

33.

SZÁLCSATOLT, SUB-PS-OS, HÁROM HULLÁMHOSSZ TARTOMÁNYBAN MŰKÖDŐ TI-ZAFÍR LÉZER FEJRE SZERELHETŐ, KÉTFOTONOS GERJESZTÉSŰ, PÁSZTÁZÓ FLUORESZCENCIA MIKROSKÓPHOZ, AZ AGY *IN VIVO* VIZSGÁLATÁHOZ

Szipőcs Gergely^{1,2}, Krolopp Ádám^{1,2}, Shau Poh Chong³, Rózsa Dániel^{2,3}, Török Peter³ és
Szipőcs Róbert^{1,2}

¹R&D Ultrafast Lasers Kft, Budapest

²HUN-REN Wigner Fizikai Kutatóközpont, Budapest

³Nanyang Technological University, Singapore

1. Bevezetés

Az ultragyors optikai szállézereket vagy szálcsatolt ultragyors szilárdtest lézereket széles körben alkalmazzák a nemlineáris mikroszkópiában, mint például a kétfotonos gerjesztésű fluoreszcencia (2PEF), a másodharmonikus keltés (SHG) vagy a koherens anti-Stokes Raman-szórás (CARS) mikroszkópiában [1,2]. Ezeknek a lézereknek számos speciális követelménynek kell megfelelniük az élettudományok területén a kísérleti körülményektől függően: például jellemzően több különböző fluoreszcens jelölésre és ezek megfelelően hatékony (megfelelő hullámhosszú) kétfotonos gerjesztésére van szükség a különböző szövetkomponensek megkülönböztetéséhez a képalkotás során, a jelöléshez használt fluoroforok emissziós spektrumai lehetőleg minimális mértékben fedjék át egymást, az impulzus időtartamát és az objektív utáni fókuszolt átmérőjét is a legkisebbre kell csökkenteni a legnagyobb nemlineáris hatás (maximális fluoreszcencia, SHG vagy CARS jel), a minták minimális hőterhelése érdekében.

Egyes kísérletekben szabadon mozgó állatok agyának *in vivo* képalkotása szükséges, ahol egy kis méretű, könnyű, fejre szerelt pásztázó mikroszkópot [3] használnak a képalkotáshoz, amelyben az ultragyors lézerimpulzusokat egy optikai szál juttatja a fókuszáló optikával ellátott pásztázó fejbe, míg a kibocsátott fluoreszcenciát ugyanaz a két-köpenyű (*ang. double clad*) optikai szál gyűjti össze és juttatja el az (APD vagy PMT) fotodetektor(ok)hoz. A gerjesztéshez használt közeli infravörös lézerimpulzusokat és a visszafelé terjedő fluoreszcencia jelet egy dikroikus tükör (DM) választja ketté a lézer és a szálbcsatoló között, ahol megfelelően megtervezett lézerfény-blokkoló (LBF) és sáváteresztő-szűrő (BPF) védi a detektorokat a visszaszórt lézerfénytől.

Az ultragyors lézerimpulzusok szálon keresztüli továbbítása nem triviális feladat az optikai szálakban fellépő két fő fizikai jelenség miatt: fényintenzitással arányos Kerr-nemlinearitás és a kromatikus diszperzió (elektromágneses hullámok különböző hullámhosszakon eltérő terjedési sebessége optikai hullámvezetőkben) miatt. Előbbi pl. önfázis-moduláció (SPM) formájában jelentkezik, ami a lézerspektrum kiszélesedését eredményezi.

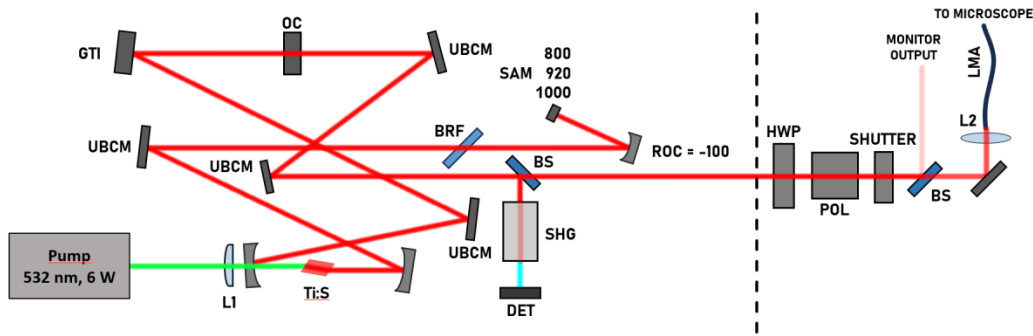
A biológiai minták alacsony hőterhelése az *in vivo* képalkotás fő követelménye, amely nagy csúcsintenzitású (ultrarövid és/vagy alacsony ismétlési frekvenciájú) lézerimpulzusokat igényel a kétfotonos gerjesztéshez. Sajnos minél rövidebb a lézerimpulzus, annál nagyobb a transzformáció-limitált spektrális sáv szélessége, ami a szál diszperziójára vonatkozó egyre nagyobb érzékenységet eredményez. Egy nemrégiben megépített szálcsatolt Ti-zafír lézerünkben [2] minimalizáltuk a száldiszperzió problémáját azáltal, hogy lézerünk impulzushosszát ~150 fs-ról ~0,6 ps-ra növeltük, valamint a lézer ismétlési frekvenciáját ~80 MHz-ről ~20 MHz-re csökkentettük annak érdekében, hogy közel hasonló csúcsintenzitású impulzusokat kapjunk egy közel ~2 m hosszú, üreges maggal és megfelelő fotonikus tiltott sávval rendelkező (HC-PBG) optikai szál (HC-800-2, NKT Photonics) után. A kereskedelmi forgalomban kapható üreges magú PBG szálak (HC-800-2, HC-920, HC-1030) sáv szélessége a közép-hullámhosszuktól függően ~100 nm körüli értékre korlátozódott korábbi vizsgálataink [2] vizsgálataink során.

Egy fejre szerelt pásztázó mikroszkóp rendszer esetében (ahol nincs hely a fent említett optikáknak és detektoroknak) azonban továbbra is össze kell gyűjteni a látható tartományban detektálendő fluoreszcens fényt, így az egyetlen lehetőség a kettős köpenyű, nagy módusátmérőjű (LMA), üvegmagú szálak használata az ultragyors lézerimpulzusos lézerforrás és a pásztázó fej közötti fényátvitelre. Egy ilyen szálban az optikai impulzusok csúcsintenzitását és spektrális sávzélességét a nemlinearitás illetve a szál diszperziója korlátozza, utóbbit alapvetően a kvarcüveg anyagi diszperziója határozza meg.

Egy hónapja megjelent konferencia cikkünkben [4] bemutattuk egy, a szingapúri NTU egyetem NOBIC képalkotó központja részére nemrégiben kifejlesztett és megépített, ~69 MHz-es, sub-ps-os Ti-zafir lézerünket, amelynek fontosabb paramétereit (ismétlési frekvencia, impulzushossz) egy olyan, dupla köpenyű, polarizációtartó LMA optikai szálra optimalizáltunk (P-25/250DC-PM, Thorlabs), amely megfelel egy egér- vagy patkányfejre szerelhető, pásztázó kétfoton mikroszkóppal szemben támasztott követelményeknek. Jelen cikkünkben az ott bemutatott eredményeket foglaljuk össze, illetve ismertetjük a témához kapcsolódó jelenlegi munkánkat. Az említett cikkben [4] bemutatott lézer három diszkrét hullámhossz tartományban, ~800 nm, ~920 nm és ~1000 nm körül üzemeltethető, amelyet a lézer módusszinkronizálásra használt telítődő abszorbens tükrök (SAM) nagy reflexiós sávzélessége határoz meg. A következőkben bemutatunk egy szálcsatló egységet is, amelyet közvetlenül a lézer kimenetére, annak burkolatára szereltünk fel, mint kiegészítő elemet. Cikkünk végén tárgyaljuk a szálátviteli és kétfoton abszorpciós fluoreszcencia képalkotásos méréseink eredményeit festett agyszeleteken, a szingapúri NTU NOBIC képalkotó központjában kifejlesztett mikroszkóp rendszerrel, illetve bemutatjuk legújabb további vonatkozó fejlesztéseinket.

2. Kísérleti elrendezés

Lézerünk felépítése és vezérlése hasonló a [2] hivatkozásban leírtakhoz, azzal a fő különbséggel, hogy lézerünkbe nem tudtunk Herriot-cellát beépíteni a lézerünk ismétlési frekvenciájának csökkentése érdekében (lásd az 1. ábrát). Ennek fő oka az volt, hogy a ~20 MHz-es, szub-ps-os, ~530 mW átlagos teljesítményű Ti:zafir lézer [2] fényimpulzusainak csúcsintenzitása kísérletileg az LMA szál nemlineáris küszöbértéke felett volt (a maximális magátmérőt a képalkotási feltételek (pl. NA) korlátozták), ami az impulzusok jelentős spektrális kiszélesedését eredményezte az LMA szálban, ami az optikai impulzusok spektrális sávzélességét a kezdeti ~1-2 nm-es értékről 4-5 nm-re növelte, a becsatolt teljesítménytől függően. Nyilvánvaló, hogy a spektrálisan kiszélesedett optikai impulzusok sokkal érzékenyebbek váltak a szál diszperziójára, hasonlóan a 80-150 fs-os, transzformáció-limitált optikai impulzusokhoz. Kompromisszumként a lézer ismétlési frekvenciáját ~69 MHz-re állítottuk be, amelyet alapvetően a lézerrezonátor fizikai hossza határoz meg. A lézer rezonátorában egy alacsony reflexiós veszteségű, ultraszélessávú GTI diszperziókompenzáló eszköz biztosította a -20.000 fs² és -40.000 fs² között állítható negatív összdiszperziót, amely lehetővé tette számunkra, hogy az impulzus időtartamát ~0,5 ps és ~1 ps közötti tartományban változtassuk [5]. A móduscsatlóáshoz használt SAM eszköztől függően a lézer átlagosan ~530 mW (795 nm-en), ~340 mW (920 nm-en) és 160 mW (995 nm-en) teljesítményt szolgáltatott, amely értékeket közvetlenül a lézer nyitótükrök után mértünk. A GTI eszköz vezérléséhez a kimeneti teljesítmény körülbelül ~20%-át használtuk fel egy vékony BBO kristályban történő SHG jel előállítására [5].

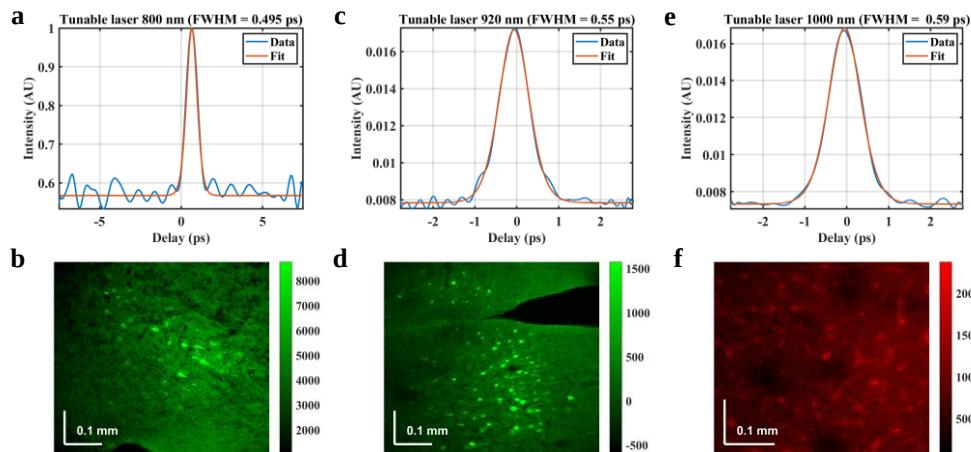


1. ábra: Szálcsatolt, sub-ps-os Ti-zafir lézer [4]. Ti-zafir kristály (úthossz: $PL = 4$ mm), BRF: kettőtörő szűrő a hullámhossz stabilizálására és hangolására, UBCM: ultraszélessávú, csörpölt tükrök, GTI: piezo-vezérelt Gires–Tournois interferométer diszperziókompenzálásra [5], SAM: telítődő abszorbenes tükrök (SAM 800, SAM 920 és SAM 1000) ugyanazon réz hűtőlapra szerelve. OC: nyitótükör, L1, L2: fókuszáló lencsék, SHG: másodharmonikus keltő egység a lézer szabályozásához és „kétfotonos” mikroszkóp referenciajel biztosításához, BS: R~ 20%-os nyalábosztók, HWP/POL: teljesítményszabályozás, LMA: 2 m hosszú, nagy módusátmérőjű optikai szál FC/PC csatlakozókkal [4].

A fentiekben bemutatott (és az R&D Ultrafast Lasers Kft által legyártott) hangolható Ti:zafir lézert fluoreszcens jelölőkkel megfestett, fixált egér-agyszeletek mérésére használtuk egy, a NTU NOBIC Imaging Center által kifejlesztett pásztázó kétfoton-abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal. A lézerimpulzusok időbeli hosszát a szálkimenetnél mértük egy autokorrelátor (APE pulseCheck NX, Berlin, Németország) segítségével, mielőtt a lézernyalábot a mikroszkópba küldtük volna. A kétfotonos mikroszkóp specifikációja megtalálható a nemrégiben megjelent [6] hivatkozásban.

3. Eredmények [4]

Az előző szakaszban leírt kísérleti elrendezéssel fluoreszcens jelölőkkel ellátott, fixált egér agyszeletekről képeket készítettünk. Az alkalmazott Ti-zafir lézer impulzusszélességét körülbelül 495 fs, 550 fs és 590 fs értékeknek mértük a 800 nm, 920 nm és 1000 nm reprezentatív hullámhosszokon (lásd 2. ábra a, c, e). A szálcsatolt lézer kimenetén mért átlagos teljesítmény rendre 74 mW, 65 mW és 40 mW volt. Kétfotonos mikroszkópunk fényáteresztőképessége közel 50%, ennek megfelelően az objektív síkjában mért maximális teljesítmény ~37 mW, ~30 mW és ~20 mW volt a három különböző hullámhosszon. A 2. ábra (b, d, e) mutatja a kétfotonos fluoreszcencia képeket (512×512 pixel felbontással), 3,2 μ s-ra állított pixel expozíciós idővel. A neuronok (gCAMP6-tal jelölve, 2b. és d. ábra) és az asztrociták (GFAP-ra AF594-gyel festve, 2f. ábra) egyértelműen beazonosíthatók a képeken.



2. ábra: Fluoreszcens jelöléssel ellátott, fixált egéragy-szeletekről NTU NOBIC 2PEF mikroszkóppal készített képek.

4. Továbblépési lehetőségek

A nemrégiben kifejlesztett, és piacon tavaly november óta elérhető, ún. anti-rezonáns szerkezetű, légmagos optikai szálak [7] lehetővé teszik, hogy egyetlen optikai szál alkalmazásával (!) a fentiekben bemutatott, három hullámhossz tartományban (~ 800 nm, ~ 920 nm és ~ 1000 nm környékén működő), szálcsatolt, szub-ps-os lézerünk impulzusainak energiáját az ismétlési frekvencia csökkentésével [2] többszöröseire emeljük anélkül, hogy az optikai szálban nemlineáris hatásoktól kellene félnünk, aminek következtében hasonló mértékben növelni tudjuk a detektált fluoreszcencia jel nagyságát, a mikroszkóp jel-zaj (S/N) viszonyát. Jelenleg laborjainkban ilyen antirezonáns optikai szálak tesztelése folyik egy ~ 20 MHz-es ismétlési frekvenciájú [2], de már mindhárom említett hullámhossz tartományban működő szub-ps-os Ti-zafir lézerrel, nemlineáris mikroendoszkópiás és kvantummikroszkópiai alkalmazásokhoz.

Felhasznált irodalom

- [1] Á. Krolopp, A. Csákányi, D. Haluszka, D. Csáti, A. Kolonics, N. Wikonkál, and R. Szipőcs, „*Handheld nonlinear microscope system comprising a 2 MHz repetition rate, mode-locked Yb-fiber laser for in vivo biomedical imaging*,” Biomed. Opt. Express **7**, 3531-3542 (2016).
- [2] Á. Krolopp, L. Fésűs, G. Szipőcs, N. Wikonkál, R. Szipőcs, „*A 20 MHz Repetition Rate, Sub-Picosecond Ti-Sapphire Laser for Fiber Delivery in Nonlinear Microscopy of the Skin*,” Life **14**, 231 (2024).
- [3] B.A. Flusberg, J.C. Jung, E.D. Cocker, E.P. Anderson, and M.J. Schnitzer, "In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope," Opt. Lett. **30**, 2272 (2005).
- [4] G. Szipőcs, Á. Krolopp, S. P. Chong, P. Török and R. Szipőcs, "Fiber-coupled, sub-ps Ti-sapphire Laser for Multi Excitation Wavelength, Head-Mounted Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy of the Brain," European Conferences on Biomedical Optics 2025, June 22-26, Munich, Germany, (Optica Publishing Group – SPIE) paper W3A.46 (2025).
- [5] G. Szipőcs, Á. Krolopp, S. P. Chong, P. Török, and R. Szipőcs, "Low Reflection Loss Dispersion Compensation Scheme for Broadly Tunable sub-ps Solid State Lasers," in CLEO 2023, Technical Digest Series (Optica Publishing Group, 2023), paper JTh2A.121 (2023).
- [6] S. P. Chong, and P. Török, "Influence of laser pulse shape and cleanliness on two-photon microscopy," Opt. Contin. **3**, 552 (2024).
- [7] Francesco Poletti, "Nested antiresonant nodeless hollow core fiber," Opt. Express **22**, 23807 (2014)

Köszönetnyilvánítás

A bemutatott eredmények részben a HUN-REN Wigner FK TKP2021-NVA-04 számú projektjének, valamint az R&D Ultrafast Lasers Kft 2018-2.1.5-NEMZ-2018-00003 Eurostar és 2020-1.2.3-EUREKA-2022-00022 Eureka projektjeinek támogatásával jött létre.