

## ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

## Нейрофотоника: оптические методы исследования и управления мозгом

Л.В. Доронина-Амитонова, И.В. Федотов, А.Б. Федотов,  
К.В. Анохин, А.М. Жёлтиков

*Методы оптической физики открывают уникальные возможности для исследования мозга и высшей нервной деятельности. На стыке передовых лазерных технологий и современной нейробиологии стремительно развивается новое междисциплинарное направление естественнонаучных исследований — нейрофотоника, в рамках которой разрабатывается обширный арсенал средств для функциональной диагностики мозга, стимуляции отдельных нейронов и их сетей, а также молекулярной инженерии клеток мозга с целью диагностики и терапии нейродегенеративных и психических заболеваний. Центральная роль в решении наиболее сложных задач исследования мозга, включая изучение клеточных и молекулярных механизмов формирования памяти и поведения, отводится световодным системам. На основе оптических волокон нового поколения разрабатывается уникальный, принципиально новый класс устройств нейрофотоники и лазерной нейроинженерии — волоконно-оптические нейроэндоскопы и нейроинтерфейсы. Такие системы открывают новые горизонты в исследовании сложнейших функций мозга, обеспечивая возможность долговременной мультиспектральной регистрации отклика флуоресцентных маркерных белков, а также фотостимуляции нейронной активности в глубоких слоях мозга живых свободноподвижных животных с высоким пространственным разрешением и минимальной степенью инвазивности. На этой основе в экспериментах с живыми свободноподвижными животными реализуются уникальные методики исследования процессов обучения и формирования долговременной памяти. Представлен обзор этого быстро развивающегося направления исследований.*

**Ключевые слова:** нейрофотоника, оптоволоконные системы, нелинейно-оптическая микроскопия

PACS numbers: 42.81.-i, 87.19.L-, 87.85.D-

DOI: 10.3367/UFNr.0185.201504c.0371

### Содержание

1. Введение (371).
2. Оптические технологии в нейробиологии (372).
  - 2.1. Физические методы регистрации нейронной активности в живом мозге.
  - 2.2. Оптогенетика и флуоресцентные биомаркеры.

Л.В. Доронина-Амитонова, И.В. Федотов, А.Б. Федотов.  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 119991 Москва, Российская Федерация;  
Российский квантовый центр,  
ул. Новая 100а, 143025 Сколково, Москва, Российская Федерация  
К.В. Анохин. Национальный исследовательский центр  
"Курчатовский институт",  
пл. Академика Курчатова 1, 123182 Москва, Российская Федерация  
А.М. Жёлтиков. Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 119991 Москва, Российская Федерация  
E-mail: zheltikov@physics.msu.ru  
Российский квантовый центр,  
ул. Новая 100а, 143025 Сколково, Москва, Российская Федерация;  
Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт",  
пл. Академика Курчатова 1, 123182 Москва, Российская Федерация;  
Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University,  
College Station TX 77843, USA

Статья поступила 25 декабря 2014 г.

- 2.3. Безмаркерные оптические методы исследования мозга.
  3. Оптоволоконные технологии в нейрофотонике (375).
    - 3.1. Собственные моды и локализация света в волноводных системах нейрофотоники.
    - 3.2. Микроструктурированные световоды.
    - 3.3. Полые фотонно-кристаллические световоды.
  4. Физические принципы световодной нейроэндоскопии (382).
  5. Минимикроскопы для исследования мозга бодрствующих животных (385).
  6. Оптоволоконные нейроинтерфейсы (385).
  7. Физические принципы световодной нейроэндоскопии (387).
    - 7.1. Генерация оптических гармоник.
    - 7.2. Спонтанное комбинационное рассеяние света.
    - 7.3. Когерентное комбинационное рассеяние света.
  8. Заключение (390).
- Список литературы (391).

### 1. Введение

Оптические методы находят всё более широкое применение в науках о жизни и биомедицине. На основе оптических технологий реализованы высокоинформативные схемы изучения мозга с использованием флуоресцентных биомаркеров [1, 2], химически селективной микроскопии спонтанного [3] и когерентного [4, 5] комбинационного рассеяния света, а также нелинейно-

оптической микроскопии высокого пространственного разрешения на основе явлений двух- и трёхфотонного поглощения [6–8], а также генерации второй и третьей оптических гармоник [9, 10].

Особый интерес вызывают уникальные возможности, открываемые лазерными технологиями, для решения одной из центральных и наиболее сложных задач нейробиологии — обнаружения и изучения взаимосвязи между активностью нервных клеток и поведением животного. Передовые методы электрофизиологии продолжают играть важную роль в исследовании мозга, позволяя регистрировать активность отдельных нервных клеток, что приводит к важным открытиям в нейробиологии, таким как обнаружение нейронов места [11], нейронов координатной сетки [12] и нейронов поворота головы [13]. Эти открытия, проливающие свет на то, как мозг кодирует информацию о положении в пространстве [14], отмечены Нобелевской премией по физиологии и медицине 2014 года [15]. Примечательно, что Нобелевская премия 2014 года по химии присуждена изобретателям флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения [16] — технологии, получающей всё более широкое применение при исследовании мозга.

Разработанные в последние годы новые оптогенетические технологии [17], основанные на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов и биомаркеров, открывают принципиально новые возможности для изучения мозга, позволяя впервые осуществить минимально инвазивное системное исследование больших распределённых сетей электрически и химически возбуждаемых клеток, в том числе нейронов и глиальных клеток мозга, при одновременном наблюдении за самостоятельным поведением экспериментального животного в течение длительного времени [18, 19]. Нейробиологические исследования живых свободноподвижных животных, возможность которых открывается благодаря применению методов оптогенетики [20], предъявляют особые требования к гибкости, компактности, механической прочности и функциональной универсальности используемых в эксперименте средств доставки и сбора оптического излучения. В подобных экспериментах важно обеспечить оптимальную геометрию и высокую локальность возбуждения нервных клеток, а также реализовать эффективный сбор оптического отклика и доставку оптического сигнала с минимальными потерями. Оптоволоконные световодные системы нового поколения [21, 22] представляют собой уникальную платформу для создания нейроинтерфейсов для оптогенетических экспериментов с живыми свободноподвижными животными, удовлетворяющих всем вышеперечисленным требованиям.

С помощью оптоволоконных нейроинтерфейсов, как будет показано в настоящем обзоре, удаётся решить ключевую для нейробиологии задачу исследования глубоких слоёв мозга свободноподвижного животного. Получившие широкое распространение методы двухфотонной микроскопии, как правило, не позволяют исследовать области мозга, лежащие на глубине более чем 1–1,5 мм [23], ограничивая тем самым область исследований корой головного мозга. Использование оптоволоконных нейроинтерфейсов позволяет решить эту важную задачу. Волоконно-оптические нейроинтерфейсы ввиду их компактности, механической гибкости и высокой универсальности могут быть использованы для мини-

мально инвазивной оптической диагностики произвольных глубоколежащих областей мозга [24, 25]. Благодаря такому уникальному сочетанию качеств волоконно-оптические нейроинтерфейсы стремительно превращаются в незаменимый инструмент нейробиологических исследований.

В настоящем обзоре рассмотрены световодные системы для нейрофотоники, а также представлены наиболее значимые результаты исследований, выполненных с использованием оптоволоконных нейроинтерфейсов. Обзор построен по следующему плану.

В разделе 2 обсуждается, какое место занимают оптические технологии в современной нейробиологии. Проводится обзор физических методов регистрации нейронной активности в живом мозге и указываются основные преимущества оптических методов регистрации нейронной активности, даётся краткое введение в оптогенетические технологии, рассматриваются методы оптической регистрации нейронной активности с помощью генетически кодируемых флуоресцентных биомаркеров, а также не требующие применения биомаркеров оптические методы исследования мозга, включая технологии нелинейно-оптической микроскопии.

В разделе 3 рассматриваются новые оптоволоконные технологии, используемые для разработки световодной платформы нейрофотоники. Кратко излагаются основные физические принципы оптоволоконных нейроэндоскопов и нейроинтерфейсов, обсуждаются вопросы, связанные с физикой локализации электромагнитного поля в собственных модах перспективных для нейрофотоники световодов с сердцевиной сверхмалого диаметра, и пути создания световодов для нейроэндоскопии высокого пространственного разрешения, а также рассматриваются новые типы световодных систем на основе микро- и наноструктурированных световодов, получающих всё более широкое распространение при создании нейроэндоскопов и нейроинтерфейсов.

Раздел 4 посвящён обсуждению физических принципов световодной нейроэндоскопии и тех новых возможностей исследования мозга свободноподвижных животных, которые предоставляются световодными нейроэндоскопами нового поколения.

В разделе 5 проводится анализ новых возможностей исследования мозга свободноподвижных животных с помощью миниатюрных портативных микроскопов, закрепляемых на голове животного.

В разделе 6 обобщаются результаты исследований, направленных на создание оптоволоконных нейроинтерфейсов.

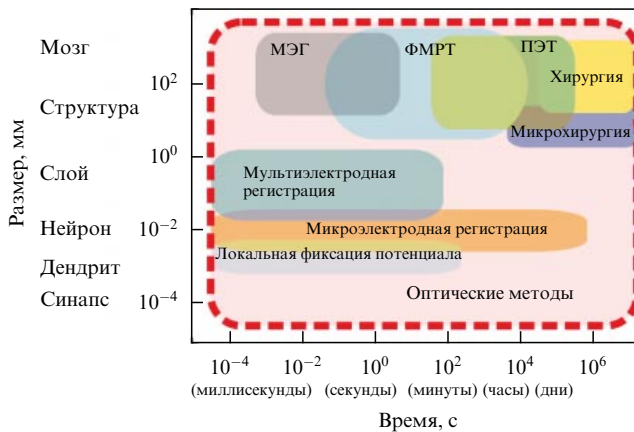
В разделе 7 даётся краткое описание основных физических процессов, используемых для световодной нейроэндоскопии высокого разрешения.

В заключении (раздел 8) суммируются полученные к настоящему времени основные результаты исследований в направлении разработки световодных систем нейрофотоники.

## 2. Оптические технологии в нейробиологии

### 2.1. Физические методы регистрации нейронной активности в живом мозге

Для решения ключевых вопросов нейробиологии, касающихся установления взаимосвязи между протекающими



**Рис. 1.** Физические методы регистрации нейронной активности в живом мозге и роль оптических технологий: позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ); функциональная магнитно-резонансная томография (ФМРТ); магнитоэнцефалография (МЭГ). По осям отложены характерные пространственное и временное разрешения и отмечены характерные размеры важнейших структур и элементов мозга. Область параметров, в которой работают оптические методы, очерчена штриховым контуром.

в нейронах процессами и особенностями поведенческого отклика, адаптации и обучения, требуются экспериментальные средства, позволяющие изучить весь комплекс динамических свойств нейронной сети у живых активных животных, вовлечённых в разнообразные виды когнитивной деятельности [26, 27]. Физические методы исследования мозга, такие как магнитно-резонансная томография [28], позитронно-эмиссионная томография [29] и магнитоэнцефалография [30], предоставляют возможность сделать первые шаги в этом направлении. Каждый из этих методов позволяет получить важную информацию о функциональном состоянии мозга. Однако ни один из них не обеспечивает пространственного разрешения, необходимого для исследования фундаментальных нейробиологических процессов, обуславливающих работу мозга, на уровне отдельных клеток (рис. 1). Несмотря на отдельные успехи, достигнутые с применением ПЭТ для исследования мозга бодрствующих грызунов [31], все вышеперечисленные методы оказываются эффективными лишь в экспериментах на анестезированных или обездвиженных животных.

Электрофизиологические методы до сих пор остаются основным средством изучения нейронной активности живых бодрствующих животных [32, 33]. Высокая чувствительность и высокое временное разрешение новейших электрофизиологических инструментов позволяют изучать как отклик отдельных ионных каналов, так и явления, связанные с активностью нескольких клеток в нейрональной сети. Прямая регистрация электрических сигналов, обусловленных ионными токами, протекающими через клеточную мембрану, даёт возможность получать информацию о состоянии нервных клеток без использования каких-либо дополнительных агентов. С другой стороны, прямой электрический контакт с клеткой при электрофизиологических измерениях может значительно повлиять на её активность и исказить результат эксперимента.

Оптические методы позволяют существенно снизить нежелательное влияние зондирующего сигнала на клетку и обладают рядом принципиальных преимуществ перед

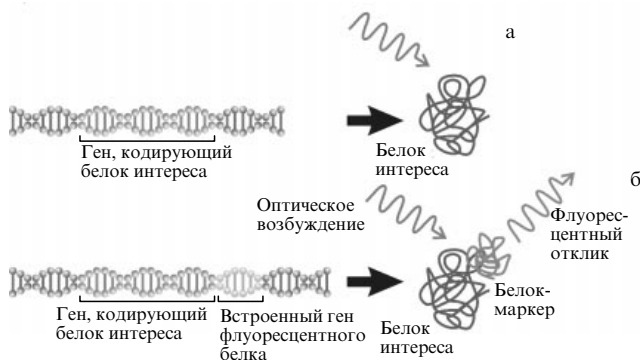
другими методами исследования мозга. Одним из важнейших преимуществ оптических технологий изучения мозга является возможность одновременной регистрации сразу нескольких факторов нейронной активности. Применение разработанных в последние десятилетия оптогенетических технологий, основанных на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов и флуоресцентных маркеров, позволяет с помощью оптических методов активировать нейроны требуемого типа или подавлять их активность, а также получать важную информацию о нейронной активности в данной области мозга посредством регистрации флуоресцентного сигнала [34]. С помощью такого подхода удаётся решить задачу регистрации широкого класса фундаментальных процессов, связанных с работой нервных клеток, в том числе процессов появления, удаления и перестройки синапсов [35]. Флуоресцентные кальциевые красители [36] и оптогенетические сенсоры [37] успешно используются для регистрации кальциевых токов. С их помощью удаётся зарегистрировать электрическую активность и изменение мембранного потенциала клетки [38, 39], а также исследовать процессы накопления белков [40], участвующих в формировании памяти [41].

Стремительно развивающиеся в последние годы методы оптогенетики открывают возможность управлять нейронной активностью свободноподвижных животных с высоким пространственным и временным разрешением. С этой целью в нейроны выбранного типа генетически встраиваются специальные, играющие роль светочувствительных ионных каналов, белки, такие как канал родопсин или галородопсин, позволяющие соответственно активировать нейроны или подавить их активность [42–44]. Активностью нервных клеток со встроенными каналами можно управлять оптическим излучением с определённой длиной волны. Данный подход открывает уникальные возможности для исследования нервной деятельности и когнитивных функций, позволяя не только наблюдать за сложными структурными и функциональными изменениями нервной ткани, но и избирательно управлять активностью клеток. С помощью оптогенетических методов удаётся осуществить селективное возбуждение лишь тех клеток в выбранной области мозга, которые представляют интерес для изучения конкретного нейробиологического процесса [45].

Таким образом, оптические методы существенно расширяют возможности экспериментального изучения мозга, позволяя регистрировать электрическую активность нервных клеток одновременно с геномной активностью благодаря использованию потенциал-чувствительных красителей и специально подобранных маркеров. Наконец, оптические методы обеспечивают возможность одновременной регистрации активности и динамических изменений в большой области мозга с высоким пространственным разрешением, что является принципиально важным для изучения больших нейронных сетей [46].

## 2.2. Оптогенетика и флуоресцентные биомаркеры

Оптическая микроскопия мозга, которая с привлечением современных лазерных технологий может быть осуществлена с субклеточным разрешением, позволяет получить важнейшую информацию об анатомии, морфологии, функциональном состоянии и патологиях мозга. С



**Рис. 2.** Генетическое кодирование флуоресцентных маркеров. (а) Участок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), кодирующий исследуемый белок. (б) Участок ДНК со встроенным геном флуоресцентного белка. Экспрессия гена исследуемого белка сопровождается экспрессией гена флуоресцентного белка, обеспечивая возможность оптической регистрации наработки исследуемого белка в определённой области мозга.

помощью методов оптогенетики удаётся маркировать отдельные молекулы, внутриклеточные структуры и живые клетки генетически кодируемыми флуоресцентными метками. Маркерные системы, основанные на органических белках, обычно состоят из двух частей: "сенсора" — белка, который испытывает структурные изменения, зависящие от исследуемых параметров (это может быть зависимость от мембранного потенциала, внутриклеточной динамики различных ионов, экспрессии генов и производства белков), и "маркера", обычно

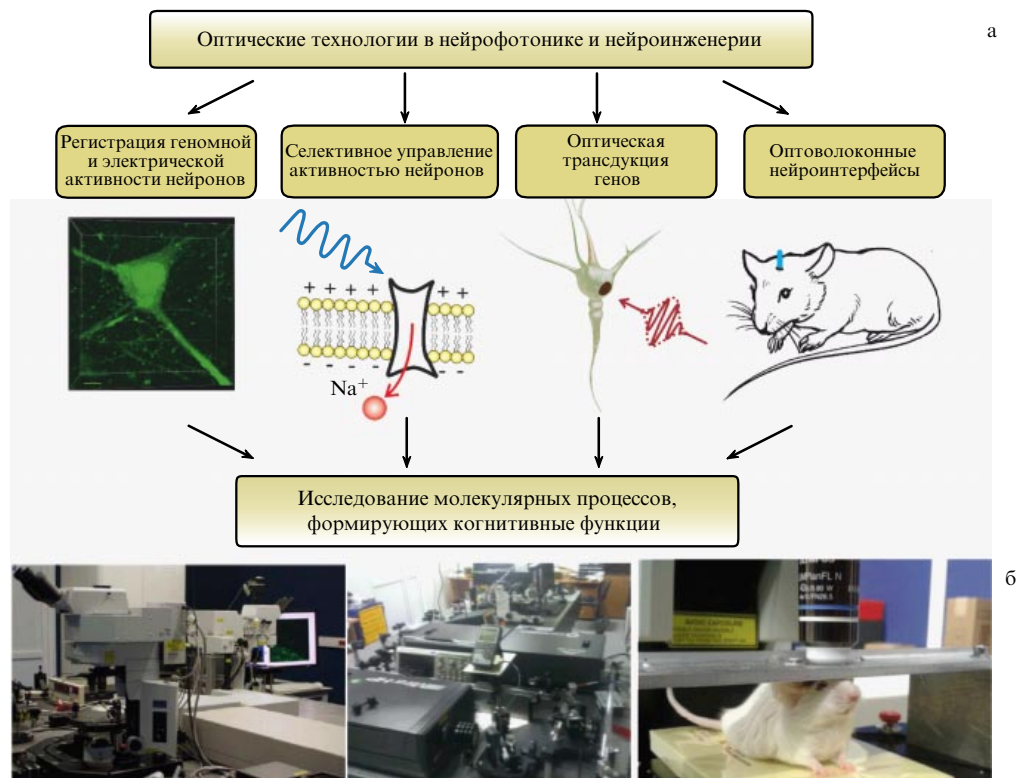
являющегося флуоресцентным белком, оптический отклик которого модулирован изменениями сенсорного белка (рис. 2).

Новый этап в использовании оптических методов в исследовании мозга связан с выделением гена зелёного флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein — GFP) [47, 48] и последующим созданием его "улучшенных" форм [49, 50]. Главные преимущества флуоресцентных белков, используемых в качестве биомаркеров, обусловлены их высокой стабильностью и способностью образования хромофора в отсутствие вспомогательных кофакторов, ферментов или каких-либо субстратов кроме молекулярного кислорода [49]. Важно отметить, что GFP-подобные белки в большинстве случаев оказываются нетоксичными для клеток-мишеней.

Таким образом, имеется уникальная возможность диагностики активности нервных клеток и функционального состояния живого мозга свободноподвижных животных (рис. 3) на основе исследования оптического отклика генетически кодируемых флуоресцентных белков [51, 52].

### 2.3. Безмаркерные оптические методы исследования мозга

В ряде задач использование флуоресцентных маркеров может быть неудобным или даже неприемлемым, так как дополнительные метки — искусственные или натуральные — могут вносить недопустимо сильные возмущения в живую биологическую систему. Этот фактор становится критически важным в случае небольших молекул, таких как сигнальные белки, метаболиты, нейротранс-

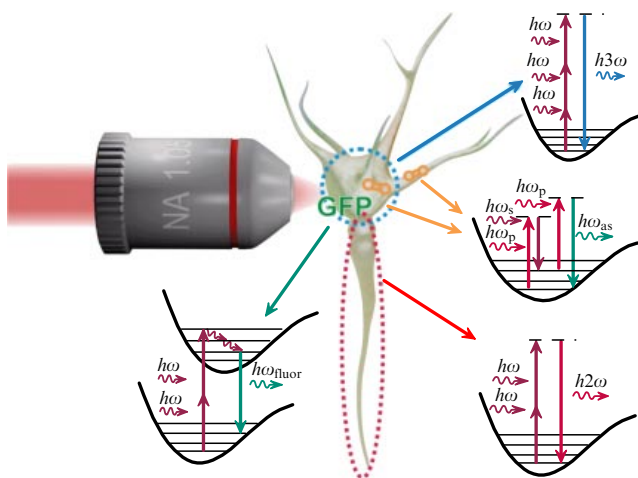


**Рис. 3.** (а) Оптические методы исследования молекулярных и клеточных механизмов когнитивных функций и управления ими. (б) Фотографии специализированных лазерных источников и микроскопов, используемых для комплексного исследования мозга, сделанные в лаборатории нейрофотоники отдела нейронаук Национального исследовательского центра (НИЦ) "Курчатовский институт" и в лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

миттеры и лекарственные белки, размер которых меньше размера флуоресцентной метки. Особенно серьёзное беспокойство вызывает использование маркеров в медицинских целях. Ввиду этих обстоятельств оптические методы диагностики, позволяющие достичь высокой чувствительности при регистрации специфических молекулярных сигналов без использования маркеров, играют всё более важную роль в биологии и медицине [4].

О связи функциональной активности нервных клеток и их оптических свойств было известно уже в конце 1940-х годов [53]. На этой основе был разработан обширный арсенал безмаркерных методов диагностики мозга. Широко используются методы, основанные на регистрации изменений в кровеносной системе, обусловленных функциональным состоянием мозга. Одним из главных регистрируемых параметров является связанная с активностью нервных клеток степень насыщения крови кислородом [54]. Другой важный измеряемый параметр — объём капилляров, характеризующий приток крови к тканям мозга, проявляет сильные корреляции с электрической активностью нейронов в прилегающих тканях [55]. Разработаны эффективные методы определения динамических значений степени насыщения крови кислородом на основе измерения затухания света [56]. Основные недостатки описанных выше методов исследования связаны с низким пространственным разрешением и большими временами изменения параметров крови в ответ на нейронную активность.

Методы нелинейно-оптической микроскопии открывают новые возможности для исследования строения тканей мозга и регистрации нейронной активности без применения флуоресцентных маркеров (рис. 4). Нелинейно-оптические процессы, используемые для микроскопии мозга, можно разделить на два типа по отношению к когерентности применяемого для построения изображения сигнала. К процессам первого типа относятся явления многофотонного поглощения, а также процессы с истощением излучения, используемые в методах микроскопии, основанных на применении некогерентного сигнала (включая микроскопию двух- и трёхфотонного поглощения, а также флуоресцентную микроско-



**Рис. 4.** Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия мозга: диаграммы сложения квантов оптических полей в процессах генерации второй и третьей гармоник, когерентного антистоксова рассеяния света и индуцируемой двухфотонным поглощением флуоресценции.

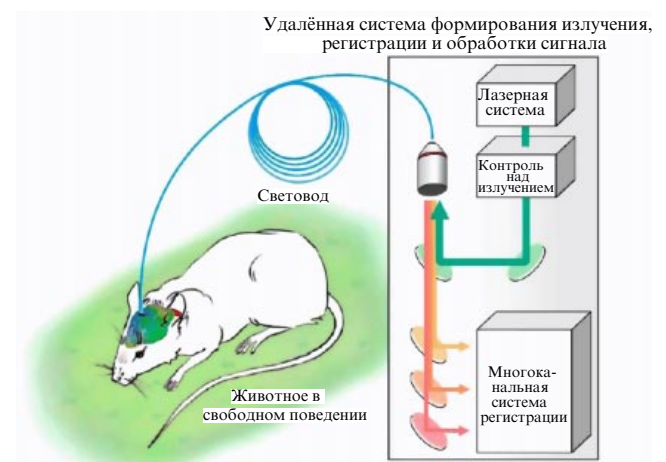
пию сверхвысокого пространственного разрешения с вынужденным истощением флуоресценции (Stimulated Emission Depletion — STED). К процессам второго типа относятся приводящие к генерации когерентного сигнала нелинейно-оптические явления, такие как генерация второй (ГВГ) и третьей (ГТГ) оптических гармоник, когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС) и вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР) света. Обсуждению физических принципов световодной эндоскопии с использованием методов нелинейной оптики посвящён раздел 7.

### 3. Опволоконные технологии в нейрофотонике

Работа с живыми объектами накладывает особые требования на устройства оптической визуализации, а необходимость проводить биологические исследования на бодрствующих свободноподвижных мышах, как наиболее удобных объектах для исследований, приводит к необходимости максимальным образом уменьшить размер оптических сенсорных систем.

Основная идея миниатюризации оптических микроскопов представлена на рис. 5 [57]. Принципиальным шагом в решении этой задачи является физическое отделение оптического микроскопа от массивных компонентов, состоящих из лазерных систем накачки, систем регистрации оптического отклика, а также систем контроля над фокусировкой и сканированием. Ключевым элементом в этой схеме, как видно из рис. 5, являются оптические волокна, используемые для транспортировки излучения накачки от удалённого источника, сбора оптического отклика и доставки его на удалённый детектор. Использование гибкого и компактного оптоволоконка позволяет таким образом проводить исследования на свободноподвижных животных.

В разработках световодной платформы нейрофотоники широко применяются оптические волокна нового поколения — микро- и наноструктурированные световоды. В разделах 3.1–3.3 рассматриваются вопросы, связанные с физикой локализации электромагнитного



**Рис. 5.** Миниатюризация оптической нейромикроскопии. Ключевой идеей является физическое разделение фокусирующего излучение элементов микроскопа и массивных элементов, включающих в себя лазерные источники, систему регистрации и систему автоматического контроля над фокусировкой и сканированием.

поля в собственных модах перспективных для нейрофотоники световодов с сердцевиной сверхмалого диаметра, обсуждаются пути создания световодов для нейроэндоскопии с высоким пространственным разрешением, а также рассматриваются новые типы световодных систем на основе микро- и наноструктурированных световодов, получающих всё более широкое распространение при создании нейроэндоскопов и нейроинтерфейсов.

### 3.1. Собственные моды и локализация света в волноводных системах нейрофотоники

Развитие методов микроскопии с пространственным разрешением, превышающим дифракционный предел, является одной из центральных задач современной оптической физики. Быстро прогрессирующие методы микроскопии ближнего поля [58] обеспечивают рекордно высокое пространственное разрешение при исследовании специально подготовленных образцов, позволяя получать уникальную информацию о строении вещества и физических процессах в приповерхностных слоях.

Однако методы ближнепольной микроскопии сталкиваются с серьёзными трудностями при решении широкого класса задач, связанных с изучением процессов и деталей пространственной структуры по всему объёму вещества, что необходимо при исследовании живых систем. Решение задач этого класса становится возможным на основе реализации новых физических принципов оптической микроскопии дальнего поля, таких как многофотонная микроскопия [59, 60], микроскопия когерентного антистоксова рассеяния света [5] и вынужденного комбинационного рассеяния света [61], а также STED-микроскопия [62]. Новые методы микроскопии дальнего поля, обеспечивающие пространственное разрешение на уровне нескольких десятков нанометров (в отдельных случаях менее 20 нм [63]), успешно применяются для исследования внутриклеточных процессов в живых организмах, регистрации отдельных молекул, а также изучения широкого класса наноструктур и нанобъектов.

Современные оптоволоконные технологии позволяют создавать микро- и наноструктурированные световодные системы, в том числе оптические волокна с субмикронной световедущей сердцевинкой [64]. Такие системы открывают широкие возможности для реализации методов микроскопии сверхвысокого разрешения в волоконно-оптическом формате, включая разработку волоконно-оптических источников и систем доставки сверхкоротких импульсов для решения задач нелинейно-оптической эндоскопии и диагностики нейронной активности головного мозга [65, 66]. Для реализации уникальных возможностей микроскопии сверхвысокого разрешения в волоконно-оптическом формате необходимы детальное исследование фундаментальных физических факторов, ограничивающих локализацию электромагнитного излучения в волноводных системах, и изучение методов формирования и передачи предельно компактных световых пучков в оптоволоконных системах.

Рассмотрим волноводную структуру с произвольным профилем показателя преломления  $n(r)$ . Поле направляемой волноводной моды представим в виде [67]

$$E(r, \varphi, z, t) = F(r) \cos(m\varphi) \exp(-i\beta z) \exp(i\omega t), \quad (1)$$

где  $z, r, \varphi$  — цилиндрические координаты,  $t$  — время,  $F(r)$  — поперечный профиль поля волноводной моды,

$m$  — азимутальный индекс моды,  $\beta$  — постоянная распространения,  $\omega$  — частота излучения.

Поперечный профиль поля волноводной моды находится в результате решения волнового уравнения

$$\frac{d^2 F}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dF}{dr} + \left[ \left( \frac{\omega}{c} n(r) \right)^2 - \beta^2 - \frac{m^2}{r^2} \right] F = 0. \quad (2)$$

Радиус волноводной моды определим как

$$w = \left( \frac{S}{\pi} \right)^{1/2}, \quad (3)$$

где  $S$  — эффективная площадь волноводной моды,

$$S = \frac{2\pi \left[ \int_0^\infty |F(r)|^2 r dr \right]^2}{\int_0^\infty |F(r)|^4 r dr}. \quad (4)$$

Профиль показателя преломления световодной структуры зададим в следующем виде [67, 68]:

$$n(r) = \begin{cases} n_1 \left[ 1 - 2 \left( \frac{r}{\rho} \right)^g A \right]^{1/2}, & 0 \leq r \leq \rho, \\ n_2 = n_1 (1 - 2A)^{1/2}, & \rho \leq r, \end{cases} \quad (5)$$

где  $n_1$  и  $n_2$  — показатели преломления материалов, образующих световодную структуру,  $\rho$  — радиус сердцевины световода,  $A = (n_1^2 - n_2^2)/(2n_1^2)$ , показатель степени  $g$  определяет крутизну профиля показателя преломления в волноводной структуре:  $g = 1$  соответствует треугольному профилю  $n(r)$ ,  $g = 2$  — параболическому профилю  $n(r)$ . Большие значения  $g$  соответствуют волноводу со ступенчатым профилем показателя преломления.

Для стандартного световода радиус волноводной моды с высокой точностью описывается формулой Маркузе [68]:

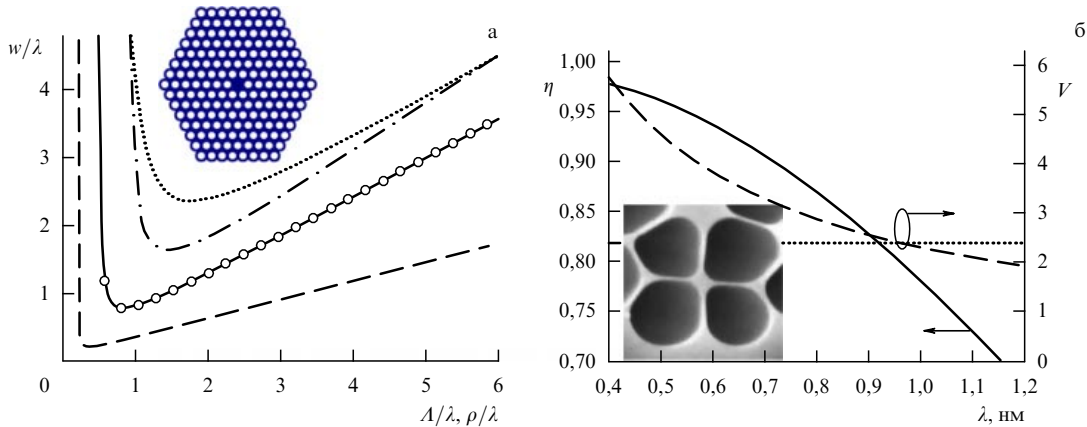
$$\frac{w}{\rho} \approx \frac{A}{V^{2/(2+g)}} + \frac{B}{V^{3/2}} + \frac{C}{V^6}, \quad (6)$$

где  $A, B, C$  — численные коэффициенты,  $V$  — волноводный параметр,

$$V = \frac{2\pi\rho}{\lambda} (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}, \quad (7)$$

$\lambda$  — длина волны излучения. Для световода со ступенчатым профилем показателя преломления,  $g \rightarrow \infty$ , численные коэффициенты в выражении (6) определяются следующим образом [68]:  $A = 0,65$ ,  $B = 1,619$ ,  $C = 2,879$ .

На рисунке ба пунктирной кривой представлена зависимость радиуса волноводной моды  $w$ , нормированного на длину волны  $\lambda$ , от радиуса сердцевины световода  $\rho$ , рассчитанная для стандартного слабонаправляющего световода со ступенчатым профилем показателя преломления при  $n_1 - n_2 = 0,01$ . Волноводный параметр  $V$  является количественной мерой баланса эффектов дифракции и волноводного ограничения светового пучка за счёт явления полного внутреннего отражения в волноводной структуре. При больших значениях  $V$  большая часть мощности волноводной моды локализована в сердцевине световода. При малых  $V$  значительная часть мощности волноводной моды переносится эванесцент-



**Рис. 6.** (а) Зависимость радиуса волноводной моды кварцевого структурированного световода от постоянной структуры  $A$ , рассчитанная с помощью аппроксимации (9) для  $\lambda = 1$  мкм,  $d/A = 0,3$  (штрихпунктирная кривая),  $d/A = 0,5$  (сплошная кривая) и  $d/A = 0,9$  (штриховая кривая). Светлыми кружками показан результат численного решения уравнения (2). Пунктирной кривой представлена зависимость радиуса волноводной моды от размера сердцевин  $\rho$  для стандартного световода с  $n_1 - n_2 = 0,01$ . На вставке изображено поперечное сечение фотонно-кристаллического световода. (б) Параметр  $\eta$ , характеризующий относительную мощность излучения, передаваемого по сердцевине волновода, и волноводный параметр  $V$  в зависимости от длины волны излучения для кварцевого световодного канала радиусом 350 нм (изображённого на вставке). Пунктирной прямой показана граница одномодового режима  $V = 2,405$ .

ным полем в оболочке световода. Эти общие свойства волноводных систем объясняют характер зависимости радиуса волноводной моды.

Для волноводов с большим радиусом сердцевин (при больших значениях  $V$ ) поле моды в основном сосредоточено в оболочке, так что размер моды увеличивается с возрастанием радиуса оболочки. Для световода со ступенчатым профилем показателя преломления ( $g \rightarrow \infty$ ) радиус моды  $w$  при больших значениях  $V$ , как следует из выражения (6), увеличивается прямо пропорционально радиусу сердцевин (см. пунктирную кривую на рис. 6а),  $w \approx A\rho$ . При уменьшении  $V$  локализация поля моды в сердцевине световода становится всё более слабой [67, 69]. Как следствие, при малых  $V$  наблюдается увеличение радиуса моды с уменьшением  $\rho$  (см. пунктирную кривую на рис. 6а).

Рассмотрим теперь световод со структурой поперечного сечения, характерной для фотонно-кристаллического волокна [70, 71] (см. вставку на рис. 6а). Центральная часть световода, служащая его сердцевинной, окружена оболочкой с гексагональной системой воздушных отверстий диаметром  $d$ , разделённых расстоянием  $A$ . Волноводный параметр для световода такого типа определяется следующим образом [72]:

$$V_{\text{PCF}} = \frac{2\pi A}{\lambda} (n_1^2 - n_{\text{eff}}^2)^{1/2}, \quad (8)$$

где  $n_{\text{eff}}$  — эффективный показатель преломления структурированной оболочки световода, определяемый как эффективный показатель преломления основной моды бесконечной гексагональной периодической структуры с воздушными отверстиями диаметром  $d$  и периодом  $A$ .

Как показано в работе [72], формула Маркузе, записанная в виде

$$\frac{w}{A} \approx \frac{A_{\text{PCF}}}{V_{\text{PCF}}^{2/(2+g_{\text{PCF}})}} + \frac{B_{\text{PCF}}}{V_{\text{PCF}}^{3/2}} + \frac{C_{\text{PCF}}}{V_{\text{PCF}}^6}, \quad (9)$$

при правильном выборе численных значений коэффициентов ( $A_{\text{PCF}} = 0,7078$ ,  $B_{\text{PCF}} = 0,2997$ ,  $C_{\text{PCF}} = 0,0037$ ,  $g_{\text{PCF}} = 8$ ) обеспечивает высокую точность аппроксима-

ции зависимости отношения  $w/A$  от параметра  $V_{\text{PCF}}$ . На рисунке 6а проведено сравнение зависимости радиуса волноводной моды от постоянной структуры  $A$ , вычисленной с помощью формулы (9) (сплошная кривая), и результатов численных расчётов волнового уравнения (2) (светлые кружки). Погрешность аппроксимации результатов численных расчётов с помощью приближённой формулы (9) в рассматриваемом диапазоне параметров не превышает 2%.

При фиксированном значении отношения  $d/A$  волноводный параметр  $V_{\text{PCF}}$ , аналогично стандартному параметру  $V$ , служит количественной мерой баланса дифракции и волноводного ограничения светового пучка в волноводной структуре. При больших значениях  $V_{\text{PCF}}$  имеет место сильная локализация поля волноводной моды в сердцевине световода. В этом режиме радиус моды увеличивается с возрастанием постоянной фотонно-кристаллической структуры  $A$ . В случае малых  $V_{\text{PCF}}$  локализация поля моды в сердцевине световода становится всё более слабой по мере уменьшения  $A$ . Эти тенденции обуславливают существование минимума зависимости радиуса моды от постоянной структуры  $A$  (рис. 6а).

Увеличение отношения  $d/A$  приводит к уменьшению эффективного показателя преломления  $n_{\text{eff}}$  структурированной оболочки фотонно-кристаллического световода, что эквивалентно увеличению параметра  $V_{\text{PCF}}$  для данного значения  $A/\lambda$ . При относительно небольших величинах отношения  $d/A$  фотонно-кристаллический световод в интересующем нас диапазоне значений  $A/\lambda$  является одномодовым ( $V_{\text{PCF}} < 2$  для  $d/A = 0,3$ ). Минимальное значение радиуса моды при этом составляет  $w_{\text{min}} \approx 1,6\lambda$  (штрихпунктирная кривая на рис. 6а). Большие значения отношения  $d/A$  приводят к достаточно сильной локализации поля моды в сердцевине волновода даже при малых величинах  $A/\lambda$ . В случае  $d/A = 0,9$  радиус моды достигает минимального значения  $w_{\text{min}} \approx 0,22$  при  $A \approx 0,37\lambda$  (штриховая кривая на рис. 6а).

Сильная локализация поля направляемых мод в сердцевине световода с большими значениями отношения  $d/A$  соответствует высокой числовой апертуре вол-

новодной структуры. Световоды с большой числовой апертурой обеспечивают высокую эффективность сбора сигнала флуоресцентного отклика в схемах нелинейной флуоресцентной спектроскопии сверхвысокого разрешения.

К настоящему времени разработано несколько способов изготовления световодов с субмикронной сердцевиной. Технологии микроструктурирования оптических волокон позволяют создавать световодные структуры, в которых излучение распространяется вдоль стеклянных каналов радиусом менее 200 нм [73], окружённых оболочкой с высоким содержанием воздуха (см. вставку на рис. 6б). Большие значения контраста показателей преломления  $\Delta$ , характерные для таких световодных систем, обеспечивают высокую степень локализации поля в световодном канале [69, 74].

Кварцевая световодная структура, показанная на вставке рис. 6б, аналогична волоконной структуре, использовавшейся в экспериментах [73]. Радиус световодного канала этой структуры составляет 350 нм. Согласно результатам расчётов, представленным на рис. 6б, такой световод является одномодовым для длин волн менее 970 нм (граница одномодового режима  $V = 2,405$  показана пунктирной прямой). Для центральной длины волны титан-сапфирового лазера ( $\lambda = 800$  нм) отношение мощности  $P_c$  излучения, локализованного в кварцевом канале, к полной мощности волноводной моды  $P_0$  (с учётом мощности эванесцентного поля моды) составляет  $\eta = P_c/P_0 \approx 87\%$  (сплошная кривая на рис. 6б). Эффективный радиус моды излучения с длиной волны 800 нм, согласно численным расчётам, составляет  $w \approx 0,4\lambda$ . Этот результат хорошо согласуется с получаемой из экспериментов оценкой коэффициента оптической нелинейности световодной структуры

$$\gamma = 2\pi\lambda^{-1} \int n_2(r) S_z^2 d^2r \left| \int S_z d^2r \right|^{-2} \approx 400 \text{ Вт}^{-1} \text{ км}^{-1},$$

где  $n_2$  — нелинейный показатель преломления,  $S_z = (\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*)_z$  — продольная составляющая вектора Пойнтинга.

Технология перетяжки микроструктурированных световодов при высокой температуре [75, 76] позволяет создавать световоды со структурой поперечного сечения, подобной показанной на вставке рис. 6а. Эксперименты по генерации суперконтинуума в таких световодах также указывают на локализацию светового поля в

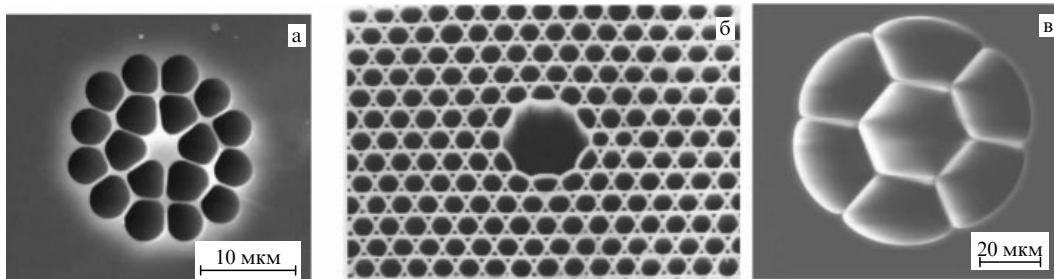
направляемой моде с эффективным радиусом менее  $\lambda$ . В частности, для световых импульсов с центральной длиной волны 800 нм достигнуты значения коэффициентов оптической нелинейности, указывающие на локализацию поля в волноводной моде с эффективным радиусом  $w \approx 0,4\lambda$ .

Технологии нанобработки полупроводниковых материалов позволяют получать высококачественные световоды с большой числовой апертурой, локализуя световое поле в волноводных модах с эффективной площадью менее  $0,1 \text{ мкм}^2$  [77]. Такие световодные структуры открывают широкие возможности для обработки оптических сигналов [77–80] в телекоммуникационном диапазоне частот ( $\lambda \approx 1,55 \text{ мкм}$ ), однако из-за узкой запрещённой зоны кремния не могут работать в видимом диапазоне.

Таким образом, анализ волнового уравнения для собственных мод микро- и наносветоводных структур и его приближённых аналитических решений показывает возможность использования таких структур для формирования и волноводной передачи субволновых световых пучков. Управлять локализацией поля в этом режиме можно посредством изменения структуры световода. Для диэлектрических световодов с периодической (фотонно-кристаллической) оболочкой существует оптимальное значение периода структуры, обеспечивающее максимальную локализацию поля в собственной моде световода.

### 3.2. Микроструктурированные световоды

Новые возможности для создания оптоволоконных нейроинтерфейсов и нейроэндоскопов открываются благодаря быстрому развитию технологии микроструктурированных (МС) световодов. Световоды этого типа, известные также как фотонно-кристаллические (ФК) световоды, играют всё более значительную роль в оптической физике и всё шире используются в современных оптических устройствах и лазерных системах [70–79]. Световоды этого класса по структуре, механизмам формирования и свойствам волноводных мод существенно отличаются от обычных оптических волокон. Для передачи излучения в МС-световодах служит сплошная (рис. 7а) или полая (рис. 7б, в) сердцевина, окружённая микроструктурированной оболочкой, содержащей систему ориентированных вдоль оси волокна цилиндрических воздушных отверстий. Подобная микроструктура обычно изготавливается посредством вытяжки из пре-



**Рис. 7.** Фотографии поперечного сечения микроструктурированных световодов различных типов, полученные с помощью электронно-лучевого микроскопа. (а) Микроструктурированное волокно с высоким контрастом показателя преломления сердцевины и эффективным показателем преломления оболочки. (б) Полое фотонно-кристаллическое волокно, работающее за счёт высокой отражательной способности оболочки в области фотонно-запрещённых зон. (в) Полое антирезонансное волокно, работающее за счёт многолучевой интерференции в тонкой стенке в оболочке волновода.



формы, набранной из капиллярных трубок и сплошных кварцевых стержней.

МС-волокна при определённых условиях поддерживают, помимо обычных волноводных режимов, обеспечиваемых явлением полного внутреннего отражения, волноводные моды электромагнитного излучения, формирующиеся благодаря высокой отражательной способности оболочки волокна в области фотонных запрещённых зон [80–84]. Такие режимы волноводного распространения реализуются в волокнах с оболочкой в виде двумерной периодической микроструктуры (двумерного фотонного кристалла) с поллой либо твердотельной сердцевиной. Фотонная запрещённая зона, возникающая в спектре пропускания двумерной периодической оболочки волокон данного типа, обеспечивает высокий коэффициент отражения для излучения, распространяющегося вдоль поллой сердцевины, что позволяет существенно снизить присутствие модам обычных полых волноводов со сплошной оболочкой оптические потери, быстро возрастающие с уменьшением диаметра поллой сердцевины.

Уникальность МС-световодов для оптических технологий и волоконных лазерных систем обусловлена возможностью активного формирования частотного профиля дисперсии собственных мод таких волокон посредством изменения их структуры [85–89]. МС-световоды позволяют реализовать сложные частотные профили дисперсии, которые не могут быть сформированы в стандартных оптических волокнах. Как следствие, в МС-волокнах наблюдаются новые нелинейно-оптические явления и новые режимы спектрально-временного преобразования сверхкоротких лазерных импульсов [82].

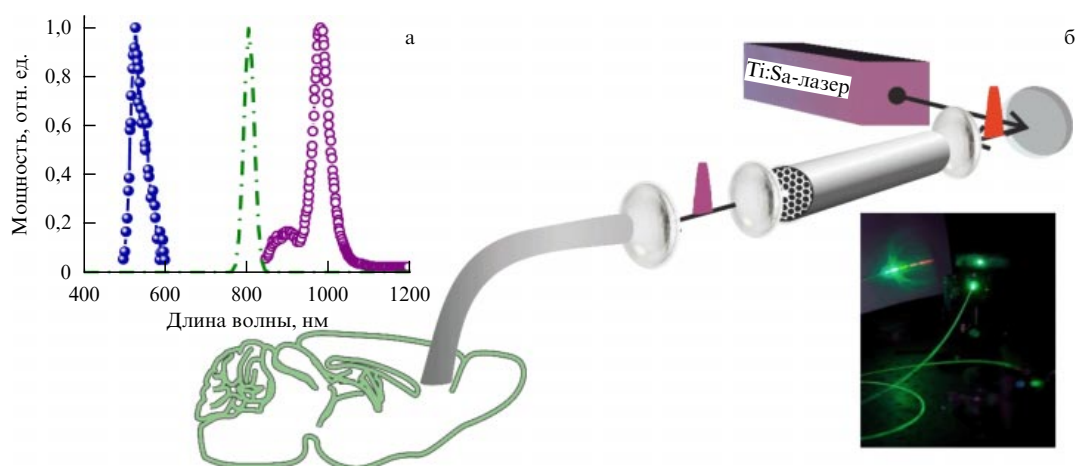
На рисунке 7а изображено поперечное сечение МС-волокна с большой разностью показателя преломления оболочки, обеспечиваемой высоким удельным содержанием воздуха в оболочке. Волокно этого типа позволяет достичь высокой степени локализации электромагнитного поля в сердцевине, что приводит к большим значениям коэффициента нелинейности, определяющего эффективность нелинейно-оптических взаимодействий в

волокне при заданной пиковой мощности лазерного импульса.

Высокоэффективные волоконно-оптические преобразователи частоты сверхкоротких импульсов [82] и источники излучения с широким непрерывным спектром (суперконтинуума) [86, 89], разработанные на основе МС-световодов с высокой оптической нелинейностью, позволяют решать фундаментальные задачи в области оптической метрологии [90, 91] и оптики сверхкоротких лазерных импульсов [82], а также активно применяются в лазерной биомедицине [92], нелинейной спектроскопии [93, 94] и микроскопии [95, 96].

Микроструктурированные волокна успешно используются в качестве перестраиваемых источников лазерного излучения [97, 98], принцип действия которых основан на солитонном самосдвиге частоты. Как показано в работе [66], на основе этого явления могут быть созданы удобные настраиваемые волоконные системы для двухфотонного возбуждения нескольких биомаркеров в задачах нейрофизиологии.

Схема эксперимента [66] представлена на рис. 8. Было показано, что МС-волокно с дисперсией и нелинейностью, сконструированной для генерации стабильных сдвинутых по частоте солитонов, служит универсальным волоконным источником для возбуждения и регистрации отклика двухфотонной флуоресценции от различных красителей. Спектр солитонного импульса может быть подобран оптимальным образом под спектр двухфотонного поглощения практически любого биомаркера. В частности, при накачке излучением Ti:Sa-лазера с центральной длиной волны 800 нм (штрихпунктирная кривая на рис. 8а) волокно, изображённое на рис. 8б, обеспечивало на выходе стабильный солитон с центральной длиной волны 980–990 нм (показанный светлыми кружками на рис. 8а), идеально подходящий для эффективного двухфотонного возбуждения белковых молекул EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) или конъюгированных с красителем Alexa Fluor 488 вторичных антител, которые широко используются в качестве меток в клеточной биологии и флуоресцентной микроскопии. Двухфотонный флуоресцентный отклик,



**Рис. 8.** (а) Флуоресцентный отклик красителя Alexa Fluor 488 (тёмные кружки), возбуждаемого солитонным импульсом, формируемым в МС-световоде (светлые кружки). Спектр лазерного импульса показан штрихпунктирной кривой. (б) Схема эксперимента по двухфотонному волоконно-оптическому зондированию флуоресцентных биомаркеров с помощью перестраиваемых по частоте солитонов, формируемых МС-световодом с высокой нелинейностью [66]. За счёт солитонного сдвига частоты удаётся достичь оптимальной настройки спектра солитонного импульса на выходе световода относительно спектра двухфотонного поглощения используемого биомаркера.

зарегистрированный через волоконный зонд, представлен кружками на рис. 8а [66].

Технология микроструктурированных световодов позволяет существенно расширить функциональность оптоволоконных систем, обеспечивая возможность объединения нескольких световодных компонентов, ответственных за различные функции, в одном оптоволокне [99]. Так, для разработки нового класса оптических сенсоров значительный интерес представляют МС-волокна с двойной оболочкой [100]. В волоконных лазерах на основе МС-волокон с двойной оболочкой внутренняя часть оболочки обеспечивает одномодовый режим волноводного распространения и большую площадь волноводной моды для получения высокоэнергетического лазерного излучения. Внешняя часть оболочки предназначена для эффективного сбора некогерентного флуоресцентного отклика в многомодовом режиме. На основе световодов этого класса удаётся реализовать схемы оптического зондирования, в которых когерентное излучение накачки поступает к объекту по небольшой сердцевине, определяющей размер засвечиваемой области и высокого пространственного разрешения, а внутренняя часть оболочки служит для эффективного сбора некогерентного флуоресцентного сигнала и доставки его в обратном направлении к детектору [101–103].

### 3.3. Полые фотонно-кристаллические световоды

Собственные моды полых световодов отличаются по природе и свойствам от собственных мод обычных волноводов, формируемых за счёт явления полного внутреннего отражения. Ввиду того что показатель преломления сердцевины полых волноводов меньше показателя преломления оболочки, моды, локализуемые в сердцевине полого волновода, являются вытекающими. Для стандартных полых капиллярных световодов с оболочкой большой толщины эти потери возрастают с уменьшением радиуса  $a$  полой сердцевины волокна по закону [104]  $\lambda^2/a^3$ , где  $\lambda$  — длина волны излучения. С учётом этого обстоятельства практически пригодными оказываются лишь капиллярные световоды с большим диаметром сердцевины, передающие лазерное излучение в существенно многомодовом режиме.

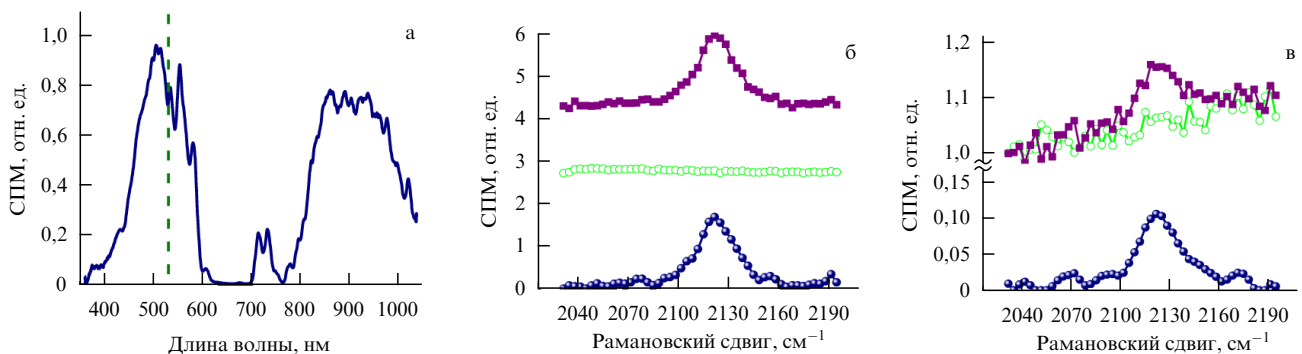
Технология МС-световодов позволяет разрешить противоречие между потерями и качеством модового состава полых волноводов. В самом общем виде методы снижения потерь в полых световодах и улучшения мо-

дового состава их собственных мод основаны на явлении оптического антирезонанса [105] — ослаблении связи между модами, локализуемыми в сердцевине волновода, и модами оболочки. Как показано в работах [106, 107], антирезонансные явления могут оказывать существенное влияние на свойства собственных мод МС-световодов различного типа, что может быть использовано [108] для снижения потерь в полых МС-волноводах (см. также обзор [105]). Антирезонансные режимы волноводного распространения в МС-световодах с полнотелой сердцевинной и заполненными аналитом воздушными отверстиями оболочки, как показано в работе [109], могут быть использованы для создания новых сенсорных устройств.

Применение полых фотонно-кристаллических волноводов открывает новые возможности для нейрофотоники. Распространение излучения накачки по полой сердцевине позволяет не только проводить эффективные оптические исследования помещённого внутрь газа [110], но и избавиться от оптического фона, вызванного спонтанным комбинационным рассеянием излучения в кварцевой сердцевине волновода или люминесценцией примесей в твердотельном волокне. Это приводит к значительному увеличению чувствительности волоконно-оптического зондирования при правильном подборе волновода.

В работе [111] показано, что именно антирезонансные полые волноводы лучше всего подходят для волоконно-оптического зондирования спонтанного комбинационного рассеяния света тканей мозга. Воздушные моды поддерживаются в полой сердцевине данного волокна благодаря антирезонансному отражению от кольцевой структуры в оболочке. Эта кольцевая структура играет роль интерферометра Фабри–Перо с интерференционными резонансными и антирезонансными полосами [108, 112, 113], вызывающими чередование минимумов и максимумов в передаваемом спектре полой структуры сердцевины волокна (фотография полого антирезонансного волокна представлена на рис. 7в).

Антирезонансные волокна имеют достаточно широкую спектральную полосу пропускания, по сравнению с таковой обычных полых фотонно-кристаллических волокон, позволяя тем самым осуществлять накачку и захватывать отстроенный рамановский отклик сердцевины, не требуя наличия дополнительных оболочек и структур для сбора сигнала (спектр пропускания пред-



**Рис. 9.** (а) Спектр пропускания антирезонансного волокна с полой сердцевинной. Длина волны лазера накачки показана штриховой прямой. Спектральная плотность мощности (СПМ) сигналов, собранных с помощью (б) полого волокна с кольцевой оболочкой и (в) стандартного кварцевого волокна: исходный спектр водного раствора EdU (квадраты), фон вследствие комбинационного рассеяния волокна (светлые кружки) и спектры после процедуры вычитания фона (тёмные кружки) [111].

ставлен на рис. 9а). Кроме того, оболочка волокон данного типа может быть весьма компактной (в отличие от оболочки ФК-волокон, структура которых представляет собой двумерный периодический кристалл), что принципиально позволяет на основе такой структуры создавать пучки волокон для визуализации и передачи изображений.

Были проведены эксперименты по сравнению чувствительности волоконно-оптического зондирования с помощью стандартного кварцевого волновода и полого антирезонансного волокна на примере регистрации рамановского отклика характерного маркера пролиферации клеток EdU (5-этинил-2'-дезоксисуридин) [111]. Было показано, что линии комбинационного рассеяния, относящиеся к алкиновой группе и СН-связям EdU, так же как и линия комбинационного рассеяния воды, наблюдались в исходных спектрах сигнала, собранного с помощью волокон обоих типов, однако различие в свойствах фона, собранного волоконными зондами разных типов, оказалось поразительным, как видно из рис. 9б, в.

Указанное различие свойств фона обусловлено различием в физической природе фона, собранного волокнами разного типа. В самом деле, сигнал комбинационного рассеяния алкиновой группы EdU, собранный стандартным волокном с кварцевой сердцевиной, наблюдается на сильном фоне, который существенно искажает спектр сигнала (квадраты на рис. 9в). Данный фон включает в себя две основные части: интенсивный сигнал комбинационного рассеяния внутри волоконного зонда и гораздо менее интенсивную компоненту, обусловленную флуоресценцией раствора EdU. Для вычитания фона, обусловленного комбинационным рассеянием кварцевой сердцевины волокна, спектр этой части фона измерялся в отдельном эксперименте (светлые кружки на рис. 9в), в котором 532-нанометровая лазерная накачка соответствующей мощности пропускалась через волоконный зонд без образца. В волоконном зонде, основанном на явлении антирезонансного ограничения света в полой сердцевине волокна, наблюдается другая картина. Сравнение полного уровня фона в исходных спектрах комбинационного рассеяния, измеренных с помощью антирезонансного полого волоконного зонда (квадраты на рис. 9б), с фоновым сигналом комбинационного рассеяния волокна (светлые кружки на рис. 9б) показывает, что в фоне доминирует широкополосная флуоресценция раствора EdU. Как следствие, сигнал, собранный антирезонансным полым волоконным зондом, наблюдается на гораздо меньшем и более ровном фоне.

Таким образом, антирезонансные волокна с полой сердцевиной позволяют проводить высокочувствительную волоконно-оптическую регистрацию пролиферации клеток с помощью спонтанного комбинационного рассеяния. Волокна данного типа более чем на порядок уменьшают уровень фона по сравнению с таковым в случае стандартных оптических световодов с кварцевой сердцевиной, значительно улучшая тем самым чувствительность рамановского зондирования синтеза ДНК в клетках, и, таким образом, представляют собой мощный инструмент для волоконно-оптической визуализации живых клеток [111].

Световоды из полых ФК-волокон благодаря сильной зависимости их пропускания от длины волны излучения могут быть использованы в качестве спектрального фильтра, работающего в волоконном формате. В рабо-

те [114] показаны преимущества использования полых ФК-волокон как эффективных спектральных фильтров в задачах полностью волоконного зондирования нескольких биомаркеров. Схема эксперимента представлена на рис. 10а. Для получения когерентного широкополосного излучения накачки (рис. 10б) использовалось МС-волокно с высокой нелинейностью, структура которого показана на вставке рис. 10б, с диаметром сердцевины 2 мкм и нулевой дисперсией групповых скоростей в области длины волны 770 нм. Спектральным волоконным фильтром служило полое ФК-волокно, поперечный срез которого показан на вставке рис. 10в. Структура полого ФК-волокон реализована так, чтобы поддерживать распространение только той части суперконтинуума, которая может эффективно возбуждать флуоресценцию биомаркеров в мозге мыши (рис. 10в). Показано, что такая система позволяет одновременно осуществлять эффективное волоконно-оптическое зондирование нескольких биомаркеров в мозге мыши. Зарегистрированные таким образом спектры флуоресцентных маркеров EGFP и Alexa Fluor 594 представлены на рис. 10г.

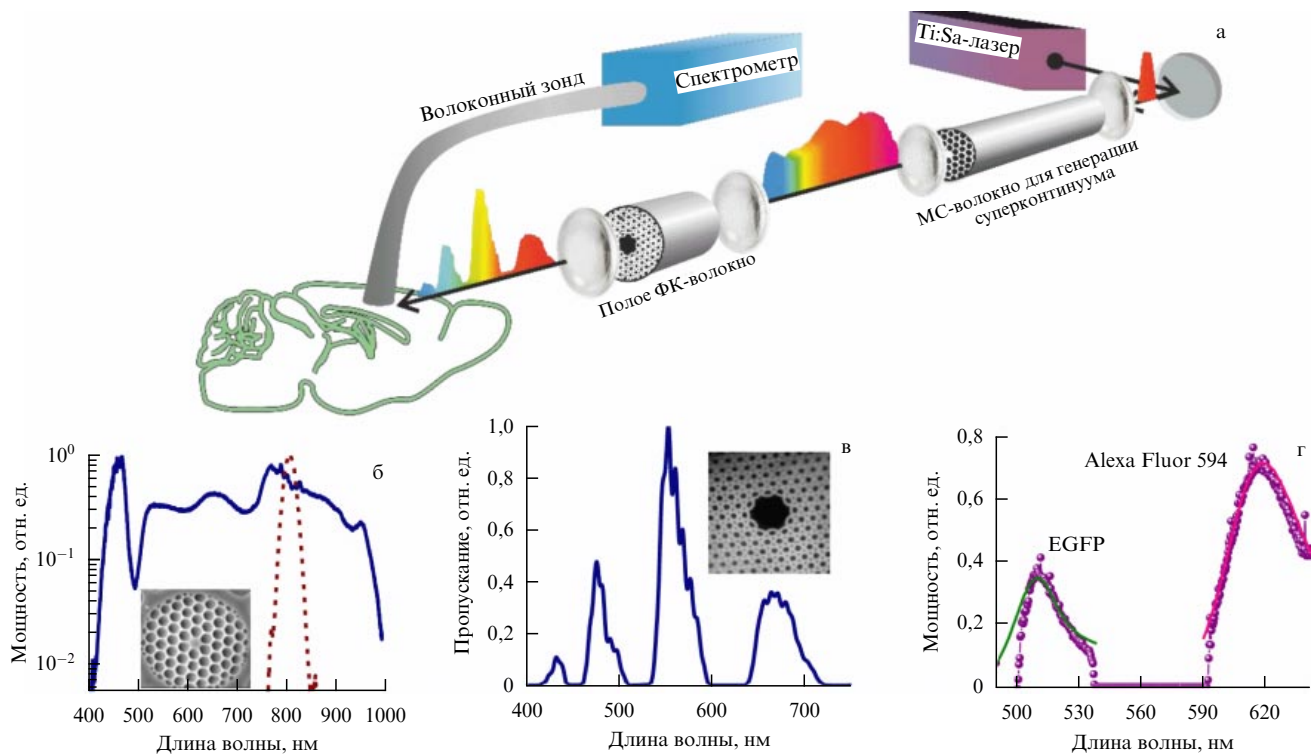
Полые ФК-световоды позволяют решить ряд важных проблем, возникающих при волоконной доставке сверхкоротких лазерных импульсов для исследования мозга и управления мозгом.

Во-первых, благодаря низкой нелинейности газа, заполняющего сердцевину полого световода, удаётся свети к минимуму нежелательные нелинейно-оптические эффекты.

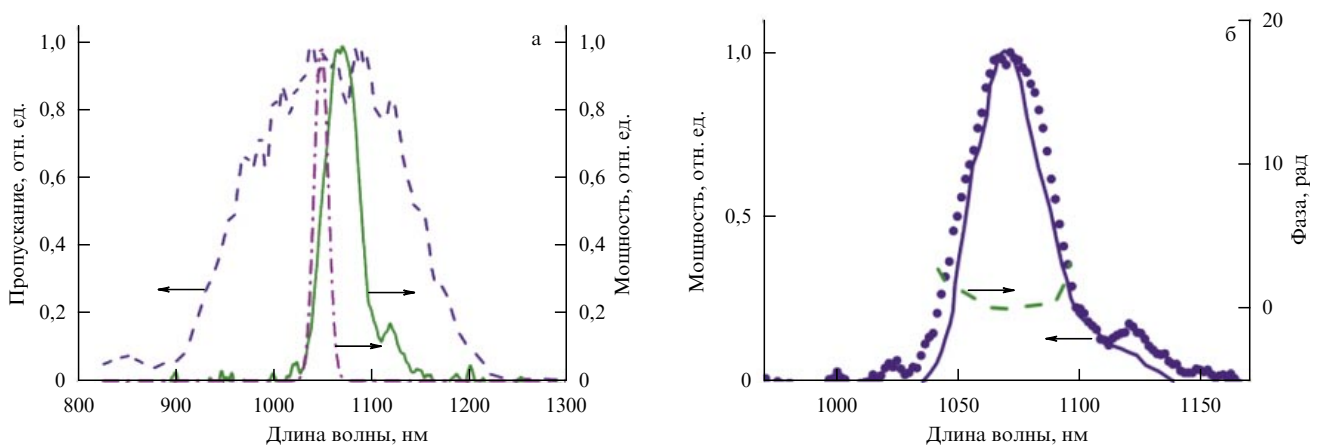
Во-вторых, низкая дисперсия, характерная для полых ФК-волокон вдали от границ полосы пропускания, позволяет уменьшить дисперсионное расплывание сверхкоротких световых импульсов.

В-третьих, порог пробоя газа, содержащегося в полой сердцевине волновода, на несколько порядков ниже порога пробоя световодов с твердотельной сердцевиной, что даёт возможность увеличить интенсивность лазерных импульсов, позволяя тем самым осуществлять микроскопию более глубоких слоёв мозга.

Экспериментальные исследования указывают на существование привлекательных для биомедицинских приложений режимов доставки, реализуемых с помощью полых ФК-волокон, высокоэнергетичных наносекундных [115], пикосекундных [116] и фемтосекундных [116] лазерных импульсов. Однако для большинства биомедицинских приложений интересен фемтосекундный диапазон длительностей импульсов, так как в этом случае имеется возможность уменьшить тепловыделение и наработку реактивных кислородных центров, которые могут приводить к гибели клеток [117]. Сильная дисперсия в полых ФК-волноводах в центре фотонной запрещённой зоны, соответствующей максимуму пропускания, вызывает удлинение сверхкоротких лазерных импульсов, ограничивая возможности использования излучения фемтосекундной длительности в широком круге биомедицинских приложений, основанных на нелинейной оптике. В работе [118] показано, что данная проблема может быть решена посредством правильной предварительной компенсации дисперсии. В экспериментах [118] полое ФК-волокно с диаметром сердцевины 15 мкм позволило осуществить эффективное временное сжатие мощных фемтосекундных лазерных импульсов (рис. 11) до длительности около 110 фс при пиковой мощности примерно 5 МВт.



**Рис. 10.** Схема волоконно-оптической системы для возбуждения и сбора флуоресцентного отклика различных маркеров в мозге мышей (а) на основе сильнонелинейного МС-волокна для генерации широкополосного излучения (суперконтинуум) (б) и полого ФК-волокна для спектральной фильтрации (в); спектры (г) флуоресцентных маркеров EGFP и Alexa Fluor 594, зарегистрированные с помощью разработанной системы [114].



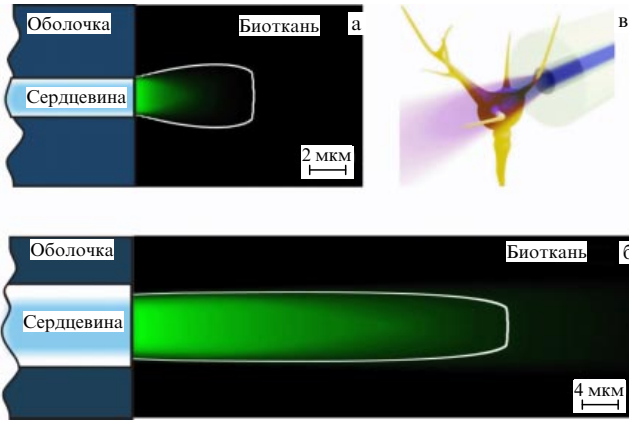
**Рис. 11.** (а) Спектр пропускания полого ФК-волокна (штриховая кривая), спектр импульса иттербиевого лазера (штрихпунктирная кривая), спектр импульса из оптического параметрического усилителя (сплошная кривая). (б) Характерные лазерные импульсы на выходе полого ФК-волокна: измеренный спектр (кружки), спектр, восстановленный из карт XFROG (X-windows based Finite Recursive Object Generator) (сплошная кривая), и спектральная фаза (штриховая кривая) [118].

#### 4. Физические принципы световодной нейроэндоскопии

Для правильной интерпретации данных, полученных с помощью волоконно-оптических зондовых систем, требуется ясное представление об особенностях возбуждения и сбора флуоресцентного отклика волоконным зондом. Схема волоконно-оптического зондирования биологических тканей и геометрия возбуждения и сбора флуоресцентного отклика показаны на рис. 12. При регистрации флуоресцентного отклика в формате эндоскопии пространственное разрешение метода определяется параметрами световодного зонда и оптическими

свойствами исследуемой среды. В этом случае область эффективного волоконно-оптического зондирования прилегает к выходному торцу волокна, а её объём определяется, с одной стороны, объёмом эффективной засветки биоткани, с другой стороны — объёмом эффективного сбора некогерентного флуоресцентного отклика, которые в общем случае не равны между собой.

Расчёты всех параметров волоконно-оптического зондирования, таких как чувствительность метода и геометрические размеры области эффективного сбора сигнала, могут быть проведены с помощью методов численного моделирования на основе следующей модели. Волоконный зонд с числовой апертурой  $NA = (n_{\text{core}}^2 - n_{\text{clad}}^2)^{1/2}$ , где



**Рис. 12.** Волоконно-оптическое зондирование биологических тканей. Карты функции  $\psi(r, z)$ , рассчитанные для ткани мозга с параметрами  $n_0 = 1,36$ ,  $\mu_s \approx 11,3 \text{ мм}^{-1}$ , зондируемой волоконными зондами при (а)  $a_{\text{core}} = 1 \text{ мкм}$ ,  $\text{NA} = 0,38$  и (б)  $a_{\text{core}} = 4,5 \text{ мкм}$ ,  $\text{NA} = 0,2$ . Область, выделенная контуром, обеспечивает сбор волоконным зондом 80 % флуоресцентного сигнала. (в) Схема волоконно-оптического зондирования отдельных нервных клеток с помощью волокон с малым размером сердцевин и высокой числовой апертурой.

$n_{\text{core}}$  и  $n_{\text{clad}}$  — показатели преломления сердцевин и оболочки волокна соответственно, доставляет излучение накачки до флуоресцентно окрашенной ткани и собирает флуоресцентный отклик в пределах угла сбора, определяемого числовой апертурой волокна,  $\theta_0 = \arcsin(\text{NA}/n_0)$ , где  $n_0$  — показатель преломления ткани. Полная мощность флуоресцентного сигнала, собранного волоконным зондом в такой схеме, выражается как

$$P \propto \sigma \eta N I_0 \int_0^\infty dz \int_0^\infty \phi(r, z) f(r, z) T^2(r, z) r dr, \quad (10)$$

где  $\sigma$  — сечение поглощения,  $\eta$  — квантовый выход флуоресценции,  $N$  — плотность центров флуоресценции, которая предполагается постоянной для исследуемого объема,  $r$  — поперечная координата, отсчитываемая от оси волокна,  $z$  — продольная координата, измеряемая от выходного торца волоконного зонда,  $I_0$  — интенсивность излучения накачки в центре пучка на выходном торце волоконного зонда, т.е. при  $r = 0$ ,  $z = 0$ . Функция  $\phi(r, z)$ , определяющая эффективность сбора флуоресцентного сигнала волоконным зондом в данной точке пространства, зависит от числовой апертуры волокна  $\text{NA}$  и полного телесного угла  $\theta(r, z)$ , стягиваемого сердцевинной волокна, следующим образом:

$$\phi(r, z) = 2\pi \int_0^{\theta(r, z)} \sin \xi d\xi.$$

Функция  $f(r, z)$  учитывает пространственное распределение интенсивности накачки на выходе из волокна, а функция  $T(r, z)$  определяет затухание вследствие рассеяния и поглощения. Хорошо известно, что в тканях мозга в видимом и ближнем инфракрасном спектральных диапазонах длина поглощения  $l_a$  на порядок больше длины рассеяния  $l_s$  [119], что позволяет с высокой точностью при расчётах учитывать только эффекты, связанные с рассеянием.

Функция  $\psi(r, z) = \phi(r, z) f(r, z) T^2(r, z)$ , входящая в подынтегральное выражение уравнения (10), определяет вклад от физически малого объема с центром  $r$  и  $z$  внутри

исследуемой области в полный флуоресцентный сигнал, собранный волоконным зондом. Затухание излучения вследствие рассеяния в биологической ткани может быть рассчитано многими способами. Для таких расчётов подходит, в частности, достаточно простая модель диффузного рассеяния Кубелки–Мунка [120], согласно которой  $T = T_{\text{KM}} = (\mu_s z + 1)^{-1}$ , где  $\mu_s = l_s^{-1}$  — коэффициент рассеяния,  $l_s$  — длина рассеяния. Для многомодового волокна функция  $f(r, z)$ , характеризующая пространственное распределение интенсивности излучения накачки на выходе волоконного зонда, может быть представлена в виде

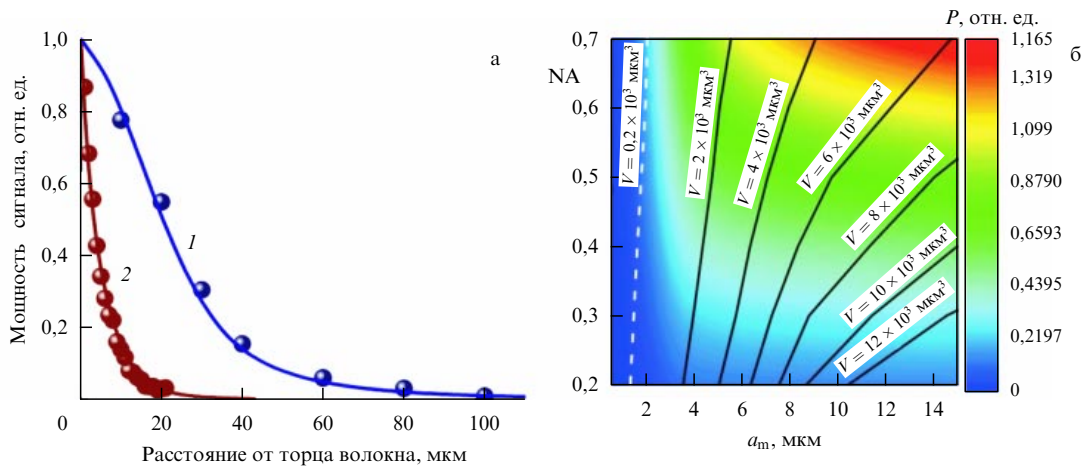
$$f(r, z) = a_m^2 (z \tan \theta_d + a_m)^{-2},$$

где  $a_m$  — эффективный радиус моды,  $\theta_d$  — угол расхождения. Для одномодового режима распространения пространственный профиль интенсивности излучения на выходе волокна может считаться гауссовым. Полагая, что функция  $f(r, z)$  выражается в виде  $f(r, z) = a_m^2 (z \tan \theta_d + a_m)^{-2}$ , и используя серию степенных разложений  $f(r, z) \approx 1 - 2(z/a_m) \tan \theta_d$ ,  $T_{\text{KM}} \approx 1 - \mu_s z$ , справедливых при малых  $z$ , можно определить характерную длину расхождения накачки для многомодового зонда как  $l_d \approx a_m / (2 \tan \theta_d)$ .

Таким образом, видно, что волокна с меньшими сердцевинами и большими числовыми апертурами усиливают расхождение зондирующего излучения, уменьшая тем самым объём волоконно-оптического зондирования. Одна из двух физически различных ситуаций может реализоваться в зависимости от преобладания дифракционных эффектов или преобладания рассеяния. В режиме, в котором  $l_d > l_s$ , продольный размер зондируемой области  $L$  определяется рассеянием, тогда как в случае  $l_d < l_s$  пространственный размер  $L$  определяется дифракцией излучения на выходе волоконного зонда.

Результаты экспериментов и теоретического моделирования показывают, что размеры области эффективного сбора флуоресцентного отклика волокном с плоским выходным торцом определяются главным образом диаметром сердцевин и числовой апертурой волокна, а также оптическими свойствами исследуемой биоткани [121, 122]. На рисунке 13а проведено сравнение результатов теоретического расчёта с экспериментальными данными для двух световодов различного типа: стандартного телекоммуникационного волокна с радиусом сердцевин 4,5 мкм (кривая 1) и МС-волокна с радиусом сердцевин 1 мкм (кривая 2). Кружками представлены результаты экспериментальных измерений мощности собранного флуоресцентного отклика в зависимости от расстояния флуоресцентной частицы диаметром 6,5 мкм, моделирующей нервную клетку, до торца волокна. Сбор сигнала осуществлялся тем же волокном, по которому доставлялось излучение накачки. Кривыми представлены зависимости для каждого волокна, рассчитанные с помощью формулы (10). Видно прекрасное согласие экспериментальных данных с результатами модели.

Объём оптического зондирования тканей мозга с характерными параметрами (показателем преломления  $n_0 = 1,36$  и коэффициентом рассеяния  $\mu_s \approx 11,3 \text{ мм}^{-1}$ ) волокном с диаметром сердцевин 50 мкм и  $\text{NA} = 0,2$  составляет около  $10^5 \text{ мкм}^3$ , а увеличение диаметра сердцевин до 100 мкм приводит к последовательному возрастанию области зондирования до тех пор, пока дифракционная длина  $l_d$  не сравняется с длиной рассеяния  $l_s$ . Дальнейшее увеличение сердцевин волокна уже не будет приводить к заметному возрастанию области



**Рис. 13.** (а) Мощность собранного волоконным зондом флуоресцентного сигнала от люминесцентной частицы диаметром 6 мкм как функция расстояния  $z$  от торца стандартного волокна (кривая 1) и МС-волокна (кривая 2). Кружками представлены экспериментальные данные, кривые — результаты расчётов на основе описанной в тексте модели. (б) Мощность  $P$  собранного волоконным зондом флуоресцентного сигнала от однородной флуоресцентной среды с показателем преломления  $n_0 = 1,36$  как функция эффективного радиуса моды  $a_m$  и числовой апертуры  $NA$  при постоянной интенсивности поступающего по волокну излучения и  $a_0 \approx a_m$ ,  $\theta_d \approx \theta_0$  [121]. Показаны изолинии постоянного объёма  $V$  оптического зондирования. Объём тела нейрона отмечен штриховой линией.

зондирования, так как основной вклад начнут вносить параметры исследуемой среды, а не волокна. Таким образом, волокна с диаметром сердцевины 50–100 мкм и более позволяют получать и интегрировать сигнал из отдельных целых структур мозга.

При использовании стандартных одномодовых волокон объём области оптического зондирования тканей мозга мыши составит около  $10^3$  мкм<sup>3</sup>, что позволяет исследовать лишь небольшое число нервных клеток. Результаты теоретического моделирования в этом случае для однородно флуоресцентной среды и волокна диаметром 9 мкм представлены на рис. 12б. Зелёным цветом показана область эффективного сбора сигнала волоконным зондом в случае возбуждения с помощью того же волокна, а белой линией выделена область, из которой собирается 80 % флуоресцентного отклика. Волокна этого типа обеспечивают возможность оптического зондирования отдельных клеток с типичным размером 7 мкм (например, нейронов) в случае, когда их плотность находится на уровне  $\rho \approx 2 \times 10^5$  клеток на 1 мм<sup>3</sup> (как, например, в соматосенсорной зоне коры головного мозга мышей [123]). В самом деле, зондируемый объём для волоконных зондов данного типа составляет  $V \approx 10^3$  мкм<sup>3</sup>, так что в среднем в нём содержится менее одного нейрона в нервной ткани этого типа,  $V < 1/\rho$ .

Микроструктурированные волокна с малым диаметром сердцевины (2 мкм и меньше) и высокой числовой апертурой ( $NA > 0,35$ ) позволяют зондировать область объёмом менее 100 мкм<sup>3</sup>, что обеспечивает возможность волоконно-оптической регистрации сигнала от отдельных нервных клеток (объём нейрона в среднем составляет около 200 мкм<sup>3</sup>).

Использование методов нелинейно-оптической микроскопии в волоконном формате позволяет также значительно повысить локальность зондирования [124]. Двухфотонная люминесценция совместно с правильно подобранным зондом увеличивают локальность зондирования более чем в два раза по сравнению с таковой в однофотонном случае.

Оптимальные параметры волоконного зонда определяются посредством достижения компромисса между локальностью оптического возбуждения и мощностью

собранного флуоресцентного отклика, что в конечном счёте и определяет чувствительность волоконно-оптического зондирования. Это проиллюстрировано на рис. 13б, где изолинии объёма зондирования  $V$  нанесены на карту мощности собираемого флуоресцентного сигнала в координатах  $a_m$ – $NA$ . Штриховой линией обозначена изолиния объёма, соответствующего одному нейрону среднего размера. Когда требуется определённый уровень локальности, означающий необходимость оставаться на определённой изолинии  $V$ , более мощный флуоресцентный сигнал и, следовательно, более высокая чувствительность оптического зондирования могут быть достигнуты с помощью использования волоконных зондов с большим размером сердцевины и большей  $NA$ . В этом случае ключевые преимущества МС-волокон для оптического зондирования нейронов проявляются особенно ярко, благодаря тому что данные волокна позволяют максимально эффективно сочетать малый диаметр сердцевины и высокую числовую апертуру. В частности, МС-волокна с небольшим диаметром сердцевины ( $a_{core} \approx a_m \approx 1$  мкм,  $NA \approx 0,4$ ) ограничивают объём области оптического зондирования величиной менее чем 50 мкм<sup>3</sup>. Такие оптические зонды могут обеспечить доступ к отдельным нейронам в областях мозга с высокой плотностью нервных клеток, а также позволяют осуществить субклеточную визуализацию.

Результаты расчёта показывают, что для сбора люминесцентного отклика от отдельной нервной клетки с типичным диаметром порядка 7 мкм, находящейся в биоткани с характерными параметрами  $n_0 = 1,36$ ,  $\mu_s = 11,3$  мм<sup>-1</sup>, оптимальным является волокно с параметрами:  $NA = 0,7$ ,  $a_0 = 2,5$  мкм ( $a_m = 2$  мкм). При этом мощность собранного люминесцентного отклика от исследуемой клетки, прилегающей к торцу волокна, увеличится более чем на порядок по сравнению с таковой в случае предельно высокого пространственного разрешения.

Основным способом получения изображений в формате волоконно-оптической эндоскопии является использование пучков волокон, расположенных близко друг к другу. При этом каждое волокно в пучке обеспечивает эффективный сбор сигнала из своей области, который при построении итогового изображения будет

представлен одним пикселем на общей картине. Пространственное разрешение при получении такого изображения определяется параметрами отдельных волокон в пучке, как описано выше, а также расстоянием между ними. Таким образом, область сбора отдельного волокна в пучке определяет физический размер пикселя, а расстояние между волокнами — расстояние между пикселями. Как показывают представленные выше результаты моделирования, оптимальным для достижения компромисса между чувствительностью и локальностью при исследовании тканей мозга мышей является волокно с диаметром сердцевины около 2,5 мкм. Пучок из таких волокон позволит осуществить визуализацию нейронной активности мозга мышей с клеточным разрешением и максимальной чувствительностью.

## 5. Минимикроскопы для исследования мозга бодрствующих животных

Значительных успехов в изучении мозга живых животных удалось добиться благодаря закреплению сверхминиатюрных портативных микроскопов непосредственно на голове свободноподвижного животного. Ключевыми элементами такого нелинейно-оптического микроскопа являются одномодовое оптоволокно, доставляющее фемтосекундные импульсы излучения накачки к исследуемой области мозга, миниатюрный сканер, оптические элементы для передачи изображения, объектив, дихроичные зеркала и фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Для компенсации дисперсии одномодового оптоволокна используются дисперсионные решётки. Первые разработанные минимикроскопы обеспечивали при исследовании мозга анестезированных крыс субклеточное пространственное разрешение на глубине до 250 мкм [125].

Авторами работы [126] показана возможность изготовления миниатюрного микроскопа на основе фотонно-кристаллического волокна с полый сердцевиной. Такой подход обеспечивает эффективную доставку фемтосекундных импульсов накачки и не требует предварительной компенсации дисперсии. Минимикроскоп благодаря своему малому весу (всего 3,9 г) позволяет проводить исследования на анестезированных мышах. В последующих работах была продемонстрирована схема двухфотонного миниатюрного микроскопа на основе пучка волокон и градиентной линзы на выходном торце [127], а также предложена идея использования фотонно-кристаллического волокна с двойной оболочкой для эффективной доставки лазерного излучения и сбора сигнала [101].

Новое поколение миниатюрных волоконных двухфотонных микроскопов обеспечивает как возможность проводить исследования на бодрствующих животных, так и высокое пространственное разрешение [128]. Это впервые позволило реализовать микроскопию мозга свободноподвижных животных с субклеточным пространственным разрешением на глубине до 250 мкм. Вес микроскопа, предназначенного для исследований такого вида, может быть уменьшен до 2,9 г [129, 130].

В последние годы разрабатываются лёгкие (весом около 1–2 г) миниатюрные однофотонные флуоресцентные микроскопы. Продемонстрирован миниатюрный модуль для однофотонной микроскопии весом 1,1 г, обеспечивающий высокую скорость съёмки [65]. Благодаря использованию сверхкомпактных фотодиодов и камеры удалось создать компактные безволоконные минимикроскопы с пространственным разрешением на уровне 2,5 мкм [131].

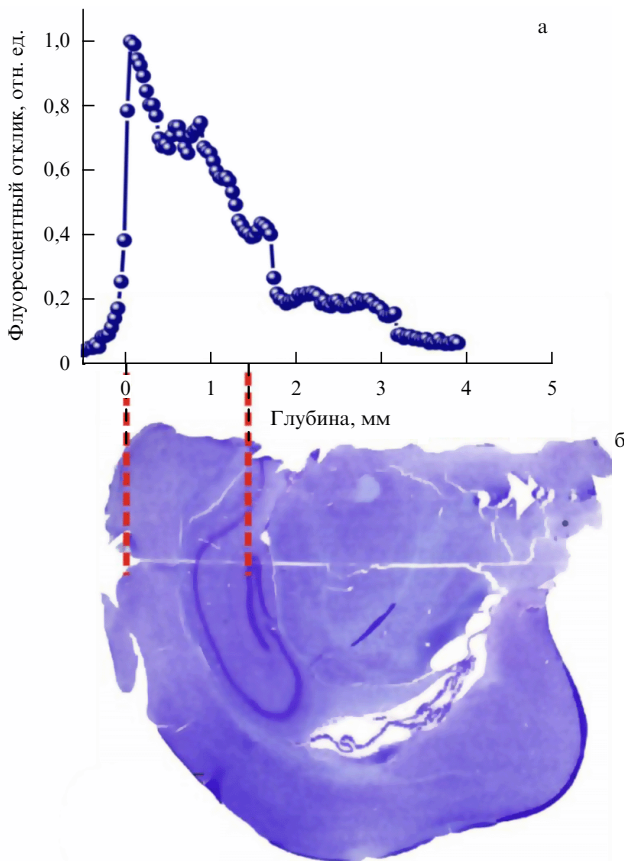
Крепящийся на голове животного минимикроскоп позволил выполнить ряд важных экспериментов по изучению мозга, включая исследование динамических изменений нейронных сетей, состоящих из "клеток места" [132]. Исследование связей нейронной активности с паттернами поведения требует проведения экспериментов на одном животном в течение длительного времени, для чего был разработан специальный метод живления градиентных линз [133]. В настоящее время значительные усилия направлены на разработку миниатюрных микроскопов для клинических приложений [134–138].

## 6. Оптоволоконные нейроинтерфейсы

Одна из главных трудностей оптической микроскопии мозга связана с малой глубиной проникновения лазерного излучения из-за его сильного рассеяния в тканях мозга. Для стандартных параметров лазерного излучения, используемого в микроскопии мозга (средняя мощность 1 Вт, частота 80 МГц, длительность импульса 100 фс), глубина, на которой удаётся осуществить исследование коры головного мозга методами микроскопии, составляет около 500–700 мкм. При этом на предельных глубинах, как правило, удаётся получить лишь изображения системы капилляров (на глубине до 600 мкм [139]) или глиальных клеток (на глубине до 700 мкм [140]), а не нейронов.

Предложено несколько путей увеличения глубины оптической микроскопии мозга живых животных. Использование регенеративного усилителя позволяет реализовать двухфотонную микроскопию тканей мозга на глубине до 1000 мкм [141, 142]. Дальнейшее увеличение пиковой мощности накачки нежелательно, так как при этом возникает риск фотоповреждения биотканей [117]. Альтернативный подход основан на повышении длины рассеяния за счёт увеличения длины волны лазерного излучения накачки. Показано, что применение для накачки лазера на кристалле Cr:Forsterite с длиной волны 1280 нм даёт возможность провести двухфотонную микроскопию мозга на глубине более 1000 мкм [143]. Использование мощного перестраиваемого источника на основе фотонно-кристаллического световодного стержня позволило осуществить трёхфотонную флуоресцентную микроскопию с накачкой на длине волны 1700 нм, обеспечивающей оптимальный компромисс между уменьшающимся рассеянием лазерного излучения и увеличивающимся поглощением его тканями мозга [8]. Однако такой подход не позволяет визуализировать нейроны на глубине более 1,2 мм и жёстко фиксирует длину волны возбуждающего излучения, тем самым резко ограничивая набор возможных для применения в этом случае флуоресцентных маркеров.

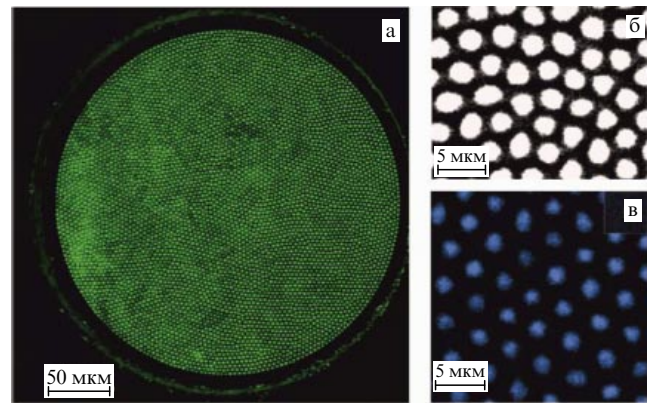
Трудности оптических методов, связанные с сильным рассеянием лазерного излучения тканями мозга, могут быть преодолены благодаря использованию световодных систем доставки возбуждающего излучения и сбора сигнала. На рисунке 14а представлены результаты измерения с помощью оптоволоконного зонда флуоресцентного отклика зелёного флуоресцентного белка EGFP в мозге живой трансгенной мыши линии zif-EGFP [144]. Сканирование с помощью волоконного зонда с диаметром сердцевины 9 мкм и внешним диаметром 125 мкм проводилось с шагом 40 мкм. Обеспечиваемое методом пространственное разрешение вдоль направления сканирования оказывается достаточным для визуализации различных паттернов активности в разных структурах



**Рис. 14.** (а) Измеренная интенсивность флуоресцентного отклика зелёного флуоресцентного белка EGFP в зависимости от глубины в мозге живой трансгенной мыши линии *zif-EGFP*. (б) Карта мозга мыши, исследованного в эксперименте, полученная с помощью методики морфоконтроля по Ниссли *in vitro*. Возбуждение и сбор флуоресцентного отклика проводились с помощью одного и того же волокна.

мозга. Важно отметить, что однократное введение волоконного зонда диаметром 125 мкм в ткани живого мозга вносит настолько малые повреждения в структуру ткани, что след от волокна остаётся практически незаметным на окрашенных по Ниссли срезах мозга. Заметный след от волоконного зонда (рис. 14б) остаётся лишь после повторения процедуры сканирования более 10 раз.

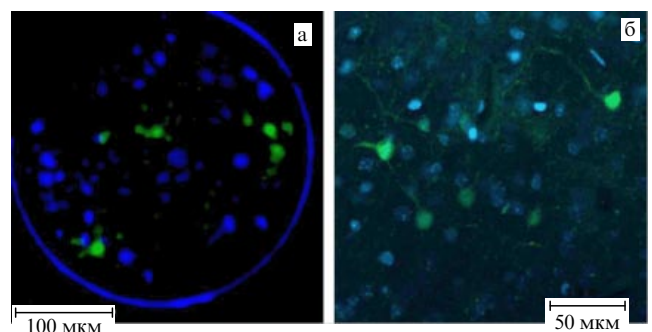
Важные сведения о работе глуболежащих структур мозга удаётся получить с помощью пучков оптических волокон (рис. 15). Использование этой технологии позволяет осуществить регистрацию кальциевой активности нейронов в зубчатой фасции гиппокампа (на глубине 3,4 мм от поверхности коры) и ядер таламуса (на глубине 5,6 мм от поверхности коры), помеченных красителем Oregon green ВАРТА-1 [145]. Выполнены эксперименты по наблюдению *in vivo* за экспрессией генов [146] и миграцией нейробластов в переднем мозге [147]. Благодаря возможности удалённого детектирования продемонстрирована одновременная визуализация трёх различных красителей в подкорковых структурах мозга живой мыши [148]. Размер волокон в используемом пучке и расстояние между ними позволяют изучать глубокие ткани мозга живого животного с высоким пространственным разрешением, сравнимым с разрешением, характерным для методов *in vitro* стандартной конфокальной микроскопии.



**Рис. 15.** Фотографии торца многожильного световодного зонда, используемого для получения изображений отдельных участков и структур мозга в формате эндоскопии: (а) панорамный снимок, (б, в) увеличенные изображения. Диаметр отдельной световодной жилы на рис. б  $\approx 2,4$  мкм. Диаметр моды излучения с длиной волны 473 нм на рис. в  $\approx 1,4$  мкм.

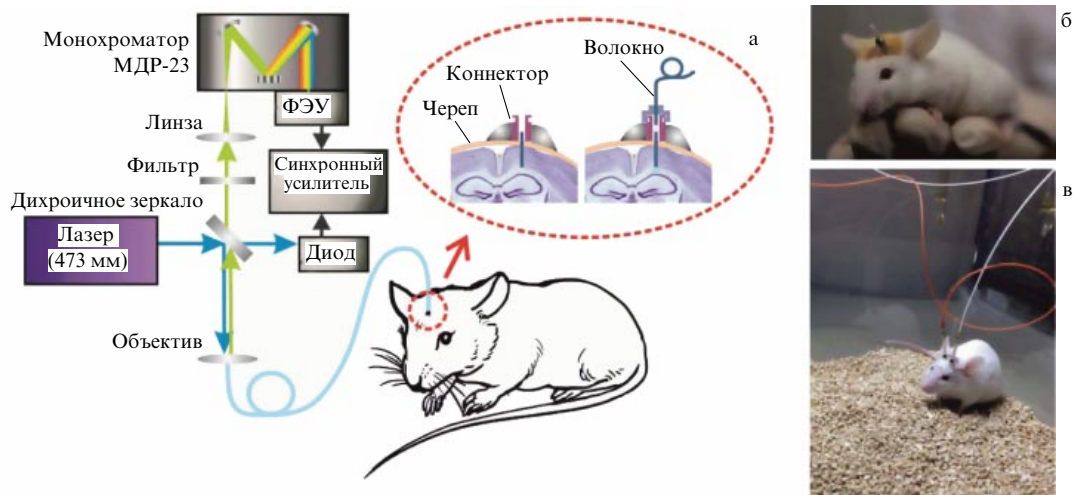
На рисунке 16 представлены результаты экспериментального исследования [148] нейронов зубчатой фасции гиппокампа трансгенных мышей линии *Thy1-EGFP*, дополнительно окрашенной маркером DAPI dilactate. С помощью красителя DAPI dilactate удаётся получить изображение ядер клеток (синий цвет на рис. 16). Сигнал зелёного цвета дают клетки, нарабатывающие *Thy1-EGFP* [148].

Волоконные эндоскопы успешно применяются для регистрации нейронной активности в глубоких слоях мозга свободноподвижных мышей [144, 149, 150]. Лёгкость и компактность зондов позволяют проводить эксперименты в течение нескольких дней [149]. Однако проведение долговременных исследований в таком режиме затруднительно, так как вживлённое оптоволокно, которое легко может быть повреждено грызуном, требует постоянного повышенного внимания. Таким образом, при долговременных измерениях возникает существенная необходимость содержать мышей в особых условиях, кроме того, наличие длинного оптоволокна на голове может мешать животному и нарушать естественные формы его поведения.



**Рис. 16.** (В цвете онлайн.) Двухцветное изображение области зубчатой фасции гиппокампа трансгенных мышей линии *Thy1-EGFP*, дополнительно окрашенной маркером DAPI dilactate: (а) изображение, полученное *in vivo* с помощью многожильного оптоволоконного зонда, состоящего из нескольких тысяч световодов; (б) изображение, полученное *in vitro* на конфокальном микроскопе Olympus FluoView 10.





**Рис. 17.** (а) Долговременная регистрация нейронной активности в глубоких слоях мозга свободноподвижного животного с помощью составного волоконно-оптического нейроинтерфейса. Фотографии экспериментального животного (б) со вживлённым модулем оптоволоконного нейроинтерфейса, (в) с присоединённой световодной частью оптоволоконного нейроинтерфейса.

С помощью специально оптимизированных оптоволоконных нейроинтерфейсов удаётся осуществить долговременную (на протяжении одного месяца) регистрацию экспрессии гена фактора транскрипции *zif268* в коре и гиппокампе головного мозга свободноподвижных мышей [22, 151]. Разработанный для этих целей оптоволоконный нейроинтерфейс состоит из закрепляемого на голове мыши модуля и присоединяемого на время эксперимента измерительного волокна. Благодаря лёгкости и компактности фиксируемого на голове животного модуля, состоящего из волоконного коннектора и вживляемого в мозг мыши волокна, всё время между измерениями исследуемые мыши живут в стандартных клетках в привычных условиях.

Схема эксперимента по долговременной регистрации нейронной активности в глубоких слоях мозга свободноподвижного животного с помощью разработанного волоконно-оптического нейроинтерфейса представлена на рис. 17а. При необходимости измерение длинный отрезок оптоволоконка присоединяется к коннектору, закреплённому на голове животного. Фотографии экспериментальных животных со вживлёнными коннекторами представлены на рис. 17б, в [22].

Таким образом, на основе использования оптоволоконных нейроинтерфейсов удаётся решить одну из наиболее трудных задач оптического исследования мозга — одновременную регистрацию нейронной активности и изучение функционального состояния сразу нескольких пространственно разделённых областей головного мозга свободноподвижного животного [22].

## 7. Физические принципы световодной нейроэндоскопии

### 7.1. Генерация оптических гармоник

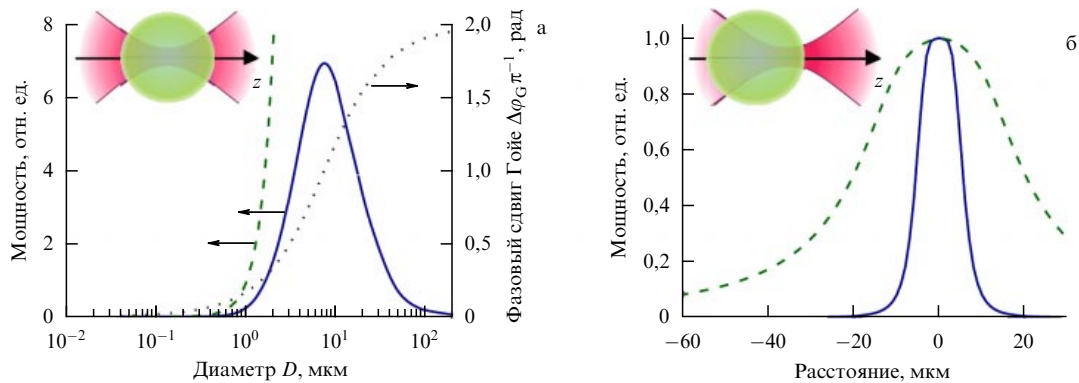
Методы нелинейно-оптической микроскопии, основанные на генерации второй и третьей оптических гармоник, позволяют проводить исследования биотканей без применения флуоресцентных маркеров [9, 152]. Эффективность генерации третьей гармоники определяется нелинейно-оптической восприимчивостью третьего порядка материала среды  $\chi^{(3)}$  и фазовой расстройкой между фазой поля на частоте оптической гармоники  $\varphi_n$

и фазой нелинейной поляризации  $\varphi_p$ , наведённой в среде. Фазовая расстройка  $\Delta\varphi = \varphi_n - \varphi_p$  состоит из двух частей [153]:  $\Delta\varphi = \Delta\varphi_m + \Delta\varphi_g$ , где  $\Delta\varphi_m = \Delta kz$  — фазовая расстройка, обусловленная дисперсией среды,  $\Delta k = 6\pi\Delta n/\lambda_p$ ,  $\lambda_p$  — длина волны накачки,  $\Delta n$  — разность показателей преломления среды на частотах накачки и третьей гармоники,  $z$  — координата вдоль направления распространения пучка,  $\Delta\varphi_g = 4 \arctan(z/b)$ ,  $b = 2\pi n w_0^2/\lambda_p$  — конфокальный параметр,  $n$  — показатель преломления,  $w_0$  — радиус сфокусированного пучка.

Эффекты фазового согласования оказывают сильное влияние на эффективность генерации третьей оптической гармоники. Хорошо известным результатом теории нелинейно-оптических взаимодействий является запрет на ГТГ в режиме жёсткой фокусировки в оптически однородной протяжённой среде. Однако при наличии оптической неоднородности вблизи фокуса жёстко сфокусированного пучка (см. вставку на рис. 18а) условия подавления ГТГ не выполняются, благодаря чему методом микроскопии ГТГ удаётся регистрировать скрытые границы раздела, оптические неоднородности и полости [9, 152]. Сигнал достигает максимальной интенсивности, когда размер оптической неоднородности близок конфокальному параметру пучка накачки  $b = 2\pi n w_0^2/\lambda_p$  (рис. 18). Благодаря этому эффекту появляется возможность реализации методики трёхмерной визуализации [154].

На рисунке 18 представлена зависимость эффективности генерации третьей гармоники от диаметра  $D$  сферической неоднородности в среде с нелинейностью третьего порядка для пучка с конфокальным параметром  $b = 7,48$  мкм. Как видно из рисунка, сигнал третьей гармоники возрастает при увеличении  $D$  до тех пор, пока  $D$  не сравняется с конфокальным параметром  $b$ , а затем уменьшается при  $D > b$ . Благодаря сочетанию нелинейности и когерентности сигнал третьей гармоники генерируется в малой области, ограниченной конфокальным параметром жёстко сфокусированного пучка. Таким образом, микроскопия ГТГ характеризуется значительно более высоким продольным разрешением (сплошная и штриховая кривые на рис. 18б) по сравнению с таковым линейных методов.

Эффективность генерации второй оптической гармоники определяется нелинейно-оптической восприимчивостью второго порядка  $\chi^{(2)}$ . Симметрия тензора  $\chi^{(2)}$



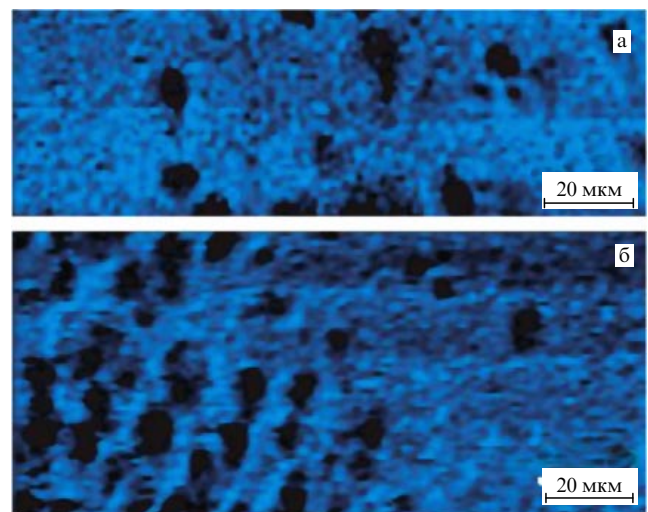
**Рис. 18.** (а) Интенсивность сигнала третьей оптической гармоники (сплошная кривая), флуоресцентного отклика (штриховая кривая) и фазовый сдвиг  $\Delta\phi_g$  (пунктирная кривая), вычисленные как функции диаметра сферической неоднородности в среде с нелинейностью третьего порядка (схема представлена на вставке). Конфокальный параметр пучка накачки 7,48 мкм. (б) Интенсивности сигнала третьей оптической гармоники (сплошная кривая) и флуоресцентного отклика (штриховая кривая), вычисленные как функции расстояния между фокусом и центром сферической неоднородности.

накладывает ограничения на вид тканей, которые могут быть визуализированы: необходимым условием является наличие структур с нарушенной центральной симметрией [155]. В биологических тканях такая ситуация наблюдается в молекулярных диполях, поляризованных упорядоченных структурах и при наведённой полем анизотропии. Уже известно, что при нейровизуализации такими поляризованными упорядоченными структурами могут служить ансамбли нейронных микротрубочек [156], а при дополнительном окрашивании гиперполяризуемыми веществами изменение сигнала второй гармоники позволяет регистрировать потенциал действия на клеточных мембранах [157, 158].

Недавно выполненные экспериментальные исследования показывают возможность использования микроскопии, основанной на генерации второй и третьей оптических гармоник, для визуализации морфологических особенностей и строения ткани с субклеточным разрешением в мозге живых мышей [10]. Продемонстрирована универсальная система на основе хром-форстеритового лазера, периодически поляризованного кристалла с квадратичной нелинейностью и ФК-волокна для визуализации сигнала второй и третьей оптической гармоник, а также когерентного антистоксова рассеяния света в тканях мозга мыши [152].

На рисунке 19 представлены результаты измерений морфологии среза толщиной 20 мкм мозга мыши линии C57BL/6 методом микроскопии генерации третьей оптической гармоники без какого-либо дополнительного окрашивания. Представлен сигнал третьей гармоники от двух различных областей мозга: пятого слоя соматосенсорной коры (рис. 19а) и части зубчатой фасции гиппокампа (рис. 19б). Клетки на представленных картах проявляются как области с отсутствием сигнала. Изображения демонстрируют высокий контраст, возможность визуализации морфологических деталей и субклеточное разрешение [159].

Таким образом, микроскопия на основе генерации оптических гармоник обеспечивает возможности безмаркерной визуализации клеток мозга с высоким пространственным разрешением. Однако достигнутый уровень миниатюризации подобных оптических систем пока не позволяет исследовать мозг свободноживущих животных. Был продемонстрирован компактный микроскоп на основе генерации второй и третьей гармоник, применяющийся для исследования *in vivo* кожи человека на глубине до 200 мкм [160]. Для доставки фемтосекундных лазер-

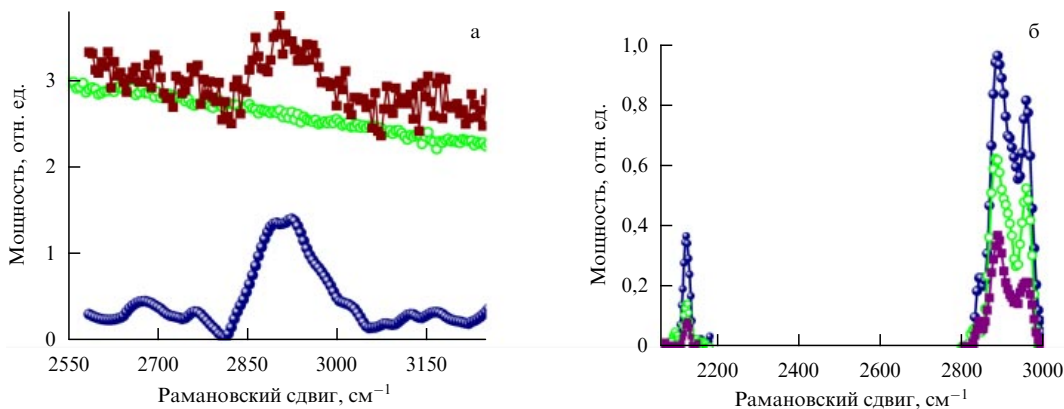


**Рис. 19.** Карты сигнала третьей гармоники для двух областей мозга мыши линии C57BL/6 без дополнительного окрашивания: (а) пятого слоя соматосенсорной коры, (б) части зубчатой фасции гиппокампа.

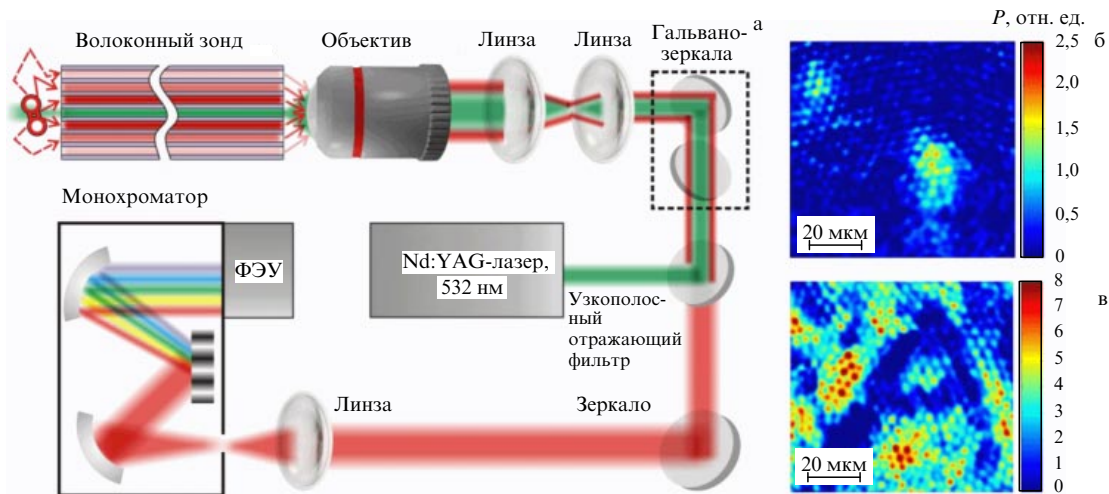
ных импульсов было выбрано фотонно-кристаллическое волокно с большой площадью моды, позволяющее распространять излучение накачки на длине волны 1260 нм в одномодовом режиме, а для сбора нелинейно-оптического отклика, рассеянного в обратном направлении, использовалось многомодовое волокно. Продольный размер системы составлял 3 см.

## 7.2. Спонтанное комбинационное рассеяние света

Методы микроскопии комбинационного рассеяния света разрабатываются и используются в течение достаточно длительного времени [161–163]. Основные трудности волоконно-оптических методов диагностики на основе комбинационного рассеяния связаны с низким уровнем регистрируемого сигнала. Повышение уровня этого сигнала открывает уникальные возможности безмаркерной химически селективной визуализации различных веществ. Полезный сигнал комбинационного рассеяния довольно сложно зарегистрировать на фоне сигнала неупругого рассеяния света из материала волокна [164]. Один из возможных путей преодоления этой трудности заключается в использовании зонда, состоящего из двух волокон: одно волокно предназначено для передачи возбуждающего излучения, другое — для сбора сигнала



**Рис. 20.** (а) Сигнал комбинационного рассеяния из мозга мыши линии C57BL/6, полученный через оптоволоконный зонд: необработанный спектр — квадраты, спектр фона из волоконного зонда — светлые кружки, спектр комбинационного рассеяния моды колебаний СН-связи после вычитания фона — тёмные кружки. (б) Спектр комбинационного рассеяния раствора EdU, зарегистрированный с помощью волоконного зонда для концентраций раствора EdU 5 мМ л<sup>-1</sup> (квадраты), 10 мМ л<sup>-1</sup> (светлые кружки) и 20 мМ л<sup>-1</sup> (тёмные кружки) [169].



**Рис. 21.** (а) Схема микроскопии комбинационного рассеяния с использованием пучка световодов [150]. (б, в) Изображения кластеров алмазных наночастиц на поверхности стекла, полученные через оптоволоконный зонд с помощью микроскопии комбинационного рассеяния после вычитания фона.

[165]. Для увеличения чувствительности метода применяются состоящие из небольшого числа (обычно не более 20) волокон пучки, в которых центральное волокно обеспечивает передачу лазерного излучения, а остальные волокна отвечают за сбор сигнала [166, 167]. Однако такие системы ввиду их довольно большого размера не подходят для нейроэндоскопии. В связи с этим значительные усилия в настоящее время направлены на миниатюризацию зонда [168].

В работе [169] разработан оптоволоконный микрозонд, основанный на многомодовом волокне с внешним диаметром 125 мкм. С помощью этого микрозонда выполнена спектроскопия комбинационного рассеяния липидов и воды в мозге мыши (рис. 20а), а также широко применяющихся в нейробиологии маркеров синтеза ДНК в клетках (рис. 20б). Как показано в работе [170], с помощью оптимальной обработки спектров комбинационного рассеяния удаётся выделять слабые сигналы от зондируемой области мозга на фоне сигнала неупругого рассеяния света в волокне (см. рис. 20).

Использование специально сконструированных пучков волокон позволяет повысить чувствительность и скорость удалённой волоконно-оптической регистрации комбинационного рассеяния света. Основная идея этого метода состоит в том, что с помощью пучка оптических

волокон осуществляется сжатие двумерного изображения в одномерную линию, подаваемую на вход спектрометра. Для этого максимальное число оптических волокон (насколько позволяет высота используемой ПЗС-матрицы (ПЗС — прибор с зарядовой связью)) собирается в пучок таким образом, чтобы с одного торца волокна были уложены по форме окружности (входной торец), а с другого — упорядочены в линию и выходной торец соединён со входом спектрометра [171–174].

Для повышения чувствительности волоконно-оптического зондирования оптическая схема настраивается так [150], чтобы сбор некогерентного сигнала комбинационного рассеяния производился одновременно всеми волокнами (около 6000) в пучке, обеспечивая большую площадь и высокую апертуру сбора.

Схема эксперимента [150] представлена на рис. 21а. Высокое пространственное разрешение обеспечивается благодаря локальному возбуждению отклика комбинационного рассеяния в каждый момент времени только по одному из волокон диаметром 2,4 мкм. Сигнал комбинационного рассеяния проходит через систему коллимирующих линз и поступает на систему регистрации, состоящую из монохроматора, ФЭУ и синхронного усилителя. Карта сигнала комбинационного рассеяния строится попиксельно посредством повторения таких измере-

ний для каждого волокна в пучке. Из регистрируемого сигнала комбинационного рассеяния вычитается фоновый сигнал, измеренный на частоте, отличной от частоты сигнала комбинационного рассеяния. Изображения кластеров алмазных наночастиц, полученные с помощью волоконно-оптической регистрации спонтанного комбинационного рассеяния света, представлены на рис. 21б, в.

Дальнейшее повышение чувствительности волоконно-оптического зондирования основывается на использовании оптических световодов с полой сердцевиной для доставки излучения накачки [111, 175–177].

### 7.3. Когерентное комбинационное рассеяние света

Методы нелинейно-оптической микроскопии, основанные на когерентном рассеянии света, открывают новые возможности для исследования строения тканей мозга и регистрации нейронной активности без применения флуоресцентных маркеров [4]. Микроскопия когерентного антистоксова рассеяния света успешно используется для чувствительного химически селективного зондирования тканей головного мозга мышей [178]. Метод КАРС позволяет реализовать микроскопию высокого пространственного разрешения для исследования миелинизированных нервных волокон в мозге живых анестезированных животных. Миелиновая оболочка аксонов характеризуется высокой концентрацией упорядоченных  $\text{CH}_2$ -групп, которые могут быть зарегистрированы с помощью КАРС-микроскопии.

Характерные спектры КАРС, полученные в экспериментах на коре головного мозга мыши, представлены на рис. 22. В этих спектрах ярко выражены симметричные моды  $\text{CH}$ -колебания липидов (с центром пика на длине волны 547 нм), а также симметричные и асимметричные моды колебания растяжения воды (слившиеся в пик с центром на длине волны 537 нм). Отношение амплитуд пиков определяется наличием и ориентацией липидов и воды в тканях мозга в области взаимодействия со сфокусированными лазерными пучками [179].

Методы КАРС-микроскопии активно используются для визуализации биологически значимых химических процессов в мозге живых животных. Этими методами удаётся зарегистрировать  $\text{CH}_2$ -колебания в мозге анестезированных мышей со скоростью до 20 кадров в секунду [180]. Такая скорость получения изображений на много порядков превышает скорость съёмки в микроскопии

спонтанного комбинационного рассеяния света. Экспериментальные исследования показывают, что КАРС-микроскопия обеспечивает высокое пространственное разрешение, позволяя различать тонкие детали структуры нервных клеток без использования маркеров [181, 182].

Серьёзной проблемой при волоконно-оптической доставке излучения накачки и стоксовой компоненты для КАРС-микроскопии является сильный нерезонансный фон, возникающий при распространении излучения по оптическому волокну. В работе [183] продемонстрирована достаточно простая схема для подавления этого фона, основанная, как и в случае методик волоконной регистрации спонтанного рамановского рассеяния, на использовании двух разных волокон для доставки излучения накачки и регистрации сигнала.

Ряд трудностей, присущих КАРС-микроскопии, удаётся устранить на основе использования процесса ВКР. Важные преимущества ВКР-микроскопии связаны с отсутствием в ВКР-сигнале нерезонансного фона. ВКР-микроскопия, несмотря на свои многочисленные достоинства, долгое время не использовалась для химически селективной микроскопии из-за малой скорости построения ВКР-изображений (около 1 мин на 1 кадр) и значительного влияния на ВКР-сигнал уменьшения мощности накачки в оптически плотных системах. В последние годы разработаны экспериментальные методы, позволяющие успешно устранить эти недостатки [184]. Для повышения скорости построения ВКР-изображений используются модулированный стоксов сигнал и регистрация сигнала на основе специально сконструированных высокоскоростных аналоговых синхронных усилителей [184].

Авторами работы [185] продемонстрирован миниатюрный ВКР-микроскоп. Излучение в него подаётся по сохраняющему поляризацию волокну. Скорость построения изображений для этой миниатюрной системы достигает семи кадров в 1 с при диаметре поля зрения, соответствующем 500 пикселям. Продemonстрирована ВКР-микроскопия на основе сигнала комбинационного рассеяния на липидах ( $\text{CH}_2$ , отстройка  $2845 \text{ см}^{-1}$ ) и белках ( $\text{CH}_3$ , отстройка  $2950 \text{ см}^{-1}$ ) в коже живой мыши [185].

## 8. Заключение

Системный подход к решению сложных задач исследования многообразных функций мозга требует развития новых технологий для регистрации комплекса взаимосвязанных физических, химических и биологических процессов в мозге млекопитающих в условиях их естественного поведения. Оптические технологии открывают новые уникальные возможности для достижения этой цели. С помощью методов оптической физики в последние годы разработаны новые нелинейно-оптические технологии и созданы уникальные оптоволоконные нейроинтерфейсы, позволяющие исследовать работу мозга млекопитающих в процессе их обучения и усвоения ими опыта.

Оптоволоконные нейроинтерфейсы благодаря их компактности и механической гибкости открывают широкие возможности для исследования функций живого мозга в экспериментах со свободноподвижными животными. Разработанные оптоволоконные нейроинтерфейсы успешно сочетаются с оптогенетическими технологиями и позволяют регистрировать функциональные состояния живого мозга посредством измерения сигнала оптического отклика генетически кодируемых флуоресцентных белков. Проведённые исследования показывают возможность полностью оптической регистрации широ-

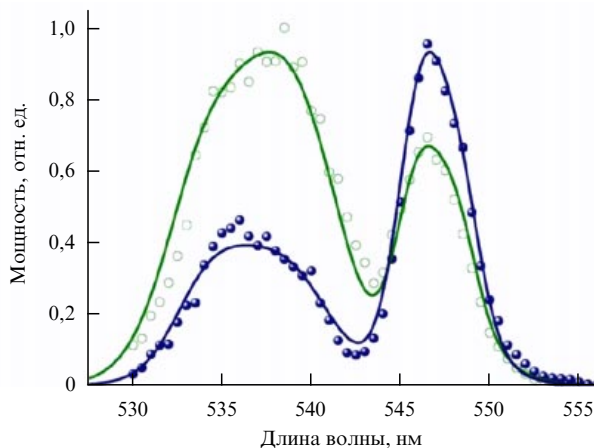


Рис. 22. Характерные спектры КАРС, измеренные для областей мозга мыши с высоким (светлые кружки) и низким (тёмные кружки) содержанием воды. Сплошными кривыми показаны результаты численного моделирования [179].

кого класса флуоресцентных маркеров, визуализирующих функционально значимые процессы, связанные с нейронной активностью.

На основе процессов двухфотонного поглощения, генерации второй и третьей гармоник, а также когерентного комбинационного рассеяния света реализована методика комплексной мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии, позволяющая получать наиболее полную информацию о физических и биохимических процессах, сопровождающих высшую нервную деятельность. Явления генерации второй и третьей оптических гармоник, а также когерентного антистоксова рассеяния света позволяют реализовать безмаркерные технологии регистрации функционально значимых процессов, происходящих в живом мозге. На основе сочетания передовых оптоволоконных технологий и новых методов лазерной микроскопии и оптогенетики разработана компактная волоконно-оптическая платформа для реализации нелинейно-оптической микроскопии мозга, включающая в себя волоконные источники лазерного излучения, волоконные преобразователи частоты, волоконные источники суперконтинуума, волокна для передачи сверхкоротких лазерных импульсов, а также реализованные в волоконном формате сверхкомпактные оптические фильтры.

Авторы глубоко признательны М.В. Ковальчуку и П.К. Кашкарову за постоянное внимание и поддержку работы, а также О.И. Ивашкиной, М.А. Зоц, А.А. Ланину, А.А. Воронину, Д.А. Сидорову-Бирюкову и Н.А. Сафронову за неоценимую помощь и многочисленные плодотворные обсуждения.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 13-02-01465, 13-04-40335, 14-29-07182, 14-29-07264) и фондом Роберта Уелча (грант А-1801). Работа над разделом 3 выполнена при поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0092 от 21 ноября 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0092). Развитие методов микроскопии с использованием сверхкоротких импульсов инфракрасного диапазона проводится при поддержке Российского научного фонда (проект 14-12-00772).

## Список литературы

- Lakowicz J R *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (New York: Springer, 2006)
- Pawley J (Ed.) *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (New York: Springer, 2006)
- Turrell G, Corset J (Eds) *Raman Microscopy: Developments and Applications* (Amsterdam: Elsevier, 1996)
- Min W et al. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62** 507 (2011)
- Evans C L, Xie X S *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1** 883 (2008)
- Denk W, Strickler J H, Webb W W *Science* **248** 73 (1990)
- Hoover E E, Squier J A *Nature Photon.* **7** 93 (2013)
- Horton N G et al. *Nature Photon.* **7** 205 (2013)
- Débarre D et al. *Nature Meth.* **3** 47 (2006)
- Witte S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** 5970 (2011)
- O'Keefe J, Dostrovsky J *Brain Res.* **34** 171 (1971)
- Hafting T et al. *Nature* **436** 801 (2005)
- Chen L L et al. *Exp. Brain Res.* **101** 8 (1994)
- Moser E I, Kropff E, Moser M-B *Annu. Rev. Neurosci.* **31** 69 (2008)
- O'Keefe J, Moser M-B, Moser E I "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2014", Nobel Media AB 2014, Web 29 March 2015, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2014/)
- Betzig E, Hell S W, Moerner W E "The Nobel Prize in Chemistry 2014", Nobel Media AB 2014, Web 29 March 2015, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/)
- Knöpfel T, Boyden E S (Eds) *Optogenetics. Tools for Controlling and Monitoring Neuronal Activity* (Progress in Brain Research, Vol. 196) (Amsterdam: Elsevier, 2012)
- Holtmaat A et al. *Nature Protocols* **4** 1128 (2009)
- Kerr J N D, Nimmerjahn A *Curr. Opin. Neurobiol.* **22** 45 (2012)
- Bernstein J G, Garrity P A, Boyden E S *Curr. Opin. Neurobiol.* **22** 61 (2012)
- Aravanis A M et al. *J. Neural Eng.* **4** S143 (2007)
- Doronina-Amitonova L V et al. *Nature Sci. Rep.* **3** 3265 (2013)
- Kobat D, Horton N G, Xu C J. *Biomed. Opt.* **16** 106014 (2011)
- Flusberg B A et al. *Nature Meth.* **2** 941 (2005)
- Fu L, Gu M J. *Microsc.* **226** 195 (2007)
- Brecht M et al. *J. Neurosci.* **24** 9223 (2004)
- Kerr J N D, Denk W *Nature Rev. Neurosci.* **9** 195 (2008)
- Callaghan P T *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy* (Oxford: Clarendon Press, 1993)
- Schmidt K C, Smith C B *Nucl. Med. Biol.* **32** 719 (2005)
- Cohen D *Science* **175** 664 (1972)
- Schulz D et al. *Nature Meth.* **8** 347 (2011)
- Gabriel M *Physiol. Behavior* **12** 145 (1974)
- Krüger J, Bach M *Exp. Brain Res.* **41** 191 (1981)
- Wilt B A et al. *Annu. Rev. Neurosci.* **32** 435 (2009)
- Yang G, Pan F, Gan W-B *Nature* **462** 920 (2009)
- Stosiek C et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 7319 (2003)
- Tian L et al. *Nature Meth.* **6** 875 (2009)
- Djurisic M et al. *J. Neurosci.* **24** 6703 (2004)
- Palmer L M, Stuart G J *J. Neurosci.* **29** 6897 (2009)
- Chalfie M et al. *Science* **263** 802 (1994)
- Anokhin K V et al. *Brain Res.* **544** 101 (1991)
- Boyden E S et al. *Nature Neurosci.* **8** 1263 (2005)
- Zhang F et al. *Nature Protocols* **5** 439 (2010)
- Zhang F et al. *Nature Meth.* **3** 785 (2006)
- Liu X et al. *Nature* **484** 381 (2012)
- Ji N et al. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18** 605 (2008)
- Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y J. *Cell. Compar. Physiol.* **59** 223 (1962)
- Prasher D C et al. *Gene* **111** 229 (1992)
- Heim R, Prasher D C, Tsien R Y *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** 12501 (1994)
- Ormö M et al. *Science* **273** 1392 (1996)
- Cubitt A B et al. *Trends Biochem. Sci.* **20** 448 (1995)
- Степаненко О В и др. *Цитология* **49** 395 (2007)
- Hill D K, Keynes R D *J. Physiol.* **108** 278 (1949)
- Bouchard M B et al. *Opt. Express* **17** 15670 (2009)
- Malonek D, Grinvald A. *Science* **272** 551 (1996)
- Strattonnikov A A, Loschenov V B *J. Biomed. Opt.* **6** 457 (2001)
- Helmchen F *Exp. Physiol.* **87** 737 (2002)
- Kawata S, Ohtsu M, Irie M (Eds) *Nano-Optics* (Springer Series in Optical Sciences, Vol. 84) (Berlin: Springer, 2002)
- Zipfel W R, Williams R M, Webb W W *Nature Biotechnol.* **21** 1369 (2003)
- Helmchen F, Denk W *Nature Meth.* **2** 932 (2005)
- Freudiger C W et al. *Science* **322** 1857 (2008)
- Hell S W *Nature Meth.* **6** 24 (2009)
- Bates M et al. *Science* **317** 1749 (2007)
- Желтиков А М УФН **177** 737 (2007); Zheltikov A M *Phys. Usp.* **50** 705 (2007)
- Flusberg B A et al. *Nature Meth.* **5** 935 (2008)
- Doronina L V et al. *Opt. Lett.* **34** 3373 (2009)
- Snyder A W, Love J D *Optical Waveguide Theory* (London: Chapman and Hall, 1983)
- Marcuse D *J. Opt. Soc. Am.* **68** 103 (1978)
- Zheltikov A J. *Opt. Soc. Am. B* **22** 1100 (2005)
- Russell P *Science* **299** 358 (2003)
- Желтиков А М УФН **170** 1203 (2000); Zheltikov A M *Phys. Usp.* **43** 1125 (2000)
- Nielsen M D et al. *Opt. Lett.* **28** 2309 (2003)
- Akimov D A et al. *Opt. Lett.* **28** 1948 (2003)
- Foster M, Moll K, Gaeta A *Opt. Express* **12** 2880 (2004)
- Leon-Saval S et al. *Opt. Express* **12** 2864 (2004)
- Foster M, Gaeta A *Opt. Express* **12** 3137 (2004)
- Salem R et al. *Nature Photon.* **2** 35 (2008)
- Foster M A et al. *Nature* **441** 960 (2006)
- Foster M A et al. *Nature* **456** 81 (2008)
- Levy J S et al. *Nature Photon.* **4** 37 (2009)
- Knight J C *Nature* **424** 847 (2003)
- Желтиков А М УФН **174** 73 (2004); Zheltikov A M *Phys. Usp.* **47** 69 (2004)
- Birks T A, Knight J C, Russell P St J *Opt. Lett.* **22** 961 (1997)
- Желтиков А М *Оптика микроструктурированных волокон* (М.: Наука, 2004)
- Fedotov A B et al. *Appl. Phys. B* **73** 181 (2001)
- Желтиков А М УФН **176** 623 (2006); Zheltikov A M *Phys. Usp.* **49** 605 (2006)
- Fedotov A B et al. *Appl. Phys. B* **77** 313 (2003)
- Coen S et al. *Opt. Lett.* **26** 1356 (2001)
- Ranka J K, Windeler R S, Stentz A J *Opt. Lett.* **25** 25 (2000)

90. Jones D J et al. *Science* **288** 635 (2000)
91. Udem T, Holzwarth R, Hänsch T W *Nature* **416** 233 (2002)
92. Hartl I et al. *Opt. Lett.* **26** 608 (2001)
93. Коноров С О и др. *ЖЭТФ* **126** 26 (2004); Konorov S O et al. *JETP* **99** 19 (2004)
94. Sidorov-Biryukov D A, Serebryannikov D A, Zheltikov A M *Opt. Lett.* **31** 2323 (2006)
95. Paulsen H N et al. *Opt. Lett.* **28** 1123 (2003)
96. von Vacano V, Wohlleben W, Motzkus M *Opt. Lett.* **31** 413 (2006)
97. Головченко Е А и др. *Письма в ЖЭТФ* **42** 74 (1985); Golovchenko E A et al. *JETP Lett.* **42** 87 (1985)
98. Mitschke F M, Mollenauer L F *Opt. Lett.* **11** 659 (1986)
99. Konorov S, Zheltikov A, Scalora M *Opt. Express* **13** 3454 (2005)
100. Myaing M T et al. *Opt. Lett.* **28** 1224 (2003)
101. Ye J Y et al. *Proc. SPIE* **5700** 23 (2005)
102. Fedotov I V et al. *Appl. Opt.* **48** 5274 (2009)
103. Федотов И В и др. *Российские нанотехнологии* **5** (3–4) 98 (2010); Fedotov I V et al. *Nanotechnol. Russ.* **5** 266 (2010)
104. Marcatili E A J, Schmeltzer R A *Bell Syst. Tech. J.* **43** 1783 (1964)
105. Russell P St J *J. Lightwave Technol.* **24** 4729 (2006)
106. Litchinitser N M et al. *Opt. Lett.* **27** 1592 (2002)
107. Litchinitser N M et al. *Opt. Express* **11** 1243 (2003)
108. Roberts P et al. *Opt. Express* **13** 8277 (2005)
109. Litchinitser N M, Poliakov E *Appl. Phys. B* **81** 347 (2005)
110. Zheltikov A M *Nature Mater.* **4** 267 (2005)
111. Doronina-Amitonova L V et al. *Opt. Lett.* **37** 4642 (2012)
112. Zheltikov A M *Appl. Opt.* **47** 474 (2008)
113. Желтиков А М *УФН* **178** 619 (2008); Zheltikov A M *Phys. Usp.* **51** 591 (2008)
114. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **98** 253706 (2011)
115. Tauer J et al. *Laser Phys. Lett.* **4** 444 (2007)
116. Konorov S O et al. *Appl. Opt.* **43** 2251 (2004)
117. Balciunas T et al. *Nature Commun.* **6** 6117 (2015)
118. Lanin A A et al. *Appl. Phys. Lett.* **100** 101104 (2012)
119. Yaroslavsky A N et al. *Phys. Med. Biol.* **47** 2059 (2002)
120. Ishimaru A *Wave Propagation and Scattering in Random Media* (New York: Academic Press, 1978); Исмару А *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981)
121. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **101** 021114 (2012)
122. Tai D C et al. *J. Biomed. Opt.* **12** 034033 (2007)
123. Schüz A, Palm G *J. Compar. Neurol.* **286** 442 (1989)
124. Fedotov I V et al. *Appl. Phys. Lett.* **104** 083702 (2014)
125. Helmchen F et al. *Neuron* **31** 903 (2001)
126. Flusberg B A et al. *Opt. Lett.* **30** 2272 (2005)
127. Göbel W et al. *Opt. Lett.* **29** 2521 (2004)
128. Sawinski J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 19557 (2009)
129. Engelbrecht C J et al. *Opt. Express* **16** 5556 (2008)
130. Piyawattanametha W et al. *Opt. Lett.* **34** 2309 (2009)
131. Ghosh K K et al. *Nature Meth.* **8** 871 (2011)
132. Ziv Y et al. *Nature Neurosci.* **16** 264 (2013)
133. Barretto R P J et al. *Nature Med.* **17** 223 (2011)
134. Liang C et al. *Appl. Opt.* **41** 4603 (2002)
135. Carlson K et al. *Appl. Opt.* **44** 1792 (2005)
136. Rouse A R et al. *Appl. Opt.* **43** 5763 (2004)
137. Lane P M et al. *Opt. Lett.* **25** 1780 (2000)
138. Ota T et al. *J. Biomed. Opt.* **10** 024010 (2005)
139. Kleinfeld D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 15741 (1998)
140. Nimmerjahn A et al. *Nature Meth.* **1** 31 (2004)
141. Theer P, Hasan M T, Denk W *Opt. Lett.* **28** 1022 (2003)
142. Mittmann W et al. *Nature Neurosci.* **14** 1089 (2011)
143. Kobat D et al. *Opt. Express* **17** 13354 (2009)
144. Doronina-Amitonova L V et al. *J. Biophoton.* **3** 660 (2010)
145. Vincent P et al. *EMBO Rep.* **7** 1154 (2006)
146. Bharali D J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 11539 (2005)
147. Davenne M et al. *Chem. Senses* **30** (Suppl. 1) i115 (2005)
148. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **101** 233702 (2012)
149. Yamaguchi S et al. *Nature* **409** 684 (2001)
150. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **102** 161113 (2013)
151. Doronina-Amitonova L V et al., in *12th Intern. Conf. on Laser Applications in Life Sciences 2010, LALS-2010, Oulu, Finland, June 9–11, 2010, Technical Digest*, p. 124
152. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **99** 231109 (2011)
153. Reintjes J F *Nonlinear Optical Parametric Processes in Liquids and Gases* (New York: Academic Press, 1984)
154. Squier J et al. *Opt. Express* **3** 315 (1998)
155. Campagnola P J, Loew L M *Nature Biotechnol.* **21** 1356 (2003)
156. Dombeck D A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 7081 (2003)
157. Dombeck D A et al. *J. Neurophysiol.* **94** 3628 (2005)
158. Shneider M N, Voronin A A, Zheltikov A M *Phys. Rev. E* **81** 031926 (2010)
159. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **103** 093701 (2013)
160. Chia S-H et al. *Opt. Express* **18** 17382 (2010)
161. Mizuno A et al. *J. Raman Spectrosc.* **25** 25 (1994)
162. Koljenović S et al. *J. Biomed. Opt.* **10** 031116 (2005)
163. Krafft C et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **389** 1133 (2007)
164. Udovich J A et al. *Appl. Opt.* **47** 4560 (2008)
165. McCreery R L, Fleischmann M, Hendra P *Anal. Chem.* **55** 146 (1983)
166. Bergholt M S et al. *J. Biophotonics* **6** 49 (2013)
167. Krafft C et al. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **1** 39 (2012)
168. Komachi Y et al. *Appl. Opt.* **48** 1683 (2009)
169. Doronina-Amitonova L V et al. *Appl. Phys. Lett.* **101** 113701 (2012)
170. Beier B D, Berger A J *Analyst* **134** 1198 (2009)
171. Ma J, Ben-Amotz D *Appl. Spectrosc.* **51** 1845 (1997)
172. Gift A D et al. *J. Raman Spectrosc.* **30** 757 (1999)
173. McClain B L, Jiaying, Ben-Amotz D *Appl. Spectrosc.* **53** 1118 (1999)
174. Dochow S et al. *Opt. Express* **20** 20156 (2012)
175. Komachi Y et al. *Opt. Lett.* **30** 2942 (2005)
176. Sato H et al. *Vibration. Spectrosc.* **50** 125 (2009)
177. Konorov S O et al. *Opt. Lett.* **31** 1911 (2006)
178. Evans C L et al. *Opt. Express* **15** 12076 (2007)
179. Voronin A A et al. *Opt. Lett.* **36** 508 (2011)
180. Evans C L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 16807 (2005)
181. Fu Y et al. *Opt. Express* **16** 19396 (2008)
182. Légaré F et al. *Opt. Express* **14** 4427 (2006)
183. Balu M et al. *Opt. Express* **18** 2380 (2010)
184. Saar B G et al. *Science* **330** 1368 (2010)
185. Saar B G et al. *Opt. Lett.* **36** 2396 (2011)

## Neurophotonics: optical methods to study and control the brain

L.V. Doronina-Amitonova, I.V. Fedotov, A.B. Fedotov

Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 119991 Moscow, Russian Federation;

Russian Quantum Center, ul. Novaya 100a, 143025 Skolkovo, Moscow, Russian Federation

K.V. Anokhin. National Research Centre "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova 1, 123182 Moscow, Russian Federation

A.M. Zheltikov. Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 119991 Moscow, Russian Federation

E-mail: zheltikov@physics.msu.ru

Russian Quantum Center, ul. Novaya 100a, 143025 Skolkovo, Moscow, Russian Federation;

National Research Centre "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova 1, 123182 Moscow, Russian Federation;

Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX 77843, USA

Methods of optical physics offer unique opportunities for the investigation of brain and higher nervous activity. The integration of cutting-edge laser technologies and advanced neurobiology opens a new cross-disciplinary direction of natural sciences — neurophotonics, leading to the development of a vast arsenal of tools for functional brain diagnostics, stimulation of individual neurons and neural networks, as well as molecular engineering of brain cells aimed at a diagnosis and therapy of neurodegenerative and psychic diseases. Optical fibers suggest unique approaches helping to confront the most challenging problems in brain research, including the analysis of cellular and molecular mechanisms behind memory and cognition. Optical fibers of new generation offer new solutions for the development of fundamentally new, unique tools for neurophotonics and laser neuroengineering — fiber-optic neuroendoscopes and neurointerfaces. These instruments open new horizons for the investigation of the most complex brain functions, enabling a long-term multiplex detection of fluorescent protein markers, as well as photostimulation of neuronal activity in deep brain areas in living, freely behaving animals with an unprecedented spatial resolution and minimal invasiveness. This emerging technology opens new horizons for understanding learning and long-term memory through experiments with living, freely behaving mammals. Here, we offer a brief review of this rapidly growing field of research.

**Keywords:** neurophotonics, fiber-optic probes, nonlinear-optical microscopy

PACS numbers: **42.81.**–i, 87.19.L–, 87.85.D–

Bibliography — 185 references

*Uspekhi Fizicheskikh Nauk* **185** (4) 371–392 (2015)

DOI: 10.3367/UFNr.0185.201504c.0371

Received 25 December 2014

*Physics – Uspekhi* **58** (4) (2015)