

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Fizikos fakultetas

Lazerinių tyrimų centras

Oskaras Venckus

**BIOLOGINIŲ BANDINIŲ NETIESINĖ POLIARIMETRINĖ
PLATAUS LAUKO MIKROSKOPIJA**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinės fizikos ir optinių technologijų
studijų programa

Studentas Oskaras Venckus

Leista ginti 2021-05-18

Darbo vadovas prof. dr. Virginijus Barzda

Konsultantas dr. Lukas Kontenis

Centro direktorius prof. dr. Aidas Matijošius

Vilnius 2021

TURINYS

ĮVADAS	3
SANTRUMPOS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1. 1. Tiesinė optinė mikroskopija	5
1. 2. Antrosios harmonikos generacija.....	6
1. 3. Dviejų fotonų sužadavimo fluorescencija.....	8
1. 4. Molekulinių struktūrų identifikavimas	10
1. 5. Netiesinė poliarimetrinė mikroskopija.....	10
2. METODAI.....	15
2. 1. Mikroskopo schema	15
2. 2. Bandiniai	17
2. 3. Eksperimento eiga.....	17
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	19
IŠVADOS.....	27
SUMMARY	28
LITERATŪRA.....	29

ĮVADAS

Netiesinė optinė mikroskopija vaizdams gauti naudoja reiškinius, vykstančius intensyviuose elektromagnetiniuose laukuose. Šių reiškinių intensyvumas proporcingas žadinančios spinduliuotės intensyvumo kvadratui, todėl, fokusuojant šviesą, galima žadinti bandinį tūryje. Biologinė medžiaga silpnai sugeria infraraudonąją spinduliuotę ir mažai ją sklaido, todėl ji dažnai naudojama netiesinėje mikroskopijoje ir leidžia registruoti vaizdus iki 1 mm gylyje. Vienas netiesinės optikos reiškiny – antros harmonikos generacija – vyksta intensyviai spinduliuotei sklindant centro simetrijos neturinčia terpe. Biologiniuose bandiniuose tuo pasižymi tik kelios skaidulinės molekulės: miozinas – sudedamoji raumeninių skaidulų dalis, atsakinga už raumenų susitraukinėjimą, kolagenas – struktūrinis baltymas, randamas tarpląstelinėje erdvėje. Jis atlieka įvairias funkcijas: palaiko organų ir audinių formą, padeda kai kurioms ląstelėms judėti tarpląstelinėje erdvėje ir t.t.

Netiesinė mikroskopija šiuos baltymus leidžia vaizdinti chemiškai neapdorojus, todėl galima ją pritaikyti neinvazinei medicininei apžiūrai. Kolageno sudaroma struktūra yra svarbi jo atliekamai funkcijai, todėl anomalūs jos pakitimai gali signalizuoti tam tikrų ligų vystymosi pradžia. Kuo anksčiau liga aptinkama, tuo mažesnė patiriama žala. Poliarimetrija atskleidžia dar daugiau struktūras charakterizuojančių parametrų, todėl tai perspektyvi tyrimų sritis.

Plataus lauko vaizdinimas retai sutinkamas netiesinėje mikroskopijoje, nes ilgą laiką didelės galios impulsinių lazerių pasikartojimo dažnis buvo per mažas. Tačiau plataus lauko mikroskopas gali vaizdinti visą regimąjį lauką vienu metu, todėl tinka greitiems gyvų sistemų procesams stebėti (pvz: raumens skaidulos susitraukinėjimams) arba dideliame kiekiui klinikinių bandinių vaizdinti. Šiame darbe buvo siekiama patikrinti kokios yra tokio mikroskopo taikymo galimybės poliarimetriniams tyrimams.

Darbo tikslas: sukonstruoti plataus lauko netiesinį optinį poliarimetrinį mikroskopą.

Darbo uždaviniai:

- Užregistruoti dviejų fotonų sužadavimo fluorescencijos signalą, antros harmonikos generaciją miozine, kolagene, atlikti poliarimetrinę analizę;
- Ištirti kolageno skaidulų persiklojimo kampu įtaką antros harmonikos generacijos intensyvumo priklausomybei nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos.

SANTRUMPOS

AD – apskritiminis (poliarizacijos) dichroizmas

AHG – antros harmonikos generacija

DFSF – dviejų fotonų sužadavimo fluorescencija

FDS – fundamentinio dažnio spinduliuotė

H&E – hematokslinas ir eozinas (dažymo metodo pavadinimas)

NOM – netiesinis optinis mikroskopas / netiesinė optinė mikroskopija

PAHG – į poliarizaciją atsižvelgianti AHG mikroskopija

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Pirmieji mikroskopai suteikė galimybę išvysti anksčiau nematytus dalykus, suprasti, kad visa kas gyva sudaryta iš mažiųjų, plika akimi neįžiūrimų ląstelių. Tobulėjant optinių elementų gamybos technikoms, paaiškėjo, kad vaizdo ryškumą lemia ne tik lęšių kokybė, bet ir teorinė riba, dėl kurios mažesnių objektų pamatyti negalima [1]. Šiais laikais yra atrasta daug būdų tą ribą apeiti, tačiau mokslininkus domina ne vien tai.

Kur kas kebliau yra tinkamai paruošti bandinį stebėjimui. Dėl mažo ryškumo gylio, bandinys turi būti atpjautas itin plonais sluoksniais. Toks bandinys yra perregimas ir nekontrastingas. Nudažymas šią problemą sprendžia, tačiau niekada negali žinoti kaip ši invazinė procedūra stebėjimo objektą paveikė. Todėl ieškoma būdų padidinti norimos struktūros kontrastą sukeltant kaip įmanoma mažiau dirbtinių pakitimų [2].

1. 1. Tiesinė optinė mikroskopija

Pirmiausiai plonų biologinių bandinių matomumui gerinti buvo naudojami dažai. Nudažius struktūras, jos atrodo tamsesnės, nes prasčiau praleidžia šviesą. Histologai dažniausiai naudoja dažymo hematoksilinu ir eozinu (H&E) techniką [3]. Hematoksilino dažymo mišinys naudojamas rūgštinių bandinio sričių dažymui. Jis dažo nukleorūgštis (DNR, RNR), todėl nuspalvina ląstelių branduolius, ribosomas. Iš pradžių dažas yra violetinės spalvos ir vizualiai sunku jį atskirti nuo rausvai dažančio eozino, bet veikiant silpnai šarminiu vandens tirpalu, hematoksilinu paveiktos sritys įgyja mėlyną spalvą. Eozinas nespecifiškai jungiasi su baltymais, todėl juo nusidažo beveik visos ląstelėje esančios struktūros. H&E dažymas aktualus iki šiol, nes ryškiai nuspalvina branduolius. Tada galima įvertinti jų formą, dydžio santykį su visos ląstelės. Ši informacija naudinga norint atpažinti įvairias ligas, įskaitant ir vėžinius darinius [3].

Fluorescencinė mikroskopija pagrįsta norimų struktūrų žymėjimu specialiomis molekulėmis-žymekliais. Sugerdami tam tikro dažnio šviesą, jie fluorescuoja žemesnio dažnio šviesą. Šiais laikais molekules-žymeklius galima transportuoti ir prikabinti prie bet kokios norimos struktūros. Vaizdinant, žadinančios spinduliuotės spektrinė sritis yra užblokuojama, o į detektorius surenkamas tik fluorescuojančių molekulių sklaidžiamas signalas [4].

Mikroskopijoje yra dvi vaizdų gavimo technikos: plataus lauko ir skenuojanti. Pirmoji

yra paprastesnė, jai nebūtinai judantys optinių elementų. Plataus lauko mikroskopu galima užregistruoti visą regėjimo lauką vienu metu. Pagrindinis trūkumas yra ribotas bandinio storis. Kuo storesnis bandinys, tuo labiau sklaida užgožia vaizdą, todėl nukenčia jo kokybė.

Antrąją techniką įgyvendinti sudėtingiau, nes pluoštas turi būti sukonzentruojamas į kaip įmanoma mažesnę židinių bandinyje. Nuo to priklauso mikroskopo skiriamoji geba. Žadinantis pluoštas yra valdomas skenuojančiais veidrodžiais. Židinyje keliauja per bandinį, o iš jo srities gautas fluorescencijos signalas yra surenkamas didele sparta veikiančiu taškiniu detektoriumi. Po skenavimo suformuojamas gautas vaizdas [4]. Vienas populiariausių skenuojančių mikroskopų – konfokalinis fluorescencinis. Kad pagerintų ryškumą, šis mikroskopas užblokuoja ne židinio plokštumoje esančią šviesą mažo skersmens ($d < 30 \mu\text{m}$) apertūra. Todėl galima tirti ir storesnius bandinius. Dar vienas tokio mikroskopo privalumas – galima skenuoti erdvinį vaizdą ir pasiekti artimą difrakcijai skiriamąją gebą. Tačiau toks vaizdinimo būdas yra palyginus lėtas, nes vienu metu galima stebėti tik vieną tašką. Plataus lauko mikroskopas per tą patį laiką gali užregistruoti visą regėjimo lauką. Dar vienas konfokalinio mikroskopo trūkumas – žadinanti spinduliuotė apšviečia didžiulę smėlio laikrodžio formos sritį abipus židinio plokštumos, kuri veltui fluorescuoja, nes tas signalas detektoriaus nepasiekia. Laikui bėgant molekulės blunka, t.y. praranda gebėjimą fluorescuoti, todėl bereikalingas jų žadinimas yra vengtinas [5].

1. 2. Antrosios harmonikos generacija

Kai buvo sukurtas lazeris, tapo įmanoma didelės galios spinduliuotę sufokusuoti labai mažame tūryje. Netrukus pirmą kartą pademonstruoti ir netiesinės optikos reiškiniai. Kai jie buvo geriau suprasti, imta juos naudoti įvairiems mikroskopijos kontrastams įgyvendinti, o ta sritis pavadinta netiesine optine mikroskopija (NOM).

Prabėgus vieneriems metams po pirmojo lazerio sukūrimo, 1961 m. P. A. Franken laboratorijoje buvo atliekami eksperimentai su impulsiniu rubino lazeriu. Jo sklaidžiamą spinduliuotę nukreipus į kvarcą, buvo pastebėtas dvigubo dažnio spinduliuotės atsiradimas. Tas reiškinys vėliau buvo pavadintas antrosios harmonikos generacija (AHG) [6]. Medžiaga, tinkama optinių harmonikų generacijai, turi būti skaidri tiek fundamentinio dažnio spinduliuotei (FDS), tiek norimo aukštesnių dažnių obertonams ir turėti nenulinį netiesinį dielektrinį koeficientą. Dielektrinės medžiagos poliarizuotumo P priklausomybę nuo

elektrinio lauko E supaprastintai galima išreikšti taip:

$$P = XE (1 + a_1E + a_2E^2 + a_3E^3 + \dots) = p_0 + p_1 + p_2 + \dots \quad (1)$$

kur X – tiesinio poliarizavimo konstanta. Už antros harmonikos generaciją atsakingas narys Xa_1E^2 . Elektrinio lauko kitimas elektromagnetinių bangų atveju aprašomas sinusoide, todėl $E = E_0 \sin \omega t$. Išreiškiame kvadratinio poliarizuotumo narį:

$$p_1 = Xa_1E_0^2 \sin^2 \omega t = Xa_1E_0^2 \sin^2 \omega t = Xa_1 \left(\frac{E_0^2}{2} \right) (1 - \cos 2\omega t). \quad (2)$$

Lygtis duoda ne tik dvigubo dažnio elektrinio lauko virpesius $\cos 2\omega t$, bet ir pastovaus nepusiausvyro lauko dedamąją. Izotropinėse ir centro simetriją turinčiose terpėse savaime negali atsirasti pastovaus elektrinio lauko dedamoji, todėl lyginių harmonikų generacija jose vykti negali. Būtina AHG sąlyga – centro simetrijos nebuvimas. Toks pat ribojimas galioja ir medžiagoms, pasižyminčiomis piezoelektrinėmis savybėmis. Tai parodyta eksperimentiškai: stikle, turinčiame izotropinę struktūrą AHG neįmanoma sukelti AHG [7].

Po to įsibėgėjo medžiagų, kuriose vyksta AHG paieškos. Paprasčiausia buvo su kristalais, turinčiais piezoelektrinių savybių, nes jų struktūra neturi centro simetrijos [8]. Tačiau biologinės kilmės medžiagos buvo ne ką mažiau įdomios. Tirdami arklių ir jaučių Achilo sausgysles, kuriose gausu kolageno, Fukada ir Yasuda atrado, kad kolagenas pasižymi piezoelektrinėmis savybėmis [9], todėl kilo įtarimų, kad kolagenas galėtų sukelti AHG. Nors tuo metu dar nežinojo apie kolageną akyje, 1965 m. Sovietų Sąjungos mokslininkai teigė, kad plika akimi matė infraraudonąją spinduliuotę AHG pavidalu [10].

S. Fine ir W. P. Hansen 1971 metais buvo pirmieji aptikę AHG signalą biologiniuose audiniuose. Pasitelkę moduliutos kokybės rubino lazerį (694 nm) su elektrooptine sklende, jie ištyrė triušio ir šuns akių odenas, ragenas, lęšiukus tinklainės-gyslainės audinius, triušio pilvo srities odą, Achilo sausgyslę, kraują, pelės naviko melanosomas. Daug kolageno turintys audiniai: ragena, odena, sausgyslė ir oda apšviesti lazerine spinduliuote, duodavo siauros juostos 347 nm bangos ilgio AHG signalą. Tuo tarpu apšvietus lęšiuką, tinklainės-gyslainės audinį, kraują ir melanosomas, AHG nebuvo aptiktas [11].

Netiesinis mikroskopas pirmą kartą pademonstruotas prieš daugiau nei 40 metų. Tai buvo skenuojantis mikroskopas, skirtas stebėti skaidrius neorganinius bandinius. 1,06 μm bangos ilgio, 0,5 W galios nuolatinės veikos lazerinis pluoštas buvo sufokusuotas beveik difrakcijos apribotoje dėmėje. Skenuojant bandinį, suminio dažnio fotonai buvo gaudomi šaldomu fotodaugintuvu ir, moduluojant pagal signalo intensyvumą, atvaizduojami

osciloskopo ekrane. Kadangi žadinimo spinduliuotės šaltinis buvo nuolatinės veikos lazeris, toks mikroskopas nebuvo labai efektyvus, bandinys nespėdavo atiduoti šilumos, todėl riboja galią, o antros harmonikos generacija vyko beveik šratinio triukšmo lygyje. Tačiau pavyko pamatyti tradiciniais mikroskopais nematomas netiesinio kristalo struktūras – smulkius įbrėžimus, poliravimo žymes [12].

Kai NOM imta taikyti ir biologiniams objektams vaizdinti, mikroskopu, kurio skiriamoji geba buvo $\sim 50 \mu\text{m}$, gautas AHG signalas iš žiurkės uodegos sausgyslės kolageno. Pastebėta, kad kolageno orientacija tvarkingai orientuota ilgais atstumais [13]. Kai pradėti naudoti femtosekundiniai lazeriai, imta vaizdinti geresne skiriamąja geba ir didesne sparta, o taip pat ir didesniame, net šimtų mikrometrų gylyje. Jau buvo suprasta, kad AHG šaltiniais gali būti kolagenas, miozinas ar mikrovamzdeliai, todėl buvo pradėta siūlyti AHG kontrastą taikyti medicininiais tikslams [14].

Kadangi kontrastui išgauti nebūtinai cheminis apdorojimas, pastaruoju metu skiriamas dėmesys gyvų organizmų neinvaziniam stebėjimui. Tik neseniai tapo įmanoma efektyviai panaudoti plataus lauko AHG vaizdinimą, tačiau ši sritis yra labai perspektyvi. Pavyzdžiui, Toronto universiteto mokslininkai parodė, kad AHG plataus lauko mikroskopu galima 10 kadru per sekundę dažniu stebėti drozofilos lervos raumenų susitraukinėjimą jos nenužudant. Didelės spartos neinvazinis raumenų AHG vaizdinimas leistų gauti naudingos informacijos apie kinetinius procesus, ištirti ligų, tokių aritmija ar raumenų distrofija pasireiškimą, arba atskleisti įvairių vaistų teigiamus ar šalutinius poveikius. Plataus lauko AHG mikroskopas taip pat gali būti pritaikytas histopatologijoje, nes susidaro dideli kiekiai bandinių, kuriuos reikia kaip įmanoma greičiau ištirti ir padėti specialistams kuo anksčiau nustatyti diagnozę [15].

1. 3. Dviejų fotonų sužadavimo fluorescencija

Maria G. Mayer savo disertacijoje dar 1931 m. iškėlė teoriją apie dviejų fotonų sugerties galimybę [16]. Tikrovėje reikškinį pademonstruoti pavyko W. Kaiser ir C. G. B. Garrett. Jie pasirinko naudoti kubinės simetrijos kalcio fluorida kristalą, kad galėtų įrodyti, jog stebima ne AHG. Kristalas buvo legiruotas iki 0,1 % koncentracijos legiruotą europio jonais ($\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$). Jonai pasižymėjo stipria 330–400 nm šviesos sugertimi ir mėlynos šviesos fluorescencija, su centriniu bangos ilgiu ties $\sim 420 \text{ nm}$. Kristalas dėl draustinės juostos tarpo ilgesnių nei 455 nm bangų sugerti negalėjo. Sufokusavus raudoną 694 nm lazerio šviesą kristale, buvo užregistruota mėlynos šviesos 425 nm bangos ilgio dviejų fotonų sužadavimo fluorescencija (DFSF). Kristalą

pakeitus grynu, nelegiruotu kalcio fluorida kristalu, DFSF neįvyko. Jiems taip pat pavyko parodyti, kad kaip numatė Mayer, kristale atsirandančios mėlynos spinduliuotės intensyvumas buvo proporcingas kritusios raudonos spinduliuotės intensyvumo kvadratui [17].

Pirmą skenuojantį DFSF mikroskopą sukūrė W. Denk ir J. H. Strickler, naudodami sinchronizuotų modų dažų lazerį (bangos ilgis 630 nm, impulsų pasikartojimo dažnis 80 MHz, impulso trukmė 100 fs). Pro mikroskopą jie stebėjo 6–9 μm skersmens fluorescuojančias polistireno sferas, sugeriančias 365 nm bangos ilgio šviesą ir kiaulės kepenų ląsteles, turinčias dažytos DNR. Bandiniai buvo skaidrūs lazerinei spinduliuotei, tačiau pluošto židinyje intensyvumas buvo pakankamas dviejų fotonų sugerčiai. Kadangi DFSF signalo intensyvumas proporcingas žadinančios spinduliuotės intensyvumui pakeltam kvadratu, DFSF tikimybė tolstant nuo židinio staigiai krenta, tai leidžia atlikti optinį sekcionavimą. Paprastai skenuojančiame mikroskope tą funkciją atlieka konfokalinė apertūra, tačiau DFSF mikroskope ji nereikalinga. Ją pašalinus, į detektorių patenka santykinai daugiau signalo. Taip pat blunka tik ta sritis, kuri tuo metu yra vaizdinama. Tai dar vienas DFSF mikroskopijos privalumas. Pakartotinai skenuodamas vaizdą vienoje plokštumoje, Denk ir Strickler mikroskopas išblukindavo tik 2 μm storio sritį [18]. Biologinė medžiaga ilgesnio bangos ilgio šviesą mažiau sklaido, todėl DFSF skenuojantis mikroskopas gali vaizdinti didesniame gylyje, nei konfokalinis fluorescencinis mikroskopas. P. Theer ir M. T. Hasan sugebėjo gauti žalio fluorescuojančio baltymo DFSF vaizdus iš gyvų pelių smegenų net 1000 μm gylyje [19].

Nors NOM eksperimentams reikalinga didelio intensyvumo spinduliuotė, buvo manoma, kad didinant žadinimo intensyvumą, blukti turėtų tik žadinama sritis. Tačiau buvo įrodymų, kad nuo tam tikro intensyvumo slenksčio, pakartotinai skenuojant bandinį, jame ima kauptis pažaidos [20]. Iš pradžių laikyta, kad dėl intensyvios žadinančios spinduliuotės bandinio sritis yra įkaitinama iki denatūruojančių temperatūrų, nes pažaidos atsirasdavo net ir nesant pigmentinių molekulių bandinyje. Tačiau greitai pademonstruota, kad pluošto židinyje lokali temperatūra nepakyla daugiau nei 3° C nuo aplinkos lygio net ir esant nuolatinės veikos 100 mW galios švitinimui, nes didžioji dalis spinduliuotės nėra sugerama [21]. A. Hopt ir E. Neher pagal pirmtakų stebėjimus suvedė, kad fotopažaidų kiekis priklausė nuo žadinančios spinduliuotės intensyvumo pakelto laipsniu $\sim I^{2,5}$. Reiškiniui paaiškinti buvo iškelta trifotonės sugerties teorija. Kai bandinys žadinamas 800–900 nm spinduliuote (pvz, titano safyro lazeris), trijų fotonų sugertis prilygtų vieno 250–300 nm fotono sugerčiai. Šioje srityje maksimaliai sugeria DNR ir baltymai ir pakinta jų molekulinės struktūros [22].

1. 4. Molekulinių struktūrų identifikavimas

Užregistruoti AHG ar DFSF vaizdai gali būti panaudoti skaidulinių struktūrų išsidėstymo analizėje. Pavyzdžiui, informacija apie tai kaip audinyje išsidėstęs kolagenas gali daug pasakyti apie audinio tipą ir būklę. Išskiriami 28 kolageno potipiai, iš kurių I, II ir III tipo skaidulos sudaro 80–90 % viso žmogaus kolageno. Skirtumai tarp skirtingų tipų kolageno yra nežymūs, todėl atskirti juos vien iš signalo intensyvumo labai sudėtinga. Yra keli būdai išsiaiškinti kokiomis orientacijomis išsidėsčiusios skaidulos: tekstūrinė, erdvinio spektro ir poliarimetrinė analizės [23].

Tekstūrinę analizę įprastai atlieka ekspertas, gerai pažįstantis audinius ir jų anomalijas. Tačiau pastaruoju metu pasirodė bandymų naudoti mašininio mokymosi algoritmus. Dėl to galima apdoroti žymiai daugiau vaizdų per trumpesnę laiką ir įvertinti juos kiekybiniais parametrais. Apmokymui reikia rankiniu būdu kruopščiai sukategorizuotų duomenų, be to, algoritmas negali atpažinti pavienių molekulių, tik ištikus darinius. Tačiau privalumas tas, kad analizei užtenka tiesiog DFSF intensyvumo vaizdo, todėl atlikti ją paprasčiau [24].

Erdvinio spektro analizei taip pat nereikalinga poliarizacijos informacija. Atlikus vaizdo greitąją Furje transformaciją išryškėja vyraujančios kolageno orientacijos. Metodas gana tiksliai nusako orientacijas, tačiau stipriai nukenčia skiriamoji geba, kadangi Furje transformacija aptinka ne pavienes skaidulas, o jų sudaromą raštą. Nepaisant to, tinka kiekybiniais tyrimams ir gali padėti neinvaziniu būdu diagnozuoti tokias ligas kaip keratokonūsą (akies ragenos deformacija) ankstyvoje stadijoje [25].

Poliarimetrinė analizė tiria bandinio sąveiką su žadinančios šviesos poliarizacijos būseną ir lygina ją su matematinio modeliu, kad nustatytų, kokiomis orientacijomis išsidėsčiusios skaidulos. Ji leidžia išgauti krypties informaciją iš vieno vaizdo taško, todėl jei tik leidžia skiriamoji geba, galima nustatyti pavienių skaidulų orientacijas. Poliarimetrinių duomenų rinkimas ir analizė užtrunka žymiai ilgiau, nes reikia užregistruoti daugybę vaizdų toje pačioje bandinio vietoje esant skirtingiems poliarizacijos parametrams [23].

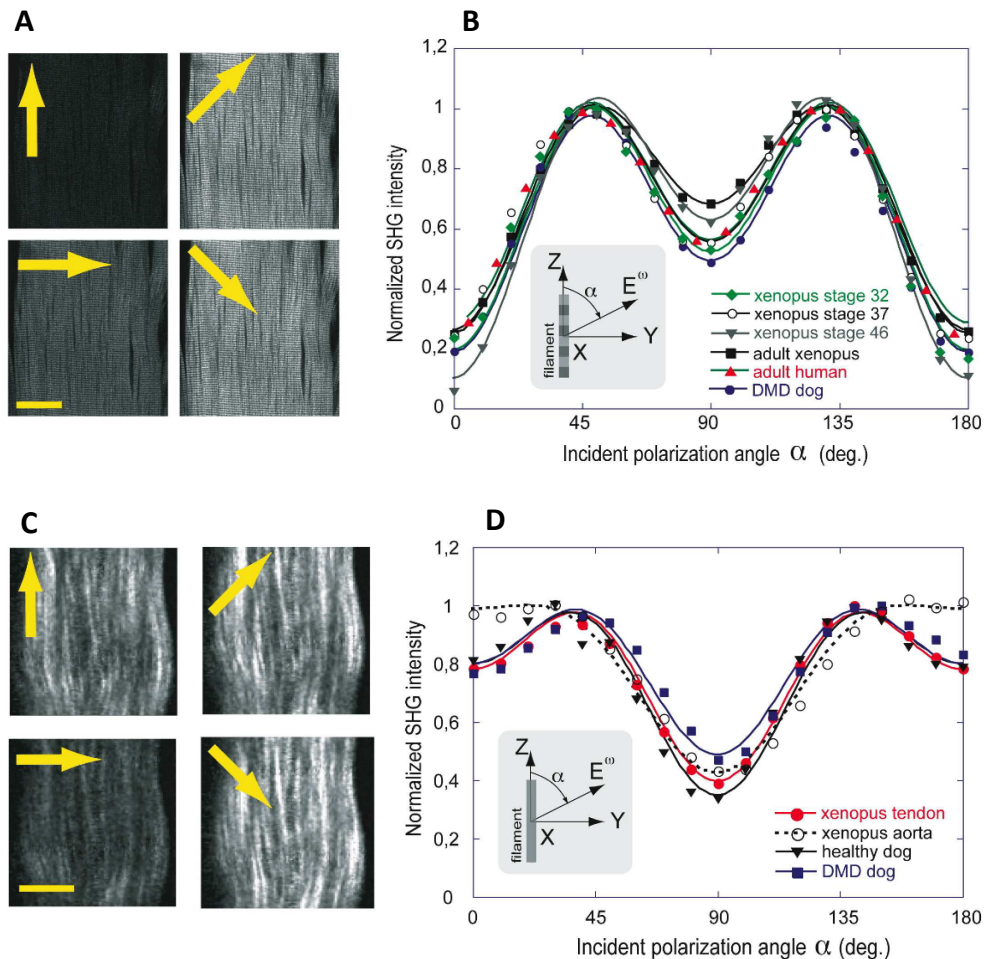
1. 5. Netiesinė poliarimetrinė mikroskopija

Į poliarizaciją atsižvelgianti AHG mikroskopija (PAHG) sprendžia uždavinį, kaip iš bandinio sąveikos su šviesos poliarizacija kuo tiksliau ir patikimiau nustatyti įvairius molekulinių struktūrų parametrus. Kadangi AHG yra sudėtingas procesas, dažnu atveju tenka

iškelti prielaidas. Pavyzdžiui, įprasta laikyti, kad kolageno ir miozino skaidulos pasižymi cilindrine simetrija, pagal kurią netiesinio jautrio tenzoriaus $\chi^{(2)}$ nenykstantys elementai yra d_{31} , d_{33} ir d_{15} . Tada AHG signalo intensyvumo I priklausomybę nuo lazerio spinduliuotės poliarizacijos nusako toks sąryšis:

$$I \sim \left[\sin^2 2(\alpha - \phi) + \left(\frac{\chi_{31}^{(2)}}{\chi_{15}^{(2)}} \sin^2(\alpha - \phi) + \frac{\chi_{33}^{(2)}}{\chi_{15}^{(2)}} \cos^2(\alpha - \phi) \right)^2 \right] \quad (3)$$

čia α – į bandinį kritusios tiesinės lazerio spinduliuotės poliarizacijos kampas, o ϕ – cilindrinę simetriją turinčios skaidulos orientacija [27]. Užregistravus seriją vaizdų keičiant įeinančios spinduliuotės tiesinės poliarizacijos kampą, gaunami kintančio AHG intensyvumo vaizdai (Pav. 1 A ir C). Po to kiekvienam vaizdo taškui pagal surinktas intensyvumo vertes randami parametrai, su kuriais funkcija (3) geriausiai atitinka išmatuotas vertes. Iš tų parametrų galima



1 pav. A – miozino AHG vaizdai esant skirtingai tiesinei poliarizacijai; B – AHG intensyvumo priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampo profiliai skirtinguose raumens bandiniuose; C – kolageno AHG vaizdai esant skirtingai tiesinei poliarizacijai; D – AHG intensyvumo priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampo profiliai skirtinguose kolageno daug turinčių audinių bandiniuose. Paimta iš [26].

apskaičiuoti lateralią skaidulų orientaciją, spiralės sukimo kampą [26].

Dar vienas metodas – matuoti AHG signalo intensyvumą, gaunamą žadinant bandinį kairinio arba dešinio sukimo apskritiminės poliarizacijos lazerine spinduliuote. Dėl kolageno skaidulos chiralizmo, į skirtingo sukimo apskritiminę poliarizaciją jos reaguoja nevienodai. Apskritiminis AHG dichroizmas AD gaunamas pagal formulę:

$$AD = \frac{I_L^{2\omega} - I_R^{2\omega}}{(I_L^{2\omega} + I_R^{2\omega})/2} \quad (4)$$

čia $I_L^{2\omega}$ yra išmatuotas AHG signalo intensyvumas, kai žadinančio pluošto poliarizacija kairinio sukimo, o $I_R^{2\omega}$ – kai dešinio. Nors tiesinėje optikoje AD įgyja vertes intervale $[-1; 1]$, AHG signalo AD įgyja vertes intervale $[-2; 2]$. AD išmatuoti nėra lengva, nes užregistruoto signalo skirtumai yra nedideli ir atsiranda tik kai skaidulos orientacija turi kampą lyginant su vaizdinimo plokštuma. Dėl šios priežasties šis metodas tinka norint gauti skaidulų erdvinę orientaciją. Net ir nedidelė tiesinės poliarizacijos dedamoji rezultata gali sugadinti, todėl reikia itin kruopštaus kalibravimo [28].

Apjungus tiesinės ir apskritiminės poliarizacijos technikas, gaunama Stokes'o-Mueller'io poliarimetrija. Ji pagrįsta šviesos poliarizacijos būsenų aprašymu Stokes'o vektoriais ir tos šviesos sąveikų su įvairiomis terpėmis aprašymu Mueller'io matricomis. Stokes'o vektoriaus ir Mueller'io matricos sandaugos rezultatas yra pro terpės praėjusios šviesos Stokes'o vektorius. Stokes'o vektoriaus prasmė [29]:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} \quad (5)$$

Šviesos, keliaujančios z ašimi S_0 , S_1 , S_2 ir S_3 parametrai yra apibūdinami taip:

$$\begin{aligned} S_0 &= \langle I_x \rangle + \langle I_y \rangle = \langle I_{x'} \rangle + \langle I_{y'} \rangle = \langle I_{RC} \rangle + \langle I_{LC} \rangle, \\ S_1 &= \langle I_x \rangle - \langle I_y \rangle, \\ S_2 &= \langle I_{x'} \rangle - \langle I_{y'} \rangle, \\ S_3 &= \langle I_{RC} \rangle - \langle I_{LC} \rangle. \end{aligned} \quad (6)$$

Stokes'o vektorius nagrinėja šviesos pluoštą kaip dviejų kolinearių keliaujančių bangų superpoziciją. $\langle I_u \rangle$ – žymi tam tikros poliarizacijos bangos vidutinį intensyvumą per laiką τ , kai τ yra žymiai ilgesnis, nei keli optiniai ciklai. Lygtyse x ir y žymi vertikalią arba horizontalią

tiesinę poliarizaciją, x' ir y' taip pat žymi tiesinę poliarizaciją, tik pasuktą 45deg kampu, RC ir LC žymi dešininę (right-hand circular) arba kairinę (left-hand circular) apskritiminę poliarizaciją. S_0 žymi pilną bangos intensyvumą, todėl Stokes'o vektorių galima panaudoti trimačiam normalizuotam bangos poliarizacijos vektoriui aprašyti [29]:

$$\vec{s} = (s_1, s_2, s_3) = \left(\frac{S_1}{S_0}, \frac{S_2}{S_0}, \frac{S_3}{S_0} \right). \quad (7)$$

Vektoriaus modulis nusako poliarizacijos laipsnį P :

$$P = |\vec{s}| = \sqrt{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}, \quad 0 \leq |\vec{s}| \leq 1. \quad (8)$$

Vektorių galime įsivaizduoti kaip patalpintą vienetinėje sferoje (dar vadinamoje Poincaré sfera [30]), kurios paviršius atitinka visiškai poliarizuotos šviesos būsenas, o vidus – dalinai poliarizuotos šviesos būsenas. Sferos pusiaujyje šviesa yra tiesiškai poliarizuota, o ašigaliuose apskritimiškai poliarizuota. Visuose kituose sferos paviršiaus taškuose poliarizacijos būseną yra elipsinė.

Šviesos poliarizacijos būsenos pasikeitimas sąveikoje su optiniais elementais aprašomas Mueller'io matrica \mathbf{M} [29]:

$$\mathbf{S}' = \mathbf{M}\mathbf{S}. \quad (9)$$

Čia \mathbf{S} – šviesos poliarizacijos būseną prieš sąveiką su optiniu elementu, o \mathbf{S}' – po sąveikos su optiniu elementu. Keletas pavyzdžių:

$$\mathbf{M}(LP) = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}; \quad \mathbf{M}(LR) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos \Delta & \sin \Delta \\ 0 & 0 & -\sin \Delta & \cos \Delta \end{bmatrix} \quad (10)$$

Čia $\mathbf{M}(LP)$ – idealaus tiesinio poliarizatoriaus Mueller'io matrica, o $\mathbf{M}(LR)$ – idealios tiesinės banginės su Δ užlaikymu plokštelės matrica. Zonduodami bent keturių skirtingų Stokes'o vektorių į bandinį patenkančių ir išeinančių spindulių Stokes'o vektorius, galime atkurti Mueller'io matricą. Tada pasitelkiant teorinius modelius arba empirinius duomenis, Mueller'io matrica gali suteikti duomenų apie bandinį, kurių neįmanoma užregistruoti kitais mikroskopijos metodais. Yra daugybė pavyzdžių, kaip Stokes'o Mueller'io poliarimetrija gali būti pritaikyta biologinių audinių analizei, ligų diagnostikai ir t.t. [31].

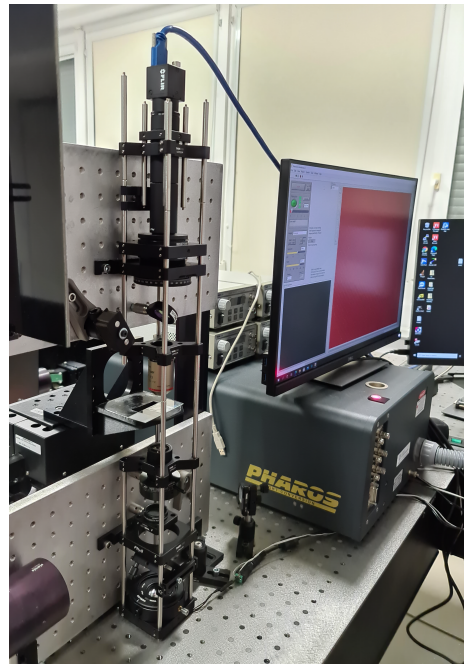
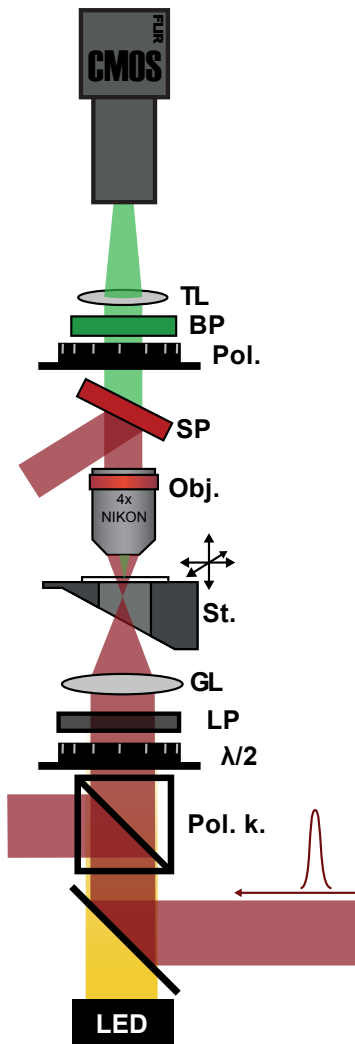
Netiesinės optikos variantas yra dviguba Stokes'o Mueller'io poliarimetrija (DSMP). Kadangi antros harmonikos generacija vyksta sąveikaujant dviems fotonams, Stokes'o vektorius

vietoj keturių verčių turi devynias, o Mueller'io matricos matmenys yra 4×9 . Tokiu atveju nebūtina Kleinmano simetrijos prielaida. Be to su DSMP galima eksperimentiškai įrodyti kada Kleinmano simetrija galioja ir tuo remiantis galima ją toliau taikyti paprastesniuose poliarimetriniuose AHG tyrimuose [32].

2. METODAI

2. 1. Mikroskopo schema

Konstruojamas buvo toks netiesinis optinis mikroskopas, kuriame žadinantis pluoštas fokusuojamas į židinį prieš bandinį (Pav. 2). Tokio plataus lauko mikroskopo schema yra nesunkiai realizuojama ir suteikia daug laisvės valdyti į bandinį patenkančios spinduliuotės intensyvumo pasiskirstymą. Konstrukcijos pagrindas buvo dvi vertikaliai pastatytos aliuminio plokštės su tvirtinimo skylėmis, prie kurių buvo tvirtinami *Thorlabs* „Optical Cage System“ laikikliai ir plieniniai strypeliai.



- CMOS – matrica
- TL – tūbos lęšis
- BP – *band-pass* juostinis filtras
- Pol. – poliarizuojantis filtras
- SP – *short-pass* 700 nm filtras
- Obj. – objektyvas
- St. – bandinio stalelis
- GL – glaudžiamasis lęšis
- LP – *long-pass* 1000 nm filtras
- $\lambda/2$ – pusės bangos ilgio plokštelė
- Pol. k. – poliarizuojantis kubas
- LED – baltos šviesos šaltinis

2 pav. Sukonstruoto plataus lauko netiesinio optinio mikroskopo nuotrauka ir optinė schema.

FDS šaltinis buvo 8 W galios impulsinis lazeris, kurio centrinis bangos ilgis 1030 nm, impulso trukmė 250 fs, o pasikartojimo dažnis 200 kHz (PHAROS, *Light Conversion*). Prieš patekdamas į mikroskopą, pluoštas būdavo susilpninamas motorizuotu atenuatoriumi („*Watt Pilot*“, *Altechna*). Pluošto galią buvo galima valdyti ribose nuo 5 mW iki 7 W. Po to pluoštas buvo nukreiptas į poliarizuojantį pluoštų daliklį, kuris išgrynindavo tiesinės poliarizacijos būseną. Iš kart už jo buvo pusės bangos ilgio plokštelė, įstatyta į rotacinį laikiklį, kuris leido kontroliuoti įeinančios spinduliuotės poliarizacijos kampą. Esant didelei žadinančio spindulio galiai ir ties tam tikromis pusės bangos plokštelės orientacijomis, plokštelė imdavo pati generuoti antros harmonikos signalą, todėl toliau optiniame kelyje sekė ilgabangis filtras **LP** (FEL1000, *Thorlabs*), sulaikantis šviesą regimajame diapazone ir praleidžiantį FDS.

Toliau pluoštas eidavo pro fokusuojantį 30 mm židinio nuotolio glaudžiamąjį lęšį **GL** (AC254-030-AB-ML, *Thorlabs*). Židinyje būdavo laikomas tiesiai po bandiniu, kad už židinio besisukečiantys spinduliai apšviestų norimo dydžio sritį bandinyje. Reguluoti apšviečiamą plotą buvo galima keičiant atstumą nuo šio lęšio iki bandinio.

Priklausomai nuo žadinančios spinduliuotės intensyvumo ir bandinio savybių, jame vykdavo netiesiniai reiškiniai, kurių rezultatas buvo naujų dažnių spinduliuotės atsiradimas. Spinduliuotė buvo surenkama 4x/0,13 NA arba 20x/0,50 NA mikroskopo objektyvu (CFI Plan Fluor, *Nikon*). Už objektyvo buvo įstatytas trumpų bangų iki 700 nm praleidimo filtras **SP** (FES0700, *Thorlabs*), sulaikantis didžiąją dalį FDS. Kad intensyvi spinduliuotė nebegrįžtų į objektyvą ir bandinį ir nesukeltų nepageidaujamų pažeidimų, filtras **SP** buvo išstatytas kampu, nukreipiant nereikalingą spinduliuotę į pluošto gaudyklę. Po to, priklausomai nuo eksperimento, būdavo įstatomas juostinis filtras **BP**: 515–10 nm (FL514.5-10, *Thorlabs*), praleidžiantis tik antrąją harmoniką arba 600–40 nm (FB600-40, *Thorlabs*) dvifotonio sužadavimo fluorescencijos signalui išskirti. Jei to reikalavo eksperimentas, už filtrų būdavo galima įstatyti poliarizatorių **Pol.** (LPVISA100-MP2, *Thorlabs*). Iš bandinyje sugeneruoto signalo pašalinus FDS likučius, signalas tūbos lęšiu (*Nikon 200 mm tube lens, Edmund Optics*) buvo projektuojamas ant CMOS matricos (*BlackFly S BFS-U3-51S5M-C, FLIR*).

Bandinys būdavo padedamas ant plastikinio 3D spausdinto stalelio su skylė žadinimo pluoštui praeiti (**St.**). Stalelio erdvinė padėtis buvo valdoma motorizuotais nanopozicionavimo įtaisais (ANT95Lx2 ir ANT130V-5, *Aerotech*). Prireikus, bandinį buvo galima apšviesti baltos šviesos šaltiniu **LED**. Kadangi **LP** filtras regimosios šviesos nepraleidžia, jį tekdavo kiekvieną kartą iš optinio kelio patraukti.

Vaizdams registruoti buvo naudojama vienspalvė 5 MP kamera *Blackfly S* iš *FLIR*.

Kameroje naudojamos CMOS matricos *Sony IMX264* matmenys 2448x2048, o įstrižainė 11 mm. Jutiklio kvantinis našumas 63 %. Vaizdai buvo registruojami naudojantis „*Vision Acquisition Software*“ papildiniu grafinio programavimo aplinkai „*Labview*“ (*National Instruments*), o apdorojami per „*ImageJ*“.

2. 2. Bandiniai

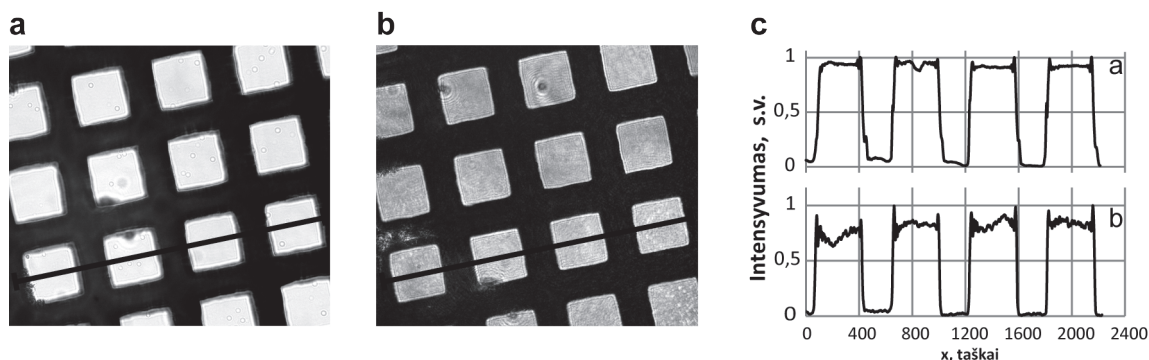
Buvo naudojami keturi bandiniai: 50 μm storio z-pjovimo kvarcas (PWQB-368252, *Precision Micro-Optics*) su ant viršaus padėtu 51 μm periodo metaliniu tinkleliu (*PELCO® 500 TEM, Ted Pella Inc.*); įvairių žiurkės organų ir audinių mikromasyvas ant objektinio stiklelio (RAT901a, *Biomax inc.*); 5 μm storio žmogaus sveikos odos ir melanomos audinių sandūros sluoksnis, dažytas hematoksilinu ir eozinu (KMUK); žiurkės uodegos sausgyslė.

2. 3. Eksperimento eiga

Pirmiausia ant stalelio būdavo padedamas bandinys ir pasišviečiant balta šviesa regėjimo lauke būdavo surandama norima stebėti sritis. Po to bandinio vertikali pozicija būdavo nustatoma taip, kad ryškumas būtų didžiausias. Nustačius optimalią ekspozicijos trukmę ir stiprinimą (*gain*), būdavo užregistruojamas vaizdas. Po to būdavo įstatomas LP filtras ir 510–10 nm juostinis filtras AHG stebėti arba 600–40 nm filtras DFSF stebėti. Nustatoma didesnė ekspozicijos trukmė ir didelis stiprinimas, jei vaizdas itin tamsus arba nieko neįmanoma įžiūrėti, atsargiai, kad nebūtų pažeistas bandinys, padidinama į mikroskopą patenkančio pluošto galia. Žadinančios spinduliuotės intensyvumą bandinyje taip pat buvo galima valdyti fokusuojančio lęšio **GL** vertikalia padėtimi. Artinant lęšį link bandinio intensyvumas didėdavo, tačiau apšviečiama sritis mažėdavo, tolinant – priešingai. Jei ekspozicija gaudavosi persotinta, pirmiausia būdavo mažinamas matricos stiprinimas, nes dėl jo vaizduose atsiranda daug triukšmo.

Triukšmui sumažinti būdavo užfiksuojami keli pasikartojantys kadrai ir gaunama kiekvieno taško šviesumo vidurkinė vertė, iš gauto vaizdo taip pat būdavo atimamas matricos triukšmas, gaunamas registruojant ekspoziciją aklinoje tamsoje.

Kalibruojant mikroskopą buvo naudojama kvarco plokštelė su ant viršaus padėtu *PELCO®* tinkleliu. Kvarco plokštelė generuodavo AHG signalą net esant palyginti nedideliam intensyvumui, o tinklelis tą signalą užstodavo ir mesdavo šešėlį. Dėl didelio kontrasto, šis bandinys padėjo įvertinti išgaunamą vaizdo kokybę, nustatyti skalę. Ankstesniame darbe buvo



3 pav. *PELCO*[®] tinklelio nuotrauka, užfiksuota pro 40x/0,75 NA objektyvą naudojant baltą apšvietimą (a) ir vykstant AHG BBO kristale (b). Pažymėtų linijų šviesumo profiliai (c).

išbandyti 4x/0,13 NA, 10x/0,30 NA, 20x/0,50 NA arba 40x/0,75 NA mikroskopo objektyvai (CFI Plan Fluor, *Nikon*): su kiekvienu buvo užregistruotas tinklelio vaizdas (pav. 3b). Tada buvo gauti vienos iš gardelės ašių šviesumo profiliai (pav. 3c). Padalijus sveiko gardelės periodų skaičiaus ilgį mikrometrais iš atitinkančio ilgio matricos taškais, buvo apskaičiuotas vieno matricos taško ilgis mikrometrais kiekvienu atveju. Kiti mastelių parametrai pateikti lentelėje 1. Pagal šiuos rezultatus ir buvo pasirinkti 4x objektyvas dėl labai plataus lauko (apima beveik 3 mm) ir 20x objektyvas dėl geros skiriamosios gebos.

1 lentelė. Taškų ant matricos skaičiaus ir SI sistemos ilgio vienetų sąsajos.

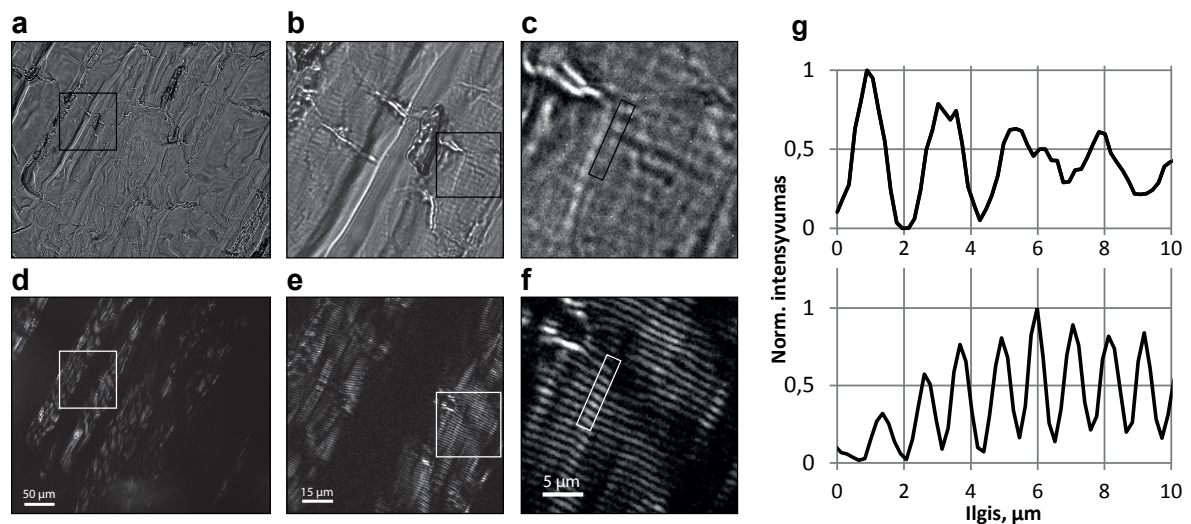
Objektyvas	taško ilgis	lauko plotis	taškų sk. per 100 μm
4x/0,13 NA	1,15 μm	2,81 mm	87
10x/0,30 NA	352,5 nm	862,9 μm	284
20x/0,50 NA	175,3 nm	429,1 μm	570
40x/0,75 NA	87,7 nm	214,6 μm	1141

Poliarizaciniams vaizdams registruoti į pradinę padėtį būdavo atsukama pusės bangos plokštelė ir kadrai fiksuojami sukant šią plokštelę lygiais intervalais, kol poliarizacija apsukama 180 laipsnių. Kolageno poliarizaciniam vaizdai gauti buvo naudojama PAHG analizės programa [33], sukurta *Super-resolution Light Microscopy and Nanoscopy lab* tyrėjų komandos (The Institute of Photonic Sciences, Barselona, Ispanija). Tenzoriaus elementų paieškai atlikti buvo naudojama programa „*Excel*“ ir jos papildinys „*Solver*“.

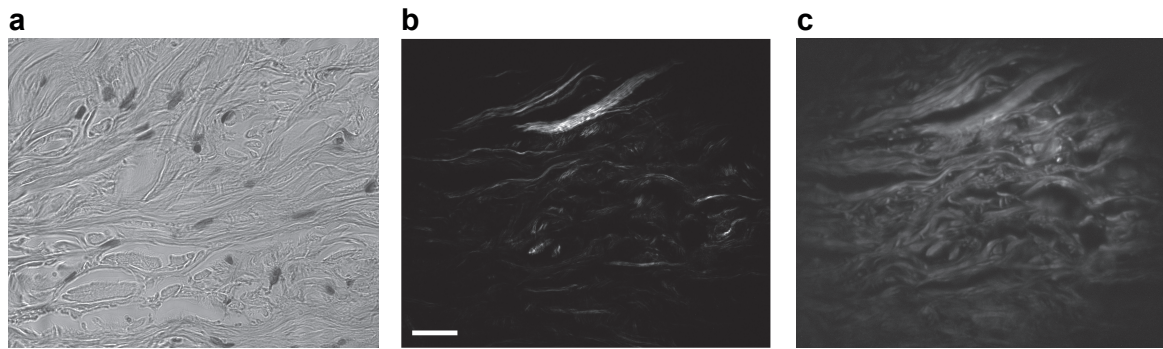
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Pirmiausia sukonstruotas mikroskopas buvo išbandytas registruojant turimų bandinių vaizdus ir lyginant išmatuotas vertes, pritaikant literatūroje siūlomus modelius.

Žiurkės skeletinio raumens vaizdams registruoti buvo naudojamas 20x/0,5 NA objektyvas (Pav. 4a-f). Mikroskopo skiriamosios gebos pakako nustatyti vienos miofibrilės sarkomero – mažiausio raumens funkcinio vieneto – ilgį. Išilgai skaidulos einančiuose intensyvumo profiliuose (Pav. 4g) atstumas tarp minimumų, kai buvo naudotas baltos šviesos šaltinis buvo $2,28 \pm 0,13 \mu\text{m}$, o AHG vaizde – pusė ilgio ($1,14 \pm 0,13 \mu\text{m}$) [34]. Ties M linija (sarkomero viduriu), dėl priešingomis kryptimis orientuotų miofibrilių, AHG signalas sumažėja, todėl vienam sarkomerui gaunamas dviejų AHG intensyvumo pikų signalas [35]. Toks dydis atitinka literatūroje pateikiamą vidutinio sarkomero ilgį $\sim 2 \mu\text{m}$ [36]. AHG vaizdinimo lyginant su įprastu apšvietimu gaunamais vaizdais privalumai: didesnis kontrastas, didelis specifiškumas (AHG tik nuo miozino). Baltos šviesos plataus lauko



4 pav. Išilginis žiurkės skeletinio raumenens pjūvis (A3, RAT901a). Baltoje šviesoje gautas vaizdas (a, b, c) su skaitmeniniu priartinimu (b ir c). Tos pačios srities antros harmonikos generacijos signalo vaizdas (d, e, f). Skaitmeniškai priartintos tos pačios sritys, kaip ir baltos šviesos vaizde (e ir f). Priartintos sritys pažymėtos. Skalės pateiktos AHG vaizduose. Grafikuose (g) intensyvumo profiliai gauti iš pavaizduotų zonų (c ir f vaizduose) [34].



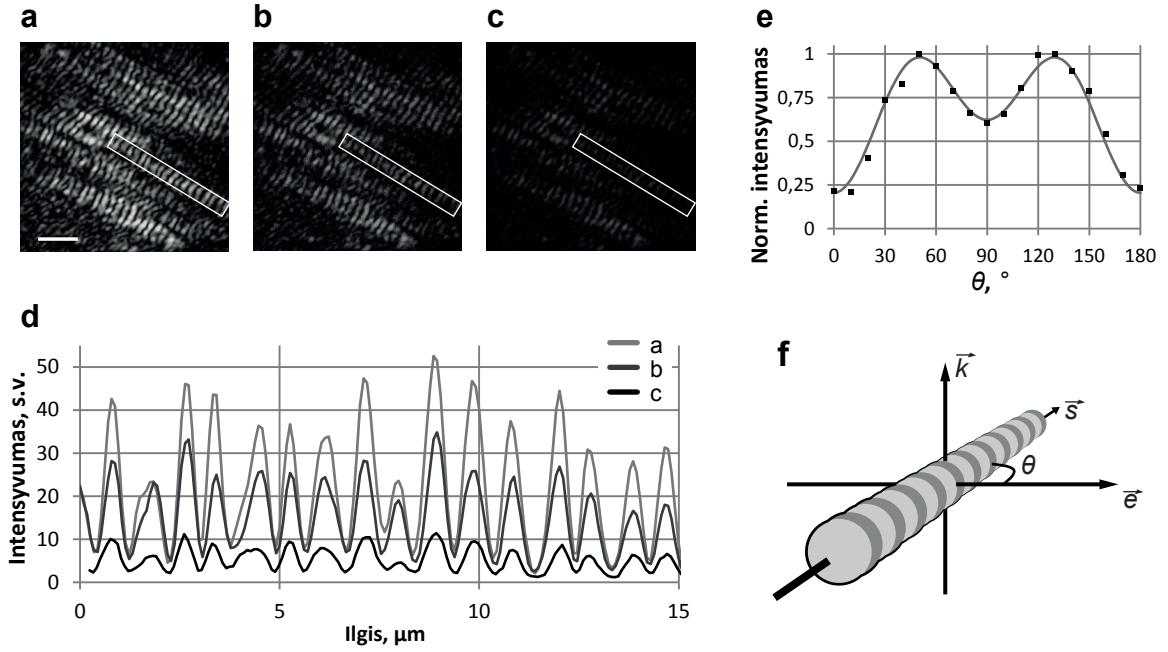
5 pav. Odos audinio sluoksnis (KMUK), dažytas eozinu ir hematoksilinu: esant baltam apšvietimui (a), kolageno AHG (b) ir eozino DFSF (c). Skalė – 25 μm [34].

mikroskopijoje vaizdas nekontrastingas, daugelyje vietų kontrasto nepakanka periodinei struktūrai išskirti, tačiau AHG mikroskopija leidžia vaizdinti dinامينius procesus gyvuose audiniuose nepasitelkiant žymeklių [15].

DFSF eksperimentams reikėjo bandinio, galinčio fluorescuoti žadinant 515 nm bangos ilgio spinduliuote. Tokius kriterijus atitiko eozinas [37] – vienas iš dažų, kuriais buvo dažytas odos audinio bandinys (KMUK). Vaizdas pasirodė susiliejęs, bet sufokusuoti aštriau nebuvo įmanoma (Pav. 5c). Tokį vaizdą galėjo nulemti ne itin specifiskas dažo molekulių pasiskirstymas bandinyje. Eozinas dažo baltymus, o šie yra beveik visose struktūrose, todėl kontrastas nukenčia. [3]. Nepaisant to, vaizdas gali būti naudingas didesnėse skalėse arba kitų vaizdo kontrastų multimodalinėse sistemose papildymui. Taip pat užregistruotas ir AHG signalas toje pačioje bandinio vietoje, leidžiantis pamatyti kolageno išsidėstymą audinyje (pav. 5b) [34].

Prieš pradėdant poliarimetrinius matavimus, reikėjo patikrinti ar į bandinį krintančios spinduliuotės galia nesikeičia keičiant poliarizaciją. Buvo atliktas toks eksperimentas: keičiant poliarizacijos kampą buvo registruojamas bandinio DFSF intensyvumas. Netvarkingai orientuotų dažų molekulių DFSF nuo poliarizacijos nepriklauso, todėl signalo intensyvumas turėjo nekisti. Išmatavus gauta, kad fluorescencijos intensyvumas nesikeitė daugiau nei 0,5 % [34].

Skeletinių raumenų skaidulose AHG efektyvumo priklausomybė nuo FDS poliarizacijos buvo gauta užregistravus 18 vaizdų keičiant elektrinio lauko vektoriaus pasukimą kas 10° . Kiekybiškai palyginamos vertės buvo gautos pasirinkus viena kryptimi orientuotą miofibrilę ir apskaičiuojant jos intensyvumo maksimumų vidurkius. Poliarizacijos kampas, kuris turėjo atsitiktinę atskaitos sistemą, pervestas į sistemą, sutampančią su kampu θ



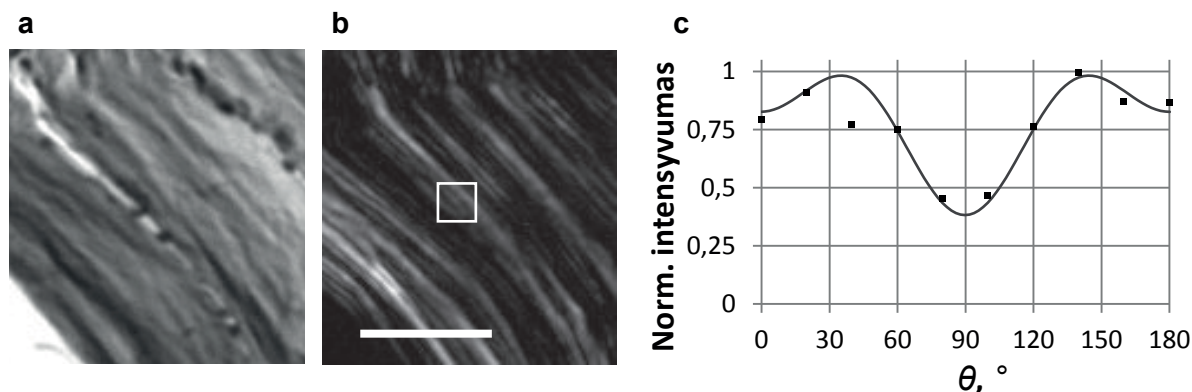
6 pav. Išilginio žiurkės skeletinio raumenens pjūvio (A1, RAT901a) AHG signalo intensyvumo priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos. Skalė – 5 μm. Paveikslėliuose a, b ir c pažymėtų zonų intensyvumo profiliai esant skirtingam žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampui (d). AHG intensyvumo priklausomybė nuo kampo tarp išilginės miofibrilės ašies ir elektrinio lauko vektoriaus (e). Supaprastinta eksperimento schema (f): \vec{k} – FDS sklidimo krypties vektorius – statmenas vektoriumi \vec{s} ; \vec{s} – miofibrilės ašiai kolinearūs vektorius; \vec{e} – elektrinio lauko svyravimo kryptis; θ – kampas tarp vektorių \vec{s} ir \vec{e} [34].

(žr. pav. 6) taip, kad aukštesnysis minimumas sutaptų su 90° kampui, o mažiausios intensyvumo vertės sutaptų su 0° ir 180° kampais. Gautos AHG intensyvumo vertės buvo palygintos su modeliu, paremtu prielaida, kad miozino molekulės sudaro cilindrinės simetrijos struktūrą:

$$I_{AHG} = I_0 \left((d_{31} \sin^2 \theta + d_{33} \cos^2 \theta)^2 + d_{15}^2 \sin^2(2\theta) \right), \quad (11)$$

čia d_{31} , d_{33} ir d_{15} yra nepriklausomi, nenykstantys netiesinio tenzoriaus elementai. Naudojant evoliucinį algoritmą, surasta su kuriomis parametrų vertėmis buvo geriausias modelio atitikimas duomenims: $d_{31} = 0,79$, $d_{33} = 0,45$ ir $d_{15} = 0,76$ [34]. Kai Kleinmano simetrijos sąlyga tenkinama, tada $d_{31} = d_{15}$ [38]. Šiame eksperimente verčių d_{31} ir d_{15} santykis buvo pakankamai arti: $\frac{d_{15}}{d_{31}} = 0,96$, Santykis tarp d_{33} ir d_{31} buvo $\frac{d_{33}}{d_{31}} = 0,59$ [34]. Literatūroje [39] miofibrilių miozinui ši vertė svyruoja tarp 0,5 ir 0,6.

Užregistravus 10 vaizdų 20° elektrinio lauko vektoriaus sukimo intervalais buvo išmatuota kolageno AHG signalo priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos.



7 pav. Žiurkės uodegos saugyslės vaizdo dalis apšvietus balta šviesa (a) ir kolageno AHG (b), skalė – 50 μm . Grafike pateiktos iš pažymėtos srities gautos vidurkinės vertės keičiant FDS poliarizaciją (taškai) ir tas vertes geriausiai atitinkantis modelis, pavaizduotas kreive (c). θ – kampas tarp FDS elektrinio lauko vektoriaus ir skaidulos išilginės ašies (žr. pav. 6f).

Parinkus vieną skaidulų „ryšulėlį“ (pav. 7b pažymėta sritis) buvo gautos vidurkinės intensyvumo vertės. Iškelus prielaidą apie Kleinmano simetriją ir radus geriausiai atitinkantį modelį, gauti tokie parametrai: $d_{31} = 0,603$, $d_{33} = 0,898$. Čia, kitaip nei miozino atveju, AHG intensyvumas yra mažiausias, kai FDS elektrinio lauko vektorius \vec{e} su skaidulos išilgine ašimi \vec{s} sudaro statmeną kampą. Apskaičiavus orientacijos parametą D :

$$D = \frac{d_{33}/d_{15}}{2 + d_{33}/d_{15}} \quad (12)$$

ir vidutinį kolageno harmonoforų išsidėstymo skaiduloje kampą φ_e :

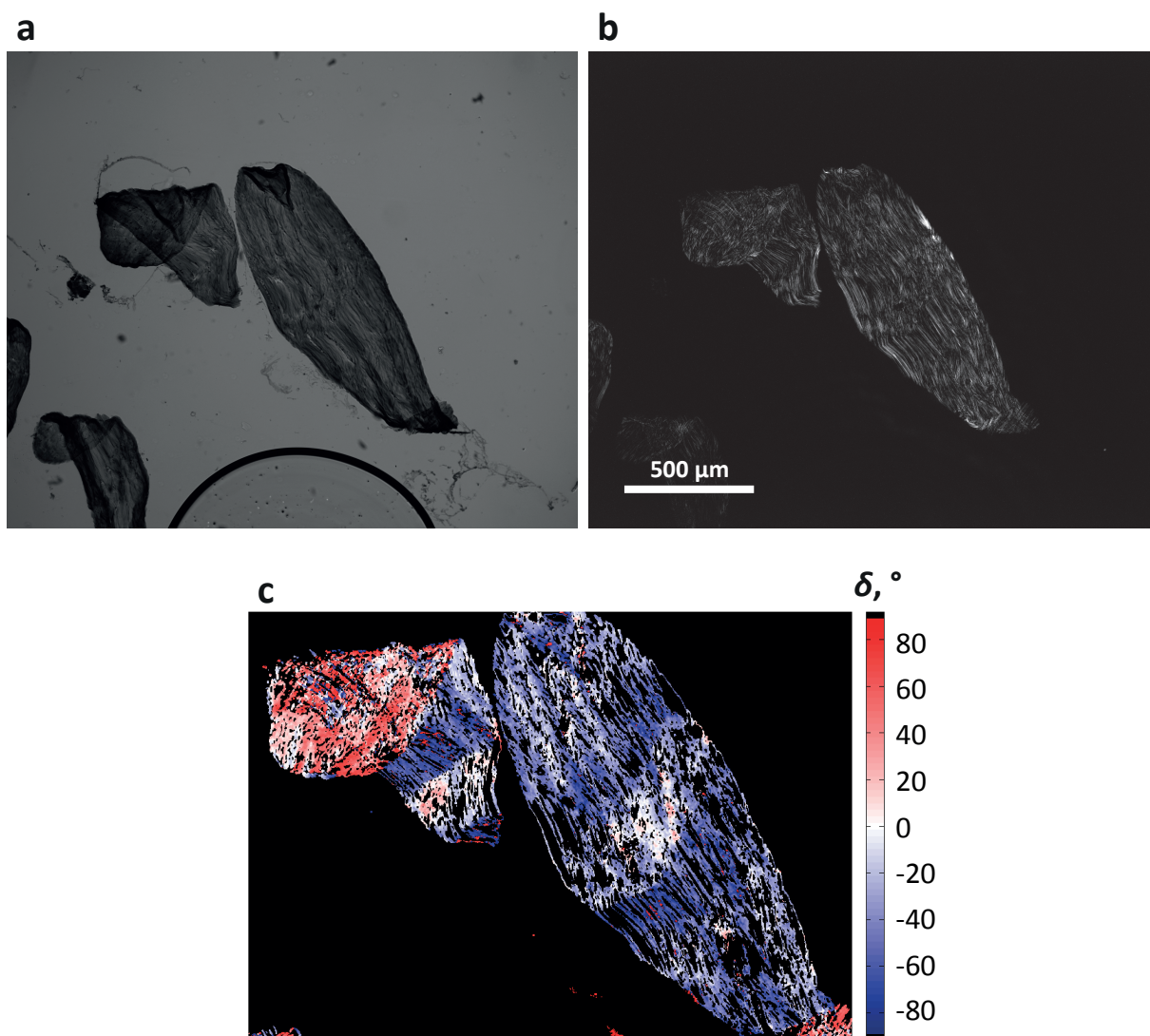
$$\varphi_e = \sqrt{\arccos D} \quad (13)$$

gautos vertės buvo $D = 0,42$ ir $\varphi_e = 49,2^\circ$. Jos atitiko literatūroje randamas vertes, be to, kolageno skaidulų netiesiniai optiniai parametrai gali skirtis skirtinguose audiniuose ir skirtingų rūšių gyvūnuose, leidžiama apie 5 % paklaida [26].

Iš tų pačių vaizdų, panaudojus PAHG vaizdinimo programą (žr. psl. 18), buvo gautas skaidulų orientacijų pasiskirstymas (pav. 8c). Programa pagal intensyvumo profilį nustato minimumus ir maksimumus, o tada pagal jų padėtį vaizdų serijoje nustato skaidulos pasukimo kampą δ . Kadangi nereikia ieškoti geriausiai duomenis atitinkančios kreivės, programa rezultatą duoda per labai trumpą laiko tarpą (kelios minutės). Tuo tarpu kiti δ skaičiavimo algoritmai gali užtrukti net kelias valandas.

Kiekvienam vaizdo taškui Skaidulų orientacija vaizdinimo plokštumoje δ nustatyta pagal tai per kiek laipsnių reikia paslinkti kreivę (žr. pav. 7), kad ji geriausiai atitiktų tam taškui užregistruotas AHG intensyvumo vertes (pav. 8c). Po to tas gautas vaizdas buvo

palygintas su spektrinės analizės vaizdu, gautu iš poliarizacinės informacijos neturinčio AHG intensyvumo vaizdo. Vaizdas buvo suskaidytas į 128x128 pikselių segmentus, kuriems atskirai buvo atlikta greitoji Furje transformacija ir gauti tokių pačių matmenų erdviniai spektrai, kurie buvo išdėlioti į originalias segmentų vietas (pav. 9). Erdviniame spektre arčiau centro yra mažo kontrasto sritis, o tolstant nuo jo, kontrastas didėja. Kadangi skaidulos buvo išsirikiaavusios tam tikra kryptimi, išilgai jų orientacijai kontrastas buvo nedidelis, o statmenai – didelis. Todėl erdvinis spektras gaunasi elipsės formos. Ilgoji elipsės ašis atspindi statmeną skaidulų orientacijai kryptį. Norint rasti skaidulų kryptį, reikia ieškoti tos elipsės trumposios ašies. Jei viename segmente vyrauja kelios skaidulų orientacijos, jos taip pat yra matomos kaip



8 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės atplaišos: baltos šviesos vaizdas (a), kolageno AHG vaizdas, gautas sudėjus maksimalias vertes iš visų skirtingų žadinančios spidnuliuotės poliarizacijų vaizdų (b), iš PAHG analizės gauta skaidulų orientacija δ vaizdo plokštumoje lyginant su vertikalia paveikslėlio ašimi (c).

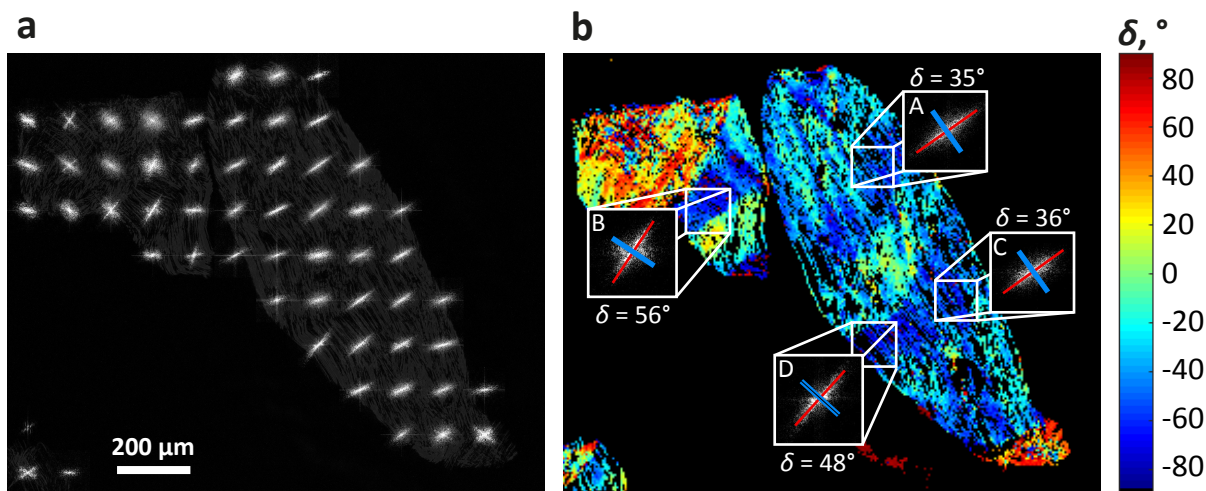
papildomos persiklojančios elipsės.

Palyginimui su poliarimetrinės analizės būdu gautu skaidulų laterališios orientacijos δ vaizdu, pažymėtose srityse (pav. 9b) buvo apskaičiuoti verčių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai (lent. 2).

2 lentelė. Paveikslėlyje 9b pažymėtų sričių δ vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bei spektrinės analizės būdu gautos vertės

Sritis	δ vidurkis	δ st. n.	FFT vertė
A	45,8°	15,5°	35°
B	47,0°	22,2°	56°
C	47,7°	16,4°	36°
D	57,9°	17,0°	48°

Srityse A, C ir D laterališios skaidulų orientacijos δ vertės gautos poliarimetrinės analizės būdu buvo paslinktos per $\sim 10^\circ$ nuo verčių gautų FFT analizės būdu. Vadinasi atskaitos sistema nėra tiksliai vertikali lyginant su paveikslėlio ašimi. Taip galėjo nutikti dėl netiksliai į laikiklį įstatytos pusės bangos plokštelės, su kuria buvo keičiamas FDS tiesinės poliarizacijos kampas.



9 pav. Žiurkės uodegos saugyslės atplaišos erdvinių spektrų koliažas, gautas suskaidžius originalų paveikslėlį į 128x128 pikselių sekcijas, kurioms FFT buvo atlikta atskirai (a). Atrinkti keli erdviniai spektrai ir parodyta iš kurių bendro vaizdo vietų jie paimti (b). Spektro elipsės ilgoji ašis sutampa su didžiausio kontrasto kryptimi (statmena skaidulų orientacijai), ji pažymėta raudona plona linija. Tai ašiai statmena yra trumpoji ašis ir yra pažymėta mėlyna stora linija. Ji sutampa su skaidulų orientacija. Šalia kiekvieno spektro užrašytas ir iš spektro gautas orientacijos kampas lyginant su vertikalia vaizdu ašimi.

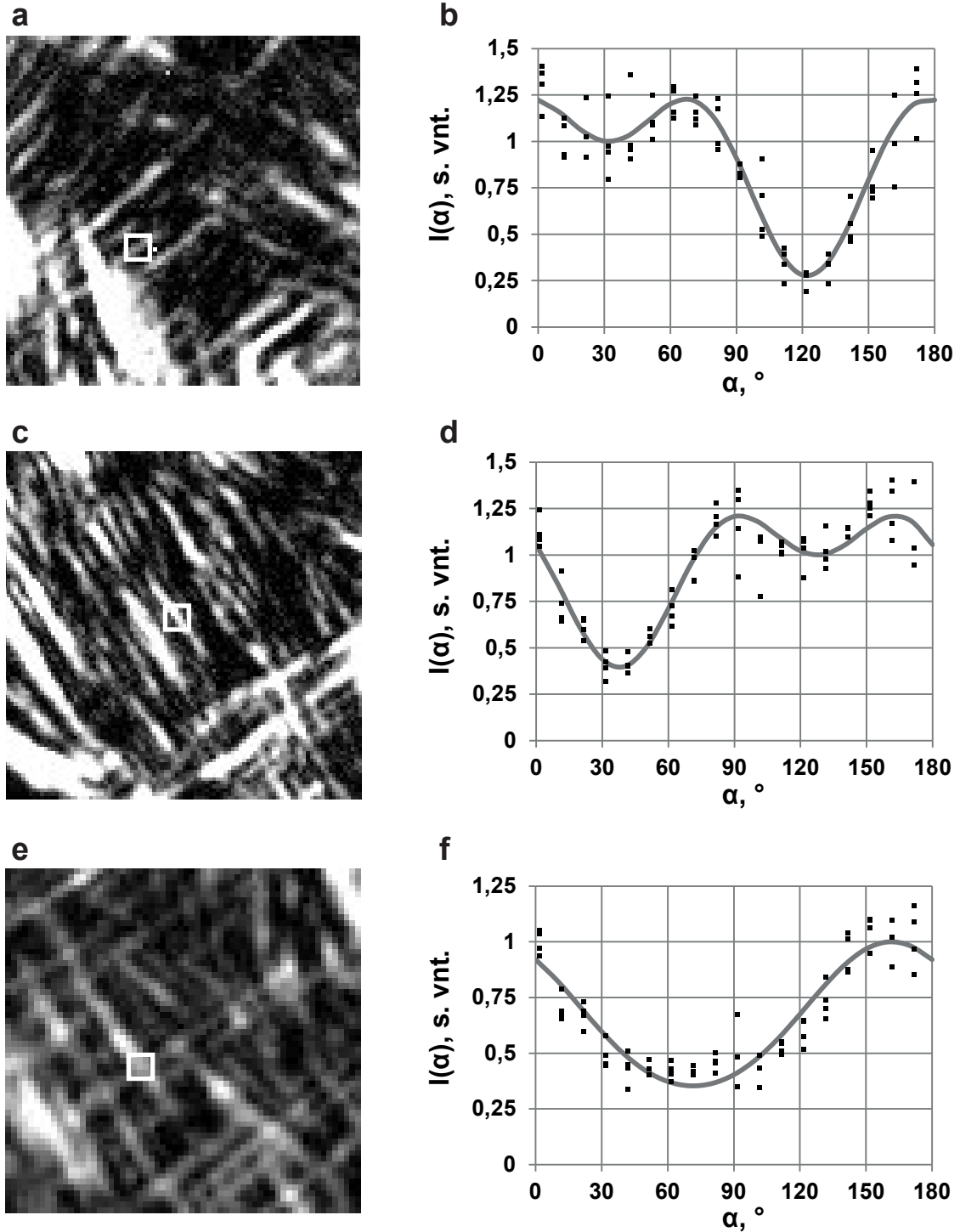
Kadangi poliarizacijos pasukimas yra dvigubai didesnis nei pačios plokštelės pasukimas, nuokrypis galėjo būti maždaug 5° . Problemą išspręstų tikslus motorizuotas laikiklis, kurį būtų galima sukalibruoti pagal FFT gaunamas vertes. Į sritį B pateko skirtingų skaidulų orientacijos ir buvo rastas jų visų vidurkis. Tą liudija ir didesnis standartinis nuokrypis. FFT vertė to neatspindi, nes buvo pasirinkta tik vieną skaidulų orientaciją atspindinti elipsė.

Dažnai kolageno sudaromos struktūros yra įvairiais kampais persipynę tinklai. Lygtis 11 galioja tol, kol egzistuoja cilindrinė simetrija. Tai yra – skaidulos yra orientuotos viena ašimi. Tačiau paprastumo dėlei laikoma, kad cilindrinė simetrija nėra pažeidžiama, kai skaidulos nėra orientuotos lygiagrečiai, o jų intensyvumo signalai susideda nepriklausomai. Šiame darbe buvo pasirinktas toks kolageno skaidulų bandinys, kuriame yra tiek sričių, kur skaidulos orientuotos lygiagrečiai, tiek sričių, kur kolageno skaidulos persikloja tam tikru kampu (Pav. 10). Modeliui su duomenimis lyginti buvo užregistruoti 72 kadrai sukant pusės bangos plokštelę kas 5° . Išrinkus po 10 vietų lygiagrečiai orientuotoms skaiduloms ir 10 dviem skirtingais kampais orientuotoms skaiduloms, buvo surinktas nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampo priklausančios AHG signalas. Palyginus persiklojančių skaidulų AHG intensyvumo grafikus (pav. 10f) su lygiagrečiai einančių skaidulų grafikus (pav. 10b, d) paaiškėjo, kad atskirų skaidulų AHG signalų suma neduoda panašios AHG intensyvumo priklausomybės nuo žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampo į realų persiklojusią skaidulų signalą. Todėl norint geriau išaiškinti sudėtingų kolageno bandinių struktūras, reikia geresnio sąveiką galinčio paaiškinti modelio.

Tuo tarpu šiame darbe siūloma persiklojusias skaidulas atpažinti pagal parametrų santykius $\frac{d_{33}}{d_{31}}$ ir $\frac{d_{31}}{d_{15}}$ naudojant lygtimi 11 aprašomą modelį.

Lygiagrečiai orientuotoms skaiduloms $\frac{d_{33}}{d_{31}} = 1,71 \pm 0,22$, o $\frac{d_{31}}{d_{15}} = 0,92 \pm 0,03$. Dėl artimų Kleinmano simetrijai sąlygų, $\frac{d_{31}}{d_{15}}$ artimas vienetui.

Persiklojusioms kampu skaiduloms $\frac{d_{33}}{d_{31}} = 1,91 \pm 0,32$, o dėl itin žemų d_{15} verčių, santykis tarp d_{31} d_{15} nebuvo labai nuspėjamas: $\frac{d_{31}}{d_{15}} = 12942 \pm 15124$, tačiau visais atvejais buvo didesnis nei 1. Tokią persiklojusio kolageno savybę galima panaudoti pritaikant filtrą, kuris atskiria skirtingomis kryptimis persiklojančio kolageno signalą ir leidžia toms sritims taikyti kitokią analizę. Santykių $\frac{d_{33}}{d_{31}}$ skirtumas nebuvo pakankamai didelis, todėl norint atskirti skaidulų persiklojimą mažiau patikimas.



10 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės kolageno skaidulų poliarimetrija. Vaizduose buvo parinktos sritys (pažymėta baltais kvadratais), kad jose būtų tik viena ašimi išsidėsčiusios skaidulos (a ir c) kampu persiklojusios skaidulos (e). Grafikuose b, d ir f pavaizduota pažymėtų sričių AHG signalo intensyvumo I priklausomybė nuo žadinančio šaltinio poliarizacijos kampo α . Sukant pusės bangos ilgio plokštelę, elektrinis lauko vektorius kerta tą pačią ašį keturis kartus, todėl kiekvienam žadinančios spinduliuotės poliarizacijos kampui pavaizduotos 4 AHG intensyvumo vertės.

IŠVADOS

Sukonstruotas plataus lauko netiesinis optinis poliarimetrinis mikroskopas. Naudojantis mikroskopu buvo užregistruoti dviejų fotonų sužadavimo fluorescencijos signalai, antros harmonikos generacija tiek miozino turinčiuose bandiniuose, tiek kolageno turinčiuose bandiniuose, atliktos poliarimetrinės analizės, gauti duomenis atitinkantys modeliai, kurių parametrų vertės sutapo literatūroje aprašomų parametrų vertėmis.

Sužinota, kad kolageno skaiduloms persiklojus kampu, cilindrine simetrija paremtas modelis duoda itin aukštą modelio parametrų santykį $\frac{d_{31}}{d_{15}}$. Toks pastebėjimas gali būti pritaikomas siekiant vaizde atskirti sritis, kuriose skaidulos orientuotos lygiagrečiai, o kur persiklojusios kampu. Tai yra naudinga su kolageno persitvarkymu susijusių ligų diagnozei, nes leidžia įvertinti lygiagrečiai išsidėsčiusių ir kampu persiklojusių skaidulų santykį.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF PHYSICS
LASER RESEARCH CENTER

Oskaras Venckus

Master's thesis

NONLINEAR WIDEFIELD POLARIMETRIC MICROSCOPY
OF BIOLOGICAL SAMPLES

SUMMARY

Nonlinear microscopy utilizes light phenomena occurring in electromagnetic fields of extremely high intensity to provide new imaging capabilities. Multi-photon excitation fluorescence (MPEF) and second harmonic generation (SHG) are among them. The former occurs when a pigment molecule absorbs two or more photons and emits one of higher frequency, but the latter only appears in specific materials, which are lacking the center of symmetry. This property is not common in nature, especially in live organisms. However fibrillar proteins myosin and collagen are capable of SHG and require no chemical processing to be discernible. Since these proteins have vital roles, ability to noninvasively inspect them leads to potential use cases in medicine.

Since inception of nonlinear microscopy, exclusively only scanning microscopes were used. Biological matter is translucent to near infrared light (commonly used in nonlinear microscopy) so deeper penetration into the sample is possible. Effectiveness of second-order nonlinear phenomena is proportional to the square of excitation light intensity, thus optical sectioning can be achieved, which enables 3D imaging without a pinhole. However, a scanning microscope is inherently slow, because it can only image one point at a time.

Wide field microscopy, on the other hand, captures the whole image at once and is much faster. This technology can find its use in real-time imaging of kinetic processes, e.g. muscle contraction, or high throughput of histological samples in medical environment.

Polarimetric SHG methods are more sensitive to subtle molecular structure alterations, usually not visible by other means. The less a disease is developed, the easier it is to treat it.

LITERATŪRA

- [1] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv für mikroskopische Anatomie* **9**(1), 413–468, (1873).
- [2] S. Bell and K. Morris, *An introduction to microscopy* (2009).
- [3] T. Veuthey, G. Herrera and V. I. Dodero, Dyes and stains: from molecular structure to histological application, *Frontiers in Bioscience* **19**(1), 91–112, (2014).
- [4] J. Mertz, *Introduction to optical microscopy* (2019).
- [5] R. H. Webb, Confocal optical microscopy, *Reports on Progress in Physics* **59**(3), 427, (1996).
- [6] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters and G. Weinreich, Generation of optical harmonics, *Physical Review Letters* **7**(4), 118, (1961).
- [7] P. Franken and J. Ward, Optical harmonics and nonlinear phenomena, *Reviews of Modern Physics* **35**(1), 23, (1963).
- [8] R. C. Miller, Optical second harmonic generation in piezoelectric crystals, *Applied Physics Letters* **5**(1), 17–19, (1964).
- [9] E. Fukada and I. Yasuda, Piezoelectric effects in collagen, *Japanese Journal of Applied Physics* **3**(2), 117, (1964).
- [10] L. S. Vasilenko, V. P. Chebotaev, Y. V. Troitskii, Y. A. Anan'ev, B. M. Sedov, Y. N. Tsiovkin, N. V. Volkenshtein, L. V. Dubovoi, V. F. Shanskii, Y. V. Gott et al., Visual Observation of Infrared Laser Emission, *JETP* **21**(3), (1965).
- [11] S. Fine and W. P. Hansen, Optical second harmonic generation in biological systems, *Applied optics* **10**(10), 2350–2353, (1971).
- [12] J. N. Gannaway and C. J. R. Sheppard, Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope, *Optical and Quantum Electronics* **10**(5), 435–439, (1978).
- [13] I. Freund, M. Deutsch and A. Sprecher, Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon, *Biophysical journal* **50**(4), 693–712, (1986).
- [14] P. J. Campagnola and L. M. Loew, Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms, *Nature biotechnology* **21**(11), 1356, (2003).

- [15] R. Cisek, H. Zhao and V. Barzda, Wide-field second harmonic generation microscopy using a high power Yb laser, 2017 Photonics North (PN) pp. 1–1, (2017).
- [16] M. Göppert-Mayer, Über elementarakte mit zwei quantensprüngen, *Annalen der Physik* **401**(3), 273–294, (1931).
- [17] W. Kaiser and C. G. B. Garrett, Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$, *Physical review letters* **7**(6), 229, (1961).
- [18] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science* **248**(4951), 73–76, (1990).
- [19] P. Theer, M. T. Hasan and W. Denk, Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ regenerative amplifier, *Optics letters* **28**(12), 1022–1024, (2003).
- [20] H. J. Koester, D. Baur, R. Uhl and S. W. Hell, Ca^{2+} fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage, *Biophysical journal* **77**(4), 2226–2236, (1999).
- [21] A. Schönle and S. W. Hell, Heating by absorption in the focus of an objective lens, *Optics letters* **23**(5), 325–327, (1998).
- [22] A. Hopt and E. Neher, Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy, *Biophysical journal* **80**(4), 2029–2036, (2001).
- [23] C.-H. Chen, A. V. Nair, S.-C. Chuang, Y.-S. Lin, M.-H. Cheng, C.-Y. Lin, C.-Y. Chang, S.-J. Chen and C.-H. Lien, Dual-LC PSHG microscopy for imaging collagen type I and type II gels with pixel-resolution analysis, *Biomed. Opt. Express* **12**(5), 3050–3065, (2021).
- [24] Y. V. Kistenev, D. Vrazhnov, V. Nikolaev, E. Sandykova and N. Krivova, Analysis of collagen spatial structure using multiphoton microscopy and machine learning methods, *Biochemistry (Moscow)* **84**(1), 108–123, (2019).
- [25] A. Ghazaryan, H. F. Tsai, G. Hayrapetyan, W.-L. Chen, Y.-F. Chen, M.-Y. Jeong, C.-S. Kim, S.-J. Chen and C.-Y. Dong, Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy, *Journal of biomedical optics* **18**(3), 031105, (2012).
- [26] F. Tiaho, G. Recher and D. Rouède, Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy, *Optics express* **15**(19), 12286–12295, (2007).
- [27] R. Hristu, S. G. Stanciu, D. E. Tranca and G. A. Stanciu, Improved quantification of

- collagen anisotropy with polarization-resolved second harmonic generation microscopy, *Journal of biophotonics* **10**(9), 1171–1179, (2017).
- [28] M. Schmeltz, C. Teulon, G. Latour, D. Ghoubay, V. Borderie, C. Aimé and M.-C. Schanne-Klein, Implementation of artifact-free circular dichroism SHG imaging of collagen, *Optics express* **27**(16), 22685–22699, (2019).
- [29] R. Azzam, Stokes-vector and Mueller-matrix polarimetry, *JOSA A* **33**(7), 1396–1408, (2016).
- [30] J. Bigelow and R. Kashnow, Poincaré sphere analysis of liquid crystal optics, *Applied optics* **16**(8), 2090–2096, (1977).
- [31] N. Ghosh and A. I. Vitkin, Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook, *Journal of biomedical optics* **16**(11), 110801, (2011).
- [32] A. Golaraei, L. Kontenis, R. Cisek, D. Tokarz, S. J. Done, B. C. Wilson and V. Barzda, Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy, *Biomedical optics express* **7**(10), 4054–4068, (2016).
- [33] M. Alizadeh, D. Merino, G. Lombardo, M. Lombardo, R. Mencucci, M. Ghotbi and P. Loza-Alvarez, Identifying crossing collagen fibers in human corneal tissues using pSHG images, *Biomedical optics express* **10**(8), 3875–3888, (2019).
- [34] O. Venckus, Biologinių bandinių vaizdinimas plataus lauko netiesiniu optiniu mikroskopu, magistrantūros studijų mokslo tiriamasis darbas, Vilniaus universitetas, (2021).
- [35] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola and W. A. Mohler, Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres, *Biophysical journal* **90**(2), 693–703, (2006).
- [36] G. Recher, D. Rouede, P. Richard, A. Simon, J.-J. Bellanger and F. Tiaho, Three distinct sarcomeric patterns of skeletal muscle revealed by SHG and TPEF microscopy, *Optics express* **17**(22), 19763–19777, (2009).
- [37] A. E. Tuer, D. Tokarz, N. Prent, R. Cisek, J. Alami, D. J. Dumont, L. Bakueva, J. A. Rowlands and V. Barzda, Nonlinear multicontrast microscopy of hematoxylin-and-eosin-stained histological sections, *Journal of biomedical optics* **15**(2), 026018, (2010).
- [38] S.-W. Chu, S.-Y. Chen, G.-W. Chern, T.-H. Tsai, Y.-C. Chen, B.-L. Lin and C.-K. Sun, Studies of χ^2/χ^3 tensors in submicron-scaled bio-tissues by polarization harmonics optical microscopy, *Biophysical journal* **86**(6), 3914–3922, (2004).

- [39] C. Odin, T. Guilbert, A. Alkilani, O. P. Boryskina, V. Fleury and Y. Le Grand, Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy, *Optics express* **16**(20), 16151–16165, (2008).