

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

Амитонова Любовь Владимировна

Световодные системы для нейрофотоники

01.04.21 – Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Работа выполнена на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: д.ф.-м.н, профессор
Желтиков Алексей Михайлович
Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова, Москва

Официальные оппоненты: д.ф.-м.н, профессор
Гончуков Сергей Александрович
Национальный исследовательский ядерный университет
«МИФИ», Москва

д.ф.-м.н, профессор
Лощенов Виктор Борисович
Федеральное государственное бюджетное учреждение нау-
ки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской
академии наук, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение нау-
ки Центр фотохимии Российской академии наук (ЦФ РАН),
Москва

Защита состоится « 06 » июня 2013 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.31
при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, по адресу: 119991 ГСП-1
Москва, Ленинские горы, МГУ, улица Академика Хохлова, дом 1, стр. 62, Корпус нелинейной опти-
ки, аудитория имени С.А. Ахманова.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки Московского го-
сударственного университета имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27).

Автореферат разослан « 23 » апреля 2013 г.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью, просьба высылать
по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

к.ф.-м.н.

Коновко А. А.

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Оптические методы являются одними из наиболее перспективных направлений проведения диагностики и измерений в биологии и биомедицинских приложениях. Оптическая визуализация располагает непревзойденными возможностями, которые включают в себя целый ряд методов: визуализацию флуоресцентных биомаркеров, методы химически селективной визуализации за счет эффектов спонтанного и когерентного комбинационного рассеяния света и методы нелинейно-оптической микроскопии, такие как микроскопия двухфотонного поглощения, микроскопия генерации второй и третьей гармоники.

Возможность изучать живые системы на протяжении длительного времени является ключевой для многих биологических исследований, поэтому методы оптической регистрации, адаптированные для долговременных экспериментов над живыми бодрствующими животными, сейчас наиболее востребованы. Работа с живыми объектами, *in vivo*, накладывает особые требования к устройствам визуализации в отношении их гибкости, компактности, механической прочности и необходимости объединять разнообразные функциональные задачи, такие как обеспечение оптимальной геометрии локального возбуждения биомолекул, эффективный сбор оптического отклика, доставка сигналов с минимальными потерями и возможности визуализировать различные аспекты биологических процессов. Отдельной проблемой является визуализация глубоких слоев мозга живого животного. Для методов двухфотонной микроскопии глубина визуализации не может превышать 1 мм или 1.5 мм в случае использования специальных маркеров и микроскопных систем, что позволяет *in vivo* исследовать только кору головного мозга.

Компактный размер, механическая гибкость и все более растущая функциональность волоконно-оптических устройств в сочетании с последними разработками флуоресцентных маркеров для разнообразных клеточных процессов обеспечивают новые возможности для *in vivo* функциональной визуализации в биологических задачах. Таким образом волоконно-оптические зонды становятся ключевыми компонентами оптических сенсорных систем.

В первых работах по волоконно-оптическому получению изображений живой ткани была продемонстрирована возможность использования пучков оптических волокон для визуализации внутренних функциональных сигналов в глубоких слоях мозга свободноподвижных кошек. Хотя изображение получалось плохого качества и с низким разрешением, идея использовать оптические волокна для изучения бодрствующих животных продолжила развиваться и была позднее применена к живым мышам. В этих работах оптическое волокно использовалось лишь в течение короткого времени и либо как отдельный точечный зонд, который регистрирует, но не визуализирует характеристики ткани либо в устройствах не обеспечивающих клеточного разрешения. До сих пор методы волоконно-оптической визуализации подразумевали работу только с одним флуоресцентным биомаркером и не были адаптированы для задач нелинейно-оптической микроскопии и микроскопии комбинационного рассеяния света. Таким образом, существующие волоконно-оптические системы визуализации обладают рядом существенных ограничений.

Цель диссертационной работы состоит в исследовании линейных и нелинейных оптических явлений в контексте задач биовизуализации и разработке световодных систем для оптического зондирования тканей мозга живых бодрствующих животных.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

I. Исследование и оптимизация параметров световодных зондов для эффективного сбора некогерентного флуоресцентного отклика с высоким пространственным разрешением.

II. Разработка и экспериментальная реализация волоконно-оптического формата визуализации пространственного распределения одновременно нескольких флуоресцентных маркеров в мозге живого свободноподвижного животного с субклеточным разрешением.

III. Исследование и разработка методов для реализации полностью волоконной системы для многокомпонентного линейного и нелинейного оптического зондирования набора биомаркеров на базе микроструктурированных волокон.

IV. Разработка и экспериментальная реализация волоконно-оптического нейроинтерфейса для минимально инвазивного измерения уровня экспрессии флуоресцентных маркерных белков в глубоких слоях мозга живых животных в течение длительного времени одновременно из нескольких пространственно разнесенных структур мозга живого животного.

V. Разработка и экспериментальная реализация безмаркерной волоконно-оптической визуализации пространственного распределения веществ и структур с комбинационно активными линиями в режиме эндоскопии.

VI. Исследование и экспериментальная реализация возможностей увеличения чувствительности эндоскопного формата регистрации спонтанного комбинационного рассеяния.

VII. Исследование и экспериментальная реализация возможностей безмаркерной визуализации нервных тканей с помощью микроскопии генерации третьей гармоники и последующих возможностей комбинации данного метода с флуоресцентной микроскопией.

Научная новизна

- I. Микроструктурированные (МС) волокна с малым размером сердцевины увеличивают локальность оптического зондирования в случае волоконно-оптического формата визуализации. Экспериментально показано, что МС волокно с радиусом сердцевины ≈ 1 мкм и числовой апертурой 0.38 может ограничивать оптическое зондирование в области объемом меньше чем 50 мкм^3 , позволяя оптический опрос отдельных нейронов в рамках типичного эксперимента по визуализации мозга.
- II. Оптоволоконный микрозонд, состоящий из ≈ 6000 волокон с диаметром сердцевины каждого отдельного волокна 2.4 мкм, соединенный с конфокальным оптическим микроскопом позволяет *in vivo* визуализировать пространственное распределение одновременно нескольких флуоресцентных маркеров в мозге живого свободноподвижного животного с субклеточным разрешением равным 3 мкм.

- III. Микроструктурированные волокна, в которых генерируется широкополосное излучение суперконтинуум с широким спектром от 420 до 1000 нм, могут быть интегрированы с волоконными спектральными фильтрами на основе полых антирезонансных световодов для реализации многоцветного возбуждения и регистрации одновременно нескольких флуоресцентных маркеров.
- IV. Микроструктурированное волокно со сконструированным должным образом профилем дисперсии обеспечивает плавную перестройку излучения от 800 до 1400 нм и позволяет точно подобрать длину волны солитона на выходе волокна к спектру двухфотонного поглощения любого флуоресцентного биомаркера, усиливая таким образом отклик двухфотонной флуоресценции, что может быть использовано для нелинейно-оптического зондирования в волоконном формате.
- V. Разработан волоконно-оптический нейроинтерфейс, который, как было экспериментально показано, позволяет минимально инвазивно проводить измерения уровня экспрессии флуоресцентных маркерных белков в глубоких слоях мозга живых животных в течение длительного времени (до одного месяца) при их свободном поведении во время и после разнообразных физиологических и фармакологических воздействий, а также позволяет проводить измерения уровня флуоресценции одновременно из нескольких пространственно разнесенных структур мозга живого животного.
- VI. Пространственное распределение веществ с комбинационно активными линиями может быть визуализировано в волоконном формате в режиме эндоскопии с разрешением 3 мкм методом регистрации спонтанного комбинационного рассеяния света.
- VII. Антирезонансные волокна с поллой сердцевинной позволяют увеличить до 17 раз чувствительность волоконно-оптической регистрации комбинационного рассеяния по сравнению со стандартными световодами.
- VIII. Показано, что когерентное подавление генерации третьей гармоники в жестко сфокусированных лазерных пучках позволяет осуществлять высокоточную безмаркерную визуализацию отдельных нейронов в тканях мозга; и экспериментально показана возможность комбинации метода микроскопии генерации третьей гармоники с флуоресцентными методами микроскопии без изменения контрастности сигнала третьей гармоники.

Практическая значимость

Результаты, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы для создания новых подходов и методов многофункциональной волоконно-оптической визуализации живых объектов, что позволяет подойти к исследованию и решению фундаментальных задач биологии и нейрофизиологии.

На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:

- I. На основе созданной световодной платформы, состоящей из МС-световодов для генерации широкополосного излучения (суперконтинуума) и полых МС-световодов для спектральной фильтрации засветки, обеспечивается комплексная многочастотная оптическая регистрация активности нейронов головного мозга с использованием нелинейно-оптических взаимодействий и флуоресценции маркерных белков.
- II. Микроструктурированные световоды с малым (несколько микрон) размером сердцевинки обеспечивают существенное увеличение локальности волоконно-оптического зондирования, обеспечивая возможность регистрации оптического отклика отдельных нейронов головного мозга. Использование микроструктурированных световодов с радиусом сердцевинки 1 мкм и числовой апертурой 0.38 позволяет ограничить область сбора сигнала объемом менее 50 мкм³.
- III. Созданный волоконно-оптический нейроинтерфейс позволяет осуществлять регистрацию отклика флуоресцентных маркерных белков в глубоких слоях мозга живых животных при их свободном поведении с минимальной степенью инвазивности в течение длительного времени (до одного месяца), а также проводить одновременные измерения уровня флуоресценции из нескольких пространственно разнесенных областей мозга живого животного.
- IV. Микросветоводные зондирующие системы, состоящие из пучков оптических волокон, интегрированных с гальваносканирующими зеркалами, обеспечивают одновременную визуализацию пространственного распределения нескольких флуоресцентных маркеров в мозге живого свободноподвижного животного с субклеточным пространственным разрешением, а также позволяют строить изображения микрообъектов на основе регистрации комбинационного рассеяния света в режиме эндоскопии с высоким пространственным разрешением.
- V. Антирезонансные волоконно-оптические световоды с поллой сердцевинкой обеспечивают эффективное подавление фонового сигнала комбинационного рассеяния из волокна, что приводит к эффективному (более, чем на порядок) повышению чувствительности волоконно-оптической регистрации спонтанного комбинационного рассеяния по сравнению со стандартными волоконными световодами.

Апробация работы

По материалам диссертационной работы опубликовано 28 научных работ, из них 12 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК России: **Optics Letters**, **Applied Physics Letters**, **Applied Optics**, **Journal of Biophotonics** и 16 статей в сборниках трудов конференций. Основные результаты исследований докладывались на научных семинарах кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на международных конференциях.

Личный вклад автора

Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные работы. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад диссертанта был определяющим. Все представленные в диссертации результаты получены лично автором.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4-х глав, заключения и библиографии. Общий объем диссертации составляет 145 страниц, включая 49 рисунков. Библиография включает 156 наименований на 15 страницах.

Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и аргументирована научная новизна исследований, показана практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

Первая глава посвящена обзору литературы в рамках поставленной задачи. В **разделе 1.1** рассмотрены современные методы исследования нейронной активности *in vivo* и обосновано, почему именно оптические методы визуализации являются наиболее востребованными при исследованиях мозга. Рассмотрены преимущества оптической *in vivo* визуализации, такие как высокое пространственное и временное разрешение при сохранении большого поля зрения, возможность исследования сразу нескольких аспектов нейронной активности (электрическая активность, вход в клетку ионов кальция, экспрессия генов и производство различных белков, появление и исчезновение синапсов и т.д.) в сравнении с различными методами томографии и электрофизиологии (Рис. 1(а)). В **разделе 1.2** описаны экспериментальные возможности оптической визуализации нейронной активности живых бодрствующих животных и показано, что оптические волокна становятся ключевыми компонентами оптических биосенсоров и визуализирующих устройств, благодаря своей гибкости, компактности и возможности сочетать различные функции. В **разделе 1.3** описаны свойства и преимущества микроструктурированных (МС) световодов в контексте задач оптического зондирования, а также представлены и описаны различные типы оптических волоконных зондов. В завершающем главу **разделе 1.4** описаны возможности безмаркерной оптической визуализации, такие как методы комбинационного рассеяния света и генерация оптических гармоник (Рис. 1(б)).

Во **второй главе** приведено описание экспериментальной аппаратуры и методик измерений, использованных при проведении представленных в настоящей диссертации исследований. В **разделе 2.1** подробно описаны использованные в работе лазерные источники, такие как твердотельные непрерывные лазеры, а также фемтосекундные лазерные генераторы на кристаллах Cr:Forsterite и Ti:Sapphire и области их применения. В **разделе 2.2** дано описание различных типов оптических световодов, включающих в себя стандартные телекоммуникационные волокна с диаметром сердцевины 9 или 50 мкм, различные типы микроструктурированных световодов, в том числе полые

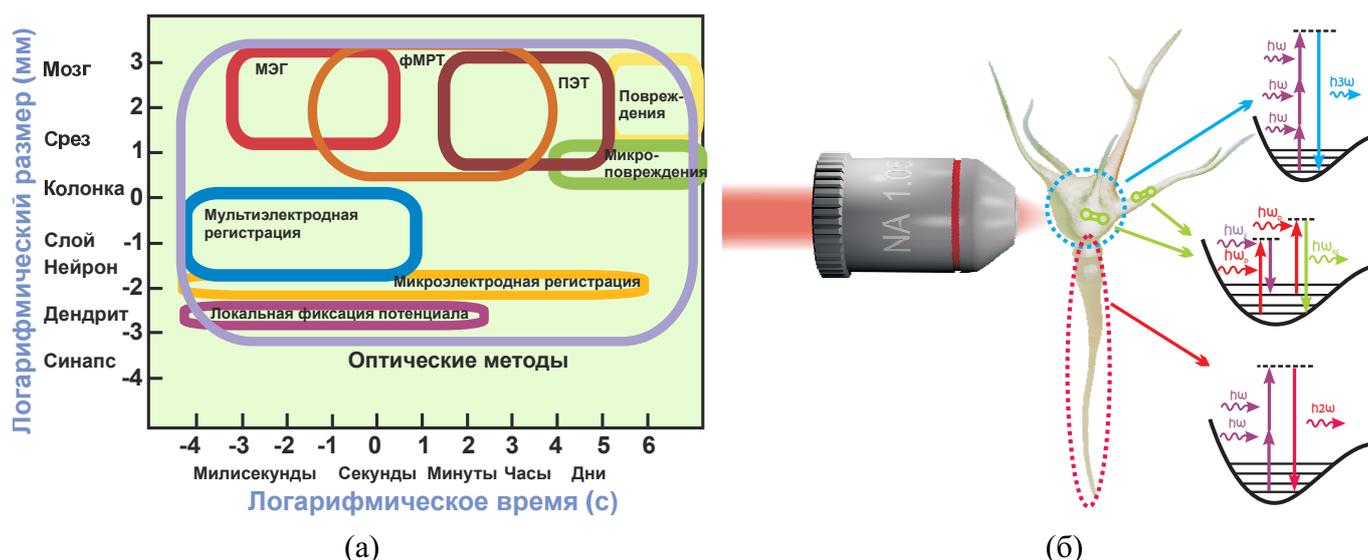


Рис. 1. (а) Сравнение пространственного и временного разрешений различных методов исследования работы мозга *in vivo*, (б) Схематичное изображение нейрона как сложной системы, обладающей набором нелинейно-оптических свойств, развитие методик визуализации которых позволит получать дополнительную информацию о структуре, свойствах и активности клеток.

антирезонансные волноводы, а также пучки волокон (6000 световодов с диаметром сердцевины отдельного волокна 2.4 мкм, расстоянием между ними 3.2 мкм). **Раздел 2.3** посвящен описанию методов прижизненного маркирования нейронной активности. Маркерные системы, основанные на органических белках, обычно состоят из двух частей: это «сенсор» – белок, который испытывает структурные изменения, зависящие от исследуемых параметров (таких как мембранный потенциал, вход ионов в клетку, экспрессия генов) и «маркер» – флуоресцентный белок, оптический отклик которого модулирован изменениями сенсорного белка. Для маркирования широко используется линейка красителей Alexa Fluor, а также флуоресцентные белки EGFP и DsRed2. Ген EGFP может быть встроен в геном организма, а именно в ту область ДНК, которая кодирует белок интереса. Таким образом, в тех клетках, в которых экспрессируется ген белка интереса и этот белок начинает продуцироваться, одновременно начинает продуцироваться и белок EGFP, который может быть зарегистрирован по флуоресценции. Это дает возможность визуализировать геномную активность нейронов.

В третьей и четвертой главах изложены оригинальные результаты. **Третья глава** посвящена исследованию и оптимизации световодных систем для визуализации нейронной активности живых животных. В **разделе 3.1** проведено исследование и подбор параметров оптических зондов для различных задач. Был произведен теоретический расчет свойств волоконно-оптического зондирования, таких как чувствительность, геометрия области эффективно сбора сигнала, продольное и поперечное разрешение, исходя из известных параметров волокна и исследуемой системы. Затем теоретическая модель сравнивалась с результатами экспериментов, проведенных на микрочастицах, покрашенных красителем родамин бж. Оптическое возбуждение осуществлялось излучением второй гармоники непрерывного Nd:YAG лазера на длине волны 473 нм. Геометрия возбуждения

и сбора флуоресцентного отклика представлена на Рис. 2(а). Пример экспериментально измеренной области сбора сигнала МС волокном с радиусом сердцевины 1 мкм представлен на Рис. 2(б). Было показано, что предложенная теоретическая модель полностью совпадает с экспериментальными данными (Рис. 2(в) точки – экспериментальные данные, линии – теоретическая модель для (1) стандартного и (2) МС световодов).

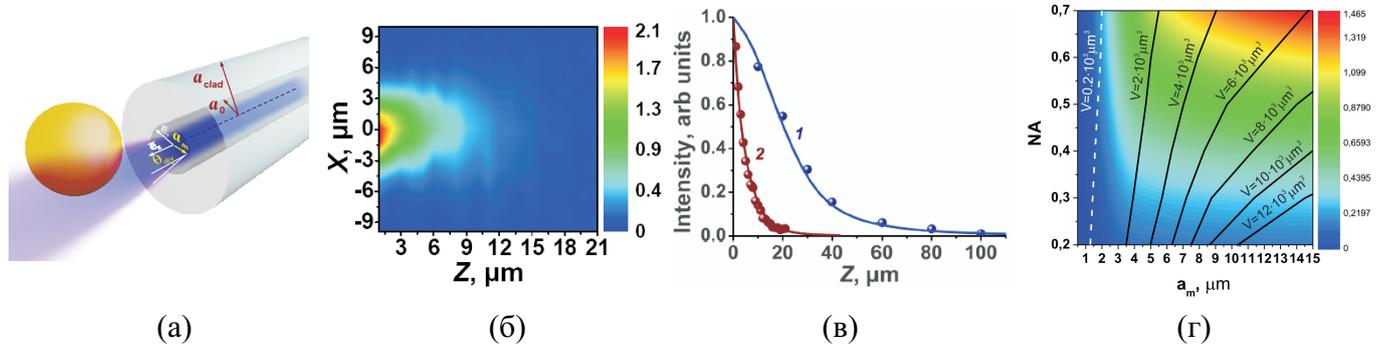


Рис. 2. (а)-(в) Волоконное зондирование флуоресцентно прокрашенных микрочастиц. (а) Схема эксперимента: a_{core} – радиус сердцевины, a_m – эффективный радиус моды, θ_{div} – угол расхождения излучения, \vec{e}_z , \vec{e}_r – продольный и поперечный единичные вектора. (б) xz -карты флуоресцентного отклика, измеренные с помощью МС волокна с $a \approx 1$ мкм и $NA \approx 0.38$ (в) Собранная мощность флуоресценции, измеренная как функция расстояния z , используя (1) стандартное волокно и (2) ФК волокно (точки) в сравнении с теоретической моделью (сплошные линии). (г) Мощность флуоресцентного сигнала, собранного волоконным зондом, как функция эффективного радиуса моды a_m и числовой апертуры NA , для постоянной интенсивности излучения доставляемой по волокну. Сплошные линии показывают изолинии постоянного объема оптического зондирования. Объем тела нейрона показан штриховой линией.

Таким образом, было экспериментально показано, что МС волокна с малым размером сердцевины увеличивают локальность оптического зондирования в волоконно-оптических форматах визуализации (Рис. 2(б)). Было продемонстрировано, что используемое в экспериментах МС волокно с радиусом сердцевины 1 мкм и числовой апертурой 0.38 ограничивает зондирование в области объемом меньше $50 \mu\text{m}^3$, позволяя тем самым оптический опрос с субклеточным разрешением.

На основе предложенной теоретической модели были даны рекомендации по выбору оптимального волоконного зонда для различных задач. На Рис. 2(г) представлена рассчитанная мощность флуоресцентного сигнала, собранного волоконным зондом, как функция эффективного радиуса моды a_m и числовой апертуры NA , для постоянной интенсивности излучения накачки. Сплошные линии показывают изолинии постоянного объема оптического зондирования. Видно, что существует компромисс между чувствительностью (уровнем зарегистрированного отклика) и локальностью, который достигается путем правильного подбора параметров волокна: увеличение радиуса сердцевины до приемлемого разрешения с одновременным увеличением NA (для постоянной мощности накачки Рис. 2(г)). Исходя из этого было теоретически предсказано, что использование волокна с радиусом 2.5 мкм и $NA = 0.7$ для зондирования нейронов с типичным объемом в $200 \mu\text{m}^3$ позволит больше чем на порядок увеличить уровень сбора некогерентного отклика.

Было теоретически показано, что диаметр сердцевины около 2-2.5 мкм позволяет различать отдельные клетки мозга с максимальной чувствительностью. В разделе 3.2 было экспериментально

продемонстрировано, что подобранный волоконный зонд, состоящий из 6000 волокон, с диаметром сердцевины отдельного волокна в 2.4 мкм в комплексе с конфокальным микроскопом обеспечивает *in vivo* визуализацию нейронов в мозге живых животных с высоким пространственным и временным разрешением.

Многокомпонентная визуализация является ключевым инструментом в биологии, так как в огромном классе задач просто необходимо одновременно регистрировать сразу несколько параметров исследуемой живой системы. В разделе 3.2 была показана возможность волоконно-оптической *in vivo* визуализации с высоким пространственным и временным разрешением одновременно нескольких биомаркеров на примере визуализации маркеров EGFP, DAPI dilactate и Neurotrace Nissl 640/660 в мозге живой мыши. Для этого излучение трех диодных лазерных источников на длинах волн 405, 473 и 559 нм, последовательно заводилось в отдельные волокна в пучке с помощью объектива (20x, $NA = 0.5$) и двух гальванометрических зеркал, ортогонально сканирующих лазерным лучом входной торец пучка. Построение изображения осуществлялось путем последовательного считывания с помощью ФЭУ сигнала из отдельных точек (пикселей) картины (Рис. 3(а)). Это позволяло максимально эффективно заводить излучение разных длин волн в волокна с небольшим размером сердцевины в автоматическом режиме.

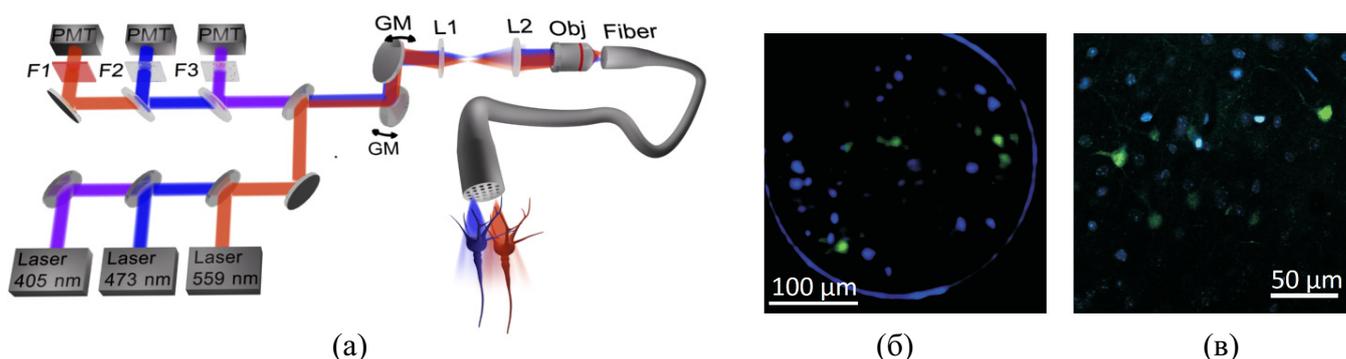


Рис. 3. (а) Схема многоцветной визуализации мозга с помощью микророзонда из пучка волокон, соединённого с микроскопом: GM, гальванометрические сканирующие зеркала; Obj, объектив; L1, L2, линзы; F1, F2, F3, фильтры; PMT, фотоумножители. (б-в) Распределение двух маркерных красителей в нейронах зубчатой фасции гиппокампа трансгенных мышей линии Thy1-EGFP, дополнительно прокрашенных DAPI dilactate, зарегистрированное *in vivo* с помощью многосердцевинного оптоволоконна (б) и *in vitro* на конфокальном микроскопе (в). Синим цветом визуализированы ядра клеток (краситель DAPI dilactate), зелёным Thy1-EGFP-позитивные клетки.

На Рис. 3(б) представлены результаты эксперимента по *in vivo* получению изображения в формате эндоскопии и их сравнение со стандартным *in vitro* методом конфокальной микроскопии (Рис. 3(в)). Видно, что уровень пространственного разрешения, достигнутый с помощью волоконно-оптического метода визуализации, является достаточным для зондирования отдельных нейронов вместе с самыми крупными отростками, как было рассчитано в проведенном теоретическом моделировании. Данное разрешение не подходит для визуализации более мелких деталей пространственной структуры клеток, таких как дендриты, которые видны на изображениях полученных на конфокальном микроскопе. При необходимости, как было показано выше, эта проблема может быть решена с использованием МС волокон с субмикронным диаметром сердцевины.

Остается еще одна проблема, заключающаяся в необходимости использовать одновременно несколько лазеров накачки. В настоящее время задачи многокомпонентного зондирования требуют одновременного использования нескольких лазерных систем накачки: для линейной флуоресцентной микроскопии это набор лазеров в видимом диапазоне; для двухфотонной микроскопии это фемтосекундные лазеры на кристаллах Ti:S и Cr:F. В **разделах 3.3 и 3.4** было предложено использование только одного лазера накачки в комбинации с МС волокном для задач одновременного многокомпонентного зондирования как в линейном, так и в нелинейном режимах, совмещающее в себе возможность компактной полностью волоконной реализации.

Для демонстрации мультиплексного возбуждения и регистрации в случае однофотонного возбуждения использовалось совмещение уникальных свойства высоконелинейных МС волокон с твердотельной сердцевиной как источников широкополосного излучения суперконтинуум со свойствами полых фотонно-кристаллических (ПФК) волокон для реализации функции спектрального фильтра (Рис. 4(а)). Для получения излучения суперконтинуум использовалось волокно, структура которого показана на вставке к Рис. 4(б), с диаметром сердцевины 2 мкм и нулевой дисперсией групповых скоростей в районе 770 нм. Источник оптической накачки (фемтосекундный Ti:Sapphire лазер) генерировал импульсы длительностью 50 фс, на центральной длине волны 810 нм (спектр показан пунктиром на Рис. 4(б)), частотой повторения 90 МГц и энергией 6 нДж, которые заводились в МС волокно. Внутри волокна лазерные импульсы накачки испытывают влияние целого ряда нелинейно-оптических процессов, таких как фазовая самомодуляция, генерация множественных солитонов, комбинационное рассеяние и солитонный самосдвиг частоты (СССЧ). Как результат, МС волокно преобразовывает спектр импульсов накачки в излучение суперконтинуум со спектром, простирающимся более чем на одну октаву от 430 до 970 нм (синяя линия Рис. 4(б)), который может использоваться для возбуждения практически любого красителя. Структура ПФК волокна реализована так (вставка к Рис. 4(в)), чтобы поддержать распространение только той части суперконтинуума, которая может эффективно возбуждать флуоресценцию биомаркеров (Рис. 4(в)). В спектральной полосе, где биомаркеры излучают флуоресценцию, ПФК не пропускает излучение накачки, таким образом эффективно уменьшает зашумляющее влияние рассеянного от исследуемых тканей излучения суперконтинуум, что, в свою очередь, повышает чувствительность регистрации. Одновременно измеренные с помощью описанной системы однофотонные спектры люминесценции красителей EGFP и Alexa Fluor 594 в мозге мыши представлены на Рис 5(а).

Универсальный источник для возбуждения нескольких красителей в двухфотонном режиме также может быть основан на фемтосекундном Ti:S осцилляторе и МС волокне, как описано в **разделе 3.4**. Конструкция сердцевины и внутренней части оболочки МС волокна нацелена на достижение высокой нелинейности и дисперсионного профиля, обеспечивающего, во-первых, аномальную дисперсию на центральной длине волны используемого в экспериментах лазерного излучения накачки (800 нм), во-вторых, реализацию явления СССР на заданной длине волны. Как только фемтосекундный импульс начинает распространяться в подобном МС волокне, он стремится сфор-

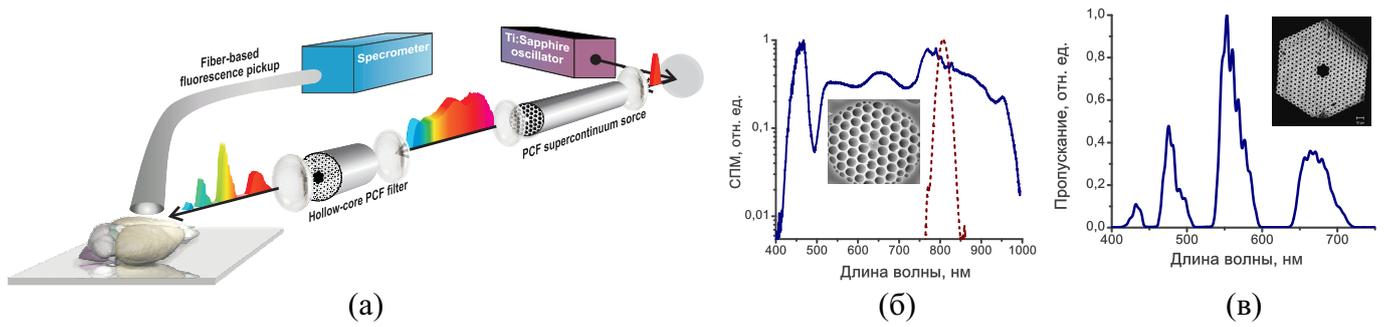


Рис. 4. (а) Схема волоконно-оптической системы возбуждения и сбора флуоресцентного отклика различных маркеров в мозге трансгенных мышей. Высоконелинейное ФК волокно служит для спектрального преобразования импульсов Ti:S лазера на длине волны 810 нм в излучение суперконтинуума. (б) Спектры излучения накачки (пунктир) и суперконтинуума (сплошная линия). (в) Спектр пропускания полого ФК волокна, которое служит спектральным фильтром, передающим часть суперконтинуума для эффективного возбуждения флуоресценции биомаркеров, но в то же время препятствующим распространению света в области флуоресценции биомаркеров.

мировать солитон. В результате явления СССЧ (проявляющегося из-за эффекта комбинационного рассеяния) происходит постепенный и постоянный сдвиг в длинноволновую область центральной длины волны солитона. Для солитона на выходе рассмотренного типа МС волокон может быть достигнут диапазон перестройки длин волн шириной 600 нм (от 800 до 1400 нм), таким образом спектр солитонного импульса может быть подобран оптимальным образом под спектр двухфотонного поглощения практически любого используемого биомаркера. В проведенных экспериментах МС волокно обеспечивало на выходе стабильный солитон с центральной длиной волны 980-990 нм (красная кривая Рис. 5(б)) идеально подходящий для эффективного двухфотонного возбуждения белковых молекул EGFP или биологического красителя AlexaFluor 488. Спектр зарегистрированного двухфотонного отклика AlexaFluor 488 в мозге мыши представлен синим на Рис. 5(б). В результате было показано, что созданная световодная платформа, состоящая из МС-световодов для генерации широкополосного излучения (суперконтинуум) и солитонного излучения, полых МС-световодов для спектральной фильтрации, а также Ti:S осциллятора обеспечивает универсальный

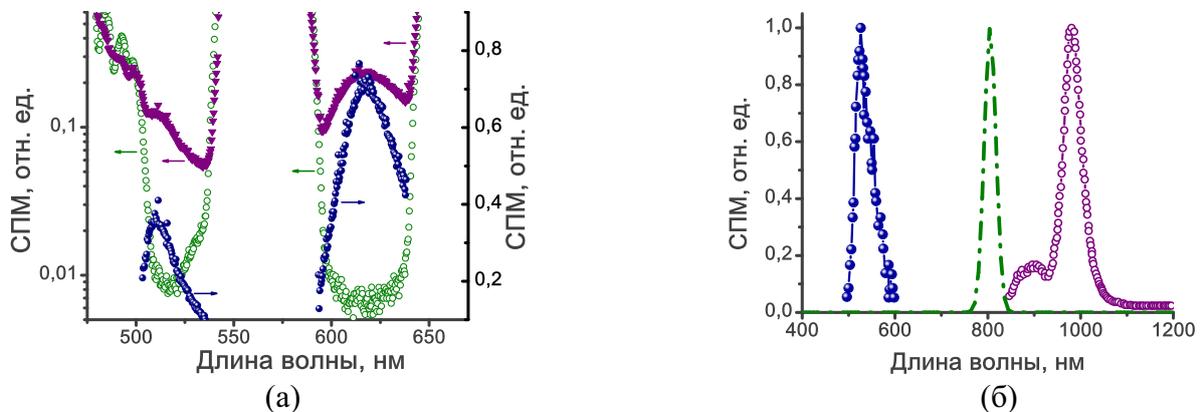


Рис. 5. Флуоресцентные отклики (а) красителей EGFP и Alexa Fluor 594 измеренные одновременно в мозге мыши с помощью световодной платформы, (б) красителя AlexaFluor 488 (синяя кривая), возбужденного ДФП сдвинутого по частоте солитона на выходе из высоко нелинейного МС волокна (окрасная кривая). Штрихпунктирная линия - спектр лазерного импульса.

источник видимого и ближнего ИК излучения для комплексной многочастотной оптической регистрации практически любых флуоресцентных меток как в линейном, так и в нелинейном режимах.

Таким образом, как описано выше, были исследованы возможности и методы оптимизации как самих волоконных зондов, так и универсальных источников излучения, максимально совместимых с волоконными технологиями. Еще одним, безусловно важным, звеном в системе зондирования нейронной активности живых животных является интерфейс между изучаемым мозгом и самим зондом, который, в случае простого вживления оптоволоконна, обладает рядом существенных недостатков, не позволяя проводить долговременные исследования, хотя возможность изучать живые системы на протяжении длительного времени является ключевой для многих задач. В разделе 3.5 описан разработанный в диссертационной работе метод, позволяющий проводить измерения уровня флуоресценции глубоких слоев мозга живых животных при их свободном поведении во время и после обучения, который принципиально рассчитан на длительные, в масштабах нескольких недель, измерения нейронной активности. Специальный коннектор и двух этапный метод крепления оптоволоконна дают возможность проводить долговременный ряд экспериментов на одном и том же животном в любой структуре мозга и при этом сохранять уверенность в получении сигнала от одной и той же группы клеток (схема эксперимента и разработанного интерфейса представлена на Рис. 6(a)). При этом благодаря максимально легкому и компактному размеру вживляемой системы все время между измерениями животные могут жить в своих домашних клетках без дополнительных неудобств, а также без опасности повредить оптоволоконно.

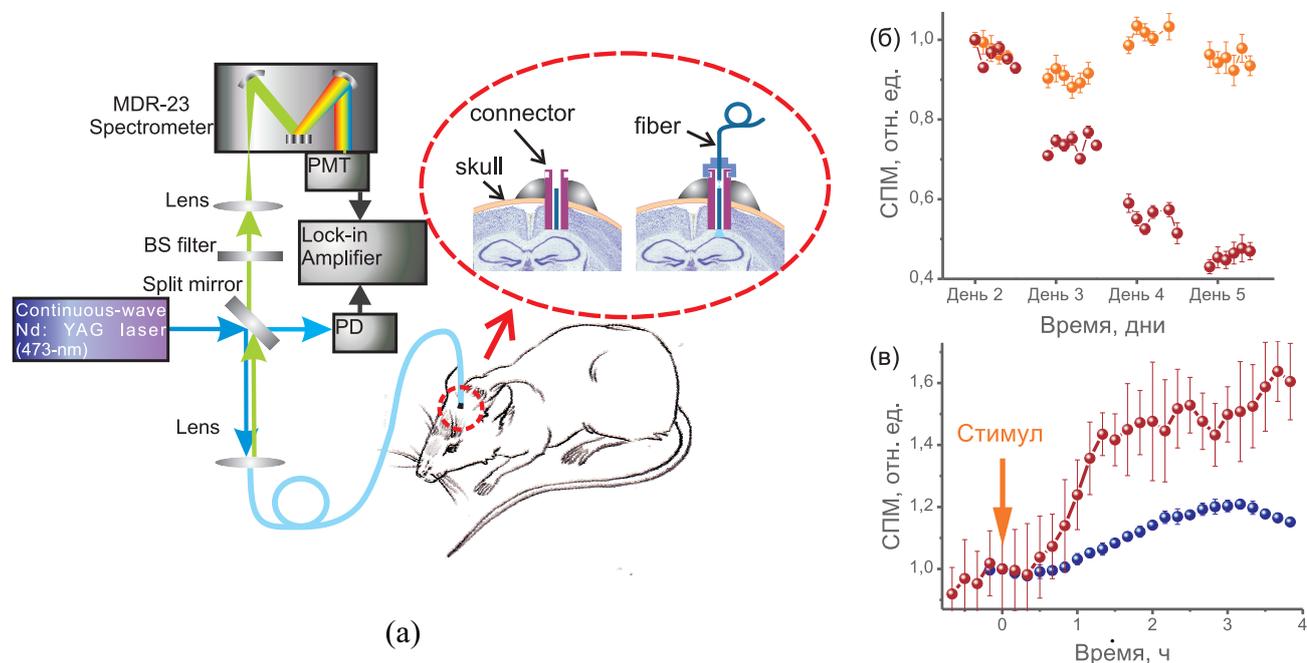


Рис. 6. Долговременное зондирование флуоресцентных маркеров в глубоких слоях мозга живых свободно-движных животных с помощью разработанного волоконно-оптического нейроинтерфейса. (а) Экспериментальная схема. (б-в) Экспериментальные результаты для CA1 области гиппокампа: (б) сравнение динамик уровня экспрессии EGFP для мыши подверженной световой депривации (красные точки) и контрольной мыши, содержащейся в стандартных условиях (оранжевые точки) на протяжении 4-х дней. (в) зависимости уровня экспрессии EGFP от времени в течение 4-х часов после электрокожной стимуляции (красные точки) и после введения судорожного агента (синие точки). Момент стимуляции отмечен стрелкой.

Было экспериментально показано, что разработанный метод позволяет проводить измерения нейронной активности в различных временных масштабах: (1) в течении нескольких дней, результаты этих экспериментов представлены на Рис. 6(б), для животных находившихся в стандартных условиях (оранжевая кривая) и подвергающихся световой депривации (красная кривая). Видно, что в случае депривации уровень геномной активности нервных клеток равномерно спадает со временем на протяжении 4-х дней. (2) в течение нескольких часов, результаты этих экспериментов представлены на Рис. 6(в). Регистрировались измерения экспрессии генов в ответ на электрокожную стимуляцию (красный цвет) и в ответ на внутрибрюшинное введение судорожных агентов (синий цвет). Видно, что эти воздействия приводят к росту геномной активности. (3) С другой стороны, данный метод обладает достаточным временным разрешением (миллисекунды) для регистрации таких быстрых процессов, как изменение кальциевых токов.

Предложенный волоконно-оптический метод за счет гибкости и компактности вживляемых деталей позволил впервые продемонстрировать оптическую регистрацию отклика одновременно двух разных пространственно разнесенных глуболежащих структур головного мозга живых свободноподвижных животных. На Рис. 7 представлены фотографии экспериментальных животных со вживленными коннекторами в свободном поведении без волокон (а) и во время экспериментов с подсоединенными волокнами для доставки и сбора сигнала (б). Экспериментально измеренные геномные отклики нейронной активности одновременно из двух полушарий соматосенсорной коры в ответ на стимуляцию вибрисс с одной (правой) стороны головы представлены на Рис. 7(в). Как и ожидалось, геномная активность увеличивается только в контрлатеральном по отношению к стимулу полушарии (в нашем случае левом) - красная линия Рис. 7(в).

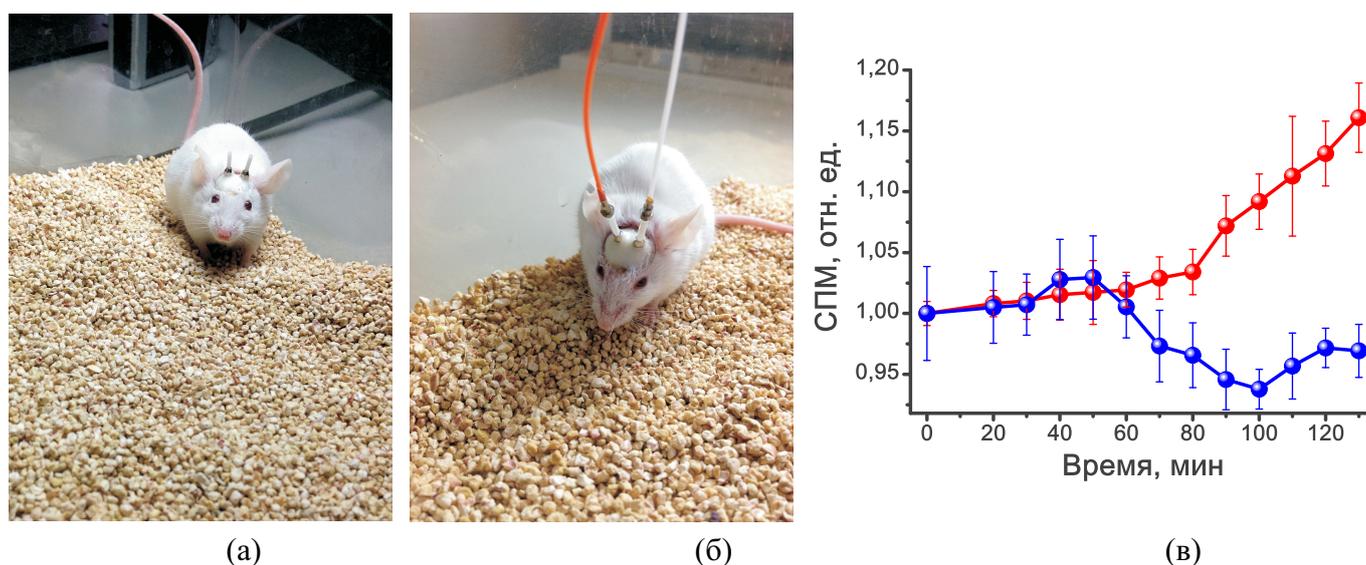


Рис. 7. Регистрация оптического отклика одновременно от двух разных пространственно разнесенных глуболежащих структур головного мозга живых свободноподвижных животных. (а-б) Фотографии экспериментальных мышей со вживленными нейроинтерфейсами (а) без волокон и (б) с подсоединенными волокнами. (в) Результаты измерений геномного отклика нейронов одновременно в двух полушариях соматосенсорной коры после стимуляции вибрисс с одной стороны головы. Видно, что активность возрастает только в контрлатеральном по отношению к стимулу полушарии (красная кривая).

В четвертой главе диссертационной работы исследуются возможности безмаркерной оптической визуализации. Известно, что микроскопия комбинационного рассеяния света открывает уникальные возможности химически селективной визуализации различных веществ без необходимости использования дополнительных флуоресцентных маркеров. В разделе 4.1 показано, что сочетание метода микроскопии спонтанного комбинационного рассеяния света с волоконным форматом доставки и сбора сигнала может обеспечить большее удобство использования, удаленный доступ, а также возможности для *in vivo* исследований при сохранении безмаркерного получения изображений с высоким пространственным разрешением. В проведенных экспериментах было впервые показано, что использование пучков оптоволокон в сочетании с системой сканирования и оптической схемой для регистрации линий спонтанного рамановского рассеяния на входном торце волокна позволяет в формате эндоскопа визуализировать с высоким пространственным разрешением структуры и распределение различных веществ по их комбинационно-активным линиям.

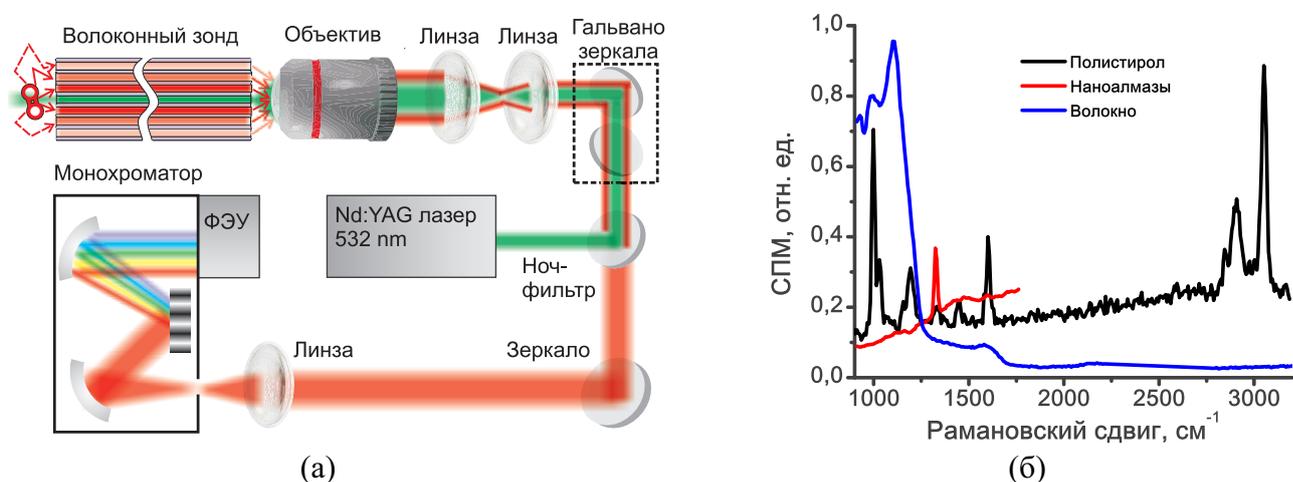


Рис. 8. (а) Схема эксперимента по волоконно-оптической визуализации пространственного распределения веществ по их комбинационно-активным линиям с помощью пучка волокон. (б) Нормированные спектры комбинационного рассеяния волокна, используемого в качестве зонда для визуализации (синяя линия), полистирольной пластинки (черная линия) и алмазных наночастиц (красная линия).

Схема эксперимента представлена на Рисунке 8(а). С помощью двух гальваносканирующих зеркал и объектива непрерывное излучение второй гармоники Nd:YAG лазера на длине волны 532 нм последовательно фокусировалось в различные точки на переднем торце волоконного зонда, состоящего из нескольких тысяч волокон, с шагом 0.5 мкм и таким образом заводилось в различные волокна данного микрозонда. Главной трудностью в случае регистрации спонтанного комбинационного рассеяния света является низкий уровень сигнала, что до сих пор серьезно ограничивало возможности волоконно-оптической визуализации. Для повышения чувствительности предложенного метода сбор некогерентного рамановского отклика осуществлялся с использованием одновременно всех волокон в пучке (около 6000 шт.), таким образом обеспечивая достаточно большую площадь и апертуру сбора при сохранении высокого пространственного разрешения. Карта рамановского отклика строилась попиксельно путем повторения данных измерений для каждого волокна в пучке.

На Рис. 8 (б) синим цветом представлен отклик комбинационного рассеяния используемого волокна, который ограничивает визуализируемые рамановские линии в области от 1250 см^{-1} . В качестве экспериментальных образцов были выбраны алмаз и полистирол, так как они представляют собой примеры комбинационно-активных систем с заметно различающимися рамановскими спектрами (Рис. 8 (б) красная и черная линии) и, таким образом, позволяют максимально хорошо продемонстрировать возможности реализованной системы. На Рис. 9 представлены результаты экспериментов по рамановской волоконной визуализации различных веществ в формате эндоскопии: (а) полистирольная пластина с царапиной, (б) кластеры алмазных наночастиц, (в) алмазные наночастицы распределенные по поверхности стекла в виде буквы «А».

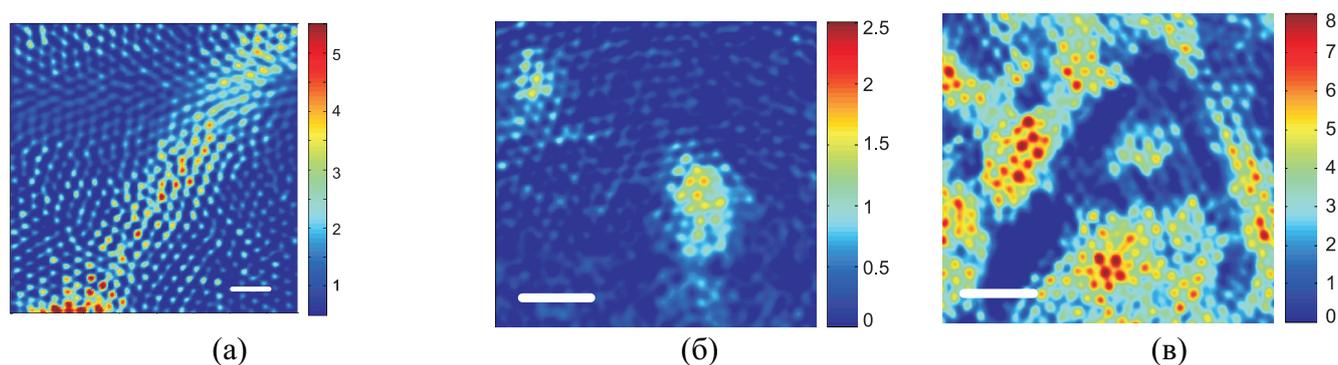


Рис. 9. Карты рамановского отклика: (а) полистирольной пластинки с царапинами (б) наноалмазных кластеров и (в) распределения алмазных наночастиц на поверхности стекла, образующего форму буквы «А», визуализированные с помощью оптоволоконного зонда. Шкала (а) 10 мкм, (б-в) 20 мкм.

Таким образом, была экспериментально продемонстрирована возможность визуализировать распределение веществ по их рамановским линиям в эндоскопном формате с пространственным разрешением около 3 мкм. Однако, видно, что в случае волоконных методов зондирования встречаются серьезные трудности, относящиеся к рамановскому фону, присущему материалу, из которого изготовлен волоконный зонд (Рис. 8 (б)), что уменьшает чувствительность волоконно-оптического рамановского зондирования. В разделе 4.2 было показано, что оптические волокна в сочетании с подходящей математической процедурой выделения спектральных рамановских линий могут быть использованы для регистрации характерной симметричной моды колебаний растяжения CH_2 -связи в тканях мозга, а также алкиновой группы характерных маркеров пролиферации клеток EdU. Однако, дальнейшее повышение чувствительности волоконно-оптических методов зондирования и визуализации комбинационного рассеяния является актуальной задачей.

В разделе 4.3 было показано, что решение этой проблемы может быть адресовано к должным образом сконструированным полым волноводам (вставка на Рис. 10(а)). Полые антирезонансные волокна имеют достаточно широкую полосу пропускания, позволяя осуществлять накачку и захватывать отстроенный рамановский отклик сердцевиной. На Рис. 10 представлены спектры маркера пролиферации клеток EdU измеренные через полое антирезонансное (б) и стандартное телекоммуникационное (в) волокна одинаковой длины. В обоих случаях удалось зарегистрировать сигнал, однако разница в свойствах фона оказывается поразительной. В случае кварцевого волокна

основным источником фона является рамановский фон волокна, тогда как в случае полого волокна доминирующей частью фона становится уже флуоресценция самого исследуемого образца, что значительно повышает соотношение сигнал/шум. В работе было экспериментально показано, что антирезонансные волокна с полой сердцевиной позволяют увеличить до 17 раз чувствительность волоконно-оптической регистрации маркеров пролиферации клеток с помощью спонтанного комбинационного рассеяния по сравнению со стандартными световодами, тем самым радикально повышая чувствительность зондирования синтеза ДНК в живых клетках и представляя мощный инструмент для волоконно-оптической визуализации бодрствующих животных.

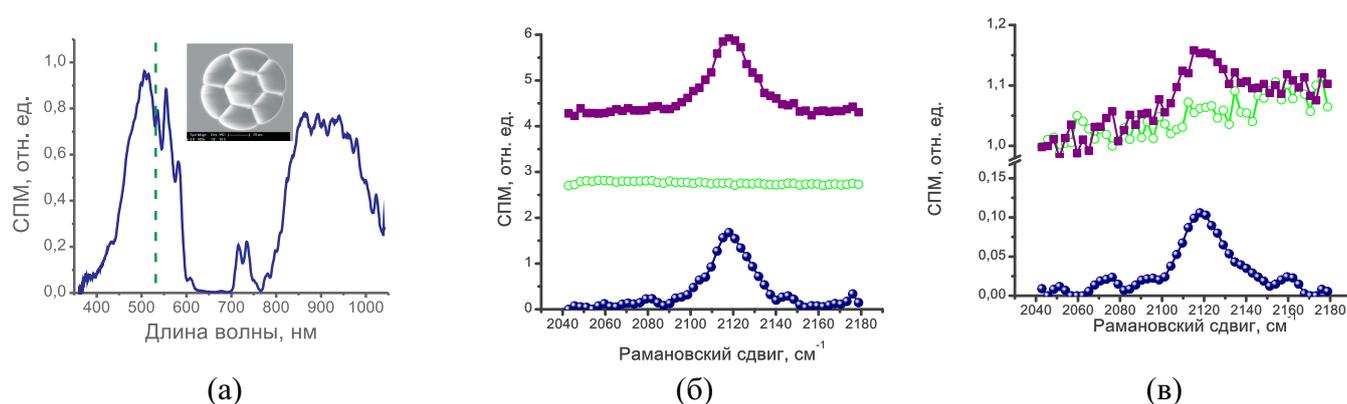


Рис. 10. (а) Изображение антирезонансного волокна с полой сердцевиной и спектр пропускания данного волокна. Длина волны лазера накачки показана штриховой линией. (б-в) Спектрально разрешенные сигналы, собранные с помощью (б) полого антирезонансного и (в) стандартного волокон: исходный спектр 20 мМ водного раствора EdU (красная кривая), фон вследствие комбинационного рассеяния волокна (зеленая кривая) и спектры после процедуры вычитания фона (синяя кривая).

Нелинейная оптика открывает уникальные возможности для биовизуализации. Двухфотонная микроскопия позволяет регистрировать функциональные изменения в клетках живой ткани благодаря специальным маркерам, в то же время микроскопия, основанная на генерации третьей гармоники (ГТГ), является многообещающим методом для изучения структурных изменений. Исследование мозга как сложного физического объекта требует одновременной визуализации структурных и функциональных особенностей, и каждая из описанных методик микроскопии при правильном комбинировании может привнести уникальную часть информации. В разделе 4.4 была реализована экспериментальная схема для исследования влияния свойств различных структур мозга и биомаркеров на эффективность генерации третьей оптической гармоники. Для ГТГ требуется большая длина волны излучения накачки, чем обычно используется в микроскопии двухфотонного поглощения. Оптимальный контраст в микроскопии ГТГ достигается в диапазоне от 1200 до 1300 нм, так как, большие длины волн эффективно поглощаются молекулами воды, а в случае более коротковолновой накачки сигнал третьей гармоники лежит в ультрафиолетовой области, что приводит к его сильному поглощению в биотканях. Поэтому в экспериментах использовалось излучение фемтосекундного лазера на кристалле Cr:F с центральной длиной волны 1260 нм. Энергия была снижена до 1 нДж, для избежания фотоповреждений. Сигнал на частоте третьей гармоники фильтровался от основного излучения с помощью оптических фильтров и дихроичных зеркал и детектировался

с помощью ФЭУ и синхронного усилителя.

Известно, что условия фазового согласования для ГТГ управляются составом и структурой материала в фокусе. Ткани мозга состоят из большого числа аксонов и дендритов с характерными диаметрами в диапазоне 0.3-2 мкм, миелиновая оболочка которых по сути состоит из липидов имеющих большое значение нелинейной восприимчивости третьего порядка $\chi^{(3)}$. Подбирая размер конфокального параметра сравнимым по размеру со средним аксоном, мы получаем геометрию, в которой условия фазового согласования обеспечивают эффективную ГТГ от отростков. В этом случае нейроны, состоящие из органелл, размеры которых много меньше конфокального параметра, не будут генерировать сигнал третьей гармоники. На Рис. 11(а) представлены результаты измерений области в соматосенсорной коре среза мозга мыши линии C57Bl/6. Клетки на данной карте проявляются как области с отсутствием сигнала (На Рис. 11(а) хорошо различимы 4 клетки). Полученные изображения демонстрируют высокий контраст, возможность разрешения морфологических деталей и субклеточное разрешение.

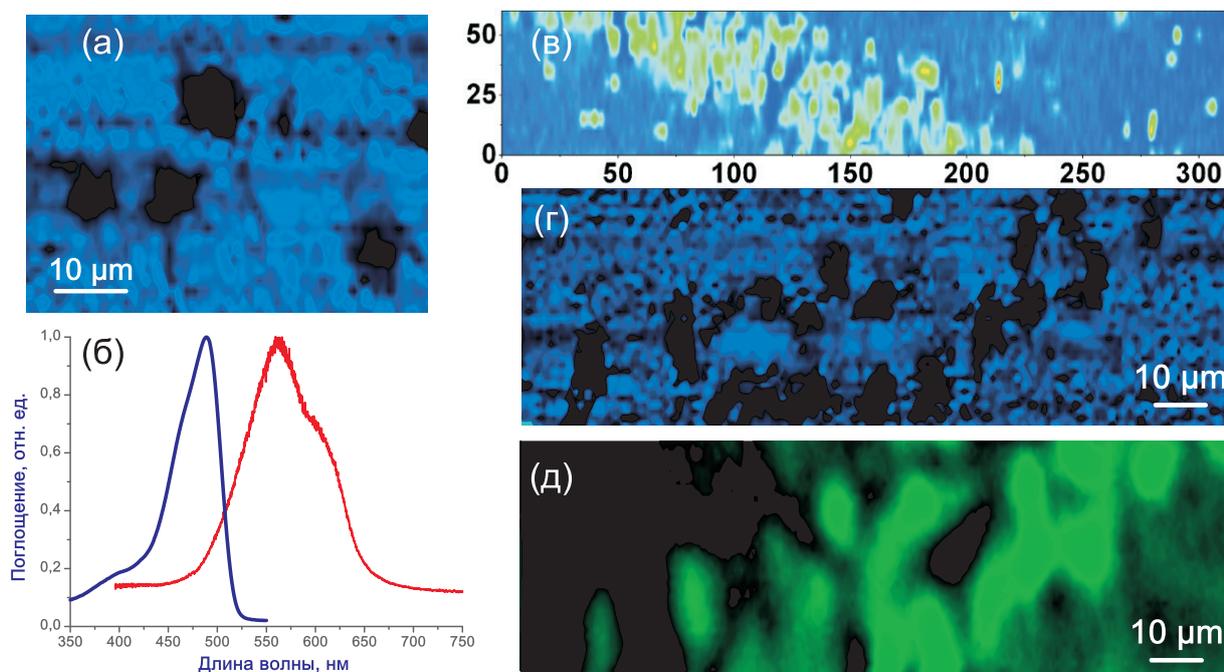


Рис. 11. (а) Карта сигнала третьей гармоники от среза мозга мыши. Клетки проявляются как темные области. (б) Спектры поглощения красителей EGFP (синий цвет) и Cresyl Violet (красный цвет). (в) Карта сигнала третьей гармоники от среза мозга стандартной C57Bl/6 мыши, дополнительно окрашенного красителем Cresyl Violet. Данный краситель инвертирует ГТГ и клетки проявляются как яркие области. (г-д) Комплексная микроскопия срезов мозга: (г) неинвертированный сигнал третьей гармоники. (д) сигнал однофотонной флуоресценции от одной и той же области соматосенсорной коры на срезе мозга Zif-EGFP мыши.

Таким образом, микроскопия ГТГ позволяет безмаркерно визуализировать морфологию тканей мозга, что могло бы быть полезно в ряде исследований особенно при сочетании ее с картами функциональных изменений, визуализируемых по флуоресценции дополнительных красителей. Однако известно, что любой резонанс увеличивает значение $\chi^{(3)}$, тем самым радикально изменяя карту ГТГ, а используемым флуоресцентным маркерам присущи широкие полосы поглощения и, следова-

тельно, резонансы. Например, в работе было экспериментально показано, что маркер Cresyl Violet полностью инвертирует карты распределения сигнала третьей гармоники из-за наличия двухфотонного резонанса. На Рис. 11(б) красной линией представлен спектр поглощения маркера Cresyl Violet. Теперь именно прокрашенные клетки эффективно генерируют сигнал третьей гармоники, не позволяя тем самым визуализировать морфологию независимо от дополнительного красителя (Рис. 11(в)).

Было экспериментально показано, что существуют условия, в которых возможно использование широко распространенного маркера EGFP совместно с микроскопией ГТГ без изменения контрастности сигнала третьей гармоники. На Рис. 11 представлены экспериментальные результаты: (г) - карта третьей гармоники, (д) - соответствующая ей карта сигнала флуоресценции EGFP. Видно, что в случае накачки на длине волны 1260 нм, флуоресцентный белок EGFP не обладает резонансами (синяя линия на Рис. 11(б) и, таким образом, не влияет на генерацию сигнала третьей гармоники (Рис. 11(г)).

В Заключение сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы, которые перечислены ниже:

- I.** Показано, что микроструктурированные волокна с малым размером сердцевины увеличивают локальность оптического зондирования в волоконно-оптических форматах визуализации. Экспериментально показано, что МС волокно с радиусом сердцевины ≈ 1 мкм и числовой апертурой 0.38 может ограничивать оптическое зондирование в области объемом меньше чем 50 мкм^3 , позволяя оптический опрос отдельных нейронов в рамках типичного эксперимента по визуализации мозга.
- II.** Экспериментально показано, что оптоволоконный микрозонд, состоящий из ≈ 6000 волокон с диаметром сердцевины каждого отдельного волокна 2.4 мкм, соединенный с конфокальным оптическим микроскопом позволяет *in vivo* визуализировать пространственное распределение одновременно нескольких флуоресцентных маркеров в мозге живого свободноподвижного животного с субклеточным разрешением равным 3 мкм.
- III.** Экспериментально показано, что МС волокна, в которых генерируется широкополосное излучение суперконтинуум с широким спектром от 420 до 1000 нм, могут быть интегрированы с волоконными спектральными фильтрами на основе полых антирезонансных световодов для реализации одновременной многоцветной регистрации флуорофорных маркеров в мозге трансгенных животных, что обеспечивает путь к полностью волоконному формату мультиплексного зондирования.
- IV.** Экспериментально продемонстрировано, что МС волокно со сконструированным должным образом профилем дисперсии обеспечивает плавную перестройку излучения от 800 до 1400

нм и позволяет точно подобрать длину волны солитона на выходе волокна к спектру двухфотонного поглощения любого флуоресцентного биомаркера, усиливая таким образом отклик двухфотонной флуоресценции, что может быть использовано для нелинейно-оптического зондирования в волоконном формате.

- V. Разработан волоконно-оптический нейроинтерфейс, который, как было экспериментально показано, позволяет минимально инвазивно проводить измерения уровня экспрессии флуоресцентных маркерных белков в глубоких слоях мозга живых животных в течение длительного времени (до одного месяца) при их свободном поведении во время и после разнообразных физиологических и фармакологических воздействий, а также позволяет проводить измерения уровня флуоресценции одновременно из нескольких пространственно разнесенных структур мозга живого животного.
- VI. Экспериментально продемонстрировано, что пространственное распределение веществ с комбинационно активными линиями может быть визуализировано в волоконном формате в режиме эндоскопии с разрешением 3 мкм методом регистрации спонтанного комбинационного рассеяния света.
- VII. Экспериментально показано, что антирезонансные волокна с полый сердцевинной позволяют увеличить до 17 раз чувствительность волоконно оптической регистрации маркеров пролиферации клеток с помощью спонтанного комбинационного рассеяния по сравнению со стандартными световодами, таким образом, значительно улучшая чувствительность химически селективного зондирования синтеза ДНК в клетках и предлагая мощный инструмент для волоконно-оптической визуализации живых клеток.
- VIII. Показано, что когерентное подавление генерации третьей гармоники в жестко сфокусированных лазерных пучках позволяет осуществлять высокоточную безмаркерную визуализацию отдельных нейронов в тканях мозга; и экспериментально показана возможность комбинации метода микроскопии генерации третьей гармоники с флуоресцентными методами микроскопии без изменения контрастности сигнала третьей гармоники.

Список публикаций автора по теме работы

1. *L. V. Doronina*, I. V. Fedotov, A. A. Voronin, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, K. V. Anokhin, E. V. Rostova, A. B. Fedotov, and A. M. Zheltikov Tailoring the soliton output of a photonic crystal fiber for enhanced two-photon excited luminescence response from fluorescent protein biomarkers and neuron activity reporters // *Optics Letters*. 2009. Vol. 34(21), P. 3373-3375.
2. I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, *L. V. Doronina*, and A. M. Zheltikov Enhancement of guided-wave two-photon-excited luminescence response with a photonic-crystal fiber // *Applied Optics*. 2009. Vol. 48, no. 28, P. 5274–5279.
3. *L. V. Doronina-Amitonova*, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov Fiber-optic probes for in vivo depth-resolved neuron-activity mapping // *Journal of Biophotonics*. 2010. Vol. 3, no. 10–11, P. 660–669.
4. *L. V. Doronina-Amitonova*, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov Photonic-crystal-fiber platform for multicolor multilabel neurophotonic studies // *Applied Physics Letters*. 2011. Vol.98, P. 253706.
5. *L. V. Doronina-Amitonova*, A. A. Lanin, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, A. M. Zheltikov Nonlinear-optical brain anatomy by harmonic-generation and coherent Raman microscopy on a compact femtosecond laser platform // *Applied Physics Letters*. 2011. Vol. 99, P. 231109.
6. A. A. Voronin, I. V. Fedotov, *L. V. Doronina-Amitonova*, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov Ionization penalty in nonlinear Raman neuroimaging // *Optics Letters*. 2011. Vol. 36, no. 4, P. 508–510.
7. *L. V. Doronina-Amitonova*, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov Enhancing the locality of optical interrogation with photonic-crystal fibers // *Applied Physics Letters*. 2012. Vol. 101, P. 021114.
8. A. A. Lanin, I. V. Fedotov, D. A. Sidorov-Biryukov, *L. V. Doronina-Amitonova*, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, C.-K. Sun, F. Omer Ilday, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin and A. M. Zheltikov Air-guided photonic-crystal-fiber pulse-compression delivery of multimegawatt femtosecond laser output for nonlinear-optical imaging and neurosurgery // *Applied Physics Letters*, 2012. Vol. 100, no. 10, P. 101104–101104.
9. *L. V. Doronina-Amitonova*, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov // *Applied Physics Letters*. 2012. Vol. 101, P. 113701.
10. *L. V. Doronina-Amitonova*, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, M. Hu, C. Wang, and A. M. Zheltikov Fiber-optic Raman sensing of cell proliferation probes and molecular vibrations: Brain-imaging perspective // *Optics Letters*. 2012. Vol. 37, no. 22, 4642–4644.

11. *L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, O. Efimova, M. Chernysheva, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov* Raman detection of cell proliferation probes with antiresonance-guiding hollow fibers // *Applied Physics Letters*. 2012. Vol. 101, no 23, P. 233702.
12. *L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, and A. M. Zheltikov* Multicolor in vivo brain imaging with a microscope-coupled fiber-bundle microprobe // *Applied Physics Letters*. 2013. Vol. 102
13. *L. V. Doronina, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, K. V. Anokhin, Yu. M. Mikhailova, A. A. Lanin, A. B. Fedotov, M. N. Shneider, R. B. Miles, A. V. Sokolov, M. O. Scully, and A. M. Zheltikov* The second law of thermodynamics, Maxwell's demons, photonic-crystal fibers, and optimal waveguide solutions for biophotonics // 18th International Laser Physics Workshop (LPHYS'09). 2009. Technical Digest, P. 207, Barcelona, Spain.
14. *Л. В. Доронина, И. В. Федотов, О. И. Ивашкина, М. А. Зоц, К. В. Анохин, Ю. М. Михайлова, А. А. Ланин, А. Б. Федотов, М. Н. Шнайдер, Р. Б. Майлс, А. В. Соколов, М. О. Скалли, А. М. Желтиков* Второй закон термодинамики, демоны Максвелла, фотонно-кристаллические волокна и оптимальные волноводные моды в биофотонике // VI Международная конференция молодых ученых "Оптика - 2009". 2009. Труды конференции, стр. 140-142, Санкт Петербург, Россия.
15. *A. B. Fedotov, A. Yu. Tashchilina, I. V. Fedotov, L. V. Doronina, P. A. Zhokhov, D. A. Sidorov-Biryukov, A. A. Ivanov, M. V. Alfimov, A. M. Zheltikov* Nanoparticles in a Nanowaveguide: Enhanced-Functionality Optical Systems // Третий международный форум по нанотехнологиям. 2010. Сборник материалов форума, Москва, Россия.
16. *L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov* Fiber-optic solutions for in vivo neuron-activity mapping // XII International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS). 2010, June 9-11. Oulu, Finland.
17. *L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov* Fiber-optic probes for in vivo depth resolved multiplex neuron-activity mapping // International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (ICONO/LAT). 2010, August 23–27. Kazan, Russia.
18. *Л. В. Амитонова, М. А. Зоц, О. И. Ивашкина* Использование оптических волокон для детектирования флуоресцентных маркеров в мозге // XIV научная школа-конференция по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. 2010. Москва.
19. *A. B. Fedotov, A. A. Lanin, L. V. Doronina-Amitonova, A. A. Voronin, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, K. V. Anokhin, A. M. Zheltikov* Nonlinear-optical brain neuroimaging using optical harmonic generation and coherent raman scattering // 5th Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium. 2011, October 18-20. Saint-Petersburg, Russia.
20. *L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. A. Voronin, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov* Nonlinear-optical brain anatomy: Morphometry and chemically

selective neuroimaging using optical harmonic generation, coherent Raman scattering, and two-photon microscopy // 20th International Laser Physics Workshop. 2011, July 11–15. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

21. М. А. Зоц, О. И. Ивашкина, Л. В. Амитонова In vivo мониторинг экспрессии немедленного раннего гена zif268 в мозге трансгенных животных с помощью волоконно-оптических методов // XV школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. 2011. стр. 32, Москва, Россия.
22. М. А. Zots, О. I. Ivashkina, L. V. Amitonova, А. М. Zheltikov and К. V. Anokhin Fiber-optic monitoring of zif 268-promoted EGFP fluorescence in the brain of freely moving mice // 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence. 2011, July 14-18. Florence, Italy.
23. Л. В. Амитонова, А. Б. Федотов, А. А. Ланин, О. И. Ивашкина, М. А. Зоц, К. В. Анохин, А. М. Желтиков Нелинейно-оптические методы трехмерной микроскопии на основе генерации оптических гармоник и когерентного антистоксова рассеяния света с использованием фемто-секундных лазерных импульсов для визуализации глубоких слоев тканей головного мозга // III Симпозиум по когерентному оптическому излучению полупроводниковых соединений и структур. 2011, 28-30 ноября. Тезисы, стр.31, Москва-Звенигород.
24. О. И. Ивашкина, М. А. Зоц, Л. В. Амитонова, И. В. Федотов, К. В. Анохин Регистрация экспрессии генов в мозге бодрствующих животных с помощью нового волоконно-оптического метода // 9-я Курчатовская молодежная научная школа. 2011. Москва.
25. И. В. Федотов, Л. В. Амитонова, М. А. Зоц, О. И. Ивашкина, А. Б. Федотов, К. В. Анохин, А. М. Желтиков Оптимальные световые поля и световодные системы для оптической регистрации нейронной активности // XVI Научная школа «Нелинейные волны». 2012. Нижний Новгород, Россия.
26. О. I. Ivashkina, М. А. Zots, L. V. Amitonova, I. V. Fedotov, А. В. Fedotov, А. М. Zheltikov Gene expression monitoring with new optic fiber-based method // The Fifth International Conference On Cognitive Science. 2012, June 18–24. Kaliningrad, Russia.
27. О. I. Ivashkina, М. А. Zots, L. V. Amitonova, I. V. Fedotov, А. В. Fedotov, А. М. Zheltikov and К. V. Anokhin Fiber-optic technique for registration of reporter gene expression in the brain of freely moving animals // 8th FENS Forum of Neuroscience. 2012, July 14-18, Barcelona, Spain.
28. L. Amitonova, А. Lanin, I. Fedotov, О. Ivashkina, М. Zots, А. Fedotov, К. Anokhin, А. Zheltikov Coherent nonlinear-optical brain imaging by optical harmonic-generation and coherent anti-Stokes Raman microscopy on a compact femtosecond laser platform // 11th ECONOS Conference, 2012, July. P. 22, Aberdeen, Great Britain.