

Vilniaus universiteto  
Fizikos fakulteto  
Lazerinių tyrimų centras

Mykolas Mačiulis

KOLAGENO DAUGIAMODĖ NETIESINĖ MIKROSKOPIJA BIOLOGINIUOSE AUDINIUOSE

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinės fizikos ir optinių technologijų  
studijų programa

Studentas

Mykolas Mačiulis

Leista ginti

2021-05-21

Darbo vadovas

prof. Virginijus Barzda

Konsultantas

dr. Lukas Kontenis

Centro direktorius

prof. Aidas Matijošius

Vilnius 2021

## Turinys

Santrumpos	3
1. Įvadas	4
2. Literatūros apžvalga	5
2.1. Mikroskopijos raida	5
2.2. Netiesinė optika	6
2.3. Biologinių audinių netiesinė mikroskopija	7
3. Instrumentai ir priemonės	9
3.1. Netiesinio optinio skenuojančio mikroskopo sukūrimas	10
3.2. Biologiniai bandiniai	15
3.3. Vaizdų analizė	16
4. Rezultatai	17
4.1. Žiurkės uodegos sausgyslės bandinys	17
4.2. Žmogaus storosios žarnos bandinys	20
5. Rezultatų aptarimas	21
5.1. Žiurkės uodegos sausgyslė	21
5.2. Žmogaus storoji žarna	24
6. Išvados	26
Santrauka	27
Abstract	28
Dalyvavimas mokslinėse konferencijose	29
Padėka	30
Literatūros sąrašas	31

## Santrumpos

H&E – Hematoxylin and Eosin

NA – Numerical Aperture

2PEF – Two-Photon Excitation Fluorescence

MPF – Multi-Photon Fluorescence

NIR – Near-Infrared

SHG – Second-Harmonic Generation

THG – Third-Harmonic Generation

FOV – Field of View

PMT – Photomultiplier Tube

PSF – Point Spread Function

FWHM – Full Width at Half Maximum

CMOS – Complementary Metal-Oxide-Semiconductor

LED – Light-Emitting Diode

SCIA – Structural Crosscorrelation Image Analysis

## 1. Įvadas

Optinė mikroskopija yra plačiai naudojama biologinių audinių vaizdinimui. Histologinių pjūvių dažymas su hematoksilinu ir eozinu (H&E) patologijoje laikomas auksiniu standartu [1]. H&E pjūvių vaizdinimas su šviesaus lauko mikroskopu naudojamas didelio našumo/pirminės grandies klinikiniam vaizdinimui. O konfokalinis mikroskopas kartu su specialiais fluorescenciniais dažais naudojamas detaliam audinių, ląstelių ir jų komponentų vaizdinimui. Tačiau netiesinė optinė mikroskopija suteikia papildomų kontrastų ir naujos informacijos apie biologines struktūras. Viena tokių yra kolagenas. Tai svarbus struktūrinis baltymas, tarpląstelinio užpildo komponentas, kuris labiausiai paplitęs žmogaus organizme ir gali būti efektyviai vaizdinamas panaudojant netiesinį antros harmonikos generacijos (SHG) režimą [2]. Nustatyta, kad kolageno struktūra pakinta vėžio paveiktuose audiniuose [3]. Dėl to kolageno tyrimai yra taikomi vėžio diagnostikoje.

Be SHG signalo, tuo pačiu metu gali būti registruojami dviejų fotonų sužadavimo fluorescencijos (2PEF) ir trečios harmonikos generacijos (THG) signalai [4]. SHG ir 2PEF signalų prigimtis yra plačiai ištyrinėta [2,5–7], tačiau apie THG netiesinę mikroskopiją ir šio signalo prigimtį informacijos mažiau. Šiame darbe bus vystomi 2PEF, SHG ir THG mikroskopijos taikymai histologijoje, dėmesį sutelkiant į tarpląstelinio užpildo vaizdinimą THG kontrasto būdu.

Šio darbo tikslas yra sukurti netiesinį optinį skenuojantį mikroskopą ir naudojantis juo iširti skirtingų kontrastų netiesinius biologinių audinių vaizdus histologiniuose pjūviuose bei išsiaiškinti THG vaizdo kontrasto prigimtį vaizdinant kolageną.

## 2. Literatūros apžvalga

### 2.1. Mikroskopijos raida

Optiniai instrumentai, kurie leido pažvelgti į objektus iš arčiau nei galima su plika akimi, išsivystė tik 16–17 a. [8,9]. Hans Janssen 1590 metais sukūrė sudėtinį mikroskopą su dviem lęšiais. Mikroskopu kaip instrumentu pasinaudojo Robert Hooke išleisdamas “Micrographia“ [10]. Antonie van Leeuwenhoek pritaikė mažų sferinių lęšių panaudojimą ir pirmasis pagamino praktinį mikroskopą su vienu lęšiu. Jis stebėjo ir nupiešė augalų mikrostruktūrą bei mikroorganizmus, kurie iki tol nebuvo aprašyti [11]. Joseph Jackson Lister pagamino objektyvą, kuriame buvo pašalinta dalis chromatinių ir sferinių aberacijų. Tai leido gauti žymiai aukštesnės kokybės vaizdus lyginant su pirmtakais.

Žinomi vardai mikroskopijoje yra Carl Zeiss ir Ernst Abbe. Abė aprašė difrakcijos įtaką formuojamiems vaizdams ir pritaikė teorinius skaičiavimus mikroskopams projektuoti [12]. Jis pastebėjo, kad didesnės skaitinės apertūros (anglų k. Numerical Aperture NA) objektyvai perteikia geresnės skyros vaizdus:

$$NA = n \cdot \sin(\theta) \quad (1)$$

kur  $n$  – lūžio rodiklis.

Šis pastebėjimas leido išvesti garsiąją formulę (2). Joje  $NA$  kartu su  $\lambda$  apibrėžia klasikinę skyros ribą:

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (2)$$

kur  $\lambda$  – bangos ilgis.

Po šių Abės įžvalgų objektyvai gana greitai priartėjo prie teorinės ribos, dėl to net ir su šiuolaikiniais objektyvais pasiekama skyra yra panaši.

Tam tikriems bandiniams šviesaus lauko kuriamo kontrasto nepakanka. Nudažius dominančias struktūras fluorescuojančiais dažais jas galima išskirti iš fono. Marvin Minsky sukūrė konfokalinį mikroskopą, kurio dizainas leidžia užregistruoti tik tuos fotonus, kurie sklinda iš objektyvo židinio plokštumos. Tai leido vaizdinti storus bandinius be fono, o stumdant bandinį ar

pluoštą Z kryptimi registruoti optinius bandinio pjūvius ir formuoti 3D vaizdus [13]. 3D optinis vaizdinimas be bandinio pjaustymo buvo dar viena revoliucija mikroskopijoje.

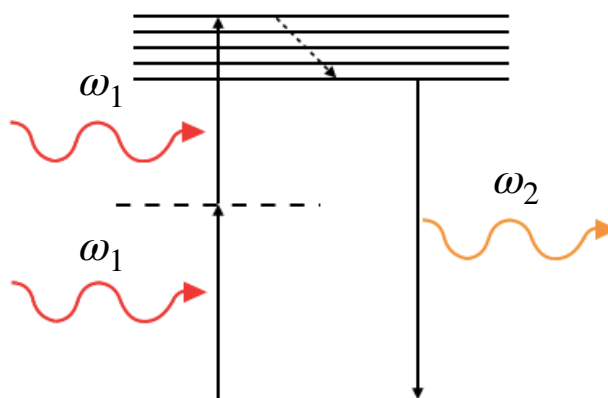
Mikroskopija šiuo metu yra neatskiriama medicinos, biologijos bei medžiagų mokslo dalis, bei įrankis daugelyje kitų sferų. Žinomiausios kompanijos Nikon, Zeiss ir Olympus. Jos raida ypač suaktyvėjo nuo tada, kai buvo atrasti ir pritaikyti netiesinės optikos principai.

## 2.2. Netiesinė optika

Toliau apžvelgsime pagrindinius netiesinius procesus, kurie būdingi mikroskopijai.

1931 metais Maria Göppert-Mayer teoriškai parodė, kad kartu veikiantys mažesnės energijos fotonai gali sužadinti tokią būseną, kuri paprastai pasiekama dėl vieno didesnės energijos fotono sugerties [14]. Šis reiškinys vadinamas daugiafotoniu sužadinimu. Laiko tarpas, per kurį pasireiškia šis kvantinis įvykis, yra maždaug  $10^{-16}$  sekundžių eilės. Eksperimentiškai tai pavyko parodyti tik po 30 metų, kai buvo išrastas lazeris. O praėjus dar beveik trisdešimčiai metų, 1990 metais mokslininkai Denk, Stickler ir Webb pademonstravo pirmąjį netiesinį dviejų fotonų sužadinimo fluorescencijos 2PEF mikroskopą [15].

Fotonų energija yra atvirkščiai proporcinga fotonų bangos ilgiui [5]. Taigi, turėdami lazerį, kurio generuojamų fotonų bangos ilgis  $\lambda = 1030$  nm, galime sužadinti fluoroforą, kurį paprastai sužadiname su vienu fotonu, kurio bangos ilgis  $\lambda = 515$  nm. Šis procesas pavaizduotas 1 pav. pateiktoje Jablonskio energijos lygmenų diagramoje.



1 pav. Jablonskio energijos lygmenų diagrama.

Daugiafotoniai reiškiniai vadinami netiesiniais dėl to, kad turi netiesinę priklausomybę nuo žadinimo šviesos intensyvumo [5]. Tai reiškia, kad padvigubinus intensyvumą gausime keturis kartus didesnę netiesinį signalą. Kadangi jie pasireiškia per labai trumpą laiką, tai svarbus būtent intensyvumas, o ne vidutinė galia. Galia yra energija per laiko vienetą  $W = J \cdot s^{-1}$ , o intensyvumas  $I$  – fotonų skaičius ploto vienetui per laiką. Taigi, intensyvumas gali būti skaičiuojamas kaip galia per plotą  $I = \frac{W}{cm^2}$ .

Norėdami padidinti intensyvumą, turime fokusuoti šviesą tiek erdvėje, tiek ir laike. Erdvėje sufokusuoti lazerio pluoštą galime naudodami optinius elementus, o laike – lazerius, kurie generuoja ultratrumpus impulsus [5]. Kadangi netiesiniai optiniai procesai turi kvadratinę arba kubinę priklausomybę nuo žadinančios spinduliuotės intensyvumo, tai šie procesai pasireišk tik didelės skaitinės apertūros objektyvo židinio taške, kuriame fotonų tankis yra pakankamas. Visur kitur intensyvumas staigiai krenta, dėl to netiesinį signalą gauname tik iš labai mažo erdvės taško. Tai veikia kaip konfokalinės apertūros analogija ir yra vienas pagrindinių privalumų norint formuoti trimačius vaizdus. Kitas privalumas prieš klasikinę šviesaus lauko ar konfokalinę mikroskopiją yra tas, kad žadinimui naudojama spinduliuotė yra NIR (anglų k. Near–Infrared) bangų srityje. Ilgesnių bangų spinduliuotė yra mažiau sklaidoma ir sugerama, dėl to gali giliau įsiskverbti į biologinius audinius.

Netiesinis optinis mikroskopas gali registruoti ne tik 2PEF, bet ir būti modifikuotas papildomiems netiesiniams režimams. Papildomos informacijos apie bandinius galime sužinoti iš antros harmonikos generacijos (anglų k. SHG) ir trečios harmonikos generacijos (anglų k. THG). SHG atveju du fotonai virsta vienu dvigubai didesnio dažnio fotonu be medžiagos sužadavimo. SHG sąveikia pasireiškia necentrosimetrinėse medžiagose, o efektyvumas ir generuojamo signalo poliarizacija priklauso nuo medžiagos kristalinės struktūros [2].

THG yra procesas, pasižymintis trečios eilės netiesiniu jautriu  $\chi^{(3)}$  [16]. Jo metu trys tos pačios energijos fotonai generuoja vieną fotoną, kuris turi tris kartus didesnę dažnį. THG nėra apribota vien necentrosimetrinių medžiagų.

### 2.3. Biologinių audinių netiesinė mikroskopija

Siekiant suprasti biologinių audinių funkciją ir patologiją svarbu žinoti jų struktūrą bei jos pokyčius. Priklausomai nuo pasirinkto vaizdinimo režimo galima atskirai išskirti vienas struktūras

nuo kitų arba vaizdinti keletą vienu metu. Pagrindinės dalys, kurias galime matyti audiniuose, yra ląstelių branduoliai, tarpląstelinis užpildas ir citoplazma.

Histologijoje pjūvių H&E dažymas yra vienas populiariausių metodų atliekant diagnostiką [17]. Jis suteikia kontrastą tarp ląstelės branduolių, citoplazmos ir tarpląstelinio užpildo. Šis dažymo metodas geriausiai išryškina branduolius ir yra patologų laikomas auksiniu standartu vėžio diagnostikai. Deja, bet šviesaus lauko mikroskopijai reikalingi itin ploni bandinių pjūviai ( $5 \mu\text{m}$ ). Jų paruošimas ilgai užtrunka (10-72 val.) [18]. Dėl to 3D vaizdų formavimas tampa labai sudėtingas, nes reikia vaizdinti daug atskirų bandinių, o tai užimta daug laiko. Be to, tai apsunkina pjūvių koregistraciją.

Netiesinis skenuojantis optinis mikroskopas ne tik išsprendžia 3D vaizdų formavimo problemą, bet ir suteikia papildomų vaizdinimo kontrastų panaudojant įvairius netiesinius režimus. 2PEF, SHG ir THG vaizdinimo režimai suteikia papildomos informacijos ir yra naudojami medicininėje diagnostikoje [2,5–7].

Kolagenas neturi centro simetrijos, dėl to gerai generuoja SHG signalą. H&E dažytuose pjūviuose naudojamas THG režimas gerai atvaizduoja ląstelių branduolius ir taip pat suteikia informacijos apie tarpląstelinį užpildą. Patologijoje yra žinoma, kad vėžinių ląstelių paveiktuose audiniuose pakinta kolageno struktūra [3]. Dėl to vėžinių susirgimų diagnostika panaudojant netiesinę mikroskopiją yra aktuali tema ir turi plačias pritaikymo galimybes [2,5–7].

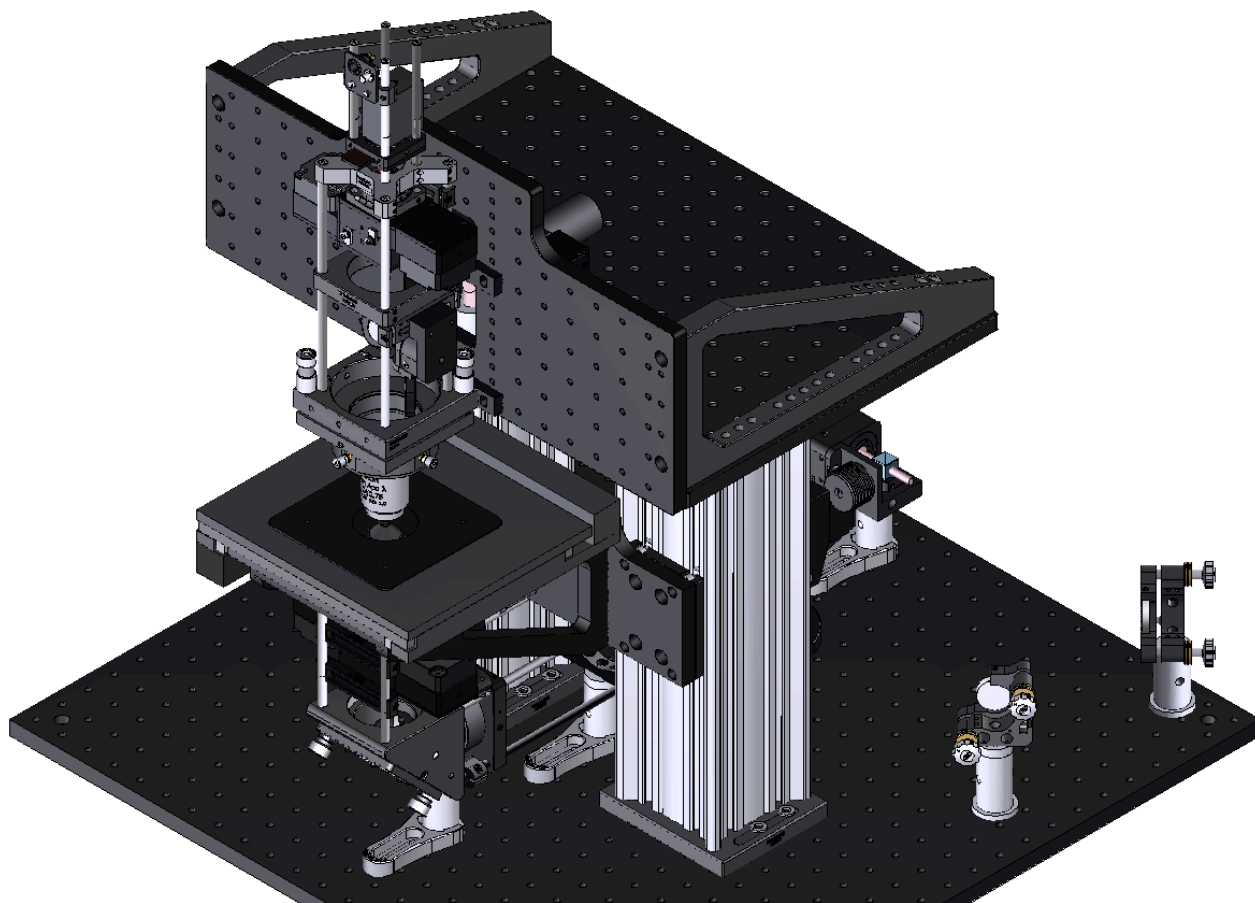


### 3. Instrumentai ir priemonės

Konfokalinis mikroskopas vis dar populiarus įrankis medicinos ir mokslo laboratorijose, bet netiesinis skenuojantis mikroskopas yra unikalus, nes viename židinio taško tūryje galima bandyti naujas technikas.

Netiesinė mikroskopija Lietuvoje yra dar jauna sritis, o norint ją vystyti reikia eksperimentinės bazės ir patirties turinčių žmonių. Sukūrus tokią bazę galima imtis biomedicininį tyrimų ir galiausiai taikymų klinikinės ir inovatyviosios medicinos srityse. Viena iš šio darbo užduočių buvo sukurti netiesinį skenuojantį mikroskopą, kuris leistų atlikti biologinių audinių tyrimus.

Mikroskopas buvo kuriamas remiantis V. Barzdos laboratorijos patirtimi Toronte. Pirminį mikroskopo ir programinės įrangos dizainą sukūrė Toronto ir VU absolventas L. Kontenis [19]. Netiesinio skenuojančio mikroskopo 3D modelis pateiktas 2 pav.



2 pav. Netiesinio skenuojančio mikroskopo 3D modelis.

### 3.1. Netiesinio optinio skenuojančio mikroskopo sukūrimas

Pagrindiniai elementai, sudarantys netiesinį mikroskopą, yra lazeris, optinė sistema ir signalo detektoriai. Toliau šiame skyrelyje detaliau apžvelgsime kiekvieną iš jų.

Vienas pagrindinių netiesinio mikroskopo elementų yra lazeris. Lazeriniai šaltiniai turi pasižymėti trumpais impulsais (100–1000 fs), bangos ilgių spektro ruožu nuo 700 nm iki 1100 nm (geriausia, jei bangos ilgį galima derinti) ir sąlyginai nedidele galia (iki 1 W). Daugiau nei du dešimtmečius mikroskopų rinkoje dominuoja sinchronizuotų modų femtosekundiniai titano safyro ( $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ ) kietojo kūno lazeriai [20]. Šių lazerų impulso trukmė apie 50–100 fs, bangos ilgį galima derinti nuo 700 nm iki 1000 nm, tačiau jiems kaupinti reikalingas papildomas lazeris.

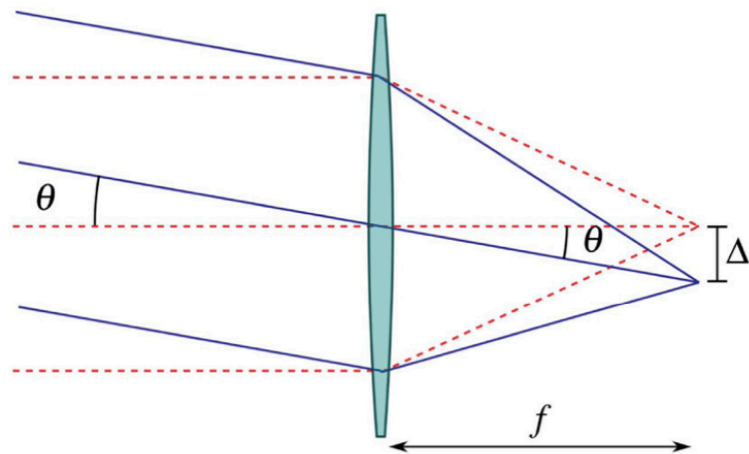
Rinkoje vis dažniau pasirodo ir kitų šaltinių, kurie yra tinkami naudojimui netiesiniuose mikroskopuose [21]. Vienas tokių yra iterbiu legiruotas kalio gadolinio volframato ( $\text{Yb:KGW}$ ) osciliatorius. Jų kaupinimo spinduliuotė kovertuojama į lazerinę labai efektyviai ir išskiria mažai nenaudingos šilumos [22]. Trivalenčių iterbio jonų sugerties linija ties 980 nm bangos ilgiu leidžia juos efektyviai kaupinti su telekomunikacijoje gerai išvystytais indčio galio arsenido ( $\text{InGaAs}$ ) lazeriniais diodais. Tiesiogiai iš osciliatoriaus gaunama vidutinė galia yra pakankama netiesinės mikroskopijos taikymams, dėl to jie yra pigesni už titano safyro sistemas.  $\text{Yb:KGW}$  impulsų trukmė šiek tiek ilgesnė, paprastai 100–500 fs.

Šiame darbe naudojamas FLINT (Light Conversion) osciliatorius, kuris puikiai tinka netiesinės mikroskopijos taikymams. Šio šaltinio centrinis bangos ilgis 1030 nm, impulso trukmė 100 fs, impulsų pasikartojimo dažnis 76 MHz, o vidutinė galia 1 W.

Biologiniams bandiniams vaizdinti užtenka vos kelių nJ impulsų energijos. Bandinį turi pasiekti 1–20 mW vidutinė galia. Atlikus mikroskopo galios pralaidumo matavimus paaiškėjo, kad pralaidumas yra 20 %. Toks pralaidumas yra pakankamas, nes žinant, kad osciliatoriaus vidutinė galia 1 W, tai maksimaliai ties bandiniu galime turėti net 0,2 W. Tai yra dešimt kartų daugiau negu reikia tipiniams bandiniams.

Pačiu paprasčiausiu atveju bandinio atvaizdą galime gauti skenavimą atlikdami stumdant bandinį per fiksuotą lazerio pluoštą. Tačiau norint didesnio vaizdų formavimo greičio, bandinių stabilumo ir vaizdų kokybės reikia skenuoti lazerio pluoštą ant statiškai įtvirtinto bandinio [23]. Netiesiniame skenuojančiame mikroskope vaizdas formuojamas panaudojant vieno taško rastrinį skenavimą. Šis būdas yra sudėtingesnis, todėl reikalauja papildomų prietaisų konstruojant

mikroskopą. Įrenginiai, su kuriais galima skenuoti pluoštą, yra akusto-optiniai deflektoriai [24], rezonansiniai [25] ir nerezonansiniai [26] galvanometriniai veidrodžiai ir kt. Šiame darbe buvo pasirinkta naudoti pora galvanometrinių skenuojančių veidrodžių. Vienas skenavimui X ašimi, kitas – Y ašimi. Atliekant tokį skenavimą svarbu išlaikyti pluoštą centruotą ant objektyvo galinės apertūros [27]. Taip pat turime užtikrinti, kad lazerio pluoštas pilnai padengtų objektyvo galinę apertūrą [22]. Įvertinus šias kritines sąlygas matome, kad vienas iš būdų skenuoti bandinį yra keičiant pluošto kritimo kampą  $\theta$  ant objektyvo galinės apertūros. Tai yra pagrindinis uždavinys konstruojant tokią skenavimo sistemą. 3 pav. pavaizduota, kaip kinta atstumas  $\Delta$ , esantis židinio plokštumoje atstumu  $f$ , priklausomai nuo kampo  $\theta$ .



3 pav. Atstumo  $\Delta$  priklausomybė nuo skenavimo kampo  $\theta$  [22].

Objektyvas yra neatsiejama kiekvieno mikroskopo dalis. Priklausomai nuo mikroskopo tipo, jų gali būti vienas arba daugiau [22]. Jeigu naudojame atspindžio (anglų k. Epi) konfigūraciją, tai objektyvas yra vienas ir per jį keliauja tiek žadinimo, tiek emisijos spinduliuotė. Jeigu mikroskopas veikia pralaidumo režimu (anglų k. Trans), tada naudojami du objektyvai: vienas skirtas žadinimo spinduliuotei, o kitas surinkti emisijos spinduliuotę iš bandinio ir nukreipti link detektoriaus.

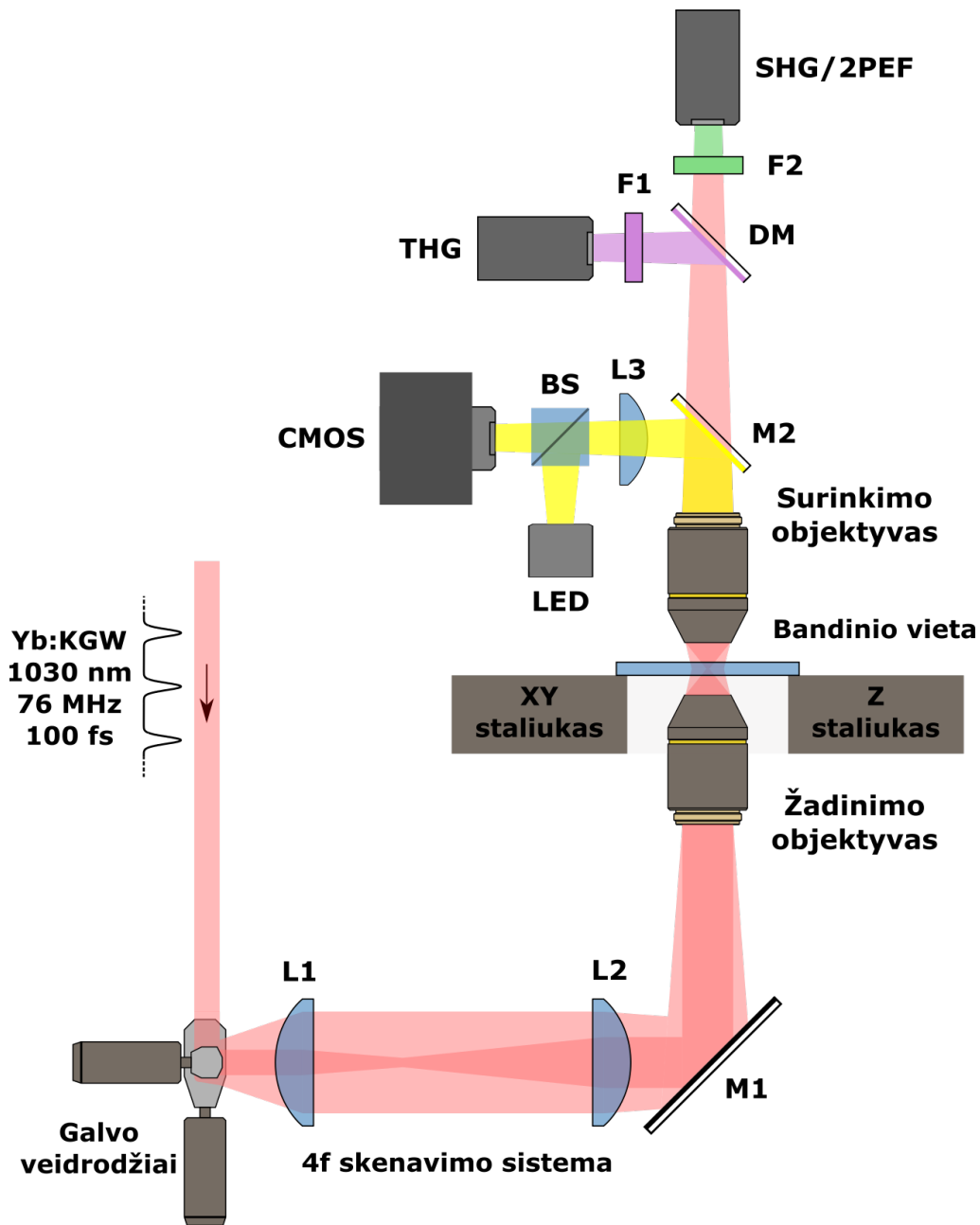
Renkantis objektyvus reikia atsižvelgti į jų parametrus specifiniams taikymams. Pagrindiniai objektyvų parametrai yra skaitinė apertūra NA, matymo laukas (anglų k. FOV), didinimas ir darbinis atstumas [28]. Skaitinė apertūra nurodo, kokių kampų šviesa sklinda iš/į objektyvą. Imersijos skysčio nenaudojantys objektyvai siekia iki  $NA=1$ , o didesnėms vertėms reikalingi imersiniai objektyvai. Turime įvertinti, kad didesnė skaitinė apertūra apriboja atstumą nuo bandinių, dėl to naudoti didelės NA vertės objektyvus ne visada patogu turint storus bandinius. Jeigu bandinys

yra stipriai sklaidantis, tuomet svarbu, kad surenkančio objektyvo NA būtų didesnė arba bent jau ne mažesnė už žadinančio objektyvo [29].

FOV parametras nurodo, koks skersmuo yra matomas ant bandinio. Didinimas nurodo, koki fizinį lauko dydį mm atitinka prieš tai jau minėtas skenavimo kampas  $\theta$ . Šis parametras turi būti suderintas kartu su objektyvo FOV, nes neverta skenuoti už ribų.

Netiesinei skenuojančiai mikroskopijai optimalu pasirinkti tokį objektyvą, kuris turėtų sąlyginai mažą didinimą, bet turėtų sąlyginai didelę NA vertę. Šiame darbe žadinimui pasirinktas Nikon CFI Lambda Plan Apochromat 20X/0.75 objektyvas, o signalo surinkimui naudojami įvairūs objektyvai priklausomai nuo taikymo, nes norint surinkti UV srityje esantį THG signalą reikia atsižvelgti į objektyvo pralaidumą.

Patogiam bandinio transliavimui naudojamas XY motorizuotas staliukas (ASI), o Z ašyje naudojamas atskiras staliukas (Standa), kuris transliuoja žadinimo objektyvą. Mikroskopas gali registruoti šviesaus lauko vaizdą per CMOS spalvotą kamerą (FLIR). Šviesaus lauko kameros apšvietimui buvo pasirinktas plataus matomo spektro LED šaltinis (Thorlabs), kuriam buvo pagamintas valdiklis. Netiesiniams MPF, SHG ir THG signalams atskirti naudojami filtrai (Thorlabs: BP530-10, BP514.5-10 ir FGUV11). Jiems užregistruoti naudojami fotodaugintuvai (Hamamatsu, H10682) ir duomenų surinkimo plokštė (National Instruments). 4 pav. pateikta netiesinio optinio skenuojančio mikroskopo schema.



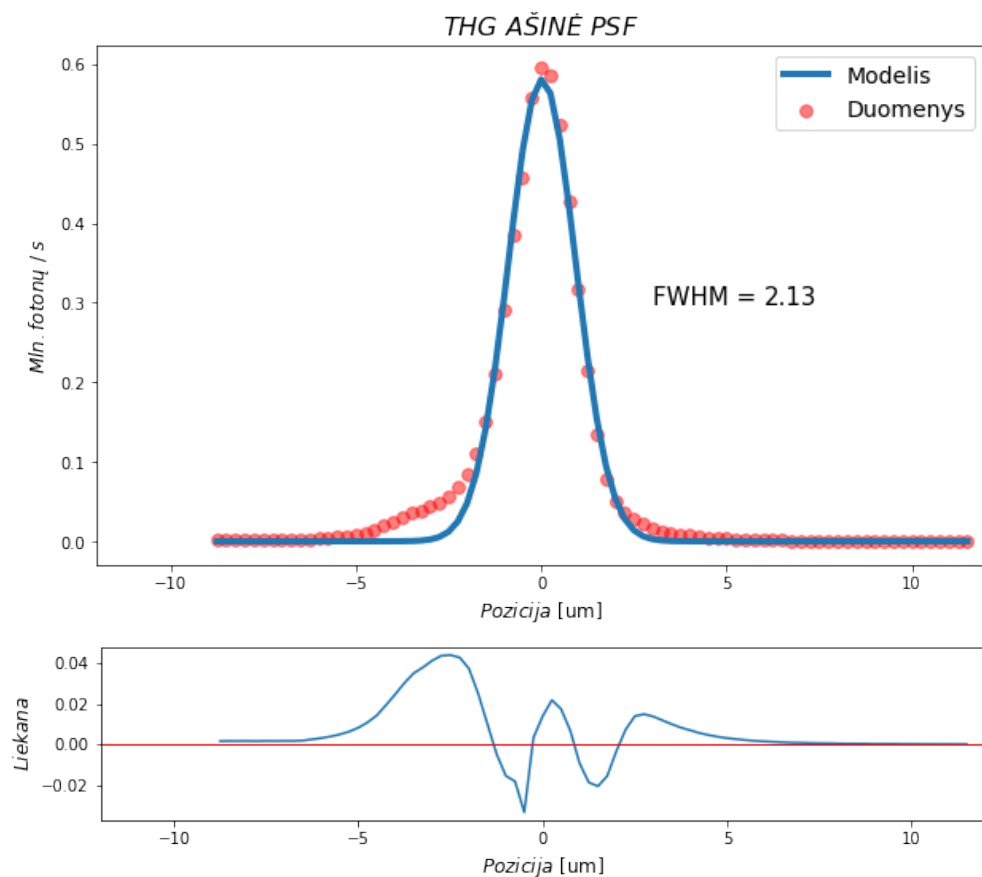
4 pav. Netiesinio optinio skenuojančio mikroskopo schema. Mikroskopą sudaro šie komponentai: L1, L2 ir L3 – lęšiai, M1 ir M2 – veidrodžiai, BS – pluošto daliklis, LED – baltos šviesos diodas, CMOS – kamera, DM – dichroinis veidrodis, F1 ir F2 – filtrai.

Vienas iš svarbiausių parametru, apibūdinančių XYZ skyrą, vaizdo kokybę ir efektyvumą yra taško sklaidos funkcija (anglų k. PSF). Mikroskopu gautas vaizdas yra realaus objekto bandinyje konvoliucija su taško sklaidos funkcija. Taigi, atlikę eksperimentą galime nustatyti mikroskopo raišką. Raiška apibūdinama XY ir Z plokštumose, bet ašinė PSF visada yra blogesnė.

Medžiagos, turinčios  $\chi^{(3)}$  netiesiškumą, gali efektyviai generuoti THG signalą ties skirtingų lūžio rodiklių sandūra dėl Gouy fazės poslinkio [19]. Taigi, fokusuodami į vieną iš dengiamojo

stikliuko paviršių gauname THG signalą. Norint nustatyti ašinę PSF atliekamas eksperimentas, kurio metu registruojamas THG signalo intensyvumas nuo dengiamojo stikliuko paviršiaus transliuojant objektyvą Z kryptimi. Gauti duomenys aproksimuojami Gauso funkcija, kurios pilnas plotis ties puse maksimalaus signalo aukščio (anglų k. FWHM) parodo mikroskopo raišką.

Modeliavimui buvo panaudota atviro kodo “Python” programavimo kalba ir “Markov Chain Monte Carlo” modeliavimo algoritmas. Algoritmo laisvaisiais parametrais buvo pasirinkta amplitudė, centrinė dalis  $\mu$  ir standartinis nuokrypis  $\sigma$ . Eksperimento duomenys ir modelis pateikti 5 pav. Iš šių rezultatų matome, kad mikroskopo raiška ašine kryptimi siekia  $2,13 \mu\text{m}$ . Tokia raiška yra pakankama atliekant bandinių optinius pjūvius ir formuojant trimačius jų vaizdus.



5 pav. THG ašinės PSF eksperimento duomenys ir modelis.

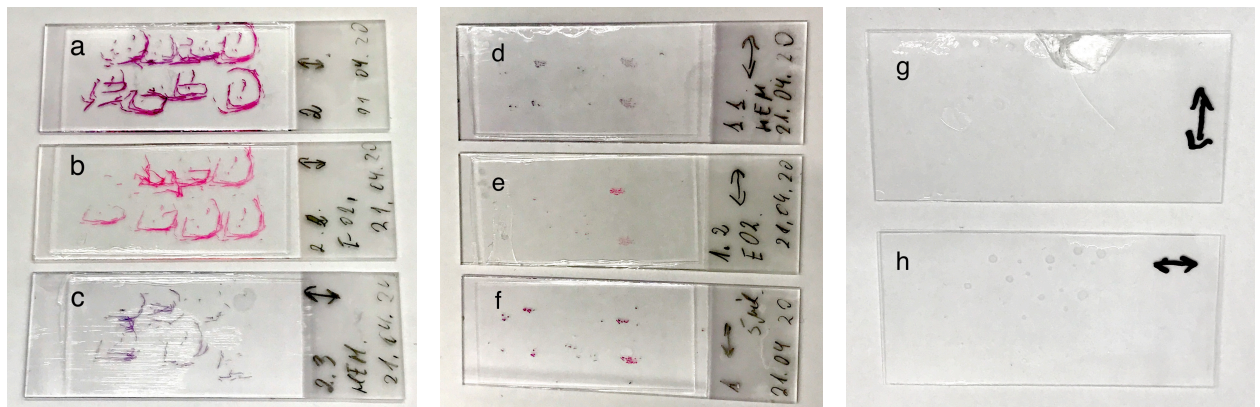
PSF eksperimentas yra rutininis laboratorijos matavimas, kuris turi būti atliekamas periodiškai. Jis nėra sudėtingas ir nereikalauja didelių laiko sąnaudų, tačiau suteikia daug informacijos apie netiesinio mikroskopo būklę. Sekant ją nuolat galima laiku pastebėti nukrypimus ir juos ištaisyti.

### 3.2. Biologiniai bandiniai

Šiame darbe buvo tirti žiurkės uodegos sausgyslės ir žmogaus storosios žarnos biologiniai audiniai. Žiurkės uodegos sausgyslė buvo pasirinkta kaip modelinis bandinys. Kadangi darbo tikslas – nustatyti, kokią įtaką THG signalui nuo tarpląstelinio užpildo turi dažai, tai 5  $\mu$ m storio histologiniai pjūviai buvo dažyti skirtingai:

- hematoksilinu ir eozinu (H&E);
- tik hematoksilinu;
- tik eozinu;
- nedažyti.

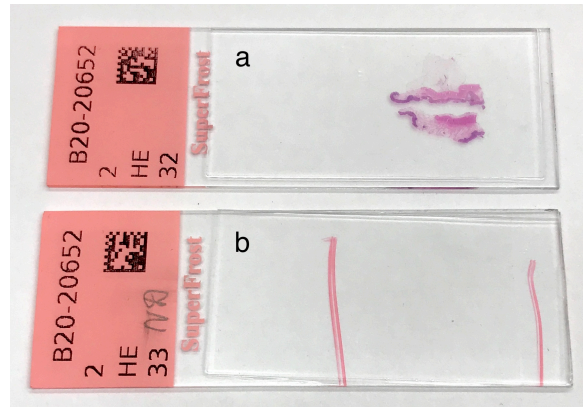
Visi šie dažymo metodai buvo pritaikyti žiurkės uodegos sausgyslės išilginiams ir skersiniams pjūviams. Taigi, iš viso buvo paruošti aštuoni modeliniai žiurkės uodegos sausgyslės bandiniai, kurie pateikti 6 pav.



6 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės bandiniai. Išilginiai pjūviai dažyti su:

hematoksilinu ir eozinu (H&E) – a, eozinu – b, hematoksilinu – c. Skersiniai pjūviai dažyti su: hematoksilinu – d, eozinu – e, H&E – f. Nedažytų bandinių skersinis pjūvis – g, išilginis pjūvis – h.

THG efektas buvo tirtas ir kitame bandinyje – storjoje žarnoje. Valstybinis patologijos centras (VPC) paruošė žmogaus storosios žarnos sveiko audinio 5  $\mu$ m storio skersinius pjūvius parafine. Bandiniai buvo paruošti remiantis VPC etikos taisyklėmis. Vienas bandinys buvo dažytas H&E, o kitas – nedažytas. Iš viso buvo paruošti du žmogaus storosios žarnos bandiniai, kurie pateikti 7 pav.



7 pav. Žmogaus storosios žarnos bandiniai. Skersinis pjūvis dažytas H&E – a, nedažytas – b.

### 3.3. Vaizdų analizė

Gautiems skirtingų netiesinių režimų vaizdams analizuoti buvo panaudotas struktūrinės koreliacijos vaizdų analizės (anglų k. Structural Crosscorrelation Image Analysis, SCIA) metodas [30], o su atviro kodo programavimo kalba “Python” buvo sukurtas algoritmas.

Kadangi MPF, SHG ir THG signalai registruojami iš to paties mikroskopo židinio taško, dėl to juos galima palyginti tarpusavyje pikselio tikslumu. Skirtingų kanalų normuotos to paties pikselio vertės žymimos  $A_{i,k}$  ir  $B_{i,k}$ . Jų sandauga  $Z_{i,k}$  suteikia informacijos apie koreliaciją arba antikoreliaciją:

$$Z_{i,k} = A_{i,k} \cdot B_{i,k}, \text{ kur } A_{i,k} = \frac{a_{i,k}}{a_{max}} \text{ ir } B_{i,k} = \frac{b_{i,k}}{b_{max}} \quad (3)$$

SCIA metodas gali būti pritaikytas ir trijų multimodalinės netiesinės mikroskopijos vaizdų analizei.



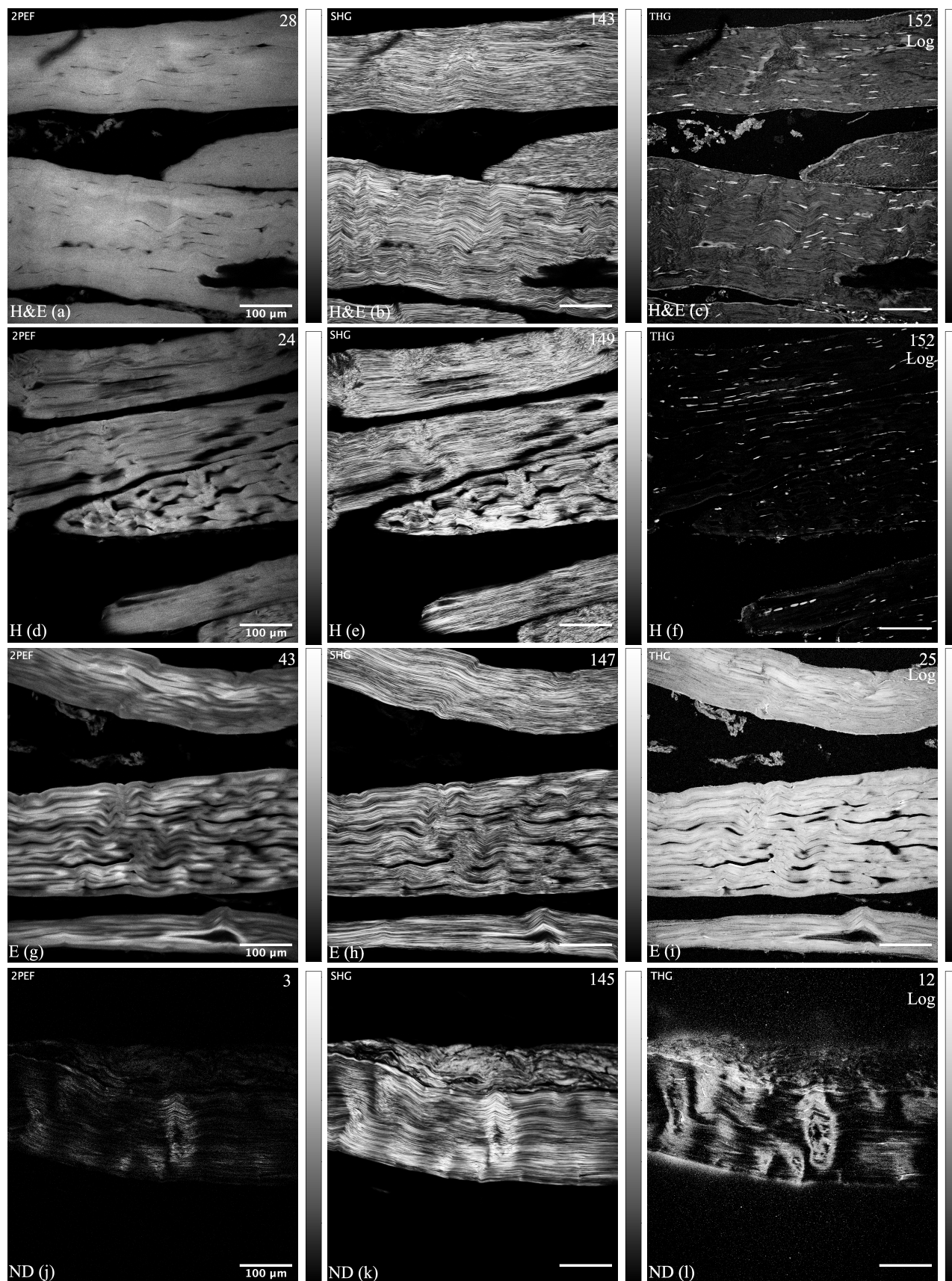
## 4. Rezultatai

Visi matavimai buvo atlikti išlaikant tas pačias sąlygas. Vidutinė galia ties bandiniu buvo 20 mW. Mikroskopo matymo laukas – 600  $\mu$ m. Pilno vaizdo signalo integravimo trukmė 20 s. Matricos dydis 298800 pikselių (1660 stulpelių, 1800 eilučių). Vieno pikselio integravimo trukmė 6,17  $\mu$ s. Lazerio pluošto poliarizacija buvo tiesinė, kurios orientacija horizontali pateiktų vaizdų atžvilgiu.

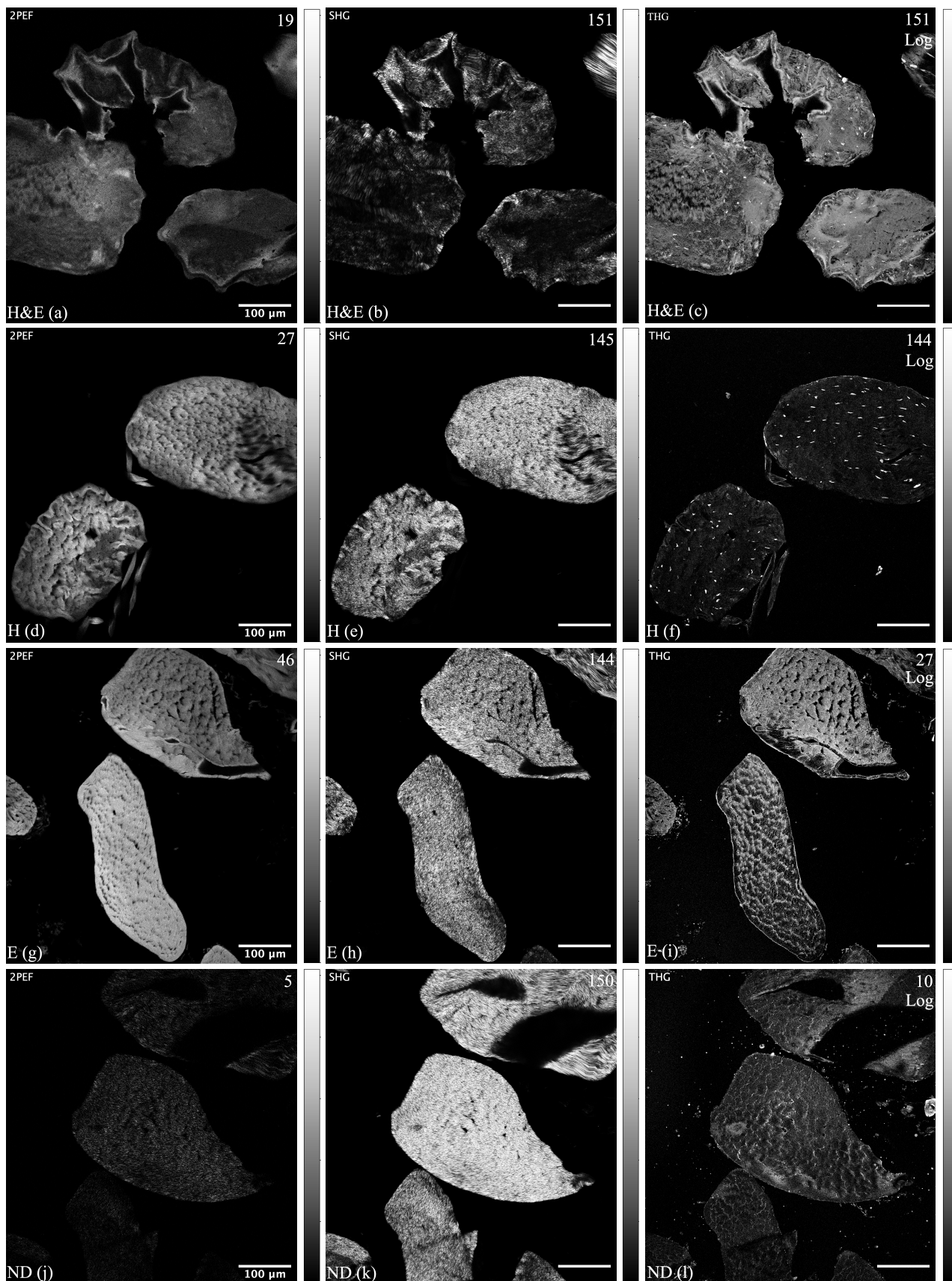
### 4.1. Žiurkės uodegos sausgyslės bandinys

Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio MPF, SHG ir THG vaizdai pateikti 8 pav. (a), (b) ir (c) vaizdai dažyti su hematoksilinu ir eozinu (H&E). (d), (e) ir (f) – tik su hematoksilinu (H). (g), (h) ir (i) – tik su eozinu (E). (j), (k) ir (l) – vaizdai iš nedažyto bandinio. THG vaizdai pateikti logaritminėje skalėje dėl plataus signalo verčių diapazono.

Analogiškai pateikti žiurkės uodegos sausgyslės skersinio pjūvio netiesiniai vaizdai 9 pav. (a), (b) ir (c) vaizdai gauti iš dažyto bandinio su hematoksilinu ir eozinu, (d), (e) ir (f) – tik su hematoksilinu, (g), (h) ir (i) – tik su eozinu, o (j), (k) ir (l) – nedažyto bandinio. THG vaizdai pateikti logaritminėje skalėje.



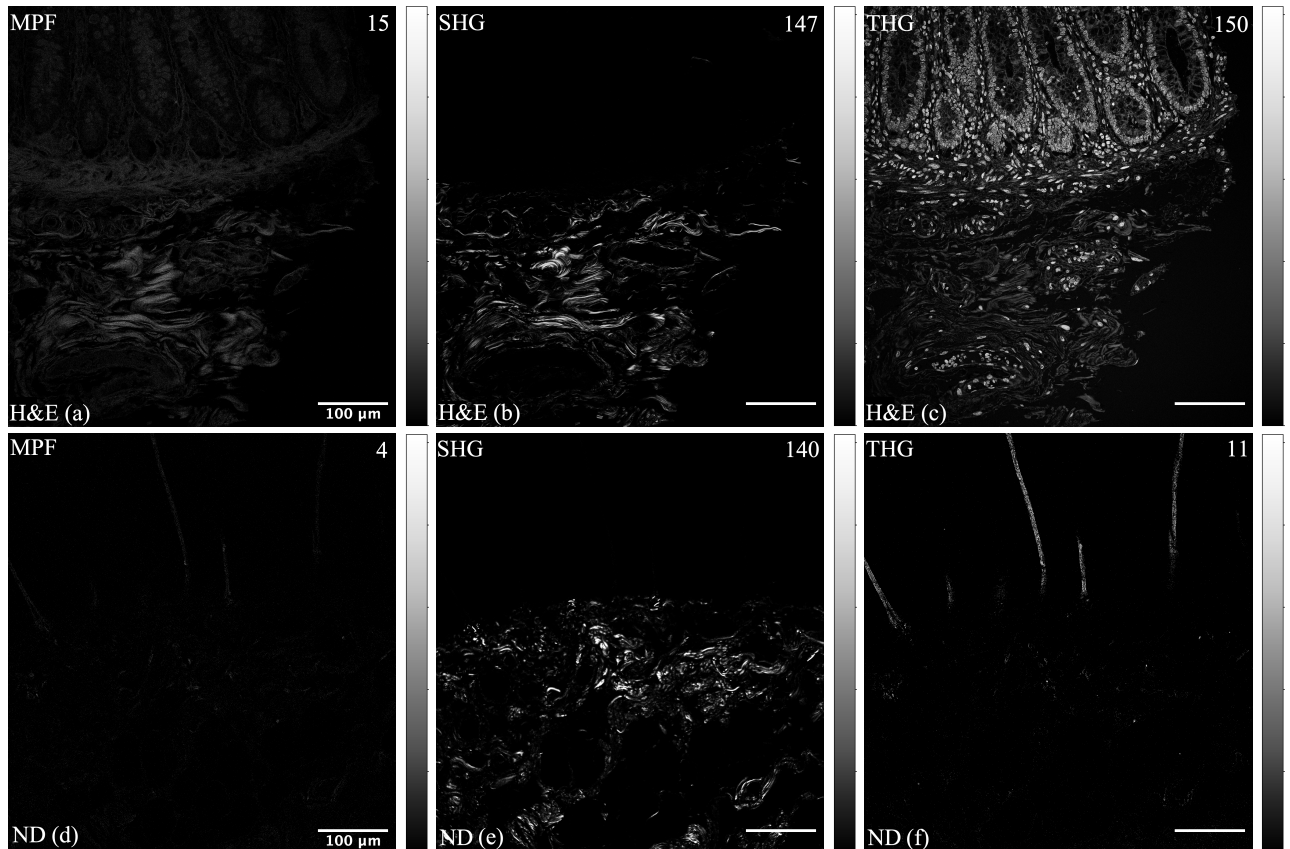
8 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio MPF, SHG ir THG vaizdai. (a), (b), (c) – dažyti H&E. (d), (e), (f) – dažyti su hematoksilinu. (g), (h), (i) – dažyti su eozinu. (j), (k), (l) – nedažyti.



9 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės skersinio pjūvio MPF, SHG ir THG vaizdai. (a), (b), (c) – dažyti H&E. (d), (e), (f) – dažyti su hematoksilinu. (g), (h), (i) – dažyti su eozinu. (j), (k), (l) – nedažyti.

## 4.2. Žmogaus storosios žarnos bandinys

Sveiko žmogaus storosios žarnos skersinio pjūvio MPF, SHG ir THG vaizdai pateikti 10 pav. (a), (b) ir (c) vaizdai gauti iš bandinio, dažyto hematoksilinu ir eozinu (H&E). (d), (e) ir (f) pateikti nedažyto bandinio (ND) netiesiniai vaizdai.



10 pav. Žmogaus storosios žarnos skersinio pjūvio MPF, SHG ir THG vaizdai.

(a), (b), (c) – dažyti H&E. (d), (e), (f) – nedažyti.

Šių bandinių apatinėje dalyje matosi storosios žarnos sienelė, kurią sudaro kolagenas, o viršutinėje dalyje – storosios žarnos gleivinė. Kolageno struktūra gerai matosi SHG vaizduose (10 pav. (b) ir (e)). Gleivinės makro struktūrą matome dažyto bandinio MPF režimo vaizde (10 pav. (a)). Detalesnį jos vaizdą su ląstelių branduoliais vaizduoja dažyto bandinio THG režimas (10 pav. (c)).

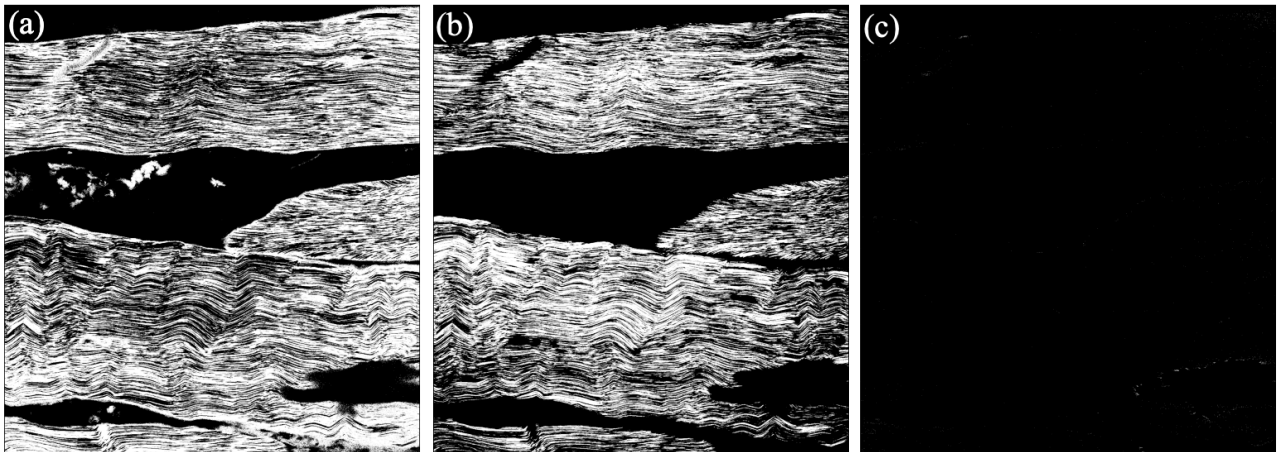
Nedažytame bandinyje autofluorescencija labai silpna ir nesuteikia pakankamo kontrasto (10 pav. (d)). Geras kontrastas šiame bandinyje matomas tik SHG režimo vaizde (10 pav. (e)). THG vaizde (10 pav. (f)) galime matyti tik atskiras gleivinės kontūro dalis, kurios matomos ir autofluorescencijos vaizde (10 pav. (d)).

## 5. Rezultatų aptarimas

### 5.1. Žiurkės uodegos sausgyslė

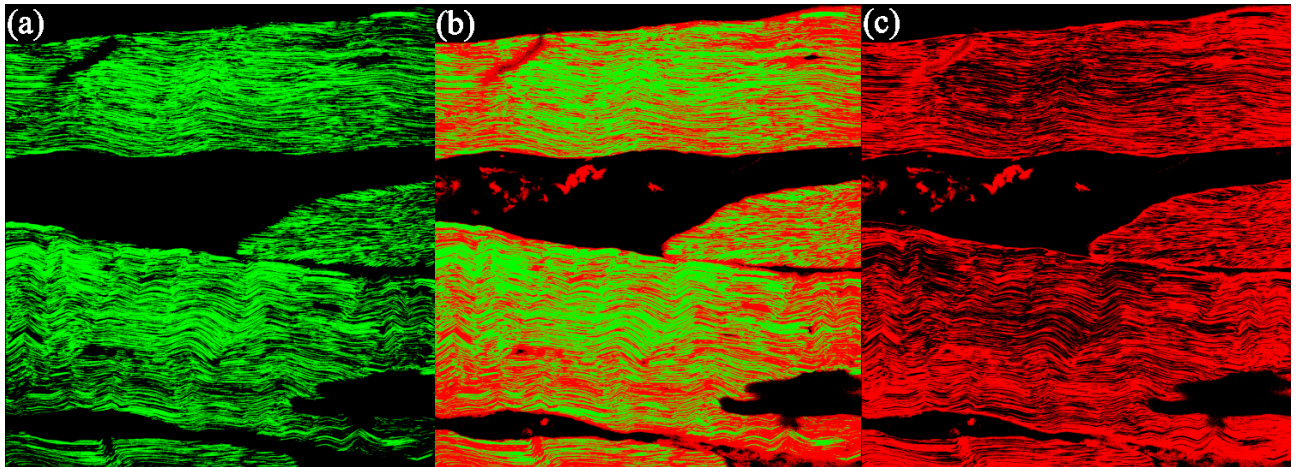
Iš pateiktų žiurkės uodegos sausgyslės netiesinių vaizdų (išilginio ir skersinio pjūvio) matome, kad skirtingi dažai neturi įtakos SHG signalui, kuris sklinda iš kolageno. Nedažytų bandinių SHG vaizduose (8 pav. (k) ir 9 pav. (k)) užregistruotų fotonų maksimalus skaičius labai panašus kaip ir dažytuose bandiniuose, vadinasi dažų molekulės prisitvirtindamos sudaro artimą centrosimetrinei struktūrai.

Tačiau įdomu palyginti MPF ir SHG vaizdus tarpusavyje. Matome, kad H&E bandinyje MPF vaizde (8 pav. (a)) signalas iš tarpląstelinio užpildo pasiskirstęs homogeniškai. Tuo tarpu to paties bandinio SHG vaizde (8 pav. (b)) signalas charakterizuoja kolageno struktūrą, kuris išsidėstęs išilgai. Abiejų vaizdų koreliacija ir antikoreliacija pateikta 11 pav. Nekoreliuotame MPF kanalo vaizde (11 pav. (a)) matome kolageno invertuotą vaizdą, kuris leidžia manyti, kad kolageno skaidulos išsidėsto viena šalia kitos su priešingų ženklų dipoliais, todėl žadinant su tiesine lazerio pluošto poliarizacija SHG signalas duoda būtent tokį kontrastą. Vietose, kuriose skaidulų dipoliai vienas šalia kito turi tos pačios reikšmės ženklą, gauname didesnę signalo intensyvumą, o kur dipoliai yra priešingo ženklo – intensyvumas sumažėja. Iš nekoreliuoto SHG kanalo vaizdo (11 pav. (c)) galima spręsti, kad visas kolagenas bandinyje buvo padengtas H&E dažais.



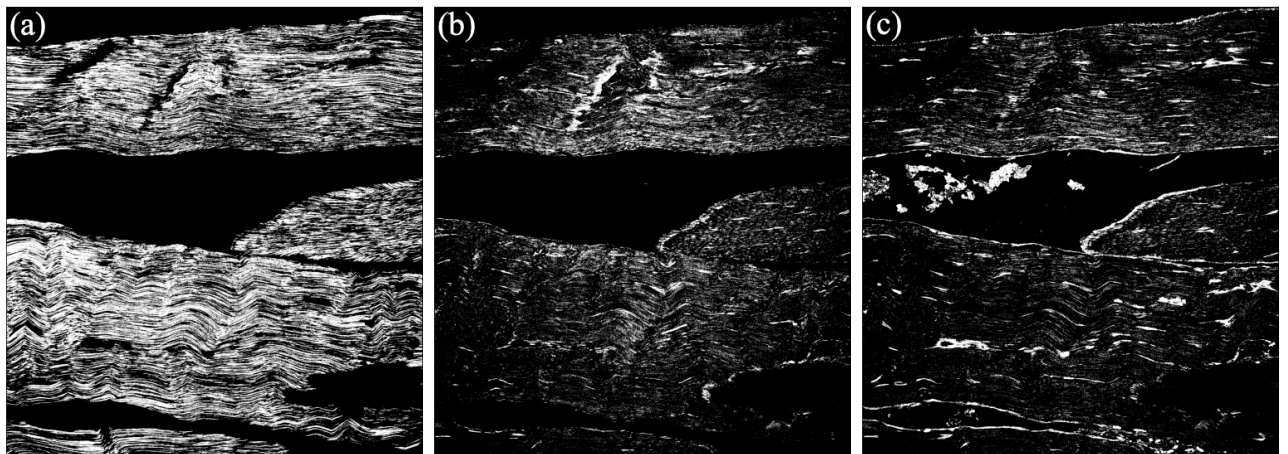
11 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių MPF ir SHG vaizdų koreliacija ir antikoreliacija. (a) – nekoreliuotas MPF kanalo vaizdas, (b) – koreliacija tarp MPF ir SHG, (c) – nekoreliuotas SHG kanalo vaizdas.

Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF ir SHG koreliacija ir antikoreliacija gerai matosi 12 pav., kur jų koreliacija (a) pateikta žalia spalva, antikoreliacija (c) raudona spalva, o abu vaizdai kartu (b).



12 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF ir SHG koreliacija ir antikoreliacija. (a) – koreliacija tarp MPF ir SHG, (b) – vaizdas (a) ir (c) kartu, (c) – nekoreliuotas MPF kanalo vaizdas.

Panašų efektą duoda SHG su THG vaizdų palyginimas. Jų koreliacija ir antikoreliacija pateiktos 13 pav.

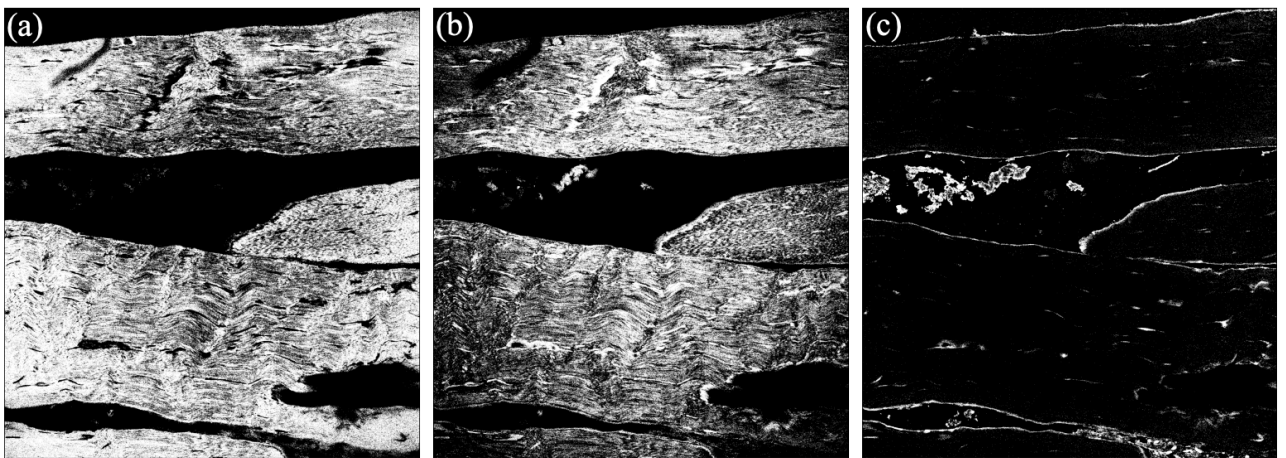


13 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų SHG ir THG koreliacija ir antikoreliacija. (a) – nekoreliuotas SHG kanalo vaizdas, (b) – koreliacija tarp SHG ir THG, (c) – nekoreliuotas THG kanalo vaizdas.

Tai įdomu ir nauja, nes yra parodyta ir aprašyta, kad eozinas (E) ir hematoksilinas (H) duoda MPF signalą, o H, kuriuo nusidažo ląstelių branduoliai, generuoja THG signalą [17]. Tačiau stebina tai,

kad THG režime galime matyti ne tik ląstelių branduolius, bet ir tarpląstelinį užpildą, kurį daugiausiai sudaro kolagenas. Tai patvirtina ir koreliacija tarp SHG ir THG kanalų (13 pav. (b)). Tuo tarpu nekoreliuotas THG signalo vaizdas (13 pav. (c)) išryškina ląstelių branduolius, kurių negalime matyti SHG vaizduose, nes branduolius nudažantis hematoksilinas turi trečios eilės netiesinį jautrį.

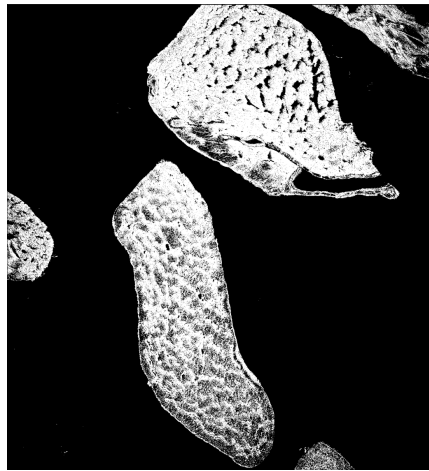
H&E dažytų bandinių MPF ir THG vaizdų koreliacija ir antikoreliacija pateikta 14 pav. Matome, kad nekoreliuotas THG kanalo vaizdas (14 pav. (c)) parodo mažiau ląstelių branduolių nei tame pačiame vaizde tarp SHG ir THG koreliacijos (13 pav. (c)). Vadinasi, hematoksilino fluorescencija iš ląstelių branduolių nevisai užgesina eozino fluorescenciją [17].



14 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės išilginio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF ir THG koreliacija ir antikoreliacija. (a) – nekoreliuotas MPF kanalo vaizdas, (b) – koreliacija tarp MPF ir THG, (c) – nekoreliuotas THG kanalo vaizdas.

Matome, kad nekoreliuotame MPF kanalo vaizde (14 pav. (a)) lieka nemažai signalo. Tai parodo, kad THG signalas iš tarpląstelinio užpildo nėra toks homogeniškas kaip MPF signalas. Prieš tai tą patį jau parodėme palygindami MPF ir SHG signalus.

Tarpląstelinis užpildas matosi visais dažytų bandinių atvejais (H&E, H ir E). Reikia pastebėti, kad H bandiniuose didžiausią THG signalą duoda ląstelių branduoliai (152 fotonai), o iš tarpląstelinio užpildo registruojame vidutiniškai tik vieną fotoną pikselyje. Tačiau E bandiniuose iš tarpląstelinio užpildo registruojame vidutiniškai 13 fotonų viename pikselyje. Tą patvirtina ir koreliacija tarp visų trijų netiesinių režimų (MPF, SHG ir THG) bandinyje, kuris dažytas tik eozinu. Žiurkės uodegos sausgyslės skersinio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF, SHG ir THG koreliacija pateikta 15 pav.



15 pav. Žiurkės uodegos sausgyslės skersinio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF, SHG ir THG koreliacija.

Įdomu ir tai, kad H&E bandiniuose THG signalas iš tarpląstelinio užpildo (5 fotonai) buvo mažesnis lyginant su E bandiniais (13 fotonų), o signalo intensyvumui iš ląstelių branduolių skirtingi dažai įtakos neturėjo. Iš to galima daryti išvadą, kad THG signalą histologiniuose pjūviuose gauname dėl hematoksilino ir eozino. Esant jiems kartu, H&E bandiniuose, THG signalas iš tarpląstelinio užpildo yra mažesnis, o didžiausias THG signalo intensyvumas iš tarpląstelinio užpildo kyla iš bandinių, kurie dažyti tik E.

Nedažytuose bandiniuose THG režimo vaizdų kontrastas priklauso nuo bandinio orientacijos. THG signalas pasireiškia vietose, kuriose keičiasi terpės lūžio rodiklis. Išilginio pjūvio (8 pav. (l)) vaizde išryškėja tik tos vietos, kuriose kolageno skaidulos nupjautos kampu. Tokių vietų išilginiame pjūvyje nėra daug. Skersiniame pjūvyje (9 pav. (l)) galima matyti tarpląstelinio užpildo struktūrą ir iš nedažyto bandinio. Taip yra dėl to, kad skersai nupjauta labai daug kolageno fibrilių, kurias sudaro atskiros pynės, o šias dengia ryškiau matomų fascijų kontūrai.

Autofluorescencija nedažytuose bandiniuose buvo mažo intensyvumo (3-5 fotonai pikselyje), todėl dažytų bandinių tas beveik neįtakoja. MPF signalas atliktuose matavimuose buvo nepriklausomas nuo bandinio pjūvio orientacijos.

## 5.2. Žmogaus storoji žarna

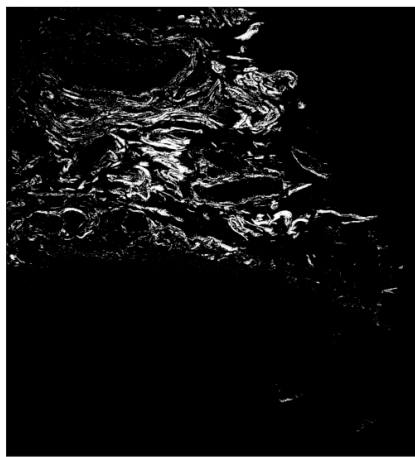
Atlikę kontrolinius matavimus su žmogaus storosios žarnos skersinio pjūvio bandiniais matome, kad prieš tai gauti žiurkės uodegos sausgyslės rezultai dažniausiai atsikartoja. H&E



bandinyje MPF signalas iš tarpląstelinio užpildo homogeniškas (10 pav. (a)). Nedažytame bandinyje (10 pav. (d)) autofluorescencija labai silpna (4 fotonai viename pikselyje).

SHG signalo intensyvumas tarp H&E bandinio (10 pav. (b)) ir nedažyto bandinio (10 pav. (e)) praktiškai nesiskiria ir yra artimas gautiems modeliniuose žiurkės uodegos sausgyslės bandiniuose.

H&E bandinio THG vaizdinimo režime matome signalą iš tarpląstelinio užpildo. Tą parodo ir koreliacija tarp visų trijų netiesinių režimų bandinyje, kuris dažytas H&E. Žmogaus storosios žarnos skersinio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF, SHG ir THG koreliacija pateikta 16 pav.



16 pav. Žmogaus storosios žarnos skersinio pjūvio, dažyto H&E, netiesinių vaizdų MPF, SHG ir THG koreliacija.

Įdomu tai, kad storosios žarnos THG signalo intensyvumas iš tarpląstelinio užpildo didesnis (15 fotonų) už gautą analogiškame žiurkės uodegos sausgyslės bandinyje (5 fotonai). Nėra aiški to priežastis, bet matome, kad žmogaus storosios žarnos bandinyje kolageno skaidulos išsidėsčiusios netvarkingai. Dėl to galime daryti prielaidą, kad THG signalo intensyvumą lemia specifinė tarpląstelinio užpildo struktūra.

THG režimu vaizdinami H&E histologiniai pjūviai suteikia gerą ląstelių branduolių ir tarpląstelinio užpildo kontrastą. Dėl to šio netiesinio režimo panaudojimas gali būti naudingas ir suteikti papildomos informacijos atliekant vėžio diagnostiką. Juolab, kad šis režimas nereikalauja papildomo bandinių paruošimo.

## 6. Išvados

1. Kolageną, kuris yra pagrindinis tarpląstelinio užpildo komponentas, galime vaizdinti THG režimu dėl dažymo hematoksilinu ir eozinu. Abu dažai tiek atskirai, tiek kartu generuoja THG signalą. Didžiausią THG signalo intensyvumą iš tarpląstelinio užpildo suteikia eozinas. THG signalo matavimų rezultatai ląstelių branduoliuose atitinka prieš tai publikuotus duomenis.

2. Kolageno kontrastas, matomas SHG vaizdinimo režime, atsiranda dėl tvarkingos kolageno skaidulų struktūros. Vietose, kuriose skaidulų dipoliai vienas šalia kito turi tos pačios reikšmės ženklą, gauname didesnę signalo intensyvumą, o kur dipoliai yra priešingo ženklo – intensyvumas sumažėja.

3. Kolageno struktūriniam SHG vaizdinimui H&E dažymas įtakos neturi, dėl to galima naudotis dideliais histologinių bandinių archyvo ištekliais, o ruošiant naujus bandinius dažymas nėra būtinas.

4. H&E bandiniai paruošiami standartiniams patologiniams tyrimams, dėl to jų vaizdinimas panaudojant THG režimą nereikalauja papildomo bandinių paruošimo ir suteikia gerą ląstelių branduolių ir tarpląstelinio užpildo kontrastą, kuris duoda papildomos informacijos ir gali būti panaudotas atliekant vėžio diagnostiką.

5. THG vaizdinimo režimas suteikia daugiau informacijos apie kolageno struktūrą ir išryškina fascijas, kuriomis yra apgaubtos kolageno pynės.

## Santrauka

Optinė mikroskopija yra plačiai naudojama biologinių audinių vaizdinimui. Hematoksilinu ir eozinu (H&E) dažytų pjūvių vaizdinimas šviesaus lauko mikroskopu naudojamas didelio našumo/ pirminės grandies klinikiniam vaizdinimui, o konfokalinis mikroskopas kartu su specialiais fluorescenciniais dažais naudojamas detaliam audinių, ląstelių ir jų komponentų vaizdinimui. Papildomai naudojami netiesinės optinės mikroskopijos metodai gali suteikti papildomų kontrastų ir naujos informacijos apie biologines struktūras. Viena tokių struktūrų yra kolagenas, kurio tyrimai yra taikomi vėžio diagnostikoje. Taikant MPF, SHG ir THG netiesinius vaizdinimo režimus galima gauti skirtingus biologinių audinių kontrastus. Nors šie netiesinės optikos režimai yra seniai žinomi, tačiau apie THG netiesinę mikroskopiją ir šio signalo prigimtį informacijos nėra daug. Dėl to buvo nuspręsta sukurti netiesinį optinį skenuojantį mikroskopą, su juo ištirti MPF, SHG ir THG kontrastų biologinių audinių histologinių pjūvų vaizdus ir išsiaiškinti THG vaizdo kontrasto prigimtį vaizdinant kolageną. Rezultatai parodė, kad kolageną, kuris yra pagrindinis tarpląstelinio užpildo komponentas, galime vaizdinti THG režimu dėl hematoksilino ir eozino dažų. Abu dažai tiek atskirai, tiek kartu generuoja THG signalą. Didžiausią THG signalo intensyvumą iš tarpląstelinio užpildo suteikia eozinas. THG vaizdinimo režimas taip pat suteikia gerą ląstelių branduolių ir tarpląstelinio užpildo kontrastą, bei duoda papildomos informacijos apie kolageno struktūrą. Kadangi H&E bandiniai paruošiami standartiniams patologiniams tyrimams, jų vaizdinimas panaudojant THG režimą nereikalauja papildomo bandinių paruošimo ir gali būti taikomas atliekant vėžio diagnostiką.

## Abstract

### MULTIMODAL NONLINEAR MICROSCOPY OF COLLAGEN IN BIOLOGICAL TISSUES

Optical microscopy is widely used in medicine for imaging of biological tissues. Imaging of histological H&E-stained sections with a brightfield microscope is used in high-throughput / primary stage clinical imaging, while confocal microscopy in combination with special fluorescent dyes is used for detailed imaging of tissues, cells, and their components. Nonlinear optical microscopy provides additional contrast and new information about biological structures. One of such structures is collagen, which is investigated for applications in cancer diagnostics. Different contrasts of biological tissues can be obtained using nonlinear imaging modes of MPF, SHG and THG. Although these nonlinear optical modalities have long been known, there is not much information about THG nonlinear microscopy and the origin of this signal. As a result, it was decided to develop a nonlinear optical scanning microscope and use it to study MPF, SHG and THG images obtained from histological sections in order to elucidate the nature of THG in collagen. The results showed that collagen, which is a major component of the extracellular matrix, can be visualized in THG mode due to hematoxylin and eosin dyes. Both dyes generate THG signal individually and in conjunction. Eosin provides the highest THG signal intensity from the extracellular matrix. Also, THG imaging provides good contrast between cell nuclei and the extracellular matrix, and provides additional information about the collagen structure. Because H&E samples are prepared for standard pathological testing, imaging using THG mode does not require additional sample preparation and can be used in cancer diagnosis.

## Dalyvavimas mokslinėse konferencijose

Prezentacijos tarptautinėse mokslinėse konferencijose:

1. THIRD-HARMONIC GENERATION MICROSCOPY OF COLLAGEN IN BIOLOGICAL TISSUES STAINED WITH HEMATOXYLIN AND EOSIN

Žodinis pranešimas, "Open Readings 2021", virtuali konferencija, 2021 m. kovo 16-19 d.

2. THIRD HARMONIC GENERATION MICROSCOPY OF COLLAGEN IN HEMATOXYLIN AND EOSIN STAINED BIOLOGICAL TISSUES

Žodinis pranešimas, "Focus on Microscopy 2021", virtuali konferencija, 2021 m. kovo 28-31 d.

## Padėka

Šis darbas nebūtų padarytas be žmonių, kurie prie to prisidėjo. Noriu padėkoti darbo vadovui prof. Virginijai Barzdai už ypatingą dėmesį, netikėtas išvalgas ir už mokslininko požiūrį į darbą. Konsultantui dr. Lukui Konteniui už profesionalius patarimus ir pagalbą kuriant mikroskopą. Kolegai Viktorui Mažeikai už biologines diskusijas ir atliekant laboratorinius matavimus.

Taip pat dėkoju Nacionaliniam Vėžio Institutui (NVI) ir Valstybiniam Patologijos Centrai (VPC) už paruoštus ir suteiktus biologinius bandinius.

## Literatūros sąrašas

- [1] Malatesta M 2016 Histological and Histochemical Methods - Theory and practice *Eur. J. Histochem.* **60**
- [2] Campagnola P J and Dong C-Y 2011 Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis *Laser Photonics Rev.* **5** 13–26
- [3] Golaraei A, Kontenis L, Cisek R, Tokarz D, Done S J, Wilson B C and Barzda V 2016 Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy *Biomed. Opt. Express* **7** 4054
- [4] Carriles R, Schafer D N, Sheetz K E, Field J J, Cisek R, Barzda V, Sylvester A W and Squier J A 2009 Invited Review Article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy *Rev. Sci. Instrum.* **80** 081101
- [5] Zipfel W R, Williams R M and Webb W W 2003 Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences *Nat. Biotechnol.* **21** 1369–77
- [6] W. Piston D, J. Fellers T and W. Davidson M Fundamentals and Applications in Multiphoton Excitation Microscopy *Multiphoton Microsc.*
- [7] Mostaçõ-Guidolin L, Rosin N and Hackett T-L 2017 Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications *Int. J. Mol. Sci.* **18** 1772
- [8] Wade N J 1999 *A natural history of vision* (Cambridge, Massachusetts: The MIT Press)
- [9] Hentschel K 2014 A History of Optics from Greek Antiquity to the Nineteenth Century *Ann. Sci.* **71** 586–8
- [10] Hooke R and Jo. Martyn and Ja. Allestry. 1665 *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses :with observations and inquiries thereupon /by R. Hooke ...* (London : Printed by Jo. Martyn and Ja. Allestry, printers to the Royal Society ... ,)

- [11] Antonie van Leeuwenhoek *Observationes microscopicae Antonii Lewenhoeck, circa particulas liquorum globosa et animalia*
- [12] Masters B R 2007 Ernst Abbe and the Foundation of Scientific Microscopes *Opt. Photonics News* **18** 18
- [13] Müller M 2006 *Introduction to confocal fluorescence microscopy* (Bellingham, Wash: SPIE Press)
- [14] Göppert-Mayer M 1931 Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen *Ann. Phys.* **401** 273–94
- [15] Denk W, Strickler J and Webb W 1990 Two-photon laser scanning fluorescence microscopy *Science* **248** 73–6
- [16] Barad Y, Eisenberg H, Horowitz M and Silberberg Y 1997 Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation *Appl. Phys. Lett.* **70** 922–4
- [17] Tuer A, Tokarz D, Prent N, Cisek R, Alami J, Dumont D J, Bakueva L, Rowlands J and Barzda V 2010 Nonlinear multicontrast microscopy of hematoxylin-and-eosin-stained histological sections *J. Biomed. Opt.* **15** 026018
- [18] Sarri B, Canonge R, Audier X, Simon E, Wojak J, Caillol F, Cador C, Marguet D, Poizat F, Giovannini M and Rigneault H 2019 Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastro-intestinal cancer detection *Sci. Rep.* **9** 10052
- [19] Kontenis L 2017 *Experimental Nonlinear Polarimetric Microscopy* (University of Toronto)
- [20] Masters B R and So P T C 2008 *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy* (New York: Oxford University Press)
- [21] Xu C and Wise F W 2013 Recent advances in fibre lasers for nonlinear microscopy *Nat. Photonics* **7** 875–82
- [22] Young M D, Field J J, Sheetz K E, Bartels R A and Squier J 2015 A pragmatic guide to multiphoton microscope design *Adv. Opt. Photonics* **7** 276



- [23] Botcherby E J, Juškaitis R, Booth M J and Wilson T 2008 An optical technique for remote focusing in microscopy *Opt. Commun.* **281** 880–7
- [24] Lv X, Zhan C, Zeng S, Chen W R and Luo Q 2006 Construction of multiphoton laser scanning microscope based on dual-axis acousto-optic deflector *Rev. Sci. Instrum.* **77** 046101
- [25] Nguyen Q-T, Callamaras N, Hsieh C and Parker I 2001 Construction of a two-photon microscope for video-rate Ca<sup>2+</sup> imaging *Cell Calcium* **30** 383–93
- [26] Masters B R, So P T and Gratton E 1997 Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin *Biophys. J.* **72** 2405–12
- [27] Marshall G F and Stutz G E 2012 *Handbook of optical and laser scanning* (Boca Raton, FL: CRC Press)
- [28] W. Davidson M Microscope Objective Specifications *Microsc. Object. Specif.*
- [29] Zinter J P and Levene M J 2011 Maximizing fluorescence collection efficiency in multiphoton microscopy *Opt. Express* **19** 15348
- [30] Greenhalgh C, Cisek R, Prent N, Major A, Aus de Au J, Squier J and Barzda V 2005 Time and structural crosscorrelation image analysis of microscopic volumes, simultaneously recorded with second harmonic generation, third harmonic generation, and multiphoton excitation fluorescence microscopy *Photonics North 2005* ed W C W Chan, K Yu, U J Krull, R I Hornsey, B C Wilson and R A Weersink (Toronto, Canada) p 59692F