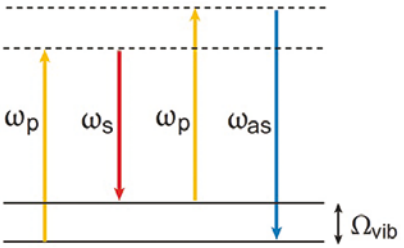
Új, fluoreszcens jelölés mentes, 3D mikroszkópiás képalkotó eljárás in vivo diagnosztikai vizsgálatokhoz

Szerző: Szegedi Imre

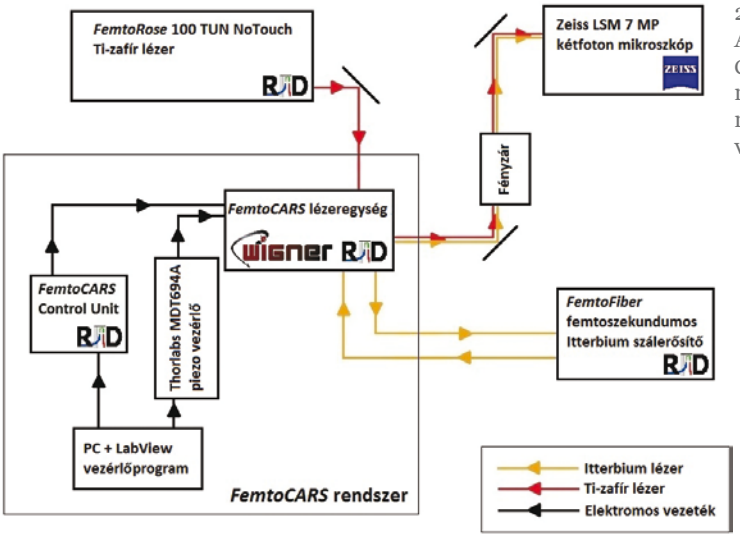
Az anyagszerkezeti és biológiai mintákon végzett vizsgálatoknál egyaránt új lehetőségeket kínál az a 3D mikroszkópiás képalkotó rendszer, amelyet Szipőcs Róbert, a 2011 novemberében Akadémiai Szabadalmi Nívódíjjal elismert villamosmérnök, fizikus vezetésével hazai kutatók dolgoztak ki.

Szipőcs Róbert, az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtestfizikai és Optikai Intézetének (SZFI) tudományos főmunkatársa szerint a CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) módszeren alapuló képalkotási eljárás azért érdekes a már hagyományosnak tekinthető kétfoton abszorpciós fluoreszcencián alapuló pásztázó lézermikroszkópiás vizsgálatokhoz képest, mert ezzel úgy lehet háromdimenziós képet alkotni, hogy közben a vizsgálandó minta egyes összetevőit nem kell specifikus festékjelölésekkel ellátni, illetve arra sincs szükség, hogy azok természetes fluoreszcenciával rendelkezzenek. (A kétfotonos rendszernél két, gyakorlatilag egy időben beeső foton energiája egyesül és hozza létre a fluoreszcens indikátor gerjesztését egy körülbelül egy köbmikrométer térfogatú térrészben.)

Az új módszerrel az egyes molekulákra jellemző saját rezgési spektrum segítségével alkothatunk háromdimenziós képeket. Hogyan? Úgy, hogy először felveszik a vizsgálandó molekula saját, infravörös tartományra vonatkozó abszorpciós vagy Raman-spektrumát. Ennek ismeretében két szinkronizált kimenettel rendelkező ultrarövid impulzusú lézerrendszer hullámhosszát – az egyik célszerűen az 1030 nanométeren működő itterbium szállézeres erősítőrendszer, a másik egy a hangolható titán-zafír lézer – úgy állítják be, hogy e lézerek különbségi (azaz lebegési) frekvenciája egy adott molekuláris rezgési állapothoz tartozó energiának feleljen meg *(1. ábra)*. A két lézersugárnak a mikroszkópban lévő mintára való fókuszálásával – ügyelve arra, hogy térben nagyon pontosan beállítsák a lézerek párhuzamos futását – lemérhetjük egy adott, tipikusan bonyolult szerves molekula relatív koncentrációjának változását a 3D térben. Fontos az egyes lézerimpulzusok relatív késleltetésének pontos beállítása is, mert ha nem egyszerre ér oda a két fényimpulzus, akkor nem keltenek jelet, nem kapunk értékelhető képet a mintáról. A kutatók e célból a két lézer működésének szinkronizálásához egy speciális, FemtoCARS-nak elnevezett egységet fejlesztettek ki – ez a titán-zafír lézer fényének egy részéből, egy megfelelően megtervezett fotonikus kristály szerkezetű szálban, 1030 nanométeren, megfelelő erősségű optikai szinkronjelet állít elő egy itterbium szállézeres erősítőrendszer számára, illetve elvégzi a lézerimpulzusok térbeli és időbeli átfedésének pontos beállítását, illetve a fényerő, a polarizációs állapotok megfelelő szabályozását *(2. ábra* és *1. kép)*.



1. ábra. A CARS folyamat energiadiagramja: ω_p – Ti-zafír lézer frekvenciája (pumpa), ω_S – Yb-szálerősítő frekvenciája (Stokes), ω_{as} – a CARS folyamatban keletkezett fény frekvenciája, Ω_{vib} – a vizsgált molekula rezgési frekvenciája



2. ábra. A teljes CARS mérőrendszer rendszervázlata

1. kép. Az MTA Wigner FK SZFI és az R&D Ultrafast Lasers Kft. által közösen kifejlesztett FemtoCARS egység

A kutatás első fázisában e módszerrel először szén nanocsöveket vizsgáltak, ezzel állították be a lézeres mérőrendszert, majd ezután kezdődött el a biológiai minták, például zsírszövetek mérése, elemzése (pl. a *3. ábrán* látható, CARS módszerrel zsírszövetről készített 3D kép). Szipőcs Róbert szerint a CARS módszer segítségével egyebek között a bőr ekcémás vagy pikkelysömörös elváltozását diagnosztizálhatják, monitorozhatják a kezelések során. A telített vagy telítetlen zsírsavakon kívül más típusú szerves molekulák, például különböző gyógyszerjelöltek *in vivo* monitorozására is alkalmas lehet az új eljárás.

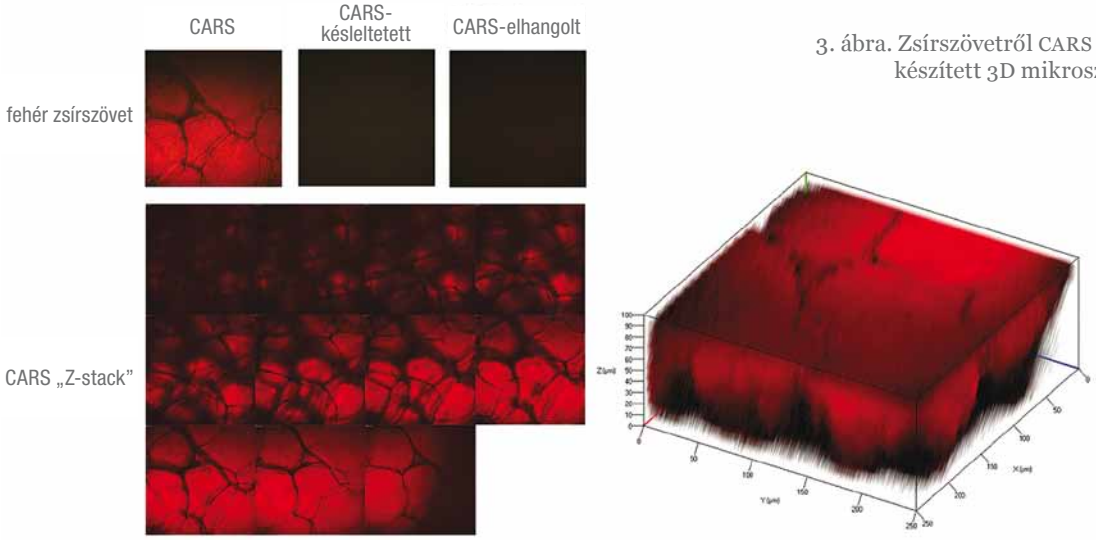
Minden szerves molekulának nagyon bonyolult rezgési spektruma van, adott frekvencián vagy átfednek, vagy különböznek egymástól, ezért általában több hullámhosszon célszerű a nagy pontosságot igénylő méréseket elvégezni. Detektálható egy adott szerves molekula teljes rezgési spektruma is, de ez meglehetősen időigényes feladat. Az ilyen jellegű 3D mikroszkópiás vizsgálatoknak azonban fizikai határt szab, hogy ezekkel az optikai eljárásokkal a szövetekben létrejövő fényszórás és abszorpció miatt legfeljebb egy milliméternyi mélységben tudják mérni az egyes molekulák koncentrációját a szervezetben.

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, amilyeneket korábban nem.

A fejlesztéseik során arra is figyelnek, hogy viszonylag kis koncentrációban jelen lévő molekulákat is ki tudjanak mutatni – ezt a célt szolgálja az MTA Wigner SZFI-ben kifejlesztett, úgynevezett SRS (Stimulated Raman Scattering) detektor rendszer is. Az egyéb gépészeti, elektronikai fejlesztéseket az R&D Ultrafast Lasers Kft. végzi, míg az MTA Wigner Kutatóközpont Szilárdtestfizikai és Optikai Intézetének szakembereire a lézerrendszer optimális kialakítása, valamint a mikroszkóp továbbfejlesztése, átalakítása hárul.

A két hullámhosszon szinkronban működő femtoszekundumos lézerrendszer első nemzetközi szakmai bemutatójára egy idén januári, San Diegó-i lézerfizikus szakkonferencián – FILAS 2012 – került sor, míg ez év májusában Miamiban egy, a szintén az Optical Society of America által szervezett, Biomedical Imaging elnevezésű konferencián – Biomed 2012 – már a teljes CARS mérőrendszerrel biológiai mintákon elvégzett méréseket is bemutatták a szakmai közönségnek.

Szipőcs Róbert szerint új CARS lézerrendszerük gyakorlatilag az összes kétfoton pásztázó lézermikroszkópiás vizsgálatokra specializálódott laborban kiegészítésként felállítható – függetlenül attól, hogy a kutatóhelyen milyen típusú hangolható femtoszekundumos Ti-zafír lézert használtak. Az eszközük ugyanis automatikusan leköveti a hangolható Ti-zafír lézer ismétlési frekvenciáját. „Olyan kiegészítő rendszert ajánlunk partnereinknek, felhasználóinknak, amellyel könnyen át tudnak térni a CARS mikroszkópiás vizsgálatokra” – tájékoztatta magazinunkat Szipőcs Róbert, aki szerint az első ipari kivitelű, CARS lézer és mikroszkóp rendszerüket egy hónapon belül leszállítják üzleti partnerüknek. A berendezés a hazai kutatóhelyek számára is elérhető áron kapható. ●



3. ábra. Zsírszövetről CARS módszerrel készített 3D mikroszkópiás kép