

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

Чеботарев Артем Станиславович

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

1.3.19. Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научные руководители** – *Ланин Александр Александрович,*  
кандидат физико-математических наук
- Желтиков Алексей Михайлович,*  
доктор физико-математических наук, профессор
- Официальные оппоненты** – *Моисеев Сергей Андреевич,*  
доктор физико-математических наук, профессор  
Казанский национальный исследовательский  
технический университет им. А.Н. Туполева –  
КАИ, Казанский квантовый центр, директор
- Звягин Андрей Васильевич,*  
доктор физико-математических наук,  
Институт молекулярной тераностики, Научно-  
технологический парк биомедицины, ФГАОУ ВО  
Первый Московский государственный  
медицинский университет имени И.М. Сеченова  
(Сеченовский Университет), заместитель  
директора по науке
- Ширшин Евгений Александрович,*  
доктор физико-математических наук, доцент  
Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова, физический факультет,  
кафедра квантовой электроники, доцент

Защита диссертации состоится «27» июня 2024 г. в 13 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.013.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 62, корпус нелинейной оптики, ауд. имени С.А. Ахманова.

E-mail: [diss.sov.31@physics.msu.ru](mailto:diss.sov.31@physics.msu.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3011>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.013.4,  
кандидат физ.-мат. наук

Коновко Андрей Андреевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 ткм 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 ФБ на то время [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 pH и Cl<sup>-</sup> 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

## Научная новизна

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).

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  $\sim 1$  мин.

Впервые измерены абсолютные значения двухфотонной яркости флуоресцентных белковых сенсоров АФК семейства  $\text{srYFP}$ , демонстрирующие значения 10 – 45 ГМ (1 ГМ =  $10^{-50} \text{ см}^4 \cdot \text{с} \cdot \text{фотон}^{-1}$ ), что сопоставимо с наиболее распространенными кальциевыми сенсорами серии  $\text{GCaMP}$ . 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. Определены изобестические точки всей линейки изучаемых белков в двухфотонном формате. Впервые измерены значения трехфотонной яркости сенсора кислотности среды  $\text{SynHer3s}$  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 SyPer3s и NuPer7 в нейронах глубоких слоев среза коры головного мозга мыши с субклеточным разрешением при добавлении соответствующего аналита. 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**

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 динамика 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/см<sup>2</sup> 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 500x500 мкм<sup>2</sup>, 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 SynHer3s и HyPer7 в культурах клеток, переживающих срезах и мозге анестезированной мыши без видимых повреждений ткани (при достижении интенсивности на клетке до 1.9 ГВт/см<sup>2</sup> и средней мощности 25 мВт) за счет высокой эффективности трехфотонного возбуждения флуоресценции (около  $10^{-81}$  см<sup>6</sup>с<sup>2</sup>фотон<sup>-2</sup>). 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).

### **Апробация результатов исследования**

Основные результаты диссертационной работы были представлены в соавторстве с Чеботаревым А.С. либо им лично на 7 российских и международных научных конференциях. Материалы диссертационных исследований были опубликованы в 13 печатных работах (19.67 п.л.) в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, таких как *Sensors and Actuators B: Chemical*, *Optics Letters*, *Journal of Biophotonics*, *Journal of Physics: Photonics*, *Journal of Raman Spectroscopy*.

## **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 трансфецированных 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.

## **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, четырех глав текста, заключения, благодарностей и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 149 страниц, включая 54 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 140 наименования.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** обосновывается актуальность темы исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, и степень ее разработанности, формулируется цель и основные задачи, описывается объект и предмет исследования, излагается научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертации, формулируются положения, выносимые на защиту, описывается степень достоверности и апробация результатов работы, а также личный вклад автора.

**Первая глава** представляет собой обзор литературы по теме исследований, выполненных при подготовке диссертационной работы. В разделе 1.1 обсуждаются физические принципы, лежащие в основе нелинейно-оптической микроскопии, преимущества данной техники над линейными аналогами в применении к изучению биологических тканей. В разделе 1.2 обсуждаются 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. Раздел 1.3 посвящен описанию дополнительных источников контраста в виде сигналов генерации второй и третьей оптических гармоник, позволяющие реализовывать мультимодальный аспекта нелинейно-оптической микроскопии.

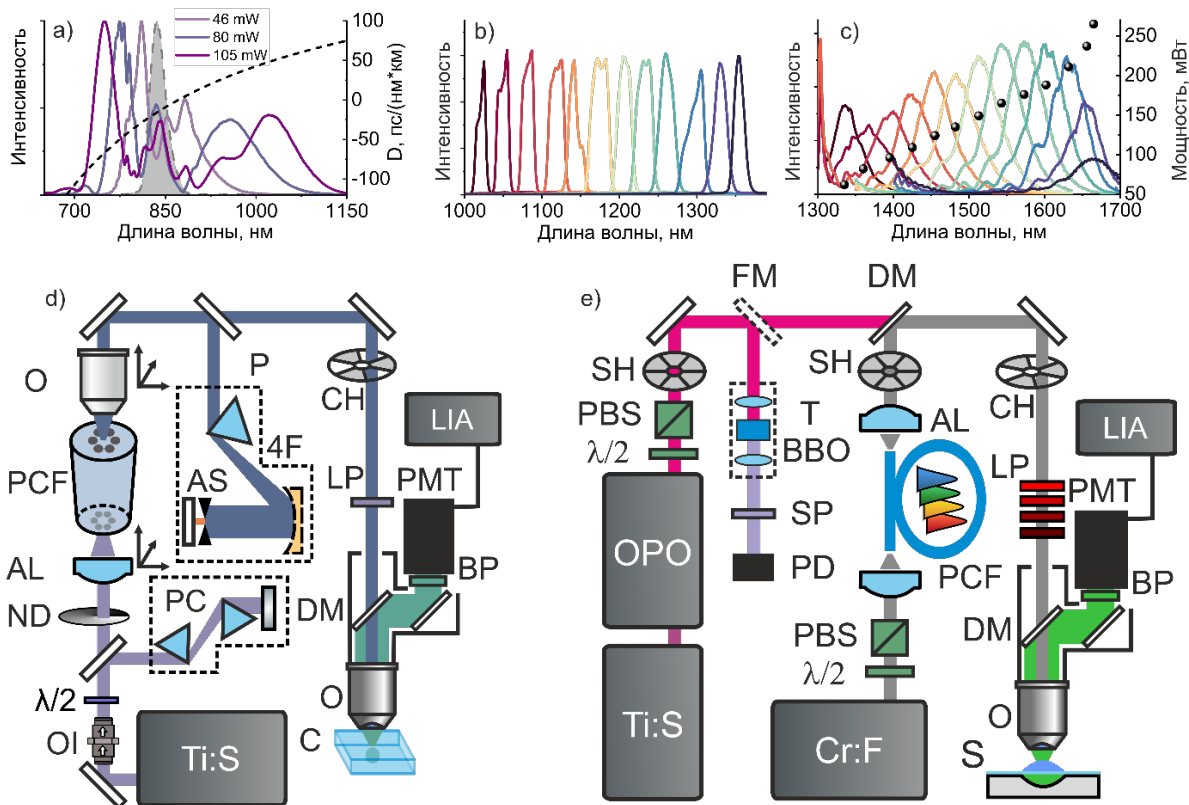


Рис.1 (а-с) Спектры перестраиваемого зондирующего излучения и (d,e) схемы экспериментальных установок для проведения двух- и трехфотонной спектроскопии флуоресцентных меток в спектральных диапазонах (a,d) 650-1150 нм, (b,e) 1000-1400 нм и (с, e) 1320 -1700 нм.

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, а также описаны две экспериментальные схемы, используемые в дальнейшем для проведения нелинейно-оптической микроскопии. В разделе 2.1 вводятся основные формулы, описывающие детектируемые сигналы флуоресценции при двух- и трехфотонном возбуждении и способы измерения сечений поглощения, основанные на использовании опорного образца или сигнала второй гармоники.

Раздел 2.2 посвящен реализации нелинейно-оптической спектроскопии. Для генерации фемтосекундного зондирующего излучения в столь широком диапазоне были сконструированы 3 оптические схемы, основанные на нелинейно-оптических спектральных преобразованиях входных импульсов

накачки. Первая платформа на базе титан-сапфирового генератора импульсов и микроструктурированного (МС) световода предоставляет собой источник когерентного широкополосного излучения, преимущественно за счет фазовой самомодуляции, простирающегося в диапазоне от 650 нм до 1150 нм. Для исследования спектрального диапазона 1000 – 1400 нм, что покрывает зону двухфотонного возбуждения перспективных красных и инфракрасных флуоресцентных меток, применяется параметрический генератор света, синхронно накачиваемый титан-сапфировым лазером. Наконец, третья 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.

Проведенные измерения спектров широко распространенных органических красителей демонстрируют высокую точность предложенных методов, позволяя восстанавливать как форму спектральной зависимости, так и абсолютные значения сечений возбуждения. При этом, техники обладают высокой чувствительностью – не хуже  $(C\varphi\sigma_2)_{\min} \approx 1$  мкМ ГМ и  $(C\varphi\sigma_3)_{\min} \approx 1$  мкМ $\cdot 10^{81}$ ·см<sup>6</sup>·с<sup>2</sup>, спектральным разрешением  $\Delta\lambda \approx 10$  нм и скоростью записи до 1 мин в случае применения МК волноводов.

Помимо спектроскопических техник изучения флуоресцентных белковых сенсоров, в представленной диссертации развиваются подходы к нелинейно-оптической микроскопии. В разделе 2.3 речь идет о двух созданных оптических платформах для функциональной и структурной визуализации различных биологических моделей. В силу ратиометрической природы сенсоров, системы обладают двухцветной накачкой, совмещенной в пространстве и синхронизованной во времени с записью изображений с микроскопа. Для работы с культурами клеток была модернизирована схема с использованием МС световода. Реализованное независимое управление спектральной фазой обоих крыльев СК позволило повысить на порядок сигнал двухфотонной микроскопии. В случае сильно-рассеивающих образцов применялась мощная лазерная система, дополненная фемтосекундными лазерными источниками на длинах волн 1050 нм и 1250 нм для доступа к контрастам за счет генерации второй и третьей гармоник, а также флуоресценции при трехфотонном возбуждении.

**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.

В разделе 3.1 представлены результаты измерения и анализа двух- и трехфотонных спектров зеленых сенсоров, базирующихся на пермутированном желтом флуоресцентном белке (срYFP), а также красного/инфракрасного сенсора HyPer-FAST. Зеленые сенсоры из одного семейства демонстрируют высокую двухфотонную яркость (произведение квантового выхода флуоресценции на сечение двухфотонного поглощения) 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. Существенные вариации в формах спектров объясняются сильным влиянием локального поля окружения хромофора. Определены изобиестические точки всей линейки изучаемых белков в двухфотонном формате. Динамические диапазоны ратиометрических откликов сопоставимы со значениями в линейном случае. Для сенсора кислотности SypHer3s произведены измерения трехфотонного спектра возбуждения, раскрывающие ещё больший антистоксовый сдвиг пика окисленной формы, а также высокие абсолютные значения яркости до  $\varphi\sigma_3 \approx 10^{-80} \text{ см}^6 \text{ с}^2$ .

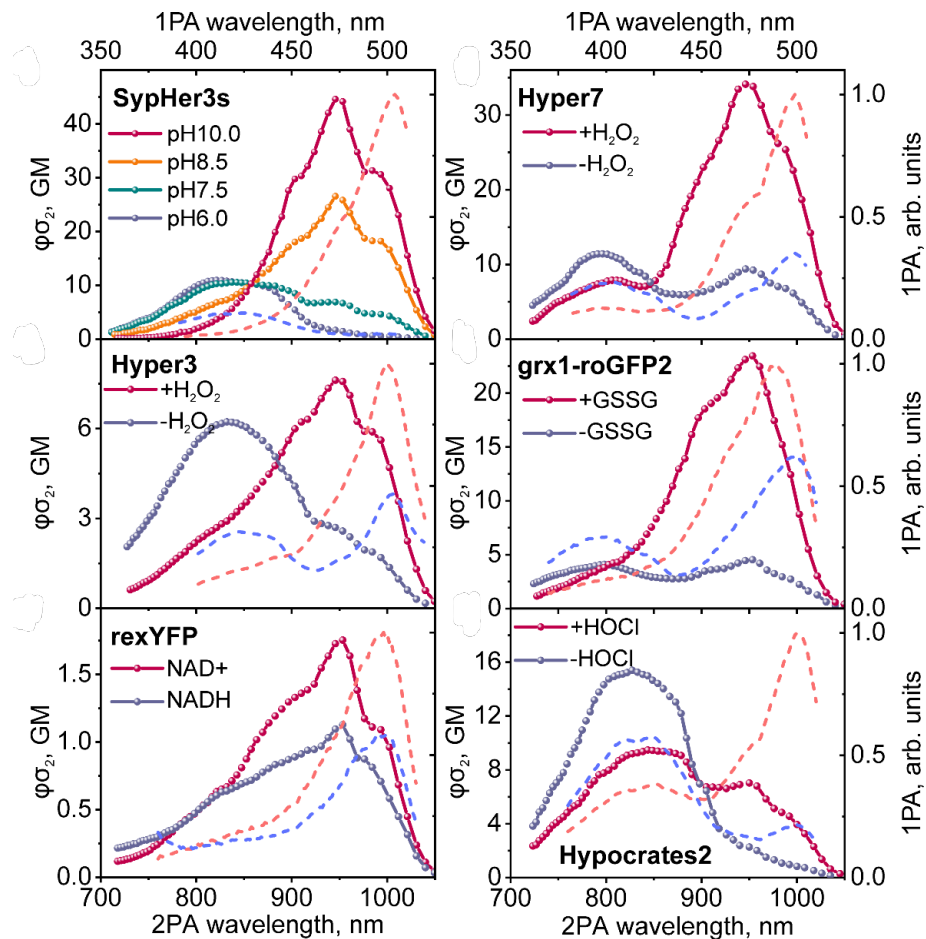


Рис.2 Спектры двухфотонного возбуждения в абсолютных значениях сенсоров в отсутствие (синий) и присутствии насыщающей концентрации (красный) аналита. Пунктирными линиями показаны спектры однофотонного возбуждения.

В разделе 3.2 приведены результаты экспериментов по двухфотонной микроскопии культур клеток HeLa, экспрессирующих сенсоры SypHer3s (pH) и Hyper7 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Продемонстрирована двухцветная попеременная визуализация с субклеточным разрешением при накачках на 790 нм и 980 нм. Отношение сигналов при возбуждении на этих длинах волн является функцией концентрации аналита, а его изменение называется ратиометрическим откликом сенсора. Запись изображений с последовательным добавлением различных концентраций аналита позволяет построить титровочные кривые – зависимость ратиометрического отклика от концентрации. Эти кривые позволили определить минимальные и насыщающие концентрации для данных сенсоров, а также рабочие и динамические диапазоны. Помимо этого, они позволяют восстановить абсолютные значения концентраций.

Далее демонстрируется возможность визуализации динамических изменений концентраций с использованием фемтосекундных импульсов длительность около 100 фс, средней мощностью 2-4 мВт и пиковой интенсивностью в фокусе не более 40 ГВт/см<sup>2</sup>. Временное разрешение, обусловленное временем записи кадров и переключением накачки, составляло ~ 3с при общем времени съемки до 1 часа. Тщательный контроль стабильности системы позволяет достоверно задетектировать изменения кислотности среды или концентрации пероксида водорода с точностью  $\Delta C[H^+] \approx 0.05$  рН и  $\Delta C[H_2O_2] \approx 0.1$  мкМ.

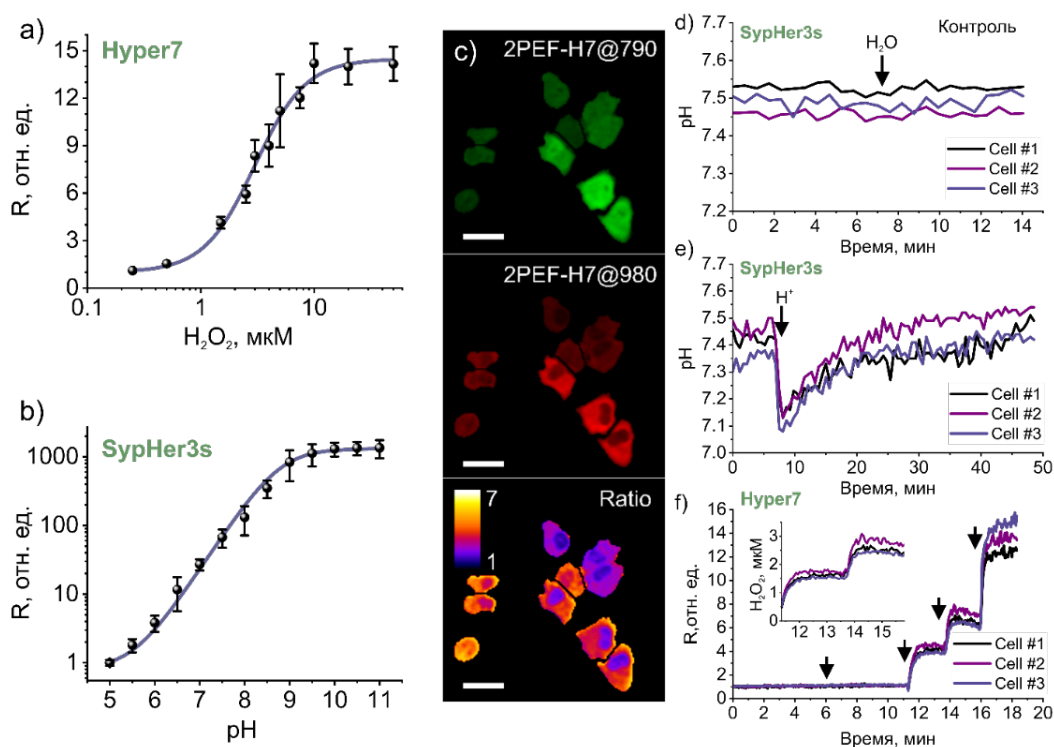


Рис.3 (a-b) Зависимость отношения сигналов при возбуждении на 980 нм к 790 нм от концентрации аналита для сенсоров (a) Hyper7 и (b) SuperHer3s. (c) Изображение клеток, полученное при возбуждении на двух длинах волн, и их отношение. (d-f) Динамические записи ратиометрического двухфотонного отклика при добавлении контроля/аналита.

Сенсор Hyper-FAST позволяет присоединять различных флуорогены, тем самым меняя свои спектральные свойства и открывая возможность эффективного двухфотонного возбуждения доступными лазерными источниками на кристаллах иттербия (1040 нм) и хром-форстерита (1250 нм). Однако, сенсор не обладает ратиометричностью. Для решения этой проблемы была реализована конструкция с добавлением опорного флуоресцентного белка UnaG. В работе предложены и реализованы две оригинальные модальности по однопучковому возбуждению данного сенсора - чистое двухфотонное возбуждения пары белок-сенсор на длине волны 1040 нм и гибридное двух- и трехфотонное возбуждение на 1240 нм.

В разделах 3.3 и 3.4 осуществлен переход к микроскопии сенсоров в глубине фиксированного и свежевывнутого мозга мыши. Первая модель позволила проанализировать способность системы к построению микроскопических изображений в присутствии сильного рассеяния на различных глубинах, определить пространственное разрешение и характерные длины затухания в интересующей ткани. Проиллюстрирована ДФП- И ТФП- микроскопия таких тканей, как кора головного мозга и печень мыши с использованием сенсоров Hyper7 и SuperHer3s. В дополнении к флуоресцентным методам, приведены примеры отличительных морфологических особенностей тканей с помощью микроскопии генерации второй и третьей гармоники, раскрывая в полной мере потенциал мультимодального подхода.

Для более детального изучения ограничений двух- и трехфотонной микроскопии был создан фантом мозга с использованием смеси рассеивающих и флуоресцентных полистироловых шариков с диаметрами 0.9 и 2 мкм, соответственно. Длины рассеяния такого образца близки к фиксированному мозгу и составляют  $l_{790} = 52$  мкм;  $l_{980} = 76$  мкм;  $l_{1250} = 105$  мкм, что достигалось подбором концентраций рассеивателей. Зависимости отношения сигнал-фон демонстрируют предельную глубину визуализации равную  $\sim 6-7$  длин рассеяния для двухфотонной микроскопии. Фоновый сигнал обусловлен возбуждением флуоресцентных шариков вне фокуса мощным сходящимся конусом накачки. Однако, в случае трехфотонного возбуждения полное отсутствие фонового сигнала, а падение соотношения сигнал-фон обусловлено достижением максимальной доступной мощности Cr:F лазера. Показано, что уменьшение эффективной числовой апертуры фокусировки за счет рассеяния приводит к ухудшению продольного разрешения по линейной зависимости  $1+az$ , где  $\alpha_{790} = 2.4 \pm 0.2 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\alpha_{980} = 1.2 \pm 0.1 \text{ mm}^{-1}$  и  $\alpha_{790} = 0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^{-1}$ . Наконец, измерения сигнала от уединенного 0.5-мкм-шарика в динамическом диапазоне  $\sim 5$  порядков

позволил проявить лучшее подавление сигнала трехфотонной микроскопии вне фокальной плоскости, чем двухфотонной.

В завершении главы 3 приводятся результаты серии экспериментов по мониторингу концентрационных динамик целевых аналитов в нейронах с субклеточным разрешением. Для проведения таких исследований использовались свежесрезанные срезы мозга мыши, сохраняющие свою функциональность в течении 1-2 часов после извлечения. Общая процедура измерений заключалась в построении изображений из области мозга объемом примерно  $280 \times 280 \times 30$  мкм на глубине  $\sim 100$  мкм, содержащей несколько флуоресцентных клеток. При таких настройках временной шаг составляет  $\sim 15$ с. Средние мощности накачек после объектива не превышали 20 мВт и 30 мВт для излучения на 790 нм и 980 нм, соответственно (для работы с сенсорами Syner3s и Nupur7) и 10 мВт и 35 мВт для 1040 нм и 1250 нм (для работы с сенсором Nupur-FAST). Такие параметры обеспечивают отсутствие фотообесцвечивания меток и теплового/нелинейного повреждения тканей.

В результате, во всех экспериментах, удалось достоверно задетектировать концентрационные динамики кислотности среды / пероксида водорода в отдельных нейронах при добавлении или стимулировании выработки соответствующего аналита. Для корректного восстановления значений ратиометрического сигнала была необходима перекалибровка пиковой интенсивности на глубине для разных длин волн возбуждения.

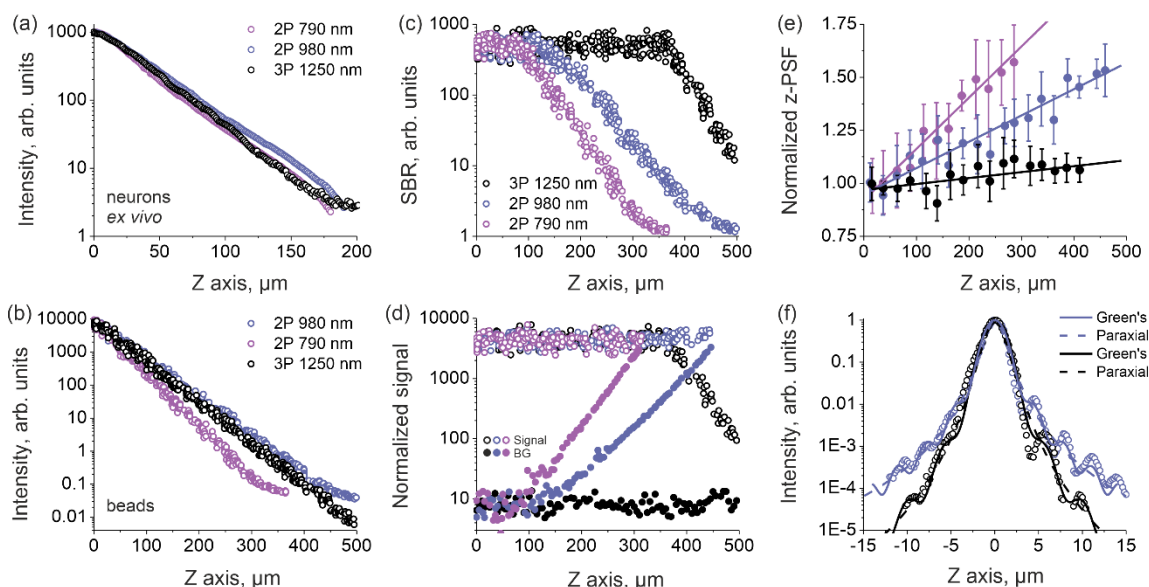


Рис.4 Зависимости сигналов Nupur7-нейронов в фиксированном срезе (a) и флуоресцирующих 2-мкм шариков (b), отношение сигнал-фон (c) и нормированные сигналы от шариков (полые круги) и фона (заполненные круги) от глубины z при двух- и трехфотонном возбуждении на 790 нм (фиолетовый), 980 нм (синий) и 1250 (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).

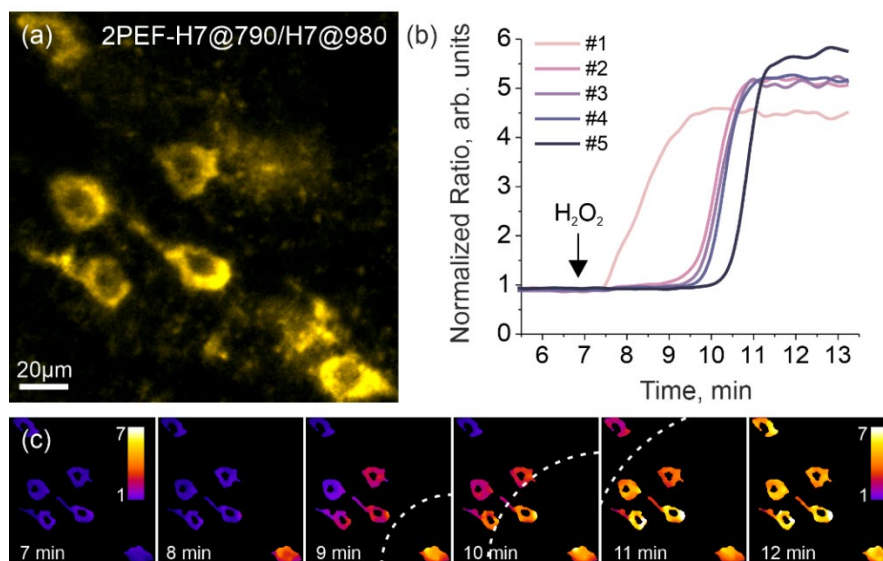


Рис.5 (a) Колокализация ответа НуPer7 из митохондрий нейронов (желтый) возбуждаемый на длине волны 790 нм и 980 нм. (b, c) Двухфотонный ратиометрический ответ НуPer7 из митохондрий пяти нейронов при добавлении пипеткой насыщающей концентрации 5 мМ  $H_2O_2$ . (c) Пунктирной линией на глаз проведен профиль распространения перекиси в срезе, реконструированный по сигналу сенсора.

**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.

В разделе 4.1 описываются необходимые шаги для проведения микроскопии мозга живой мыши, демонстрируется безмаркерная визуализация поверхностного слоя методом микроскопии генерации второй и третьей гармоники. Флуоресцентная метка, сенсор Нуper7, локализована в митохондриях микронного размера, то есть на грани оптического предела. Излучение на 980 нм позволяет различить такие структуры на глубинах вплоть до 600 мкм от поверхности мозга.

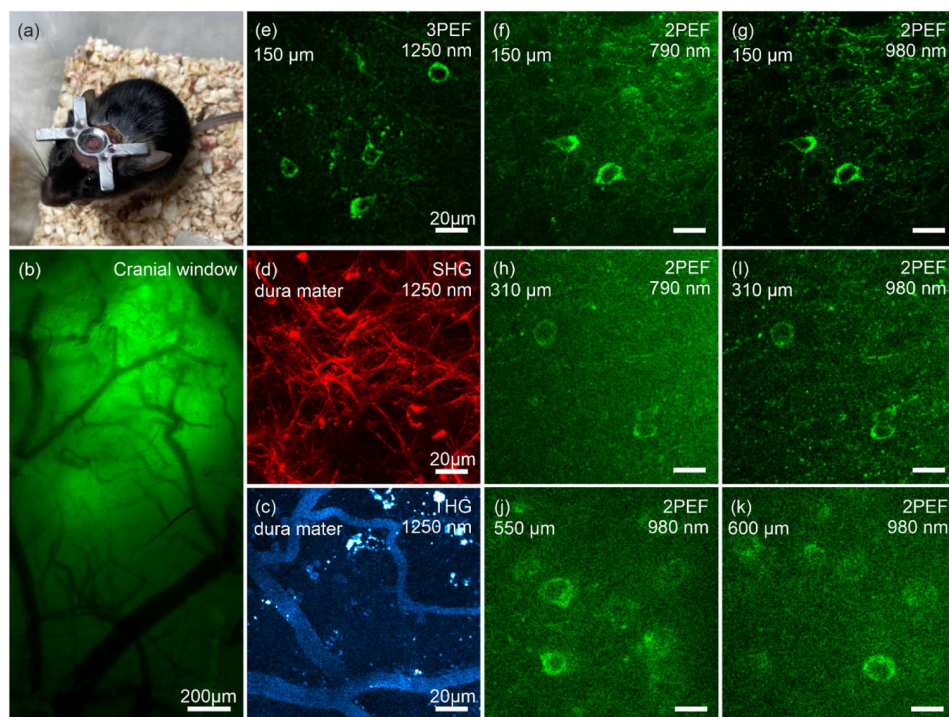


Рис.6 (а) Фотография мыши с головным крепежом для крепления под микроскопом. (b) Флуоресцентная визуализация приповерхностной слоя мозга через краниальное окно. (c, d) Микроскопия третьей (c) и второй (d) гармоник приповерхностного слоя мозга dura mater. (e–k) Трех- (e) и двухфотонная (f–k) флуоресцентная 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).

В разделах 4.2 – 4.4 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. Опрос сенсоров производился излучением Ti:S лазера на длине волны 790 нм и параметрического генератора света на длине волны 980 нм. В то время, как сигналы флуоресценции в отдельных каналах возбуждения могут флуктуировать за счет внешних факторов, отношение сигналов остается постоянным при записи опорной линии. 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. Например, распад отростков нейронов при развитии инсульта или перемещение нейтрофилов к очагу инфекции. Помимо этого, реализованная мультимодальность экспериментальной установки, позволяет получить дополнительную структурную информацию за счет ГВГ и ГТГ микроскопии, также в режиме реального времени.

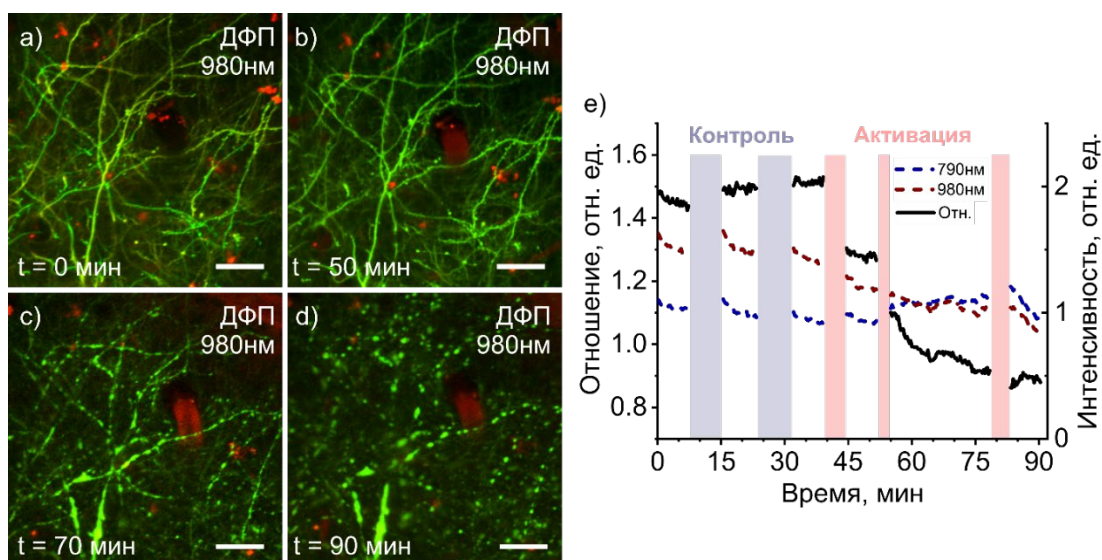


Рис.7 (а-d) Двухфотонные изображения отростков нейронов на глубине 50 мкм, экспрессирующих сенсор SytHer3s, в моменты времени (а) 0, (b) 50, (с) 70 мин и (с) 90 мин с начала эксперимента. (е) Зависимости сигналов флуоресценции SytHer3s при возбуждении на 790 нм (синяя линия) и 980 нм (красная линия) и их отношение (черная линия). В промежутки времени, отмеченные серыми областями, производилось освещение области светодиоидом. Закол красителя соответствует 30мин.

## 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 деполаризации 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  $\sim 50$  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  $\sim 15$  нм. Использование жесткой фокусировки ( $NA \approx 1$ ) и тяжелой иммерсионной воды с изоляцией от атмосферы ( $\mu_{D2O} = \mu_{H2O} / 500$  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 преобладание 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  $\Delta C[H^+] \approx 0.05$  рН 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 SuperHer3s (около  $1 \times 10^{-80} \text{ см}^6 \text{ с}^2$ ) 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 специфических 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.

## Список публикаций по теме диссертации, входящих в базы данных WoS и Scopus:

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. – Т. 410. – 135646. JIF WoS: 8.4 / 2,86 п.л. / вклад соискателя 70%.
2. **Chebotarev A.S.** Multimodal label-free imaging of murine hepatocellular carcinoma with a subcellular resolution / Ledyayeva V.S., Patsap O.I., Ivanov A.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Shokhina A.G., Lanin A.A. // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – Т. 16. - №. 12. – e202300228. JIF WoS: 2.8 / 1,73 п.л. / вклад соискателя 70%.
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. – Т. 14. - №. 3. – e202000301. JIF WoS: 2.8 / 1,93 п.л. / вклад соискателя 70%.
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. – Т. 46. - №. 15. – С. 3608–3611. JIF WoS: 3.6 / 0,99 п.л. / вклад соискателя 15%.
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. – Т. 3. - №. 4. – 044001. JIF Scopus: 3.9 / 2,14 п.л. / вклад соискателя 50%.
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. – Т. 52. - №. 9. – С. 1552–1560. JIF WoS: 2.5 / 1,68 п.л. / вклад соискателя 70%.
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. – Т. 51. - №. 10. – С. 1942-1950. JIF WoS: 2.5 / 1,63 п.л. / вклад соискателя 50%.
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. – Т. 45. - №. 4. – С. 836-839. JIF WoS: 3.6 / 0,98 п.л. / вклад соискателя 30%.
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. JIF WoS: 2.8 / 1,15 п.л. / вклад соискателя 50%.
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. JIF WoS: 2.8 / 1,39 п.л. / вклад соискателя 30%.
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. JIF WoS: 3.6 / 0,93 п.л. / вклад соискателя 15%.

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. JIF WoS: 2.5 / 1,11 п.л. / вклад соискателя 50%.
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. JIF WoS: 2.8 / 1,15 п.л. / вклад соискателя 50%.

#### 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).