

Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

CARS-Mikroskopie mit ultrabreitbandigen Er:Faserlasern

Anwendungsfreundliche Anregungs-Laser und die Unterdrückung des nicht-resonanten Untergrunds sind die Grundlage für den breiten praktischen Einsatz der CARS-Mikroskopie. Wissenschaftler des Centrums für Angewandte Photonik der Universität Konstanz gelang es im Rahmen eines durch die Baden-Württemberg Stiftung finanzierten Projekts, die CARS-Mikroskopie für die klinische und industrielle Anwendung weiterzuentwickeln.

Die optische Mikroskopie spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der biologischen Wissenschaften. In den letzten Jahren hat insbesondere die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eine große Bedeutung gewonnen. Diese ergibt nach vorheriger Präparation der Probe mit fluoreszierenden Proteinen oder synthetischen Farbstoffen hochaufgelöste, dreidimensionale Abbildungen. Die nötige Anfärbung ist allerdings ein Nachteil dieser Technik. Hinzu kommt, dass alle Markierungsfarbstoffe ausbleichen, was die erzielbaren Beobachtungsdauern stark einschränkt.

Aus diesem Grund wird in den letzten Jahren sehr intensiv an der Erforschung neuer Methoden zur chemisch selektiven, räumlich hochauflösenden Mikroskopie mit Kontrasterzeugung ohne vorherige Anfärbung der Proben gearbeitet. Eine besondere Rolle nimmt hierbei die Mikroskopie mit Kontrasterzeugung auf der Basis von molekularen Schwingungen ein. Der Einsatz von Infrarot (IR)-Absorptionsmikroskopie und Ramanmikroskopie ist in biomedizinischen Anwendungen wegen der starken Absorption von Wasser (IR) und der langen nötigen Integrationszeiten (Raman) jedoch schwierig.

Diese Probleme werden mit der Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Mikroskopie umgangen. Für diese nicht-lineare optische Technik werden zwei Laserstrahlen gleichzeitig auf die Probe fokussiert. Wenn die Frequenzdifferenz der beiden Strahlen einer Schwingungsresonanz der Probenmoleküle entspricht, dann wird ein intensives Signal bei einer neuen Frequenz erzeugt. Das Signal kann über einfache Filter leicht von den Anregungswellenlängen getrennt werden.

Der breite Einsatz der CARS-Mikroskopie scheiterte bisher an zwei Schwierigkeiten: Einerseits waren die benötigten Laserlichtquellen bislang sehr groß, empfindlich und aufwändig im Betrieb, so dass ein Einsatz beispielsweise in einer klinischen Umgebung kaum vorstellbar war. Andererseits wurde mit dem CARS-Signal immer auch ein nicht-resonanter Untergrund erzeugt, der die Empfindlichkeit der Technik einschränkte.

Beide genannten Punkte wurden in einem von der Baden Württemberg Stiftung geförderten Projekt von Frau Prof. Dr. Elisa Ferrando-May, Herrn Prof. Dr. Alfred Leitenstorfer und Herrn Prof. Dr. Andreas Zumbusch, alle an der Universität Konstanz, adressiert. Im Rahmen dieses Projekts wurde zunächst gezeigt, dass die am Lehrstuhl Leitenstorfer entwickelte Er:Faserlaser-Technologie für die CARS-Mikroskopie genutzt werden kann. Auf Basis dieser Technologie entstandene robuste, kleine und im Betrieb sehr zuverlässige Anregungslichtquellen werden von der Toptica Photonics AG vertrieben. Mit einem derartigen Lasersystem sind die in Abb. 2 gezeigten Aufnahmen von menschlichen Fettzellen über viele Tage möglich, was vollkommen neue Einblicke in die zellbiologischen Prozesse des Fettstoffwechsels ermöglicht.

Er:Faserlaser bieten aber auch eine große Flexibilität hinsichtlich der Dauern der erzeugten Laserpulse. Dies konnte im Rahmen des Projekts genutzt werden, um den störenden nicht-resonanten Untergrund vollständig zu unterdrücken, was auch in Aufnahmen an lebenden Fadenwürmern gezeigt werden konnte.

Als interessanter Nebenaspekt wurde dabei auch demonstriert, dass neben dem CARS-Signal mit der zweiten und

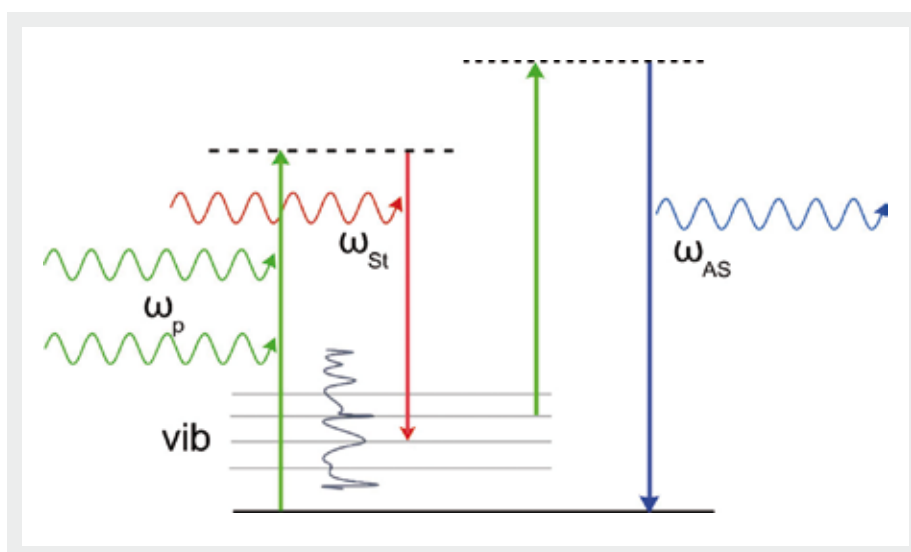


Abb. 1: Schematische Darstellung des klassischen CARS-Anregungsprozesses. Zwei Anregungslaser mit den Frequenzen ω_p und ω_{st} werden eingestrahlt. Wenn $\omega_p - \omega_{st}$ mit der Frequenz eines molekularen Schwingungsübergangs übereinstimmt, wird ein resonanzverstärktes Signal bei ω_{as} erzeugt

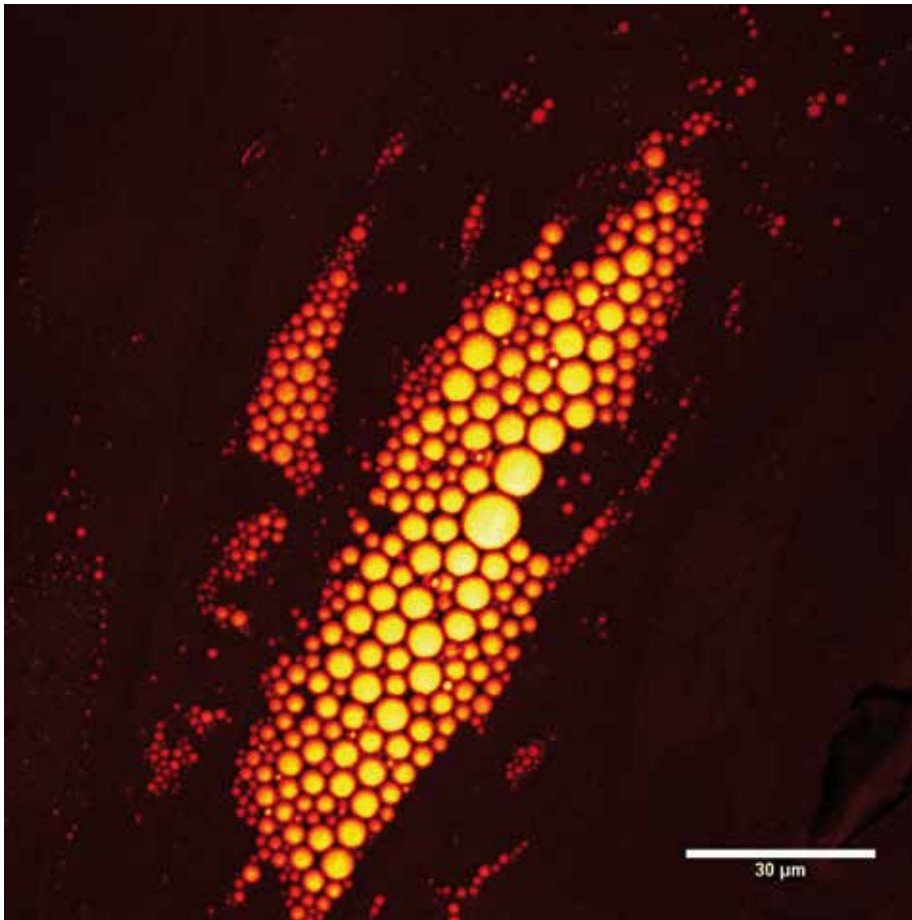


Abb. 2: CARS mikroskopische Aufnahme einer ungefärbten, lebenden menschlichen Fettzelle, aufgenommen bei einer Resonanzfrequenz von 2845 cm⁻¹, bei der insbesondere Lipide starken Kontrast zeigen

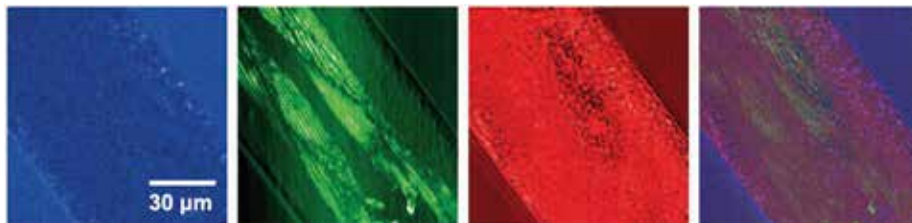


Abb. 3: Simultan aufgenommene Kontraste ungefärbter, lebender *C. elegans* Fadenwürmer bei THG (blau), SHG (grün), CARS (rot) und deren Überlapp (ganz rechts), Pulsdauer des Aufnahme-Laserstrahls im Objektivfokus etwa 7 fs

ritten Harmonischen (second harmonic generation, SHG und third harmonic generation THG) auch zwei andere nicht-lineare optische Signale auftreten, die zueinander komplementäre Signale liefern. Sind die Laserpulse kurz genug, so gelingt die Abbildung der drei verschiedenen Kontrastmodalitäten mit einem einzigen Laserstrahl. Die Technik für die Erzeugung und iterationsfreie Charakterisierung solcher Pulse mit Dauern von weniger als 7 fs im Fokus eines hochwertigen

Mikroskopobjektivs wurde dabei ebenfalls im Rahmen dieses Projekts entwickelt. Neben den Anwendungen auf biologische Proben (s. Abb. 3) zeigte sich, dass die im Rahmen des Projekts entwickelten Techniken sich auch hervorragend für die mikroskopische Charakterisierung von materialwissenschaftlichen Proben wie beispielsweise dünne Polymerfilme eignen.

Literatur:

- [1] G. Krauss, T. Hanke, A. Sell, D. Träutlein, A. Leitenstorfer, R. Selm, M. Winterhalder, A. Zumbusch „A compact coherent anti-Stokes Raman scattering microscope based on a picosecond two-color Er: fiber laser system“, *Opt. Lett.*, 34 (2009) 2847-2849
- [2] R. Selm, M. Winterhalder, A. Zumbusch, G. Krauß, T. Hanke, A. Sell, A. Leitenstorfer „Ultrabroadband background-free Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy based on a compact Er: fiber laser system“, *Opt. Lett.*, 35 (2010) 3282-3284
- [3] R. Selm, G. Krauss, A. Leitenstorfer, A. Zumbusch, „Simultaneous second-harmonic generation, third-harmonic generation, and four-wave mixing microscopy with single sub-8 fs laser pulses“, *Appl. Phys. Lett.*, 99 (2011) 181124.
- [4] R. Selm, G. Krauss, A. Leitenstorfer, A. Zumbusch „Noniterative characterization of few-cycle laser pulses using flattop gates“. *Opt. Expr.*, 20 (2012) 5955-5961.
- [5] D. Brida, G. Krauss, A. Sell, A. Leitenstorfer „Ultrabroadband Er: fiber lasers“. *Laser & Photonics Reviews*, in press (May 2014); DOI: 10.1002/lpor.201300194

Kontakt:

Prof. Dr. Andreas Zumbusch
Universität Konstanz
Department Chemie
Fach 722
78457 Konstanz

Tel. 07531 882357

andreas.zumbusch@
uni-konstanz.de

<http://cms.uni-konstanz.de/zumbusch/>