

Nina Vuorivirta

MULTIFOTONIMIKROSKOPIA TYÖKALUNA AIVOKUVANTAMISESSA

Kandidaatintyö
Teknis-luonnontieteellinen tiedekunta
Ohjaaja ja tarkastaja: Mikko Huttunen
Kesäkuu 2020

TIIVISTELMÄ

Nina Vuorivirta: Multifotonimikroskopia työkaluna aivokuvantamisessa
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Teknis-luonnontieteellinen
Kesäkuu 2020

Multifotonimikroskopia on optinen kuvantamismenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia elävien kolmiulotteisten näytteiden rakenteita ja toiminnallisia ominaisuuksia. Tässä kandidaatintyössä tutkitaan multifotonimikroskopian hyödyntämistä aivokuvantamisen sovelluksessa neuronijoukkojen ja niiden välillä tapahtuvien nopeiden signaalintiprosessien havainnoimiseksi. Työn tavoitteena on selvittää menetelmän mahdollisuuksia aivojen monimutkaisen neuronitason toiminnan havainnoimisessa sekä esitellä keinoja näytteistä aiheutuvien rajoitusten, kuten kuvantamisyyvyyden, käsittelemiseksi.

Työ jakaantuu kolmeen osaan. Teoriaosuuden luvussa 2 esitellään biologisten näytteiden kuvantamiseen käytettäviä perinteisiä optisia mikroskopiamenetelmiä pääpiirteittäin ja tuodaan esille elävästä, paksusta näytteestä aiheutuvat kuvantamisen haasteet. Luku 3 käsittelee epälineaariseen optikkaan perustuvan mikroskopian teoriaa, ja sen tavoitteena on perustella multifotonimikroskopian paremmuus edellä mainittuihin haasteisiin vastaamisessa perinteisiin fluoresenssimikroskopiakäyttöihin, kuten laajakenttä- ja konfokaalimikroskopiaan, verrattuna. Multifotonimikroskopian taustalla vaikuttavien epälineaaristen optisten ilmiöiden, kuten kaksi- ja kolmefotoniabsorption sekä taajuudenkahdennuksen (engl. Second-harmonic generation, SHG), selittämällä havainnollistetaan mahdollisuus käyttää kuvantamisessa pidempiä aallonpituuksia perinteisiin menetelmiin verrattuna. Tällä paitsi parannetaan kuvantamisen tehokkuutta elävien näytteiden voimakkaasti sirottavissa kudoksissa, myös perustellaan tarve tehokkaiden, lyhytkestosten laserpulssien käyttämiseksi. Lisäksi esitellään kontrastin parantamisessa apuna käytettävien fluoresoivien merkkiaineiden erityinen työkalu, Ca^{2+} -kuvantaminen, jonka avulla neuronitason toimintaa voidaan havainnoida solujen kalsiumdynamiikkaa tutkimalla. Työn viimeisessä osassa perehdytään kohdattaviin aivokuvantamisen haasteisiin, kun tekniikkaa on pystyttävä käyttämään aivojen toiminnallisuuden tutkimiseksi solutasolla, suurella alueella ja syvällä elävän eläimen kudoksissa. Lopuksi perehdytään tarkemmin yleisesti aivotutkimuksessa käytettyyn koe-eläimeen, banaanikärpäseen (*Drosophila melanogaster*), erilaisia multifotonitekniikoita ja lähestymistapoja vertailemalla.

Työ osoittaa, että eri näytteiden syvältä kuvantamisessa on tehtävä kompromisseja käytettävän tekniikan ajallisen ja avaruudellisen resoluution suhteen näiden tekijöiden ollessa sidonnaisia toisiinsa. Huomataan, että ei ole yhtä yleispätevää menetelmää erilaisten näytteiden tutkimiseksi muun muassa rakenteiden erilaisten optisten ominaisuuksien takia. Merkittäväksi kuvantamisen laatuun vaikuttavaksi tekijäksi paljastuu kuvannettavan näytteen elinkelpoisuuden säilyttäminen, joka rajoittaa näytteen altistamista kuvantamisolosuhteille esimerkiksi ajallisesti tai määrällisesti. Todetaan, että mahdollisuus multifotonimikroskopian suoraan hyödyntämiseen ihmisen aivojen aktiivisuuden tutkimisessa lähitulevaisuudessa on epätodennäköistä. Työ kuitenkin osoittaa, että koe-eläimet mahdollistavat aivojen aktiivisuuden tutkimisen suurissa neuronipopulaatioissa ja vuorovaikuttavissa neuroniverkoissa, joten käytetty tekniikka on erittäin potentiaalinen keino aivojen neuronitason toiminnan ymmärtämiseksi.

Avainsanat: Multifotonimikroskopia, kaksi- ja kolmefotoniabsorptio, taajuudenkahdennus, kalsiumkuvantaminen, aivokuvantaminen

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintyö on toteutettu osana tekniikan kandidaatin tutkintoa Tampereen yliopistossa. Aiheen valikoitumiseen vaikuttivat oman pääaineen lisäksi biolääketieteen tekniikan sivuaineopinnot sekä mielenkiinto fysiikan tutkimukseen biologisen kuvantamisen taustalla. Aiheeseen tutustuminen kasvatti mielenkiintoani entisestään, ja toivonkin pääseväni oppimaan näistä asioista tulevaisuudessa paljon lisää.

Haluan osoittaa erityiskiitokset ohjaajalleni Mikko Huttuselle, joka auttoi kiinnostavan aiheen valinnassa ja oli valmis neuvomaan läpi koko projektin. Sain ohjaajaltani näkökulmia, joista uskon voivani ammentaa oppia vielä pitkälle tulevaisuuteen tämän työn ulkopuolella.

Tampereella, 26.6.2020

Nina Vuorivirta

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO BIOLOGISTEN NÄYTTEIDEN KUVANTAMISEEN.....	1
2. PERINTEINEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIA.....	4
2.1 Laajakenttäfluoresenssimikroskopia.....	4
2.2 Konfokaalimikroskopia	6
2.3 Fluoresoivat merkkiaineet	9
3. EPÄLINEAARISEEN OPTIIKKAAN PERUSTUVA MIKROSKOPIA	13
3.1 Epälineaarisen optiikan perusteita.....	13
3.2 Multifotonimikroskopia.....	15
3.3 Multifotonimikroskopiassa käytettävät valonlähteet	20
3.4 Ca ²⁺ -kuvantaminen	24
4. KUVANTAMISEN HAASTEITA KÄYTÄNNÖSSÄ.....	28
4.1 Aivokuvantaminen.....	28
4.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	31
5. YHTEENVETO.....	35
LÄHTEET	38

KUVALUETTELO

<i>Kuva 1. Havaittavan signaalin suodattaminen konfokaalimikroskopiassa aukon avulla.</i>	<i>7</i>
<i>Kuva 2. a) 1-fotonifluoresenssi, b) 2-fotonifluoresenssi ja c) taajuudenkahdennus.....</i>	<i>15</i>
<i>Kuva 3. Konfokaalimikroskopiassa (vasemmalla) fluoresenssia (vihreä) tapahtuu koko näytteen syvyydessä, joten signaalia on suodatettava rajoittavalla aukolla. Multifotonimikroskopiassa (oikealla) fluoresenssisignaalin muodostuminen rajoittuu pieneen tilavuuteen polttopisteen läheisyydessä.</i>	<i>18</i>
<i>Kuva 4. Vaihtoehtoisia skannauskuvia kolmiulotteisessa näytteessä. Perustuu lähteeseen [8].</i>	<i>23</i>
<i>Kuva 5. Erilaisia aivotutkimuksessa käsiteltäviä kokoluokkia.</i>	<i>29</i>

LYHENTEET, SUUREET JA VAKIOT

2PEF	kaksifotonifluoresenssi
3D	kolmiulotteinen
3PEF	kolmefotonifluoresenssi
2PFM	kaksifotonifluoresenssimikroskopia
3PFM	kolmefotonifluoresenssimikroskopia
Ca ²⁺	kalsiumioni
CARS	Raman-mikroskopian muunnelma, engl. Coherent anti-Stokes Raman scattering
CCD-kamera	ilmainen, jossa signaalin muodostaa puolijohdekomponentti, engl. Charge-coupled device camera
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EM	elektronimikroskopia
FOV	näkökenttä, engl. Field of view
FP	fluoresoiva proteiini
GECI	geneettisesti koodattu kalsiumindikaattori, engl. Genetically encoded calcium indicator
GFP	vihreä fluoresoiva proteiini, engl. Green fluorescent protein
MB	sienikappale; neuroneita sisältävä rakennepari hyönteisen aivoissa, engl. Mushroom body
MRI	magneettikuvaus, engl. Magnetic resonance imaging
NADH	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
OPA	optinen parametrinen vahvistin, engl. Optical parametric amplifier
PMT	valomonistinputki, engl. Photomultiplier tube
SHG	taajuudenkahdennus, engl. Second-harmonic generation
THG	kolmannen harmonisen synnyttäminen, engl. Third-harmonic generation
UV	ultravioletti
<i>E</i>	sähkökenttä
<i>F_{rep}</i>	valonlähteen toistotaajuus
<i>I</i>	säteilyn intensiteetti
<i>NA</i>	numeerinen aukko, engl. Numerical aperture
<i>p</i>	todennäköisyys
<i>P</i>	polarisaatio
<i>P_{avg}</i>	valonlähteen keskiteho
<i>P_{huippu}</i>	valonlähteen hetkellinen huipputeho
<i>pH</i>	lioksen happamuutta kuvaava suure
<i>R_{xy}</i>	pitkittäissuuntainen resoluutio, erottelukyky
<i>R_z</i>	syvyysresoluutio, erottelukyky
<i>δ</i>	molekulaarinen vuorovaikutusala
<i>λ</i>	aallonpituus
<i>χ</i>	sähköinen susceptibiliteetti
<i>τ</i>	valonlähteen lähettämän pulssin kesto
<i>c</i>	valonnopeus
<i>ε₀</i>	tyhjiön permittiivisyys
<i>h</i>	Planckin vakio
<i>ħ</i>	redusoitu Planckin vakio

1. JOHDANTO BIOLOGISTEN NÄYTTEIDEN KUVANTAMISEEN

Optinen kuvantaminen on tärkeä osa nykypäivän biotieteiden tutkimusta. Optisen mikroskopian kehitys on vaikuttanut merkittävästi käsitykseemme biologiasta mahdollistamalla elävien näytteiden tutkimisen ja pienien organismien, kuten bakteerien ja solujen löytämisen. Modernin valomikroskopian noin sata vuotta vanha historia alkoi 1800-luvun lopulla, kun Ernst Abben havainnot kasvattivat mikroskooppien kykyä suurentaa kohteita merkittävästi. Abbe kehitti apokromaattisen linssin, joka vähentää lasin taitekertoimesta aiheutuvia mikroskooppiobjektiivien kuvantamisvirheitä eli aberratioita. Hän esitteli myös Abben siniehdon, joka määrittää linssin aseman tarpeeksi terävän kuvan muodostamiseksi. Hän kehitti yhden mikroskopian kehityksen kannalta tärkeimmistä tuloksista, Abben diffraktiorajan, jonka mukaan mikroskoopin resoluutio määräytyy valon aallonpituuden ja objektiivilinssin numeerisen aukon suhteena. Abben saavutukset paransivat mikroskooppien resoluutiota huomattavasti, jolloin niillä pystyttiin erottelemaan toisistaan 1–10 μm :n kokoluokkaa olevia kohteita, kuten bakteereita ja nisäkkäiden soluja. Perinteisen valomikroskopian eli kirkaskenttämikroskopian merkittävä ongelma oli kuitenkin biologisille näytteille ominainen huono kontrasti, mikä teki niiden tutkimisesta edelleen hankalaa. [1]

Faasikontrastimikroskopia on näytteen eri osista aiheutuviin muutoksiin valon taiteker-toimessa perustuva menetelmä, jota hyödyntämällä voidaan synnyttää korkea kontrasti ja siis tutkia tyypillisesti vaikeasti havainnoitavissa olevien näytteiden, kuten elävien solujen, rakenteita. Faasikontrastimikroskopian periaatteen esitteli Fritz Zernike, ja hänet palkittiinkin fysiikan Nobelilla keksinnöstään vuonna 1953. August Köhler kehitti Köhlerin valaistuksena tunnetun optista mikroskopiaa merkittävästi edistäneen periaatteen vuonna 1896. Köhlerin valaistusta käyttämällä mikroskoopin resoluutio optimoidaan valaisemalla näytettä tasaisesti koko näkökentän alueella. Köhler rakensi myös ensimmäisen ultraviolettimikroskoopin vuonna 1904 tarkoituksenaan parantaa mikroskoopin resoluutiota Abben diffraktiorajan periaatteella käyttämällä näytteen valaisemiseen lyhyemmän aallonpituuden säteilyä. Kokeissaan Köhler huomasi, että jotkut kappaleet emittoivat pidemmän aallonpituuden valoa, kun niihin kohdistetaan UV-säteilyä. Faasikontras-

timikroskopiaan perustuvalla kontrastin synnyttämiseksi vaihtoehtoinen tapa on Köhlerin havaitsema fluoresenssi, jonka avulla näyte voidaan havaita mustaa taustaa vasten sen emittoimissa näkyvää valoa. Köhlerin havaintoa hyödynsi ensimmäisenä Oskar Heimstädt, joka rakensi ensimmäisen toimivan fluoresenssimikroskoopin vuonna 1910. [1]

Fluoresenssimikroskopia on optinen tekniikka, jota voidaan käyttää biologisten näytteiden tutkimiseen hyvällä kontrastilla. Multifotonimikroskopia puolestaan on fluoresenssi-prosesseihin perustuva menetelmä, jossa näytteeseen kohdistetaan pidemmän aallonpituuden valoa perinteisiin fluoresenssimikroskopiamenetelmiin verrattuna, ja jossa vuorovaikutusmekanismeissa on yhden fotonin sijaan läsnä kaksi tai useampia fotoneita. Multifotonitekniikoita soveltamalla pystytään merkittävästi vähentämään sellaisia valon ja aineen välisiä vuorovaikutuksista aiheutuvia ongelmia, jotka rajoittavat perinteisten fluoresenssimikroskopioiden käyttöä paksujen elävien näytteiden tutkimisessa, kun tekniikan tehokkuuden lisäksi huomioon on otettava myös näytteen elinkelpoisuuden säilyttäminen. Multifotonimikroskopiaan liittyy sen taustalla vaikuttavien fysikaalisten mekanismien luontaisia ominaisuuksia, joiden seurauksena sirottavista näytteistä pystytään keräämään herkästi korkean signaali–kohinasuhteen dataa. Multifotonitekniikoita käyttämällä paksuja, rakenteeltaan monimutkaisia ja optisesti haastavia näytteitä voidaan tutkia tarkasti huomattavasti perinteisiä fluoresenssimikroskopiamenetelmiä syvemmillä.

Tämä kandidaatintyö on kirjallisuusselvitys, jossa tutkitaan multifotonimikroskopian käyttömahdollisuuksia paksujen biologisten näytteiden, erityisesti aivojen, tutkimisessa. Työn kannalta oleellinen ongelma on, että hyödyllisen tiedon saamiseksi nopeita solutason prosesseja on pystyttävä tutkimaan niiden luontaisessa ympäristössä eli elävän organismin sisällä. Tämänhetkisen aivotutkimuksen yksi suurimmista tavoitteista on rakentaa kokonaisvaltainen käsitys siitä, miten aivot pohjimmiltaan toimivat. Kysymykseen vastaaminen vaatii yhteyksien muodostamista yksittäisten neuronien ja niiden välisten verkostojen toiminnallisuuden välille. Aivojen monimutkaisesta rakenteesta ja toiminnallisuuskuvioista seuraa tiukat vaatimukset tekniikan ominaisuuksille, kun mikroskooppisia kappaleita on pystyttävä tutkimaan makroskooppisella alueella, eikä tämä onnistu tekemättä kompromisseja kuvantamistekniikan ajallisen ja avaruudellisen resoluution sekä kuvannettavan tilavuuden välillä. Työn tavoitteena onkin selvittää multifotonimikroskopian käyttömahdollisuuksia tällaisten haastavien näytteiden kuvantamisessa.

Työ jakautuu rakenteeltaan kolmeen osaan. Ensimmäisessä luvussa käsitellään fluoresenssimikroskopiaa yleisellä tasolla ja tutustutaan niin kutsuttuihin perinteisiin, lineaari-

seen optiikkaan perustuviin fluoresenssimikroskopiamenetelmiin. Ensimmäisen osion lopussa esitellään myös fluoresoivat merkkiaineet, joita käytetään fluoresenssimikroskopiassa kontrastin parantamiseen. Toisessa luvussa johdatellaan lukija epälineaarisen optiikan perusteisiin ja esitellään multifotonimikroskopiassa hyödynnettäviä vuorovaikutusmekanismeja. Tutustutaan multifotonimikroskopian peruseriaatteisiin, ja muun muassa valonlähteisiin perehtymällä selvitetään, miten vaaditut epälineaariset prosessit saadaan synnytettyä näytteessä. Lopuksi esitellään fluoresenssivärjäyksen erityinen työkalu, kalsiumkuvantaminen, jota käytetään muun muassa aivokuvantamisessa neuronien aktiivisuuden tutkimiseen. Työn viimeinen osio käsittelee multifotonimikroskopian soveltamista käytännössä. Luvussa käsitellään syvällä sirottavissa kudoksissa kuvantamista ja sitä, miten multifotonimikroskopiolla voidaan vastata sovelluksessa esiintyviin haasteisiin. Aivokuvantamisen alaluvussa tuodaan esille kuvantamisalueen kokoluokat, kuvantamisen nopeus ja resoluutio, sekä näihin liittyvät kompromissit. Viimeiseksi esitellään aivotutkimuksessa yleisesti käytetty koe-eläin, *Drosophila melanogaster* eli banaanikärpänen ja näytetään joitakin multifotonimikroskopiolla saatuja tuloksia tämän koe-eläimen tapauksessa.

2. PERINTEINEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIA

2.1 Laajakenttäfluoresenssimikroskopia

Brittiläinen tutkija George Gabriel Stokes esitteli fluoresenssi-ilmiön jo 1800-luvun puolivälissä, ja ensimmäinen toimiva fluoresenssimikroskooppi rakennettiin 1900-luvun alussa. Fluoresenssimikroskopiaa ei kuitenkaan pystytty heti juurikaan soveltamaan biologian tutkimuksissa. Biologisissa näytteissä esiintyvien molekyylien sisäsyntyinen fluoresenssi on usein heikkoa ja epäsäännöllistä, mistä seuraa tarve fluoresoivien merkkiaineiden käytölle kuvantamisen apukeinona. Fluoresenssimikroskopia alkoikin kehittyä merkittävästi 1930-luvulla, kun tällaisia fluoresoivia aineita alettiin hyödyntää biologisten näytteiden kuvantamisessa värjäämällä näytemolekyylejä. [2] Fluoresoiviin merkkiaineisiin ja värjäykseen perehdytään tarkemmin tämän työn aluvussa 2.3.

Perinteisessä 1-fotonifluoresenssiprosessissa fluoresoiva molekyyli eli fluorofori absorboi valoenergiaa tietyn aallonpituuden fotonina ja hetkeä myöhemmin emittoi osan tästä energiasta pidemmän aallonpituuden fotonina. Fotonin energian E riippuvuutta sen aallonpituudesta λ kuvataan yhtälöllä

$$E = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2.1)$$

jossa c on valonnopeus ja h Planckin vakio. Koska fotonin energia pienenee sen aallonpituuden kasvaessa, on yhden fotonin fluoresenssiprosessissa absorboituvan fotonin aallonpituus aina emittoituneen fotonin aallonpituutta suurempi. Emittoituneen ja absorboituneen fotonin aallonpituuksien erotusta kutsutaan Stokesin siirtymäksi.

Fluoresenssimikroskopia on yksi laajasti käytetty biologisten näytteiden kuvantamistekniikka, koska sen avulla voidaan tutkia solu- ja molekyyli-tason prosesseja sekä avaruudellisesti että ajallisesti. Fluoresenssin avulla näytteeseen muodostetaan korkea kontrasti, kun valitut molekyylit erottuvat mustaa taustaa vasten emittoiden valoa. [2] Usein fluoresenssin käyttäminen kontrastointitekniikkana vaatii erilaisten fluoresoivien merkkiaineiden käyttöä, ja yksi suuri etu fluoresenssiin perustuvassa kuvantamisessa on, että näytteen monia eri kohteita voidaan värjätä ja havainnoida samanaikaisesti.

Perinteisessä laajakenttäfluoresenssimikroskopiassa koko näyte valaistetaan lyhyen, tyyppillisesti vihreän, sinisen tai UV-alueen aallonpituuden valolla, jota saadaan esimerkiksi elohopea- tai ksenonvalonlähteestä [3]. Virittävä valo heijastetaan näytteeseen kaksivärisellä peilillä, joka on asetettu 45 asteen kulmaan tulevaan säteilyyn nähden. Peili heijastaa näytteeseen vain tietyn aallonpituuden fotonit ja päästää muut aallonpituudet lävitseen. Emittoitunut fluoresenssisignaali kerätään näytteestä valoilmaisimelle datan myöhempää prosessointia, analysointia ja varastointia varten. Yleinen laajakenttäfluoresenssimikroskopiassa käytetty valoilmaisin on CCD-kamera (engl. Charge-coupled device camera), jossa kuva heijastetaan puolijohtavien valoherkkien elementtien päälle, jotka synnyttävät valon intensiteettiin verrannollisen sähkövarauksen. [2]

Laajakenttäfluoresenssimikroskopian etu on hyvä vaakasuuntainen (x - y) resoluutio, joka kuvaa pienintä mahdollista etäisyyttä, jolla kaksi pistettä voidaan erottaa toisistaan. Resoluutio määritellään yhtälöllä

$$R_{xy} \approx \frac{0,61\lambda}{NA}, \quad (2.2)$$

jossa λ on valon aallonpituus ja NA mikroskoopin objektiivilinssin numeerinen aukko.

Laajakenttäfluoresenssimikroskopiaan liittyy merkittäviä rajoituksia paksujen biologisten näytteiden kuvantamisessa. Virittävän säteilyn muuntamistehokkuus fluoresenssiksi on usein heikkoa. Ensinnäkin vain pieni osa näytteeseen kohdistetuista fotoneista absorboituu ja synnyttää fluoresenssisignaalin. Lisäksi aikaansaatu fluoresenssi emittoituu näytteestä joka suuntaan, jolloin vain osa signaalista päätyy keräävälle objektiivilinssille. [2] Koko näytteen valaisemisesta syntyy signaalireitille merkittävä määrä tarkastelukohdan ulkopuolista valoa, mikä ilmenee signaalin kohinana. Lisäksi biologisissa kudoksissa valoalto vaimenee ja siroaa usein voimakkaasti. Nämä tekijät aiheuttavat kuvannettavan kohteen sumentumisen sekä huonon, lähes olemattoman, syvyysterävyuden paksuissa näytteissä. Laajakenttäfluoresenssimikroskopian syvyysresoluutio R_z on siis lähes olematon, mikä tekee menetelmästä soveltumattoman paksujen näytteiden syvältä kuvantamiseen. Ohuiden näytteiden yksityiskohtaiseen ja nopeaan kuvantamiseen laajakenttäfluoresenssimikroskopia soveltuu kuitenkin hyvin, kun etukäteen on tarkkaan määritetty, mikä osa näytteestä on värjätty.

Photo bleaching -ilmiö ja *fototoksisuus* ovat fluoresenssimikroskopiassa aiheuttavia valovaurioita, jotka rajoittavat tekniikan soveltamista etenkin eläviin näytteisiin. Photo bleaching -ilmiö johtuu fluoresenssimikroskopiassa tarvittavasta suuresta valon intensi-

teetistä, joka rajoittaa fluoresoivien molekyylien käyttöikää hajottamalla merkkiaineita valokemiallisesti [4]. Käytännössä tämä tarkoittaa, että yksittäinen merkkiaine voidaan virittää rajoitetun määrän kertoja, jonka jälkeen molekyylistä ei enää havaita fluoresenssia. Fototoksisuudella puolestaan tarkoitetaan prosessia, jossa kuvannettavan organismin solut vaurioituvat tai pahimmillaan kuolevat altistuessaan korkeaintensiteetiselle säteilylle (pitkäkestoisesti) [4]. Fluoresenssimikroskopian oleellinen haaste onkin näiden valovaurioiden minimointi kuitenkin säilyttämällä samanaikaisesti mahdollisimman suuri signaalifotonin havaitsemistodennäköisyys yksittäisessä virittymistapahtumassa.

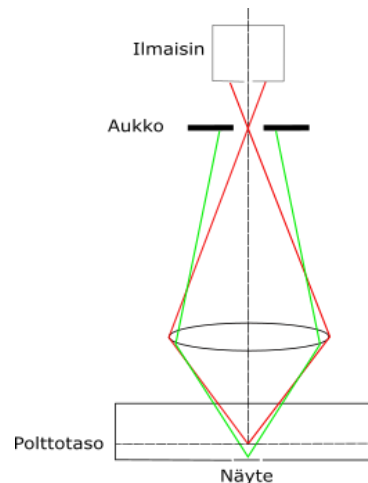
2.2 Konfokaalimikroskopia

Konfokaalimikroskopia on optinen tekniikka, jonka avulla kohdetta voidaan tarkastella ohut optinen leike kerrallaan. Tekniikan avulla kohteesta voidaan muodostaa kolmiulotteinen malli optista jaksotusta hyödyntämällä eli yhdistämällä useita optisia leikkeitä toisiinsa. Tekniikan kehitti ja patentoi Marvin Minsky vuonna 1957. [5] Konfokaalimikroskoopin optiset komponentit ovat pitkälti samat verrattuna tavalliseen fluoresenssimikroskooppiin, ja konfokaalimikroskooppia käytetäänkin tyypillisesti fluorereensioptiikan kanssa. Merkittävä ero laajakenttäfluoresenssimikroskooppiin on, että kohdetta voidaan kuvantaa optinen leike kerrallaan, ja tietokoneen avulla muodostaa kolmiulotteinen kuva näistä leikkeistä. Tällainen kuvantaminen on hyödyllistä, kun halutaan esimerkiksi hahmottaa kolmiulotteisten biologisten kudosten rakenteita.

Edellisessä alaluvussa esiteltiin laajakenttämikroskopian merkittävä ongelma, avaruudellista resoluutiota heikentävä tarkastelukohdan ulkopuolelta ilmaisimelle päätyvä signaali. Konfokaalimikroskopiassa tämä ongelma ohitetaan asettamalla signaalireitille pieni aukko, joka estää kuvannettavan pisteen ulkopuolisen valon päätyvän ilmaisimelle. Aukolla siis varmistetaan ilmaisimelle saapuvan signaalin alkuperä. Kuva 1 havainnollistaa aukon merkitystä signaalin havainnoimisessa.

Konfokaalimikroskopiassa valo kohdistetaan näytteeseen kokoavilla ja sädettä ohjaavilla komponenteilla, skannaavilla peileillä, jotka tuottavat pyyhkäisyn näkökentässä, sekä objektiivilla, joka fokusoii valon diffraktiorajoitettuun pisteeseen näytteessä [6]. Valonsäde kohdistetaan pienelle alueelle, joka kuvannetaan ilmaisimelle siten, että säteily kulkee pienen aukon läpi. Tämän aukon koko vastaa valaistun pisteen kokoa, ja aukko on asetettu pisteen konjugaattitasoon. Aukon koko ja sijainti mahdollistavat kohteen kaikista muista tasoista tulevan signaalin suodattamisen, mikä parantaa mikroskooppisysteemin resoluutiota huomattavasti. [5] Näytteestä emittoitunut fluoresenssivalo ohjataan aukon läpi valoherkälle ilmaisimelle, esimerkiksi valomonistinputkelle (engl. Photomultiplier

tube, PMT). Detektoitu valo synnyttää PMT:n sisälle suhteellisen virran, joka vahvistetaan ja muutetaan digitaaliseksi myöhempää kuvan muodostamista ja varastointia varten. [6] Kaksiulotteinen kuva muodostetaan jokaisessa tasossa piste pisteeltä -periaatteella pyyhkäisemällä laserilla halutun alueen yli. Tätä toistetaan tarvittavalle määrälle ohuita kuvannettavia tasoja, ja kolmiulotteinen malli muodostetaan yhdistämällä nämä leikkeet toisiinsa.



Kuva 1. Havaittavan signaalin suodattaminen konfokaalimikroskopiassa aukon avulla.

Konfokaalimikroskopiassa lasersäde siis pyyhkii kuvannettavaa tasoa huomattavan suurella nopeudella. Oleellista kuitenkin on, että laserskannaavassa konfokaalimikroskopiassa sekä kohde että aukko pidetään paikallaan. Sen sijaan paikkaa, johon valo kohdistetaan, siirretään optisesti näytteen yli sähköisesti ohjattaviin galvanometriin moottoreihin asetetuilla oskilloivilla peileillä. Pistelähde-laserskannauksessa kaksi oskilloivaa, toisiinsa nähden eri nopeuksilla kääntyvää, peiliä tuottavat x - y -suuntaisen pyyhkäisyn. [7] Tämä on niin kutsuttu tavallinen laserskannaus-kuvantamismoodi, jossa laserin polttopiste rasteriskannataan kuvannettavassa tasossa [8]. Pystysuuntainen (y) skannauspeili liikkuu vain pienen matkan skannauslinjan päässä ja sen liike on siis myös hitaampaa. Vastaavasti vaakatasoisen (x) pyyhkäisyn tuottavan peilin on liikuttava kohteen yli nopeammin ja päädyssä nollauduttava nopeasti uuden pyyhkäisyn aloittamiseksi. Vaaka-suuntaisen peilin nopeutta kuitenkin rajoittaa sen massasta aiheutuva hitaus: nopea liikkeen muutos on haastavaa, mikä vaikeuttaa vääristymättömien kuvien tuottamiseksi vaadittavan lineaarisen pyyhkäisyn toteuttamista. Useilla tällaisilla perinteisillä galvanometriskannereita hyödyntävillä mikroskoopeilla pystytäänkin tuottamaan vain 5–10 kuvaa sekunnissa. [7] Tässä rasterimoodissa datankeräysnopeus määräytyy sen nopeuden mukaan, jolla koko skannauskuvio pystytään toistamaan, joten suurien alueiden ku-

vantaminen on hidasta [8]. Monissa sovelluksissa tämä nopeus on riittävä, mutta esimerkiksi nopeiden solutason prosessien tutkimisessa vaaditaan usein huomattavasti nopeampaa kuvantamista. Vaihtoehtoisiin nopeampiin skannausmoodeihin, joita hyödynnetään etenkin laserskannaavassa multifotonimikroskopiassa, perehdytään tarkemmin alaluvussa 3.3.

Perinteiseen konfokaalimikroskopiaan liittyy muutamia merkittäviä rajoituksia paksujen näytteiden syväältä kuvantamisessa. Ensinnäkin fluoresenssin synnyttämiseen käytettävä lyhyt, tyypillisesti sinivihreän tai UV-alueen valo, siroaa ja absorboituu biologisten kudosten kaltaisissa optisesti tiheissä näytteissä usein voimakkaasti, mikä rajoittaa kuvantamissyvyyttä. Mikroskooppisysteemin havainnointireitille asetettu aukko estää tarkastelukohdan ulkopuolisen signaalin havainnoimisen ja vähentää kohinaa mahdollistaen korkean resoluution, mutta aukon käyttämiseen liittyy myös haittapuolia. Paksuja biologisia näytteitä kuvannettaessa signaalin intensiteetti saattaa olla heikko jo ennen aukolle pääymistä. Kudokset sirottavat säteilyä voimakkaasti, eikä sironnut säteily läpäise aukkoa, vaikka olisikin peräisin tarkasteltavasta tasosta. Signaalikatoa voidaan kompensoida virittämällä fluoroforeja tehokkaammin valon intensiteettiä kasvattamalla, mutta siitä aiheutuu edellisessä alaluvussa esiteltyjä valovaurioita. [6] Konfokaalimikroskopian merkittävä ongelma paksun näytteen kuvantamisessa onkin, että fluoroforien viritys ja emissio tapahtuvat aina koko näytteen paksuuden käsittävällä alueella. Kun samaan tasoon kohdistetaan korkeaintensiteettistä valoa tarpeettomasti useita kertoja, näyte vaurioituu.

Elävän organismin kuvantamisessa konfokaalimikroskopian ja yleisesti kaikkien laserskannaukseen perustuvien mikroskopiakäyttöjen käyttöä rajoittaa usein myös nopean kuvantamisen tarve [6]. Laserskannaava mikroskooppi on laite, joka mittaa vain yhden pikselin eli kuvapisteen kerrallaan. Käytännössä tämä tarkoittaa, että kuvan hankkimiseen tarvittava kokonaisaika on jaettava kaikkien kuvan sisältämien pikselien kesken.

Laajakenttämikroskopiaan verrattuna konfokaalimikroskopiolla pystytään saavuttamaan muun muassa parempi resoluutio havainnoitavaa signaalia suodattamalla. Käsiteltyjen ominaisuuksien ja rajoitusten perusteella nämä kaksi menetelmää sopivat hyvin ohuiden näytteiden tutkimiseen esimerkiksi laboratorioviljelmissä tai ihon pintakerroksessa. Paksujen kolmiulotteisten näytteiden nopeaan syväältä kuvantamiseen kumpikaan näistä tekniikoista ei kuitenkaan ole optimaalinen. Luvussa 3 esitellään multifotonimikroskopia, jonka ominaisuudet tekevät siitä huomattavasti näitä niin kutsuttuja perinteisiä menetelmiä paremman työkalun kolmiulotteisten näytteiden syväältä kuvantamiseen.

2.3 Fluoresoivat merkkiaineet

Autofluoresenssilla tarkoitetaan tilannetta, jossa tutkittava näyte fluoresoi luontaisesti. Tarkoituksenmukaisen autofluoresenssin hyödyntämisessä kuvantamisen kontrastoinnissa on se etu, että näytteeseen ei kohdistu ylimääräisestä aineesta tai sen lisäämistöimenpiteestä aiheutuvia häiriöitä. Näytteen näkökulmasta luontaisesti fluoresoivat molekyylit ovatkin ideaalisia ilmaisimia ja merkkiaineita, mutta koska biologisten molekyylien sisäsyntyinen fluoresenssi on usein heikkoa ja epäsäännöllistä, on luontaisten fluoroforien valikoima erittäin rajoitettu. Esimerkki luontaisesti fluoresoivasta molekyylistä on muun muassa solujen metabolian tutkimisessa hyödynnetty nikotiiniamidiadeniini-nukleotidi (NADH), joka emittoi säteilyä pääosin näkyvän valon spektrin sinivihreän valon alueella [2,9].

Vaihtoehtona autofluoresenssille fluoresenssimikroskopiassa korkean kontrastin muodostamiseksi apuna voidaan käyttää näytteeseen ulkopuolelta tuotavia fluoresoivia väriaineita ja ilmaisimia, jotka mahdollistavat tiedon hankkimisen näytteen paikallisista fysikaalisista, kemiallisista tai rakenteellisista parametreista [9]. Fluoresoivien merkkiaineiden avulla voidaan määrittää muun muassa tarkasteltavan molekyylin sijainti, metallionin (esim. Ca^{2+}) konsentraatio, liuoksen happamuus eli pH, tai tutkia molekyylien välisiä vuorovaikutustapahtumia. Fluoroforeja käytetään indikaattoreina, kun muuttuva parametri on esimerkiksi konsentraatio tai pH. Toisaalta jos fluoroforia käytetään kohteiden visualisoimiseksi tai paikantamiseksi, puhutaan yleensä väriaineesta. Usein monia erilaisia väriaineita käytetään samanaikaisesti erottamaan eri rakenteita toisistaan. Merkkiaine sitoutuu haluttuun osaan tutkittavaa näytettä. Avaruudellisesti järjestäytyneen kohteen, kuten solun, fluoresenssivärjäyksessä jokainen fluorofori kiinnittyy tiettyyn osaan kohdetta, esimerkiksi solukalvoon tai tumaan. [2]

Fluoresoivilla merkkiaineilla voidaan parantaa kuvantamisen kontrastia, mutta värjäys saattaa kuitenkin häiritä näytteen rakenteita tai biologista toimintaa esimerkiksi muuttamalla ympäristön kemiallisia tai fysikaalisia olosuhteita. Lisäksi merkkiaineen toiminta on vahvasti sidoksissa muun muassa käytettävään valonlähteeseen ja näytteen ominaisuuksiin, joten kuhunkin sovellukseen sopivan merkkiaineen valinnassa on kiinnitettävä huomiota useaan yksityiskohtaan. Mikroskooppilaitteiston näkökulmasta fluorofori on pystyttävä virittämään tehokkaasti käytettävissä olevilla valon aallonpituuksilla. Ideaalisella fluoroforilla on laaja absorptio- ja kapea emissioakaista, mikä mahdollistaa useiden fluoroforien virittämisen samalla valonlähteellä. Suuri Stokesin siirtymä, absorptio- ja emissioaallonpituuden erotus, kasvattaa luettavan signaalin luotettavuutta. Näytteen näkökulmasta virittävän valon aallonpituuden tulee olla sellaisella aallonpituusalueella, että

se siroaa mahdollisimman vähän, jolloin valo voi edetä näytteessä syvemmälle. Valon on myös synnyttävä minimaalinen määrä ei-toivottua autofluoresenssia näytteen muista osista. Koska fototoksisuus ja sironta pienenevät siirryttäessä pidempiin aallonpituuksiin, elävien solujen kuvantamisessa käytetään tyypillisesti fluoroforeja, joiden absorptio- ja emissiomaksimit ovat lähi-infrapun alueella.

Fluoresoivan merkkiaineen tärkeitä ominaisuuksia ovat myös koko, (foto)stabiiliuus ja sen emittoiman säteilyn kirkkaus. Merkkiaineella on oltava korkea affiniteetti ja tarkkuus värjättävälle kohteelle, esimerkiksi tietylle solun osalle, jotta voidaan varmistaa merkkiaineen sitoutuminen juuri haluttuun kohtaan. Myös kohteella on siis oltava sellaisia kemiallisia ominaisuuksia, joilla se saa merkkiaineen sitoutumaan itseensä. Merkkiaine on myös pystyttävä toimittamaan kohteeseen helposti ja nopeasti. Esimerkiksi solunsisäisissä kohteissa tämä tarkoittaa merkkiaineen tai sen välittäjän korkeaa solukalvon läpäisevyyttä sekä hyvää liukenevuutta soluun. Merkkiaine ei saa myöskään häiritä näytettä biokemiallisesti tai rakenteellisesti eli sen on oltava bioyhteensopiva näytteen kanssa. Mikroskopiassa fluoroforin ja tutkittavan näytteen tarkkaan määritellyn osan valikoivaa vuorovaikutusta, joka mahdollistaa muuten näkymättömien tapahtumien havainnoimisen, kutsutaan tyypillisesti värjäämiseksi [9]. Mikäli merkkiainetta käytetään väriaineena eikä indikaattorina, on sen oltava mahdollisimman epäherkkä kohteen ympäristön muutoksille, mikä tarkoittaa, että merkkiaineen fluoresenssiominaisuudet eivät saa muuttua ympäristön olosuhteiden muutosten seurauksena. Toisaalta jos merkkiainetta käytetään indikaattorina, on sen oltava herkkä tutkittavan parametrin muutoksille. Tällöin on kuitenkin selvitettävä, onko läsnä mahdollisesti myös muita parametreja, joiden muutoksiin indikaattori reagoi. [2,9]

Edellä esitellyt fluoroforien vaihtelevat ominaisuudet määrittelevät niiden käyttömahdollisuudet eri kuvantamissovelluksissa. On olemassa monia erilaisia fluoroforeja, kuten pieniä orgaanisia väriaineita, sekä ilmaisimina käytettäviä nanokiteitä ja (geneettisesti koodattuja) fluoresoivia proteiineja. Erityyppisillä fluoroforeilla on tietyt ominaisuudet, jotka saattavat vaihdella sovelluksen mukaan ja ne saattavat vaikuttaa havainnointiin, menetelmän dynaamiseen alueeseen, signaalin luotettavuuteen sekä mahdolliseen eri kohteiden rinnakkaiseen havainnointiin [9]. Seuraavissa kappaleissa kerrotaan tarkemmin fluoresoivista proteiineista, ja esitellään lyhyesti myös nanokiteet sekä orgaaniset väriaineet.

Fluoresoivia proteiineja (FP) käytetään laajasti biotieteissä solubiologiasta fysiologiaan. Niiden avulla voidaan muun muassa selvittää halutun solun sijainti tai tutkia elävissä soluissa, kudoksissa ja kokonaisissa organismeissa tapahtuvia dynaamisia prosesseja.

Fluoresoivia proteiineja käytetään myös joidenkin muuttuvien parametrien, kuten konsentraation tai pH:n ilmaisimina [2]. Fluoresoivien proteiinien merkittävä hyöty on, että ne ovat laajasti muunneltavissa, ja niiden avulla voidaan värjätä lähes mikä tahansa tutkittava proteiini. Fluoresoivat proteiinit ovat DNA-tekniikoihin perustuvien menetelmien geneettisesti koodattavissa olevia fluoroforeja, mikä on hyödyllinen ominaisuus monien elävien näytteiden tutkimisessa.

Yksi tunnetuimmista biologisissa tutkimuksissa käytettävistä fluoresoivista proteiineista on vihreä fluoresoiva proteiini (engl. Green fluorescent protein, GFP). GFP:n löysivät Osamu Shimomura *et al.* *Aequorea victoria* -meduusasta vuonna 1962. GFP:ta voidaan viedä moniin erilaisiin organismeihin bakteereista ja sienistä aina nisäkkäiden soluihin, mikä tekee siitä erittäin monikäyttöisen. Luonnollinen GFP absorboi voimakkaasti 395 nm:n aallonpituudella ja emittoi 509 nm:n säteilyä. GFP on laajasti geneettisesti muunneltavissa oleva merkkiaine ja sen mutanttiproteiinit kattavat laajan emissiospektrin, joka sisältää muun muassa vihreän, sinisen, syaanin, keltaisen ja lähi-infrapun aallonpituuksia. Lisäksi näitä mutantteja voidaan jalostaa edelleen aina uusiksi versioiksi. Osamu Shimomura, Martin Chalfie ja Roger Y. Tsien palkittiin kemian Nobelillä vuonna 2008 GFP:n kehittämisestä biologian tutkimuksen käyttöön. [10]

On olemassa erilaisia menetelmiä FP:n viemiseksi näytteeseen. Yksi tapa on ilmaista kohdeproteiini tarkasti fluoresoivaan proteiiniin yhdistämällä toisiaan vastaavat DNA:t. Fluoresoiva proteiini voidaan viedä kohdesoluun esimerkiksi ruiskuttamalla. Solukalvon läpäisevyyden parantamiseksi hyödynnetään usein esimerkiksi proteiinin geenin soluun kantavaa virusta. Aikaansaatu tila voi tarpeen mukaan olla väliaikainen tai pysyvä. [2] Fluoresoivien proteiinien ja orgaanisten väriaineiden viemiseen kohteeseen tutustutaan tarkemmin alaluvussa 3.4, jossa käsitellään muun muassa kokonaisten neuronipopulaatioiden kalsiumindikaattoreihin perustuvaa fluoresenssivärjäystä.

Fluoresoivien proteiinien hyödyntäminen on merkittävä osa neurobiologian tutkimusta. Fluoresenssimikroskopiassa käytettäviä geneettisesti koodattuja fluoresoivia proteiineja yhdistämällä on pystytty kuvantamaan aivojen neuroneita samanaikaisesti lähes 90 eri värillä merkkiaineella. *Brainbow* -tekniikassa geenimuunneltu eläin ilmaisee neljän eri värin FP:n erilaisia seoksia neuroneissa: keltaista, punaista, syaania sekä oranssia tai vihreää. Tekniikkaa on hyödynnetty muun muassa jäljittämään kaikki neuronit hiiren aivoissa 1 mm³:n tilavuudessa (Liven *et al.*, 2007). [10]

Fluoresoivien proteiinien lisäksi mikroskopiassa käytettäviä merkkiaineita ovat myös orgaaniset väriaineet ja fluoresoivat nanokiteet. Orgaaniset väriaineet ovat tyypillisesti pieniä, halkaisijaltaan noin 1–2 nm:n kokoisia molekyylejä. Orgaanisia väriaineita on paljon erilaisia ja niitä jaotellaan muun muassa väreittäin absorptio- ja emissioaallonpituuksien perusteella. Kirkkaat puolijohtavat nanokiteet, kvanttipisteet, taas ovat fluoresoivia merkkiaineita, joilla on jatkuva absorptiokaista UV-alueelta lähes emissiokaistalle asti. Emissiokaista on kvanttipisteen koosta riippuva, ja sijaitsee näkyvän valon tai lähi-infrapunan alueella. Kvanttipisteiden etu onkin, että yhdellä valonlähteellä voidaan virittää useita erikokoisia merkkiaineita. [9] Verrattuna orgaanisiin väriaineisiin, kvanttipisteet ovat vähemmän herkkiä photo bleaching -ilmiölle, eli ne kestävät säteilyaltistusta pidempään menettämättä fluoresenssiominaisuuksiaan. Kvanttipisteiden ongelma kuitenkin on, että ne vaihtelevat satunnaisesti kahden tilan, emittoivan ja ei-emittoivan välillä. Ilmiötä kutsutaan vilkutukseksi. [10]

Kuten aiemmin tässä alaluvussa todettiin, näytteen ulkopuolelta tuoduilla fluoresoivilla merkkiaineilla saattaa olla vaikutuksia näytteen rakenteeseen ja toimintaan. Esimerkiksi geneettisesti koodattujen fluoresoivien proteiinien vieminen solun sisälle johtaa väistämättä ylimääräiseen GFP:n ilmaisuun soluissa, joten fluoresenssivärjäyksen yhteydessä on aina kiinnitettävä huomiota siihen, etteivät solun toiminta, prosessit tai rakenne muutu haitallisesti ylimääräisen aineen vaikutuksista. [10] Yksi mahdollinen ratkaisu välttää fluoresoivien merkkiaineiden haitat on käyttää värjäysvapaita mikroskopiamenetelmiä. Esimerkiksi taajuudenkähdenusta (ks. alaluku 3.1) hyödyntävässä mikroskopiassa vahva signaali syntyy biologisissa rakenteissa, joten molekyylejä ei tarvitse erikseen värjätä näytteen ulkopuolelta tuotavilla ilmaisimilla. Muita värjäysvapaita mikroskopiakäyttökoita ovat esimerkiksi Raman-mikroskopia sekä sen muunnelma CARS-mikroskopia (engl. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy), joihin ei tässä työssä perehdytä tarkemmin.

3. EPÄLINEAARISEEN OPTIIKKAAN PERUSTUVA MIKROSKOPIA

3.1 Epälineaarisen optiikan perusteita

Edellisessä luvussa esiteltyt fluoresenssimikroskopian tekniikat, laajakenttä- ja konfokaalimikroskopia, perustuvat lineaariseen optiseen prosessiin, jossa valo vuorovaikuttaa molekyylin kanssa saaden sen värähtelemään ja emittoimaan uuden matalampienergisemmän valoallon. Kontrasti synnytetään aineen ja valon välisistä lineaarisista vuorovaikutuksista, joissa yhden fotonin käsittävän prosessin tapahtumistodennäköisyys riippuu lineaarisesti aineeseen kohdistetun valon intensiteetistä.

Epälineaarisen optiikan tutkimushaaran voidaan nähdä alkaneen vuonna 1931, kun Maria Goeppert-Mayer ennusti teoreettisesti 2-fotoniabsorption olemassaolon [11]. Bell Labs totesi ilmiön kokeellisesti lähes samaan aikaan, kun Peter Frank *et al.* havaitsivat ensimmäistä kertaa taajuuskahdennettua valoa vuonna 1961. Epälineaariset optiset prosessit eroavat lineaarisista siten, että niissä tapahtuu korkeamman kertaluvun valon ja aineen välisiä vuorovaikutuksia, joissa kontrastin synnyttämiseen osallistuu useita fotoneita. Mikroskopian näkökulmasta näiden vuorovaikutusten epälineaarinen luonne johtaa laadultaan monin tavoin erilaisiin kuvantamisominaisuuksiin. [12]

Epälineaarinen optiikka kuvaa valon vuorovaikutuksia epälineaarisessa väliaineessa. Maxwellin teorian mukaan eristeväliaineen sähköisiä ominaisuuksia kuvaavat aineen yhtälöt voidaan kuvata väliaineen polarisaation ja väliaineessa vaikuttavan sähkökentän välisellä suhteella

$$P = P(E), \quad (3.1)$$

jossa P on väliaineen polarisaatio ja E väliaineen sähkökenttä.

Sähkömagneettisen säteilyn sähkökenttä vuorovaikuttaa aineen kanssa, ja lineaarisessa optiikassa aineen polarisaation riippuvuutta sähkökentästä kuvataan yhtälöllä

$$P = \epsilon_0 \chi E, \quad (3.2)$$

jossa ε_0 on tyhjiön permittiivisyys ja sähkökentän sekä aineeseen syntyvän polarisaation yhdistävä verrannollisuusvakio χ on aineen sähköinen susceptibiliteetti. Sähköinen susceptibiliteetti on ominaisuus, joka kuvaa aineen kykyä vuorovaikuttaa sähkökentän kanssa.

Lineaarisen optiikan polarisaation yhtälö (3.2) on voimassa ainoastaan sähkökentän ollessa riittävän heikko. Epälineaarisen optiikan perusta on aineen polarisaation epälineaarisuus suurilla sähkökentän amplitudeilla. Toisin sanoen epälineaarinessa optiikassa tarkastellaan ilmiöitä, jotka skaalautuvat sähkökentän korkeampien potenssien mukaan. Polarisaation yhtälö saa tällöin (yksinkertaistetun) muodon

$$P = \varepsilon_0(\chi E + \chi^2 E^2 + \chi^3 E^3 + \dots), \quad (3.3)$$

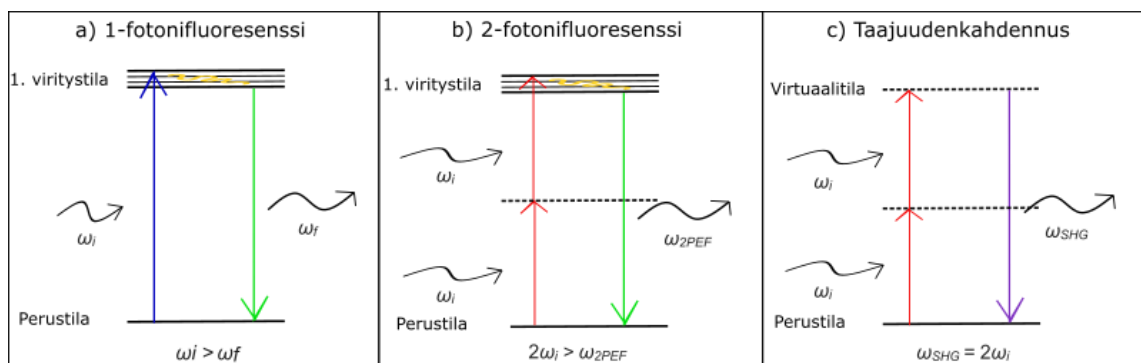
jossa verrannollisuusvakion χ ja sähkökentän E potenssi kertoo epälineaarisuuden kertaluvun. [13]

Monet epälineaariset optiset ilmiöt perustuvat väliaineen vasteen epälineaarisuuteen. Tässä opinnäytetyössä tullaan tarkastelemaan toisen ja kolmannen kertaluvun epälineaarisia prosesseja. Mainittakoon, että yhtälöissä (3.1) - (3.3) esitetyt kenttäsuureet ovat todellisuudessa vektoreita, joten niitä yhdistävät verrannollisuusvakiot (χ) eivät ole skalaareita vaan tensoreita. Teorian syvällisempi matemaattinen tarkastelu on monimutkaista ja ylittää tämän opinnäytetyön laajuuden, joten se sivuutetaan. Edellä kuvattu yksinkertaistettu esitys polarisaation ja kentän suhteesta mahdollistaa kuitenkin ymmärtämään säteilyn syntymisen periaatteen epälineaarisen polarisaation keinoin. Epälineaarisen polarisaation avulla voidaan esimerkiksi ymmärtää, kuinka monokromaattinen valonlähde muuntuu epälineaarinessa väliaineessa valoksi, joka sisältää myös uusia taajuuskomponentteja.

Valon ja aineen vuorovaikutus voi ilmetä monena erilaisena optisena prosessina. Yksi yleisistä biologisten näytteiden kuvantamisessa hyödynnetyistä prosesseista on 2-fotonifluoresenssi (engl. 2-photon excited fluorescence, 2PEF). Tällaisessa prosessissa molekyyli absorboi yhden fotonin sijaan kaksi fotonia, joiden yhteenlaskettu energia on (suunnilleen) sama kuin 1-fotonifluoresenssissa absorboituvan fotonin energia. Kahden fotonin ja molekyylin välinen vuorovaikutus tapahtuu nopeasti, usein muutamien femto- tai pikosekuntien aikana. Tapahtumassa fotonien energiat summautuvat, minkä seurauksena molekyyli siirtyy virittyneelle tilalle. Viritystilän purkautuessa molekyyli emittoi samanlaisen fluoresenssifotonin, jonka se olisi emittoinut 1-fotoniabsorption seurauk-

sena. [12] Koska fotonin energia on kääntäen verrannollinen aallonpituuteen, 2-fotoniabsorptiota hyödyntämällä molekyylin virittävän valon aallonpituus voidaan suunnilleen kaksinkertaistaa. Tämä on kuitenkin vain yksinkertaistus, koska multifotoniabsorptiospektrit ovat usein huomattavasti leveämpiä 1-fotoniabsorptiospektreihin verrattuna. [14]

2-fotoniabsorption lisäksi toinen tämän työn kannalta kiinnostava epälineaarinen vuorovaikutusmekanismi on taajuudenkahdennus (engl. Second-harmonic generation, SHG), jossa kaksi fotonia siroavat samanaikaisesti tuottaen uuden fotonin, jonka energia on täsmälleen alkuperäisten fotonien energioiden summa. Ilmiön merkittävä ero 2-fotoniabsorptioon on, että prosessissa ei tapahdu molekyylien virittymistä, eikä siis synny energiahäviöitä. Kuva 2. havainnollistaa 1- ja 2-fotonifluoresenssin sekä taajuudenkahdennuksen periaatteellisia eroja. Symbolilla ω viitataan fotonin kulmataajuuteen.



Kuva 2. a) 1-fotonifluoresenssi, b) 2-fotonifluoresenssi ja c) taajuudenkahdennus.

Edellä kuvatulla tavalla molekyylin energiatilan virittäminen voi tapahtua myös kolmen tai useamman fotonin samanaikaisen absorptio seurauksena, jolloin kyseessä on 3- tai multifotoniabsorptio. Myös taajuudenkahdennukselle periaatteeltaan samanlainen prosessi voidaan saada aikaan useampien fotonien energioiden summautuessa. Kolmen fotonin tilanteessa puhutaan tällöin kolmannen harmonisen synnyttämisestä (engl. Third-harmonic generation, THG). Yleisesti molempien vuorovaikutusmekanismien tapauksessa pätee, että mitä enemmän fotoneita prosessiin osallistuu, sitä pidempi tulevan fotonin aallonpituus voi olla.

3.2 Multifotonimikroskopia

Biologiset näytteet koostuvat usein monimutkaisista, taitekertoimiltaan ja absorbansseiltaan eroavista kolmiulotteisista rakenteista. Tällaiset ominaisuudet hankaloittavat näytteen optista tarkastelua etenkin silloin kun luotettavan informaation keräämiseksi on ohuiden leikkeiden sijaan tutkittava kolmiulotteisia näytteitä, ja optisesti haastavat rakenteet ympäröivät tarkastelukohtaa. Multifotonimikroskopiaan liittyy useita ominaisuuksia,

joiden takia se soveltuu edellisessä luvussa esiteltyjä fluoresenssimikroskopiamenetelmiä paremmin elävien näytteiden syvältä kuvantamiseen. Tässä alaluvussa käsitellään muutamia multifotonimikroskopialle tyypillisiä ominaisuuksia ja tehdään vertailua konfokaalimikroskopiaan tavoitteena perustella multifotonitekniikan paremmuus kolmiulotteisten näytteiden syvältä kuvantamisessa.

Multifotonimikroskopia perustuu alaluvussa 3.1. esiteltyihin epälineaarisiin optisiin prosesseihin kuten 2- ja 3-fotoniabsorptioon sekä taajuudenkahdennukseen ja kolmannen harmonisen synnyttämiseen. Yleisesti multifotoniabsorptiota hyödynnetään fluoresoivien merkkiaineiden tai näytteessä esiintyvien luontaisesti fluoresoivien molekyylien kuvantamisessa. Taajuudenkahdennus soveltuu syntymekanisminsa takia erityisen hyvin kuitumaisten, sisäistä järjestystä omaavien proteiinien kuvantamiseen. Kolmannen harmonisen synnyttämisellä voidaan luoda kontrasti visualisoimaan taitekertoimien eroja näytteen rakenteissa. [15] Koska SHG ja THG eivät ole absorboivia prosesseja, niihin perustuvassa kuvantamisessa ei tarvita fluoresoivia merkkiaineita, mikä mahdollistaa värjäysvapaan kuvantamisen. Edellä mainittuja erilaisia kontrastointimekanismeja voidaan yhdistää, jolloin puhutaan multimodaalisesta kuvantamisesta. Rinnakkainen prosessi, esimerkiksi täydentävä SHG, saattaa kuitenkin joissakin tapauksissa olla myös ei-toivottu signaali, joka vaikeuttaa 2-fotonifluoresenssikuvan tulkintaa, jos emissiosuotimen kaistanleveyteen sisältyy täsmälleen viritysaallonpituuden puolikas.

Merkittävin multifotonimikroskopian syvältä kuvantamisen mahdollistava tekijä on pidemmän, tyypillisesti lähi-infrapuna-alueen (engl. Near infra-red, NIR), aallonpituuden valon käyttö näytteen valaisemisessa. Koska säteilyn sironta on kääntäen verrannollinen aallonpituuden neljänteen potenssiin, pidemmän aallonpituuden valoa käyttämällä näytteeseen voidaan tunkeutua huomattavasti syvemmälle. NIR-säteilyllä on myös huomattavasti vähemmän fototoksisia vaikutuksia elävän näytteen soluihin, mikä on tärkeää näytteen elinkelpoisuuden säilyttämisen kannalta etenkin pitkäkestoisessa kuvantamisessa. [11] Multifotonimikroskopian suurin mahdollinen kuvantamissyvyys riippuu virittävän valon todennäköisyydestä päätyä tarkastelupisteeseen siroamatta sekä emittoidun fluoresenssisignaalin todennäköisyydestä päätyä ilmaisimelle [16]. Tutkittavan näytteen optisilla ominaisuuksilla on siis merkittävä vaikutus maksimi-kuvantamissyvyyteen, ja samoilla kuvantamisparametreilla saatetaankin saavuttaa hyvin erilaisia syvyyksiä eri näytteissä.

Koska useimmat multifotoniabsorptioon perustuvat mikroskopian periaatteet voidaan selvittää tarkastelemalla 2-fotonifluoresenssia, suoritetaan periaatteellinen käsittely

tästä lähtien sen näkökulmasta turhan toiston välttämiseksi. Mahdolliset periaate-erot korkeamman kertaluvun prosesseihin mainitaan erikseen.

Jotta multifotoniabsorption kaltainen epälineaarinen prosessi voisi tapahtua, on fotonien vuorovaikutettava halutun näytemolekyylin kanssa lähes samanaikaisesti. Heisenbergin epätarkkuusperiaatteen mukainen samanaikaisuus määritellään molekulaaristen energiavaihteluiden aikaskaalana fotonin energiaskaalassa. Tyypillisesti multifotoniabsorptiossa fotonien on kohdattava sama molekyyli noin 10^{-15} – 10^{-12} sekunnin sisällä. [17] Tapahtuman voidaan siis todeta olevan epätodennäköinen, ja mikroskopian näkökulmasta sen synnyttäminen vaatii suuren ($\sim 10^{24}$ cm⁻² s⁻¹) fotonitiheyden. Riittävän suuri fotonitiheys saadaan aikaan valonlähteellä, jonka lähettämän säteilyn intensiteetti I on luokkaa 10^6 – 10^{12} W cm⁻². Yleisessä tutkimuskäytössä olevilla pulssitetuilla lasereilla tällainen intensiteetti voidaan saavuttaa vain objektiivinssin polttotasossa. Virittymistodennäköisyys p riippuu käytettävän valon intensiteetistä epälinearisuuden kertaluvun mukaan. Toisen kertaluvun prosessille todennäköisyys on verrannollinen intensiteettiin suhteessa $p_2 \propto I^2$, ja vastaavasti kolmannen kertaluvun prosessille suhteessa $p_3 \propto I^3$. Virittymistodennäköisyyden ja valon epälineaarinen riippuvuus aiheuttaa havaittavan signaalin rajoittumisen polttotasoon, mistä seuraa multifotonimikroskopian sisäsyntyinen optinen jaksotus (vrt. konfokaalimikroskopia). [16]

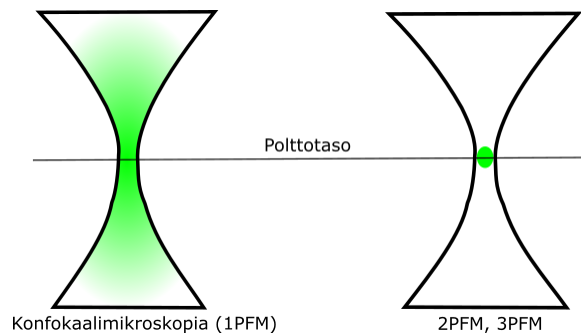
Fluoroforin todennäköisyys p absorboida kaksi fonia polttopisteessä yksittäisen valopulssin aikana voidaan esittää paraksiaalisena approksimaationa:

$$p = \delta P_{avg}^2 F_p^{-1} \left(\frac{\pi NA^2}{2\pi \hbar c \lambda} \right)^2 \xi. \quad (3.4)$$

Todennäköisyys riippuu lineaarisesti molekulaarisesta vuorovaikutusalasta δ , neliöllisesti valonlähteen keskimääräisestä tehosta P_{avg} , käänteisesti valopulssien toistotaajuudesta F_p sekä objektiivinssin numeerisen aukon, NA , neljännessä potenssista. Muut termit ovat virittävän valon aallonpituus λ , redusoitu Planckin vakio \hbar , valonnopeus c ja epälinearisuuden kertaluvusta riippuva kerroin ξ .

Kun valonsäde kohdistetaan näytteeseen, sen intensiteetti pienenee epälineaarisesti polttopisteen ylä- ja alapuolella. 2-fotonifluoresenssi heikkenee noin suhteessa $1/z^2$, kun z kuvaa etäisyyttä polttotasosta. Vastaava suhdeluku 3-fotonifluoresenssille on $1/z^4$. [18] Jos säde kohdistetaan näytteeseen korkean numeerisen aukon objektiivilla ($NA \geq 1$), valtaosa virittymisestä rajoittuu kokoluokaltaan vain 1 μm^3 :n tilavuuteen. [10] Kuva 3. havainnollistaa signaalin muodostumisen rajoittumista pieneen tilavuuteen. Signaalin

muodostumisen rajoittumisesta (lähes) ainoastaan polttotasoon seuraa sisäsyntyinen optinen jaksotus, mikä vähentää merkittävästi koko näytteen käsittäviä valovaurioita ja poistaa tarpeen tarkastelukohdan ulkopuolisen signaalin suodattamiselle rajoittimen avulla. Femtosekuntilasereilla voidaan synnyttää virittymisen aikaansaamiseksi tarvittava korkea säteilyn huipputeho ylläpitäen samalla alhaista keskimääräistä tehoa, joka minimoi näytteeseen kohdistuvat valovauriot. [15] Multifotonimikroskopiassa käytettäviä valonlähteitä ja niiden ominaisuuksia käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.3.



Kuva 3. Konfokaalimikroskopiassa (vasemmalla) fluoresenssia (vihreä) tapahtuu koko näytteen syvyydessä, joten signaalia on suodatettava rajoittavalla aukolla. Multifotonimikroskopiassa (oikealla) fluoresenssisignaalin muodostuminen rajoittuu pieneen tilavuuteen polttopisteen läheisyydessä.

Tyypillisesti multifotonimikroskopiassa (engl. 2-Photon fluorescence microscopy, 2PFM; 3-Photon fluorescence microscopy, 3PFM) hyödynnetään laserskannausta. Laserskan-naava multifotonimikroskooppi voidaan jaotella neljään osaan: äärimmäisen nopea pulssilaserlähde, näytteen virittämiseen tarvittava optiikka, signaalin havainnoinnin optiikka sekä elektroniikka, jolla mitattu signaali mitataan ja digitalisoidaan myöhempää käsittelyä varten. Virittämisen optiikalla tarkoitetaan tässä yhteydessä lasersäteiden ohjausta, pulssin muotoilua ja pulssijonon kohdistamista. Havainnoinnin optiikka viittaa emittoituneen fluoresenssisignaalin keräykseen. [19] Laser kohdistetaan haluttuun tasoon näytettä, ja näyte rasteriskannataan alaluvussa 2.2 esitellyn periaatteen mukaisesti. Kun laserfokus kohtaa näytteen fluoroforit, fluoresenssisignaali syntyy valikoidusti rajoitetussa tilavuudessa ja signaali havaitaan ilmaisimella. Signaalit summataan kuvapistean (~ms) kuluessa ja kartoitetaan yksittäisinä kuvapisteinä tietokoneella.

Objektiivi on multifotonimikroskoopin tärkeä komponentti, koska sen avulla synnytetään kapea laserfokus, joka tarvitaan virittymisen paikallistamiseksi. Objektiivin oleellisia parametreja ovat menetelmän avaruudellisen resoluution ja fluoresenssisignaalin keräyskulman määrittävä objektiivin numeerinen aukko (engl. Numerical aperture, NA) sekä näkökentän (engl. Field of view, FOV), työskentelyetäisyyden ja viritysvälin trans-

mission määrittävä suurennos. Korkean NA:n objektiiveilla voidaan saavuttaa suuri paikallinen resoluutio FOV:ta rajoittaen. Kuvantamisessa on siis käytännössä aina tehtävä kompromisseja kuvannettavan alueen koon ja resoluution suhteen. Tästä aiheutuvia käytännön rajoituksia käsitellään tarkemmin luvussa 4.

Laserskannaava 2-fotonifluoresenssi- ja konfokaalimikroskopia ovat tekniikoina monilta osin samanlaiset. 2-fotonifluoresenssin hyödyntämiseen liittyy kuitenkin monia etuja paksujen näytteiden syvältä kuvantamisessa. Ensinnäkin 2PFM on kehitetty kuvantamaan erityisesti optisesti paksuja näytteitä. Käytetyt aallonpituudet ovat tyypillisesti noin kaksinkertaisia konfokaalimikroskopiaan verrattuna, mikä mahdollistaa sirottavien näytteiden kuvantamisen syvemmältä sironnan ollessa käänteisesti verrannollinen aallonpituuteen. Pidemmän aallonpituuden säteily myös absorboituu moninkertaisesti vähemmän biologisissa kudoksissa. Fluoresenssin havainnoinnin kannalta pidemmän aallonpituuden käyttämisessä on myös se hyöty, että fluoroforien absorptio- ja emissiospektrit eroavat toisistaan enemmän, mikä sulkee pois tarkoituksettoman viritysvalon ja sironnan havainnoimisen ilman tarvetta suodattaa tarkasteltavaa signaalia. Signaalin rajoittuminen polttotasoon, niin kutsuttu virittymisvankeus, mahdollistaa signaalin havainnoimisen ilman konfokaalimikroskopiassa käytettävää rajoitinta, jolla tarkastelutason ulkopuolelta tuleva säteily suodatetaan pois havainnointireitiltä. Tekniikoiden merkittävä periaate-ero siis on, että konfokaalimikroskopiassa 3D-resoluutio saavutetaan havainnointitilavuutta rajoittamalla, kun 2PFM:ssa rajoitetaan virittymistilavuutta. Virittymisen rajoittuessa vain pieneen tarkasteltavaan alueeseen vältytään merkittävästi näytteen turhalta valoaltistukselta, josta aiheutuu valovaurioita, kuten photo bleaching -ilmiötä ja näytteen elinkelpoisuutta vaarantavaa fototoksisuutta. Paksuissa näytteissä emittoitunut säteily myös siroaa väistämättä, minkä seurauksena signaalin kulku poikkeaa oletetusta. Konfokaalimikroskopiassa käytetty aukko siis estää huomattavan osan tarkastelutasosta peräisin olevaa säteilyä pääsemästä ilmaisimelle ja näin ollen samalla myös heikentää signaalia. 2PFM:ssa virittymisen tapahtuessa rajatussa tilassa voidaan olla varmoja signaalin alkuperästä ja kaikki tarkastelutilasta tulevat säteet pystytään havaitsemaan, vaikka ne siroaisivat ennen ilmaisimelle päätymistä. [11] Tässä kappaleessa tehty periaatteellinen vertailu on voimassa myös 3-fotonifluoresenssimikroskopian tapauksessa.

Valonlähteen säteilyn intensiteettiä kasvattamalla fluoresenssi voidaan synnyttää yhä useammalla fotonilla. 3-fotonifluoresenssimikroskopia on tekniikka, jonka avulla pidempiä aallonpituuksia käyttämällä voidaan kuvantaa näytettä vielä syvemmältä kuin 2PFM:lla. 3PFM:aan liittyy kaksi merkittävää etua vastaavaan 2-fotoniabsorptioon pe-

rustuvaan tekniikkaan verrattuna. Ensinnäkin entistä pidemmän aallonpituuden valo siroaa kudoksissa vähemmän, ja 3PFM:ssa paremman syvyysläpäisevyyden saavuttamiseksi molekyylien virittämiseen voidaan käyttää aallonpituudeltaan jopa 1 700 nm:n valoa, jota vastaava aallonpituus 1-fotoniabsorptiossa on noin 560 nm. Toiseksi fluoresenssin todennäköisyyden riippuvuus intensiteetin kuutiosta aiheuttaa tehokkaamman fluoresenssin heikkenemisen, mikä rajoittaa signaalin syntymisen entistä pienemmässä tilavuudessa polttopisteen ympäristössä. 3PFM:lla voidaan siis merkittävästi vähentää tarkastelutason ulkopuolista signaalia, mikä parantaa menetelmän signaali–kohina -suhdetta. [18]

3PFM:aan liittyy myös omat haittapuolensa. Mitä useampaa fotonia vuorovaikutustapah-tuman synnyttämiseen käytetään, sitä intensiivisempää valoa tarvitaan aikaansaamaan polttopisteeseen riittävän suuri fotonitiheys aiheuttamaan fotonien lähes samanaikainen törmäys kohdemolekyylisiin. Koska fotonitiheys on suurempi, eli säteilyä käytetään määrällisesti 3PEF:n synnyttämiseksi enemmän, on hyvin todennäköistä, että paikalliset valovauriot ovat voimakkaampia kuin 2PFM:ssa. [4] Säteilyn tehon suuruuteen on siis kiinnitettävä erityistä huomiota sen bioyhteensopivuuden säilyttämisen suhteen elävissä näytteissä. Toinen merkittävä huomio on, että valon sironta vähenee aallonpituuden kasvaessa, mutta 3PFM:ssa käytetyt pidemmät infrapunaa aallonpituudet absorboituvat herkemmin monissa biologisissa näytteissä. Tästä aiheutuu usein tarve suuremman huipputehon optisille pulsseille ja tarpeeseen räätälöidyille valonlähteille. [18]

3.3 Multifotonimikroskopiassa käytettävät valonlähteet

Albert Einstein esitteli laserin peruseriaatteen vuonna 1917. Vuosikymmeniä myöhemmin, vuonna 1960, Theodore Maimanin kehittämä punainen lasersäde lähetettiin Yhdysvaltain New Jerseyssä sijaitsevasta tutkatornista ja se havaittiin yli 40 km:n etäisyydellä alkupisteestään. [20] Koska multifotoniabsorptio vaatii tapahtuakseen fotonien lähes samanaikaisen kohtaamisen näytemolekyylin kanssa, on riittävän signaalin aikaansaamiseksi virittävänä valona käytettävä korkean hetkellisen huipputehon säteilyä. 2-fotoniabsorptiosta seurausta oleva viritystapahtuma havaittiin vuonna 1961, ja vastaava 3-fotoniprosessi vuonna 1964: yli 30 vuotta sen jälkeen, kun Goeppert-Mayer oli ennustanut tällaisen epälineaarisen prosessin olemassaolon. Kokeellisen havainnon mahdollisti juuri Maimanin vuonna 1960 kehittämä laser. [21] Multifotonimikroskopiaa pystyttiin alkaa soveltamaan käytännössä vuonna 1991, kun Timothy Gosnell ja Antoinette Taylor kehittivät nopeita, lyhyistä (~100 fs) punaisen valon ja infrapunaa säteilyä pulsseista koostuvia jonoja tuottavan laser-valonlähteen, jonka toistotaajuus oli noin 100 MHz [22].

Perinteisessä 1-fotoniabsorptioon perustuvassa fluoresenssimikroskopiassa viritettävien molekyylien absorptiokaista on välillä 350–500 nm, joka käsittää aallonpituudet UV-alueelta vihreään valoon. 2PFM:ssa vastaavan tilan synnyttämiseksi käytetyt viritävän valon aallonpituudet sijaitsevat sähkömagneettisen säteilyn spektrin punaisen valon tai NIR-säteilyn alueella, noin välillä 700–1 000 nm. [21] 3PFM:ssa voidaan käyttää vielä pidempiä aallonpituuksia, tyypillisesti noin 1 700 nm:iin asti.

Usean fotonin aiheuttaman viritystilan aikaansaamiseksi fotonien on vuorovaikutettava molekyylin kanssa lähes samanaikaisesti, noin femtosekunnin sisällä. Tilanne saadaan aikaiseksi käyttämällä suuren fotonitiheyden säteilyä eli korkeaintensiteettistä valoa, koska kahden fotonin samanaikaisen absorptio todennäköisyys riippuu neliöllisesti valon hetkellisestä intensiteetistä. [23] Lyhyiden, mutta korkean hetkellisen intensiteetin omaavien valopulssien kohdistaminen näytteeseen siis kasvattaa 2-fotoniabsorptio todennäköisyyttä. Keskimääräinen teho on biologisten näytteiden tutkimisessa pyrittävä pitämään mahdollisimman alhaisena ylimääräisten 1-fotoniprosessien välttämiseksi, joiden tapahtumistodennäköisyys on huomattavasti vastaavia epälineaarisia prosesseja suurempi. Turhat lineaariset virittymisprosessit aiheuttavat näytteen kuumenemista ja voivat siis tuottaa merkittäviä valovaurioita. Lisäksi niistä aiheutuu tarpeetonta fluoresenssiemissiota, joka häiritsee halutun signaalin mittaamista. Näytteen kannalta siedettävä keskimääräinen teho ei ole yksiselitteisesti määriteltävissä sen riippuessa näytteen ominaisuuksista sekä kuvantamisparametreista, kuten suurennoksesta ja skannausnopeudesta. Korkean numeerisen aukon ($NA \approx 1$) objektiivin diffraktiorajoitetulla valaistuksella siedettävät tehorajat polttopisteessä ovat tyypillisesti muutamia milliwatteja. Mikroskoopin optisten komponenttien ja näytteen aiheuttamien valohävikkien takia saatetaan usein silti tarvita yli 1 W:n lasertehto, jos halutaan kuvantaa syvällä sirottavassa kudoksessa. [21] Tyypillisesti multifotonimikroskopiassa käytettävien valonlähteiden tuottaman pulssin kesto on lyhimmillään 70 fs ja säteilyn huipputeho jopa 450 kW. Aallonpituutta voidaan säätää noin 600 nm:n skaalassa, mikä mahdollistaa optimaalisen aallonpituuden valitsemisen halutun fluoroforin viritämiseksi. [20]

Käytettävästä valonlähteestä emittoituneen säteilyn hetkellisen huipputehon ja keskimääräisen tehon välillä on yhteys

$$P_{huippu} = \frac{1}{F_{rep}\tau} P_{avg}, \quad (3.5)$$

jossa P_{huippu} on hetkellinen huipputeho, P_{avg} keskimääräinen teho, τ pulssin kesto ja F_{rep} toistotaajuus. Etenkin eläviä näytteitä kuvannettaessa on siis tärkeää kuvantamis-

tehokkuuden näkökulmasta saavuttaa tarpeeksi suuri huipputeho kuitenkin säilyttäen riittävän matala keskimääräinen teho näytteen elinkelpoisuuden säilyttämiseksi. [20] Yhdistämällä femtosekuntilaserin pulssin huipputeho korkean numeerisen aukon objektiivin voidaan synnyttää polttotilaan tarpeeksi suuria fotonitiheyksiä multifotoniabsorption aikaansaamiseksi.

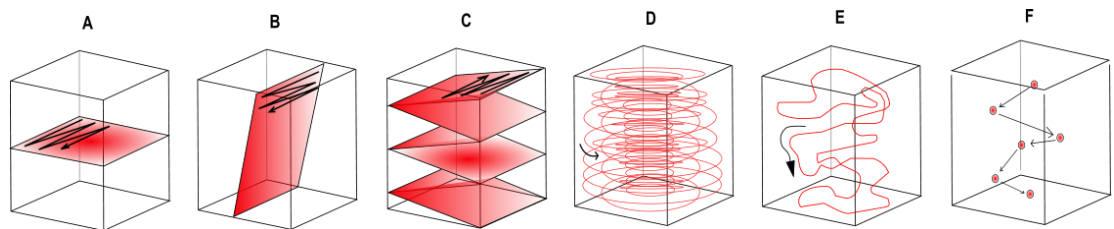
Yksi tyypillisesti multifotonimikroskopiassa käytetty valonlähde on moodilukittu titaani-safiiri-laser. Valonlähteen laaja aallonpituuden säätöalue, noin 700–1 050 nm, mahdollistaa useimpien fluoresenssimikroskopiassa käytettävien fluoroforien virittämisen ja erilaisten fluoroforien samanaikaisen havainnoinnin. Sen teho on myös riittävän suuri virittämään useita fluoroforeja korkean numeerisen aukon objektiivin avulla huomattavasti yli aallonpituuden säätöalueen. [21] Titaani-safiirilaserilla voidaan tuottaa multifotoniabsorption synnyttämiseksi vaadittava korkea, jopa 50 GW:n, hetkellinen huipputeho. Valonlähteen toistotaajuus on noin 100 MHz, eli se lähettää uuden pulssin nanosekunnin välein. Yksittäisen pulssin kesto on alle 100 fs. [16] Tyypillinen pulssin kesto, noin 100 fs, on melko optimaalinen, koska huomattavasti tätä lyhyemmät pulssit vääristyisivät voimakkaasti mikroskooppilaitteiston optiikasta aiheutuvan valon dispersion seurauksena. [22]

Jotta kolmen fotonin samanaikaisen absorption aiheuttama virittyminen olisi mahdollinen, on käytettävän valon aallonpituuden oltava pidempi ja fotonitiheyden suurempi vastaavaan 2-fotoniprosessiin verrattuna. Titaani-safiiri-laserit eivät kuitenkaan itsessään toimi kovin hyvin yli 1 000 nm:n aallonpituuksilla, jolloin tarvitaan vaihtoehtoista valonlähdettä [22]. Eräs yleinen lähestymistapa vielä suurempitehoisen valon tuottamiseksi on hyödyntää optista parametrista vahvistinta (engl. Optical parametric amplifier, OPA). OPA vastaanottaa tietyn aallonpituuden valoa ja muuntaa sen kahden eri aallonpituuden valoksi. Toisen säteen aallonpituus on alkuperäisen säteen aallonpituutta lyhyempi. Tätä lyhyemmän aallonpituuden omaavaa sädettä kutsutaan perinteisesti signaalisäteeksi, jota voidaan käyttää 2-fotonikuvantamisessa. Toisen säteen aallonpituus on puolestaan alkuperäistä aallonpituutta suurempi ja sitä voidaan hyödyntää 3-fotonikuvantamisessa. Säteet johdetaan pulssipuristimen läpi, jolla varmistetaan, että näytteeseen päätyy ainoastaan lyhytkestoisimmat pulssit. [23] Femtosekunnin optisten parametrioskillaattoreiden avulla voidaan siis laajentaa Titaani-safiiri-laserin spektrialuetta, kun tarvitaan valoa, jonka aallonpituus on yli 1 000 nm [20].

Valaistus vaikuttaa merkittävästi monien mikroskopiasovellusten tärkeään muuttujaan, kuvantamisnopeuteen. Alaluvussa 2.2 kuvattiin laserskannaavien mikroskooppien niin kutsuttu perinteinen skannausmoodi, jossa lasersäde pyyhkäisee tietyn kuvannettavan

tason yli. Tällaisessa rasterimoodissa kuvanmuodostusnopeus määräytyy sen nopeuden mukaan, jolla koko skannauskuvio pystytään toistamaan, joten suurien alueiden kuvantaminen on hidasta. Koska myös multifotonimikroskoopeissa hyödynnetään usein laserskannausta, ja esimerkiksi neurofysiologisia prosesseja havainnoitaessa tämän perinteisen skannausmetodin nopeus ei riitä halutun informaation keräämiseksi, esitellään seuraavaksi muutamia vaihtoehtoja skannausnopeuden kasvattamiseksi.

Kuva 4 havainnollistaa vaihtoehtoisia skannauskuvioita. Rasteriskannaus voidaan toteuttaa yhdelle kohtisuoralle tasolle kerrallaan (Kuva 4A). Kuvannettavaa tasoa voidaan kallistaa käyttäen nopean z-suuntaisen skannauksen mahdollistavia tarkennuslaitteita (Kuva 4B). Kaksiulotteinen rasteriskannaus voidaan toteuttaa objektiivin jatkuvalla liikutamisella (Kuva 4C). Kuvat 4A–4C perustuvat rasteriskannaukseen, jossa yhden rivin skannaus kestää tyypillisesti yli 1 ms ja tyypillinen kuvanmuodostusaika on noin 1 s [22].



Kuva 4. *Vaihtoehtoisia skannauskuvioita kolmiulotteisessa näytteessä. Perustuu lähteeseen [8].*

Kuvantamisnopeuden kasvattamiseksi voidaan muodostaa erilaisia ei-rasterimaisia kuvioita (Kuva 4D–4F). Erittäin potentiaalinen keino nopeaan 3-ulotteiseen kuvantamiseen on niin kutsuttu hajasaantiskannaus, jossa lasersädettä poikkeutetaan jatkuvasti reitiltään muodostaen epäjatkuva kuvio ikään kuin ”hyppäämällä” pisteestä toiseen kolmiulotteisen kappaleen sisällä (Kuva 4F). [16] Tällaista lähestymistapaa hyödynnetään esimerkiksi laserskannaavassa multifotonimikroskopiassa, kun suuria solupopulaatioita halutaan tutkia nopeasti, syvällä elävässä kudoksessa eikä koko näytteen skannaaminen ole välttämätöntä.

Vaihtoehto skannausnopeuden kasvattamiselle kuviota muuttamalla on multifokaalinen skannaus, jossa kuvantamisnopeutta kasvatetaan käyttämällä samanaikaisesti useaa laserin fokuuspistettä. Multifokaalisessa skannauksessa säde jaetaan osiin, jotka skannaavat samanaikaisesti näytteen yli. Lähestymistapa vaatii tarpeeseen räätälöityjä kuvantamisilmaisimia, koska eri sädeosien synnyttävä fluoresenssi on pystyttävä erottelemaan. Menetelmän ongelma kuitenkin on, että sirottavissa näytteissä kuva saattaa summentua, ja lisäksi säteen jakaminen pienempitehoisiksi osiksi pienentää multifotoniabsorption todennäköisyyttä [22].

Vaihtoehto laserskannaavalle mikroskopialle on valolevymikroskopia, jonka merkittävä periaatteellinen ero laserskannaavaan tekniikkaan on, että näytteen valaisu ja fluoresenssisignaalin havainnointi toteutetaan kohtisuorassa toisiinsa nähden. Valolevymikroskopia on tekniikka, jossa yhdistyvät laajakenttämikroskopian korkea datanhankintanopeus sekä laserskannaavan mikroskopian kolmiulotteisen kuvantamisen kannalta oleellinen kyky optiseen jaksotukseen. Fluoresenssi synnytetään valolevyllä, joka kohdistetaan yhteen tasoon näytettä kerrallaan. [24] Jokainen kuvannettava taso valaistetaan vain kerran, ja virittymistä tapahtuu ainoastaan valaistussa tasossa, joten kuva voidaan kerätä suoraan kameralla. Koska kuvanmuodostus ei vaadi havainnoitavan tason skannausta, mahdollistaa tekniikka huomattavasti suuremman kuvantamisnopeuden. Valolevymikroskopian käyttöön paksuissa näytteissä liittyy kuitenkin rajoituksia. Esimerkiksi kuvantamissyvyys on tyypillisesti pienempi kuin vastaavassa laserskannaavassa mikrosopiassa, koska näytteessä siroavia signaalifotoneita ei pystytä havaitsemaan.

3.4 Ca^{2+} -kuvantaminen

Ca^{2+} -kuvantaminen on fluoresoivien merkkiaineiden hyödyntämiseen perustuva mikroskopian työkalu, joka mahdollistaa muun muassa neuronien aktiivisuuden tutkimisen solupopulaatioissa aivojen toiminnallisuuden havainnoimiseksi. Tarkasti määritettyyn kohtaan näytettä viedyt kalsiumindikaattorit välittävät tietoa solujen Ca^{2+} -ionikonsentraatioon kytköksissä olevista prosesseista fluoresenssiominaisuuksiaan muuttamalla.

Pienikokoisten kalsiumindikaattoreiden kehittäminen alkoi 1980-luvulla, minkä seurauksena nähtiin, että yksi hermostollisen aktiivisuuden seuraus, solunsisäisen kalsiuminkonsentraation kasvu, voisi monessa tilanteessa korvata aktiopotentiaaleihin liittyvän aktiivisuuden epätarkan suoran optisen havainnoinnin. Vaikka saatu signaali on monessa tilanteessa vain karkea arvio aktiopotentiaalien suuruudesta, Ca^{2+} -aktiivisuuteen perustuva toiminnallinen kuvantaminen on hyödyllinen työkalu hermostollisen toiminnan liittämiseksi yksittäisiin neuroneihin. Kalsiumkuvantamista hyödynnetään usein yhdessä multifotonimikroskopian kanssa, jolla voidaan kuvantaa elävien näytteiden sirottavia kudoksia korkealla resoluutiolla ja herkkyydellä. [25]

Solujen Ca^{2+} -signaalit noudattavat avaruudellisen sijoittumisen ja ajan suhteen monimutkaisia aktiivisuuskuvia. Lisäksi signaalit kulkevat solujen sisällä ja niiden välillä aaltomaisesti. Fysiologisia signaalintiketjuja on näin ollen mahdotonta toisintaa tarkasti laboratorio-olosuhteissa (*in vitro*), joten solujen välisiä signaaleja on pystyttävä taltioimaan ja analysoimaan elävän organismin sisällä (*in vivo*). Koska neuroneiden aktiivisuus ja ak-

tiopotiaalien synty yhdistetään tyypillisesti solun sisään virtaavaan kalsiumiin, käytetään kalsiumindikaattoreita paljastamaan muuten näkymättömiä neuronien aktiivisuuskuvioita. Kalsiumkonsentraation optisen havainnoinnin kehitys on mahdollistanut Ca^{2+} -ionikonsentraation suoran havainnoinnin solunsisäisenä viestinkuljettajasignaalinä, ja Ca^{2+} -indikaattorien hyöty solujen signaalin tutkimisessa perustuukin siihen, että neuronien aktiivisuuden mittaukset pystytään toteuttamaan elävän organismin sisällä. [26]

Elimien kokonaisvaltaiseen toimintaan liittyvän tiedon keräämiseksi on pystyttävä tarkastelemaan kokonaisia solupopulaatioita. Tällaisessa signaalinneissa neuronien solunsisäisillä Ca^{2+} -ioneilla on ratkaiseva rooli. Ca^{2+} -signaalien sekä niiden aika- ja paikkariippuvaisen ominaisuuksien ymmärtäminen soluissa ja kudoksissa on oleellista elinsysteemien fysiologiseen säätelyyn liittyvän tiedon keräämiseksi sekä farmakologisten lähestymistapojen kehittämiseksi. Yhdistämällä valittuun optiseen kuvantamistekniikkaan ja tutkittavaan näytteeseen sopiva Ca^{2+} -indikaattori solunsisäisiä kalsiumsignaaleja pystytään tarkastelemaan korkealla ajan ja paikan resoluutiolla. Kalsiumindikaattoreita hyödyntämällä saavutettu kuvantamisresoluutio ajan suhteen on millisekuntien luokkaa ja paikan suhteen mikrometrien luokkaa. [26] Tällaista kuvantamisen lähestymistapaa voidaan hyödyntää erilaisten koe-eläinten monissa kudoksissa solunsisäisen kalsiumin havainnoimiseksi ja solunsisäisten signaalintensiteettien tutkimiseksi. Kalsiumkuvantamisen tekniikka mahdollistaa jopa satojen neuronien samanaikaisen aktiivisuuden tutkimisen.

Kalsiumkuvantamista hyödynnetään multifotonimikroskopiassa, kun halutaan havainnoida neuronien aktiivisuutta elävässä aivokudoksessa. Yhdistettynä epälineaariseen absorptioon perustuvaan mikroskopiaan kalsiumkuvantamista voidaan hyödyntää neuroniverkostojen toiminnan reaaliaikaisessa analysoinnissa yksittäisen solun resoluutiolla. Multifotonimikroskopia mahdollistaa myös pitkäaikaisen neuronien kalsiumsignaalinnein dynamiikan tutkimisen, koska fluoresenssi synnytetään pääosin vain tarkasteltavaan kohtaan näytettä, jolloin menetelmästä aiheutuvat photo bleaching -ilmiö ja fototoksisuus pysyvät alhaisina.

On olemassa erilaisia kalsiumindikaattoreita, joita yhdistävä tekijä on, että niistä kaikki toimivat sitomalla Ca^{2+} -ioneja. Kalsiumindikaattorit voidaan jaotella kahteen ryhmään. Ensimmäiseen, niin kutsuttuun perinteisten kalsiumindikaattorien ryhmään kuuluvat pienimolekyyliset kemialliset indikaattorit, jotka ovat synteettisiä orgaanisia väriaineita. Toinen ryhmä koostuu geneettisesti koodatuista kalsiumindikaattoreista (engl. Genetically encoded calcium indicator, GECI), jotka ovat kalsiumherkkiä fluoresoivia proteiineja.

[26] Geneettisesti koodattuja kalsiumindikaattoreita käytetään laajalti aivokuvantamisessa, koska niitä voidaan ilmentää geneettisesti muunneltujen koe-eläinten solupopulaatioissa [8]. Hermostollisen aktiivisuuden kuvantamisessa niitä hyödynnetään viemällä ne tarkasteltaviin neuroneihin, ja GECI:en merkittävä hyöty onkin, että ne voidaan kohdistaa tarkasti määritettyihin soluluokkiin. [25]

Seuraavaksi esitellään lyhyesti muutama lähestymistapa sekä orgaanisten että geneettisesti koodattujen indikaattorien viemiseksi näytteen neuroneihin. Useita neuroneita voidaan värjätä samanaikaisesti esteröityjen orgaanisten väriaineiden paineruiskutuksella, johtamalla väriaineiden dekstraani-konjugoituja muotoja neuronien aksonipoluille tai hyödyntämällä elektroporaatiota [8,20]. Geneettisesti koodatut indikaattorit voidaan viedä näytteeseen virukseen perustuvalla kuljetuksella, elektroporaatiolla tai koe-eläimen geenimuunteluun perustuvalla tekniikalla [20].

Orgaanisella Ca^{2+} -väriaineella on sähköstaattinen varaus, joten se ei pysty läpäisemään solukalvoa ilman kemiallisia tai fysikaalisia toimenpiteitä. Väriaine voidaan tehdä neutraaliksi ja siis solukalvon läpäiseväksi esteröimällä, jonka jälkeen se voidaan viedä solupopulaatioon paineruiskutuksella [20]. Kun väriaine on diffundoitunut solun sisään, sen kemiallinen rakenne muuttuu ja aine jää loukkuun solun sisälle. Orgaanisista kalsiumindikaattoreista voidaan myös tuottaa dekstraani-konjugoituneita muotoja, joiden ruiskuttaminen neuronin aksonipoluille johtaa paikalliseen värjäytymiseen ja lopulta väriaineen kulkeutumiseen haluttuun kohtaan. [8] Kolmas tapa orgaanisen väriaineen viemiseksi soluun on hyödyntää elektroporaatiota, jossa ainetta imeytetään näytteeseen sähköimpulssien avulla [20]. Paikallisessa elektroporaatiossa väriainetta sisältävä mikropipetti sijoitetaan kohdealueeseen ja pipetin läpi kohdistetaan heikkoja sähköisiä pulsseja, mikä aiheuttaa lyhytkestoisia häiriöitä solukalvolla ja merkkiaine pääsee solun sisään. Merkkiaineita voidaan viedä 10–100 neuronin populaatioihin, ja paikallisen elektroporaation merkittävä etu on, että merkkiainetta päätyy tarkasteltavien osien ulkopuolelle vain hyvin pieniä määriä. [25]

GECI:en viemiseksi näytteeseen on myös useita vaihtoehtoja. Ensimmäinen tapa on käyttää virusta hyödyntävää indikaattorin ruiskutusta, jolla voidaan esimerkiksi värjätä tarkkaan valittuja alueita aivoissa. Virusperäisessä transduktiossa bakteerisolun DNA:ta siirtyy solusta toiseen bakteereja infektoivien virusten välityksellä. Indikaattori voidaan myös osoittaa koe-eläimen sisällä kasvavaan alkioon kohdunsisäisellä elektroporaatiolla. Siirtogeenisen, geneettisesti koodattuja indikaattoreita ilmaisevan eläimen muodostaminen puolestaan mahdollistaa neuronien toiminnan pitkäaikaisen tarkkailun solu-, verkosto- ja systeemitasolla. Tällaista lähestymistapaa käytetään, kun halutaan tutkia

esimerkiksi näytteen ominaisuuksien kehittymistä ja ylläpitoa sekä eläimen oppimista tai muistia. [20]

Vaikka kalsiumkuvantaminen on suhteellisen tehokas tekniikka ja se mahdollistaa muuten näkymättömän solujen aktiivisuuden havainnoinnin, liittyy siihen myös ongelmia. Kuten alaluvussa 2.3 todettiin, näytteeseen ulkopuolelta tuotavat merkkiaineet todennäköisesti häiritsevät näytteen toimintaa tai rakennetta jollakin tasolla. Ca^{2+} -indikaattorit muun muassa poikkeuksetta häiritsevät solunsisäistä kalsiumdynamiikkaa. Indikaattori siis interferoi raportoitavan muuttujan kanssa, mikä mahdollisesti rajoittaa kerättävää informaatiota. [26] Toinen Ca^{2+} -indikaattoreihin liittyvä ongelma on, että fluoresenssin muutoksien yhdistäminen signaalipiikkien lukumäärään tai keston ei ole suoraviivaista [20].

4. KUVANTAMISEN HAASTEITA KÄYTÄNNÖSSÄ

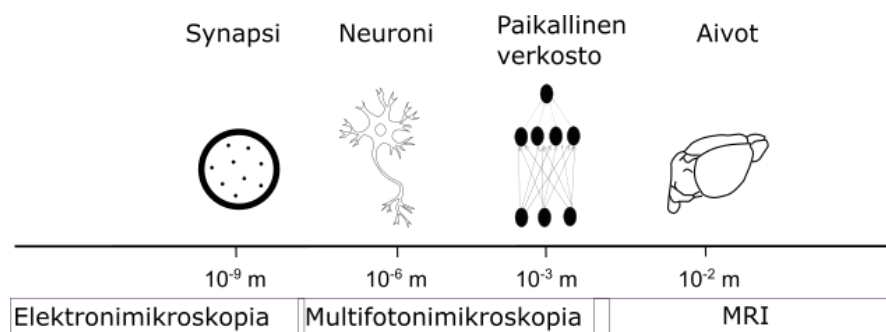
4.1 Aivokuvantaminen

Aivoista eristettyjen neuronien rakenteesta ja toiminnasta on saatu merkittävä määrä tietoa *in vitro* -tutkimuksilla, jotka toteutetaan näytteen luontaisen toimintaympäristön ulkopuolella. Neuronit ovat monimutkaisia verkostoja muodostavia aivojen toiminnallisia yksiköitä, joiden signalointi tapahtuu erilaisia aktiivisuuskuvioita pitkin jopa koko aivot käsittävällä alueella. Aivojen ominaisuuksien syvällisemmäksi ymmärtämiseksi on pystyttävä havainnoimaan kokonaisten hermoverkkojen neuronitason toimintaa niiden luonnollisessa ympäristössä, jolloin puhutaan *in vivo* -kuvantamisesta. [27] Aivotutkimuksen yhteydessä yleisesti käytetty termi, konnektomi, tarkoittaa hermoverkkojen välisten yhteyksien karttaa. Jotta voitaisiin muodostaa selkeä kuva aivoista ja niiden toiminnasta, on ensin rakennettava konnektomi, koska se kattaa neuronitason koko aivot käsittävät yhteydet [22]. Koska monien neurologista alkuperää olevien sairauksien synty- ja toimintamekanismeja ei vielä ymmärretä kovin hyvin, on niihin soveltuvien hoitokeinojen kehittäminen erittäin haastavaa. Tällä hetkellä yleinen käsitys on, että neuronien toiminnan ymmärtäminen konnektomi-tasolla tulee olemaan tärkeässä roolissa tiedon kartuttamisessa.

Informaation kulku aivoissa tapahtuu hermoverkoissa ja niiden välillä. Se on neuronitason signaalien etenemistä toiminnallisten liitosten läpi, jotka perustuvat aksonien projektiioihin. Tyypillisesti (eläimestä riippuva) neuronin koko on joitakin kymmeniä mikrometrejä. Neuronin aksonin halkaisija on tyypillisesti noin 1 μm , mutta sen projektiopituus voi olla yli 1 cm. Käytännössä tämä siis tarkoittaa, että pienet neuronitason prosessit ulottuvat aivoissa huomattavasti laajemmille etäisyyksille, aksonien tapauksessa jopa koko aivot käsittävälle alueelle. Yksittäisen neuronin aksoniprojektion tunnistaminen on oleellista aivojen toiminnan ymmärtämiseksi sekä terveiden aivojen että sairauksien kannalta. Koska aksoniprojektiot saattavat käsittää suuren alueen, on yksittäisen aksonin jäljittäminen hankalaa, vaikka tekniikan resoluutio mahdollistaisikin sen erottamisen. [28]

Aivojen monimutkaisesta rakenteesta aiheutuu haasteita kuvantamistekniikoille, kun tavoitteena on tutkia makroskooppisia tilavuuksia mikroskooppisella resoluutiolla. On olemassa erilaisia kuvantamistekniikoita, joilla aivojen rakenteesta ja toiminnasta voidaan kerätä tietoa eri näkökulmista. Kuvantamistekniikat voidaan jaotella optisiin ja ei-optisiin

menetelmiin. Esimerkkejä aivokuvantamisessa käytettävistä ei-optisista menetelmistä ovat elektronimikroskopia (EM) ja magneettikuvaus (engl. Magnetic resonance imaging, MRI). Elektronimikroskopian avaruudellinen resoluutio on käytettävistä menetelmistä korkein, ja tekniikkaa onkin käytetty muun muassa hermoston synaptisten yhteyksien tutkimisessa. Tämän korkean resoluution tekniikan kuvantamisalue ei kuitenkaan ole läheskään tarpeeksi suuri esimerkiksi kokonaisten aksoniprojektioiden tutkimiseksi. MRI puolestaan mahdollistaa aivojen kuvantamisen suurella alueella ja sitä käytetäänkin yleisesti muun muassa lääketieteessä sairauksien löytämiseksi. MRI-tekniikalla aivojen toiminnallisia yhteyksiä voidaan tutkia makroskooppisella tasolla, mutta tekniikan resoluutio on vain noin 100 μm , joka ei ole riittävä yksittäisten neuronien erottamiseksi. [28] Yleisesti voidaan siis todeta, että kuvantamisessa on aina tehtävä kompromisseja resoluution ja kuvannettavan tilavuuden välillä. Kuva 5 havainnollistaa aivokuvantamisessa käsiteltäviä kokoluokkia ja erilaisten tekniikoiden toiminta-alueita. Optisilla kuvantamismenetelmillä voidaan saavuttaa tasapaino kuvannettavan alueen ja resoluution välille. Käytännössä tämä tarkoittaa, että hermostollisia yhteyksiä pystytään tutkimaan niiden koko vaikutusalueella yksittäisen solun resoluutiolla, kun käytetään suhteellisen pieniä koe-eläimiä. Seuraavassa aluvuossa esitellään laajasti konnektomitutkimuksissa käytetty koe-eläin, *Drosophila melanogaster* eli banaani-kärpänen ja käsitellään multifotonimikroskopian soveltuvuutta kyseisen eläinmallin konnektomitutkimuksiin.



Kuva 5. Erilaisia aivotutkimuksessa käsiteltäviä kokoluokkia.

Optisen mikroskopian hyödyntämistä aivokuvantamisessa rajoittaa merkittävästi voimakkaasti sirottava, monimutkaisista rakenteista koostuva aivokudos. Aluvuossa 3.2 esiteltiin multifotonimikroskopian ominaisuuksia, joiden perusteella se on potentiaalinen menetelmä optisesti haastavien kolmiulotteisten näytteiden kuvantamiseen. Multifotonimikroskopia on optinen tekniikka, jota voidaan (yhdessä täydentävien kontrastointityökalujen kanssa) käyttää tutkimaan aivoja yksittäisen solun resoluutiolla, noin millimetrin syvyydellä ja muutamien satojen mikrometrin pituisella alueella [22]. Multifotonimikroskopiolla pystytään tuottamaan alle mikrometrin avaruudellinen resoluutio, joka on riittävä yksittäisen neuronin havainnoimiseksi näytteessä. Tällainen resoluutio saavutetaan

käyttämällä korkean NA :n objektiivilinssiä. NA :n kasvattaminen kuitenkin pienentää mikroskoopin näkökenttää, eli rajoittaa riittävän suurella resoluutiolla tarkasteltavaa tilavuutta. Koska kuvannettavan alueen ja resoluution suhteen on tehtävä kompromisseja, tutkittavien näytteiden valikoima on koon suhteen rajoitettu, kun esimerkiksi kokonaisten aksoniprojektoiden on mahdollista kuvantamisalueeseen hyödyllisen tiedon saamiseksi.

Aivotutkimuksessa kuvantamisen aikaskaalat vaihtelevat nopeiden (~ 1 ms) solutason prosessien havainnoimisesta pitkäaikaisen muistin kehittymisen seuraamiseen vuosien aikana [22]. Avaruudellisen resoluution ja kuvannettavan tilavuuden lisäksi kuvantamistekniikalle haasteen asettaa myös ajallinen resoluutio.

Neuronitason signaalien yhteyksien ymmärtämiseksi aktiivisuutta on pystyttävä mittaamaan samanaikaisesti verkostojen avaruudellisesti eriävissä sijainneissa. Neuroniverkostojen vierekkäiset neuronit saattavat noudattaa hyvinkin erilaisia aktiivisuuskuvioita. Vastavuoroisesti näytteessä kauas toisistaan sijoittuneet solut saattavat kuulua samaan toiminnalliseen verkostoon vuorovaikuttaen toistensa kanssa pitkien aksoniprojektoiden välityksellä. Informaatiota on siis pystyttävä keräämään lähes samanaikaisesti monista neuronipopulaation soluista laajassa näytetilavuudessa. Lisäksi mittausten on oltava toteutettavissa signaalien aikaskaalassa, tyypillisesti millisekunnin ajallisella resoluutiolla. [20] Ongelma kuitenkin on, että samanaikainen ajallisen ja avaruudellisen resoluution sekä kuvantamistilavuuden optimointi on haastavaa.

Edellä todettiin jo vaatimus kompromissien teolle avaruudellisen resoluution ja kuvannettavan alueen koon välillä. Laserskannaavia tekniikoita voidaan käyttää tuottamaan korkean avaruudellisen resoluution kuvia syvällä kolmiulotteisissa näytteissä, mutta kuvantamisnopeus on tällöin rajallinen. Kuvantamisnopeutta voidaan kasvattaa rajallisesti esimerkiksi erilaisia skannauskuvioita muodostamalla, jolloin toisaalta osa tarpeellisesta informaatiosta saattaa jäädä keräämättä. Esimerkki vaihtoehtoiseen kuvioon perustuvasta skannausmenetelmästä on hajasaantiskannaus, jossa useasta ennalta määrätystä pisteestä koostuva sarja voidaan kuvantaa nopeasti suuressa tilavuudessa muuttamalla laserin fokus lähes viiveettä. Toinen vaihtoehto skannausnopeuden kasvattamiseksi on useiden virittävien säteiden käyttäminen rinnakkain eli fokuksipisteiden lisääminen. Tämän menetelmän käyttö kuitenkin lisää valon siroamista, mikä rajoittaa kuvantamissyvyyttä. Valolevy mikroskopiantekniikan käyttö puolestaan mahdollistaisi huomattavasti nopeamman kuvantamisen, mutta sen hyödyntäminen paksuissa läpinäkymättömissä näytteissä on tyypillisesti rajoitettua.

Vaikka multifotonimikroskopia on potentiaalinen työkalu aivokuvantamisessa, liittyy tekniikkaan siis myös merkittäviä rajoituksia, kuten kuvantamissyvyys ja -nopeus. Parhaimmillaan kuvantamissyvyyttä voidaan kasvattaa näytteen ominaisuuksien mukaan vain noin 1 mm:n syvyyteen. Esimerkiksi hiiren aivoissa tämä syvyys vastaa aivojen kuorikerrosta, josta ei välttämättä saada toivottua informaatiota. Tyypillisesti aivokuoren alla sijaitsevien rakenteiden kuvantamiseksi aivojen päällyskudoksia joko poistetaan kirurgisesti tai näytteeseen lisätään tunkeutuvia optisia elementtejä, esimerkiksi linsskejä. [25] Tällaiset invasiiviset toimenpiteet eivät kuitenkaan ole ongelmattomia, koska niiden seurauksena näytteen rakenne vaurioituu ja hermostollinen toiminta saattaa vääristyä johtaen epäluotettavaan informaatioon.

Haluttuja tuloksia tuottavat kuvantamisalueet eroavat merkittävästi aivojen eri syvyytasoissa pääosin elimen geometrian takia. Näin ollen laserskannaavassa multifotonimikroskopiassa muuttumattoman skannausmoodin (esimerkiksi vakiokokoisien tason x - y -pisteskanalaus) käyttäminen tuottaa huomattavan määrän hyödyttöä dataa ja pidentää kuvantamisen kestoa turhaan, mikä johtaa hyödyttömän datan varastointiin sekä tarpeetomaan ajallisen resoluution huononemiseen. Aivojen profiili muuttuu tasaisesti syvyystason muuttuessa, joten kuvantamisalueen muuttaminen useissa pisteissä mahdollistaa tehokkaamman kuvantamisen. Käytännössä siis skannausaluetta muutetaan useita kertoja kuvantamisprosessin aikana, jolloin kuvantamisnopeus kasvaa merkittävästi. [28]

4.2 *Drosophila melanogaster*

Tässä alaluvussa esitellään banaanikärpäsen, *Drosophila melanogasterin*, aivojen ominaisuuksia optiikan näkökulmasta ja perustellaan, miksi se on sopiva koe-eläin tämänhetkisiin konnektomitutkimuksiin. Lisäksi luvussa perehdytään banaanikärpäsen aivojen optisista ominaisuuksista aiheutuviin rajoituksiin kuvantamisessa ja esitellään keinoja, joita tutkimuksissa on tähän mennessä löydetty koko kärpäsen aivot käsittävän kuvantamisen mahdollistamiseksi.

Banaanikärpäsen aivojen optisen tutkimisen tavoitteena on rakentaa koko aivot käsittävä kartta neuronien välisistä yhteyksistä [29]. Optisella mikroskopiolla voidaan tuottaa alle mikrometrin luokkaa oleva avaruudellinen resoluutio, joka on riittävä yksittäisten neuronien erottamiseksi. Kuitenkin jopa multifotonitekniikoilla kuvantamissyvyys aivokudoksen sisällä rajoittuu tyypillisesti muutamiin satoihin mikrometreihin, mistä aiheutuu tarve kärpäsen kaltaisen pienen koe-eläimen käyttämiselle. [27]

Banaanikärpäsen hermosto on kompakti, ja eläin omaa monipuoliset tilariippuvaiset käytösmallit, joilla se luo vasteen aistiärsykkeille [29]. Sen aivot ovat pienet, (noin 1 mm × 0,3 mm × 0,2 mm) niiden keskimääräinen paksuus on noin 200 µm, ja ne sisältävät noin 10⁵ neuronia [30]. Näiden ominaisuuksien perusteella banaanikärpänen on ideaali koe-eläin aivojen toiminnan tutkimiseksi optisilla menetelmillä, yksittäisen solun resoluutiolla. Kärpäsen konnektomi käsittää noin 90 000 sen aivojen noin 135 000 neuronista [31].

Multifotonimikroskopiaa on sovellettu kärpäsen aivojen tutkimiseen muun muassa yhdessä kalsiumkuvantamisen kanssa. Menetelmän etu on, että kuvantaminen voidaan toteuttaa alle millisekunnin ajallisella ja alle mikrometrin avaruudellisella resoluutiolla. [31] Yksittäisiä neuroneita voidaan siis havainnoida lyhyissä tapahtumissa, kuten 1 ms:n kestoisien aktiopotentiaalien etenemisessä. Geneettisesti koodattuja fluoresoivia merkkiaineita on hyödynnetty monipuolisesti kärpäsen aivojen tutkimisessa. Niitä on käytetty muun muassa eri rakenteiden sijaintien määrittämiseen, neuronien aktiivisuustasojen arvioimiseen ja ajan kuluessa muuttuvan aktiivisuuden havainnoimiseen. Niitä on käytetty laajasti selvittämään biologisten prosessien kokoelmaa, molekyylitason toimintoja ja solutason komponentteja. Etenkin GFP:n muunnoksia on käytetty laajasti kärpäsen aivojen hermostollisen aktiivisuuden tutkimisessa. [32] Geneettisesti koodattuihin kalsiumindikaattoreihin perustuvaa Ca²⁺-kuvantamista hyödyntämällä multifotonimikroskopiolla on pystytty tarkkailemaan samanaikaisesti yli sataa neuronia elävän banaanikärpäsen aivojen hajuaistiin liittyvissä oppimis- ja muistikeskuksissa, sienikappaleissa (engl. Mushroom body, MB) [31]. Yksi MB sisältää noin 2 300 *Kenyon*-solua, jotka ovat kyseiselle aivoalueelle ominaisia neuroneita. Erilaisia Ca²⁺-ilmaisimia ja synteettisiä Ca²⁺-väriaineita on käytetty myös monitoroimaan fluoresenssin muutoksia kärpäsentoukan hermopäätteissä yksittäisen solun resoluutiolla. [32]

Kärpäsen aivojen neuronitiheys on poikkeuksellisen suuri. Myös kolmiulotteisen näytteenoton on siis oltava tiheää, mikä rajoittaa nopeiden, harvojen, skannaustekniikoiden, kuten hajasaantiskannauksen käyttöä. Tiheitä näytteenottotekniikoita, kuten valolevy- ja laajakenttäteknikkaa voidaan hyödyntää aivojen rakenteen jatkuvaan, alle millisekunnin resoluution havainnointiin, mutta tekniikoiden käyttö rajoittuu usein läpinäkyviin kudoksiin. Kärpäsen aivokudos on myös poikkeuksellisen sirottavaa. 2-fotonifluoresenssimikroskopiolla elävän hiiren ja seeprakalan aivoja on pystytty kuvantamaan noin 1 mm:n syvyydellä [30]. Kärpäsen aivojen paksuus on huomattavasti pienempi kuin tyypillinen 2PFM:n syvyytläpäisevyys. Aivot koostuvat kuitenkin sameasta aivokudoksesta sekä ilmateistä, jotka häiritsevät valon kulkua kohteessa. Tämän vuoksi edes 2PFM ei ole riittävän läpäisykykyinen tunkeutumaan koko aivojen syvyyteen ilman erillisiä toimenpiteitä.

[31] Ilmatiet vastaavat hapenvaihdosta karpäsen aivoissa, kun esimerkiksi hiirellä näiden rakenteiden tilalla aivoissa on verta, mikä selittää eroavuudet suurimmassa mahdollisessa kuvantamissyvytydessä. Tarkastellaan seuraavaksi tarkemmin karpäsen aivojen optisten ominaisuuksien vaikutusta mahdollisuuteen käyttää eri kuvantamismenetelmiä.

Kuo-Jen Hsu *et al.* havaitsivat tutkimuksessaan banaanikarpäsen aivojen ilmasteistä aiheutuvan voimakkaan vaikutuksen valon kulun vääristymään. Tutkimuksen tavoitteena oli löytää sopiva menetelmä kuvantaa syvältä karpäsen aivoja, jossa valon kulku häiriintyy voimakkaasti ja kuvantamissyvyys rajoittuu. He tekivät vertailun kolmella aallonpituudella virittämällä karpäsen aivojen molekyyliä yhdellä, kahdella ja kolmella fotonilla. Tutkimuksessa saatiin selville, että koko karpäsen aivot käsittävä kuvantamissyvyys saavutetaan joko aivojen kaasunpoistolla tai käyttämällä pitkän (1 300 nm) aallonpituuden säteilyä. [30]

Kuten aiemmin tässä työssä on todettu, viritystilan synnyttämiseen käytettävä pidemmän aallonpituuden valo siroaa kudoksissa vähemmän, mikä motivoi multifotonimikroskopian hyödyntämisen sirottavien kudosten syvältä kuvantamiseen. Teoriaosuudessa esiteltiin myös, kuinka korkeamman kertaluvun optisia prosesseja voidaan hyödyntää kontrastiltaan paremman kuvan tuottamiseksi, kun virittyminen rajoittuu aina pienempään tilaan virittävien fotonien määrän kasvaessa, jolloin tekniikan kyky luontaiseen optiseen jakoutukseen paranee.

Hsu *et al.* hyödynsivät kahta lähestymistapaa havainnoidakseen karpäsen koko aivoja. Ensimmäinen menetelmä oli kaasunpoisto, jossa ilma pumpattiin pois karpäsen aivokudoksen seassa olevista ilmasteistä. Menetelmällä saavutettiin koko aivot käsittävä kuvantamissyvyys, mutta sen merkittävä ongelma oli, että koe-eläin kuoli käsittelyn seurauksena. Toinen, elävän koe-eläimen tutkimisen mahdollistava, menetelmä oli hyödyntää 3PFM:aa, jossa vihreällä fluoresoivalla proteiinilla värjättyjä karpäsen aivoja tutkittiin käyttäen 1 300 nm:n aallonpituuden valoa. Menetelmällä saavutettiin riittävä kuvantamissyvyys (200 μm) koko aivojen tutkimiseksi, ja lisäksi synnytetään täydentävä THG-signaali, josta saatiin tietoa taitekertoimiltaan eroavista rakenteista. [30] Taulukko 1. koottaa yhteen oleelliset tutkimustulokset. Hsu *et al.* siis osoittivat, että karpäsen aivojen syvältä kuvantamista rajoittava voimakas sironta aiheutuu kudoksen sisältämistä ilmasteistä, ja että kuvantamissyvyttä on mahdollista kasvattaa multifotonitekniikalla pidempää aallonpituutta käyttämällä.

Taulukko 1. Aallonpituuden kasvattamisen (multifotoniabsorption hyödyntämisen) merkitys kuvantamissyvyyteen banaanikärpäsen aivoissa. Tulokset perustuvat lähteeseen [30].

	1PFM	2PFM	3PFM
Aallonpituus λ (nm)	488	920	1 300
Kaasunpoisto	Ei	Ei	Ei
Syvyys $d \approx$ (μm)	40	120–140	200
Kaasunpoisto	Kyllä	Kyllä	
Syvyys $d \approx$ (μm)	120–140	200	

Yksi tämän kandidaatintyön tavoitteista oli perustella epälineaariseen optikkaan perustuvan mikroskopian paremmuus niin kutsuttuihin perinteisiin menetelmiin verrattuna, kun halutaan kuvantaa eläviä kolmiulotteisia näytteitä. Banaanikärpänen on esimerkki, joka osoittaa multifotonimikroskopian olevan potentiaalinen työkalu tiedon keräämiseksi aivojen kaltaisista optisesti haastavista näytteistä. Tulokset motivoivat jatkamaan multifotonimikroskopian kehittämistä (mahdollisesti yhdessä muiden menetelmien kanssa) kärpäsen aivotutkimuksessa koko aivot käsittävän hermoverkkojen kartan rakentamiseksi ja entistä monipuolisemman tiedon hankkimiseksi.

5. YHTEENVETO

Tämän kandidaatintyön tavoitteena oli esitellä mahdollisuuksia biologisten näytteiden kuvantamiseksi optisen mikroskopian lähestymistapoja hyödyntämällä. Esittelemällä niin kutsutut perinteiset fluoresenssimikroskopiamenetelmät motivoitiin tarve kehittää paksujen näytteiden syvältä kuvantamiseen paremmin soveltuvia menetelmiä. Perusajatus oli, että kuvantamissyvyyttä voidaan parantaa näytteeseen kohdistettavan säteilyn aallonpituutta kasvattamalla, kun tiedetään säteilyn sironnan käänteinen verrannollisuussuhde aallonpituuteen. Aivojen toiminnallisuuteen tutustumalla perusteltiin, miksi kuvantaminen on pystyttävä toteuttamaan elävän organismin sisällä, eikä pienten yksittäisten alueiden tutkiminen kerrallaan riitä kokonaisvaltaisen tiedon keräämiseksi. Samalla tuotiin esille kuvantamisolosuhteista aiheutuvat haasteet, jotka selventävät, miksi aivoista ja niiden toiminnallisuudesta tiedetään suhteellisen vähän. Banaanikärpäsellä suoritettuihin tutkimuksiin tutustumalla näytettiin, että kuten teoriaosuudessa periaatteellisesti todettiin, multifotonitekniikalla pystytään todella kasvattamaan kuvantamissyvyyttä.

Monipuolisista menetelmistä ja työkaluista huolimatta toistaiseksi ei ole saatu rakennettua sellaista kokonaisvaltaista kuvausta minkään eläimen aivojen toiminnasta, joka käsittäisi elimen kaikki organisatoriset tasot. Tällä hetkellä käytettävissä olevilla menetelmillä jo suhteellisen pienet koe-eläimet, kuten kärpänen tai hiiri, ovat haastavia kokonaisvaltaisen tiedon keräämiseksi. Ihmisen aivot ovat näitä koe-eläimiä huomattavasti kompleksisemmat. Ihmisaivot ovat kooltaan noin 167 mm × 140 mm × 93 mm ja ne sisältävät yli 10^9 neuronia, joten ei ole odotettavaa, että esimerkiksi multifotonimikroskopiaa voitaisiin (ainakaan lähitulevaisuudessa) hyödyntää ihmisen aivojen tutkimisessa. Tämä ei kuitenkaan osoita multifotonimikroskopian hyödyttömyyttä tai anna syytä olla kehittämättä tekniikkaa. Aivotutkimuksessa käytettävissä olevat eläinmallit ovat laajasti muunneltavissa geenitekniikalla, mikä mahdollistaa niiden aivojen toiminnan mallintamisen hyödyntämällä erilaisia työkaluja, kuten geneettisesti koodattuja kalsiumindikaattoreita. Yleinen oletus onkin, että eläinmallit sopivat mahdollisesti jopa paremmin perustiedon päättelemiseksi siitä, miten neuroniverkostot toimivat. Käytettävät koe-eläimet mahdollistavat aivojen aktiivisuuden tutkimisen suurissa neuronijoukoissa ja vuorovaikuttavissa verkostoissa, mikä tekee multifotonimikroskopiaan perustavasta kuvantamisesta erittäin potentiaalisen keinon neuronien toiminnan ja eläimen välisen käytöksen riippuvuuden tutkimiseksi.

Multifotonimikroskopian resoluutio on riittävä erottamaan yksittäisiä neuroneita (~1 μm) sekä havaitsemaan nopeita neuronitason prosesseja (~1 ms). Tekniikalla saavutettava kuvantamissyvyys (~1 mm) on riittävä pienen koe-eläimen, kuten banaanikärpäsen aivojen, joiden paksuus on noin 200 μm , tarkastelemiseen kokonaisuudessaan. Koska yksittäisen solun erottamiseksi säilytettävä resoluutio on mahdollista ylläpitää muutamien satojen mikrometrien pituisella alueella, on kärpäsen aivoista pystytty selvittämään useita kokonaisia aktiivisuuskuvia, jotka tapahtuvat aivojen kokoon nähden laajalla alueella millisekuntien skaalassa. Koska pientä koe-eläintä käyttämällä multifotonimikroskopian ajallinen ja paikallinen resoluutio sekä kuvannettava alue pystytään optimoimaan samanaikaisesti parhaiten, on banaanikärpäsen konnektomi kaikista tutkimuksessa käytettävistä koe-eläimistä kattavin ja se käsittää jo suurimman osan, eli 90 000 eläimen aivojen noin 135 000 neuronista.

Banaanikärpänen on kuitenkin organismina erittäin yksinkertainen, eikä voida olettaa, että sen konnektomin rakentaminen toisi kokonaisvaltaisen käsityksen aivoista elimenä. Kuvantamistekniikoita on siis kehitettävä, jotta olisi mahdollista siirtyä tutkimaan monimutkaisempien ja suurempien organismien toimintaa. Kuten aivokuvantamista käsittelevässä alaluvussa todettiin, erilaisista ja erikokoisista rakenteista voidaan kerätä tietoa monesta näkökulmasta erilaisia tekniikoita hyödyntäen. Yksi mahdollisuus ratkaista haasteet, jotka ovat seurausta aivojen suurista kokoluokkien ja aikaskaalojen eroista, voisi siis olla erilaisten tekniikoiden yhdistäminen, koska ainakin tällä hetkellä vaikuttaa, että yksittäisen tekniikan ominaisuuksia ei voida kehittää optimaaliseksi näin suurella vaihteluvälillä.

Koska laserskannaava multifotonimikroskopia on näytteistystekniikka, jonka kuvantamisnopeus on aina rajoitettu, lienee selvää, ettei menetelmällä välttämättä pystytä havaitsemaan kaikkein nopeimpia neuronitason tapahtumia. Merkittävin syy tähän on, että näytteen koon kasvaessa myös neuronien yhteydet laajentuvat yhä suuremmalle alueelle, mutta tapahtumien aikaskaala ei juurikaan muutu. Multifotonitekniikkaa voidaan soveltaa myös valolevymikroskopiassa, jonka kuvanmuodostusnopeus on huomattavasti laserskannaavan tekniikan nopeutta suurempi. Valolevymikroskopian avaruudellista resoluutiota elävän organismin tutkimisessa rajoittaa kuitenkin sen laajakenttäluonne, jonka vuoksi valo siroaa paksuissa läpinäkymättömissä näytteissä. Yksi vaihtoehto voisi olla yksittäisten neuroneiden tutkiminen ensin niiden luonnollisessa ympäristössä laserskannaavalla multifotonimikroskopiolla. Sen jälkeen suurempia tilavuuksia voitaisiin kuvantaa nopeasti valolevymikroskopiolla hyödyntämällä aiemmin kerättyä tie-

toa yksittäisten neuronien liikkeistä ja toiminnasta. Vastaavanlaisilla toisiaan täydentävillä lähestymistavoilla voitaisiin mahdollisesti kerätä uutta tietoa, kun yksittäistä menetelmää ei pystytä optimoimaan toimiakseen riittävän nopeasti, tarkasti ja riittävän suurella alueella.

LÄHTEET

- [1] P. Banks, Development of the Optical Microscope, Federal Information & News Dispatch, LLC, 2017, s. 5–8. Saatavissa: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/development-of-the-optical-microscope/>
- [2] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2. painos, John Wiley & Sons, Incorporated, 2013.
- [3] R. L. Price, W. G. Jerome, Basic Confocal Microscopy, 1. painos, Springer New York, 2011.
- [4] J. Icha, M. Weber, J. C. Waters, C. Norden, Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it, Wiley Periodicals, 2017. Saatavissa: https://publications.mpi-cbg.de/Icha_2017_6914.pdf
- [5] S. González, A. Halpern, Laser-Scanning Confocal Microscopy. In: H. Soyer, G. Argenziano, R. Hofmann-Wellenhof, R. Jühr (eds), Color Atlas of Melanocytic Lesions of the Skin, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, s. 39–46.
- [6] C. A. Combs, Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods, Current Protocols in Neuroscience, 2010. Saatavissa: <http://www.microscopist.co.uk/wp-content/uploads/2017/04/Fluorescence-Microscopy-NS-Protocols-2017.pdf>
- [7] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M. D. Bootman, Fluorescence Microscopy, Cold Spring Harb Protoc., 2014. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4711767/pdf/nihms749436.pdf>
- [8] W. Göbel, F. Helmchen, In Vivo Calcium Imaging of Neural Network Function, Physiology, American Physiological Society, 2007, s. 358–365. Saatavissa: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00032.2007>
- [9] U. Kubitscheck, Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications, John Wiley & Sons, Incorporated, 2013.
- [10] B. R. Masters, The Development of Fluorescence Microscopy, In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, 2010. Saatavissa: http://fen.bilkent.edu.tr/~physics/news/masters/ELS_Hist_FI_Micro.pdf
- [11] Y. Markaki, H. Harz, Two-photon fluorescence light microscopy, Humana Press, 2017. Saatavissa: <http://web.mit.edu/solab/Documents/Assets/So-2PF%20light%20microscopy.pdf>
- [12] F. Helmchen, W. Denk, Deep tissue two-photon microscopy, Nature Methods, Vol. 2, No. 12, 2005, s. 932–940, <https://doi.org/10.1038/nmeth818>.
- [13] R. Boyd, Nonlinear Optics, Academic Press, 2008, s.
- [14] R. T. Borlinghaus, B. Griesshaber, Multiphoton Microscopy – a Satisfied Wish List, Leica Microsystems, 2017, verkkosivu (viitattu 17.5.2020). Saatavissa: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/multiphoton-microscopy-a-satisfied-wish-list/>

- [15] A. Larson, Multiphoton microscopy, *Nature Photon*, Vol. 5, No. 1, (2011), 2010, <https://doi.org/10.1038/nphoton.an.2010.2>.
- [16] D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, C. Xu, Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation, *Optics Express*, Vol. 17, No. 16, 13354-13364, 2009. Saatavissa: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-17-16-13354>
- [17] A. Diaspro, V. Caorsi, P. Bianchini, G. Chirico, C. Usai, *Multiphoton Microscopy*, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering, John Wiley & Sons, Incorporated, 2006.
- [18] C. J. Rowlands, D. Park, O. T. Bruns, K. D. Piatkevich, D. Fukumura, R. K. Jain, M. G. Bawendi, E.S. Boyden, P. TC. So, Wide-field three-photon excitation in biological samples, *Light: Science & Applications*, Vol. 6, No. 5, 2017. Saatavissa: <http://syntheticneurobiology.org/PDFs/17.05.rowlands.FULL.pdf>
- [19] M. D. Young, J. J. Field, K. E. Sheetz, R. A. Bartels, J. Squier, A pragmatic guide to multiphoton microscope desing, *Advances in Optics and Photonics*, 2015. Saatavissa: <https://www.osapublishing.org/aop/abstract.cfm?uri=aop-7-2-276>
- [20] K. König, *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging: Applications in Biology and Medicine*, De Gruyter, 2018, s. 321–338.
- [21] J. B. Pawley, *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Springer US, 2006, s. 535–549.
- [22] K. Svoboda, R. Yasuda, Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience, *Neuron*, Vol. 50, s. 823–839, 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.019.
- [23] Three-photon imaging: How it works, *Scientifica*, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 25.5.2020): <https://www.scientifica.uk.com/learning-zone/three-photon-imaging-how-it-works>.
- [24] E.G. Reynaud, U. Kržič, K. Greger, E. H. K. Stelzer, Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage, *Taylor & Francis Group, HFSP Journal*, Vol. 2, No. 5, 2008. Saatavissa: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2976/1.2974980>.
- [25] J. W. Lichtman, W. Denk, The Big and the Small: Challenges of Imaging the Brain's Circuits, *American Association for the Advancement of Science*, 2011. Saatavissa: <https://science.sciencemag.org/content/334/6056/618.full?rss=1>
- [26] J. T. Russell, Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology, *British Journal of Pharmacology*, 2010, s. 1605–1625. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166690/>
- [27] B. N. Ozbay, G.L. Futia, M. Ma, V.M. Bright, J. T. Gopinath, E. G. Hughes, D. Restrepo, E.A. Gibson, Three dimensional two-photon brain imaging in freely moving mice using a miniature fiber coupled microscope with active axial-scanning, *Nature Publishing Group*, 2018. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29802371>.

- [28] T. Zheng, Z. Yang, A. Li, X. Lv, Z. Zhou, X. Wang, X. Qi, S. Li, Q. Luo, H. Gong, S. Zeng, Visualization of brain circuits using two-photon fluorescence micro-optical sectioning tomography, *Optics express*, Vol. 21, No. 8, 2013, s. 9839–9850. Saatavissa: <https://www.osapublishing-org.libproxy.tuni.fi/oe/fulltext.cfm?uri=oe-21-8-9839&id=252777>
- [29] M. J. Aragon, M. Wang, J. Shea, A.T. Mok, H. Kim, K. M. Lett, N. Barkdull, C. B. Schaffer, C. Xu, N. Yapici, Non-invasive multiphoton imaging of neural structure and activity in *Drosophila*, 2019. Saatavissa: https://www.researchgate.net/publication/336402628_Non-invasive_multiphoton_imaging_of_neural_structure_and_activity_in_Drosophila.
- [30] K. Hsu, Y. Lin, A. Chiang, S. Chu, Optical properties of adult *Drosophila* brains in one-, two-, and three-photon microscopy, *Biomedical optics express*, 2019, s. 1627–1637. Saatavissa: <https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-10-4-1627>
- [31] K. Hsu, Ye. Lin, Yu. Lin, K. Su, K. Feng, S. Wu, Yu-C. Lin, A. Chiang, S. Chu, Millisecond two-photon optical ribbon imaging for small-animal functional connectome study, *Optics Letters*, Vol. 44, No. 13, 2019, s. 3190–3193. Saatavissa: <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-44-13-3190>
- [32] E. Rebollo, K. Karkali, F. Mangione, E. Martín-Blanco, Live imaging in *Drosophila*: The optical and genetic toolkits, *Methods*, Vol. 68, No. 1, 2014, s. 48–59. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202314001819>