

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Чеботарев Артем Станиславович

**Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на
основе использования ратиометрических флуоресцентных
белковых сенсоров**

1.3.19. Лазерная физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

к.ф.-м.н., с.н.с.

Александр Александрович Ланин

д. ф.-м. н., профессор

Алексей Михайлович Желтиков

Москва – 2024

Оглавление

| | |
|--|-----------|
| Введение | 5 |
| Глава 1. Современные инструменты оптогенетики для изучения метаболизма клеток в реальном времени | 20 |
| 1.1 Многофотонная флуоресцентная микроскопия и пути ее оптимизации 20 | |
| 1.1.1 Основные принципы, достижения и ограничения двухфотонной микроскопии | 20 |
| 1.1.2 Флуоресцентная микроскопия при трехфотонном возбуждении как развитие метода многофотонной визуализации | 24 |
| 1.2 Методы оптогенетики для функциональной визуализации и стимуляции живых тканей | 27 |
| 1.2.1 Флуоресцентные маркеры для многофотонной микроскопии биохимических процессов | 27 |
| 1.2.2 Двух- и трехфотонная спектроскопия органических красителей и флуоресцентных белков | 29 |
| 1.3 Мультиmodalность нелинейно-оптических подходов в исследовании биологических объектов..... | 34 |
| Глава 2. Разработанные системы нелинейной спектроскопии и микроскопии | 38 |
| 2.1 Теоретические основы спектроскопии двух- и трех-фотонного возбуждения флуоресцирующих молекул | 38 |
| 2.2 Откалиброванные системы измерения сечений двух- и трехфотонного поглощения флуоресцентных маркеров | 42 |
| 2.2.1 Когерентный суперконтинуум для спектроскопии двухфотонного поглощения | 42 |
| 2.2.2 Свободный от эталона метод измерения ДФП-спектров маркеров красного и ближнего ИК диапазонов | 51 |
| 2.2.3 Перестраиваемый лазерный источник на базе оптических солитонов для ТФП-спектроскопии | 56 |
| 2.3 Лазерные системы многофотонной функциональной и структурной микроскопии | 61 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1 Компактный световодный источник для двухканальной двухфотонной микроскопии | 62 |
| 2.3.2 Ратиометрическая и мультимодальная визуализация ткани мощными ИК импульсами | 67 |
| 2.4 Выводы..... | 72 |

Глава 3. Исследование потенциала нелинейной визуализации биосенсоров на растворах, клеточных культурах и биоптате

| | |
|---|-----|
| 3.1 Спектроскопия сенсоров АФК в растворах при многофотонном возбуждении | 76 |
| 3.1.1 Принцип работы ратиометрических белковых сенсоров при одно- и многофотонном возбуждении | 76 |
| 3.1.2 Двухфотонная спектроскопия ратиометрических сенсоров на основе желтого флуоресцентного белка cpYFP | 78 |
| 3.1.3 Исследование спектральных зависимостей двухфотонных яркостей сенсора Hyper-FAST с различными ИК флуорогенами..... | 82 |
| 3.1.4 Трехфотонная спектроскопия сенсора кислотности среды SypHer3s | 85 |
| 3.2 Визуализация клеточных культур как важная модель апробации методик | 88 |
| 3.2.1 Измерение динамики абсолютных значений pH и H ₂ O ₂ в клеточных культурах | 88 |
| 3.2.2 Однопучковая гибридная визуализация фьюзов сенсора Hyper-FAST и опорных флуоресцентных белков..... | 95 |
| 3.3 Нелинейно-оптическая визуализация сенсорных белков в рассеивающих тканях | 98 |
| 3.3.1 Визуализация нейронов и астроцитов в срезах коры головного мозга мыши | 99 |
| 3.3.2 Параметры и особенности построения изображения при многофотонной микроскопии на фантоме мозга | 102 |
| 3.3.3 Мультимодальная нелинейно-оптическая визуализация морфологии и биосенсоров в срезах печени мыши | 106 |
| 3.4 Мониторинг динамики АФК в нейронах живого мозга в острых экспериментах | 110 |
| 3.5 Выводы..... | 117 |

| | |
|---|------------|
| Глава 4. Мультимодальная визуализация окислительных процессов в живых животных..... | 120 |
| 4.1 Визуализация сенсора пероксида водорода в митохондриях нейронов глубоких слоев неокортекса мыши | 120 |
| 4.2 Развитие ацидоза в мозге мыши при оптико-индуцированном закупоривании сосудов..... | 124 |
| 4.3 Модуляция пероксида водорода в гепатоцитах печени мыши методами хемогенетики | 128 |
| 4.4 Визуализация защитных механизмов нейтрофилов рыбы на основе сильных окислителей..... | 131 |
| 4.5 Выводы..... | 136 |
| Заключение..... | 137 |
| Список использованных источников | 141 |

Введение

Актуальность работы

Метод лазерной сканирующей микроскопии, основанный на регистрации флуоресценции молекул при двухфотонном поглощении (ДФП) инфракрасного излучения, с самого своего зарождения в 1990 году [1] тесно связан с исследованиями различных биологических тканей [2]. Причиной этого является возможность формировать контрастные изображения помеченных объектов с высоким пространственным разрешением в сильно рассеивающих средах на глубинах, не доступных линейными методами визуализации. Данная особенность позволила перейти к исследованию на субклеточном уровне морфологии ткани, а позднее – ее функционала, в более сложных биологических моделях: переживающие срезы [3], анестезированные и свободно-подвижные животные [4].

Генетически-кодируемые флуоресцентные сенсоры (ГКФС), основанные на флуоресцентных белках (ФБ) [5], на настоящее время являются наиболее перспективными функциональными метками для такой микроскопии животных. Пролитывая свет на процессы метаболизма клеток в различных биологических моделях, они прочно вошли в набор инструментов современных биомедицинских исследований. Полный потенциал ГКФС раскрывается благодаря многофотонной микроскопии, позволяя, например, исследовать активность многих десятков нейронов зрительной коры мозга при демонстрации мышке визуального стимула [6]. Ряд флуоресцентных сенсоров демонстрирует возможность однофотонного ратиометрического опроса, что позволяет интерпретировать ответ индикатора вне зависимости от уровня экспрессии белка и тем самым радикально повысить информативность регистрируемого сигнала. Бурное развитие в области разработки новых сенсоров требует создание универсальной оптической платформы для определения нелинейно-оптических характеристик перспективных молекул с целью выявления их потенциала в задачах многофотонной функциональной визуализации.

В дополнении к описанным преимуществам, нелинейно-оптическая микроскопия открывает доступ к новым источникам контраста, реализуя мультимодальный аспект данного подхода. Так, естественным образом, двухфотонная микроскопия расширяется с помощью одновременного детектирования сигналов генерации второй (ГВГ) и третьей оптической гармоники (ГТГ), а также флуоресценции при трехфотонном поглощении (ТФП). Микроскопия второй гармоники обладает крайне высокой специфичностью, позволяя визуализировать ориентированные биологические структуры с большой гиперполяризуемостью, например пучки коллагена или микротрубочки [7]. Напротив, микроскопия третьей гармоники чувствительна к оптическим границам сред, поэтому прекрасно подходит для определения морфологии ткани [8]. Интересной особенностью также является эффект резонансного усиления ГТГ, что проявляется, например, в значительном сигнале от эритроцитов. Наконец, на первый взгляд схожая с ДФП, флуоресцентная ТФП-микроскопия привносит новые особенности, связанные с принципиальным отличием в ограничении глубины визуализации и новыми спектральными окнами возбуждения маркеров.

Внедрение нелинейно-оптических методик визуализации крайне актуально для исследования окислительно-восстановительных (ОВ) процессов в сложных живых системах с высоким пространственным и временным разрешением, позволяющим восстановить концентрационные динамики активных форм кислорода (АФК) в норме и патологии. Растущий интерес к АФК объясняется их ключевой ролью в широком спектре биохимических процессов. Так, нарушение баланса генерации и нейтрализации АФК в клетках наблюдается в процессе развития ряда критических патологий у человека. С другой стороны АФК являются врожденным оружием иммунной системы для уничтожения патогенных бактерий и вирусных инфекций, а также обладают регуляторной функцией.

Степень разработанности темы исследования

Поиски путей оптимизации нелинейно-оптической лазерной микроскопии и создание большого количества флуоресцентных белков и сенсоров в различных спектральных диапазонах привело к возникновению задачи измерения абсолютных значений и спектральных зависимостей сечений двухфотонного возбуждения. Нетривиальность методики связана, в первую очередь, с труднодоступностью источников перестраиваемого фемтосекундного излучения и сложностью учета всех сопутствующих флуктуации параметров импульсов. Существенный вклад в построение техники таких измерений внесли М.Дробышев и А. Ребане [9–11]. Используя в своих работах каскадную Ti:Sapphire лазерную систему, состоящую из регенеративного и параметрического усилителей с возможностью удвоить оптические частоты сигнальной и холостой волны, им удалось покрыть спектральный диапазон исследования флуоресцентных маркеров от 550 нм до 1600 нм. Аккуратные измерения пространственных и временных характеристик импульсов позволили создать линейку опорных спектров двухфотонного возбуждения ряда органических красителей [9], и с их помощью промерить набор наиболее распространенных на то время ФБ [11].

Предложенная оптическая платформа, включающая два фемтосекундных усилителя, является крайне сложной и дорогостоящей, что серьезно ограничивает её широкое применение и распространение. В частности, в научной литературе наблюдается существенный недостаток информации по нелинейно-оптическим характеристикам для большинства новых белков и сенсоров.

В области визуализации ратиометрических белковых сенсоров для исследования динамики АФК в режиме *in-vivo* в основном проведены работы с помощью стандартной широкопольной и конфокальной флуоресцентной микроскопии на оптически прозрачных биологических объектах, например личинках рыб *Danio rerio*. Переход на исследование редокс сигналинга у грызунов, более близкой модели человеку, был осуществлен в нескольких

работах [12,13]. Одновременная динамика рН и Cl⁻ была продемонстрирована в нейронах мыши на глубинах ~150 мкм с помощью сенсора LSSmClorHensor. Визуализация сенсора перекиси roGFP в живых и фиксированных срезах мозга показана на нейронах гиппокампа в работе [12]. На живой анестезированной мыши была проведена двухфотонная визуализация митохондрий в нейронах спинного мозга до и после надреза, экспрессирующих roGFP [13]. Отсутствие второго лазерного источника не позволяло двухфотонно записывать динамику сенсора, т.к. перестройка генератора по длине волны требует много времени. При этом, эксперименты были проведены на клетках вблизи поверхности, визуализация которых конфокальным микроскопом также приводится в тексте и может быть реализована без двухфотонного опроса.

Таким образом, растущий интерес к задаче визуализации ОВ процессов при помощи ратиометрических белковых сенсоров в режиме *in-vivo* требует развития методов, как спектроскопического анализа двух- и трехфотонной яркости индикаторов, так и создания оптических платформ для функциональной и мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии данных маркеров, что обуславливает высокую степень актуальности настоящей диссертационной работы.

Цели и задачи диссертационной работы

Цель представленной работы заключается в развитии новых лазерных источников и оптимизации нелинейно-оптических методик визуализации для повышения качества и информативности функциональной микроскопии живых животных с использованием ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров. В соответствии с поставленной целью сформулированы и решены следующие основные задачи:

а) Создание оптических платформ, на базе лазерных генераторов фемтосекундных импульсов и микроструктурированных световодов для количественных измерений двух- и трехфотонных сечений поглощений флуоресцентных маркеров в спектральном диапазоне от 650 нм до 1700 нм;

б) Оптимизация параметров лазерного излучения (длин волн, длительностей импульсов, пиковых и средних мощностей) для ратиометрического двухфотонного опроса и глубокой визуализации сенсоров в сильно рассеивающих тканях;

в) Количественное исследование чувствительностей, динамических диапазонов и предельных глубин визуализации концентрационных динамик АФК при многофотонном опросе ратиометрических флуоресцентных сенсоров

г) Визуализация с субклеточным пространственным разрешением методами ратиометрической нелинейно-оптической микроскопии флуоресцентных сенсоров динамики кислотности, концентрации пероксида водорода и хлорноватистой кислоты в нейронах, гепатоцитах и нейтрофилах живых мышей и личинок рыб при патологиях и повреждениях тканей

Объект и предмет исследования

Объектом исследования диссертационной работы является двух- и трехфотонное возбуждение генетически-кодируемых флуоресцентных белковых сенсоров активных форм кислорода на базе флуоресцентного белка *srYFP*. В качестве предмета исследования выступают спектры многофотонного возбуждения изучаемых сенсоров в различных состояниях, а также их ратиометрические отклики на изменение концентраций аналита в различных биологических моделях в рамках нелинейно-оптического возбуждения.

Научная новизна

В представленной диссертации экспериментально продемонстрировано, что использование нелинейных спектральных преобразований в микроструктурированных (МС) световодах может служить источником широкополосного когерентного излучения для проведения двух- и трехфотонной спектроскопии в диапазонах длин волн 650 – 1150 нм и 1320 – 1700 нм, соответственно. При этом, чувствительности предложенных методов

составляют около $(C\phi\sigma_2)_{\min} \approx 1 \text{ мкМ}\cdot\text{ГМ}$ и $(C\phi\sigma_3)_{\min} \approx 1 \text{ мкМ}\cdot 10^{-81}\cdot\text{см}^6\cdot\text{с}^2$, а быстрый доступ к различным длинам волн накачки позволяет реализовать запись спектра за ~ 1 мин.

Впервые измерены абсолютные значения двухфотонной яркости флуоресцентных белковых сенсоров АФК семейства *сrYFP*, демонстрирующие значения 10 – 45 ГМ (1 ГМ = $10^{-50} \text{ см}^4\text{с фотон}^{-1}$), что сопоставимо с наиболее распространенными кальциевыми сенсорами серии *GCaMP*. Установлена общая закономерность в положении пика возбуждения окисленной формы сенсоров в районе 950 нм, связанная с преобладание электронно-колебательного перехода **0–1** для депротонированной формы хромофора. Определены изобестические точки всей линейки изучаемых белков в двухфотонном формате. Впервые измерены значения трехфотонной яркости сенсора кислотности среды *SypHer3s* и обнаружен существенный высокочастотный сдвиг пика трехфотонного возбуждения окисленной формы.

Определены концентрационные чувствительности и динамические диапазоны изучаемых сенсоров при двухфотонном двухцветном возбуждении. Впервые продемонстрирован хорошо детектируемый отклик сенсоров *SypHer3s* и *HyPer7* в нейронах глубоких слоев среза коры головного мозга мыши с субклеточным разрешением при добавлении соответствующего анализита. Экспериментально продемонстрировано, что ограничение глубины визуализации в фантоме мозга в случае трехфотонной микроскопии вызвано недостатком возбужденных флуоресцентных агентов в фокусе, в отличие от принципиального фонового сигнала вне фокуса в случае двухфотонной микроскопии.

Впервые применена техника двухфотонной микроскопии с ратиометрическим опросом для изучения редокс статуса клеток в ряде моделей патологий. Конкретно, продемонстрирована динамика уровня кислотности среды в нейронах коры головного мозга мыши в процессе фотоиндуцированного инсульта. В случае с печенью показана генерация пероксида водорода в гепатоцитах в результате закола D-аминокислот в

присутствии оксидазы D-аминокислот (DAO), моделируя развитие ферроптоза. Показана пространственно-временная динамика поведения нейтрофилов, параллельно с динамикой концентрации хлорноватистой кислоты, в трансгенных рыбах *Danio rerio* в случае механического повреждения плавника и бактериальной инфекции.

Научная и практическая значимость

В представленной диссертации создан уникальный лазерный комплекс, объединяющий четыре источника фемтосекундных импульсов, для решения задач двух- и трехфотонной спектроскопии флуоресцентных меток и мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии глубоких слоев биологических тканей в широком спектральном диапазоне (650 – 1700 нм).

Предложенный и реализованный комплексный подход к измерению спектральных зависимостей двух- и трехфотонного сечения поглощения флуоресцентных маркеров в общей сложности в спектральном диапазоне 700 – 1700 нм полностью решает задачу определения многофотонных яркостей подавляющего числа существующих флуоресцентных белков и сенсоров. Обладая высокой точностью измерения, предложенные подходы позволяют избегать трудоемких корректировок искомого сигнала, базируются на более доступных лазерных системах, а также обладают потенциалом к полной автоматизации процесса.

Разработанные экспериментальные техники измерения спектров двух- и трехфотонного возбуждения позволяют, с одной стороны, подобрать оптимальные параметры возбуждающего излучения, с другой, количественно сравнить различные флуоресцентные маркеры, предсказывая их перспективность в задачах визуализации в живых животных еще на этапе создания сенсора. Помимо практической значимости, данные спектры несут в себе информацию о распределении локального поля вблизи хромофора и дипольных моментах основного и возбужденного состояний.

Проведенные эксперименты по многофотонной визуализации на таких модельных биологических объектах, как нейрональные культуры и культуры клеток HeLa, демонстрируют высокую чувствительность и большой динамический диапазон ратиометрического отклика изучаемых сенсоров в многофотонном формате. В свою очередь глубокая визуализация нейронов в свежевывнутых срезах мозга мыши апробирует метод двух- и трехфотонной микроскопии в применении к изучению окислительно-восстановительных процессов на уровне отдельных клеток *in-vivo*. Наконец, динамические записи многофотонного ратиометрического сигнала от сенсоров, экспрессирующийся в нейронах коры головного мозга мыши, гепатоцитов печени мыши и нейтрофилах малька рыбы *danio rerio*, дают уникальную информацию о динамиках концентраций основных медиаторов редокс статуса клетки в процессе развития различных патологий.

Методология и методы исследования

Экспериментальные методы исследования включали в себя разработку оптических схем для многофотонной спектроскопии и микроскопии. В частности, использовались нелинейно-оптические преобразования фемтосекундных импульсов в МС световодах для получения зондирующего излучения; измерение и управление длительностями получаемых импульсов; реализация двухцветной попеременной накачки для многофотонной микроскопии с ратиометрическим откликом. К теоретическим и вычислительным методам исследования относилась разработка программного обеспечения для обработки и анализа полученных экспериментальных данных; их сопоставление с известными физическими моделями.

Защищаемые положения

1. Нелинейно-оптическое преобразование фемтосекундных импульсов в коротком отрезке микроструктурированного световода преимущественно за счет фазовой самомодуляции в области нормальной ДГС позволяет сформировать когерентное широкополосное излучение (со средней

мощностью не менее 50 мВт, длительностью не более 100 фс, степенью деполяризации не более 4% и параметром качества пучка M^2 не меньше 1.2), отлично подходящее для проведения спектроскопии и микроскопии двухфотонного возбуждения флуоресцентных маркеров в диапазоне от 650 нм до 1150 нм. Управление спектральной амплитудой и фазой такого излучения позволяет достичь порога детектирования (произведение сечения процесса на квантовый выход и концентрацию молекул) около 1 мкМ x ГМ при спектральном разрешении до 10 нм, а также на порядок повысить сигнал двухфотонной микроскопии.

2. Спектры двухфотонного поглощения флуоресцентных сенсоров окислительно-восстановительных процессов одного семейства (на основе белка YFP) обладают различной формой и амплитудой за счет вариации локального электрического поля возле единого флуорофора. Большой динамический диапазон ратиометрического ответа данного семейства сенсоров, а также высокая эффективность двухфотонного возбуждения флуоресценции, открывают широкие перспективы их нелинейно-оптической визуализации.

3. Использование пары остро сфокусированных фемтосекундных импульсов на центральных длинах волн вблизи максимумов двухфотонного возбуждения окисленной и восстановленной форм сенсоров (SynHer3s и HyPer7) позволяет в процессе ратиометрического опроса визуализировать динамику кислотности и концентрацией перекиси в культурах клеток при интенсивности накачек до 40 ГВт/см² и средней мощностью до 3 мВт. Высокая эффективность двухфотонного возбуждения флуоресценции (до 35 ГМ) и большой динамический диапазон ответа данных сенсоров (194 и 5.6, соответственно) позволяет исследовать в реальном времени окислительно-восстановительные процессы в нейронах мозга анестезированной мыши с субклеточным пространственным разрешением (на глубине до 300 мкм от поверхности, в

области до 500×500 мкм², с временным и пространственным разрешением до 1 с и 1 мкм, соответственно).

4. Остро сфокусированные фемтосекундные импульсы лазера на кристалле хром-форстерит с пониженной частотой повторения позволяют визуализировать методом трехфотонного возбуждения флуоресценции сенсоры кислотности и пероксида водорода SyrHer3s и HyPer7 в культурах клеток, переживающих срезах и мозге анестезированной мыши без видимых повреждений ткани (при достижении интенсивности на клетке до 1.9 ТВт/см² и средней мощности 25 мВт) за счет высокой эффективности трехфотонного возбуждения флуоресценции (около 10^{-81} см⁶с²фотон⁻²). Увеличение локальности многофотонного возбуждения, а также уменьшение рассеяния и деградации пучка накачки позволяет многократно повысить соотношение сигнал/фон при трехфотонной визуализации (на длине волны 1250 нм) данных сенсоров в мозге мыши на глубинах более 200 мкм, по сравнению с двухфотонной микроскопией (на длине волны 790 нм).

Достоверность результатов исследования

Степень достоверности результатов диссертационного исследования определяется высоким современным уровнем использованного научно-технического оборудования, применением экспериментальных методик в соответствии с известными и доказанными научными подходами, повторяемостью процедуры получения экспериментальных данных и анализом полученных зависимостей согласно ранее разработанным и общепризнанным теоретическим моделям. Материалы основных результатов диссертационной работы также прошли этап рецензирования при публикации в международных научных изданиях.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационной работы были представлены в соавторстве с Чеботаревым А.С. либо им лично на российских и международных научных конференциях:

1. А. А. Ланин, **А. С. Чеботарев**, А. Г. Шохина, Д.С. Билан, В. В. Белоусов, А.Б. Федотов, "Нелинейно-оптическая визуализация сенсоров окислительного стресса в живых животных", Сборник тезисов «XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова», с 296-297 (2023)
2. Д. С. Билан, Д. А. Котова, А.Д. Иванова, А. И. Костюк, Р. И. Раевский, И. В. Кельмансон, А. С. Панова, А. Д. Сергеева, Ю. В. Храмова, В. А. Катруха, А. П. Трифонова, М. А. Судоплатов, Д. Д. Рапота, В.В. Чебаненко, М.С. Почечуев, **А.С. Чеботарев**, А.А. Ланин, И.В. Федотов, А.Б. Федотов, В.В. Белоусов, "Генетически кодируемые инструменты для визуализации биохимических процессов в моделях *in vivo*", Сборник тезисов «XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова», с 294-295 (2023)
3. А. А. Ланин, **А. С. Чеботарев**, Г. Н. Мартынов, А. Г. Шохина, Д. С. Билан, В. В. Белоусов, А. Б. Федотов, "Нелинейно-оптическая микроскопия редокс-биосенсоров в живых животных", Сборник научных трудов «Оптогенетика+ 2023» (2023)
4. В. А. Катруха, Ю. В. Храмова, **А. С. Чеботарев**, А. Д. Иванова, Г. Н. Мартынов, А. А. Ланин, А. Б. Федотов, Д. С. Билан, "Регистрация биохимических процессов *in vivo* в коре головного мозга мыши с помощью генетически кодируемых биосенсоров", Сборник научных трудов «Оптогенетика+ 2023» (2023)
5. **A. S. Chebotarev**, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, G. N. Martynov, A. A. Ivanov, D. S. Bilan, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Cell-specific multimodal nonlinear imaging of acidosis and oxidative stress in mouse brain *in vivo*," in *2022 International Conference Laser Optics (ICLO)* (2022), pp. 1–1.
6. А. А. Ланин, **А. С. Чеботарев**, И. В. Кельмансон, М. С. Почечуев, А. А. Иванов, Д. С. Билан, А. Б. Федотов, В. В. Белоусов, А. М. Жёлтиков, "Мультимодальная нелинейно-оптическая визуализация генетически кодируемых белков-маркеров активных форм кислорода и кислотности", Сборник трудов «Нейротехнологии будущего. Нейрокампус 2022: старт» с 50-52 (2022)
7. **А. С. Чеботарев**, А. А. Ланин, М. С. Почечуев, И. В. Кельмансон, В. В. Белоусов, А. Б. Федотов, и А. М. Желтиков, "Мультимодальная безмаркерная визуализация нейронов, астроцитов и глиоваскулярного интерфейса методами нелинейно-оптической микроскопии," в *Сборник Трудов XI Международной Конференции «Фундаментальные Проблемы Оптики–2019»* (2019), с. 383–384.

Материалы исследований по теме диссертационной работы были опубликованы в 13 печатных работах в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, таких как Optics Letters, Journal of Biophotonics, Journal of Physics: Photonics, Journal of Raman Spectroscopy:

1. **Chebotarev A.S.** Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution / Kelmanson I.V., Ivanova A.D., Khramova Y.V., Katrukha V.A., Kotova D.A., Raevskii R.I., Moschenko A.A., Linovsky G.N., Fedotov A.B., Belousov V.V., Bilan D.S., Lanin A.A. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2024. – T. 410. – 135646.
2. **Chebotarev A.S.** Multimodal label-free imaging of murine hepatocellular carcinoma with a subcellular resolution / Ledyeva V.S., Patsap O.I., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Shokhina A.G., Lanin A.A. // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – T. 16. - №. 12. – e202300228.
3. **Chebotarev A.S.** Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging / Pochechuev M.S., Lanin A.A., Kelmanson I.V., Kotova D.A., Fetisova E.S., Panova A.S., Bilan D.S., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // *Journal of Biophotonics*. – 2021. – T. 14. - №. 3. – e202000301.
4. Pochechuev M.S. Multimodal nonlinear-optical imaging of nucleoli / Lanin A.A., Kelmanson I.V., **Chebotarev A.S.**, Fetisova E.S., Bilan D.S., Shevchenko E.K., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M. // *Optics Letters*. – 2021. – T. 46. - №. 15. – C. 3608–3611.
5. Lanin A.A. Single-beam multimodal nonlinear-optical imaging of structurally complex events in cell-cycle dynamics / **Chebotarev A.S.**, Kelmanson I.V., Pochechuev M.S., Fetisova E.S., Bilan D.S., Shevchenko E.K., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // *Journal of Physics: Photonics*. – 2021. – T. 3. - №. 4. – 044001.
6. **Chebotarev A.S.** Single-beam dual-color alternate-pathway two-photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology / Lanin A.A., Raevskii R.I., Kostyuk A.I., Smolyarova D.D., Bilan D.S., Savitskii I.V., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2021. – T. 52. - №. 9. – C. 1552–1560.
7. Lanin A.A. Single-beam optogenetic multimodal $\chi(3)/\chi(5)$ nonlinear microscopy and brain imaging / **Chebotarev A.S.**, Pochechuev M.S., Kelmanson I.V., Kotova D.A., Bilan D.S., Ivanov A.A., Panova A. S., Tarabykin V.S., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2020. – T. 51. - №. 10. – C. 1942-1950.
8. Lanin A.A. Cell-specific three-photon-fluorescence brain imaging: neurons, astrocytes, and gliovascular interfaces / Pochechuev M.S., **Chebotarev A.S.**, Kelmanson I.V., Bilan D.S., Kotova D.A., Tarabykin V.S., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M. // *Optics Letters*. – 2020. – T. 45. - №. 4. – C. 836-839.
9. Lanin A.A. Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging / **Chebotarev A.S.**, Pochechuev M.S., Kelmanson I.V., Kotova D.A., Bilan D.S., Ermakova Y.G.,

Fedotov A.B., Ivanov A.A., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // Journal of Biophotonics. – 2020. – Т. 13. - №. 3. – e201900243.

10. Lanin A.A. Nonlinear-optical stain-free stereoimaging of astrocytes and gliovascular interfaces / Pochechuev M.S., **Chebotarev A.S.**, Kelmanson I.V., Belousov V.V., Zheltikov A.M. // Journal of Biophotonics. – 2019. – Т. 12. - №. 11. – e201800432.

11. Pochechuev M.S. Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation / Lanin A.A., Kelmanson I.V., Bilan D.S., Kotova D.A., **Chebotarev A.S.**, Tarabykin V., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M. // Optics Letters. – 2019. – Т. 44. - №. 12. – С. 3166-3169.

12. Lanin A.A. Three-photon-resonance-enhanced third-harmonic generation for label-free deep-brain imaging: In search of a chemical contrast / **Chebotarev A.S.**, Pochechuev M.S., Kelmanson, Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A. M. // Journal of Raman Spectroscopy. – 2019. – Т. 50. - №. 9. – С. 1296-1302.

13. Lanin A.A. The whither of bacteriophytochrome-based near-infrared fluorescent proteins: Insights from two-photon absorption spectroscopy / **Chebotarev A.S.**, Barykina N.V., Subach F.V., Zheltikov A.M. // Journal of Biophotonics. – 2019. – Т. 12. - №. 5. – e201800353.

Личный вклад автора

Все представленные экспериментальные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии в лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова. В частности, автором были собраны оптические схемы по многофотонной спектроскопии и микроскопии, проведены эксперименты по измерению спектров двух- и трехфотонного возбуждения флуоресцентных белковых сенсоров, а также по *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* микроскопии. Также автором производилась обработка и анализ полученных экспериментальных данных, в том числе при помощи собственноручно написанного программного обеспечения.

Работы по наработке, выделению и очистке препаратов флуоресцентных белков, подготовке трансфицированных эукариотических клеточных культур, а также по проведению хирургических операций на грызунах и мальках осуществлялись сотрудниками отдела метаболизма и редокс биологии института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова под руководством зав. лабораторией метаболических основ

патологии к.б.н. Д.С.Билана и зав. отделом метаболизма и редокс-биологии чл.-корр. РАН В. В. Белоусова.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав и заключения со списком используемых в тексте аббревиатур и сокращений, а также со списком использованной литературы. После каждой главы сформулированы краткие итоги.

Первая глава представляет собой обзор литературы по теме исследований, выполненных при подготовке диссертационной работы. Обсуждаются физические принципы, лежащие в основе нелинейно-оптической микроскопии, преимущества данной техники над линейными аналогами в применении к изучению биологических тканей. Рассматриваются основные флуоресцентные метки, использующиеся для маркирования тканей, а также техники измерения двух- и трехфотонных спектров возбуждения таких маркеров. Особое внимание уделяется сенсорам на основе флуоресцентных белков, в первую очередь изучаемым в представленной диссертации редокс сенсорам. Описываются дополнительные источники контраста в виде сигналов генерации второй и третьей оптических гармоник, позволяющие реализовывать мультимодальный аспекта нелинейно-оптической микроскопии.

Во второй главе представлены разработанные оптические системы для проведения двух- и трехфотонной спектроскопии суммарно в спектральном диапазоне от 650 нм до 1700 нм, валидация данных систем на органических красителях. Для генерации фемтосекундного зондирующего излучения в столь широком диапазоне были сконструированы 3 оптические схемы, основанные на нелинейно-оптических спектральных преобразованиях входных импульсов накачки. Также описаны две экспериментальные схемы, используемые в дальнейшем для проведения нелинейно-оптической микроскопии. В силу ратиометрической природы изучаемых сенсоров,

системы обладают двухцветной накачкой, совмещенной в пространстве и синхронизованной во времени с записью изображений с микроскопа.

Третья глава посвящена исследованию потенциала двух- и трехфотонной визуализации и опроса нового поколения флуоресцентных белковых сенсоров АФК и других медиаторов окислительно-восстановительных процессов. Эксперименты проведены в порядке усложнения моделей: сначала исследуются нелинейно-оптические спектроскопические свойства на растворах белков, затем, в режиме микроскопии, измеряются параметры отклика сенсоров на простейшей модели культур клеток HeLa, и в завершении метод апробируется визуализацией живых тканей на глубинах, недоступных линейным методам. Отдельно исследуется вопрос фундаментальных ограничений глубины визуализации двухфотонной микроскопии и преодоления этого предела.

Четвертая глава посвящена применению созданных и оптимизированных лазерных систем совместно с изученными сенсорами для исследования в реальном времени окислительно-восстановительных процессов в живых животных в процессе развития патологий. В частности, были поставлены эксперименты по детектированию уровня кислотности среды в нейронах коры головного мозга мыши в процессе фотоиндуцированного инсульта. В случае с печенью наблюдалась генерация пероксида водорода в гепатоцитах в результате закола D-аминокислот в присутствии оксидазы D-аминокислот (DAO). Наконец, несколько трансгенных линий рыб *Danio rerio*, обладающие генетически модифицированными нейтрофилами, позволили пронаблюдать в реальном времени отклик иммунной системы в случае механического повреждения и бактериальной инфекции.

Глава 1. Современные инструменты оптогенетики для изучения метаболизма клеток в реальном времени

Одно из основных применений оптической микроскопии со времен создания в 17 веке является изучение биологических образцов [14]. Желание исследовать все более сложные организмы и процессы в них приводит к возникновению новых вызовов в задаче построения микроскопических изображений. Большинство живых тканей по своим оптическим свойствам являются сильно рассеивающими средами. Такие классические методы, как микроскопия светлого поля или широкопольная флуоресцентная микроскопия, зачастую, становятся неприменимы для образцов толщиной более 10 мкм. В настоящее время эталонным методом среди линейно-оптических является лазерная сканирующая конфокальная микроскопия [15], позволяющая работать со срезами толщиной до 50 мкм в случае коры головного мозга. Дальнейшее продвижение по глубине визуализации, необходимое для работы с живыми животными, обеспечивают нелинейно-оптические методы.

1.1 Многофотонная флуоресцентная микроскопия и пути ее оптимизации

1.1.1 Основные принципы, достижения и ограничения двухфотонной микроскопии

Среди всех нелинейно-оптических эффектов, используемых для получения контраста в лазерной сканирующей микроскопии, центральное место в биологических исследованиях занимает двухфотонное поглощение [16]. Два фотона, прибывающих «одновременно» на флуоресцентную молекулу, поглощаясь переводят её в возбужденное состояние, с дальнейшей релаксацией в основное состояние и испусканием фотона флуоресценции. Нелинейная природа эффекта, проявляемая в квадратичной зависимости вероятности поглощения, а как следствие итогового сигнала высвечивания, от пиковой интенсивности импульсов накачки, естественным образом приводит в сфокусированных пучках к, так

называемому, оптическому секционированию – локализации сигнала в небольшой области фокуса (рис.1.a,b,d). Таким образом, в глубине однородно покрашенного образца, происходит автоматическое сильное подавление фонового сигнала, генерируемого вне фокуса, что схоже с функцией пинхола в конфокальной микроскопии. Ключевым же отличием является то, что в двухфотонной реализации происходит детектирование не только баллистических фотонов флуоресценции, но и фотонов, испытавших множественное рассеяние. Дополнительно, проникающая способность обуславливается использованием фемтосекундного излучения из инфракрасного диапазона 700-1400 нм, соответствующего большим длинам рассеяния по сравнению с видимым (рис.1.e) [17]. Также к преимуществам двухфотонной микроскопии часто относят меньшую фототоксичность, что связано как с локализацией двухфотонного поглощения, так и с меньшим количеством эндогенных поглотителей в инфракрасном диапазоне [18].

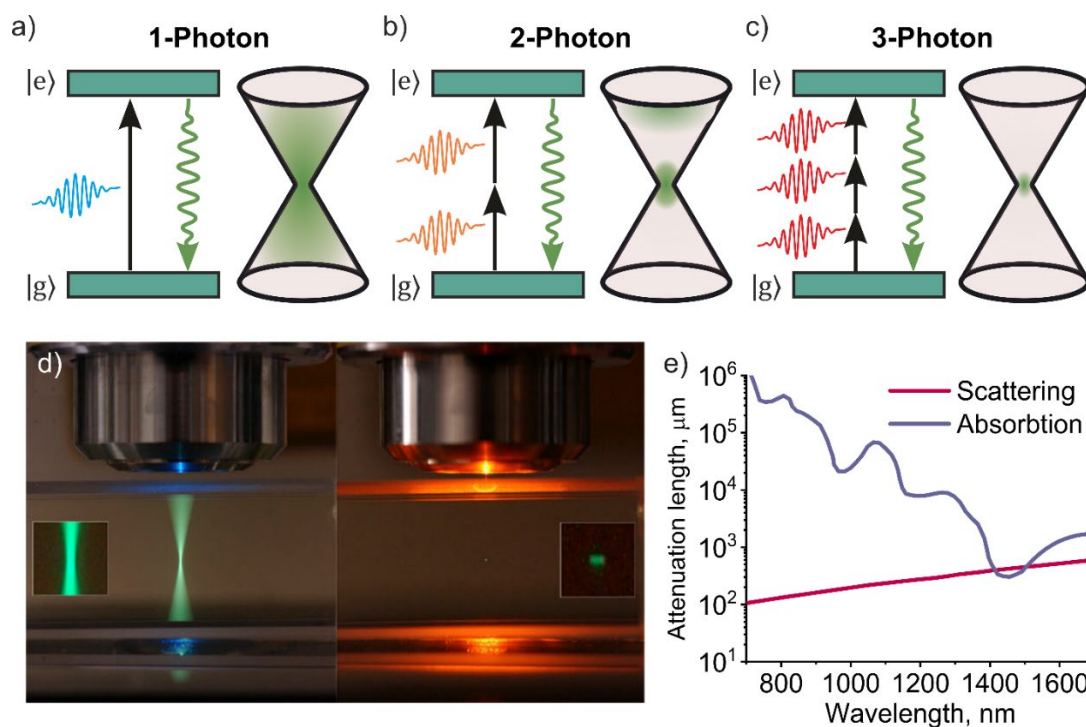


Рис.1 (a-c) Энергетические диаграммы и распределение флуоресценции в сфокусированном лазерном пучке в случае (a) одно- (b) двух- и (c) трехфотонного возбуждения. (d) Фотография флуоресценции в кювете с красителем, демонстрирующая отличие в локализации сигнала при одно- (слева) и двухфотонном (справа) возбуждении. (e) Зависимость длины рассеяния (красная линия) и поглощения (синяя линия) от длины волны излучения, моделирующая кору головного мозга мыши [19].

С момента первой демонстрации возможности построения изображений методом двухфотонной микроскопии в 1990 году (рис.2.a) [1], началось бурное развитие этой области. С использованием в качестве зондирующего излучения фемтосекундных импульсов лазерного генератора на кристалле Ti:Sapphire были проведены in-vivo эксперименты по визуализации коры головного мозга крысы на глубинах до 600 мкм [20,21]. Так, двухфотонная микроскопия подкрашенных флуоресцеином кровеносных сосудов позволила измерить флуктуации скорости кровеносного потока в отдельных капиллярах в 2-4 слоях коры [45]. Объединение методов электрофизиологии с ДФП-микроскопией пролило свет на локализацию потоков ионов кальция вблизи сомы пирамидальных нейронов, меченных чувствительным к Ca^{2+} флуорофором, при распространении нервных импульсов (рис.2.b) [21].

Дальнейшие стратегии увеличения глубины визуализации заключались в уменьшении частоты повторения импульсов накачки с одновременным увеличением энергии в импульсе, либо смещении длины волны возбуждения дальше в инфракрасную зону [22–24]. В одной из наиболее значимых работ, демонстрирующих первый подход, использовался регенеративный усилитель импульсов Ti:S-лазера до энергий ~ 200 нДж с частой повторения 200 кГц и центральной длиной волны 925 нм [22]. Это позволяло существенно увеличить эффективность двухфотонного возбуждения флуоресцентных меток, сохраняя при этом допустимый уровень средней мощности на поверхности ткани. В результате, впервые были визуализированы, как прокрашенные кровеносные сосуды, так и меченые флуоресцентными белками нейроны на глубинах до 1 мм. Однако, сложность и дороговизна такого источника, а также ограничение в частоте съемки и необходимость синхронизовать запись с моментом прихода импульса, ограничивают доступность метода. В качестве примера второго подхода было использовано излучение параметрического генератора света (ПГС) на центральной длине волны 1280 нм, накачиваемого Ti:S-лазером с частотой повторения 82 МГц. Хотя выбор такой длины волны действительно позволил пронаблюдать помеченные красной краской сосуды на глубинах

сначала 1 мм [23], а затем и 1.6 мм (рис.2.с) [24], существенной проблемой является необходимость использования относительно тусклых и редких красных флуоресцентных белков в задачах, требующих таргетной прокраски. Тем не менее обе стратегии привели к достижению важного результата – возможность микроскопии мозга мыши вплоть до 1 мм глубины, что означает визуализацию всей коры.

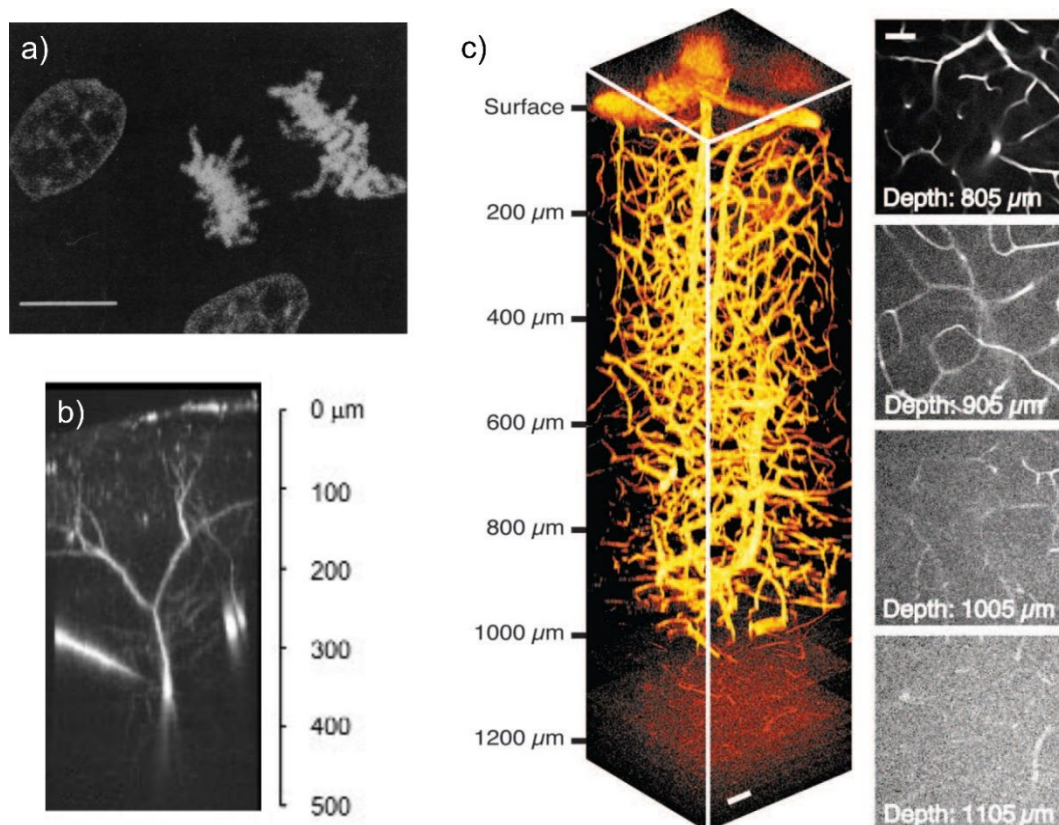


Рис.2 (а) Первое изображение клеток, полученное методом ДФП-микроскопии [1]. (b) ДФП-микроскопия нейронов 2-3 слоя коры мозга крысы, совмещенная с измерением потенциалов действия методами электрофизиологии [21]. (с) Трехмерная реконструкция прокрашенных кровеносных сосудов во всей коре мозга живой мыши, полученная при двухфотонной микроскопии на 1280 нм. Справа представлены изображения на разных глубинах [24].

Несмотря на все преимущества двухфотонной микроскопии, на практике наблюдается фундаментальный предел глубины визуализации ДФП-микроскопии для конкретных тканей и длин волн возбуждения. Интуитивное представление этого факта заключается в следующем: по мере распространения сфокусированного пучка в глубь рассеивающей ткани интенсивность излучения растет \sim квадратично с приближением к перетяжке

пучка (и, следовательно, эффективность двухфотонного поглощения увеличивается $\sim z^4$), в то время как падение интенсивности, связанное с рассеянием, экспоненциально. Таким образом, начиная с некоторой глубины, сигнал флуоресценции, генерируемый вне фокуса, превысит полезный сигнал из области перетяжки. Предложенная в работе Theer and Denk (2006) [25] теоретическая модель детально описывает такое поведение, показывая зависимость предельной глубины визуализации от таких факторов, как длительность импульсов накачки, эффективная числовая апертура сходящегося пучка, однородность прокраски образца и, конечно, длины рассеяния. Максимальный фоновый сигнал генерируется вблизи поверхности образца, приблизительно на 1 длине рассеяния. Рассчитанный теоретический предел глубины визуализации в случае сильно не гомогенной прокраски составил 7 длин рассеяния, однако в более реалистичном сценарии оценки и эксперименты сходятся на фундаментальном ограничении в 5-6 длин рассеяния [25–27]. Для коры головного мозга мыши значения длин рассеяния составляют 152-158 мкм и 305-319 мкм для 920 и 1300 нм, соответственно [28].

1.1.2 Флуоресцентная микроскопия при трехфотонном возбуждении как развитие метода многофотонной визуализации

С имеющимися ограничениями, ДФП-микроскопия все ещё на порядок превосходит возможности конфокальной микроскопии, делая этот метод лидером в задаче функциональной визуализации вот уже на протяжении 30 лет. Логичным направлением развития многофотонной микроскопии видится переход к нелинейным процессам более высоких порядков, а именно к эффекту трехфотонного поглощения (рис.1.с). Действительно, более сильная нелинейность должна обеспечить лучшую локализацию сигнала и подавления общего фона, а естественный переход в ещё более инфракрасную зону возбуждения увеличивает длину рассеяния (рис.1.е). Показанная принципиальная возможность трехфотонной микроскопии ещё в середине 1990х годов [29,30], так и осталась концепцией до начала 2010х, что связано с недостаточным развитием доступных лазерных источников фемтосекундных

импульсов с достаточной энергией в спектральном диапазоне >1000 нм. Однако, начиная с 2013 года, когда с помощью ТФП-микроскопии на длине волны 1700 нм были впервые *in-vivo* визуализированы нейроны, лежащие за корой головного мозга мыши (рис.3.а) [31], данный метод начал быстро набирать популярность. За 10 лет, благодаря трехфотонной микроскопии, были получены впечатляющие результаты – наблюдение активности нейронов гиппокампа в живой мыши [32], демонстрация микроскопии сквозь череп бодрствующей мыши [33], визуализация активности нейронов зрительной коры мыши при демонстрации ей дрейфующей решетки [6] и другие.

Проведенные исследования выявили основные паттерны для построения эффективной и слабо инвазивной ТФП-микроскопии. Во-первых, золотым стандартом длин волн возбуждения являются окрестности 1300 нм и 1700 нм, что приближенно считается зонами трехфотонного поглощения самых популярных зеленых [34] и красных [35] флуоресцентных белков и сенсоров. При этом спектральной диапазон 1350-1600 нм соответствует пику поглощения воды (рис.1.е), что делает его недоступным для использования при работе с биологическими тканями. Вторым аспектом является очевидный вопрос инвазивности метода, ведь для генерации схожего с двухфотонно возбужденным сигналом требуется в 5-10 раз больше интенсивности в фокусе [36]. С увеличением глубины фокусировки доминирование риска фотоповреждения за счет ионизации сменяется на тепловые повреждения [37]. Основной стратегией получения значительного сигнала флуоресценции при сохранении допустимого уровня средней мощности на поверхности образца является уменьшение частоты повторения импульсов до ~ 1 МГц с одновременным увеличением энергии в импульсе до $\sim 1-10$ нДж, в зависимости от глубины визуализации (рис.3.б). При этом, за счет гораздо большей проникающей способности «красных» фотонов, начиная с некоторой глубины, сигнал, генерируемый в процессе трехфотонного поглощения, сравнивается с сигналом от двухфотонного поглощения при одинаковых значениях средней мощности, частоты повторения и длительности импульсов

на поверхности (рис.3.с) [38]. Наконец, замечательным отличием ТФП-микроскопии от ДФП-микроскопии мозга является практически полное отсутствие фонового сигнала, связанного с генерацией флуоресценции вне фокуса, во всех практически значимых случаях (рис.3.d). Таким образом, соотношение сигнал-фон уже не является ключевым фактором, ограничивающим глубину визуализации, и на первый план выходит ограничение в нагреве ткани и доступность оптимальных лазерных источников.

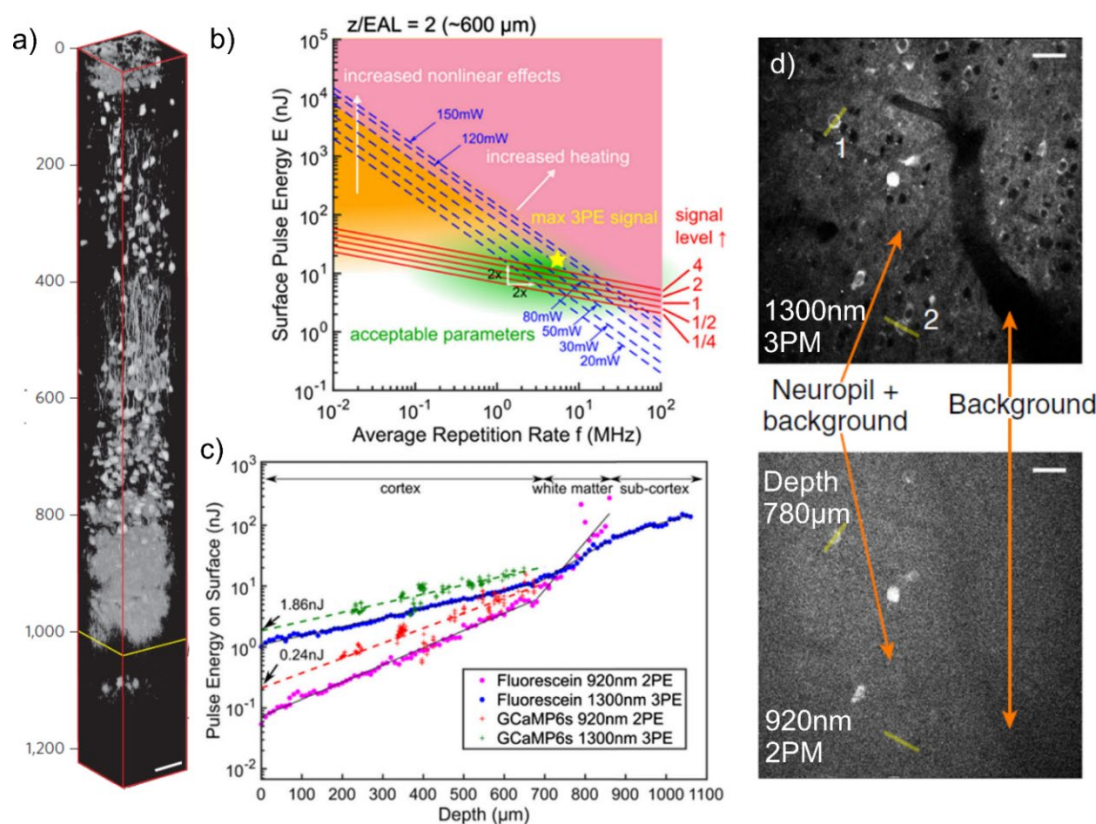


Рис.3 (а) Трехмерная реконструкция нейронов в коре головного мозга мыши в том числе за белым веществом, полученное методом ТФП-микроскопии [31]. (b) Пространство параметров для оптимизации ТФП-микроскопии для глубины ~600 мкм, представленное энергией импульса на поверхности ткани и частотой повторения импульсов. Зеленая область соответствует оптимальным параметрам [37]. (c) Экспериментальные данные зависимостей необходимых энергий в импульсе от глубины для генерирования одинакового сигнала флуоресценции для ДФП (розовые и красные точки) и ТФП-микроскопии (синие и зеленые точки) [38]. (d) Примеры изображений нейронов, экспрессирующих сенсор GCaMP6s, на глубине 780 мкм, полученные при трехфотонном возбуждении на 1300 нм (сверху) и двухфотонном возбуждении на 920 нм (внизу) [38].

1.2 Методы оптогенетики для функциональной визуализации и стимуляции живых тканей

1.2.1 Флуоресцентные маркеры для многофотонной микроскопии биохимических процессов

Изучая предельные возможности и области применения многофотонной микроскопии, нельзя обойти стороной вторую, помимо лазерных источников, основную составляющую данного метода – флуоресцентные агенты. Большой спектр задач, решаемых с помощью флуоресцентной микроскопии, связан с развитием методов специфичного маркирования тканей флуоресцентными метками. К ним относятся квантовые точки [39,40], органические красители [41,42], генетически кодируемые флуоресцентные белки (ГКФБ) [43,44] и эндогенные флуорофоры [30]. В представленном списке доминирующее положение занимают ГКФБ, т.к. существуют методы, позволяющие встроить кодирующий их ген специфично в определенные типы клеток и даже их отдельные компартменты [5,45]. История ГКФБ началась с выделения зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) из медузы *Aequorea victoria* в 1962 г. [46], однако широкое распространение в молекулярной биологии ЗФБ получил после работ по клонированию его ДНК [47] и экспрессированию белка в бактериях [45] в 1990-х годах. Такие результаты, как, например, создание полностью трансгенных свиней для изучения возможности донорства органов, известны далеко за пределами научного сообщества. В 2008 году была присуждена нобелевская премия по химии «за открытие и разработку зелёного флуоресцентного белка» [48].

В настоящее время, наиболее комплексные исследования построены на применение сенсоров на основе ГКФБ (ГКФС), детектирующих динамику концентраций различных аналитов. В зависимости от принципа действия они могут быть отдельными ГКФБ, флуоресцентными белками с присоединенным сенсорным доменом, двумя связанными белками с возможностью Фёрстеровского переноса энергии и другие [49]. Далее в диссертации будут исследованы в многофотонном контексте сенсоры, относящиеся ко второму

типу. Важнейшей реализацией таких белков являются, так называемых, круговые пермутанты флуоресцентных белков (cpFP) [50], для которых формируются новые N- и C- концы на поверхности β -бочонка вблизи хромофора и к ним присоединяется чувствительный домен. Таким образом увеличивается конформационная подвижность ГКФБ, а именно при связывании аналита сенсорным доменом конформационные изменения транслируются в область хромофора, меняя его оптические свойства (рис.4.а) [51].

Наиболее распространёнными ГКФС являются различные вариации сенсора GCaMP [52] на базе ЗФБ для детектирования ионов кальция (Ca^{2+}), играющего ключевую роль в сигналинге клетки [53,54]. Практически все современные достижения многофотонной функциональной микроскопии мозга продемонстрированы в виде наблюдения кальциевой активности нейронов [55]. В представленной работе фокус смещен на значительно менее изученную сферу функциональной визуализации, а именно исследование окислительно-восстановительных процессов в клетках в различных патологиях с помощью редокс сенсоров семейства пермутированных белков на основе желтого флуоресцентного белка (cpYFP) [56–58]. Важной особенностью данного семейства сенсоров является их ратиометрическая природа, то есть возможность белка находиться в двух состояниях («окисленном» и «восстановленном») с заметным сечением возбуждения, что проявляется в виде двух пиков в спектре возбуждения. Изменение соотношения этих пиков в суммарном спектре в зависимости от концентрации аналита позволяет реализовать количественные измерения. В роли целевых аналитов выступают различные активные формы кислорода (АФК) и другие маркеры окислительных процессов, такие как пероксид водорода (H_2O_2) [59], хлорноватистая кислота (HOCl) [58], никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+ и NADH) [60], водородный показатель (pH) [57] и другие. В настоящее время сложилось общее понимание о колоссальной роли данного класса метаболических медиаторов в совершенно разных биохимических процессах,

протекающих в организме (рис.4.b) [61]. Однако, конкретные механизмы и сценарии остаются слабо изученными, в силу сложности экспериментальной реализации наблюдений на живых животных.

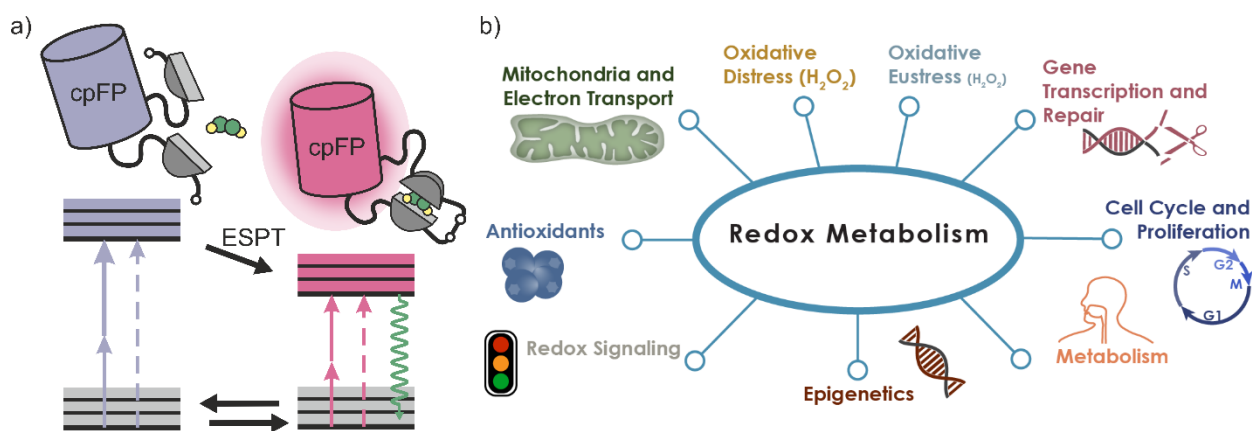


Рис.4 (а) Концептуальная схема работы флуоресцентных белковых сенсоров на основе круговых пермутантов. Основание в виде ФБ с присоединенным сенсорным доменом в двух состояниях изображены сверху. Внизу продемонстрированы энергетические диаграммы двух состояний для семейства изучаемых в представленной работе сенсоров на базе cpYFP. (б) Примеры биохимических процессов, в протекании которых важную роль играют АФК.

1.2.2 Двух- и трехфотонная спектроскопия органических красителей и флуоресцентных белков

Для оценки потенциала каждого отдельного флуоресцентного маркера и оптимизации многофотонной микроскопии необходимо обладать информацией об их «яркости». В контексте двухфотонного возбуждения под яркостью метки понимают произведение сечения двухфотонного поглощения (σ_2) на квантовый выход флуоресценции (ϕ). Полноценной характеристикой является как спектральная зависимость сечения от длины волны возбуждения, так и абсолютные значения σ_2 , измеряемые в Гепперт-Майерах ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ см}^4 \cdot \text{с}$) [16]. При этом, в силу квантово-механических различий процесса одно- и двухфотонного поглощения, оба фактора могут сильно отличаться от предсказаний на основе однофотонного спектра.

Существенные изменения в спектре двухфотонного поглощения по сравнению с однофотонным могут быть объяснены правилами отбора для симметричных молекул, как это наблюдается, например, для органического

красителя Rhodamine B [62]. Однако, в случае флуоресцентных белков, симметрия хромофора оказывается нарушена, что нивелирует правила отбора [63]. Далее, рассматривая переход из основного состояния (S_0) в первое возбужденное электронное состояние (S_1), возможны два наиболее распространенных сценария. Для хромофоров, находящихся в депротонированной (анионной) форме характерен сдвиг пика поглощения в синюю сторону спектра, в то время как белки с протонированным (нейтральным) хромофором имеют спектр, схожий с удвоенным однофотонным. Более детально, показано, что в первом случае доминирует электронно-колебательный переход 0-1, в отличие от чистого электронного перехода 0-0 в однофотонном случае (рис.5.a) [64]. Помимо специфического поведения пика, относящегося к переходу S_0 - S_1 , любопытным является наблюдаемое резонансное усиление двухфотонных переходов S_0 - S_n , где S_n соответствует высшим электронным состояниям (рис.5.a) [63].

Особенности в пиковых значениях сечений двухфотонного поглощения наиболее наглядно проявляются при рассмотрении семейства флуоресцентных белков, обладающих одним и тем же хромофором, как, например, исследуемые в этой диссертации сенсоры на основе srYFP или красные «фруктовые» белки [65]. Наблюдаются большие вариации в пиковых значениях двухфотонного сечения в отличие от линейного коэффициента молярной экстинкции (ϵ) среди белков данных семейств. Например, для «фруктовой» серии ϵ изменяется в диапазоне $\sim 60 \cdot 10^3 - 90 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в то время, как σ_2 лежит в диапазоне 20-140 ГМ для тех же белков (рис.5.b,c). Поскольку вероятность двухфотонного перехода пропорциональна не только дипольному моменту перехода μ_{10} , но и разности постоянных дипольных моментов основного и возбужденного состояний $\Delta\mu_{10}$, сечение двухфотонного поглощения чувствительно к локальному полю, окружающего хромофор [66]. В отличие от органических красителей, растворенных в буфере, хромофор флуоресцентного белка расположен в сложном упорядоченном окружении ближайших аминокислот и часто зафиксирован внутри β -бочонка. Таким

образом, точечные замены некоторых аминокислот могут оказывать значительное влияние на двухфотонную яркость белка. В результате, предсказания двухфотонных свойств новых белков на основании однофотонных спектров, в общем случае, является некорректным, что приводит к задаче измерения спектральных зависимостей сечений двухфотонного возбуждения в абсолютных значениях.

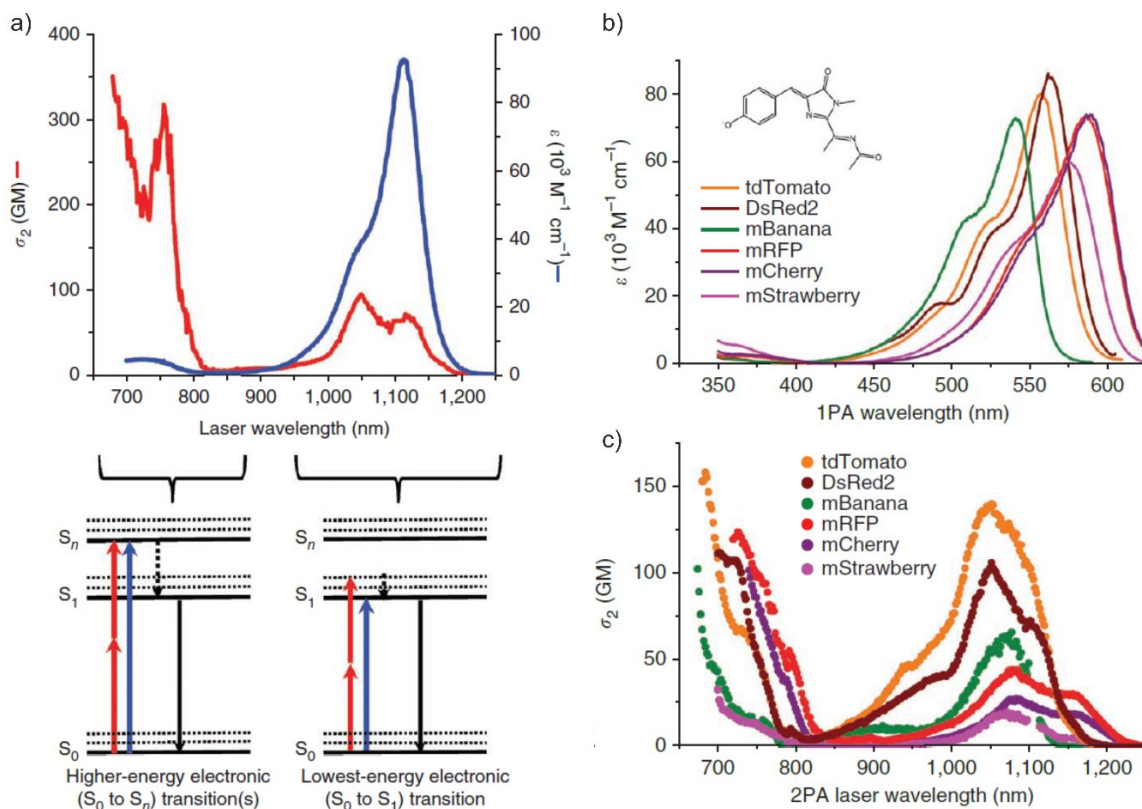


Рис.5 (а) Основные особенности спектра двухфотонного возбуждения флуоресцентного белка в сравнении с однофотонным на примере белка TagRFP (сверху) и диаграммы Яблонского, соответствующих переходов [11]. (b,c) Спектры (b) одно- и (c) двухфотонного возбуждения белков «фруктовой» серии с одним и тем же хромофором, как демонстрация нетривиальности формы спектра и относительных яркостей в двухфотонном случае [65].

Экспериментальная реализация двухфотонной спектроскопии флуоресцентных агентов можно разделить на два основных направления – основанные на детектирование флуоресцентного сигнала при двухфотонном возбуждении образца фемтосекундными импульсами [9,67] или же на нелинейном пропускании образца с использованием высокоэнергичного непрерывного или импульсного лазерного источника [68,69]. И, хотя, первый подход технически сложнее в реализации, он является предпочтительным, т.к.

позволяет избежать критические артефакты измерения, связанные, например, с эффектами тепловой линзы, насыщения, вынужденного рассеяния и т.д. [68]. С другой стороны, требуются как фемтосекундные источники, перестраиваемые в широком спектральном диапазоне, так и точные измерения пространственных и временных характеристик излучения на каждой длине волны возбуждения. В результате для прямого измерения абсолютного значения сечения двухфотонного поглощения требуются такие параметры, как пространственное распределение излучения, степень когерентности второго порядка $g^{(2)}$, спектральная чувствительность системы детектирования, квантовый выход и концентрация флуоресцентного образца [62]. Неизбежные экспериментальные ошибки измерения всех параметров привели к колоссальному разбросу в значениях σ_2 , приводящихся в литературе для одинаковых образцов. Так, для одного из наиболее распространённого зеленого флуоресцентного белка EGFP приводятся значения яркости 1.5 ГМ [69], 20 ГМ [70], 30 [11], 40 ГМ [71], 60 ГМ [72] и 180 ГМ [73].

Начиная с пионерских работ по двухфотонной спектроскопии органических красителей в 1996 г. [62], в большинстве публикаций изучают спектральный диапазон ~ 700 - 1000 нм, доступный для перестройки Ti:S-лазера. Данный диапазон покрывает типичную область возбуждения наиболее распространенных зеленых флуоресцентных белков, но не решает задачу спектроскопии полностью, так как оставляет без внимания перспективные красные [74] и инфракрасные [75] ФБ. Одна из наиболее заметных работ по решению данной задачи была осуществлена *N.S. Makarov, M. Drobizhev и A. Rebane* в 2008 г. [9]. Лазерная система (рис.6) представляла из себя достаточно сложную и дорогостоящую конфигурацию, состоящую из фемтосекундного генератора на кристалле Ti:S, регенеративного усилителя и параметрического усилителя. В результате, сигнальная волна (1100-1600 нм), вторая гармоника от сигнальной (550-790 нм) и холостой (790-1100 нм) волн в сумме покрывали спектральный диапазон 550-1600 нм. Полученные спектры для 15 органических красителей послужили опорными данными для измерения 48

флуоресцентных белков от синего (EBFP) до инфракрасного (eqFP670) [11], что в настоящее время все ещё является наиболее широкой базой данных по двухфотонным свойствам ФБ. Интересно, что в 2016 г. эта же группа ученых опубликовала работу с более точными измерениями органических красителей, но уже в диапазоне 680-1050 нм [10], которые будут использованы в этой работе в качестве опорных данных.

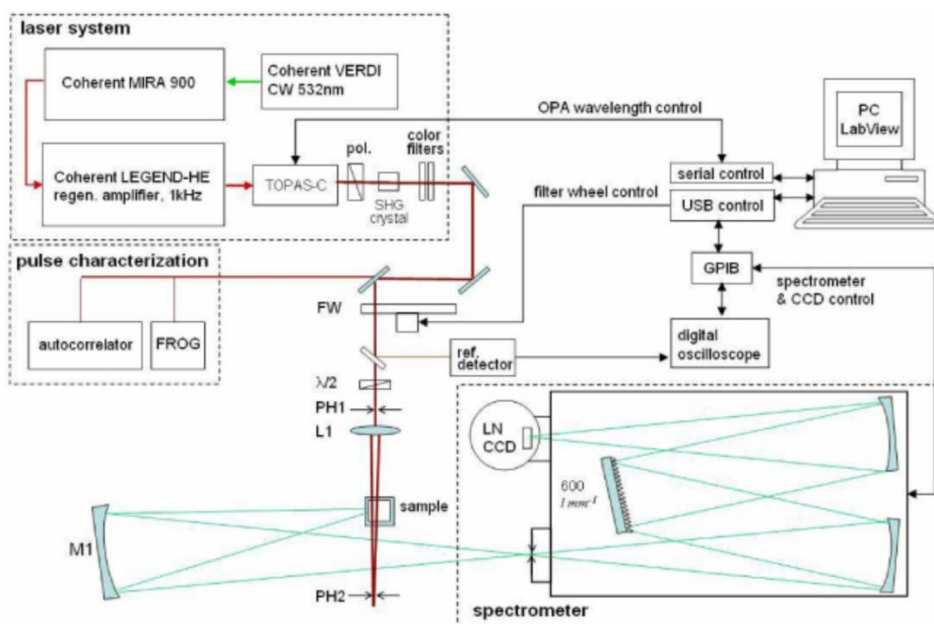


Рис.6 Схема экспериментальной установки для двухфотонной спектроскопии органических красителей и флуоресцентных белков в спектральном диапазоне 550-1600 нм [9].

К сожалению, в то время как системы для двухфотонной визуализации биологических образцов становятся коммерчески доступны, техника двухфотонной спектроскопии ФБ остается прерогативой небольшого количества физических лабораторий. В результате, постоянно пополняющийся список флуоресцентных белков и сенсоров на их основе остается неизученным, что приводит к плохой оптимизации экспериментов. В предложенной диссертации, в частности, предлагается оригинальный подход к измерению спектров двухфотонного возбуждения с возможностью автоматизации, при этом упрощающий и удешевляющий экспериментальную реализацию по сравнению с аналогами.

1.3 Мультимодальность нелинейно-оптических подходов в исследовании биологических объектов

Явление генерации гармоник представляется, пожалуй, наиболее известным эффектом нелинейной оптики. Открытый на заре лазерной эпохи [76] когерентный процесс превращения двух фотонов накачки в один фотон излучения с энергией в два раз больше быстро нашел применение в задачах микроскопии органических и неорганических образований. В дальнейшем данное явление было обобщено на преобразование N фотонов. При этом в зависимости от четности N на процесс генерации могут накладываться ограничения: в средах, обладающих центром инверсии, четные нелинейные восприимчивости обращаются в ноль. В силу уменьшения значений восприимчивостей с ростом порядка нелинейности и ограничение на используемые мощности при работе с живыми тканями, в биофотонике применяют процессы генерации второй и третьей гармоники.

Одним из основных преимуществ микроскопии генерации гармоник по сравнению с многофотонной флуоресцентной микроскопией является использование в качестве контраста эндогенной структуры образца, без необходимости предварительной подготовки оно. Такие методики часто называют безмаркерными. Другой важнейшей особенностью является чувствительность к оптическим неоднородностям при одновременном отсутствии сигнала из толщи, что позволяет детально визуализировать морфологию наблюдаемых объектов. Помимо этого, процесс генерации гармоники, в отличие от флуоресценции, происходит без возбуждения реальных энергетических уровней молекул. Соответственно, метод свободен от таких отрицательных факторов, как нагрев и фотообесцвечивание [77].

Хотя классическими объектами для генерации второй гармоники (ГВГ) являются кристаллы, биологические ткани могут содержать крупные упорядоченные структуры без центра инверсии, которые способны стать источником сигнала на удвоенной частоте. Действительно, хорошо известно, что коллаген, представляющий основу соединительной ткани, может служить

источником сигнала второй гармоники [78,79]. В то время, как существует приблизительно 20 изоформ коллагена, коллаген 1 типа является наиболее распространенной формой белка и даже наиболее распространенным белком в организме в принципе. Благодаря такой распространенности, удается провести нелинейную ГВГ микроскопию большого числа объектов (рис.7): сухожилий [80], кожи [81], роговицы [82], кровеносных сосудов [83], а также ряда внутренних органов, таких как легкие [84], печень [85] и почки [86]. Ряд патологий, например несовершенный остеогенез (болезнь «хрустального человека») и склеродермия, сопровождаются нарушением структуры коллагеновых волокон и могут быть обнаружены с помощью ГВГ [87]. Похожие исследования раковой опухоли яичника показали возможность раннего обнаружения [88].

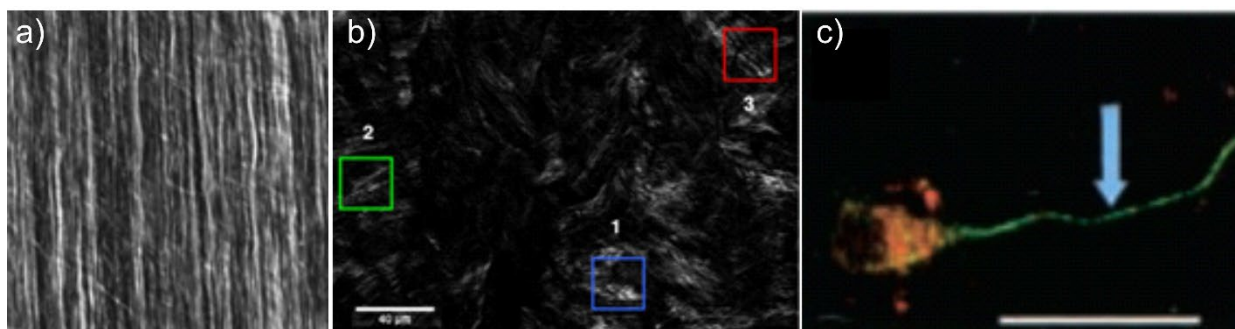


Рис.7 Типичные изображения микроскопии второй гармоники от (a) сухожилий [80], (b) роговицы [82] и упорядоченных микротрубочек в аксоне нейрона [89] (масштабная линейка 20 мкм).

Другим интересным источником нелинейного сигнала на удвоенной частоте являются микротрубочки, образованные белками альфа и бета тубулином. Полярность их структуры обеспечивает ненулевую квадратичную восприимчивость [89]. И хотя поперечный размер составляет около 25 нм, а нелинейность, по-видимому, весьма мала, в местах их скопления возможна генерация достаточного сигнала для микроскопии. Так, в экспериментах наблюдался ГВГ сигнал от аксонов и апикальных дендритов нейронов, которые, в частности, состоят из поляризованных пучков микротрубочек [89,90].

Помимо непосредственного измерения сигнала ГВГ из толщи биологической ткани существуют ряд интересных методик, несущих новую информацию. К таким методам относятся измерение параметра анизотропии, несущий информацию об упорядоченности структуры [91], запись голограмм сигнала ГВГ, дающий контраст по интенсивности и фазе [92], и измерение мембранного потенциала клеток [93].

В отличие от ГВГ, процесс генерации третьей гармоники (ГТГ) не нуждается в определенной симметрии среды, что значительно расширяет круг объектов, доступных для микроскопии. Хотя излучение на утроенной частоте может быть сгенерировано как комбинаций ГВГ и генерации суммарной частоты, происходящие на квадратичной нелинейности, в биологических тканях преобладает процесс прямой ГТГ на кубической восприимчивости среды [94]. В силу большей нелинейности процесса, сигнал лучше локализуется в перетяжке зондирующего излучения.

Одной из ключевых особенностей ГТГ является тот факт, что в сфокусированных пучках генерация сигнала возможна только в областях неоднородности показателя преломления, кубической восприимчивости или коэффициента поглощения [95]. Таким образом, происходит локализация сигнала на различных интерфейсах. В биологических тканях такими интерфейсами могут служить, например, граница между водным окружением и липидными структурами, такими как мембрана клеток, визикулы [96,97] и липидные тела [8,98], а также некоторые неорганические структуры: кости и зубная эмаль [99,100]. Также сигнал третьей гармоники может детектироваться от белковых образований, таких как коллагеновые и мышечные волокна [96,101].

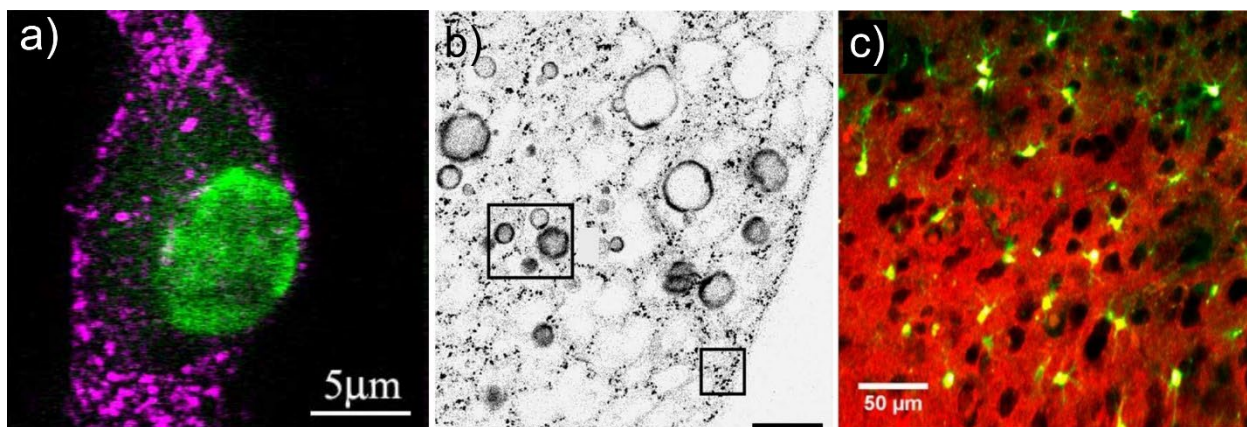


Рис.8 Микроскопия третьей оптической гармоникой (а) нейрона в культуре клеток (фиолетовый цвет) [100], (b) внутренняя поля структура легкого, записанная на глубине 50 мкм от поверхности (масштабная линейка 50 мкм) [102]. (c) Комбинированное изображение на основе микроскопии ГТГ (красные области: липиды в межклеточном пространстве) и ДФП (зеленые: тела клеток) среза ткани мозга мыши [103].

Сигнал третьей гармоники естественным образом зависит от величины нелинейной восприимчивости, которая в свою очередь состоит из нерезонансного и резонансного вклада [104]. Резонансный вклад, очевидно, имеет ярко выраженную спектральную зависимость, максимум которого наблюдается при попадании энергии одного, двух или трех фотонов в линию поглощения изучаемого образца. Таким образом, возможно резонансное усиление ГТГ при правильном выборе длины волны, что позволит существенно улучшить контраст изображений, а также дает возможность реализации химически селективной ГТГ микроскопии. В результате генерация третьей гармоники успешно применяется, как спектральный метод изучения твердых тел [105–107] и тонких пленок [108,109] и демонстрирует чувствительность к молекулярному строению и взаимодействию между растворителем и растворенным веществом [110,111]. Помимо этого, есть ряд работ, показывающие резонансное усиление ГТГ от меланина и гемоглобина [99,112–114].

Глава 2. Разработанные системы нелинейной спектроскопии и микроскопии

Качество получаемых данных при глубокой многофотонной флуоресцентной микроскопии биологических тканей на прямую зависит от физических параметров возбуждающего лазерного излучения и нелинейно-оптических характеристик флуоресцентных маркеров. Данная глава будет посвящена описанию созданных оптических платформ и методик измерений, как для задачи нелинейно-оптической спектроскопии, так и визуализации флуоресцентных белков-индикаторов.

Спектральные измерения позволяют судить о перспективности в приложении к микроскопии каждого отдельно образца, подбирать оптимальные условия возбуждения, а также несут в себе информацию об электростатических свойствах хромофора в конкретном окружении. Получаемые многофотонные спектры, за частую, обладают существенными отличиями в относительной яркости и форме от спектров возбуждения в однофотонном случае, что делает эти измерения незаменимым шагом на пути к оптимизации многофотонной визуализации.

Переходя к задаче микроскопии, важно учитывать ратиометрическую природу изучаемых сенсоров. В данной главе будут предложены и охарактеризованы две лазерные системы с двухцветной накачкой и синхронизацией со сканирующей системой. Параметры излучения аккуратно оптимизируются для ратиометрического опроса клеточных культур и биоптата. В дополнении к этому, оптическая платформа расширяется с помощью других лазерных источников для реализации мультимодального аспекта нелинейно-оптической микроскопии.

2.1 Теоретические основы спектроскопии двух- и трех-фотонного возбуждения флуоресцирующих молекул

Конечной целью спектроскопических измерений является нахождение зависимости яркости флуоресценции изучаемого образца от длины волны

возбуждения при поглощении n фотонов. Под яркостью понимают произведение $\varphi\sigma_n$, где φ – квантовый выход флуоресценции, а σ_n – сечение n -фотонного поглощения. Таким образом, необходимо понять от каких параметров накачки и образца зависит итоговый детектируемый сигнал флуоресценции S_n . Дальнейшие формулы могут быть применены, как для построения методов многофотонной спектроскопии растворов флуоресцентных образцов, так и для отправной точки в задаче оптимизации построения изображений в рассеивающих тканях. В общем случае, величина S_n достаточно интуитивно определяется соотношением [115]:

$$S_n \equiv \left\langle F_n(t) \right\rangle = \left\langle \frac{1}{n} \cdot \eta\varphi \cdot N_{abs}(t) \right\rangle, \quad (1)$$

где F_n – количество фотонов флуоресценции, собранное за единицу времени, n – степень «фотонности» процесса, η – эффективность сбора сигнала, φ – квантовый выход флуоресценции, N_{abs} – число фотонов, поглощённых в единицу времени и определяемое соотношением:

$$N_{abs}(t) = \int_V C(\vec{r}, t) \cdot \sigma_n \cdot I^n(\vec{r}, t) dV, \quad (2)$$

где C – концентрация флуоресцентного образца, σ_n – сечение n -фотонного поглощения, I – интенсивность падающего излучения, V – объем, занимаемый образцом. Усреднение ведется по времени.

Уже на этом этапе становится понятно, что прямое измерение яркости $\varphi\sigma_n$ является крайне затруднительной задачей, так как требует аккуратной характеристики временных и пространственных распределений интенсивности накачки перестраиваемого источника, также как и спектральной чувствительности схемы детекции. Различные упрощения могут быть получены в приближениях плоского волнового фронта или же сфокусированного Гауссова пучка, а также рассматривая тонкий или же бесконечный образец. Рассмотрим случай сфокусированного Гауссова пучка в бесконечной однородно покрашенной среде ($C(\mathbf{r}, t) = \text{const}$), так как такая

конфигурация неплохо соответствует описанным ниже спектроскопическим экспериментам и служит моделью для глубокой микроскопии. Опуская выкладки, мы приходим к следующим выражениям для количества детектируемых фотонов в единицу времени при двух- и трехфотонном возбуждении:

$$S_{2PEF} = \frac{1}{2} g_p^{(2)} \cdot \eta \cdot C \cdot (\varphi\sigma_2) \cdot n_0 \cdot \frac{\pi \langle P \rangle^2}{\lambda \cdot \tau \cdot f}; \quad (3)$$

$$S_{3PEF} = \frac{1}{3} g_p^{(3)} \cdot \eta \cdot C \cdot (\varphi\sigma_3) \cdot n_0 \cdot NA^2 \cdot \frac{2\pi^2 \langle P \rangle^3}{3 \cdot \lambda^3 \cdot \tau^2 \cdot f^2}, \quad (4)$$

где $g_p^{(2)} = 0.66$ и $g_p^{(3)} = 0.51$ степени когерентности второго и третьего порядка в предположении Гауссова профиля временной огибающей, n_0 – показатель преломления среды, NA - числовая апертура пучка, P – средняя мощность излучения, λ – длина волны накачки, τ - длительность импульса, f - частота повторения импульсов. Приведенные формулы (3,4) дают наглядное представление об основных параметрах и зависимостях, определяющих сигнал флуоресценции при многофотонном возбуждении. Также, данные формулы позволяют предложить подходы к измерениям спектров многофотонного возбуждения, минуя трудозатратные определения пространственно-временных параметров излучения и спектральных чувствительностей.

В данной диссертации будут использоваться два подхода в зависимости от специфики источника фемтосекундных импульсов, перестраиваемых в широком спектральном диапазоне. В том случае, когда мы можем быть уверены в воспроизводимости каждой отдельной порции сканирующего излучения мы можем воспользоваться опорным образом с известной зависимостью $\varphi\sigma_n(\lambda)$. Тогда достаточно в идентичных условиях возбуждения и детектирования произвести запись сигнала флуоресценции от изучаемого и опорного образца. Для получения абсолютных значений яркости,

дополнительно необходимо знать концентрацию растворов C , а также нормированные спектры высвечивания $F(\lambda)$. В конечном счете, спектр n -фотонного возбуждения в абсолютных величинах можно получить из формулы:

$$\left(\varphi\sigma_n\right)_s(\lambda) = \frac{S_{n,s}(\lambda)}{S_{n,r}(\lambda)} \cdot \frac{C_r}{C_s} \cdot \frac{\int F_{n,r}(\lambda_{fl}) d\lambda_{fl}}{\int F_{n,s}(\lambda_{fl}) d\lambda_{fl}} \cdot \left(\varphi\sigma_n\right)_r(\lambda), \quad (5)$$

где S , измеряемый на ФЭУ сигнал, интегрирование спектров ведётся в полосе, определяемой фильтром перед ФЭУ, индексы s и r относятся к исследуемому и опорному образцу.

В другом случае, когда процесс перестройки длины волны излучения сопряжён с неизбежными изменениями в длительностях и энергиях выходных импульсов раз от раза, нам необходимо иметь некую информацию об этих флуктуациях для последующей нормировки. Прямые измерения всех параметров идут в разрез с задачей упрощения экспериментальной техники. На роль удобного опорного сигнала может претендовать нелинейно-оптический сигнал другой природы, записываемый параллельно с основным экспериментом. Мы использовали процесс генерации второй гармоники в нелинейном кристалле, т.к. простота экспериментальной схемы позволяет быстро производить необходимые подстройки. Тогда, мы можем попытаться найти форму спектра n -фотонного возбуждения исходя из следующей простой формулы:

$$\left(\varphi\sigma_n\right)_{arb}(\lambda) = \frac{S_n(\lambda)}{P_{SHG}^{n/2}(\lambda)} \cdot \eta(\lambda), \quad (6)$$

где P_{SHG} – сигнал второй гармоники, η – нормировочный коэффициент, включающий спектральные чувствительности приборов и пропускание оптических элементов.

Хотя такой подход, на первый взгляд, упускает из внимания возможные флуктуации размеров пучка и различные чирпы импульсов на кристалле и

образце, в представленной далее реализации данные факторы не играют существенной роли. При этом, данный метод позволяет найти форму многофотонного спектра без использования опорного образца, а в случае необходимости определения абсолютных значений достаточно произвести сравнение на одной длине волны возбуждения.

2.2 Откалиброванные системы измерения сечений двух- и трехфотонного поглощения флуоресцентных маркеров

Существенным аспектом проведенных исследований является общий спектральный диапазон измерений (650 – 1700 нм), покрывающий два основных ближне-инфракрасных окна прозрачности биологических тканей – так называемые NIR-I (700 – 1000 нм) и NIR-II (1000 – 1700 нм) [116]. При этом, первое окно соответствует двухфотонному возбуждению наиболее распространенных GFP-подобных флуоресцентных белков, в частности исследуемых в этой работе сенсоров на основе пермутированного желтого белка cpYFP. Окно NIR-II удобно разбить на два диапазона, разделенных линией поглощения воды, а именно NIR-IIa (1000 – 1400 нм) и NIR-IIb (1500 – 1700 нм). Данные спектральные участки позволяют исследовать трехфотонное возбуждение GFP-подобных сенсоров, а также двух- и трехфотонное возбуждение перспективных красных и инфракрасных белков. Для генерации фемтосекундного зондирующего излучения в столь широком диапазоне были сконструированы 3 оптические схемы, основанные на нелинейно-оптических спектральных преобразованиях входных импульсов накачки.

2.2.1 Когерентный суперконтинуум для спектроскопии двухфотонного поглощения

Данный подход базируется на спектральном уширении фемтосекундных импульсов в фотонно-кристаллическом (ФК) волноводе вблизи нуля дисперсии групповых скоростей. Из получаемого спектра суперконтинуума последовательно выделялись спектральные линии, используемые для сканирования образцов. Оптическая схема (рис.9) базировалась на лазерном

генераторе сверхкоротких импульсов на кристалле Ti:sapphire (Ti:S), перестраиваемом в диапазоне 760 - 850 нм и формирующем ~ 40-фс-импульсы с энергией до 8 нДж (до 640 мВт) и частотой повторения 80 МГц.

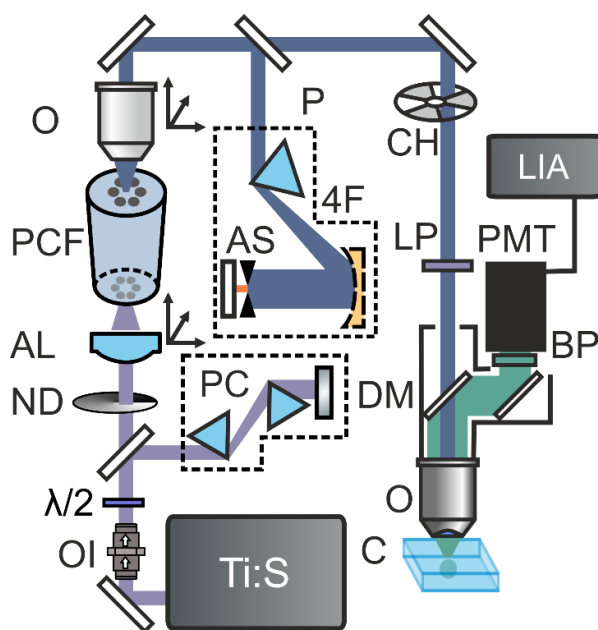


Рис.9 Схема экспериментальной установки. Ti:S, Ti:Sapphire лазер; OI, оптический изолятор; $\lambda/2$, полуволновая пластинка; PC, призмный компрессор; ND, нейтральный фильтр; AL, асферическая линза; PCF, фотонно-кристаллический волновод; O, объектив; P, призма; 4F, 4F пространственный фильтр; AS, подвижная щель; CH, оптический прерыватель; LP, низкочастотный фильтр; DM, дихроичное стекло; BP, полосовой фильтр; PMT, фотоэлектронный умножитель; LIA, синхронный усилитель; C, образец

В ходе экспериментов Ti:S-лазер настраивался на генерацию на длине волны $\lambda = 840$ нм, что обусловлено фактическим положением изобестической точки таких сенсоров, как SypHer3s и HyPer7. Для последующего заведения излучения в микроструктурированное волокно в экспериментальную схему помещался оптический изолятор (5AFI-B-800, АВЕСТА) со степенью подавления ~ 38 дБ, что, однако, приводило к дисперсионному удлинению импульсов до 255 фс (рис.10.а). Такие фазовомодулированные импульсы с невысокой пиковой мощностью (менее 20 кВт) не позволяют сформировать суперконтинуум достаточной ширины в ФК-световодах с увеличенной сердцевиной диаметром 2.5 мкм и длиной волны нуля ДГС около 870 нм. Поэтому линейный чирп компенсировался в собранном призмном компрессоре с расстоянием между призмами из стекла SF14 60 см и полным

пропусканием 92%. В результате перед торцом ФК-световода импульсы имели длительность 44 фс (рис.10.b). Мощность излучения регулировалась непрерывным нейтральным фильтром и могла варьироваться в диапазоне 1 – 400 мВт, что соответствует пиковой мощности до 120 кВт.

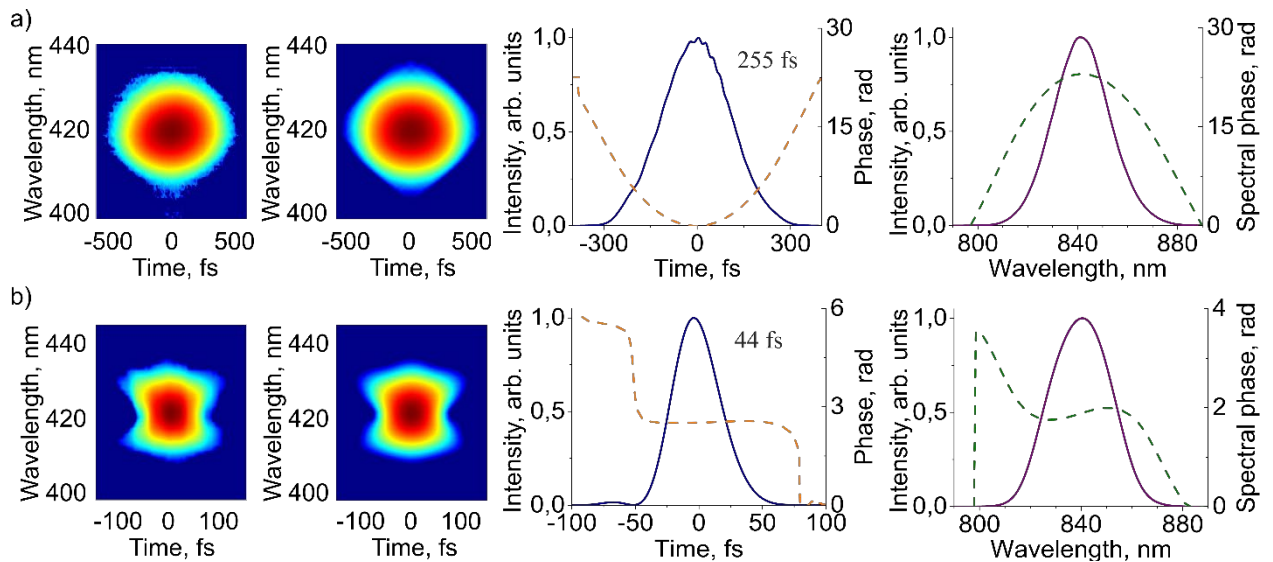


Рис.10 Экспериментальные и восстановленные спектрограммы импульсов, а также восстановленный временной и спектральный профиль с соответствующими фазами для импульсов после оптического изолятора (а) и после компрессора (b).

Ставя цель создать эффективный источник для двухфотонной спектроскопии мы обязаны проконтролировать все важнейшие параметры излучения: мощность, спектр, поляризация, пространственное распределение и расходимость.

Нелинейное преобразование в области нормальной ДГС позволяет получать суперконтинуум не такой большой спектральной ширины, как при работе в аномальной ДГС, но обладающий большей спектральной яркостью и стабильностью. Поэтому поиск оптимального ФК-световода было среди тех, которые обладать нулем дисперсии в длинноволновой части рабочего спектра > 850 нм. Были протестированы 3 образца с диаметрами сердцевин 4.5 мкм, 4 мкм и 2.5 мкм. В результате наиболее подходящее уширение спектра наблюдалось в 2.5-мкм-световоде протяженностью 13 мм (рис.11.a). Проведенное моделирование с параметрами диаметра отверстий $\varphi = 2.4$ мкм и расстояния между отверстиями $\Lambda = 2.7$ мкм дало дисперсионную кривую с

нулем на 870 нм (рис.11.b). Характерная нелинейная длина для данного волновода на длине волны накачки составила $L_{NL} \approx 2$ мм, при дисперсионной длине $L_D \approx 200$ мм. В таком случае удавалось получить стабильные спектры суперконтинуума, покрывающие в общей сложности диапазон 650 -1150 нм с достаточной спектральной плотностью мощности для двухфотонного возбуждения образцов (рис.11.b). Заведение в ФК-волновод с диаметром сердцевинки 2.5 мкм осуществлялось с помощью асферической линзы с числовой апертурой 0.55 (C230TMD-B, Thorlabs). При этом эффективность заведения, измеряемая как отношение мощности непосредственно на выходе из волокна к мощности перед фокусирующей линзой составляла 80%.

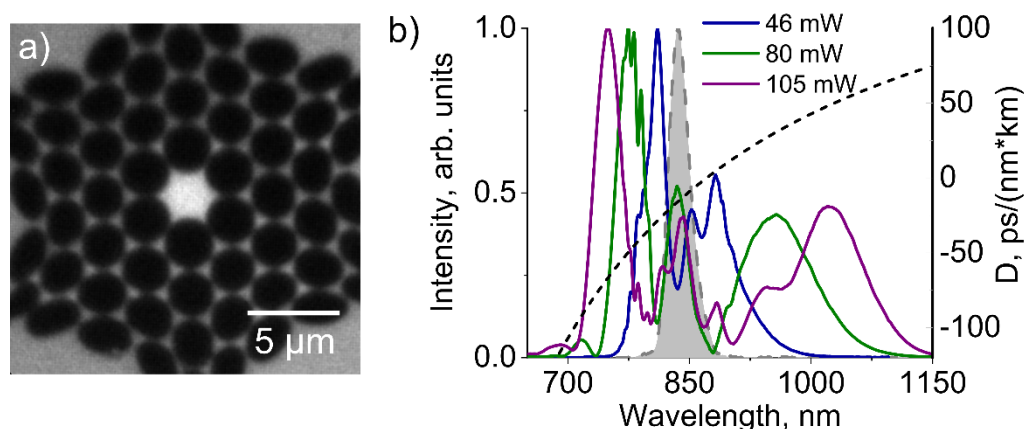


Рис.11 (а) Фотография торца, используемого ФК-волновода с диаметром сердцевинки $\sim 2,5$ мкм и длиной 13 мм. (b) Нормированные спектры суперконтинуума в зависимости от мощности перед фокусирующей асферической линзой; закрашенный профиль соответствует 7 мВт; пунктир соответствует дисперсии волокна.

Для оценки временных характеристик, получаемого излучения были выбраны два спектральных пика при мощности накачки 80 мВт с центральными длинами волн 770 нм и 950 нм. Остальная часть излучения отсекалась высокочастотным или низкочастотным фильтром с длиной волны отсечки 800 и 850 нм, соответственно. Далее на базе методики SHG FROG с нелинейным кристаллом бета бората бария толщиной 20 мкм, были записаны спектрограммы и восстановлены временные профили излучения в областях >850 нм и <800 нм (рис.12). Приведенные ниже спектрограммы были записаны в конфигурации с коллимирующей тонкой линзой вместо объектива, чтобы избежать дисперсионного искажения импульсов. В результате показано, что

вырезаемые спектральными фильтрами части излучения представляют собой отдельные фемтосекундные импульсы длительностью ~ 46 фс и ~ 62 фс на 770 и 950 нм, соответственно. Спектральные ширины импульсов поддерживают длительности до 22 фс и 15 фс. В основных экспериментах для коллимации излучения использовался ИК объектив LCPlanN 50x/0.65 (Olympus), вместо аналогичной асферической линзы. Хотя использование объектива и приводит к наведению существенного положительного чирпа и, следовательно, к удлинению импульсов, такое решение необходимо, т. к. асферические линзы страдают от значительной хроматической aberrации, что сильно ограничивает использование сколлимированного таким путем суперконтинуума.

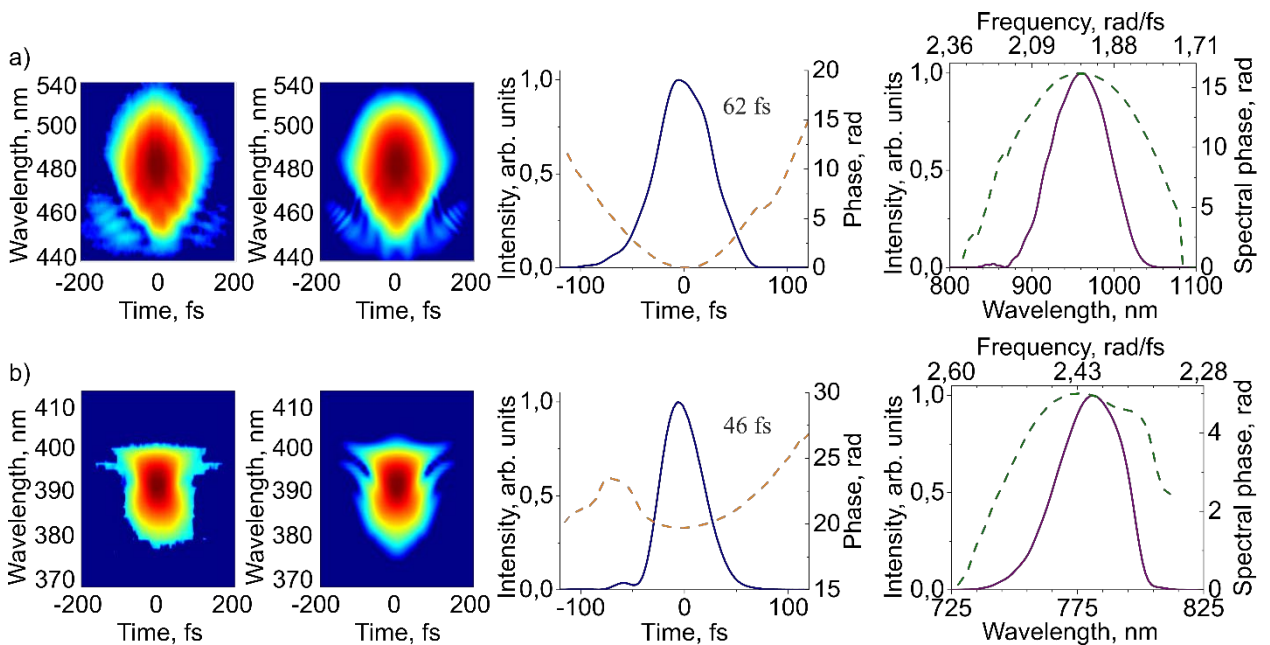


Рис.12 Экспериментальная и восстановленная спектрограмма (а) в области >850 нм (б) и в области <800 нм. Восстановленный временной профиль и временная фаза излучения, полученная с помощью FROG. Восстановленный спектр и спектральная фаза.

Далее было проверено качество пучка для обеих спектральных областей. На рис.13.a,b представлены изображения мод излучения, наложенные на изображение торца волновода. Площади мод составили 3.1 мкм^2 и 4.0 мкм^2 для 770 и 950 нм, соответственно. Далее проводилось измерение M^2 “красных” и “синих” компонент суперконтинуума, при помощи ахроматического дублета (Thorlabs, AC127-075-B-ML) с фокусным расстоянием $f = 75$ см. Полученная зависимость диаметра пучка от координаты z (рис.13.c) демонстрирует

совпадение положения перетяжек на обеих длинах волн и фактор качества пучков $M^2 \approx 1.2$, что очень важно для получения качественных изображений и опрашивании одного объема вещества при ратиометрической микроскопии.

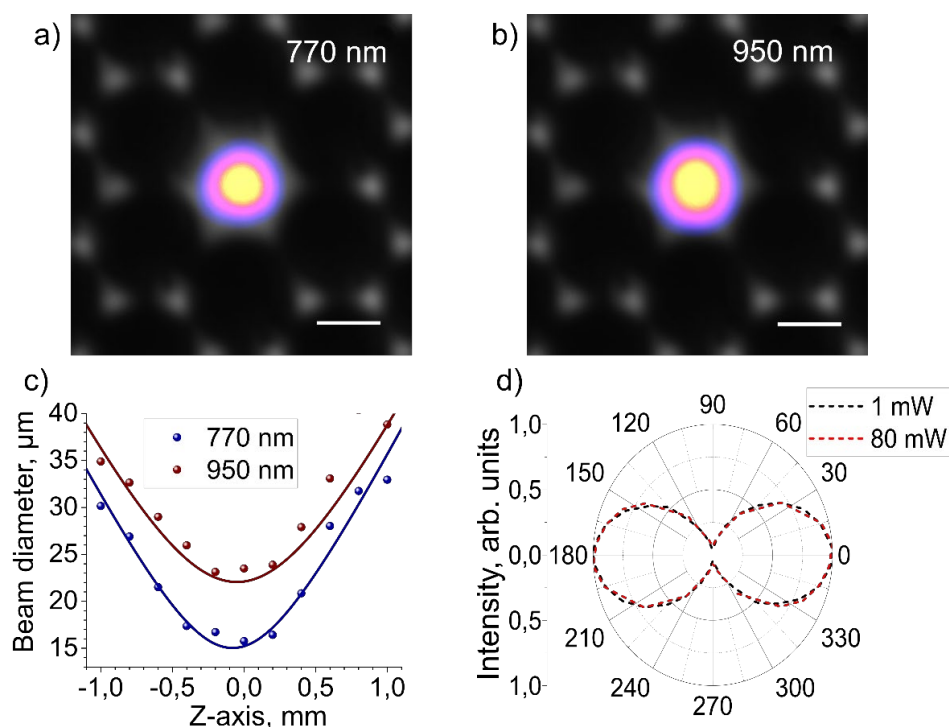


Рис.13 (a,b) Изображения поперечной структуры пучка в двух спектральных диапазонах. Шкала 2 мкм. (c) Зависимость диаметра пучка (FWHM) от аксиального направления для двух частей спектра при фокусировке ахроматической линзой с фокусным расстоянием $f = 75$ см. (d) Зависимости полной мощности излучения из ФК-световода от угла поворота поляризатора при накачке 1 мВт, линейный случай, (черная линия) и 80 мВт, генерация СК (красная линия). Направление 0-180 соответствует горизонтальной поляризации (p-поляризации).

Важно аккуратно контролировать поляризацию излучения заводимого и формирующегося в ФК-световоде, что добить максимальной эффективности преобразования, избегать интерференцию поляризационных мод, иметь линейную поляризацию на выходе для эффективного прохождения последующих оптических элементов. Из-за невозможности управлять поляризационными свойствами в широком спектральном окне 650-1150 нм при помощи полуволновых и четвертьволновых пластинок, ФК-световод механически устанавливался таким образом, чтобы поляризация основной моды совпадала с поляризацией падающего излучения – вдоль плоскости оптического стола (как на рис.13а, 13б, рис.11а). В итоге на выходе из

световода излучение испытывало слабое искажение поляризации в случае линейного распространения при мощности 1 мВт (рис.13с, черная линия), и в случае генерации СК при 80 мВт (рис.13с, красная линия). При этом степень деполяризации излучения составили 4%, перед световодом оно было 2.5%.

Возвращаясь к спектроскопической части установки, выделение различных спектральных компонент выполнялось в $4f$ -системе путем разложения суперконтинуума в спектр в двух последовательно расположенных под углом Брюстера призмах SF-11 с последующим вырезанием спектральной линии с помощью щели на моторизированной подвижке (рис.9). Для коллимации суперконтинуума после призм использовалось сферическое зеркало с фокусным расстоянием $f = 200$ мм (CM508-200-P01, Thorlabs), что позволяло избежать проблем с хроматической aberrацией. Во второй фокальной плоскости располагалась щель и зеркало, возвращающее излучение назад.

Узкая щель располагалась на моторизированной подвижке, что в результате позволяло плавно перестраивать спектр возбуждающего излучения в диапазоне 650 – 1150 нм с шириной линий от 10 до 25 нм при фиксированной ширине щели, что обусловлено дисперсией призмы. Полученное излучение направлялось в систему детектирования двухфотонной флуоресценции. При этом мощность, падающая на образец, составляла ~ 0.3 -3 мВт в зависимости от части спектра.

Стенд для измерений представлял собой инвертированный микроскоп широкого поля с установленным водным ИК объективом XLUMPlanFLN 20x NA1.00 (Olympus), подвижной вертикальным столиком с площадкой для покровного стекла с раствором исследуемого вещества и систему регистрации сигнала, состоящую из фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) (H9307-02, Hamamatsu). Разделение сигнала осуществлялось дихроичным зеркалом DMLP650R, коротковолновое излучение из ФК-световода отсекалось фильтром FELH650, а в канале регистрации были размещены высокочастотный фильтр FESH600 и полосовой фильтр FBH520/40 или

MF559-34 для подавления накачки и выделения сигнала флуорофоров. Оцифровка сигнала производилась с одновременным усилением и очисткой от шумов при помощи синхронного детектора Lock-in (HF2LI, Zurich Instruments). Управляющее напряжение на ФЭУ составляло 0.84 В, частота работы чоппера 1.4 кГц, временная константа 300 мс. Автоматизированная запись полного спектра для одного образца занимала ~1 мин., сканирование по спектру осуществлялось с задержкой 600 мс между соседними положениями шаговика.

Для проверки работоспособности система тестировалась на хорошо изученных органических красителях – Coumarin540A и Coumarin334, а также Rhodamine B и Fluorescein. В качестве опорного образца был выбран краситель Rhodamine 6G, спектр двухфотонного возбуждения которого брался из работы Ребанэ [10]. Rhodamine 6G, Rhodamine B и Coumarin334 растворялись в этаноле с концентрациями $C_{6G} = 110$ мкМ, $C_B = 140$ мкМ $C_{C344} = 230$ мкМ, соответственно; Coumarin540A растворялся в тетрахлорметане с $C_{C540A} = 250$ мкМ; Fluorescein в воде с pH 11.0 с концентрацией $C_{Fl} = 210$ мкМ.

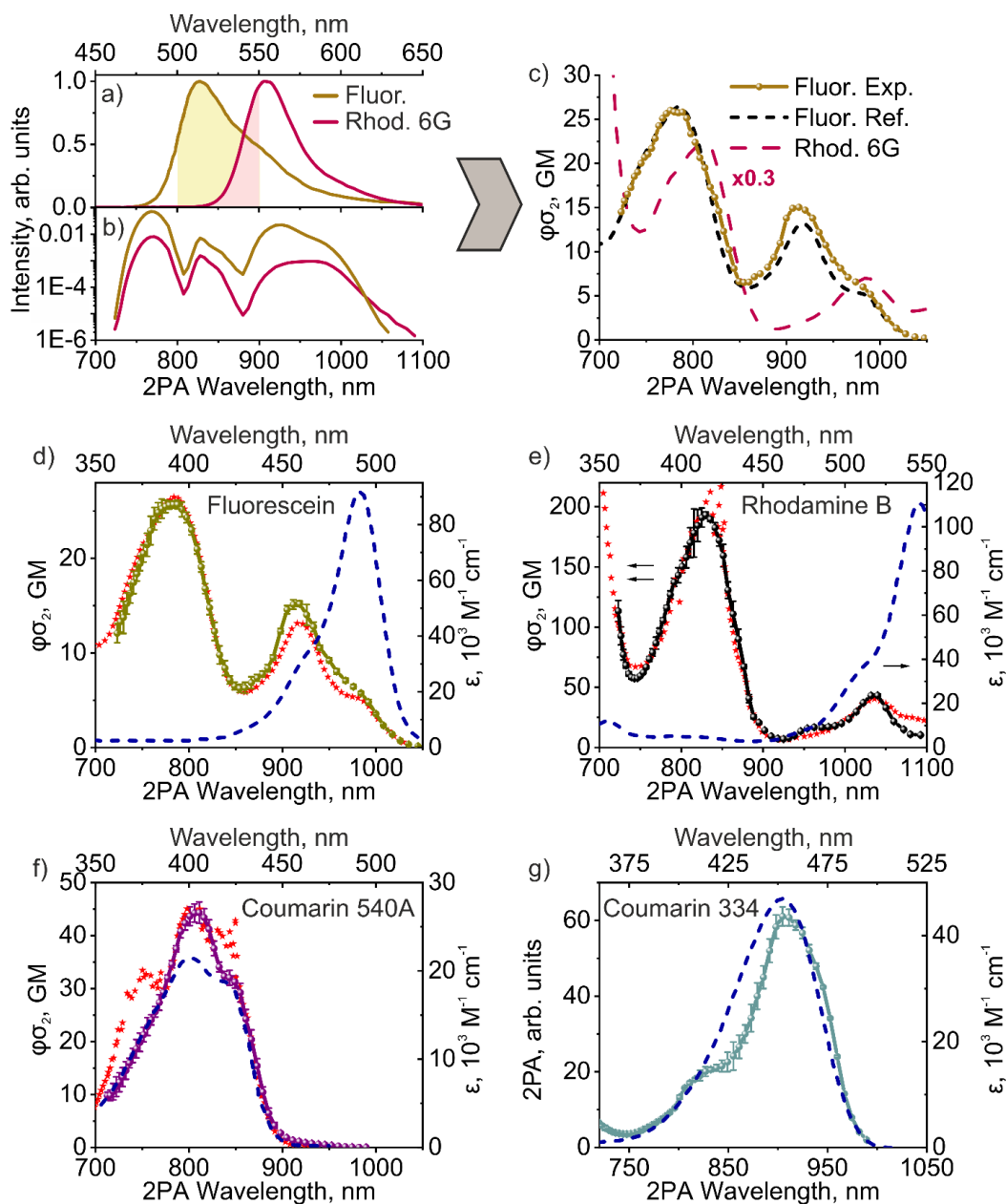


Рис.14 (а) Спектры флуоресценции Rhodamine 6G (красный) и Fluorescein (желтый) с закрашенной областью детектирования сигнала 500-550 нм. (б) Зависимость сигнала флуоресценции образцов при сканировании с помощью наиболее широкого СК (105 мВт). (с) Измеренный спектр двухфотонной яркости Fluorescein (желтый) и его сравнение с литературными данными (черный пунктир). Красным пунктиром показан спектр Rhodamine 6G, используемый для восстановления спектр. (d-g) Измеренные спектры двухфотонного возбуждения, их сравнение с литературными данными (красные звезды) и спектры однофотонного возбуждения из литературы (синий пунктир).

Так как фиксированный спектр суперконтинуума обладает несколькими минимумами спектральной плотности мощности, для более точных измерений проводились три серии экспериментов с тремя различными спектрами. Так, рабочими спектрами были выбраны спектры при мощности накачки перед ФК-световодом 46, 80 и 105 мВт (рис.11.б). Общий протокол измерений

заключался в последовательном сканировании спектральной области 650 нм – 1150 нм при трех фиксированных спектрах СК для каждого образца, повторенные по 5 раз. На рисунке 14.b продемонстрирован пример выходной зависимости сигнала в случае наиболее широкого спектра накачки (110мВт). Используя формулу 5, восстанавливалась зависимость двухфотонной яркости от длины волны возбуждения. Усредненные кривые из трех экспериментов сшивались. В результате были определены пять спектров двухфотонного возбуждения, в которых области с наибольшей погрешностью соответствуют минимумам спектра возбуждения и области в районе длины волны накачки - 840 нм. На рис.14.d-g отдельно показаны результаты измерений для каждого образца, а также нанесен спектр однофотонного возбуждения. Для всех образцов кроме C334 звездочками показаны сравнения с литературными данными [9,10]. Для Coumarin334 таких данных в литературе не найдено.

Полученные результаты убеждают в высокой точности, стабильности и универсальности представленной системы измерения двухфотонных спектров возбуждения. Параметры зондирующего излучения были ограничены средней мощностью до 3 мВт и пиковой интенсивностью до 5 ГВт/см², позволяя избежать артефактов измерения в следствии фотообесцвечивания образцов или формирования тепловой линзы. При этом чувствительность схемы составляет $(C\phi\sigma_2)_{\min} \approx 1$ мкМ·ГМ со спектральным разрешением до $\Delta\lambda \approx 10$ нм. Важной особенностью также является быстрота сканирования, составляющая ~ 1 мин.

2.2.2 Свободный от эталона метод измерения ДФП-спектров маркеров красного и ближнего ИК диапазонов

В данном разделе будет описана система для двухфотонной спектроскопии в спектральном диапазоне 1000-1400 нм, что покрывает зону двухфотонного возбуждения перспективных красных и инфракрасных флуоресцентных меток. Оптическая система (рис.15) была реализована на базе лазерного генератора сверхкоротких импульсов Mira (Coherent) на кристалле Ti:sapphire (Ti:S), генерирующего спектрально-ограниченные импульсы

длительностью около 110 фс, энергией 40 нДж, с частотой повторения 76 МГц, перестраиваемые по спектру от 700 до 960 нм. Часть мощности Ti:S генератора использовалась для синхронной накачки параметрического генератора света (ПГС) на периодически поляризованном кристалле титанил-фосфат калия, фемтосекундные импульсы сигнальной волны которого перестраиваются в диапазоне от 1000 нм до 1500 нм и имеют энергию до 5 нДж. Длительность импульсов варьировалась в диапазоне $\sim 250\text{-}350$ фс. Мощность излучения управлялась с помощью последовательно расположенных полуволновой пластинки и поляризационного кубика.

В этих экспериментах восстановление двухфотонных спектров было реализовано путем нормировки на опорный сигнал генерации второй гармоники в кристалле β -бората бария толщиной 50 мкм. Небольшая порция излучения ПГС отводилась от основного оптического тракта, где фокусировалась в кристалл ахроматической линзой с фокусным расстоянием $f = 100$ мм. Для выполнения условий фазового синхронизма при различных длинах волн накачки существовала возможность изменения угла θ , а проблема изменения условий фокусировки решалась путём юстировки положения кристалла вдоль оптической оси. Сгенерированный сигнал второй гармоники отсекался от накачки высокочастотным фильтром и перестраивался с помощью линзы на приемную головку фотодиода. Спектральная чувствительность диода в дальнейшем учитывалась для корректировки полученных значения сигнала ГВГ.

Стенд для измерений двухфотонных спектров идейно повторяет вышеописанный стенд, в данном случае излучение накачки и флуоресценции разделялось дихроичным зеркалом DMLP950R, в канале детекции перед ФЭУ устанавливался полосовой фильтр, исходя из спектра флуоресценции образца. Дополнительно была реализована возможность записи спектров флуоресценции с помощью волоконного спектрометра Flame OceanOptics.

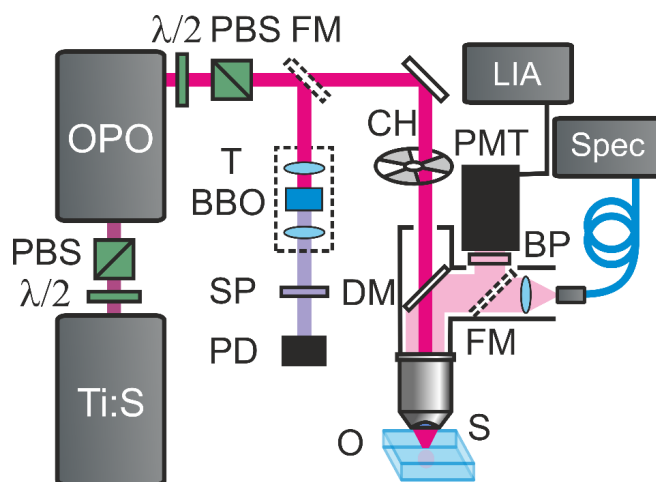


Рис.15 Схема экспериментальной установки. Ti:S, Ti:Sapphire лазер; OPO, параметрический генератор света; $\lambda/2$, полуволновая пластинка; PBS, поляризационный делитель света; FM, откидное зеркало; T, телескоп; BBO, кристалл бората бария; SP, высокочастотный фильтр; PD, фотодиод; CH, оптический прерыватель; DM, дихроичное зеркало; O, объектив; S, образец; BP, полосовой фильтр; PMT, фотоэлектронный умножитель; LIA, синхронный усилитель; Spec, спектрометр.

Так как сигнал ГВГ должен корректно отражать все существенные изменения в параметрах возбуждающего излучения, необходимо проанализировать различия в условиях генерации ВГ и флуоресцентного сигнала при двухфотонном возбуждении при различных длинах волн накачки. Основным оптическим элементом, вносящим значительные пертурбации в излучение, является ИК объектив XLUMPlanFLN 20x NA1.00 (Olympus). Для всего тракта, включающего дихроичное зеркало, объектив, водную иммерсию и покровное стекло, была промерена пропускная способность, которая составила 45-35% в спектральном диапазоне 1000-1300 нм с дальнейшим резким падением до 3% на 1400 нм, что связано с поглощением воды (рис.16.a). Соответствующие потери в пиковой интенсивности, а точнее в I^2 , учитывались при восстановлении спектров. Другим неучтенным эффектом может служить изменение моды излучения и, соответственно, размеров перетяжки в фокусе. Для прямой проверки условий фокусировки столик с образцом помещался на подвижку вдоль оптической оси объектива. Далее записывались z-сканы сигнала третьей гармоники, генерируемой от границы раздела вода-стекло (рис.16.b). Ширины данных профилей на полувысоте оказались одинаковыми во всем спектральном диапазоне с точностью $\sim 2\%$.

Наконец, длительность импульсов, приходящих на образец, может оказаться больше, чем длительность на кристалле за счет дисперсии групповых скоростей (ДГС). Не обладая информацией о конкретных сортах и расположениях линз в коммерческом объективе, мы можем оценить сверху набег ДГС исходя из длины объектива 75 мм и в предположении материала из класса тяжелых флинтгов, например SF10. В таком случае, ДГС составит 7500 фс^2 на длине волны 1050 нм, которая соответствует наиболее коротким импульсам ПГС. Тогда, уширение chirпированных импульсов длительностью 250 фс (рис.16.с) составит $\sim 10\%$. Суммируя все вышесказанное, мы можем рассчитывать на корректное восстановление спектров двухфотонном возбуждения с помощью нормировки на сигнал ГВГ.

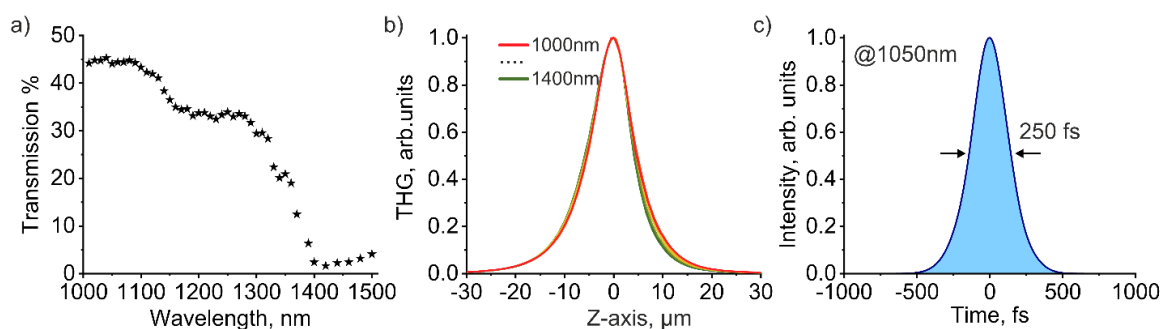


Рис.16 (а) Пропускание оптического трактата стенда в зависимости от длины волны ПГС. (b) Продольные профили сигнала третьей гармоники, генерирующейся на границе раздела стекло-лунка для различных длин волн накачки. (с) Пример временной огибающей интенсивности излучения ПГС на длине волны 1050 нм, измеренный с помощью методики FROG.

Удобными образцами для экспериментальной проверки метода служат красители *Styryl 9M* (Aldrich), растворённый в хлороформе (CHCl_3), и *Zn-tetra-tert-butyl-phthalocyanine* (Aldrich), растворённый в тетрахлорметане (CCl_4). Путём повторного разбавления были получены концентрации $C_{\text{Styryl}}=27 \text{ мкМ}$ (мкмоль/л) и $C_{\text{Zn-tetra}}=25 \text{ мкМ}$. Пик излучения этих инфракрасных красителей приходится на 780 нм, спектральная полоса интегрирования составляла 750-800 нм (рис.17.а). В ходе экспериментов дополнительно контролировалась квадратичная зависимость сигнала от мощности накачки (рис.17.б). На рисунке 12.с,d представлены восстановленные спектры двухфотонного

возбуждения обоих красителей и сравнение с литературными данными [9], а также однофотонные спектры. Хорошее соответствие измеренных и опорных спектров (рис.17.с,d) подтверждают валидность предложенной техники измерения ДФП-спектров в спектральном окне 1000-1500 нм. Не будучи ограниченными в доступных мощностях зондирующего излучения, чувствительность методики составила $(C\phi\sigma_2)_{\min} \approx 0.01$ мкМ·ГМ со спектральным разрешением порядка $\Delta\lambda \approx 10$. Однако, необходимость перестройки ПГС и аккуратной юстировки кристалла для ГВГ, в купе с широким спектральным диапазоном исследований, приводит к существенному проигрышу в скорости измерений по сравнению с подходом, описанным в предыдущем разделе. Для прописывания одного спектра требуется ~ 1 час.

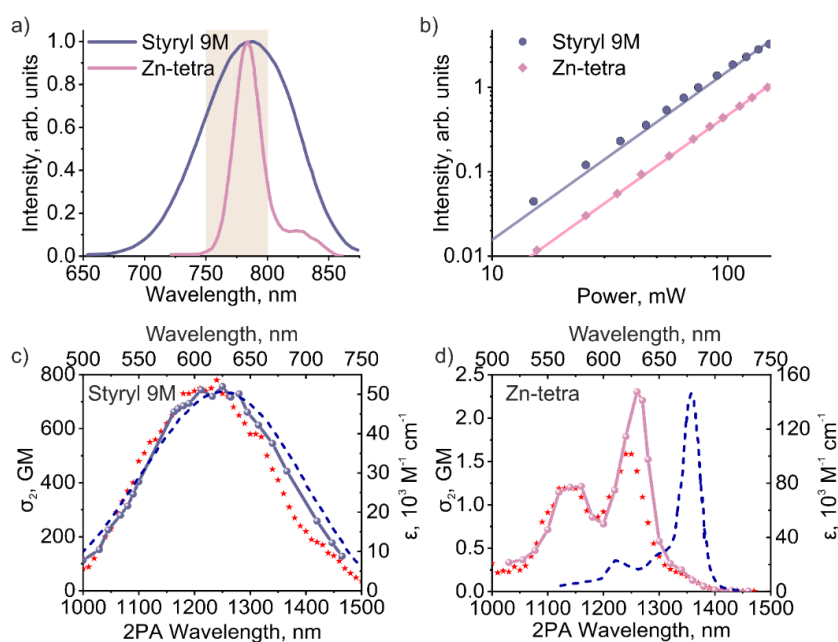


Рис.17 (а) Спектры флуоресценции красителей Styryl 9M (синий) и Zn-tetra-tert-butyl-phthalocyanine (розовый). Закрашенная область соответствует спектральному окну детекции. (b) Зависимости интенсивности флуоресценции от мощности накачки на длине волны ПГС 1100 нм для Styryl 9M и Zn-tetra-tert-butyl-phthalocyanine. Линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных степенными функциями $I=A \times P^2$. (c,d) Измеренные спектры двухфотонного возбуждения (синие линии), их сравнение с литературными данными (красные звезды) и спектры однофотонного возбуждения из литературы (синий пунктир).

2.2.3 Перестраиваемый лазерный источник на базе оптических солитонов для ТФП-спектроскопии

На данный момент существует большое количество убедительных статей по измерению двухфотонных спектров возбуждения различных органических красителей и флуоресцентных белков [10,11]. В случае трехфотоники в литературе присутствуют лишь несколько статей подобного толка [35,117–121], при этом часто сканируется небольшой спектральный диапазон. Хотя идейно измерения спектральной зависимости трехфотонного сечения поглощения не отличается от измерений двухфотонных, они накладывают более требовательные условия на источники сканирующего излучения, оптическую схему возбуждения и детектирования сигнала, а также требуют аккуратного учета новых по сравнению с двухфотоникой источников возможных артефактов.

Как отмечалось ранее, интересными спектральными областями для трехфотонного возбуждения являются диапазоны 1100-1400 и 1500-1700 нм, разделенных линией поглощения воды. Для исследования диапазона 1100-1350 нм (рис.18.а) мы использовали ПГС. В указанном диапазоне ПГС генерировал фемтосекундные импульсы с энергией до 5 нДж и длительностями в диапазоне 200-300 фс. Небольшая часть излучения направлялась в схему по генерации второй гармоники в 50 мкм кристалле ВВО, сигнал которой в дальнейшем использовался для нормировки трехфотонного отклика. Хотя ПГС и позволяет дальнейшую перестройку вплоть до 1500 нм, пиковая мощность в импульсах существенно ухудшается в длинноволновом регионе и, за частую, её оказывается недостаточно для трехфотонного возбуждения образца.

Для генерации фемтосекундного излучения, перестраиваемого в диапазоне 1350-1700 нм использовался эффект самосдвига частоты солитона в области аномальной дисперсии фотонно-кристаллического волновода (NL1040) длиной 17 см, при накачке Cr:F-лазером на длине волны 1250 нм (рис.18.б). Диаметр сердцевины составлял 4 мкм, длина волны нуля ДГС λ_{ZDW}

≈ 1.04 мкм, нелинейный коэффициент $\gamma \approx 10$ рад/км/Вт. Для предотвращения срыва генерации за счет отраженного от торца волновода излучения, в оптический тракт помещался изолятор. Заведение в волновод осуществлялось асферической линзой с $f = 2.97$ мм и $NA = 0.6$, коллимировалось излучение асферической линзой с $f = 8$ мм и $NA = 0.5$. В результате, варьируя мощность накачки перед волокном в диапазоне 50-250 мВт, удавалось получить на выходе отдельно стоящие солитоны в спектральном диапазоне 1330-1700 нм, со средними мощностями 10-30 мВт. Длительность таких импульсов на образце составляла ~ 100 фс, что приводит, в условиях жесткой фокусировки, к пиковым интенсивностям в диапазоне 100-300 ГВт/см², достаточной для трехфотонного возбуждения детектируемого сигнала флуоресценции от образцов.

Для выделения отдельных солитонов, перед стендом для детектирования сигналов флуоресценции при трехфотонном возбуждении располагался сменный набор низкочастотных фильтров FELH в диапазоне 1300-1500 нм с шагом 50 нм. Стенд для измерений представлял собой инвертированный микроскоп широкого поля с установленным водным ИК объективом XLPLN25XWMP2 25x 1.05NA, Olympus, подвижной вертикальным столиком с площадкой для образца и систему регистрации сигнала, состоящую из фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) (H9307-02, Hamamatsu). Разделение сигнала осуществлялось дихроичным зеркалом DMLP950R, коротковолновое излучение из ФК-световода отсекалось фильтром FELH950, а в канале регистрации помещался полосовой фильтр в зависимости от образца. Оцифровка сигнала производилась с одновременным усилением и очисткой от шумов при помощи синхронного детектора Lock-in (HF2LI, Zurich Instruments). Управляющее напряжение на ФЭУ составляло 0.8 В, частота работы чоппера 1.4 кГц, временная константа 1 с.

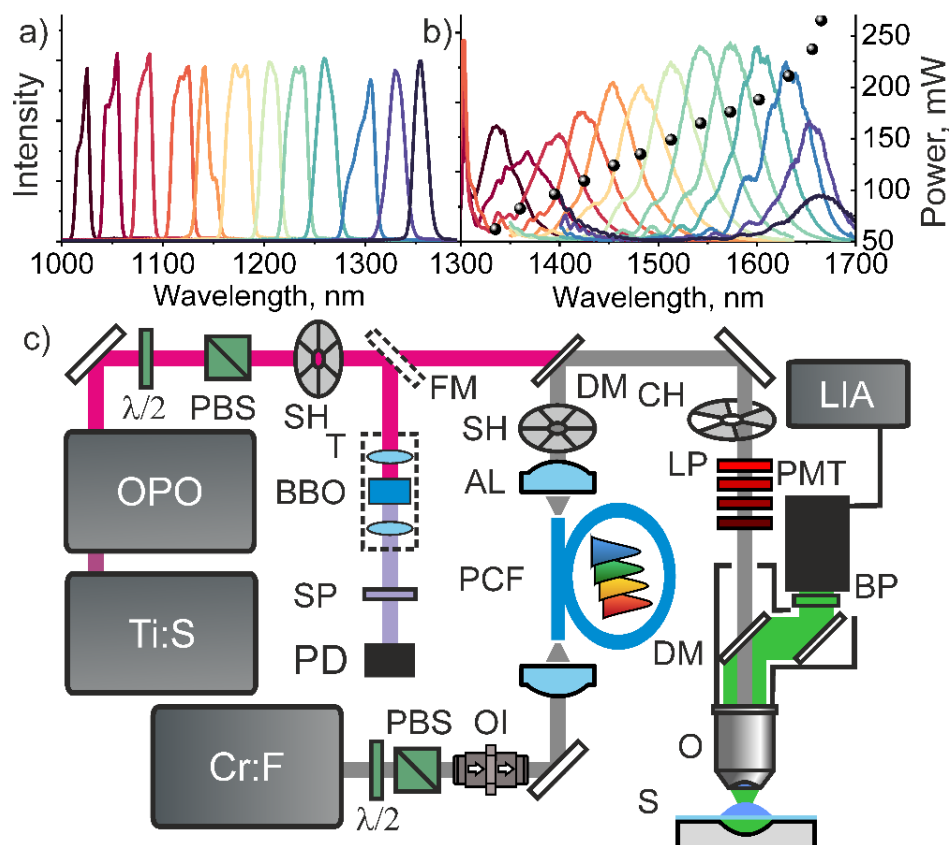


Рис.18 (а) Спектры перестраиваемых фемтосекундных импульсов ПГС. (б) Спектры солитонов, генерируемые в ФК волноводе с соответствующими значениями (точки) мощности накачки Cr:F лазера. (с) Схема экспериментальной установки. Ti:S, Ti:Sapphire лазер; OPO, параметрический генератор света; Cr:F, Cr:Forsterite лазер; $\lambda/2$, полуволновая пластинка; PBS, поляризационный делитель света; OI, оптический изолятор; SH, шатер; FM, откидное зеркало; T, телескоп; BBO, кристалл бората бария; SP, высокочастотный фильтр; PD, фотодиод; DM, дихроичное зеркало; AL, асферическая линза; PCF, фотонно-кристаллический волновод; CH, оптический прерыватель; LP, низкочастотный фильтр; O, объектив; S, образец; BP, полосовой фильтр; PMT, фотоэлектронный умножитель; LIA, синхронный усилитель.

Таким образом, эксперимент разделялся на два этапа. При этом при сканировании с помощью ПГС, параллельно записи интересующего сигнала флуоресценции образца при трехфотонном возбуждении, так же детектировался сигнал второй гармоники, сгенерированного в нелинейном кристалле. Этот сигнал, в последствии, использовался для нормировки экспериментальных данных, позволяя учесть изменения в мощности и длительности импульсов при перестройке длины волны. Искомая зависимость трехфотонной яркости от длины волны возбуждения находилась из соотношения (6).

В измерениях диапазона длин волн, покрываемых солитонами, напротив удобно использовать методику нормировки сигнала флуоресценции на сигнал от опорного образца, возбужденного трехфотонно в идентичных условиях. Таким образом выступал раствор Rhodamine 6G в этаноле, трехфотонный спектр которого убедительно измерен в статье *А.Ребане* [120]. В этом случае итоговый спектр вычислялся с использованием формулы (5).

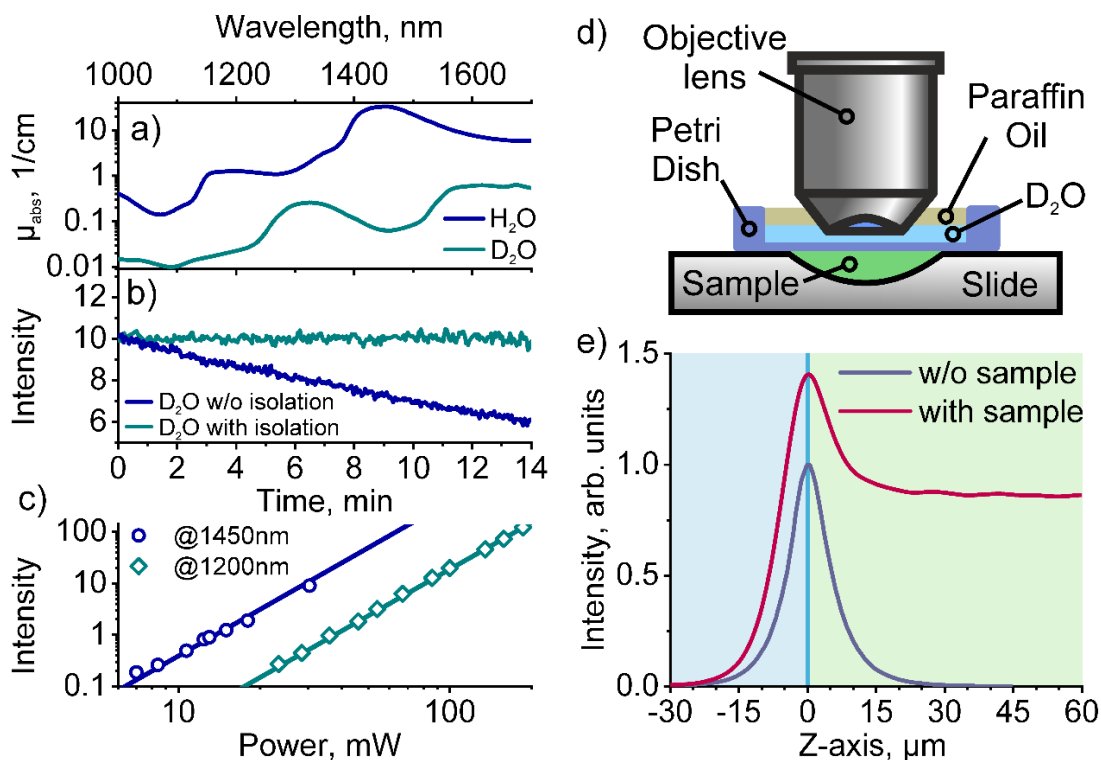


Рис.19 (а) Коэффициент поглощения воды и тяжелой воды [122]. (б) Динамика сигнала флуоресценции Coumarin 540A при трехфотонном возбуждении на длине волны 1500 нм без (синяя линия) и с (зеленая линия) изоляцией иммерсионной тяжелой воды парафиновым маслом. (с) Зависимости интенсивности флуоресценции от мощности накачки на длине волны ПГС 1200 нм (выколотые ромбы) и солитона 1450 нм (выколотые круги) для Coumarin 540A. Линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных степенными функциями $I=A \times P^3$. (д) Схема изоляции иммерсионной тяжелой воды парафиновым маслом. (е) Зависимость измеренных сигналов на ФЭУ при сканировании области 90 мкм около покровного стекла (координата 0 мкм), разделяющего D₂O (синяя область) и флуоресцентный раствор (красная линия) или этанол (синяя линия) в качестве контроля.

При этом, в изучаемом спектральном диапазоне мы сталкиваемся с новыми экспериментальными сложностями, не встречаемыми при двухфотонной спектроскопии, описанной выше. Первое очевидное затруднение в работе с используемым объективом с водной иммерсией (рабочее расстояние 2 мм), заключается в значительном поглощении воды в

диапазоне 1400-1500 нм (рис.19.a), не позволяющий сканировать данную область и кардинально искажающий полезный сигнал на соседних длинах волн. Для решения этой проблемы использовалась тяжелая вода (D_2O) с коэффициентом поглощения в ~ 100 раз меньше обычной воды (рис.19.a). Однако, тяжелая вода обладает гигроскопичностью, то есть способностью поглощать водяные пары из воздуха, что приводит к значительному падению пропускания иммерсии на минутных масштабах (рис.19.b). Избежать этого можно, изолировав тяжелую воду от атмосферы, например парафиновым маслом (рис.19.b,d).

Другой особенностью является паразитная генерация третьей гармоники на границах раздела сред. В нашем случае жесткой фокусировки импульсов с энергией ~ 1 нДж, единственная область генерации существенного сигнала на утроенной частоте является граница раздела покровного стекла и раствора с образцом. Действительно, как представлено на рис.13.e в случае отсутствия какого бы то ни было флуоресцентного образца мы детектируем существенный сигнал рассеянной третьей гармоники. С другой стороны, даже в том случае, когда спектральная полоса детекции полностью гасит сигнал ГТГ, возможен процесс каскадного однофотонного возбуждения образца фотонами на утроенной частоте. Однако, представленная схема с жесткой фокусировкой позволяет полностью нивелировать данный паразитный сигнал, проводя запись сигнала вглубь образца на 30-40 мкм (рис.19.e). Решая вопрос с паразитным сигналом, мы одновременно не сталкиваемся с проблемой заметного поглощения излучения накачки в растворе образца за счет микронной длины оптического пути.

Оба решения значительно упрощают экспериментальную технику измерений трехфотонных спектров возбуждения по сравнению с подходом из статьи *A. Rebane and A. Mikhaylov* [120]. Апробация реализованного подхода на органических красителях, также как и измерения новых флуоресцентных белковых сенсоров будет представлено в разделе 3.1.4.

В завершении раздела 2.2 приводится сводная таблица с основными параметрами созданных оптических платформ для измерения двух- и трехфотонных спектров возбуждения.

| | СК | ПГС | Cr:F солитоны |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Конфигурация | Интегральный сигнал | | |
| Спектральный диапазон | 690 – 1100 нм | 990 – 1550 нм | 1300 – 1700 нм |
| Длительность импульса на образце | ~250 фс | 200-350 фс | ~100 фс |
| Средняя мощность | 0.3 – 3 мВт | ~ 10 мВт | 10 – 30 мВт |
| Диаметр пучка в фокус | 2 мкм | | |
| Пиковая интенсивность | 0.5-5 ГВт/см ² | 12-21 ГВт/см ² | 110-330 ГВт/см ² |
| Спектральное разрешение | 10 нм | 10 нм | 15 нм |
| Предельная чувствительность | 1 мкМ·ГМ | 0.01 мкМ·ГМ | 1 мкМ·10 ⁻⁸¹ ·см ⁶ ·с ² |
| Длительность записи | 1 мин | 60 мин | 30 мин |

Таблица 1. Сводная таблица параметров зондирующего излучения, спектрального разрешения, предельной чувствительности и длительности записи спектров для оптических платформ, представленных в разделах 2.2.1, 2.2.2 и 2.2.3.

2.3 Лазерные системы многофотонной функциональной и структурной микроскопии

Помимо спектроскопических техник изучения флуоресцентных белковых сенсоров, в представленной диссертации развиваются подходы к нелинейно-оптической микроскопии. В этом разделе речь пойдет о двух созданных оптических платформах для функциональной и структурной визуализации различных биологических моделей. В силу ратиометрической природы сенсоров, системы должны обладать двухцветной накачкой, совмещенной в

пространстве и синхронизованной во времени. Хотя функционал обеих систем может пересекаться, их отличительные черты делают их оптимальным инструментом для разных задач визуализации.

2.3.1 Компактный световодный источник для двухканальной двухфотонной микроскопии

Данная система является расширением идеи использования спектрального уширения фемтосекундных импульсов в фотонно-кристаллических волноводах для спектроскопии из раздела 2.2.1. Как было показано (рис.12), пики в спектре суперконтинуума представляют из себя отдельно стоящие фемтосекундные импульсы, а сам пучок обладает хорошими пространственными и поляризационными характеристиками (рис.13). Все это делает данный световодный источник хорошим кандидатом на роль двухцветной накачки для двухфотонной ратиометрической микроскопии.

Для построения микроскопических изображения был сконструирован инвертированный лазерно-сканирующий микроскоп (рис.20), состоящий из двухкоординатного гальванометрического сканатора (GVS002, Thorlabs), сканирующей линзы (SL50-2P2, Thorlabs), тубусной линзы (TTL200M,P Thorlabs) и водного микрообъектива XLUMPlanFLN 20x NA1.00. Гальванометрический сканатор обеспечивает полный угол сканирования $\pm 10^\circ$ и частоту колебаний зеркала быстрой оси до 350 Гц, что позволяет получать изображения с частотой кадров до 0.68 к/сек при разрешении 512x512 точек. Для записи z-стеков используется шаговый двигатель Standa, установленный в трансляционный столик z-оси с шагом до 0.15 мкм. Используя двухцветную накачку, важно, что оптический тракт микроскопа предназначен для работы с излучением в диапазоне 680-1300 нм, что обусловлено конструктивными параметрами и просветлением линз. Управление всей установкой осуществляется с помощью программы Vidrio ScanImage через систему сбора данных National Instruments USB-6363 BNC.

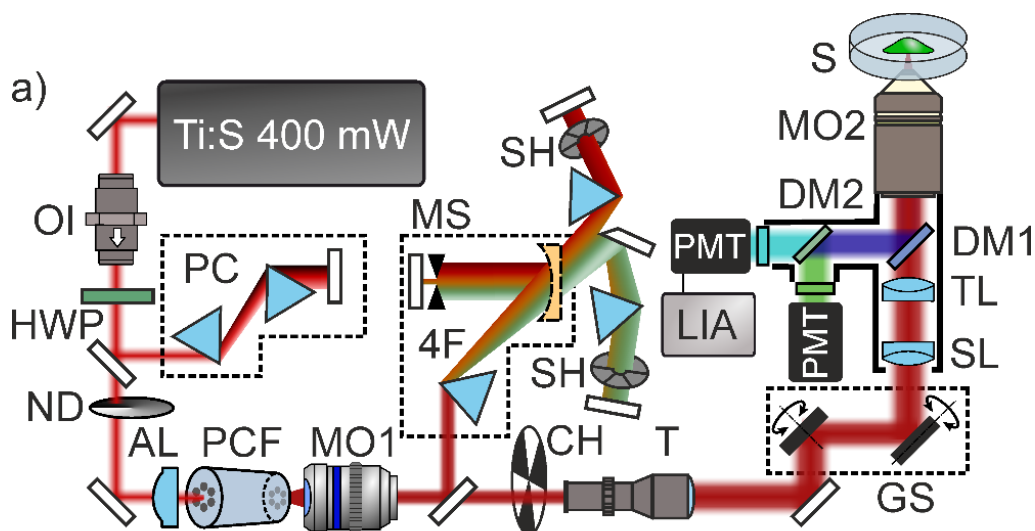


Рис.20. Схема установки. Ti:S, Ti:Sapphire лазер; OI, оптический изолятор; HWP, полуволновая пластинка; PC, призмный компрессор; ND, нейтральный фильтр; AL, асферическая линза; PCF, фотонно-кристаллический световод; MO1/MO2, микроскопный объектив; 4F, система спектральной фильтрации; MS, моторизированная щель, SH, шатер; CH, оптический прерыватель; T, телескоп, GS, гальваносканер; SL, сканирующая линза; TL, тубусная линза; DM1/DM2, дихроичное стекло; PMT, фотоэлектронный умножитель; LIA, синхронный усилитель; S, образец.

В начале необходимо определиться со степенью уширения спектра. Как будет показано в главе 3, оптимальными длинами волн для возбуждения восстановленной и окисленной форм изучаемых сенсоров на базе белка *srYFP* являются окрестности ~ 800 нм и ~ 940 нм, соответственно (рис.21.а). Процесс уширения спектра диктуется дисперсионными свойствами волновода и параметрами накачки. В нашем случае был выбран спектр суперконтинуума, получаемый при накачке 80 мВт с использованием волновода, описанного в разделе 2.2.1. В этом случае мы можем рассмотреть две спектральные области ~ 730 -810 нм и ~ 870 -1050 нм с пиками на 780 нм и 940 нм и энергиями ~ 0.3 нДж (рис.21.а). Хотя энергии в импульсах представляются достаточно маленькими для проведения двухфотонной микроскопии, спектральная ширина дает надежду на возможность получения импульсов длительностью до ~ 20 фс. Однако, большое количество диспергирующих элементов в оптическом тракте приводит к драматическому уширению фемтосекундных импульсов коротковолнового и длинноволнового крыла суперконтинуума до

длительностей порядка 1 пс на образце. Поэтому встает вопрос об аккуратном выделении, характеризации и компенсации чирпов данных импульсов.

Измерения длительностей и фазовых набегов осуществлялись с помощью методики временного стробирования с разрешением по частоте (FROG) при смешении исследуемого излучения с репликой импульса в кристалле ВВО толщиной 20 мкм. Установленный на коллимацию излучения объектив приводит к удлинению импульсов до 330 фс и 430 фс за счет наведенного положительного линейного ($\varphi^{(2)}$) и нелинейного ($\varphi^{(3)}$) чирпов $(3.0 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ фс}^2$, $(3.8 \pm 0.8) \times 10^3 \text{ фс}^3$ и $(2.2 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ фс}^2$, $(2.4 \pm 0.8) \times 10^3 \text{ фс}^3$ для 780 и 940 нм, соответственно (рис.21.b-e). Для решения задачи выделения и одновременной предкомпенсации фемтосекундных импульсов обоих спектральных компонент был собран двухканальный призмный компрессор, состоящий из трех призм SF-11 (рис. 20). Это позволило спектрально выделить нужные области спектра, навести на каждую из них свой оптимальный фазовый набег, и затем обратно свести излучение в одну пространственную моду. Использование стандартного двух призмного компрессора позволяет лишь оптимизировать одну длину волны, тогда как на второй пагубный чирп не компенсируется, а лишь нарастает. Также двухканальный компрессор использовался для попеременной смены длины волны возбуждения путем установки в оптические пути двух шаттеров (SHB1T, Thorlabs). Работа шаттеров синхронизировалась с записью кадров двухфотонной микроскопии. Оптимальное расстояние между призмами подбиралось исходя из максимизации сигнала второй гармоники, генерируемого в тонком 20-мкм кристалле ВВО в перетяжке объектива микроскопа. В результате длины плеч компрессоров составили 41 см для излучения на 780 нм и 68 см для 950 нм, что приводит к отрицательным чирпам $\varphi^{(2)} = - (7.9 \pm 0.6) \times 10^3 \text{ фс}^2$, $\varphi^{(3)} = - (24 \pm 4) \times 10^3 \text{ фс}^3$ и $\varphi^{(2)} = - (6.1 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ фс}^2$, $\varphi^{(3)} = - (20 \pm 3) \times 10^3 \text{ фс}^3$ и длительностям 760 фс и 1150 фс на входе в микроскоп (рис.21.b-e).

Для более полного понимания структуры импульсов на образце была реализована методика измерения сверхкоротких импульсов дисперсионного

сканирования [123]. Выбор обусловлен необходимостью измерения параметров импульса в фокусе высокоапертурного объектива микроскопа. Идея методики дисперсионного сканирования заключается в измерении и анализе специальных спектрограмм, называемых дисперсионными сканами. Спектрограмма представляет собой зависимость спектральной интенсивности сигнала второй гармоники, генерируемого лазерным импульсом, в зависимости от известного дополнительного набега спектральной фазы. В нашем случае варьирование фазы осуществляется с помощью вдвигания и выдвигания второй призмы компрессора, описанного выше. Сигнал второй гармоники, генерируемый в кристалле ВВО толщиной 20 мкм, перестраивался на входную щель спектрометра ахроматической линзой ACL25416U-A (Thorlabs) с числовой апертурой NA 0.79. Сигнал накачки отсекался высокочастотным фильтром FESH600 (Thorlabs).

Прямые измерения импульсов в фокусе объектива показывают, что временные огибающие серьезно искажены из-за наличия некомпенсированного нелинейного набега $\varphi^{(3)}$, что проявляется в виде наклонной линии на дисперсионном скане (рис.21.f,g). Восстановленные спектральные фазы приводят к практически нулевым значениям ДГС ($\varphi^{(2)}$), но значениям $\varphi^{(3)} = - (16 \pm 3) \times 10^3 \text{ фс}^3$ и $\varphi^{(3)} = - (15 \pm 3) \times 10^3 \text{ фс}^2$, транслирующиеся в осциллирующие фронты импульсов с длительностями $\sim 53 \text{ фс}$ и 57 фс для 780 нм и 940 нм, соответственно (рис.21.d,e).

Представленная система является компактным и, относительно, дешевым решением для двухцветной ратиометрической микроскопии. Изначальное распространение излучения в одной пространственной моде удобно для работы в режиме двухцветной накачки, а предложенный двухканальный компрессор позволяет гибко управлять фазовыми набегами, позволяя увеличить сигнал флуоресценции при двухфотонном возбуждении в ~ 10 раз. Такая система может быть удобна для титровочных экспериментов на простых биологических моделях, такие как культуры клеток или тонкие срезы. Для проведения глубокой визуализации в толстых срезах или же в режиме *in-vivo*,

однако, требуются более мощные системы, описанию которых посвящены следующие два раздела.

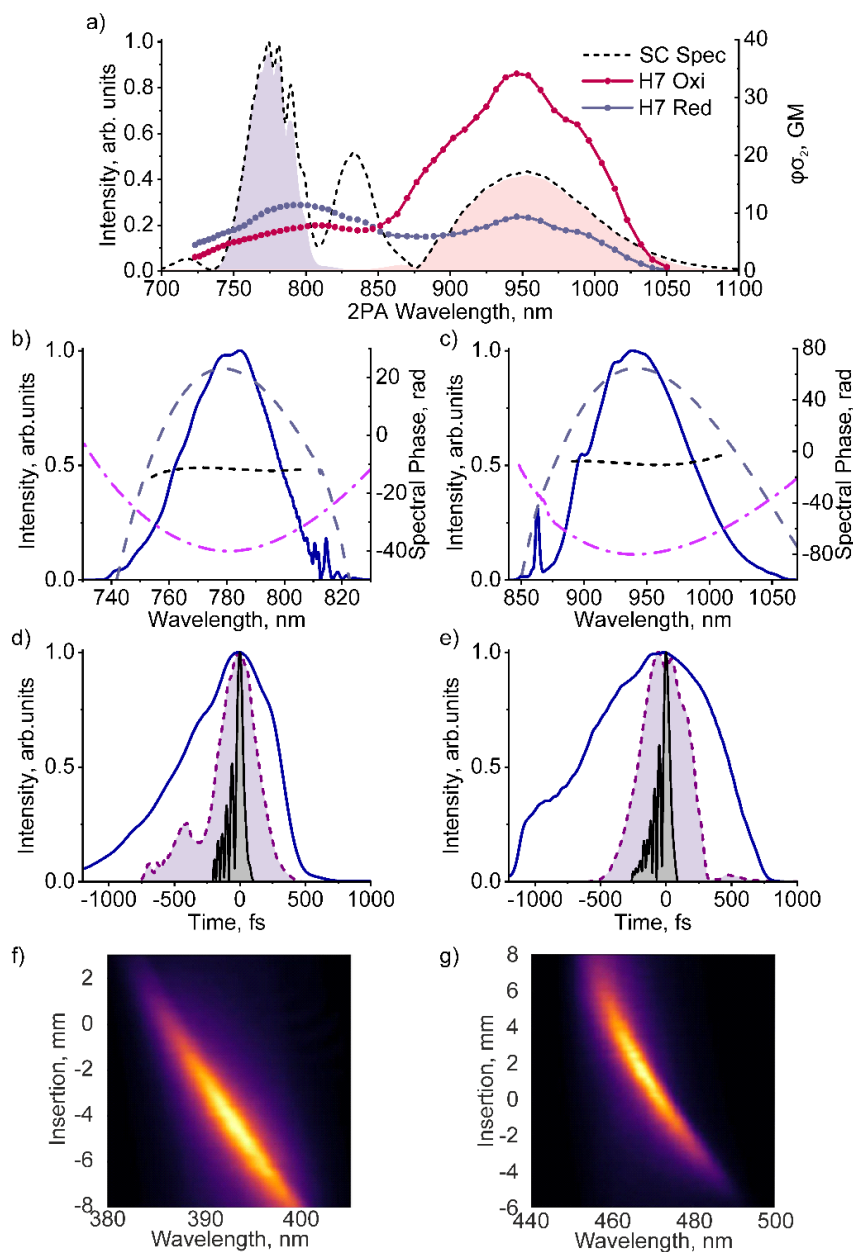


Рис.21 (а) Спектр суперконтинуума (черный пунктир) при мощности накачки 80мВт и выделяемые спектральные области для двухцветной ратиометрической микроскопии. Также показаны спектры двухфотонного возбуждения восстановленной (синяя линия) и окисленной (красная линия) формы сенсора HyPer7. (b,c) Спектр восстановленных импульсов с центральной длиной волны (b) 780 нм и (c) 950 нм, а также восстановленные спектральные фазы до призмного предкомпинсатора (розовая штрих-пунктирная линия), на входе в многофотонный микроскоп (бледно синяя пунктирная линия) и на образце (черный короткий пунктир). (d,c) Измеренные и восстановленные методикой FROG временные огибающие импульсов (d) «синего» и «красного» крыла до (синяя линия) и после (розовый пунктир) призмного предкомпинсатора и временная огибающая импульса на образце, полученная техникой d-scan (черная линия). (f,g) Дисперсионные сканы для импульсов на (f) 780 нм и (g) 950 нм.

2.3.2 Ратиометрическая и мультимодальная визуализация ткани мощными ИК импульсами

Оптическая система для мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии сильно рассеивающих биологических объектов была реализована с использованием 4 лазерных источников фемтосекундных импульсов (рис.22). Это лазерный генератор сверхкоротких импульсов Mira (Coherent) на кристалле Ti:sapphire (Ti:S), генерирующей спектрально-ограниченные импульсы длительностью около 110 фс, энергией до 40 нДж, с частотой повторения 76 МГц, перестраиваемые по спектру от 740 до 930 нм; синхронно накачиваемый Ti:S лазером параметрический генератор света (ПГС) на периодически поляризованном кристалле титанил-фосфат калия, фемтосекундные импульсы сигнальной волны которого перестраиваются в диапазоне от 970 нм до 1500 нм и имеют энергию до 5 нДж; лазер с увеличенной длиной резонатора на кристалле Cr:Forsterite (Cr:F) [124,125], формирующий 60-фс-импульсы с энергией до 20 нДж на длине волны 1250 нм с частотой повторения 29 МГц; а также компактный твердотельный иттербиевый лазер (Yb) с возможностью перестройки в диапазоне 1030-1060 нм, длительностью импульсов ~110 фс, энергией до 50 нДж и частотой повторения 70 МГц. Специальные фильтры отсекали остаточную флуоресценцию из резонаторов.

Опираясь на спектроскопические данные, которые будут описаны в Главе 3, мы можем определить наиболее подходящие длины волн для каждого источника и, на основании их, спроектировать оптическую схему. Так, в последующих экспериментах буду использоваться центральные длины волн 790 нм, 980 нм, 1050 нм и 1250 нм, для Ti:S-лазера, ПГС, Yb-лазера и Cr:F-лазера, соответственно. При этом, с учетом необходимости ратиометрического и мультимодального построения изображений, в системе реализован легкий доступ к каждому источнику накачки. Излучение на 790 нм и 980 нм обеспечивают ратиометрический опрос образцов, поэтому их сведению и синхронизацию с микроскопом уделялось особое внимание.

Во-первых, объединение пучков четырех лазеров в одну пространственную моду, направляемую в сканирующий микроскоп (LSM), производилось при помощи попарного сведения импульсов на трех дихроичных зеркалах DMLP805 (DM1), DMSP1000 (DM2) и DMSP1180 (DM3). Во-вторых, в каждый из оптических путей были установлены юстируемые телескопы (Т) для оптимального заполнения зрачка объектива и аккуратного аксиального совмещения сфокусированных пучков, особенно на длинах волн ратиометрического опроса. В-третьих, для выделения накачки, на пути лазерных лучей были установлены 4 диафрагменных шаттера (SHB05T, Thorlabs) с типичным временем переключения менее 10 мс (8 мс открытие, 9 мс закрытие). Для синхронизации с работой микроскопа использовалась плата Arduino Uno, на которую приходил сигнал покадровой синхронизации микроскопа (Frame Out) и которая управляла контроллерами шаттеров. Для удобства, все соединения осуществлялись BNC-кабелями, а плата Arduino была убрана в специальный напечатанный на 3д-принтере корпус, где были добавлены кнопки и светодиодная индикация для переключения режимов ручного управления шаттерами или синхронизации с микроскопом.

Длительности импульсов в различных частях оптической схемы контролировались переносным устройством на базе методики оптического стробирования с разрешением по частоте (FROG) с использованием 50-мкм кристалла бета-бората бария. Для предкомпенсации положительного chirpa у импульсов на длинах волн 790 нм, 1050 нм и 1250 нм были установлены призмные компрессоры (PC) из тяжелого стекла SF-14 с эффективностью пропускания ~85%. Для предотвращения срыва генерации в оптические пути Ti:S лазера и Yb лазера помещались оптические изоляторы.

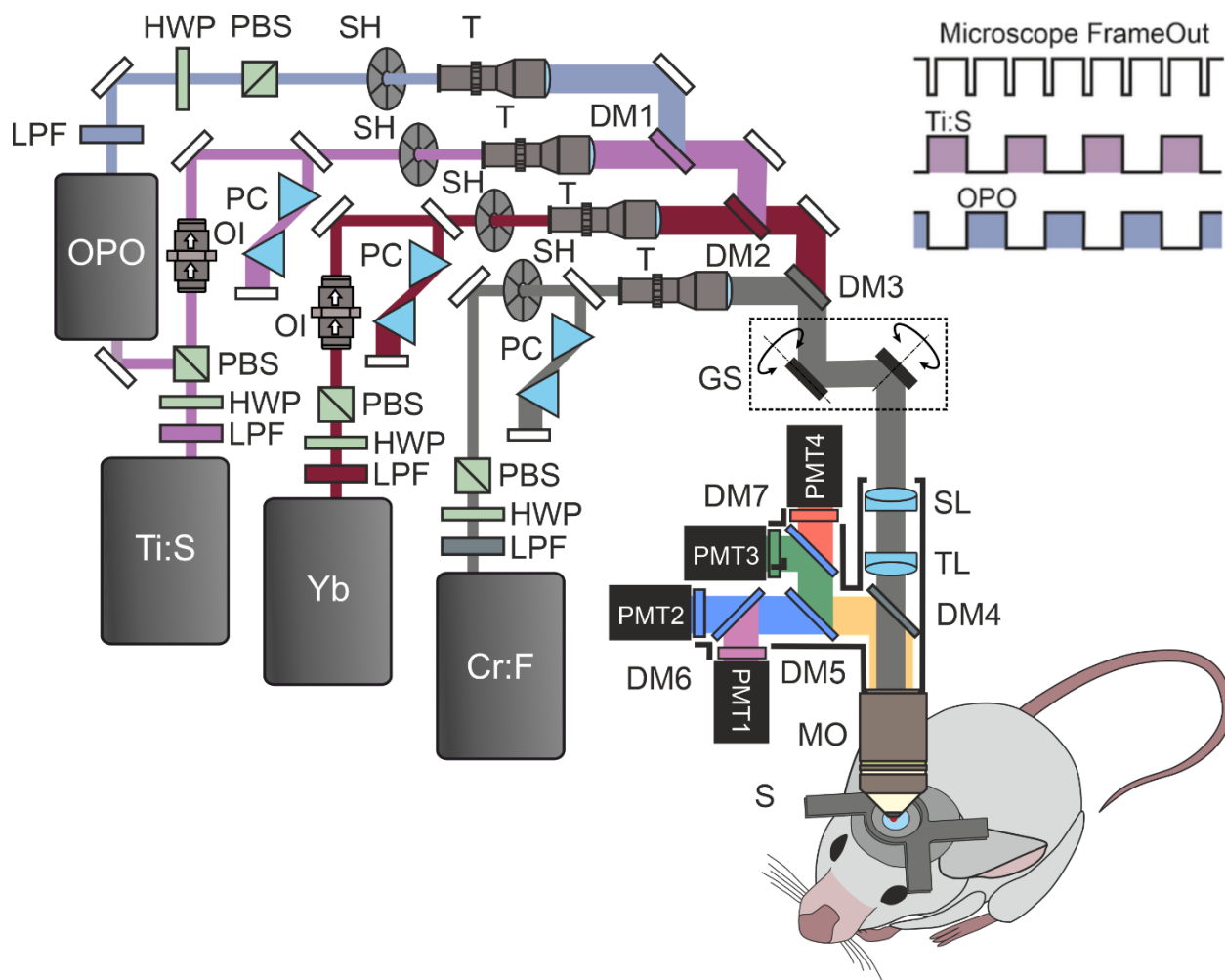


Рис. 22 Схема экспериментальной установки для многофотонной микроскопии культур клеток, переживающих срезов и живых объектов. Ti:S, Ti: sapphire лазер; OPO, параметрический генератор света; Cr:F, Cr: forsterite лазер; OI, оптический изолятор; LPF, высокочастотный фильтр; $\lambda/2$, полуволновая пластинка; PBS, поляризационный делитель света; PC, призмный компрессор; T, телескоп; SH, оптический шатер; DM1 – DM6, дихроичные зеркала; PMT1 – PMT4, фотоэлектронные умножители, SL, сканирующая линза, TL, тубусная линза, MO, микрообъектив; S, образец. На вставке показан синхроимпульсы для попеременного облучения образца.

Сведение перетяжек в аксиальном направлении при фокусировке, а также управление заполнением зрачка объектива осуществлялось размещением увеличивающих телескопов Галилея в обоих пучках. Использовались линзы с фокусным расстоянием $f = -15$ см и $f = 20$ см для Ti:S-лазера и $f = -5$ см и $f = 10$ см для OPO. Для нахождения разрешающей способности микроскопа были использованы флуоресцентные полистироловые шарики диаметром 0.5 мкм, зафиксированные в агарозе. Такие шарики позволяли наблюдать сигналы ГТГ, двух- и трехфотонной флуоресценции, а так как их размер был меньше или сопоставим с размерами перетяжки, то получаемые трехмерные

распределения сигнала можно ассоциировать с аппаратной функцией нелинейно-оптического микроскопа. На рисунке 23 показаны сигналы третьей гармоники и флуоресценции при трехфотонном поглощении от Cr:F лазера, а также двухфотонные профили для Ti:S-лазера и ПГС. При этом разрешение системы составило в радиальном направлении 0.49, 0.51, 0.47 мкм и в аксиальном направлении 1.98, 2.03 и 2.3 мкм для Ti:S, OPO и Cr:F, соответственно.

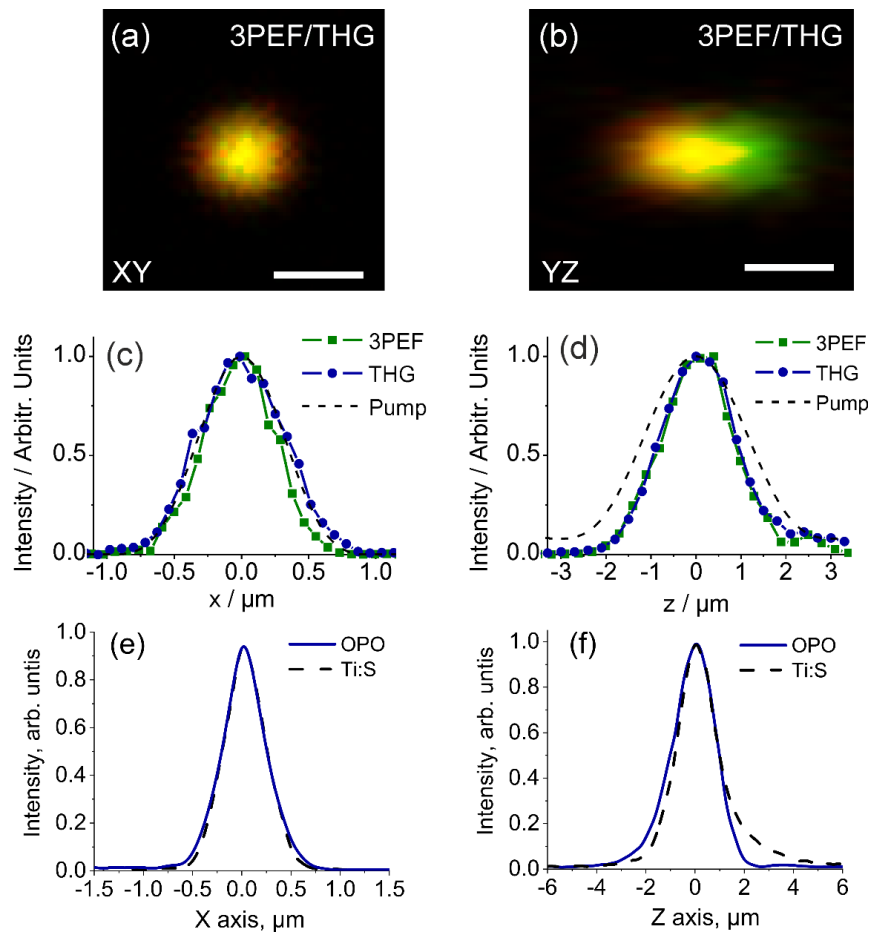


Рис 23 (a, b) ЗРЕФ (зеленый цвет) и THG-изображения (красный цвет) 500-нм флуоресцирующей частицы и ее (c) поперечный и (d) продольный профили при возбуждении на 1240 нм. (e) поперечные и (f) продольные профили флуоресценции при двухфотонном возбуждении на 790 и 980 нм.

Создавая лазерный комплекс, объединяющий несколько одновременно работающих источников фемтосекундных импульсов в спектральном диапазоне от 750 нм до 1550 нм, необходимо продумать систему одновременной регистрации нелинейных сигналов. Был произведен расчет оптической схемы, показывающий как можно модернизировать доступную

двухканальную схему регистрации до четырехканальной. Важно правильно подобрать оптику для аккуратной перестройки изображения сильно рассеянного сигнала из фокальной плоскости объектива на торцы ФЭУ всех четырех каналов.

Для реализации системы четырехканальной регистрации сигнала была проведена модификация мультифотонного микроскопа Thorlabs MPM2. Исходная двухканальная система регистрации сигнала в микроскопе (рис. 24.а) состоит из микрообъектива МО; дихроиков DM, осуществляющих разделение сигнала на спектральные каналы; сопрягающей оптической системы (ОС) и фотоэлектронных умножителей РМТ (ФЭУ, Hamamatsu H7422). Так как исходная конструкция системы регистрации сигнала подразумевает легкую замену ФЭУ, устанавливаемых с помощью переходников с креплением типа «ласточкин хвост», задача увеличения числа спектральных каналов решается с помощью установки на их место узлов, разделяющих исходный спектральный канал на два дополнительных.

Конструкция узла для увеличения числа спектральных каналов (рис. 24.d) состоит из держателя дихроичного зеркала и фильтров (Thorlabs DFM1B/M и DFM1T1), к которому крепятся ФЭУ с помощью переходника типа «ласточкин хвост». Так как добавленный держатель дихроика изменяет расстояние от микрообъектива до ФЭУ, дополнительно требуется модификация сопрягающей ОС в микроскопе для предотвращения возникновения виньетирования пучков и возможного снижения интенсивности сигнала.

Исходная ОС (рис. 24.е) собрана по схеме Кеплера из двух положительных линз L1 и L2 с фокусными расстояниями $f_1 = 60$ мм и $f_2 = 15$ мм, сопрягающих плоскости выходного зрачка микрообъектива МО и ФЭУ. При этом конструкция микроскопа такова, что линза L1, установленная в корпусе микроскопа, является труднозаменяемой, а линза L2 в переходнике ФЭУ легко поддается замене. Таким образом, задача модификации ОС состоит в подборе к линзе L1 дополнительных линз, удерживающих размер пучка в

пределах размера светочувствительной площадки ФЭУ, при этом плоскости их установки не могут быть произвольными и обусловлены соответствующими местами в держателе дихроичного зеркала и переходника ФЭУ. В реализованной ОС для четырехканальной системы регистрации (рис. 24) подобранные линзы L3 (Thorlabs LB1181-A, $f_3 = 35$ мм) и L4 (Thorlabs LA1560-A, $f_4 = 25$ мм) позволяют получать изображения без значительной потери сигнала и виньетирования.

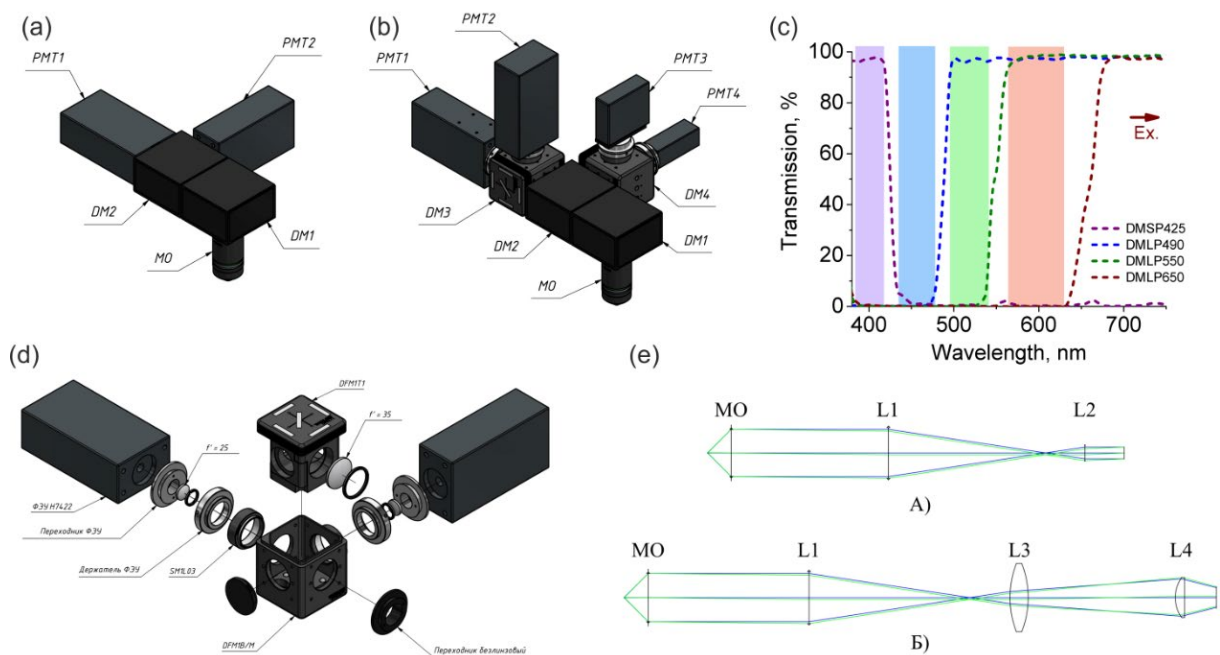


Рис.24. Многоканальная система регистрации нелинейных сигналов. (а) Исходная двухканальная система регистрации. (б) модифицированная четырехканальная система регистрации. МО – микрообъектив; DM – держатели дихроичных зеркал и фильтров; PMT – фотоэлектронные умножители. (с) Один из реализованных способов спектрального разделения каналов регистрации сигналов. (d) Узел для увеличения числа спектральных каналов. (е) Сопрягающие оптические системы А – исходная сопрягающая оптическая система микроскопа, Б – сопрягающая система четырехканальной системы регистрации. МО – микрообъектив, L – линзы, фокусные расстояния линз $f_1 = 60$ мм, $f_2 = 15$ мм, $f_3 = 35$ мм, $f_4 = 25$ мм. Микрообъектив МО и линзы L1, L2 исходной ОС с неизвестными конструктивными параметрами указаны как тонкие компоненты.

2.4 Выводы

Аккуратный подбор параметров сверхкоротких импульсов и МС световодов, в котором они преобразуются, позволил создать две оптические платформы для изучения нелинейно-оптических свойств флуоресцентных маркеров. Первая платформа на базе титан-сапфирового генератора

импульсов и МС световода предоставляет собой источник когерентного широкополосного излучения, простирающегося в диапазоне от 650 нм до 1150 нм, управление спектральной амплитудой и фазой которого позволило реализовать систему измерения сечений двухфотонного возбуждения флуоресцентных маркеров, а также двухцветную двухфотонную микроскопию. Вторая платформа, используя плавно перестраиваемый по длине волны от 1350 нм до 1700 нм источник на базе солитонного самосдвига частоты в МС световоде импульсов хром-форстеритового лазера, позволяет исследовать спектры трехфотонного поглощения зеленых маркеров.

Для мультимодальной многофотонной микроскопии была создана многоканальная оптическая система, объединяющая лазерный сканирующий микроскоп и четыре лазерных источника сверхкоротких импульсов, которые позволяют осуществлять двух- и трехфотонный опрос белковых сенсоров на основе зеленых, желтых и красных флуоресцентных белков, а также визуализировать структуру ткани при генерации второй и третьей оптических гармоник. Реализованная система попеременной подачи излучения на образец позволяет опрашивать ратиометрические белковые сенсоры для функциональной визуализации ткани.

Представленные результаты опубликованы в научных статьях:

1. **A. S. Chebotarev**, A. A. Lanin, R. I. Raevskii, A. I. Kostyuk, D. D. Smolyarova, D. S. Bilan, I. V. Savitskii, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Single-beam dual-color alternate-pathway two-photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology," *J. Raman Spectrosc.* 52, 1552–1560 (2021).
2. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Three-photon-resonance-enhanced third-harmonic generation for label-free deep-brain imaging: In search of a chemical contrast," *J. Raman Spectrosc.* 50, 1296–1302 (2019).
3. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, N. V. Barykina, F. V. Subach, and A. M. Zheltikov, "The whither of bacteriophytochrome-based near-infrared fluorescent proteins: Insights from two-photon absorption spectroscopy," *J. Biophotonics* 12, e201800353 (2019).

Представлены на конференции:

А. А. Ланин, **А. С. Чеботарев**, Г. Н. Мартынов, А. Г. Шохина, Д. С. Билан, В. В. Белоусов, А. Б. Федотов, “Нелинейно-оптическая микроскопия редокс-биосенсоров в живых животных”, Сборник научных трудов «Оптогенетика+2023» (2023)

Готовится к публикации

1. **A. S. Chebotarev**, R. I. Raevsky, G. N. Linovsky, A. I. Kostyuk, V. V. Belousov, A. V. Fedotov, D. S. Bilan, and A. A. Lanin, "Ultrafast supercontinuum sculpting for two-photon spectroscopy and microscopy of ratiometric fluorescent indicators", (процесс рецензирования)

Глава 3. Исследование потенциала нелинейной визуализации биосенсоров на растворах, клеточных культурах и биоптате

Переход к задаче детектирования клеточного метаболизма по средствам многофотонной микроскопии флуоресцентных редокс сенсоров требует понимания возможных пределов глубины визуализации и чувствительности сенсоров. Первым шагом является получение данных о спектральных зависимостях двух- и трехфотонных яркостей интересующих флуоресцентных меток, что позволит оптимальным образом подобрать источники возбуждения. Найденные абсолютные значения яркости, в свою очередь, помогут оценить потенциал данных сенсоров.

Далее необходимо проделать серию модельных экспериментов по микроскопии для проверки возможности ратиометрических измерений в многофотонном режиме, начиная с культур клеток. В нашем случае это распространенная модель «бессмертных» раковых клеток HeLa Kyoto, а также более сложная нейрональная культура. Помимо простой проверки работоспособности систем, данные модели позволяют произвести аккуратную титровку каждого отдельного сенсора, измерить динамический диапазон ратиометрического отклика, определить минимальные и предельные границы чувствительности к концентрации соответствующей целевой молекулы.

Наконец, наиболее убедительными экспериментами в преддверии работы с живыми животными являются эксперименты по визуализации отдельных клеток в глубине фиксированных или свежевывнутых срезов коры головного мозга мыши, а также срезов печени. Доставленный вирусным способом ген флуоресцентного белка с дополнительными генетическими элементами, обеспечивающими специфичность, приводит к экспрессии соответствующего сенсора в определенном типе клеток. При этом, после извлечения органа, при правильном обращении, клетки остаются функциональными в течении времени порядка 1 часа. Тем самым, мы имеем возможность стимулировать

ратиометрический отклик сенсоров теми или иными внешними воздействиями.

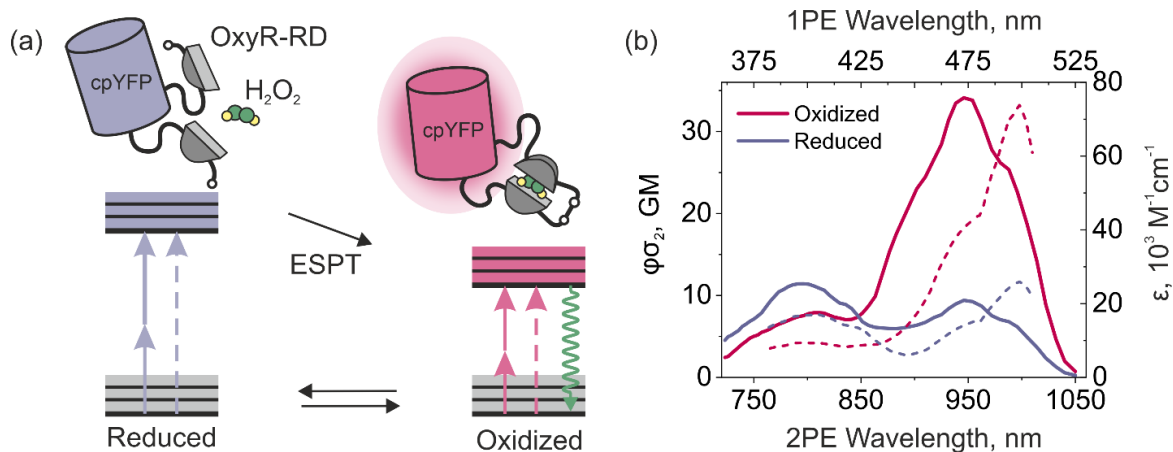


Рис.25 (а) Условная схема строения сенсора HyPer7, состоящего из белка cpYFP с чувствительным доменом Oxy-RD. Энергетическая диаграмма возбуждения и испускания восстановленной и окисленной форм сенсора. (б) Спектры одно- и двухфотонного (пунктирные и сплошные линии) возбуждения белка HyPer7 в восстановленной (синие линии) и окисленной (красные линии) форме.

3.1 Спектроскопия сенсоров АФК в растворах при многофотонном возбуждении

3.1.1 Принцип работы ратиометрических белковых сенсоров при одно- и многофотонном возбуждении

Исследуемым объектом являлись флуоресцентные белковые сенсоры, направленные на детектирование различных активных форм кислорода. Основная часть из них основана на циркулярно-пермьютированном желтом флуоресцентном белке cpYFP, к концам которого присоединён соответствующий сенсорный домен (рис.25.а). Данное семейство сенсоров относится к ратиометрическим сенсорам, то есть обладающим двумя явно выраженными пиками возбуждения (рис.25.б). В свою очередь эти пики соответствуют протонированной (нейтральной) и депротонированной (анионной) форме хромофора, при этом соотношение молекул в этих формах пропорционально концентрации аналита. Такая особенность открывает возможность измерений динамик биохимических процессов путем попеременного возбуждения на двух длинах волн, каждая из которых преимущественно возбуждает одну из форм. Благодаря этому, удастся

избежать большого количества возможных артефактов измерения, связанных с изменением яркости флуоресцентных меток за счет внешних факторов.

Общий механизм чувствительности основан на окислении дисульфидной связи на концах сенсорного домена в присутствии целевой молекулы. При этом изменяется конформация белка, приводящая, в конечном счете, к изменению флуоресценции. Можно выделить три фактора, ответственных за изменение итогового детектируемого сигнала. Во-первых, может происходить существенный сдвиг константы диссоциации pK_a , что приводит к изменению процентного соотношения молекул с протонированным или депротонированным хромофором, в общем случае, необязательно одинаково в каждой из форм белка. Во-вторых, возможно значительное изменение квантового выхода флуоресценции при переходе из восстановленной в окисленную форму белка и наоборот. Наконец, каждое из возможных состояний сенсора может обладать своей отличной от других величиной сечения поглощения. Суммируя все выше сказанное, мы можем представить произвольное состояние раствора белкового сенсора в виде суммы 4 состояний, а сигнал флуоресценции при n -фотонном возбуждении задается формулой:

$$S_n \sim \sum_{i=A,N} \rho_i^{Red} \varphi_i^{Red} \sigma_{n,i}^{Red} + \sum_{i=A,N} \rho_i^{Oxi} \varphi_i^{Oxi} \sigma_{n,i}^{Oxi}, \quad (7)$$

где ρ – относительное содержание в растворе молекул каждой из конформаций с протонированным/депротонированным хромофором, φ – квантовый выход флуоресценции, σ_n – сечение n -фотонного поглощения, суммы соответствуют восстановленным и окисленным конформациям белка, суммирование идет по анионному и нейтральному состоянию хромофора.

С точки зрения нелинейно-оптического взаимодействия, наибольший интерес представляет последний фактор, так как сечение поглощения в одно- и многофотонном случае обладает принципиально разными зависимостями от элементов матрицы дипольного момента основного и возбужденного

состояния хромофора [11]. Именно этим объясняются иногда наблюдаемые в эксперименте существенные различия при наложении спектров одно- и многофотонного возбуждения (рис.25.b).

3.1.2 Двухфотонная спектроскопия ратиометрических сенсоров на основе желтого флуоресцентного белка *cpYFP*

Нами были изучены двухфотонные свойства ряда редокс сенсоров, включающих в себя сенсоры *SypHer3s*, представляющий из себя белок *cpYFP* с присоединенным неактивным сенсорным доменом, *HyPer3* и *HyPer7*/*HyPer7*, обладающих чувствительностью к H_2O_2 за счет сенсорного домена *OxyR-RD*, *RexYFP*, чувствительный к соотношению $NAD^+/NADH$ с доменом *T-Rex*, а также сенсоры *HC10* на базе домена *NemR* *Hyrocates* и *Hyrocates2*.

Каждый из образцов разбавлялся в подходящем буфере до концентрации $C = 50$ мкМ. Полученные восстановленные суспензии сенсоров далее использовались в экспериментах, а для создания окисленного варианта в эппендорфы добавлялась заведомо насыщающая концентрация аналита. В случае *SypHer3s* белок разбавлялся в четырех заранее титрованных буферах с pH 6.0, 7.5, 8.5 и 10. Измеренные для каждого образца спектры высвечивания при двухфотонном возбуждении (рис.26.a) ожидаемо не сильно отличаются друг от друга, а также соотносятся со спектрами, полученными в однофотонном режиме, что соответствует правилу Каши. Для контроля степени фотонности измерены зависимости сигнала флуоресценции от мощности накачки с дальнейшей аппроксимацией зависимостью $I \sim P^2$ (рис.26.b).

Измерения производились по методике с опорным красителем и с помощью световодного источника суперконтинуума, описанного в разделе 2.2.1. Полученные двухфотонные спектры (рис.26.c-h) позволяют говорить о перспективности данных сенсоров в задачах двухфотонной визуализации *in vivo*, так как обладают пиковой яркостью в диапазоне 10-45 ГМ (за исключением *rexYFP*), что сравнимо с яркостью широко распространенного кальциевого сенсора *GCaMP6m* [126]. При этом сенсоры демонстрируют значительный

динамический диапазон ратиометрического отклика, определяемый как $\mathcal{R} \equiv R^{980nm}/R^{790nm}$, где R^λ есть отношение сигналов флуоресценции, окисленной к восстановленной форме белка при возбуждении на длине волны λ . Выбор длин волн 790 и 980 нм обусловлен дальнейшими экспериментами по двухфотонной микроскопии. Общей особенностью для всех сенсоров является ярко выраженный пик окисленной формы белка на ~ 950 нм, в то время как в однофотонном случае максимум возбуждения приходится на ~ 500 нм. Такой стоксовый сдвиг может быть объяснён двухфотонным резонансным усилением перехода со дна основного состояния S_0 на первый колебательный уровень состояния S_1 [66]. При этом наблюдаемые для некоторых сенсоров отличия формы и амплитуды спектра по сравнению с однофотонными данными связан, с большой долей вероятности, с влиянием локального поля окружения хромофора на стационарные дипольные моменты основного и возбужденного состояний. Следствием этого является важность полученных данных о положении изобестических точек для каждого сенсора в двухфотонном формате, так как при выборе длин волн для проведения двухфотонной микроскопии будет ошибочно полагаться на однофотонные спектры возбуждения.

Развитие патологических процессов окисления в тканях зачастую приводит к генерации целого ряда активных форм кислорода, особенно сильное искажение может претерпеть кислотность среды за счет высвобождения свободных протонов H^+ [61]. Одна из важных особенностей сенсора *NuPer7* заключается в слабой чувствительности ратиометрического ответа на H_2O_2 при изменении кислотности среды с 6.5 до 8.5 рН в случае однофотонного возбуждения, что важно подтвердить при двухфотонной накачке [59].

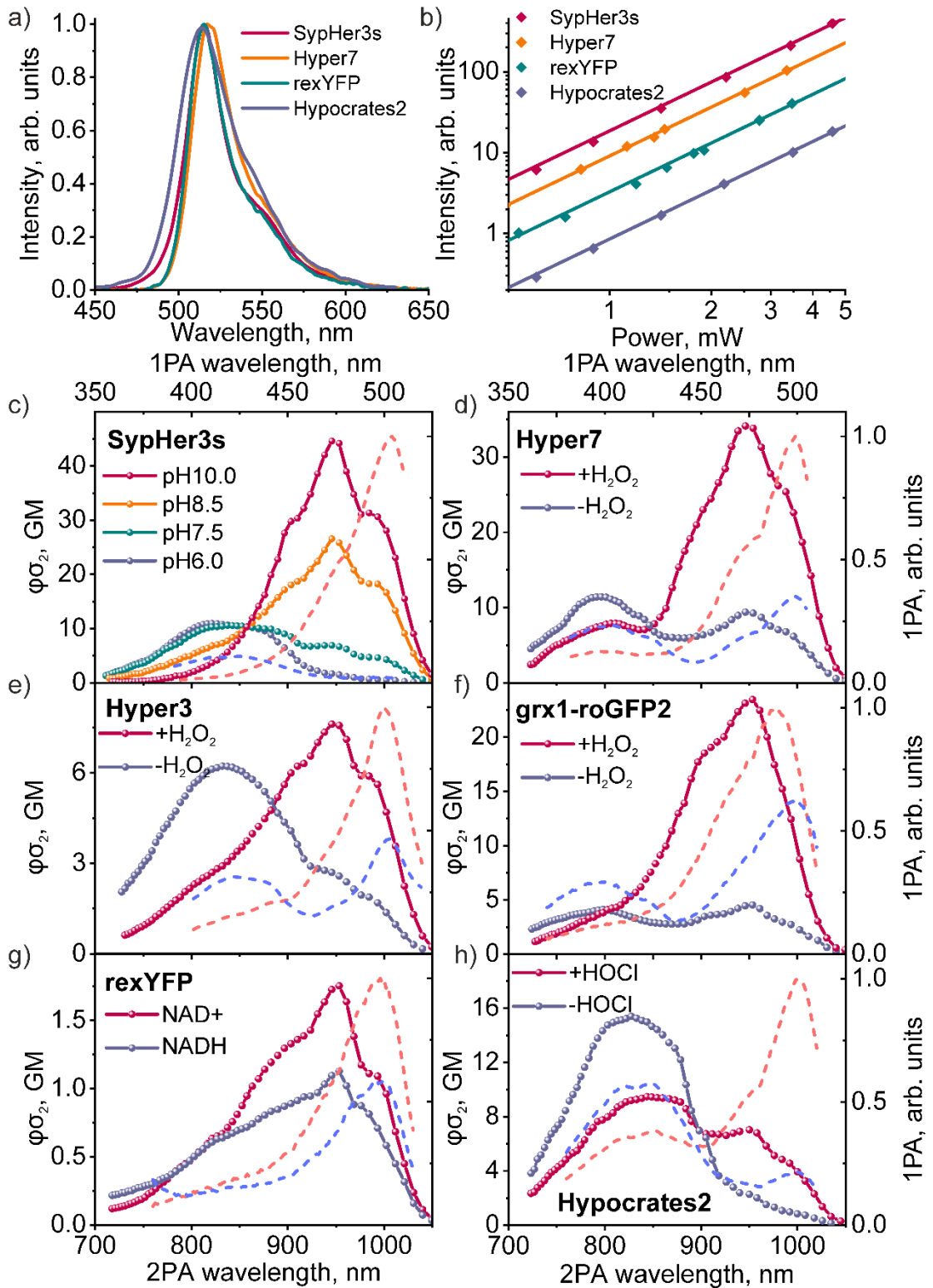


Рис.26 (a) Измеренные спектры флуоресценции при двухфотонном возбуждении сенсоров. (b) Зависимости сигнала флуоресценции от мощности накачки и аппроксимация экспериментальных точек квадратичной зависимостью. (c-h) Измеренные спектры двухфотонного возбуждения в абсолютных значениях сенсоров в отсутствие (синий) и присутствии насыщающей концентрации (красный) аналита. Пунктирными линиями показаны спектры однофотонного возбуждения.

| Сенсор | Аналит | λ_{iso} , нм | $(\varphi\sigma_2)_{max}$, ГМ | 1Ф/2Ф \mathcal{R} |
|---------------------|--------------|----------------------|--------------------------------|---------------------|
| SypHer3s | H^+ | 855 | 45±7 | 194/160 |
| HyPer7HyPer7 | H_2O_2 | 850 | 34±5 | 5.1/5.6 |
| HyPer3 | H_2O_2 | 885 | 8±1.3 | 4.3/7.1 |
| Grx1-roGFP2 | GSH/GSSG | 800 | 23±3.5 | 4.3/6.5 |
| RexYFP | $NAD^+/NADH$ | 800 | 1.8±0.3 | 1.5/1.7 |
| Hypocrates2 | HOCL | 900 | 15±2.4 | 7.2/5.0 |
| Hypocrates | HOCL | 900 | 10±1.5 | 2.3/2.7 |

Таблица 2. Спектроскопические двухфотонные свойства исследуемых белковых сенсоров

Для этого записывались ДФП-спектры окисленной и восстановленной форм в зависимости от кислотности среды от 6.5 pH до 8.5 pH. Концентрации белка и опорного красителя Rhodamine 6G составляли $C_{H7} = 8.1$ мкМ и $C_{6G} = 110$ мкМ. Можно заметить различную тенденцию в изменениях спектров возбуждения для восстановленной (рис. 27.a) и окисленной (рис. 27.b) форм. В окисленном варианте сенсора спектр не изменяя форму монотонно масштабируются при росте pH, что может быть объяснено тушением флуоресценции при протонировании хромофора [127]. У восстановленной формы белка растет только «синий» пик возбуждения, а «красный» не изменяется. Для них построены зависимости отношения регистрируемых сигналов $R^{r,o} = (S^{980}/S^{790})^{r,o}$ для обеих форм HyPer7 (рис.27.c,d). Из-за отмеченного искажения формы спектра заметно влияние pH на ратиометрический сигнал для восстановленной формы белка: $\mathcal{R}^r \equiv R^r(6.5pH)/R^r(8.5pH) \approx 3$ и отсутствие чувствительности для окисленной $\mathcal{R}^o \approx 1$. В случае однофотонного ратиометрического возбуждения на длинах волн 405 нм и 490 нм, отношения между сигналами для восстановленной и окисленной

форм составляет ~ 1.3 и ~ 1.0 , соответственно [59]. Не смотря на проявляющуюся большую чувствительность к кислотности двухфотонного метода опроса HyPer7 в диапазоне $\Delta\text{pH} \approx \pm 0.5$ отношение $R^r(7\text{pH})/R^r(8\text{pH}) \approx 1.4$, что позволяет свободно следить за перекисью при дрейфе pH.

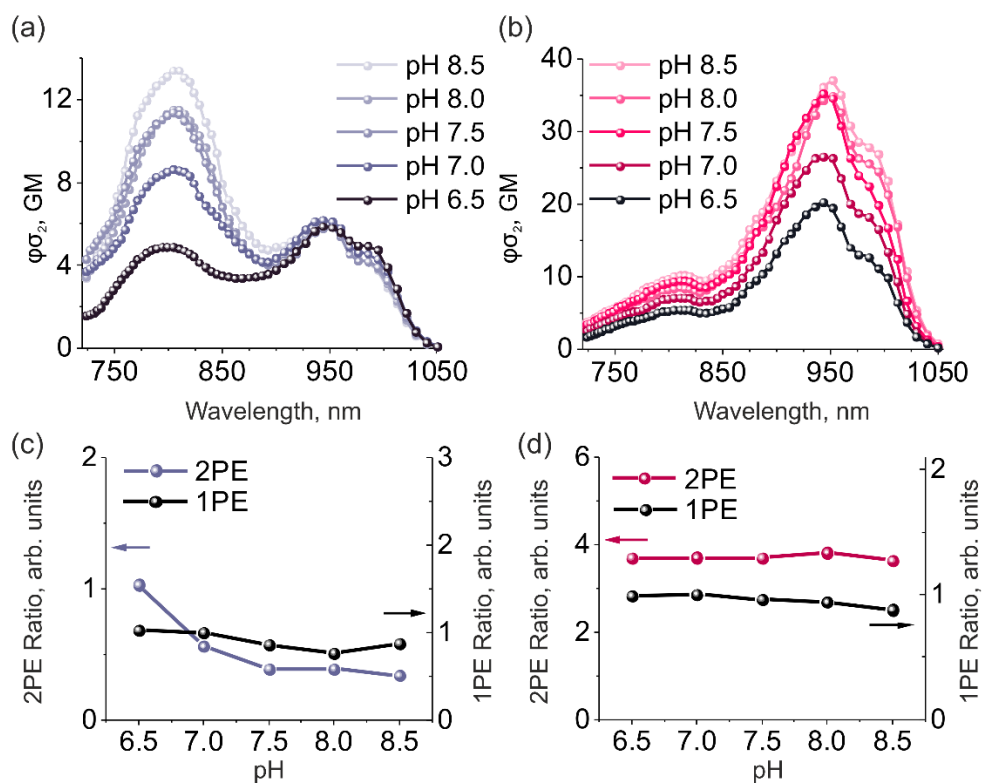


Рис.27 (a, b) Спектр двухфотонного возбуждения восстановленной (a) и окисленной (b) формы белка HyPer7 в зависимости от кислотности среды. (c, d) Отношение яркостей при одно- и двухфотонном возбуждении HyPer7 в полностью восстановленной (c) и окисленной (d) форме.

3.1.3 Исследование спектральных зависимостей двухфотонных яркостей сенсора HyPer-FAST с различными ИК флуорогенами

Описанные выше «зеленые» сенсоры являются мощным инструментом для изучения редокс процессов в живых животных. И, хотя, они позволяют визуализировать отдельные клетки в коре головного мозга, отношение сигнал-шум (SBR) на глубинах $> 200\text{-}300$ мкм становится близким к 1, в особенности на длине волны накачки 790 нм мыши (что впервые продемонстрировано в данной работе, в главе 4). Значительного улучшения SBR можно добиться смещением длины волны возбуждения в красную область, что существенно увеличивает длину рассеяния и уменьшает шумовой сигнал, генерируемый вне фокуса. Для этого необходимо использовать красные или инфракрасные

флуоресцентные белки, область двухфотонного возбуждения которых, очевидно, будет лежать в диапазоне > 1000 нм.

В роли исследуемого образа выступал альтернативный белковый сенсор перекиси водорода HyPer-FAST (HF) на базе белка Y-FAST [128]. Данная конструкция принципиально отличается от стандартных пермутированных сенсоров, так как не обладает собственным хромофором, но при этом может связываться с различными флуорогенами, привнесенными из вне. С другой стороны, она обладает стандартным для семейства HyPer чувствительным доменом OxyR. Таким образом, существует возможность кардинально менять оптические свойства сенсора путем выбора различных флуорогенов, в частности сдвинуть длины волн возбуждения в красную часть спектра, что и является основной причиной перспективности конструкции для двухфотонной микроскопии.

В качестве тестируемых флуорогенов для сенсора HyPer-FAST исследовались HBR-3,5-DOM [129], N871b и 3a [130]. Измеряемые образцы представляли собой растворы в буфере PBS с 2mM TCEP. Концентрация HyPer-FAST во всех образцах составляла $C_{HF} = 50$ μ M. В образцы с сенсором добавлялся с избытком советующий флуороген до $C_{fl} = 200$ μ M. Окисленная форма белка достигалась путем добавления 3 mM H_2O_2 .

Опираясь на однофотонные данные для данных флуорогенов, мы можем оценить необходимый спектральный диапазон двухфотонного сканирования для полноценного спектроскопического анализа, который составил 800-1400 нм. В результате, эксперименты производились на обеих оптических схемах из разделов 2.2.1 и 2.2.2. Для определения абсолютных значений двухфотонной яркости $\varphi\sigma_2$ в эксперименте использовался краситель Rhodamine 6G, растворенный в этаноле до концентрации $C_{Rhod} = 90$ мкМ. Двухфотонный спектр брался из работы A. Rebane et.al [10].

На рис.28 показаны результаты измерений. Представленные данные позволяют проанализировать наиболее перспективные флуорогены с точки зрения эффективности возбуждения в двух предполагаемых модальностях с

использование одной длины волны накачки – двухфотонное возбуждение твердотельным иттербиевым лазером (Yb) на 1040 нм и хром-форстеритовым лазером (Cr:F) на 1240 нм. С учетом спектров высвечивания (рис.28.а), выбранным спектральным диапазоном детекции в последующих экспериментах по многофотонной микроскопии являлся диапазон 600 – 650 нм.

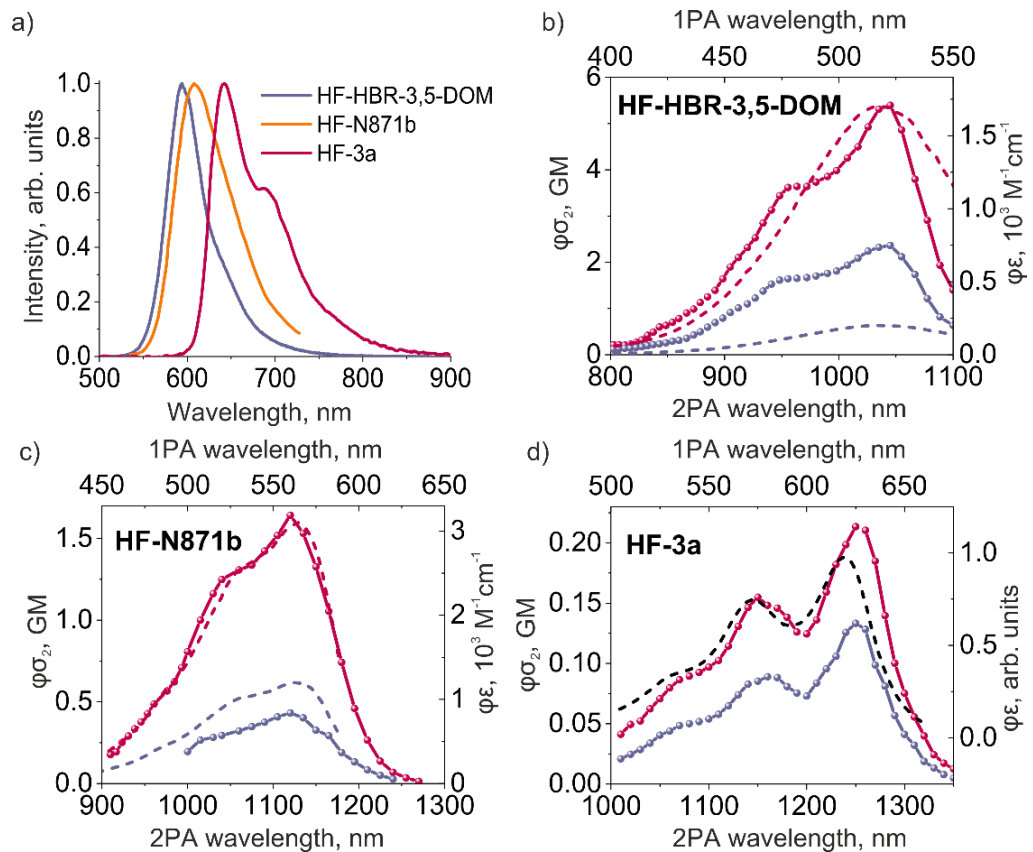


Рис.28 (а) Спектры флуоресценции исследуемого сенсора HFPer-FAST с различными флуорогенами. (b-d) Измеренные двух- (сплошные линии) и однофотонные (пунктирные линии) спектры возбуждения сенсора HFPer-FAST с флуорогенами (b) HBR-3,5-DOM, (c) N871b и (d) 3a, выраженные в абсолютных значениях яркости $\phi\sigma_2$ и $\phi\epsilon$, соответственно. Представлены спектры окисленной (красный) и восстановленной формы (синий).

Рассматривая возбуждение на 1040 нм, двухфотонная яркость сенсора HF в окисленном состоянии с различными флуорогенами и с учетом предполагаемого спектрального окна детектирования выражается, как $(\phi\sigma_2) \times S$,

где $S = \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} F(\lambda) d\lambda / \int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda$, $F(\lambda)$ – нормированный спектр флуоресценции.

Она составила 2.8 ГМ, 0.83 ГМ и 0.04 ГМ для HBR-3,5-DOM, N871b и 3a, соответственно (рис.28.b-d). При возбуждении на 1240 нм, среди флуорогенов

подходят N871b и 3a с двухфотонными яркостями $(\varphi\sigma_2)\times S = 0.05$ ГМ и 0.14 ГМ, соответственно.

Так как данные сенсоры не являются ратиометрическими, был предложен подход с добавлением к белковой конструкции дополнительного опорного флуоресцентного белка. Более подробно данный конструкт будет описан в разделе 3.2.3.

3.1.4 Трехфотонная спектроскопия сенсора кислотности среды *SypHer3s*

Измерения трехфотонных спектров является новой техникой, слабо освещенной в литературе. Для верификации предложенного в разделе 2.2.3 метода можно воспользоваться сравнением со спектрами референсных красителей из статьи [120]. Также косвенным свидетельством валидности метода может служить сравнение с двух- однофотонными спектрами. Для этого были выбраны красители Coumarin540A и Rhodamine B, т.к. они позволяют протестировать весь спектральный диапазон, доступный для сканирования. Полосы интегрирования сигнала флуоресценции устанавливались полосовыми фильтрами на 500-550 нм и 565-615 нм (рис.29.a). Образцы растворялись в тетрахлорметане и этаноле до концентраций $C = 250$ мкМ для C540A и Rhod B, соответственно.

Спектральная область 1100 – 1350 нм сканировалась с помощью ПГС, с параллельной записью сигнала второй гармоники. В спектральном диапазоне 1320-1700 нм использовалась перестройка солитонов в ФК-волноводе, а опорным красителем служил Rhodamine 6G. Перекрытие спектральных окон позволило, в последствии, снять финальные трехфотонные спектры. В ходе измерений на каждой длине волны записывалась зависимость сигнала флуоресценции от положения перетяжки относительно лунки с образцом, а итоговое значение выбиралось на глубине 30 мкм от покровного стекла.

Для Coumarin540A измерения хорошо соотносятся с референсным спектром, а также практически идеально совпадают в точности до нормировки длины волны с одно- и двухфотонными спектрами данного красителями

(рис.29.с). В свою очередь измеренный трехфотонный спектр Rhodamine B (рис.29.d), для которого нет литературных данных, также демонстрирует плавную зависимость яркости от длины волны возбуждения с двумя слабо выраженными пиками на 1400 нм и 1550 нм.

Далее изучался сенсор кислотности среды SypHer3s. Образцы разводились до концентрации $C = 50$ мкМ в заранее титрованных буферах с рН 6.0, 7.5, 8.5 и 10. Полученные спектры (рис.29.b,e,f) демонстрируют ратиометрическую природу сенсора с изобестической точкой на 1220 нм и динамическим диапазоном 26. Интересным является неожиданный стоксов сдвиг пика окисленной формы, приходящегося на 1350 нм, по отношению к утроенной длине волны однофотонного возбуждения (1500 нм) и 1.5λ от двухфотонного пика (1425 нм). Данный факт делает сенсор SypHer3s крайне перспективным в задачах трехфотонного функционального имаджинга глубоких слоев биологических тканей, так как длина волны возбуждения 1350 нм не страдает от сильного поглощения воды. При этом, абсолютные значения трехфотонной яркости составили в пиках восстановленной и окисленной форм $(\varphi\sigma_3)_{\max} = 2 \cdot 10^{-81}$ см⁶ с² и $(\varphi\sigma_3)_{\max} = 1 \cdot 10^{-80}$ см⁶ с², соответственно. Данные значения соотносятся с найденными литературными данными для органических красителей Rhodamine 6G (1300 нм): $\varphi\sigma_3 \approx 6.0 \cdot 10^{-81}$ см⁶ с² и Coumarin 540A (1210 нм): $\varphi\sigma_3 \approx 1.3 \cdot 10^{-81}$ см⁶ с² [120], а также превосходят значения для кальциевого сенсора GCaMP6f (1320 нм): $\varphi\sigma_3 \approx 0.2 \cdot 10^{-81}$ см⁶ с² [121].

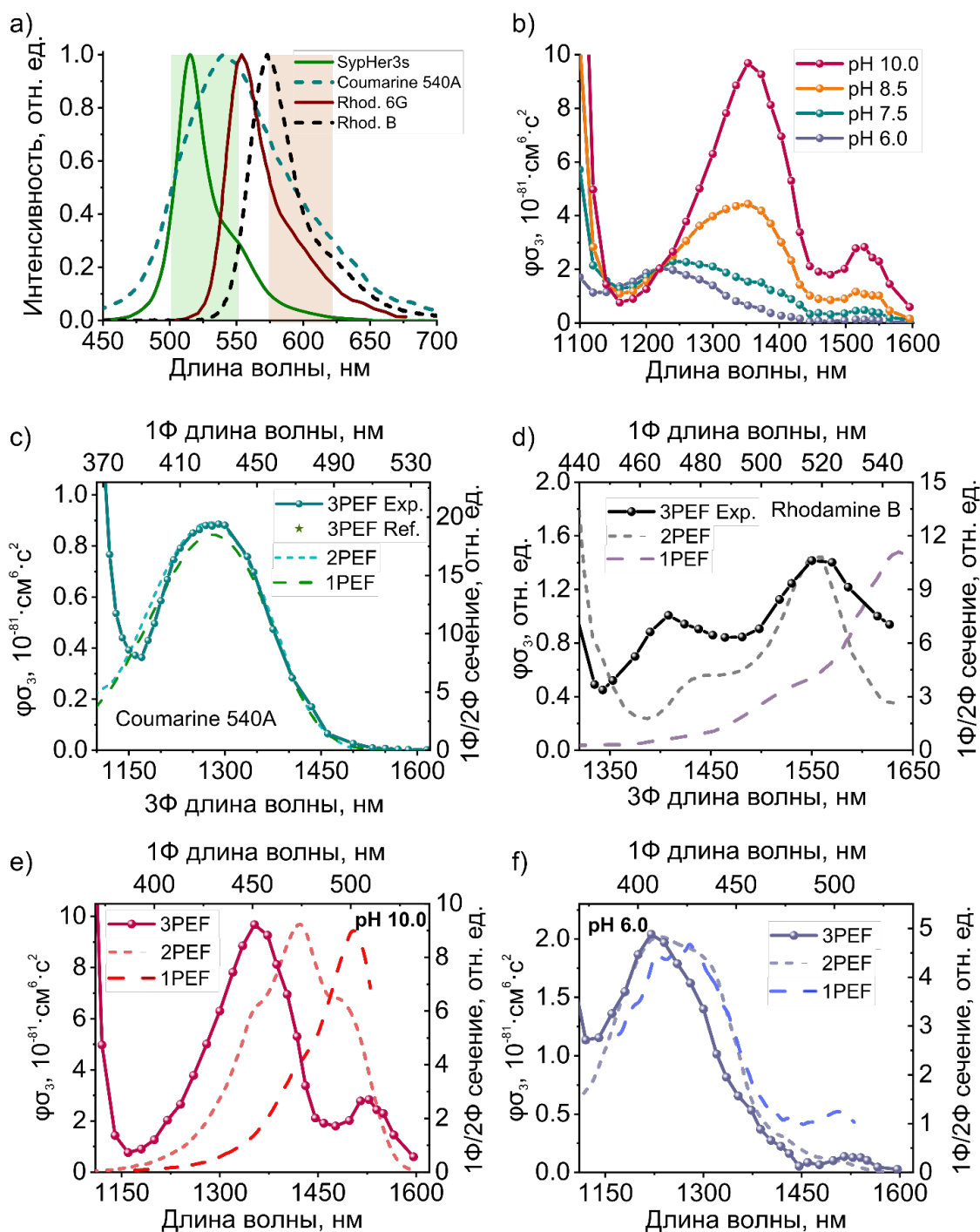


Рис.29 (а) Спектры флуоресценции исследуемых органических красителей и белка SypHer3s. (b-f) Измеренные зависимости относительной трехфотонной яркости от длины волны возбуждения для (а) красителя Coumarin 540A, (с) Rhodamine B и (b) сенсора кислотности среды SypHer3s в зависимости от pH. Также показаны двух- (короткий пунктир) и однофотонные (пунктир) спектры возбуждения соответствующих образцов. Для Coumarin 540A проведено сравнение (звезды) с трехфотонным спектром из статьи [120].

3.2 Визуализация клеточных культур как важная модель апробации методик

Идеальной моделью для начала работы по нелинейно-оптической микроскопии изучаемых сенсоров являются культуры трансфицированных клеток, в цитоплазме которых экспрессируется соответствующий белок. С одной стороны, данные образцы являются удобным источником контраста для тестирования лазерных платформ из раздела 2.3. Проверяется двухцветная попеременная визуализация с субклеточным разрешением, а также однопучковый мультимодальный имаджинг. С другой стороны, культуры клеток можно использовать для полноценного описания возможностей сенсоров детектировать динамики концентраций целевых аналитов в режиме многофотонного возбуждения. Будут промоделированы биохимические отклики системы на добавление аналитов, проведены количественные титровки, позволяющие восстановить абсолютные значения концентраций, определены динамические диапазоны и чувствительности сенсоров.

3.2.1 Измерение динамики абсолютных значений pH и H₂O₂ в клеточных культурах

Эксперименты на культурах клеток были проведены с сенсорами SypHer3s (pH) и HyPer7 (H₂O₂). Так как для дальнейшего перехода к живым тканям и *in-vivo* требуются мощные лазерные системы, титровка обоих сенсоров производилась с помощью модифицированного многофотонного микроскопа из раздела 2.3.2. Альтернативная система на базе суперконтинуума также была проверена на возможность динамических измерений на клетках, экспрессирующих сенсор HyPer7HyPer7.

Были проведены калибровочные измерения на культуре клеток HeLa, когда клетки помещались в буферы с pH 5.5 до 9.0 с шагом 0.5. При каждом новом буфере использовалась свежая культура клеток и при помощи многофотонного микроскопа записывались сигналы двухфотонной флуоресценции SypHer3sSypHer3s при возбуждении на длинах волн 790 нм и 980 нм пяти областей с клетками размером 720x720 мкм². При этом

изображения с обоих лазеров усреднялись по 10 кадрам. Все изображения предварительно сглаживались гауссовым фильтром с радиусом 2 пикселя (2.8 мкм) для уменьшения выбросов. Изображения нормировались на поля лазеров для компенсации уменьшения сигнала на краях области записи, а также вычитался фон, обусловленный автофлуоресценцией густо посаженных клеток и взятый из темных областей кадра. При этом отношение сигнал/фон до удаления последнего в экспериментах с $pH = 6.5-8.5$ составлял $\sim 10 - 15$ для клеток средней яркости. В то же время даже в худшем случае (запись картинок на 980 нм при $pH 5.5$) такое соотношение составляло не меньше 4. Мощности составляли 1.5–2.7 мВт для Ti:S-лазера и 1.5 – 10 мВт для ПГС.

На рисунке 30а показаны сигналы флуоресценции клеток в зависимости от буфера, в который они помещены, и от длины волны, которыми облучаются, а также отношения этих сигналов $R_{980/790}$. Аппроксимация экспериментальных данных была проведена по формуле $\mathcal{R}(pH) = 1 + \frac{(\mathcal{R}_{max} - 1)}{1 + 10^{n(pKa - pH)}}$, где были получены параметры $R_{max} = 1300$, $pK_a = 8.7 \pm 0.1$, и $n = 1.0$. На рисунке 30b приведена характерная визуализация HeLa при двухфотонном возбуждении на длине волны 790 нм. Хорошо видна различная яркость клеток, обусловленная вариацией уровня экспрессии SypHer3sSypHer3s в культуре. Очевидно, что в таком случае использовать индикатор целевых веществ на основе абсолютного сигнала белка, коим может выступать тот же SypHer3sSypHer3s, весьма затруднительно. Однако пользуясь записанным изображением при возбуждении на длине волны 980 нм и полученным из калибровки законом преобразования $R_{980/790} \rightarrow pH$ можно построить карту кислотности с субклеточным пространственным разрешением (рис.30c). При этом мы получаем практически однородное изображение уровня кислотности для всех клеток в поле зрения.

Используя ранее измеренные спектры возбуждения при $pH = 5.0$ и $pH = 11.0$, можно построить карту значений динамического диапазона сенсора SypHer3s, как функцию длин волн пары накачек (рис.30.d). Отдельно

отмечены возможные варианты выбора длин волн в пиках возбуждения ($\lambda_1 = 840$ нм; $\lambda_2 = 940$ нм) с $R = 40$, а также ($\lambda_1 = 840$ нм; $\lambda_2 = 980$ нм) с $R = 240$ и близкая к итоговому выбору длины волн точка ($\lambda_1 = 775$ нм; $\lambda_2 = 980$ нм) с $R = 1600$. Таким образом, выбирая длины волн двухцветной накачки для ратиометрического опроса сенсоров, оправданным является небольшая отстройка от пиковых значений яркости сенсора, приводящая к потере сигнала, но значительно повышающая динамический диапазон изменения ратиометрического сигнала.

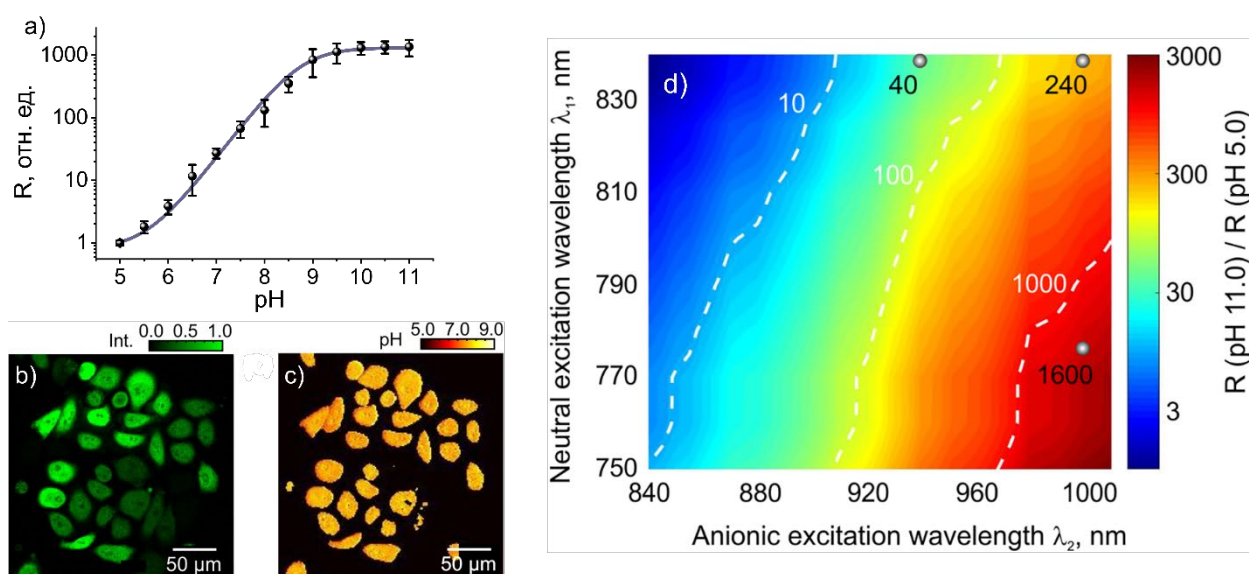


Рис. 30 (а) Зависимость сигнала флуоресценции при двухфотонном возбуждении сенсора SypHer3s на длинах волн 790 нм (синие линии) и 980 нм (черные), отношение этих сигналов (пустые квадраты), и аппроксимация этих отношений (красные линии) в эксперименте на чистом белке (закрашенные фигуры) и с клетками HeLa (пустые фигуры). (b, c) Изображение культуры клеток HeLa с pH = 7,5, полученное при возбуждении на 775 нм и соответствующая карта кислотности. (d) Карта динамического диапазона метода в зависимости от выбранных длин волн накачки, определяемого как отношение отношений сигналов в предельных значениях pH – 5.0 и 11.0. Белыми пунктирными линиями показаны изолиний на значениях 10, 100 и 1000.

Далее нами была проведена апробация разработанной методики на задаче контроля кислотности клеток при добавлении лактата в среду. Эксперименты проводились на культурах клеток HeLa (рис.31a,c,e,g) и нейронов (рис.31.b,d,f,h), экспрессирующих SypHer3s. Чашки различались длительностью ингибирования (40 мин, 12 ч, 2 дня) и концентрацией ингибитора 4-CIN (0, 100 и 400 мкМ). Для HeLa поле зрения выбиралось

равным 720×720 мкм². Мощность накачки на образце составляла примерно 1,5 мВт (Ti:S) и 3,5 мВт (ПГС). В случае с нейронами поле зрения составляло 360×360 мкм², а мощность накачки: 2 – 3,5 мВт (Ti:S) и 4 – 12 мВт (ПГС). Во всех экспериментах записывалась серия последовательных изображений с возможностью временного разрешения до 3 с. с общим времени записи до 1 часа. В большинстве экспериментов, сначала записывалась базовая линия (минимум 5 минут), затем в область поля зрения капали 2,5 мМ лактата, момент капания отмечен на графиках вертикальной штриховой линией. Помимо этого, были записаны контрольные измерения, в которых вместо лактата добавлялся буфер (рис.31.с, 31.d). При обсчете строились индивидуальные временные зависимости среднего сигнала с вычитанием фона для каждой клетки (рис.31.с-f), после чего сигнал пересчитывался в рН. Флуктуации сигнала составляли не более $\Delta C[H^+] \approx 0.05$ рН, позволяя тем самым гарантировано детектировать изменения уровня кислотности среды в обеих сериях экспериментов.

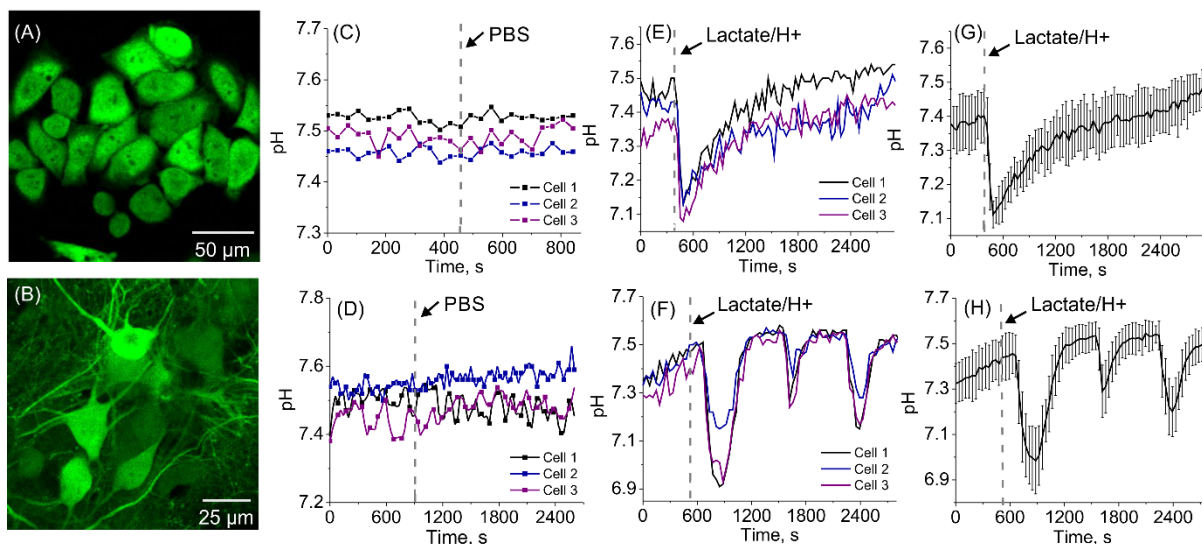


Рис.31 Изображения культур клеток HeLa (a) и нейронов (b), полученные при возбуждении на 790 нм и 980 нм. (c-h) Полученные эволюции кислотностей внутри каждой клетки и в целом для клеток HeLa (c,e,g) и нейронов (d,f,h). (c,d) Динамика кислотности отдельных клеток с добавлением буфера, не приводящего к изменению значения рН и (e,d) с добавлением 2,5 мМ лактата. (g,h) Усреднение значений рН во времени по 11 клеткам. Вертикальная пунктирная линия отвечает времени добавления буфера/лактата.

Далее мы перешли к титровке сенсора НуPer7 на культуре эукариотических клеток HeLa Kyoto, трансфицированных плазмидой рCS2+,

несущей ген HyPer7. Для записи динамики ратиотметрического отклика использовалась схема мультифотонной микроскопии с попеременной накачкой на 790 нм и 980 нм, описанной выше. В ходе эксперимента производилась запись в спектральном канале 500-550 нм изображений размером 580x580 мкм (384x384 пикселя), с усреднением по 2 кадрам для каждой накачки. В таком режиме временной шаг составлял 3.85 с.

Микроскопия проводилась в среде Хэнкса с 20 mM HEPES. В начале ~2 мин. записывался базовый сигнал, далее производились 4 последовательных добавления раствора пероксида в буфере, приводящих к изменению концентрации в диапазоне от 0.25 мкМ до 50 мкМ. Такие измерения были проделаны на 9 чашечках Петри: по 3 серии с добавлением 0.5-1.5-3-7.5 мкМ и 0.25-2.5-4-50 мкМ и 5-10-20 мкМ перекиси. При обработке изображений вычитался фон и накладывался медианный фильтр с диаметром 1 пиксель. Для измерения сигнала выбирались клетки, входящие в 4% самых ярких пикселей (рис.32.а). Полученные для каждой клетки зависимости от времени флуоресценции, возбужденной на 790 нм и 980 нм, сглаживались скользящим средним и находилось отношение $R = S^{980}/S^{790}$. Таким образом, в каждой серии экспериментов учитывалось ~ 20 клеток, динамика ратиотметрического сигнала которых выглядела как ступенчатая функция (рис. 32.б). Стабильные и повторяющиеся уровни нормированного на начальное значение ратиотметрического сигнала при различных концентрациях H₂O₂ позволяло провести титровку сенсора (рис. 32.с), которая была аппроксимирована функцией Хилла $R = 1 + (R_{\max}-1)/(1+(K_a/C[H_2O_2])^n)$ с $R_{\max} = 14.5 \pm 0.4$, $K_a = 3.0 \pm 0.2$ и $n = 1.9 \pm 0.2$. Наблюдается эффект насыщения на концентрациях H₂O₂ > 10 μМ, минимальная чувствительность составляет 0.25 μМ (рис. 32б, вставка). При этом динамический диапазон изменения ратиотметрического сигнала в эукариотических клетках составляет $R_{\text{invitro}} \approx 1 - 14.5$. В однофотонном случае динамический диапазон в случае клеток и белка составляет около 8 [59]. В области линейного роста зависимости ратиотметрического сигнала от концентрации 1 - 10 мкМ возможно

восстановление абсолютных значений концентрации пероксида с точностью $\Delta C[\text{H}_2\text{O}_2] \approx 0.1 \text{ мкМ}$ (рис.32.с, вставка).

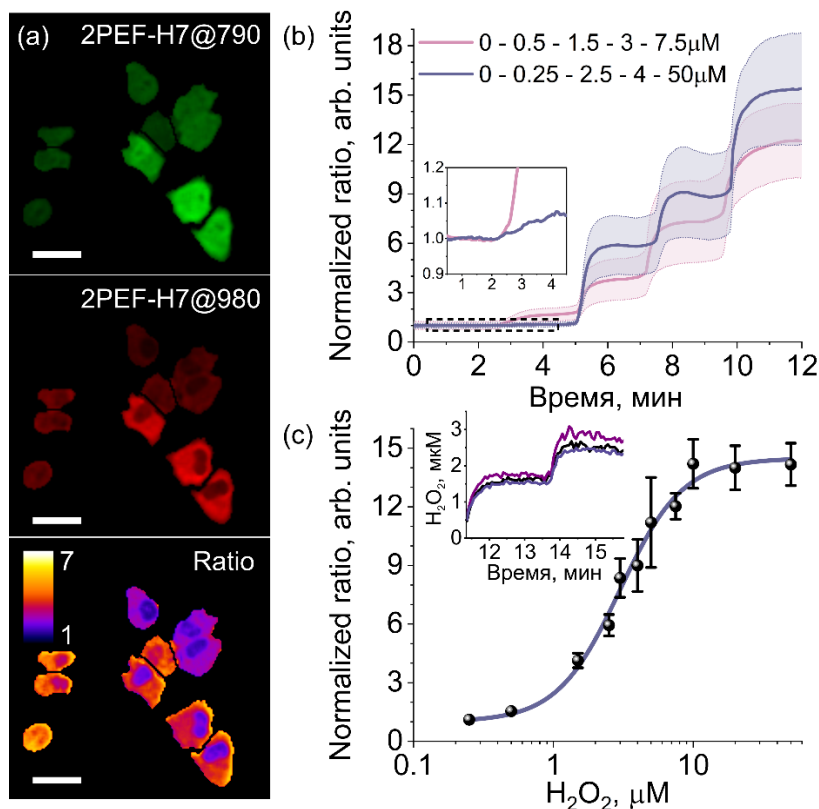


Рис. 32 (а) Изображения двухфотонной флуоресценции NuPer7 в цитоплазме клеток HeLa при возбуждении на 790 нм (зеленый) и 980 нм (красный), а также отношение сигналов флуоресценции при концентрации пероксида 1.5 мкМ. Масштабная шкала 50 мкм. (б) Динамика изменения отношений сигналов двухфотонной флуоресценции при возбуждении на 980 нм к возбуждению на 790 нм в двух экспериментах при добавлении различных концентраций пероксида. (с) Экспериментальные значения отношений сигналов от концентрации H_2O_2 в растворе (точки) и аппроксимация функцией Хилла (линия). На вставке показан пример восстановления абсолютных значений концентрации H_2O_2 для отдельных клеток.

Наконец, аналогичные эксперименты были проведены с использованием волоконного источника суперконтинуума в качестве двухцветной накачки и собранного лазерно-сканирующего микроскопа из раздела 2.3.1. Для этого попеременно записывались флуоресцентные изображения клеток HeLa на одной глубине при переключении накачки между спектральными крыльями «780 нм» и «940 нм». В начале 100-200 с записывался постоянный уровень, далее производились 3 последовательных добавления пероксида, приводящих к изменению концентрации H_2O_2 контролируемым образом.

Изображения клеток (рис.33.а) содержат четко выраженные границы ядер и даже ядрышек, практически не уступая по качеству изображениям, полученным на коммерческом микроскопе выше. Из полученных временных стеков убирались 20% самых тусклых клеток, вычитался фон и накладывался гауссов фильтр с диаметром 0.5 пикселя. Далее изображения из канала «940 нм» делились на изображения из канала «780 нм». В результате получалась динамическая карта отношений сигналов, пропорциональная концентрации H_2O_2 . Далее выбирались 8-12 клеток, усредненные временные зависимости отношений сигналов которых повторяют результат вышеописанного эксперимента (рис.32.б и рис.33.б).

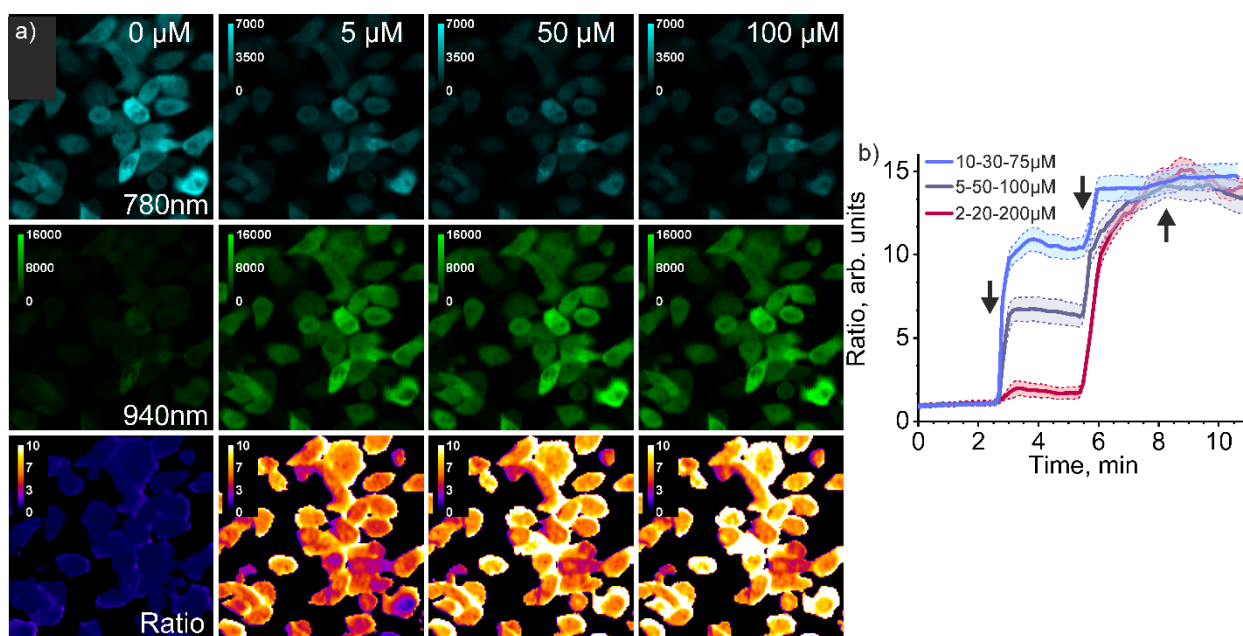


Рис.33 (а) Изображения двухфотонной флуоресценции NuPer7 в цитоплазме клеток HeLa при возбуждении отдельными крыльями суперконтинуума с пиками на 780 нм (циановый) и 940 нм (зеленый), а также отношение сигналов флуоресценции при концентрациях пероксида 0 мкМ, 5 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. (б) Динамика изменения отношений сигналов двухфотонной флуоресценции в трех экспериментах при последовательном добавлении указанных концентраций пероксида.

Проведенные эксперименты также позволили собрать информацию о типичных значениях параметров лазерной накачки, необходимой для визуализации конкретных сенсоров. Средние значения мощности на образце для излучения на 790 нм и 980 нм составили 2 мВт и 4 мВт, соответственно. В условиях сканирования образца со временем выдержки 3 мкс, в каждом пикселе за кадр поглощается энергия 0.07 и 0.23 пДж, что транслируется в

нагрев воды заведомо меньше, чем 0.01 °C и 0.03 °C. Учитывая значительный теплоотвод из микронного объема за время записи кадра ~ 1 с, температура образца остается постоянной. Высокоапертурный объектив с NA1.05 обеспечивает фокусировку в пятно диаметром ~ 0.8 мкм импульсов длительностью 150-200 фс на образце. Таким образом, пиковая интенсивность составляет 35-50 ГВт/см² ГВт/см², что в ~ 5 раз ниже интенсивности для образования одного свободного электрона за импульс путем многофотонной ионизации и в ~160 раз ниже порога оптического пробоя воды [131].

3.2.2 Однопучковая гибридная визуализация фьюзов сенсора HyPer-FAST и опорных флуоресцентных белков

В разделе 2.2.3 были исследованы двухфотонные спектральные яркости сенсора пероксида водорода HyPer-FAST. Найденные спектры возбуждения, лежащие в диапазоне 1000-1300 нм, хорошо подходят к существующим фемтосекундным генераторам на кристалле Yb и Cr:F. Однако, стоит отметить, что сенсор HyPer-FAST не является ратиометрическим, что может привести к артефактам в наблюдаемых динамиках сигнала в *in-vivo* экспериментах. Для решения этой проблемы мы также исследовали возможные флуоресцентных белки, сшиваемые с сенсором, на роль опорного сигнала. При этом, необходимость разделения флуоресценции двух меток накладывает условие на выбор опорного белка из сине-зеленой части спектра, что приводит к нескольким возможным модальностям возбуждения с одновременным двух- и трехфотонным поглощением. На роль опорного маркера были протестированы флуоресцентные белки mTagBFP2, TagCFP, mTurquoise, UnaG. На культуре клеток исследовались относительные двух- и трехфотонные яркости, а также амплитуды откликов на добавления H₂O₂ в режиме мультифотонной микроскопии.

Для прямой проверки яркости предлагаемых белков при трехфотонном возбуждении были приготовлены эукариотические вектора, несущие гены mTagBFP2, TagCFP, mTurquoise и UnaG, а также сенсоры SypHer3s и HyPer7HyPer7, трехфотонная визуализация которых уже была

продемонстрирована [132]. Трансфецированные клетки HeLa возбуждались излучением на длине волны 1240 нм с мощностью на образце 35 мВт или 17 мВт (для двух самых ярких образцов). На рис.34.а представлены относительные трехфотонные яркости белков, нормированные на яркость самого тусклого белка mTagBFP2. Как и ожидалось из анализа одно- и двухфотонных яркостей, наиболее перспективными оказались белки mTurquoise и UnaG. Финальный выбор был сделан в пользу UnaG в силу большей яркости, низким значением $pK_a = 4.0$ и, в последствии, лучшей работы во фьюзах. Его трехфотонная яркость в ~ 460 раз больше mTagBFP2 и в ~ 20 раз превосходит, используемые ранее сенсоры на основе cpYFP (SypHer3s и HyPer7HyPer7), что делает его отличным референсом в паре с относительно неяркими, но двухфотонно-возбуждаемыми сенсорами HF-3a/N871b.

Обсуждаемые выше модальности, а именно чистое двухфотонное возбуждения пары белок-сенсор на длине волны 1040 нм (рис.34.б) и гибридное двух- и трехфотонное возбуждение на 1240 нм (рис.34.с) были верифицированы путем измерения зависимости яркости флуоресценции каждого из образцов от мощности накачки (рис.34.д). Аппроксимация экспериментальных данных зависимостью $I = AP^\alpha$ подтверждают трехфотонную природу возбуждения UnaG на 1240 нм и двухфотонную для всех остальных флуоресцентных маркеров.

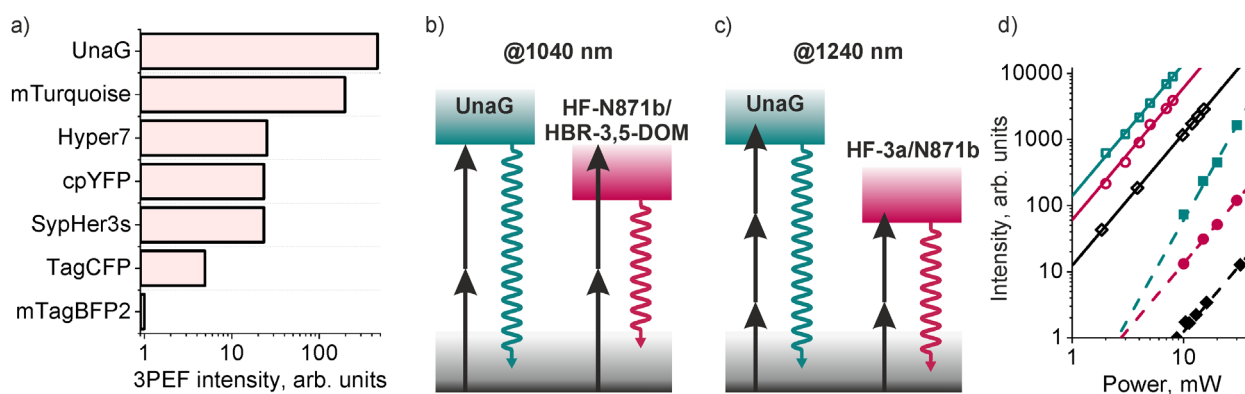


Рис.34 (а) Сравнение интенсивности флуоресценции тестируемых FPs при трехфотонном возбуждении на длине волны 1240 нм в режиме мультифотонной микроскопии культуры клеток HeLa. (б, с) Схема (б) чистого двухфотонного и (с) гибридного двух- и

трехфотонного возбуждения фьюза FP-HF на длинах волн 1040 нм и 1240 нм, соответственно. (d) Зависимости интенсивности флуоресценции от мощности накачки на длине волны 1040 нм (выколотые точки) и 1240 нм (сплошные точки) для UnaG (зеленый), HF-N871b (красный) и HF-3a (черный). Сплошные и пунктирные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных степенными функциями $I = AP^\alpha$. $\alpha=3$ для UnaG-1240 нм (сплошные квадраты); для остальных $\alpha=2$.

Наконец, нами были протестированы различные конструкции фьюзов на предмет абсолютной яркости и амплитуды отклика. Для этого мы записывали временные стеки изображений клеток в обоих каналах с шагом ~ 1.5 с. В начале в течение ~ 2 мин записывался базовый уровень сигнала, далее производилось добавление в чашечку Петри пероксида водорода до концентрации 200 мкМ, являющейся заведомо насыщающей. В качестве возможных линкеров тестировались цепочки из 3 и 8 аминокислот, а также линкер P2A, приводящая к тому, что белок и сенсор синтезируются вместе, но дальше перестают быть связанными. В результате мы не заметили существенных различий в работе фьюзов, однако вариант P2A является менее контролируемый, а среди двух линкеров нами был выбран более длинный (8aa). С другой стороны, было выяснено существенное увеличение яркости UnaG и амплитуды отклика при изменении места сшивания с N-конца на C-конец. Так, яркость UnaG в 2.5 раза больше во втором случае и составляет около 90% от яркости флуоресценции чистого UnaG.

На рисунке 35 представлены результаты экспериментов с выбранными конструкциями HF-HBR-3,5-DOM-8aa-UnaG (рис.35a), HF-N871b-8aa-UnaG (рис.35b) и HF-3a-8aa-UnaG (рис.35c). В случае HBR-3,5-DOM сигнал флуоресценции сенсора незначительно пролазит в канал детекции 500-550нм, что приводит к искажению ратиометрических измерений. Общий динамический диапазон отклика для всех вариантов ~ 5 . При сравнении двух вариантов накачки (1050нм-3мВт и 1250нм-20мВт) для краски N871b получаются практически одинаковые сигналы и для UnaG и для N871b ($\sim 20\%$ ярче при 1050 нм в обоих случаях). Яркость 3a в ~ 3 раза меньше яркости N871b при накачке на 1240 нм, а сравнение HBR-3,5-DOM и N871b при накачке на 1040 нм показывает всего 20% прирост в пользу HBR-3,5-DOM. Таким

образом, конструкции HF-HBR-3,5-DOM-8aa-UnaG и HF-N871b-8aa-UnaG представляются наиболее удачным для возбуждения парой импульсов на длинах волн 1040 нм и 1240 нм.

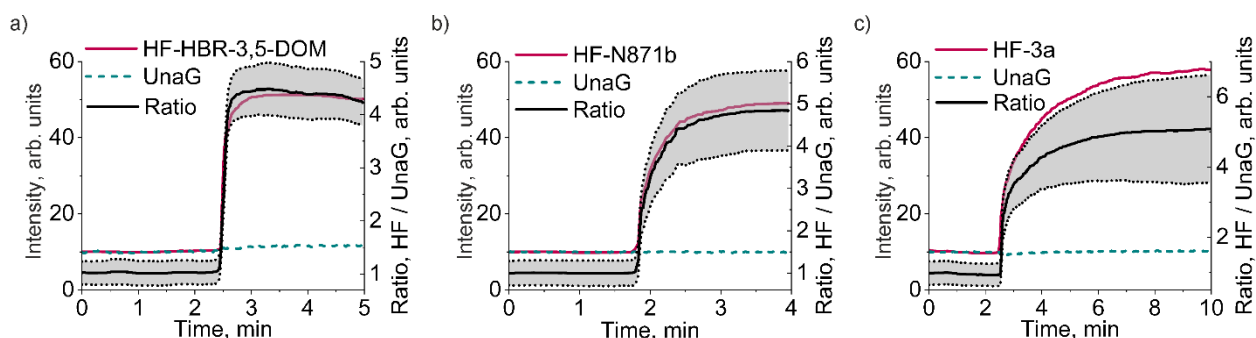


Рис.35 Динамики сигналов флуоресценции при двух- и трехфотонном возбуждении сенсора HF (красный), опорного белка UnaG (зеленый пунктир) и их отношения (черный) в экспериментах по мультифотонной микроскопии культуры клеток HeLa с добавлением насыщающей концентрации пероксида водорода 200μМ. Закрашенная область соответствует стандартному отклонению отношений N клеток. (a) Конструкция HF-HBR-3,5-DOM-8aa-UnaG, 1040 нм, N=24; (b) HF-N871b-8aa-UnaG, 1240 нм, N=20; (c) HF-3a-8aa-UnaG, 1240 нм, N=50.

3.3 Нелинейно-оптическая визуализация сенсорных белков в рассеивающих тканях

Следующее приближение к задаче функциональной визуализации в тканях живых организмов является модель толстых срезов биоптата, зафиксированных в растворе формалина. Не обладая возможностью визуализации концентрационных динамик различных аналитов, мы, однако, можем проанализировать способность системы к построению микроскопических изображений в присутствии сильного рассеяния, на различных глубинах. В данном разделе проиллюстрирована ДФП- и ТФП-микроскопия таких тканей, как кора головного мозга и печень мыши с использованием сенсоров *NuPer7NuPer7* и *SypHer3s*. В дополнении к флуоресцентным методам, будет приведены примеры отличительных морфологических особенностей тканей с помощью микроскопии генерации второй и третьей гармоники, раскрывая в полной мере потенциал мультимодального подхода. Выявленные особенности в построении микроскопических изображений в фиксированных срезах на различных длинах волн возбуждения и различных нелинейностях требует

дополнительного анализа. Выполненные эксперименты на фантоме мозга позволили определить основные параметры, влияющие на качество проводимой микроскопии.

3.3.1 Визуализация нейронов и астроцитов в срезах коры головного мозга мыши

Образцы мозга, использованные в этих исследованиях, были взяты у 8-10-недельных самцов мышей линии C57BL/6, взятых в институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Для окрашивания нейронов 1 мкл аденовируса AAV9-hSyn1-SypHer3sSypHer3s (для экспрессии SypHer3sSypHer3s в цитоплазме нейронов), AAV9-gfap-SypHer3sSypHer3s (экспрессия SypHer3sSypHer3s в цитоплазме астроцитов) или AAV9-hSyn1-HyPer7-dMito (экспрессия HyPer7 в митохондриях нейронов) вводили в кору головного мозга крысы с помощью 5-мкл шприца Hamilton с иглой 33-го размера. Через три недели после инъекции вируса мозг умерщвленных крыс был разрезан на корональные срезы толщиной ≈ 2 мм. Срезы отстаивали в течение 24 часов в 4% растворе формальдегида для предотвращения разложения тканей.

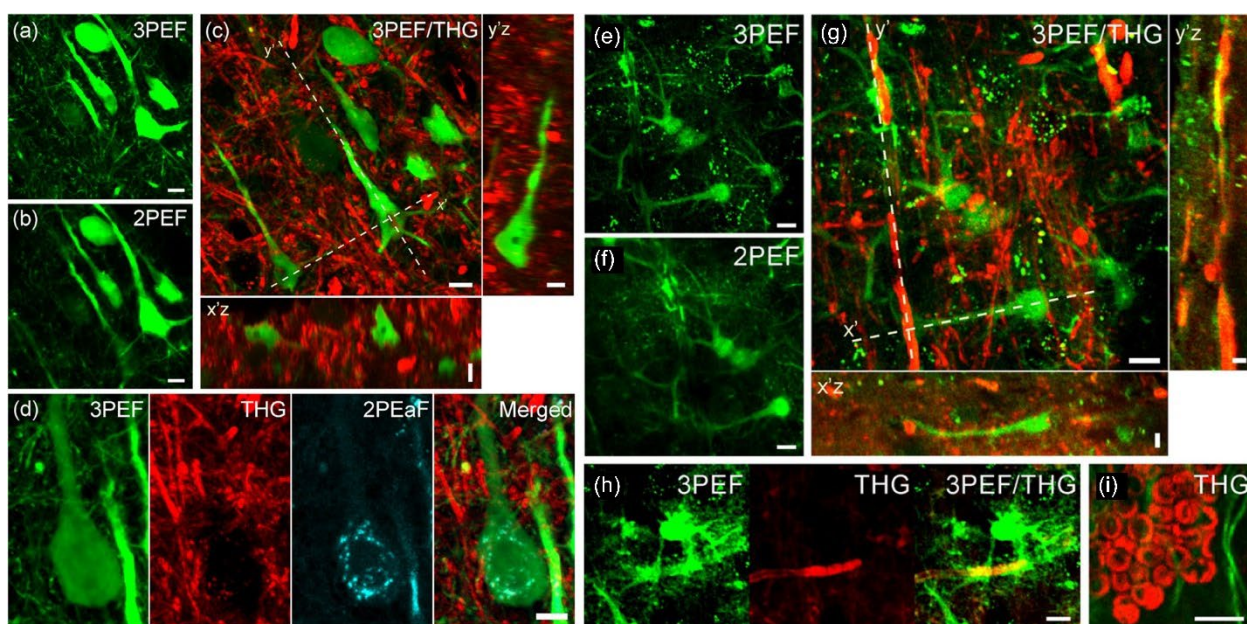


Рис.36 (a, b) Типичные флуоресцентные изображения нейронов, полученные методами (a) двух- и (b) трехфотонной микроскопии SypHer3s, экспрессируемого в телах нейронов коры мозга крысы при накачке на длине волны 790 и 1250 нм, соответственно. (c) Наложение изображений нейронов коры мозга крысы, полученных одновременно методами

микроскопии третьей гармоники (красный цвет) и трехфотонного возбуждения (зеленый цвет) при накачке на длине волны 1250 нм. По бокам приведены распределения сигналов вглубь вдоль плоскостей $x'z$ и $y'z$, отмеченных пунктирными линиями. (d) Изображение нейрона в трех каналах: трехфотонная флуоресценция *SypHer3s* (ЗРЕФ), третья гармоника (ТНГ), двухфотонная автофлуоресценция на ~650 нм (2РЕаF), и совмещенное изображение. Масштабные линейки 10 мкм. (e,f) Трех- и двухфотонные изображения астроцитов. (g,h) Картирование астроцитов и кровеносных сосудов в коре мозга крысы, образующие глиаваскулярные интерфейсы, при помощи микроскопии генерации третьей гармоники (красный цвет) и трехфотонного возбуждения флуоресценции *SypHer3s*, экспрессируемого в телах глиальных клеток. (i) Изображения отдельных эритроцитов в сосуде при микроскопии третьей гармонике.

В начале необходимо научиться определять основные источники контраста по их микроскопическим изображениям. Были проведены эксперименты по картированию нейронов, астроцитов и глиаваскулярных интерфейсов в коре мозга крысы при помощи объединения нескольких методик визуализации: двух- и трехфотонное возбуждение флуоресценции сенсора кислотности *SypHer3s/SypHer3s*, экспрессирующегося в цитоплазме клеток, генерация третьей оптической гармоники от оптических неоднородностей ткани и кровеносных сосудов, двухфотонная автофлуоресценция органелл в клетках (рис.36). Флуоресцентная микроскопия, ожидаемо дает полное представление о морфологии отдельных клеток, включая отростки (рис.36.a,b,e,f). Оптическое секционирование позволяет рассмотреть изучаемую область в различных разрезах (рис.36.c,d). Интересным является повсеместное присутствие контраста за счет сигнала третьей гармоники (красный канал на рис.36). Можно выделить два основных источника этого сигнала – эритроциты (рис.36.i) и миелиновые оболочки отростков нейронов, пронизывающих всю ткань. С другой стороны, области отсутствия сигнал ТГ отлично колокализуются с телами клеток. Комбинация методов раскрывает ещё более сложное устройство ткани, например, визуализирует опутывание отростками астроцита кровеносный сосуд, т.е. так называемый глиаваскулярный интерфейс (рис.36.g).

Далее мы перешли к исследованию качества построения изображений по мере увеличения глубины визуализации. Для сравнения возможностей глубокой визуализации сенсора *HyPer7* при двух- и трехфотонном

возбуждении были записаны сигналы двух- и трехфотонной флуоресценции NuPer , в зависимости от глубины при возбуждении на длинах волн 790 нм и 980 нм (рис.37). Было произведено сравнение изображений, получаемых на глубинах 40 мкм (рис.37.a), 120 мкм (рис.37.b) и 160 мкм (рис.37.c) от поверхности различными методиками. В приповерхностном слое все изображения получаются приблизительно одного качества (рис.37.a): отчетливо видны форма клетки, ее ядро, можно разглядеть отдельные митохондрии и отростки. Были построены профили сигналов через сому клетки в поперечном и продольном направлениях (рис.37.d,g). Двухфотонные сигналы повторяют друг друга, тогда как трехфотонный, не предоставляя новых деталей, имеет подавленный в ~ 10 раз (при $x \approx 13$ мкм и $z \approx 17$ мкм) уровень фонового сигнала из ядра, где светящихся митохондрий быть не должно. Полученные стеки позволили произвести трехмерную реконструкцию нейронов в глубине среза. При увеличении глубины проникновения бросается в глаза быстрое замутнение изображений, получаемых двухфотонной микроскопией. На глубине 120 мкм выделить ядро используя накачку на 790 нм уже не удастся. Дальнейшее увеличение глубины до 160 мкм приводит к полной потере изображений нейронов в случае высокочастотной накачки на 790 нм, а также потере деталей на изображениях на длине волны 980 нм и сохраняющейся высокой контрастности сигнала трехфотоники. Существенное ухудшение качества изображения с глубиной при возбуждении на 790 нм по сравнению с 980 нм, может быть обусловлено увеличенным автофлуоресцентным фоном и более сильным рассеянием, приводящим к быстрой потере полезного сигнала с глубиной. Записанные трехмерные стеки позволил построить трехмерные изображения клеток и зависимости среднего сигнала клеток от глубины. Полученные экспериментальные кривые при разных длинах волн возбуждения хорошо ложатся на затухающую зависимость $I=I_0\exp\{-\beta z/l\}$, где $\beta = 2, 3$ порядок многофотонного процесса, l , характерная длина затухания сигнала при данной длине волны накачки: $l_{790} = 52$ мкм, $l_{980} = 66$ мкм, $l_{1250} = 93$ мкм. Основной вклад

в эту длину дает потеря баллистических фотонов накачки за счет рассеяния $l \approx l_{sc}$ [22,25]. Получившиеся скорость затухания сигнала в ~ 2 раза больше, чем для экспериментов *in vivo*, что отмечалось в других работах с фиксированными срезами мозга и связана с вымыванием выравнивающей показатель преломления межклеточной жидкости, а также формированием в формальдегиде более ригидных химических связей, необходимых для сохранения морфологии ткани [23].

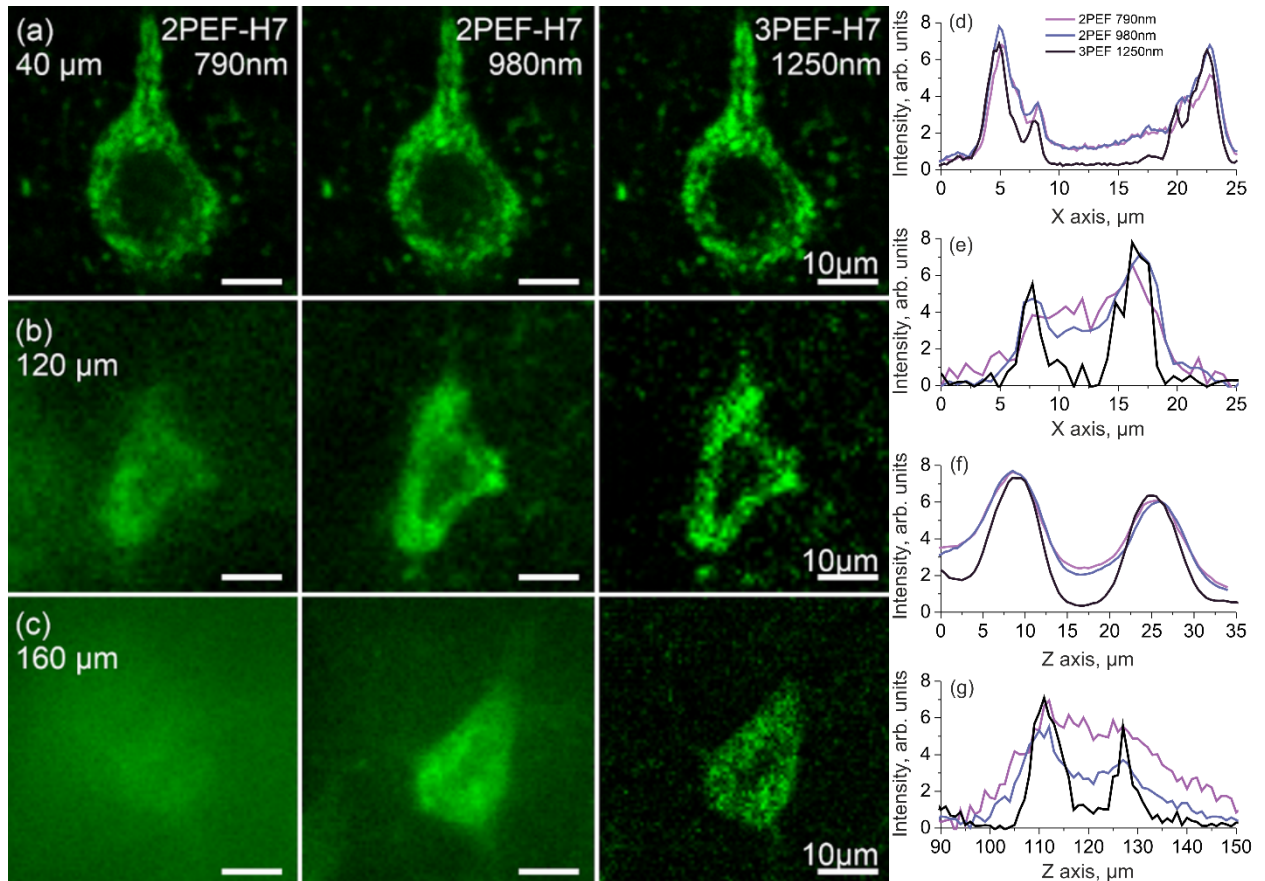


Рис. 37 Сравнение двух- и трехфотонных изображений NeuPer7 в митохондриях нейронов фиксированного среза мозга мыши *ex vivo* на глубинах 40 мкм (а), 120 мкм (б) и 160 мкм (в) при возбуждении на 790 нм (левый столбик), 980 нм (центральный столбик) и 1250 нм (правый столбик). (d – g) Сравнение профилей сигналов двух- и трехфотоники в латеральном (d, e) и аксиальном (f, g) направлениях на глубинах 40 мкм (d, f) и 120 мкм (e, g) при возбуждении на 790 нм (розовая линия), 980 нм (синяя линия) и 1250 нм (черная линия).

3.3.2 Параметры и особенности построения изображения при многофотонной микроскопии на фантоме мозга

Перед тем как переходить к микроскопии живых тканей остается вопрос о процессе распространения лазерного излучения в сильно рассеивающих средах. Основные характерные черты, а также принципиальные отличия двух-

и трехфотонной микроскопии, можно пронаблюдать на фантоме мозга, представляющего из себя смесь микронных флуоресцентных и рассеивающих полистироловых шариков. Эта простая модель позволяет измерить разрешающую способность микроскопа и её ухудшение с увеличением глубины визуализации; определить динамики падения сигнала в следствии рассеяния и соотношения сигнал-шум с глубиной и, в конечном счете, выявить причины, ограничивающие возможности двух- или же трехфотонной микроскопии.

Для исследования основных особенностей распространения излучения на целевых длинах волн 790, 980 и 1240 нм в рассеивающих средах, были записаны z-стеки для модельного образца с характерными длинами рассеяния близкими к фиксированному мозгу с редким включением флуоресцирующих шариков. Рассеивающей основой фантома была взвесь 0.9-мкм прозрачных полистироловых шариков с концентрацией $\sim 8 \times 10^9$ шариков/мл (CLB9 Sigma-Aldrich) в низкотемпературной агарозе, обогащенной флуоресцентными шариками диаметром 2 мкм (L4530 Sigma-Aldrich), взвешенных в количестве $\sim 1.5 \times 10^8$ шариков/мл. Хромофор шариков подбирался таким образом, чтобы проявлять свойства двух- и трехфотонного возбуждения накачками на 790 нм, 980 нм и 1240 нм, соответственно. Большой сигнал от шариков за счет яркого хромофора и относительно большого размера позволила наблюдать монотонное экспоненциальное падение сигнала в динамическом диапазоне $\sim 10^6$ при адресации к объектам на глубине до $7l_{sc}$ (Рис.38.b). Характерные длины потерь с учетом многофотонности процессов $l_{790}^{bd} = 55$ мкм, $l_{980}^{bd} = 76$ мкм, $l_{1240}^{bd} = 105$ мкм, что хорошо соответствует длинам рассеяния серого вещества фиксированного мозга [23]. Загибы в зависимостях для длин волн накачки 790 нм и 980 нм на глубинах ~ 350 мкм и ~ 500 мкм объясняются достижением сигнала от шарика значения фона. При погружении вглубь изображение несет полезную информацию об объекте, пока соотношение сигнал фон $SBR \equiv I^{bd}/I^{bg}$ не падает до 1 (Рис.38.c). Характерные длины экспоненциального падения SBR на длинах волн 790 нм, 980 нм и 1250 нм

равны $l^{\text{SBR}}_{790} = 41$ мкм, $l^{\text{SBR}}_{980} = 48$ мкм и $l^{\text{SBR}}_{1240} = 37$ мкм. на основании чего можно оценить характерные длины падения абсолютного значения фонового сигнала $l^{\text{bg}} = l^{\text{bd}} l^{\text{SBR}} / (l^{\text{SBR}} - l^{\text{bd}})$, что дает $l^{\text{bg}}_{790} \approx 88$ мкм и $l^{\text{bg}}_{980} \approx 186$ мкм. Фон обусловлен возбуждением флуоресцентных шариков вне фокуса мощным сходящимся конусом накачки. Представленный случай равномерного распределения шариков в пространстве синонимичен обширной экспрессии белка у генетически модифицированных мышей или большой зоне заражения при вирусной доставке генетических конструкций. Важно отметить отличающуюся природу падения SBR у трехфотонного сигнала, для чего были построены зависимости сигналов фона и шариков при непрерывной подстройке мощность лазера (Рис.38.d). При этом средний уровень сигналов от шариков лежит на верхней границе динамического диапазона АЦП микроскопа $\sim 10^4$ (Рис.38.d), а фон для двухфотоники на глубинах до 100 мкм ($1.5-2l_{\text{sc}}$) формируется темновыми шумовыми токами ФЭУ занимающие низшие разряды АЦП < 10 . Опускаясь глубже при двухфотонном возбуждении возникает равномерный фоновый сигнал, экспоненциально растущий на длинах волн той же скоростью как SBR, который, сравниваясь с сигналом шариков на глубинах ~ 350 мкм и ~ 500 мкм, что определяет предельную глубину визуализации при наличии избытка мощности накачки. В длинах рассеяния эта предельная глубина равна $\sim 6-7l_{\text{sc}}$, и определяется яркостью хромофора и плотностью шариков [25,133]. В трехфотонном случае на всей глубине визуализации ~ 550 мкм ($\sim 5l_{\text{sc}}$), при варьировании мощности накачки более чем в 100 раз, фоновый сигнал не достигает уровня темновых отсчетов ФЭУ, а загибы кривых на зависимостях SBR (Рис.38.c) и нормализованного сигнала (Рис.38.d) на глубинах более 350 мкм связано с исчерпанием запаса мощности лазера.

Помимо сильного фонового сигнала двухфотонная микроскопия продемонстрировала потерю пространственного разрешения на больших глубинах. Используя знания о продольном разрешении каждой из методик на основе измерения 500-нм шариков, были получены оценки изменения

продольного разрешения техник с глубиной на базе деконволюций продольных профилей 2-мкм-шариков (Рис.38.е). Проявились линейные зависимости увеличения z-разрешения каждой из методик $z\text{-PSF}^{\text{norm}} = 1 + \alpha z$, где $\alpha_{790} = 2.4 \pm 0.2 \text{ mm}^{-1}$, $\alpha_{980} = 1.2 \pm 0.1 \text{ mm}^{-1}$ и $\alpha_{790} = 0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^{-1}$. Потеря разрешения обусловлена эффективным уменьшением NA фокусировки в глубокие слои из-за повышенных потерь на рассеянии излучения, идущего под большими углами [25]. Более слабое влияние на разрешение трехфотонной микроскопии обусловлено меньшим рассеянием и меньшим заполнением зрачка объектива, что важно для использования полной мощности лазера. В результате, z-разрешение двухфотонных техник на предельных глубинах на длинах волн увеличилось с 1.3 мкм до ~2.2 мкм и с 1.4 мкм до ~2.0 мкм на 790 нм и 980 нм, в то время как трехфотонное возбуждение демонстрирует на всем протяжении ~1.65 – 1.85 мкм. Измерения 0.5-мкм шариков с такой же концентрацией в нерассеивающей среде толщиной до 1000 мкм не проявили изменения продольного разрешения ни в одной из методик. Измерения сигнала от уединенного 0.5-мкм-шарика в динамическом диапазоне ~5 порядков позволил проявить лучшее подавление сигнала трехфотонной микроскопии вне фокальной плоскости, чем двухфотонной (Рис.38.f). Записанные профили были восстановлены при помощи расчета жесткой фокусировки высоко апертурным объективом на базе функции Грина, что позволило восстановить форму пучка в деталях [134,135]. Не обращаясь к численному расчету, динамики спадов 2PEF и 3PEF сигналов при удалении от центра шарика вдоль z могут быть хорошо аппроксимированы в параксиальном приближении $\sim(1 + ((z - z_0)/b)^2)^{-\beta}$, где b конфокальный параметр, $\beta = 2, 3$ порядок многофотонности (Рис.38.f). На удалении $z - z_0 \approx 12$ мкм от яркого источника сигнал трехфотоники примерно в 10 раз слабее двухфотоники. Именно относительно слабый спад сигнала с расстоянием приводит к регистрации заметного фонового сигнала в двухфотонике.

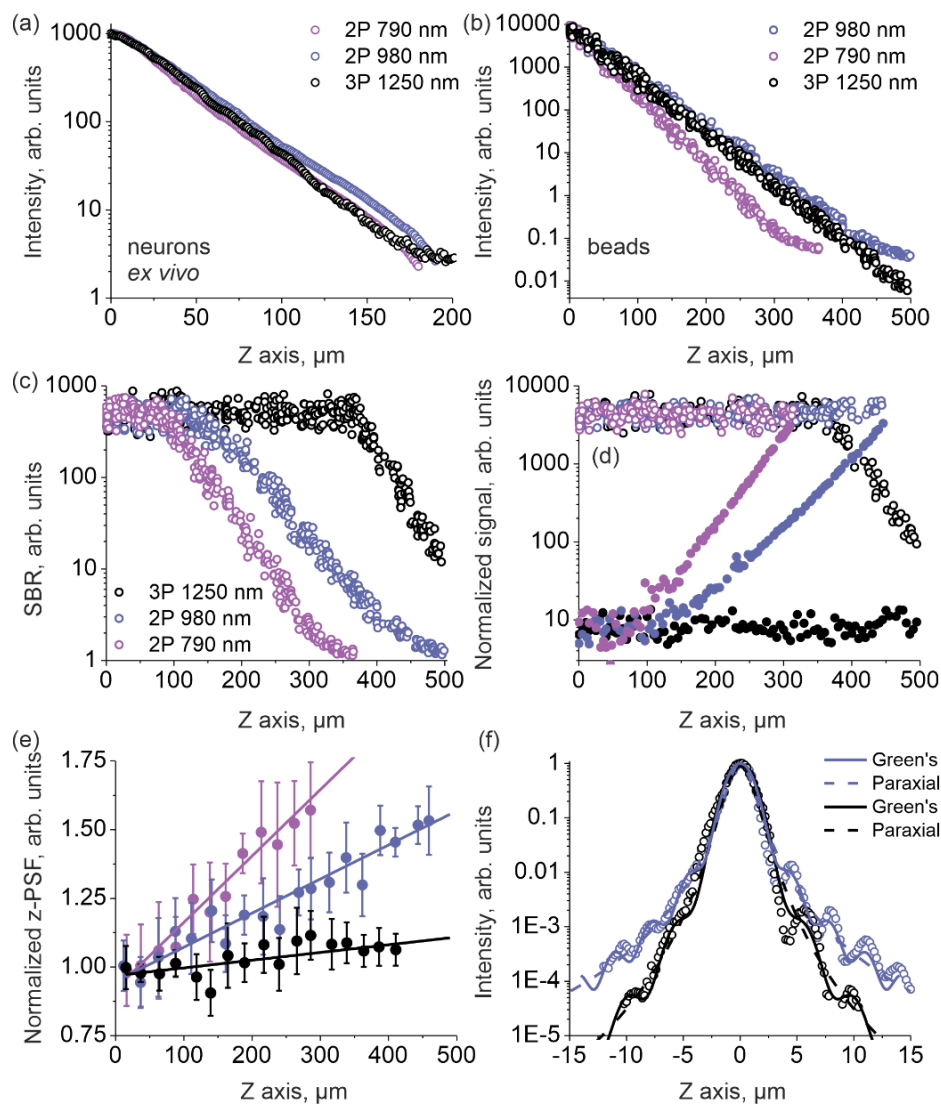


Рис.38 Зависимости сигналов NuPer7-нейронов в фиксированном срезе (a) и флуоресцирующих 2-мкм шариков (b), отношение сигнал-фон (c) и нормированные сигналы от шариков (полые круги) и фона (заполненные круги) от глубины z при двух- и трехфотонном возбуждении на 790 нм (фиолетовый), 980 нм (синий) и 1250 (черный). (e) Нормированное продольное разрешение двух- и трехфотонной микроскопии на длинах волн 790 нм (фиолетовый), 980 нм (синий) и 1250 (черный) и аппроксимация линейными зависимостями (линии). (f) Экспериментальные (черные круги), численные (сплошные линии) и аналитические (пунктирные линии) ДФП и ТФП z-профили 500-нм шарика при накачке на 980 нм (синий) и 1250 нм (черный).

3.3.3 Мульти模альная нелинейно-оптическая визуализация морфологии и биосенсоров в срезах печени мыши

Построенная система позволяет визуализировать ткани печени, при этом существенную роль играют сигналы автофлуоресценции и второй/третьей гармоники. Таким образом открывается возможность безмаркерной микроскопии, в частности исследование морфологии печени при различных патологиях. На рис.39 представлены изображения среза печени мыши,

полученные при 2Ф и 3Ф возбуждении автофлуоресценции внутренних флуорофоров и генерации гармоник излучением на центральных длинах волн 790 нм, 980 нм и 1250 нм. Несмотря на широкий спектр используемых накачек, записываемые изображения двухфотонной и трехфотонной автофлуоресценции в зеленом и красном каналах выглядят похоже. Отлично различимы портальные вены, синусы, отдельные гепатоциты и ядра в них. Основным источником автофлуоресценции гепатоцитов в зеленом канале являются флавиопротеины. Основным источником флуоресценции в цитоплазме здоровых гепатоцитов является NADH и FAD.

На изображениях с большим увеличением между гепатоцитами проявляются стеллатные клетки, содержащие витамин А в липидных каплях (ЛК). На изображениях от гепатоцитов они отличаются формой и смещенной в красную часть спектра автофлуоресценцией цитоплазмы. Различные формы витамина А демонстрируют высокую эффективность двухфотонного возбуждения от длины волны 790 нм [7], что проявляется как самые яркие сферические особенности на флуоресцентных изображениях. Помимо яркого трехфотонного сигнала автофлуоресценции, эти капли являются источниками мощной третьей гармоники. Высокая эффективность этих процессов может быть объяснена большим количеством TAGs липидов, входящие в состав капель и обладающие высокой нелинейностью [8], а также наличием промежуточного двухфотонного резонансного перехода вблизи длины волны 815 нм [136]. Помимо богатых витамином А больших капель третья гармоника проявляет располагающиеся в цитоплазме гепатоцитов липидные капли микронного и субмикронного размеров. Вторая гармоника на срезе здоровой печени проявляется лишь от капсуля на периферии среза и отдельных фибрилл экстрацеллюлярного матрикса вокруг синусов.

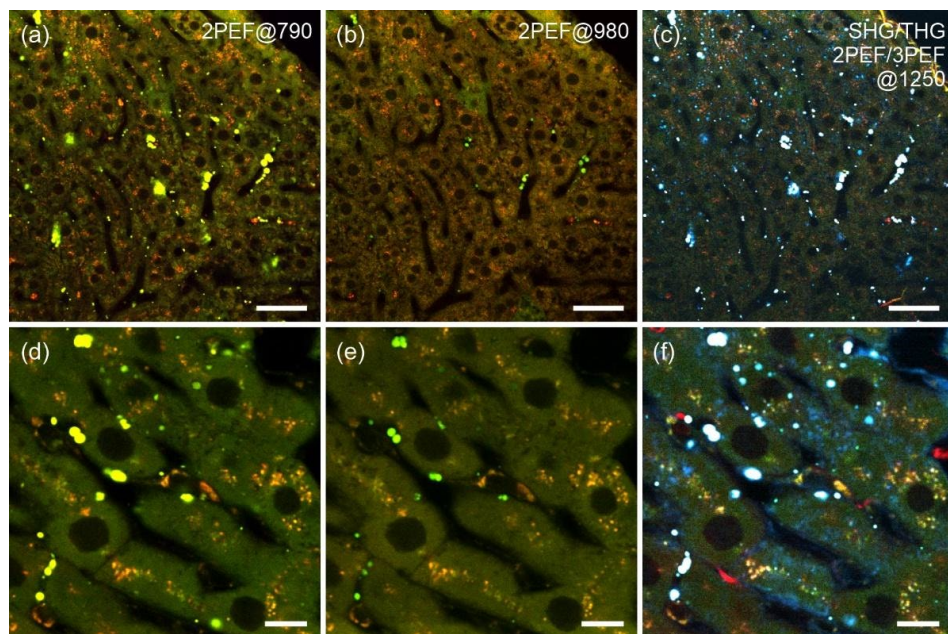


Рис.39 Многофотонные изображения нормальной печени с маленьким (а-с) и большим (d-f) увеличением, полученные при возбуждении на длинах волн 790 нм (а, d), 980 нм (b, e) и 1240 нм (с, f). Зеленый и красный каналы относятся к двух и трехфотонной флуоресценции и ГВГ в диапазонах 500- 540 нм и 590-650 нм, соответственно. Циановый канал демонстрирует ГТГ в диапазоне 385-425 нм. Масштабная черта 50 мкм (а-с) и 10 мкм (d-f).

Далее мы перешли к визуализации толстых срезов печеней на различных стадиях развития гепатоцеллюлярной карциномы. На рис.40 представлены три характерные изображения мультфотонной микроскопии печени на ранней стадии болезни на длинах волн накачки 790 нм и 1250 нм, при которых особенности морфологии проявляются наиболее отчетливо. Наблюдается большой дефицит липидных капель в stellate клетках, при этом сами клетки могут быть различимы по специфической форме, расположению и сдвинутой в красную область флуоресценцией из цитоплазмы. В первой области (рис.40.b,c) структура гепатоцитов и их автофлуоресценция слабо отличаются от нормальной ткани, однако, ГТГ микроскопия выявляет целую россыпь липидных капель внутри гепатоцитов. Слабый уровень автофлуоресценции и высокий уровень гармоник указывают, что такие капли в основном состоят из липидов с малым количеством витамина А и указывают на развитие ранних стадий стеатоза.

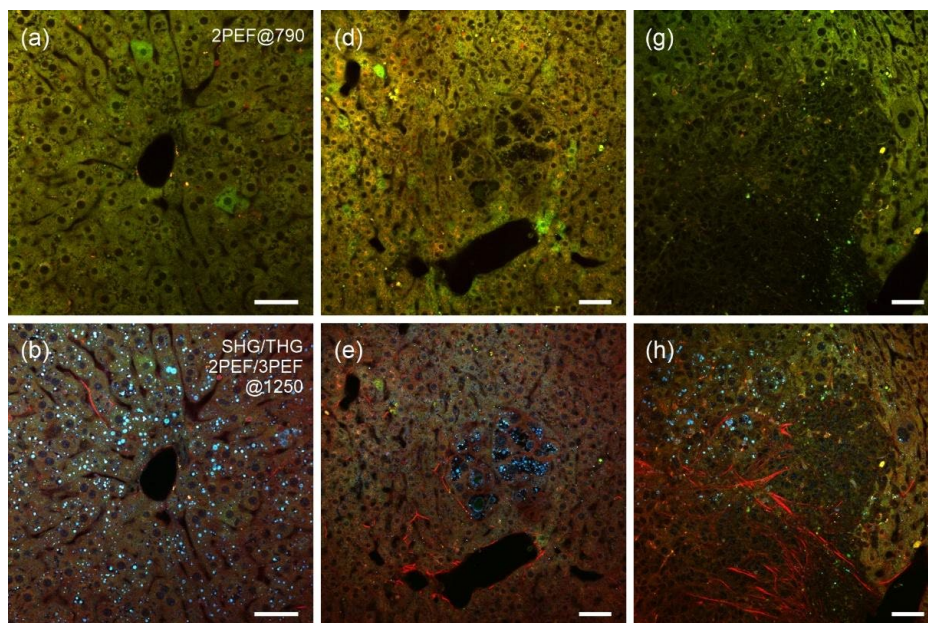


Рис.40 Изображения печени с ранней стадией гепатоцеллюлярной карциномы, полученные при возбуждении на 790 нм (а, с, е), и 1240 нм (b, d, f). Показано изменение количества липидных тел (а, b), небольшая область некроза (с, d) и некроз с фиброзом (е, f).

Далее были проведены исследования различных способов доставки вирусного конструкта, несущего ген флуоресцентного сенсора HyPer7HyPer7. Гидродинамическая доставка генов включает быструю инъекцию большого объема раствора ДНК в организм (рис.41.а,d). Скорость и объем создают давление, заставляющее генетический материал проникать в клетки. Также возможен прямой закол вирусной конструкции (рис.41.б,е) и комбинация двух методов (рис.41.с,ф). В результате, комбинация двух методов демонстрирует существенно более высокий уровень экспрессии.

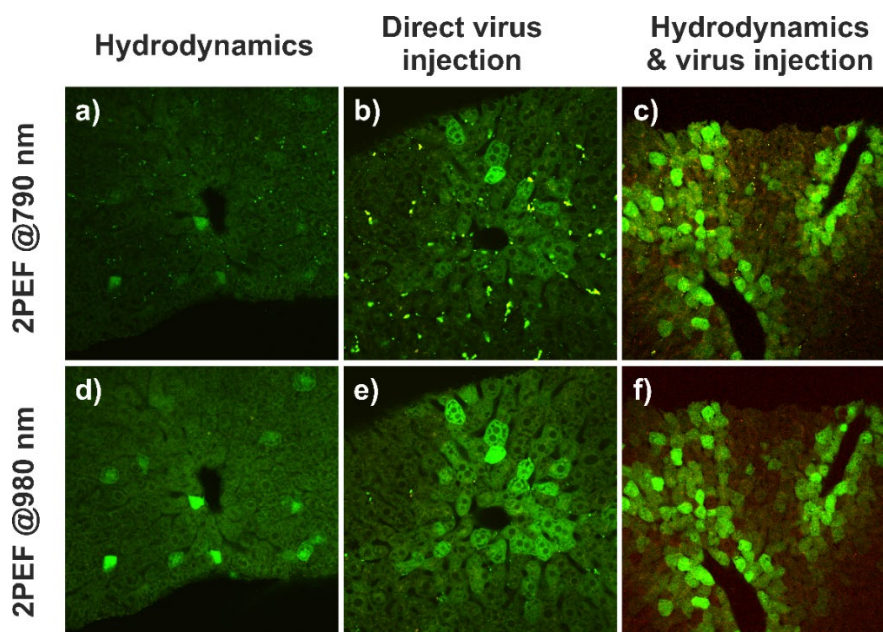


Рис.41 Изображения флуоресценции сенсора SyPer7 в гепатоцитах среза печени, доставленного (a,d) гидродинамическим способом, (b, c) прямой инъекцией вируса и (c,f) их комбинацией. Изображения получены при двухфотонном возбуждении на (a-c) 790 нм и (d-f) 980 нм.

3.4 Мониторинг динамики АФК в нейронах живого мозга в острых экспериментах

Проанализировав возможности и ограничения структурной мультимодальной микроскопии остается последний шаг для перехода к функциональной визуализации *in-vivo* – мониторинг концентрационных динамик целевых аналитов в живых тканях. Для этого подходят свежевывнутые срезы мозга мышей, описанных выше, так как, при правильном обращении, функционирование тканей сохраняется в течении ~ 1-2 часов. Для этого, извлеченные срезы помещались в чашечку петри, подключённую к системе прокачки перистальтическим насосом буферного раствора ACSF, насыщаемого карбогеном. Для «стабилизации» образца эксперименты начинались после 30 мин нахождения среза в растворе.

В первой серии измерений мы наблюдали динамику уровня кислотности среды в глубоких слоях мозга за счет симпорта лактата/ H^+ . Опираясь на титровку сенсора SyPer3s, описанную в разделе 3.2.1, мы задались целью абсолютного определения значений рН в конкретных нейронах. Однако, во избежание ошибочных расчетов, необходимо правильным образом учесть такие факторы, автофлуоресцентный фон и различие динамик затухания сигнала при двухцветном опросе.

На рисунках 42a.b мы представляем типичные изображения двухфотонной флуоресцентной микроскопии свежих срезов головного мозга, записанные с использованием длины волны накачки 790 нм. Нейроны, экспрессирующие SyPer3s, четко видны на этих изображениях на фоне автофлуоресценции. Был проведен спектральный анализ этой автофлуоресценции (рис.42.c) и выяснилось, что в ней преобладают вклады НАДФ, флавина и липопигментов. Сумма спектров автофлуоресценций этих флуорофоров составляет более 90% общего фона.

Если не учитывать должным образом этот фон, отношение сигнал/фон имеет тенденцию быть значительно заниженным, что в конечном итоге уменьшает глубину визуализации и измерения рН. Для решения этой проблемы был принят ряд мер. В качестве одной из таких мер, спектры НАДФ, флавинов и липопигментов были тщательно проанализированы и подавлены в максимально возможной степени с помощью подходящей комбинации дихроичных зеркал (DMLP490R, Thorlabs) и полосовых фильтров (FBH520-40, Thorlabs). Для дальнейшего увеличения отношения сигнал/фон последний был тщательно измерен путем анализа темных областей, не экспрессирующих SypHer3s. Затем этот фон вычитали из сигнала 2PEF. С такой коррекцией фона отношение сигнал / шум показания рН было достаточным для достижения глубины визуализации 2PEF до 200-500 мкм.

При лазерном возбуждении на двух длинах волн, внесение поправок на зависящее от длины волны ослабление излучения тканью мозга имеет решающее значение для точной рН-рatiометрии. В наших экспериментах такая коррекция была выполнена путем привязки двухфотонного сигнала на каждой из двух длин волн накачки на $\lambda_1 \approx 790$ нм (синие кружки на рис.42.d) или $\lambda_2 \approx 980$ нм. (черные ромбы на рис.42.d). Как и ожидалось, сигнал, возбуждаемый излучением 790 нм, затухает заметно быстрее, чем сигнал, возбуждаемый на длине волны 980 нм. Наилучшие оценки длины ослабления излучения, полученные из этих z-сканирований, $l_0 \approx 60$ мкм для излучения на длине волны 790 нм и $l_0 \approx 80$ мкм при 980 нм, что согласуются с литературными данными для тканей головного мозга крысы [137].

Для проверки чувствительности ратиометрической двухфотонной микроскопии к рН из глубоких областей мозга мы добавляли немного PBS и лактата (20 мМ) через поверхность среза мозга. Видно, что добавление нейтрального буфера PBS не влияет на показания рН (от времени $t = 200$ до 500 с на рисунках 42e,f). Однако при добавлении лактата показание ратиометрии постепенно уменьшается ($t > 500$ с на рисунках 42e,f), что

указывает на постепенный рост внеклеточного рН в ответ на поступающий поток лактата/H⁺, переносимого с поверхности среза мозга.

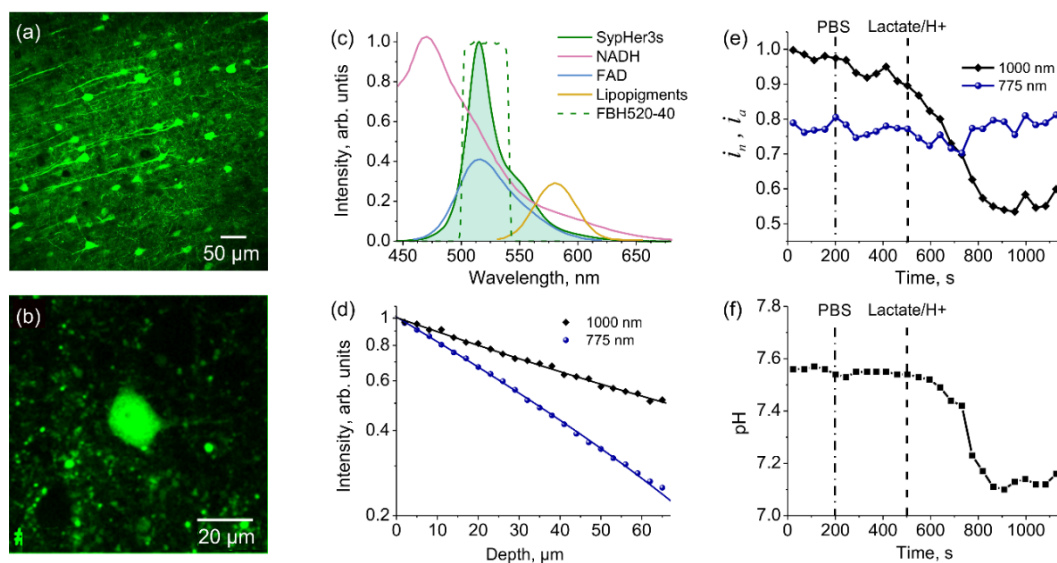


Рис.42 (a, b) Изображение области мозга, зараженной маркером SypHer3s в канале двухфотонной флуоресценции при накачке Ti:S-лазером. (c) Спектры используемых фильтров и флуоресценции основных источников автофлуоресцентного сигнала. (d) Зависимость сигнала двухфотоники от глубины для длин волн накачки 790 нм (синие точки) и 1000 нм (черные точки) (e) Зависимости сигналов двухфотонной флуоресценции при возбуждении сенсора SypHer3s в теле нейрона на длинах волн 790 нм (черный) и 1000 нм (синий) от времени. Штрих-пунктирная линия - моменты добавления буфера (контроль), пунктирная - лактата. (f) Перерасчет отношений сигналов при возбуждении на 980 нм к 775 нм, с учетом нормировки на сигнал второй гармоники и глубины залегания клетки, в уровень рН внутри нейрона, и показана эволюция кислотности внутри клетки при добавлении нейтральной среды и лактата.

Далее мы перешли к исследованию потенциала использования двухфотонного возбуждения HyPer7 для исследования в переживающих срезах мозга динамики H₂O₂ экзогенной и эндогенной природы, реализованной непосредственным впрыском перекиси в среду, либо ее генерации как продукт окисления добавленной D-аминокислоты в D-аминоксидазе (DAAO) [138].

Визуализация нейронов, экспрессирующих HyPer7 в митохондриях, показала хорошую колокализацию сигнала при накачке на длинах волн 790 нм и 980 нм во всей области наблюдения высокоапертурным объективом до ~500 мкм (Рис.43.а), что важно для равномерного ратиометрического опроса широкого поля. Пространственного разрешения на глубине ~100 мкм от поверхности среза достаточно, чтобы увидеть распределение митохондрий в

соте пирамидального нейрона коры мыши и его апикальном дендрите, а также отсутствие сигнала из ядра. Для восстановления динамики сигнала HyPer7 в этих нейронах при внешней добавке 5 мМ H_2O_2 при помощи пипетки последовательно записывали трехмерные стеки толщиной 12 мкм из изображений 360×360 pixels с усреднением по 3 кадрам со скоростью около 1.5 с на кадр с постоянным чередованием возбуждения на 790 нм и 980 нм. Шаг по времени составлял 15 с, что соответствует длительности записи одного стека на обеих длинах волны. При таком способе доставки ананта происходит постепенное распространение H_2O_2 по поверхности и внутрь среза, что позволило записать пространственную динамику изменения ратиометрического сигнала HyPer7 (Рис.43.b,c). Далее была определена насыщающая концентрация перекиси в аналогичных 6 экспериментах со срезами как ~ 2.5 мМ, при которой достигается максимальный ратиометрический отклик $R \approx 6$.

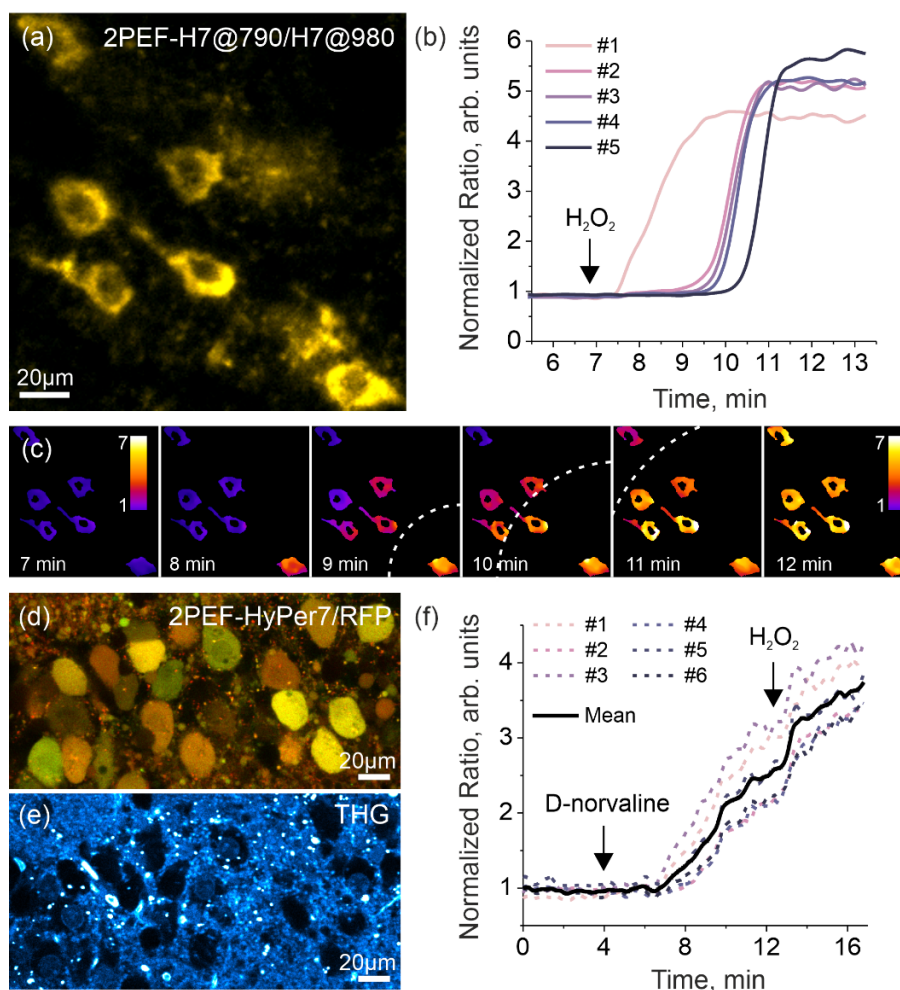


Рис.43 (а) Колокализация ответа HyPer7 из митохондрий нейронов (yellow color) возбуждаемый на длине волны 790 нм (green color) и 980 нм (red color). (b, c) Двухфотонный ратиометрический ответ HyPer7 из митохондрий пяти нейронов при добавлении пипеткой насыщающей концентрации 5 mM H₂O₂. (c) Пунктирной линией на глаз проведен профиль распространения перекиси в срезе, реконструированный по сигналу сенсора. (d, e) Двухфотонная флуоресцентная микроскопия HyPer7 (green color) и метки ДААО белка RFP (red color) (d) при накачке на 980 нм и микроскопия третьей гармоники (e). (f) Динамика двухфотонного ратиометрического ответа HyPer7 из шести ДААО-нейронов при добавлении 5 mM D-norvaline и затем насыщающей концентрации 5 mM H₂O₂.

Совместная экспрессия HyPer7 и ДААО-RFP в одних нейронах контролировалась по флуоресценции при накачке на длине волны 980 нм, которая хорошо возбуждает биосенсор и метку tagRFP, ассоциированную с ДААО (Рис.43.d). Степень заражения клеток можно было определить по сигналу третьей гармоники от 1250 нм, проявляющий все клетки в срезе как темные пятна (Рис.43.e) [135,139]. Для инициации эндогенной генерации перекиси в нейронах, экспрессирующих ДААО, на срез капался раствор D-norvaline с концентрацией 10 mM, при этом ратиометрический сигнал *R* вырос в ~2.7 раза за 8 минут (рис.43.f). Для выявления полного динамического диапазона сенсора в такой конфигурации в конце эксперимента добавлялась перекись с насыщающей концентрацией 5 mM, повышающая ответ сенсора до ~4.5.

Завершающая часть экспериментов, связанных с работой на фиксированных и переживающих срезах коры головного мозга мыши, была посвящена применению описанной выше конструкции псевдо ратиометрического сенсора на базе белка HyPer-FAST в связке с UnaG. Проверяемыми модальностями были ратиометрические измерения с помощью конструкций HF-HBR-3,5-DOM-8aa-UnaG и HF-N871b-8aa-UnaG при двухфотонном возбуждении на 1040 нм (Yb-лазер) и двух/трехфотонном возбуждении на 1240 нм (Cr:F-лазер), соответственно. Помимо самого сенсора, в нейронах мыши экспрессировался также комплекс ДААО, колокализация которого осуществлялась с помощью синего флуоресцентного белка tagBFP2 (рис.44.a).

Спектральные диапазоны детектирования составляли 400-450 нм, 500-550 нм и 600-650 нм для tagBFP, UnaG и Hyper-FAST, соответственно. Флуороген HBR-3,5-DOM показывал лучшую проникающую способность, что позволило записать глубокий стек изображений, визуализирующий нейроны вплоть до глубин ~ 250 мкм (рис.44.b,c), недоступных конфокальной микроскопии.

Эксперименты по детектированию ратиометрического отклика были проведены на 6 мышах, по 3 на каждую конфигурацию сенсора. В зависимости от уровня экспрессии флуоресцентных меток выбиралась мощность накачки. В лучших измерениях использовалось 20 мВт для Yb лазера и 75 мВт для Cr:F лазера перед микроскопом. При таких настройках достигался стабильный сигнал флуоресценции UnaG на временных отрезках > 60 мин. В ходе экспериментов находилась область мозга с трансфицированными нейронами. Далее с шагом в 5 минут в этой области записывался z-стек глубиной ~ 50 мкм. После первой записи в систему прокачки буфера добавлялся флуороген. За следующие ~15 минут наблюдался рост и выход на константу сигнала в канале детекции сенсора Hyper-FAST, связанный, по всей видимости, с базовым уровнем H₂O₂. Далее, таким же образом производилось добавление D-норвалина, приводящее к генерации пероксида водорода, что проявляется в виде роста ратиометрического сигнала (рис.44.d-h). В контрольных экспериментах использовалась специальная мышь с отсутствующим комплексом DAAO.

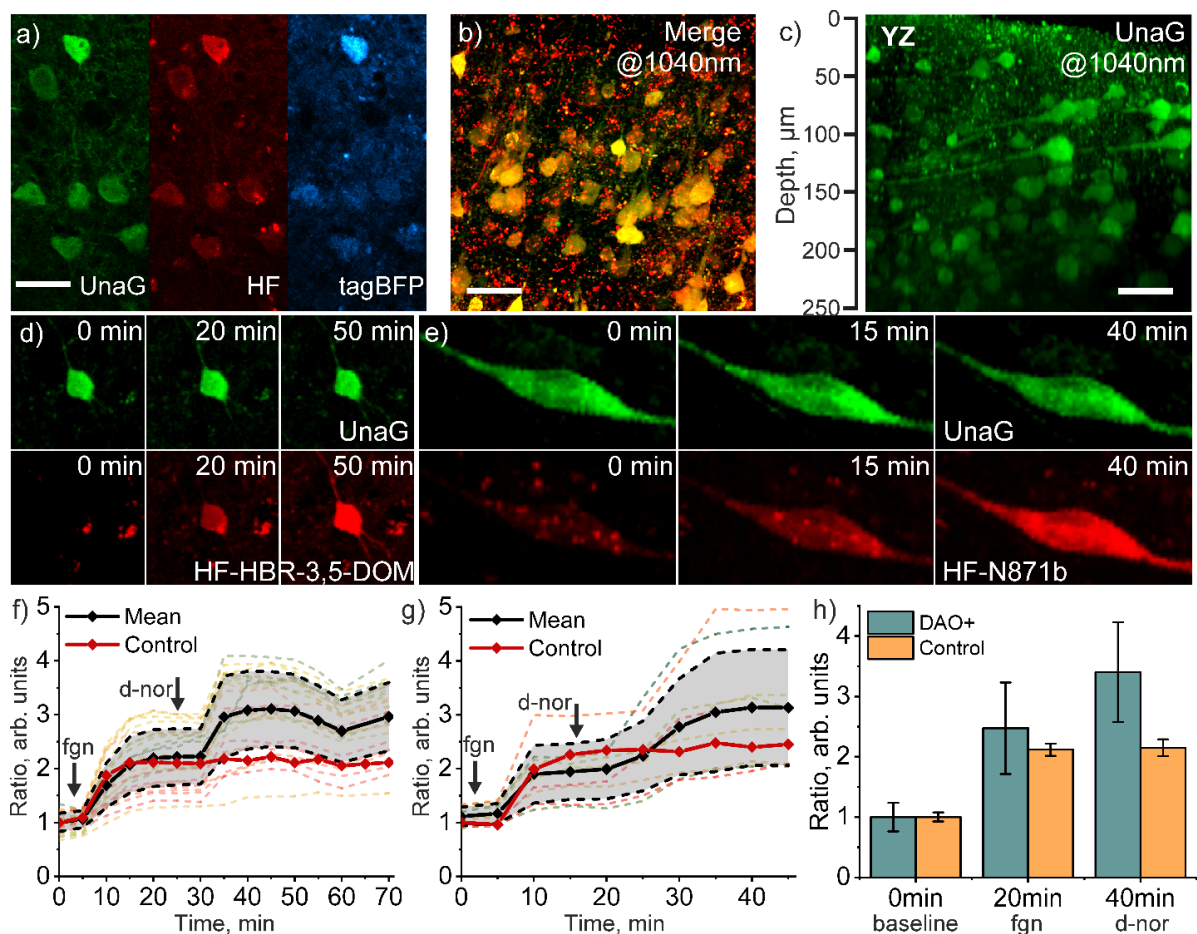


Рис.44 (а) Изображения нейронов в каналах 500-550 нм (UnaG, зеленый), 600-650 нм (HyperFAST, красный) и 400-450 нм (tagBFP, циановый). (b) Проекция максимальной интенсивности (60-120 мкм) изображений флуоресценции белка UnaG (зеленый) и сенсора HF-HBR-3,5-DOM (красный) в нейронах после добавления d-norvaline. (c) Проекция сигнала флуоресценции UnaG в плоскости YZ, полученная из z-стека размером 300x300x260 мкм. (d-g) Динамики ратиометрического сигнала и изображения в обоих каналах при последовательном добавлении флуорогена и d-norvaline (черные вертикальные стрелки) в случае (d,f) HBR-3,5-DOM и (e,g) N871b при возбуждении на 1040 и 1240 нм, соответственно.

На стадии предобработки экспериментальных данных, полученные z-стеки объединялись в zt-гиперстек, в каждом канале вычитался фон. Далее, гиперстек разбивался на 3-4 временных стека в виде проекций максимальной интенсивности из толщин ~ 15 мкм. Наконец, находилась временная зависимость сигналов флуоресценции в обоих каналах из тел клеток. В случае обработки канала 600-650 нм предварительно удалялся константный сигнал автофлуоресценции в виде ярких точек, ассоциированных с липофусцином (рис.44.b).

На рисунке 44.h представлена статистика по откликам сенсора более чем от 100 нейронов для флуорогена HBR-3,5-DOM. При этом, во всех экспериментах сигнал от опорного белка UnaG не изменялся при добавлениях флуорогена и D-норвалина (рис.44.d,e). Таким образом, проведённые измерения апробируют предложенную концепцию псевдо ратиометрического измерения динамик H_2O_2 с применением одного лазерного источника в глубоких слоях мозга.

3.5 Выводы

Измерены спектры двухфотонного возбуждения в абсолютных значениях белковых сенсоров редокс окислительно-восстановительных процессов одного семейства (на основе белка YFP). Значительные различия в формах и амплитудах спектров объясняется вариацией локального электрического поля возле единого флуорофора. Яркости сенсоров демонстрируют значения 10-45 ГМ, что сопоставимо с наиболее распространенными кальциевыми сенсорами серии GCaMP. Установлена общая закономерность в положении пика возбуждения окисленной формы сенсоров в районе 950 нм, связанная с преобладанием электронно-колебательного перехода $0-1$ для депротонированной формы хромофора. Двухфотонные изобиестические точки всей линейки изучаемых белков лежат в диапазоне 800-900 нм.

В режиме двухцветной двухфотонной микроскопии культур клеток получены калибровочные кривые для сенсоров кислотности и пероксида водорода, позволяющие восстановить абсолютные значения концентраций. Продемонстрирована возможность быстрой (до 1 с) визуализации динамик концентраций с точностью не хуже $\Delta C[H^+] \approx 0.05$ pH и $\Delta C[H_2O_2] \approx 0.1$ мкМ, как на культуре, так и в нейронах на глубинах > 100 мкм переживающего среза мозга мыши.

Пики двухфотонного возбуждения сенсора Hyper-FAST с красными флуорогенами HBR3,5-DOM, N871 и 3a приходятся на длины волн 1040 нм, 1120 нм и 1250 нм, соответственно, что обеспечивает эффективное возбуждение излучением Yb лазера (1040 нм) и Cr:F лазера (1250 нм).

Добавление опорного зеленого белка UnaG позволяет реализовать ратиометрический опрос в режимах чистого двухфотонного (на 1040 нм) и гибридного двух- / трехфотонного (на 1240 нм) возбуждения, пригодного для визуализации динамики пероксида водорода в клеточных культурах и переживающих срезах мозга.

Высокое пиковое значение яркости трехфотонного возбуждения SypHer3s (около 1×10^{-80} см⁶ с²) расположено на длине волны 1340 нм в окне прозрачности биотканей и зависит от кислотности среды, что открывает перспективы использования сенсора для трехфотонной функциональной микроскопии глубоких слоев. Излучение на 1250 нм позволяет трехфотонно визуализировать нейроны с сенсорами SypHer3s и HyPer7, демонстрируя многократное увеличение соотношения сигнал/фон на глубинах > 200 мкм в коре головного мозга мыши по сравнению с двухфотонным возбуждением.

Предельная глубина визуализации двухфотонной микроскопии (отношение сигнал/фон = 1), определенная на фантоме мозга, составляет 6-7 длин рассеяния и обуславливается генерация сигнала вне фокуса в поле сходящегося пучка накачки. Флуоресцентная микроскопия при трехфотонном возбуждении демонстрирует отсутствие детектируемого фонового сигнала на глубинах не менее 5 длин рассеяния, меньшую деградацию фокусировки и большую локализацию сигнала.

1. **A. S. Chebotarev**, V. S. Ledyeva, O. I. Patsap, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, A. G. Shokhina, and A. A. Lanin, "Multimodal label-free imaging of murine hepatocellular carcinoma with a subcellular resolution," *J. Biophotonics* 16, e202300228 (2023). IF 3.207
2. **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, E. S. Fetisova, A. S. Panova, D. S. Bilan, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging," *J. Biophotonics* 14, e202000301 (2021). IF 3.207
3. M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, **A. S. Chebotarev**, E. S. Fetisova, D. S. Bilan, E. K. Shevchenko, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Multimodal nonlinear-optical imaging of nucleoli," *Opt. Lett.* 46, 3608–3611 (2021). IF 3.560

4. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, M. S. Pochechuev, E. S. Fetisova, D. S. Bilan, E. K. Shevchenko, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Single-beam multimodal nonlinear-optical imaging of structurally complex events in cell-cycle dynamics," *J. Phys. Photonics* 3, 044001 (2021). IF 4.080
5. A. A. Lanin, M. S. Pochechuev, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, D. S. Bilan, D. A. Kotova, V. S. Tarabykin, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Cell-specific three-photon-fluorescence brain imaging: neurons, astrocytes, and gliovascular interfaces," *Opt. Lett.* 45, 836–839 (2020). IF 3.560
6. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, D. S. Bilan, Y. G. Ermakova, A. B. Fedotov, A. A. Ivanov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging," *J. Biophotonics* 13, e201900243 (2020). IF 3.207
7. A. A. Lanin, M. S. Pochechuev, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Nonlinear-optical stain-free stereoimaging of astrocytes and gliovascular interfaces," *J. Biophotonics*, e201800432 (2019). IF 3.207
8. M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, D. S. Bilan, D. A. Kotova, **A. S. Chebotarev**, V. Tarabykin, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation," *Opt. Lett.* 44, 3166–3169 (2019). IF 3.560

Глава 4. Мультимодальная визуализация окислительных процессов в живых животных

В данной главе будут представлены результаты по исследованию двух- и трехфотонной визуализации тканей коры головного мозга мыши, печени мыши, а также личинок линии рыб семейства *Danio rerio* (рис.45). Будут продемонстрированы предельные возможности визуализации сенсоров активных форм кислорода в таких тканях при двух- и трехфотонном возбуждении.

Проведение ратиометрических измерений динамик концентраций целевых для сенсоров активных форм кислорода является основной задачей разрабатываемого метода. Интерес представляют развитие окислительного стресса в различных типах клеток во время той или иной патологии. Для демонстрации таких возможностей нами были поставлены эксперименты по детектированию уровня кислотности среды в нейронах коры головного мозга мыши в процессе фотоиндуцированного инсульта. В случае с печенью мы наблюдали генерацию пероксида водорода в гепатоцитах в результате закола D-аминокислот в присутствии оксидазы D-аминокислот (DAO). Наконец, несколько трансгенных линий рыб *Danio rerio*, обладающие генетически модифицированными нейтрофилами, позволяют пронаблюдать в реальном времени отклик иммунной системы в случае механического повреждения и бактериальной инфекции.

4.1 Визуализация сенсора пероксида водорода в митохондриях нейронов глубоких слоев неокортекса мыши

Следуя аналогичной логике из разделов 3.3-3.4, эксперименты на живых животных были начаты со структурной микроскопии глубоких слоев ткани. Для этого были выбраны мыши из линии C57BL/6 возрастом 8–10 недель. Животные до эксперимента располагались в специальном виварии Института биоорганической химии РАН при контролируемой комнатной температуре 22–24 °С. Для проведения визуализации мышам производилась инъекция 1

мкл раствора AAV9-hSyn1-HyPer7-dMito вирусных частиц в область коры головного мозга через отверстие 3 мм диаметром на глубину 0.7 мм. Митохондриальная локализация флуоресцентной метки позволят различить субклеточные структуры микронного размера, то есть на грани оптического предела, что является серьезным вызовом для построенной оптической системы.

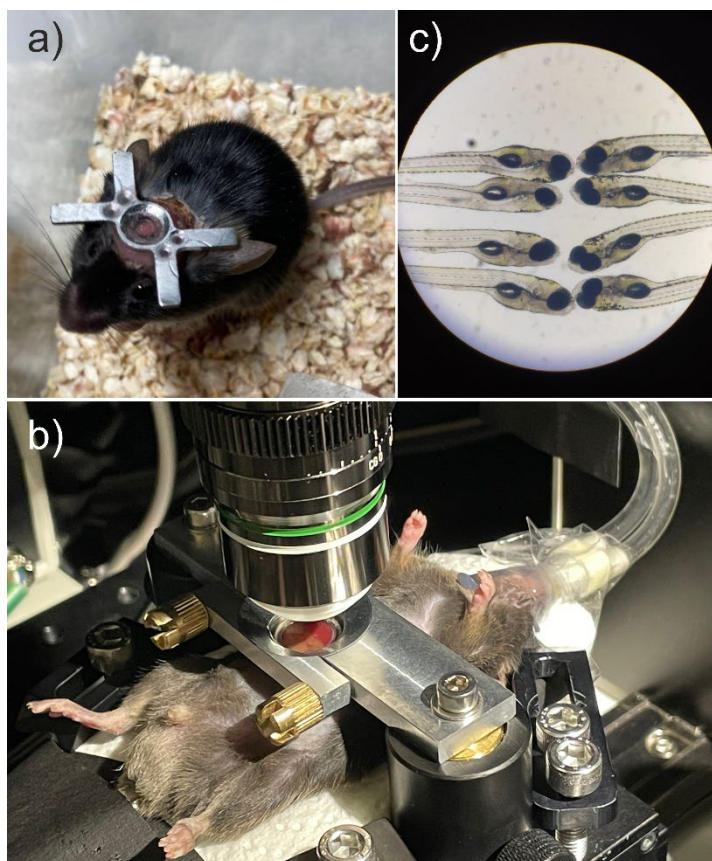


Рис.45 (а) Фотография мыши с головным крепежом для крепления под up-right микроскоп. (b) Анестезированная мышь с абдоминальным окном в ходе экспериментов по многофотонной микроскопии. (с) Фотография личинок рыб *Danio rerio* в окуляре светлопольного микроскопа.

Важной технической задачей являлось обеспечение доступа и фиксации животных под объективом микроскопа. В случае работы с мозгом коллегами биологами производилась операция по созданию краниального окна. Отверстие в черепе покрывалось стеклышком диаметром 4 мм и фиксировалось на клей к краям черепа. Оставшаяся часть черепа, окружающая покрывное стекло было в дальнейшем покрыто зубным цементом. Специальная металлическая пластина присоединялась к черепу при помощи

цемента (Рис.45.b). Под микроскопом мышь фиксировалась за головную пластину на обогреваемой подложке, температура мышцы контролировалась при помощи ректальной термодары. Во время визуализации мышь была анестезирована газовой смесью воздуха и 2% изофлурана. Наблюдение в белом свете краниального окна позволяло оценить качество поверхности покровного стекла для дальнейшей микроскопии (рис.46.a).

Поиск области заражения осуществлялся при помощи детекции флуоресценции в широком поле зрения, реализованной на штативе мультифотонного микроскопа, со слабо увеличивающим объективом 4x (рис.46.b). На рисунке 46.b изображено свечение флуоресценции HyPer7- нейронов в коре, записанное через краниальное окно на 10 день после закола. Область заражения составляла около 1 мм в диаметре и 1 мм в глубину, что контролировалось на вынутом мозге после окончания экспериментов. При многофотонной визуализации первые ~ 70 мкм от поверхности покровного стекла составляла *dura matter*, богатая кровеносными сосудами (Рис.46.c) и соединительной тканью (Рис.46.d), которые отлично визуализировались при помощи генерации третьей гармоники эритроцитами и коллагенами излучением на 1250 нм [136,140].

За *dura matter* располагался бедный нейронами I-слой коры мозга, необходимая мощность для визуализации которых составляла ~ 20 мВт после объектива на 790 нм и 980 нм. Предел трехфотонной визуализации нейронов составлял ~ 100 мкм от поверхности коры (~ 170 мкм от поверхности мозга) (Рис.46.e), что ограничивалось нехваткой мощности и не оптимальной эффективностью возбуждения белка. Двухфотонная визуализация на этой глубине не страдала от нехватки сигнала, но вклад вне фокальной фоновой засветки становится заметен (Рис.46.f,g). На глубине ~ 260 мкм от поверхности коры (~ 330 мкм от поверхности мозга) влияние фона на длине волны 790 нм сравнивается с полезным сигналом и затрудняет дальнейшее продвижение вглубь (Рис.46.h,i). Максимальная глубина визуализации ~ 550 мкм от

поверхности коры, где расположены пирамидальные нейроны 5 слоя, была достигнута на длине волны 980 нм (Рис.46.j,k).

Для получения предельных глубин визуализации на длинах волн 790 нм, 980 нм и 1250 нм были использованы мощности ~150 мВт, ~200 мВт и ~190 мВт на образце, соответственно. Измерение одной и той же области в течение трех недель показал, что сигнал выходит на максимальный уровень к ~18 дню после закола и его яркость в ~3.5 раза больше, чем на десятый день. Анализ сигнала с глубиной дает следующие характерные длины затухания $l^{invivo}_{790} = 98$ мкм, $l^{invivo}_{980} = 120$ мкм, $l^{invivo}_{1250} = 190$ мкм, что в ~2 раза больше, чем было измерено *ex vivo* на фиксированном срезе. Несмотря на более высокий порядок нелинейности, скорость падения сигнала с глубиной в трехфотонике не хуже, чем для двухфотоники, что мы наблюдали во всех проведенных экспериментах (с шариками, *ex vivo*, *in vivo*), но подавление фона намного лучше. Интересно отметить значительное уменьшение скорости падения сигнала для двухфотонной микроскопии для $z > 150$ мкм вплоть до $l^{invivo}_{790} \approx l^{invivo}_{980} = 260$ мкм, что может быть объяснено преодолением области отека. Достигнутые глубины для длин волн накачек 980 нм и 1250 нм не являются фундаментальными ограничениями методик визуализации, связанные с фоновым сигналом и/или повреждением ткани высокоинтенсивным излучением. Повышение мощности, улучшение локализации закола вируса могут значимо увеличить глубину визуализации, позволив просканировать всю колонку коры мозга мыши. Особенно большой потенциал содержится в трехфотонной визуализации NuPer7 из-за отсутствия фона, интенсивная оптимизация которой может идти за счет увеличения энергии в импульсе накачки и подборе оптимальной длины волны возбуждения.

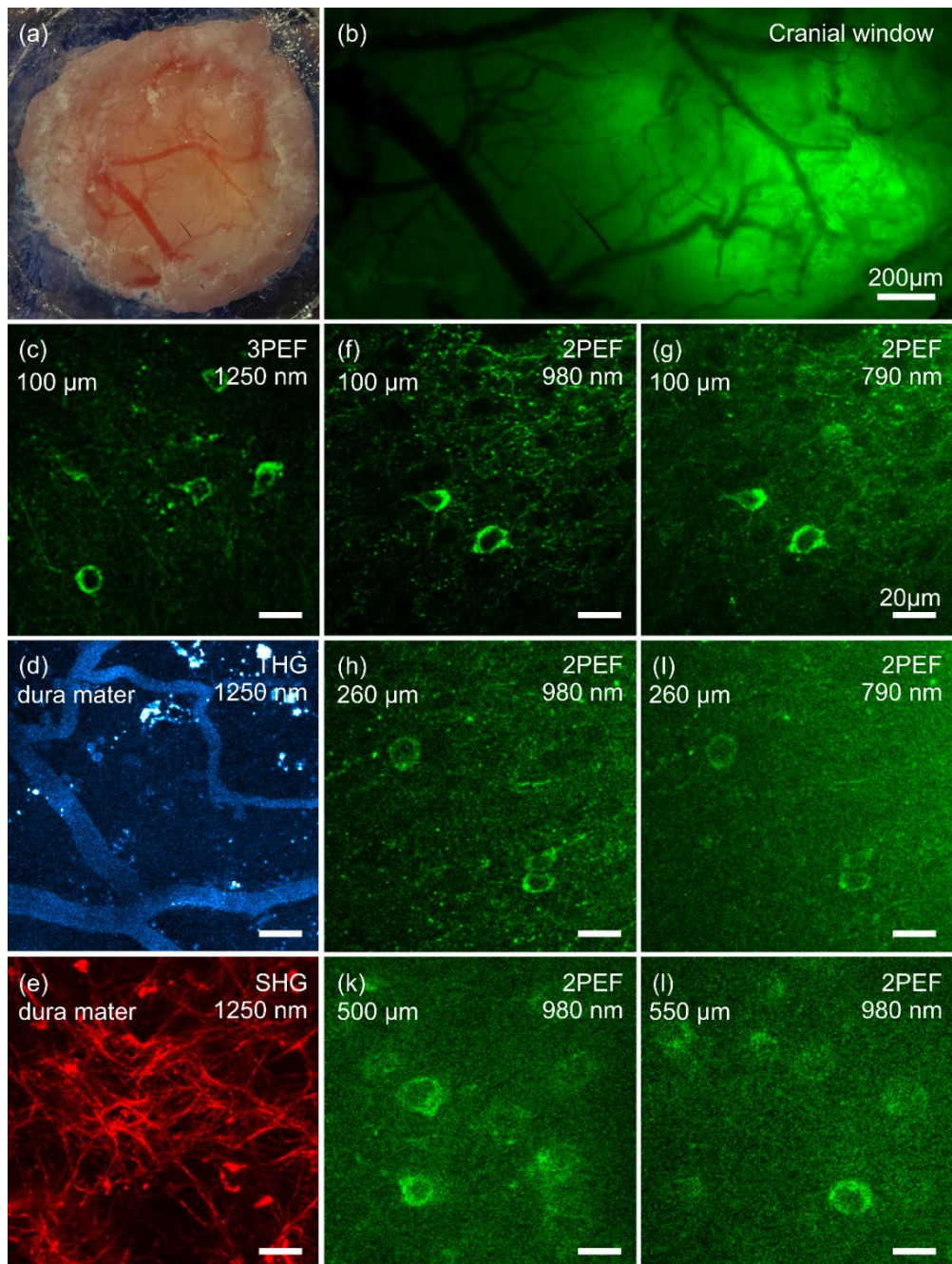


Рис.46 (а) Фотография краниального окна через окуляр микроскопа. (b) Флуоресцентная визуализация приповерхностной слоя мозга через краниальное окно. Scale bar is 200 μm . (c, d) Микроскопия третьей (c) и второй (d) гармоник приповерхностного слоя мозга dura mater. (e–k) Трех- (e) и двухфотонная (f–k) флуоресцентная микроскопия нейронов с HyPer7 *in vivo* при возбуждении на 790 нм (f, h) и 980 нм (g, i, k) на глубине 100 мкм (e–g), 260 мкм (h, i), 500 мкм (j) и 550 мкм (k).

4.2 Развитие ацидоза в мозге мыши при оптико-индуцированном закупоривании сосудов

Нами были проведены исследования по изучению динамики кислотности среды с субклеточным разрешением в коре головного мозга мыши *in vivo* при инсульте, вызываемым фотоиндуцированной окклюзией. Для этого

использовался метод ратиометрического определения рН с помощью генетически-кодируемого сенсора SypHer3s при двухцветном двухфотонном возбуждении флуоресценции. Использовалась серия мышей из предыдущего раздела, но с забором вирусных частиц AAV9-hSyn1-SypHer3s на разные глубины.

В начале были проведены аналогичные записи глубоких стеков изображений. За счет цитоплазматической экспрессии белка мы наблюдаем более четкие тела нейронов по сравнению с митохондриальной локализацией. Различные области закола вирусной конструкции позволили визуализировать, как нейроны II/III слоя коры головного мозга мыши на глубинах до 300 мкм (рис.47.a,b), так и глубоко залегающие пирамидальные нейроны на глубине ~600 мкм (рис.47.c). Таким образом, наша оптическая система в комбинации с сенсорами SypHer3s и HyPer7 позволяет проводить двухфотонную визуализацию нейронов большей части коры головного мозга мыши.

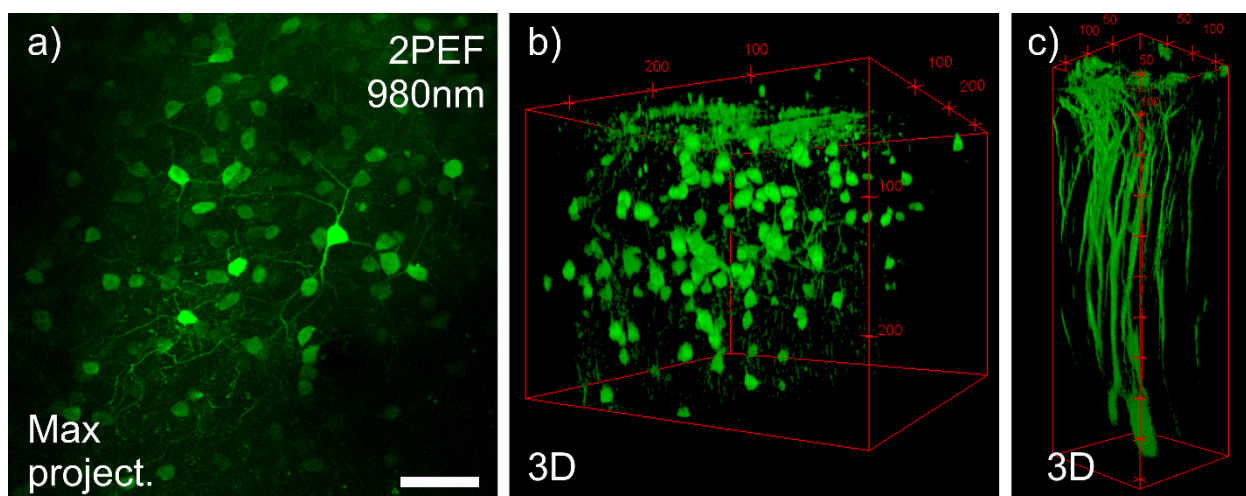


Рис.47 (a) Проекция максимальной интенсивности стека изображений из глубины 50-200 мкм от поверхности, полученных при двухфотонном возбуждении на длине волны 980 нм сенсора SypHer3s in-vivo. (b,c) Трехмерная реконструкция нейронов из (b) II/III слоя коры головного мозга мыши и (c) отростков пирамидальных нейронов с глубины ~700 мкм.

Далее мы перешли к ратиометрическим измерениям рН в нейронах в процессе развития инсульта. Используемый фотоиндуцированный подход для окклюзии сосудов заключается в фотоактивации красителя Rose Bengal в сосудах и капиллярах мозга, что приводит к образованию тромба (рис.48.b). Краситель в объеме 10 мкл/г закалывался в брюшину. Для фотоактивации

красителя, а также для контроля процесса окклюзии одновременно с записью двухфотонного сигнала, в многофотонном микроскопе был реализован дополнительный канал подсветки/детекции, включающий в себя светодиод M565L3 (Thorlabs) с низкочастотным фильтром FELH550 и CCD камеру 4070M-GE-TE-4 (Thorlabs), визуализирующий поверхность мозга с сосудами в отраженном свете с частотой обновления кадров 10 fps. Разделение каналов детекции двухфотонного сигнала и канала фотоактивации осуществлялось с помощью дихроичного зеркала DMPLP550. Дополнительно, динамика движения отдельных эритроцитов может быть получена ГТГ-микроскопии области отдельного капилляра узкой линией, что позволяет достичь необходимой частоты записи кадров >30 fps (рис.48.а). Сигнал двухфотонной флуоресценции, вырезаемый спектральным фильтром в диапазоне 500-540 нм, записывался в обратном направлении с помощью ФЭУ Н7422РА-40. Такой набор спектральных фильтров позволяет, с одной стороны, производить двухфотонную запись динамики рН при инсульте в реальном времени, с другой не приводит к выгоранию сенсора SyрHer3s (рис.48.с).

В ходе экспериментов производилась повторная запись стеков глубиной 10 мкм при возбуждении на 790 и 980 нм. Детектировался канал зеленой флуоресценции сенсора SyрHer3s, а также хвост флуоресценции красителя Rose Bengal в канале >600 нм (Рис.49.а-с). Вначале записывался бейзлайн длительностью не менее 5 мин. Далее контрольное освещение мозга мыши светодиодом без закола красителя, демонстрирующее отсутствие выгорания сенсора SyрHer3s и стабильность уровня рН. Далее происходит закол красителя с сопутствующей постепенной окклюзией сосудов, наблюдаемых на CCD-камере.

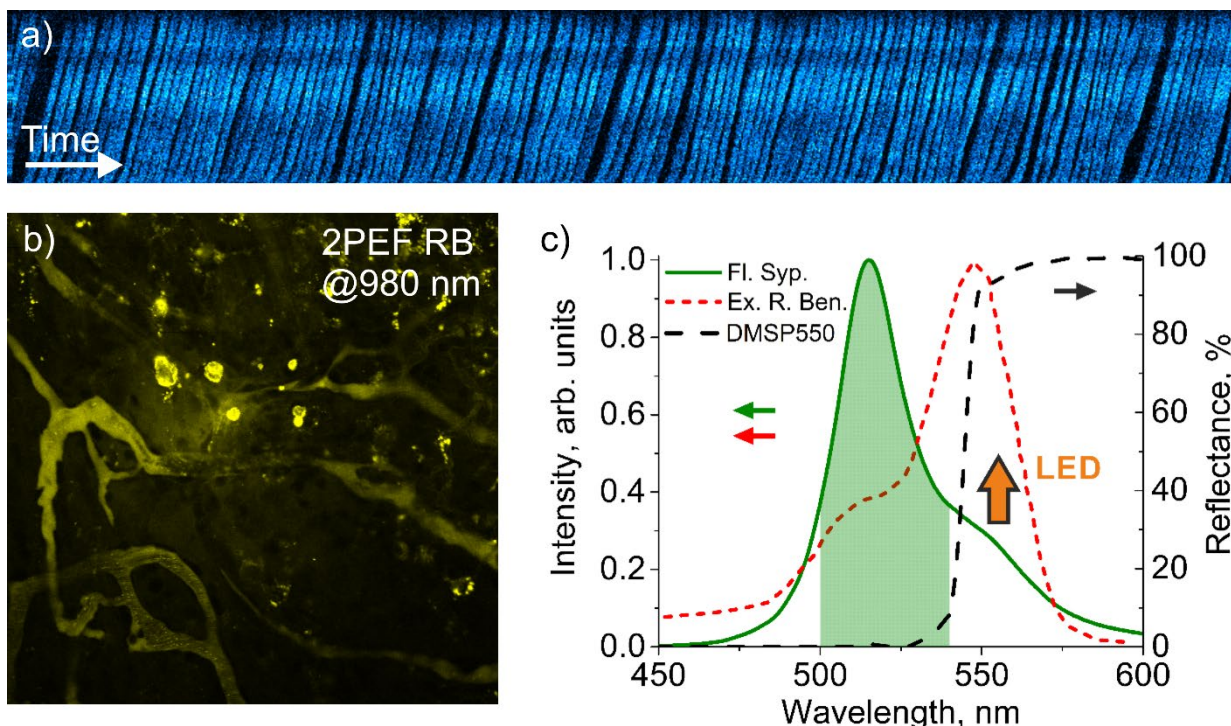


Рис.48 (a) Треки отдельных эритроцитов в капилляре мозга мыши, записанные с помощью ГТГ-микроскопии. (b) Изображения тромба в сосуде после фотоактивации красителя Rose Bengal. (c) Спектральное разделение канала детектирования флуоресценции сенсора Syner3s (зеленая область) и канала фотоиндуцирования светодиоидом (оранжевая стрелка) красителя Rose Bengal (красный короткий пунктир) с помощью дихроичного зеркала DMSP550 (черный пунктир).

В то время, как сигналы флуоресценции в отдельных каналах возбуждения могут флуктуировать за счет внешних факторов, отношение сигналов остается постоянным при записи опорной линии ($\Delta R < 0.05$). Такое преимущество ратиометрического подхода к измерению концентрации аналитов наглядно демонстрируется на приведенных динамиках. Микронное разрешение техники позволяет, параллельно с биохимическим откликом клеток, пронаблюдать морфологические изменения. Падение ратиометрического сигнала $\Delta R \approx 0.6$, ассоциированного с закислением среды, сопровождается с деградацией отростков.

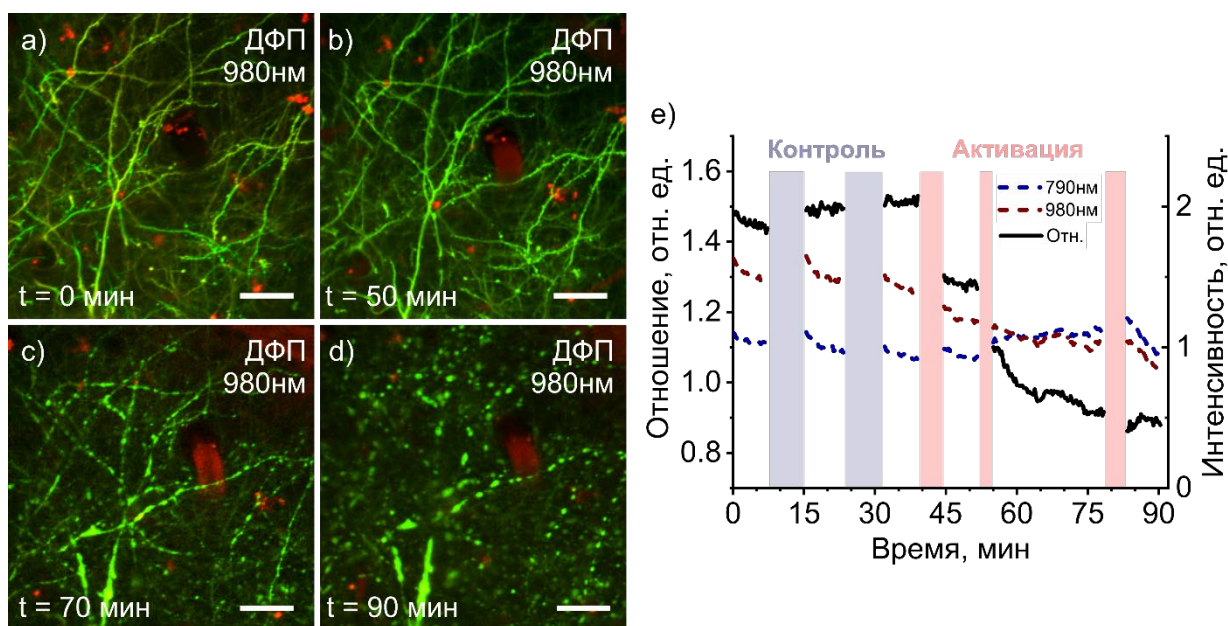


Рис.49 (a-d) Двухфотонные изображения отростков нейронов на глубине 50 мкм, экспрессирующих сенсор SytHer3s, в моменты времени (a) 0, (b) 50, (c) 70 мин и (d) 90 мин с начала эксперимента. (e) Зависимости сигналов флуоресценции SytHer3s при возбуждении на 790 нм (синяя линия) и 980 нм (красная линия) и их отношение (черная линия). В промежутки времени, отмеченные серыми областями, производилось освещение области светодиодом. Закол красителя соответствует 30 мин.

4.3 Модуляция пероксида водорода в гепатоцитах печени мыши методами хемотропии

Метаболизм печени, как одного из наиболее активных в этом отношении органов, в значительной степени зависит от баланса про- и антиоксидантных факторов. Однако, молекулярные механизмы, обуславливающие патологическую роль активных форм кислорода в развитии заболеваний печени, до сих пор остаются во многом не определенными. Для моделирования процесса окислительного стресса основных клеток печени, гепатоцитов, можно индуцируемым образом генерировать пероксид водорода за счет окисления привнесенной извне оксидазы D-аминокислот (DAAO) при доставке D-аминокислот. Тем самым, можно изолированно проследить роль H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса на ткань печени. В этом разделе мы реализуем инструмент наблюдения за уровнем пероксида водорода в клетках печени в процессе индуцированной генерации АФК.

Для этого самцам мышей C57BL/6J в возрасте 10-12 недель инъецировали частицы аденоассоциированных вирусов AAV8-TBG:HyPer7-

ДААО напрямую в печень. Для работы с печенью вживлялось абдоминальное кольцо из титана, фиксированное на клей (рис.50.a). Специальные пазы позволяли прятать лишнюю кожу, обеспечивая плотное прилегания покровного стекла диаметром 6 мм. Далее был сконструирован специальный механизм для фиксации кольца под объективом (рис.45.b). Через 2 недели после операции мышей под ингаляционным наркозом фиксировали на оптической установке, позволяющей осуществлять двухфотонный опрос флуоресцентного индикатора HyPer7.

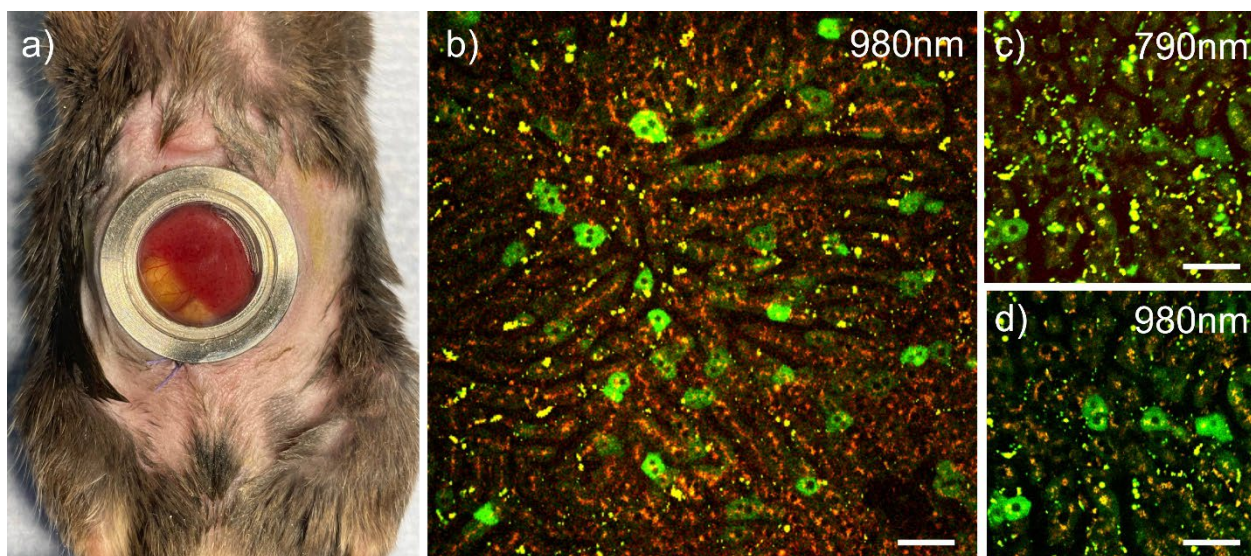


Рис.50 (a) Фотография мыши с абдоминальным окном . (b) Панорамное изображение печени при двухфотонном возбуждении на 980 нм. Зеленый канал детекции соответствует спектральному диапазону 500-550 нм и визуализирует сенсор HyPer7. Красный канал 600-650 нм. (c,d) Изображение отдельных гепатоцитов при возбуждении на (c) 790 нм и (d) 980 нм.

Запись изображения далее ведется из приповерхностного слоя 0-30 мкм (рис.50.b). Однако, возможна потеря плотного контакта покровного стекла и печени, что сразу приводит к радикальному ухудшению сигнала, так как промежуток заполняется непрозрачной жидкостью. Используемые каналы возбуждения 790 и 980 нм обладали существенной разницей в контрастности визуализации сенсора в пользу более красной длины волны (рис.50.c,d), что обуславливается, в первую очередь, сильной автофлуоресценцией тканей печени, в частности липидных капель, обсуждаемых в разделе 3.3.3. Для получения изображений и ратиометрических измерений печень облучалась со

средней мощностью 15 мВт и 30 мВт на образце для накачки на 790 нм и 980 нм, соответственно.

Особенностью эксперимента являлась подвижность печени за счет дыхания и движения перестатики. В связи с этим запись ратиометрических измерений производилась из области $\sim 300 \times 300$ мкм с разрешением, 256×256 пикселей с временем накопления сигнала 3 мкс, что обеспечивало частоту обновления кадров >3 fps. Такая частота кадров позволяла получать не искаженные двухфотонные изображения в рамках одного кадра. Однако между кадрами существовал существенный сдвиг в плоскости изображения. Поэтому при обработке данных осуществлялся автоматизированный трекинг отдельных клеток за счет их выделения по пороговым значениям яркости. Также, значительный уровень автофлуоресценции от липидных тел может исказить результаты ратиометрических измерений, поэтому в процессе обработки убирались пиксели, выходящие за динамический диапазон.

В эксперименте производились заклы в брюшину D-норвалина и D-аланина в объеме 500 мкл. Ратиометрическая схема детекции демонстрирует синхронное изменение сигналов в противоположные стороны в каналах накачки 790 нм и 980 нм сразу после закола (рис.51). Быстрота ответа обуславливается обширной кровеносной системой, пронизывающей всю печень, что приводит к моментальной доставке и впитыванию субстрата. Показания сенсора NuPer7 выходят на плато примерно через 30 мин. Таким образом, несмотря на плохие оптические свойства печени, трудности в получении изображений из-за подвижности мягких тканей, а также высокий уровень автофлуоресценции, нам удалось достоверным образом проследить процесс локальной генерации пероксида водорода в отдельных гепатоцитах.

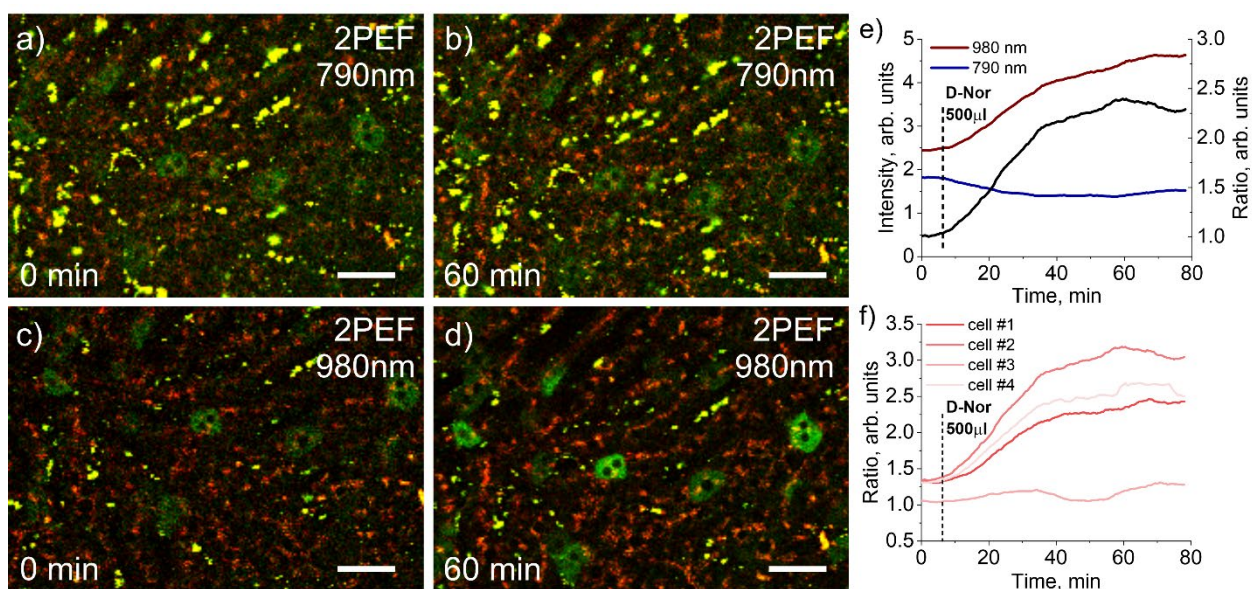


Рис.51 (a-d) Двухфотонные изображения, полученные при возбуждении на (a,b) 790 нм и (c,d) 980 нм (a,c) до и (b,d) после закала 500 мкл аминокислоты D- норвалин. (e) Динамики сигналов при возбуждении на 790 (синяя линия) и 980 нм (красная линия) и их отношение в отдельном гепатоците. (f) Динамики ратиометрического отклика 4 клеток при закале аминокислоты D- норвалин.

4.4 Визуализация защитных механизмов нейтрофилов рыбы на основе сильных окислителей

Воспаление является сложным биологическим процессом, который возникает в результате реакции иммунной системы в ответ на различные повреждающие факторы. Первыми в область воспаления мигрируют нейтрофилы, этот тип клеток представляет важное клеточное звено врожденного иммунитета. На сегодняшний день биология нейтрофилов является одной из наименее изученных областей в иммунологии. Для данных клеток характерно наличие фермента, миелопероксидазы, который с использованием H_2O_2 катализирует образование гипогалогенных кислот, в частности, хлорноватистой кислоты ($HOCl$). В данной работе при помощи биосенсора *Nurocrates2* исследована динамика $HOCl$ внутри клеток нейтрофилов. Иммунная система рыбы *D. rerio* имеет сходства по основным свойствам с системой млекопитающих, в том числе нейтрофилы *D. rerio* имеют схожие с нейтрофилами млекопитающих морфологические, биохимические и функциональные особенности.

В исследовании участвовали три трансгенных линии мальков рыб *Danio rerio*, в нейтрофилах которых экспрессировался либо сенсор хлорноватистой кислоты *Hypocrates2*, либо его контрольная версия *Hypocrates2-CS*, либо красный флуоресцентный белок *mCherry*. Для проведения всех процедур трансгенных мальков *Danio rerio* возраста 5 dpf анестезировали в растворе трикаина с концентрацией 0,016%, pH 7,0. Чтобы иммобилизовать рыб использовали 1% легкоплавкую агарозу, также с добавлением анестетика. Мальков помещали в остывшую каплю агарозы и укладывали на бок в лунку конфокальной чашки Петри. После застывания агарозы в чашку Петри добавляли аквариумную воду с анестетиком.

Отличной демонстрацией возможности структурной и функциональной микроскопии живых организмов является трехмерное сканирование всего малька длиной 3.7 мм. Для этого мы записали 6 последовательных z-стеков, каждый глубиной в 400 мкм, с последующей сшивкой в трехмерном пространстве. В результате получилась объемная 3-канальная реконструкция малька размером 3700x720x440 мкм и разрешением 5550x1080x220 пкс. Помимо двух- или трехфотонного возбуждения маркеров (рис.52.b), мы имели доступ к источникам контраста в виде генерации второй и третьей гармоники от Cr:F лазера, позволяющие получать информацию о морфологии тканей. Конкретно, вторая гармоника генерировалась в плавниках, образованных соединительными хрящами, а также мышечной тканью вдоль тела (рис.52.d). Третья гармоника позволяет визуализировать морфологию отдельных клеток, в особенности кровенёных телец, что позволят сформировать обширную карту кровеносных сосудов (рис.52.c).

Ампутацию кончика хвостового плавника проводили при помощи микрохирургического скальпеля перед иммобилизацией рыб. В результате генерируются молекулы пероксида водорода, выполняющие роль сигнальных молекул для нейтрофилов. Сбегаясь на рану, они преобразовывают H_2O_2 в гипохлорид, приводящий к гипогалогенному стрессу окружающих тканей.

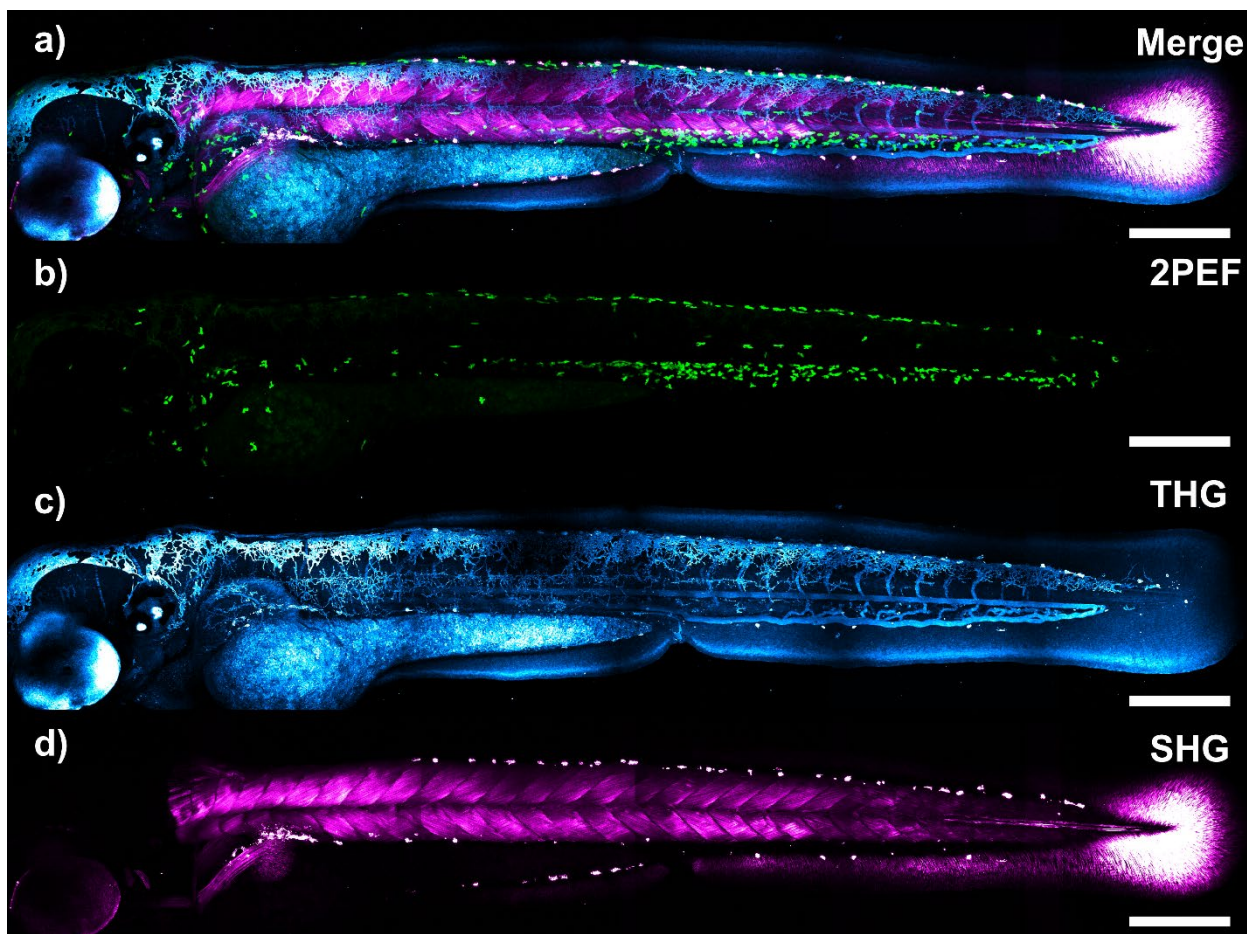


Рис.52 (а) Сшитые изображения проекции максимальной интенсивности, полученные при визуализации малька возрастом 3dpf. (b) Спектральный канал детекции 500-550 нм, визуализирующий нейтрофилы с сенсором Нурocrates2. Возбуждение на 980 нм. (с, d) Изображения (с) третьей и (d) второй гармоники при возбуждении на 1240 нм. Масштабная шкала 300 мкм.

Нами записывались изображения поврежденного плавника в виде z-стеков с временным шагом ~ 50 с и попеременной накачкой на 790 и 980 нм (рис.53.a-f). Для дополнительной информации о морфологии также параллельно записывались сигналы ГТГ и ГВГ от излучения на 1250 нм. Далее каждый срез по времени перестраивался в проекцию максимальной интенсивности. Полученный временной стек содержал в себе динамику движения отдельных нейтрофилов. Далее производился автоматический трекинг отдельных клеток, измерялся сигнал при двух длинах волн накачки и находилась динамика ратиометрического сигнала (рис.53.g,h).

Исследовались ратиометрические отклики как для сенсора Нурocrates2 (рис.38.g), так и для его контроля Нурocrates2-CS (рис.53.h), что является необходимой проверкой, так как сенсор Нурocrates2 не является рН

стабильным. В результате мы наблюдаем для большинства клеток небольшой рост ратиометрического сигнала $<50\%$, как для обычной, так и для контрольной версии сенсора, что может быть объяснено изменением уровня рН. Таким образом, можно говорить, что нейтрофилы обладают неким защитным механизмом от проникновения гипогалогенов в свою цитоплазму.

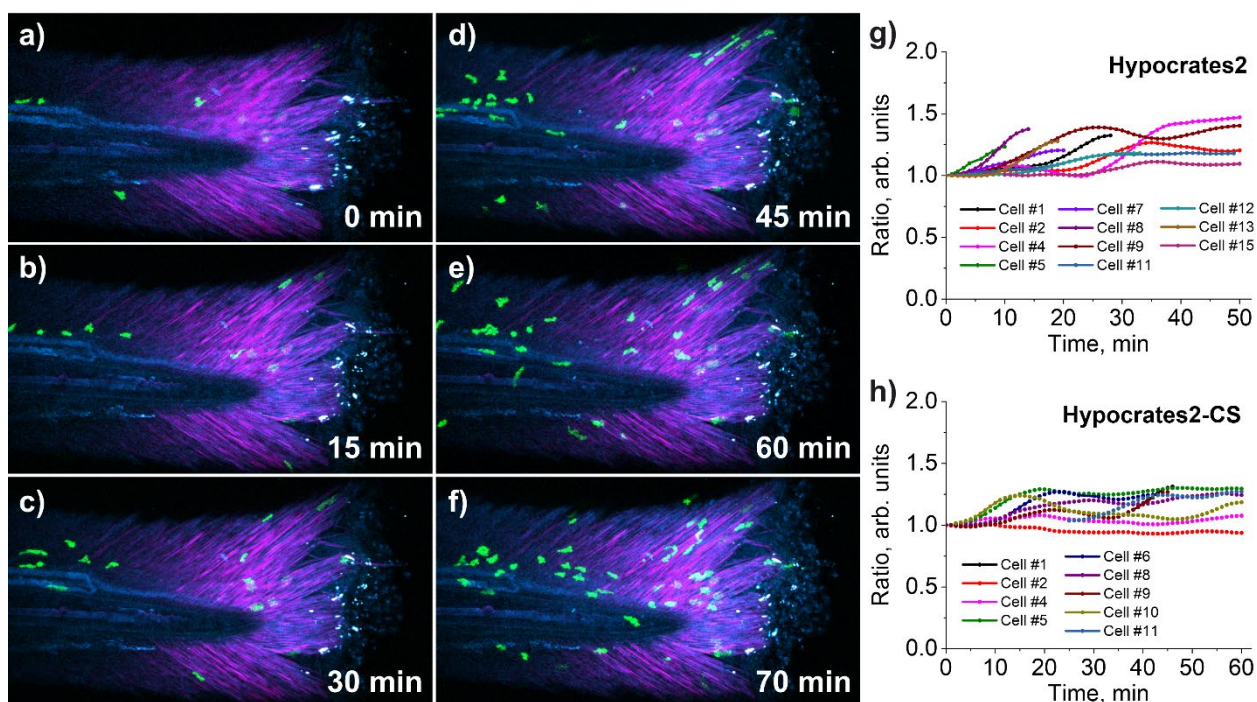


Рис.53 (a-f) Наложенные 2PEF (зеленый), THG (циановый) и SHG (фиолетовый) изображения плавника малька после ампутации кончика в различные моменты времени. (g, h) Трекинг ратиометрического сигнала (g) сенсора Hypocrates2 и (h) контрольной версии для отдельных нейтрофилов в процессе развития иммунного отклика.

Вторая серия экспериментов была посвящена наблюдению за процессом борьбы иммунной системы с привнесенной бактериальной инфекцией. Для этого при помощи инжектора Eppendorf FemtoJet 4i и капилляров из боросиликатного стекла подкожно вводили бактериальную суспензию кишечной палочки *E. Coli*. При этом существовало две модальности эксперимента – локализация сенсора Hypocrates2 (или контроля) в нейтрофилах (рис.54.a) или же в самих бактериях *E. Coli* (рис.54.b). Во втором случае для визуализации нейтрофилов использовалась линия рыб с экспрессией в них красного белка mCherry.

Также как и с плавниками, записывались z-t-стеки, однако в силу значительно меньшей области сканирования, временное разрешение

составляло 20-30 с. В результате удавалось пронаблюдать в реальном времени процесс фагоцитоза нейтрофилами бактерий. В случае локализации сенсора в цитоплазме нейтрофилов мы не наблюдаем какое бы то ни было изменение ратиометрического сигнала в процессе поедания бактерий (рис.39.с), что подтверждает наличие защитного механизма, обнаруженного в экспериментах с повреждением плавников. При этом, мы наблюдаем значительный ответ сенсора Нурocrates2, достоверно превышающий ответ контрольной версии, детектируемой от бактерий в фагосоме нейтрофила (рис.54.d).

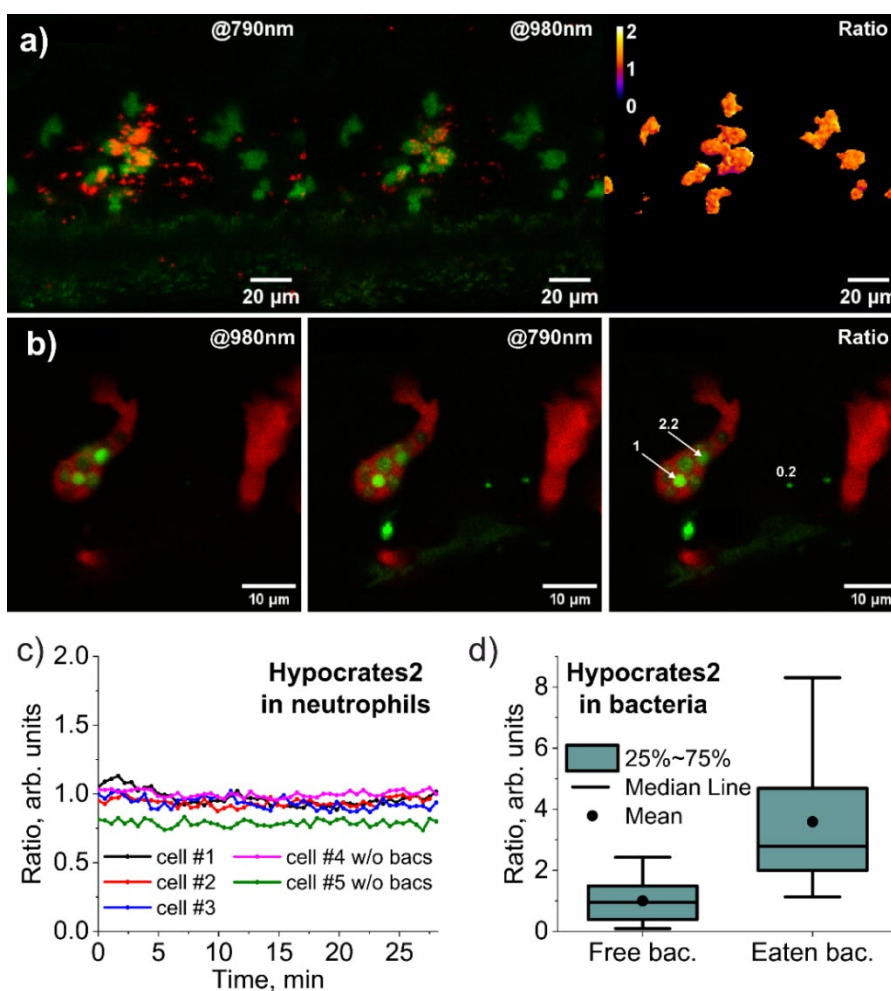


Рис.54 (а) Изображения процесса фагоцитоза бактерий нейтрофилами с сенсором Нурocrates2, полученные при возбуждении на 790, 980 нм, а также их отношение. (b) Изображения бактерий *E. Coli* с сенсором Нурocrates2 в фагосоме нейтрофила, полученные при возбуждении на 790 и 980 нм. (c) динамика ратиометрического сигнала сенсора в нейтрофилах в процессе поедания бактерий. (d) Статистика по N=64 и N= 36 бактерий в и снаружи нейтрофилов, соответственно. Отложены значения ратиометрического сигнала.

4.5 Выводы

Продемонстрирована визуализация с субклеточным пространственным разрешением динамики кислотности, концентрации пероксида водорода и хлорноватистой кислоты в нейронах, гепатоцитах и нейтрофилах живых мышей и личинок рыб при патологиях и повреждениях тканей. Объединение методик флуоресцентной микроскопии при двух- и трехфотонном возбуждении и микроскопии на основе второй и третьей гармоники позволяет проследить взаимосвязи между биохимическими параметрами клеток и морфологическими изменениями или же пространственными распределениями специфичных клеток в таких различных паталогических сценариях, как ишемия головного мозга, развитие злокачественной опухоли в печени и отклик иммунной системы на механическое повреждение или же бактериальную инфекцию.

Опубликованные работы:

1. **Chebotarev**, A.S., Kelmanson, I.V., Ivanova, A.D., Khramova, Y.V., Katrukha, V.A., Kotova, D.A., Raevskii, R.I., Moshchenko, A.A., Linovsky, G.N., Fedotov, A.B., Belousov, V.V., Bilan, D.S., and Lanin, A.A. “Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution.” *Sensors and Actuators B: Chemical* (2024), 410, p.135646. IF 8.640

Заключение

Проведено всестороннее исследование возможностей применения техник нелинейно-оптической микроскопии и спектроскопии к задаче мультимодальной структурной и функциональной визуализации живых систем, маркированных ратиометрическими флуоресцентными сенсорами. Продемонстрирован высокий потенциал использования двух- и трехфотонной флуоресцентной микроскопии для исследования окислительно-восстановительных процессов в живых тканях с помощью нового поколения белковых сенсоров.

В частности, показано, что нелинейно-оптическое преобразование фемтосекундных импульсов в коротком отрезке микроструктурированного световода преимущественно за счет фазовой самомодуляции в области нормальной ДГС позволяет сформировать широкополосное излучение высокого качества (со средней мощностью не менее 50 мВт, длительностью не более 100 фс, степенью деполяризации не более 4% и параметром качества пучка M^2 не меньше 1.2) для проведения спектроскопии и микроскопии двухфотонного возбуждения флуоресцентных маркеров в диапазоне от 650 нм до 1150 нм, что покрывает область двухфотонного возбуждения наиболее популярных флуоресцентных белков. Управление спектральной амплитудой и фазой такого излучения позволяет достичь порога чувствительности спектроскопии (произведение сечения процесса на квантовый выход и концентрацию молекул) около 1 мкМ ГМ при спектральном разрешении до 10 нм, а также на порядок повысить сигнал двухфотонной микроскопии.

Показано, что при использовании перестраиваемого источника фемтосекундных импульсов с достаточно большой длительностью (> 200 фс), высокоапертурного объектива ($NA \approx 1$) и аккуратном учете спектральных потерь оптической схемы возможно корректное восстановление спектров двухфотонного возбуждения путем нормировки на опорный сигнал второй гармоники от нелинейного кристалла. Данная техника позволила покрыть

спектральный диапазон 1000-1500 нм, соответствующий области возбуждения перспективных красных и инфракрасных флуоресцентных меток.

Созданный источник зондирующего излучения в диапазоне 1320-1700 нм на базе оптических солитонов (длительности ~ 50 фс), формирующихся в процессе распространения импульсов Cr:F лазера на длине волны 1250 нм в МС световоде в области аномальной ДГС, позволяет проводить исследования трехфотонных спектроскопических свойств флуоресцентных меток с чувствительностью $1 \text{ мкМ} \cdot 10^{-81} \cdot \text{см}^6 \cdot \text{с}^2$ и спектральным разрешением ~ 15 нм. Использование жесткой фокусировки ($NA \approx 1$) и тяжелой иммерсионной воды с изоляцией от атмосферы ($\mu_{D_2O} = \mu_{H_2O} / 500$ на 1.43 мкм), позволило избежать артефактов измерений за счет поглощения воды и генерации паразитного сигнала третьей гармоники от границ раздела.

Суммарный рабочий спектральный диапазон созданных платформ для двух- и трехфотонной спектроскопии 650 – 1700 нм покрывает все практически значимые зоны оптической прозрачности биологических тканей и длин волн возбуждения существующих флуоресцентных белков.

Измерены спектры двухфотонного возбуждения в абсолютных значениях белковых сенсоров редокс окислительно-восстановительных процессов одного семейства (на основе белка YFP). Значительные различия в формах и амплитудах спектров объясняется вариацией локального электрического поля возле единого флуорофора. Яркости сенсоров демонстрируют значения 10-45 ГМ, что сопоставимо с наиболее распространенными кальциевыми сенсорами серии GCaMP. Установлена общая закономерность в положении пика возбуждения окисленной формы сенсоров в районе 950 нм, связанная с преобладанием электронно-колебательного перехода **0–1** для депротонированной формы хромофора. Двухфотонные изобиестические точки всей линейки изучаемых белков лежат в диапазоне 800-900 нм.

В режиме двухцветной двухфотонной микроскопии культур клеток получены калибровочные кривые для сенсоров кислотности и пероксида водорода, позволяющие восстановить абсолютные значения концентраций.

Продемонстрирована возможность быстрой (до 1 с) визуализации динамик концентраций с точностью не хуже $\Delta C[\text{H}^+] \approx 0.05$ pH и $\Delta C[\text{H}_2\text{O}_2] \approx 0.1$ мкМ, как на культуре, так и в нейронах на глубинах > 100 мкм переживающего среза мозга мыши.

Пики двухфотонного возбуждения сенсора Hyper-FAST с красными флуорогенами HBR3,5-DOM, N871 и 3a приходятся на длины волн 1040 нм, 1120 нм и 1250 нм, соответственно, что обеспечивает эффективное возбуждение излучением Yb лазера (1040 нм) и Cr:F лазера (1250 нм). Добавление опорного зеленого белка UnaG позволяет реализовать ратиометрический опрос в режимах чистого двухфотонного (на 1040 нм) и гибридного двух- / трехфотонного (на 1240 нм) возбуждения, пригодного для визуализации динамики пероксида водорода в клеточных культурах и переживающих срезах мозга.

Высокое пиковое значение яркости трехфотонного возбуждения SuperHer3s (около 1×10^{-80} см⁶ с²) расположено на длине волны 1340 нм в окне прозрачности биотканей и зависит от кислотности среды, что открывает перспективы использования сенсора для трехфотонной функциональной микроскопии глубоких слоев. Излучение на 1250 нм позволяет трехфотонно визуализировать нейроны с сенсорами SuperHer3s и Hyper7, демонстрируя многократное увеличение соотношения сигнал/фон на глубинах > 200 мкм в коре головного мозга мыши по сравнению с двухфотонным возбуждением.

Предельная глубина визуализации двухфотонной микроскопии (отношение сигнал/фон = 1), определенная на фантоме мозга, составляет 6-7 длин рассеяния и обуславливается генерация сигнала вне фокуса в поле сходящегося пучка накачки. Флуоресцентная микроскопия при трехфотонном возбуждении демонстрирует отсутствие детектируемого фонового сигнала на глубинах не менее 5 длин рассеяния, меньшую деградацию фокусировки и большую локализацию сигнала.

Продемонстрирована визуализация с субклеточным пространственным разрешением динамики кислотности, концентрации пероксида водорода и

хлорноватистой кислоты в нейронах, гепатоцитах и нейтрофилах живых мышей и личинок рыб при патологиях и повреждениях тканей. Объединение методик флуоресцентной микроскопии при двух- и трехфотонном возбуждении и микроскопии на основе второй и третьей гармоники позволяет проследить взаимосвязи между биохимическими параметрами клеток и морфологическими изменениями или же пространственными распределениями специфичных клеток в таких различных паталогических сценариях, как ишемия головного мозга, развитие злокачественной опухоли в печени и отклик иммунной системы на механическое повреждение или же бактериальную инфекцию.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.ф.-м.н Александру Александровичу Ланину и профессору Алексею Михайловичу Желтикову за постоянное внимание к работе автора и эффективные обсуждения ее экспериментальных и теоретических основ. Автор выражает глубокую благодарность к.ф.-м.н Андрею Борисовичу Федотову за постоянную поддержку и внимание, что обеспечило высокий научный потенциал проводимых исследований, а также сотрудникам лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии, Федотову Илье Валерьевичу за вдохновляющую рабочую атмосферу, активное плодотворное сотрудничество при выполнении экспериментальных исследований и интересные дискуссии, способствовавшие развитию понимания теоретических аспектов производимой работы; И.В. Савицкому, М.С. Почечуеву, М.А. Солотенкову за помощь в совместном проведении экспериментов.

Работа проведена при поддержке гранта РФФ 22-72-10044

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248**, 73–76 (1990).
2. F. Helmchen and W. Denk, "Deep tissue two-photon microscopy," *Nat. Methods* **2**, 932 (2005).
3. L. L. Hsu, S. B. Pelet, T. M. Hancewicz, P. D. Kaplan, and P. T. C. So, "Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra," *J. Biomed. Opt.* **10**, 024016 (2005).
4. B. A. Molitoris and R. M. Sandoval, "Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes," *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **288**, F1084–F1089 (2005).
5. D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov, "Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues," *Physiol. Rev.* **90**, 1103–1163 (2010).
6. M. Yildirim, H. Sugihara, P. T. So, and M. Sur, "Functional imaging of visual cortical layers and subplate in awake mice with optimized three-photon microscopy," *Nat. Commun.* **10**, 177 (2019).
7. W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7075–7080 (2003).
8. D. Débarre, W. Supatto, A.-M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy," *Nat. Methods* **3**, 47 (2006).
9. N. S. Makarov, M. Drobizhev, and A. Rebane, "Two-photon absorption standards in the 550–1600 nm excitation wavelength range," *Opt. Express* **16**, 4029–4047 (2008).
10. S. de Reguardati, J. Pahapill, A. Mikhailov, Y. Stepanenko, and A. Rebane, "High-accuracy reference standards for two-photon absorption in the 680–1050 nm wavelength range," *Opt. Express* **24**, 9053–9066 (2016).
11. M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, and A. Rebane, "Two-photon absorption properties of fluorescent proteins," *Nat. Methods* **8**, 393–399 (2011).
12. K. C. Wagener, B. Kolbrink, K. Dietrich, K. M. Kizina, L. S. Terwitte, B. Kempkes, G. Bao, and M. Müller, "Redox indicator mice stably expressing genetically encoded neuronal roGFP: versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology," *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 41–58 (2016).
13. M. O. Breckwoldt, F. M. Pfister, P. M. Bradley, P. Marinković, P. R. Williams, M. S. Brill, B. Plomer, A. Schmalz, D. K. St Clair, and R. Naumann, "Multiparametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo," *Nat. Med.* **20**, 555–560 (2014).
14. H. Gest, "The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society," *Notes Rec. R. Soc. Lond.* **58**, 187–201 (2004).
15. J. G. White, W. B. Amos, and M. Fordham, "An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy.," *J. Cell Biol.* **105**, 41–48 (1987).
16. M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen," *Ann. Phys.* **401**, 273–294 (1931).

17. S. Golovynskiy, I. Golovynska, L. I. Stepanova, O. I. Datsenko, L. Liu, J. Qu, and T. Y. Ohulchanskyy, "Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications," *J. Biophotonics* **11**, e201800141 (2018).
18. K. Svoboda and S. M. Block, "Biological Applications of Optical Forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247–285 (1994).
19. M. Wang, C. Wu, D. Sinefeld, B. Li, F. Xia, and C. Xu, "Comparing the effective attenuation lengths for long wavelength in vivo imaging of the mouse brain," *Biomed. Opt. Express* **9**, 3534–3543 (2018).
20. D. Kleinfeld, P. P. Mitra, F. Helmchen, and W. Denk, "Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15741–15746 (1998).
21. K. Svoboda, F. Helmchen, W. Denk, and D. W. Tank, "Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo," *Nat. Neurosci.* **2**, 65–73 (1999).
22. P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, "Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti: Al₂O₃ regenerative amplifier," *Opt. Lett.* **28**, 1022–1024 (2003).
23. D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, and C. Xu, "Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation," *Opt. Express* **17**, 13354–13364 (2009).
24. D. Kobat, N. G. Horton, and C. Xu, "In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex," *J. Biomed. Opt.* **16**, 106014–106014 (2011).
25. P. Theer and W. Denk, "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy," *JOSA A* **23**, 3139–3149 (2006).
26. A. Leray, C. Odin, E. Huguet, F. Amblard, and Y. Le Grand, "Spatially distributed two-photon excitation fluorescence in scattering media: Experiments and time-resolved Monte Carlo simulations," *Opt. Commun.* **272**, 269–278 (2007).
27. M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak, "Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth," *J. Neurosci. Methods* **111**, 29–37 (2001).
28. T. Wang, D. G. Ouzounov, M. Wang, and C. Xu, "Quantitative Comparison of Two-photon and Three-photon Activity Imaging of GCaMP6s-labeled Neurons in vivo in the Mouse Brain," in *Optics and the Brain* (Optica Publishing Group, 2017), pp. BrM4B-4.
29. S. W. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader, A. Soini, H. M. Malak, I. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, "Three-photon excitation in fluorescence microscopy," *J. Biomed. Opt.* **1**, 71–74 (1996).
30. C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10763–10768 (1996).
31. N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu, "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain," *Nat. Photonics* **7**, 205–209 (2013).
32. D. G. Ouzounov, T. Wang, M. Wang, D. D. Feng, N. G. Horton, J. C. Cruz-Hernández, Y.-T. Cheng, J. Reimer, A. S. Tolias, N. Nishimura, and C. Xu, "In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain," *Nat. Methods* **14**, 388–390 (2017).

33. T. Wang, D. G. Ouzounov, C. Wu, N. G. Horton, B. Zhang, C.-H. Wu, Y. Zhang, M. J. Schnitzer, and C. Xu, "Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull," *Nat. Methods* **15**, 789–792 (2018).
34. "Two-Photon Fluorescent Probes," <https://www.janelia.org/lab/harris-lab/research/photophysics/two-photon-fluorescent-probes>.
35. X. Deng, Z. Zhuang, H. Liu, P. Qiu, and K. Wang, "Measurement of 3-photon excitation and emission spectra and verification of Kasha's rule for selected fluorescent proteins excited at the 1700-nm window," *Opt. Express* **27**, 12723–12731 (2019).
36. L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, and C. Xu, "Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 3427–3433 (2014).
37. T. Wang and C. Xu, "Three-photon neuronal imaging in deep mouse brain," *Optica* **7**, 947–960 (2020).
38. T. Wang, C. Wu, D. G. Ouzounov, W. Gu, F. Xia, M. Kim, X. Yang, M. R. Warden, and C. Xu, "Quantitative analysis of 1300-nm three-photon calcium imaging in the mouse brain," *Elife* **9**, e53205 (2020).
39. X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, and S. Nie, "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots," *Nat. Biotechnol.* **22**, 969 (2004).
40. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science* **307**, 538–544 (2005).
41. C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel, and W. W. Webb, "Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores," *Bioimaging* **4**, 198–207 (1996).
42. L. V. Johnson, M. L. Walsh, and L. B. Chen, "Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 990–994 (1980).
43. P. Young and G. Feng, "Labeling neurons in vivo for morphological and functional studies," *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 642–646 (2004).
44. G. Miesenböck, "Genetic methods for illuminating the function of neural circuits," *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 395–402 (2004).
45. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," *Science* **263**, 802–805 (1994).
46. O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*," *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
47. D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier, "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein," *Gene* **111**, 229–233 (1992).
48. "The Nobel Prize in Chemistry 2008," <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>.
49. E. C. Greenwald, S. Mehta, and J. Zhang, "Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks," *Chem. Rev.* **118**, 11707–11794 (2018).
50. G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien, "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11241–11246 (1999).

51. A. I. Kostyuk, A. D. Demidovich, D. A. Kotova, V. V. Belousov, and D. S. Bilan, "Circularly permuted fluorescent protein-based indicators: history, principles, and classification," *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4200 (2019).
52. J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto, "A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein," *Nat. Biotechnol.* **19**, 137 (2001).
53. M. Mank, A. F. Santos, S. Drenth, T. D. Mrsic-Flogel, S. B. Hofer, V. Stein, T. Hendel, D. F. Reiff, C. Levelt, and A. Borst, "A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging," *Nat. Methods* **5**, 805–811 (2008).
54. L. Tian, S. A. Hires, T. Mao, D. Huber, M. E. Chiappe, S. H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S. A. McKinney, and E. R. Schreiter, "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators," *Nat. Methods* **6**, 875 (2009).
55. J. Lecoq, N. Orlova, and B. F. Grewe, "Wide. fast. deep: recent advances in multiphoton microscopy of in vivo neuronal activity," *J. Neurosci.* **39**, 9042–9052 (2019).
56. D. S. Bilan and V. V. Belousov, "HyPer family probes: state of the art," *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 731–751 (2016).
57. Y. G. Ermakova, V. V. Pak, Y. A. Bogdanova, A. A. Kotlobay, I. V. Yampolsky, A. G. Shokhina, A. S. Panova, R. A. Marygin, D. B. Staroverov, and D. S. Bilan, "SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range," *Chem. Commun.* **54**, 2898–2901 (2018).
58. A. I. Kostyuk, M.-A. Tossounian, A. S. Panova, M. Thauvin, R. I. Raevskii, D. Ezeriņa, K. Wahni, I. Van Molle, A. D. Sergeeva, and D. Vertommen, "Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo) hypohalous acids and their derivatives," *Nat. Commun.* **13**, 1–17 (2022).
59. V. V. Pak, D. Ezeriņa, O. G. Lyublinskaya, B. Pedre, P. A. Tyurin-Kuzmin, N. M. Mishina, M. Thauvin, D. Young, K. Wahni, S. A. M. Gache, A. D. Demidovich, Y. G. Ermakova, Y. D. Maslova, A. G. Shokhina, E. Eroglu, D. S. Bilan, I. Bogeski, T. Michel, S. Vríz, J. Messens, and V. V. Belousov, "Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function," *Cell Metab.* **31**, 642–653 (2020).
60. D. S. Bilan, M. E. Matlashov, A. Y. Gorokhovatsky, C. Schultz, G. Enikolopov, and V. V. Belousov, "Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments," *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1840**, 951–957 (2014).
61. H. Sies, V. V. Belousov, N. S. Chandel, M. J. Davies, D. P. Jones, G. E. Mann, M. P. Murphy, M. Yamamoto, and C. Winterbourn, "Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 499–515 (2022).
62. C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *JOSA B* **13**, 481–491 (1996).
63. M. Drobizhev, N. S. Makarov, T. Hughes, and A. Rebane, "Resonance Enhancement of Two-Photon Absorption in Fluorescent Proteins," *J. Phys. Chem. B* **111**, 14051–14054 (2007).
64. M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, and A. Rebane, "Describing Two-Photon Absorptivity of Fluorescent Proteins with a New Vibronic Coupling Mechanism," *J. Phys. Chem. B* **116**, 1736–1744 (2012).

65. M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes, and A. Rebane, "Absolute Two-Photon Absorption Spectra and Two-Photon Brightness of Orange and Red Fluorescent Proteins," *J. Phys. Chem. B* **113**, 855–859 (2009).
66. M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes, and A. Rebane, "Color hues in red fluorescent proteins are due to internal quadratic Stark effect," *J. Phys. Chem. B* **113**, 12860–12864 (2009).
67. M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm," *Appl. Opt.* **37**, 7352–7356 (1998).
68. D. A. Oulianov, I. V. Tomov, A. S. Dvornikov, and P. M. Rentzepis, "Observations on the measurement of two-photon absorption cross-section," *Opt. Commun.* **191**, 235–243 (2001).
69. H. Hosoi, S. Yamaguchi, H. Mizuno, A. Miyawaki, and T. Tahara, "Hidden Electronic Excited State of Enhanced Green Fluorescent Protein," *J. Phys. Chem. B* **112**, 2761–2763 (2008).
70. H. Hashimoto, K. Isobe, A. Suda, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Measurement of two-photon excitation spectra of fluorescent proteins with nonlinear Fourier-transform spectroscopy," *Appl. Opt.* **49**, 3323–3329 (2010).
71. G. A. Blab, P. H. Lommerse, L. Cagnet, G. S. Harms, and T. Schmidt, "Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins," *Chem. Phys. Lett.* **350**, 71–77 (2001).
72. R. M. Wachter, M.-A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson, and S. J. Remington, "Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein," *Structure* **6**, 1267–1277 (1998).
73. H. Kawano, T. Kogure, Y. Abe, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins," *Nat. Methods* **5**, 373–374 (2008).
74. D. M. Shcherbakova, O. M. Subach, and V. V. Verkhusha, "Red Fluorescent Proteins: Advanced Imaging Applications and Future Design," *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 10724–10738 (2012).
75. D. M. Shcherbakova and V. V. Verkhusha, "Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging," *Nat. Methods* **10**, 751–754 (2013).
76. P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, "Generation of Optical Harmonics," *Phys. Rev. Lett.* **7**, 118–119 (1961).
77. J. A. Squier, M. Müller, G. J. Brakenhoff, and K. R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy," *Opt. Express* **3**, 315–324 (1998).
78. I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, "Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon," *Biophys. J.* **50**, 693–712 (1986).
79. S. Witte, A. Negrean, J. C. Lodder, C. P. De Kock, G. T. Silva, H. D. Mansvelder, and M. L. Groot, "Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5970–5975 (2011).
80. T. A. Theodossiou, C. Thrasivoulou, C. Ekwobi, and D. L. Becker, "Second Harmonic Generation Confocal Microscopy of Collagen Type I from Rat Tendon Cryosections," *Biophys. J.* **91**, 4665–4677 (2006).
81. S.-J. Lin, S.-H. Jee, C.-J. Kuo, R.-J. Wu, W.-C. Lin, J.-S. Chen, Y.-H. Liao, C.-J. Hsu, T.-F. Tsai, Y.-F. Chen, and C.-Y. Dong, "Discrimination of basal cell carcinoma

- from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging," *Opt. Lett.* **31**, 2756–2758 (2006).
82. M. Han, G. Giese, and J. F. Bille, "Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera," *Opt. Express* **13**, 5791–5797 (2005).
 83. A. Zoumi, X. Lu, G. S. Kassab, and B. J. Tromberg, "Imaging Coronary Artery Microstructure Using Second-Harmonic and Two-Photon Fluorescence Microscopy," *Biophys. J.* **87**, 2778–2786 (2004).
 84. E. C. Rothstein, M. Nauman, S. Chesnick, and R. S. Balaban, "Multi-photon excitation microscopy in intact animals," *J. Microsc.* **222**, 58–64 (2006).
 85. W. Sun, S. Chang, D. C. S. Tai, N. Tan, G. Xiao, H. Tang, and H. Yu, "Nonlinear optical microscopy: use of second harmonic generation and two-photon microscopy for automated quantitative liver fibrosis studies," *J. Biomed. Opt.* **13**, 064010 (2008).
 86. A.-M. Pena, A. Fabre, D. Débarre, J. Marchal-Somme, B. Crestani, J.-L. Martin, E. Beaurepaire, and M.-C. Schanne-Klein, "Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy," *Microsc. Res. Tech.* **70**, 162–170 (2007).
 87. O. Nadiarnykh, S. Plotnikov, W. A. Mohler, I. Kalajzic, D. Redford-Badwal, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation imaging microscopy studies of osteogenesis imperfecta," *J. Biomed. Opt.* **12**, 051805 (2007).
 88. O. Nadiarnykh, R. B. LaComb, M. A. Brewer, and P. J. Campagnola, "Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by Second Harmonic Generation imaging microscopy," *BMC Cancer* **10**, 94 (2010).
 89. D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7081–7086 (2003).
 90. A. C. Kwan, D. A. Dombeck, and W. W. Webb, "Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11370–11375 (2008).
 91. P. J. Campagnola and L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," *Nat. Biotechnol.* **21**, 1356 (2003).
 92. O. Masihzadeh, P. Schlup, and R. A. Bartels, "Label-free second harmonic generation holographic microscopy of biological specimens," *Opt. Express* **18**, 9840–9851 (2010).
 93. B. A. Nemet, V. Nikolenko, and R. Yuste, "Second harmonic imaging of membrane potential of neurons with retinal," *J. Biomed. Opt.* **9**, 873–882 (2004).
 94. B. R. Masters and P. So, *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy* (Oxford University Press, 2008).
 95. А. М. Желтиков, "Фемто-и аттосекундная спектхронография," Учебно-Методическое Пособие По Курсу Лекций М Интеллект-Центр (2006).
 96. M. Rehberg, F. Krombach, U. Pohl, and S. Dietzel, "Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy," *PLOS ONE* **6**, e28237 (2011).
 97. F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J.-M. Legeais, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Multimodal Nonlinear Imaging of the Human Cornea," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2459–2465 (2010).

98. G. J. Tserevelakis, E. V. Megalou, G. Filippidis, B. Petanidou, C. Fotakis, and N. Tavernarakis, "Label-Free Imaging of Lipid Depositions in *C. elegans* Using Third-Harmonic Generation Microscopy," *PLOS ONE* **9**, e84431 (2014).
99. S.-Y. Chen, C.-Y. S. Hsu, and C.-K. Sun, "Epi-third and second harmonic generation microscopic imaging of abnormal enamel," *Opt. Express* **16**, 11670–11679 (2008).
100. D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, and Y. Silberberg, "Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy," *J. Struct. Biol.* **147**, 3–11 (2004).
101. B. Weigelin, G.-J. Bakker, and P. Friedl, "Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion," *IntraVital* **1**, 32–43 (2012).
102. D. Débarre, W. Supatto, A.-M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy," *Nat. Methods* **3**, 47–53 (2006).
103. S. Witte, A. Negrean, J. C. Lodder, C. P. J. de Kock, G. T. Silva, H. D. Mansvelder, and M. L. Groot, "Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5970–5975 (2011).
104. R. W. Boyd, "Nonlinear optics," in *Handbook of Laser Technology and Applications (Three-Volume Set)* (Taylor & Francis, 2003), pp. 161–183.
105. S. O. Konorov, D. A. Akimov, A. A. Ivanov, M. V. Alfimov, S. Botti, R. Ciardi, L. D. Dominicus, L. S. Asilyan, A. A. Podshivalov, D. A. Sidorov-Biryukov, R. Fantoni, and A. M. Zheltikov, "Femtosecond optical harmonic generation as a non-linear spectroscopic probe for carbon nanotubes," *J. Raman Spectrosc.* **34**, 1018–1024 (2003).
106. M. A. Díaz-García, F. Agulló-López, W. E. Torruellas, and G. I. Stegeman, "Identification of two-photon states in phthalocyanines by third harmonic generation spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **235**, 535–540 (1995).
107. A. Schülzgen, Y. Kawabe, E. Hanamura, A. Yamanaka, P.-A. Blanche, J. Lee, H. Sato, M. Naito, N. T. Dan, S. Uchida, Y. Tanabe, and N. Peyghambarian, "Two-Photon Resonant Third-Harmonic Generation in $\{\mathrm{La}\}_2\{\mathrm{CuO}\}_4$," *Phys. Rev. Lett.* **86**, 3164–3167 (2001).
108. T. Hasegawa, K. Ishikawa, T. Kanetake, T. Koda, K. Takeda, H. Kobayashi, and K. Kubodera, "Excitonic resonant effect in the third-order nonlinear optical properties of blue- and red-form polydiacetylene films," *Chem. Phys. Lett.* **171**, 239–244 (1990).
109. W. E. Torruellas, D. Neher, R. Zanoni, G. I. Stegeman, F. Kajzar, and M. Leclerc, "Dispersion measurements of the third-order nonlinear susceptibility of polythiophene thin films," *Chem. Phys. Lett.* **175**, 11–16 (1990).
110. I. Ledoux, I. D. W. Samuel, J. Zyss, S. N. Yaliraki, F. J. Schattenmann, R. R. Schrock, and R. J. Silbey, "Third-order microscopic nonlinearities of very long chain polyenes: saturation phenomena and conformational effects," *Chem. Phys.* **245**, 1–16 (1999).
111. J. Y. Huang and M. H. Wu, "Nonlinear optical studies of binary mixtures of hydrogen bonded liquids," *Phys. Rev. E* **50**, 3737–3746 (1994).
112. R. D. Schaller, J. C. Johnson, and R. J. Saykally, "Nonlinear Chemical Imaging Microscopy: Near-Field Third Harmonic Generation Imaging of Human Red Blood Cells," *Anal. Chem.* **72**, 5361–5364 (2000).

113. G. O. Clay, A. C. Millard, C. B. Schaffer, J. Aus-der-Au, P. S. Tsai, J. A. Squier, and D. Kleinfeld, "Spectroscopy of third-harmonic generation: evidence for resonances in model compounds and ligated hemoglobin," *JOSA B* **23**, 932–950 (2006).
114. M.-R. Tsai, S.-Y. Chen, D.-B. Shieh, P.-J. Lou, and C.-K. Sun, "In vivo optical virtual biopsy of human oral mucosa with harmonic generation microscopy," *Biomed. Opt. Express* **2**, 2317–2328 (2011).
115. C. Xu and W. W. Webb, "Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy," *Top. Fluoresc. Spectrosc. Vol. 5 Nonlinear Two-Photon-Induc. Fluoresc.* 471–540 (2002).
116. G. Hong, A. L. Antaris, and H. Dai, "Near-infrared fluorophores for biomedical imaging," *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 1–22 (2017).
117. H. Liu, J. Wang, X. Peng, Z. Zhuang, P. Qiu, and K. Wang, "Ex and in vivo characterization of the wavelength-dependent 3-photon action cross-sections of red fluorescent proteins covering the 1700-nm window," *J. Biophotonics* **11**, e201700351 (2018).
118. C. J. Liu, A. Roy, A. A. Simons, D. M. Farinella, and P. Kara, "Three-photon imaging of synthetic dyes in deep layers of the neocortex," *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
119. Y. Hontani, F. Xia, and C. Xu, "Multicolor three-photon fluorescence imaging with single-wavelength excitation deep in mouse brain," *Sci. Adv.* **7**, eabf3531 (2021).
120. A. Rebane and A. Mikhaylov, "Improved reference standards for femtosecond three-photon excitation of fluorescence in the wavelength range 950-1750 nm," in *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVIII* (International Society for Optics and Photonics, 2018), Vol. 10498, p. 1049830.
121. "Two-Photon Fluorescent Probes | Janelia Research Campus," <https://www.janelia.org/lab/harris-lab/research/photophysics/two-photon-fluorescent-probes>.
122. S. Kedenburg, M. Vieweg, T. Gissibl, and H. Giessen, "Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region," *Opt. Mater. Express* **2**, 1588–1611 (2012).
123. M. Miranda, C. L. Arnold, T. Fordell, F. Silva, B. Alonso, R. Weigand, A. L'Huillier, and H. Crespo, "Characterization of broadband few-cycle laser pulses with the d-scan technique," *Opt. Express* **20**, 18732–18743 (2012).
124. A. A. Ivanov, A. A. Voronin, A. A. Lanin, D. A. Sidorov-Biryukov, A. B. Fedotov, and A. M. Zheltikov, "Pulse-width-tunable 0.7 W mode-locked Cr: forsterite laser," *Opt. Lett.* **39**, 205–208 (2014).
125. A. A. Ivanov, G. N. Martynov, A. A. Lanin, A. B. Fedotov, and A. M. Zheltikov, "High-energy self-mode-locked Cr:forsterite laser near the soliton blowup threshold," *Opt. Lett.* **45**, 1890–1893 (2020).
126. L. M. Barnett, T. E. Hughes, and M. Drobizhev, "Deciphering the molecular mechanism responsible for GCaMP6m's Ca²⁺-dependent change in fluorescence," *PLoS One* **12**, e0170934 (2017).
127. D. Botman, D. H. de Groot, P. Schmidt, J. Goedhart, and B. Teusink, "In vivo characterisation of fluorescent proteins in budding yeast," *Sci. Rep.* **9**, 2234 (2019).
128. M.-A. Plamont, E. Billon-Denis, S. Maurin, C. Gauron, F. M. Pimenta, C. G. Specht, J. Shi, J. Quérard, B. Pan, J. Rossignol, K. Moncoq, N. Morellet, M. Volovitch, E. Lescop, Y. Chen, A. Triller, S. Vriza, T. Le Saux, L. Jullien, and A. Gautier, "Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 497–502 (2016).

129. A. G. Tebo, B. Moeyaert, M. Thauvin, I. Carlon-Andres, D. Böken, M. Volovitch, S. Padilla-Parra, P. Dedecker, S. Vriz, and A. Gautier, "Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging," *Nat. Chem. Biol.* **17**, 30–38 (2021).
130. I. N. Myasnyanko, A. S. Gavrikov, S. O. Zaitseva, A. Y. Smirnov, E. R. Zaitseva, A. I. Sokolov, K. K. Malyshevskaya, N. S. Baleeva, A. S. Mishin, and M. S. Baranov, "Color tuning of fluorogens for FAST fluorogen-activating protein," *Chem. Eur. J.* **27**, 3986–3990 (2021).
131. A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf, "Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues," *Appl. Phys. B* **81**, 1015–1047 (2005).
132. A. A. Lanin, A. S. Chebotarev, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, D. S. Bilan, Y. G. Ermakova, A. B. Fedotov, A. A. Ivanov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging," *J. Biophotonics* **13**, e201900243 (2020).
133. N. Akbari, M. R. Rebec, F. Xia, and C. Xu, "Imaging deeper than the transport mean free path with multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **13**, 452–463 (2022).
134. J.-X. Cheng and X. S. Xie, "Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy," *JOSA B* **19**, 1604–1610 (2002).
135. L. V. Doronina-Amitonova, A. A. Lanin, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, and A. M. Zheltikov, "Dark-field third-harmonic imaging," *Appl. Phys. Lett.* **103**, 093701 (2013).
136. A. A. Lanin, A. S. Chebotarev, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Three-photon-resonance-enhanced third-harmonic generation for label-free deep-brain imaging: In search of a chemical contrast," *J. Raman Spectrosc.* **50**, 1296–1302 (2019).
137. A. N. Yaroslavsky, P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich, and H. J. Schwarzmaier, "Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range," *Phys. Med. Biol.* **47**, 2059 (2002).
138. B. Steinhorn, A. Sorrentino, S. Badole, Y. Bogdanova, V. Belousov, and T. Michel, "Chemogenetic generation of hydrogen peroxide in the heart induces severe cardiac dysfunction," *Nat. Commun.* **9**, 4044 (2018).
139. M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, A. S. Chebotarev, E. S. Fetisova, D. S. Bilan, E. K. Shevchenko, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Multimodal nonlinear-optical imaging of nucleoli," *Opt. Lett.* **46**, 3608–3611 (2021).
140. A. A. Lanin, M. S. Pochechuev, A. S. Chebotarev, I. V. Kelmanson, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Nonlinear-optical stain-free stereomicroscopy of astrocytes and gliovascular interfaces," *J. Biophotonics* **12**, e201800432 (2019).