

Az „Optikai szállézeres technológián alapuló nemlináris mikroendoszkóp rendszer fejlesztése orvosi diagnosztikai és gyógyszeripari alkalmazásokhoz” projekt fontosabb tudományos és műszaki eredményei

Szipöcs Róbert, PhD

r.szipocs@szipocs.com

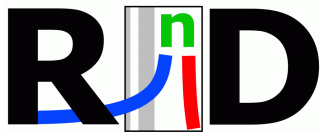
R&D Ultrafast Lasers Kft.

www.szipocs.com

és

MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont, Budapest

www.wigner.hu



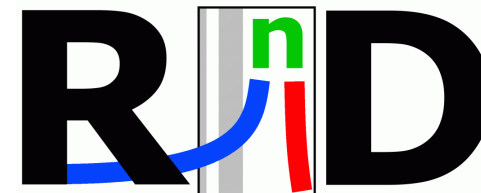
Projektazonosító: FIBERSC2 (Nemzeti Technológia Program)

Résztvevők:

1. R&D Ultrafast Lasers Kft (femtosekundumos szilárdtest és optikai szállázerek fejlesztése, elektronika, gépészet)
2. Genetic Immunity Kft (nanomedicina, immunológia)
3. MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont (optikai szálak, mikroszkóp optikai tervezés, mikroszkópiás módszerek fejlesztése)
4. MTA Szegedi Biológiai Központ (időfelbontásos spektroszkópiai mérések)
5. Szegedi Tudományegyetem, Optikai Tanszék (optikai szálak átviteli és diszperziós tulajdonságainak mérése)
6. Semmelweis Egyetem, Bőrklinika (bőrgyógyászat)

Témák:

1. Impulzusüzemű (ps, fs) Yb-szállázerek és erősítők fejlesztése nemlineáris mikroszkópiás mérésekhez
2. Optikai szálak tervezése nemlineáris frekvenciakonverzióhoz és alakhű átvitelhez, impulzusterjedés optikai szálakban
3. Nemlineáris mikroszkópiai módszerek (CARS, SHG) fejlesztése in vivo (festékelölés mentes) mikroszkópiás mérésekhez
4. Nemlineáris mikroendoszkóp fejlesztése orvosi diagnosztikai és gyógyszeripari alkalmazásokhoz
5. Alkalmazások a bőrgyógyászatban, biztonságtechnikai vizsgálatok (basaliomák, egyéb daganatos elváltozások, fekélyek vizsgálata, barrier funkció vizsgálata, az elhízás, a metabolikus állapot hatása a bőr szerkezetére, stb.)
6. Gyógyszeripari és kozmetológiai alkalmazások (nanomedicinák, egyéb gyógyszerkészítmények penetrációja bőrbe)
7. A CARS módszer alkalmazása az idegtudományok területén



Bemutakozás: Az R&D Ultrafast Lasers Kutatási és Fejlesztési Kft.

BOOTH NUMBER: 8109

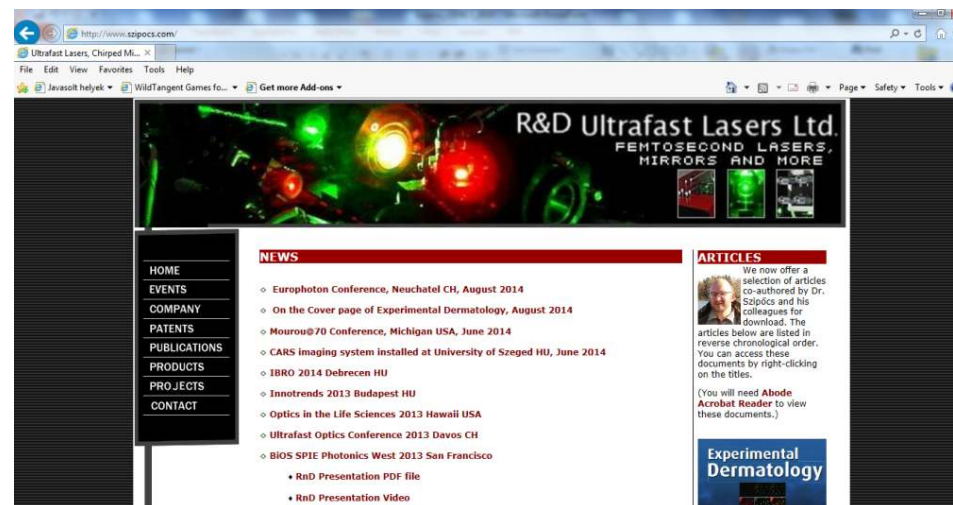
R&D ULTRAFAST LASERS LTD.



Company Description

Featured Product: Dual wavelength fs laser system for 3D CARS imaging including tunable Ti:sapphire and Yb fiber laser

Manufacturer of single or double wavelength ultrafast laser systems including ultrashort (ps or fs) pulse, ultrabroadband or broadly tunable Ti:sapphire lasers, Yb-doped fiber lasers, amplifiers and optical parametric oscillators. Their typical applications include time resolved or CARS spectroscopy or nonlinear (2P, SHG or SRS/CARS) microscopy. Manufacturer of ultrafast laser optical coatings including different dispersive mirrors such as chirped mirrors. Complete laser laboratory construction.



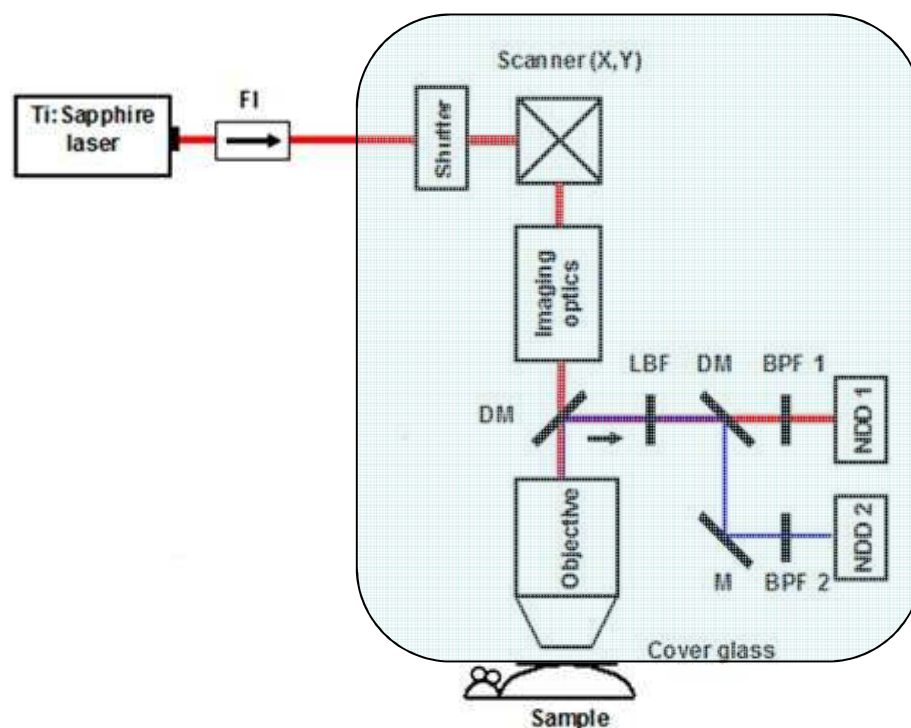
Alapítva: 1997-ben

Telephely: 1121 Budapest, Konkoly Thege út 29-33. 6. ép. I. em. (KFKI Campus)

Infrastruktúra: 3 lézeroptikai laboratórium, 1 elektronikus és 1 gépészműhely, irodák, tárgyaló, raktár

Honlap: www.szipocs.com

Egy pásztázó 3D kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóp sematikus felépítése




NEW! Our latest version of femtosecond pulse Ti:sapphire laser developed for nonlinear 3D microscopy

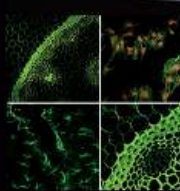
Femtosecond 100 Tm Compact/MiniTech (TM)

- tuning range 680 to 1050 nm
- patented ultrabroadband chirped mirror (UBCM) technology
- internal shutter (can be operated directly by the microscope)
- wavelength setting by a computer or a microscope
- compatible with Carl Zeiss microscopes (ZEN software)
- internal pump laser
- fully closed housing, operation is independent of environmental conditions (e.g., humidity)

R&D Ultrafast Lasers Ltd. - your partner in nonlinear 3D microscopy

Other related products and services:

- ion beam sputtered, low dispersion or dispersion compensating mirrors
- building complete laser-optical laboratories
- consulting
- service for femtosecond pulse laser system



R&D Ultrafast Lasers Research and Development Ltd.
H-1013 Budapest, Attila st. 73.
RFX Campus: H-1021 Budapest,
Könyv Tízegyház 20-33, Building 6, Floor 1
Phone/Fax: +36 1 332 2322 | Email: r.szp@rslasers.com
WEB site: www.rslasers.com

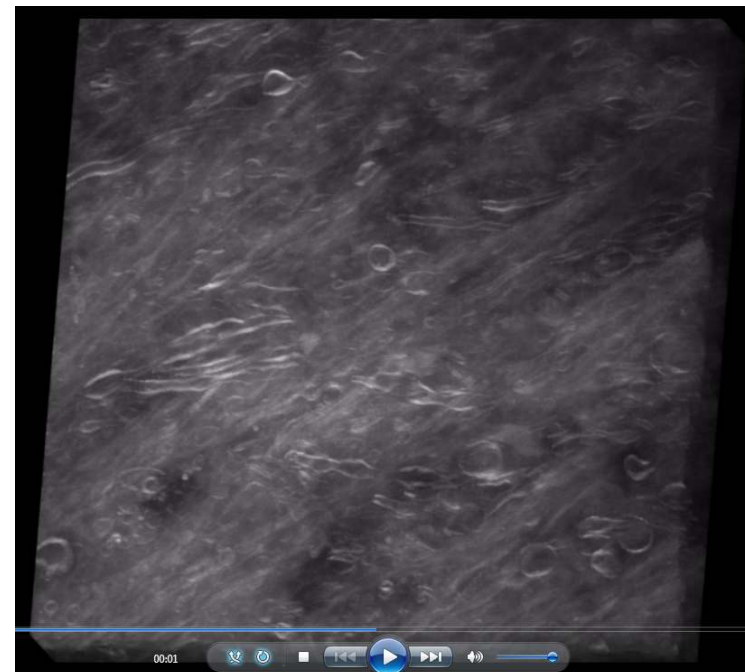


CARS SYSTEM INSTALLED AT UNIVERSITY OF SZEGED

Related articles

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

Photo Gallery

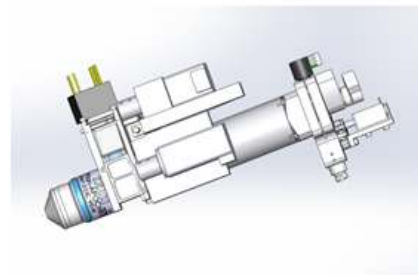


Költségek:

- Hangelható, impulzusüzemű Ti-zafír lézer > 100.000 EUR
- Asztali pásztázó mikroszkóp > 100.000 EUR
- Rezgésmentes asztal, klimatizált, pormentes laboratórium

Projekt célkitűzések

- *Az alkalmazott impulzusüzemű lézer költségeinek jelentős csökkentése*
- *Optikai szálak fényátvitel, szálintegráltság*
- *Kisméretű mikroszkóp fej (kézben tarthatóság)*
- *In vivo 3D mikroszkópiás mérések, biztonságtechnikai mérések*
- *Alkalmazások az orvosi diagnosztika (pl. bőrgyógyászat) és a gyógyszeripar (pl. nanomedicina) területén*



FemtoFiber + scanning head for confocal/2PF imaging = FiberScope

3D (konfokális!) mikroszkópia már létező klinikai alkalmazásai



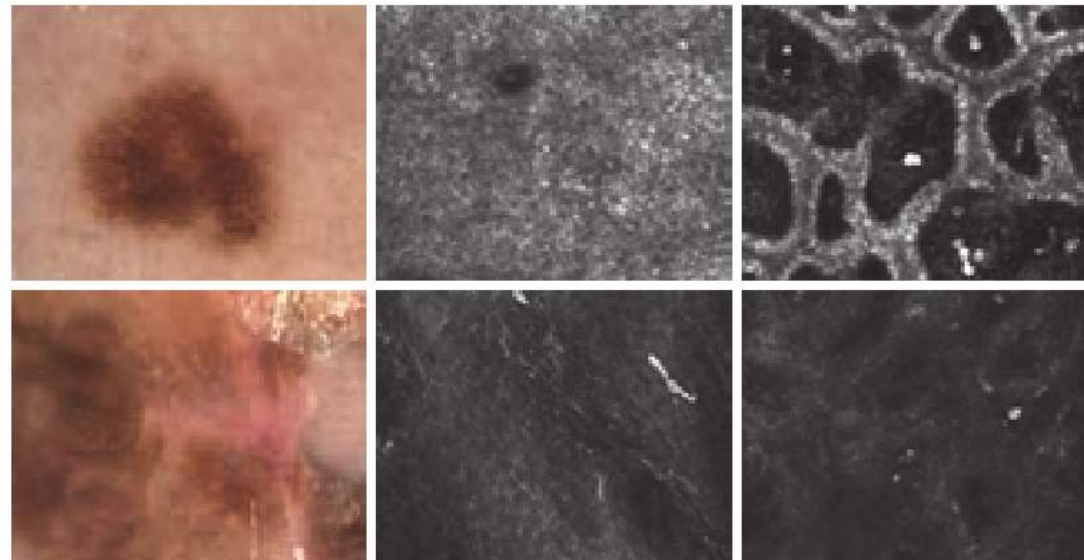
The **confocal microscope** illuminates a portion of skin with the point source of light and **detects** the **reflected light** through a **pinhole**.

Lucid's non-invasive VivaScope confocal microscopes provide cellular resolution images to help identify various skin conditions.

Miért előnyös az in vivo 3D mikroszkópia?

- ☺ Tumor határának pontos meghatározásának lehetősége
- ☺ Nem kell várni a patológiai vizsgálatok eredményére!

Given that this imaging form lets physicians **look into tissue *in vivo*** without any of the processing that is done in the pathology lab, confocal imaging may well reveal new skin features that cannot be directly correlated to the pathology.



(Top) A benign mole viewed from (left) the skin's surface at visible wavelengths, (center) at a depth of 10 μm and (right) at 161 μm with infrared confocal microscopy.
(Bottom) Malignant melanoma at (left) surface level in visible light, (center) at a depth of 35 μm and (right) at 95 μm with confocal microscopy.

In vivo 3D nemlineáris mikroszkópia orvosi diagnosztikai célokra

DermalInspect

Non-invasive multiphoton tomography of human skin

In vivo optical biopsies with subcellular spatial resolution based on near infrared femtosecond laser technology for:

- Diagnostics of dermatological disorders
- Melanoma detection
- Tissue engineering
- Cosmetic research
- In situ drug monitoring
- Intratissue imaging of pharmaceutical components

Mirror arm for DermalInspect
more flexibility, new options for measuring



Summary of the mirror arm in Adobe PDF format ([click here](#), 0,3 MB)

Summary of the DermalInspect in Adobe PDF format ([click here](#), 2,2 MB)

REVIEW ARTICLE Clinical multiphoton tomography (PDF, [click here](#))



Hátrány: hagyományos Ti-zafír lézer technológia - költséges !

Szálintegrált, femtoszekundumos AND Yb-szállézer



Femtobiológia projekt (2006-2009): R&D Ultrafast Lasers Kft, Furukawa Electric (FETI) közös laboratórium

J. Fekete, A. Cserteg, Szipőcs; **All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator**, Laser Physics Letters 6, 49-53, 2009



Projekt célkitűzések

- *Az alkalmazott impulzusüzemű lézer költségeinek jelentős csökkentése*
- *Optikai szálalás fényátvitel, szálintegráltság*

Módusszinkronizált Yb-szállézer!

Előnyök:

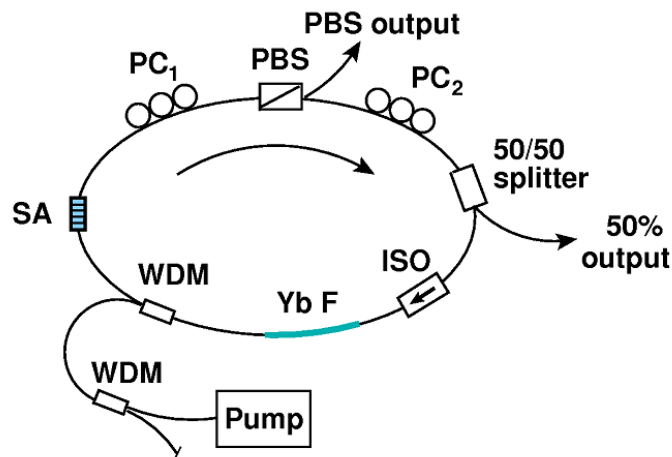
- *Kiseb méret*
- *Szálintegráltság*
- *Kiseb költség*

Hátrány:

- *Szűkebb hangolási tartomány (1020-1060 nm)*

All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator

- ❑ Operation determined by interplay between **gain**, **self-phase modulation**, **dispersion** and **filtering** effects
- ❑ Pulse shaping is based on **nonlinear polarization rotation** in the fiber together with **spectral and temporal filtering** by a polarizing element



PC: polarization controller

PBS: polarizing beam splitter

ISO: isolator

Yb F: Ytterbium doped fiber

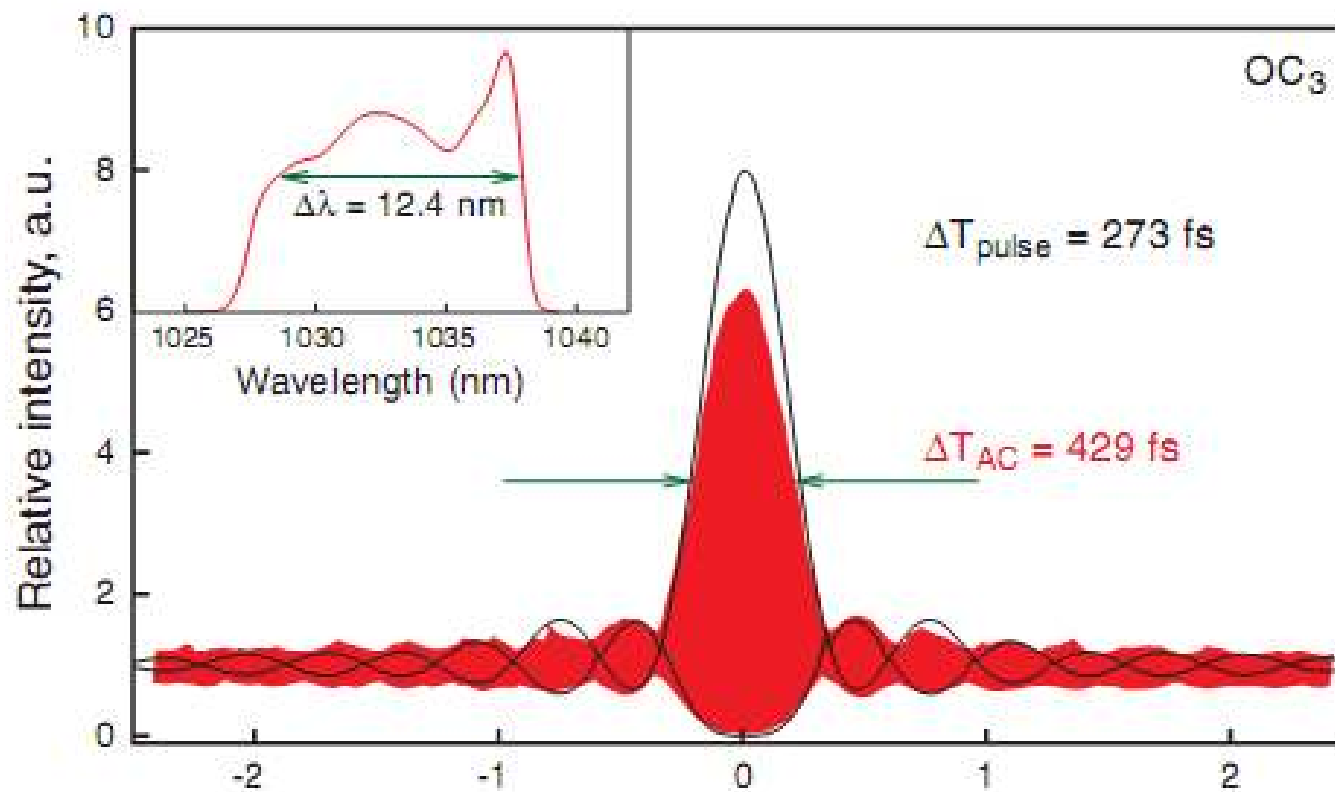
WDM: wavelength division multiplexer

SA: saturable absorber

J. Fekete, A. Cserteg, Szipőcs; All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator, *Laser Physics Letters* 6, 49-53, 2009

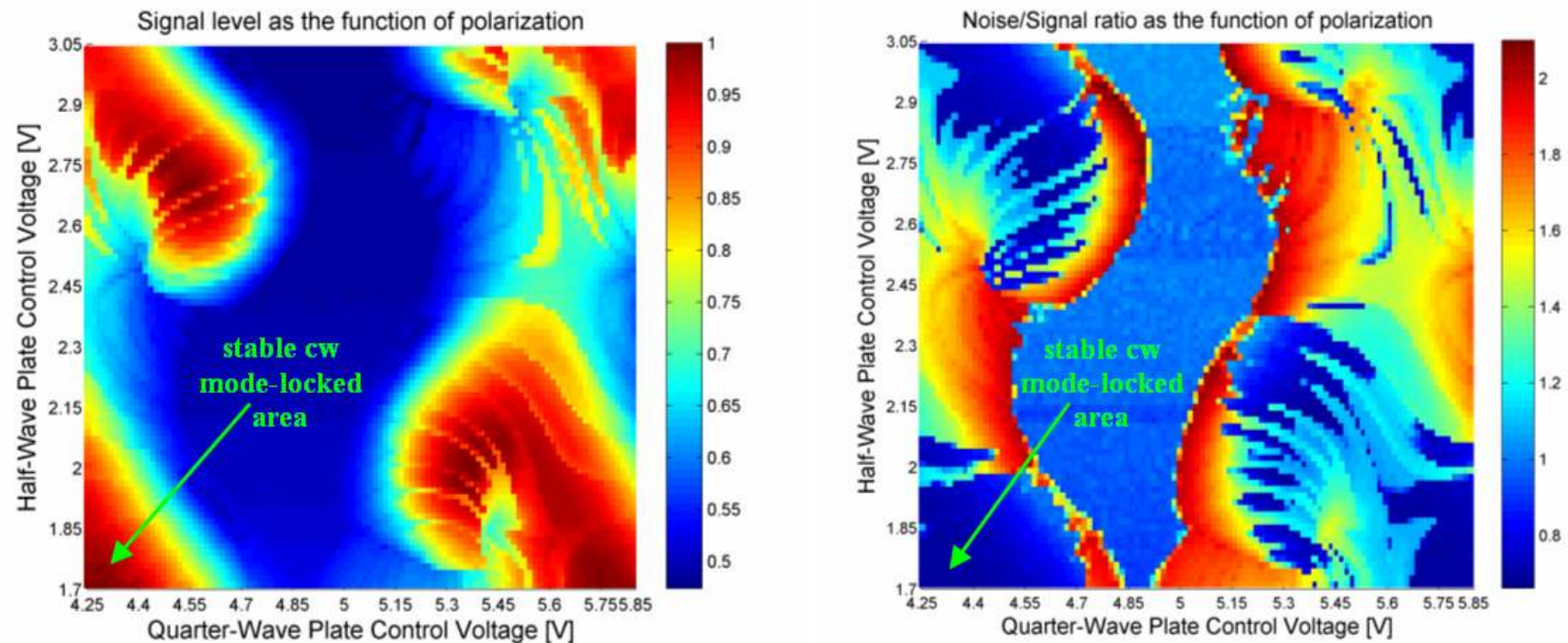
Szálintegrált, femtoszekundumos AND Yb-szállézer

Mért jellemzők: spektrális sáv szélesség és impulzushossz



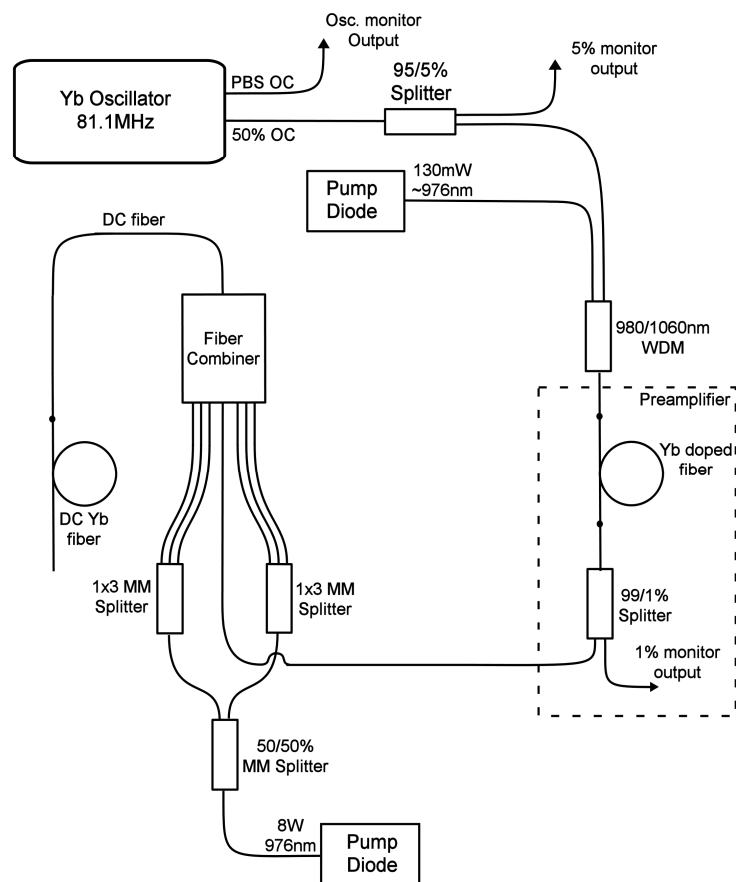
J. Fekete, A. Csérteg, Szpőcs; **All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator**
Laser Physics Letters 6, 49-53, 2009

Recording of „stability maps” using SLH circuits

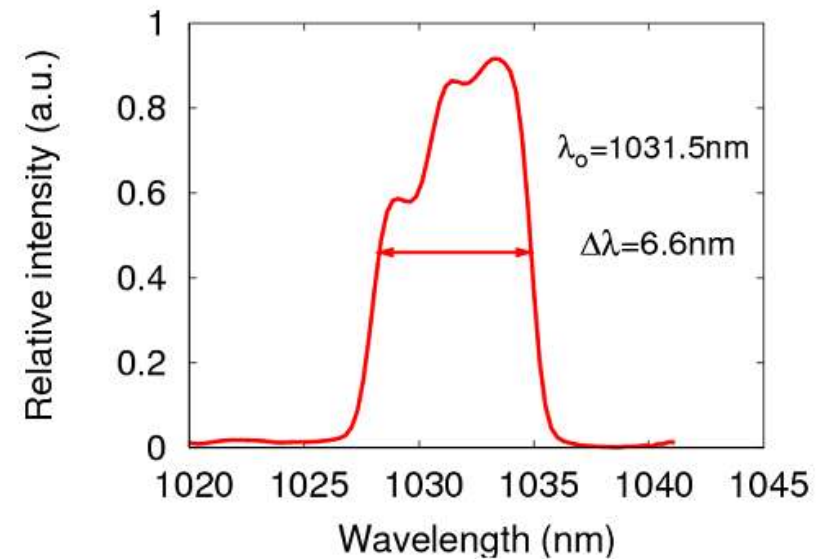


Measured signal power (left) and normalized noise power (right) as the function of control voltage on the polarization controllers.

Yb szálerősítő felépítése



Mért bemeneti spektrum



$P_{osc} \sim 2-5 \text{ mW}$

$P_{\text{preamp}} \sim 40\text{-}60 \text{ mW}$

$P_{\text{amp}} \sim 600 - 900 \text{ mW}$

$\tau \sim 300\text{-}400$ fs (kompresszált)

> Sebészeti alkalmazások?

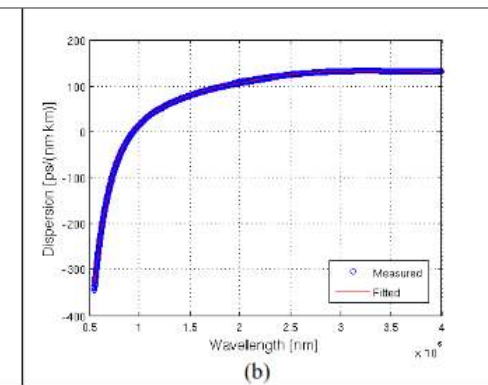
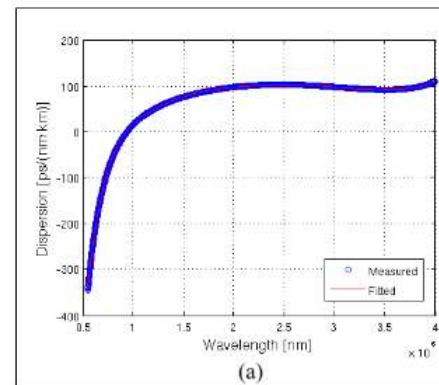
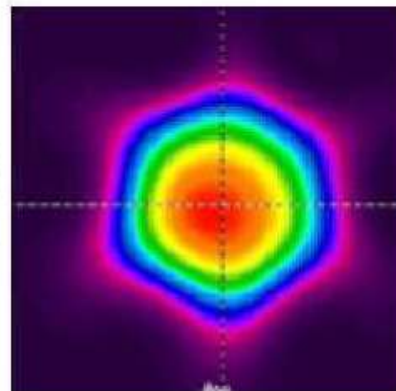
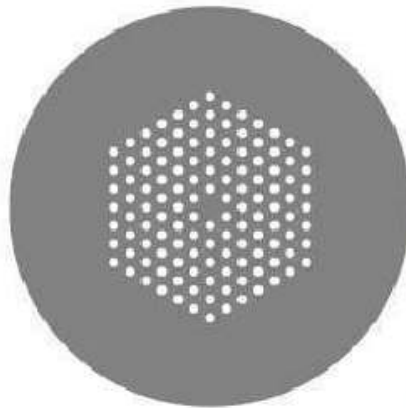
FemtoFiber: fs pulse yb-fiber oscillator/amplifier system



- Polarization is controlled by a built in PolaRITE III polarization controller
- Control voltages of the PolCont are set by a computer through an RS232 interface
- Pump powers of the diodes are set by a built in microcontroller unit

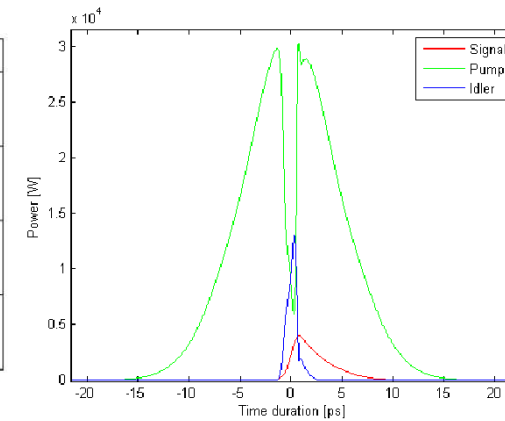
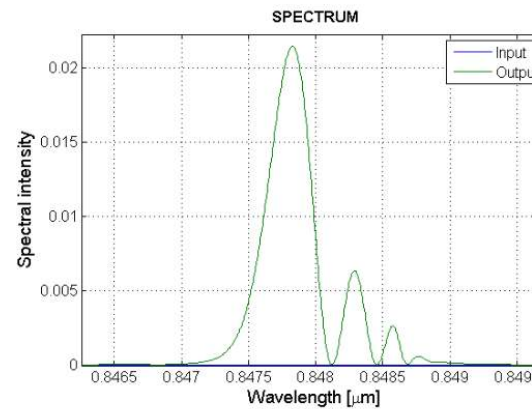
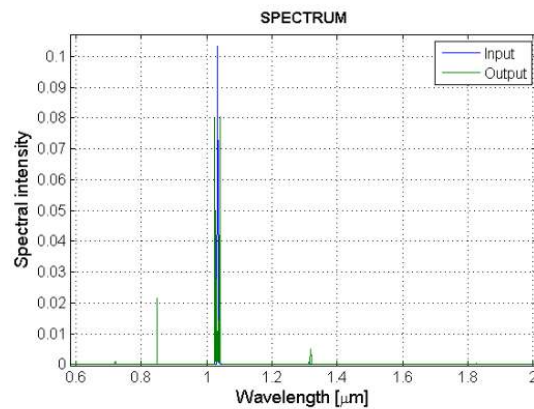
Széles sávban történő hangolhatóság biztosítása Yb-szállézer esetében

- *Speciális diszperziós tulajdonságokkal rendelkező optikai szálak tervezése, gyártása és minősítése*
- *Impulzusterjedés modellezése optikai szálban*
- *Kísérleti megvalósítás*



Széles sávban történő hangolhatóság biztosítása Yb-szállézer esetében

- *Impulzusterjedés modellezése optikai szálban*



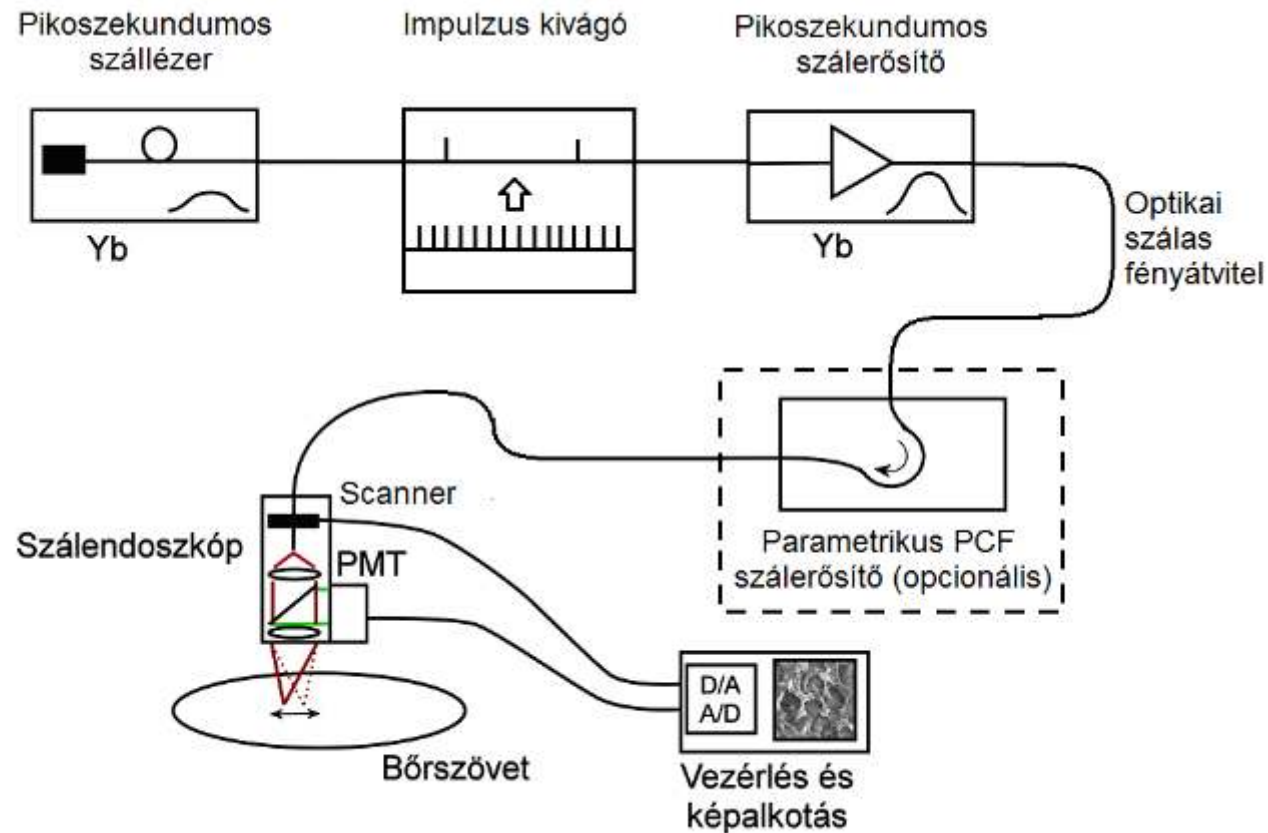
Széles sávban történő hangolhatóság biztosítása Yb-szállézer esetében

- *Kísérleti megvalósítás: szükséges a lézerimpulzusok ritkítása!*

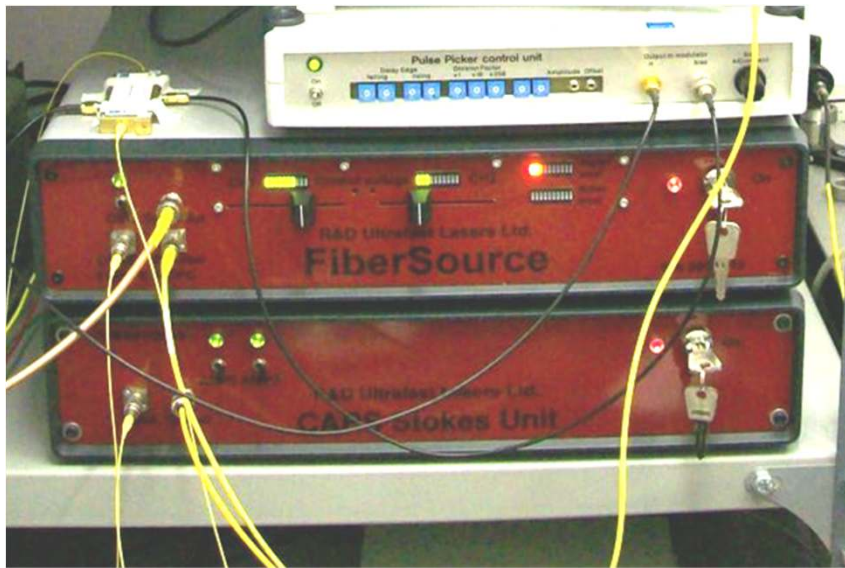


Yb-szállézer kimenetére csatlakoztott PCF szálból kilépő piros lézerfény fényképe (bal oldalon) és egy IR kamerával rögzített kép (jobb oldalon)

A projekt során megvalósított mikroendoszkóp rendszerterve

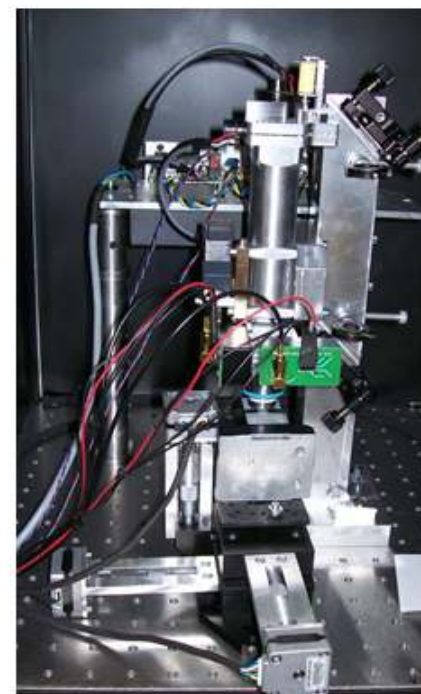
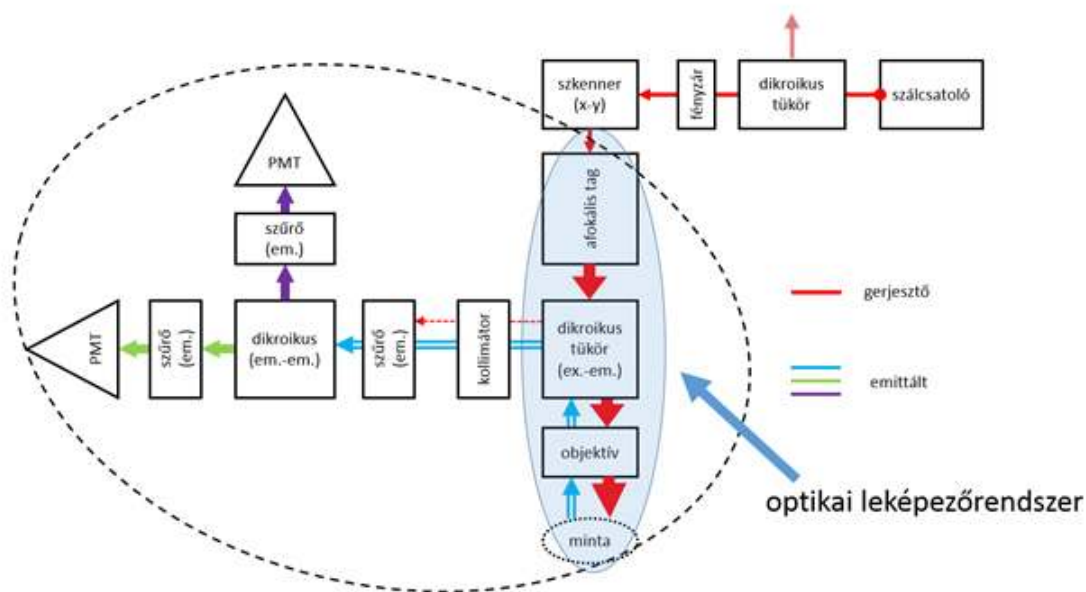


***A FiberScope eszköz Yb-szállézeres fényforrásáról és a burkolattal ellátott
FiberScope mérőfejről készült fénykép***

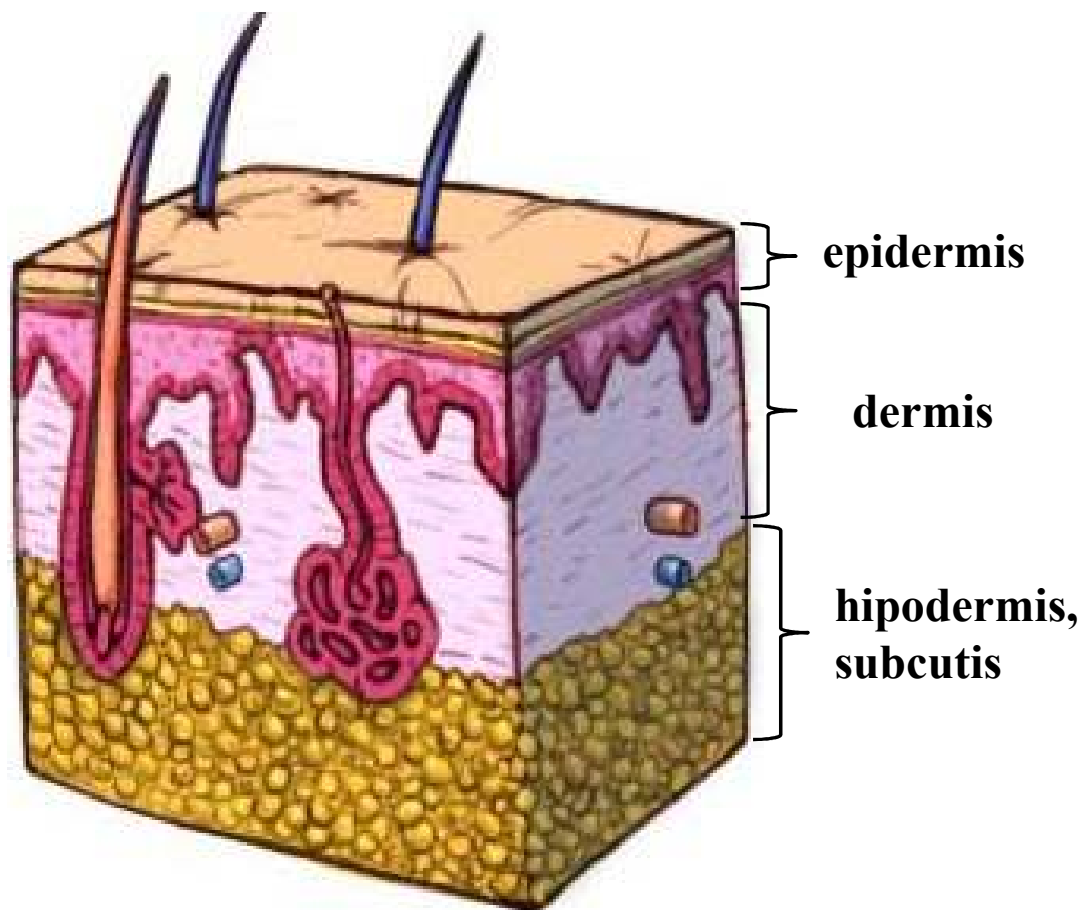


FiberScope nemlineáris mikroendoszkóp

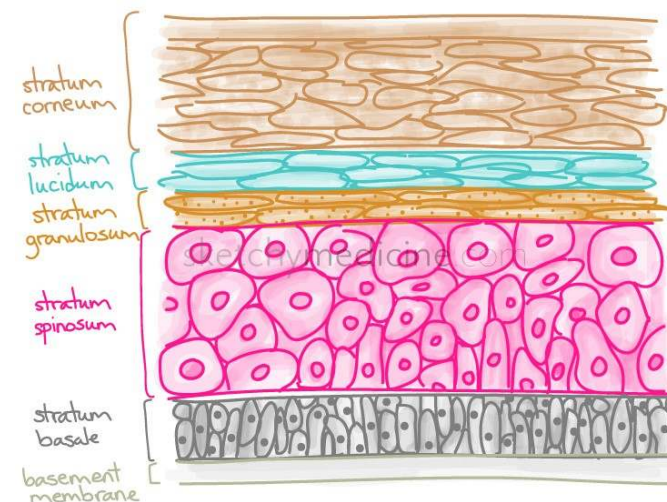
FiberScope mikroszkóp fej tervezés



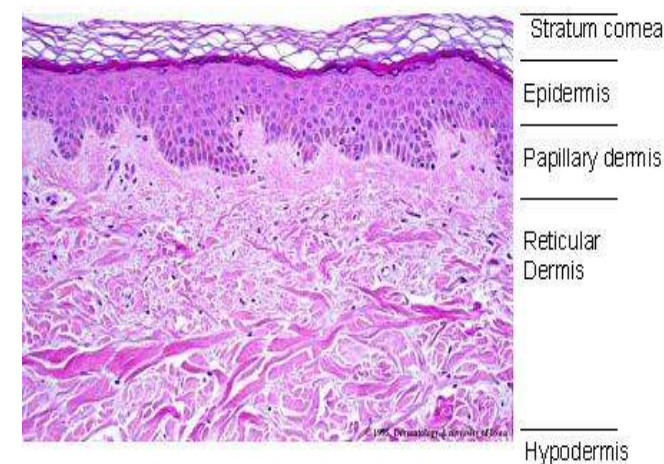
Z.22 ábra Bal oldalon: a megvalósított *FiberScope* mikroszkóp egységének blokkvázlata. Jobb oldalon: a *FiberScope* nemlineáris mikro(endo)szkóp a tesztmérések során (X-Y-Z irányokban léptetőmotorral pozicionálható tárgyasztallal, állványra szerelve).



epidermis rétegei



dermis szerkezete



Stratum cornea
Epidermis
Papillary dermis
Reticular Dermis
Hypodermis

Alkalmazott nemlineáris folyamatok:

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

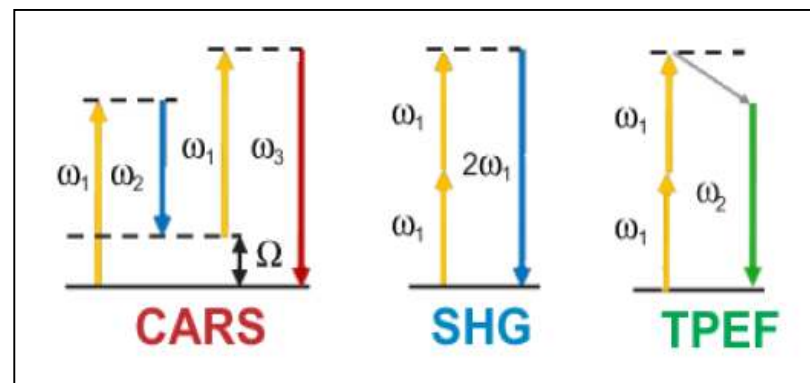
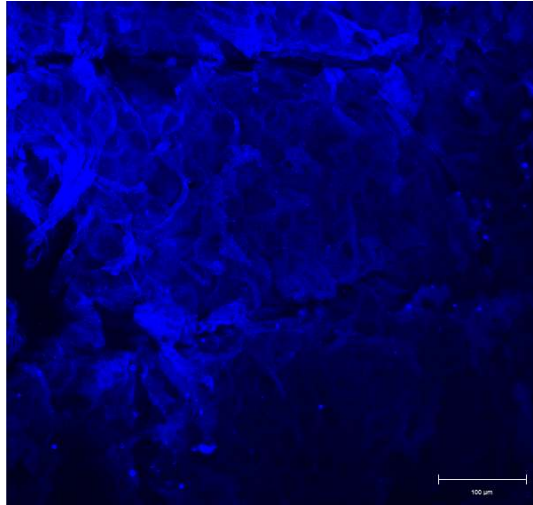


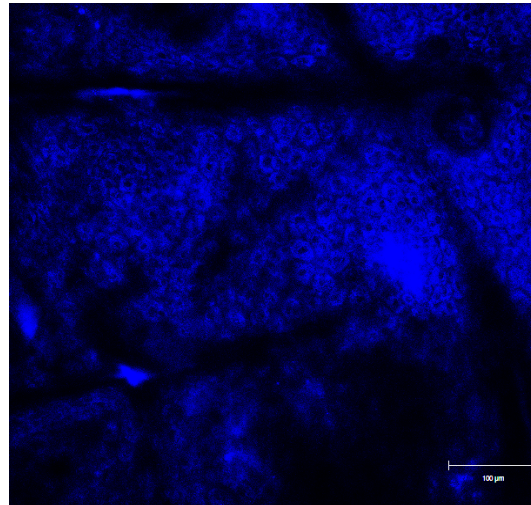
Table 1. Endogenous skin chromophores.

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

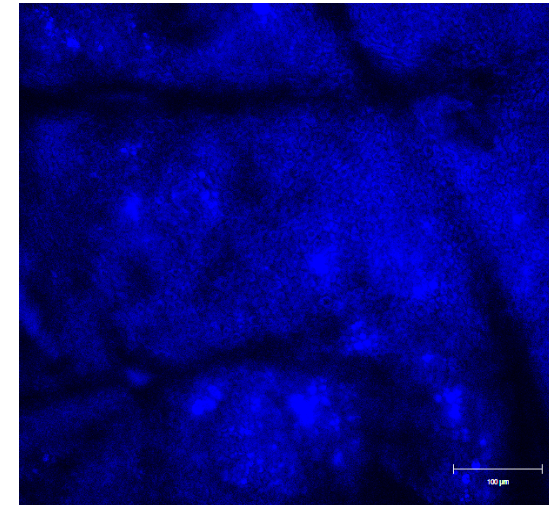
str. corneum: keratin (TPEF)



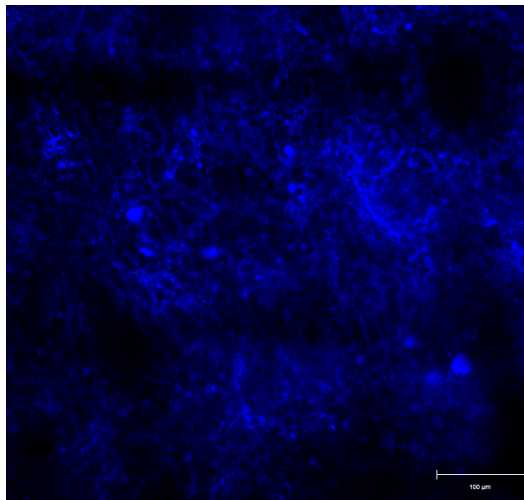
str. spinosum: NADH (TPEF)



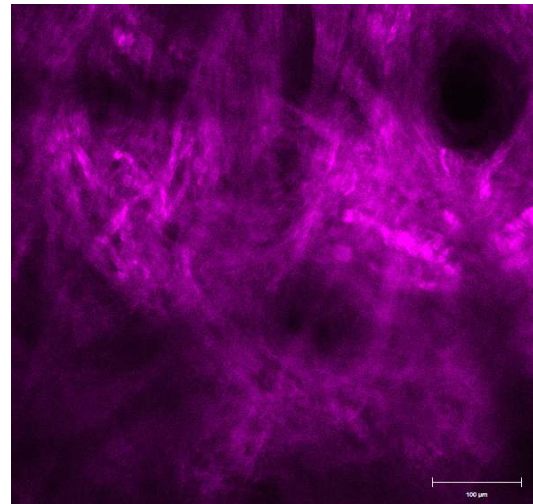
str. basale: NADH (TPEF)



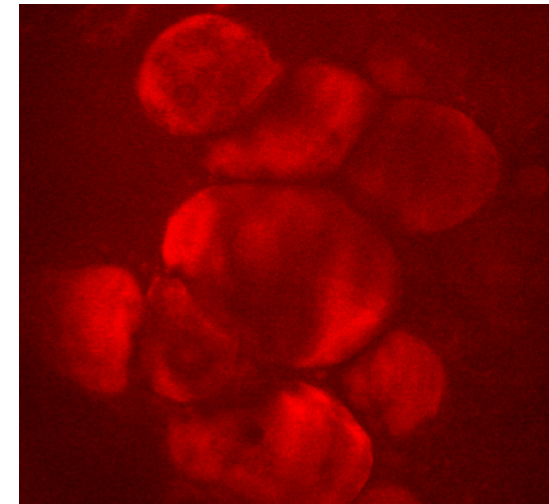
dermis: elasztin (TPEF)



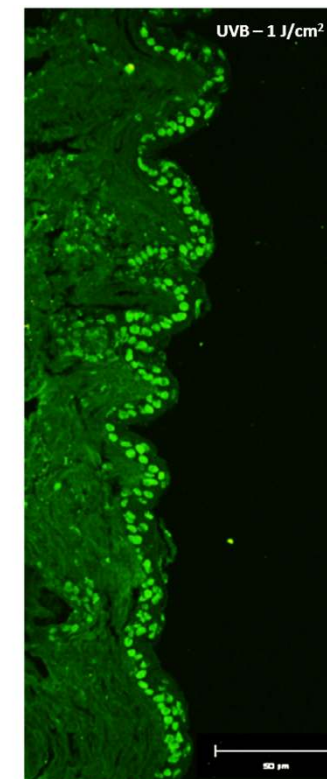
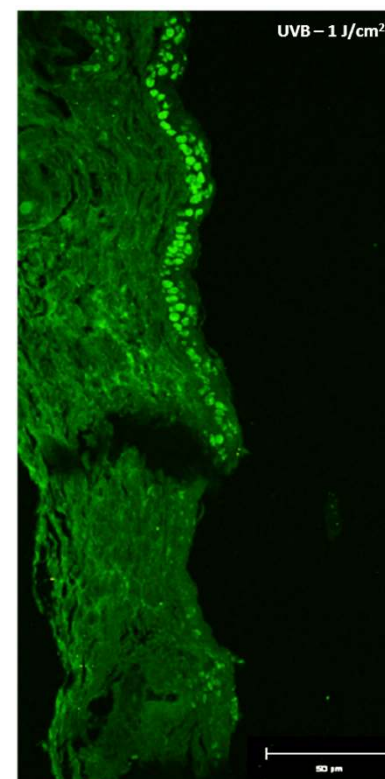
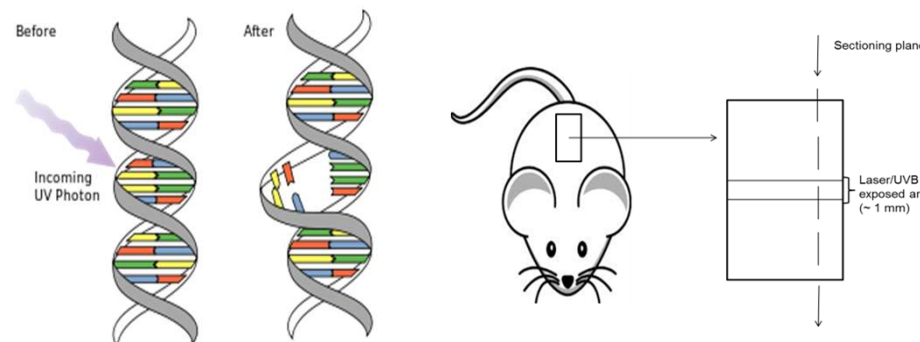
dermis: kollagén (SHG)



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 Gruijl 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.

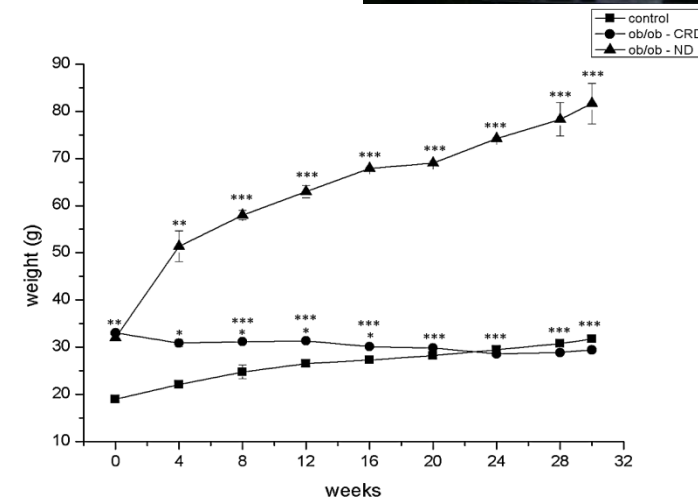
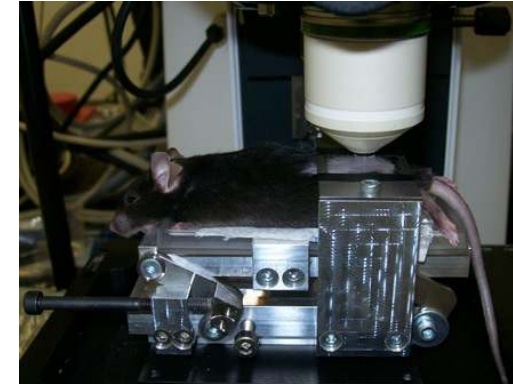
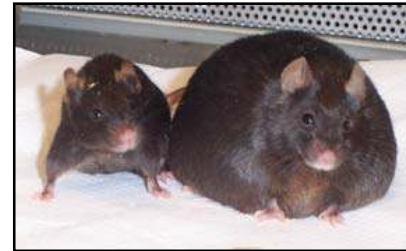
Haluszká D, Lorincz K, Banvolgyi A, Gyongyosi N, Kolonics A, Szepöcs R, Karpáti S, Wikonkal N: *The effect of repair mechanisms on risk of DNA damage during in vivo two-photon skin imaging*, J. OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 133:(1) p. S219. (2013)

The 6th International Investigative Dermatology Meeting
International Investigative Dermatology 2013
 8-11 May 2013
 Edinburgh Scotland

A 2. típusú diabétesz és a bőr kollagén szerkezetének vizsgálata ob/ob knockout egereken, in vivo

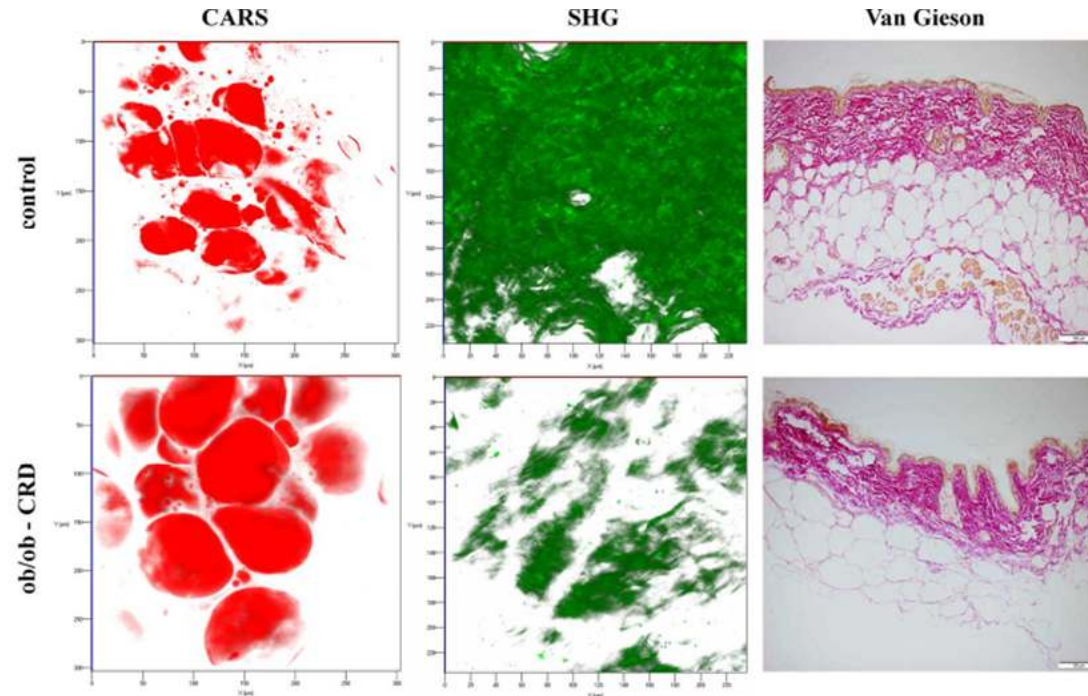
Ob/ob egerek:

- a 2-es típusú diabétesz (csökkent inzulin érzékenység) modellállatai
- ob gén – leptin – étvágy szabályozása
- leptin 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 szabadgyök termelés – metabolikus betegségek + a bőr korai öregedése



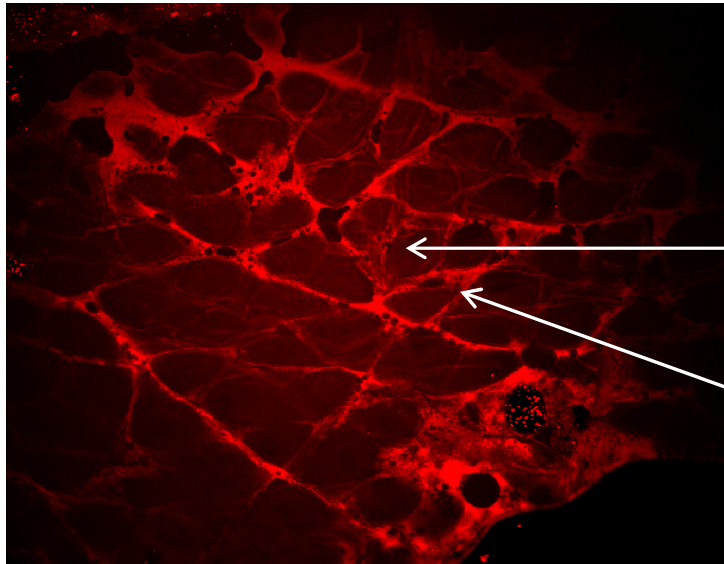
SHG (kollagén) + CARS (zsírsejtek)

A 2. típusú diabétesz és a bőr kollagén szerkezetének vizsgálata ob/ob knockout egereken, in vivo



Z.10 ábra Kontol és génmódosított ob/ob egerek bőréről készült CARS (zsírsejtek) és SHG (kollagén) felvételek, valamint a vonatkozó bőrmintákról készített patológiás festések után készített mikroszkópiás fényképek. Jól látható a normál testsúlyú (control) és elhízott (ob/ob) egerek bőre közötti különbség a felvételeken.

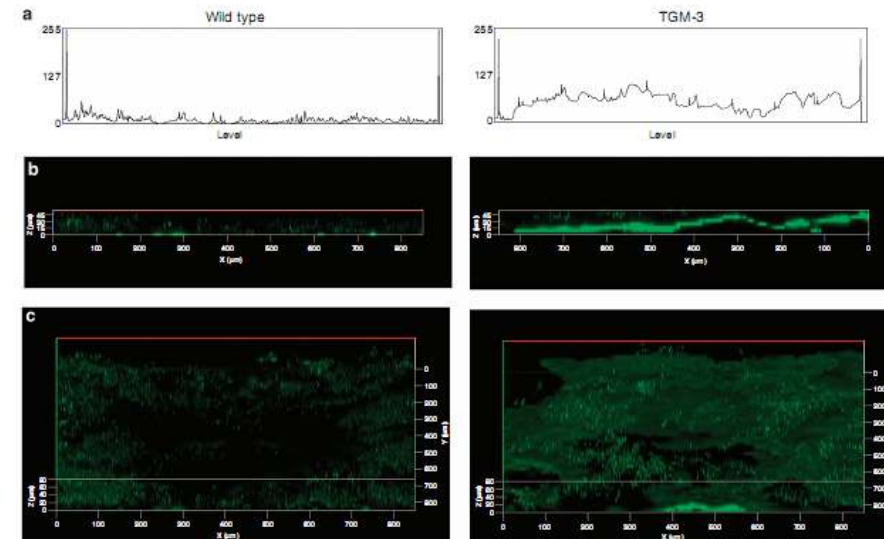
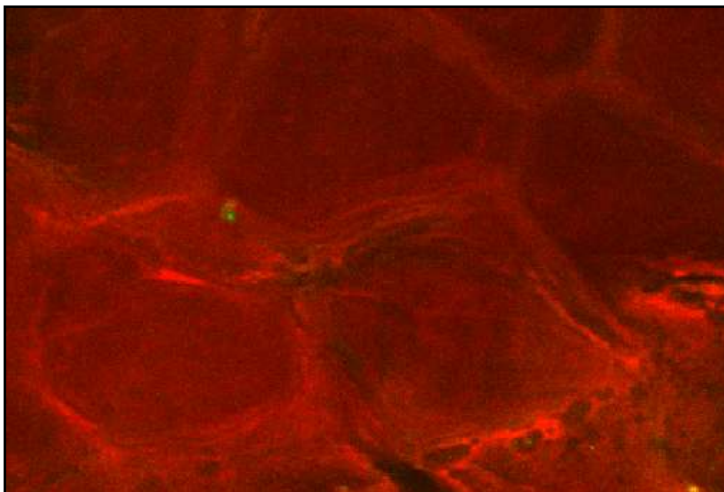
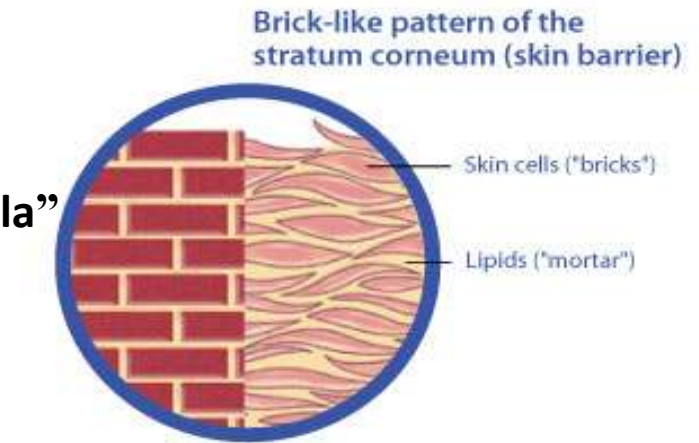
Haluszka, D., Lőrincz, K., Molnár, G., Tamás, G., Kolonics, A., Szípcs, R., Kárpáti, S. and Wikonkál, N. M: „In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-stokes Raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit,” **Microsc. Res. Tech.** **78**, 823–830 (2015)



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 excízió, 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-, Nemikórtani
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

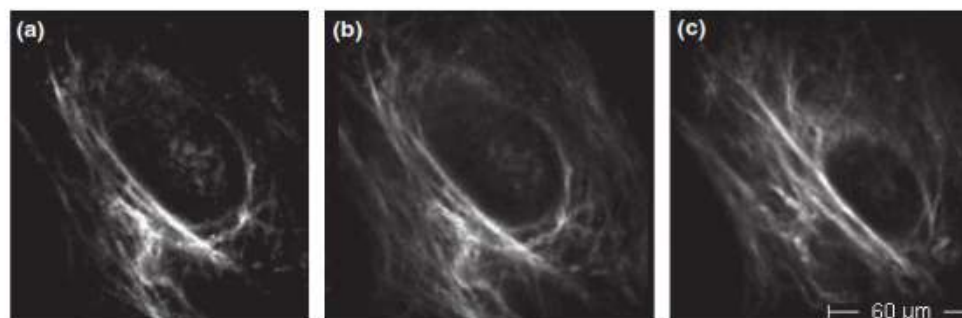


Fig. 4. Basal cell carcinoma. (a) 100 μm depth, excitation wavelength 800 nm. Shifting the wavelength to 800 nm, basaloid cells become less visible; employing an excitation wavelength of 820 nm basaloid cells disappear and it is possible to observe empty spaces surrounded by collagen fibres (phantom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



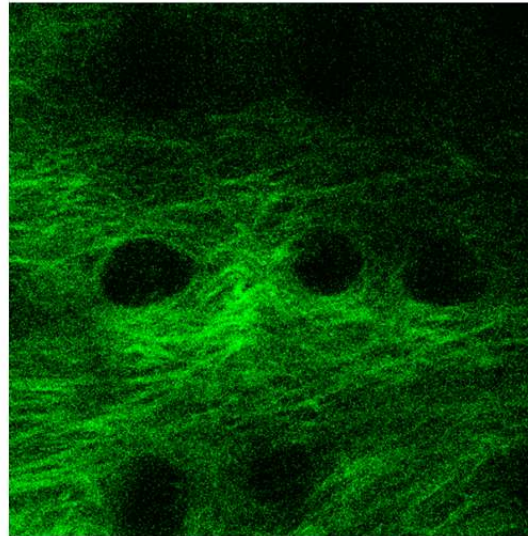
A bőr tumorok közös jellemzője és a tumor invázió kulcsfontosságú mozzanata az extracelluláris mátrix fehérjék (I. típusú kollagén) degradációja a mátrix metalloproteáz (MMP) enzim család aktiválásán keresztül.

- a tumor sejtek nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeznek
- kerítéslécszerű un. paliszád elrendeződésűek
- 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

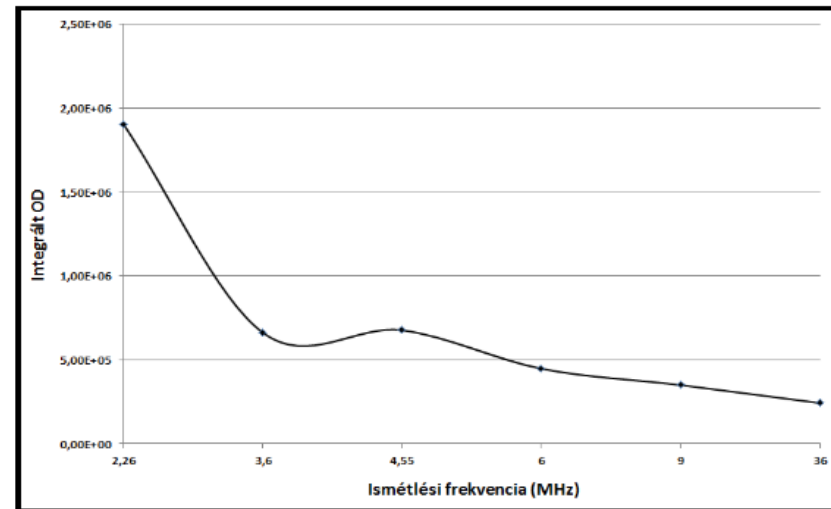
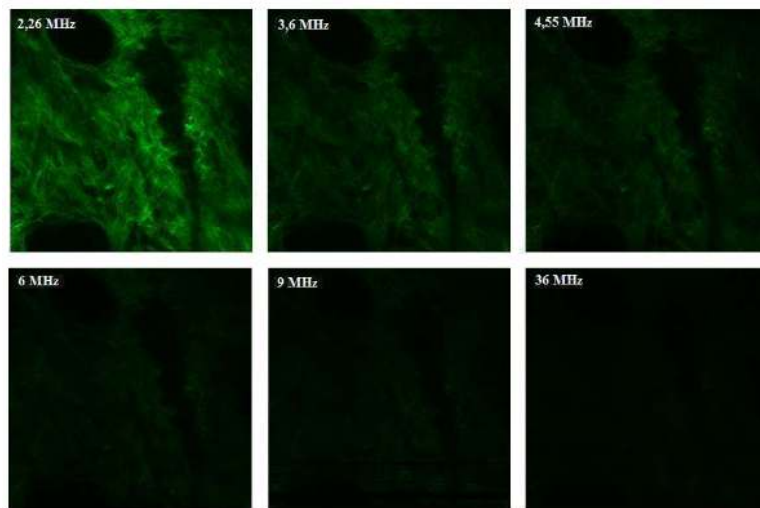
Kollagén vizsgálata SHG módszerrel!

Seidenari S, Arginelli F, Bassoli S, Cautela J, Cesinaro AM, Guanti M, Guardoli D, Magnoni C, Manfredini M, Ponti G, König K. *Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography*. Skin Res Technol, 2013. 19(1): p. e297-304.

Basaliomák vizsgálata



Z.4 ábra Egérbőr kollagén eloszlásáról *FiberScope* eszközzel készített *in vivo* SHG kép (1024x1024 képpont)



Az Yb-szállézer ismétlési frekvenciájának hatása a mért SHG jel nagyságára

Képmínőség 5 mW átlagteljesítmények mellett

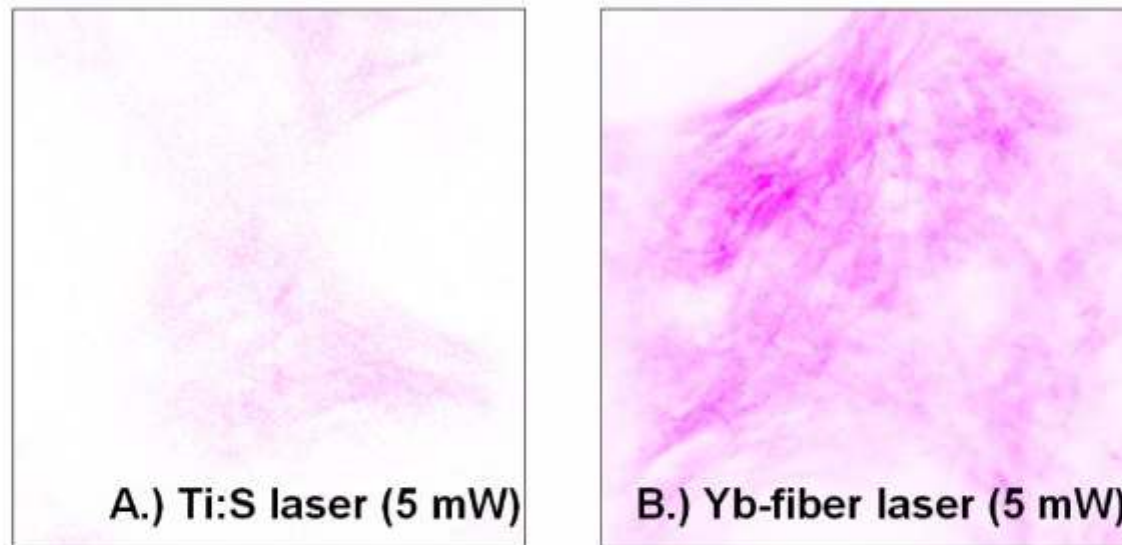


Figure 1. Comparison of SHG imaging performance of different mode-locked lasers having the same average power of 5 mW (on the sample) for nonlinear microscopy. Ex-vivo murine skin sample, imaging depth: $z = 30 \mu\text{m}$, same microscope settings. Collagen distribution measured by A) an industry standard,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



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.

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 Szépőcs^{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, Venerology and Dermatocology, Semmelweis University Hungary, Budapest, Hungary

Correspondence: Róbert Szépőcs, Institute for Solid State Physics and Optics of Wigner RCP, PO Box 49, H-1525 Budapest, Hungary, Tel./Fax: +36 1 3922582, e-mail: szepocs.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-moiety-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

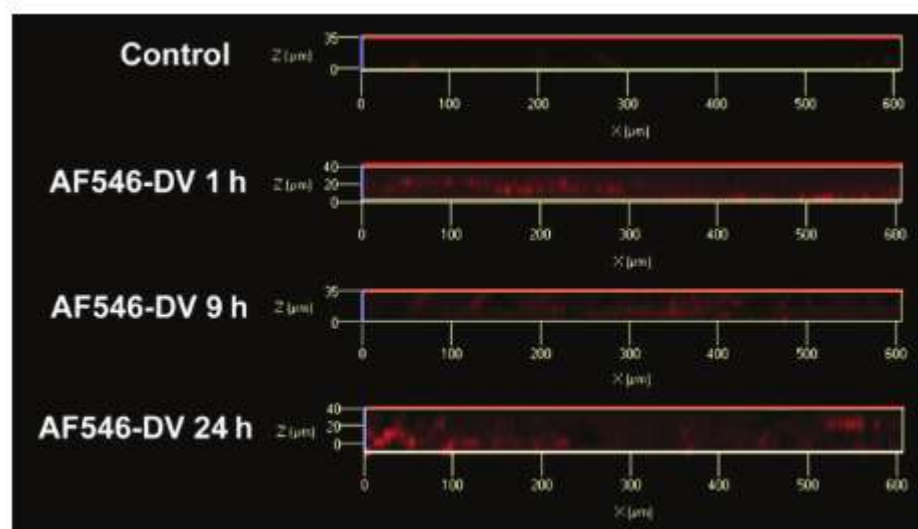
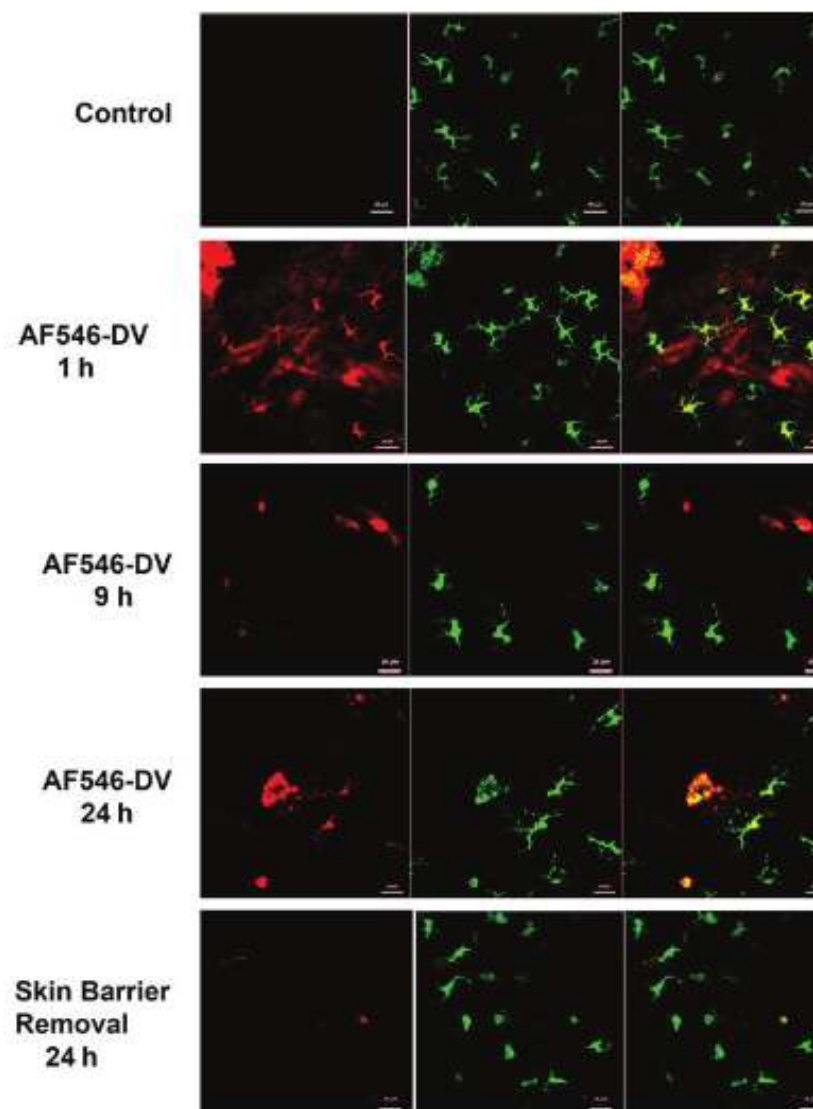
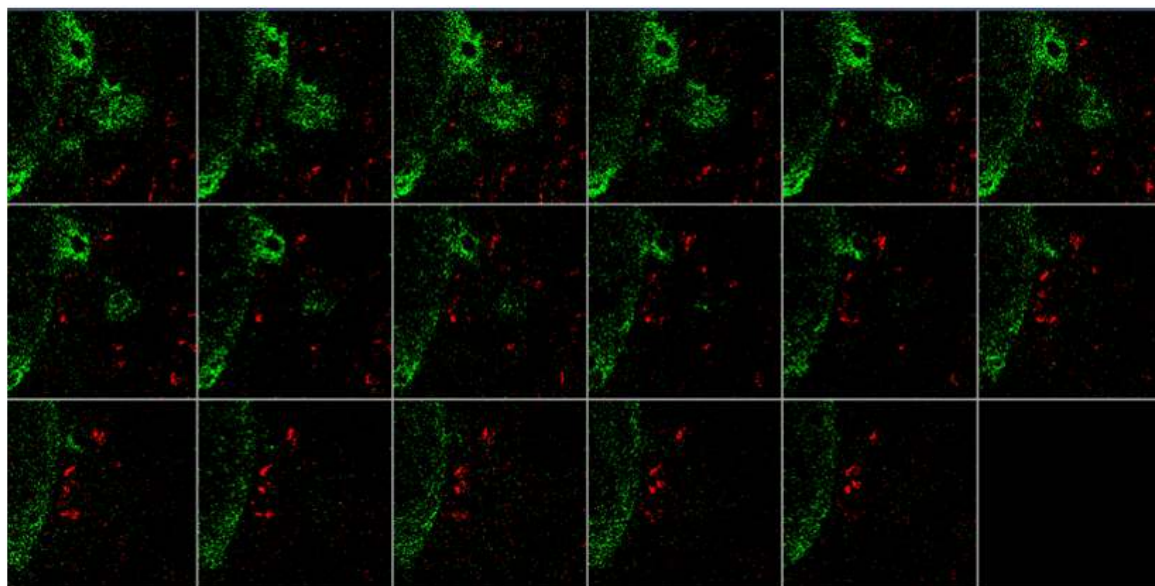




Figure 2. Kinetics of AF546-DV uptake by Langerhans cells (LCs) in eGFP-Langerin knock-in mouse ear *in vivo*. Nearly all LCs had incorporated AF546-DV after 1 h of topical treatment: strong colocalization was detected in both channels [NDD 2 – green/eGFP (middle column) versus NDD 1 – red/AF546-DV (left column)] as presented on the merged pictures (right column). Images of red light emission also revealed that the nanoparticles were distributed homogeneously 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 .



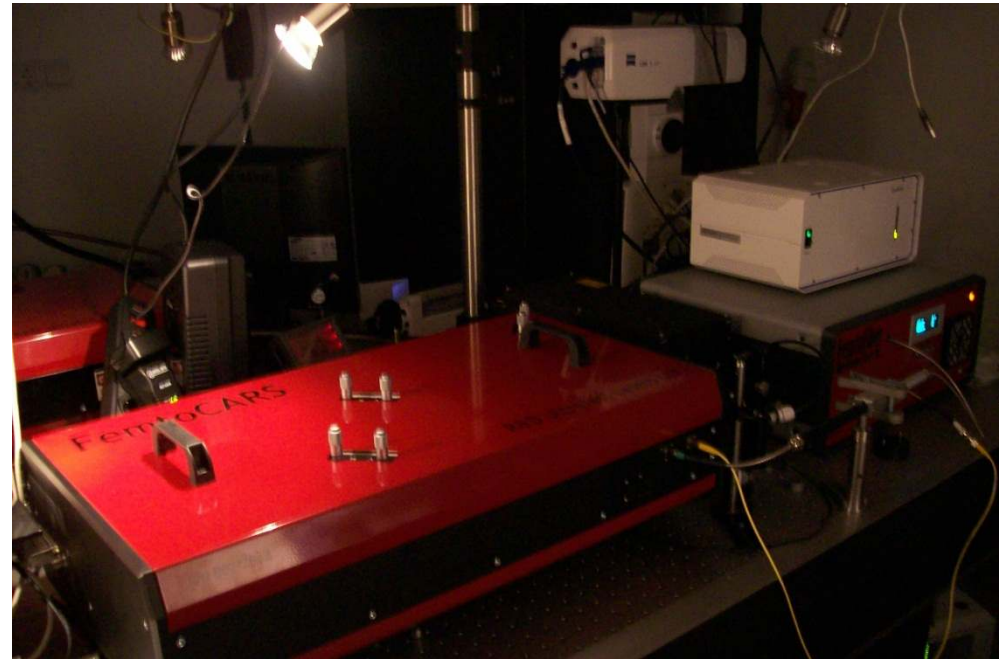
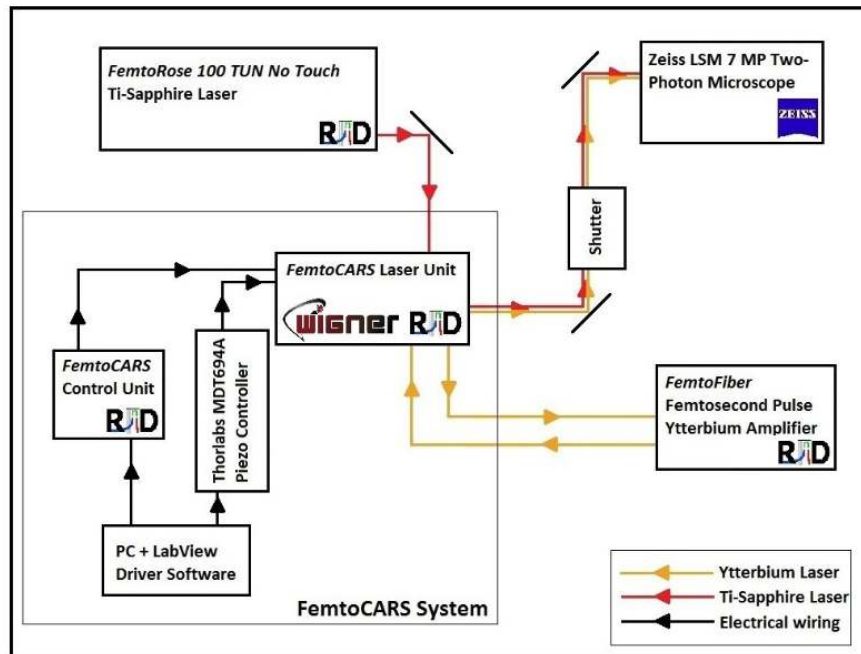


Z.5 ábra Alexa-546 jelölt DermaVir nanorészecske (AF546-DV) *in vivo* penetrációs vizsgálata egérbőrön *FiberScope* nemlineáris mikroendoszkóppal, ~1030 nm-es gerjesztéssel (128x128 képpont). Zöld csatorna: kollagén SHG jele, piros csatorna: az AF546-tal jelölt DermaVir részecskék fluoreszcens jel a DermaPrep/DermaVir kezelést követő 1 óra múlva. A „z-stack” felvétel sorozaton jól látszik, hogy a Langerhans sejtek 1 óra elteltével felveszik a bőr felszínére felvitt, festékjelölt AF546-DV részecskéket, ami kirajzolja a Langerhans sejtek elhelyezkedését a bőrben.

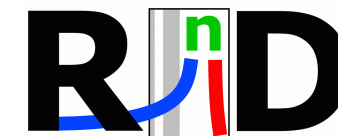
FemtoCARS

the

Label-free, 3D Microscopic Imaging System for Real-time in vivo Diagnostics



CONTROL



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



H-1012 Budapest, Attila str. 73, HUNGARY
www.fslasers.com

Phone/Fax: +36 (1) 392 2582
r.szipocs@szipocs.com

FemtoCARS

the
Label-free, 3D Microscopic Imaging System for Neurology

In 2012, a novel, cost efficient CARS imaging setup was developed at Wigner RCP of HAS (Csati, 2012), which was used for label-free, 3D microscopic imaging of different biological samples, such as white adipose tissue (Kolonic, 2012). A commercial version of the prototype CARS system at Wigner RCP has been constructed and built for the University of Szeged (USZ) by the end of 2012 by the R&D Ultrafast Laser Ltd in collaboration with Carl Zeiss Jena. The CARS imaging system comprises a femtosecond pulse, tunable Ti:sapphire laser (R&D), an inherently synchronized two-stage Yb-fiber amplifier unit (R&D), a CARS Unit (R&D) and a CARS-upgraded version (Wigner) of Axio Examiner LSM 7 MP microscope (Carl Zeiss). Using this commercial setup, researchers at USZ (Molnár G) and Wigner RCP (Szipőcs R) have demonstrated that this novel CARS-imaging setup allows for label free imaging of the brain (Figure 1.). For instance, tuning their CARS setup to CH₂ vibration of myelin lipids, they could record high quality 3D CARS images of the myelin. Since myelin loss and axonal degeneration are the pathological hallmarks of several inherited and acquired neurological disorders, a method that allows simultaneous visualization of the two inter-related processes in live tissues may have great research utility. Such method had not been available prior to the introduction of the CARS system.

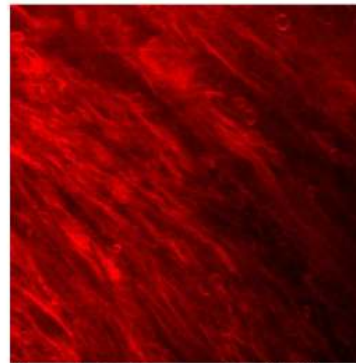
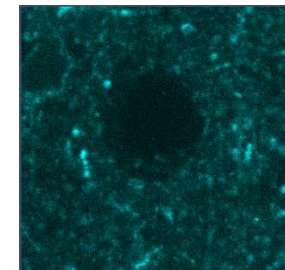


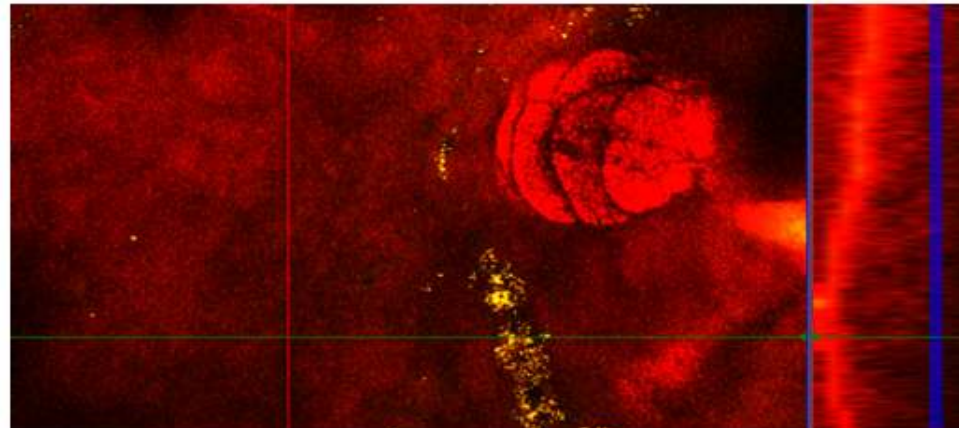
Figure 1. CARS image of myelin fibers in the white matter of rat. In vivo preparation.



FemtoCARS

the

Label-free, 3D Microscopic Imaging System for Real-time *in vivo* monitoring of nanomedicine or cosmetics



Z.7 ábra PEIm részecskék *in vivo* penetrációjának vizsgálata egérbőrben CARS módszerrel.

FemtoCARS

the

Label-free, 3D Microscopic Imaging System for Real-time in vivo Diagnostics

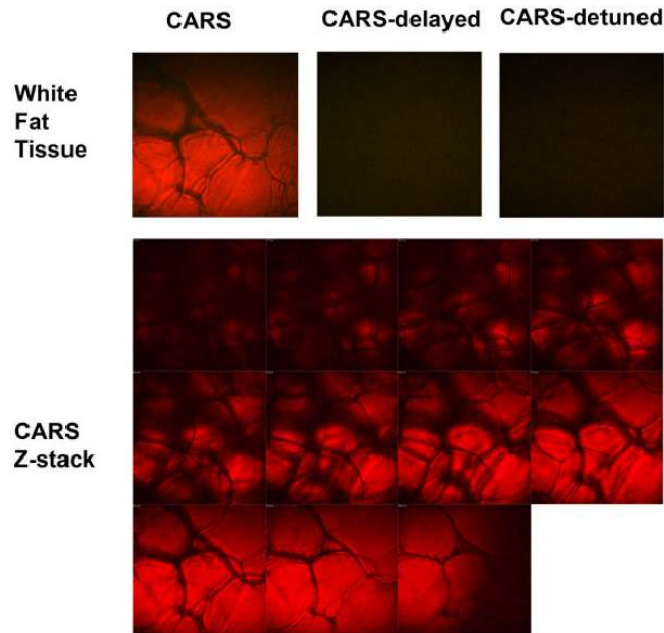
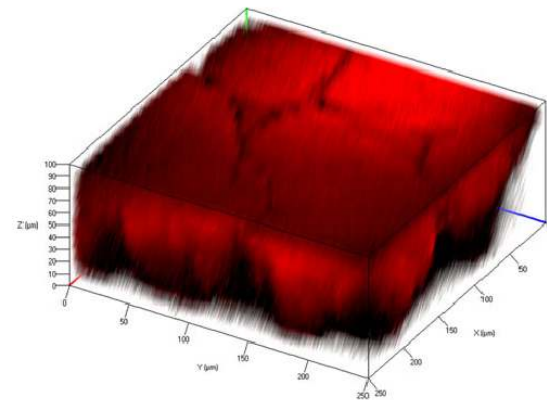


Fig. 3 CARS-images of murine white adipose tissue.



Kolonics A, Csáti D, Antal P, Szipőcs R; A simple, cost efficient fiber amplifier wavelength extension unit for broadly tunable, femtosecond pulse Ti-sapphire lasers for CARS microscopy; In: Proc. BIOMED Biomedical Optics and Digital Holography and Three Dimensional Imaging (Miami, Florida, United States, April 28-May 2 2012); OSA Technical Digest Series; BSu3A.28 /1-3 (2012)

FemtoCARS the Label-free, 3D Microscopic Imaging System for Real-time in vivo Diagnostics

Dermis

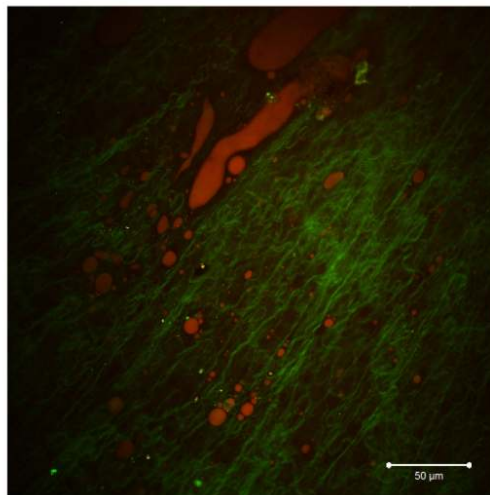


Photo: Kolonics/Szipőcs

Epidermis

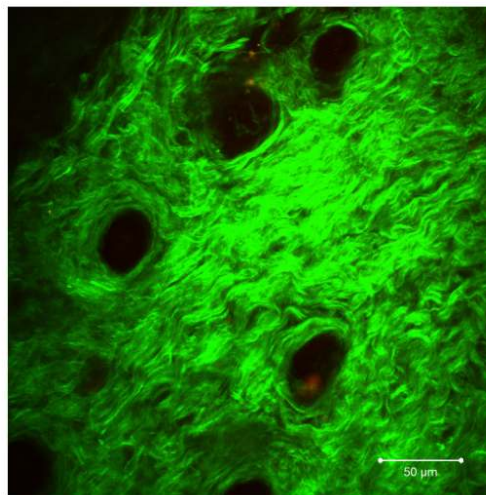
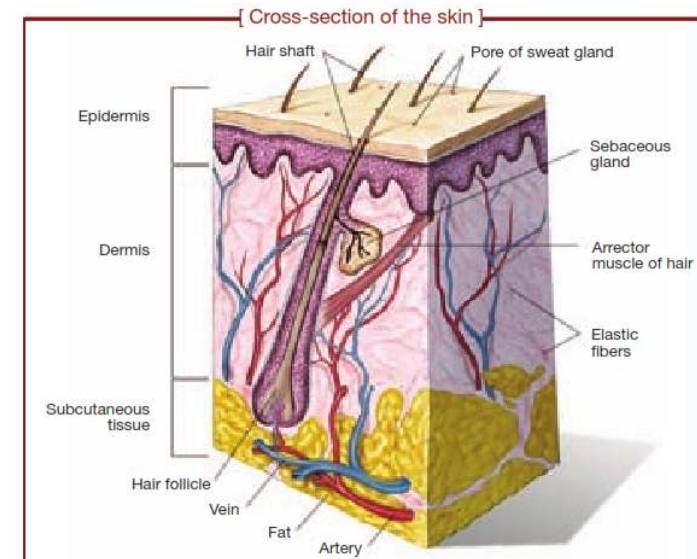


Photo: Kolonics/Szipőcs



red: CARS signal from lipids, green: SHG signal of collagen

NIH Public Access

Author Manuscript

Lab Invest. Author manuscript; available in PMC 2013 April 10.

Published in final edited form as:

Lab Invest. 2012 October; 92(10): 1492–1502. doi:10.1038/labinvest.2012.109.

Multicolored Stain-free Histopathology with Coherent Raman Imaging

Christian W. Freudiger¹, Rolf Pfannl², Daniel A. Orringer^{3,4,5}, Brian G. Saar^{1,†}, Minbiao Ji¹, Qing Zeng^{6,7}, Linda Ottoboni⁸, Wei Ying⁹, Christian Waeber⁹, John R. Sims⁹, Philip L. De Jager^{8,10,11}, Oren Sagher⁵, Martin A. Philbert¹², Xiaoyin Xu^{6,7}, Santosh Kesari^{13,14}, X. Sunney Xie¹, and Geoffrey S. Young^{6,7,*}

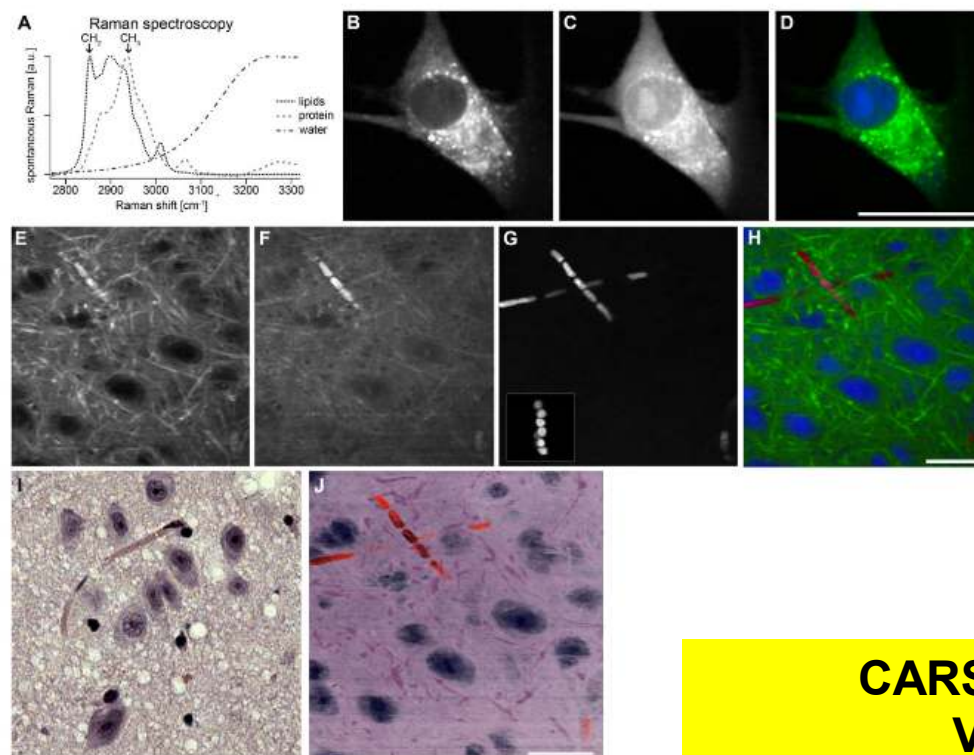


Figure 1.

Stain-free histologic imaging with multi-color CRI. (A) Vibrational spectra of the major constituents of tissue: lipids, protein and water. Arrows indicate Raman shifts at which imaging is performed. (B–D) SRS images of a live C2C12 mammalian cell acquired at the CH₂-stretching vibration at 2845cm⁻¹(B) and CH₃-stretching vibration at 2940cm⁻¹ (C). Multicolor image (D) generated from images (B) and (C) with the green channel (CH₂ image) showing the cell-body and the blue channel (thresholded CH₃-CH₂ difference image) highlighting the nuclear morphology including a bright nucleolus. (E–H) SRS images of fresh *ex vivo* brain tissue acquired at CH₂-stretching vibration at 2845cm⁻¹ (E), CH₃-stretching vibration at 2940cm⁻¹ (F), and vibrationally off-resonant showing TPA of hemoglobin at a sum frequency of 23,700 cm⁻¹ (G). Multicolor image (H) generated from images (E–G) with the green channel (CH₂ image) highlighting cytoplasm and myelin sheaths, blue channel (thresholded CH₃-CH₂ difference image) showing the nuclear morphology, and the red channel (hemoglobin image) highlighting red blood cells. (I) H&E-stained micrograph from the same region in the brain. (J) Same multicolor image as (H) with a different pseudo-color scheme, chosen to mimic the appearance of an H&E-stained micrograph, illustrates the similar image content and appearance of stain-free images and H&E stained sections. Scale bar, 25 μm.

CARS IN VIVO PATOLÓGIAI
VIZSGÁLATOKHOZ

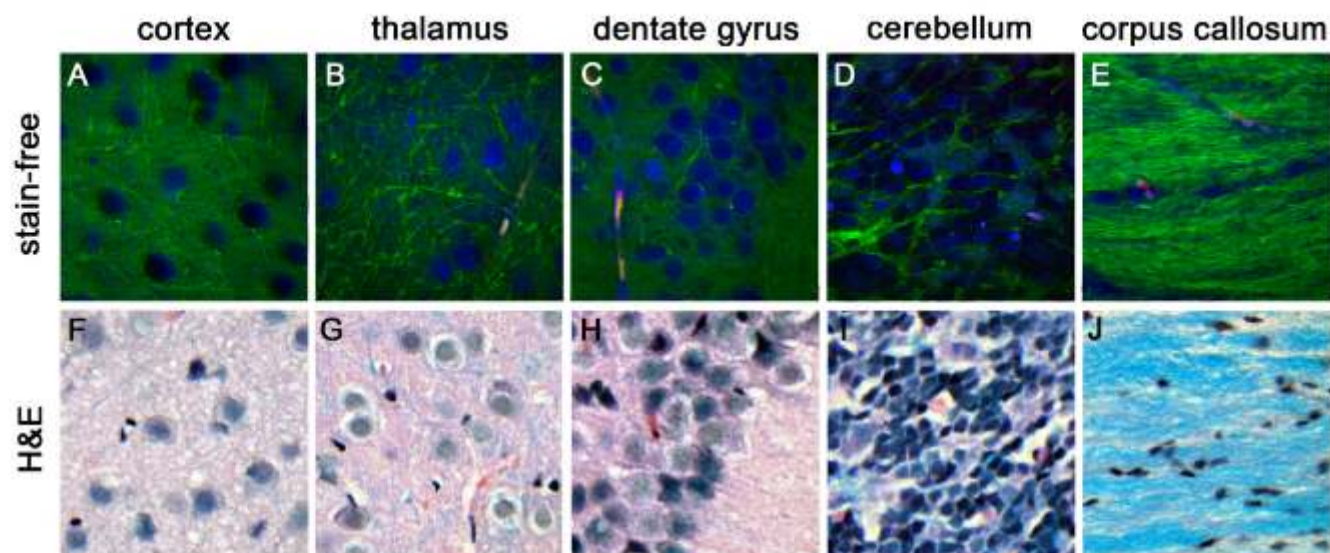


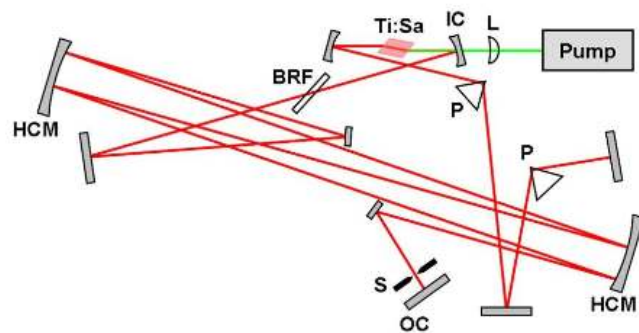
Figure 3.

Multicolor stain-free images of various brain regions in a wild-type mouse in comparison with paraffin-embedded, H&E and Luxol-stained sections. (green: CH₂ image; blue: CH₃-CH₂ difference image; red: hemoglobin image) of (A) cortex, (B) thalamus, (C) dentate gyrus, (D) cerebellum, and (E) corpus callosum. (F-J) show H&E/luxol stained section of corresponding regions.

Egyéb fontos eredmények

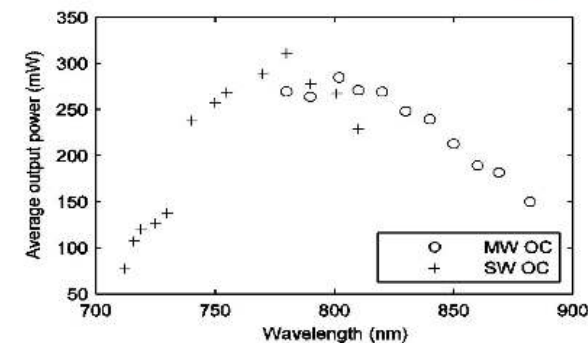
Hangolható, femtoszekundumos, hosszúrezonátoros Ti-zafír lézer

Schematic of the oscillator



L: pump focusing lens, IC: input coupler mirror, Ti:Sa: titanium-sapphire crystal, BRF: birefringent filter for tuning, P: prisms, HCM: Herriott-cell mirrors, OC: output coupler, S: slit for hard-aperture KLM

Typical measured output power vs. wavelength (at 2.6 W pump)



Two different output couplers were used for short wavelengths (SW OC, crosses) and for longer wavelengths (MW OC, circles).

FemtoRose 300 TUN/NoTouch

The Cost Efficient

Long-Cavity, Broadly Tunable, femtosecond pulse Ti:sapphire laser



Key features

- Low pump laser cost (~ 2.6 W pumping)
- Low, 22 MHz repetition rate
- Higher fluorescence signal
- Lower thermal damage in sample
- No extra-cavity chirp control is required
- Wavelength control by a Zeiss 2P microscope

Applications

- Multiphoton microscopy
- Ultrafast spectroscopy

FemtoRose 300 TUN/NoTouch

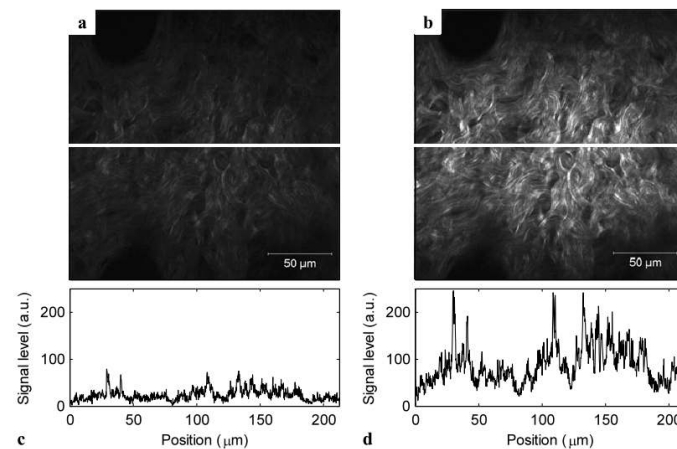
Low Average Power, High Quality Imaging in Two-Photon Microscopy

Előnyök:

- Jobb képminőség (jel/zaj arány) ugyanannál az átlagteljesítménynél
- Kisebb a minta termikus károsodásának esélye!
- Olcsóbb pumpáló lézer (532 nm, max. 4 W) kell, ezért sokkal olcsóbb a lézer!

Tunable, low-repetition-rate, cost-efficient femtosecond Ti:sapphire laser for nonlinear microscopy

Fig. 6 Two-photon absorption fluorescence raw images of mouse dorsal skin using (a) the 76 MHz laser and (b) the 22 MHz laser, at nearly the same excitation power (3.081 mW for the 76 MHz laser and 3.015 mW for the 22 MHz laser). (c) and (d) show the corresponding intensity profiles along the white horizontal line in the middle of the images



GRIN lencsés mikroendoszkóp terve

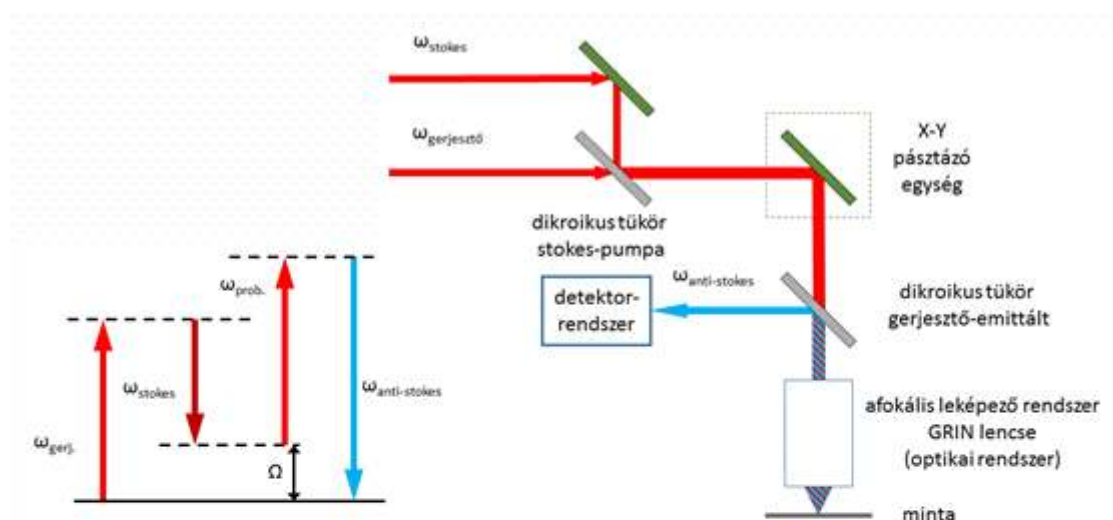
Pásztázó nemlineáris mikroszkópok optikai leképező rendszerének modellezése
GRIN lencsés endomikroszkóp



- 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

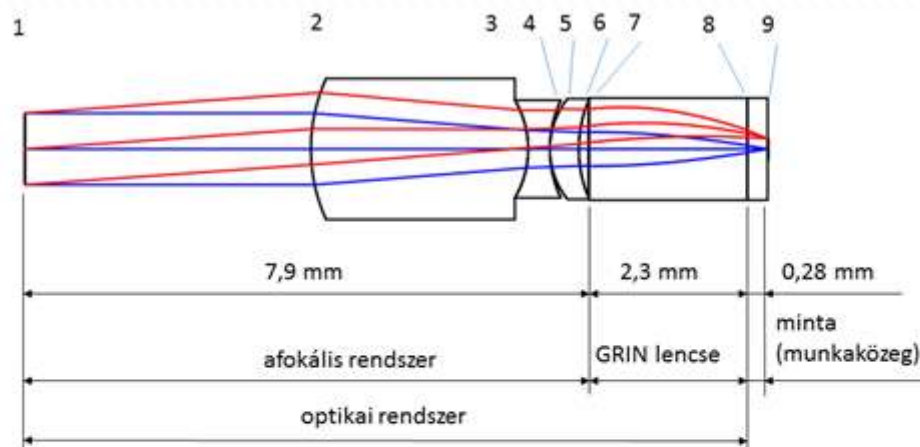
GRIN lencsés mikroendoszkóp terve



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)

GRIN lencsés mikroszkóp terve

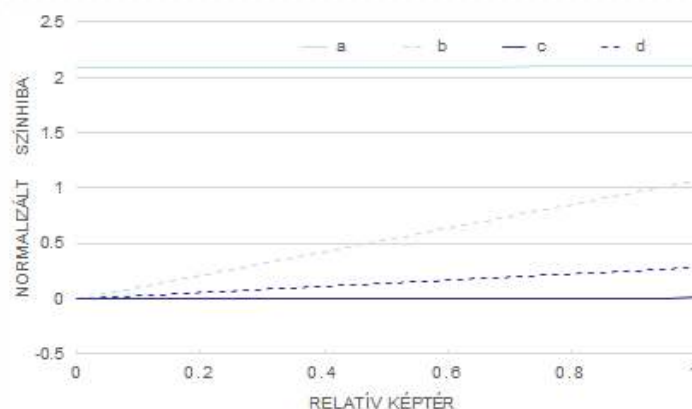


2. ábra:

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.

Egyéb fontos eredmények

GRIN lencsés mikroszkóp terve

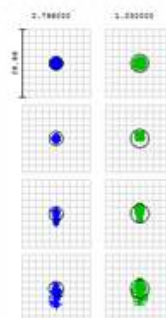
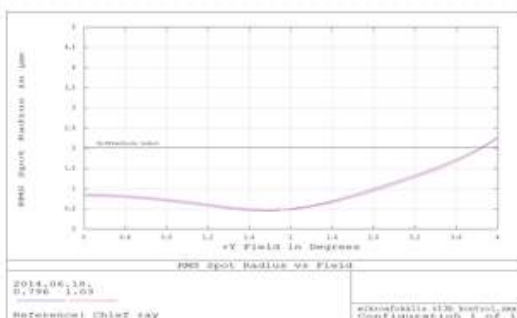


3. ábra:

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)

Fontosabb tudományos közlemények (2008-2015)

1. Várallyay Z, Saitoh K, Fekete J, Kakihara K, Koshiba M, Szepőcs R: *Reversed dispersion slope photonic bandgap fibers for broadband dispersion control in femtosecond fiber lasers*, *OPTICS EXPRESS* 16, 15603-15616 (2008)
2. Fekete J, Várallyay Z, Szepőcs R: *Design of high bandwidth one- and two-dimensional photonic bandgap dielectric structures at grazing incidence of light*. *APPLIED OPTICS* 47, 5330-5336 (2008)
3. Fekete J, Cserteg A, Szepőcs R: *All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator*, *LASER PHYSICS LETTERS* 6, 49-53 (2009)
4. Várallyay Z, Saitoh K, Szabó Á, Szepőcs R: *Photonic bandgap fibers with resonant structures for tailoring the dispersion*, *OPTICS EXPRESS* 17, 11869-11883,(2009)
5. Antal P, Szepőcs R: *Tunable, low-repetition-rate, cost-efficient femtosecond Ti:sapphire laser for nonlinear microscopy*, *APPL. PHYS. B107*, 17–22 (2012)
6. P. Bognár, D. Haluszka, N. Wikonkál, A. Kolonics, R. Szepőcs, S. Kárpáti, *Reduced Inflammatory Threshold Indicates Skin Barrier Defect in Transglutaminase 3 Knockout Mice*, *J. INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* 134, 105-111 (2014)
7. Grósz T, Kovács AP, Kiss M, Szepocs R, Measurement of higher order chromatic dispersion in a photonic bandgap fiber: Comparative study of spectral interferometric methods, *APPLIED OPTICS* 53, 1929-1937 (2014)
8. Kolonics A, Csiszovszki Zs, Tóke ER, Lőrincz O, Haluszka D, Szepőcs R, *In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy*, *EXPERIMENTAL DERMATOLOGY* 23, 596-605 (2014)
9. Toke ER, Lorincz O, Csiszovszki Z, Somogyi E, Felföldi G, Molnár L, Szepőcs 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, 566-574.(2014)
10. Várallyay Z, Szepőcs R, *Stored Energy, Transmission Group Delay and Mode Field Distortion in Optical Fibers*, *IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS* 20, 0904206/1-6 (2014)
11. Haluszka, D., Lőrincz, K., Molnár, G., Tamás, G., Kolonics, A., Szepőcs, R., Kárpáti, S. and Wikonkál, N. M: „In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-stokes Raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit,” *Microsc. Res. Tech.* 78, 823–830 (2015)
12. Haluszka Dóra, Lőrincz Kende, Csákányi Attila, Vass Lajos, Krolopp Ádám, Kolonics Attila, Szepőcs Róbert, Kárpáti Sarolta, Wikonkál Norbert: „Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában,” *BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE* 91, 34–39 (2015)