

Kézben tartott nemlineáris mikroszkópia

Szerző: Szegedi Imre

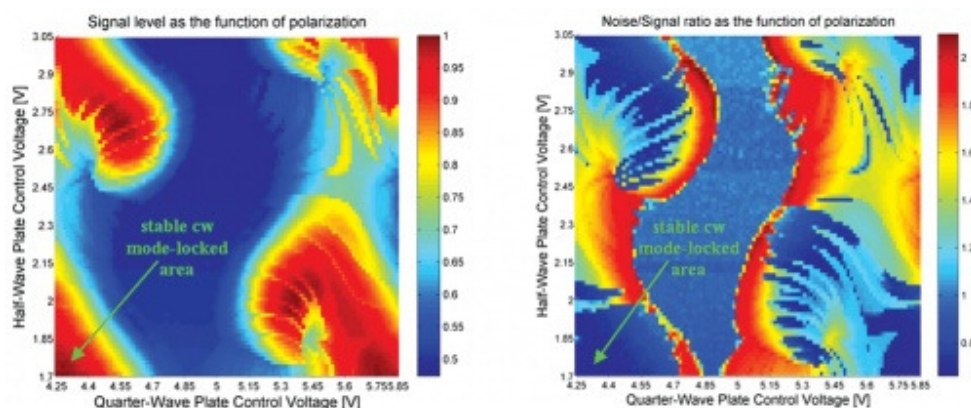
Rövidesen zárul az a Nemzeti Technológiai Program által támogatott munka, amelynek célja egyebek mellett szállézeres technológián alapuló nemlineáris mikroendoszkóp kifejlesztése volt. A konzorciumot vezető Szipőcs Róbert, az MTA Wigner FK Szilárdtestfizikai és Optikai Intézetének (SZFI) főmunkatársa, az R&D Ultrafast Lasers Kft. vezetője nem pihenhet, hiszen az idén márciusban meghirdetett Nemzeti Agykutatási Program újabb kihívást jelent a lézerfizikus és munkatársai számára. A most záruló (azonosítószám: TECH-09-A2-2009-0134) projektet, illetve a minap indult programot ismertették az érintettek.

A Nemzeti Technológiai Program által támogatott fejlesztések több részfeladatra koncentráltak. Ennek elemeként az MTA Wigner SZFI-ben például speciális tulajdonságú optikai szálak megtervezését (*lásd Várallyay és Szipőcs, IEEE-JSTQE, 2014*), illetve az R&D Ultrafast Lasers Kft. és a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékének segítségével ezekből mintadarabok gyártását, tesztelését és minősítését (*lásd Grósz és társai, Appl.Opt, 2014*) végezték el. Ugyancsak feladat volt, hogy a korábban elkészített femtoszekundumos szállézer prototípusából (*lásd Fekete és társai, Laser Phys. Lett., 2009*) ipari célra is alkalmazható változatot készítsenek, azaz olyat, ami folyamatos, zavar- (például Q-kapcsolástól) mentes módusszinkronizált működésre alkalmas, ezért megfelelően stabil és biztonságos fényforrásként használható a mikroendoszkópiás rendszerekben. Ezeknek a hagyományos szilárdtestlézeres megoldásokkal szemben az a nagy előnyük, hogy kisebb helyen elférnek, lényegesen olcsóbbak, illetve – mivel egy optikai szálból jön ki a fény –, endoszkópiás rendszerekbe is könnyebben integrálhatóak. Hátrányuk csupán annyi, hogy a szállézeres tipikusan egy szűk hullámhossztartományban működnek – az itterbium lézer körülbelül az 1 mikrométeres hullámhosszon, míg a telekommunikációs megoldásokban használt erbiumpulapú szállézer megközelítőleg az 1,5–1,6 mikrométeres hullámhossztartományon. Ugyanakkor az itterbiumra épülő rendszerek nagyon nagy határfokon dolgoznak, azaz az elektromos teljesítmény jelentős részéből optikai teljesítmény lesz, míg az erbiumpulapú rendszer a nagy sebességű adatátviteli rendszerekben használható előnyösen.



A FIBERSC2 projekt során kifejlesztett, ipari kivitelű, szálintegrált pikoszekundumos Yb-szállézer és erősítő rendszer

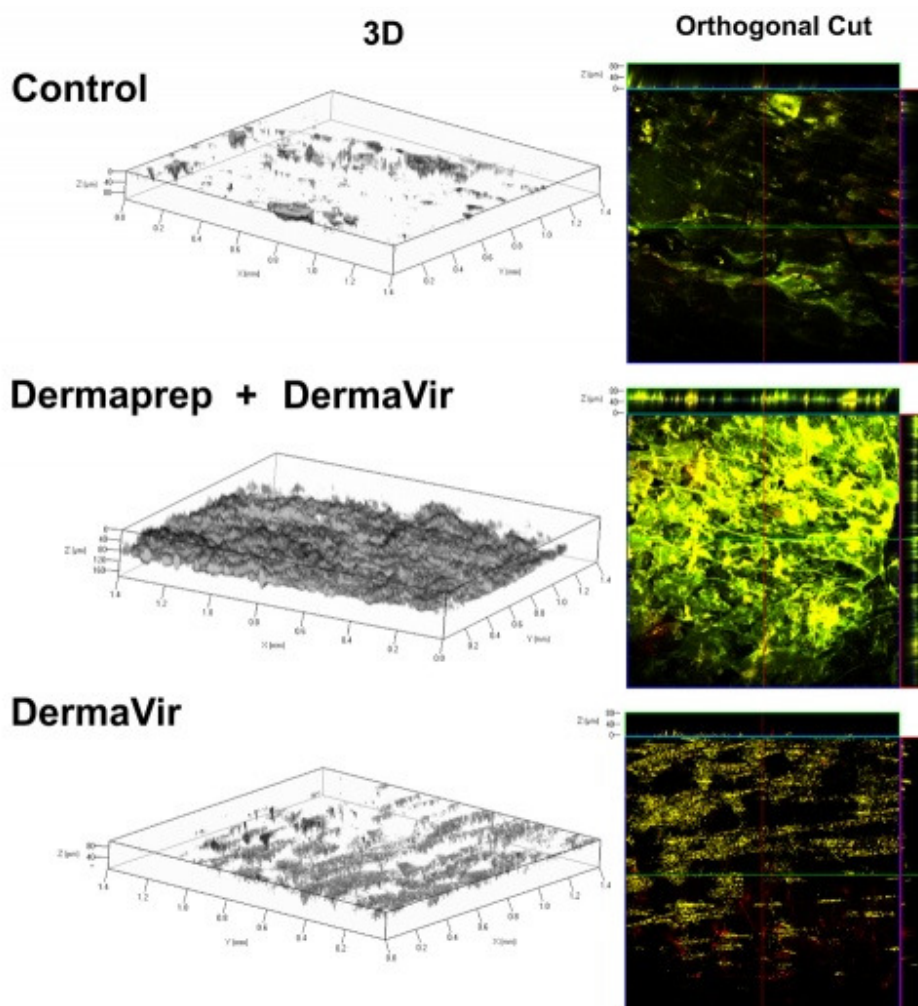
„A légmagos, méhsejt szerkezetű optikai szálak fejlesztésekor **Várallyay Zoltán** kollégám közreműködésével olyanokat terveztünk, amelyek széles optikai spektrumon garantálják az optikai impulzusok alakhű átvitelét, a kompresszióját, valamint a szálintegráltság biztosításához szükséges egyéb feltételeket. Munkánk másik fontos területe az úgynevezett üvegmagos optikai szálak tervezése volt, amelyek segítségével az előbb említett itterbium lézerek egyetlen hullámhosszát átkonvertálhatjuk egy másik, a mérések szempontjából hasznosabb hullámhosszra” – tájékoztatta magazinunkat a kutatásokat irányító Szipőcs Róbert.



Az Yb-oszcillátor stabil működési tartományait leíró „térképek”

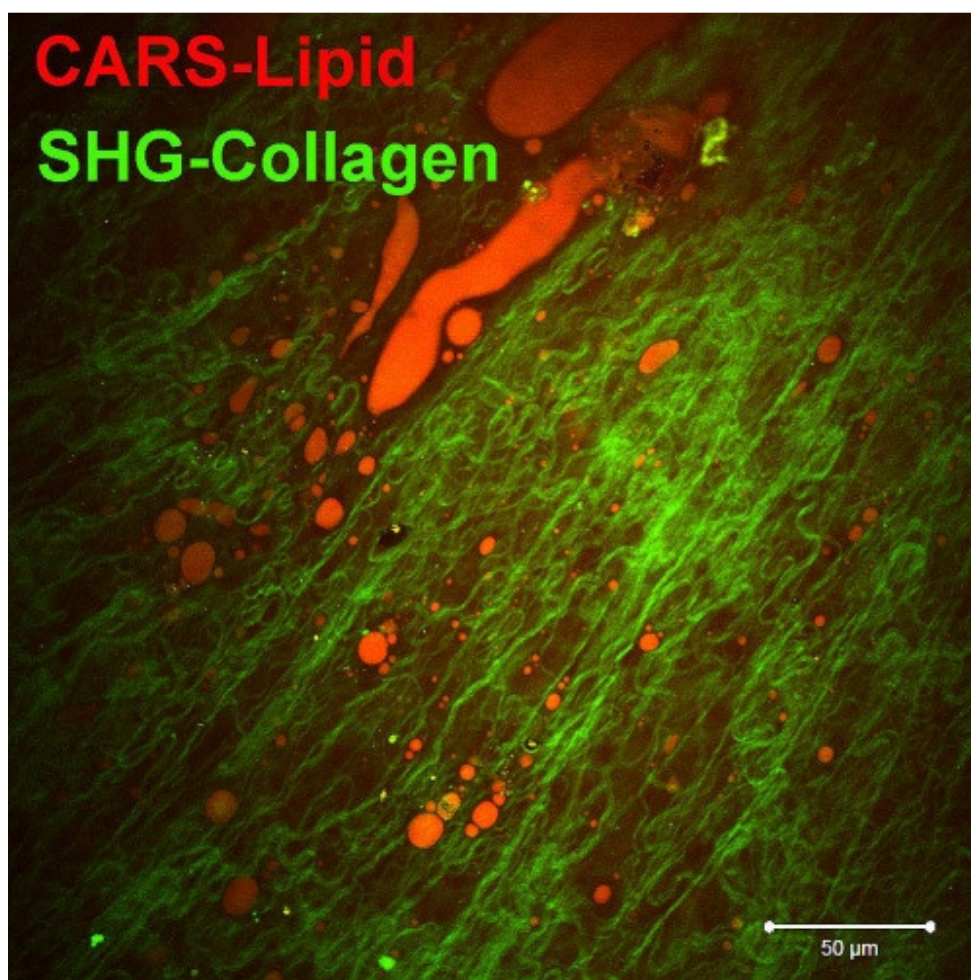
Ez – vagyis az Yb-szállézer teljesítményének egy optikai szálban történő, megfelelő hatásfokú átkonvertálása – lehetővé teszi az automatikusan szinkronizált, két hullámhosszon történő impulzusüzemű működést is. Ez azért rendkívül érdekes, mert a két hullámhossz megfelelő beállításával (ami az üvegmagos szál szerkezetének függvénye) elkészíthetők olyan, optikai szál alapú fényforrások, amelyekkel különböző, tipikusan szerves molekulákat szelektíven lehet gerjeszteni az ún. CARS módszer alkalmazásával (lásd Kolonics és társai, *Biomedical Optics Congress, Miami, OSA, 2012*), aminek köszönhetően pedig az eddig nem világító molekulák láthatóvá válnak. Azaz, festékek használata nélkül is meg lehet határozni a molekulák mikroszkópiás, 3D térbeli elhelyezkedését.

A most említett eredményeket felhasználták már egy ipari kivetelű CARS-mikroszkópiás mérőrendszer megvalósításánál is (lásd „*Új, fluoreszcens jelölésmentes, 3D mikroszkópiás képalkotó eljárás in vivo diagnosztikai vizsgálatokhoz*”, Innotéka, 2012. aug.–szept.). Ez esetben egy hangolható Ti-zafír lézer fényének egy részét átkonvertálták 1 mikron környékére, ezután a jelet egy többfokozatú Yb-erősítővel felerősítették, majd kompresszálták. A legújabb fejlesztési eredmények közül kettőt érdemes kiemelni: az első, hogy Ti-zafír lézer alapú CARS mikroszkópiás rendszerük hangolható fényforrásaként már nemcsak saját gyártmányú lézerüket, hanem más kétfoton mikroszkópia laboratóriumokban szintén széles körben alkalmazott, az USA-beli Spectra-Physics cég által kifejlesztett Mai Tai lézert is használni tudják, vagyis egyszerűen megoldható a már létező kétfoton mikroszkópia laboratóriumokban a CARS mérési módszer adaptációja.



Fluoreszcens jelöléssel ellátott, plazmid DNS-t tartalmazó nanorészecskék (PEIm) bőrben történő penetrációjának in vivo vizsgálata Yb-szállézeres kétfoton mikroszkóppal

Másik fontos új fejlesztési eredményük, ami a CARS méréseket lényegesen egyszerűbbé és pontosabbá teszi, a Carl Zeiss LSM 7 MP mikroszkóphoz kifejlesztett, pneumatikus szűrőcsereelő egységük, amivel pillanatok alatt lehet váltani a különböző mérési beállítások (például zsírok, fehérjék, NO) között anélkül, hogy további költséges detektorokkal kellene bővíteni a rendszert. Többek között szegedi tudományos partnereikkel az idegsejteket borító mielinhüvely szerkezetét vizsgálták a patkányagy fehér- és szürkeállományában, de arra is alkalmasnak tűnik a rendszer, hogy a CARS és az ún. SHG módszer együttes alkalmazásával, festéktelen alkalmazása nélkül pontosan kimutassa az elhízott emberek bőrszerkezetében bekövetkező elváltozásokat. Itt kell megjegyeznünk, hogy a konzorcium munkájában – egyebek között a most említett témával is –, részt vesz még a Semmelweis Egyetem Bőrklínikája is (lásd még: „*Lézeres diagnosztika a bőrgyógyászatban*”, Innotéka, 2013. június, valamint Bognár és társai, *J. Inv. Dermatology*, 2014).

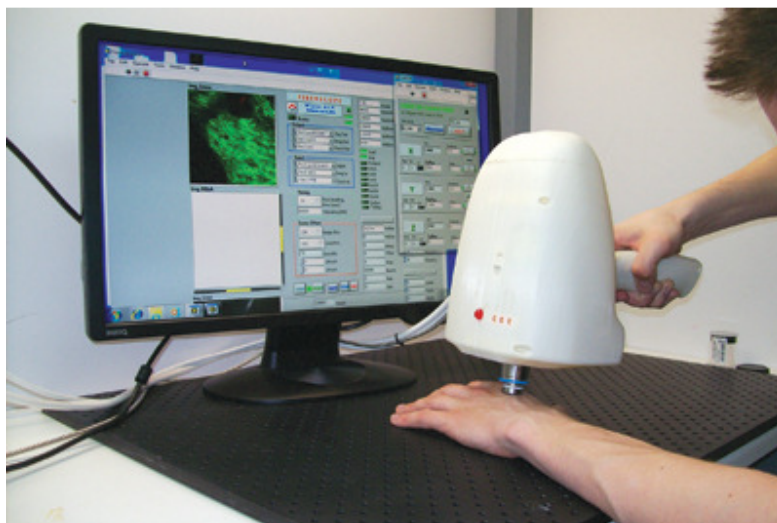


*Az elhízás hatásának vizsgálata a bőr szerkezetére SHG+CARS mikroszkópiával
(SHG: kollagén, CARS: zsírsejtek)*

A Wigner kutatóközpont munkatársai által tökéletesített eljárás újabb alkalmazási lehetősége a gyógyszeripari partnerük, a Genetic Immunity Kft. által behozott terület lehet (lásd Tőke és társai, *Gene Therapy*, 2014). Ebben az esetben nanorészecskék felszívódását, sejtek általi felvételét, majd lebomlását követik *in vivo* 24 órán keresztül. A CARS módszer alkalmazása ezen a területen egy új kitörési pontot jelenthet, mert ha az FDA (US Food and Drug Administration) engedélyezi ezt az új nemlineáris mikroszkópiás technikát, akkor a nanorészecskék működésének *in vivo* humán nyomon követésére, mérésére van egy kiváló, megfelelően nagy felbontással rendelkező mérési technika.

A program résztvevői a műszerek árát és méretét is számottevően csökkentették, ami azért fontos, mert a lézerek széles körű alkalmazásának éppen ez a két tényező szab jelenleg gátat. Különleges megoldásokkal sikerült elérniük, hogy például az R&D Ultrafast Lasers Kft. által gyártott hangolható, femtoszekundumos Ti-zafír lézerek ára felére-harmadára csökkent (lásd Antal és Szipőcs, *Appl. Phys B*, 2012).

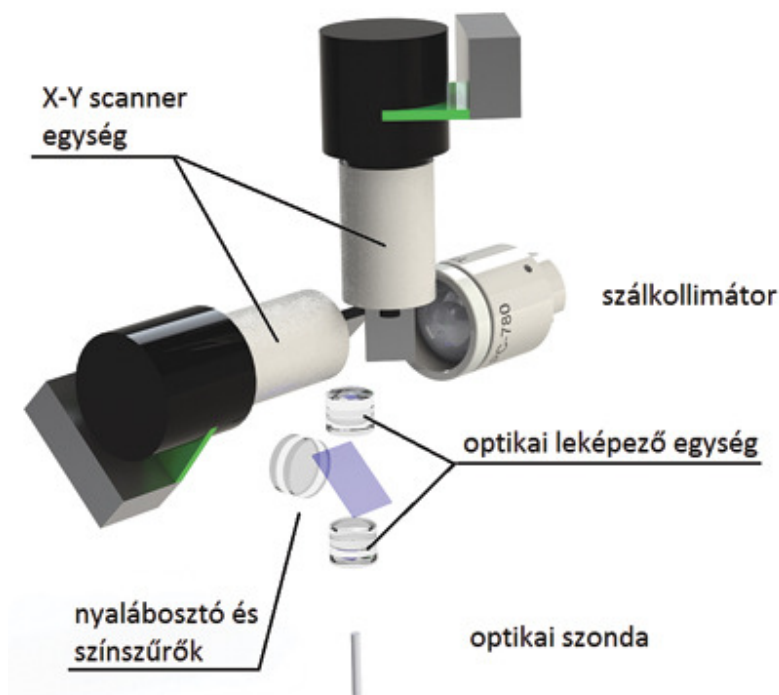
Az MTA Wigner kutatóközpontban **Csákányi Attila** gépészmérnök aktív közreműködésével született meg például egy hajszárító méretű, kézben tartható, orvosi diagnosztikai célokat szolgáló kétfoton mikroszkóp. A fejlesztő szerint ez a módszer akkor lesz életképes, akkor terjed el, ha minden érdekelt kezébe könnyen kezelhető készüléket adnak. Ám nemcsak a könnyű kezelhetőség a fontos, hanem a kis méret is.



FiberScope, a kézben tartott nemlineáris mikroszkóp

A fejlődés itt is lenyűgöző. „Egy-két évtizeddel ezelőtt egy kétfoton mikroszkóp az összes részegységével együtt legalább egy köbméternyi térfogatot töltött ki, mi most ott tartunk, hogy kézbe vehető, könnyű és egyszerűen kezelhető eszközünk van, de már elérhető közelségben van a mobiltelefon méretű berendezés is” – nyilatkozta magazinunknak Csákányi Attila, aki a fejlesztőmunka egyik kihívásának azt tartja, hogy a felhasználó valóban csak azt kapja, amire szüksége van. Korábban a kutatók megvették a nagyméretű, költséges, univerzális lézereket és mikroszkópokat, majd megpróbálták összeilleszteni azokat. A kutatócsoport munkatársai ugyanakkor éppen az integrációra esküsznek – náluk a lézer és a mikroszkóp egy egységet jelent, vagyis ezek alkalmazásorientált, integrált rendszerek. Az integráció, a

költségsökkentés azonban nem eredményezheti a képminőség észrevehető romlását. Időnként szükség van kompromisszumokra, de ez nem veszélyeztetheti a biztonságos működést, nem jelenthet biztonságtechnikai kockázatot.



7 mm hosszú, 1 mm átmérőjű „optikai szondával” ellátott,
mobil telefon méretű kétfoton mikroszkóp terve

A Szipőcs Róbert vezette kutatócsoport által kidolgozott új lézer- és mikroszkópiás képalkotó rendszer esetében a pásztázási sebesség, a felbontás, az érzékenység hasonló a hagyományos kétfoton abszorpciós mikroszkópos eljáráshoz, ugyanakkor olyan *in vivo* vizsgálatokat tudnak elvégezni, amelyeket korábban nem. A fejlesztéseik során arra is figyeltek, hogy viszonylag kis koncentrációban jelen lévő molekulákat is ki tudjanak mutatni – ezt a célt szolgálja az MTA Wigner SZFI-ben jelenleg is fejlesztés alatt álló, úgynevezett SRS (Stimulated Raman Scattering) detektor rendszer is.

A jelenlegi fejlesztési irány az extrém, ami a kiváló felbontást és a mikroszkóp kis méretét is jelenti, nemlineáris mikroszkópok előállítására. Például kísérleti fázisban van egy mindössze egy milliméteres átmérőjű optikai mérőszondával ellátott endoszkópos kétfoton mikroszkóp, amivel az agy akár több milliméteres mélységben is *in vivo* vizsgálható.

A CARS módszerhez kapcsolódó fejlesztéseik *in vivo* patológiás vizsgálatokra is alkalmasak lehetnek: ha egy mintában sikerül meghatározni különböző molekulák háromdimenziós eloszlását, akkor az gyakorlatilag egyenértékű a patológiás festéssel. Csak hogy a jövőben már nem kell kimetszeni a szövetet, hanem akár helyben is vizsgálhatják azt.

A Wigner Fizikai Kutatóközpont a Szegedi Tudományegyetem alvállalkozójaként részese a Nemzeti Agykutató Programnak – festékmentes, az SRS módszeren alapuló mikroszkópiás méréseket fejlesztenek idegtudományi célokra. Ennek előzményeként Szipőcs Róbert és kollégái néhány évvel ezelőtt Szegeden kiépítettek egy kétfoton mikroszkópiás labort, aminek része volt egy, az R&D Ultrafast Lasers Kft. által gyártott rögzített hullámhosszú és egy hangolható femtoszekundumos lézerrendszer is. A kiváló munkakapcsolatnak köszönhetően közösen gondolkoztak el azon, hogy miként lehetne a festékjelölésmentes technikákat az agykutatásban is felhasználni, illetve miként lehetne kisebb koncentrációjú molekulákat is meghatározni, megmérni. „Ezen a téren nagy segítséget jelenthet az idén márciusban meghirdetett Nemzeti Agykutató Program” – mondta Szipőcs Róbert.



MTA Wigner FK Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet • szfki.hu