



GÖTEBORGS UNIVERSITET

# **Laser Scanning Multiphoton Microscopy**

**Focusing on Fluorescence Correlation Spectroscopy and  
Fluorescence Lifetime Imaging for Biomedical Applications**

**JEEMOL JAMES**

Institutionen för kemi och molekylärbiologi  
Naturvetenskapliga fakulteten

Akademisk avhandling för filosofie doktorsexamen i biofysik, som med tillstånd från  
Naturvetenskapliga fakulteten kommer att offentligt försvaras fredag den 25 Mars  
2022 kl. 14.00 i PJ, Institutionen för fysik, Kemigården 1, Göteborg.

ISBN: 978-91-8009-687-4 [Print]

ISBN: 978-91-8009-688-1 [Pdf]

Available online at: <http://hdl.handle.net/2077/70451>



## GÖTEBORGS UNIVERSITET

### **Svensk summering**

Multifotonmikroskopi (MPM) är en laserbaserad mikroskopiteknik med stor potential för icke-invasiv tredimensionell avbildning av komplex biologisk vävnad. Denna avhandling undersöker hur MPM-tekniken kan kombineras med fluorescenskorrelationsspektroskopi (FCS) och mätningar av fluorescenslivslängd (FLIM). Avhandlingen behandlar både metodutveckling och studier av medicinska tillämpningar.

En praktisk guide för hur MPM-FCS baseras på tvåfotonexciterad fluorescens kan realiserats, presenteras som en del av arbetet. Primära faktorer som påverkar mätningarnas validitet fanns framförallt utgöras av koncentration, numerisk apertur och laserexcitation. Metodens möjlighet att mäta diffusionens beroende av viskositet påvisades genom att mäta diffusionen från ett färgämne, Rhodamine B, i olika vatten-glycerolblandningar. Baserat på mätningarna kunde även viskositeten hos en kollagengel med okända egenskaper bestämmas.

Ett annat delarbete behandlar hur MPM-FLIM kan implementeras för vävnadsdiagnostik. Mer specifikt studerades lymfkörtelvävnad härrörande från melanompatienter *ex vivo*. Med hjälp av MPM-FLIM kunde atypiska celler, friska lymfocyter, och blodkärl identifieras i vävnaden baserat på morfologiska egenskaper samt fluorescenslivslängdsdata. Dessutom studerades tvåfotonexciterad spektral- och FLIM-karakterisering av cellers autofluorescens i epidermala vävnadskulturer *in vitro*. Kända centrala komponenter för autofluorescensen är nikotinamidadenindinukleotid (NADH) och flavinadenindinukleotid (FAD). Studien belyser vikten av att även andra fluoroforer, såsom strukturella proteiner och keratin, bör beaktas vid tolkning av FLIM-data. Detta fynd är viktigt i kontext av studier av komplexa biologiska prover för att informationen ska tolkas på korrekt sätt.

Sammanfattningsvis för arbetet i denna avhandling tekniken ett steg närmare möjliga kliniska och praktiska tillämpningar av MPM i kombination med FCS och FLIM. Framtida studier bör inriktas på ytterligare fördjupad förståelse av de grundläggande principerna för att därigenom kunna leda teknikutvecklingen framåt.

**Keywords:** Multifotonmikroskopi, fluorescenskorrelationsspektroskopi, fluorescenslivslängd, melanoma metastasis, autofluorescensen