

Laseroptische Methoden basierend auf der Zweiphotonen-Mikroskopie zur Detektion von Chondrozyten auf artifiziellen Kollagen-I/III-Trägern

Ronald Schade¹, Jörg Martini², Katja Tönsing², Dario Anselmetti² und Klaus Liefelth¹

¹Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik (iba) e.V., 37308 Heilbad Heiligenstadt, Rosenhof

²Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, Lehrstuhl für Experimentelle Biophysik & Angewandte Nanowissenschaften, 33615 Bielefeld, Universitätsstraße 25

Zusammenfassung

Für die Therapie von Knorpelschäden werden in zunehmendem Maße Produkte des Tissue Engineerings eingesetzt. Das Verfahren der Matrix-gekoppelten Autologen Chondrozyten Implantation (MACI[®]) stützt sich dabei auf die präimplantative Kultivierung von Chondrozyten auf Kollagen I/III-Trägern mit anschließender Implantation der zellbewachsenen Kollagenträger in den Knorpeldefekt. Die nichtinvasive Kontrolle des präimplantativen Kultivierungsprozesses hinsichtlich Zellzahl, Zellwachstum und Zellverteilung ist bisher jedoch nur eingeschränkt möglich. Es werden Möglichkeiten vorgestellt, Chondrozyten auf Kollagen I/III-Trägern mittels Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskopie (2PLSM) selektiv zu visualisieren. Durch die laserrasternde Mikroskopie können dreidimensionale Strukturinformationen in nativen, ungefärbten MACI[®]-Konstrukten gewonnen werden. Durch die Anwendung von Femtosekunden-Laserpulsen im NIR-Bereich zur Zweiphotonenanregung und Second Harmonic Generation (SHG) ist die mikroskopische Darstellung von stark streuenden zellbewachsenen Kollagen-Membranen bis in eine Tiefe von 300 µm möglich. Die selektive Darstellung von Chondrozyten und Kollagen I/III-Zellträgermaterialien kann anhand a) der nativen Fluoreszenz-Emissionsspektren und b) der SHG-Signale der Kollagen-Träger erfolgen. Die Ergebnisse stellen die Ausgangsbasis für die online-Kontrolle der Zellkultivierung im Tissue Engineering unter mechanischer Stimulation dar und können gleichfalls zur nichtinvasiven Bestimmung der Zahl an Chondrozyten in Knorpelbiopsien im Sinne einer Qualitätskontrolle für das Tissue Engineering eingesetzt werden.

1. Einleitung

Wesentliche Funktionen des Bewegungs- und Stützapparates des Menschen werden durch das Knorpelgewebe sichergestellt. Insbesondere die reibungsarme Funktion der Gelenke ist an intaktes hyalines Knorpelgewebe gebunden. Die Eigenschaften des Knorpels werden dabei im Wesentlichen von der Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix (ECM) bestimmt. Die ECM von intaktem hyalinem Knorpel besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II, Proteoglycanen wie Chondroitin- und Keratansulfat, Glucosaminen und Wasser [1,2]. Die ECM-Matrix wird von Chondrozyten synthetisiert, die innerhalb von sogenannten Lakunen in der Knorpelmatrix eingebettet sind und den einzigen Zelltyp innerhalb des Knorpels darstellen. Wird das Knorpelgewebe aufgrund pathologischer Prozesse (Arthritis) bzw. durch Verletzungen geschädigt, so ist das Regenerationsvermögen zur Bildung neuen Knorpelgewebes allerdings sehr eingeschränkt und die Patienten müssen teilweise erhebliche Beeinträchtigungen im Bewegungsablauf und Schmerzen ertragen. Um die Probleme bei der Knorpelneusynthese zu umgehen, werden verstärkt Methoden des Tissue Engineerings eingesetzt [3,4]. Die Matrix-gekoppelte Autologe Chondrozyten Implantation (MACI[®]) stellt dabei ein bisher klinisch erfolgreiches Verfahren für die Behandlung von Knorpelschäden dar. Dieses Therapieverfahren beruht auf der Implantation autologer Chondrozyten des Patienten, die aus einer kleinen Biopsie gesunden Knorpelgewebes entnommen, isoliert und in einer ersten Kultivierungsphase

konventionell in Monolayerkulturen vermehrt werden. Anschließend werden diese Chondrozyten auf speziellen Zellträgermaterialien (Kollagenmembranen bestehend aus porcinem Kollagen Typ I und Kollagen Typ III in der Form eines dreidimensionalen Vlies-Netzwerkes) ausgesät und präimplantativ für einige Tage weiter kultiviert. Für die klinische Versorgung des Knorpeldefektes wird der zellbewachsene Zellträger direkt in das Defektareal implantiert. Das Ziel dieses Verfahren ist es, in den Knorpeldefekt eine ausreichende Zahl an Chondrozyten einzusetzen, wobei der Kollagenträger eine Stützfunktion übernimmt und die Zellen quasi dreidimensional im Areal positioniert werden können. Nach der Implantation erfolgt dann die körpereigen gesteuerte Neusynthese von Knorpelgewebe durch die implantierten Chondrozyten mit gleichzeitigem Abbau des Kollagenträgers in einem Zeitraum bis ca. einem Jahr. Die wesentliche Voraussetzung für die Bildung biofunktionalem hyalinen Knorpels ist die Fähigkeit der Chondrozyten zur Synthese knorpelspezifischer ECM-Komponenten, die durch den Grad der Zelldifferenzierung bestimmt wird. Während der Zellvermehrung in Monolayerkulturen findet jedoch rasch eine Zelldifferenzierung statt. Durch zellstimulierende Verfahren kann während der präimplantativen Kultivierung die Redifferenzierung der Chondrozyten unterstützt werden. Neben der Stimulierung durch geeignete Kultur- und Medienbedingungen einschließlich der Zugabe von Wachstumsfaktoren (TGF-beta1 [5], FGF-2, PDGF-bb [6]) kann durch mechanischen Stress auf die Chondrozytenkulturen einschließlich hydrostatischem Druck [7,8-10] der Differenzierungsgrad der Chondrozyten positiv beeinflusst werden. Da die Chondrozyten aus unterschiedlichen Biopsien mit unterschiedlichem Schädigungsgrad stammen, stellen sich die entscheidenden Fragen nach Art und Dauer der Zellstimulation, um eine optimale Zellredifferenzierung zu erreichen. Da das Zellmaterial quantitativ begrenzt ist, muss für eine entsprechende Analyse ein nichtinvasives online-Detektionsverfahren zur Verfügung stehen.

Laseroptische Raster-Mikroskopieverfahren bieten für entsprechende Analysen dreidimensionaler Zellkulturen sehr gute Voraussetzungen. Aufgrund der hohen Lichtstreuung und des optisch dichten Materials zellbewachsener Kollagen I/III-Träger ist für die dreidimensionale Analyse die NIR-induzierte Zweiphotonenanregung der nativen Fluoreszenz eine geeignete Untersuchungsmethode. Die 2PLSM [11-15] bietet die Vorteile der dreidimensionalen Analyse mittels optischer Schnitte und ermöglicht im Vergleich zur Einphotonenanregung üblicher konfokaler Mikroskope aufgrund der verwendeten Anregungswellenlänge im NIR-Bereich von 760-1000 nm eine hohe Eindringtiefe des anregenden Lichtes ohne unzulässig hohe Fotoschädigungen und Fotobleichung des biologischen Materials [16]. Aufgrund der hohen Effizienz der Zweiphotonenanregung von nativen intrazellulären Fluorophoren wie NAD(P)H, Flavinen, Elastin und Kollagenen [14,17] sowie der SHG, speziell von assemblierten strukturegebenden Kollagenen [18-20] können Komponenten von Tissue Engineering-Konstrukten durch Autofluoreszenz- und SHG-Detektion zellschonend nichtinvasiv detektiert werden. Somit kann auf konventionelle Fluoreszenzfärbungen von Zellen, wie sie für die konfokale Laserscanmikroskopie nach Einphotonenanregung üblich ist, verzichtet werden. Die Autofluoreszenz-Emissionsspektren komplexer biologischer Proben weisen im Allgemeinen jedoch eine hohe Bandbreite auf, wobei sich Spektren interessierender Einzelkomponenten nur geringfügig unterscheiden bzw. sich spektral weit überlappen [14]. Für eine selektive Detektion von Autofluoreszenzsignalen einzelner Komponenten eines dreidimensionalen Tissue Engineering-Konstruktes (Chondrozyten, Kollagen-Träger, synthetisierte ECM) als Voraussetzung für eine quantitative Analyse müssen die Autofluoreszenz- und SHG-Signale anhand ihrer spektralen Eigenschaften getrennt werden. In diesem Artikel werden Untersuchungen zur selektiven Autofluoreszenzanalyse sowie der Optimierung der Signalperformance bei der Analyse chondrozytenbewachsener Kollagen I/III-Träger des Knorpel-Tissue Engineerings (bovines Knorpelmodell) vorgestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Chondrocyten auf Kollagen I/III-Trägern

Die Chondrozyten wurden aus gesunden bovinen Rinderknie-Biopsien mittels Collagenase- und Papain-Verdau gewonnen und in Monolayerkultur expandiert (Medium: DMEM/Ham's F12, 10% FBS, Gentamicin 50 mg/l, 10 mg/l Ascorbinsäure, 37°C, 5% CO₂, 80% Luftfeuchtigkeit), maximal zwei Zellpassagen). Anschließend wurden 5×10^5 Zellen/cm² auf zwei unterschiedlichen Kollagen I/III-Trägermaterialien (Vlies-Membran ACI-MaixTM sowie Schwammcaffold [Porengröße 30-50 µm]; Matricel GmbH, Aachen) ausgesät

und bis zu 5 Tagen weiter inkubiert. Die mikroskopische Analyse der zellbewachsenen Kollagen I/III-Träger erfolgte mittels Zweiphotonen-Laserscanning-Mikroskopie.

2.2 Zweiphotonen-Laserscanning Mikroskopie (2PLSM)

Die Komponenten des 2PLSM umfassen einen Millennia X Festkörper-Laser sowie einem Tsunami Ti:Sa-Laser zur Generierung von 100 fs-Laserpulsen im Wellenlängenbereich von 760-960 nm (**Bild 1**: 1; beide Laser Spectra-Physics), ein TriM Scope als Multifocus-Scan-Einheit (Bild 1: 2-4; LaVison BioTec GmbH Bielefeld) und ein Mikroskop (Bild 1: 5; IX 71, Olympus).

Die Scan-Einheit besteht aus einer Pre-Chirp-Strecke zur Kompensation der Laserpuls-Dispersion (Bild 1: 2) und zwei galvanometrischen Spiegel-Scannern für den Scan der Laserfoci in der X-Y-Ebene der Probe (Bild 1: 4). Die Strahl-Multiplexer-Sektion des TriM Scope (Bild 1: 3) splittet den einfallenden Laserstrahl in eine variable Anzahl an Strahlen gleicher Anregungsleistung auf [21]. Durch Kombination des Strahl-Multiplexings mit einer Steuerung der anregenden Laserenergie können in der zu analysierenden Probe (Bild 1: 6) ausreichende Fluoreszenzsignalintensitäten mit kurzen Aquisitionszeiten für die Datenaufnahme und gleichzeitiger Minimierung von Fotoschädigungen erzielt werden.

Die anregenden NIR-Laserstrahlen werden über einen dichroitischen Spiegel (Bild 1: 9; 2P-Beamsplitter 680 DCSPXR, Chroma) auf die NIR-gecoatete Objektiv-Linse (Bild 1: 10; XLUMPLFL20XW, Arbeitsabstand 2 mm, Olympus) geleitet, während das NIR-Streulicht im Detektionsweg durch einen Shortpass-Filter (2P-Emitter E 700 SP, Chroma) geblockt wird. Mit Hilfe einer Z-Scan-Einheit (MFD, Märzhäuser) kann in Verbindung mit dem Objektiv mit langem Arbeitsabstand ein weiter Bereich tief in die Z-Ebene der Probe hinein analysiert werden.

Die Detektion der Fluoreszenzsignale im non-descanned-Modus wird über eine CCD-Kamera (Bild 1: 8; IXON BV887ECS-UVB, Andor Technology) bzw. einen Photomultiplier (PMT) bei Einzelstrahlanregung (Bild 1: 11; H7422-40, Hamamatsu) realisiert. Für spektral aufgelöste Analysen können ein Filterrad mit geeigneten Filtern, ein Spektrometer (SpectraPro 2300i, Acton Research Corporation) bzw. ein Geradsicht-Dispersionsprisma (LINOS Photonics GmbH & Co. KG) in den Detektions-Lichtweg eingekoppelt werden (Bild 1: 7). Alternativ kann eine spektrale Analyse im Einzelstrahl-Descanned-Modus unter Verwendung eines 32-fach Linear-PMT, angekoppelt an ein Spektrometer erreicht werden. An jedem einzelnen Element des 32-fach-Linear PMT's werden somit ca. 8 nm des Emissionsspektrums abgebildet (Bild 1: 11 oben). Die Datenaufnahme wird über das Software-Paket Inspector (LaVision BioTec) kontrolliert. Die Auswertung von bis zu 5-dimensionalen Fluoreszenzdatensets (geometrische X-Y-Z-Achsen sowie spektrale und zeitliche Datenachsen) wird über die Software-Programme Inspector, ImageJ [22], Imaris 4.0 (Bitplane AG) bzw. Volocity 4 (Improvision) vorgenommen.

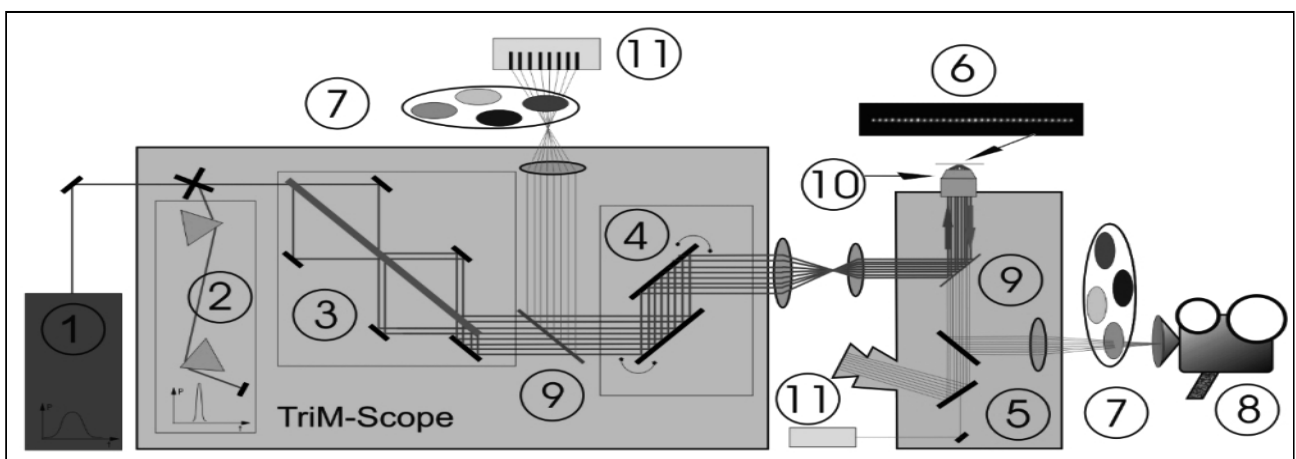


Bild 1 Schema der Komponenten des 2PLSM: 1 Ti:Sa-Laser; 2 Pre-Chirp; 3 Strahl-Multiplexer; 4 Scanner-Spiegel; 5 Mikroskop; 6 Probe; 7 Filterrad/Spektrometer/Prisma; 8 Kamera; 9 Dichroitischer Spiegel; 10 Objektiv; 11 PMT (Details siehe Text)

3. Ergebnisse

3.1 Autofluoreszenz und SHG

Die Zweiphotonen-Anregung von zellbewachsenen Kollagen I/III-Trägern induziert Autofluoreszenz- sowie SHG-Signale. SHG (Second Harmonic Generation) stellt einen physikalischen Effekt an Grenzflächen bzw. an/zwischen Phasen dar, die Moleküle mit optisch nicht-zentrosymmetrischem Aufbau aufweisen (z.B. Kollagene, Elastin, Myosin). Die SHG-Signale selbst stellen Oberschwingungen nach Frequenzverdoppelung der anregenden Wellenlänge dar [23]. Aufgrund der Schmalbandigkeit und der deutlichen Trennung der Peaks im Spektralbereich können SHG-Signale äusserst effizient von breitbandigen Autofluoreszenzsignalen der Einzelkomponenten unterschieden werden. Da nur die Kollagen I/III-Fasern der Vliese auswertbare SHG-Signale liefern, ist eine selektive Visualisierung innerhalb zellbewachsener Tissue Engineering-Konstrukte möglich (**Bilder 2 und 3**). Die SHG-Detektion von Kollagen in artifiziellen Kollagen-Trägern setzt dabei jedoch eine lokal konzentrierte Hyperstruktur von Kollagenfibrillen, wie sie z.B. in Kollagen-Vliesen vorliegt voraus. In Kollagen I/III-Schwämmen konnten bei einer Anregungsenergie von bis zu 15 mW pro Focuspunkt keine auswertbaren SHG-Signale detektiert werden.

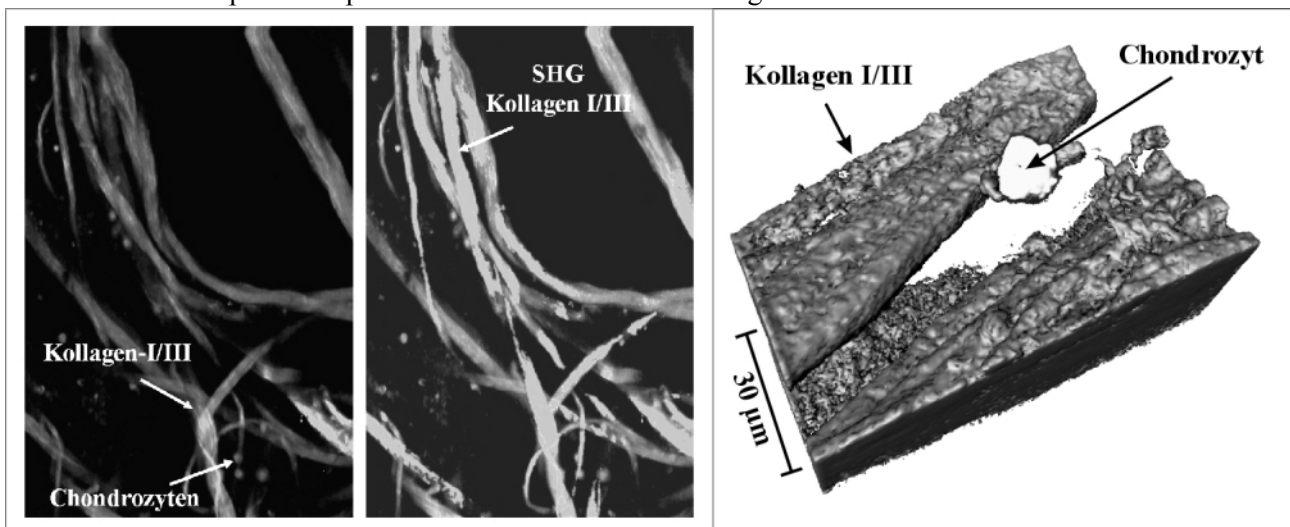


Bild 2 Autofluoreszenz und SHG von Chondrozyten auf Kollagen I/III-Vlies (820 nm, Einzelstrahl-Modus 15 mW, PMT-Detektion, links: Autofluoreszenz [ohne Filter], rechts: Projektion der sukzessiv detektierten SHG-Signale der Kollagen-Fasern [HQ 410/20] der gleichen Probe, im Original: Falschfarbenzuweisung)

Bild 3 3D-Rekonstruktion eines Chondrozyten an einer Kollagenfaser anhand selektiver Autofluoreszenz und SHG-Detektion (820 nm, Einzelstrahl-Modus 15 mW, PMT-Detektion, SHG der Kollagen-Faser [HQ 410/20], Autofluoreszenz eines Chondrozyten [HQ 525/50 und HQ 575/50], im Original: Falschfarbenzuweisung)

3.2 Spektrale Analyse der Autofluoreszenz

Die spektrale Analyse der Autofluoreszenz an jedem Pixel einer Bildebene mittels Spektrometer/Prisma liefert charakteristische Merkmale der Emissionssignale der einzelnen Strukturen in der Probe (**Bild 4**). Die spektralen Unterschiede von Chondrozyten und Kollagen-I/III-Trägern werden für eine Klassifizierung der Spektren pro Pixel genutzt. Durch eine spektrale Entmischung (spectral unmixing) und eine selektive Falschfarbenzuweisung pro Pixel in Abhängigkeit der Spektrencharakteristik ist die selektive Visualisierung und damit eine softwarebasierte quantitative Bildanalyse möglich. Der Nachteil bei diesem Verfahren besteht in der hohen Datenmenge, die bei spektral aufgelöster

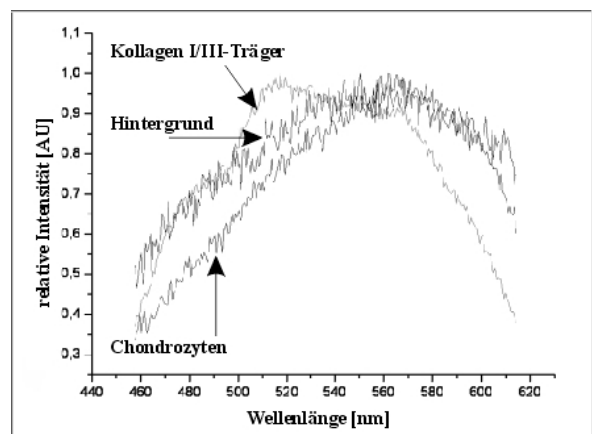


Bild 4 Emissionsspektren von Chondrozyten auf Kollagen I/III-Schwämmen (785 nm, 32 Foci à 5.5 mW, Prisma, Genauigkeit ± 10 nm)

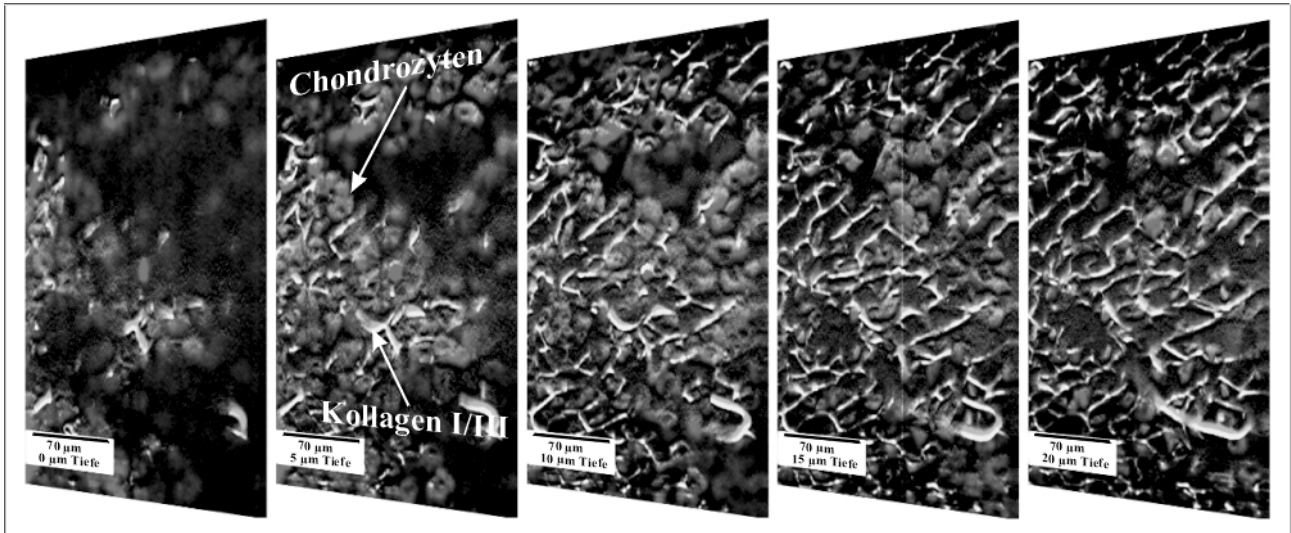


Bild 5 Chondrozyten auf Kollagen I/III-Schwamm, spektral entmischte Bilddaten an fünf Z-Ebenen (im Original: Falschfarbenuweisung)

Analyse von 1 nm über einen Spektralbereich von ca. 460-620 nm pro Pixel entsteht. Eine sinnvolle Analyse kann erreicht werden durch a) Reduzierung der Zahl an Z-Ebenen (**Bild 5**), wobei hier auf eine echte kontinuierliche 3D-Analyse verzichtet werden muss, b) durch Reduzierung der spektralen Auflösung auf 5-10 nm oder c) durch Einschränkung des zu scannenden X-Y-Areals.

3.3 Spektraler Einzelstrahl-Descanned-Modus

Trotz Zweiphotonenanregung weisen die optisch dichten Proben der chondrozytenbewachsenen Kollagen I/III-Träger relativ geringe Autofluoreszenzsignale und Streulichteinflüsse auf, was die optische Auflösung der Probenstrukturen erschwert. Durch den parallelisierten descanned-Modus können Streulichteinflüsse wirkungsvoll unterdrückt werden (hier nicht gezeigt). Durch die Kombination eines Spektrometers mit einem 32-fach Linear-PMT können die Vorteile der selektiven Visualisierung von Chondrozyten und Kollagen-Trägern durch Autofluoreszenz mit einer guten Auflösung und hoher Bilddynamik gekoppelt werden. Die spektrale Auflösung des 32-fach-PMT beträgt dabei ca. 8 nm, was sich als ausreichend für das spektrale Entmischen der Autofluoreszenzsignale der Chondrozyten und Kollagen-Träger erwiesen hat (**Bild 6**). Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der deutlichen Reduzierung der Datenmenge und einer schnellen und echten kontinuierlichen 3D-Analyse über die gesamte Tiefe der Probe in Z-Richtung.

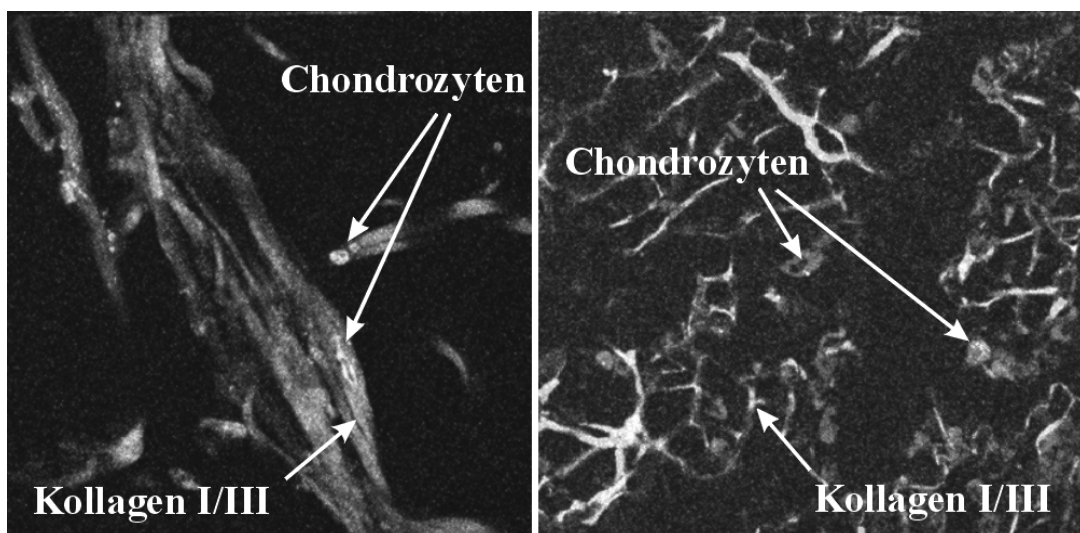


Bild 6 Chondrozyten auf Kollagen I/III-Vlies (links) und -Schwamm (rechts): Autofluoreszenz, Detektion mittels 32-fach-Linear-PMT im Einzelstrahl-Descanned-Modus (im Original: Falschfarbenuweisung)

4. Diskussion

Für die Analyse und Bewertung von Zellen und Zellverbänden im Kontakt mit (Bio)-Materialoberflächen bzw. unter dem Einfluss externer Agentien/Stimulantien (z.B. Pharmazeutika, physiko-chemische Faktoren) werden zunehmend online-Verfahren eingesetzt, die eine kontinuierliche Datenerfassung und damit die Analyse kinetischer Prozesse der Zellreaktionen ermöglichen. Die wesentliche Voraussetzung ist die nichtinvasive Detektion geeigneter Zellparameter wie Zellzahl, Zellmorphologie, Zellverteilung und Metabolismus. Durch die Weiterentwicklung und Optimierung laserscannender optischer Verfahren stehen dafür inzwischen leistungsfähige Werkzeuge zur Verfügung. Durch die vorliegenden Untersuchungen wurden Verfahren der Zellanalyse nach Zweiphotonen-Anregung entwickelt, die eine selektive Visualisierung der Hauptkomponenten von Tissue Engineering-Konstrukten für die Therapie von Knorpelschäden ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Kopplung geeigneter Detektionsverfahren mit der 2PLSM a) die selektive Analyse von Chondrozyten und Kollagen I/III-Trägern anhand ihrer spektralen Autofluoreszenz-Emissionseigenschaften und b) die simultane Analyse der Autofluoreszenz und SHG geeignete Methoden einer zellschonenden, nichtinvasiven Analyse bei Anregungsenergien im Bereich von 5-15 mW pro Focuspunkt darstellen. Die Bildgebung der naturgemäß stark streuenden Proben dreidimensionaler Zellverbände auf Trägermaterialien kann durch den descanned-Modus der Datenaufnahme deutlich verbessert werden. Auf der Basis der Ergebnisse sind die Voraussetzungen für eine optische online-Bewertung von Tissue Engineering-Konstrukten unter den Bedingungen einer zellstimulierenden Kultivierung in Fließkammer-Bioreaktoren geschaffen worden. Weiterführende Untersuchungen verfolgen das Ziel, durch die FLIM-Analyse (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) weitere Optionen für eine selektive 2PLSM-Analyse von Zellen und Trägermaterialien zu schaffen. Hierbei ist insbesondere der Effekt zellstimulierender Reize auf metabolische Zellfunktionen von großem Interesse.

Diese Forschungsarbeiten werden im Rahmen der BMBF-Forschungsinitiative „Biophotonic I“ (FKZ 13N8432, 13N8434, 13N8435) gefördert.

Literatur

- [1] C. B. James, T.L. Uhl: A Review of Articular Cartilage Pathology and the Use of Glucosamine Sulfate. *Journal of Athletic Training* 36 (2005), S. 413-419.
- [2] V. Martinek: Anatomy and pathophysiology of articular cartilage. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (2003), S. 166-170.
- [3] E.B. Hunziker: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 10 (2001), S. 432-463.
- [4] S.N. Redman, S.F. Oldfield, C.W. Archer: Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials* 9 (2005), S. 23-32.
- [5] D.K. Lee, K.B. Choi, I.S. Oh, S.U. Song, S. Hwang, C.L. Lim, J.P. Hyun, H.Y. Lee, G.F. Chi, Y. Yi, V. Yip, J. Kim, B. Lee, M.J. Noh, K.H. Lee: Continuous transforming growth factor beta1 secretion by cell-mediated gene therapy maintains chondrocyte redifferentiation. *Tissue Eng.* 11 (2005) 1-2, S. 310-318.
- [6] A.G. Tay, J. Farhadi, R. Suetterlin, G. Pierer, M. Heberer, I. Martin: Cell yield, proliferation and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng.* 10 (2004) 5-6, S. 762-770.
- [7] I. Martin, D. Wendt, M. Heberer: The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology* 22 (2004), S. 80-86.
- [8] E.M. Darling, K.A. Athanasiou: Review: Articular Cartilage Bioreactors and Bioprocesses. *Tissue Engineering* 9 (2003) 1, S. 9-26.
- [9] U. Hansen, M. Schünke et al.: Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *Journal of Biomechanics* 34 (2001), S. 941-949.
- [10] L.A. McMahon, V. Barron et al.: The state-of-the art in cartilage bioreactors. *Topics in Bio-Mechanical Engineering. T. C. f. B.-E. T. a. t. N. C. f. B. E. S. (NCBES)* (2004), S. 94-146.

- [11] M.D. Cahalan, I. Parker, S.H. Wei, M.J. Miller: Two photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nature* 2 (2002), S. 872-880.
- [12] W. Denk, K. Svoboda: Photon Upmanship: Why Multiphoton Imaging Is More than a Gimmick. *Neuron* 18 (1997), S. 351-357.
- [13] W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248 (1990), S. 73-76.
- [14] W.R. Zipfel, R.M. Williams, R. Christie, A.Y. Nikitin, B.T. Hyman, W.W. Webb: Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), S. 7075-7080.
- [15] W.R. Zipfel, R.M. Williams, W.W. Webb: Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotech.* 21 (2003), S. 1369-1377.
- [16] W.F. Cheong, S.A. Prahl, A.J. Welch: A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J.Quantum Electron.* 26 (1990), S. 2166-2185.
- [17] K. König: Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy* 200 (2000), S. 83-104.
- [18] P.J. Campagnola, L.M. Loew: Second-harmonic generation imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotech.* 21 (2003), S. 1356-1360.
- [19] S. Fine, W.P. Hansen: Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems. *Applied Optics* 10 (1971), S. 2350-2353.
- [20] R.M. Williams, W.R. Zipfel, W.W. Webb: Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophys.J.* 88 (2005), S. 1377-1386.
- [21] V. Andresen, H. Spiecker, J. Martini, K. Tönsing, D. Anselmetti, R. Schade, S. Grohmann, G. Hildebrand, K. Liefelth: *Regenerative Surgery (MeMo)* In: J. Popp, M. Strehle (Hrsg.): *Biophotonics-Vision for Better Health Care*. ISBN: 3-527-40622-0, Wiley 2006.
- [22] W.S. Rasband: *ImageJ*. (1997-2005). <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- [23] P.A. Franken, A.E. Hill, C.W. Peters, G. Weinreich: Generation of Optical Harmonics. *Phys. Rev. Lett.* 7 (1961), S. 118-119.