

# Nanobiofotonika: od lasera k živej bunke

Dušan Chorvát ml.<sup>1,2,3</sup>, Alžbeta Chorvátová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 814 04 Bratislava

<sup>2</sup> Ústav polymérov SAV, Dúbravská cesta 9, 845 41 Bratislava

<sup>3</sup> Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava

*Nanobiofotonika je jedným z najmladších interdisciplinárnych vedeckých smerov, ktorý vznikol na pomedzí nanotechnológií, fotoniky a biomedicínskych vied s cieľom preniesť medicínsku diagnostiku a terapiu na úroveň proteínov a biologicky aktívnych molekúl – základných jednotiek živej bunky. Kľúčovú úlohu v jeho rozvoji má predovšetkým vývoj pulzných laserov s ultrakrátkymi impulzmi, ktoré umožnili prepojiť spektroskopické, zobrazovacie a časovo rozlíšené metódy a poskytujú dnes komplexnú multimodálnu informáciu o biologických štruktúrach a javoch na nanometrovej škále. V našom príspevku uvádzame prehľad vybraných významných momentov mapujúcich cestu od objavenia prvého lasera cez súčasný stav nanobiofotonických technológií k perspektívam tejto novej vednej oblasti na Slovensku.*

## Úvod

Nanobiofotonika je rýchlo sa rozvíjajúci vedecký smer, ktorý zahŕňa široké spektrum záujmov počínajúc výskumom základných princípov interakcie žiarenia s biologicky aktívnymi molekulami, cez vývoj metód pre charakterizáciu ich optických vlastností, špecializovaného optického zobrazovania a optickej diagnostiky, až po využitie získaných informácií pre praktické aplikácie, zahŕňajúce napr. vývoj nových typov liečiv a liečebných postupov, ako je napr. fotodynamická terapia. Rozvoj tejto oblasti úzko súvisí s rozvojom nanomedicíny – novým chápaním medicíny s cieľovou terapiou na úrovni jednotlivých molekúl, ktorá získava vo svete čoraz väčšie uplatnenie a záujem. Ako príklady aplikácií vyvinutých v oblasti nanobiofotoniky za posledné roky môžu napríklad slúžiť techniky génovej nanochirurgie pomocou femtosekundových laserových impulzov [1], alebo vývoj nových diagnostických metód a senzorov na báze nanotechnológií [2]. Medzi kľúčové optické technológie, ktoré umožňujú kvantitatívne porozumieť bunkovej biológii na chemickom základe, patria fluorescenčná a vibračná (Ramanova) mikroskopia, časovo rozlíšená spektroskopia a metódy založené na nelineárnych interakciách svetla s materiálom.

## Princípy a história konfokálnej optickej mikroskopie

Fluorescenčná mikroskopia umožňuje zobrazovanie špecifických bunkových štruktúr na (sub)mikrometrovej škále s vysokou mierou špecifickosti a citlivosti. Napriek tomu, že jej princípy sú známe už vyše 100 rokov, zaznamenala významný technologický rozvoj až koncom minulého storočia vďaka objavu konfokálneho

princípu detekcie a v nemalej miere tiež vďaka objavu lasera a digitálneho spracovania obrazu.

Princíp konfokálneho optického zobrazovania bol sformulovaný ešte pred objavením lasera a v roku 1957 bol patentovaný M. Minským z Harvardovej univerzity [3]. V transmisnom usporiadaní pozostával optický systém z dvoch šošoviek so spoločným ohniskom a sadou štrbín, umiestnených na spoločnej optickej osi tak, aby svetlo prichádzajúce zo zdroja cez prvú štrbinu prechádzalo vzorkou a sfokusovalo sa na druhú štrbinu (z tohto princípu pochádza aj pomenovanie *konfokálny*, čiže so spoločnou ohniskovou rovinou). V súčasnosti častejšie používaná geometria pre odraz, resp. fluorescenčné zobrazovanie, je založená na tzv. epi-osvetlení, v ktorom má excitačné a emitované svetlo spoločnú dráhu a delí sa pomocou polopriepustného alebo dichroického zrkadla (obr. 1). Pre dosiahnutie rozlíšenia obmedzeného iba zákonmi difrakcie je dôležité, aby na excitáciu vzorky bol použitý bodový zdroj svetla. To je možné dosiahnuť použitím klasických lampových zdrojov a excitačnej konfokálnej štrbiny, alebo optimálne pomocou laserového zdroja. Obraz excitovanej oblasti vo vzorke sa premieta na druhú konfokálnu štrbinu, ktorá blokuje väčšinu rozptýleného svetla z iných optických rovín, čoho výsledkom je ostrý obraz vzorky vo fokusačnej rovine objektívu, nazývaný tiež optickým rezom. Aby mohol byť pomocou konfokálneho osvetlenia vytvorený obraz, vzorka sa sekvenčne rastruje, najčastejšie pomocou dvojice galvanicky vychýľovaných zrkadiel. V r. 1968 M. Egger a M. Petráň [4] navrhli usporiadanie skenovania vzorky pomocou dvojitého rotujúceho disku pokrytého otvormi, využívajúc princíp bodového skenovania 2D obrazu navrhnutého už v r. 1884 P. Nipkowom. Napriek relatívne

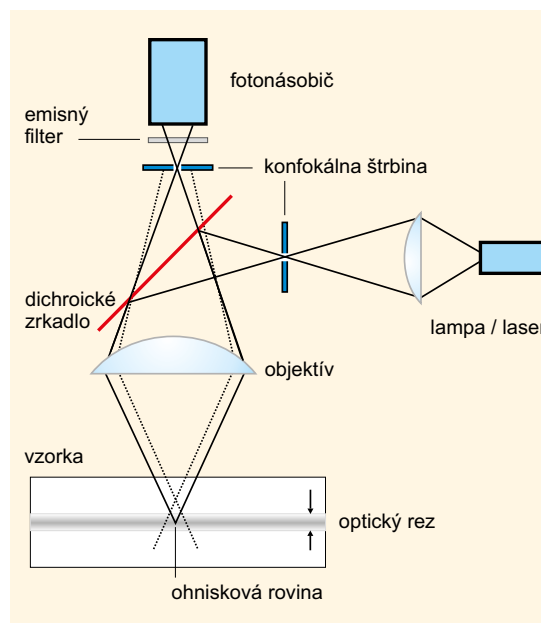
nízkej svetelnej účinnosti sú takéto konfokálne nelaserové mikroskopy fungujúce na princípe rotujúceho disku stále používané, najčastejšie v spojení s digitálnymi zobrazovacími systémami na báze CCD kamier.

Po objavení lasera v r. 1960 [5] sa rýchlo prišlo na jeho potenciál v medicíne, aj keď spočiatku sa o laseri uvažovalo najmä ako o nástroji ponúkajúcom koncentráciu energie pre výkonové aplikácie [6]. Ovplyvnenie biologických štruktúr vysoko výkonným laserovým žiarením sa doteraz využíva vo viacerých experimentálnych technikách nanobiofotoniky, akými sú napr. laserová mikromanipulácia [7], dvojfotónová fotopolymérisácia [8] a pod. Onedlho sa laserové excitačné zdroje začali používať aj v optickej mikroskopii, najmä vďaka ich schopnosti generácie monochromatického a koherentného svetla. V 70. rokoch minulého storočia Wilson a Sheppard prvýkrát demonštrovali konfokálny mikroskop s laserovou excitáciou a fotonásobičom ako detektorom [9]. Ukázali, že pomocou lasera je možné dosiahnuť medzné optické rozlíšenie, obmedzené iba zákonmi vlnovej teórie svetla. Na ich príspevku bol založený ďalší rozvoj konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu (CLSM), ktorý sa v rôznych obmenách a komerčných variantoch výrobcov mikroskopov (Zeiss, Leica, Nikon, Olympus a pod.) používa v biomedicínskom výskume dodnes.

### Laserová mikroskopia v súčasnosti

Výskum vzájomného pôsobenia laserového žiarenia s materiálmi predznamenal začiatok experimentálnej nelineárnej optiky, ktorú revolučne rozvinulo široké uplatnenie tuholátkových femtosekundových laserov [10]. V r. 1990 W. Denk pod vedením prof. W. W. Webba z Cornellovej univerzity zostrojil prvý laserový skenovací mikroskop založený na nelineárnej optickej excitácii pomocou simultánnej absorpcie viacerých fotónov [11]. Na rozdiel od predchádzajúceho klasického designu nie je v tomto prípade potrebné používať konfokálnu štrbinu, pretože k excitácii fluorescence dochádza iba vo veľmi malom objeme vzorky (rádovo v niekoľkých  $\mu\text{m}^3$ ) vďaka nelineárnej interakcii vysoko výkonných ultrakrátkych laserových impulzov. Ukázalo sa, že použitie dvojfotónovej excitácie v blízkej infračervenej oblasti má veľký význam pre biomedicínske aplikácie, pretože poskytuje lepšiu penetráciu do tkaniva a redukuje fotopoškodenie biologických vzoriek. Takýto spôsob nelineárneho optického zobrazovania je mimoriadne vhodný pre charakterizáciu vnútrobunkových štruktúr s vysokým priestorovým rozlíšením a citlivosťou. Mikroskopia s multifotónovým budením sa v súčasnosti využíva najmä pri zobrazovaní hrubých preparátov tkanív s možnosťami použitia aj v *in-vivo* medicínskej diagnostike [12]. Analogickým prístupom je využitie generácie druhej harmonického frekvencie (SHG) [13], ktorej intenzita je závislá od prítomnosti chirálnych molekúl a dá sa využiť napr. na sledovanie biologických membrán a cytoskeletu.

Ultrakrátko pulzné laserové zdroje poskytujú v kombinácii so skenovacou mikroskopiou celé spektrum ďalších mikroskopických techník, ako napríklad zvýšenie rozlíšenia až za hranicu difrakčného limitu pomocou priestorovo obmedzenej deexcitácie molekúl (stimulated emission depletion – STED) [14], alebo priestorové mapovanie dób života fluorescence (fluorescence lifetime imaging – FLIM) [15]. Techniky prekonávajúce difrakčný limit rozlíšenia patria v súčasnosti k špičko-



**Obr. 1** Tvorba obrazu v konfokálnom mikroskope s epifluorescenčným osvetlením. Excitačné a emisné svetlo prechádza rovnakou dráhou medzi objektívom a vzorkou. V prípade použitia lasera nie je potrebná excitačná štrbina. V reflexnom kontraste je namiesto dichroického zrkadla použité polopriepustné zrkadlo.

vým modalitám biofotonickej diagnostiky a umožňujú sledovanie interakcií biomolekúl a štúdium štruktúr na nanometrovej úrovni. STED mikroskopia, vyvinutá s pionierskym príspevkom prof. S. Hella z inštitútu M. Plancka v Göttingene, umožňuje s vybranými fluorescenčnými molekulami dosiahnuť priame zobrazovanie s rozlíšením od desiatok nanometrov; v prípade FLIM je kľúčom k nanobiofotonickým aplikáciám možnosť presnej kvantifikácie procesu fluorescenčného rezonančného transferu energie (FRET), ktorý sa používa pri skúmaní interakcií molekúl ako spektroskopické „pravítko“ s rozlíšením na úrovni jednotiek nanometrov.

Pri interakcii laserového žiarenia s biologickým materiálom je veľmi dôležitá vlnová dĺžka použitého žiarenia. Z tohto dôvodu sa pri vývoji nových laserových zdrojov pre mikroskopické aplikácie kladie veľký dôraz na možnosť preladenia emisie s cieľom vybrať špecifickú vlnovú dĺžku. Najrozšírenejšími metódami preladenia v oblasti impulzných laserov je selektívny výber čiar emisie pomocou vnútrorezonátorového difrakčného elementu, alebo parametrické zosilnenie femtosekundových impulzov. Inou možnosťou je použitie mikroštruktúrnych vlákien – fotonických kryštálov, ktoré poskytujú efektívnu frekvenčnú konverziu aj bez zosilnenia pulzov, ale nedosahujú také energie v pulze ako parametrické zosilňovače, čo je však pre aplikácie v mikroskopii skôr výhodou kvôli menšej pravdepodobnosti poškodenia vzorky. Posledný vývoj v oblasti excitačných zdrojov pre nelineárnu laserovú mikroskopiu uprednostňuje design s využitím femtosekundového superkontinua generovaného fotonickým vláknom [16], ktorý dovolil rozšíriť mikroskopické zobrazovacie techniky o rozmer selektívnej excitácie vzorky.

V oblasti biomedicínskeho výskumu pokračuje neustála snaha o vytvorenie neinvazívnych mikroskopických optických techník pre zobrazovanie živých buniek. Výhodou vibračných (Ramanových) zobrazovacích techník v porovnaní s fluorescenčnými je ich schopnosť zobrazit chemické formy v ich prirodzenom prostredí

» Pri interakcii laserového žiarenia s biologickým materiálom je veľmi dôležitá vlnová dĺžka použitého žiarenia. «

» V nadväznosti na fotonickú diagnostiku je fotodynamická terapia jednou z najperspektívnejších nových technológií nanobiomedicíny. <<



**Obr. 2** Pracovná stanica pre laserovú mikroskopiu v Medzinárodnom laserovom centre v Bratislave tvorená motorizovaným invertovaným optickým mikroskopom, konfokálnym skenerom (vľavo), femtosekundovým laserovým systémom a spektrálne rozlíšeným časovo korelovaným počítaním fotónov (vpravo).

navodením ich vlastnej chemickej vibrácie, a to bez potreby pridania fluorescenčných značiek. To znamená, že táto technika umožňuje vyšetrovanie molekulového zloženia a dynamiky vo vnútri buniek za prirodzených podmienok. Na druhej strane je intenzita signálov v Ramanovej mikroskopii o niekoľko rádov slabšia ako vo fluorescenčnej mikroskopii. S elegantným riešením tohto problému prišla skupina prof. S. Xie z Harvardovej univerzity, ktorá demonštrovala, že pomocou nelineárneho zmiešavania viacerých femto- a pikosekundových laserových impulzov je možné zobrazovanie nefluorescenčných štruktúr, ako napr. lipidov, v reálnom čase pomocou generácie koherentného anti-Stokesovho Ramanovho rozptylu (CARS) [17].

Simultánny charakter a vzájomné ovplyvňovanie bunkových signálnych javov vyžaduje vyhodnotenie mnohopočetných parametrov, ako je napr. funkcia času v 3D priestore. Až donedávna, najmä kvôli chýbajúcim vhodným detekčným systémom, mohol byť súčasne študovaný iba malý počet vybraných bunkových subsystémov a procesov. Použitím spektrálne rozlíšenej detekcie fluorescencie v spojení s rozvojom nových matematických metód analýzy signálov a nových typov fluorescenčných značiek, ako napr. fluorescenčných proteínov alebo kvantových nanoštruktúr, sa rádovo zvýšil počet fluorofórov, ktoré je možné sledovať súčasne [18]. Časovo rozlíšená optická spektroskopia dovoľuje odhaliť ešte ďalšiu dimenziu fluorescenčného signálu, a to detaily kinetiky deexcitácie vzbudeného stavu. Pomocou časovo rozlíšenej spektroskopie, ktorá má priamy vzťah k FLIM mikroskopii, bolo riešené rozsiahle množstvo problémov, ako napr. štúdium dynamiky a pohyblivosti komplexných molekúl v živých bunkách, štúdium proteín-proteínových interakcií a pod. Iným, často používaným prístupom k sledovaniu molekulárnych dejov je tiež sledovanie korelácií fluorescenčného signálu (Fluorescence Correlation Spectroscopy – FCS), ktoré umožňuje priame meranie parametrov dynamiky difúzie jednotlivých molekúl [19].

Keďže úlohou tohto príspevku nie je podať vyčerpávajúci obraz o všetkých aspektoch laserovej mikroskopie, v prípade bližšieho záujmu čitateľov odporúčame nahliadnúť do niektorej z prehľadových publikácií o CLSM, ako napr. z edície J. B. Pawleyho [20].

### Fotonická diagnostika a terapia

Súčasným trendom v oblasti optickej mikroskopie je budovanie komplexných experimentálnych aparátúr na báze laserových mikroskopických pracovných staníc, s možnosťou užívateľského výberu detekčných techník, snímacích režimov a kontroly podmienok pre uchovanie živých biologických vzoriek (obr. 2). Takéto zoskupenie techník optickej diagnostiky spájajúcich časovo rozlíšenú detekciu, laserovú spektroskopiu a zobrazovanie [21] umožňuje vedcom pracujúcim v biomedicínskom výskume hlbšie nahliadnúť do štruktúry a fyziológie živých organizmov od molekulárnej až po tkanivovú úroveň, čo prináša nové perspektívy pre budúci rozvoj biológie a medicíny.

V nadväznosti na fotonickú diagnostiku je fotodynamická terapia (PDT) jednou z najperspektívnejších nových technológií nanobiomedicíny. PDT je založená na koncepte, že k deštrukcii tumoru dochádza po pridaní fotosenzitizujúcej látky a následnom ožiarení vybranej oblasti v určitom časovom intervale. Selektívne vychytávanie alebo akumulácia fotosenzibilizátorov v nádorovom tkanive vedie k selektívnej deštrukcii nádoru a súčasnému k ušetreniu okolitého tkaniva. Takáto selektivita je hlavnou prednosťou liečby založenej na PDT, pretože je tak možné vyhnúť sa viacnásobným chirurgickým zákrokmi zahrňujúcim aj odstránenie orgánov v prípadoch, kde už rádioterapia či chemoterapia zlyhala. Napriek aktívnemu výskumu v tejto oblasti, je stále veľká snaha pochopiť mechanizmy ako sa akumulujú fluorescenčné sondy a fotosenzibilizátory v bunkách a mechanizmy molekulárneho pozadia ich diagnostickej funkcie a možnej fototoxicity. Jednou z dôležitých aplikácií novovyvíjaných metodík laserov-

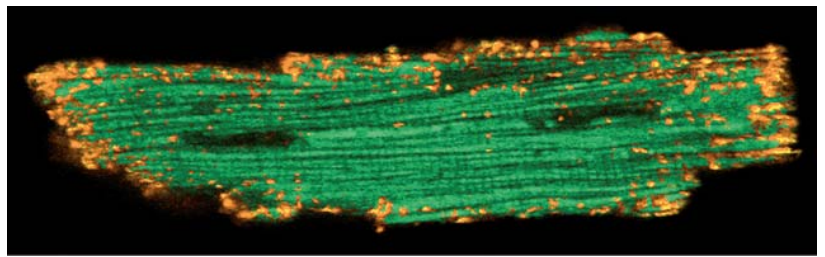
vej mikroskopie je práve snaha rozšíriť poznatky o mechanizmoch vedúcich k rozpoznaniu a selektívnemu vychytávaniu fotosenzibilizátorov v nádorových bunkách a tiež mapovanie procesov nasledujúcich po excitácii fotosenzibilizátorov [22]. Ďalším širokým okruhom aplikácií, ktorých rozvoj je podmienený novými metódami optického zobrazovania, je výskum metabolických a fyziologických procesov na úrovni jednotlivých buniek pomocou fluorescencie endogénnych a exogénnych fluorofórov (obr. 3), resp. fluorescenčných proteínov.

### Perspektívy laserovej mikroskopie na Slovensku

Nanobiofotonické technológie založené na laserovej mikroskopii sú dynamicky sa rozvíjajúcou oblasťou s exponenciálne rastúcim počtom aplikácií a stúpajúcim významom tak v biologických, ako aj v medicínskych vedách. Ich potenciál sa každoročne zvyšuje najmä vďaka podpore vedcov z oblasti špičkovej experimentálnej fyziky a technických vied.

Na Slovensku sa počiatky laserovej spektroskopie a mikroskopie odvíjajú od aktivít katedier experimentálnej fyziky, jadrovej fyziky a biofyziky Fakulty matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave, kde sa v spolupráci s Moskovskou štátnou univerzitou od 90. rokov minulého storočia rozvíjali metódy nelineárnej optickej spektroskopie (ako napr. CARS), laserovej mikrospektroskopie (FRAP – fluorescence recovery after photobleaching) a časovo rozlíšenej optickej spektroskopie. Paralelne s týmito pracoviskami sa rozvíjal výskum v oblasti Ramanovej spektroskopie a mikroskopie na katedre biofyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach. Jedným z významných výsledkov spolupráce vedeckých tímov v tejto oblasti bol tiež vznik Medzinárodného laserového centra (MLC) v Bratislave, kde v rámci oddelenia biofotoniky vznikla sieť laboratórií orientovaných na laserovú mikroskopiu, spektroskopiu a spracovanie mnohodoménových dát. V súčasnosti sa okrem uvedených tímov aplikáciami laserovej mikroskopie v biomedicíne zaoberajú aj viaceré kolektívy Slovenskej akadémie vied, ako napr. Virologický ústav SAV alebo Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV. V príprave sú tiež nové inštalácie moderných experimentálnych zariadení pre nanobiofotonický výskum na mnohých univerzitách a ústavoch, realizované s príspevkom štrukturálnych fondov EÚ.

Napriek komerčnej dostupnosti sú laserové mikroskopy stále vysoko náročnou experimentálnou metódou a často vyžadujú špecializovaný tím odborníkov a sofistikované prístrojové vybavenie. V tejto súvislosti je veľkým prínosom možnosť zapojenia sa do sietí medzinárodného výskumu, akou je napr. Laserlab Europe (projekt 7. rámcového programu EÚ), v ktorom je zapojených 46 európskych laserových pracovísk z 19 krajín. V rámci tohto projektu rieši kolektív MLC úlohy spoločnej výskumnej aktivity OPTBIO – Advanced Optical Techniques in Bio-imaging and Bio-processing, ktorého cieľom je rozvíjať techniky mikroskopie s nelineárnymi optickým budením a manipulácie biologických objektov pomocou laserového žiarenia. Jedným z cieľov projektu je vyvinúť mikroskopickú pracovnú stanicu pre multimodálne fluorescenčné zobrazovanie s nelineárnou laserovou excitáciou. S použitím femtosekundových laserových impulzov s voliteľnými priestorovo-časovo-spektrálnymi vlastnosťami a pridaním



**Obr. 3** Zobrazenie potenciálu mitochondrií v izolovanej srdcovej bunke pomocou konfokálneho skenovacieho mikroskopu s využitím fluorescenčnej sondy JC-1 (Invitrogen).

multispektrálnej časovo rozlíšenej detekcie luminescencie plánujeme získať možnosti chemicky špecifického trojdimenzionálneho zobrazovania a vizualizácie mikroštruktúr a procesov v biologických objektoch v ich prirodzenom prostredí (napr. v živých bunkách). Vyvíjaný prototyp mikroskopu chceme v budúcnosti aplikovať vo výskume metabolickej aktivity buniek, fotodynamickej terapie a charakterizácie nanoštruktúr využívaných v oblastiach molekulárnej farmakológie a molekulárnej optoelektroniky.

### Podakovanie

Táto publikácia vznikla v rámci OP Výskum a vývoj vďaka podpore projektu Centrum excelentnosti pre návrh, prípravu a diagnostiku nanoštruktúr pre elektroniku a fotoniku (NanoNet), ITMS: 26240120010, spolufinancovaného zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### Literatúra

- [1] U. K. Tiralpur, K. König: *Nature* **418**, 290 (2002).
- [2] P. N. Prasad: *Photon-based Nanoscience and Nanobiotechnology book*, J. J. Dubowski, S. Tanev (ed.), NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry **239**, 55 (2006).
- [3] M. Minsky: U.S. Patent 3013467, 1957.
- [4] M. D. Egger, M. Petráň: *Science* **157**, 305 (1967).
- [5] T. Maiman: *Nature* **187**, 493 (1960).
- [6] L. R. Solon, R. Aronson, G. Gould: *Science* **134**, 1506 (1961).
- [7] K. O. Greulich: *Micromanipulation by light in biology and medicine: The laser microbeam and optical tweezers*, Birkhäuser, 1999.
- [8] S. Maruo, O. Nakamura, S. Kawata: *Opt. Lett.* **22**, 132 (1997).
- [9] T. Wilson, C. Sheppard: *Theory and practice of scanning optical microscopy*, Academic Press, London 1984.
- [10] D. E. Spence, P. N. Kean, W. Sibbett: *Opt. Lett.* **16**, 42 (1991).
- [11] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb: *Science* **248**, 73 (1990).
- [12] B. G. Wang, K. König, K. J. Halbhauer: *J. Microsc.* **238**, 1 (2010).
- [13] Y. R. Shen: *Nature* **337**, 519 (1989).
- [14] S. W. Hell, J. Wichmann: *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994).
- [15] E. P. Buurman a kol.: *Scanning* **14**, 155 (1992).
- [16] J. A. Palero a kol.: *Optics Express* **13**, 5363 (2005).
- [17] A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie: *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142 (1999).
- [18] R. Lansford, G. Bearman, S. E. Fraser: *J. Biomed. Opt.* **6**, 311 (2001).
- [19] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb: *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705 (1972).
- [20] J. B. Pawley: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd Edition, Springer, New York 2006.
- [21] D. Chorvát, A. Chorvátová: *Laser Phys. Lett.* **6**, 175 (2009).
- [22] P. Miškovský: *Current Drug Targets* **3**, 55 (2002).