

Abstract

Second Harmonic Generation (SHG) is a well-established method for non-linear optical microscopy: materials with a proper break in centrosymmetry can be imaged with a sub-micron resolution. Several materials capable of SHG are known; one of the most important targets for the SHG-microscopy is collagen, the most abundant protein in the human body. Specifically, the rigid parts of the human eye - the cornea, sclera and lamina cribrosa consist of several different types of collagen fibrils.

In this work, a novel prototype of a Scanning Laser Ophthalmoscope (SLO)-based video-rate SHG-microscope potentially capable of In Vivo -imaging is presented. A Titanium:Sapphire (Ti:Sa) femtosecond laser ($\lambda = 832$ nm) was coupled into a modified SLO (Heidelberg Retina Tomograph). The optics and electronics of the SLO were used for scanning the laser beam and image acquisition. The laser beam was scanned over the sample and the light produced by Second Harmonic Generation was collected for imaging. The SLO electronics then turned the SHG signal into an image at a video-speed (16 frames per second)

The device was used for imaging the lamina cribrosa of enucleated pig eyes. Several lamina cribrosas were imaged at a resolution comparable to commercial multiphoton microscopes. In addition, the average pore size of the lamina cribrosa was determined and the pressure dependence of the pore size was studied by increasing the pressure in the eye artificially. 62 pores from the lamina cribrosa of five freshly enucleated pig eyes were imaged with the SHG. The increase of pressure of 44 mmHg increased the average pore size for $(15.5 \pm 3.0)\%$ in the mid-central and mid-peripheral area in the pig lamina cribrosa. However, the pore size growth was linear only in approximately one-third of the pores.

Kurzfassung

Die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) ist eine bekannte Methode in der nichtlinearen optischen Mikroskopie: Materialien ohne Zentrosymmetrie können mit einer Auflösung abgebildet werden, die besser als ein Mikrometer ist. Es sind mehrere SHG-fähige Materialien bekannt; eines der wichtigsten ist das Collagen, das Protein, welches im menschlichen Körper am häufigsten anzutreffen ist. Insbesondere ist Collagen ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Auges: die Hornhaut, die Sklera und die Lamina Cribrosa bestehen aus unterschiedlichen Collagentypen. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Aufbau eines Prototypes eines SHG-Mikroskops für die ophthalmologische Forschung dargestellt. Das Mikroskop basiert auf einem Scanning Laser Ophthalmoscope (SLO) und ist fähig Bilder mit Videofrequenz (16 Aufnahmen pro Sekunde) aufzunehmen und dies möglicherweise auch am lebenden Auge. Ein Titan-Saphir - Femtosekundenlaser ($\lambda=832$ nm) wurde in ein umgebautes SLO (Heidelberg Retina Tomograph) eingekoppelt. Das Scannen des Laserstrahl und die Bildaufnahme wurden durch die Optik und Elektronik des HRT durchgeführt. Der Laserstrahl wurde über die Probe geführt und das erzeugte SHG-Licht zur Signalerzeugung genutzt. Das SHG-Signal wurde durch die Elektronik des HRT mit Videofrequenz zu einem Bild umgewandelt. Das Gerät wurde zur Abbildung der Lamina Cribrosa von enuklierten Schweineaugen verwendet. Die erreichte Auflösung der so gewonnenen Bilder ist mit kommerziellen Multiphotonmikroskopen vergleichbar, allerdings wurde eine höhere Anregungsleistung benötigt. Im weiteren Verlauf wurde der Druck im Auge künstlich erhöht und die Druckabhängigkeit der mittleren Porengröße der Lamina Cribrosa des Schweineauges bei steigenden Druckstufen bestimmt. 62 Poren der Lamina Cribrosa von fünf frisch enuklierten Schweineaugen wurden mit Hilfe von SHG abgebildet. Die Druckerhöhung um 44 mmHg vergrößerte die durchschnittliche Porengröße um $(15.5 \pm 3.0)\%$ im zentralen Bereich und an der Peripherie der Lamina Cribrosa. Jedoch sind nur ein Drittel der Poren bei steigendem Druck linear gewachsen.