

SZAKDOLGOZAT

Réder Dalma

G05UST

2015

Nyugat-magyarországi Egyetem
Savaria Egyetemi Központ
Természettudományi és Műszaki Kar
Matematika, Fizika és Műszaki Intézet

Optikai eszközök a biológiában

Konzulens: Dr. Molnár Péter

Egyetemi docens

Nyugat-magyarországi Egyetem

Természettudományi és Műszaki Kar

Biológia Intézet, Állattani tanszék

Készítette: Réder Dalma

G05UST

Fizika BSc

Szombathely, 2015

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	5
2	Célkitűzés.....	6
3	Irodalmi áttekintés	7
3.1	A fény kölcsönhatása a biológiai szövetmintákkal	7
3.1.1	Spektroszkópia alapjai	7
3.1.2	Molekulaspektroszkópia	9
3.1.3	Fényszóródás.....	9
3.1.4	Fluoreszcencia és fluoreszcens festés, jelölés	11
3.1.5	Átlátszó szövetek mikroszkópiája, kontrasztos kiemelések.....	12
3.1.6	Szövetek nemlineáris optikai tulajdonságai	13
3.1.7	Anyagok manipulálása fénnel	13
3.2	Klasszikus optikai módszerek a biológiában.....	14
3.2.1	Mikroszkópia	14
3.2.2	Kontrasztos kiemelések.....	15
3.2.3	Epifluoreszcens mikroszkóp	19
3.2.4	Konfokális mikroszkóp	22
3.2.5	Multifoton mikroszkópia.....	24
3.2.6	Molekulák közti kapcsolatok felderítése fluoreszcens módszerrel .	25
3.2.7	Kalcium imaging.....	27
3.2.8	Membránpotenciál leképezése	29
3.2.9	Optikai módszerek a molekuláris biológiában.....	30
3.2.10	Enzim aktivitás mérés- színes reakciók	32
3.2.11	Optikai csipeszek	33
3.3	A határok kitolása, forradalmian új optikai módszerek a biológiában...	35
4	Módszerek.....	38
4.1	Sejthalál nyomon követése	38
4.1.1	Élő- és halott sejtek kimutatása.....	38
4.1.2	Metabolikus aktivitás mérése	39
4.1.3	Sejt jelölés	40
4.1.4	Time lapse microscopy	41
5	Eredmények	42

6	Megvitatás.....	45
7	Köszönetnyilvánítás.....	46
8	Irodalomjegyzék	47

1 Bevezetés

A látás talán a legfontosabb érzékszervünk, hiszen a környezetünkből származó információ 80 százaléka ezen az úton keresztül jut el hozzánk. Nem véletlen tehát, hogy a mai napig a legkedveltebb és legtöbb információt adó vizsgálati módszerek az optikai képalkotó eljárások. Az elektromágneses hullámok széles körben felhasználhatóak az anyag tulajdonságainak (kémiai, biológiai, fizikai) vizsgálatára.

Kíváncsiságunk miatt jobban meg akartuk ismerni a makroszkopikus dolgok kisebb, apróbb alkotóit és meg akartuk vizsgálni a szabad szemmel nem látható élőlényeket, építőelemeket. Ehhez azonban már kellettek bizonyos eszközök, amelyek segítettek láthatóvá tenni a „láthatatlant”. Az első mikroszkóp megalkotása óta a hihetetlenül gyorsan fejlődő tudomány megköveteli a fejlettebb, jobb nagyítású és felbontású képalkotó eszközöket, amelyeket a technika rohamos fejlődésével meg is lehet valósítani. Ahogy a kutatások egyre szerteágazóbb témájúak, úgy lehet egyre speciálisabb műszereket építeni.

Szakdolgozatomban a biológiai módszerek és a hozzá használt optikai eszközök fejlődését fogom nyomon követni.

2 Célkitűzés

- A biológiában alkalmazott optikai módszerek, azok működési elveinek bemutatása különös tekintettel a fluoreszcens módszerekre.
- A témához kapcsolódó irodalom felkutatása és áttekintése.
- A napjainkban használt legfontosabb biológiai optikai leképezési módszerek valamint a közeljövőben várható fejlesztések bemutatása.
- Néhány alapvető módszer használatának gyakorlati bemutatása és a kapott eredmények kiértékelése.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A fény kölcsönhatása a biológiai szövetmintákkal

A biológiai szöveteket fénnel való kölcsönhatásuk esetén elnyelő és szóró közegeknek tekintjük. Találkozásuk során optikai és termikus reakciók játszódnak le. Amikor a fényt alkotó részecskék, a fotonok elérik a szövetmintát, a következő esetek lehetségesek. Egyes fotonok visszaverődhetnek a felületről Fresnel törvényei szerint. Ám a fotonok többsége belép a sejtek, szövetek belsejébe és itt különféle eseményeket vált ki. Elnyelődhet és ekkor hő, valamilyen kémiai reakció vagy fluoreszcens sugárzás formájában hasznosulhat. A fotonok szóródhatnak egyes molekulákon, ekkor haladásuk iránya megváltozik. Harmadik esetben, a fotonok anélkül, hogy bárminek ütköznének, vagy elnyelődnének, áthaladnak a mintán és a túlsó oldalon távoznak. Ezeket nevezzük ballisztikus fotonoknak. (BME 285: Introduction to Biomedical Optics, 2015.)

A szövetek fénnel történő vizsgálatának, eredményeinek értelmezéséhez ismernünk kell a minták elnyelési és szóródási tulajdonságait a hullámhossz függvényében. 2013-as publikációjában Jacques összefoglalja azokat a formulákat, amelyekből megtudhatjuk az egyes sejt- és szövettípusokban fellelhető chromophore-ok abszorpciós sajátosságait, valamint ezeknek a mintáknak a szórási paramétereit. Cikkében leírja azt is, hogy egy általános szöveti minta felhasználásával hogyan lehet modellezni egy valós szövet várható tulajdonságait. (Jacques, 2013)

A sejt- és szövetminták fénnel való tanulmányozásához azért is szükséges a vizsgálandó minták és a vizsgálat céljából használt fény tulajdonságainak ismerete, hogy megtervezhessük és megalkothassuk az újabb, korszerűbb és megfelelőbb megfigyelési módszereket és eszközöket. Ezeket a technikákat és készülékeket úgy kell kifejleszteni, hogy ne tegyenek kárt a mintákban, ugyanakkor képesek legyenek az apró részleteket értékelhetővé tenni.

3.1.1 Spektroszkópia alapjai

Spektroszkópiának nevezzük azt, amikor egy módszerrel úgy gyűjtünk információt valamiről, hogy a kisugárzott színeképét, spektrumát tanulmányozzuk. A spektroszkópia fogalmát Arthur Schuster használta először 1882-ben.

A spektroszkópia tudományához tartozó módszerek rendkívül szerteágazóak, így csoportosításuk többféleképpen történhet.

1. A kölcsönhatásban részt vevő sugárzott energia típusa szerint:
 - Elektromágneses sugárzás: ez volt az első energiaforrás, amit spektroszkópiához használtak. Több csoportját különböztetjük meg a spektrum hullámhossza alapján: mikrohullámú-, terahertzes-, infravörös-, közeli infravörös-, látható-, ultraibolya-, röntgen- és gamma spektroszkópia. A biológiai vizsgálatok során főleg az elektromágneses sugárzást használják.
 - Részecskesugárzás: a deBroglie szerint az anyaghullámokban a részecskék hullámhossza meghatározható a kinetikus energiájukból.
 - Akusztikus spektroszkópia: nyomáshullámok sugárzó energiája.
 - Mechanikai módszerekkel egyes szilárd anyagok felé sugárzással közölhetünk energiát.
2. A kölcsönhatás típusa szerint:
 - abszorpciós spektroszkópia (az anyag elnyeli az energiát)
 - emissziós spektroszkópia (az anyag sugároz ki energiát a környezetébe)
 - rugalmas szórás/reflexiós spektroszkópia (a beérező sugárzás visszaverődik vagy szóródik az anyag miatt)
 - impedancia spektroszkópia (a közeg ellenállásával lassítja az energia rajta való áthaladását)
 - rugalmatlan szórás (a sugárzás és az anyag közötti energia csere miatt a sugárzás hullámhossza megváltozik)
 - rezonancia spektroszkópia (a sugárzó energia összekapcsol két kvantumállapotot az anyagban)
3. A kölcsönhatásban részt vevő anyag típusa szerint:
 - Atomok spektroszkópiája: minden atom rendelkezik egy saját, csak rá jellemző spektrummal, így ezzel a vizsgálati módszerrel meg lehet határozni különböző anyagok elemi összetételét, valamint ezzel a módszerrel fedezte fel Robert Bunsen és Gustav Kirchhoff 1860-ban a céziumot, majd egy évvel később a rubídiumot.

- Molekulák spektroszkópiája: az atomok különféle kombinációiból álló molekulák vizsgálata. Úgy, mint az egyes atomoknak, a molekuláknak is megvannak az egyedi spektrumaik.
- Kristályok és kiterjedt anyagok spektroszkópiája: a különböző atomokból és molekulákból kialakuló kristályoknak és anyagoknak számos, nagyobb sűrűségű energetikai állapotaik vannak, amely sűrűség miatt a spektrumaik gyengébbek lesznek és kevésbé elkülöníthetőek egymástól.
- Nukleonok spektroszkópiája: a nukleonoknak is megvannak a különféle energiaállapotaik. A nukleáris spinek állapotait az NMR spektroszkópia segítségével különíthetjük el. (Angol Wikipedia, 2015.)

3.1.2 Molekulaspektroszkópia

A biológiában főleg a molekula spektroszkópiai módszereket használjuk ismereteink gyarapításához. Ahhoz, hogy megértsük az élő rendszerek működését, mikromolekuláris és makromolekuláris szinten kell végeznünk vizsgálatainkat, amelyekhez megfelelő a spektroszkópia tudománya. Ám a vizsgálat így sem lehet akadálymentes, hiszen a biológiai rendszerek rendkívüli bonyolultsága és apró mérete kihívások elé állítja a kutatókat.

Az élő szervezetek spektroszkópiai módszerekkel való vizsgálatának három alapvető típusáról (abszorpció, emisszió és diffrakció) és ezek korlátairól Schultz 2008-as munkájában olvashatunk. Az egyik legfőbb nehézség az, hogy ezek az élő rendszerek jelentős méretbeli skálán mozognak, méterestől a pikométeres tartományban, így az eszköz érzékenységét nehéz beállítani. A másik probléma az, hogy nagyon komplexek a rendszerek és a megfigyelési technikák nem képesek a szelekcióra a sok alkotóelem közül. A mai technika megengedi a molekulaszintű megfigyeléseket, de a vizsgálatok során nem tudunk minden információt megszerezni. (Schultz, 2008)

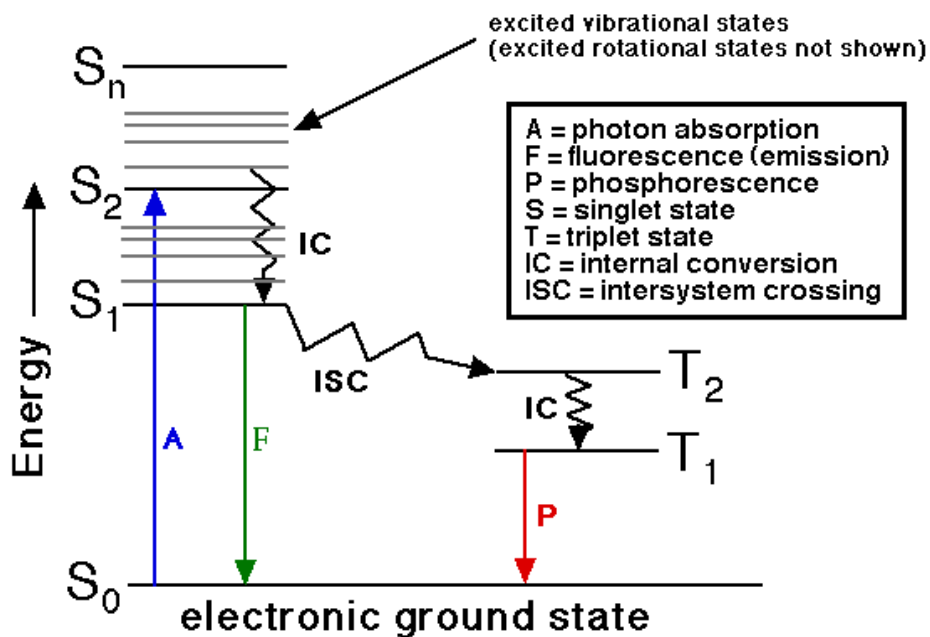
3.1.3 Fényszóródás

A szövetek felépítését, szerkezetét sejt- és sejt alatti szinten a mintára irányuló fény szóródásával feltérképezhetjük. A szövetek inhomogenitását okozó különböző

sejteken és sejtalkotókon sajátosan szóródik a fény. Ezekből a jellemző tulajdonságokból, mint például a szóródás szöge vagy a polarizáció, következtetni tudunk a vizsgált minta mikroszkopikus és makroszkopikus felépítésére.

A fényszóródást kiváltó ütközés lehet rugalmas vagy rugalmatlan. Rugalmas szóródás esetén a foton energiája a szóró közeg elektronjait gerjesztett állapotba hozza, majd visszatérnek alapállapotba. Ezt a folyamatot Rayleigh-féle szóródásnak nevezzük, amely gyakori a látható és a közeli infravörös tartományban. A rugalmas szóródással lehet *in vivo* vizsgálatokat végezni. (Boustany, Boppart, & Backman, 2010)

Rugalmatlan szóródás esetén a foton energiája nem konzerválódik. Ezen szóródási folyamat alkalmazásai a biológiai vizsgálatokban a fluoreszcens-, foszforeszcens- és Raman szóródás. A foszforeszcens szóródás során a minta elektronjai egy metastabil gerjesztett állapotba kerülnek, ahonnan azonban nagyon kis eséllyel képesek visszajutni alapállapotba. Mivel ez a metastabil állapot alacsonyabb energiaszintű, mint az első gerjesztett állapot, így a kisugárzott fény hullámhossza jóval nagyobb, mint fluoreszcencia esetén és a kibocsájtott fény intenzitása jóval kisebb. Ez a folyamat 10^{-6} - 10 s-os nagyságrend alatt lezajlik. A Raman szóródásnak két fajtája létezik. Stokes Raman szóródás során az emittált foton kevesebb energiával rendelkezik, mint a gerjesztő foton. Anti-Stokes Raman szóródás esetén viszont a kibocsájtott fotonnak nagyobb energiája van, mint a gerjesztő fotonnak. A Raman szóródás azonban nagyon kis valószínűséggel következik be, ám jellegzetes keskeny spektrális vonalai miatt jó potenciális vizsgálati módszer az orvosi biológiában. (Boas, Pitris, Ramanujam 2011)



Jablonski- diagram: megmutatja a molekulák elektronikus állapotait és az egyes állapotok közötti átmeneteket.

(Forrás: <https://www.uam.es/docencia/quimcursos/Scimedia/chem-ed/quantum/jablonsk.htm>)

3.1.4 Fluoreszcencia és fluoreszcens festés, jelölés

A fluoreszcencia a rugalmatlan szóródás egyik fajtája. A folyamat során a fotonnal való ütközés által gerjesztett elektron az energiája egy részét hő, másik részét fény formájában sugározza ki, miközben visszatér alapállapotába. Ebben az esetben a kisugárzott fény hullámhossza mindig nagyobb, mint a beérkező fényé.

Vannak molekulák, amelyek képesek fluoreszkálásra. Ezeket fluoreszcens molekuláknak, fluoreszcens festékeknek vagy fluorkrómoknak nevezzük. Azonban vannak olyan molekulák, amelyek külső behatások nélkül nem képesek a fluoreszcenciára egyes vizsgálatokhoz viszont ez szükséges lenne. Ilyenkor ezeket a molekulákat fluorkrómokkal vagy fluoreszcens festékekkel megjelölhetünk. (Lichtman & Conchello, 2005)

A fluoreszcenciára képes molekulák nem véglegesen nyelik el a fényt, hanem kibocsájtják a fotonokat egy bizonyos hullámhossztartományban. Minden fluorkrómnak megvan a jellemző excitációs spektruma, amelynek egy vagy több excitációs maximuma van. Itt a legoptimálisabb a fény abszorpciója. Az

abszorpciós és excitációs spektrumok néha átfedésbe kerülnek, de a fluoreszcen és más festékek esetén jól elkülöníthetőek. Ez azért fontos, mert a sejt jelöléses vizsgálatok során, ha többféle fluorokrómot és festéket használunk ugyanazon mintán belül, el kell tudnunk különíteni egymástól az egyes típusokat. A gerjesztett festék molekulák emittált fénye a nagyobb hullámhossz tartományában lesz (ez az emissziós spektrum), még akkor is, ha a gerjesztő fény monokromatikus. Az excitációs és emissziós spektrumok és maximumok közti különbség a Stokes-eltolódással magyarázható. (Murphy, 2001)

A fluoreszcens jelölés azért kitűnő a mikroszkópai vizsgálatok során, mert a festékek nem az egész mintát, hanem csak a megfigyelni kívánt jeleket, alkotókat emelik ki a háttérből. Ezen szelektivitási tulajdonsága miatt nagyon népszerűvé vált a vizsgálati módszerek körében. Így az elmúlt néhány évtized alatt több ezer ilyen protokollt dolgoztak ki. (Lichtman & Conchello, 2005)

Az élő szervezetek működésével kapcsolatos ismereteink gyarapításában a fluoreszcens jelölés nagy segítséget nyújt. Ennek a módszernek az alkalmazásával nem kell elpusztítanunk az élő rendszereket, hiszen lehetővé teszi az in vivo vizsgálatokat. A tudósoknak, akik azon dolgoznak, hogy az egyes sejtek, alkotóelemek hogyan veszik fel, dolgozzák fel és adják tovább a beérkező jeleket egymásnak, segítségükre lehet a fluoreszcens fehérjével való vizsgálat. (Lippincott-Schwartz, 2011; Zhu, Song, Wang, & Bai, 2008) Fluoreszcens festékek használatával ma már olyan adatokat tudnak monitorozni a sejtbiológusok, mint a pH, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- koncentráció és számos enzim aktivitását. (Ivins, Clark, & Fraser, 1993)

3.1.5 Átlátszó szövetek mikroszkópiája, kontrasztos kiemelések

A fénymikroszkópos vizsgálatokat megnehezítették az úgynevezett átlátszó anyagok, mivel e minták képeiben nagyon kicsi volt a kontraszt. Az is probléma velük, hogy olyan fázis eltolódásokat okoznak a velük kölcsönhatásban lévő fénysugárnál fényszóródás vagy fényelhajlás során, amiket az emberi szem nem képes érzékelni. Ilyenek lehetnek például a sejtek, mikroorganizmusok, vékony szöveti minták, kenetek vagy a sejtalkotók. Az efféle mintákat különféle kontrasztos kiemelésekkel tudjuk vizsgálni. Ide tartozik a fázis kontraszt

mikroszkópia, a sötét látóterű mikroszkópia, differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópia és Hoffmann modulációs kontraszt mikroszkópia. (Murphy 2001)

3.1.6 Szövetek nemlineáris optikai tulajdonságai

A minták vizsgálata során használhatunk nem lineáris módszereket is, a legismertebb például a multifoton excitációs mikroszkópia. Ilyenkor figyelembe kell vennünk a szövetek nemlineáris optikai tulajdonságait. Az erősen fényesítő szövetek mélyebb tartományaiból nem lehet nagy felbontású képet alkotni a hagyományos mikroszkópokkal. A nemlineáris optikai mikroszkópokkal, különösen a két foton excitációs mikroszkóppal, ez a korlát feloldható. A módszer kifejezetten a szövetek azon tulajdonságán alapul, hogy az egyes molekulák többszörösen szórják a fotonokat. (Fritjof Helmchen & Denk, 2005)

3.1.7 Anyagok manipulálása fénnel

A biológiai, kémiai, fizikai anyagokat nem csak megfigyelhetjük, hanem a szerkezetüket befolyásolhatjuk is. Ez így van mikroszkopikus, sőt nanoszkopikus szinten is. A manipulációt többféle módszerrel végezhetjük: pásztázó próba mikroszkópokkal (atomi erő- és pásztázó alagút effektus mikroszkóp) vagy a mező gradiens csapdák (optikai csipeszek, mágneses csipeszek, dielektroforetikus csapdák). A biológiai minták, sejtek, sejtalkotók manipulálást nagyrészt optikai módszerekkel végzik.

Közel 30 évvel ezelőtt Arthur Ashkin megfigyelte, hogy a nem fókuszált lézer sugár a centrumához vonta a nagy törésmutatójú tárgyakat a mintából és húzta magával a haladás irányába. Továbbá felfedezte azt is, hogy két más-más terjedési irányú nyaláb képes három dimenziós csapdába ejteni sejteket. Későbbi vizsgálata során rájött arra, hogy egy kis területre fókuszált lézernyaláb térben határok közé tud szorítani egy apró dielektromos részecskét és kimozdítani azt a helyéről. Ezt a technikát elnevezte optikai csipesznek. Ezzel a módszerrel képes volt kiemelni majd áthelyezni egyik helyről a másikra atomokat, molekulákat és sejteket is. (Molloy, Padgett 2002)

A fizikai, biológiai és orvosbiológiai vizsgálatok szempontjából ez nagy előrelépés volt, hiszen Ashkin technikájával külön vizsgálhattak egyes atomokat,

molekulákat, egyes sejteket, sejt rendszereket emelhetek ki anélkül a környezetükből, hogy bármilyen sérülés érte volna azokat. Jó eszköz volt arra is, hogy biológusok könnyebben vizsgálhassák a baktériumok flagellumainak tulajdonságait (Block, Blair, & Berg, 1989), elfogjanak baktériumokat és vírusokat (Ashkin & Dziedzic, 1987), manipulálhassanak sejteket (Ashkin, Dziedzic, & Yamane, 1987) és sejtalkotókat (Ashkin & Dziedzic, 1989), megmérhessék a motorfehérjék által kifejtett erőket (Simmons, Finer, Chu, & Spudich, 1996) és a DNS szálak nyúlását (Wang, Yin, Landick, Gelles, & Block, 1997).

3.2 Klasszikus optikai módszerek a biológiában

Az elmúlt évek során a biológiai rendszerek külön ágáá nőtték ki magukat az utóbbi évtizedekben. Ebben nagy szerepet játszottak a képalkotó módszerek, amelyeknek segítségével az elméleti feltevések megerősítésre vagy cáfolásra jutottak a gyakorlatban. A képalkotó módszereknek több csoportja van, például a mikroszkópia, ultrahang, CT, MRI, PET (Kherlopian et al., 2008). Az alábbiakban a klasszikus optikai módszereket és eszközöket fogom részletezni.

3.2.1 Mikroszkópia

A mikroszkópia alapjai már az ókorban megszülettek, amikor rájöttek, hogy különböző csiszolt kristályokon keresztül tekintve a kisebb tárgyak nagyobbaknak látszanak. Az első mikroszkóp megszületésére még várni kellett a XVII. századig. Innentől kezdve a mikroszkópia fejlődése és a sejtbiológia szorosan összekapcsolódtak. Ez az eszköz azért ért el ilyen sikereket a kutatók körében, mert a jobb képfelbontás segítségével kettő vagy több, egymáshoz nagyon közeli dolgot meg tudtak különböztetni, a háttérben el tudtak különíteni kisebb egybefüggő régiókat és láthatóvá tette a szabad szemnek láthatatlanul apró dolgokat. Az emberi szem felbontóképessége 10^{-4} m-es nagyságrend alá nem terjed ki. A mikroszkópokkal viszont 10^{-7} m-től, akár a 10^{-10} m-es nagyságrendekben lévő tárgyakat is képesek vagyunk vizsgálni. Nagyon sok felfedezést és eredményt sikerült elérni a mikroszkópok használatával onnantól kezdve, hogy Zaccharias Janssen és Hans Janssen megalkották az első mikroszkópot. (Masters, 2008.)

Mivel a mikroszkópia nagy elterjedtsége és fejlődése miatt rengeteg új és régi technika létezik, rengeteg metódus közül tudnánk választani. Az alábbiakban

azokat a vizsgálati eszközöket és módszereket foglalom össze, amelyeket a molekuláris biológiában használunk.

3.2.2 Kontrasztos kiemelések

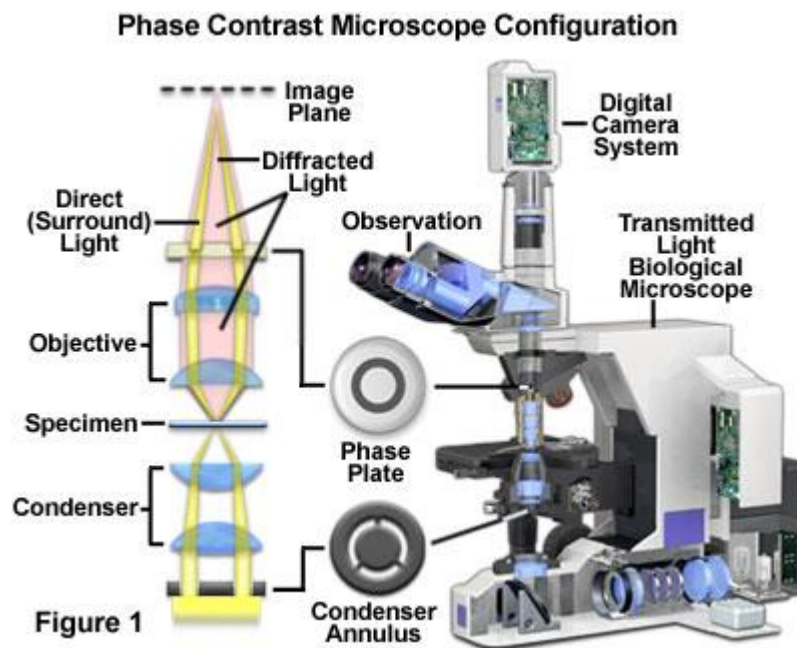
A kontrasztos kiemeléseket, olyan esetekben használjuk, amikor a vizsgálati tárgy valamilyen tulajdonsága miatt nem tűnik ki a környezetéből, így fénymikroszkópokkal a megfigyelésük nem lehetséges. Többféle ilyen módszer is létezik, de ezek közül én csak néhányat emelek ki.

A fázis kontraszt mikroszkópia során azokat a mintákat vizsgáljuk, amelyek a fehér fényt nem nyelik el, hanem elhajlítják ezáltal fáziseltolódást okoznak. Erre a problémára Frits Zernike alkotott meg egy módszert az 1930-as években, majd 1936-ban a Zeiss bemutatta az elv alapján felépített készüléket. Zernike az új technika kidolgozásáért 1953-ban fizikai Nobel-díjat kapott.

A mikroszkóp a vizsgált tárgy által okozott elhajlást átalakítja a képen lévő intenzitás különbségekké. Így a képen láthatóvá válnak a különböző alkotók. A beérkező fénysugár a mintát elérve két úton halad tovább. Az egyik komponens nem térül el, hanem áthalad a mintán, anélkül, hogy kölcsönhatásba lépne vele. A másik hullám elhajlik, és több irányba szóródik, minek következtében fáziskésést szenved. Ezt a két hullámot a mikroszkóp objektívének lencséje összegyűjti és fókuszálja a kép síkjában, ahol interferencia (erősítés vagy kioltás) lép fel. A fáziskésést okozó helyen a kép kontrasztosabb lesz, mint környezetében.

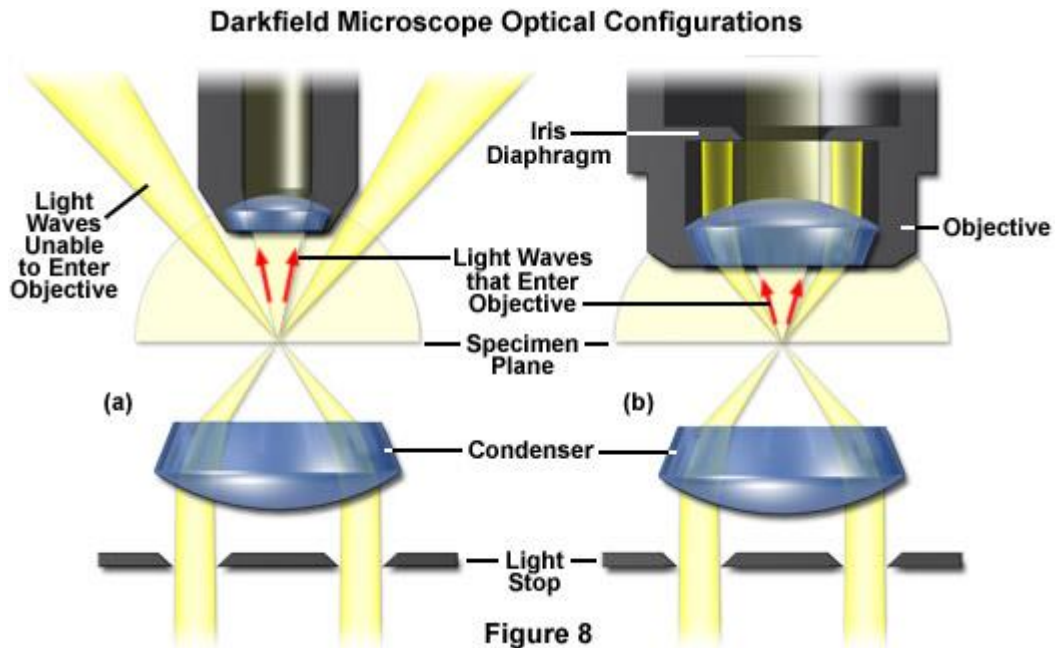
Az eszköznek két fontos alkotóelemre van szüksége ahhoz, hogy a kontrasztos képet létre tudja hozni. Kell egy gyűrűdiafragma a kondenzor apertúrájára erősítve, amely egy sötét lapból és egy átlátszó körgyűrűből áll, így a tárgyat egy kör alakú fénysugár világítja meg. A diffrakciós síkban (az objektív hátsó fókuszponti síkjában) a tovább haladó és az eltérült sugarak elválnak egymástól. A ketté vált nyalábok fázisát és amplitúdóját így külön-külön tudjuk változtatni. Kell egy fázislemez is, amely egyes fázis kontraszt objektívekben egy fény elnyelő fém bevonatú, maratott üveggyűrűből készült, amely az eltérítetlen hullám fázisát $\lambda/4$ -gyel eltolja és 70-75%-kal csökkenti az intenzitását. Így a minta által okozott interferencia után keletkezett képen az egyes pontok intenzitásának különbségeit az emberi szem már képes érzékelni a mikroszkópon keresztül.

Pozitív fázis kontraszt esetén az elhajlított hullám fázisa késik a tovább haladó hulláméhoz képest. Így például azokat a sejt alkotókat, amelyeknek a törésmutatója magasabb, mint az őket körülvevő közegé sötétebb képként látjuk, amely tárgyak törésmutatója alacsonyabb, mint a médiumé, azokat pedig világosabbnak látjuk. Lehetséges az optikai rendszerrel negatív fázis kontrasztot is létrehozni. Ekkor a továbbhaladó hullám fázisa késik az elhajlított hulláméhoz képest. A magasabb törésmutatójú alkotók világosnak látszanak a szürke háttérben.



A fázis kontraszt mikroszkóp felépítése és benne a fény haladásának útja (Forrás: http://mafihe.hu/~wiki/wiki/index.php/Mint%C3%A1zat_2.%C3%B3ra)

A sötét látóterű mikroszkópia nem sokban tér el az előzőtől. Ebben az esetben a tárgy megvilágítása olyan szögben történik, hogy az objektívbe csak az a komponens kerül be, amelyik eltérül a megvilágított mintán, az irányváltoztatás nélkül továbbhaladó fénysugár pedig nem. Így a háttér megvilágítatlan, sötét marad, benne a mintát alkotó elemek viszont csillogóan világítanak. A hátránya is éppen ebben rejlik, hiszen a csillogás miatt a felszín alatti rész nem vizsgálható.



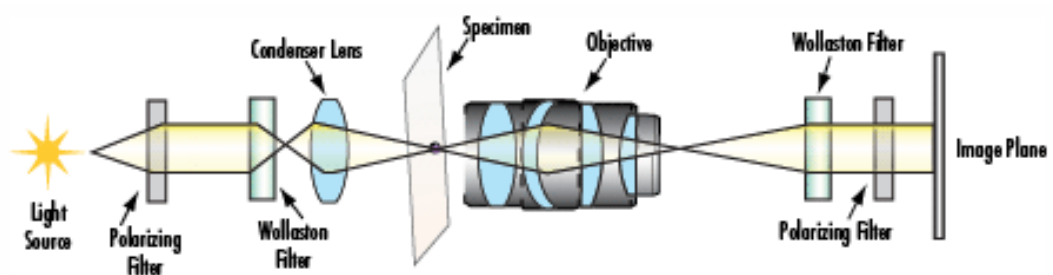
A sötét látóterű (dark field) mikroszkóp optikájának felépítése és benne a fény haladásának útja

(Forrás: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>)

Differenciál interferencia kontraszt (DIC- Differential Interference Contrast) mikroszkópia esetén a mintát egy egymáshoz közeli, koherens fénysugár párral világítják meg. Ha a nyalábok a mintának olyan részén haladnak át, ahol változó a törési index vagy a vastagság vagy mindkettő, akkor különbség lesz a sugarak által megtett utak hossza között és ez a képen megjelenő amplitúdó változást okoz. A differenciális interferencia a két hullám között erős kontrasztos mintát eredményez a tárgy és az azt körülvevő közeg határán. A módszerhez felhasznált polarizált fénysugarakat egy speciális nyaláb hasító prizmával, úgynevezett Wollaston-prizmával generálják, majd egyesítik. Ez a technika nagyon hasonló a fázis kontraszt mikroszkópiához, ám egy fontos különbség mégis van. Habár mindkettő esetében a fénysugarak relatív fázis különbsége számít, a fázis kontraszt során az amplitúdó változás közvetlenül az elhajlás nélkül továbbhaladó és az eltérített sugarak optikai útjának különbségéből adódik, a DIC során pedig az optikai útkülönbség görbéjének a deriváltjából adódik.

A módszerhez tartozó optika már a legtöbb kutatási célra használt mikroszkóphoz elérhető. Az eszköz felépítéséhez négy lényeges elem szükséges. Ezek a mikroszkóp világítóberendezésétől a kép síkjáig sorrendben a következők:

- Polarizátor: ez a kondenzor előtt van, síkban polarizálttá teszi a megvilágító fényt. A rezgés síkja a vízszintes síkban van.
- Kondenzor DIC prizma/ Wollaston I-prizma: minden beérkező polarizált fényt két nyalábbá hasít (O és E sugárpár), amelyek 90° -os szöget zárnak be egymással és majd az interferencia rendszerben játszanak szerepet.
- Objektív DIC prizma/ Wollaston II-prizma: egyesíti az egymásra merőleges sugárnyalábokat miután áthaladtak az objektívlencsén. A prizmából kijövő fény lineárisan és elliptikusan polarizált. Jelentős szerepe van a kép megalkotásában.
- Analizátor: a rezgést átengedő síkja függőleges beállítottságú. Segítségével a megalkotott kép térhatású lesz. (Murphy 2001.)

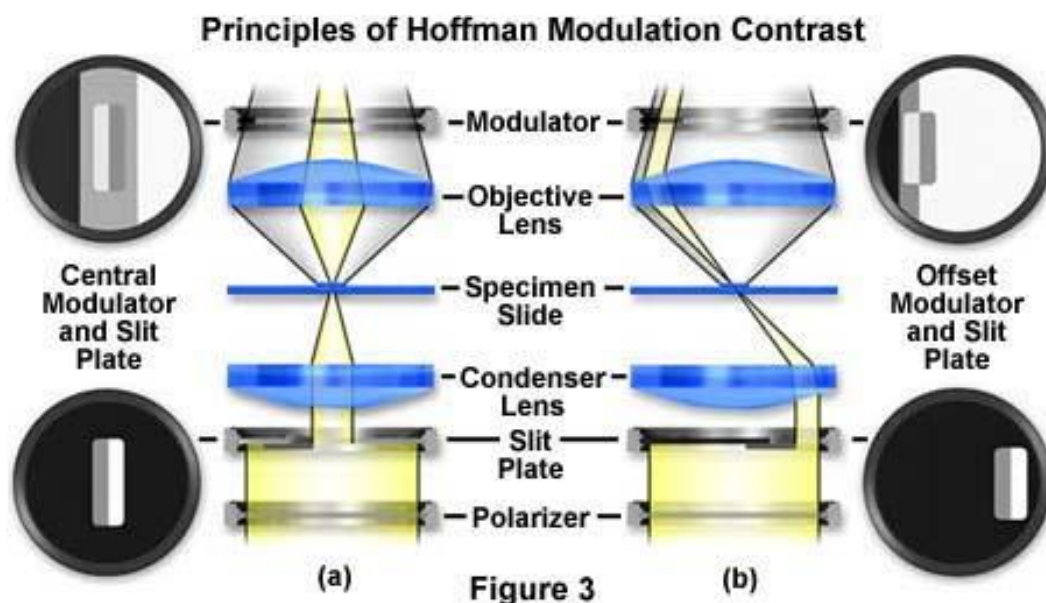


A differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópon belül a fénysugár haladásának útja

(Forrás: <http://www.edmundoptics.com/technical-resources-center/microscopy/optical-microscopy-application-differential-interference-contrast/>)

A Hoffmann moduláció kontrasztos mikroszkópia a DIC mikroszkópia egyik alternatívája. A módszer szerint szintén polarizált fénnel van megvilágítva a minta, de ebben az esetben nincsenek Wollaston prizmák. Az kondenzor első apertúrájába optikai rés van beépítve, míg az objektív hátsó apertúrájában egy modulátor lemez van. Ez a modulátor három részből áll: egy közel áttetsző rész a lemez szélén, mellette egy félig sötét téglalap, amely csak 15%-ban engedi át a

fényt, a harmadik rész pedig egy nagy, átlátszó zóna, amely teljesen átengedi a fényt. A kép ebben az esetben is térhatású. A képfelbontása és az érzékenysége gyengébb, de alacsonyabb nagyításon jobb képet mutat, mint a DIC mikroszkóp. (Hoffman & Gross, 1975)



A Hoffman modulációs kontraszt mikroszkóp optikájának felépítése és képalkotásának működési elve

(Forrás: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/hoffman.html>)

3.2.3 Epifluoreszcens mikroszkóp

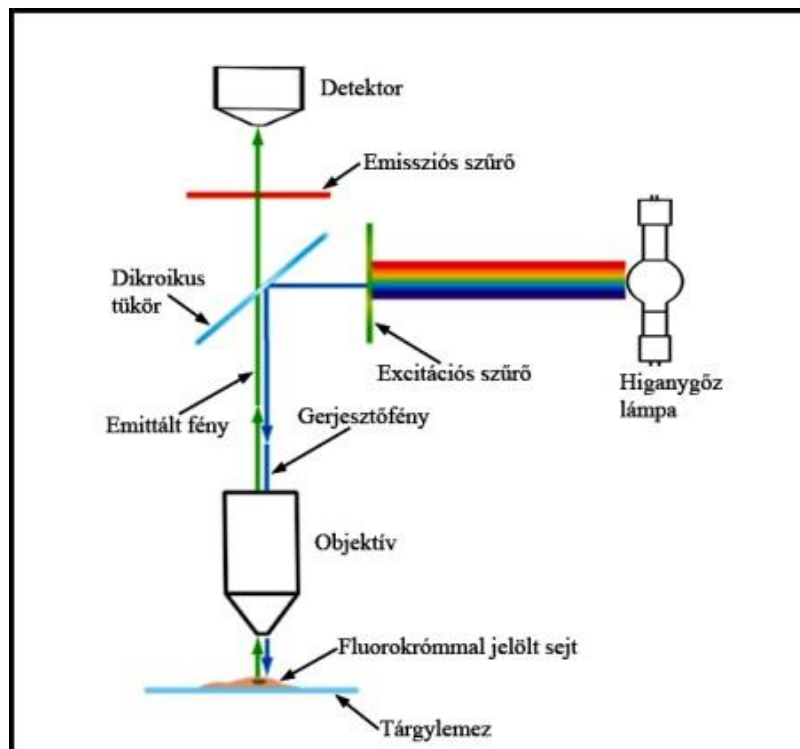
Az epifluoreszcens mikroszkóp a fluoreszcens mikroszkópok egy olyan fajtája, amelyben a gerjesztő fényforrás nem a talp részénél helyezkedik el, hanem az eszköz objektíve fölött. Ez azért jó megoldás, mert előbbi esetben a fény kondenzoron, tárgyon majd az objektíven keresztül a vizsgáló szemébe jut, ami bizonyos esetekben, például UV fénnel történő megvilágítás során, károsítja a szemet. Ha a gerjesztő fényforrás a mikroszkóp felső részén van, akkor a megvilágító fény az objektíven, a tárgyon keresztülhalad, majd az eszköz talpi részén elnyelődik, így nem károsítja a szemet.

Az alap fluoreszcens mikroszkópot több ponton is módosítani kellett ahhoz, hogy megfelelő képet kapjunk a vizsgált tárgyról. A világító berendezésnek és az objektívnek a tárgy ugyanazon oldalán kell lennie. Be kell építeni egy szűrőköckát

a fényforrás és a tárgy közé. Ki kell választani a megfelelő objektívet, amely összegyűjti a lehető legtöbb fényt, ezáltal biztosítja a jó felbontást és a kontrasztot.

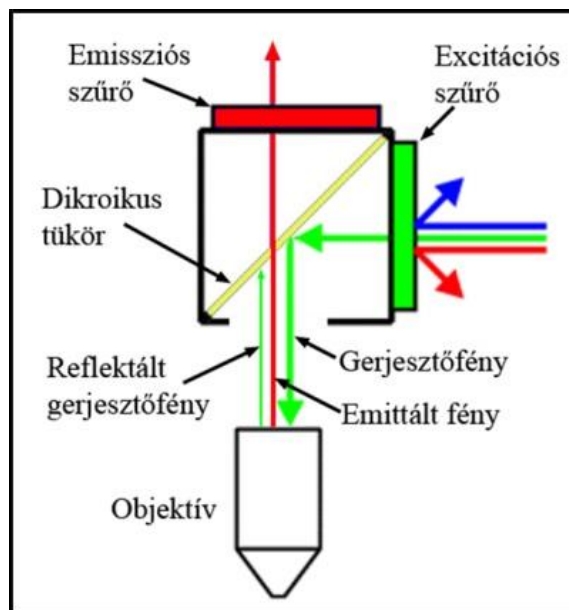
A világító berendezés gerjeszti a mintában lévő fluorokrómokat. A fényforrás vagy higanygőz-, vagy xenon gőz lámpa, vagy valamilyen lézer. Ehhez kapcsolódik egy gyűjtőlencse, amely segít a fényt fókuszálni. Ezek egyszerre több hullámhosszágú fényt sugároznak, ám a fluorokrómokat csak bizonyos hullámhosszágú fénnel lehet gerjeszteni. A megfelelő fotonok kiszűrése érdekében be kell építeni bizonyos üvegből készült szűrőket. Három féle szűrő létezik aszerint, hogy milyen fényt engednek át:

- short pass filter: egy bizonyos felső hullámhossz határ alatt minden fotont átenged
- long pass filter: egy bizonyos alsó hullámhossz határ alatt engedi át a fotonokat
- band pass filter: egy szűk tartományon belül engedi csak át a fotonokat.



Epifluoreszcens mikroszkópban a fény haladásának útja (Forrás: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/SzovettaniEsSejtteniVizsgaloModszerek/ch03s09.html>)

A fényforrást követő első szűrő, az úgynevezett excitációs szűrő. Ezt a szűrőt úgy kell megválasztanunk, hogy csak azt a hullámhossz tartományú fényt engedje át, amely a fluorokróموkat gerjesztett állapotba hozza. Innen az áthaladó fotonok a dikroikus tükörnek ütköznek. Ez egy speciális long pass filter, amelyen több rétegű rágózott fém bevonat van. Ezt a bevonatot direkt bizonyos hullámhossz tartományban lévő fény visszaverésére vagy áteresztésére tervezték. A 45°-os szögben megdőntött tükörről az alacsonyabb hullámhosszú fény derékszögben megtörve, az objektíven keresztül a tárgyra irányul. A vizsgált mintában lévő fluorokróموk ekkor gerjesztett állapotba kerülnek, majd kisugározzák az energiatöbbletüket fotonok formájában. A tárgyról érkező nagyobb hullámhosszú fluoreszcens fény keresztül tud haladni a dikroikus tükrön. Mielőtt a detektorhoz érne, még az emissziós filter kiszűri az esetlegesen a tárgyról visszaverődő gerjesztő fényt, ami zavaró jel lehet a képben. (László, 2012)



Az epifluoreszcens mikroszkóphoz tartozó szűrőkocka felépítése és benne az eltérített fénysugarak útja (Forrás: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/SzovettaniEsSejttaniVizsgaloModszerek/ch03s09.html>)

Az excitációs szűrőt, a dikroikus tükröt és az emissziós szűrőt az 1960-as években Sebastiaan Ploem beépítette egy szűrőkockába. Ez azért volt hasznos újítás, mert vannak olyan fluoreszcens festékekkel jelölt minták, amelyeknek többféle abszorpciós és emissziós hullámhosszuk van és ezek vizsgálatához más-más

excitációs és emissziós szűrő szükséges. Ezek kicserélését jelentősen gyorsítja, ha csak a különböző szűrőkockákat kell a fény útjába beforgatni az egyes filterek cserélgetése helyett. (Lichtman & Conchello, 2005)

3.2.4 Konfokális mikroszkóp

A fluoreszcens mikroszkópok egy másik fajtája a konfokális mikroszkóp. A hagyományos fluoreszcens mikroszkópok hátránya ezzel a típussal szemben, hogy azok a vizsgálati mintáról érkező világos fluoreszcens jelek, amelyek kívül esnek a mikroszkóp fókuszsíkján, csökkentik a kontrasztot a háttér és a minta között, a kép elkent lesz. Az elmosódást azonban nem csak az xy sík pereméről érkező fénynyalábok okozzák, hanem az xy síkkal párhuzamos, z-tengely mentén eltolt síkokból eredő sugarak is. A konfokális mikroszkópokat úgy állították össze, hogy ezeket a zavaró jeleket kiiktatják. (Kellermayer, 2010)

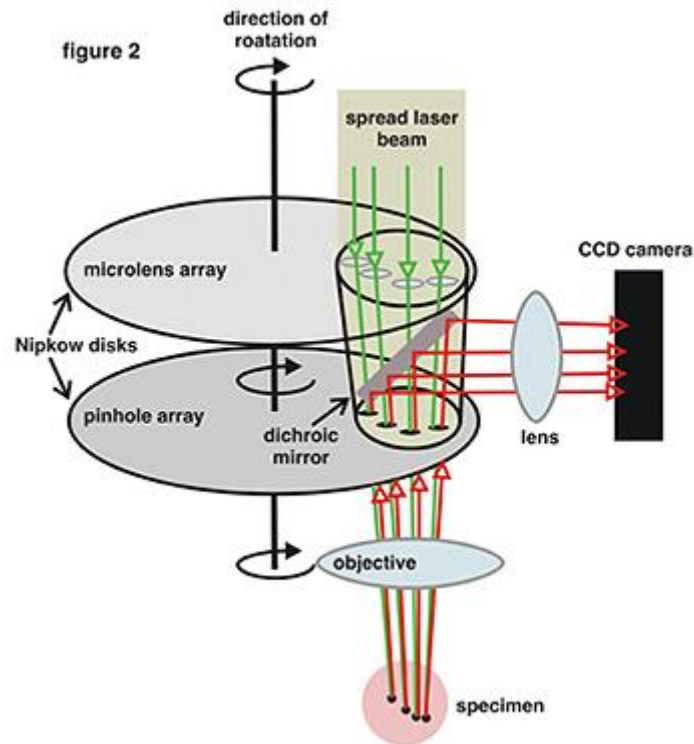
A minta megvilágítása ebben az esetben is úgy történik, hogy a fényforrás és a detektor a tárgy ugyanazon oldalán helyezkednek el. A kép jobb megalkotása érdekében nem az egész minta, hanem csak egy pontja van megvilágítva, ez a pásztázás. Ezzel a technikával azt érjük el, hogy a tárgy síkjának pereméről érkező nyalábok nem homályosítják el a képet. Aszerint, hogy a pásztázást miként valósítjuk meg, három féle technikát különíthetünk el:

- A tárgyasztal mozgatása: alig használatos, mivel lassú és nem pontos.
- Nipkow korong beépítése.
- A tárgyasztal megvilágítása lézerrel: ez a leggyakoribb és leginkább elterjedt manapság.

A forrásból érkező sugarak a szűrőkockán haladnak keresztül, ami ugyanolyan felépítésű, mint a leképezésen alapuló fluoreszcens mikroszkópoké. Egy fontos újított pontja ennek az eszköznek a konfokális apertúra. Ez a rész azt a célt szolgálja, hogy a mintából érkező fluoreszcens fotonokat megsűrje. Csak azokat engedti tovább a detektorba, amelyek a fókuszsíkból erednek és a többi kitakarja.

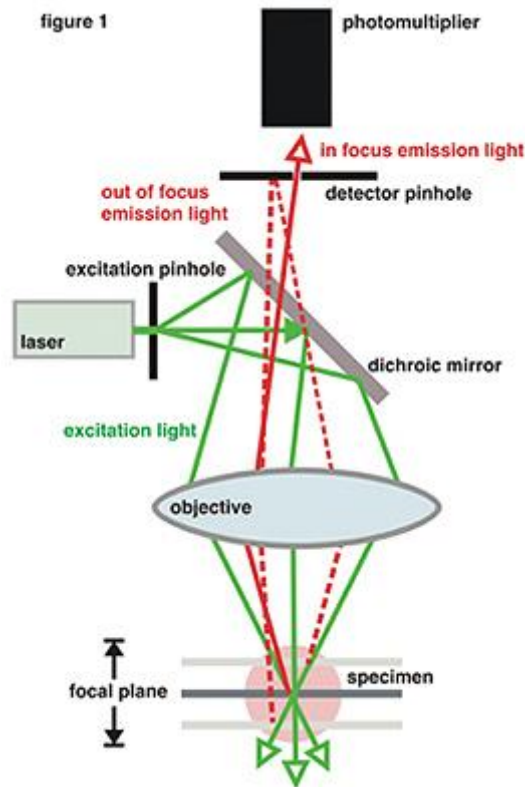
A konfokális mikroszkópoknak több típusa létezik:

Tandem pásztázó mikroszkóp (Tandem scanning microscope): egy forgó Nipkow tárcsát építettek a mikroszkópba, amelynek az a funkciója, hogy a forgása során több excitációs és emissziós rést hoz létre. (Egger & Petrán, 1967)



A tandem pásztázó mikroszkóp felépítése, benne a Nipkow korongokkal
(Forrás: <http://www.ncl.ac.uk/bioimaging/techniques/confocal/>)

Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Confocal laser scanning microscope): a tárgy megvilágítását lézer sugárral végzik, amelyet egy beépített, elektronikusan mozgatható pásztázó tükör segítségével irányítanak a minta vizsgálni kívánt pontjára. A megfigyelt pont helyzetét nemcsak az xy-síkban lehet kiválasztani, hanem a z-tengely mentén is. Az első ilyen mikroszkópot az 1960-as évek végén alkották meg, két cikket is publikáltak róla 1969-ben és 1971-ben Egger és Davidovits. Azóta ez a technika egyre jobban fejlődik és a leginkább elterjedt a konfokális mikroszkópos vizsgálatok körében.



Lézer pásztázó mikroszkópban az eltérített fénysugarak terjedéseinek útjai
(Forrás: <http://www.ncl.ac.uk/bioimaging/techniques/confocal/>)

Dekonvolúciós konfokális mikroszkóp (Deconvolutional confocal microscope): a képet zavaró jeleket dekonvolúciós algoritmusok beiktatásával szűrik ki. (Kellermayer, 2010)

3.2.5 Multifoton mikroszkópia

A mikroszkópia fejlődése során nagy előrelépést jelentett a multifoton mikroszkóp kifejlesztése. Nagy előnye az, hogy huzamosabb ideig végezhetünk in vivo megfigyeléseket biológiai mintákon és mélyebb szöveti részokről is lehet képet alkotni vele. Hátránya viszont az, hogy csak fluoreszcens fényből tud képet alkotni, visszavert fényből nem és magas pigment tartalmú sejtek valamint közeli infravörös tartományú fényt elnyelő szövetek vizsgálatára nem alkalmas. Alapvető különbség az előbbiektől és a multifoton mikroszkópia között az, hogy ebben az esetben a megvilágító fény nem folytonosan sugárzó, hanem egy pulzáló lézer.

A multifoton excitációs (MPE) mikroszkópia alapja a két foton excitációs (2PE) mikroszkópia, amelynek elméleti hátterét Maria Goeppert-Mayer publikálta 1931-

es doktori disszertációjában. A fluoreszcens molekulák két foton általi gerjesztése egy nem lineáris folyamat, amelynek során a fluoreszcens molekulák két-két fotont abszorbeálnak egy időben, vagyis kevesebb, mint 10^{-18} másodpercen belül. Ennek a két fotonnak az összes energiája megegyezik azzal az energiával, ami az egy foton általi gerjesztéshez is szükséges. Ahhoz, hogy egy foton okozza a molekula gerjesztett állapotba jutását, általában az ultraibolya, a kék vagy a zöld hullámhossz tartományában kell lennie a gerjesztő fotonnak. A 2PE vagy MPE mikroszkópia esetén a gerjesztő fény az infravörös tartományban van. Ahhoz, hogy a molekula alapállapotból gerjesztett állapotba jusson, a nagyobb hullámhosszú fotonok energiájának összegének nagyobbnak kell lennie a molekula alap- és gerjesztett állapotainak közötti energiakülönbségnél. Ez azt jelenti, hogy az ultraibolya mikroszkópia megvalósítható az UV hátrányai nélkül, mint például a polimerizáció vagy a hőmérsékleti hatások. (Masters, So 2008.)

A multifoton mikroszkópban a gerjesztést okozó infravörös tartományú fotonokat kibocsájtó eszköz egy femtoszekundumonként vagy pikoszekundumonként pulzáló csúcsteljesítményű lézer. Ezt követi a pásztázó mozgást végző rendszer és egy magas numerikus apertúrájú objektív. A fotonok egy nagy fényáteresztő képességű úton haladnak tovább egy, a gerjesztő és a kibocsájtott fotonokat szétválasztó rendszeren keresztül a nagy érzékenységű detektor felé.

A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp mellett a multifoton mikroszkóp jelentős fejlődést tett lehetővé a biológiai vizsgálati módszerekben. A MPE mikroszkóp segítségével sokkal tovább vizsgálhatók az élő minták, hiszen a fotoreakciók sebessége jelentősen csökkent. Ezzel a vizsgálati technikával beláthatunk a megfigyelt minta belső rétegeibe. (Diaspro et al., 2006)

3.2.6 Molekulák közti kapcsolatok felderítése fluoreszcens módszerrel

A mikroszkópia fejlődésével tudásunk egyre jobban szaporodott a természettudományok terén, így a biológiai ismereteink is rohamosan bővültek. Az elmúlt néhány évtizedben a tudomány és a technika eljutott arra a szintre, hogy a vizsgálatokat már az egyes molekulák szintjén is képesek vagyunk elvégezni. Ez azért kitűnő, mert nem átlagolt eredményeket kapunk a vizsgálatok során, hanem külön-külön kiértékelhetőek a heterogén, nanométeres nagyságrendbe tartozó

környezetek. Ennek köszönhetően számos olyan biológiai probléma megoldható, amelynél nem lehet kikerülni a molekulák szerkezetének vagy mechanizmusainak inhomogenitását.

A molekulaszintű vizsgálati módszerek két alapvető csoportba oszthatók. Az első típusba azok a technikák tartoznak, amelyek során a molekulák mechanikai tulajdonságait, kölcsönhatásait valamilyen erő felhasználásával vizsgálják, például: atomi-erő mikroszkópokkal, optikai- vagy mágneses csipeszekkel. A másik csoportban azok a módszerek vannak, amelyek az optikai eszközök segítségével vizsgálják a molekulák tevékenységeit, mint például az abszorpció, emisszió vagy szórás. A két kategória módszerei kiegészítik egymást, hiszen mind kettő esetben más-más szempontok alapján szerzünk információt a vizsgált mintákról. Szakdolgozatom folyamán a fluoreszcens módszerek tárgyalására szorítkozom.

A molekulák egyéni vizsgálatát sok tényező nehezíti, tehát először ezeket a korlátokat kell ledönteni. Itt olyanokra kell gondolnunk, hogy például az egyes molekulák vagy a jelölésre használt festékek rendkívül gyenge, optikailag érzékelhető jeleket adnak, amelyek egy több zajjal rendelkező háttérben észlelhetetlenek. Másik ilyen nehézség az is, hogy a sejtek összetétele nagyon sokféle és bonyolult. Egyes sejtalkotók eltérően nyelik el, emittálják, vagy éppen szórják a megvilágító fényt, így ezek is zavaró komponensekként tűnnek fel a végső detektált jelnél. Tehát a vizsgálati eljárás megalkotásánál nagyon alaposan meg kell tervezni mindent, az előkészületektől, a jelöléstől kezdve a detektálásig.

A legjobb módszerek ebben az esetben a fluoreszcencián alapulnak, mert ez a technika rendelkezik kellő érzékenységgel és szelektivitással. Másik nagy előnye, hogy noninvazív, úgyhogy használható élő sejtek tanulmányozásához. A vizsgálatokat három csoportba oszthatjuk aszerint, hogy mivel érjük el a fluoreszcens világítást: fluoreszcens proteinekkel (FP), szerves festék molekulákkal, vagy nanoméretű fluoreszkáló részecskékkel. A már megfestett molekulák leképezéséhez szükséges még olyan mikroszkóp, amelynek nagy numerikus apertúrájú objektíve, jó minőségű optikai rendszere és nagy érzékenységgű detektora van. A képalkotó módszer pedig két féle lehet: széles látóterű- vagy konfokális mikroszkópia. Ezek alapelveit már fentebb részleteztem.

A vizsgálatok kiértékeléséhez többféle paramétert is figyelembe kell vennünk. Talán a legjobban megfigyelhető a fluoreszcencia intenzitásának átalakulása az idő előrehaladásával. Ez a változás egyéb fizikai vagy kémiai reakciókat, kölcsönhatásokat jelezhet a mintában vagy környezetében. Ezeket a jeleket tanulmányozva megérthetjük a biológiai vonatkozásokat vagyis, hogy molekuláris szinten milyen folyamatok mennek végbe a sejtekben. (Xia, Li, & Fang, 2013)

3.2.7 Kalcium imaging

A kalcium ionoknak kulcsfontosságuk van az olyan intracelluláris jelek generálásában, amelyek meghatározzák a sejtek különféle élet folyamatait (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000). Ilyenek lehetnek például: a teljes sejtciklus szabályozása az osztódástól egészen a sejthalálig (Lu & Means, 1993; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003), a szívizomsejtek összehúzódásainak szabályozása (Dulhunty, Beard, Pouliquin, & Kimura, 2006), vagy neuronális esetben a preszinaptikus végen a kalcium beáramlása a kiváltó oka a neurotranszmitter tartalmú vezikulák exocitózisának (Neher & Sakaba, 2008).

A kalcium leképezésére irányuló kutatások nagyjából 30 évvel ezelőtt eljutotta arra a szintre, hogy sikerült olyan fluoreszcens festéket találni, amellyel mérni tudták az intracelluláris, szabad Ca^{2+} koncentrációját. A fejlesztéseknek innentől kezdve két iránya volt. Először is folyamatosan javítani, tökéletesíteni kellett a kalcium szenzorokat, másodsor pedig a képalkotáshoz megfelelő eszközöket kellett kivitelezni.

Az első jelölő anyagok, amelyekkel a celluláris kalcium dinamikáját kísérték figyelemmel, azok olyan biolumineszcens, kalciumhoz kötődő proteinek voltak, mint például az aequorin. A festékek következő osztálya már a szintetikus összetételű arsenazo III, amely megváltoztatja az abszorpciós spektrumát a kalciumhoz kötődve (Brown et al., 1975). A probléma ezzel a két anyaggal az volt, hogy nehézséget okozott a bejuttatásuk a mintákba. Az áttörést 1980-ban Tsien és munkatársai hozták el a sokkal érzékenyebb és sokoldalúbb fluoreszcens indikátorok alkalmazásával (Tsien, 1980). Az első generációjukba tartozó festékeket quin-2, fura-2, indo-1 vagy fluo-3 hozzáadásával hozták létre. Ezek közül a quin-2 volt az, amelyikkel először kísérleteztek. A molekulák

gerjesztéséhez ultraibolya fényt használtak, ám a fluoreszcenciához magas koncentrációban kellett alkalmazni és nem adott elég fényt a reakció. Ez után a fura-2-vel kezdtek kísérletezni, amely elődjénél sokkal jobban működött, így nem meglepő, hogy később ez terjedt el szélesebb körben a kutatóknál. A festék gerjesztéséhez 350 és/vagy 380 nm-es hullámhosszúságú fény volt szükséges és elődjénél jóval erősebben mutatta a kalcium függő változásokat. A következő nagy áttörést szintén Tsien laboratóriumában érték el (Miyawaki et al., 1997), ez a fehérje alapú genetikailag kódolt kalcium indikátorok (genetically encoded calcium indicator-GEI) családja volt.

A kalcium indikátorok beinjektálása a vizsgált sejtekbe többféle módon történhet aszerint, hogy milyen festéket használunk, milyen mintába és milyen vizsgálati céllal szeretnénk azt bejuttatni. Vegyük például a neuronokat. A legelterjedtebb eszközök és módszerek a mikroelektrodák, patch-clamp mikropipetták és az úgynevezett shadow patching.

A fluoreszcens jelölőanyagok fejlődésével párhuzamosan fejleszteni kellett a képalkotó berendezéseket is. Ezek a fényérzékelő eszközök általában egy mikroszkópból és egy hozzá tartozó, a vizsgálathoz specifikált fényforrásból, amely a kalcium indikátorok gerjesztésére szolgál. Két- most már kevésbé elterjedt-technika a széles látómezejű mikroszkópok terén a fotodiódás és a CCD-alapú kamerás eszközök. Ezekben a megvilágító fény higany vagy xenon lámpa és az excitációs és emissziós sugarakat dikroikus tükör választja szét. Ezeknél a képalkotó módszereknél az a probléma, hogy vagy nem elég jó a felbontóképesség, vagy túl nagy a zaj az egyes pixelek szintjén. A következő csoport a konfokális és a két foton mikroszkópok, amelyek működési elvéről már az előzőekben írtam. (Grienberger & Konnerth, 2012)

A legújabb fejlesztések olyan megfigyelési eszközök, amelyekkel már az élő, szabadon mozgó állatokban követhetjük nyomon a változásokat. Ezek miniatürizált fejre szerelhető gépek. Alapvetően két összetevőből állnak: az első egy mobil alkotóelem, amelyet az állat koponyájába szerelnek, ez tartalmazza az optikai részt is. A másik elem az előzőhöz optikai szállal kapcsolt és magában foglalja a képek

felvételéért felelős hardvert és szoftvert (Ghosh et al., 2011; F Helmchen, Fee, Tank, & Denk, 2001; Sawinski et al., 2009).

3.2.8 Membránpotenciál leképezése

A sejtek membránjának intra- és extra celluláris felszínei között potenciálkülönbség van. Nyugalmi állapotban a sejteken belüli tér töltése negatívabb, mint a sejteken kívüli téré. Egyes sejtekben ingerlés hatására ideiglenesen pozitív, akciós potenciál jöhet létre. A potenciál különbség kialakulásának több kiváltó oka is van. Először is, a sejtmembrán két oldalán nem egyenlő mértékben oszlanak meg az ionok. Az extra celluláris térben alacsonyabb a kálium ion és magasabb a nátrium ion koncentrációja, mint a sejteken belül. Ezt a koncentrációkülönbséget a sejtmembránban lévő, folyamatosan működő kálium-nátrium ionpumpa tartja fenn. A potenciál fenntartásához az is hozzájárul, hogy a membrán nem ugyanolyan mértékben permeábilis minden számára, így például a kálium ionoknak könnyebb átjárhatóságot biztosít, mint a nátrium ionoknak. A negatívabb sejten belüli környezetet fenntartó tényező még az, hogy olyan negatív töltésű intracelluláris ionok, fehérjék, nukleinsavak vannak bent, amelyek nem képesek kijutni a sejtől.

A sejtek megfelelő létfolyamataikhoz tehát elengedhetetlen, hogy a membránpotenciál optimálisan működjön. Egy ilyen fontos sejtteni tulajdonság tanulmányozása elengedhetetlen a kutatók számára, így többek között optikai vizsgálati módszereket is dolgoztak ki a cél érdekében. Szakdolgozatom során a neuronok elektromos jeleire irányuló technikákat ismertetek. A potenciál leképezési vizsgálatok a külsőleg alkalmazott feszültség-érzékeny festékek használatával kezdődött. A belsőleg is alkalmazható festékek megjelenésével már lehetségessé vált az akciós potenciál és a szinaptikus potenciálok vizsgálata is. Később a genetikailag kódolt érzékelők és a lézer pásztázó mikroszkópok megjelenésével újabb eredményeket értek el. Manapság a neurobiológiai vizsgálatok során a feszültség érzékeny festékekkel végzett vizsgálatok során láthatóvá váltak a szomatoszenzoros-, hallási- és látási idegi aktivitások (Tsytsarev et al., 2014).

A feszültségre érzékeny festékek működési elve a következő: a membránpotenciálban bekövetkező változás eltolódást okoz a festék excitációs

vagy emissziós spektrumában. Így megváltozik a detektált fluoreszcencia intenzitása (Loew, Campagnola, Lewis, & Wuskell, 2002). Az első nagy sikert az intracelluláris feszültség érzékeny festékek körében az hozta meg, hogy egy gerinctelen egyik neuronjába egy hegyes mikro elektródával sikerült beinjektálni a festéket (Grinvald, Salzberg, Lev-Ram, & Hildesheim, 1987). A sejten belüli festékek alkalmazását növelte a patch clamp technika, mivel ennek segítségével egyszerűbben a sejtekbe lehetett juttatni a festékeket. A festékek használatának azonban megvan az a hátulütője, hogy nem csak a plazmamembránhoz kötődnek, hanem olyan más membránokhoz is, amelyekben nem megy végbe potenciál változás.

A jövőbeni fejlődéshez olyan módszerek kidolgozásával foglalkoznak, amelyek nagyobb érzékenységgel és jobb felbontással rendelkeznek a neuronális folyamatok tanulmányozásában. Ilyen fejlesztések a genetikailag kódolt feszültség érzékelők és a különböző mikroszkópiák kombinálása (Stuart & Palmer, 2006) és a fluoreszcens fehérjék alkalmazása (Perron, 2009).

3.2.9 Optikai módszerek a molekuláris biológiában

Az elmúlt évszázad során a molekuláris biológia terén rendkívül gyors fejlődés történt és zajlik folyamatosan. Rá kellett jönnünk, hogy nem elég pusztán csak a sejteket, géneket, fehérjéket, metabolikus folyamatokat ismernünk, ezek együttes, szervezetekbe integrált működését is meg kell értenünk. Az optikai molekuláris leképezési módszer (OMI- optical molecular imaging) nagyon hasznos tanulmány a biomolekulák szerkezetének, dinamizmusainak és környezetével való kölcsönhatásainak valós idejű és térbeli vizsgálatára.

Az egyik használatos módszer a fluoreszcens fehérjékkel való jelölés. Ilyen jelölőanyagok lehetnek a zöld fluoreszcens festékek (GFP- green fluorescent protein) (Tsien, 1998), cián fluoreszcens fehérje (CFP) vagy a sárga fluoreszcens fehérje (YFP) és különböző variációi, mutációi (Nagai et al., 2002).

Az általánosan elterjedt képalkotó technikák például a lézer pásztázó mikroszkópia és a leképezésen alapuló mikroszkópia. A két módszer eszközeit már az előzőekben ismerttettem. Egy másik használt képalkotó eljárás egy nemlineáris optikai jelenségen alapul, amit másod harmonikus keltésnek (SHG- second harmonic

generation) vagy frekvencia duplázásnak nevezünk. A technika alapja az, hogy egy nagy energiájú lézersugár egy olyan erősen polarizáló közegen halad keresztül, amelyben nem középpontosan szimmetrikus molekuláris szerkezetek vannak (Campagnola & Loew, 2003). Előnye, hogy a molekulák nem kerülnek gerjesztett állapotba és nincs színvesztés a vizsgálat során.

Fluoreszcens képalkotó technikák közül a molekuláris biológiában elterjedt például a fluoreszcens rezonancia energia átvitel (FRET- fluorescence resonance energy transfer), a fluoreszcens színvisszanyerés színvesztés után (FRAP- fluorescence recovery after photobleaching), a fluoreszcens valós idejű képalkotás (FLIM- fluorescence lifetime imaging microscopy) és a fluoreszcens korrelációs spektroszkópia (FCS- fluorescence correlation spectroscopy). A FRET technika egy kvantummechanikai jelenségen alapul, amely akkor jön létre a kölcsönhatásban résztvevő szomszédos donor és acceptor molekulák között, ha a donor molekula emissziós spektruma magasabb energiájú, mint az acceptor molekula excitációs spektruma. A módszerrel az intenzitás alapján lehet méréseket végezni a fehérjék elhelyezkedése, konformáció változásai és kapcsolatai terén (Herman, Krishnan, & Centonze, 2004).

A FLIM technika alapja az, hogy a kromofórok fluoreszcens élettidejét mérik, miközben mikroszkóppal felvételeket készítenek róluk (Bastiaens & Squire, 1999). A módszer előnye, hogy a fiziológiás folyamatokat meg tudjuk figyelni, ám nagy hátránya, hogy a kép nem elég éles és drága műszerek kellenek hozzá.

A FCS egy viszonylag újonnan kidolgozott technika. Ez egy magas érzékenységgű foton számláló technika, amely az alacsony koncentrációjú, szétáradó festett molekulák áramlása miatt bekövetkező ingadozást méri a fluoreszcens jelekben (Gösch & Rigler, 2005). A módszerrel így közvetlenül tudjuk mérni a biomolekulák mozgékonyágát és az átlagos társulások és szétválások mechanizmusait.

Az optikai molekuláris leképező módszert eredetileg fixált sejtek, szövetek vizsgálatára tervezték. Később alkalmazni kezdték az RNS és DNS vizsgálatokban is (Bauman, Wiegant, Borst, & van Duijn, 1980). Az OMI egy viszonylag fiatal, de ígéretes területe a molekulaszintű vizsgálati módszerek. Ilyenek például a molekulák közötti kapcsolatok felderítése, fehérjék mechanizmusainak (J. Zhang,

Campbell, Ting, & Tsien, 2002) vagy a feszültség függő ioncsatornáknak a tanulmányozása (Sonnleitner, Mannuzzu, Terakawa, & Isacoff, 2002). A módszer segítségével a fehérjék és sejtalkotók dinamikáját, kölcsönhatásait monitorozhajtuk, a proteáz és kináz aktivitását tarthatjuk ellenőrzés alatt és számtalan más élettani funkciót és működést ismerhetünk meg élő sejtekben. (Du, Wang, Luo, & Liu, 2006)

3.2.10 Enzim aktivitás mérés- színes reakciók

Az enzimeknek a biokémiai folyamatokban igen nagy szerepük van. Nevezhetjük őket biokatalizátoroknak, hiszen feladatuk az élőlények szervezetében lejátszódó kémiai folyamatok, reakciók felgyorsítása. Az enzimek túlnyomó része fehérjéből áll, kisebb részük pedig RNS molekulákból. Fontos tulajdonságaik közé tartozik, hogy specifikusak. Ez azt jelenti, hogy minden folyamatot más-más enzim katalizál, tehát minden enzimnek megvannak a működéséhez szükséges optimális körülmények (pH, hőmérséklet, ionkoncentráció). Az enzimek által gyorsított, szabályozott folyamatok függenek az enzimek szabályozásától, aktiválásától vagy éppen gátlásától. Vizsgálatukra nagy hangsúly fektetnek, hogy az összetett, bonyolult fehérjék felépítését és működését ezáltal is jobban megismerjék.

Az enzimek aktivitásának egyik leglátványosabb, legsokatmondóbb szemléltetési, mérési módszere fluoreszcens vizsgálatokon alapul. Az egyik ilyen in vitro vizsgálat az, hogy fluorogén szubsztrátok átalakulása során mérik az enzimaktivitást. Ezzel a technikával főként a proteázok és kinázok szabályozását, terjedését és aktivitását tanulmányozzák. Az ilyen és ehhez hasonló célú vizsgálatokra léteznek fehérje alapú hírvivők is (Mahajan, Harrison-Shostak, Michaux, & Herman, 1999; Rehm et al., 2002). Kutatások során rájöttek arra, hogy a biolumineszcencia felhasználásával, a szentjánosbogarak egyik fehérjéjének segítségével, a luciferázzal is lehetséges a vizsgálat. Ennek előnye az, hogy a biolumineszcens reporterek jó érzékenységgel és alacsony a háttérzajuk. Ez alapján több új technikát is dolgoztak ki (Laxman et al., 2002). Az előzőekben említett technikáknak azonban van egy közös hibájuk: túlságosan specifikusak az enzimek tanulmányozásához. Létezik egy olyan módszer, amely kovalens kötással kapcsolódik a vizsgálni kívánt enzimhez. Ezeket a méréseket együttesen aktivitás

alapú méréseknek (ABP- activity-based probes) nevezzük. Az ABP módszereknek alapvetően három fő funkciós csoportja van: egy kémiai aktív csoport, amely kialakítja a kovalens kötést az enzimmel, egy kapcsolódó régió, amely specifikus az egyes enzimekre és egy harmadik tag, amely láthatóvá teszi a módosított enzimet. Ennek a technikának a segítségével az enzimek vizsgálata lehetséges in vitro, in vivo és in situ is (Baruch, Jeffery, & Bogyo, 2004).

Szintén a szubsztrátok fluoreszcens jeleinek megfigyelésével egy másik lehetséges vizsgálati módszer az enzimek aktivitásának mérésére: a szubsztrátok fluoreszcens anizotrópiájának mérése konfokális mikroszkóppal (Bigelow, Vishwasrao, Frelinger, & Foster, 2004).

3.2.11 Optikai csipeszek

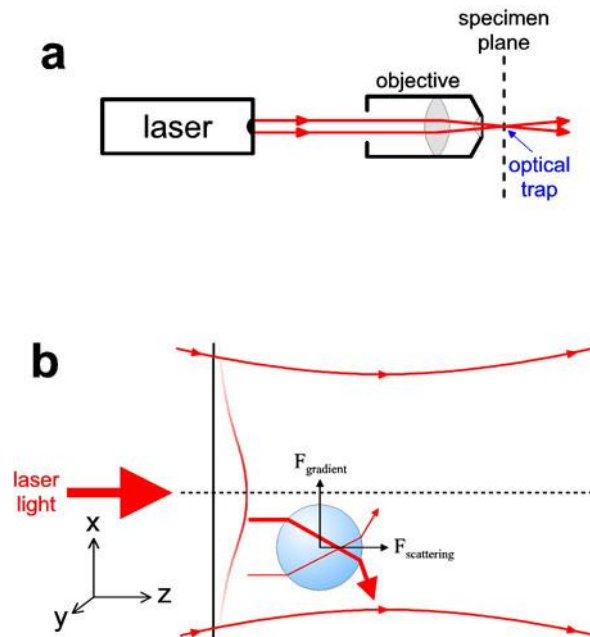
Egy korábbi fejezetben már szó volt az optikai csipeszek eredetéről és felhasználási köréről. Ebben a részben a működési elvét és a felépítését írom le. Az eszköz egy nagy numerikus apertúrájú objektívén át fókuszált nagy energiájú lézer sugár segítségével fogja meg a mikroszkopikus méretű semleges tárgyat, amelyet két erő tart a csipeszben. Az egyik a szóró erő, amellyel a fotonok mozgatják a csapdába ejtett sejtet. A másik a mező intenzitás gradiense által létrejövő erő gradiens, amely a tér mindhárom irányában fennáll. A csipesz ereje a két erő egyensúlyától függ.

A csapdába esett részecskére ható szóró- és gradiens erő függ a lézernyaláb hullámhosszától és a részecske méretétől. Három különböző rendszerhez tartozhat a megfogott elem: Mie-, Rayleigh- vagy a kettő közötti rendszer. Első esetben a részecske mérete jóval nagyobb, mint a besugárzott fény hullámhossza, az erő nagysága és iránya függ a tárgy alakjától, a befogás pedig a gömb vagy ellipszoid alakú mintára korlátozódik.

Második esetben a részecske sugara sokkal kisebb, mint a sugárzó fény hullámhossza. Ekkor az erő iránya független a tárgy alakjától és a nagysága a tárgy irányával együtt változik. A fény elektromos mezője a fénysugár legfényesebb pontja felé tolja a részecskét, ahol energiája a minimumra csökken. A szóró erő arányos az fényintenzitással és iránya a lézer irányával megegyező, a gradiens erő arányos az intenzitás gradiensével és ezzel megegyező irányú. A gradiens erő a

legfényesebb pont felé húzza a részecskét, míg a szóró erő az egyensúlyi állapot felé. (Ashkin, 1992)

Amikor a részecske mérete és a lézer fény hullámhossza hasonló nagyságrendbe esik a sugár optikai és a dipólus megközelítés sem alkalmazható, ekkor egy sokkal bonyolultabb elméletet kell kidolgozni a részecske csapdába ejtésére. (Nieminen et al., 2007)



Az optikai csipeszek működési elve (Forrás: <http://web.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm>)

Ahhoz, hogy a részecskét csapdába tudjuk ejteni megfelelően nagy erők szükségesek. Ezek az erők függenek a lézer intenzitásától, a fókuszáltságtól, a részecske alakjától és méretétől és a részecske közeghez viszonyított relatív törésmutatójától. A szükséges erő kiszámítását többféle képpen végezhetjük. (H. Zhang & Liu, 2008)

A csapdába ejtő lézer típusa is különböző lehet:

- Gauss lézer sugár
- nem Gauss lézer sugár
- kettős lézer sugár
- többszörös lézer sugár.

Mint minden módszernél, itt is vannak hátrányok. A lézer fotonjainak elnyelése során a minta felmelegedhet, roncsolódhat. A minta foto károsodásának csökkentése céljából bizonyos lézerek használatosak, például közeli infravörös tartományú Nd:YAG, Nd:YLF vagy Ti:zafir lézer. A károsodás redukálható úgy is, hogy nem egy nyalábot fókuszálunk, hanem két különbözőt. A hőhatás csökkentése érdekében használatos közegnek a nehézvíz, mert ennek két nagyságrenddel kisebb az abszorpciós együtthatója, mint a szokásos víznek a csapdába ejtéshez használt hullámhosszakon (~780 nm). (Dholakia & Reece, 2006)

Az optikai lézercsipeszeknek a biológiában több felhasználási céljuk is van. Mikro- és nanoméretű tárgyakhoz, elemekhez egyaránt használatosak. A legfőbb alkalmazási területek: sejtek pozicionálása, áthelyezése, válogatása, elkülönítése, átszervezése, újraszervezése, használhatóak lézer szikékként, lézer ollókként precíz, szubmikrométeres vágásoknál, molekulák beoltásánál a sejtfal rövid idejű megnyitásához és molekuláris erők mérésére.

3.3 A határok kitolása, forradalmian új optikai módszerek a biológiában

A 17. században a fénymikroszkópok megjelenése óriási előrelépés volt a természettudományos kutatásokban, így a biológiai vizsgálatok terén is. Megindulhatott a szabad szemmel láthatatlanul apró alkotók tanulmányozása. Ekkor még nem értették az eszköz azon határait, amit 1873-ban Ernst Abbe, 1896-ban pedig Lord Rayleigh írtak le. Ez a korlát nem más volt, mint a diffrakció által limitált képfelbontás, amelyet tapasztalati bizonyítékokkal és fizikai törvényekkel is alátámasztottak.

Később a mikroszkópok folyamatos fejlődése során a technika eljutott a fluoreszcens-, a konfokális- és a multifoton mikroszkópia korába. Nem régen még ezek az eszközök jelentették a legjobb, legsokoldalúbb vizsgálati és diagnosztikai eszközöket a sejtbiológiában. Ám a fénymikroszkópok képfelbontásának korlátait a tökéletes lencsék kombinációival és nagy numerikus apertúrájú objektívekkel sem sikerült áttörni. A felbontóképesség határa a fény hullámhosszának körülbelül a felénél volt, amely az apróbb sejtalkotók tanulmányozását nem tette lehetővé.

A felbontóképesség fokozása érdekében a leképezésen és a pásztázáson alapuló módszerek területén is megindultak a fejlesztések, ám szakdolgozatomban csak a

felbontóképesség javítására irányuló újításokra térek ki. A szuperrezolúciós pásztázó mikroszkópok közül a STED (stimulated emission depletion) technikát ismertetem. A mikroszkópia alapjait Hell és munkatársai dolgozták ki (Hell & Wichmann 1994). Ahogyan konfokális lézer mikroszkópokban, ebben az esetben is egy fókuszált lézersugár hozza gerjesztésbe a mintákat. Mielőtt néhány nanoszekundumon belül elindulna a spontán emisszió egy második, úgynevezett STED nyalábbal is megvilágítjuk a mintát. Ennek a második sugárnak fontos tulajdonságai, hogy gyűrű alakban fókuszálva világítja a mintát és hullámhossza a gerjesztő fénynyalábéhoz képest vörös irányban eltol. Ez azért szükséges, mert így a gyűrű peremén lévő festékmolekulák emisszióját stimulálja a STED nyaláb, míg a közepén lévő molekulák továbbra is gerjesztett állapotban maradnak. A STED sugár intenzitásának növelésével csökken a detektorba jutó fotonok száma, így a laterális képfelbontás javul. A három dimenziós vizsgálathoz szükséges egy újabb STED nyaláb beiktatása, amely a fókuszsíkkal szomszédos síkokban stimulálja a gerjesztett állapotban lévő molekulák emisszióját. (Sinkó, 2014)

A leképezésen alapuló egyik szuperfelbontást ígérő technika a strukturált kivilágítást alkalmazó mikroszkópia (SIM- structured illumination microscopy). A vizsgálat során a mintát különböző irányokból egy nagy frekvenciájú, ismert szinuszos mintájú fényel világítjuk meg. Ekkor egy a mintára jellemző Moiré mintázatot fogunk kapni. A kép megalkotása a megvilágítás mintájának ismeretében az eddigi felbontási határ alatt lehetségessé válik. (Sinkó, 2014) (Schemmelleh, Heintzmann, & Leonhardt, 2010)

A lokalizációs mikroszkópiái technikák szintén az optikai leképezésen alapulnak. Ide többféle módszer is tartozik, ám az alapelve mindegyiknek ugyanaz. Az eljárás lényege az, hogy a fluoreszcens molekulák időben elkülönülve villannak fel, így egyszerre kevesebbet fényképeznek le, majd utólag a képeket külön-külön analizálják. Ennek a technikának a nagy áttörése 2006-ban volt. Ekkor három, egymástól független publikáció is született ebben a témában: PALM (Betzig et al., 2006), FPALM (Hess, Girirajan, & Mason, 2006) és STORM (Rust, Bates, & Zhuang, 2006).

A leképezésen alapuló mikroszkópokhoz használt egyik kiemelkedő fényforrásként szolgáló módszere a fluorofórok megvilágításának az üveg és a közeg határán nagy szögben való teljes visszaverődést használja ki (TIRF- total internal reflection fluorescence). A TIRF mikroszkópia során létrejön egy gyorsan eltűnő tér a két, különböző törésmutatójú közeg határán, amely szelektíven, csak bizonyos fluorofórokat gerjeszt a fedőlemez síkjához közeli sejtekben. A technika hátránya, hogy a mélyebben lévő részektől nem lehetséges a képalkotás és csak tengelyirányban képes javítani a képfelbontást. Sejtbiológiai alkalmazása során az előnyei azok, hogy kitűnő kontrasztot biztosít és kisebb a színvesztés. Ennek köszönhetően élesebb, gyorsabb és hosszabb ideig tartó time-lapse vizsgálatokat végezhetünk a sejtek felszínének közelében.

A mikroszkópos vizsgálatok fejlődése nem csak egy eszköz felbontóképességének növelésével lehetséges. A fejlesztések egy másik nagy iránya a különböző optikai eszközök és elvek kombinációjával próbálják elérni a jobb felbontóképességet. Az egyik olyan lehetséges variáció, amely igen ígéretesnek bizonyul, a pásztázó mikroszkópia és a különböző optikai spektroszkópiai módszerek keverése. (Lucas & Riedo, 2012)

4 Módszerek

A biológiában számos optikai módszer használatos, attól függően, hogy melyik kutatási területre szorítkozik a vizsgálódás. Az összes technika közül, ezért a szakdolgozatomban csak néhány metódus kerül bemutatásra. Ezek az eljárások főleg a sejtek működésének időbeli változását kísérik figyelemmel. A méréseket laborban kitenyésztett sejteken végeztük el.

Az alábbiakban leírásra kerülnek az elvégzett vizsgálati módszerek, a használt berendezések, a felhasznált kísérleti anyagok és az eredmények.

4.1 Sejthalál nyomon követése

A sejtek életét két szakaszra bonthatjuk. Életük első felében főként felépítő folyamatok mennek végbe bennük, a második fázisban pedig jelentősebb mennyiségű lebontó folyamatok miatt elöregednek, végül elpusztulnak. Öregedésnek azt nevezhetjük, amikor a végbemenő változások sorozata csökkenő működési kapacitásokhoz vezetnek, és emellett csökken az alkalmazkodó- és ellenálló képesség is. A bemutatásra kerülő technikákban az élő- és a halott sejteket különböztettük meg, mértünk metabolikus aktivitást, követés céljából megjelöltünk sejteket és jelöletlen sejtek időbeli változásait fényképeztük.

4.1.1 Élő- és halott sejtek kimutatása

Ezzel a módszerrel egy C2C12 egér vázizom sejttenyészetben mutattuk ki az élő- és a halott izomsejteket.

A sejtvonalat folyékony nitrogén gőz fázisában tároltuk. A kísérlet előtt egy csövet (1 millió sejt) felolvasztottunk, lecentrifugáltunk (300g, 5 perc), majd 25 cm²-es sejttenyésztő flaskában 6 ml DMEM + 10% FBS (Sigma) médiumban tenyésztettünk, amíg a tenyészet konfluens nem lett. A médiumot eltávolítottuk, majd 3 ml tripszint adtunk a sejtekhez a tenyésztőflaskába, ami megszüntette a sejtek letapadását. Ez után a sejtes oldatot 300g-n, 5 percig centrifugáltuk és a leülepített sejtek tetejéről pipettával leszívtuk a felülúszót.

Elkészítettük a kimutatáshoz szükséges oldatot, amelynek protokollját a Live/Dead® Viability/Citotoxicity Assay Kit *for mammalian cell* cikkből használtuk. 5 ml D-FBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) oldathoz 10 µL-t

kevertünk az EthD-1 (Ethidium homodimer-1, 2 mM, Component B, Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Assay Kit) törzsoldatból és 2,5 µL-t a calcein AM (4 mM, Component A, Live/Dead® Viability/Citotoxicity Assay Kit) törzsoldatból. Ezt az oldatot közvetlenül a sejtekhez adtuk, majd néhány perc múlva egy átalakított epifluoreszcens mikroszkóp alatt víz immerziós, 10-szeres nagyítású objektívvel megvizsgáltuk a mintát.

A vizsgálat alapja az volt, hogy az élő sejtek jól megtartották magukban a calceint, amitől intenzív, fluoreszkáló zöld színt (ex/em 495nm/515nm) adtak. Az EthD-1 bejutott a sérült membránnal rendelkező sejtekbe és itt a nukleinsavakat megkötve fényes, piros fluoreszkálást (ex/em 495 nm/635 nm) eredményezett. Az EthD-1 az élő sejtek ép membránján nem jutott keresztül.

4.1.2 Metabolikus aktivitás mérése

A sejtek metabolikus aktivitásának mérésére sokféle módszer létezik. Munkám során egy fluoreszcens plate reader (Cytofluor 4000) segítségével vizsgáltunk egy különböző anyagokkal, más-más mértékben mérgezett, majd megfestett C2C12 sejttenyészetet.

Eleve adott volt microplate-ekben egy egér vázizom sejttenyészet. A lemez első sorában a kontroll tenyészet volt, amely csak a tenyészmédiumot és a sejteket tartalmazta. A második sorban lévő sejtek médiuma 1%-ban lefőzött kávéat tartalmazott. A harmadik sorban 1%-os energiatalos, a negyedikben pedig 5%-os energiatalos D-FBS oldat volt a tenyészmédium.

A vizsgálathoz használt reagens az alamar kék (alamarBlue® Cell Viability Assay Protocol) festék volt. Ezzel az anyaggal megvizsgálhatjuk a sejtek metabolikus aktivitásának állapotát az élő sejtek redukáló képességének felhasználásával. A festék színe eredetileg kék, a vizsgálathoz az 0,01 mg/ml-es töménységben alkalmaztuk. Amikor a tenyészet médiumát lecseréljük egy az alamar kékkel elkevert tenyészmédium oldattal, a folyadékban lévő festék aktív hatóanyagát, a resazulint, az élő sejtek, a citoszoljukban elkezdik resorufinná redukálni. A resazulinnal ellentétben, a resorufin rózsaszínes-pirosas színű és élénken fluoreszkáló. Az életképes sejtek folyamatosan fenntartják ezt a redukciós

folyamatot, amitől az egész tenyészet és a körülvevő oldat is élénk fluoreszkálásba kezd.

A médium lecserélést követően néhány percen belül a tenyészet redukáló tevékenysége lineárisra válik. Ekkor a plate-et betettük a plate reader-be. Az eszközben tartósan 37°C-os hőmérséklet van, valamint képes enyhe rázásra, hogy az egyes mérések előtt felkeverje az esetlegesen leülepedett, inhomogénná vált mintákat. A vizsgálat elindításakor egy optikai szál megvilágította egyesével a micro plate-eket. A mi mérésünk esetén elég volt egy excitációs/emissziós filter párt használni, ám a Cytofluor 4000-ben egyszerre 4 pár szűrőt is alkalmazhatunk. Az alamár kékhez tartozó ex-em filter pár: 530/25 nm: 580/50 nm. Az általunk beállított paraméterek szerint, a készülék 30 perc alatt hat mérési ciklust folytatott le. Az eszközzel az egyes tenyészetek fluoreszcenciája által kisugárzott fény intenzitását tudtuk megvizsgálni. A gép a megmért intenzitás mértékét egységekre vonatkoztatva adta meg, ahol a minimum érték 1, a maximális érték 99999 lehet. Az eszköz szoftvere grafikusán is tudja ábrázolni a megmért fluoreszcens egységeket az idő függvényében. A kirajzolt görbe meredekségéből következtethetünk az egyes tenyészetekben lévő sejtek számára, valamint a sejtek metabolikus aktivitására.

4.1.3 Sejt jelölés

A sejtjelölés egy fontos technika a fluoreszcens módszerek családjában. A vizsgálni kívánt mintákat különböző festékekkel jelölhetjük meg attól függően, hogy mi a megfigyelésünk célja. Egyes festékek például a membránnal, valamely fehérjével, enzimekkel vagy a mitokondriummal lépnek kölcsönhatásba, ezáltal más-más tulajdonságokat, folyamatokat, funkciókat tanulmányozhatunk.

A módszer gyakorlati bemutatásához kitenyésztett egér vázizom sejteket jelöltünk meg. A C2C12 sejt vonal tenyésztési folyamata ugyanúgy zajlott, mint az élő- és a halott sejtek kimutatása esetén. A sejtek megjelöléséhez ezúttal a MitoTracker® Green FM festéket használtuk (MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes, 2008), amely egy karbocianin alapú jelölőanyag. A fluoreszcens festék molekulái az élő sejtek membránjain át diffundálva bejutnak a plazmába, majd kötődnek az aktív mitokondriumokhoz. A próbához a festéket először DMSO oldattal 1 mM-os

eleggyé kevertük, majd a sejtek megfestéséhez ezt még 1000-szeresére hígítottuk. A tenyészettről lecseréltük a tenyészmédiumot a festéket tartalmazó médiumra. Ez után 25-30 percre 37°C-os inkubátorba helyeztük a sejteket.

A festett mintát behelyeztük epifluoreszcens mikroszkóp alá. A képen világító zöld foltokként feltűntek az egyes sejtek mitokondriumai.

4.1.4 Time lapse microscopy

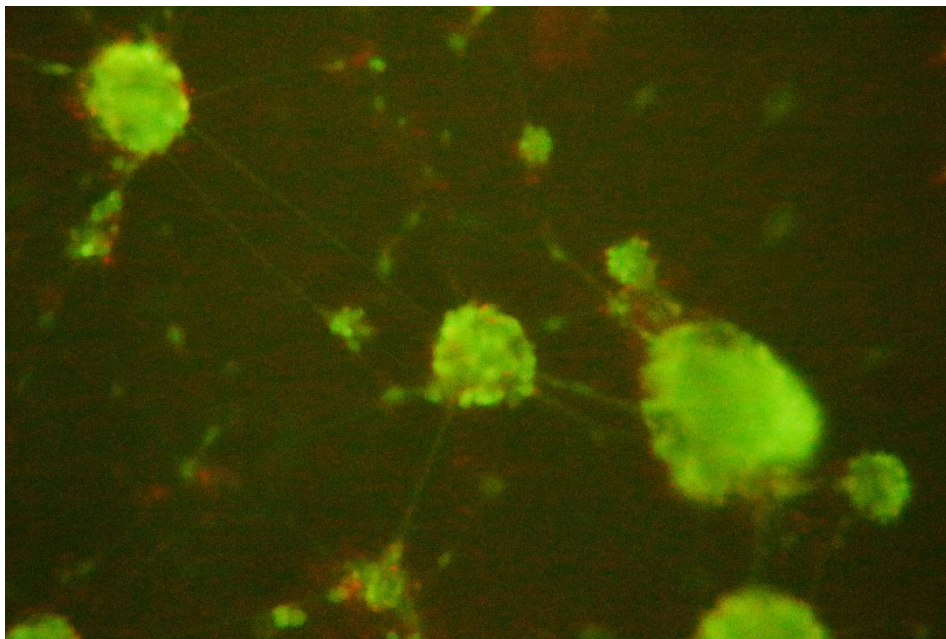
Ennek a fáziskontraszt alapú módszernek a segítségével megfigyelhetjük a sejtek, sejtorganellumok viselkedését az idő előrehaladtával mikroszkopikus szinten. A technika alkalmazásával láthatóvá válik a sejtek növekedése, letapadása vagy éppen „vándorlása”, később pedig a pusztulásuk.

A laborban elvégzett mérés során idegsejtek állapotának időbeli változását követtük nyomon. A vizsgálathoz egy Olympus invertált fáziskontraszt mikroszkópot használtunk. A mikroszkóphoz tartozó fekete-fehér, 1 Mp-es firewire, Pixelink PL A-662 típusú fényképezőgéppel, 20-szoros objektívvel készítettük a felvételeket. Egy-egy kép készítése között 1 perc telt el. Sajnos a vizsgálat időtartama igen rövid volt, mivel a mikroszkóp alatt nem tudtuk biztosítani a sejttenyészetnek a megfelelő hőmérsékletet és CO₂ szintet.

5 Eredmények

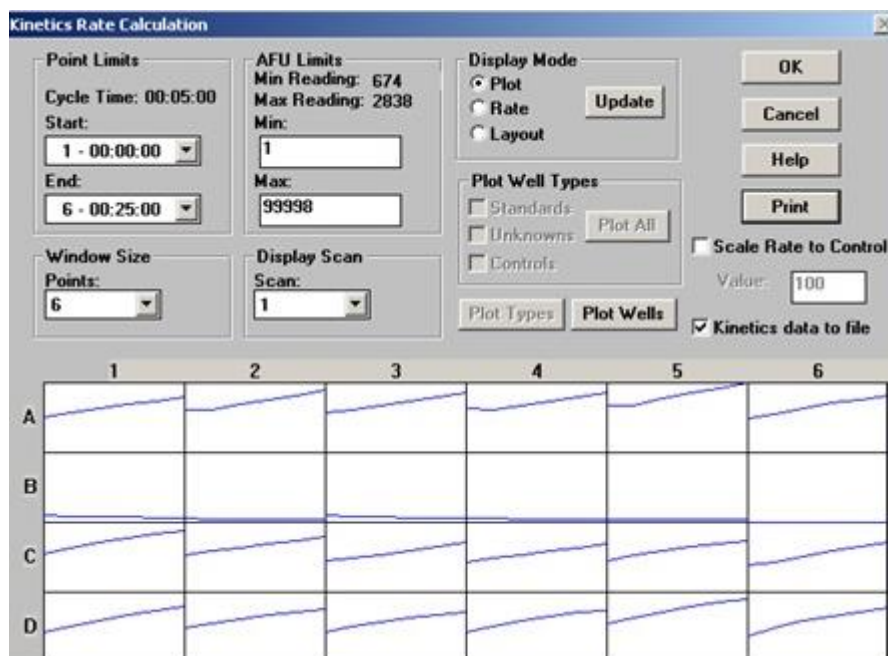
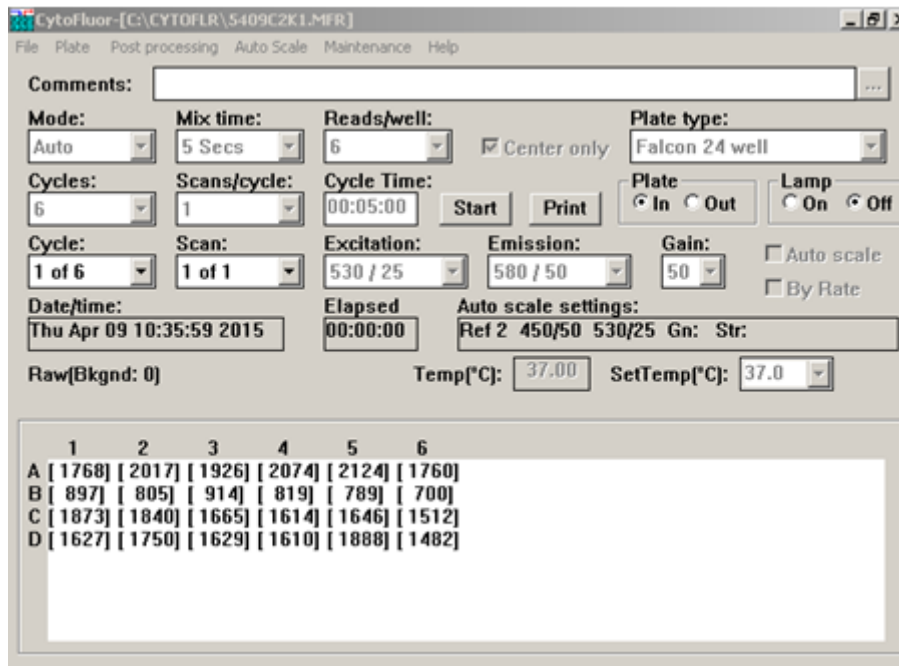
A dolgozatom készítése folyamán optikai módszereken alapuló sejttani vizsgálatokat végeztünk el. Az optikai vizsgálatok körén belül, a fluoreszcens vizsgálati technikákból mutattunk be többfélét, hogy érzékeltesük a szerteágazó felhasználási lehetőségeket. A mérések során elvégeztünk egy fáziskontraszt technikán alapuló time lapse vizsgálatot is. A megfigyeléseink a sejtek életének felépítő- és lebontó folyamatainak megkülönböztetésére irányultak.

Először egy olyan vizsgálatot végeztünk, amely során C2C12 egér vázizom sejtenyészetben jelöltük meg a sejteket. Az élő sejtek zölden világítottak az epifluoreszcens mikroszkóp alatt, míg az elpusztult sejtek piros színt mutattak. A képeken jól látszik az életben maradt és halott sejtek aránya.

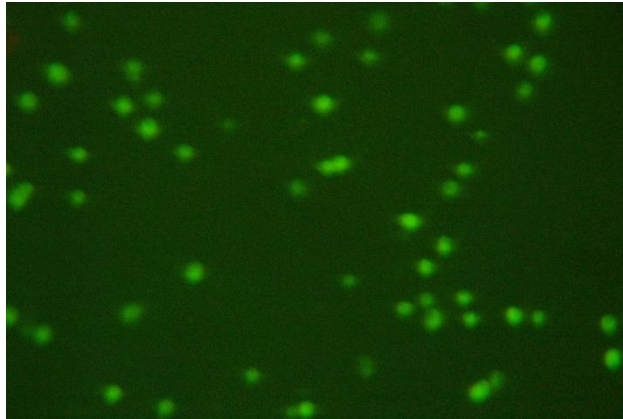


A következő vizsgálat során bemutattuk egy plate reader működését és egy ehhez az eszközhöz tartozó metabolikus aktivitás mérési módszert. A különböző mértékben mérgezett sejtek fejlődésének mértékét a tenyészetekhez hozzáadott festék segítségével vizsgáltuk meg. A megvilágítást követően minél kisebb volt a fluoreszcencia intenzitása, annál kevésbé volt képes a sejtenyészet fejlődni a kezdetben hozzáadott koffein miatt. A plate-readerhez tartozó szoftver kirajzolta az egyes mérések intenzitásához tartozó görbéket, amelyből következtettünk a sejtek mérgezettségi szintjére. Az első képen a vizsgálat beállítási paramétereit és a

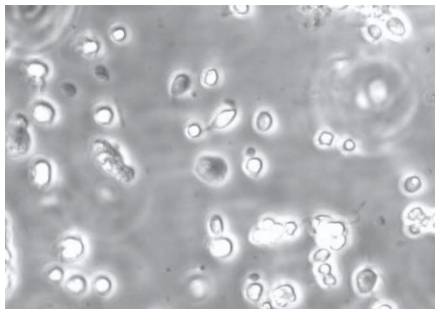
tenyészetek intenzitásának a mértéke látszódik. A második képen láthatjuk, hogy a kontroll tenyészetnek volt a legintenzívebb fénye, tehát a legegészségesebb tenyészet, míg az 1%-os kávéval mérgezett sejtek metabolizmusa volt a legalacsonyabb mértékű, tehát a legnagyobb mérgezettségnek kitett tenyészet.



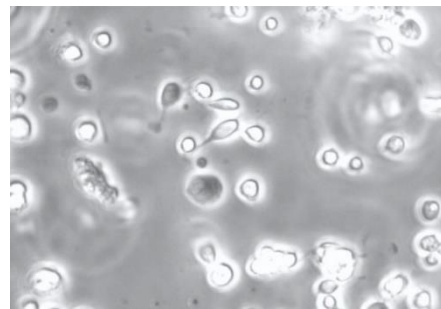
A harmadik mérés során egy sejtjelölési technikát mutattunk be. Eredményként az látszik, hogy a zöld festék az élő sejtek membránján átdiffundálva, a plazmába bekerülve eljutott a mitokondriumig és hozzákötődött. Így epifluoreszcens mikroszkóp alatt világító zöld színű pontokként láthattuk a jelölt sejteket:



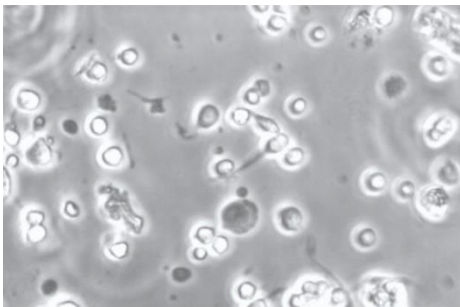
A negyedik bemutatott módszer egy time-lapse vizsgálat volt, amely során fáziskontraszt mikroszkópra erősített fényképezővel követtük a tenyészet változásait. A képsorozaton azt látjuk, hogy a letapadt neuronok nyúlványokat növesztenek a tenyészetben.



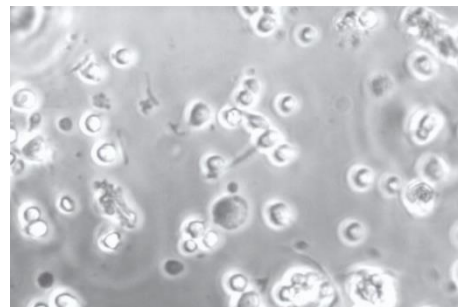
1. kép



2. kép



3. kép



4. kép

6 Megvitatás

Dolgozatom során összefoglaltuk a biológiában használatos optikai módszerek elveit és az egyes technikákhoz tartozó eszközök működési elvét az elérhető szakirodalom alapján. A megfigyelési lehetőségek közül elsősorban a fluoreszcencián alapuló eszközökre és technikákra tértünk ki részletesebben. A szakirodalom alapján megbizonyosodhattunk arról, hogy az optikai vizsgálati módszerek egy a kezdetek óta töretlenül és dinamikusán fejlődő, széles körben elterjedt tudományterület. Hasznosítása főleg a molekuláris- és sejt biológiában és a betegségek, biológiailag rendellenes folyamatok kialakulásának, lefolyásának kutatásában teljeseedik ki. Habár a kutatók kíváncsiságának, a fejlődő tudománynak és technikának köszönhetően sok kérdésre ismerjük már a választ, rengeteg nyitott kérdés és lehetőség van a további töretlen fejlődéshez.

A laborban elvégzett kísérletek folyamán több módszert is ismertettünk és bemutattunk. Ezek közül voltak olyanok, amelyeket több, de voltak olyanok is, amelyeket kevesebb siker koronázott. A mérések, megfigyelések kisebb vagy nagyobb sikeressége a laborban fellelhető eszközöknek és anyagoknak köszönhető. A kísérletek elvégzéséhez a felszereltség hiánya miatt, néhány alkalommal több eszközből kellett újat építeni.

A szakdolgozat készítése során tapasztalatokat szereztem a kísérletek felépítésének, előkészítésének, végrehajtásának és kiértékelésének gyakorlatáról. Megismerkedhettem több elektronikai és optikai berendezéssel, ezek működésével, hibalehetőségeivel és felhasználásával. Betekintést nyertem a C2C12 egér vázizom- és csirke neuron sejttenyészetek tárolásának, előkészítésének és létrehozásának folyamataival.

Dolgozatom remélem, segítséget nyújthat azoknak, akik szeretnének megismerkedni a témával, vagy valamelyik módszer vagy eszköz rövid áttekintésére kíváncsiak. A téma folytatása nyitott, mivel e téren rengeteg a fejlődési lehetőség akár szakdolgozóknak, akár kutatóknak.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Nyugat-magyarországi Egyetem Természettudományi és Műszaki Karának a tanulási és fejlődési lehetőségekért. Különösen szeretném megköszönni Dr. Molnár Péternek, szakdolgozatom témavezetőjének, a rengeteg segítséget, türelmet és támogatást, valamint gyakorlati tapasztalatszerzési lehetőséget, amit a munkám során elérhetővé tett számomra.

8 Irodalomjegyzék

- Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal*, *61*(2), 569–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1260270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ashkin, A., & Dziedzic, J. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, *235*(4795), 1517–1520. doi:10.1126/science.3547653
- Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1989). Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(20), 7914–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=298182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., & Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, *330*(6150), 769–71. doi:10.1038/330769a0
- Baruch, A., Jeffery, D. A., & Bogyo, M. (2004). Enzyme activity--it's all about image. *Trends in Cell Biology*, *14*(1), 29–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729178>
- Bastiaens, P. I., & Squire, A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in Cell Biology*, *9*(2), 48–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087617>
- Bauman, J. G., Wiegant, J., Borst, P., & van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Experimental Cell Research*, *128*(2), 485–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6157553>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*(1), 11–21. doi:10.1038/35036035
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., ... Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5793), 1642–5. doi:10.1126/science.1127344
- Bigelow, C. E., Vishwasrao, H. D., Frelinger, J. G., & Foster, T. H. (2004). Imaging enzyme activity with polarization-sensitive confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, *215*(Pt 1), 24–33. doi:10.1111/j.0022-2720.2004.01357.x
- Block, S. M., Blair, D. F., & Berg, H. C. (1989). Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature*, *338*(6215), 514–8. doi:10.1038/338514a0

- Boustany, N. N., Boppart, S. A., & Backman, V. (2010). Microscopic imaging and spectroscopy with scattered light. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *12*, 285–314. doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124811
- Brown, J. E., Cohen, L. B., De Weer, P., Pinto, L. H., Ross, W. N., & Salzberg, B. M. (1975). Rapid changes in intracellular free calcium concentration. Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. *Biophysical Journal*, *15*(11), 1155–60. doi:10.1016/S0006-3495(75)85891-7
- Campagnola, P. J., & Loew, L. M. (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, *21*(11), 1356–60. doi:10.1038/nbt894
- Dholakia, K., & Reece, P. (2006). Optical micromanipulation takes hold. *Nano Today*, *1*(1), 18–27. doi:10.1016/S1748-0132(06)70019-6
- Diaspro, A., Bianchini, P., Vicidomini, G., Faretta, M., Ramoino, P., & Usai, C. (2006). Multi-photon excitation microscopy. *Biomedical Engineering Online*, *5*, 36. doi:10.1186/1475-925X-5-36
- Du, W., Wang, Y., Luo, Q., & Liu, B.-F. (2006). Optical molecular imaging for systems biology: from molecule to organism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *386*(3), 444–57. doi:10.1007/s00216-006-0541-z
- Dulhunty, A. F., Beard, N. A., Pouliquin, P., & Kimura, T. (2006). Novel regulators of RyR Ca²⁺ release channels: insight into molecular changes in genetically-linked myopathies. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *27*(5-7), 351–65. doi:10.1007/s10974-006-9086-1
- Egger, M. D., & Petrán, M. (1967). New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science (New York, N.Y.)*, *157*(3786), 305–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6030094>
- Ghosh, K. K., Burns, L. D., Cocker, E. D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A. El, & Schnitzer, M. J. (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature Methods*, *8*(10), 871–8. doi:10.1038/nmeth.1694
- Gösch, M., & Rigler, R. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy of molecular motions and kinetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(1), 169–90. doi:10.1016/j.addr.2004.07.016
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron*, *73*(5), 862–85. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.011
- Grinvald, A., Salzberg, B. M., Lev-Ram, V., & Hildesheim, R. (1987). Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes. *Biophysical Journal*, *51*(4), 643–51. doi:10.1016/S0006-3495(87)83389-1
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, *2*(12), 932–40. doi:10.1038/nmeth818

- Helmchen, F., Fee, M. S., Tank, D. W., & Denk, W. (2001). A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals. *Neuron*, *31*(6), 903–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11580892>
- Herman, B., Krishnan, R. V., & Centonze, V. E. (2004). Microscopic analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *261*, 351–70. doi:10.1385/1-59259-762-9:351
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., & Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, *91*(11), 4258–72. doi:10.1529/biophysj.106.091116
- Hoffman, R., & Gross, L. (1975). The modulation contrast microscope. *Nature*, *254*(5501), 586–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1128652>
- Ivins, J. K., Clark, S. M., & Fraser, S. E. (1993). Biological microscopy: the emergence of digital microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, *4*(1), 69–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763397>
- Jacques, S. L. (2013). Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology*, *58*, R37–61. doi:10.1088/0031-9155/58/11/R37
- Kherlopian, A. R., Song, T., Duan, Q., Neimark, M. A., Po, M. J., Gohagan, J. K., & Laine, A. F. (2008). A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Systems Biology*, *2*, 74. doi:10.1186/1752-0509-2-74
- Laxman, B., Hall, D. E., Bhojani, M. S., Hamstra, D. A., Chenevert, T. L., Ross, B. D., & Rehemtulla, A. (2002). Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16551–5. doi:10.1073/pnas.252644499
- Lichtman, J. W., & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, *2*(12), 910–9. doi:10.1038/nmeth817
- Lippincott-Schwartz, J. (2011). Emerging In Vivo Analyses of Cell Function Using Fluorescence Imaging *. *Annual Review of Biochemistry*, *80*(1), 327–332. doi:10.1146/annurev-biochem-121010-125553
- Loew, L. M., Campagnola, P., Lewis, A., & Wuskell, J. P. (2002). Confocal and nonlinear optical imaging of potentiometric dyes. *Methods in Cell Biology*, *70*, 429–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512332>
- Lu, K. P., & Means, A. R. (1993). Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Reviews*, *14*(1), 40–58. doi:10.1210/edrv-14-1-40
- Lucas, M., & Riedo, E. (2012). Invited review article: combining scanning probe microscopy with optical spectroscopy for applications in biology and materials science. *The Review of Scientific Instruments*, *83*(6), 061101. doi:10.1063/1.4720102

- Mahajan, N. P., Harrison-Shostak, D. C., Michaux, J., & Herman, B. (1999). Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chemistry & Biology*, 6(6), 401–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375546>
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), 882–7. doi:10.1038/42264
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20(1), 87–90. doi:10.1038/nbt0102-87
- Neher, E., & Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6), 861–72. doi:10.1016/j.neuron.2008.08.019
- Nieminen, T. A., Loke, V. L. Y., Stilgoe, A. B., Knöner, G., Brańczyk, A. M., Heckenberg, N. R., & Rubinsztein-Dunlop, H. (2007). Optical tweezers computational toolbox. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), S196–S203. doi:10.1088/1464-4258/9/8/S12
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 552–65. doi:10.1038/nrm1150
- Perron, A. (2009). Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2, 5. doi:10.3389/neuro.02.005.2009
- Rehm, M., Dussmann, H., Janicke, R. U., Tavaré, J. M., Kogel, D., & Prehn, J. H. M. (2002). Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24506–14. doi:10.1074/jbc.M110789200
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10), 793–5. doi:10.1038/nmeth929
- Sawinski, J., Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Grossmann, S., Denk, W., & Kerr, J. N. D. (2009). Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), 19557–62. doi:10.1073/pnas.0903680106
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., & Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 190(2), 165–75. doi:10.1083/jcb.201002018
- Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., & Spudich, J. A. (1996). Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophysical Journal*, 70(4), 1813–22. doi:10.1016/S0006-3495(96)79746-1

- Sonnleitner, A., Mannuzzu, L. M., Terakawa, S., & Isacoff, E. Y. (2002). Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12759–64. doi:10.1073/pnas.192261499
- Stuart, G. J., & Palmer, L. M. (2006). Imaging membrane potential in dendrites and axons of single neurons. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 453(3), 403–10. doi:10.1007/s00424-006-0149-3
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6770893>
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509–44. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Tsytarev, V., Liao, L.-D., Kong, K. V., Liu, Y.-H., Erzurumlu, R. S., Olivo, M., & Thakor, N. V. (2014). Recent progress in voltage-sensitive dye imaging for neuroscience. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(7), 4733–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757943>
- Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., & Block, S. M. (1997). Stretching DNA with optical tweezers. *Biophysical Journal*, 72(3), 1335–46. doi:10.1016/S0006-3495(97)78780-0
- Xia, T., Li, N., & Fang, X. (2013). Single-molecule fluorescence imaging in living cells. *Annual Review of Physical Chemistry*, 64, 459–80. doi:10.1146/annurev-physchem-040412-110127
- Zhang, H., & Liu, K.-K. (2008). Optical tweezers for single cells. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 5(24), 671–90. doi:10.1098/rsif.2008.0052
- Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., & Tsien, R. Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(12), 906–18. doi:10.1038/nrm976
- Zhu, X.-J., Song, X.-L., Wang, D.-F., & Bai, J. (2008). [Introduction of fluorescence molecular imaging technology and its development]. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi = Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 32(1), 1–5, 25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438040>

Egyéb felhasznált irodalom:

ANGOL WIKIPEDIA, (2015). *Spectroscopy*

<http://en.wikipedia.org/wiki/Spectroscopy> (utolsó megtekintés ideje: 2015. 04.

05.)

- BOAS, DAVID A., PITRIS, CONSTANTINOS, RAMANUJAM, NIMMI (ed) (2011). *Handbook of biomedical optics* CRC Press. Boca Raton, Florida.
- KELLERMAYER MIKLÓS (2010). *Orvosbiológiai fénymikroszkópia és számítógépes képanalízis*
- LÁSZLÓ LAJOS (szerk) (2012). *Szöveti és sejtbioológiai vizsgálómódszerek* <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/SzovettaniEsSejttaniVizsgaloModszerek/book.pdf> (utolsó megtekintés: 2015. 04. 05.)
- MOLECULAR PROBES (2005). *LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells** Molecular Probes, Inc. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf> (utolsó megtekintés ideje: 2015.04. 15.)
- MOLECULAR PROBES (2008). *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes* Molecular Probes, Inc. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf> (utolsó megtekintés ideje: 2015. 04. 15.)
- MASTERS, BARRY R., SO, PETER T. C. (ed) (2008). *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy* Oxford University Press. New York.
- MOLLOY, JUSTINE E. AND PADGETT, MILES J. (2002). *Lights, action: optical tweezers* Contemporary Physics, 2002, volume 43, number 4, pages 241 ± 258
- MURPHY, DOUGLAS B. (2001). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging* Wiley-Liss, Inc. USA.
- SCHULTZ, THOMAS (2008. 10. 28.). *Spectroscopic methods for biology and medicine*
- SINKÓ JÓZSEF (2014). *Leképezési és képrekonstrukciós hibák vizsgálata és korrekciója a nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópiában* http://doktori.bibl.u-szeged.hu/2467/1/doktori_sinkoj.pdf (utolsó megtekintés ideje: 2015. 04.18.)

VANDERBILT UNIVERSITY, *BME 285: Introduction to Biomedical Optics*
<http://research.vuse.vanderbilt.edu/bmeoptics/bme285/index.htm> (utolsó
megtekintés ideje: 2015. 03. 28.)