

# Streszczenie

Niniejsza praca prowadzi czytelnika przez współczesną optyczną mikroskopię nieliniową. Najpierw przedstawia ogólne wyzwania w mikroskopii oraz zarysowuje istotne osiągnięcia w dziedzinach mikroskopii nadrozdzielczej i obrazowania przez ośrodki rozpraszające. Następnie prezentuje powszechnie stosowaną skaningową mikroskopię dwu-fotonową, wraz z opisem mikroskopu zbudowanego na bazie projektu Benjamina Judkewitza. Mikroskop umożliwia skanowanie z szybkością 30 klatek na sekundę, oraz pozwala na skanowanie wiązką Bessela czy zastosowanie techniki "Image Scanning Microscopy". Mikroskop został wykorzystany w eksperymentach biologicznych do obrazowania in-vivo neuronów wrażliwych na dopaminę.

W dalszej części opisano układ do trójwymiarowej nadrozdzielczej mikroskopii wykorzystującej fluktuacje intensywności fluorescencji (SOFI). Do wzbudzenia wykorzystano ogniskowanie czasowe zapewniające oświetlenie szerokim polem (pole widzenia ok.  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ) ograniczone w wymiarze wzdłuż osi optycznej obiektywu do  $\sim 2,4 \mu\text{m}$ . Ograniczenie osiowe poprawiono do  $\sim 1,2 \mu\text{m}$  korzystając ze wzbudzenia linią i skanowania w jednym wymiarze. Po połączeniu z techniką SOFI uzyskano  $\sim 420 \text{nm}$  rozdzielczości osiowej, co umożliwia wiarygodne rekonstrukcje w trójwymiarze przy ograniczonym wybielaniu poza płaszczyznę obrazowania.

W kolejnej części opisano nieliniowe obrazowanie ze wzbudzaniem światłem rozproszonym (NISE). Jest to nowa technika zapewniająca obrazowanie nadrozdzielcze przez ośrodki silnie rozpraszające. Wykorzystanie cząstek lawinowych pozwoliło osiągnąć rozdzielczość  $560 \text{nm}$  – ponad dwukrotnie lepszą niż teoretyczny limit  $1,2 \mu\text{m}$  – w warunkach, w których żadna standardowa metoda nie umożliwia obrazowania. Tak zaskakujący rezultat był możliwy dzięki zrozumieniu i wykorzystaniu statystyki intensywności i efektu pamięci dla światła rozproszonego, oraz wysoko nieliniowej odpowiedzi luminescencyjnej. Wzbudzenie wysoko nieliniowych luminoforów przez światło rozproszone, oraz odpowiednie skanowanie prowadzi do nieinwazyjnego i nadrozdzielczego obrazowania obiektów całkowicie ukrytych za mocno rozpraszającymi, nieprzezroczystymi warstwami. Rozwijana dalej technika NISE może mieć znaczący wpływ zarówno na badania podstawowe, jak i stosowane: od obrazowania biomedycznego i funkcjonalnego (np. badania struktury i aktywności mózgu in-vivo), przez optogenetykę, inteligentne dostarczanie leków za pomocą światła (zlokalizowane uwalnianie związków głęboko w tkankach), terapię fotodynamiczną, obliczenia analogowe za pomocą światła, aż po obróbkę materiałów (gdzie wysokie nieliniowości występują naturalnie).

W całej pracy nacisk został położony na odtwarzalność eksperymentów, dostarczając praktycznych instrukcji budowy i użytkowania poszczególnych układów eksperymentalnych. Łącznie wyniki te pokazują, że nieliniowość otwiera ścieżki do głębszego i nadrozdzielczego obrazowania, a co ważniejsze – stanowi znakomite środowisko dla nowych, ciekawych pomysłów w mikroskopii, które po zastosowaniu mogą mieć duży wpływ na świat w którym żyjemy.

**słowa kluczowe:** Mikroskopia nieliniowa, Mikroskopia dwufotonowa (TPSM), Ogniskowanie czasowe, SOFI (nadrozdzielcze obrazowanie wykorzystujące fluktuacje intensywności), Nadrozdzielczość 3D, Obrazowanie głęboko w tkankach, Obrazowanie za pomocą światła rozproszonego, Optyczny efekt pamięci, NISE (nieliniowe obrazowanie ze wzbudzaniem światłem rozproszonym)