

Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában

Principles of nonlinear microscopy and application possibilities in dermatology

HALUSZKA DÓRA^{1,2}, LŐRINCZ KENDE DR.¹, CSÁKÁNYI ATTILA², VASS LAJOS²,
KROLOPP ÁDÁM³, KOLONICS ATTILA DR.^{2,3}, SZIPÓCS RÓBERT DR.^{2,3},
KÁRPÁTI SAROLTA DR.¹, WIKONKÁL NORBERT DR.¹

Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika¹, Budapest
Magyar Tudományos Akadémia Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtest-fizikai és
Optikai Intézet², Budapest
R&D Ultrafast Laser Kft.³, Budapest

ÖSSZEFOGLALÁS

A nemlineáris mikroszkópiai módszerek az elmúlt évtizedben egyre elterjedtebbé váltak az alap kutatásokban és a klinikumban egyaránt. A bőrben található kromofórok közel-infravörös hullámhossz tartományban (700 – 1300 nm) történő gerjesztése biztonságos, jelölés nélküli képalkotást tesz lehetővé, nagy térbeli és időbeli felbontás mellett. Publikációnkban elsőként a nemlineáris képalkotó módszereket ismertetjük, majd ezek alkalmazási lehetőségeit mutatjuk be különböző dermatológiai kórképek kapcsán. Emellett munkacsoportunk legfontosabb fejlesztéseiről és eredményeiről számolunk be.

Kulcsszavak:
nemlineáris mikroszkópia - bőr - in vivo
diagnosztika

SUMMARY

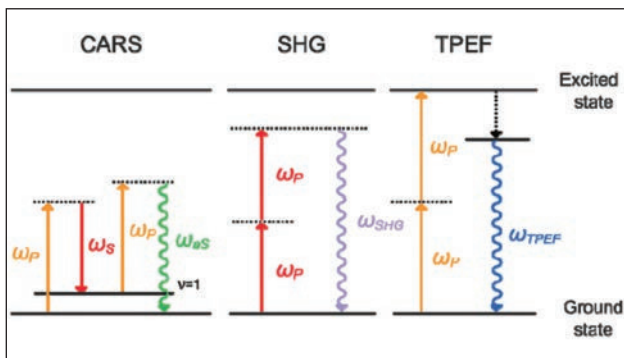
Nonlinear optical imaging techniques have become increasingly popular over the past decade both in the field of basic research and clinical practice. The excitation of skin chromophores in the near infrared spectral range (700-1300 nm) allows safe, label-free imaging with high spatial and temporal resolution. In the first part of our article we discuss the main principles of various nonlinear optical techniques, then we show the application possibilities of them in dermatology. In the second part of our review we report the main investigations and results of our group.

Key words:
nonlinear microscopy - skin - in vivo
diagnostics

A háromdimenziós képalkotó módszerek az utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedtek a diagnosztikában és az alap kutatásban egyaránt. A technika fejlődésének köszönhetően ma már a CT, MRI és ultrahang készülékek is alkalmasak háromdimenziós leképezésre különböző szoftverek segítségével, azonban ezek a módszerek időigényesek lehetnek, és a pácienseket egyes esetekben jelentős mennyiségű ionizáló sugárzás éri (1). Napjainkban a bőrgyógyászati kórképek diagnosztizálására az ultrahang technika (UH) és az egyre népszerűbb *in vivo* konfokális mikroszkópia alkalmazása a legelterjedtebb (2, 3). A módszerek közül az előbbinél korlátot szabhat az alacsony felbontás (50 µm), míg utóbbinál a csekély penetrációs készség és a fototoxicitás (4).

Az 1990-es években egy új képalkotó módszer, a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópia hozott áttörést a háromdimenziós képalkotásban, amely nemlineáris optikai elven működik. A nemlineáris optika az optika azon területe, ami a fény terjedését, nemlineáris kölcsönhatását írja le optikai közegben, ami tipikusan nagy fényintenzitások esetén érzékelhető és mérhető. Ekkor az optikai közeg polarizáltsága nemlineárisan függ a fény elektromos terétől. Impulzusüzemű lézerek esetében a lézer energiája az egyes, viszonylag ritkán egymást követő lézerimpulzusokban koncentráldódik, ezért ezekben a lézerekben gyakran tapasztalunk nemlineáris jelenséget, – gyakran a lézerműködés is ezeken a folyamatokon alapul (5). Számos nemlineáris optikai folyamat alkalmas bioló-

Levelező szerző: Dr. Wikonkál Norbert
e-mail: wikonkal.norbert@med.semmelweis-univ.hu



1. ábra

A nemlineáris optikai jelenségek energiadiagramja

giai minták *in vivo* vizsgálatára, mint például a kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (TPEF), a másodharmonikus keltés (SHG) vagy a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS).

A kétfoton gerjesztés jelenségének vizsgálata egészen az 1930-as évekig nyúlik vissza, amikor *Maria Göppert-Mayer* először tesz említést a kétfoton gerjesztés elméleti alapjairól doktori disszertációjában (6). A jelenséget azonban először *Kaiser* és *Garett* erősítette meg kísérleteiben, 1963-ban (7). Ezután ismét évtizedeknek kellett eltelnie, mire a technika és a fejlesztések eljutottak odáig, hogy megépüljön az első kétfoton fluoreszcencia mikroszkóp. *Denk, Webb és munkatársai* ezzel forradalmasították a háromdimenziós képalkotás módszerét (8). A mérés újszerűsége abban rejlik, hogy a gerjesztő lézer fényforrás csak egy 0,3 μm átmérőjű és 0,1 femtoliter térfogatú fókuszpontban hozza létre a vizsgálni kívánt anyag kétfotonos gerjesztéséhez szükséges energiasűrűséget, ott is tipikusan csak egy 0,1-1 ps-os intervallumon belül, így a lézer átlagteljesítménye továbbra is néhány mW-os tartományban tartható. A képalkotás ezen módszere nem gerjeszti a minta fókuszpontján kívül eső részeit, így a sejtkárosító hatásokat, melyek eddig jelentősen korlátozták a lézer sugárral történő *in vivo* vizsgálatokat, jelentősen csökkenteni tudja. Ahhoz, hogy a különböző nemlineáris folyamatok létrejöhessenek egy nagy intenzitású, impulzus üzemű, hangolható lézer fényforrás szükséges, mely képes a kétfoton gerjesztéshez szükséges foton sűrűséget előállítani (8). A bőrben előforduló természetes kromofórok gerjesztése többnyire 350-550 nm-es hullámhossz tartományba esik, de a kétfoton effektus hullámhossz kétszerezése miatt, a képalkotáshoz egy közel-infravörös (700-1300 nm) tartományban hangolható lézer fényforrás szükséges (9). Emellett a hosszabb hullámhosszak alkalmazása lehetővé teszi a fény mélyebb rétegekbe történő penetrációját, így akár fél mm-es mélységben is lehetséges a képalkotás. A módszer további előnye a festékjelölés-mentes mérés lehetősége. Molekuláris és sejtbiológiai kutatásokban, illetve állatkísérletekben gyakran alkalmazott technika a különböző fluoreszcens indikátorok használata vagy génmódosított, fluoreszcens proteinnel jelölt transzgenikus állatmodellek vizsgálata, melyek segítségével számos szövet és sejtkomponens egyértelműen detektálható, követhető. A módszerek hátránya, hogy a fluoreszcens festékek, fő-

leg DNS-kötő tulajdonságuk révén, potenciálisan toxikus vagy rákkeltő hatásúak lehetnek, ezért *in vivo* alkalmazásuk nem biztonságos (10). A zöld fluoreszcens proteinnel (EGFP – enhanced green fluorescent protein) jelölt transzgenikus állatmodellek felfedezése (11) mérföldkő volt számos gyógyíthatatlan betegség, mint például a daganatos megbetegedések (12) vagy az Alzheimer-kór kutatásában (13), azonban az állatok tenyésztése sok időt vehet igénybe és meglehetősen költséges.

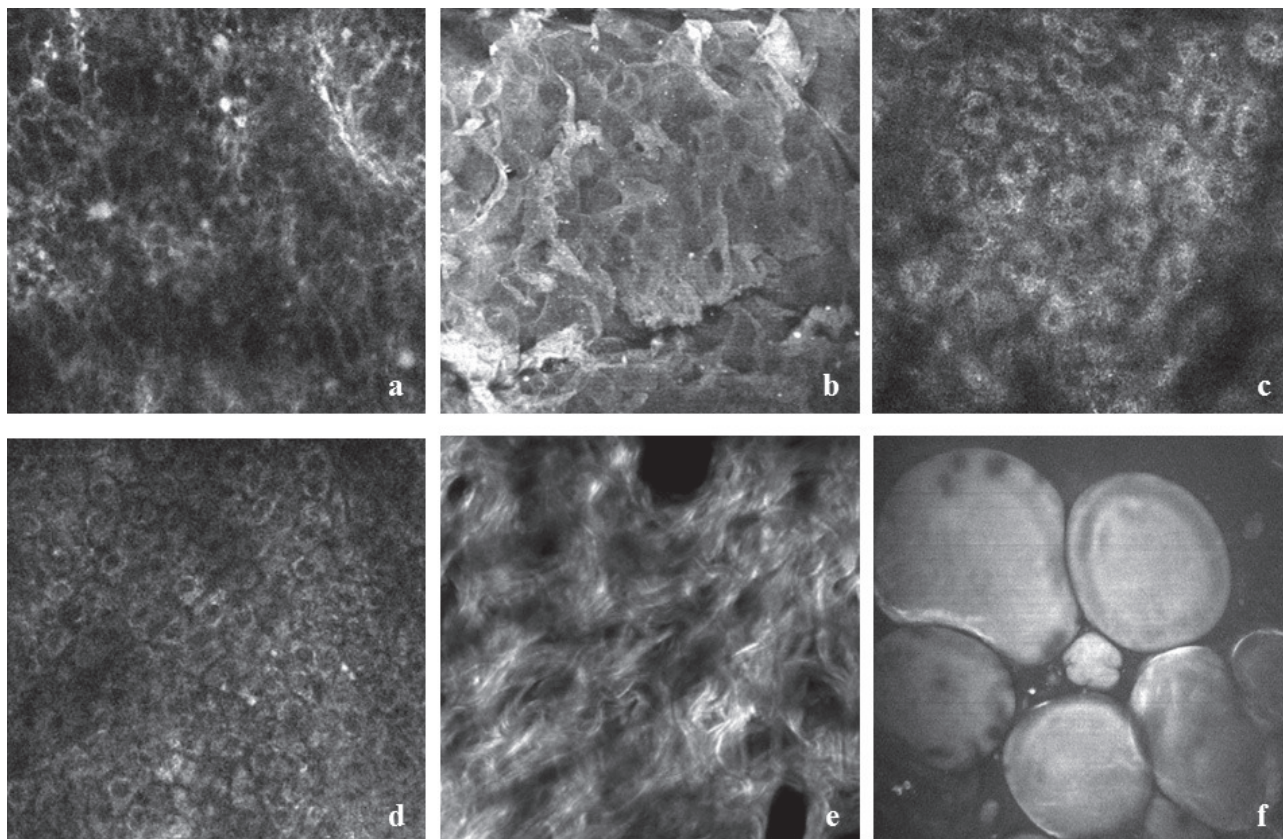
Összességében tehát a nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmasak *in vivo* vizsgálatokra nagy térbeli és időbeli felbontás mellett. A bőrben található természetes kromofórok jelölés nélkül láthatóvá tehetők ezzel a technikával, elhanyagolható fototoxicitás mellett.

A bőr endogén kromofórajának detektálása speciális optikai problémákat vet fel. A képalkotás során figyelembe kell vennünk a vizsgálni kívánt alkotóelem gerjesztési és emissziós optimumát (14), valamint az is meghatározó, hogy az azonosítandó kromofórok milyen mélységben helyezkednek el. A kétfoton gerjesztés során a gerjesztett molekulában egyszerre két foton abszorbeálódik, így energiájuk összeadódik (1. ábra – TPEF). Ezzel a módszerrel a keratin, melanin, NADH és az elasztin (2a. ábra) detektálható. A bőr legkülső rétegét alkotó stratum corneum fő kromofóra a keratin, mely jellemzően a nagy méretű, lapos, hatszög alakú szarusejtekben található, és gerjesztési optimuma az alacsonyabb 720-740 nm-es hullámhosszak mentén helyezkedik el (2b. ábra) (14). Az epidermisz sejtjei hasonló gerjesztési hullámhosszak mellett detektálhatók, itt azonban a mitokondriumban található NADH és NAD(P)H a fő kromofór, így a citoplazma fluoreszkál míg a sejtmagok sötét pontként jelennek meg. Körülbelül 20 μm mélységben detektálhatók a stratum granulosum ovális sejtjei, nagy sejt közötti térrel (2c. ábra). A stratum spinosum és stratum basale sejtjei már kisebbek, szögletes alakúak, sűrűbben helyezkednek el és szorosan illeszkednek (2d. ábra) (14). Az epidermisz sejtjeinek kétfoton karakterisztikája, mint például a nagyság és az alak, fontos információként szolgálhatnak különböző tumorok, gyulladásos betegségek diagnosztikájában, valamint *in vivo* farmakológiai vizsgálatokban (15, 16). Az utóbbi években számos publikáció jelent meg a melanóma és a nem pigmentált malignus bőrtumorok kétfoton mikroszkópiás vizsgálatairól (17-19). A basalioma kétfoton karakterisztikájára jellemző, hogy a tumorsejtek nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeznek, kerítéslécszerű ún. paliszád elrendeződésűek. A tumorban a hámsejtek szabálytalan alakúakká válnak és random módon rendeződnek el, a dermiszben pedig erős autofluoreszcenciát mutató daganatos sejtíjszkek láthatók, továbbá a kollagén szerkezet károsodott a tumor területén (20). Melanómák klinikai vizsgálata során *Dimitrow és munkatársai* a következő hat morfológiai kritériumot határozták meg: 1; melanocita infiltráció figyelhető meg a felső epidermális rétegekben 2; jelentős a sejtek közötti távolság 3; a sejtek pleomorf, szabálytalan alakúak 4; sejtfragmensek jelennek meg a stratum spinosumban 5; a keratinocita sejthatárok rosszul definiáltak 6; dentritikus sejtek azonosíthatók (21). A bőrtumorok nem invazív vizsgálata műté-

tek tervezésénél is segíthet a pontos tumorhatárok feltérképezésében, valamint a gyógyulási folyamatok és az esetleges recidíva képződés követésében.

A következő nemlineáris képalkotó módszer a másodharmonikus keltés, mely bizonyos, nem szimmetrikus szerkezetű molekulák polarizációja során jön létre, ami a gerjesztő lézertény egy részének frekvenciakétszerezését eredményezi (1. ábra – SHG). A másodharmonikus keltés (SHG) módszere a hosszú élettartalmú proteinek, mint például a kollagén (2e. ábra), mikrotubulusok vagy az izom miozin fehérjéinek képalkotására alkalmas. Az első biológiai mintán történő kísérleteket Freund hajtotta végre 1986-ban, amikor a patkányfarokban található kollagén rostok szerkezetét és orientációját vizsgálta (22). A dermiszben található kollagén bőrünk rugalmasságáért felelős struktúrprotein, melynek mennyisége az idő előrehaladtával csökken, így nem csoda, hogy számos publikáció foglalkozik a bőr öregedésének *in vivo* vizsgálatával (23, 24), illetve potenciális bőrfiatalító hatóanyagok tesztelésével (25). Azonban ne felejtjük el, hogy a dermális kollagén szerkezet a bőrtumorok vizsgálatánál is fontos paraméter lehet, hiszen a bőr daganatának közös jellemzője és a tumor invázió kulcsfontosságú mozzanata az extracelluláris mátrix fehérjék, például az I. típusú kollagén degradációja, a mátrix metalloproteáz (MMP) enzim család aktiválásán keresztül (26, 27). Megfelelő hullámhossz és szűrők kiválasztásával az epidermisz sejtei és a dermisz kollagén szerkezete egyszerre láthatóvá tehető, így a tumorok nagy pontossággal azonosíthatók (20).

A következő bemutatandó nemlineáris optikai módszer a koherens anti-Stokes Raman szórás vagy rövidebb nevén CARS. Az angolul „autók – CARS” betűszónak látszólag semmi köze a gépkocsikhoz, pedig a technika története a Ford Motor gyár kutatólaboratóriumából indult az 1960-as években, amikor P. D. Maker és R. W. Terhune rubin lézertel végeztek anyagvizsgálatokat, de ekkor még csak „three-wave mixing”-nek nevezték a módszert (28). Tíz évvel később 1974-ben Begley és munkatársai véglegesítették a technika pontos nevét (29). A módszer két, különböző hullámhosszú lézernyaláb egy pontba fókuszálásával állít elő az adott molekulára, szövetre jellemző optikai jelet (1. ábra – CARS). A CARS mikroszkópiával a molekulák tulajdonképpen, saját rezgési spektrumuk alapján azonosíthatók. Ez a képalkotási eljárás azért érdekes, mert úgy lehet háromdimenziós képet alkotni – hasonlóan az eddig ismertett módszerekhez –, hogy a vizsgálandó minta egyes összetevőit nem kell festékkjelöléssel ellátni. Ráadásul ennél a módszernél arra sincs szükség, hogy azok természetes fluoreszcenciával rendelkezzenek (30). A módszer segítségével számos biológiai mintázat azonosítható, mint például a lipid kettős rétegek (31), zsírsejtek (32), víz (33), DNS (34) vagy az idegsejteket burkoló myelinhüvely (35). A bőr vizsgálata során a CARS mikroszkópia alkalmas lehet az intracelluláris lipidek, vagy a szubkutisban található zsírsejtek (2f. ábra) azonosítására, melyek fontos információként szolgálhatnak a bőr barrier funkciójáról, vagy metabolikus állapotáról (36, 37). Az első *in vivo* CARS vizsgálatokat König és munkatársai hajtották végre egészséges önkente-



2. ábra

Ex vivo humán bőr keresztmetszete a különböző nemlineáris optikai módszerek alkalmazásával



3. ábra

„FiberScope”, a kézben tartott nemlineáris mikroszkópok, valamint pikkelysömörrel érintett betegeken (38). Az idegsejteket burkoló myelinhüvely vizsgálata a ma még gyógyíthatatlan sclerosis multiplex kutatásában jelentős szerepet játszik. CARS módszerrel a lipidekben gazdag myelin *in vivo* detektálható, így megtudhatjuk, hogy milyen folyamatok vezethetnek az idegsejteket támogató neuroglia sejtek pusztulásához és a myelinburok sérüléséhez (39).

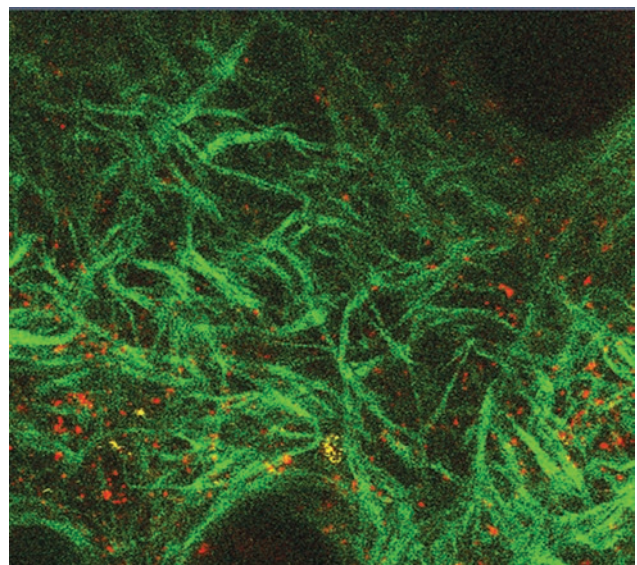
Klinikánk 2009 óta vizsgálja a nemlineáris mikroszkópiai módszerek alkalmazási lehetőségét a dermatológiában. Emellett több hazai kutatócsoporttal együttműködve végzünk fejlesztéseket, melynek célja egy kisméretű, kevésbé költséges, de teljes értékű lézerpasztázó mikroszkóp megtervezése, melyben fényforrásként egy Yb-szállézert használunk (3. ábra). A jelenleg piacon lévő, a bőr *in vivo* multifoton mikroszkópiás vizsgálatát lehetővé tevő egyetlen klinikai készülék, a DermaInspect berendezés (Jenlab GmbH, Jena, Germany), hagyományos, szilárdtest lézeres technológián alapul (40). Ennek következtében a készülék rendkívül költséges, nagy helyigényű, és a gerjesztő lézernyaláb bőrmintára juttatása, illetve a keltett optika jel detektálása is rendkívül nehézkes, mivel a fény egy bonyolult optikai tükrörendszeren keresztül jut el a mintáig. A munkacsoport által fejlesztett „FiberScope” fényforrása egy impulzusüzemű, femtoszekundumos Yb-szállézer (41), melynek költségei lényegesen alacsonyabbak a szilárdtest lézerekéhez képest, kis helyigényű, de ugyanakkor stabil működésű, így a mindennapi diagnosztikában egyszerűen használható.

Az új készülék fejlesztésének első eleme a szálintegrált rendszer biztonságtechnikai problémáinak megoldása, illetve diabéteszes állatmodellek, valamint UV-indukálta dagados elváltozások preklinikai vizsgálata. A fejlesztés legidőigényesebb része a biztonságtechnika, hiszen alapvető követelmény, hogy a lézerrésszel történő vizsgálat ne okozzon maradandó károsodást a bőrben. Elsőként tehát a különböző károsító tényezők detektálására fókuszáltunk. Lézerrel történő munka során a DNS három fotonos abszorpciója következtében, az UVB sugárzás által okozott károsodásokhoz hasonlóan, ciklobután pirimidin dimerek képződhetnek, melyek elégtelen reparáció esetén kiinduló elemei lehetnek egy esetleges mutációnak a hámsejtekben (42). A ciklobután pirimidin dimereket immunfluoreszcens jelölési technikával azonosítottuk, így meg tudtuk állapítani, hogy melyek azok

a lézer paraméterek, melyekkel jó minőségű felvételeket lehet készíteni, de nem okozunk károsodást a sejtekben (43). A fototoxikus folyamatok mellett, a termikus károsodás lehetőségét is szem előtt kell tartani, hiszen az alkalmazott, hosszabb hullámhosszú infravörös fény egy-fotonos abszorpciója jelentős hőmérséklet emelkedést okozhat a mintában, és károsíthatja a fehérjéket, illetve a DNS-t (44). Az előző vizsgálathoz hasonlóan szintén az optimális lézer paraméterek meghatározása volt a cél.

A biztonságtechnikai mérések elvégzése után már állatmodelleken végeztük vizsgálatainkat *in vivo*. A leptin deficiens diabéteszes egér modellek segítségével a dermális kollagén illetve a szubkután adipocyták morfológiai változásait tudtuk nyomon követni *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel. Munkánk során sikerült igazolnunk, hogy a nemlineáris képalkotó módszerek alkalmasak lehetnek a diabéteszhez társuló dermatológiai kórképek korai felismerésében (37). Az UV-indukált karcinómák vizsgálatát *ex vivo* basalioma mintákon végeztük, és az irodalomban már definiált morfológiai kritériumok azonosítására koncentráltunk (20). Vizsgálatunk során igazoltuk, hogy a kétfoton abszorpció (TPEF) és a másodharmónikus keltés (SHG) megfelelő módszer lehet a basaliomák diagnosztikájában, hiszen egy időben lehetséges a tumorsejtek és a tumor területén degradálódott kollagén leképezése. A bazálsejtes karcinóma kétfoton karakterisztikájára jellemző elváltozásokat az esetek többségében sikeresen azonosítottuk.

A fejlesztések során utolsóként a szállézerrel működő „FiberScope” tesztméréseit végezzük. Az 1030 nm hullámhosszú fény a bőr mélyebb rétegeibe is képes penetrálni, illetve biztonságtechnikai szempontból is kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik. Első eredményeink azt mutatták, hogy szállézerrel biztonságos lézerteljesítmények használata mellett is megfelelő minőségű felvételeket készíthetők *in vivo* egér modellen (4. ábra).



4. ábra

In vivo egérfül kollagén szerkezete (zöld) és Alexa 546 festékkel jelölt nanorészecskék (piros) penetrációja, „FiberScope”-pal mérve

Összefoglalás

Az utóbbi évtizedekben a különböző optikai képalkotó módszerek gyors fejlődésének lehetünk szemtanúi. Számos módszer került kidolgozásra, mely lehetővé teszi a bőr *in vivo* vizsgálatát. A nemlineáris optikai módszerek alapvetően új metodikai lehetőségeket, ezáltal új eredményeket hoztak a dermatológia területén. Használatukkal gyakorlatilag a bőr teljes keresztmetszete láthatóvá tehető, ezzel számos komponens detektálható, amik segíthetnek a különböző daganatok, gyulladásszerű megbetegedések diagnosztizálásában, illetve információként szolgálhatnak a bőr metabolikus állapotáról, vagy barrier funkciójáról. Munkánk eredménye olyan kisméretű, hordozható képalakító eszköz, mely a bőrgyógyászok mindennapi munkáját segítheti a gyorsabb és pontosabb diagnózis felállításában. Reményeink szerint fejlesztéseink hamarosan eljutnak abba a szakaszba, hogy az eszköz *in vivo* humán mérésekre alkalmas legyen.

Köszönetnyilvánítás

A cikkben bemutatott eredményeket a Miniszterelnökséggel megkötött TECH-09-A2-2009-0134 számú szerződés támogatásával értük el.

IRODALOM

1. *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health: Radiation Emissions from Computed Tomography: A Review of the Risk of Cancer and Guidelines.* in *CADTH Rapid Response Reports.* (2014).
2. *Rohrbach D. J., Muffoletto D., Huihui J. és mtsai.: Preoperative mapping of nonmelanoma skin cancer using spatial frequency domain and ultrasound imaging.* *Acad Radiol.* (2014) *21*, 263-70.
3. *Ulrich M., Lange-Asschenfeldt S.: In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application.* *J Biomed Opt.* (2013) *18*, 061212.
4. *Masters B. R., So P. T.: Multi-photon Excitation Microscopy and Confocal Microscopy Imaging of In Vivo Human Skin: A Comparison.* *Microsc Microanal.* (1999) *5*, 282-289.
5. *Diels J. C., Wolfgang R.: Ultrashort Laser Pulse Phenomena,* Burlington: Academic Press; (2006) 123-125
6. *Göppert-Mayer M.: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.* *Annals of Physics,* (1931) *9*, 273-95.
7. *Kaiser W., Garrett C. G.: Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺.* *Physical Review Letters,* (1961) *7*, 229-231.
8. *Denk W., Strickler J. H., Webb W. W.: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.* *Science,* (1990) *248*, 73-6.
9. *Hanson K. M., Bardeen C. J.: Application of nonlinear optical microscopy for imaging skin.* *Photochem Photobiol.* (2009) *85*, 33-44.
10. *Zink D., Sadoni N., Stelzer E.: Visualizing chromatin and chromosomes in living cells.* *Methods,* (2003) *29*, 42-50.
11. *Iwane A. H., Funatsu T., Harada Y. és mtsai.: Single molecular assay of individual ATP turnover by a myosin-GFP fusion protein expressed in vitro.* *FEBS Lett.* (1997) *407*, 235-8.
12. *Kouros-Mehr H., Bechis S. K., Slorach E. M. és mtsai.: GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model.* *Cancer Cell.* (2008) *13*, 141-52.
13. *Götz J., Schonrock N., Vissel B. és mtsai.: Alzheimer's disease selective vulnerability and modeling in transgenic mice.* *J Alzheimers Dis.* (2009) *18*, 243-51.
14. *Breunig H. G., Studier H., König K.: Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo.* *Opt Express.* (2010) *18*, 7857-71.
15. *Masters B. R., So P. T., Gratton E.: Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin.* *Biophys J.* (1997) *72*, 2405-12.
16. *Kolonics A., Csiszovszki Z., Tőke E. R. és mtsai.: In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy.* *Exp Dermatol.* (2014) *23*, 596-605.
17. *De Giorgi V., Massi D., Sestini S.: Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences.* *J Eur Acad Dermatol Venereol.* (2009) *23*, 314-6.
18. *Balu M., Kelly K. M., Zachary C. B.: Distinguishing between benign and malignant melanocytic nevi by in vivo multiphoton microscopy.* *Cancer Res.* (2014) *74*, 2688-97.
19. *Paoli J., Smedh M., Wennberg A. M. és mtsai.: Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics.* *J Invest Dermatol.* (2008) *128*, 1248-55.
20. *Seidenari S., Arginelli F., Bassoli S. és mtsai.: Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography.* *Skin Res Technol.* (2013) *19*, 297-304.
21. *Dimitrow E., Ziemer M., Koehler M. J. és mtsai.: Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma.* *J Invest Dermatol.* (2009) *129*, 1752-8.
22. *Freund I., Deutsch M., Sprecher A.: Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon.* *Biophys J.* (1986) *50*, 693-712.
23. *Koehler M. J., Hahn S., Preller A. és mtsai.: Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network.* *Exp Dermatol.* (2008) *17*, 519-23.
24. *Sugata K., Osanai O., Sano T. és mtsai.: Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy.* *Skin Res Technol.* (2011) *17*, 1-3.
25. *El Madani H. A., Tancrede-Bohin E., Bensussan A. és mtsai.: In vivo multiphoton imaging of human skin: assessment of topical corticosteroid-induced epidermis atrophy and depigmentation.* *J Biomed Opt.* (2012) *17*, 026009.
26. *Hompland T., Erikson A., Lindgren M. és mtsai.: Second-harmonic generation in collagen as a potential cancer diagnostic parameter.* *J Biomed Opt.* (2008) *13*, 054050.
27. *Thrasivoulou C., Virich G., Krenács T. és mtsai.: Optical delineation of human malignant melanoma using second harmonic imaging of collagen.* *Biomed Opt Express.* (2011) *2*, 1282-95.
28. *Maker P. D., Terhune R. W.: Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength.* *Physical Review Letters.* (1965) *137*, 801-818.
29. *Begley R. F., Byer R. L.: Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy.* *Appl. Phys. Lett.* (1974) *25*, 387-390.
30. *Cheng J.X.: Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.* *Appl Spectrosc.* (2007) *61*, 197-208.
31. *Potma E. O., Xie X. S.: Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.* *Chemphyschem.* (2005) *6*, 77-9.
32. *Nan X., Cheng J. X., Xie X. S.: Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.* *J Lipid Res.* (2003) *44*, 2202-8.
33. *Zimmerley M., Lin C. Y., Oertel D. C.: Quantitative detection of chemical compounds in human hair with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.* *J Biomed Opt.* (2009) *14*, 044019.
34. *Zhang X., Roeffaers M. B., Basu S. és mtsai.: Label-free live-cell imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy.* *Chemphyschem.* (2012) *13*, 1054-9.
35. *Kennedy A. P., Sutcliffe J., Cheng J. X.: Molecular composition and orientation in myelin figures characterized by coherent anti-stokes Raman scattering microscopy.* *Langmuir.* (2005) *21*, 6478-86.
36. *Bognar P., Németh A., Mayer B. és mtsai.: Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice.* *J Invest Dermatol.* (2014) *134*, 105-11.

37. *Haluszka D., Szipocs R., Wikonkal N. M., Kolonics A.*: Characterization of obesity in murine skin in vivo by CARS and SHG microscopy using a cost efficient, fiber laser based wavelength extension unit, in 6th EPS-QEOD Europhoton Conference. Neuchatel, Switzerland (2014).
38. *König K., Breunig H. G., Bückle R. és mtsai.*: Optical skin biopsies by clinical CARS and multiphoton fluorescence/SHG tomography. *Laser Physics Letters*. (2011) *8*, 465-468.
39. *Shi Y., Zhang D., Huff T. B. és mtsai.*: Longitudinal in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of demyelination and remyelination in injured spinal cord. *J Biomed Opt.* (2011) *16*, 106012.
40. *König K., Riemann I.*: High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt.* (2003) *8*, 432-9.
41. *Fekete J., Cserteg A., Szipocs R.*: All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator. *Laser Physics Letters*. (2009) *6*, 49-53.
42. *König K., Becker T. W., Fischer P. és mtsai.*: Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes. *Opt Lett.* (1999) *24*, 113-5.
43. *Haluszka D., Lőrincz K., Bánvölgyi A., Gyöngyösi N., Szipocs R., Kárpáti S., Wikonkal N. M.*: In vivo assessment of potential carcinogenicity of multi-photon microscopy as the function of wavelength in the near-infrared range, in 44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Copenhagen, Denmark *J Invest Dermatol.* (2014) *134*, S86
44. *Fu Y., Wang H., Shi R. és mtsai.*: Characterization of photo-damage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express*. (2006) *14*, 3942-51.

Érkezett: 2015. 01. 15.

Közlésre elfogadva: 2015. 01. 30.