этом вблизи поверхности уровень интенсивности возрастает настолько, что эффективности

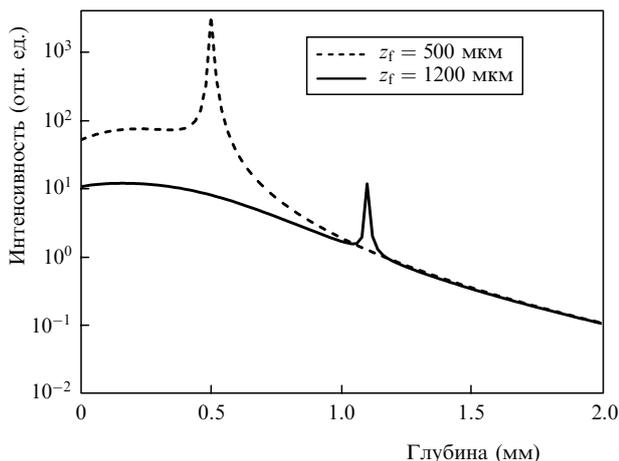


Рис.4. Распределение интенсивности излучения вдоль оси пучка накачки, сфокусированного на разных глубинах в рассеивающей среде. Параметры среды и пучка те же, что на рис.2. При фокусировке на глубине 1200 мкм интенсивность в фокусе пучка сравнима с интенсивностью на глубине 300 мкм.

двухфотонного возбуждения флуоресценции в приповерхностной области и в окрестности фокуса становятся сравнимы (рис.4). Возникает дополнительное изображение, которое мешает наблюдению глубинного слоя [12, 21]. Глубина фокусировки z_2 , начиная с которой этот эффект становится существенным, может быть определена из (4) путем численного анализа распределения полной интенсивности вдоль оси пучка. Зависимость предела z_2 от коэффициента рассеяния среды представлена на графиках разд.3.

2.4. Ограничение глубины наблюдения уровнем полезного сигнала

Рассмотренные выше ограничения глубины наблюдения можно отнести к фундаментальным для метода ДФМ. Эти ограничения нельзя преодолеть путем повышения мощности накачки или улучшения собирающей способности системы формирования изображения. Однако они могут оказаться не основными, а второстепенными в том случае, когда полезный сигнал флуоресценции становится слабым и сравнимым с уровнем шумов приемника. Контраст одиночного пикселя изображения в лазерной сканирующей микроскопии определяется количеством фотонов флуоресценции, которое регистрируется фотоприемником за время накопления сигнала из одной точки среды, по отношению к шумам фотоприемника. Шумы фотоприемника в основном возникают из-за дробового эффекта и их амплитуда пропорциональна корню квадратному из амплитуды принимаемого сигнала [22, 23]. Для достижения минимально приемлемого отношения сигнал/шум число полезных фотонов флуоресценции N_{\min} , образующих элемент изображения, должно быть не меньше 10 [23]. Количество зарегистрированных фотонов может быть рассчитано как произведение числа фотонов флуоресценции (3) на время накопления сигнала Δt в элементе изображения и на собирающую способность системы детектирования η . Последняя зависит от числовой апертуры объектива, характеристик пропускания оптических элементов формирования флуоресцентного изображения (дихроичные зеркала, фильтры), а также от величины конфокальной апертуры детектора. Если установка лазерной сканирующей микроскопии оснаще-

на недесканирующим детектором* [21], то величина собирающей способности определяется в основном числовой апертурой объектива и может быть оценена как доля полного числа фотонов флуоресценции (изотропно распределенных по направлениям в пределах полного телесного угла 4π), приходящая в конус с углом при вершине $\alpha = \arcsin(\text{NA})$:

$$\eta = \frac{2\pi(1 - \cos \alpha)}{4\pi} = \frac{1 - \sqrt{1 - \text{NA}^2}}{2}. \quad (7)$$

Количество полезных фотонов, формирующих один пиксель изображения, можно рассчитать по формуле

$$N = \frac{\alpha \Sigma_2^* C_0 \pi n}{2\tau F \lambda_{\text{ex}}} P_{\text{ex}}^2 \frac{1 - \sqrt{1 - \text{NA}^2}}{2} \Delta t, \quad (8)$$

из которой следует, что для конкретных параметров установки (α , τ , F , λ_{ex} , NA , Δt) и флуорофора с известными характеристиками (C_0 , Σ_2^*) мощность излучения накачки в фокусе, требуемая для возбуждения минимального необходимого числа фотонов флуоресценции, определяется по формуле

$$P_{\text{f}} = \left[\frac{\Delta t \alpha \Sigma_2^* C_0 \pi n}{N_{\min} 2\tau F \lambda_{\text{ex}}} \frac{1 - \sqrt{1 - \text{NA}^2}}{2} \right]^{-1/2}. \quad (9)$$

В то же время, мощность излучения накачки ограничена требованиями неинвазивности. Стандарты лазерной безопасности [10] устанавливают максимальные значения плотности энергии кратковременного облучения и средней мощности лазерного излучения для заданной экспозиции. Доза облучения 1 Дж/см² считается пограничной, выше которой проявляются различные типы повреждения биоткани – от теплового разрушения до нелинейно-оптического пробоя, в зависимости от длительности воздействия [6]. Энергетические характеристики импульсного лазерного пучка, остро сфокусированного в глубине среды, должны удовлетворить двум требованиям: в области фокуса, где интенсивность излучения высока, необходимо избегать оптического пробоя одиночным импульсом длительностью 100 фс, в то время как на поверхности образца, в области низкой интенсивности, нужно предотвратить чрезмерный нагрев биоткани при длительном сканировании одного и того же участка. Исходя из предельной безопасной дозы облучения 0.1 Дж/см², средняя мощность излучения в перетяжке не должна превышать 10 мВт, а на поверхности образца при экспозиции в доли секунды она должна быть в пределах нескольких сотен милливольт. Указанный предел средней мощности в фокусе согласуется с данными экспериментов [24, 25]: при наблюдении культуры клеток методом ДФМ превышение мощности 10 мВт влечет за собой необратимые повреждения клеток и их массовую гибель. Поэтому мы будем ориентироваться на значение $P_{\text{f}}^* = 10$ мВт как на максимальную мощность

*Недесканирующая схема детектирования подразумевает, что сигнал флуоресценции после объектива попадает непосредственно на фотоприемник, минуя сканирующие зеркала и конфокальную апертуру. Это позволяет избежать дополнительных потерь слабого полезного сигнала при нелинейном возбуждении флуоресценции, когда даже рассеянные фотоны несут полезную информацию.

в фокусе и на значение $P_0^* = 100$ мВт как на предельную мощность на границе образца.

В рассеивающем образце мощность в фокусе (на глубине $z = z_f$), и мощность на границе образца связаны законом Ламберта – Бера [11]:

$$P_f = P_0 \exp(-\mu_s z_f). \quad (10)$$

В результате глубина наблюдения z_3 , ограниченная низким уровнем полезного сигнала, определяется из условий (9) и (10) при задании максимальной мощности на границе:

$$z_3 = \frac{1}{\mu_s} \ln \left[\frac{P_0^*}{P_f} \right] = \frac{1}{\mu_s} \ln \left[P_0^* \sqrt{\frac{\alpha \Sigma_2^* C_0 \pi n}{4\tau F \lambda_{\text{ex}} N_{\text{min}}}} (1 - \sqrt{1 - \text{NA}^2}) \right]. \quad (11)$$

Для флуорофоров с малым значением Σ_2^* либо в случае их низкой концентрации мощность P_f , рассчитанная по формуле (9), может оказаться выше предельно допустимого значения P_f^* . Такая ситуация означает, что при соблюдении требований неинвазивности необходимый минимальный уровень полезного сигнала в данном образце не достигается. Простейшее решение этой проблемы – увеличение времени накопления сигнала, однако это может приводить к фотовыцветанию флуорофора [17] и нагреву поверхности [10]. Количественный анализ значений z_3 для конкретных красителей, а также обсуждение возможностей повышения глубины визуализации представлены в разд.3.

3. Обсуждение результатов

Выше были рассмотрены три фактора, ограничивающие глубину визуализации в методе ДФМ и приведены соотношения для расчета соответствующих значений максимальной глубины z_1, z_2, z_3 . Чтобы выяснить, какое из ограничений является определяющим при исследовании конкретного образца, рассмотрим зависимость величин $z_1 - z_3$ от средней длины свободного пробега фотона между актами рассеяния («длины рассеяния») $l_s = 1/\mu_s$. Рассеивающая среда обычно описывается коэффициентом рассеяния μ_s и средним косинусом угла рассеяния (фактором анизотропии фазовой функции рассеяния) g . Однако в формулах малоуглового диффузионного приближения фигурирует другая характеристика однократного рассеяния – дисперсия малоугловой части фазовой функции $\langle \theta^2 \rangle$. Чтобы соотнести эти две статистические характеристики, рассмотрим фазовую функцию рассеяния Хеньи – Гринштейна [26, 27]

$$p_{\text{HG}}(\theta) = \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2g \cos \theta]^{3/2}},$$

нормированную следующим образом: $\frac{1}{2} \int_0^\pi p_{\text{HG}}(\theta) \sin \theta d\theta = 1$, где θ – угол рассеяния. Для выделения малоугловой составляющей фазовой функции Хеньи – Гринштейна заменим ее приближенно на двухкомпонентную фазовую функцию, содержащую в явном виде малоугловую (p_1) и изотропную части [28]:

$$p_{\text{HG}}(\theta) \simeq gp_1(\theta) + (1 - g). \quad (12)$$

При такой замене малоугловая компонента p_1 , дающая вклад в рассеяние в пределах передней полусферы, хорошо аппроксимирует остронаправленную часть фазовой функции Хеньи – Гринштейна. Дисперсия малоугловой части рассчитывается как второй момент функции p_1 с интегрированием по передней полусфере $\theta \in [0; \pi/2]$. Для сред с фактором анизотропии, превышающим 0.7, можно вывести асимптотическое соотношение между $\langle \theta^2 \rangle$ и g :

$$\langle \theta^2 \rangle \simeq (1 - g). \quad (13)$$

Остальные параметры для расчета $z_1 - z_3$ выбираются в соответствии с инструментальными характеристиками стандартных систем лазерной сканирующей микроскопии, оснащенных титан-сапфировыми импульсными лазерными источниками. Полагаем, что возбуждение производится на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 800$ нм с использованием водно-иммерсионного объектива с числовой апертурой $\text{NA} = 0.8$, длительность одиночного импульса возбуждения $\tau = 100$ фс, частота следования импульсов $F = 100$ МГц, форм-фактор для импульса с гауссовым профилем $\alpha = 0.4$, время накопления сигнала из одной точки изображения $\Delta t = 3$ мкс. Оценку величины z_3 проведем для трех типов флуорофоров: эндогенного вещества (NADH), популярного органического флуорофора (флуоресцеин) и коллоидных полупроводниковых нанокристаллов («квантовые точки») – нового класса маркеров для лазерной сканирующей микроскопии. Для этих флуорофоров получены следующие значения динамического сечения двухфотонного поглощения в ближнем ИК-диапазоне: $\Sigma_{\text{NADH}}^* = 0.01$ GM [2], $\Sigma_{\text{Fsn}}^* = 100$ GM [13], $\Sigma_{\text{QDs}}^* = 2 \times 10^4$ GM [15]. Согласно данным литературы, характерные внутриклеточные концентрации экзогенных флуорофоров составляют $10^{12} - 10^{14}$ мл $^{-1}$ [29–31], а концентрации NADH достигают уровня $10^{17} - 10^{18}$ мл $^{-1}$ [32, 33].

На рис.5 продемонстрирована зависимость предельных значений глубин метода ДФМ z_1 и z_2 , ограниченных размытием острой фокусировки пучка (z_1) и приповерхностной засветкой (z_2), от длины свободного пробега фотона l_s в рассеивающей и непоглощающей среде. Дополнительно на рис.5 приведен уровень одной транспортной длины $l_t = l_s/(1 - g)$, разделяющий области малоуглового и диффузного рассеяния. Как следует из рисунков, потеря субмикронного пространственного разрешения метода ДФМ происходит приблизительно на той же глубине, на которой информативное изображение из области фокуса начинает замываться приповерхностной засветкой. Другими словами, ни один из фундаментальных пределов метода ДФМ нельзя назвать доминирующим, оба предельных значения глубин z_1 и z_2 лежат в диапазоне 10–15 длин рассеяния и близки к значению l_t . Теоретически это позволяет расширить диапазон рабочих глубин в методе ДФМ до нескольких миллиметров в умеренно рассеивающих средах.

Вместе с тем, инструментальное ограничение, налагаемое на глубину в методе ДФМ низким уровнем полезного сигнала (z_3), оказывается наиболее существенным. На рис.6 приведены зависимости величины z_3 от длины свободного пробега фотона для трех указанных типов флуорофоров, рассчитанные по типичным характеристикам установки ДФМ и реалистичным параметрам биологического флуоресцирующего объекта. Как следует из графиков, инструментально ограниченная

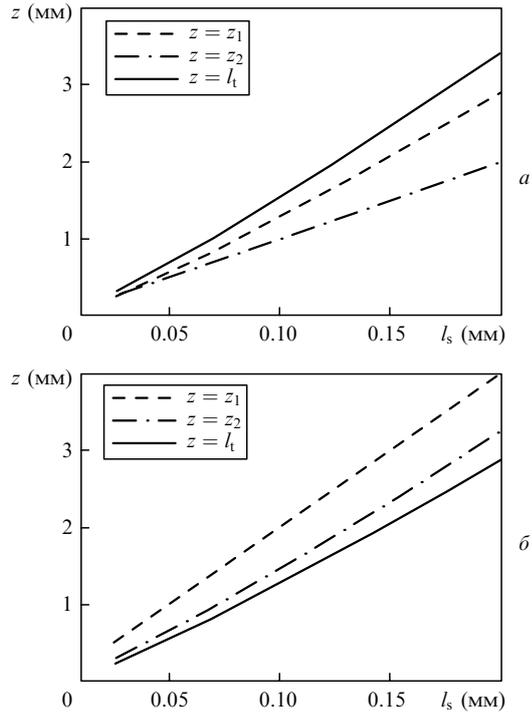


Рис.5. Максимальные глубины визуализации при двухфотонной флуоресцентной микроскопии, ограниченные размытием пучка (z_1) и избыточной приповерхностной засветкой (z_2), в зависимости от длины рассеяния в среде с фактором анизотропии $g = 0.9$ (а) и $g = 0.95$ (б). Длина волны излучения накачки $\lambda_{ex} = 800$ нм, средний показатель преломления среды $n = 1.33$, числовая апертура фокусирующего объектива $NA = 0.8$. Сплошная кривая отображает уровень одной транспортной длины.

глубина визуализации в методе ДФМ не превосходит $2l_s$ для органического экзогенного флуорофора (в нашем случае флуоресцеина) и $5l_s$ для более ярких коллоидных квантовых точек. У биотканей значения l_s в ближнем ИК диапазоне лежат в пределах 30–200 мкм, что соответствует коэффициенту рассеяния $\mu_s = 5 - 30$ мм⁻¹. Таким образом, инструментальный предел метода ДФМ составляет 60–400 мкм для органических флуорофоров и 150–1000 мкм для квантовых точек (в зависимости от типа биоткани). Мощность накачки P_f , необходимая для генерации минимального полезного сигнала, составляет около 10 мВт для органического флуорофора и около 5 мВт для квантовых точек. Это означает, что использование квантовых точек в качестве флуорофоров снижает вероятность фотоповреждения исследуемого образца в области фокуса. В то же время, превышать среднюю мощность 5 мВт в образцах, маркированных квантовыми точками, не рекомендуется: это может привести к эффекту насыщения двухфотонного поглощения у квантовых точек, что не позволит получить выигрыш в глубине визуализации и к тому же негативно скажется на пространственном разрешении [2, 34]. Что касается эндогенных флуорофоров с сечением двухфотонного поглощения порядка 0.01 ГМ, то детектирование сигнала их двухфотонной флуоресценции затруднено при концентрациях ниже 10^{16} мл⁻¹, т. к. даже при мощности возбуждения 10 мВт на детектор за время накопления сигнала может не прийти ни одного фотона флуоресценции. Однако при многократном возрастании концентрации (например, в скоплениях митохондрий) сигнал двухфотонной флуоресценции эндогенного флуорофора может ока-

заться сравнимым по величине с сигналом флуоресценции умеренно ярких органических красителей (рис.6). Это дает возможность получать изображения неокрашенных образцов биоткани по их двухфотонной автофлуоресценции с глубин, превосходящих одну длину свободного пробега фотона. С другой стороны, автофлуоресценция из областей повышенной концентрации эндогенного флуорофора может создавать помеху наблюдению двухфотонной флуоресценции от экзогенных красителей, маркирующих выделенные элементы клетки или биоткани. Во избежание этого следует либо «отстраиваться» от двухфотонной автофлуоресценции по длинам волн возбуждения экзогенных флуорофоров, либо подбирать красители, существенно отличающиеся от собственных флуорофоров по спектру флуоресценции.

Заметим, что значения z_3 , рассчитанные по формуле (11) и приведенные на рис.6, нужно рассматривать как приближенные, поскольку они получены для неких усредненных значений концентрации флуорофора. В каждом отдельном случае локальная концентрация может существенно отличаться как в большую, так и в меньшую сторону, в зависимости от особенностей накопления флуорофора. Однако возможные отклонения значений z_3 при изменении концентрации в несколько раз будут составлять от единиц до десятков процентов в соответствии с формулой (11). Существенное увеличение предела z_3 возможно при увеличении скважности следования импульсов накачки $S = (\tau F)^{-1}$ и, следовательно, повышении пиковой мощности накачки при сохранении средней. Это может быть реализовано путем уменьшения частоты следования фемтосекундных импульсов с помощью регенеративного усилителя в блоке источника накачки. Современные регенеративные усилители позволяют снизить частоту следования импульсов на три порядка [35]. Однако пиковая мощность возрастает пропорционально скважности, при этом существенно повышается вероятность оптического пробоя биологического образца в области фокуса, поскольку при средней мощности в фокусе на уровне единиц милливольт локальная интенсивность превышает 10 ТВт/см². Если же пренебречь возможностью нелинейного фотоповреждения биоткани, то использование регенеративного усилителя обе-

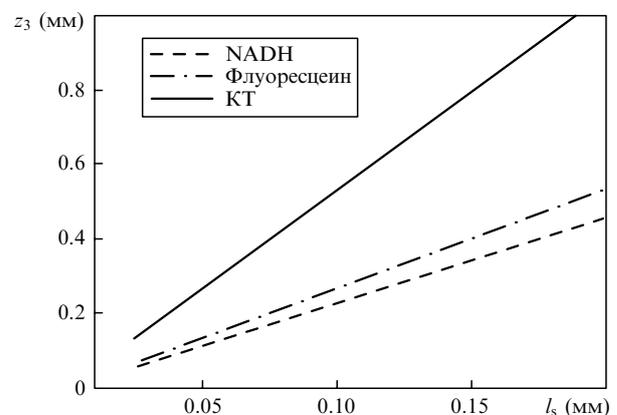


Рис.6. Максимальная глубина визуализации в методе двухфотонной флуоресцентной микроскопии, ограниченная низким уровнем полезного сигнала для трех типов флуорофоров: NADH (концентрация 10^{17} мл⁻¹), флуоресцеин (концентрация 2×10^{13} мл⁻¹), коллоидные квантовые точки (КТ, концентрация 2×10^{13} мл⁻¹). Длина волны излучения накачки $\lambda_{ex} = 800$ нм, средний показатель преломления среды $n = 1.33$, числовая апертура фокусирующего объектива $NA = 0.8$.

спечит увеличение инструментального предела метода ДФМ в образцах, маркированных коллоидными квантовыми точками, до глубины $8l_s$, что весьма близко к фундаментальным ограничениям метода, определяемым величинами z_1 и z_2 .

4. Заключение

В предложенной работе рассмотрены три основные причины, устанавливающие ограничения на глубину наблюдения в двухфотонной флуоресцентной микроскопии сильно рассеивающих биологических тканей. Выделены два фундаментальных ограничения, связанные с влиянием многократного малоуглового рассеяния на форму остро сфокусированного пучка накачки и с возникновением помех из-за приповерхностной засветки рассеивающего образца. Эти факторы ограничивают глубину визуализации в методе ДФМ на уровне 10–15 длин рассеяния, что близко к одной транспортной длине. Однако наиболее строгим является ограничение, обусловленное низким уровнем флуоресцентного сигнала с больших глубин из-за экспоненциального ослабления мощности излучения накачки, слабой эффективности двухфотонного возбуждения флуорофоров и их недостаточной концентрации. Одним из способов увеличения глубины визуализации вплоть до фундаментального предела является использование флуорофоров с наибольшим сечением двухфотонного поглощения (коллоидных квантовых точек) и регенеративного усилителя для увеличения пиковой мощности накачки, хотя последнее сопряжено с высоким риском оптического пробоя биологического образца.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского федерального агентства по науке и инновациям (госконтракт № 02.740.11.0086), РФФИ (гранты № 08-02-01293, 09-02-97083, 09-04-12254) и гранта Президента РФ для поддержки молодых кандидатов наук (МК-698.2009.2).

- Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. *Science*, **248**, 73 (1990).
- Xu C., Webb W.W., in *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (New York: Plenum Press, 1997, Vol. 5).
- So P.T.C., Dong C.Y., Masters B.R., Berland K.M. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 399 (2000).
- Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. *Nature Biotechnol.*, **21**, 1368 (2003).
- Helmchen F., Denk W. *Nature Meth.*, **2**, 932 (2005).
- Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine*. Ed. by M.Braun, P.Gilch, W.Zint (Berlin: Springer, 2008).
- Koenig K., Ehlers A., Riemann I., Schenkl S., Bueckle R., Kaatz M. *Microscopy Res. Techn.*, **70**, 398 (2007).
- Геликонов Г.В., Долин Л.С., Сергеева Е.А., Турчин И.В. *Изв. вузов. Сер. Радиофизика*, **46**, 628 (2003).
- Кириллин М.Ю., Приезжев А.В., Мюллюля Р. *Квантовая электроника*, **38**, 570 (2008).
- Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (Саратов: изд-во Саратовского гос. ун-та, 1998).
- Исимару А. *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981, т. 1).
- Theer P., Denk W. *J. Opt. Soc. Am. A*, **23**, 3139 (2006).
- Xu C., Webb W.W. *J. Opt. Soc. Am. B*, **13**, 481 (1996).
- Zipfel W.R., Williams R.M., Christie R., Nikitin A.Y., Hyman B.T., Webb W.W. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **100**, 7075 (2003).
- Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., Webb W.W. *Science*, **300**, 1434 (2003).
- Oheim M., Beaurepaire E., Chaigneau E., Mertz J., Charpak S. *J. Neurosci. Meth.*, **111**, 29 (2001).
- Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Ed. by J.B.Pawley (Berlin: Springer, 2006).
- Зере Э.П., Иванов А.П., Кацев И.Л. *Перенос изображения в рассеивающей среде* (Минск: Наука и техника, 1985).
- Kokhanovsky A.A. *Meas. Sci. Technol.*, **13**, 233 (2002).
- Долин Л.С. *Изв. вузов. Сер. Радиофизика*, **41**, 1258 (1998).
- Leray A., Odin C., Le Grand Y. *Opt. Commun.*, **281**, 6139 (2008).
- Sheppard C.J.R., Gan X., Gu M., Ray M., in *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (New York: Plenum Press, 1995).
- Dixon A., Heinlein T., Wolleschensky R. *Springer Series on Fluorescence*, **6**, 3 (2008).
- Koenig K., Becker T.W., Fischer P., Riemann I., Halhuber K.-J. *Opt. Lett.*, **24**, 113 (1999).
- Hopt A., Neher E. *Biophys. J.*, **80**, 2029 (2001).
- Henyei L.G., Greenstein J. L. *Astrophys. J.*, **93**, 70 (1941).
- Jacques S.L., Alter C.A., Prahl S.A. *Lasers in the Life Sci.*, **1**, 309 (1987).
- Долин Л.С., Сергеева Е.А. *Изв. вузов. Сер. Радиофизика*, **44**, 931 (2001).
- Vukojevic V., Heidkamp M., Ming Y., Johansson B., Terenius L., Rigler R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **105**, 18176 (2008).
- Chang E., Thekkek N., Yu W.W., Colvin V.L., Drezek R. *Small*, **2**, 1412 (2006).
- www.probes.invitrogen.com/media/pis/mp19011.pdf.
- Yu Q., Heikal A.A. *J. Photochem. and Photobiol. B: Biology*, **95**, 46 (2009).
- Lin S.J., Ford E., Haigis M., Liszt G., Guarente L. *Genes and Development*, **18**, 12 (2004).
- Катичев А.Р., Сергеева Е.А. *Оптика и спектроскопия в биомедицинских исследованиях*, **107**, 887 (2009).
- Theer P., Hasan M.T., Denk W. *Opt Lett.*, **28**, 1022 (2003).