



(ELI-HU)

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/ KONV-2012-0005

[Home](#)

[Invited Talks](#)

[Timetable](#)

[Registration](#)

[Participants](#)

[Sponsors](#)

[Contact](#)



[Lecture](#)

Szipőcs Róbert: Super-resolved fluorescence microscopy

(MTA Wigner RCP, Institute for Solid State Physics and Optics)

[Abstract](#)

Abstract

In 2014, the Royal Swedish Academy of Sciences awarded Erik Betzig, Stefan W. Hell and W. E. Moerner the Nobel Prize in Chemistry for the development of super-resolution fluorescence microscopy (SRFM).

In our lecture, we give an introduction to fluorescence microscopy, scanning confocal and multiphoton microscopy and introduce the ultimate resolution limit, the so called "diffraction limit" of classical microscope imaging systems .

Then we discuss in details the basics of the two major types of SRFM: (i) super-resolved ensemble fluorophore microscopy, such a Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy, and (ii) super-resolved single-fluorophore microscopy, such as PALM, STORM, PAINT, which methods allow us to overcome the classical diffraction (or Abbe) limit of optical microscopes. Finally, we mention a few applications of SRFM in biology and medicine.

Kémiai Nobel-díj 2014: Nanoszkópia



Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2014

SUPER-RESOLVED FLUORESCENCE MICROSCOPY

A Svéd Királyi Tudományos Akadémia a 2014. évi kémiai Nobel-díjat megosztva Erik Betzignek, Stefan W. Hellnek és W. E. Moernernek adományozta a superfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia kifejlesztéséért.

Elnevezés az előadásban:

Nanoszkópia, vagyis fénymikroszkópia nanométeres felbontással

Kémiai Nobel-díj 2014: Nanoszkópia



A XIX. század végén Ernst **Abbe** (1873) és Lord **Rayleigh** (1896) felírta az **optikai mikroszkópok** felbontását meghatározó formulájukat, amit szokás a mikroszkópok **diffrakciós korlátjának** is nevezni.

Egyszerűen fogalmazva: egy optikai minta két különböző pontját csak akkor tudjuk egymástól mikroszkóppal megkülönböztetni, ha azok távolsága nagyobb, mint az alkalmazott fény hullámhosszának kb. a fele (λ) az optikai tengelyre merőleges irányokban (x,y). Az optikai tengely (z) mentén sajnos még ennél is rosszabb a helyzet, mint az alábbi összefüggésekből kiderül.

Abbe-féle diffrakciós korlát:

Keresztirányú felbontás ($\delta_{x_{\min}}, \delta_{y_{\min}}$):

$$(\delta x_{\min}, \delta y_{\min}) = \Delta_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha},$$

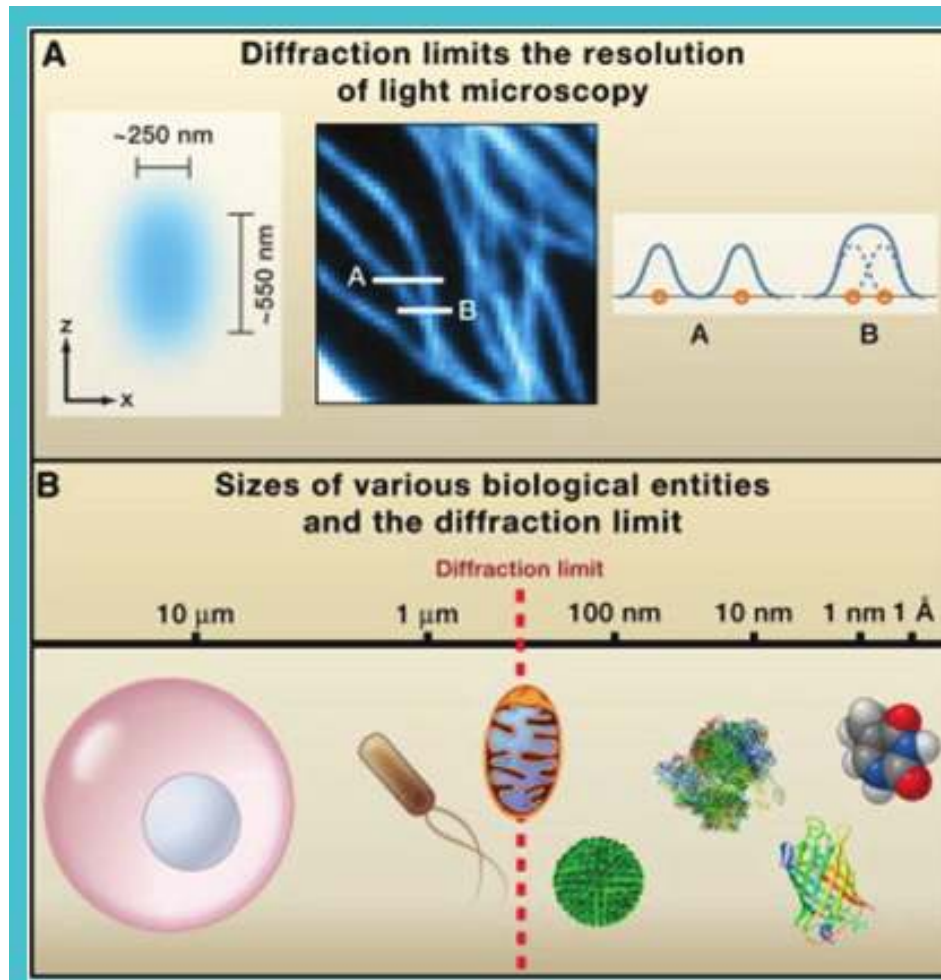
Hosszirányú felbontás ($\delta_{z_{\min}}$):

$$\delta z_{\min} \approx \frac{\lambda}{2n (\sin \alpha)^2}$$

ahol n az optikai közeg (pl. víz) törésmutatója, α az alkalmazott objektív fél-apertúra szöge.

Kémiai Nobel-díj 2014: Nanoszkópia

„Hagyományos” optikai mikroszkópok felbontása vs. biológiai alkotóegységek mérete



A fény diffrakciója korlátozza a hagyományos mikroszkópok felbontását.

Bal oldalon: egy fókuszált lézernyaláb intenzitáseloszlása. Középen: a vizsgált térbeli szerkezet. Jobb oldalon: (A) térben felbontott, illetve (B) nem felbontott térbeli szerkezet

Különböző biológiai alkotóegységek tipikus mérete. Balról jobbra: sejt (emlősben), E. coli baktérium, mitokondrium, influenza vírus, riboszóma, zöld fluoreszcens fehérje (GFP), timin (DNS alkotó)

„Hagyományos” optikai mikroszkópia

Emlékeztető:

- Vékony minták alulról, lámpával átvilágítva
- Nincs mélységi felbontás, 2D képek
- A képek felbontása nagyságrendileg a megvilágító fény hullámhosszának felel meg (0.5 mikrométer, azaz 0.0005 mm), ami függ a szemlencse és a tárgylencse (objektív) nagyításától is

Ami most új lesz:

- Lézeres megvilágítás (volt tegnap!)
- Fluoreszcens jelölések
- 3 dimenziós képek
- NEMLINEARITÁS!



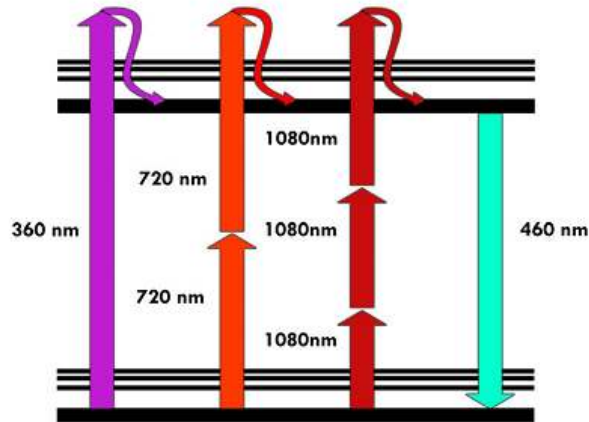
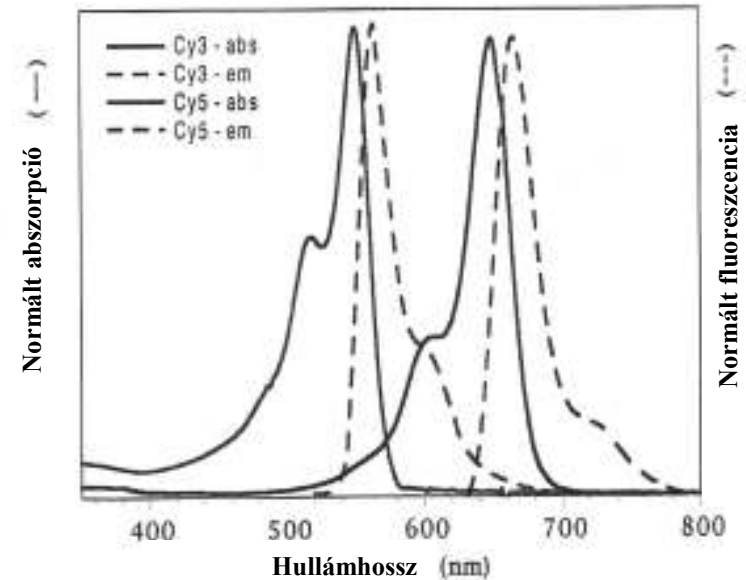


Figure 1
Perrin-Jablonski fluorescence diagram. Simplified Perrin-Jablonski scheme for IPE, 2PE and 3PE. Once the excited state has been reached the subsequent fluorescent emission is the very same for the three different modalities of excitation.



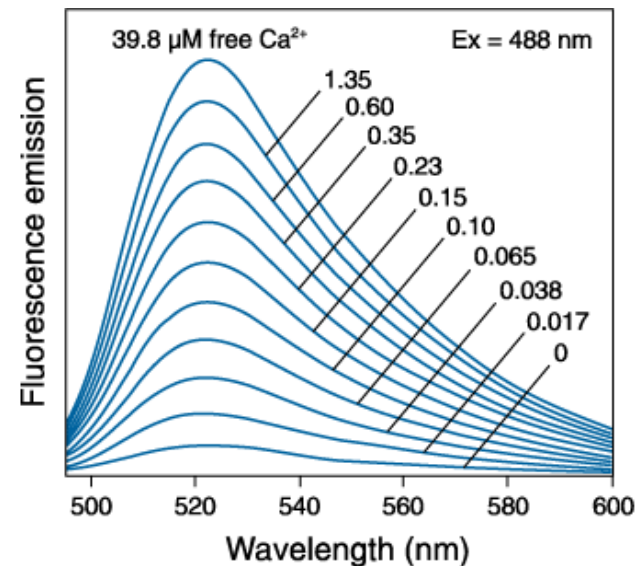
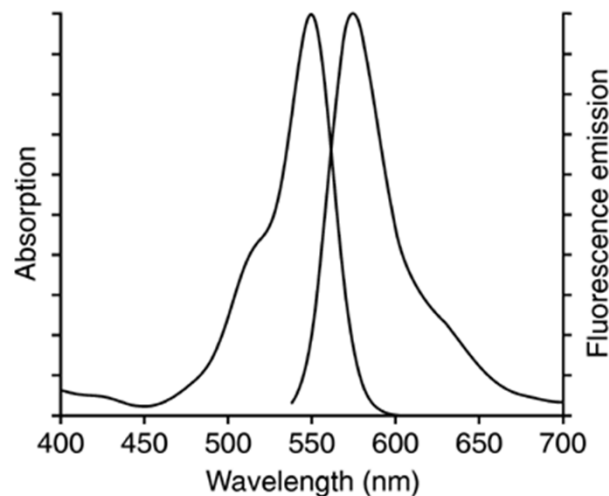
Jablonski diagram

- Tipikus fluoreszcencia élettartam $\approx 1-10$ ns
- Módusszinkronizált lézerek tipikus ismétlési frekvenciája

≈ 100 MHz \rightarrow 13 ns

Mit és hogyan mérünk?

- Különböző sejtalkotók morfológiáját (pl. mitokondriális hálózat, sejtváz, stb. elhelyezkedését a sejten belül), vagy gyógyszerkészítmények eloszlását, bőrön keresztül történő bejutását
 - specifikusan kötött festékekkel, vagy a sejtalkotó maga fluoreszkál (pl. természetes fluorofór, vagy a fehérjébe „beépített” GFP, YFP, stb.)
- Fiziológiáját (ion-koncentrációt, pl. idegsejtek esetében Ca^{2+} -, Na^{+} -ion koncentrációt, membránpotenciált feszültségérzékeny festékekkel vagy SHG-vel, kémhatást (pH), metabolikus állapotot)



Specifikusan kötött fluorofórok



Pl. Alexa festékek a Molecular probes cégnél



Molecular Probes The Handbook

The Alexa Fluor Dye Series—Note 1.1

[Share](#) |

The Alexa Fluor dyes—a series of superior fluorescent dyes that span the visible spectrum—represent a major breakthrough in the development of fluorescent labeling reagents. **RFI** Benefits of the Alexa Fluor dyes and their conjugates include:

Brightness—Alexa Fluor conjugates exhibit more intense fluorescence than other spectrally similar conjugates.

Photostability—Alexa Fluor conjugates are more photostable than most other fluorescent conjugates, allowing more time for image capture.

Instrument compatibility—Absorption spectra of the Alexa Fluor conjugates are matched to the principal output wavelengths of common excitation sources.

Color selection—Alexa Fluor conjugates are available in several distinct fluorescent colors, ranging from blue to red to near-infrared (**Figure 1, Table 1**).

pH insensitivity—Alexa Fluor dyes remain highly fluorescent over a broad pH range.

Water solubility—Alexa Fluor reactive dyes have good water solubility, so protein conjugations can be performed without organic solvents, and the conjugates are relatively resistant to precipitation during storage.

Specifikusan kötött fluorofórok

PI. Alexa festékek a Molecular probes cégnél

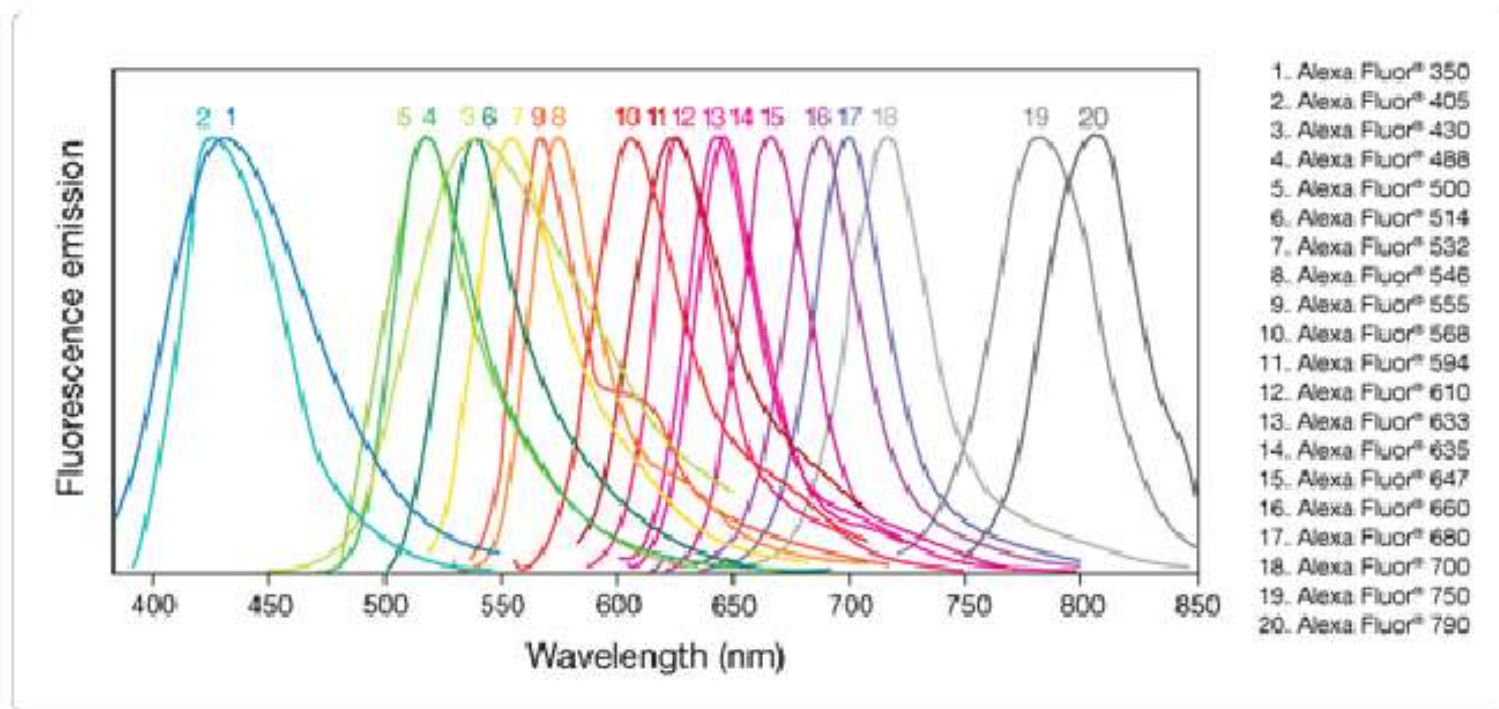


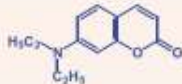
Figure 1. Emission spectra for the Alexa Fluor dye series.

Specifikusan kötött fluorofórok

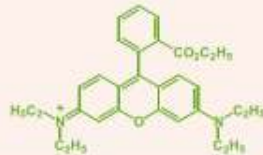
Megj.: a szuperrezolúciós mikroszkópiában használt festékek gyártója az **Atto-tec** cég, ezek jelölő festékeit nézzük most meg:

ATTO-labels are typically derivatives of:

- Coumarin



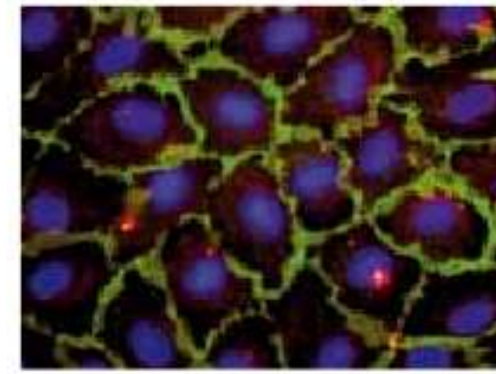
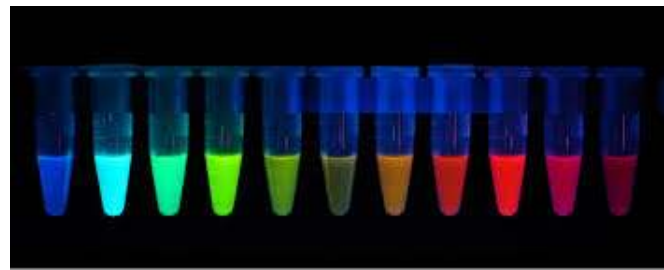
- Rhodamine



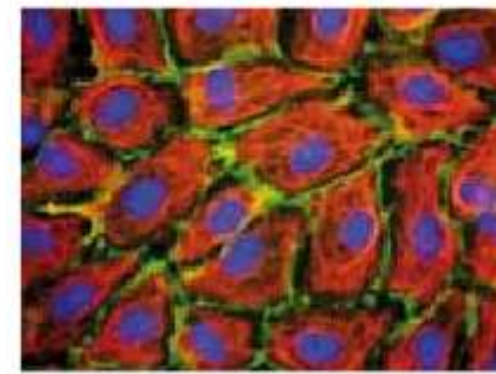
ATTO Fluorescent Labels

| Label | λ_{exc} (nm) | λ_{em} (nm) | λ_{iso} (nm) | τ_{fl} (ns) | τ_{ns} (ns) | Alternative to |
|-----------|----------------------|---------------------|----------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| ATTO 390 | 390 | 24000 | 479 | 90 | 3.8 | |
| ATTO 425 | 436 | 45000 | 454 | 90 | 3.5 | |
| ATTO 485 | 453 | 75000 | 508 | 55 | 2.2 | |
| ATTO 488 | 501 | 98000 | 523 | 80 | 3.2 | Alexa 488*, FITC, FAM** |
| ATTO 495 | 495 | 88000 | 527 | 45 | 2.6 | |
| ATTO 520 | 516 | 110000 | 538 | 90 | 3.8 | JOB*, TRIT* |
| ATTO 532 | 532 | 115000 | 553 | 90 | 3.8 | Alexa 532*, HEX** |
| ATTO 550 | 554 | 129000 | 576 | 80 | 3.2 | TAMRA**, Cy3*** |
| ATTO 565 | 563 | 129000 | 590 | 90 | 3.4 | Cy5.5***, ROX** |
| ATTO 590 | 594 | 129000 | 624 | 80 | 3.7 | Alexa 594*, Texas Red* |
| ATTO 594 | 601 | 129000 | 627 | 80 | 3.5 | Alexa 594* |
| ATTO 610 | 615 | 100000 | 634 | 70 | 3.3 | |
| ATTO 610X | 611 | 100000 | 661 | 35 | 2.5 | |
| ATTO 620 | 616 | 129000 | 643 | 50 | 2.9 | |
| ATTO 633 | 629 | 130000 | 657 | 64 | 3.2 | Alexa 633* |
| ATTO 635 | 635 | 129000 | 658 | 25 | 1.9 | Alexa 633* |
| ATTO 637 | 635 | 129000 | 658 | 25 | 1.9 | Alexa 633* |
| ATTO 647 | 645 | 129000 | 668 | 20 | 2.3 | Cy5***, Alexa 647* |
| ATTO 647M | 644 | 150000 | 668 | 65 | 3.4 | Cy5***, Alexa 647* |
| ATTO 655 | 663 | 129000 | 684 | 30 | 1.9 | Cy5***, Alexa 647* |
| ATTO 680 | 680 | 129000 | 708 | 30 | 1.8 | Cy5.5*** |
| ATTO 700 | 700 | 129000 | 719 | 25 | 1.5 | Cy5.5*** |
| ATTO 725 | 726 | 129000 | 752 | 10 | 0.5 | |
| ATTO 740 | 740 | 129000 | 764 | 10 | 0.6 | |

* Trademark of Molecular Probes, ** Trademark of Applied Biosystems, *** Trademark of GE Healthcare, Group, Invitrogen

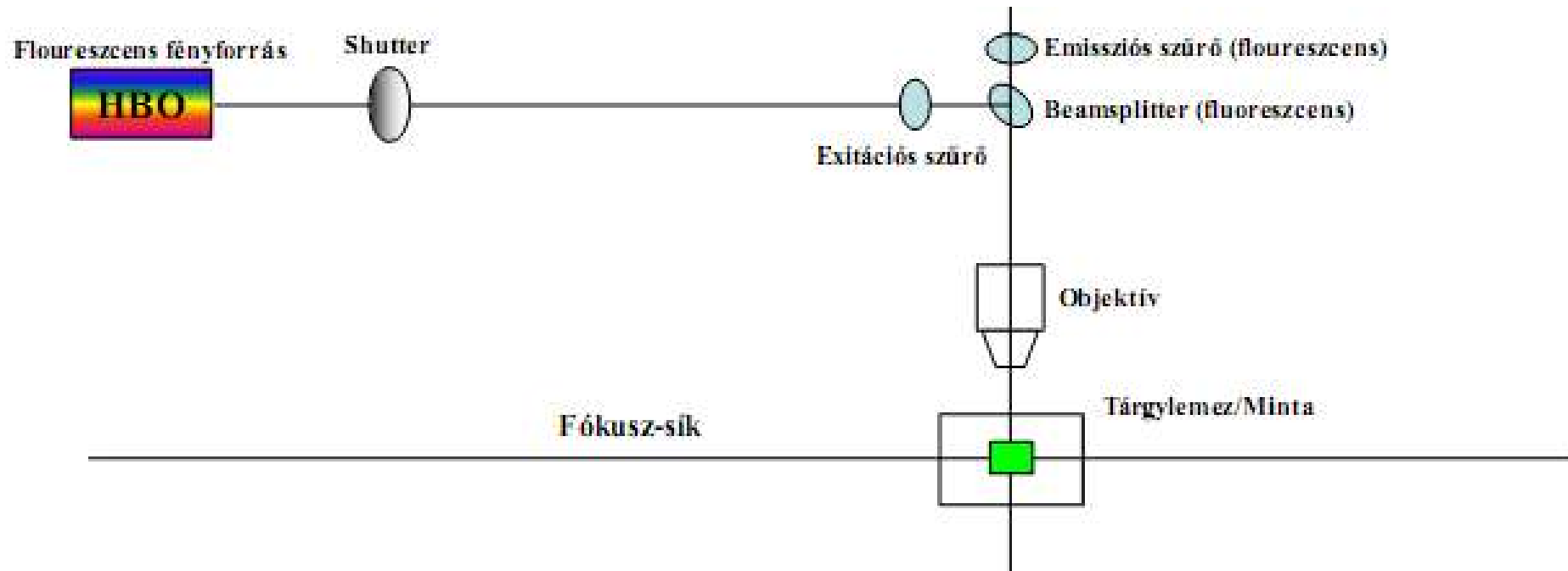


HUVEC: Inhibitor apoptosis protein/ ATTO 550; E-Cadherin/ATTO 655 and DAPI



HUVEC: Vimentin/ATTO 532; E-Cadherin/ATTO 655 and DAPI

2D fluoreszcencia mikroszkópia



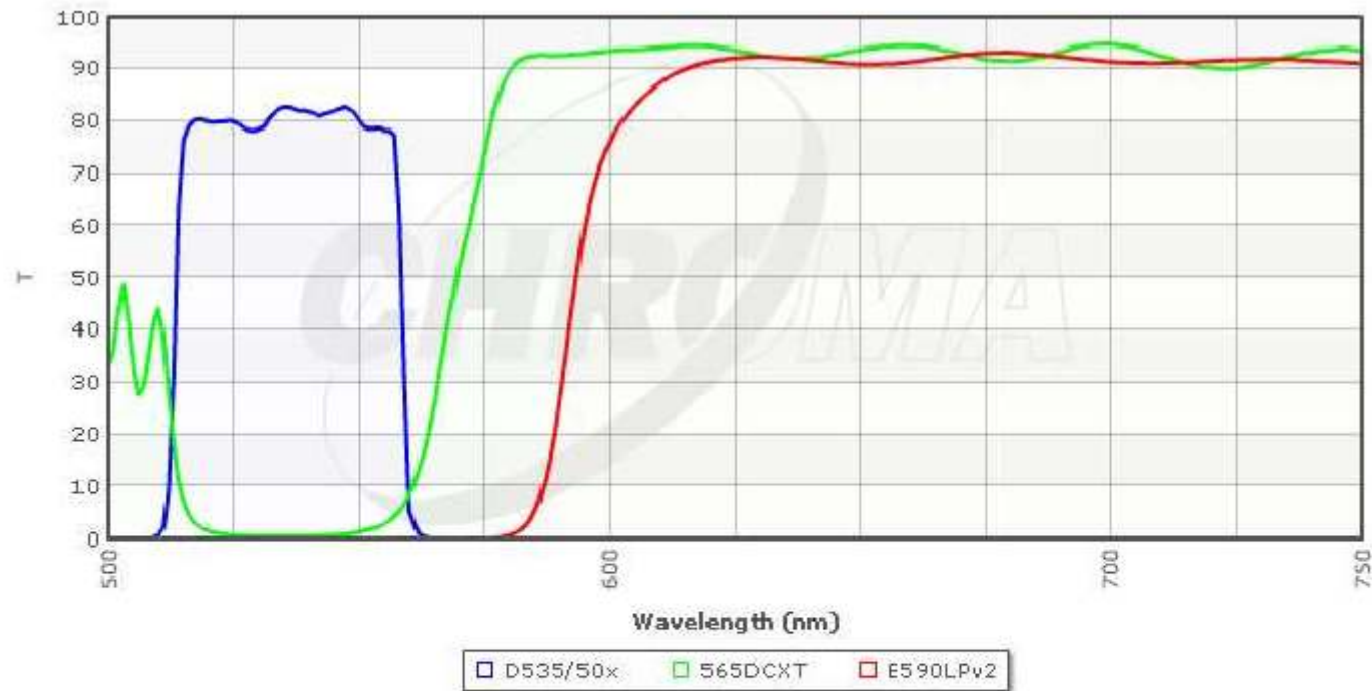
Floureszcencia mikroszkóp felépítése:

HBO: nagynyomású higanygőz-lámpa (széles spektrum, UV+látható)

2D fluoreszcencia mikroszkópia



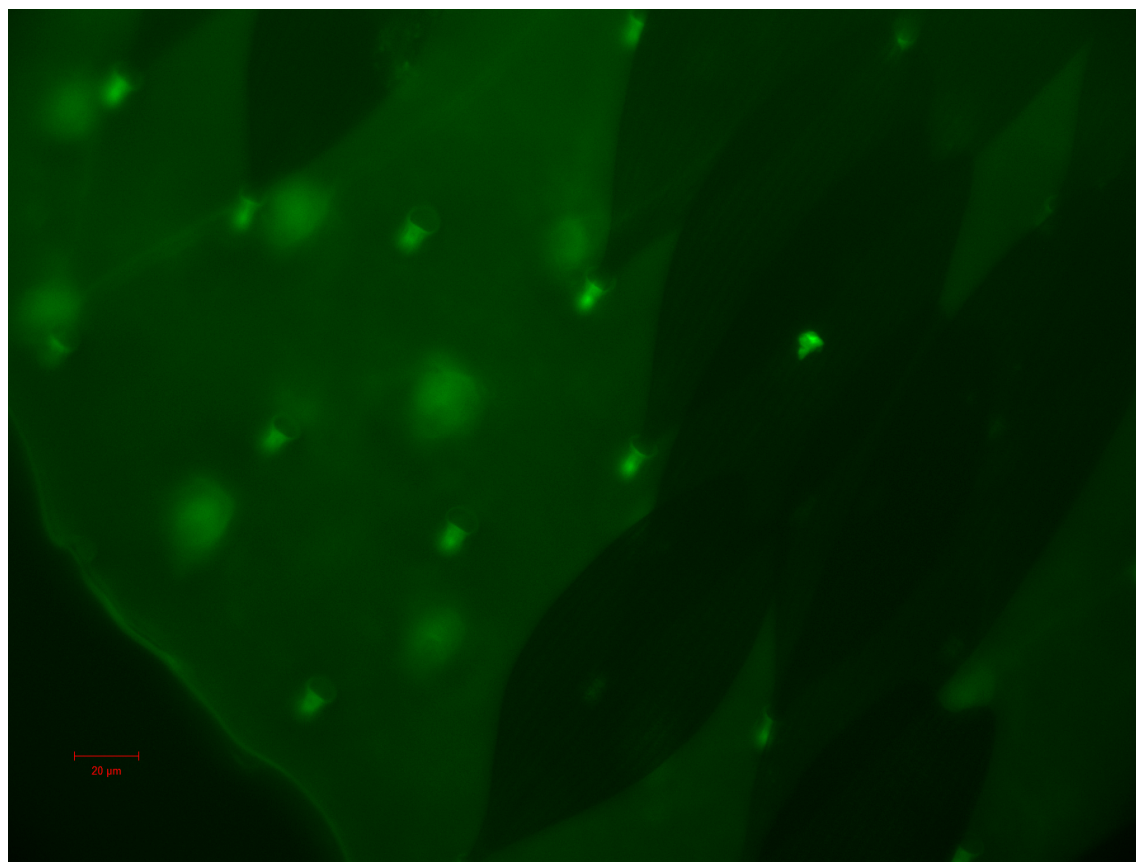
Gerjesztési és emissziós szűrők



All transmission and blocking (OD) data are actual, measured spectra of representative production lots. Spectra varies slightly from lot to lot. Optical density values in excess of 6 may appear noisy because such evaluations push the resolution limit of low light level measurements.

Set Number: 11007v2
Description: Wide Green

Természetes fluorofórok

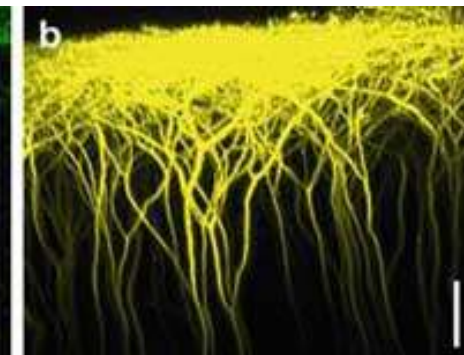
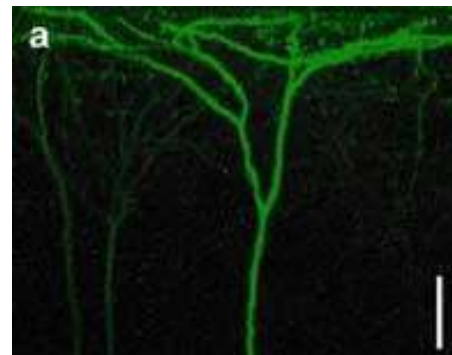
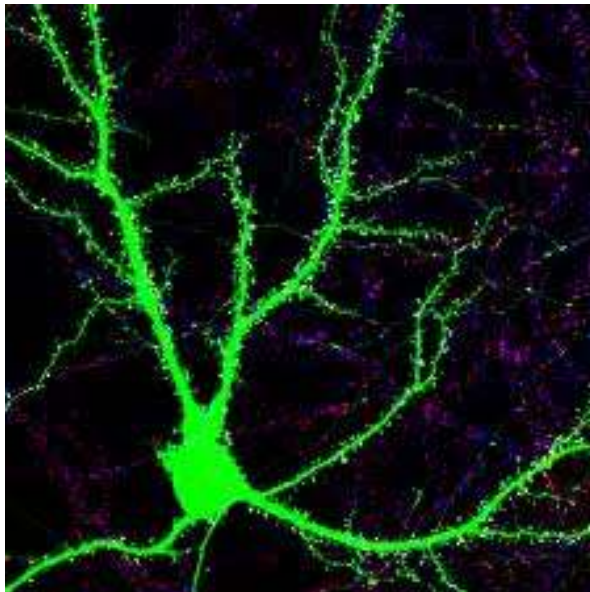


Lepkeszárnyról fluoreszcencia mikroszkópiával CCD kamerával készített 2D kép az MTA SZFKI-ban

Természetes fluorofórok: génmódosított állatok

GFP: green fluorescent protein (zölden fluoreszkáló fehérje)

YFP: yellow fluorescent protein (sárgán fluoreszkáló fehérje)



3D képalkotás elve

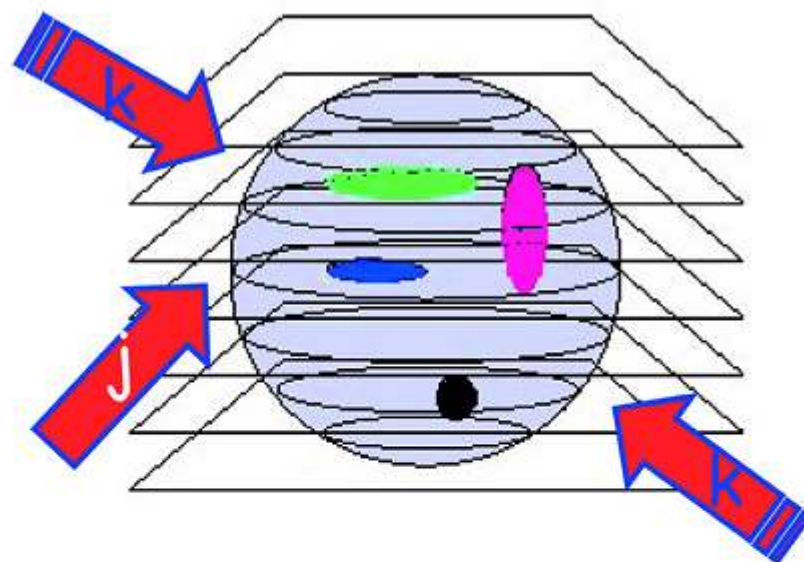
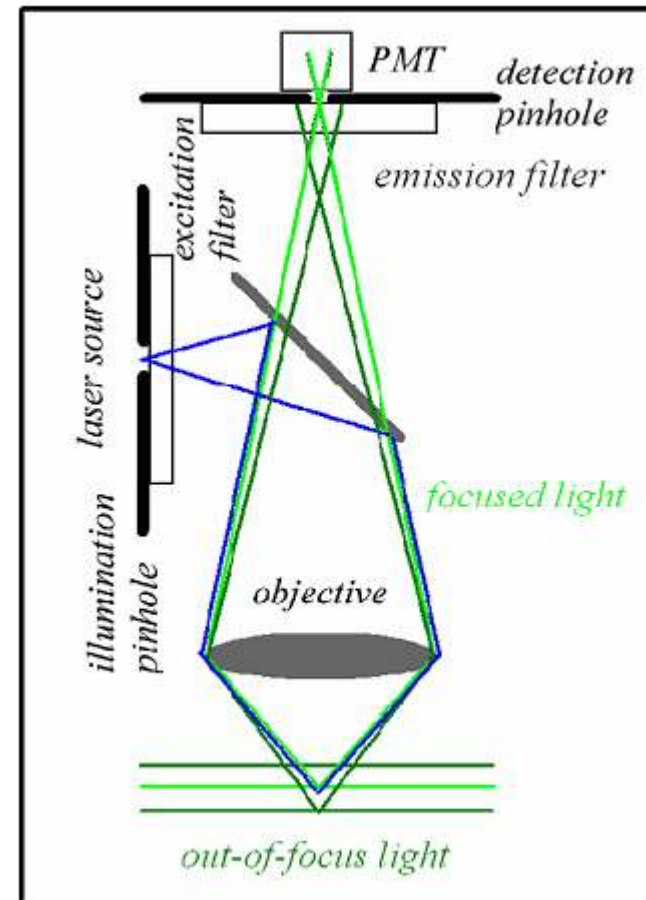
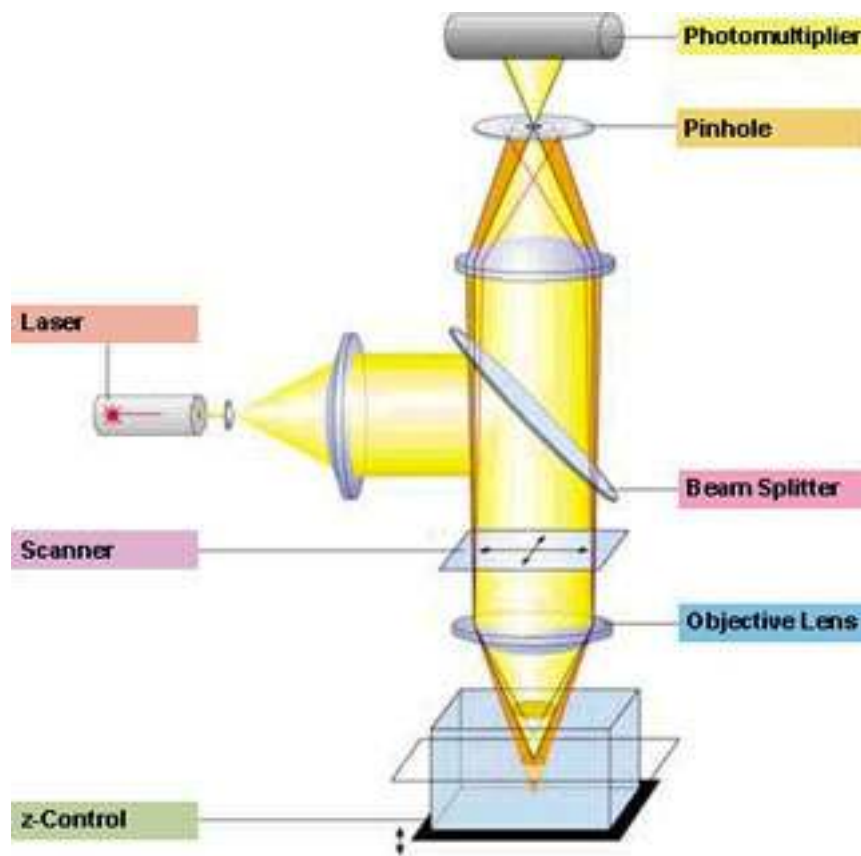


Figure 2

Optical sectioning scheme. A three-dimensional sample can be sketched as a series of optical slices. Let's call slice j the one containing the geometrical focus of the objective and refer to the adjacent planes as k slices. The sample contains a three-dimensional distribution of fluorescently labelled molecules whose intensity distribution is I , slice by slice. The thickness of each optical slice is approximately one half of the axial resolution, say $\approx \lambda/2$.

3D fluoreszcencia mikroszkópia

3D képalkotás konfokális mikroszkóppal (egyfotonos gerjesztés)



3D képképzés konfokális mikroszkóppal (egyfotonos gerjesztés)

Lézernyalábok pásztázása

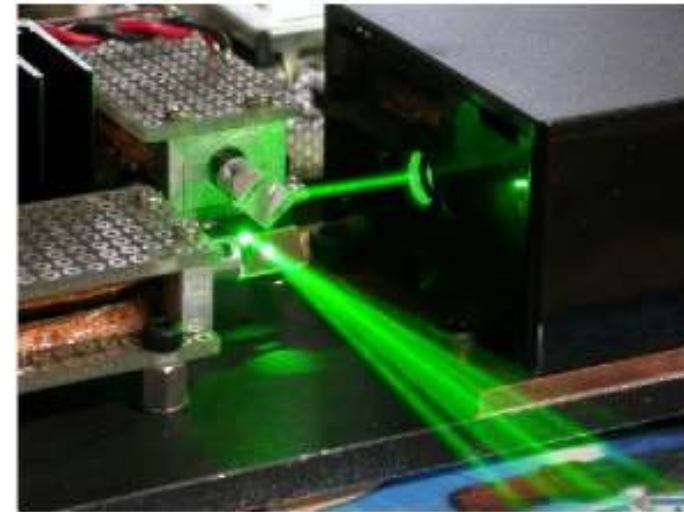
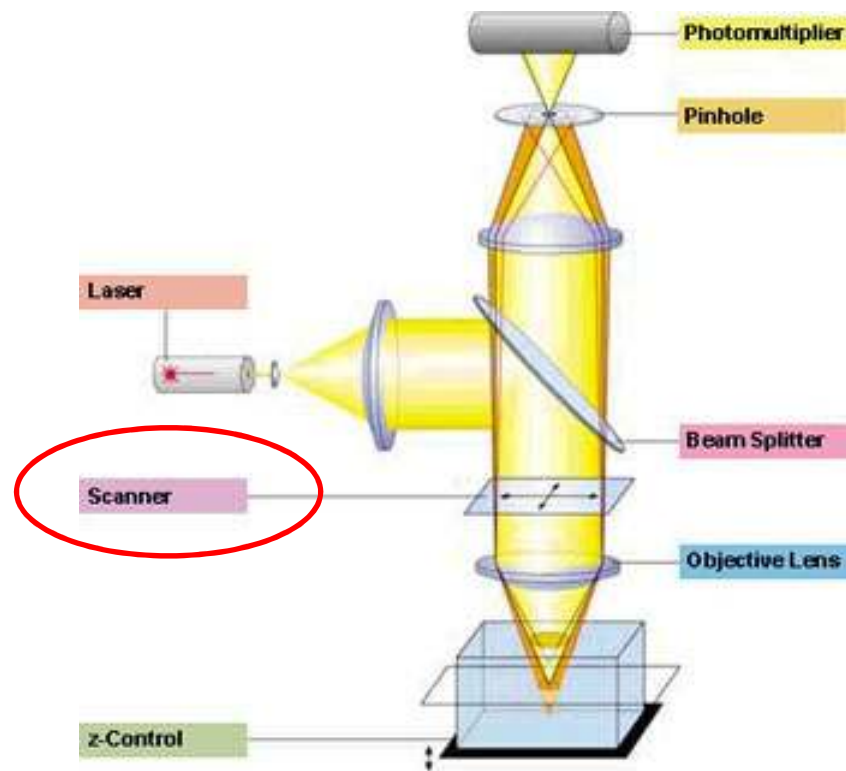
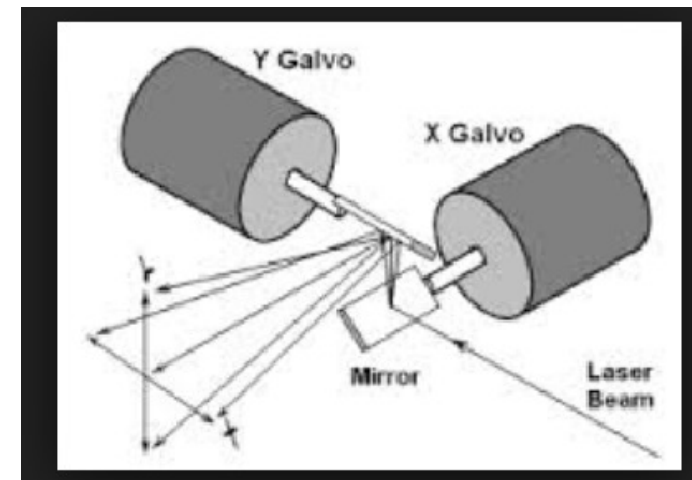


Photo 1. X-Y Scan Head



3D konfokális mikroszkópia

A pásztázó lézeres (konfokális) mikroszkóp felbontása

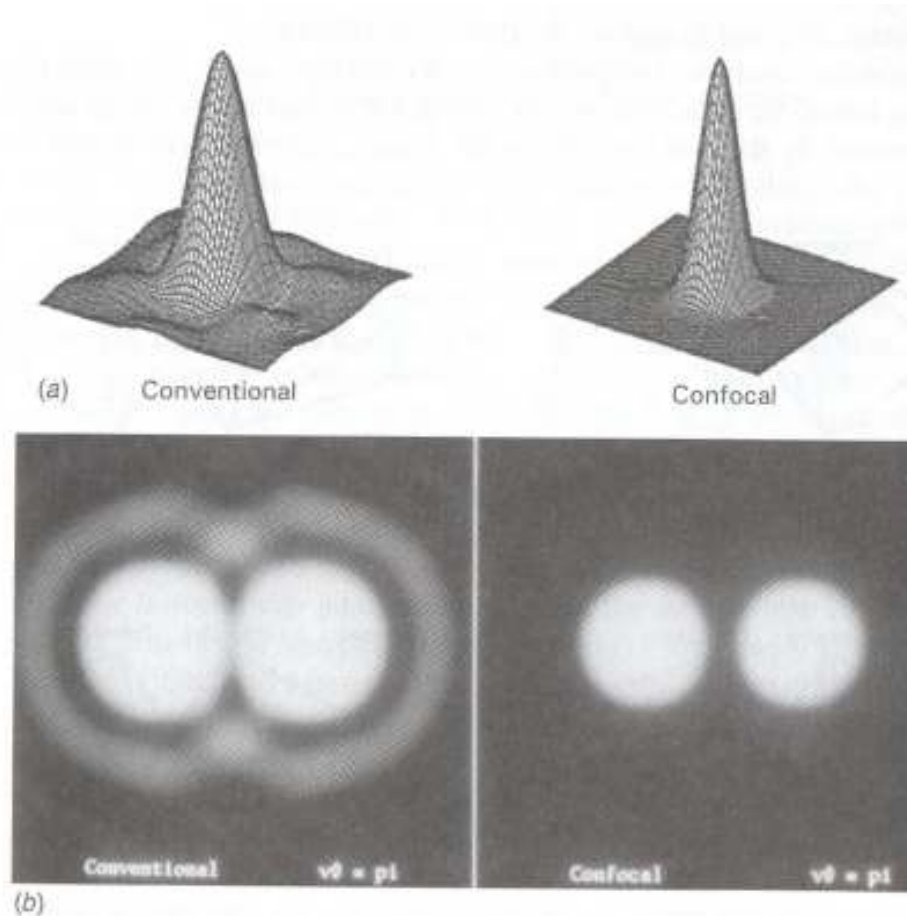
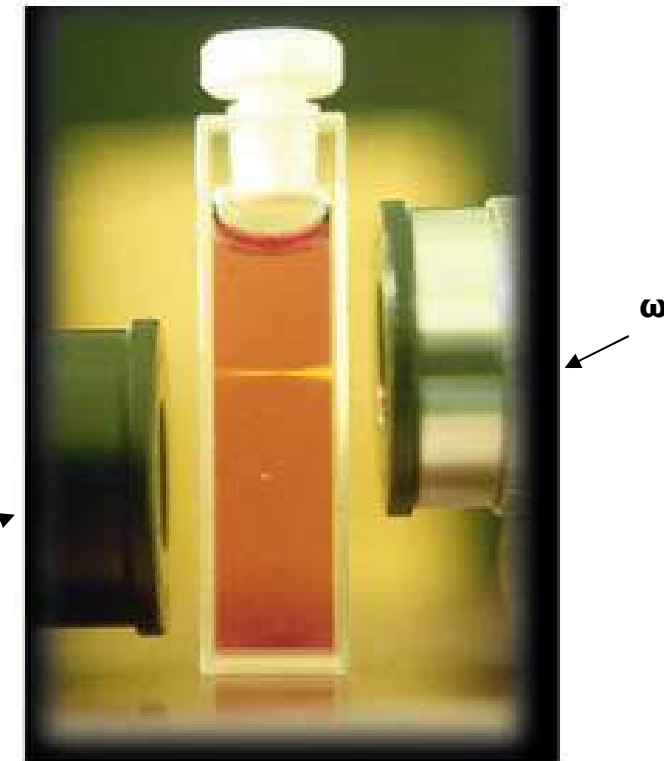
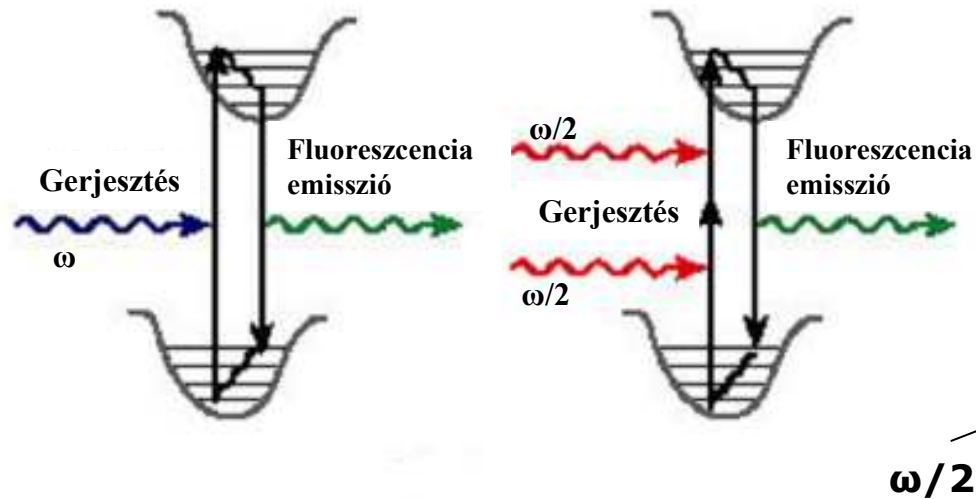


FIGURE 3 The point spread functions of the conventional and confocal microscopes are shown in (a), together with comparison images of two-point objects in (b). In both cases, the superior resolution of the confocal system is apparent.

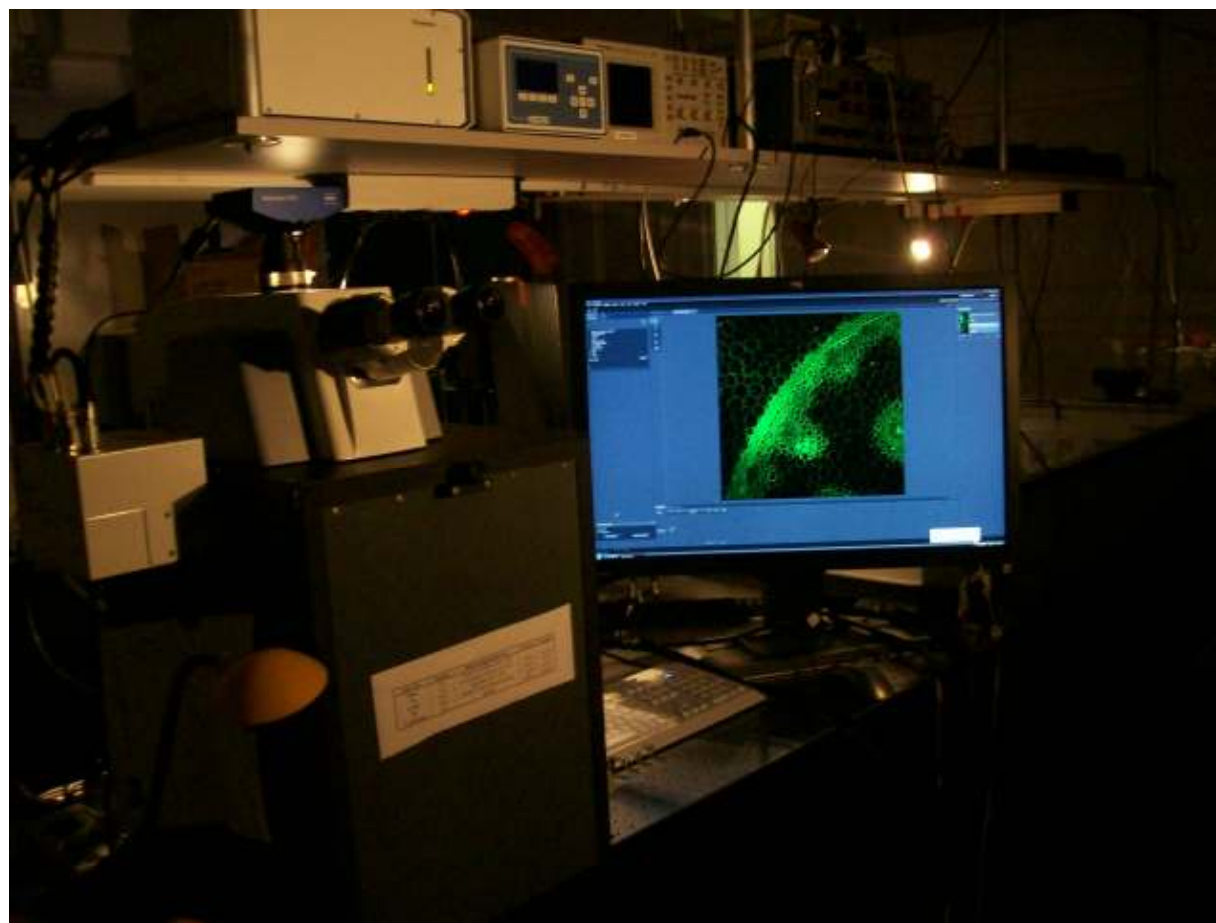
Egyfotonos és kétfotonos gerjesztés



Kétfoton abszorpció: amikor a fluoreszcens anyag egyszerre két piros fénykvantumot nyel el egy UV fénykvantum helyett

3D kétfoton mikroszkópia

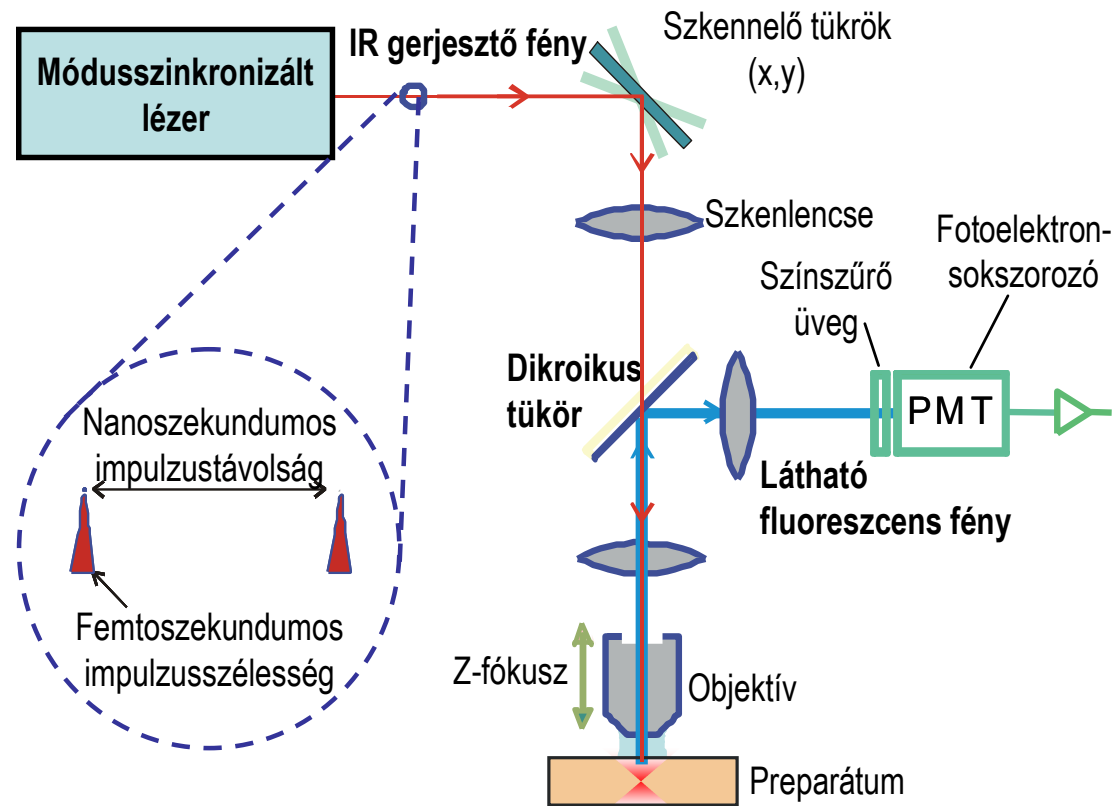
Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (2PF) mikroszkópia



LSM 710 MP Axio Examiner kétfoton mikroszkóp az MTA Wigner-ben (Carl Zeiss)

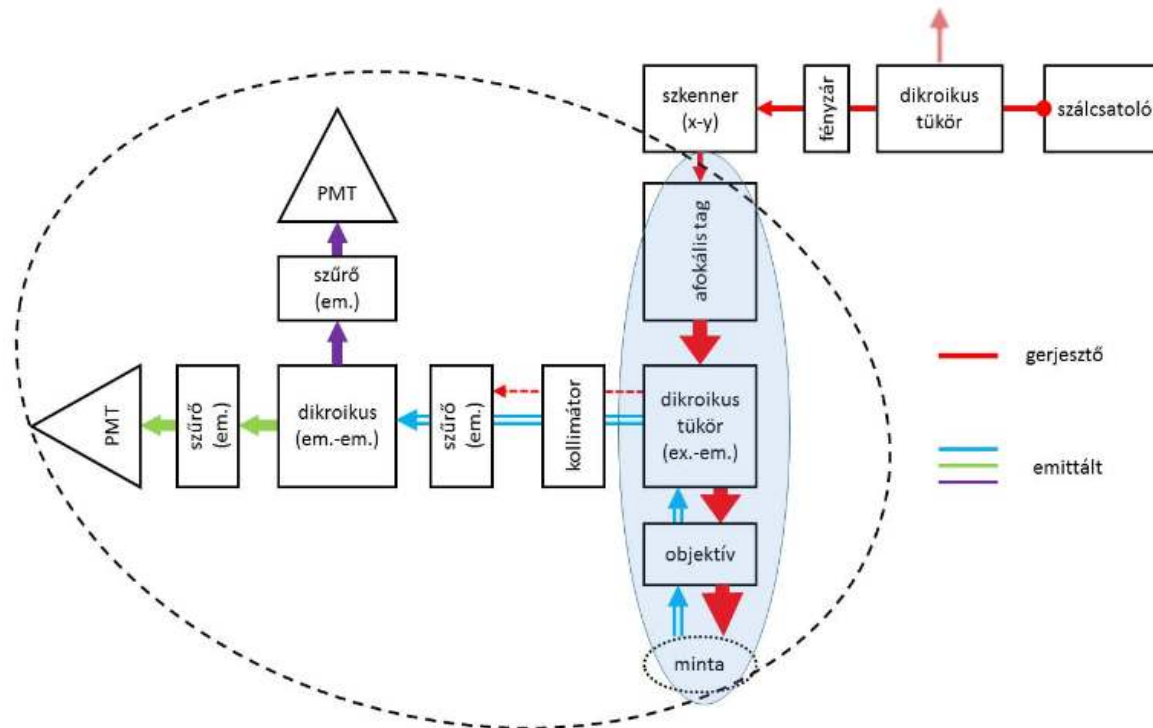
3D kétfoton mikroszkópia

Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (2PF) mikroszkópia



3D kétfoton mikroszkópia

Mikroszkóp tervezés



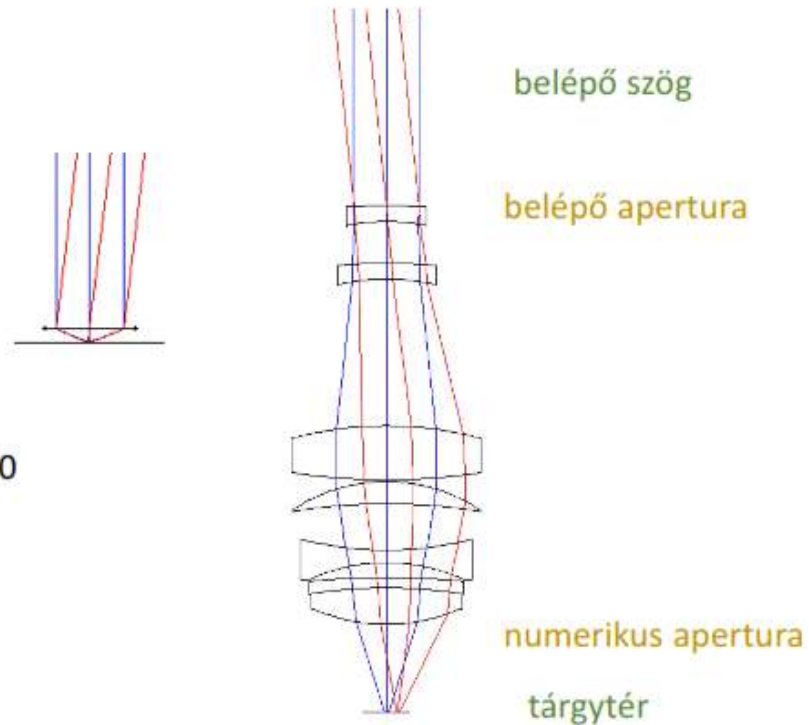
A FiberScope nemlineáris pásztázó mikroszkóp optikai rendszerének blokkvázlata a gerjesztő és emissziós fényutakkal. Szaggatott vonallal bekarikázott rész: az optika tervezés által érintett egységek. Árnyalt terület: az afokális optikai leképező rendszer tervezésénél figyelembe vett egységek.

Mikroszkóp tervezés

Pásztázó nemlineáris mikroszkópok optikai leképező rendszerének modellezése
Peremfeltételek



Zeiss W Plan-APOCHROMAT 40x 1.0
végtelenre korrigált
3,5°-os belépő szög
9 mm-es belépő apertúra
1.0 numerikus apertúra
0.5 mm-es tárgytér



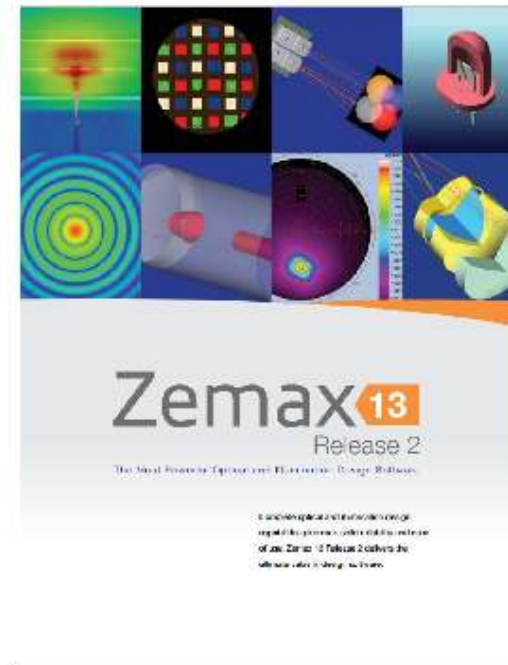
3D kétfoton mikroszkópia

Mikroszkóp tervezés

Pásztázó nemlineáris mikroszkópok optikai leképező rendszerének modellezése
Zemax



- optikai tervezőszoftver
- görbületek, távolságok optimalizációs paraméterek szerinti változtatása
- üvegyanyagok katalógus szerinti cseréje az optimalizáció során
- adott célfüggvény szerinti globális optimalizáció (lehetséges változatok automatikus keresése)
- lokális optimalizáció (választott elrendezés finomhangolása)
- optikai rendszer tulajdonságainak analízise, ábrázolása



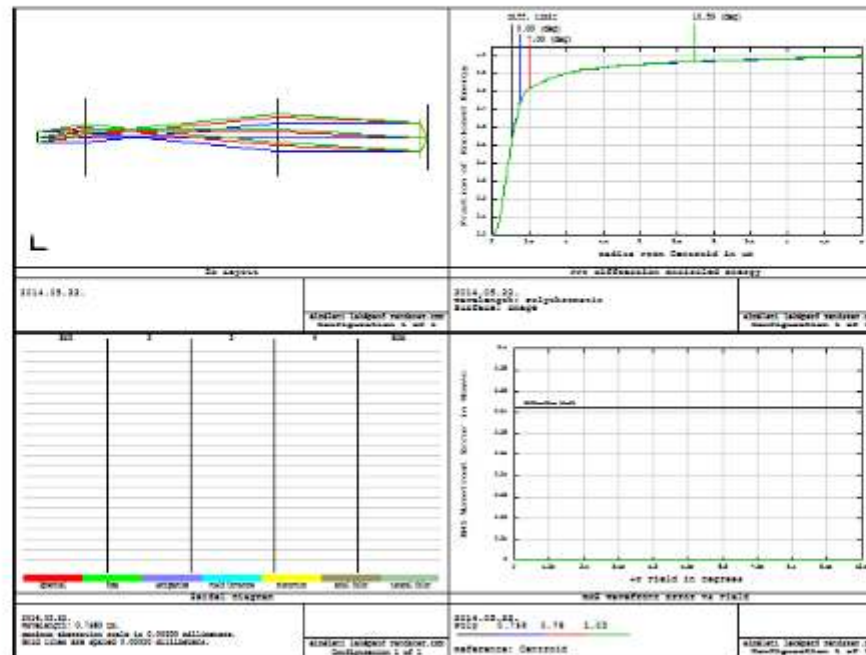
3D kétfoton mikroszkópia



Mikroszkóp tervezés, afokális tag tervezése

Pásztázó nemlineáris mikroszkópok optikai leképező rendszerének modellezése
Tervezőmódszertan

„Lens layout”
fizikai elrendezés
vázlata



„Encircled energy”
nyaláb kollimáltsága

„Seidel diagram”
leképezési hibák
hibafüggvényeinek
grafikus
megjelenítése
felületenként

„RMS wavefront error in
waves”
hullámfronthiba a
mezőpozíció
(szkenelési szög)
függvényében

Mikroszkóp tervezés, színhiba korrekció

Pásztázó nemlineáris mikroszkópok optikai leképező rendszerének modellezése
GRIN lencsés endomikroszkóp



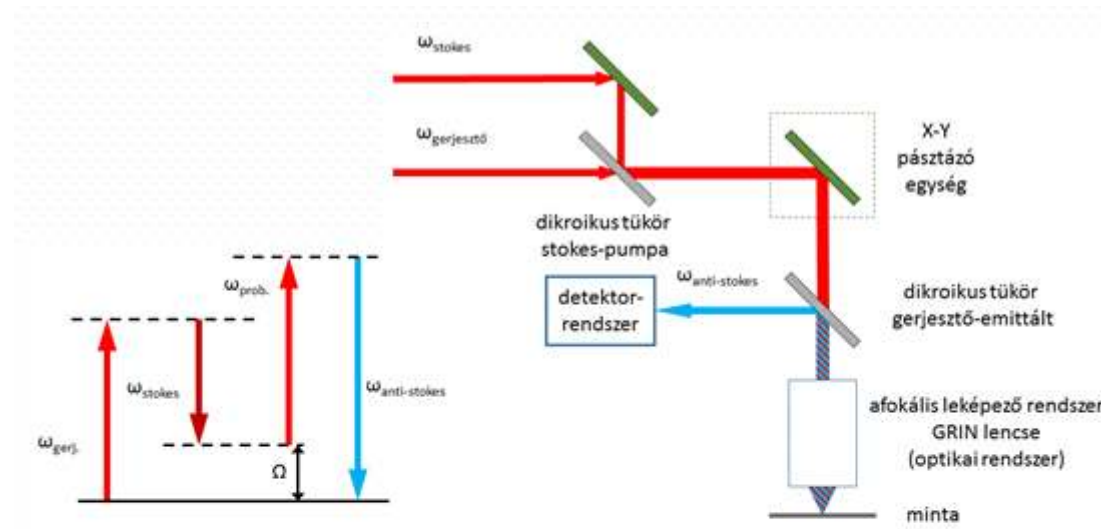
- szállézer fényforrás
- kis méret (mobiltelefon)
- IR fény behatolási mélysége kb. 500 μm
- mélyebbre csak mechanikai úton
- optikai szonda : nagy L/d arány

- főleg *in vivo*, jelölésmentes (CARS, SRS, SHG) mérések elvégzéséhez (agykutatás, bőrgyógyászat)

Nemzeti Agykutatási Program
SZTE alvállalkozója a Wigner FK

3D kétfoton mikroszkópia

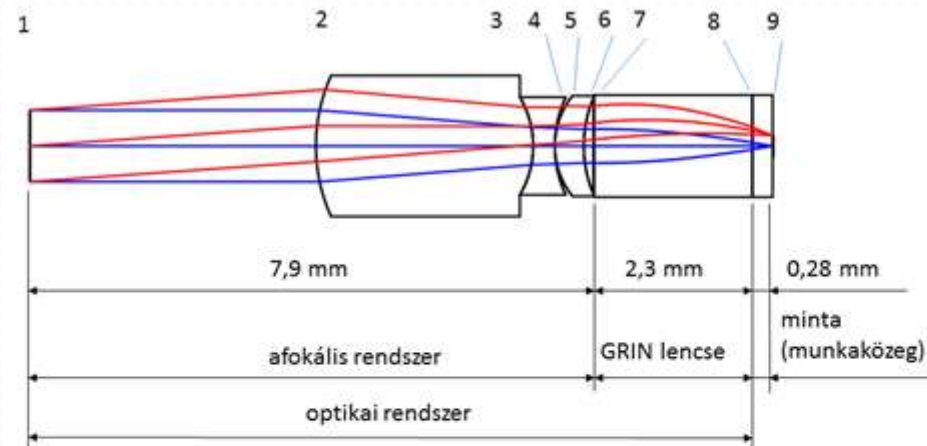
Mikroszkóp tervezés, színhiba korrekció



1.ábra:

Balra a CARS módszer energetikai diagramja, jobbra a CARS elvre épülő mikroszkóp blokkvázlata. A baloldali diagramból látható, hogy a mintát előbb gerjesztő hullámhosszúságú lézerrel gerjesztjük, majd egy másik, úgynevezett Stokes nyalábbal egy köztes energiaállapotba juttatjuk. Innen újabb gerjesztéssel olyan energiaszintre ér a minta, ahonnan egy foton formájában adja le az energiát, miközben visszatér alapállapotba. Ez a foton képviseli az anti-Stokes jelet, ezt detektáljuk. A megfelelő gerjesztő és a Stokes nyaláb hullámhosszkülönbsége anyagonként más és más, a két hullámhossz hangolásával más és más anyagok detektálhatók (pl. lipidek, fehérjék, víz)

Mikroszkóp tervezés, színhiba korrekció

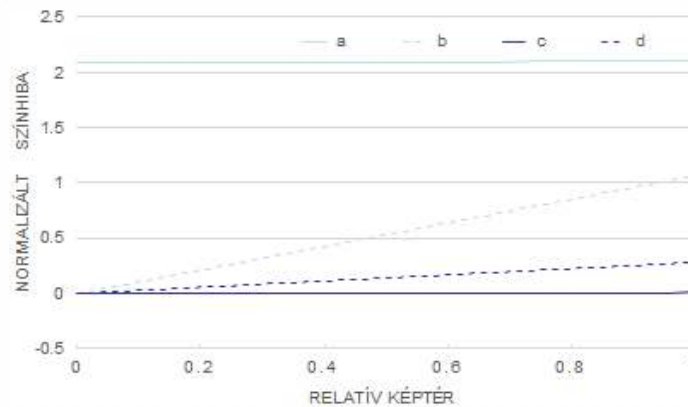


2. ábra:

A GRIN lencsés endomikroszkóp optikai rendszerének vázlata a főbb méretekkel és részeivel. Az szkennerből (1) érkező eltérített nyaláb az első (2-3 felület), második (3-4 felület), majd a harmadik lencsén (5-6 felület) keresztül a GRIN lencsébe (7-8 felület) jut. A GRIN lencse aztán a munkaközegben (8-9 felület) a képsíkra (9 felület) fókuszálja a sugarakat. Az emittált fény a (9) mintából ezen az úton visszafelé jut a detektorokba.

3D kétfoton mikroszkópia

Mikroszkóp tervezés, színhiba korrekció

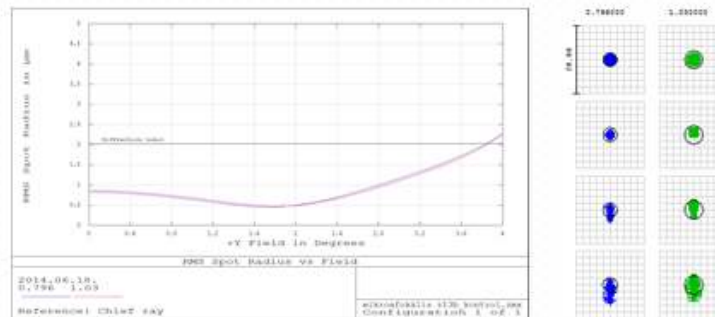


3. ábra:

A GRIN lencse és a endomikroszkóp normalizált színhibái a képtér függvényében. A színhibát a foltméretre normalizáltuk, ami azt jelenti, hogy 0 értéknél a két folt teljesen átfedi egymást, 1 értéknél nincs átfedés, így a CARS folyamat feltétele nem teljesül.

a, és b, : GRIN lencse axiális és laterális színhibái

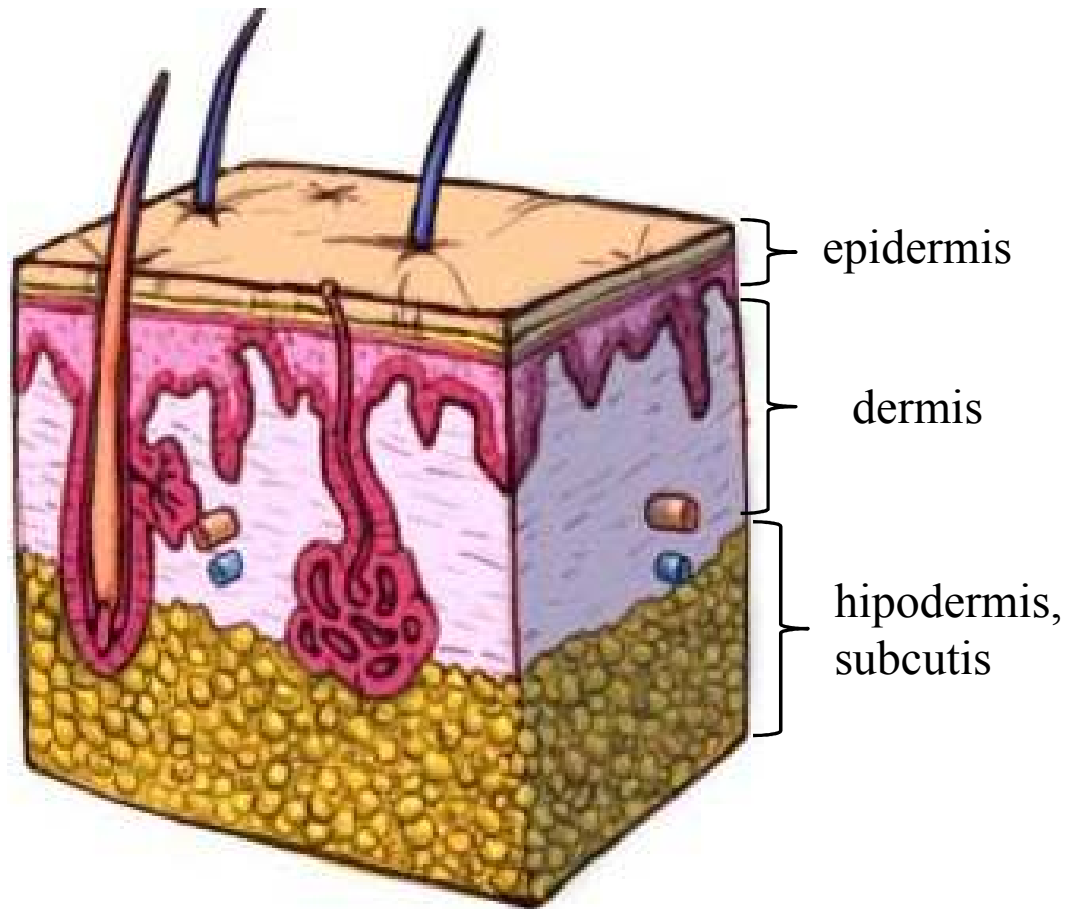
c, és d, : endoszkópmikro axiális és laterális színhibái



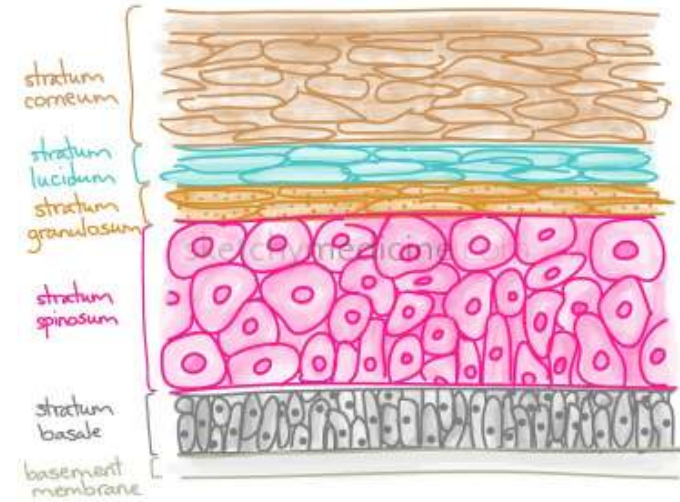
4. ábra:

A GRIN lencsés endomikroszkóp által fókuszált nyalábok foltméretei hullámhossz szerint a képtér függvényében (bal oldalon). Fekete vízszintes vonal jelöli a diffrakciókorlátot. (796 nm-re 2.28 µm, 1030 nm-re 2.95 µm) Ez a paraméter határozza meg az elérhető felbontást. Látható, hogy a kész rendszer mintkét működési hullámhosszra közel a teljes működési tartományban diffrakciókorlátos.

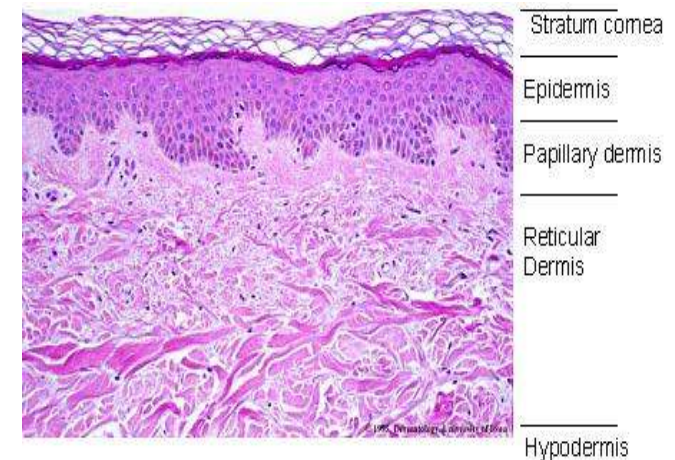
Számított foltméretek és a foltok alakjai a két működési hullámhosszon (jobb oldalon)



epidermis rétegei



dermis szerkezete



Alkalmazott nemlineáris folyamatok:

- TPEF – két foton abszorpciós fluoreszcencia (elasztin, keratin, NADH)
- SHG – másodharmonikus keltés (kollagén)
- CARS – koherens anti-Stokes Raman szórás (zsírok, lipidek)

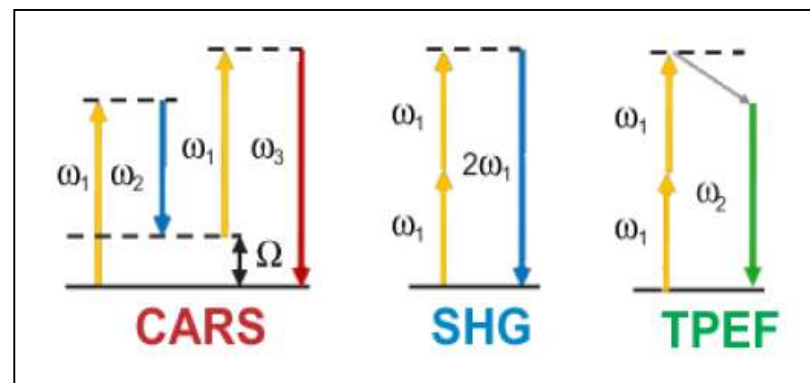
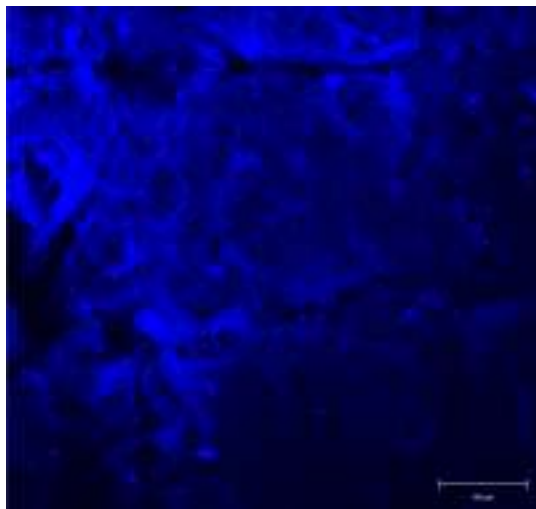


Table 1. Endogenous skin chromophores.

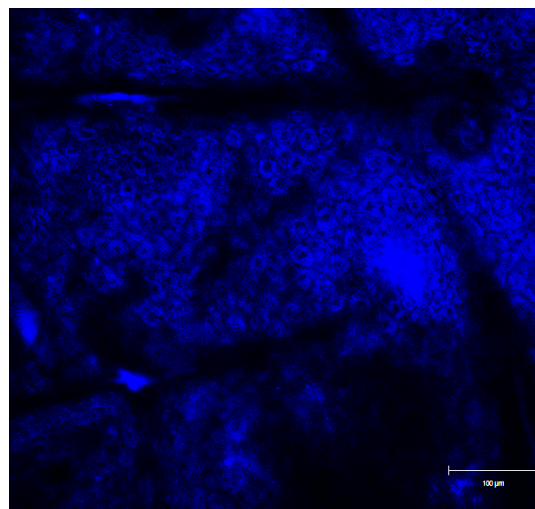
| Chromophore | Excitation λ_{ex} (nm) | Emission λ (nm) |
|----------------------|---|--|
| Fluorescence and SHG | | |
| Retinol (20) | 700–830 | 450 |
| NADH (17,97–100) | 340; 690–730 | 450–470 |
| Vitamin D (20) | < 700 | 450 |
| Flavins (17) | 370, 350; 700–730 | 430 |
| Melanin (101) | 280–450 | 440, 520, 575 |
| Elastin (101) | 300–340; 700–740 | 420–460 |
| Collagen | | |
| Fluorescence | 300–340; 700–740 | 420–460 |
| SHG (19,101) | 720–960 (tunable range of TP laser) | 360–480 ($\lambda_{ex}/2$) |
| CARS | | Emission ω (cm^{-1}) |
| C-H stretch | See (23,29) | 2845 cm^{-1} |
| Sebaceous glands | | 2845 cm^{-1} |
| Adipocytes | | 2956 cm^{-1} |

Hanson et al., Photochemistry and Photobiology, 2009., (85:33-44)

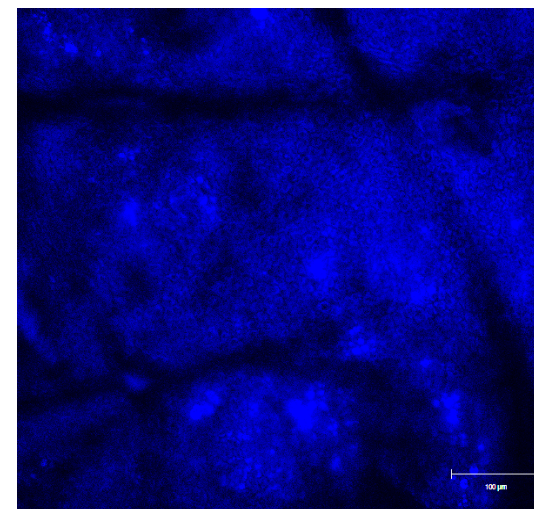
str. corneum: keratin (TPEF)



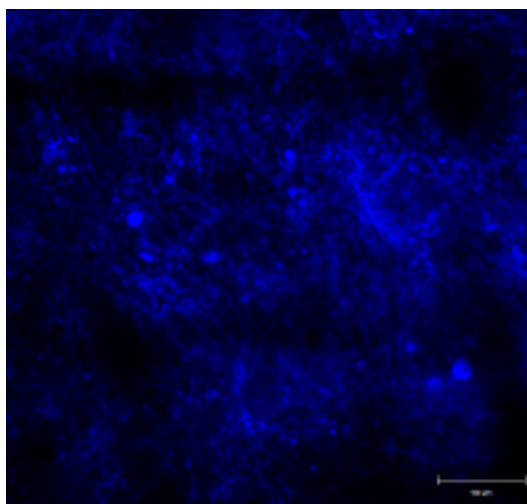
str. spinosum: NADH (TPEF)



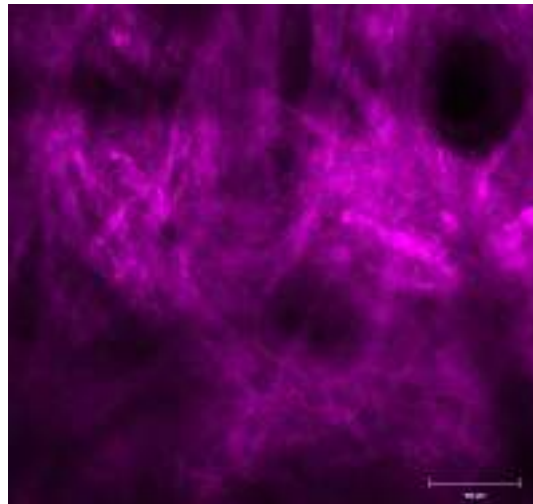
str. basale: NADH (TPEF)



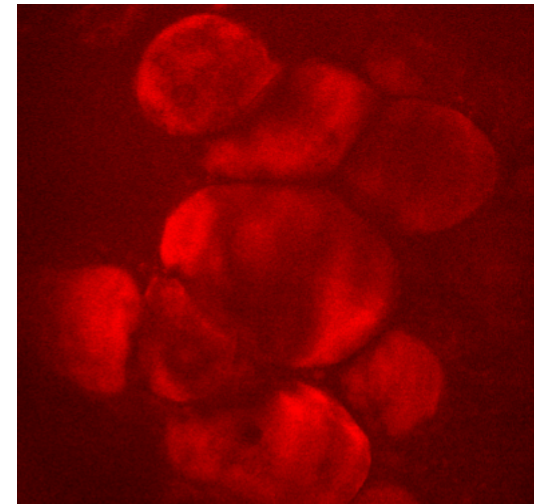
dermis: elasztin (TPEF)



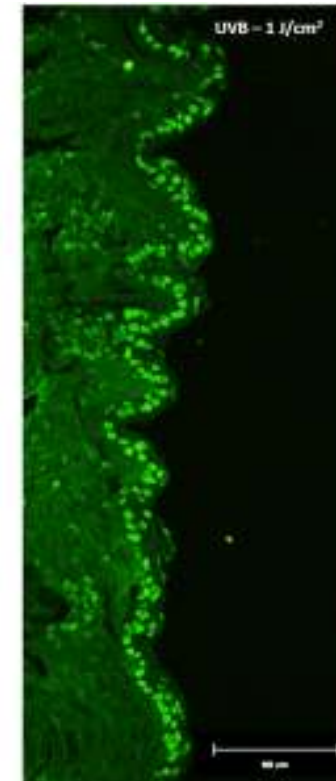
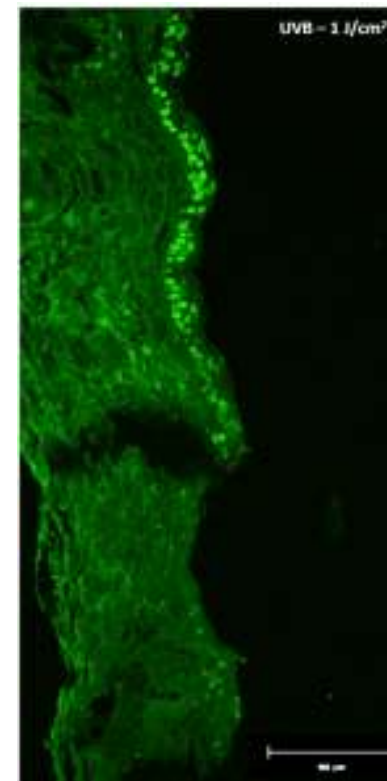
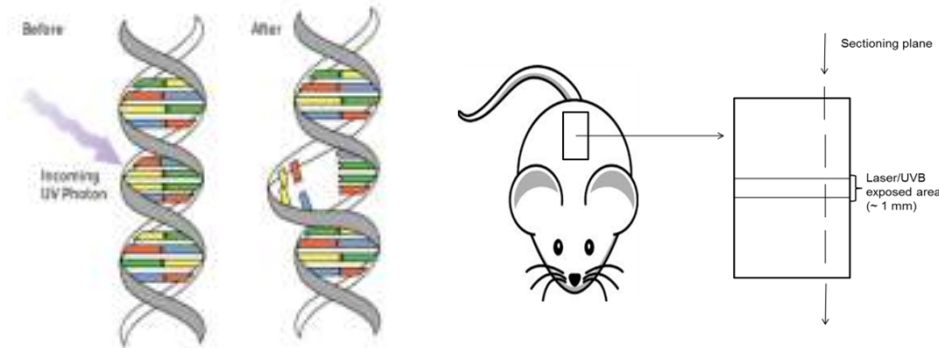
dermis: kollagén (SHG)



subcutis: zsírsejtek (CARS)



- **Károsító hatások:** hő-, mechanikai és fotokémiai
- Fotokémiai károsító hatások detektálása: intracell. kromofórok két foton excitációja következtében alakul ki, **sejtes rendszerekben ez a károsodás teljesen hasonló az UVB besugárzás által okozottakkal**
- **Cyclobutane pyrimidin dimerek:** kovalens keresztkötések a DNS azonos láncán lévő szomszédos pirimidin bázisai között - NER rendszer javítja – elégtelen javítás esetén – mutáció



de Grujil F.R. and Rebel H., *Early events in UV carcinogenesis-DNA damage, target cells and mutant p53 foci*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(2): p. 382-7.

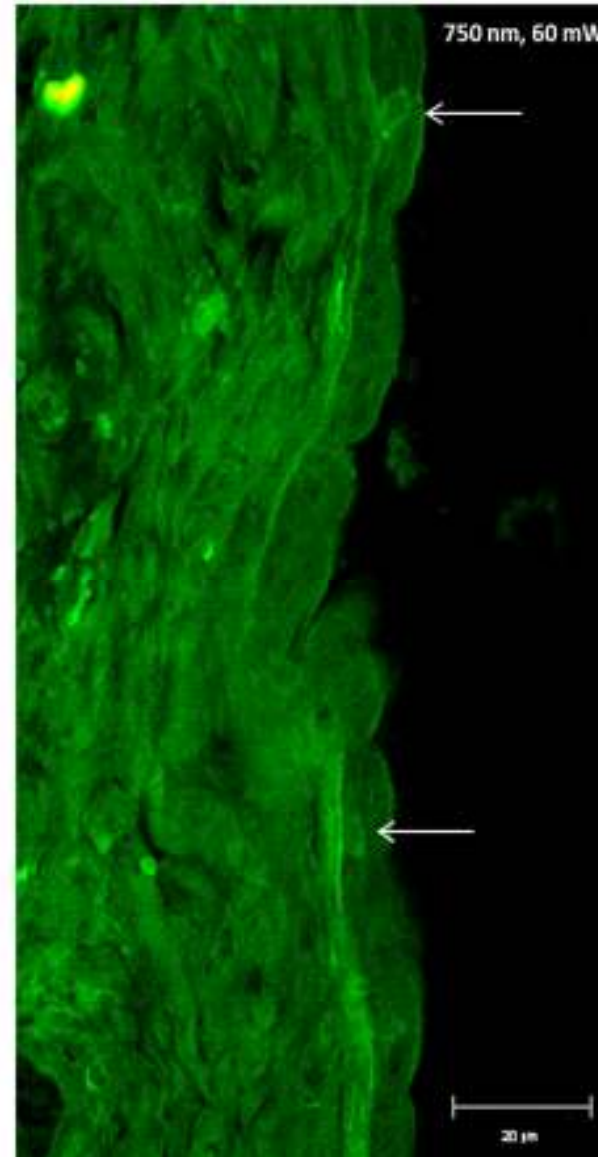
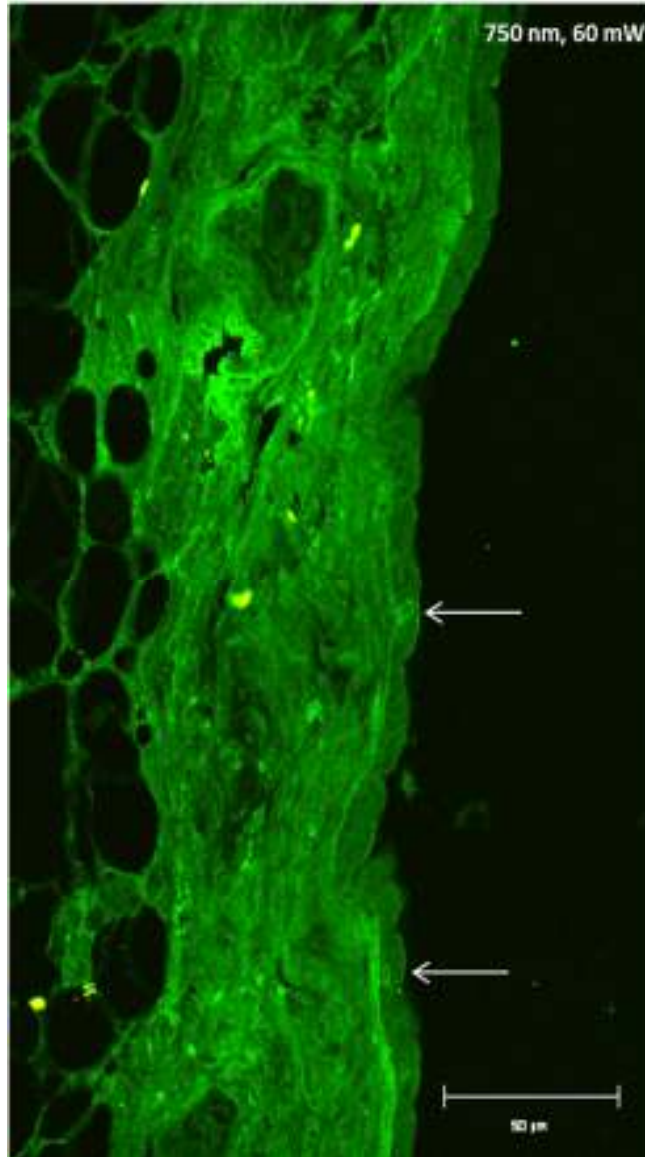
F.Fischer, B.Volkmer., S. Puschmann, R. Greinert., W. Breitbart, J. Kiefer, R. Wepf, *Skin imaged by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications*. Biophotonics and New Therapy Frontiers, 2006.

Haluszka D, Lorincz K, Banvolgyi A, Gyongyosi N, Kolonics A, Szipocs R, Karpati S, Wikonkal N: *The effect of repair mechanisms on risk of DNA damage during in vivo two-photon skin imaging*, J. OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 133:(1) p. S219. (2013)





Eredmények

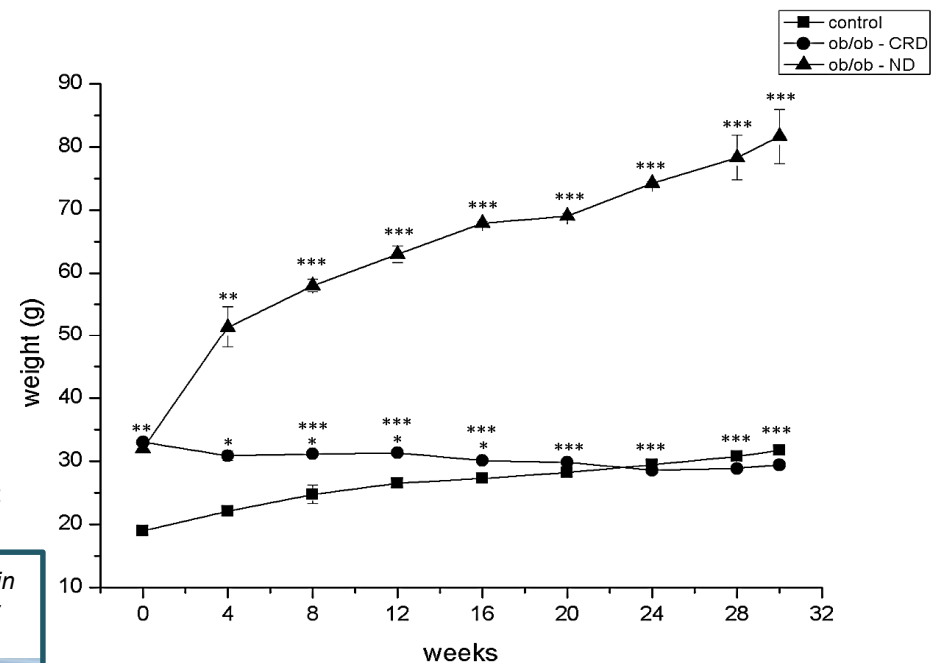
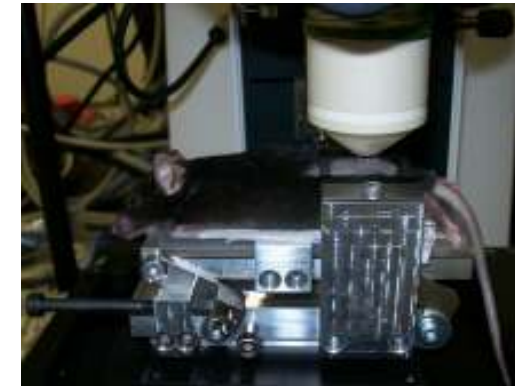
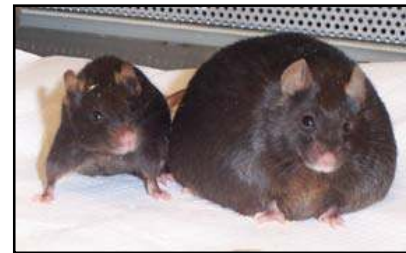


Ob/Ob egerek

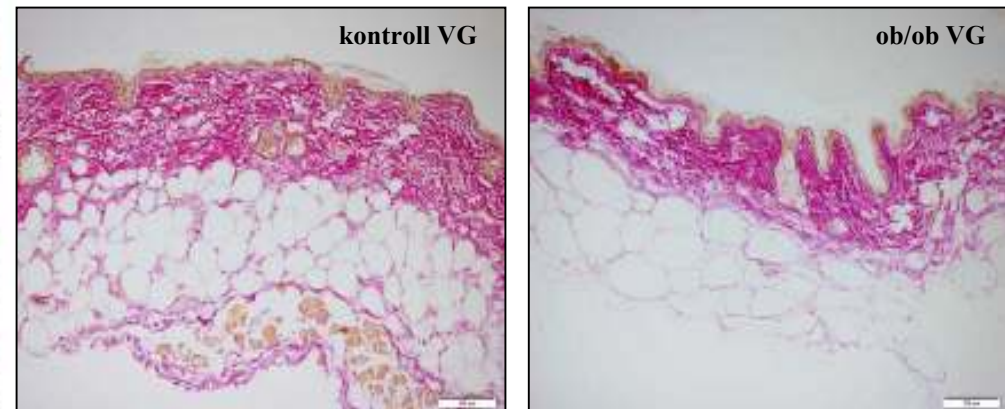
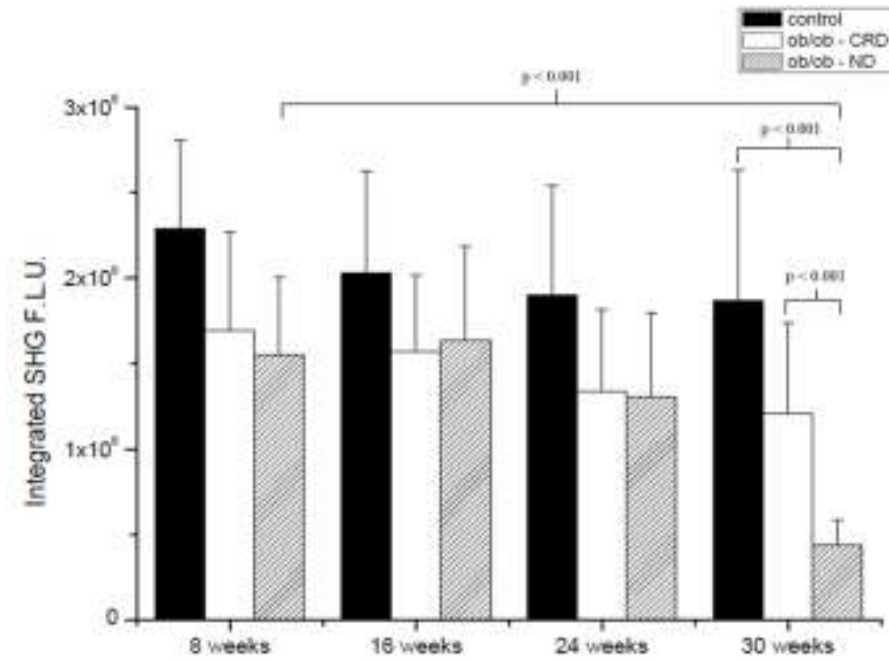
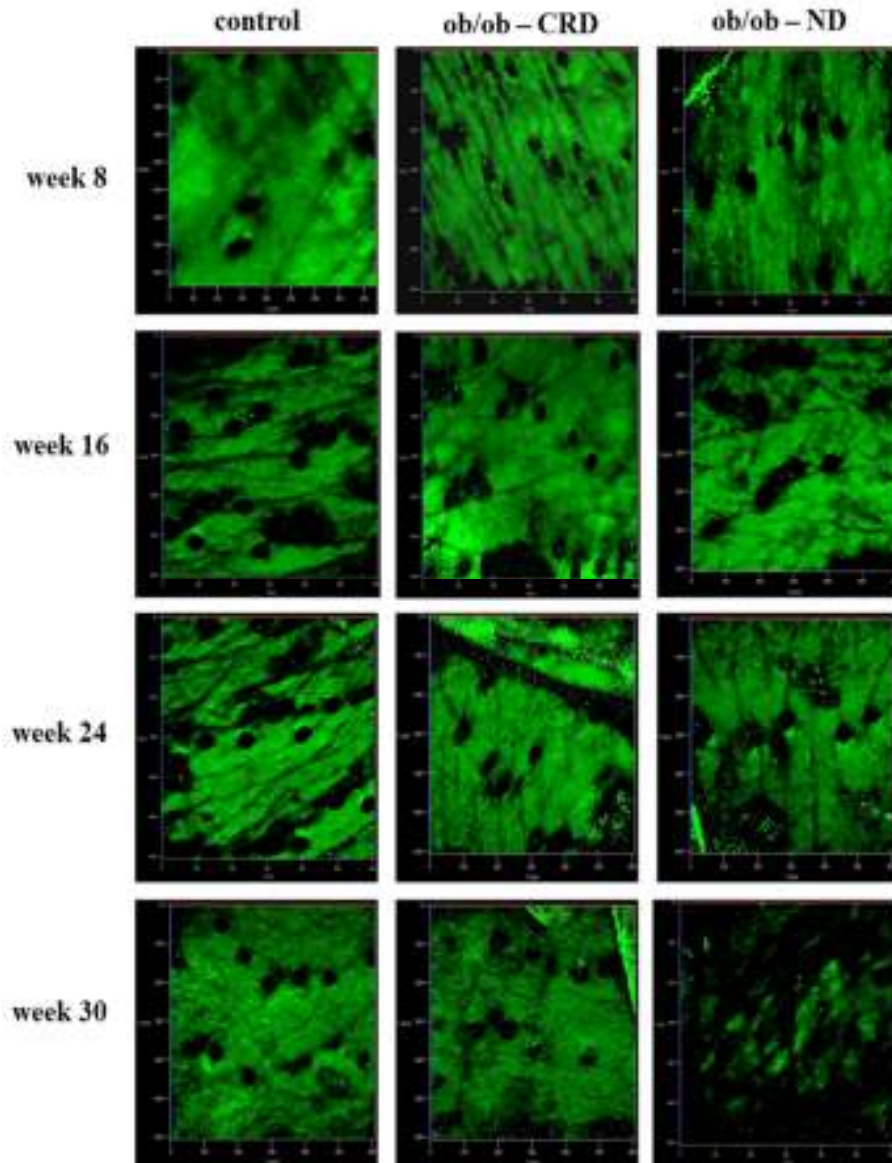
- a 2-es típusú diabétesz (csökkent inzulin érzékenység) modellállatai
- ob gén – leptin – étvágy szabályozása
- leptint kódoló gén mindkét allélja hibás – falánk, elhízott
- **2-es típusú diabétesz – bőr kollagén szerkezetének változásai**
- **3 egércsoport**
- AGEs – (advanced glycation endproducts) glükóz eredetű glikált végtermékek
- bőr autofluoreszcencia és SHG intenzitás értékei változnak
- megnövekedett zsírsejtek-szabad zsírsavak – csökken a fibroblast sejtek proliferációja + növelik a MMP13 szintjét – további szabad-gyök termelés – metabolikus betegségek + a bőr korai öregedése

Ezure T. and Amano S., *Negative regulation of dermal fibroblasts by enlarged adipocytes through release of free fatty acids*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 2004-9.

D. Haluszka, R. Szípcsoport, N. Wikonkál, A. Kolonics: *Characterization of Obesity in Murine Skin in vivo by CARS and SHG Microscopy Using a Cost Efficient, Fiber Laser Based Wavelength Extension Unit*, paper WeP-T1-P-13 (2014)



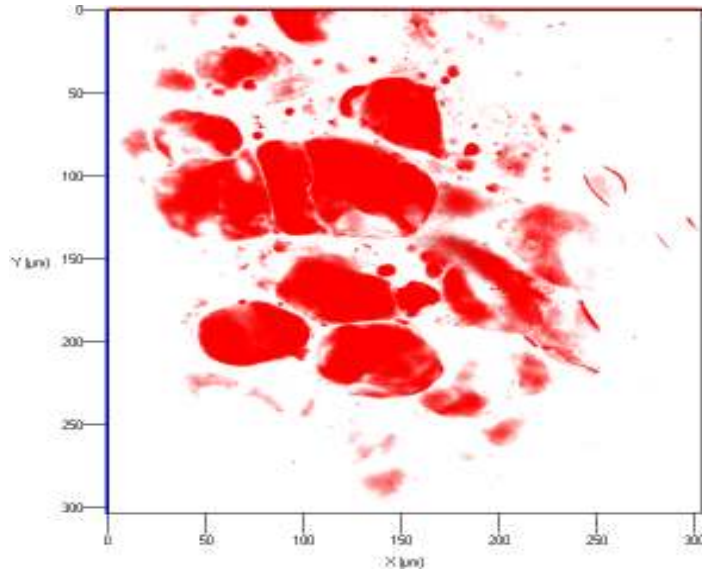
SHG (kollagén) + CARS (zsírsejtek)



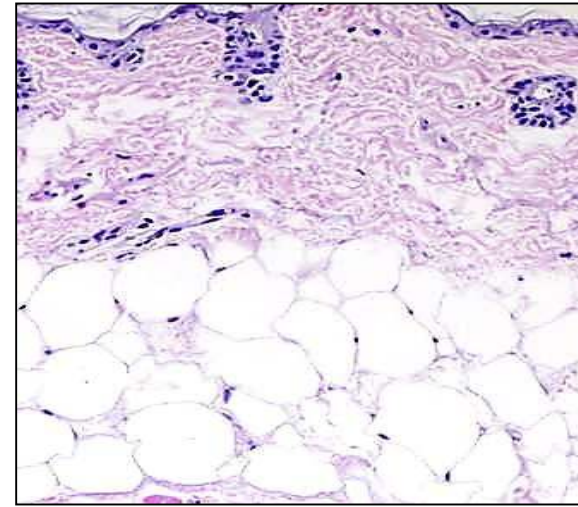
rutin szöveti festés

Koherens anti-Stokes Raman szórás mikroszkópia

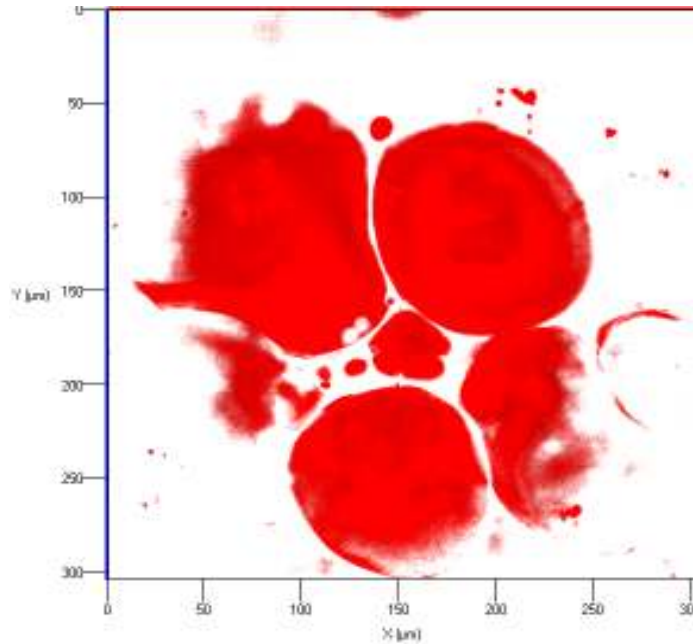
B6 kontroll CARS



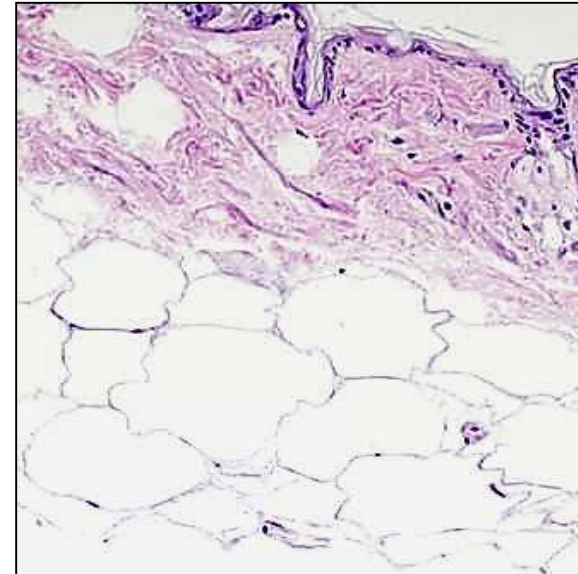
B6 kontroll HE



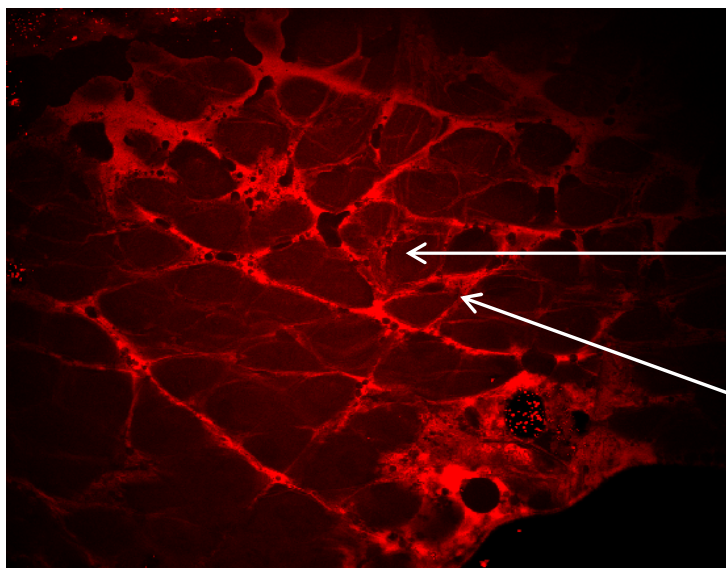
Ob/Ob CARS



Ob/Ob HE



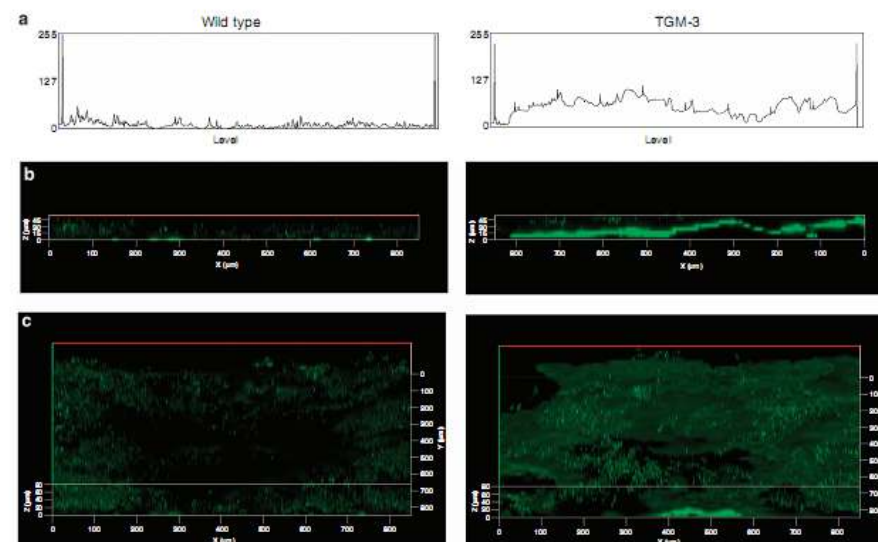
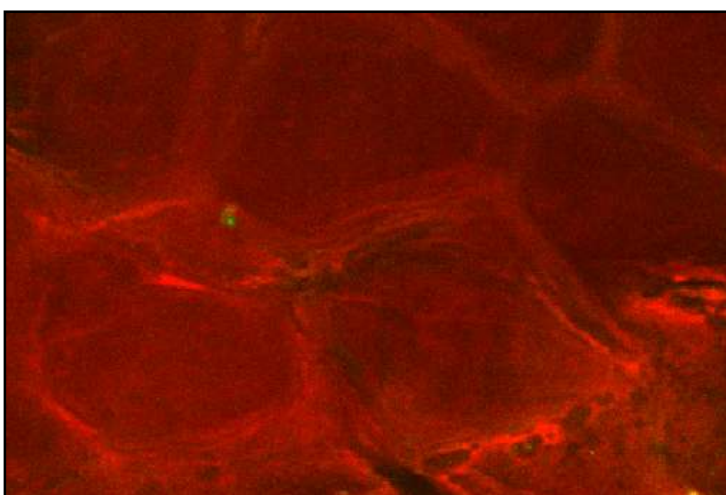
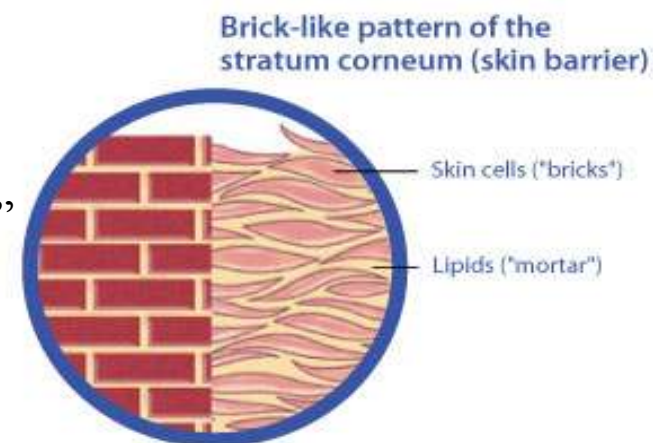
rutin szövettani festés



in vivo CARS

keratinociták – „tégla”

lipid – „habarcs”



Bognar P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas EI, Szipocs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpati S., *Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice.* J Invest Dermatol, **134**(1) 105-111 (2014)

- A hám bazális sejtrétegéből kiinduló rosszindulatú daganat, de áttétet nem képez
- Általában napfénynek kitett bőrfelületen alakul ki: arc, fül, nyak, vállak
- Több formája létezik
- Kezelés: sebészi excisió, 4-5mm biztonsági zónával
- Ennek ellenére gyakran recidívál
- A lézeres képalkotás megoldás lehet a pontos metszési sík meghatározásánál
- **Kollagén**, mint marker
- Ex vivo minták, műtét után





Semmelweis Egyetem
Bőr-, Nemifertani
és Bőronkológiai Klinika

Basaliomák vizsgálata nemlineáris mikroszkópia módszerekkel



Skin Research and Technology 2013; **19**: e297–e304
Printed in Singapore · All rights reserved
doi: 10.1111/j.1600-0846.2012.00643.x

© 2012 John Wiley & Sons A/S
Skin Research and Technology

Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography

Stefania Seidenari¹, Federica Arginelli¹, Sara Bassoli¹, Jennifer Cautela¹, Anna Maria Cesinaro², Mario Guanti¹, Davide Guardoli¹, Cristina Magnoni¹, Marco Manfredini¹, Giovanni Ponti¹ and Karsten König^{3,4}

¹Department of Dermatology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy,

²Department of Pathology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy,

³Department of Biophotonics and Lasertechnology, Saarland University, Saarbrücken, Germany and ⁴JenLab GmbH, Schillerstrasse 1, 0745, Jena, Germany

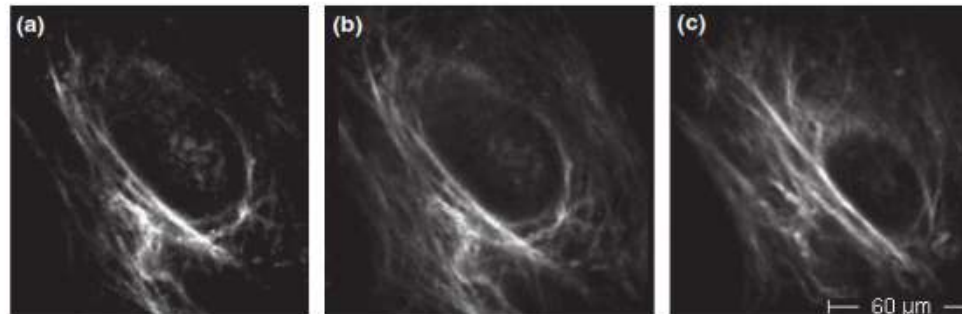


Fig. 4. Basal cell carcinoma. (a) 100 μm depth, excitation wavelength 800 nm. Shifting the wavelength to 800 nm, basaloid cells become less visible; employing an excitation wavelength of 820 nm basaloid cells disappear and it is possible to observe empty spaces surrounded by collagen fibres (phantom island); (b) 100 μm depth; (c) 120 μm depth.



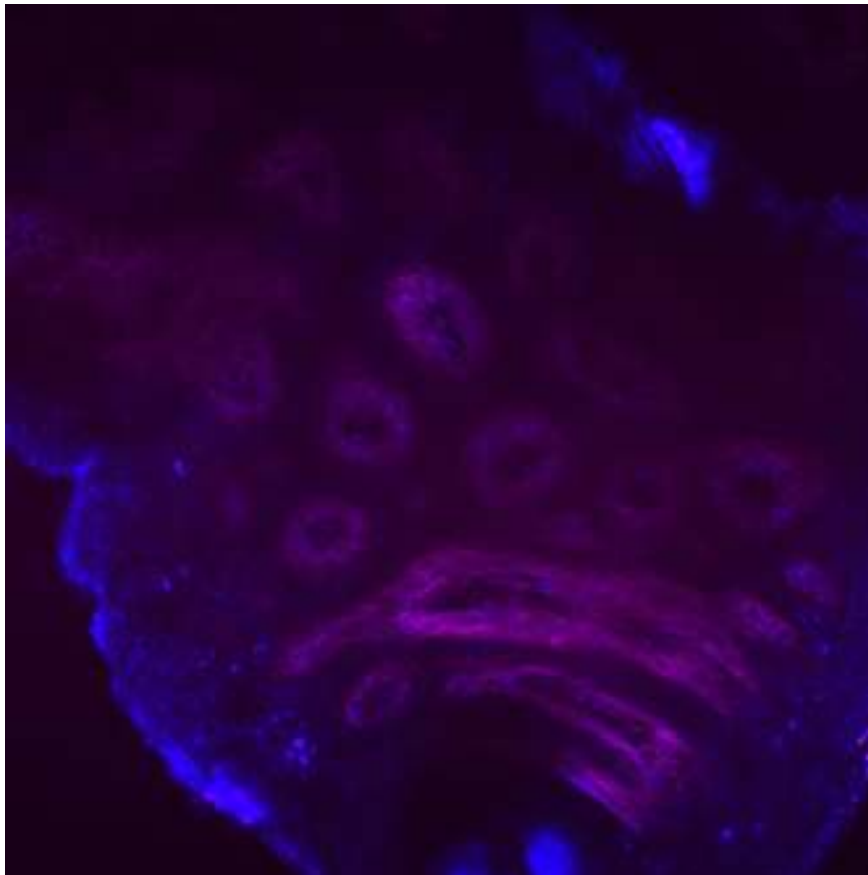
A bőr tumorok közös jellemzője és a tumor invázió kulcsfontosságú mozzanata az extracelluláris mátrix fehérjék (I. típusú kollagén) degradációja a mátrix metalloproteáz (MMP) enzim család aktiválásán keresztül.

- a tumor sejtek nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeznek
- kerítéslécszerű un. paliszád elrendezésűek
- az epidermális sejtek szabálytalan alakúak és random elrendezésűek
- a dermisben erős autofluoreszcenciát mutató daganatos sejtfejszkek láthatók
- a kollagén szerkezet károsodott a tumor területén
- markáns SHG intenzitás különbség tapasztalható a basalioma által érintett területen

Kollagén vizsgálata SHG módszerrel



Basalioma vizsgálata – 3D FiberScope fejlesztése



Kollagén szerkezet – SHG
Sejtek - autofluoreszcencia

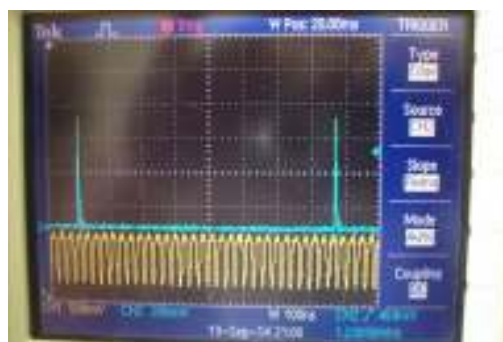
- Lézer hullámhossza
- Színszűrők kiválasztása

Szállézer specifikálása
Optikai szál specifikálása

Biztonságtechnikai vizsgálatok



FiberScope, a kézben tartott nemlineáris mikroszkóp



Lézeres fényforrás: 2-36 MHz-es ismétlési frekvenciájú, impulzusüzemű Yb-szállézer, erősítő rendszer

Leképező optika: kisméretű pásztászó mikroszkóp

Mind a lézerforrás, mind a mikroszkóp optimalizált az adott orvosi diagnosztikai feladathoz: alacsony ár!

Biztonságtechnikai vizsgálatok

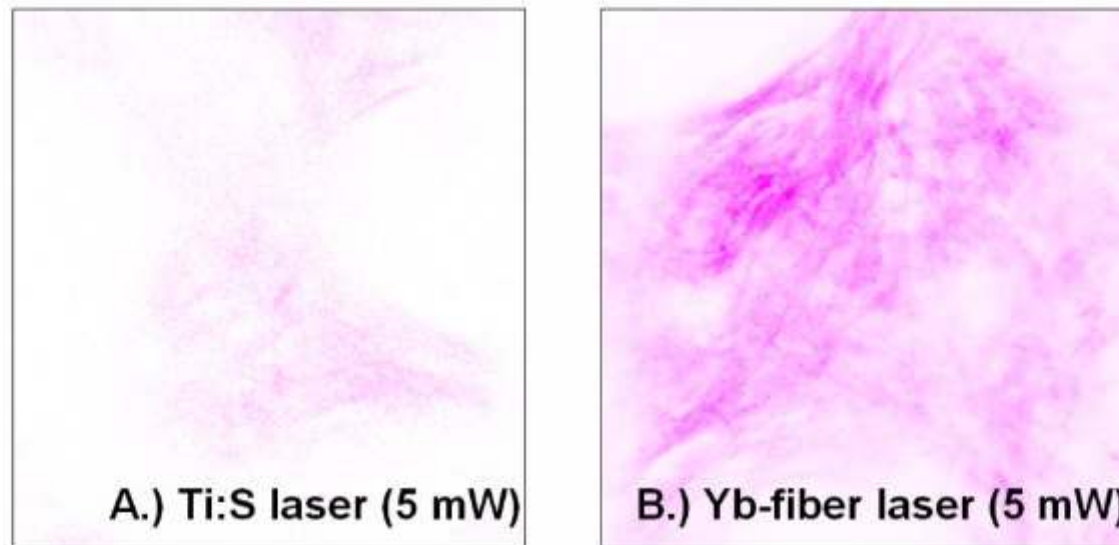


Figure 1. Comparison of SHG imaging performance of different mode-locked lasers having the same average power of 5 mW (on the sample) for nonlinear microscopy. Ex-vivo murine skin sample, imaging depth: $z = 30 \mu\text{m}$, same microscope settings. Collagen distribution measured by A) an industry standard, 80 MHz Ti:sapphire laser, and by B) our newly developed Yb-fiber oscillator and amplifier system (with a variable repetition rate).



DOI: 10.1111/exd.12464
www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy

Attila Kolonics^{1,2}, Zsolt Csiszovszki^{3,5}, Enikő R. Tőke^{3,5}, Orsolya Lőrincz^{3,5}, Dóra Haluszka^{1,4} and Róbert Szipöcs^{1,2}

¹Institute for Solid State Physics and Optics of Wigner RCP, Budapest, Hungary; ²R&D Ultrafast Lasers Ltd, Budapest, Hungary; ³Genetic Immunity Kft, Budapest, Hungary; ⁴Department of Dermatology, Venereology and Dermatoooncology, Semmelweis University Hungary, Budapest, Hungary

Correspondence: Róbert Szipöcs, Institute for Solid State Physics and Optics of Wigner RCP, PO Box 49, H-1525 Budapest, Hungary, Tel./Fax: +36 1 3922582, e-mail: szipocs.robert@wigner.mta.hu

⁵Present address: eMMUNITY Inc., 4400 East West Hwy, Bethesda, MD 20814, USA

Abstract: Epidermal Langerhans cells (LCs) function as professional antigen-presenting cells of the skin. We investigated the LC-targeting properties of a special mannose–moisty-coated pathogen-like synthetic nanomedicine DermaVir (DV), which is capable to express antigens to induce immune responses and kill HIV-infected cells. Our aim was to use multiphoton laser microscopy (MLM) *in vivo* in order to visualize the uptake of Alexa-labelled DV (AF546-DV) by LCs. Knock-in mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the langerin gene (CD207) were used to visualize LCs. After 1 h,

AF546-DV penetrated the epidermis and entered the eGFP-LCs. The AF546-DV signal was equally distributed inside the LCs. After 9 h, we observed AF546-DV signal accumulation that occurred mainly at the cell body. We demonstrated in live animals that LCs picked up and accumulated the nanoparticles in the cell body.

Key words: eGFP-Langerin knock-in mice – *in vivo* – Langerhans cells – multiphoton laser microscopy – nanomedicine formulation

Accepted for publication 3 June 2014

Figure 1. Penetration kinetics of AF546-DV through the stratum corneum in enhanced green fluorescent protein (eGFP)-Langerin knock-in mouse ear *in vivo*. xz-Multitracking sections were composed from a stack of xy-optical sections with 5 μm distances between the sections. The sections were recorded from the stratum corneum ($Z = 0 \mu\text{m}$) to the epidermis ($Z = 35\text{--}40 \mu\text{m}$). These representations reveal the penetration profiles of AF546-DV into eGFP-Langerin knock-in mouse skin reaching an average of 20 μm penetration depth underneath the honeycomb-shaped corneocyte layer after 1 h of topical treatment. AF546-DV diffused in the whole depth of the skin after 9 or 24 h despite of the fact that a part of the AF546-DV formula dried on the stratum corneum. Control: intact skin without AF546-DV.

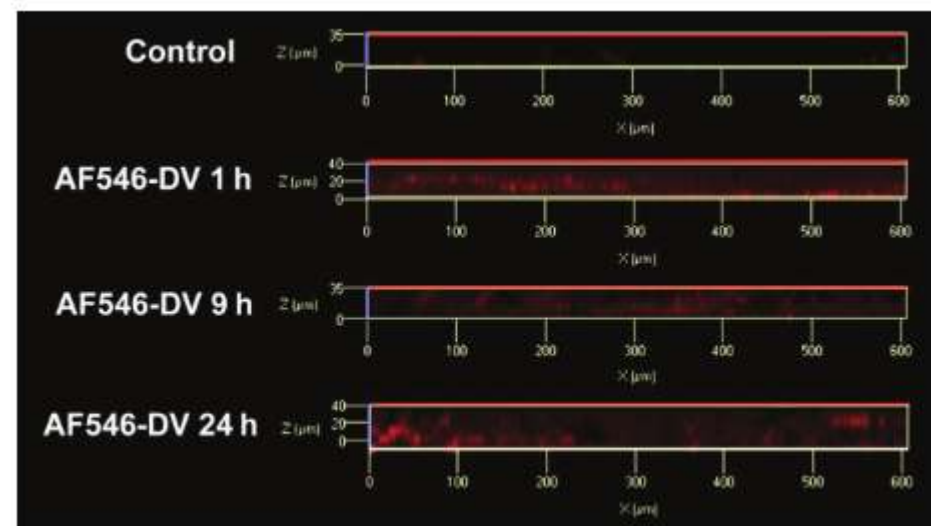
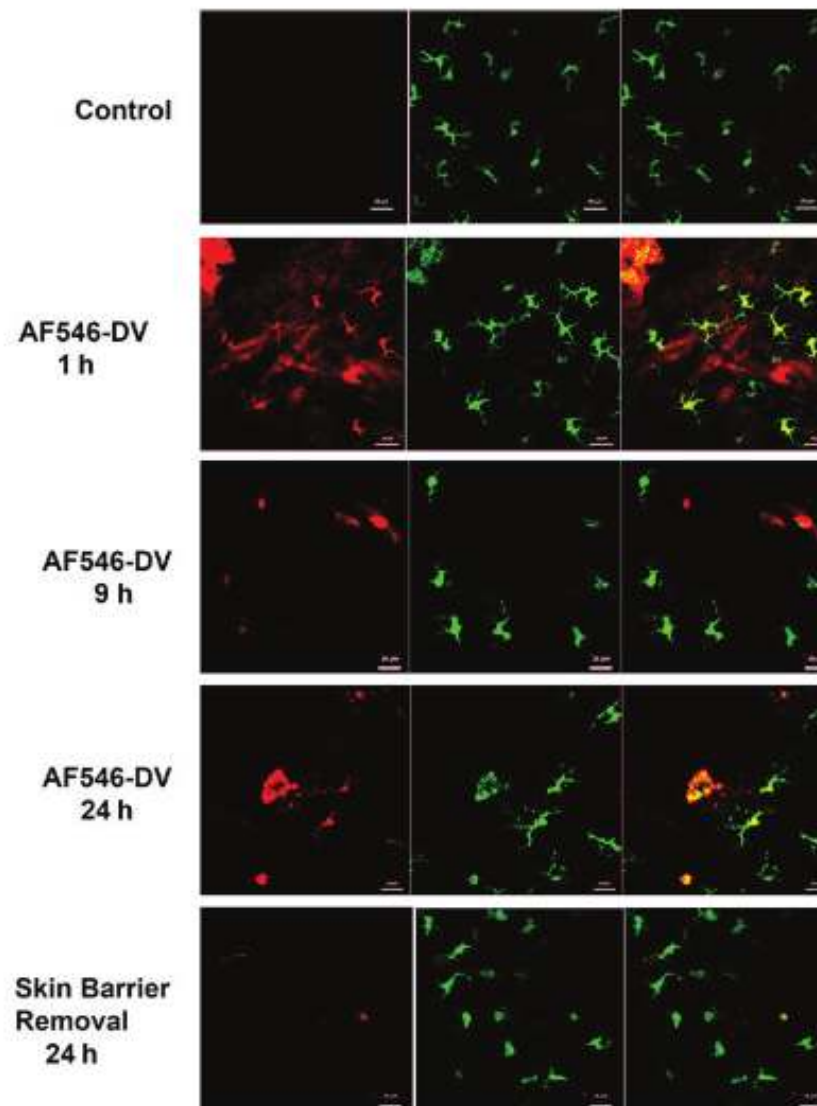




Figure 2. Kinetics of AF546-DV uptake by Langerhans cells (LCs) in eGFP-Langerin knock-in mouse ear *in vivo*. Nearly all LCs had incorporated AF546-DV after 1 h of topical treatment: strong colocalization was detected in both channels [NDD 2 – green/eGFP (middle column) versus NDD 1 – red/AF546-DV (left column)] as presented on the merged pictures (right column). Images of red light emission also revealed that the nanoparticles were distributed homogenously in all parts of the LCs. After 9 h, the intensity of red light emission by AF546-DV decreased significantly and disappeared from the dendrites and concentrated around the nucleus. Intriguingly, after 24 h, the nuclear location as well as a weak signal of AF546 in the dendrites could still be observed. The removal of the stratum corneum resulted in the activation of the vast majority of the LCs characterized by a rounded potato-like shape. The scale bar represents 20 μm .



Publikációk 2014-ben

Bognar P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas E, Szipocs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpati S: Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. **J INVEST DERMATOL**, 134:(1) pp. 105-111. (2014)

Haluszka D, Lorincz K, Szipocs R, Gyöngyösi N, Bánvölgyi A, Keszeg A, Kárpáti S, Wikonkál NM: In vivo assessment of potential carcinogenicity of multi-photon microscopy as the function, of wavelength in the near-infrared range. **J INVEST DERMATOL**, 134: p. S86. (2014)

Kolonics A, Csiszovszki Zs, Tőke ER, Lőrincz O, Haluszka D, Szípcős R: In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. **EXP DERMATOL**, 23:(8) pp. 596-605. (2014)

Lorincz K, Banvolgyi A, Haluszka D, Gyongyosi N, Szipocs R, Marton D, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K, Karpati S, Wikonkal NM: Analysis of photoaging in mice with impaired epidermal antioxidant defense using in vivo multiphoton microscopy. **J INVEST DERMATOL**, 134:(2) p. S84. 1 p. (2014)

Toke ER, Lorincz O, Csiszovszki Z, Somogyi E, Felfoldi G, Molnar L, Szipocs R, Kolonics A, Malissen B, Lori F, Trocio J, Bakare N, Horkay F, Romani N, Tripp CH, Stoitzner P, Lisziewicz J: Exploitation of Langerhans cells for in vivo DNA vaccine delivery into the lymph nodes. **GENE THERAPY**, 21:(6) pp. 566-574. (2014)

Csákányi A, Szípcős R: Fiberscope pásztázó nemlineáris mikroszkóp optikai rendszerének tervezése, Kvantumelektronika 2014, Paper P64

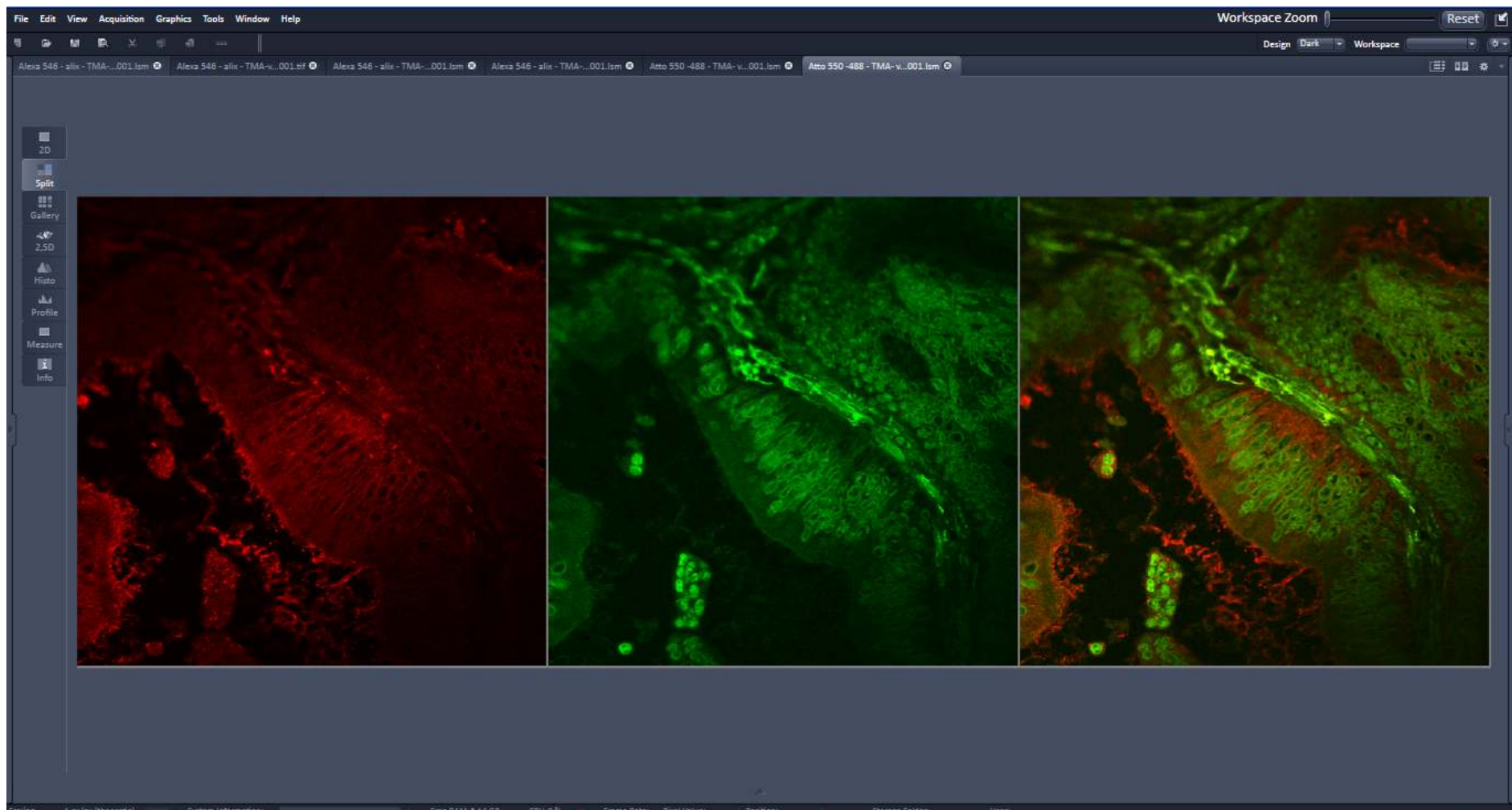
Csákányi A, Szípcős R: GRIN lencsés CARS endomikroszkóp optikai leképező rendszerének színhiba korrekciója Kvantumelektronika 2014, Paper P65

Haluszka D, Szípcős R, Wikonkál N, Kolonics A: Az elhízás hatásának ex vivo CARS és in vivo SHG mikroszkópiás vizsgálata egérbőr modellen új, Yb-szálerősítőn alapuló Stokes fényforrással Kvantumelektronika 2014, Paper P21

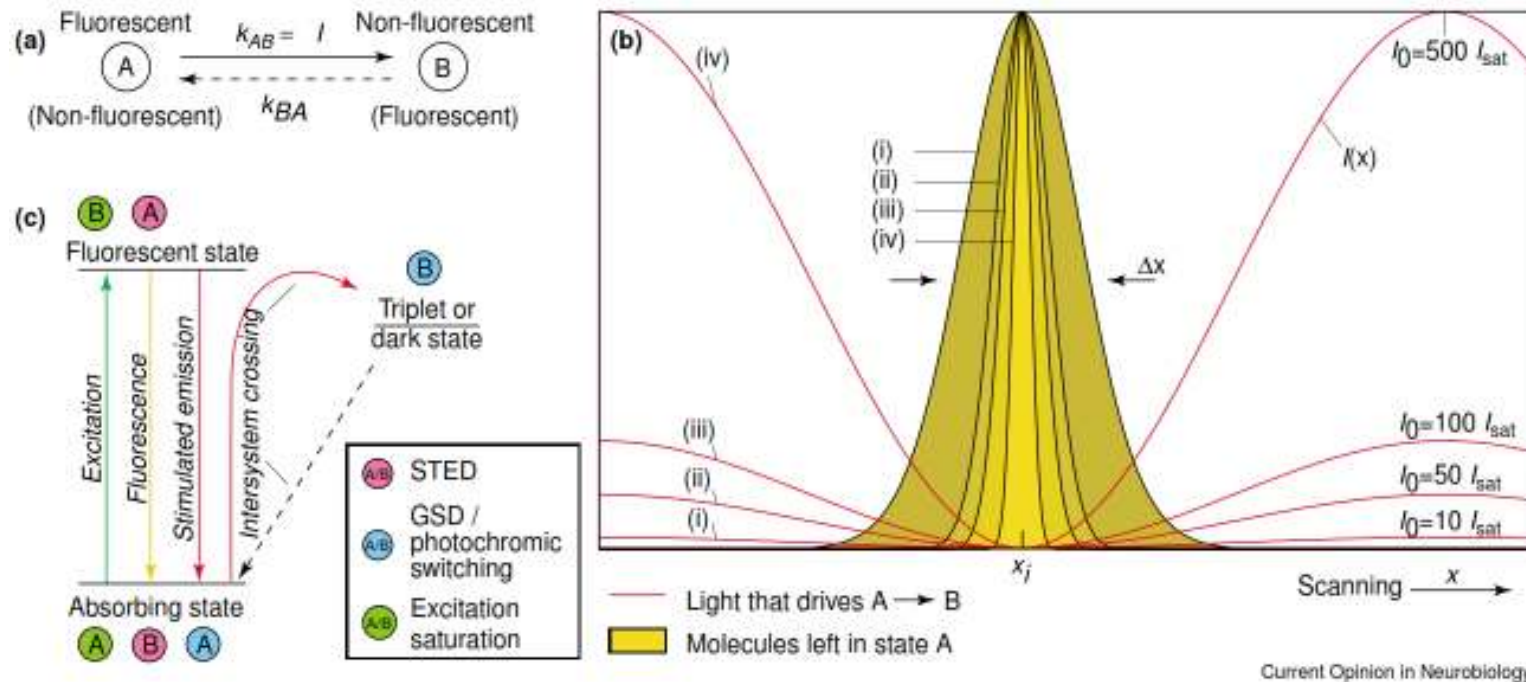
Haluszka D, Lőrincz K, Wikonkál N, Szípcős R: Az in vivo kétfoton mikroszkópiában használatos, közeli infravörös tartományban működő femtoszekundumos lézerek biztonságtechnikai vizsgálata, Kvantumelektronika 2014, Paper P22

Daganatok diagnosztikája: szükséges a felbontás növelése!

Nanoszkópia, de csak azokon a területeken, ahol az valóban szükséges!



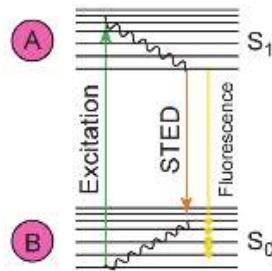
Szuperfelbontású, többfluorofóros mikroszkópia (STED)



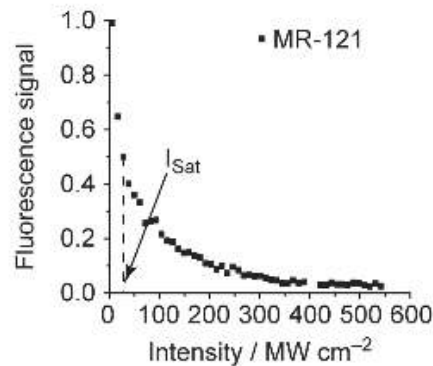
A diffrakciós korlát átlépése a STED (stimulated emission by depletion) rendszer esetében: (a) a STED mikroszkópiás méréshez használt fluoreszcens jelölés két állapota A (fluoreszcens állapot) és B (nem fluoreszcens állapot). Az A \rightarrow B optikai átmenet rátája: $k_{AB} = \sigma I$, ami arányos az ürítéshez (depletion) használt fény intenzitásával. A fordított irányú B \rightarrow A átmenet rátája k_{BA} . (b) Az (i)-(iv)-gyel jelölt, sárgával színezett területek jelölik azokat a tartományokat, ahol a fluorofórok a különböző fényintenzitás értékek (I) esetén a fluoreszcens A állapotban maradnak, ahol a csúcshintenzitás értékek (I_0) az ún. telítési intenzitás (I_{sat}) 10-szeres, 50-szeres, 100-szoros és 500-szoros értékét veszik fel. Az egyes $I(x)$ függvények mutatják az ürítő (depletion) nyalábok eloszlását az x tengely mentén, melyek az $x = 0$ pozícióban nulla értéket vesznek fel. Az ürítő nyalábok (tipikusan fánk alakú) intenzitás értékének növelésével a fluoreszcens tartomány szélessége Δx elvileg tetszőlegesen csökkenthető, így egy pásztázó mikroszkópban ez a felbontás a STED módszerrel elérhető. (c) A STED folyamat energia diagramja (rózsaszínnel jelölve).

Szuperfelbontású, többfluorofóros mikroszkópia (STED)

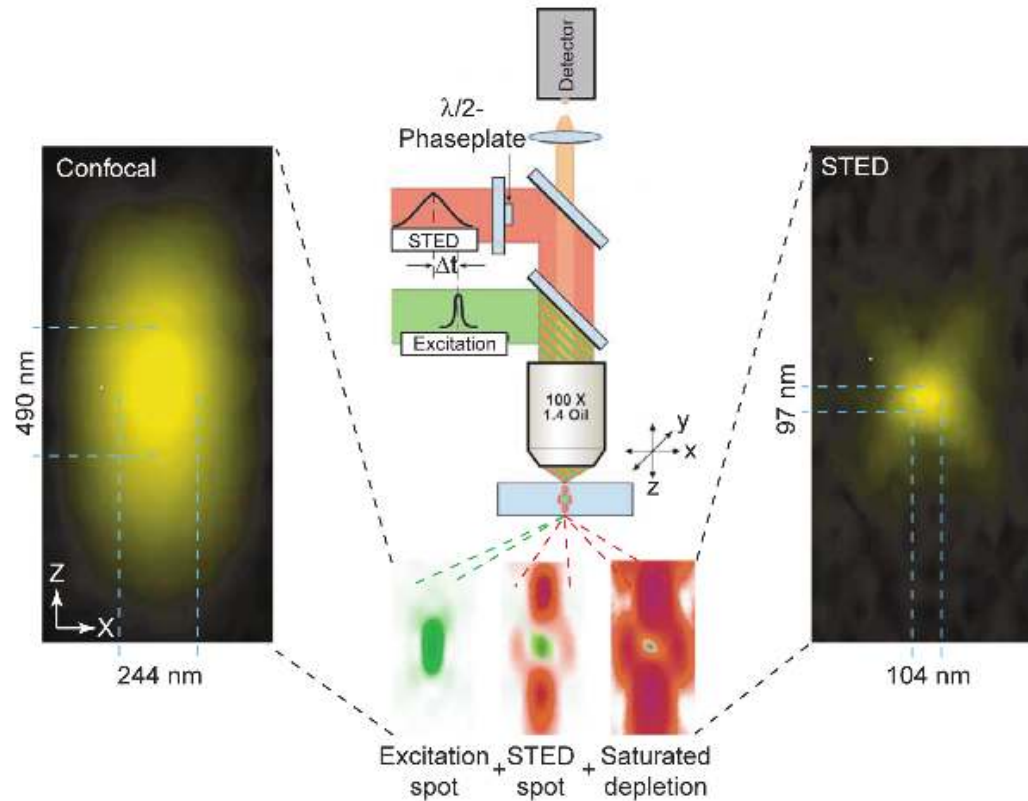
(a) STED principle



(b) Saturated depletion of state A



(c) STED microscope

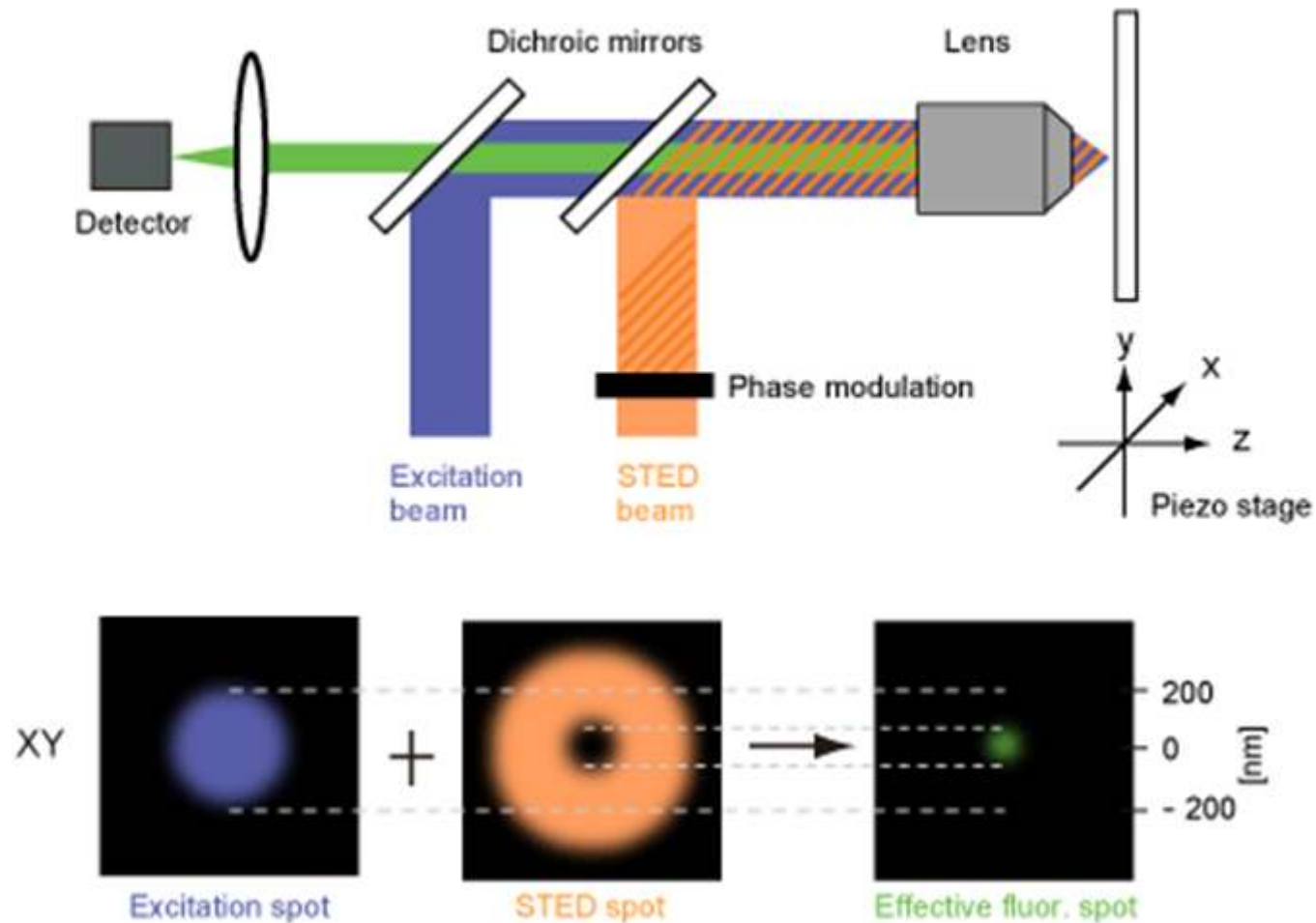


Current Opinion in Neurobiology

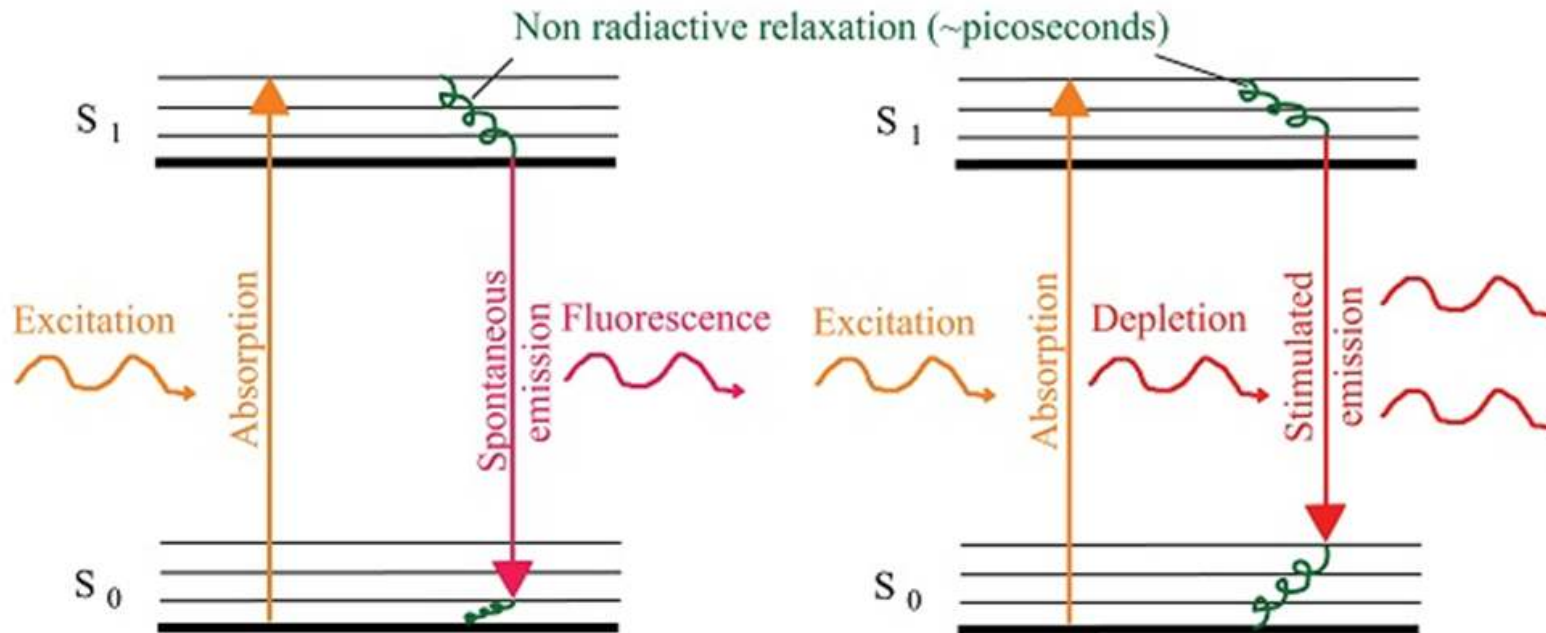
(a) A STED folyamat energia diagramja. Az alkalmazott fluorofórt az S_0 alapállapotból az S_1 gerjesztett állapotba visszük zöld (nagyenergiájú) fény segítségével. Az S_1 állapotból a fluorofór vagy spontán vagy indukált emisszió (STED folyamat) révén jut vissza az S_0 alapállapotba. (b) Az S_1 állapot üritése a STED folyamatban. (c) Bal oldalon: Fluoreszcencia intenzitás eloszlás a z és x tengelyek mentén a STED alkalmazása nélkül. Ugyanez jobb oldalon a STED alkalmazása után. Középen: A STED mikroszkóp felépítése.

Szuperfelbontású, többfluorofórus mikroszkópia (STED)

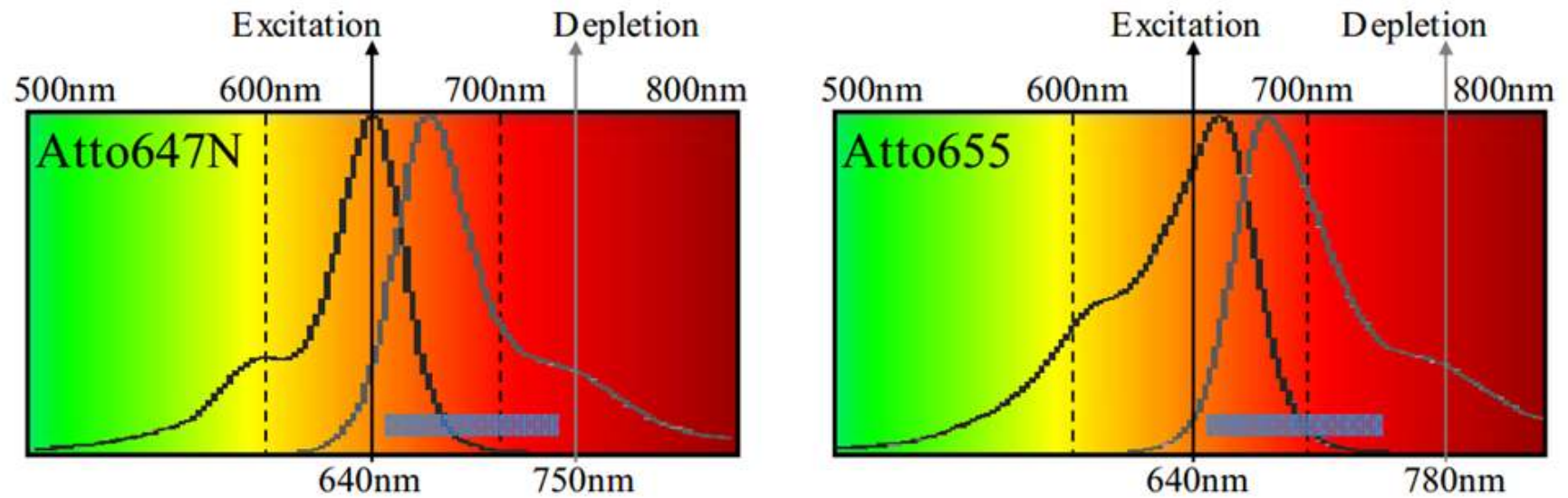
Stimulált emisszió lemerítés (STED)



Stimulált emissziós merítés

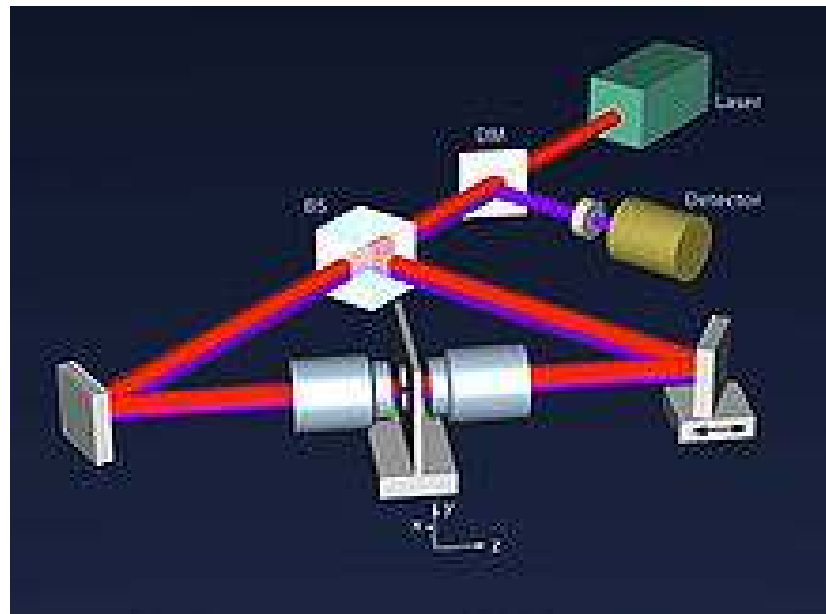


Stimulált emissziós merítés



Az üritési hullámhossz optimális megválasztása

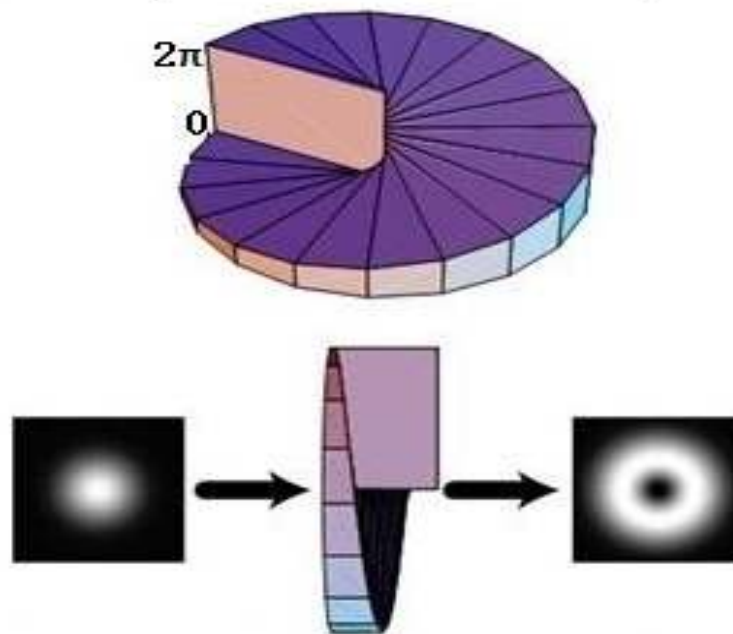
4pi mikroszkópia



Felbontás növelés a z tengely mentén, interferencia

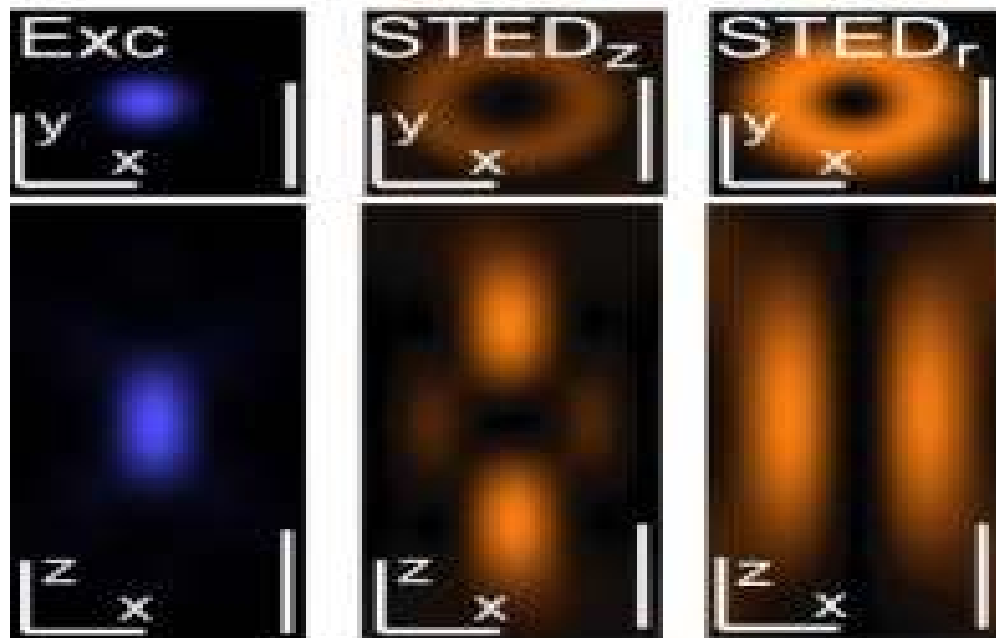
A fázismasz (vortex)

Courtesy of Courtial and O'Holleran, 2007



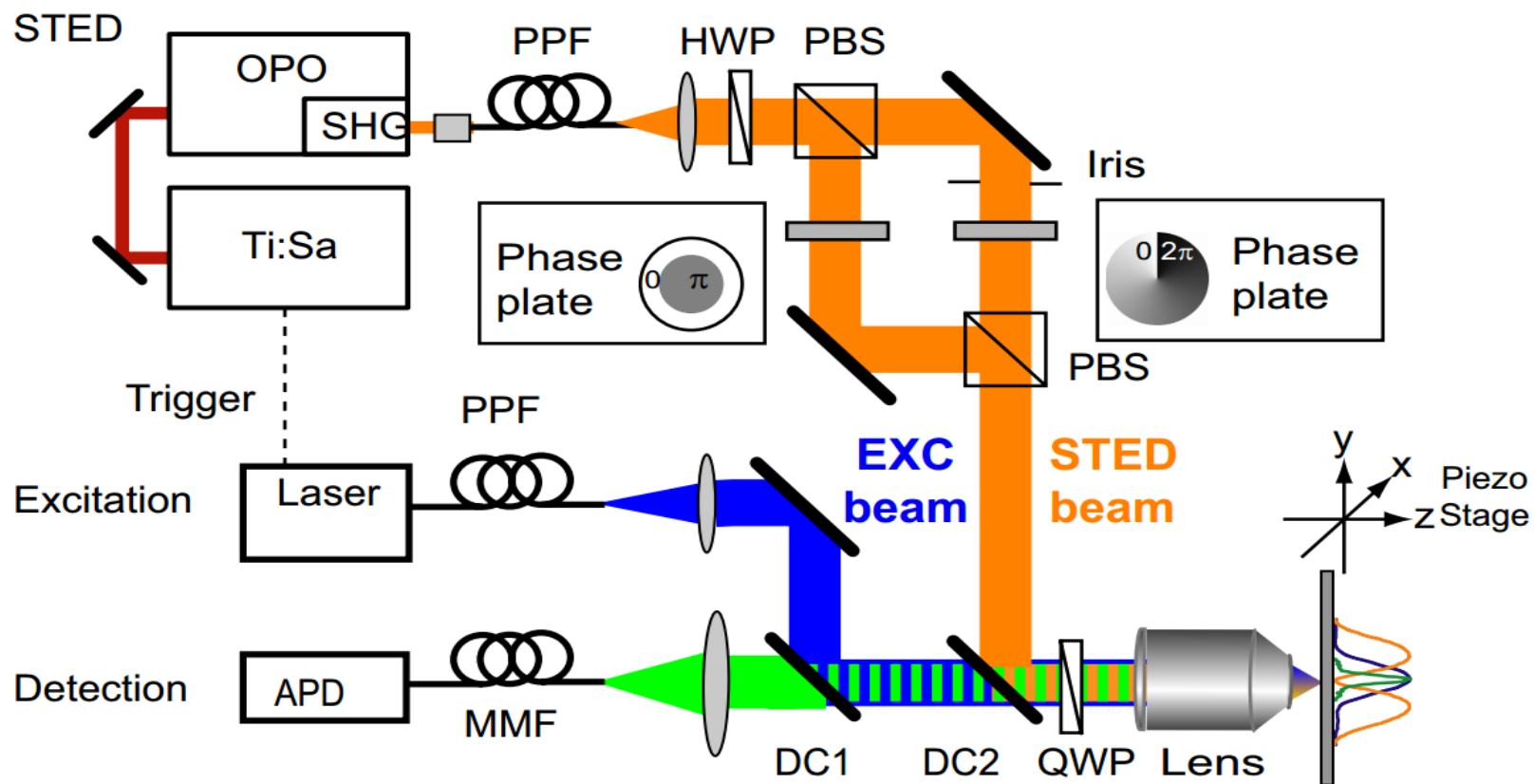
STED_R

A fázismasz (vortex)

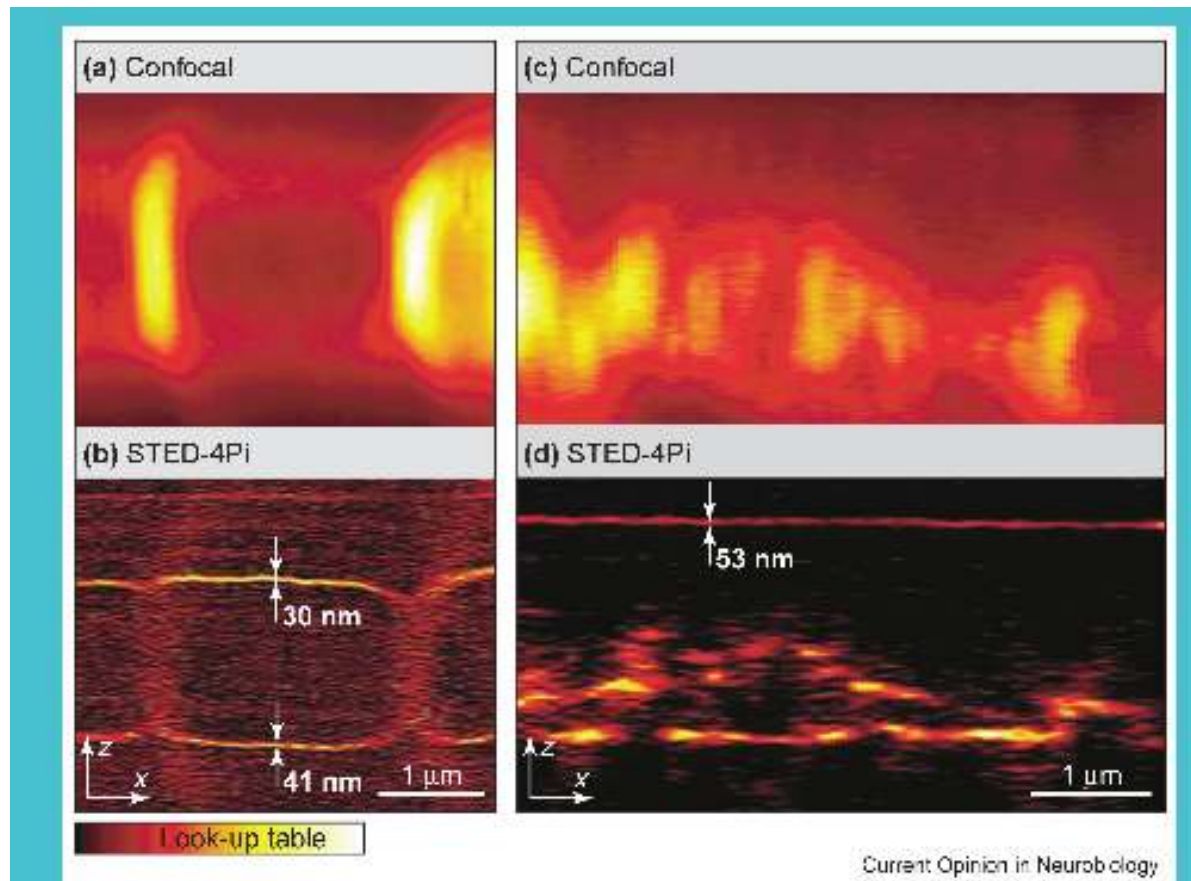


Szuperfelbontású, többfluorofórus mikroszkópia (STED)

3D STED



Szuperfelbontású, többfluorofóros mikroszkópia (STED)

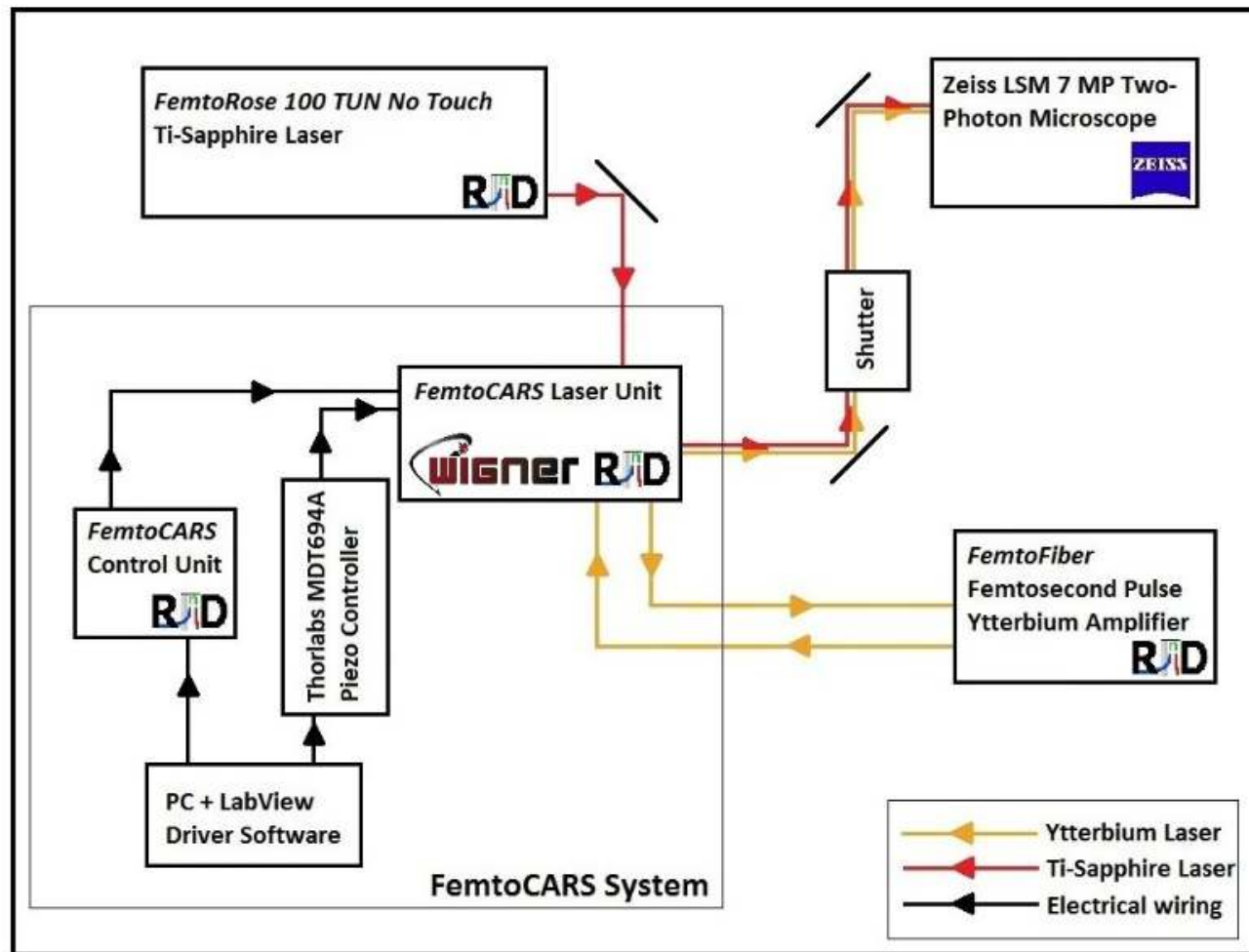


Egy STED-4Pi mikroszkóp és egy ú.n. konfokális mikroszkóp optikai tengelyen mért (z) irányú felbontásának összehasonlítása egy baktérium (*Bacillus megaterium*) sejtmembránjának RH 414 festékkel történő megfestése után. A STED-4Pi mikroszkóp hosszirányú felbontása 30-40 nm!

Szuperfelbontású, többfluorofóros mikroszkópia (STED)



STED építés CARS mikroszkópból?



Szuperfelbontású CARS mérőrendszer?

CARS SYSTEM INSTALLED AT UNIVERSITY OF SZEGED

Related articles

CARS imaging system installed at the University of Szeged, Department of Neurology (Prof. Gábor Tamás lab), June 2014

Photo Gallery



Elmélet

$$p(x, y) \approx Ce^{-\frac{(x-\mu_x)^2}{2\Delta^2} - \frac{(y-\mu_y)^2}{2\Delta^2}}$$

$$\Delta_{\min} = \frac{\Delta}{\sqrt{N}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

(1) A foton detektálás valószínűségi eloszlását az optikai tengelyre merőleges irányban $\rho(x,y)$ egy Gauss függvénnyel közelíthetjük, ahol C normálási konstans, μ_x és μ_y egy adott képpont eloszlásfüggvényének (PSF) közepe, Δ pedig az Abbe-féle diffrakciós korlát.

(2) Amennyiben tudjuk, hogy egy adott időpillanatban a fény csak egy adott pontból érkezhetsen, akkor a PSF középpontjának helye Δ_{\min} pontossággal megbecsülhető, ahol N a detektált fotonok száma. Vagyis a mikroszkóp felbontása egyfotonos detektálás esetén $N^{1/2}$ -szeresére növelhető!

Elmélet

Az egyenkénti molekula lokalizációs mikroszkópia (Single-molecule localization microscopy, SMLM) magában foglalja az összes olyan eljárást, amely egy-egy emitter elkülönítésén alapszik. Alapesetben a PSF mérete határozza meg az elérhető felbontást. Azonban, ha tudjuk, hogy adott térrészen belül csak egy pont sugároz, akkor ennek a pontnak a helye meghatározható, méghozzá az intenzitással arányos pontossággal, ahol Δ_{\min} a helymeghatározás pontossága, Δ a diffrakciókorlátos folt FWHM értéke, N az detektált fotonok száma:

$$\Delta_{\min} = \frac{\Delta}{\sqrt{N}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Elmélet

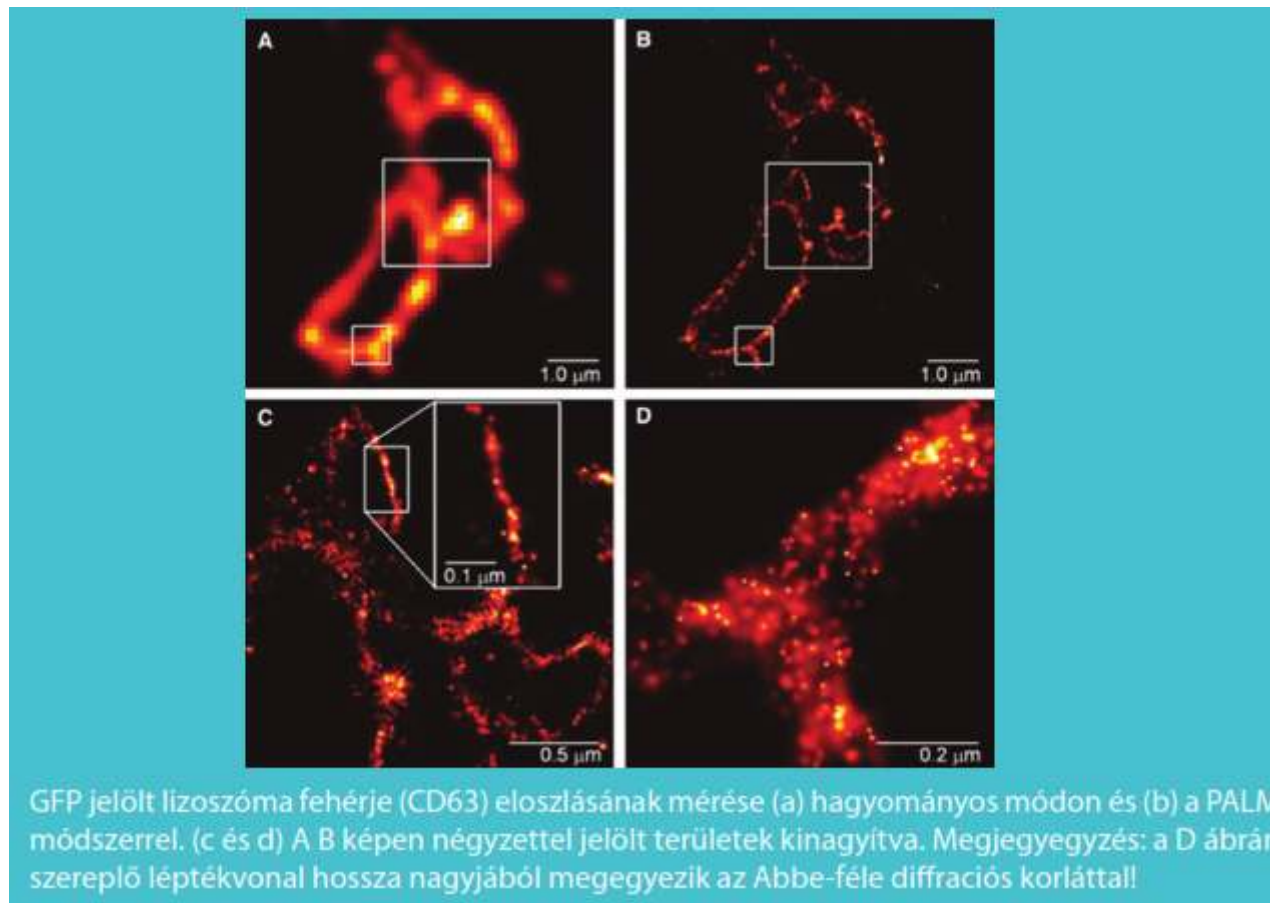
Az SMLM eljárás azzal kínál megoldást erre, hogy **egyszerre csak néhány (egymástól távol lévő) emittert aktivál**, lehetővé téve ezek helyeinek meghatározását, **majd deaktiválja őket**. A ciklus ismétlésével, más-más emitterek aktiválásával és deaktiválásával az összes emitter helyzete meghatározható.

A célnak megfelelő **fluorofor nem fluoreszcens, sötét állapotban** van jelen egészen addig, **míg véletlenszerűen aktiválásra nem kerül, általában alacsony intenzitású lézer által**. Ekkor egy lézer emisszióra stimulálja majd kifakítja vagy sötét állapotba kapcsolja vissza azt, jellemzően 10-100 ms alatt. **A kibocsájtott fotonokat kamera rögzíti**, és az így készült képből nagy pontossággal meghatározható a fluorofor helyzete. **Ciklusonként csak néhány fluorofor kerül aktív, gerjeszthető állapotba**, ahhoz, hogy az összes festékanyag helyzete meghatározható legyen, **több, akár több száz kép készítése szükséges**. Ezekből aztán **matematikai módszerekkel elkészíthető a szuperrezolúciós kép**.

Stohasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STORM), Fotoaktivált lokalizációs mikroszkópia (PALM) Fluoreszcens fotoaktivált lokalizációs mikroszkópi (fPALM)

A STORM, a PALM és az fPALM eljárások olyan szuperrezolúciós technikák, amik a festékanyag lépésenkénti aktiválását és időbeni és térbeni elkülöníthetőségét használják fel a szuperrezolúciós kép elkészítéséhez. Ennek során a fluoroforoknak csak egy optikailag elkülöníthető része kerül aktiválásra adott időben, így minden egyes festékrészecske helyzete pontosan meghatározható. Ezután az aktivált fluoroforok deaktiválásra kerülnek, majd újabb festékrészecskék aktiválásával újabb ciklus kezdődik. A folyamat során számos fluorofor helyzete kerül meghatározásra, így elkészíthető a szuperrezolúciós kép. A fenti három módszer rövid időn belül, de egymástól függetlenül került kifejlesztésre, alapelvük azonos. **A STORM eljárást eredetileg proteinekhez és aminosavakhoz kapcsolt Cy3 és Cy5 festékek használatával írták le, míg a PALM és fPALM eljárásokat fotoaktiválható fehérjékkel.** Az elérhető felbontás kb. 20 nm laterális irányban és 50 nm axiálisan, időbeli skálán 0,1-0,33 s.

Mérési eredmény



Alkalmazás az idegtudományban



tudomány /
science

Agykutatás
Pszichológia
Pedagógia
Csillagászat
Matematika

f

tudomány / science

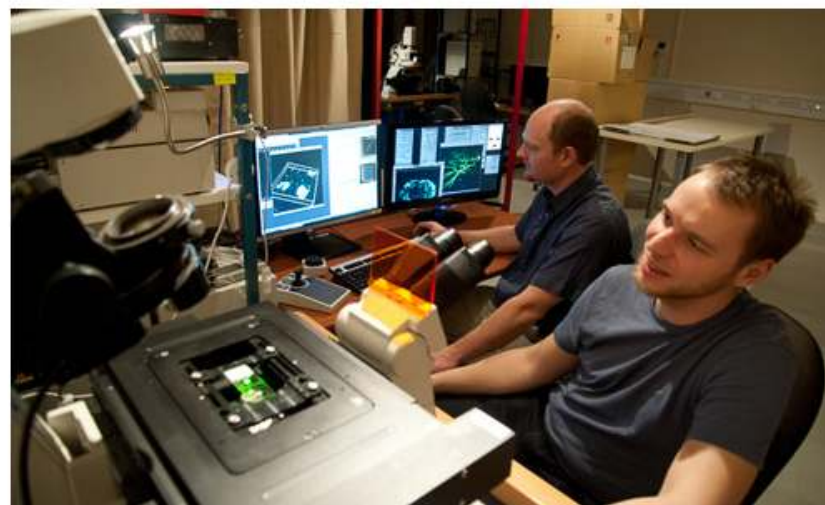
Eva Zoé Jakabffy



Tudomány gourmandoknak / Science for gourmands

A fű "kinyírja" az agy kannabisz-receptorait: a "rockfesztivál-paradigma"

2015/03/25. - írta: Janguli



Alkalmazás az idegtudományban

Függőségről - agytudatosan

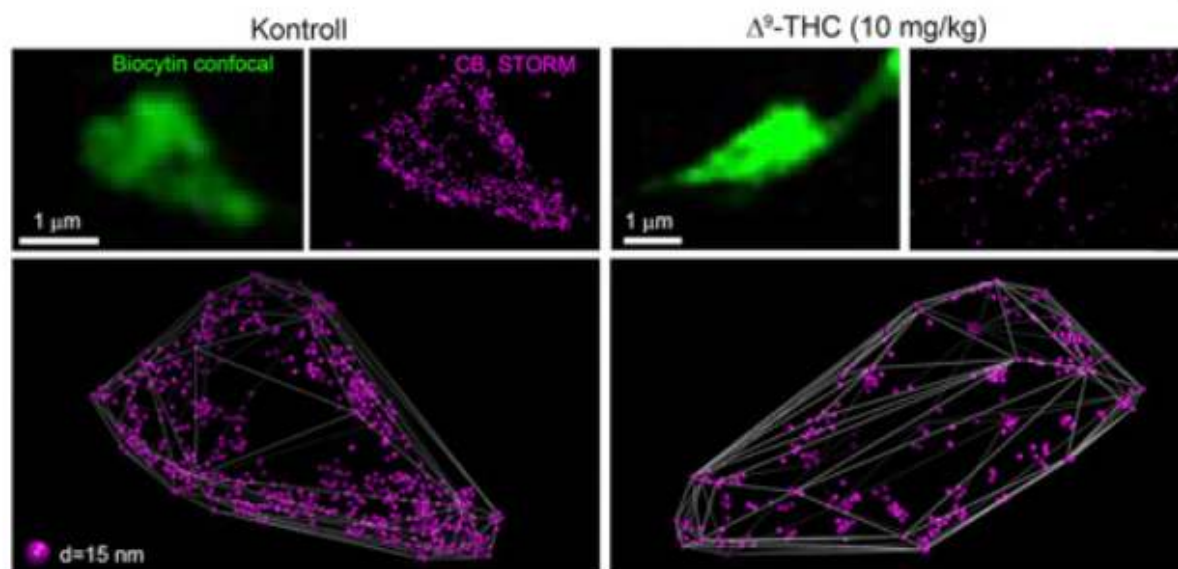


Jakabffy Éva interjúja Katona Istvánnal

Magyar Tudomány, 2010. november

Milyen másként állnának hozzá a függőségekhez a szenvedélybetegek, a környezetük és maga a társadalom, ha tudnák, mi történik ilyenkor az aggyal! A kutatók, akik jelenleg éppen a belső kannabinoid rendszer alkotóelemeit térképezik fel nanométeres pontossággal, egyre közelebb és közelebb kerülnek ahhoz, hogy feltárják a függőség kialakulásának okait és lépéseit. Hogy ezt az idegtudományban laikus is megértse, ahhoz szinte egy bolygóközi utat kell megtenni, melynek célállomása - paradox módon - saját koponyánkon belül található. Rusztikus, hétköznapi léptékeinktől el kell jutnunk az idegi elemek közti, finom kommunikációig. E célból Katona Istvánnal, a belső kannabinoid rendszer kutatójával beszélgettünk.

Alkalmazás az idegtudományban



A kutatók a többek közt az emléknymok rögzítésében nélkülözhetetlen, hippokampusz nevű agyterületen jelölték meg egyedi idegsejteket. Ezek idegvégződéseit zöld színnel tűnnek fel. A végződések felszínén **STORM szuperfelbontású mikroszkópiás eljárással** vizsgálták a kannabinoidreceptor-fehérjék elhelyezkedését olyan egerekben, amelyek a kísérletet megelőző 6 napon THC-tartalmú, vagy hatóanyag nélküli injekciókat kaptak.

Összefoglalás, megjegyzések

1. A nanoszkópia során a mérőrendszer lényegesen érzékenyebb a környezeti hatásokra, mint egy konfokális vagy 2P mikroszkóp rendszer
2. A felbontásnövekedés miatt adott területen lényegesen nagyobb az adatgyűjtéshez szükséges idő, a minta (a festék) lényegesen nagyobb lézerdózisnak van kitéve
3. A fentiek miatt in vivo nanoszkópiás mérések nem valószínűek a közeljövőben
4. Másik kérdés, hogy autofluoreszcencia, illetve SHG és CARS jelek esetén lehet-e valamilyen módon hasonló felbontás növekedést elérni?

STED előnyök

1. Viszonylag egyszerűen átalakítható egy pásztászó konfokális vagy 2P mikroszkóp STED mikroszkóppá
2. Az adatgyűjtési sebesség lényegében megfelel a konfokális vagy 2P rendszernek

PALM/STORM előnyök

1. A felbontás növelés elvileg korlátlanul növelhető
2. A minták kisebb fényterhelése