

AZ *IN VIVO* KÉTFOTON MIKROSKÓPIÁBAN HASZNÁLATOS, KÖZELI INFRAVÖRÖS TARTOMÁNYBAN MŰKÖDŐ FEMTOSZEKUNDUMOS LÉZEREK BIZTONSÁGTECHNIKAI VIZSGÁLATA

Haluszka Dóra^{1,2}, Lőrincz Kende¹, Wikonkál Norbert¹, Szipócs Róbert^{2,3}

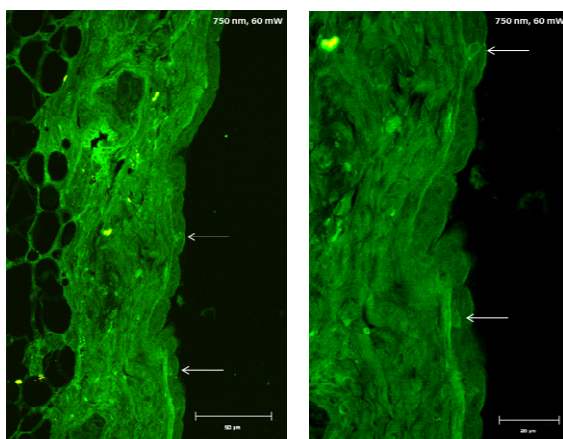
¹ *Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, 1085 Budapest, Mária u. 41.*

² *MTA Wigner FK, Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet, 1121 Budapest, Konkoly-Thege M. út 29-33.*

³ *R&D Ultrafast Lasers Kft, 1121 Budapest, Konkoly-Thege M. út 29-33.*

Az *in vivo* nemlineáris mikroszkópiai módszerek az utóbbi évtizedben egyre elterjedtebbé váltak az élettudományok területén [1-3], köszönhetően számos előnyös tulajdonságuknak. A képalkotáshoz szükséges nagy intenzitású lézer fényforrás azonban nem megfelelő beállítások mellett károsíthatja a vizsgált mintát, ez lehet hő- [4], mechanikai [5] és fotokémiai [6] károsító hatás. A fotokémiai károsodás az intracelluláris koromfórok többfotonos gerjesztésének következtében alakul ki. Sejtes rendszerekben ez a károsodás teljesen hasonló az UVB besugárzás által okozottakkal [7]. A DNS abszorpciós spektruma 245-290 nm (260 nm-es maximummal) nagyjából a napfény UVC és UVB tartományát foglalja magában. Az UV-fotonok a DNS-ben elnyelődve ciklobután-pirimidin-diméereket (CPD) és egyéb fotoproduktumokat indukálnak [8]. Az említett DNS-léziók a nukleotid excíziós reparáció (NER) révén javíthatóak ki, azonban nem megfelelő reparáció esetén, a tovább folyó replikáció hatására DNS-hurkok, majd egyszálú DNS-gap-ek keletkeznek a dimerek helyén, amely a DNS kettős hélix torzulásához és a polimeráció blokkolásához vezethet [9].

A nemlineáris folyamatok alkalmazása közben tehát különböző biztonságtechnikai szempontokat kell figyelembe vennünk. A munkánk során alkalmazott AF, SHG és CARS módszerek eltérő optikai problémákat vetnek fel. Diagnosztikai szempontból legfontosabb feladat a megfelelő felvételek készítése. A bőr vizsgálata közben figyelembe kell vennünk az endogén kromofórok két-foton karakterisztikáját. A kollagén méréséhez például nagyobb teljesítményre és más gerjesztési hullámhosszra van szükségünk, mint például az epidermis sejteiben, valamint az is meghatározó, hogy az azonosítandó kromofórok milyen mélységben helyezkednek el.



1. ábra

Célunk, hogy olyan beállításokkal sikerüljön jó minőségű felvételeket készíteni, amik nem okoznak károsodást a sejtekben, illetve egy olyan gerjesztési hullámhossz kiválasztása, amivel egyszerre több kromofór is detektálható. Munkánk során különböző hullámhosszú és teljesítményű lézer beállítások mellett sugaraztunk be frissen kimetszett egérbőrt. A mintát utána formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztunk és immunfluoreszcens jelölési technikával detektáltuk a ciklobután dimereket.

Eredményeink kiértékelése során CPD-pozitív sejteket rövidebb hullámhosszak és viszonylag nagyobb teljesítmények mellett detektáltunk (1 ábra, nyílakkal jelölve), melynek mennyisége és intenzitása a pozitív kontrollhoz képest elhanyagolható volt. A hosszabb hullámhosszak használata méréseink szerint nem okozott DNS károsodást.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatták, hogy a megfelelő beállítások mellett a nemlineáris képalkotó módszerek nem okoznak károsodást a bőrben, így a jövőben biztonságosan alkalmazhatóak *in vivo* diagnosztikai célokra.

A most bemutatott munkát a NFÜ TECH-09-A2-2009-0134 számú szerződése és az R&D Ultrafast Lasers Kft. támogatta.

Hivatkozások

- [1] P. Bognár, D. Haluszka, N. Wikonkál, A. Kolonics, R. Szipőcs and S. Kárpáti, Reduced Inflammatory Threshold Indicates Skin Barrier Defect in Transglutaminase 3 Knockout Mice, *J. Investigative Dermatology* **134**, 105-111 (2014)
- [2] A. Kolonics, Zs. Csiszovszki, E.R. Tőke, O. Lőrincz, D. Haluszka and R. Szipőcs, In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy, *Experimental Dermatology* **23**, 596-605 (2014)
- [3] E.R. Toke, O. Lorincz, Z. Csiszovszki, E. Somogyi, G. Felföldi, L. Molnár, R. Szipőcs, A. Kolonics, B. Malissen, F. Lori, J. Trocio, N. Bakare, F. Horkay, N. Romani, C.H. Tripp, P. Stoitzner, J. Lisziewicz, Exploitation of Langerhans cells for in vivo DNA vaccine delivery into the lymph nodes, *Gene Therapy* **21**, 566-574 (2014)
- [4] B.R. Masters, P.T. So, C. Buehler, N. Barry, J.D. Sutin, W.W. Mantulin and E. Gratton, Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging. *J Biomed Opt*, **9** (2004).
- [5] Y. Fu, H. Wang, R. Chi and JX Cheng, Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express*, **14** (2006).
- [6] F. Fischer, B. Volmer, S. Puschmann, R. Greinert, W. Breitbart, J. Kiefer and R. Wepf, Skin imaged by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications. *Biophotonics and New Therapy Frontiers*, (2006).
- [7] K. Konig, P.T. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg and E. Gratton, Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J Microsc*, **183** (1996).
- [8] F.R. de Gruij, and H. Rebel, Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci. *Photochem Photobiol*, **84** (2008)
- [9] H.J. Ruven, R.J. Berg, C.M. Seelem, J.A. Dekkers, P.H. Lohman, L.H. Mullenders and A.A. van Zeeland, Ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers are selectively removed from transcriptionally active genes in the epidermis of the hairless mouse. *Cancer Res*, **53** (1993)