

**VILNIAUS UNIVERSITETO  
FIZIKOS FAKULTETO  
LAZERINIŲ TYRIMŲ CENTRAS**

Diana Pavlovaitė

NETIESINĖ MIKROSKOPIJA IR TEKSTŪRINĖ ANALIZĖ VĖŽIO DIAGNOSTIKOJE

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinių technologijų studijų programa

Studentas

Diana Pavlovaitė

Leista ginti

2022-05-25

Darbo vadovas

dr. Agnė Kalnaitytė

Centro direktorius

prof. Aidas Matijošius

Vilnius 2022

# Turinys

Santrumpos .....	3
Įvadas.....	4
1. Teorinis įvadas.....	5
1.1 Netiesiniai optiniai procesai.....	5
1.2 Antros ir trečios eilės netiesiniai procesai .....	6
1.3 Fazinis sinchronizmas .....	8
2.1 AHG Poliarimetrinė mikroskopija .....	9
Stokso vektorius.....	9
2.1.1 Mueller matrica.....	9
2.1.2 DSMP.....	10
2.1.3 PIPO.....	10
3.2 Kolagenas.....	12
3. Eksperimento metodika .....	14
3.1 Netiesinis mikroskopas .....	14
3.2 PIPO duomenų analizė.....	15
3.3 Tiriamos medžiagos .....	16
4. Rezultatai ir aptarimas .....	17
5. Išvados .....	26
6. Literatūra .....	27
Summary.....	29
Santrauka .....	30

## Santrumpos

MPF/DFL – Multiphoton Fluorescence – daugiafotonė fluorescencija

SHG/AHG - Second-Harmonic Generation -Antros harmonikos generacija

P-SHG- Polarization-resolved Second-Harmonic Generation – Poliarizacinė antros harmonikos generacija

THG – Third-Harmonic generation – trečios harmonikos generacija

PMT- Photomultiplier Tube - fotodaugintuvas

CMOS - Complementary Metal-Oxide-Semiconductor (angl. k.)

LED – Light–Emitting Diode (angl. k.)

DSMP – double Stokes-Mueller polarimetry (angl. k.)

PIPO- Polarization In, Polarization Out – įeinanti poliarizacija, išeinanti poliarizacija

GLCM – Gray Level Co-occurrence Matrix -Pilkumo lygio pasikartojimų matrica

PSG – Polarization State Generator (angl. k.)

PSA – Polarization State Analyzer (angl. k.)

H&E – Hematoxilin and Eosin – Hematoksilinas ir eozinas

## Įvadas

Jau kuris laikas optinė mikroskopija tarnauja kaip vienas iš itin svarbių įrankių biomedicinos ir medicinos mokslų srityse. Pastaruosius dešimtmečius aktyviai tyrinėjama *netiesinės* optinės mikroskopijos šaka, kuri remiasi šviesos ir tiriamosios medžiagos sąveikos reiškiniais. Pagrindiniai reiškiniai, naudojami netiesinėje mikroskopijoje yra antros bei trečios harmonikos generacijos (AHG ir THG) suteikiančios pranašumą prieš įprastą mikroskopiją tuo, jog tiriamą medžiagą nėra sužadinama, taigi ir tikimybė priversti bandinį išblykšti ar kitaip jam pakenkti yra maža. Taip pat, nemaža dalis biologinėms terpėms būdingų struktūrų generuoja stiprų netiesinį atsaką, todėl nereikalauja papildomo mėginių paruošimo [1].

Informaciją apie molekulinę struktūrą ar baltymų išsidėstymą galime išgauti iš AHG paremtos mikroskopijos keliais būdais. Vienas tokių būdų, naudotis poliarizaciniais antros harmonikos generacijos tyrimais (P-AHG) [2]. Metodo esmė yra keičiant krentančios šviesos poliarizaciją, registruoti pokyčius generuojamos spinduliuotės poliarizacijoje. Jau kuris laikas ši metodika taikoma tyrimams, siekiant gauti informacijos apie kolageno struktūrą bei jos pokyčius vėžio veikiamuose audiniuose [3]. Kolagenas yra svarbus struktūrinis baltymas, sudarantis 30 procentų organizmo baltymų. Yra žinoma, kad vėžiniame audinyje pakinta kolageno struktūra [4], [5] todėl gebėjimas vaizdinti ir analizuoti šio baltymo struktūrinius pakitimus yra svarbus žingsnis siekiant pritaikyti P-SHG metodiką vėžio diagnostikoje. Taip pat, papildomos informacijos apie tiriamą terpę suteikia ir kiti netiesiniai mikroskopiniai režimai kaip trečios harmonikos generacija bei daugiafotonė fluorescencija. *Šio darbo tikslas* yra ištirti netiesiniu optiniu mikroskopu vaizdinamų sveikų ir vėžinių gimdos audinių parametrus.

### *Uždaviniai:*

- 1. Ištirti trijų pacientų su skirtingomis vėžio rūšimis, gimdos audinių sveikus ir vėžinius patologinius mėginius AHG, MPF, THG bei P-AHG netiesinėmis metodikomis.*
- 2. Nustatyti sveiką ir vėžinį gimdos audinį apibūdinančių parametrų skirtumus ir panašumus skirtingoms šio audinio vėžio rūšims.*
- 3. Palyginti vėžio paveiktų kitų audinių parametrais, aprašomais literatūroje ir įvertinti naudojamos metodikos galimybes diagnozuojant vėžinius pakitimus gimdos audiniuose.*

## 1. Teorinis įvadas

Šiame skyriuje bus aptariami pagrindiniai fizikiniai procesai ir juos aprašantys dydžiai, nusakantys netiesinius optinius procesus, jų kilmę.

### 1.1 Netiesiniai optiniai procesai

Daugelis optinių reiškinių, stebimų kasdieniniuose mūsų gyvenimuose gali būti paaiškinami tiesinės optikos reiškiniais. Tai reiškia, kad medžiagų atsakas į veikiančią elektromagnetinį lauką tiesiškai priklauso nuo elektrinio lauko stiprio. Tačiau, kai veikiančiojo lauko intensyvumas yra pakankamai didelis, medžiagos atsakas gali pakisti ir aprašymas tiesiniu formalizmu nebeatitiks stebimos situacijos. Tokiu atveju, siekiant aprašyti tyrinjamą medžiagą, turi būti įskaitomi ir aukštesnės eilės nariai. Tokių reiškinių pavyzdžiai yra aukštesnių eilių harmonikų generacija, suminio, skirtuminio dažnio generavimo procesai ir panašūs. Norint aprašyti minėtuosius reiškinius, galime tarti, kad indukuojamas poliarizuotumas  $P(t)$  priklauso nuo veikiančio elektrinio lauko stiprio. Tuomet,  $P(t)$  gali būti išreikštas Taylora eilute:

$$\overline{P(t)} = \overline{P(t)^{(1)}} + \overline{P(t)^{(2)}} + \overline{P(t)^{(3)}} + \dots \quad (1)$$

Kur  $\overline{P^{(q)}}(t) = \epsilon_0 \chi^{(q)} \overline{E^q}$ . Dydis  $\chi^{(q)}$  vadinamas q-tosios(?) eilės jautriu,  $\epsilon_0$ - vakuomo dielektrinė skvarba?, kai  $q > 1$ , dydis  $\chi^{(q)}$  vadinamas to laipsnio netiesiniu jautriu, kuris yra tenzorinis dydis.

Laikinėje erdvėje tiesiniu atveju indukuojama poliarizacija, sukelta tam tikro elektrinio lauko  $\vec{E}(t - \tau)$ , gali būti aprašoma:

$$\overline{P^{(1)}}(t) = \epsilon_0 \int_0^\infty d\tau R^{(1)}(\tau) \vec{E}(t - \tau), \quad (2)$$

kur  $R^{(1)}(\tau)$  yra antro rango tenzorius, vadinamas tiesinio atsako funkcija. Atlikus (2) formulės Fourier transformaciją galime gauti:

$$\overline{P^{(1)}}(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega; \omega) \vec{E}(\omega), \quad (3)$$

Čia  $\chi^{(1)}(\omega; \omega)$  yra tiesinis jautris dažniui  $\omega$ , šis narys gali būti išreikštas tokiu būdu:

$$\chi^{(1)}(\omega; \omega) = \int_0^\infty d\tau R^{(1)}(\tau) e^{i\omega\tau}, \quad (4)$$

Analogišku būdu galima gauti ir aukštesnės eilės poliarizacijos bei jautrio narius. [6]

## 1.2 Antros ir trečios eilės netiesiniai procesai

Bus kalbama apie antros harmonikos generaciją, trečiosios harmonikos generaciją. Šie procesai yra pagrindiniai fizikiniai reiškiniai, naudojami vaizdinimui netiesinėje mikroskopijoje.

Jei į bandinį krentantis elektrinis laukas yra sudarytas iš dviejų dažninių elementų, toks laukas gali būti reiškiamas tokiu būdu:

$$E(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + c. \quad (5)$$

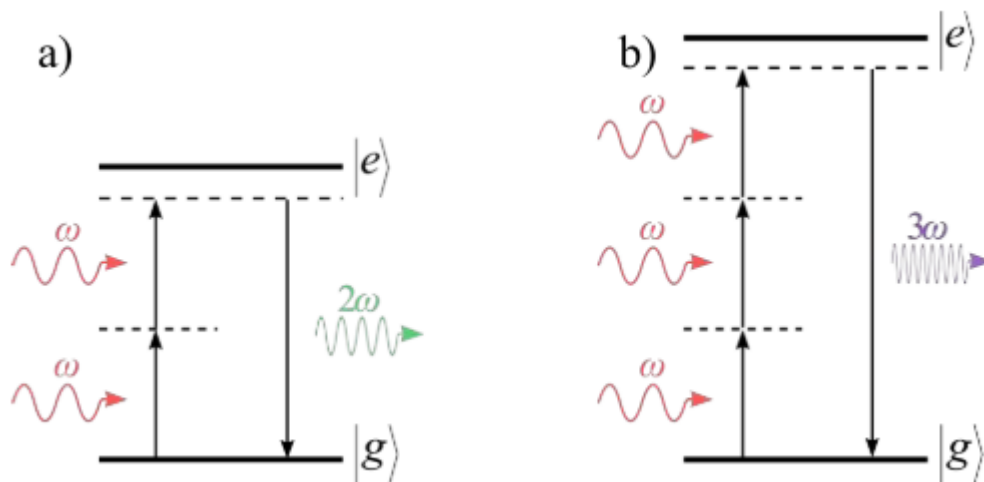
Jei įskaitome tik antro laipsnio optinius procesus, kuriems  $P^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} E(t)^2$ , tokiu atveju, įsistačius (5) išraišką, gauname:

$$P^{(2)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} [E_1^2 e^{-2i\omega_1 t} + E_2^2 e^{-2i\omega_2 t} + 2E_1 E_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} + 2E_1 E_2^* e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + c] + 2\epsilon_0 \chi^{(2)} [E_1 E_1^* + E_2 E_2^*], \quad (6)$$

Šiuo atveju  $\chi^{(2)}$  yra tenzorius, susijęs su poliarizacijos orientacijomis krentančio lauko  $E$  ir stebimo lauko  $P$ . (6) lygtyje išreikšti skirtingi antro laipsnio netiesiniai procesai, kurie galėtų pasireikšti stebimoje sistemoje, susidarius tinkamoms sąlygoms. Pirmuosiuose išraiškos nariuose, laužtiniuose skliaustuose, matomas netiesinis atsakas, pasireiškiantis generuojamais dvigubo dažnio komponentais ( $2\omega_1$  ir  $2\omega_2$ ). Šis procesas vadinamas antros harmonikos generacija (toliau-AHG), vaizduojamas 1.2.1 pav. a) dalyje. Kaip galima pastebėti diagramoje, du dažnio  $\omega$  fotonai sužadina sistemą per virtualų lygmenį ir yra konvertuojami į vieną fotoną, turintį  $2\omega$  dažnį, vieno proceso metu. Generuojamas dvigubo dažnio fotonas turės tą pačią fazę kaip ir pradiniai sumuojami fotonai. Pabrėžtina tai, jog antrosios harmonikos generacija, kaip ir kiti antro laipsnio netiesinio jautrio sąlygojami procesai, galimi tik terpėse, neturinčiose centro simetrijos. Tik tokiu atveju  $\chi^{(2)} \neq 0$ .

Kiti (6) išraiškos nariai,  $(\omega_1 + \omega_2)$  ir  $(\omega_1 - \omega_2)$  nusako procesus, vadinamus suminio ir skirtuminio dažnio generacija atitinkamai. Narys  $2\epsilon_0 \chi^{(2)} [E_1 E_1^* + E_2 E_2^*]$ , nusako optinio lyginimo reiškinį. [7]

Antros eilės netiesinio jautrio tenzorius  $\chi^{(2)}$  neša informaciją apie medžiagos gebėjimą generuoti antrą harmoniką, struktūrines savybes, bandinį sudarančias makro molekules ir trimatį komponentų išsidėstymą vaizdo plokštumoje. [8] Įprastai ši tenzorių sudaro 27 elementai, tačiau dėl erdvinės simetrijos dalis elementų gali būti neįskaitomi. Pavyzdžiui, cilindrinės simetrijos atveju ( $C_{6v}$ ), kuri dažnai taikoma nagrinėjant kolageną, netiesinio jautrio elementų skaičius sumažėja iki trijų. [9]



1.2.1 pav. Molekulių elektroninių lygmenų energijos diagramos. a) antros(ios) harmonikos generacijai, b) trečios harmonikos generacijos atveju. Vertikaliai į viršų energija didėja, ištisinės linijos vaizduoja pagrindines ir sužadintas būsenas, punktyrinė - virtualias būsenas.

AH generacija nėra rezonansinis procesas, todėl tai reiškia, kad nei vienas iš naudojamų optinių dažnių nesutampa su medžiagos sugerties dažniais, energija neužsilieka bandinyje. Dėl šios priežasties tiriamoji biologinė terpė nepatirs pažeidimų vaizdinimo metu ir metodas gali būti taikomas kaip neinvazinė priemonė gauti kiekybinės informacijos apie tiriamąją medžiagą.

Kaip ir AH generacijos atveju, trečio laipsnio netiesiniai procesai gali būti išreikšiami  $P^{(3)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E(t)^3$ . Jei teigiame, kad su medžiaga sąveikaujantis elektrinis laukas sudarytas iš trijų dažnių,  $P^{(3)}$  išraiškoje dalyvaus 44 skirtingų dažnių kombinacijų nariai:

$$\omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3, (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3), (\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 + \omega_3 + \omega_2), (\omega_2 + \omega_3 + \omega_1), (2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2)$$

Nariai, turintys  $3\omega$  dažnius gaunami sąveikaujant trimis bangoms dažniais  $\omega$ , šis procesas vadinamas trečios harmonikos generacija ir yra vaizduojamas 1.2.1 pav. b). Panašiai kaip ir AHG atveju, šį reiškinį galime stebėti, kuomet trys fotonai, turintys dažnį  $\omega$  yra konvertuojami į vieną,  $3\omega$  dažniu pasižymintį fotoną, per virtualų lygmenį.

Priešingai nei  $\chi^{(2)}$ , trečio laipsnio netiesinis jautris  $\chi^{(3)}$  būdingas visoms medžiagoms. Taigi, trečios harmonikos signalą gali generuoti kiekviena medžiaga, tik signalo stipris priklausys nuo kubinio jautrio vertės. Be to, trečiosios harmonikos signalas pranyksta

izotropinėje medžiagoje su normalia dispersija, jei tiriamos medžiagos matmenys yra didesni nei sufokusuoto pluošto konfokalinis parametras. Taip yra todėl, kad tokiu atveju, gauso pluoštas patiria Gouy fazės pokytį – trečios harmonikos signalą prieš fokuso tašką ir už skirs  $3\pi$  fazės skirtumas, lemiantis destruktivią interferenciją tarp šių bangų. Toks fazės pokytis gali būti pakoreguotas, jei lazerio pluoštas yra fokusuojamas į dviejų terpių, turinčių skirtingą lūžio rodiklį, ribą, gaunama ne absoliuti destruktivi interferencija ir signalas gali būti užregistruotas. Tai yra priežastis, kodėl naudotis trečiosios harmonikos signalu mikroskopijoje tampa paranku, kadangi ši metodika itin jautri nehomogeniškumui, kaip antai dviejų terpių riba [10], [11]. Tuo pasinaudoti galima ieškant tiriamųjų medžiagų tarp dengiamųjų stikliukų.

### 1.3 Fazinis sinchronizmas

Jau aptarėme, kad harmonikų generacija yra koherentinis procesas. Ar generuojamas signalas stiprės, ar slops sklisdamas per terpę, priklausys nuo fazinių sąryšių tarp sąveikaujančių bangų. Pradinės bangos ir generuojamas harmoninis signalas turės tokią pačią fazę, jei  $\chi^{(q)}$  realus. Tačiau dispersinėje terpėje net ir pradžioje vienodas fazes turėjusios bangos, dėl skirtingų sklidimo greičių, ilgainiui išsifazuos. Tam aprašyti naudojamas dydis vadinamas faziniu nederinimu arba bangos vektorių nederinimu:

$$\Delta k = nk_{\omega} - k_{n\omega} \quad (7)$$

Čia  $n$  nusako netiesinio proceso eilę. Antros harmonikos generacijos atveju  $n = 2$ , o trečios –  $n = 3$ . Plokščių bangų atveju, sugeneruoto harmoninio signalo intensyvumas:

$$I \sim \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right), \quad (8)$$

Dydis  $L$  vadinamas koherentiniu sąveikos ilgiu, šis dydis apibrėžiamas kaip atstumas, kuriame efektyviai generuojamas suminio dažnio signalas. Tam, kad pasiektume efektyviausią aukštesnių eilių harmonikų signalo generaciją, turi būti tenkinama  $\Delta k = 0$  sąlyga, kuri vadinama fazinio sinchronizmo sąlyga. Netiesinėje optikoje yra žinomi keli būdai fazinio sinchronizmo sąlygai patenkinti; keičiant spindulių patekimo į netiesinę terpę kampą, keičiant kolinearių pluoštų kampą kristalo optinės ašies atžvilgiu, naudojant vektorines sąveikas bei keičiant netiesinės terpės temperatūrą.



## 2.1 AHG Poliarimetrinė mikroskopija

Šiame skyriuje aptarsime metodą, naudojamą kiekybinei informacijai gauti iš antros harmonikos generacijos signalo biologinėse terpėse. Akivaizdus kelias būtų naudotis signalo intensyvumu, tačiau biologinės terpės nėra centrosimetrinės, AHG signalas priklauso nuo krentančios spinduliuotės poliarizacijos bei tiriamos medžiagos dvejojo lūžio. Taigi, siekdami išsiaiškinti daugiau informacijos apie bandinio struktūrą naudojamės papildomais parametrais, gaunamais naudojantis dvigubos Stokso-Muellerio poliarimetrijos (DSMP) metodika, kurią ir aptarsime.

### Stokso vektorius

Stokso formalizme, spindulio poliarizacija gali būti nusakoma keturis komponentus turinčiu Stokso vektoriumi  $s$ . Pirmasis elementas  $s_0$  nusako bendrą intensyvumą,  $s_1$  intensyvumo skirtumą tarp tiesiškai poliarizuotų komponentų horizontalia (HLP) ir vertikalia (VLP) kryptimis,  $s_2$  intensyvumo skirtumą tarp tiesinių poliarizacijų  $45^\circ$  ir  $-45^\circ$  kampais, o  $s_3$  intensyvumo skirtumą tarp apskritimiškai poliarizuotų dalių (kairinės ir dešinės). Tuomet, bendrą poliarizacijos laipsnį galime apskaičiuoti:

$$p = \frac{\sqrt{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}}{s_0} \quad (9)$$

Esant pilnai poliarizuotai šviesai  $p$  bus lygus 1, visiškai nepoliarizuotai – 0. Siekiant nustatyti, kokia dalis spinduliuotės yra poliarizuota tiesiškai arba apskritimiškai, toliau galima įvertinti du dydžius:

$$p_L = \frac{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}{s_0} \quad (10)$$

$$p_C = \frac{|s_3|}{s_0} \quad (11)$$

Čia,  $p_L$ - tiesiškai poliarizuotos šviesos dalis, o  $p_C$ - apskritimiškai. Analogiškai jau aptartam atvejui, jei turime pilnai tiesinę šviesos poliarizaciją,  $p_L$  reikšmė bus lygi 1, o  $p_C=0$ .

### 2.1.1 Mueller matrica

Šviesos ir medžiagos sąveikai aprašyti kartu su jau aptartu Stokso vektoriumi yra naudojama  $4 \times 4$  Mueller matrica ( $M$ ), apibūdinanti tiriamąją medžiagą. Ši matrica transformuoja įeinančios spinduliuotės Stokso vektorių į išeinančios spinduliuotės Stokso vektorių, taigi nusako sąryšį tarp šių dviejų dydžių. Bendrai tai gali būti nusakoma:

$$s_{out} = Ms_{in} \quad (12)$$

, kur  $s_{out}$  ir  $s_{in}$  yra iš bandinio išeinančios iš ateinančios spinduliuotės Stokso vektoriai.

### 2.1.2 DSMP

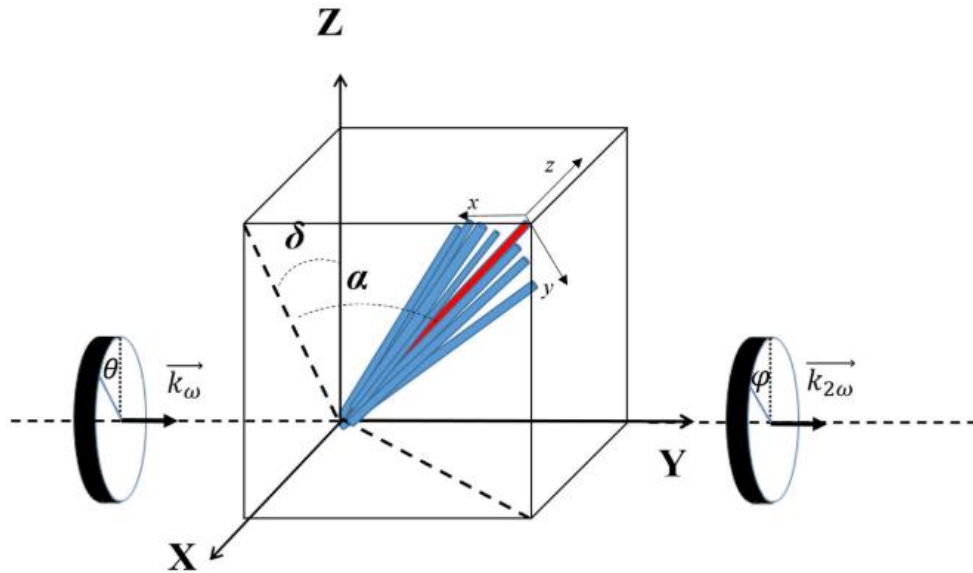
Dviguboje Stokso-Muellerio poliarimetrijoje, pagrindinė lygtis, nusakanti antros eilės netiesinį procesą nusakoma:

$$s'(2\omega) = M^{(2)}S(\omega). \quad (13)$$

Čia, generuojamas AH signalas yra nusakomas 4x1 Stokso vektoriumi  $s'(2\omega)$ , kaip ir anksčiau, tačiau lazerio pluoštas yra aprašomas 9x1 dvigubu Stokso vektoriumi  $S(\omega)$ . Šio vektoriaus komponentai yra keturių tiesinių Stokso komponentų funkcijos. [4] Norint atlikti DSMP matavimus, reikalingos devynios poliarizacinės būsenos: horizontali ( $0^\circ$ ), vertikali tiesinė, įstriža tiesinė poliarizacija ( $\pm 45^\circ$ ), dešininė ir kairinė apskritiminė, tiesinė poliarizacija  $-22,5^\circ$  kampų, ir dešininė bei kairinė eliptiškai poliarizuota šviesa.

### 2.1 3 PIPO

Šiame darbe poliarizaciniai netiesiniai matavimai buvo atliekami PIPO metodika (ang. polarization in, polarization out). Toks matavimas leidžia nustatyti antros eilės optinio netiesinio jautrio tenzoriaus elementus, reikalingus tiriamos terpės charakterizacijai. Eksperimentuose yra keičiama į bandinį krentančios lazerio spinduliuotės poliarizacija  $\theta$  ir analizuojama generuojamos antros harmonikos signalo poliarizacija  $\varphi$ . Bandinys yra talpinamas XZ plokštumoje, lazerio spinduliuotė sklinda Y ašimi (2.1.3 pav).



2.1.3 pav. PIPO eksperimento schema. Spinduliuotė sklinda Y kryptimi,  $k_\omega$ - bangos vektorius fundamentaliai spinduliuotei,  $k_{2\omega}$ - išeinančiai antrosios harmonikos spinduliuotei [12]

Tarę, kad tiriamose terpėse kolgano skaidulos yra chiraliniai bei cilindrinės formos, taikome  $C_6$  simetriją. Tokiu būdu, unikalių elementų netiesinio dielektrinio jautrio matricoje sumažėja iki keturių:  $\chi_{zzz}^{(2)}$ ,  $\chi_{zxx}^{(2)}$ ,  $\chi_{xxz}^{(2)}$  ir  $\chi_{xyz}^{(2)}$  [13]. Pasinaudoję tuo, galime išreikšti AH intensyvumą kaip lazerio spinduliuotės poliarizacijos  $\theta$  ir analizatoriaus pozicijos  $\varphi$  funkciją:

$$I_{2\omega} \propto \left| \begin{array}{l} \frac{\chi_{xyz}^{(2)'}}{\chi_{zxx}^{(2)'}} \sin(\varphi - \delta) \sin 2(\theta - \delta) + \cos(\varphi - \delta) \sin^2(\theta - \delta) \\ + \frac{\chi_{zzz}^{(2)'}}{\chi_{zxx}^{(2)'}} \cos(\varphi - \delta) \cos^2(\theta - \delta) \\ + 2 \frac{\chi_{xyz}^{(2)'}}{\chi_{zxx}^{(2)'}} \cos(\varphi - \delta) \sin(\theta - \delta) \end{array} \right|^2, \quad (15)$$

čia dydžiai  $\chi_{IJK}^{(2)'}$  nusako netiesinio jautrio narius laboratorinėje koordinačių sistemoje (XYZ). Antrasis (15) išraiškos narys yra vadinamas R santykiu ir gali būti išreikštas:

$$R = \frac{\chi_{zzz}^{(2)'}}{\chi_{zxx}^{(2)'}} = \frac{\chi_{zzz}^{(2)}}{\chi_{zxx}^{(2)}} \cos^2 \alpha + 3 \sin^2 \alpha, \quad (16)$$

čia  $\alpha$ - baltymo polinkio kampas į vaizdo plokštumą,  $R$  santykis yra svarbus dydis netiesinėje mikroskopijoje.

Trečiasis (15) išraiškos narys - C santykis, dar vadinamas chiraliniu santykiu, gali būti aprašomas:

$$C = \frac{\chi_{xyz}^{(2)'}}{\chi_{zxx}^{(2)'}} = \frac{\chi_{xyz}^{(2)}}{\chi_{zxx}^{(2)}} \sin\alpha. \quad [13] \quad (17)$$

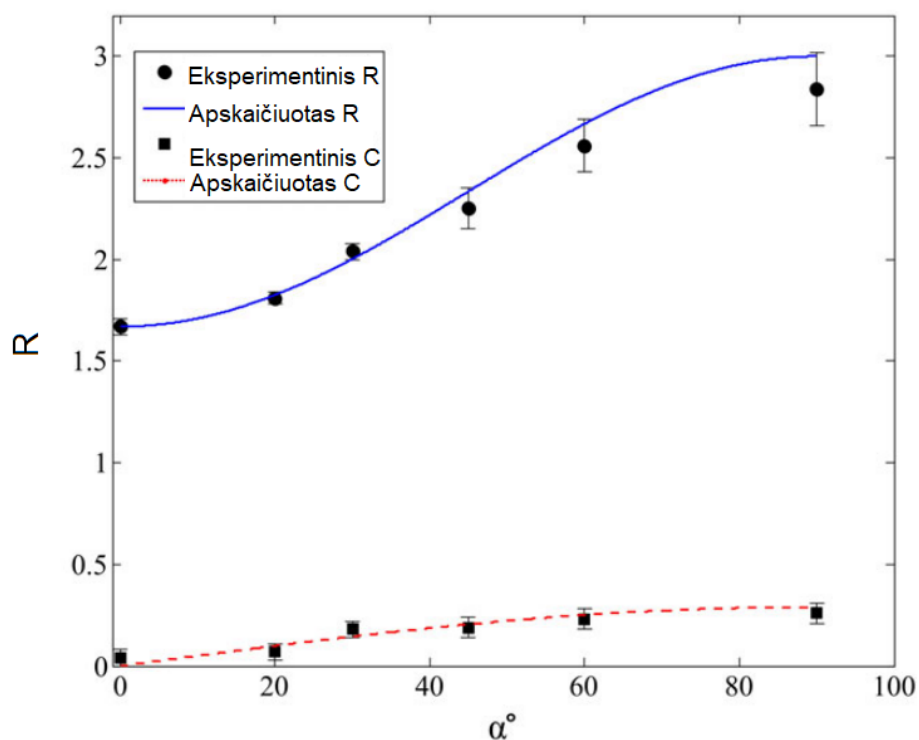
### 3.2 Kolagenas

Kolagenas yra dažniausiai sutinkamas baltymas žinduoliuose, sudarantis apie 30% visų organizmo baltymų [14]. Jis yra vienas iš tarpląstelinio užpildo sudedamųjų dalių, galintis turėti 28 skirtingas konfigūracijas, priklausomai nuo jų sudarančių polipeptidų grandinių. Kolageno struktūrinė įvairovė, kartu su erdviųjų konfigūracijų gausa lemia skirtingą audinio funkciją organizme, kuri gali padėti kaulams atlaikyti smūgius ar ragenai sufokusuoti šviesą. Kartu su biologinių funkcijų gausa, dėl kolageno gamybos ar struktūros pakitimų identifikuojamos įvairios tiek normalios, tiek patologinės būklės kaip cirozė, randų formavimasis, reumatinis artritas bei kitos. Taip pat, yra žinoma, kad vėžinių ląstelių paveiktuose audiniuose pakinta kolageno struktūra [4], [15]. Dėl plataus kolageno paplitimo bei gausos biologinių funkcijų, natūralu, jog kolagenas yra itin patrauklus ir dažnai sutinkamas tyrimų objektas.

Kolageno molekulę sudaro trys sraigtinės grandinės, kurios susivijusios į spiralę. Kiekviena paskira grandis sudaryta iš pasikartojančių amino rūgščių kombinacijų [16]. Bendrai, kolagenui būdinga ne centrosimetrinė struktūra, dėl to ši molekulė pasižymi antros harmonikos generacija, o šis procesas nereikalauja papildomo bandinio paruošimo dažant. Kaip stipriai medžiaga generuos AH galima nusakyti antros eilės netiesiniu jautriu  $\chi^{(2)}$ . Tenzoriaus elementų vertės priklauso tiek nuo molekulinės sudėties, tankio, tiek nuo molekulių erdvinio išsidėstymo viena kitos atžvilgiu [13], [17]. Tam tikrus dielektrinio jautrio matricos elementus galime rasti naudodamiesi jau aptarta P-AHG PIPO metodika.

Iki šiol atliktuose tyrimuose naudojantis netiesine optinės mikroskopijos metodika buvo tirti įvairūs vėžiniai susirgimai kepenyse [18], storojoje žarnoje [19], kiaušidėse [20], prostatoje [21] bei daugelyje kitų audinių. Turint įprastiniais patologiniais metodais paruoštą mėginį, dažytą hematoksilino ir eozino dažu, daugiafotonės fluorescencijos režimu, dėl eozino galime matyti citoplazmą, jungiamuosius audinius, taip pat ir tarpląstelinį užpildą. Trečios harmonikos generacija leidžia matyti membranas bei branduolius [3].

Ankstesniuose tyrimuose su kolagenu buvo parodyta, kad R santykio vertės itin priklauso nuo įvairių audinio konfigūracijų. Tyrimuose su žiurkės uodegos sausgysle nustatyta, kad lygiagrečioms kolageno skaiduloms, išsidėsčiusioms vaizdo plokštumoje gaunamas žymiai mažesnis R santykis ( $R \sim 1,4$ ), nei tuo atveju, jei kolageno skaidulos yra lygiagrečios, bet pasvirusios kampu  $\alpha$  į vaizdo plokštumą ( $R \sim 1,8$ ). Taip pat aukštesnės R santykio vertės buvo gautos kolageno skaiduloms išsidėsčius netvarkiai tarpusavyje, o ne lygiagrečiai kaip buvo aptariama ankstesniame pavyzdyje. Tokiu atveju gautos R vertės siekė 2 [8]. Panašūs tyrimai buvo atliekami su kiaulės achilo sausgyslės mėginiais, kurie buvo pjaunami skirtingais kampais, siekiant išsiaiškinti R santykio priklausomybę nuo kolagena skaidulų polinkio į fokusuojamą plokštumą kampo. Gauti rezultatai vaizduojami 3.2.1 pav., kur matyti, jog priklausomybė nėra tiesinė, tačiau didėjant skaidulos polinkio kampui, R santykio vertės išauga.

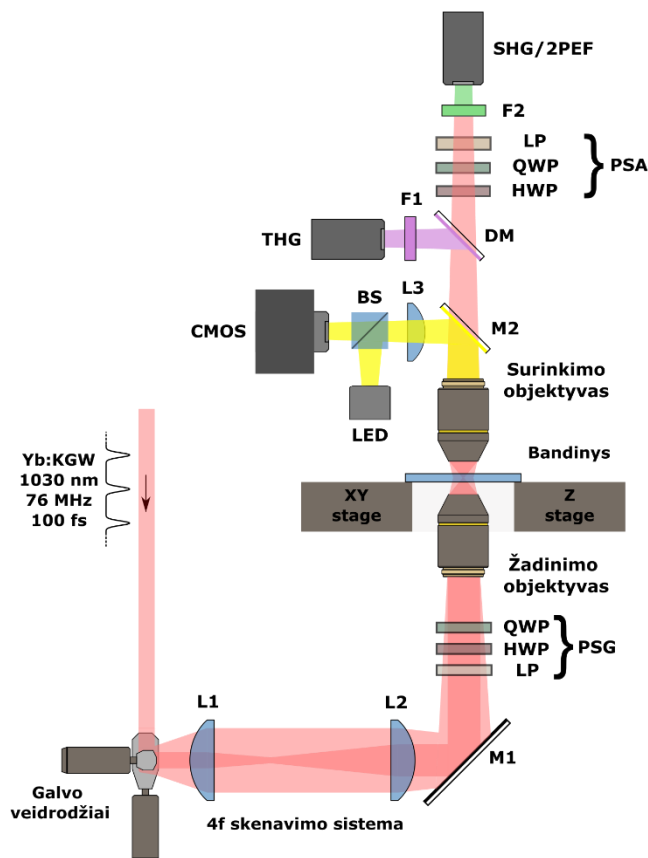


3.2.1 pav. Eksperimentinių ir apskaičiuotų R bei C santykių priklausomybės nuo kolageno skaidulos polinkio į vaizdo plokštumą kampo  $\alpha$ . Adaptuota iš [13]

### 3. Eksperimento metodika

Skyriuje bus aptariamos pagrindinės darbo metu naudotos eksperimentų metodikos ir tirtos medžiagos.

#### 3.1 Netiesinis mikroskopas



3.1.1 pav. Netiesinio mikroskopo principinė schema, adaptuota iš [22]

Pagrindinis prietaisas, naudotas šiame darbe, buvo netiesinis mikroskopas, sukurtas remiantis patirtimi, sukaupia prof. V.Barzdos laboratorijoje, Toronte. Mikroskopo schema pateikiama 3.1.1 pav. Pagrindiniai prietaisą sudarantys komponentai yra lazeris, optinė sistema ir signalo detektoriai.

Mikroskope naudojamas FLINT (Light Conversion) osciliatorius, kurio centrinis bangos ilgis yra 1030nm, impulsų trukmė 100 fs, impulsų pasikartojimo dažnis – 76MHz, vidutinė galia 1W. Yra žinoma, kad bandinį pasiekia apie 20% iš lazerio išėjusios spinduliuotės intensyvumo, taigi maksimaliai galime turėti 0,2W intensyvumo spinduliuotę bandinio žadinimui. Tai yra gerokai daugiau nei reikalinga tipiniams bandiniams netiesiniame vaizdinime.

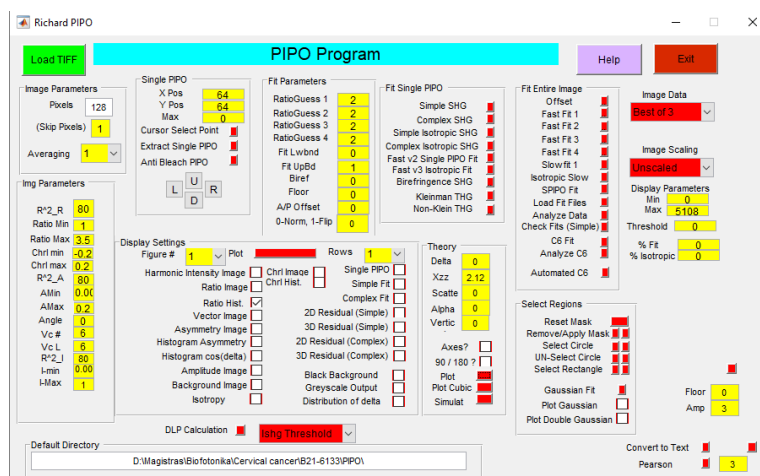
Netiesiniame mikroskope vaizdas formuojamas pasitelkiant vieno taško rastrinį skenavimą. Tam pasiekti naudojami galvanometrinių skenuojantys veidrodžiai, vienas veidrodis atlieka skenavimą X ašimi, o kitas – Y. Žadinimo objektyvui pasirinktas Nikon CFI Lambda Plan Achromat 20X/0,75 objektyvas.

Bandinio pozicija XY plokštumoje keičiama motorizuotu staliuku (ASI), fokusuojama keičiant objektyvo aukštį atskiru staliuku (Standa). Netiesiniam MPF, SHG ir THG vaizdams atskirti naudojami filtrai. Signalai detektuojami fotodaugintuvais (Hamamatsu, H10682) ir yra surenkami duomenų surinkimo plokštėmis (National Instruments). Šviesaus lauko vaizdą registruojame naudodami CMOS spalvotą kamerą.

Šviesos poliarizacija yra valdoma poliarizacinių būsenų generatoriaus (PSG-polarization state generator), o sugeneruotas signalas analizuojamas poliarizacinių būsenų analizatoriumi (PSA-polarization state analyzer). PSG sudaro poliarizatorius, pusės bangos ilgio plokštelė ir ketvirčio bangos ilgio plokštelė. Analogiškai, PSA sudaryta iš ketvirčio bangos ilgio plokštelės, pusės bangos ilgio plokštelės ir poliarizatoriaus, pastatytų prieš AH signalo duomenis surenkantį detektorį.

### 3.2 PIPO duomenų analizė

Kiekybinė poliarizacinių PIPO matavimų duomenų analizė buvo atliekama naudojantis specialiai tam tikslui parašyta MATLAB programa (3.2.1 pav.), kuri įvertina kiekvieno pikselio intensyvumo skirstinį kaip funkciją, priklausančią nuo lazerio spinduliuotės poliarizacijos ir analizatoriaus kampų. Programa parašyta dr. Richard Cisek ir kelių kitų, prof. V. Barzdos laboratorijoje, Toronto universitete. Programa apskaičiuoja R ir C santykius, leidžia sugeneruoti atitinkamų dydžių žemėlapius bei pasiskirstymų grafikus [23].



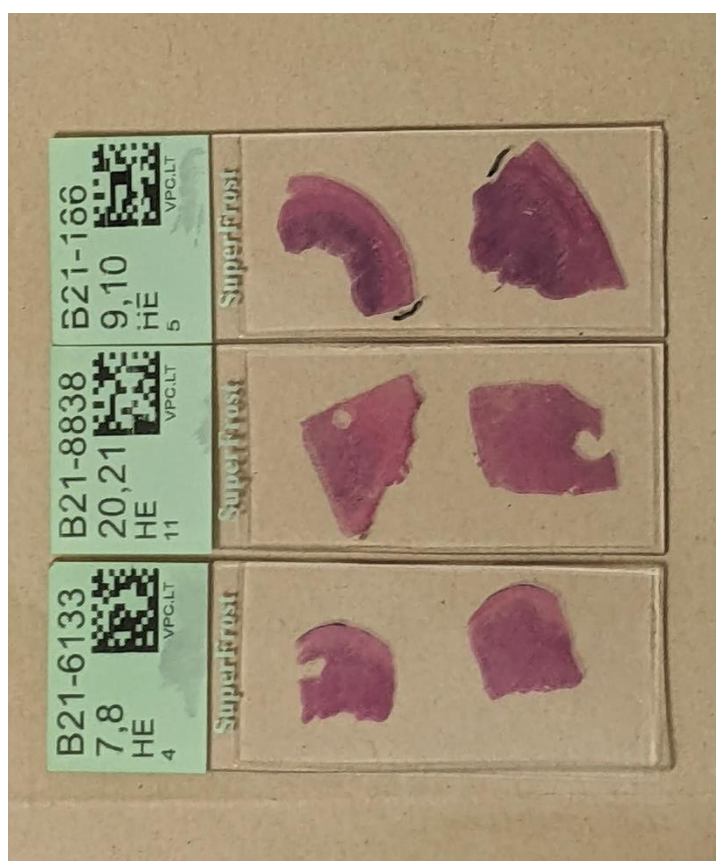
3.2.1 pav. PIPO programa

### 3.3 Tiriamos medžiagos

Šiame darbe buvo tirti žmogaus gimdos kūno biologiniai audiniai, kuriuos ruošė Valstybinio patologijos centro mokslininkai (3.3.1 pav.). Histologiniai pjūviai ruošti iš trijų pacientų audinių, pjautų 5µm storiu ir nudažytų standartiniu patologijoje naudojamu hematoksilino ir eozino dažu. Dažymas reikalingas mėginių vaizdinimui įprastiniais patologijoje naudojamais metodais.

Gimdos audiniai pasižymėjo skirtingo tipo vėžiniais dariniais bei jų diferenciacijomis. Bandiniuose B21-186 ir B21-8838 buvo nustatytos endometrioidinės adenokarcinomos. Adenokarcinomos yra piktybiniai liaukinio epitelio augliai, kuriems gali būti būdingas gleivių bei kitokio sekreto gamyba. Mėginys B21-6133 pasižymėjo aukšto piktybiškumo serozinė karcinoma, kuri yra kiek rečiau aptinkama, tačiau itin pavojinga [24].

Netiesiniai optiniai matavimai buvo atliekami išlaikant tas pačias sąlygas. Vidutinė galia bandinio plokštumoje išlaikoma 15mW. Mikroskopo matymo laukas 200x200 µm. Vaizdo integravimo trukmė – 10s.



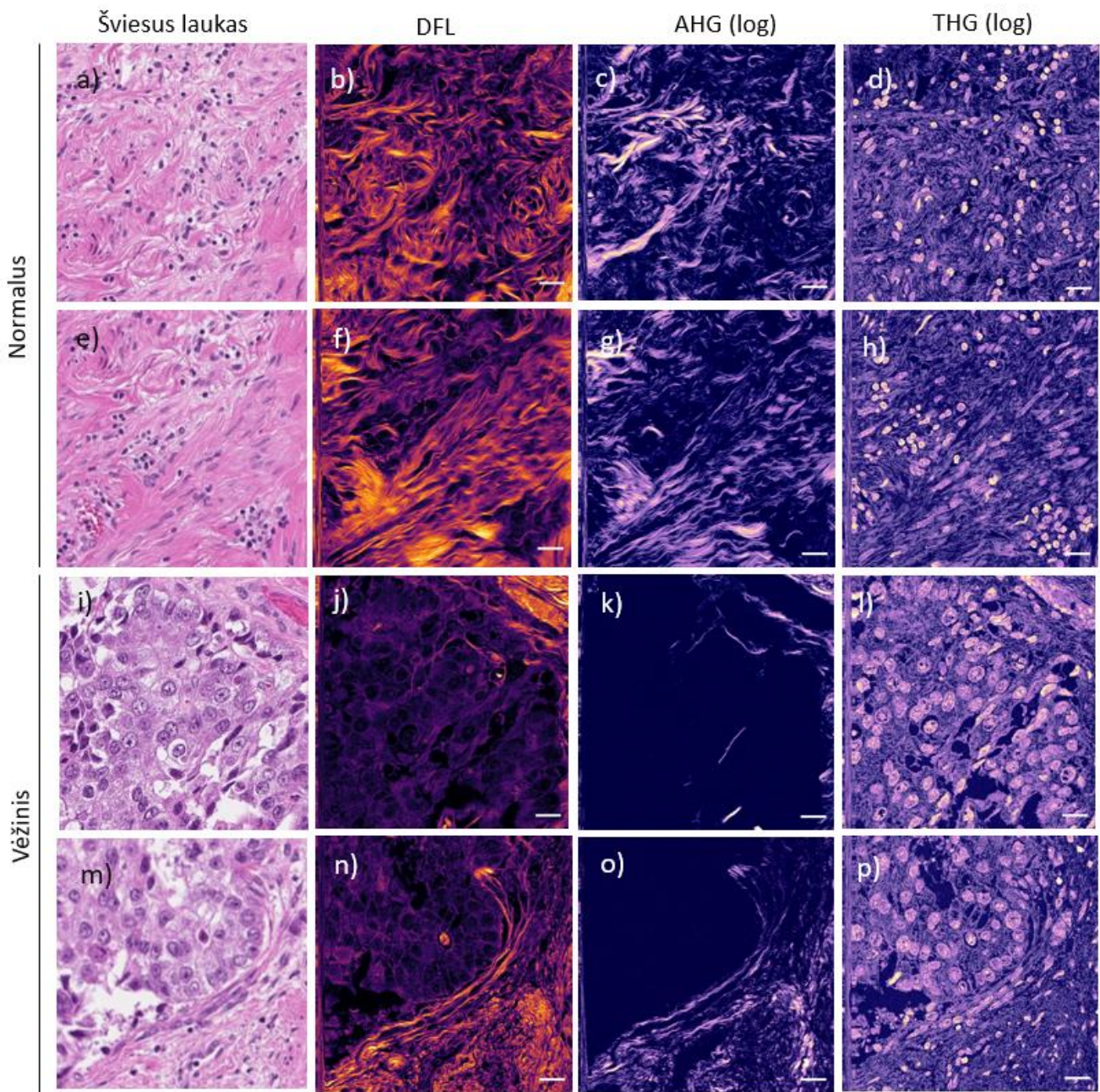
3.3.1 pav. Žmogaus gimdos kūno audinių bandiniai, dažyti H&E.



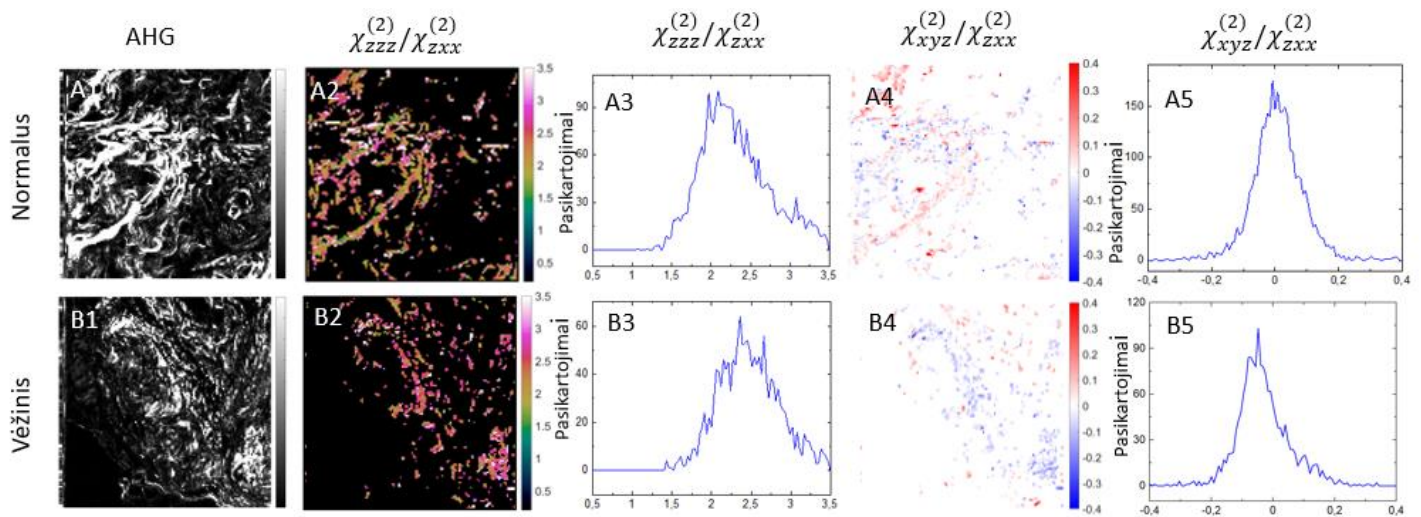
## 4. Rezultatai ir aptarimas

Baigiamojo darbo metu buvo išvaizdinti vėžio paveikti ir sveiki gimdos audiniai, paimti iš trijų pacientų su skirtingomis vėžio rūšimis. 4.1 pav. matomi vieno paciento audiniai, vaizdinti netiesiniu ir šviesiniu mikroskopais. Adenokarcinomos nepaveiktuose audiniuose, pirmose dviejose eilutėse, DFL vaizduose yra matomi kolageno vaizdai, fluorescuojantys dėl audiniui paruošti naudotų H&E dažų. b) ir f) vaizduose matyti daug, tankiai išsidėsčiusių kolageno skaidulų, tačiau jos išsidėsčiusios netvarkingai, t.y nėra matoma dominuojanti kryptis, vaizdą sudaro gausybė netvarkingai pasklidusių, banguotų skaidulų. Tų pačių sričių AHG vaizduose (4.1 pav. c ir g dalys) taip pat matomos kolageno skaidulos, tačiau palyginus su DFL, signalą generuoja tik dalis matytų kolageno skaidulų, kadangi šiuo atveju signalas yra renkamas iš kolageno, dėl jo struktūros, o ne dėl jį dažančių fluorescuojančių dažų. Šių sričių THG nuotraukose (4.1 pav. d ir h dalys) gali būti išskirti ląstelių branduoliai bei juos supantys jungiamieji audiniai. Signalas yra registruojamas dėl audinį dažančio eozino dažo [22].

4.1 pav. apatinėje dalyje pateikiami vėžio paveikti audiniai. DFL vaizduose (4.1 pav. j ir n sritys) pastebimas sumažėjęs fluorescuojančių struktūrų kiekis, taip pat šiuose vaizduose dominuoja signalas iš tarpląstelinų struktūrų, kurias išryškina eozino dažas. AHG iš vėžio paveiktų sričių (4.1 pav. k ir o) matyti mažesnis kiekis signalą kuriančių audinių. Stebima ženkliai mažesnis kiekis signalo iš kolageno skaidulų, taip pat, jos yra pavienės, dažnai atrodosutrūkusios, lyginant su sveiko audinio vaizdu. Sumažėjęs stebimo kolageno kiekis audiniuose yra vienas iš požymių, kad vyksta vėžiniai pakitimai. Tačiau pasakyti, ar kolageno tiriamoje audinio vietoje nebėra visai, ar jo struktūra negrįžtamai pakitusi dėl naviko poveikio, negalime. Taip pat, vėžio paveiktų audinių THG signalo nuotraukose ( l ir p dalys) matomi ląstelių branduoliai, tačiau jų matmenys yra pastebimai didesni nei prieš tai aptartų nevėžinio audinio (d ir h). Tai yra svarbus rezultatas, kadangi branduolių dydžio bei formos pakitimai patologams leidžia identifikuoti vėžinius pakitimus [25].



4.1 pav. Paciento B21-8838 gimdos audinių šviesaus lauko, DFL, AHG ir THG intensyvumo vaizdai. a), f), j), m) šviesaus lauko, b), f), j), n) – DFL, c), g), k), o) – AHG log skalėje, d), h), j), p) – THG logaritminėje skalėje. Mastelis - 20 $\mu$ m.

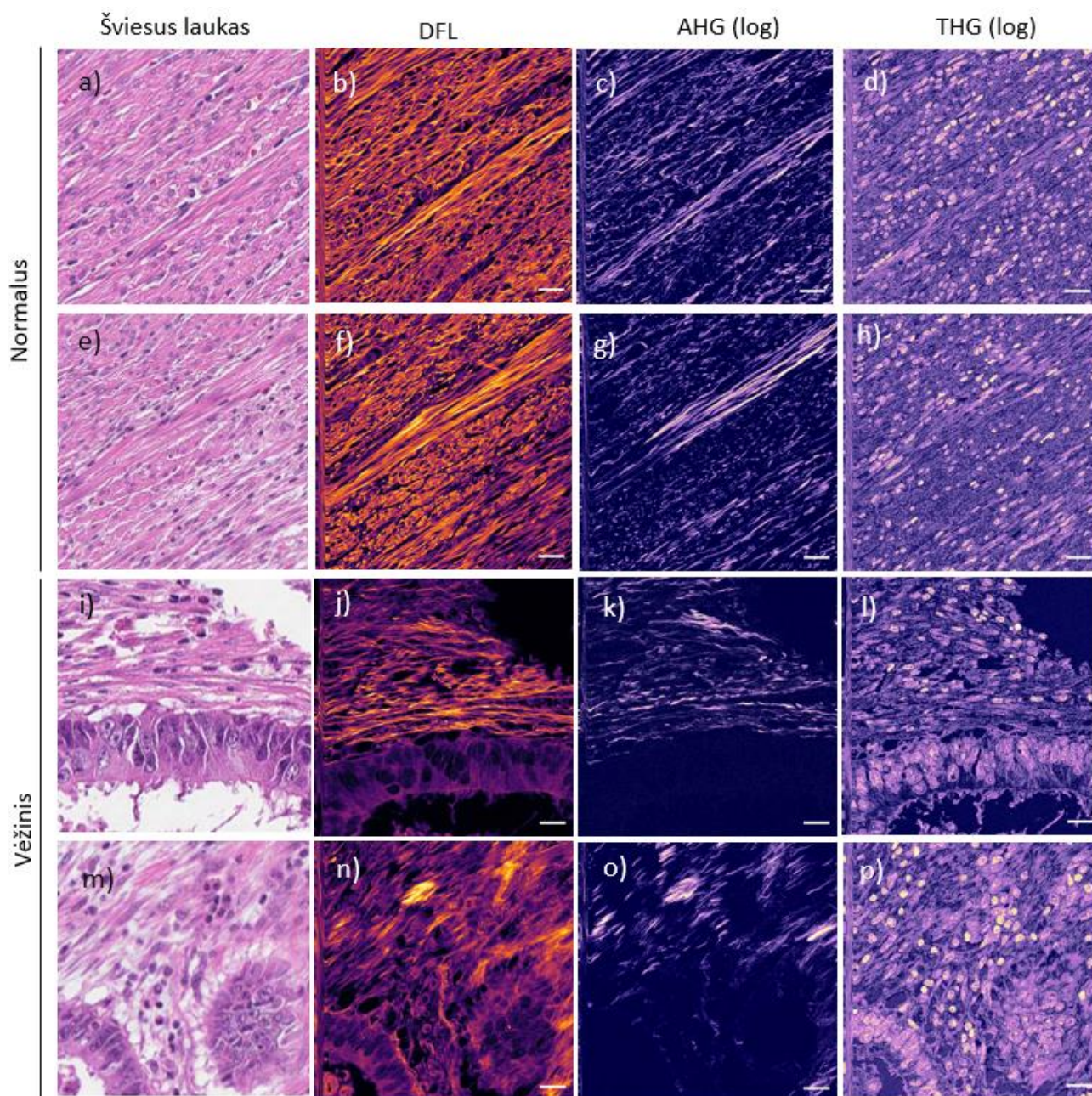


4.2 pav. P-AHG B21-8838 paciento analizės rezultatai. A eilutė – normalus audinys, B – vėžio paveiktas audinys. A2, B2 –R santykio žemėlapiai, A3, B3 – R santykio histograma, A4, B4 – C santykio žemėlapiai ir A5, B5 – C santykio histogramos

Aproksimavus matavimų duomenis gaunami R ir C santykių žemėlapiai bei histogramos, kurių pavyzdžiai pateikiami 4.2 pav. Lygindami R santykių žemėlapius matome, kad vėžinių darinių paveiktoje srityje dominuoja rausva spalva, taigi R santykio vertės yra aukštesnės. Tai patvirtina ir 4.2 pav. B3 histograma, kurioje matomas kreivės maksimumo pasislinkimas į aukštesnių verčių pusę (virš 2), vertės išsidėsčiusios intervale nuo 2 iki 3,5. Lyginant su vertėmis, stebimomis patologiškai normaliam audinyje (4.2 pav. A3).

Pateikiamuose C santykio žemėlapuose (A4 ir B4) spalviškai yra išskiriamos skaidulos, jei jos yra pakrypusios virš ar žemiau vaizdo plokštumos. C santykio vertės sveikame audinyje (A5) apima intervalą nuo -0,2 iki 0,2, analogiškai vėžio paveiktam audiniui (B5), tačiau naviko paveiktos srities C santykyje matomas maksimumo vertės slinkimas į neigiamų verčių pusę. C santykis yra susijęs su kolageno skaidulų pokrypiu ne židinio plokštumoje, taip pat jo vertės gali priklausyti ir nuo to, kaip buvo paruoštas audinio pjūvis [3]. Ženklas prie C santykio vertės nusako kolageno skaidulos poliškumą, t.y kryptį, kuria yra kertama vaizdo plokštuma.

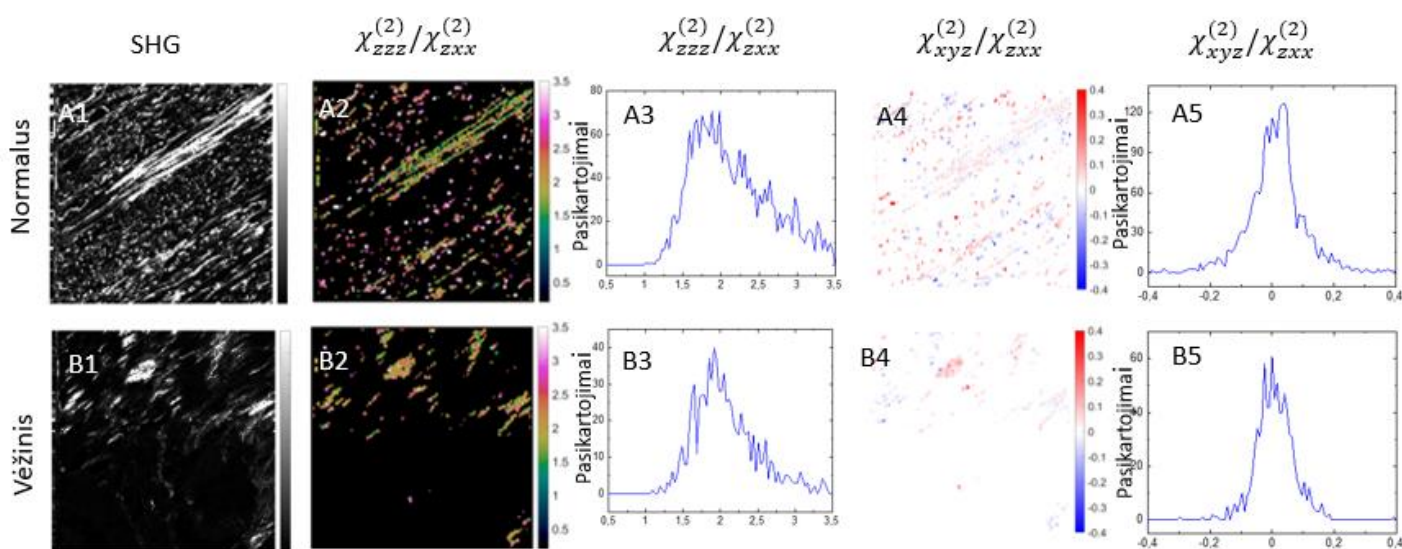




4.3 pav. Paciento B21-6133 gimdos audinių šviesaus lauko, DFL, AHG ir THG intensyvumo vaizdai. a), f), j), m) šviesaus lauko, b), f), j), n) – DFL, c), g), k), o) – AHG log skalėje, d), h), j), p) – THG logaritminėje skalėje. Mastelis - 20 $\mu$ m.

4.3 pav. Pateikiami vaizdai, gauti skenuojant netiesiniu optiniu mikroskopu paciento B21-6133 audinių mėginius. Viršutiniuose, normalaus audinio vaizduose, DFL režimu matomas dėl hematoksilino fluorescuojantis kolagenas ir aplinkiniai eozinu nusidažę ląsteliniai dariniai. Panašiai kaip ir prieš tai aptarto paciento audiniuose matomos didelės struktūros, kurios taip pat gali būti identifikuotos antros harmonikos generacijos režime. Tačiau šiuo atveju AH vaizduose dominuoja kryptingos kolageno skaidulos. Taip pat matomos sritys, kuriose AH generuojama iš taškinių sričių. Pažvelgus į vėžio paveiktų audinių vaizdus (4.3 pav apačia),

matoma panaši tendencija; AHG vaizduose stebimi mažesni baltymo tankiai, struktūros yra trumpesnės. Palyginus sveikų ir vėžinių audinių (g ir o) SHG vaizdus, galime pastebėti, kad generacija vyksta iš pavienius taškus primenančių struktūrų, o ne pailgų, kokias galima matyti sveiko audinio SHG vaizduose. 4.3 pav. l) ir p) vaizduose matoma THG generacija iš branduolių. THG vaizduose lyginant sveiką audinį (d ir h) su vėžiniu (l ir p), galima pastebėti, kad vėžiniame audinyje esama zonų, kuriose branduolių matmenys didesni, lyginant su sveikuose audiniuose matomais branduolių dydžiais. Taip pat svarbu pabrėžti, kad AH generuoja būtent tos sritys, kuriose branduolių dydžiai yra nepakitusių matmenų. Galime manyti, kad vėžio vystymasis paveikia kolageno struktūrą taip, kad kolagenas nustoja generuoti AH signalą. Galiausiai, zonose, kuriose matomas navikas (4.3 pav. m-p) signalo iš kolageno netenkame.



4.4 pav. P-AHG B21-6133 paciento analizės rezultatų pavyzdžiai. A eilutė – normalus audinys, B – vėžio paveiktas audinys. A2, B2 – R santykio žemėlapiai, A3, B3 – R santykio histogramos, A4, B4 – C santykio žemėlapiai ir A5, B5 – C santykio histogramos

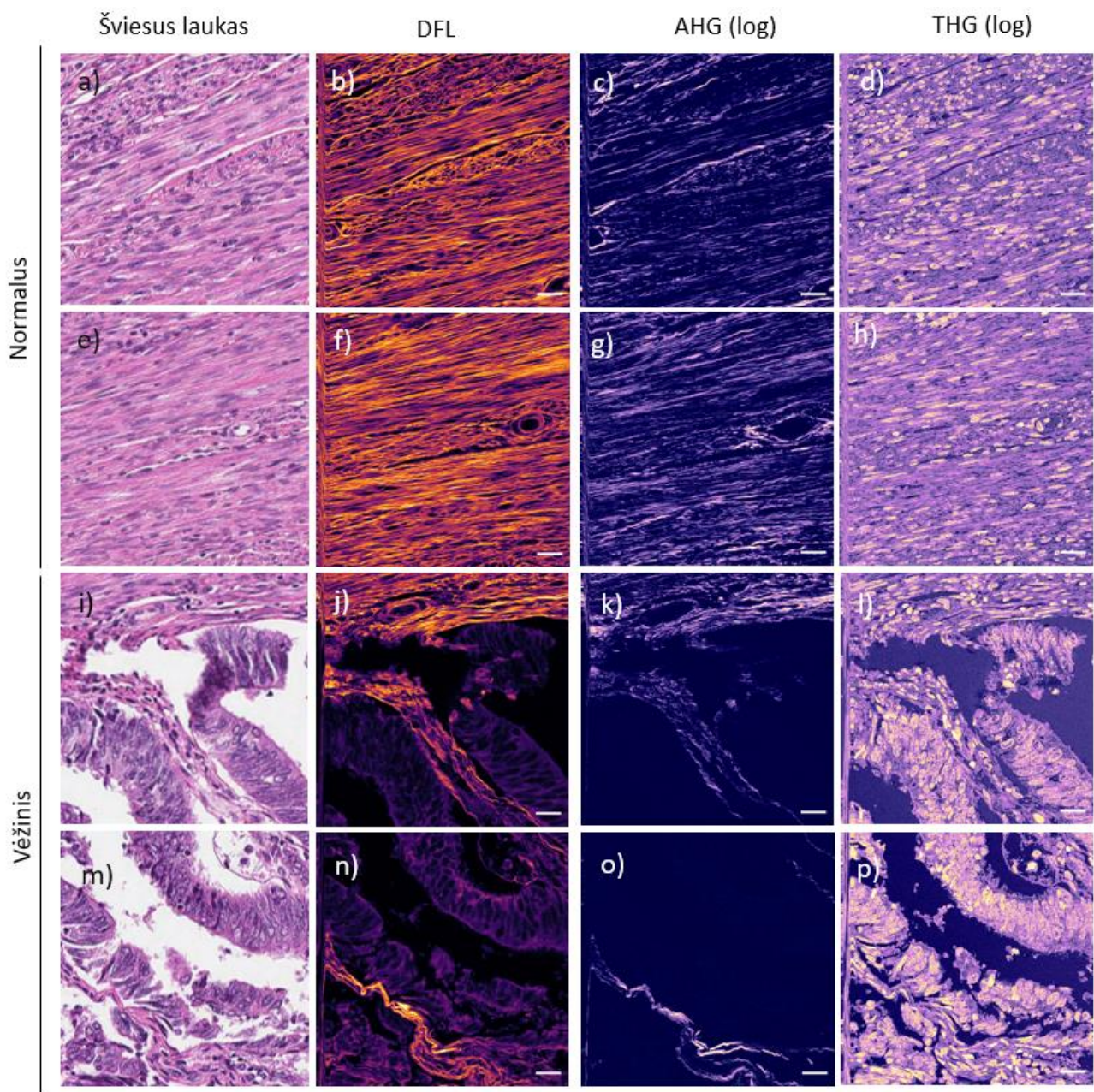
4.4 pav. pateikiami paciento B21-6133 poliarizacinių netiesinių matavimų duomenų pavyzdžiai. Įprastai normalaus audinio R santykio žemėlapiuose (4.4 pav A4) matomi keli charakteringi kolageno vaizdai. Dalis informacijos yra surenkama iš didelių, linijinių kolageno pynių, kurios R žemėlapiuose matomos žalsva spalva ir atitinka R vertes apie 2. Kiti signalo šaltiniai primena taškinius. Atitinkamai, R vertės šiose srityse yra aukštesnės. Tai gali signalizuoti, jog kolageno pynės sudaro kampą su skenuojamo vaizdo plokštuma. Tai patvirtina



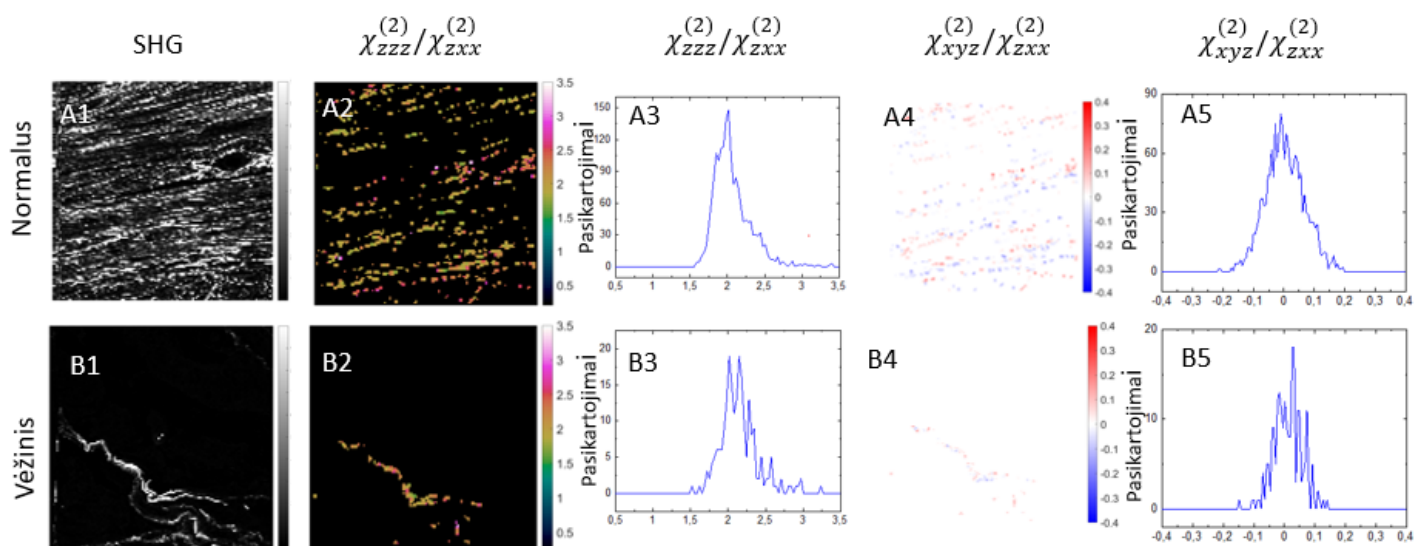
ir vaizdai matyti 4.3 pav. e) ir f), kuriuose identifikuojamas raumeninis audinys, einantis statmenai vaizdo plokštumai. R santykio histogramoje (A3) matomas platus R verčių pasiskirstymas, intervale nuo 1,3 iki 3,5. Palyginus su vėžinių sričių histogramomis matoma, kad naviko paveiktose srityse R verčių intervalas susiaurėja, pasikartojimų aukštesnių verčių srityje skaičius itin mažas. Taigi, kadangi sveikame audinyje matomas platesnis R santykio verčių pasiskirstymas nei vėžiniame, galime manyti, kad kolagenas sveikame audinyje yra išsidėstęs netvarkiai, įvairiais kampais tarpusavyje.

C santykio histogramoje (4.4 pav A5, B5) matome platų verčių pasiskirstymą intervale  $[-0,2 ; 0,2]$ , maksimumo padėtys ties 0. Tokios C santykio vertės gali reikšti tai, jog kolageno skaidulos yra išsidėčiusios įvairiais kampais į fokusuojamą plokštumą. Reikšmingi skirtumai šiuo konkrečiu atveju nėra stebimi.

4.5 pav. pateikiami tipiniai vaizdai, matomi skenuojant paciento B21-186 gimdos audinius netiesiniu mikroskopu kartu su šviesinio mikroskopo vaizdais. Stebimi sveiko audinio vaizdai tiek DFL, tiek AHG bei THG režimuose yra panašūs į prieš tai aptartus paciento B21-6133 audinių vaizdus (4.3 pav.). AH dominuoja pailgi ir kryptingi kolageno skaidulų vaizdai. Pavienėse zonose taip pat stebimi taškiniai spinduliuotės šaltiniai dėl audinio struktūros būtent šioje vietoje. Naviko paveiktose zonose (4.5 pav. i-p) vaizdai) matomo audinio struktūra yra stipriai pakitusi. Trečiosios harmonikos generacijos vaizduose (4.5 pav l) ir p)) vietomis matomi itin didelių matmenų branduoliai. Atitinkamai, šiose zonose AH generacija nėra stebima.



4.5 pav. Paciento B21-186 gimdos audinių šviesaus lauko, DFL, AHG ir THG intensyvumo vaizdai. a), f), j), m) šviesaus lauko, b), f), j), n) – DFL, c), g), k), o) – AHG log skalėje, d), h), j), p) – THG logaritminėje skalėje. Mastelis - 20 $\mu$ m.



4.6 pav. P-AHG B21-186 paciento analizės rezultatai. A eilutė – normalus audinys, B – vėžio paveiktas audinys. A2, B2 –R santykio žemėlapiai, A3, B3 – R santykio histogramos, A4, B4 – C santykio žemėlapiai ir A5, B5 – C santykio histogramos

Analizuodami gautus rezultatus, pateikiamus 4.6 pav. - visų pirma svarbu atkreipti dėmesį, jog vėžiniame audinyje zonų, generuojančių AH yra mažai, todėl tiek R, tiek C santykio žemėlapuose verčių kiekis mažas. Statistiškai vertingų rezultatų galime gauti apdorodami didelį kiekį informacijos, surinktos iš didesnės imties skenavimo zonų. Atlikus tokią analizę buvo gautos vidutinės R bei C santykių vertės bei jų medianos. Rezultatai pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. Trijų pacientų audinių poliarizacinių netiesinių matavimų analizės rezultatai

Mėginys	Zonų skaičius	< R >	R mediana	< C >	C mediana
<b>B21-8838 – adenokarcinoma</b>					
Normalus	12	2,24 ± 0,007	2,14 ± 0,009	0,06 ± 0,0012	0,04 ± 0,0016
Vėžinis	6	2,38 ± 0,011	2,30 ± 0,014	0,03 ± 0,003	0,01 ± 0,003
<b>B21-6133 – serozinė karcinoma</b>					
Normalus	10	2,29 ± 0,012	2,17 ± 0,022	0,01 ± 0,007	-0,01 ± 0,009
Vėžinis	12	2,37 ± 0,022	2,27 ± 0,027	0,02 ± 0,009	0 ± 0,01
<b>B21-186 – adenokarcinoma</b>					
Normalus	12	2,22 ± 0,012	2,14 ± 0,015	0,03 ± 0,008	0,01 ± 0,01
Vėžinis	6	2,27 ± 0,019	2,25 ± 0,024	0,02 ± 0,013	0,02 ± 0,017



Nustatytos parametrų vertės tirtiems audiniams išlaiko giminias tendencijas. Vidutinės R vertės patologiškai normaliuose audiniuose yra ženkliai mažesnės nei gautos vėžiniam audiniui. Gautos vertės svyruoja nuo vidutiniškai  $2,22 \pm 0,012$  ir  $2,24 \pm 0,007$  normaliam audiniui, ir siekia  $2,38 \pm 0,011$  bei  $2,27 \pm 0,019$  adenokarcinomos paveiktame audinyje. Tuo tarpu paciento B21-6133 sveikame audinyje gautas vidurinis R santykis yra kiek aukštesnis ( $R=2,29 \pm 0,012$ ), o vėžiniame  $R=2,37 \pm 0,022$ . Literatūroje galima aptikti R santykio vidutinių verčių plaučių [12], krūtų [4] ir kasos [3] audinių, kurios yra žemesnės nei šiame darbe analizuotų gimdos kūno vėžinių audinių. Tačiau yra išlaikoma minėtoje literatūroje stebima tendencija – vidutinės R santykio vertės tipiskai yra aukštesnės vėžio paveiktoms sritims.

Šio darbo metu tirtų audinių C santykio vidurkiai ir medianos taip pat pateikiami 1 lentelėje. Esminiai pokyčiai tarp sveikų ir vėžinių sričių vertinant C santykius nėra stebimi.

## 5. Išvados

Magistrantūros studijų baigiamajame darbe buvo išvaizdinti trijų pacientų gimdos audinio sveiki ir skirtingos rūšies vėžio paveikti audiniai, įvertinti netiesinės mikroskopijos metodais gaunami parametrai. Tyrimo metu nustatyta:

1. Kolageno kuriamas AHG signalas sveikuose gimdos audiniuose stiprus, o vėžiniuose jis palyginus silpnas arba negeneruojamas visai, nes vėžio vystymasis paveikia kolageno, esančio audiniuose, struktūrą bei tarpusavio išsidėstymą.
2. AHG ir DFL režimu matomi kolageno vaizdai stipriai priklauso nuo vėžio tipo audinyje, o gimdos audiniuose jų gali būti dviejų pagrindinių tipų, todėl ši metodika sunkiau pritaikoma nei kitiems audiniais.
3. Nustatytos R santykio vertės sveikam audiniui siekia  $\approx 2,2$ , o srityse, kuriose matomas vėžinio darinio poveikis R vertės išauga iki  $\approx 2,3$ .
4. C santykio verčių skitumai tarp sveikų ir vėžio paveiktų audinių nėra svarūs, kadangi vertėms įtaką daro paties audinio struktūra, mėginio paruošimo metodika.

## 6. Literatūra

- [1] P. J. Campagnola and L. M. Loew, “Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1356–1360, 2003, doi: 10.1038/nbt894.
- [2] P. J. Campagnola and C. Y. Dong, “Second harmonic generation microscopy: Principles and applications to disease diagnosis,” *Laser Photonics Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 13–26, Jan. 2011, doi: 10.1002/lpor.200910024.
- [3] D. Tokarz *et al.*, “Characterization of pancreatic cancer tissue using multiphoton excitation fluorescence and polarization-sensitive harmonic generation microscopy,” *Front. Oncol.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–10, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00272.
- [4] A. Golaraei *et al.*, “Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 10, p. 4054, 2016, doi: 10.1364/boe.7.004054.
- [5] D. Tokarz, R. Cisek, A. Golaraei, S. L. Asa, V. Barzda, and B. C. Wilson, “Ultrastructural features of collagen in thyroid carcinoma tissue observed by polarization second harmonic generation microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 9, p. 3475, 2015, doi: 10.1364/boe.6.003475.
- [6] R. T. Sataloff, M. M. Johns, and K. M. Kost, “Nolinear Optics--Robert W.Boyd,” *Acad. Press*, p. 576, 2005.
- [7] A. Dubietis, *Netiesinė optika*. Vilniaus Universiteto leidykla, 2011.
- [8] A. E. Tuer *et al.*, “Hierarchical model of fibrillar collagen organization for interpreting the second-order susceptibility tensors in biological tissue,” *Biophys. J.*, vol. 103, no. 10, pp. 2093–2105, 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2012.10.019.
- [9] P. Stoller, B.-M. Kim, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser, and L. B. Da Silva, “Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon,” 2002, doi: 10.1117/1.1431967.
- [10] P. Kunwar, J. Toivonen, M. Kauranen, and G. Bautista, “Third-harmonic generation imaging of three-dimensional microstructures fabricated by photopolymerization,” *Opt. Express*, vol. 24, no. 9, p. 9353, May 2016, doi: 10.1364/oe.24.009353.
- [11] D. Sandkuijl, A. E. Tuer, D. Tokarz, J. E. Sipe, and V. Barzda, “Numerical second- and third-harmonic generation microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 30, no. 2, p. 382, 2013, doi: 10.1364/josab.30.000382.
- [12] A. Golaraei *et al.*, “Characterization of collagen in non-small cell lung carcinoma with second harmonic polarization microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, no. 10, p. 3562, 2014, doi: 10.1364/boe.5.003562.
- [13] A. Golaraei *et al.*, “Collagen chirality and three-dimensional orientation studied with polarimetric second-harmonic generation microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800241.
- [14] M. E. Nimni, “Collagen: Structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–86, 1983, doi: 10.1016/0049-0172(83)90024-0.
- [15] K. Burke, P. Tang, and E. Brown, “Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, p. 031106, 2012, doi: 10.1117/1.jbo.18.3.031106.
- [16] V. Ottani, M. Raspanti, and A. Ruggeri, “Collagen structure and functional implications,”

*Micron*, vol. 32, no. 3, pp. 251–260, 2001, doi: 10.1016/S0968-4328(00)00042-1.

- [17] X. Chen, O. Nadiarynkh, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, “Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 4, pp. 654–669, 2012, doi: 10.1038/nprot.2012.009.
- [18] L. Gailhouste *et al.*, “Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: A new tool in the assessment of liver fibrosis,” *J. Hepatol.*, vol. 52, no. 3, pp. 398–406, 2010, doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.009.
- [19] S. Zhuo *et al.*, “Label-free imaging of basement membranes differentiates normal, precancerous, and cancerous colonic tissues by second-harmonic generation microscopy,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 4–7, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038655.
- [20] A. A. Zeitoune *et al.*, “Epithelial ovarian cancer diagnosis of second-harmonic generation images: A semiautomatic collagen fibers quantification protocol,” *Cancer Inform.*, vol. 16, 2017, doi: 10.1177/1176935117690162.
- [21] Y. Ling *et al.*, “Second harmonic generation (SHG) imaging of cancer heterogeneity in ultrasound guided biopsies of prostate in men suspected with prostate cancer,” *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 6, pp. 911–918, 2017, doi: 10.1002/jbio.201600090.
- [22] M. Mačiulis, “KOLAGENO MULTIMODALINĖ NETIESINĖ MIKROSKOPIJA BIOLOGINIULOSE AUDINIULOSE,” Magistrantūros studijų baigiamasis darbas, Vilniaus Universitetas, 2021.
- [23] A. Golaraei, “Polarimetric Second–Harmonic Generation Microscopy for Histopathology,” University of Toronto, 2018.
- [24] L. Zhang, S. Y. Kwan, K. K. Wong, P. T. Solaman, K. H. Lu, and S. C. Mok, “Pathogenesis and clinical management of uterine serous carcinoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12030686.
- [25] E. G. Fischer, “Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells,” *Acta Cytol.*, vol. 64, no. 6, pp. 511–519, 2020, doi: 10.1159/000508780.

## Summary

### **Nonlinear microscopy with texture analysis for cancerous tissues diagnostics**

**Diana Pavlovaitė**

Imaging of histological H&E stained sections in clinical field is usually performed with optical brightfield or confocal microscope. However, nonlinear optical microscopy provides additional information for clinical imaging of tissues, cells and their components. Focus of this work is collagen, which is one of the main components of extracellular matrix and is known to be affected by tumor growth. Studying collagens structural alterations may provide additional information about its potential growth and metastatic potential. Since fibrillar collagen has a non-centrosymmetric structure, it can be visualized by second-harmonic generation (SHG) microscopy and polarimetric SHG microscopy to obtain quantitative information about materials structure and organisation.

The aim of this work is to use scanning optical nonlinear microscopy for imaging of endometrial tissues and determining the parameters that allow separation of healthy tissue from cancerous one. As well as to determine whether this type of tissue is promising candidate for further development of cancer diagnostic tools.

## Santrauka

### **Netiesinė mikroskopija ir tekstūrinė analizė vėžinių darinių diagnostikoje**

Diana Pavlovaitė

Optinė mikroskopija yra įprastinis medicinos diagnostikoje naudojamas įrankis, H&E dažytų mėginių vaizdinimui. Tačiau netiesinės optinės mikroskopijos metodas suteikia papildomos informacijos apie audinius, ląsteles ir kitus darinius. Vienas iš tokių darinių – kolagenas, kuris yra vienas iš ekstraląstelinės matricos dalių. Informacija apie kolageno struktūros pokyčius naviko veikiamose srityse gali suteikti papildomos informacijos apie tolesnę ligos vystymąsi, metastazavimo galimybes. Kadangi kolagenui būdinga ne centrosimetrinė struktūra, jis pasižymi antrosios harmonikos generacija ir gali būti naudojamas poliarizacinės AHG mikroskopijoje gauti kokybinius rodiklius, leidžiančius spręsti apie kolageno struktūrą ir jos pakitimus.

Šio darbo tikslas yra netiesiniu optiniu mikroskopu vaizdinti gimdos audinių patologinius mėginius ir matematiniais metodais nustatyti bei palyginti vėžinius ir sveikus audinius apibūdinančius parametrus. Taip pat įvertinti šios metodikos tinkamumą tolesniam vėžinių pakitimų gimdos audiniuose diagnostikos vystymui.