



Doctoral Thesis

Applications of fiber-optic technologies for high-resolution fluorescence brain imaging

Author(s):

Engelbrecht, Christoph J.

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006061442> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 18891

Applications of Fiber-Optic Technologies for High-Resolution Fluorescence Brain Imaging

DISSERTATION
submitted to
ETH ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

CHRISTOPH J. ENGELBRECHT
Dipl.-Phys., Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
born March 23, 1979
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Rodney J. Douglas, Examiner
Prof. Dr. Fritjof Helmchen, Co-Examiner
Prof. Dr. Markus Rudin, Co-Examiner

2010

Abstract

Miniaturized fiber-optic based imaging devices enable novel microscopic studies in fundamental biological research disciplines, and (in modified implementations) they open new avenues in clinical use, such as endoscopic cancer diagnosis and treatment. Specifically in neuroscience, the development of miniature, lightweight fiber-optic microscopes is leading towards a long-standing goal of cellular-resolution brain imaging: Small portable microscopes promise to permit measurements of the neural dynamics underlying specific behaviors in awake, freely moving animals. Thus, these devices may help to overcome the limitations of current (two-photon) *in vivo* imaging experiments under anesthesia which suffer from artifacts in neuronal and astrocytic activities. Furthermore, closely related endoscopic approaches can enable high-resolution imaging from deep brain areas, which are otherwise inaccessible for optical analysis. In this Ph.D. thesis, various applications of fiber-optics technology were used to develop and advance high-resolution single- and two-photon excitation fluorescence brain imaging techniques.

In a first part, a miniaturized two-photon microscope (fiberscope) was developed, characterized, and applied to *in vivo* imaging experiments. The distal microscope head weighed only 0.6 g (world-record to our knowledge) and micrometer resolution in video-rate imaging experiments could be achieved with fields-of-view of 200 μm . The device consisted of a hollow-core photonic crystal fiber for efficient delivery of near-infrared femtosecond laser pulses, a spiral fiber-scanner for resonant beam steering, and a gradient-index lens assembly including microprisms for fluorescence excitation, dichroic beam splitting, and signal collection. Fluorescence light was proximally detected through a large-core plastic fiber using a standard photomultiplier tube on the optical table. The sensitivity of the instrument was sufficient to resolve action-potential evoked calcium transients in rat cerebellar Purkinje cell dendrites. Therefore, we conclude that the fiberscope is well suited to image cellular activity of brain structures *in vivo*. However, a disadvantage was that the photonic crystal fiber as one of the optical core components turned out to be not robust enough and irreparable contaminations of these fibers hampered further experiments en route to imaging in freely behaving animals.

Based on the experience with the miniaturized two-photon fiberscope, large-core plastic optical fibers were utilized to boost the fluorescence emission detection efficiency of a standard, table-mounted two-photon microscope in the second part of this thesis. Because nonlinear microscopy techniques confine fluorescence excitation to a spot near the optical focus, a properly positioned ring of large-core fibers could enhance detection more than two-fold. This was achieved by epicollection of fluorescence photons that were not transmitted through the objective lens and thus normally wasted. We termed this technique SUFICS, short for Supplementary Fiber-Optic Light Collection System. The study comprised an extensive analyti-

cal treatment, numerical Monte-Carlo simulations, and experimental verifications. Both deep *in vivo* imaging in mouse neocortex and functional calcium imaging considerably benefited from SUFICS-signal gain. Because of its simplicity and universality, we envision numerous applications for SUFICS in various research fields using nonlinear microscopy techniques.

As an alternative to two-photon fluorescence excitation approaches, single-photon light-sheet based microscopy was adapted to fiber-optics operation and a miniaturized Selective-Plane Illumination Microscope (miniSPIM) was developed, characterized and applied to biological imaging in the third part of this thesis. Here, excitation light was delivered through a single-mode optical fiber and a light-sheet was created with a cylindrical gradient-index lens and a right-angle microprism. Therefore, fluorescence in a whole plane was excited from the side instead of the conventional point or cone excitation from the top in regular microscopes. Fluorescence emission was collected orthogonally to the light-sheet through a gradient-index lens assembly, a coherent fiber bundle, and detected by a proximal CCD-camera. In contrast to conventional widefield fluorescence operation, the miniSPIM exhibited superior contrast and axial resolution. Therefore, we expect miniSPIM to enable novel endoscopic approaches.

In summary, the application of fiber-optic technology led to the development and advancement of promising research tools that may help to enable novel microscopic studies in neuroscientific research.

Überblick

Miniaturisierte, auf Faseroptik basierende Bildgebungsverfahren ermöglichen neue mikroskopische Untersuchungen in Bereichen der biologischen Grundlagenforschung und sie eröffnen (in abgewandelten Implementierungen) neue Wege in der klinischen Anwendung, wie zum Beispiel die endoskopische Diagnose und Behandlung von Tumoren. Insbesondere in den Neurowissenschaften führt die Entwicklung von miniaturisierten, leichten Fasermikroskopen aktuell auf ein langjähriges Ziel im Bereich der Bildgebung des Gehirns mit zellulärer Auflösung: Kleine, tragbare Mikroskope versprechen Messungen der neuronalen Dynamik, welche bestimmten Verhaltensweisen in wachen, sich frei bewegenden Tieren zugrunde liegt. Somit können solche Geräte dazu beitragen, die Grenzen gegenwärtiger (Zwei-Photonen) *in vivo* Bildgebungsexperimente zu überwinden, welche unter narkosebedingten Artefakten in den neuronalen und astrozytischen Aktivitätsmustern leiden. Darüber hinaus können eng verwandte endoskopische Methoden hochauflösende Bildgebung in tiefen Hirnregionen ermöglichen, die andernfalls nicht für optische Analysemethoden zugänglich sind. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedenartige faseroptische Technologien angewendet, um hochauflösende Ein- und Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Bildgebungsmethoden im Gehirn zu entwickeln und zu verbessern.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein miniaturisiertes Zwei-Photonen-Mikroskop (Fasermikroskop) entwickelt, charakterisiert und in *in vivo* Bildgebungsexperimenten angewendet. Der distale Mikroskopkopf wog dabei nur 0.6 g (unseres Wissens ist das Weltrekord) und es konnten Mikrometer-Auflösungen in Bildfeldern von $200\ \mu\text{m}$ mit Bildwiederholfräquenzen von mehr als 25 Hz erreicht werden. Das Gerät bestand aus einer photonischen Kristallfaser mit hohlem Kern für eine effiziente Zuführung von nahinfraroten Femtosekunden-Laserpuls, einem Spiral-Faserscanner für die resonante Strahlablenkung und einer Baugruppe aus Gradientenindexlinsen und Mikroprismen für die Fluoreszenz-Anregung, dichroitische Strahlteilung und Signalsammlung. Das Fluoreszenz-Emissionenlicht wurde durch eine Kunststoff-Faser mit großem Kerndurchmesser zum optischen Tisch geleitet und proximal mit einem Photomultiplier nachgewiesen. Die Empfindlichkeit des Instruments war ausreichend, um aktionspotential-evozierte Calciumtransienten in Purkinje-Zellen im Rattenkleinhirn aufzulösen. Daher lässt sich folgern, dass das Fasermikroskop gut geeignet ist, um zelluläre Aktivität in Gehirnstrukturen *in vivo* zu beobachten. Ein Nachteil war jedoch, dass sich die photonische Kristallfaser (eine der optischen Kernkomponenten) als nicht robust genug herausstellte und weitere Experimente auf dem Weg zur Bildgebung in frei beweglichen Tieren durch irreparable Kontaminationen dieser behindert wurden.

Basierend auf den Erfahrungen mit dem miniaturisierten Zwei-Photonen Fasermikroskop wurden im zweiten Teil dieser Doktorarbeit Kunststofffasern mit großem Kerndurchmesser eingesetzt, um die Effizienz der Fluoreszenzsammlung in einem

konventionellen, stationären Zwei-Photonen-Mikroskop zu erhöhen. Da die Fluoreszenzanregung in nichtlinearen Mikroskopen auf die Nähe des optischen Fokuspunktes beschränkt ist, konnte ein richtig positionierter Ring aus Großkernfasern die Lichtausbeute auf mehr als das Doppelte verbessern. Diese Effizienzerhöhung wurde durch die Sammlung eines Teils derjenigen Fluoreszenzphotonen erreicht, die zwar rückwärts (in Richtung des Mikroskopobjektivs) emittiert wurden, jedoch nicht durch das Objektiv nachgewiesen werden konnten und somit in der Regel verloren gingen. Wir bezeichneten diese Technologie als SUFICS, kurz für Supplementary Fiber-Optic Light Collection System. Die Studie umfasste eine ausführliche analytische Behandlung, numerische Monte-Carlo-Simulationen und experimentelle Verifikationen. Sowohl tiefe *in vivo* Bildgebungsuntersuchungen im Maus-Neokortex als auch funktionelle Calcium-Bildgebungsexperimente profitierten erheblich vom Signalzugewinn durch SUFICS. Aufgrund seiner Einfachheit und Universalität erwarten wir zahlreiche Anwendungen für SUFICS in verschiedenen Forschungsgebieten mit nichtlinearen Mikroskopen.

Als Alternative zu Methoden mit Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung wurde im dritten Teil dieser Doktorarbeit die Ein-Photonen-Lichtscheibenmikroskopie auf Faseroptik angepasst: Ein miniaturisiertes Selective Plane Illumination Microscope (miniSPIM) wurde entwickelt, charakterisiert und für die biologische Bildgebung angewendet. Konkret wurde das Anregungslicht dem Kopfteil durch eine Single-Mode-Glasfaser zugeführt und damit eine Lichtscheibe mit einer zylindrischen Gradientenindexlinse und einem rechtwinkligen Mikroprisma erzeugt. Demzufolge konnte die Fluoreszenz von der Seite in einer ganzen Ebene angeregt werden anstatt nur in einem Punkt oder Kegel von oben wie in konventionellen Mikroskopen. Das Fluoreszenz-Emissionslicht wurde rechtwinklig zur Lichtscheibe durch eine zweite Gruppe von Gradientenindexlinsen und ein kohärentes Faserbündel gesammelt und mit einer proximalen CCD-Kamera nachgewiesen. Im Gegensatz zum herkömmlichen Betrieb zeigte das miniSPIM deutliche Überlegenheit bezüglich Kontrast und axialem Auflösungsvermögen. Somit erwarten wir vom miniSPIM neuartige endoskopische Möglichkeiten.

Zusammenfassend führte die Anwendung von Glasfaser-Technologien zur Entwicklung und Verbesserung von vielversprechenden Forschungswerkzeugen, welche neuartige Mikroskopieexperimente in der neurowissenschaftlichen Forschung ermöglichen können.