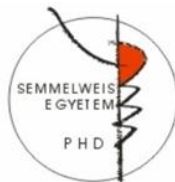


**A nemlineáris mikroszkópiában használt
impulzusüzemű lézerek diagnosztikai célú
felhasználása és potenciális egészségügyi
kockázatainak vizsgálata**

Doktori tézisek

Haluszka Dóra

**Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**



Témavezető:

Dr. Wikonkál Norbert, MTA doktora, egyetemi tanár

Konzulens:

Dr. Szipőcs Róbert, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Csík Gabriella, PhD, egyetemi docens

Dr. Emri Gabriella, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati Bizottság elnöke:

Dr. Kovalszky Ilona, MTA Doktora, egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság tagjai:

Dr. Paku Sándor, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Varga Erika, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2015

Bevezetés

Az elmúlt néhány évtizedben a nemlineáris optikai képalkotó módszerek gyors fejlődésen mentek keresztül, számos olyan módszer került kidolgozásra, mely alkalmas a bőr *in vivo* vizsgálatára. A közel infravörös hullámhossz tartományban (700-1300 nm) hangolt lézer fényforrás a bőr mélyebb rétegeibe is képes penetrálni, ahol a természetes kromofórok – mint például a melanin, NADH, elasztin, kollagén – gerjeszti, és biztonságos, jelölés nélküli képalkotást tesz lehetővé nagy térbeli és időbeli felbontás mellett. A nemlineáris optikai folyamatok között megkülönböztetjük a kétfoton abszorpciós fluoreszcenciát (TPEF), a másodharmonikus keltést (SHG) és a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS), melyek használatával gyakorlatilag a bőr teljes keresztmetszete láthatóvá tehető. Kétfoton gerjesztéssel a keratin, melanin, NADH és az elasztin detektálható, míg az SHG módszerrel bizonyos, nem szimmetrikus szerkezetű molekulák, mint például a kollagén. A CARS technika két különböző hullámhosszú lézernyaláb egy pontba fókuszálásával állít elő az adott molekulára, szövetre jellemző optikai jelet, így ezzel az intracelluláris lipidek, vagy a szubkutiszban található zsírszövetek azonosíthatóak.

Klinikánk 2009 óta több hazai akadémiai és ipari kutatócsoporttal együttműködve végez fejlesztéseket és kutatásokat, melynek célja egy kisméretű, kevésbé költséges, de teljes értékű lézerpasztázó mikroszkóp

megtervezése, mely a bőrgyógyászok mindennapi munkáját segíthet (*FiberScope*). A PhD dolgozat anyagára vonatkozó méréseinket még többségében hagyományos, Carl Zeiss gyártmányú kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal, illetve egy SHG és CARS mérésekre átalakított továbbfejlesztett változatával végeztük, és munkánk során olyan jelenségeket vizsgáltunk melyek a klinikumban gyakran előfordulnak, sok pácienset érintenek, de *in vivo* képalkotó módszerekkel még nem vizsgálták kellő részletességgel. Kísérleteinkben a különböző nemlineáris mikroszkópiai technikák alkalmazási lehetőségeit vizsgáltuk a dermatológiában, illetve felmértük a képalkotásra használt lézerek potenciális biztonságtechnikai kockázatait. Eredményeink az imént felvázolt és megvalósítani kívánt *FiberScope* tervezéséhez és megépítéséhez szükséges alapadatokat szolgáltatva.

Célkitűzések

1. Nanomedicinák bőrben történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

Az epidermiszben előforduló csontvelő eredetű dentritikus sejtek, a Langerhans sejtek a bőrben antigén prezentáló feladatot látnak el, az antigén felvétele után a nyirokutakon keresztül a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol feladatuk az antigének bemutatása a T-sejteknek. Transzktán immunizáció során az antigének bőrbe

juttatása, majd ezek felvétele és prezentációja az immunsejtek által a szervezet hatékony immunizációját teszi lehetővé az adott antigénnel szemben. Kísérletünkben a festékjelölt és jelöletlen DermaVir nanomedicina penetrációját vizsgáltuk Langerin-EGFP *knock in* egereken *in vivo* CARS módszerrel, majd a szállézer fényforrással működő *FiberScope* készülékkel.

2. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermalis kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

Az elhízás és a 2-es típusú cukorbetegség gyakorisága világszerte növekszik, számos krónikus betegség kialakulásáért felelősek. Ezek mellett változatos bőrgyógyászati kórképek előfordulása is jelentős ebben a populációban. Az elhízás során a megnagyobbodott zsírsejtek a gyulladáshoz vezető citokinek, szabad zsírsavak és szabadgyök termelésén keresztül a dermalis kollagén degradációját okozzák. Munkánk során leptin deficiens ob/ob és vad típusú egerek bőrének kötőszöveti változásait követtük nyomon *in vivo* SHG módszerrel, négy mérési időpontban, valamint a kísérlet végén a zsírsejtek méretbeli változásait detektáltuk *ex vivo* CARS technikával.

3. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

A humán elhízás és egészségtelen táplálkozás hitelesebb modellezése céljából az elhízást nem genetikai módosítással, hanem magas zsír- és/vagy cukortartalmú diéták alkalmazásával indukáltuk. Ebben a hosszútávú kísérletben szintén a dermális kollagén és a szubkután zsírsejtek szerkezeti változásait vizsgáltuk *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel.

4. Ultrarövid impuzusú titán-zafír szilárdtest lézer és ytterbium optikai szállézer fényforrás biztonságtechnikai vizsgálata

A nemlineáris mikroszkópiában használt, nagy intenzitású, impulzus üzemű lézer fényforrások nem megfelelő beállítások esetén károsíthatják a vizsgált mintát. Ebben a részfeladatban fontosnak tartottuk az általunk használt TiS szilárdtest és Yb optikai szállézer fényforrások esetleges fotokémiai és termikus károsító tényezőinek felmérését, az irodalomban megjelent ellentmondásos eredmények miatt. Az endogén kromofórok excitációja során – az UVB sugárzáshoz hasonlóan – a DNS-ben ciklubután pirimidin dimerek (CPD) képződhetnek, melyek nem megfelelő reparáció esetén kiinduló pontjai lehetnek egy esetleges

mutációnak. Az infravörös hullámhossz tartományban hangolt fényforrások továbbá termikus károsodást is okozhatnak, mely a melanin abszorpciójával hozható összefüggésbe. Diagnosztikai szempontból a jó minőségű, nagy felbontású felvételek készítése a legfontosabb. Ehhez definiálnunk kell a megfelelő paramétereket, mint az optimális hullámhossz, teljesítmény vagy expozíciós idő. Ebben a feladatban tehát célunk volt a különböző károsító tényezők detektálása és a biztonságos képalkotáshoz szükséges lézer paraméterek definiálása.

Módszerek

1. Nanomedicinák bőrben történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

Kísérletünkben 4 darab 10 hetes Langerin-EGFP-DTR *knock in* egeret használtunk. Ezeknek az állatoknak a bőrében lévő Langerhans sejtei zöld fluoreszcens proteinnel (EGFP) jelöltek. Az egereket 1,2 % Avertin oldattal altattuk, majd a fülüket tárgylemezre rögzítettük. A stratum corneum fellazítása érdekében a fület egy DermaPrep (Genetic Immunity, Magyarország) nevű speciális szivaccsal megdörzsöltük. A festékjelölt DermaVir (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) részecskéiben az Alexa546 festék egy kovalens kötéssel keresztül kötődik egy polietilénimin-mannóz (PEIm) nanorészecskéhez, ami a bejuttatni kívánt plazmid DNS-t tartalmazza. A fülre körülbelül 2 μ l mennyiségű DermaVir oldatot cseppentettünk, majd száradni hagytuk és az anyag penetrációját 1 óra elteltével mértük. Az *in vivo* CARS mérés során festék jelölés-mentes DermaVir oldatot használtunk, majd a *FiberScope* készülékkel történt vizsgálatoknál a festékjelölt nanomedicina penetrációját követtük nyomon.

2. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken

Kísérletünkben 4 darab 8 hetes nőstény leptin deficiens egeret B6.V-Lep^{ob}/J (Charles River, Olaszország) vizsgáltunk 30 héten keresztül. Ebből 2 darabot kalória megszorított diétán tartottunk, míg a másik két egeret *ad libitum* tápláltuk. Kontroll csoportként 2 darab korban és nemben megegyező C57BL/6 egeret (Charles River, Olaszország) használtunk, normál diétán tartva. Az állatok tömegét hetente egy alkalommal digitális mérleggel mértük. A kollagén szerkezeti változásait négy alkalommal mértük *in vivo* SHG módszerrel, a 8. 16. 24. és 30. héten. A lézer hullámhosszát ~795 nm-re állítottuk, a mintára eső átlagos teljesítmény 27-30 mW volt. A jó minőségű, részletgazdag felvételek készítése érdekében 1024 x 1024 felbontást választottuk, 12,61 µsec pixel dwell time és 2-es átlagolás mellett. Minden állatról 5 darab sorozatfelvételt készítettünk 60 µm mélységig 5 µm-enként, 20x nagyításban. Az adipociták méretének meghatározásához *ex vivo* CARS módszert használtuk. Ebben az esetben 4 mm átmérőjű punch biopsziát vettünk a háti régióból és tárgylemezre helyeztük, hipodermális régióval felfelé, és egerenként 3 darab sorozatfelvételt készítettünk. A CARS méréseket követően a minták szövettani feldolgozásra kerültek. A

rutin hematoxylin-eozin festés mellett van Gieson festés is készült. A szövettani metszetekről digitális felvételeket készítettünk, majd DigiMizer program segítségével határoztuk meg a dermisz vastagságát és az adipociták területét.

Az egyes SHG sorozatfelvételekhez tartozó intenzitás értékeket WCIF ImageJ program segítségével határoztuk meg. Az alacsony egyedszám miatt a statisztikai próbákat nem végeztünk, hanem az egyes mérési időpontokban a kontroll csoport eredményeit 100%-nak vettük, és ehhez viszonyítottuk a többi egércsoport átlagos SHG intenzitás értékeit. A dermisz vastagság és az adipociták méreteinek meghatározásánál is a csoportonkénti átlageredményeket hasonlítottuk össze.

3. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – a dermális kollagén tartalom és a szubkután zsírszövet vizsgálata *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS módszerrel különböző diétán tartott C57BL/6 egereken

Ebben a hosszútávú kísérletben különböző diéták dermális kollagénre és szubkután zsírsejtekre gyakorolt hatásait követtük 32 héten keresztül. 20 db 8 hetes nőstény C57BL/6 egeret vizsgáltunk. Az állatokat az alábbi 4 csoportra osztottuk, csoportonként 5 egérrel:

- HFat csoport – magas, 30% zsírtartalmú takarmány –elhízás indukálása

- HFru csoport – 20% fruktóz tartalmú ivóvíz + standard takarmány – kollagén glikáció indukálása
- HFHF csoport – 30% zsírtartalmú takarmány + 20% fruktóz tartalmú ivóvíz – elhízás + kollagén glikáció indukálása
- kontroll csoport – standard takarmány + ivóvíz

A dermális kollagén szerkezeti változásainak nyomon követésére *in vivo* SHG módszert alkalmaztunk, a kísérlet ideje alatt négy alkalommal, a 8. 16. 24. és 32. héten. Az előző kísérletben ismertetett főbb beállításokon nem változtattunk, de a gyorsabb képalkotás érdekében 512 x 512-re csökkentettük a felbontást, a pixel dwell time-ot pedig 6,3 μ sec-ra módosítottuk. Az *ex vivo* CARS mérésére szövettani analízist az előző kísérletben ismertetett módon végeztük el.

Az SHG intenzitást WCIF ImageJ program segítségével határoztuk meg. A csoportokra vonatkozó átlagos SHG intenzitás értékek közötti szignifikancia definiálására One-way ANOVA-t és Student T-testet használtunk. Az eltérést 95% konfidencia szint mellett, $p < 0,05$ értéknél fogadtuk el szignifikánsnak. A dermisz vastagságát és az adipociták területét a VanGieson festett metszetek felvételei alapján határoztuk meg Digimizer program segítségével, majd a csoportonkénti szignifikancia értékeket Student T-teszttel számoltuk ki.

4. Ultrarövid impulzusú titán-zafír szilárdtestlézer és ytterbium optikai szállézer fényforrások biztonságtechnikai vizsgálata

A vizsgálathoz 8 hetes nőtény C57BL/6 egereket használtunk. Az állatokat intraperitoneálisan beadott 1,2%-os Avertin oldattal (Sigma Aldrich Kft., Magyarország) altattuk, majd a háti részt szőrtelenítettünk, és kijelöltünk egy 5 mm x 10 mm-es téglalap alakú területet, amit a felületre merőleges irányból exponáltunk. A besugarozást egy hagyományos Carl Zeiss gyártmányú, pásztázó kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal (Axio Examiner LSM 7 Carl Zeiss, Germany) végeztük, melynek fényforrása egy hangolható, nagy teljesítményű, impulzusütemű titán-zafír (Ti:S) szilárdtest lézer (*FemtoRose 100 TUN NoTouch, R&D Kft., Magyarország*). A lézeres besugarozáshoz használt beállításokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

| | Hullámhossz | Teljesítmény | Felbontás | Pixel Dwell Time | Átlagolás | Z-stack/Interval | Objektív |
|---|--------------|--------------|-------------|------------------|-----------|--------------------------|----------|
| 1. | Ti:S 750 nm | ~ 60 mW | 512 x 512 | 1,58 μ sec | 16 | 30 μ m/ 3 μ m | 20x W |
| 2. | Ti:S 750 nm | ~ 25 mW | 1024 x 1024 | 6,3 μ sec | 2 | 30 μ m/ 3 μ m | 20x W |
| 3. | Ti:S 800 nm | ~ 25 mW | 1024 x 1024 | 6,3 μ sec | 2 | 30 μ m/ 3 μ m | 20x W |
| 4. | Ti:S 1030 nm | ~ 25 mW | 1024 x 1024 | 6,3 μ sec | 2 | 30 μ m/ 3 μ m | 20x W |
| pozitív kontroll – UVB 312 nm – 1 J/cm ² – 20 perc | | | | | | | |

A fent ismertetett módszerhez hasonlóan az Yb szállézer biztonságtechnikai vizsgálatát is elvégeztük, ebben az esetben azonban a *FiberScope* tervezett működési

paramétereivel ekvivalens értékeket használtuk: 20x W objektív, 303 μm x 303 μm terület, 512 x 512 pixel felbontás, 25 μsec pixel dwell time, 6 mW mintára eső teljesítmény és 1030 nm hullámhossz. A mérés végén a levilágított bőrterületet kivágtuk, és formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk és hosszanti irányban metszettük – így a pozitív sejtek könnyebben visszakereshetők –, és elvégeztük az immunfluoreszcens jelölést. Pozitív kontrollként UVB-vel besugarazott (FS20T12-UVB-BP, Philips) egér hátbőrt használtunk.

Eredmények

1. Nanomedicinák bőrben történő penetrációjának nyomon követése *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával

Az *in vivo*CARS mérések során a problémával kellett szembesülnünk, hogy az epidermiszben jelen levő intracelluláris lipidekből illetve egyéb lipid-tartalmú sejtkomponensekből származó CARS jel az általunk vizsgálni kívánt DermaVir PEIm komponensével átfed. Ez a mérés szelektivitását jelentősen befolyásolta. A további mérések során a *FiberScope* ytterbium szállézerrel működő képalkotó eszköz segítségével egy korábbi munkánkhoz hasonlóan ismét sikeresen kimutattuk, hogy a DermaPrep-pel kezelt bőrben lévő Langerhans sejtek egy óra elteltével felveszik az

Alexa546-jelölt nanorészecskéket, és kirajzolják a bőrben lévő immunsejteket a készülék „piros” csatornáján.

2. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – genetikailag módosított, leptin deficiens ob/ob egereken vizsgálva

A kísérlet 4. hetétől *ad libitum* táplált leptin deficiens állatok tömege nagyon gyors növekedést mutatott, még a másik, szintén leptin deficiens, de kalória restrikción tartott egércsoport tömege a kontroll csoporttal hasonló volt. A 30. héten az *ad libitum* táplált ob/ob egerek tömege (átl. 63,35 g \pm 4,31 g) közel háromszorosára gyarapodott a kontroll (átl. 26,63 g \pm 4,12 g) és kalóriamegszorított (átl.: 30,33 g \pm 1,39 g) csoporthoz képest.

Az *in vivo* SHG mérések alkalmával az első három mérési időpontban még nem tapasztaltunk markáns különbséget a vizsgált három egércsoport egyedeinek kollagén szerkezetében. A negyedik mérési időpontban a kalóriamegszorított diétán tartott ob/ob egér bőrének kollagén szerkezete szabályos, rostokban gazdag, a kontroll állatéhoz hasonló volt, mind morfológiailag, mind SHG intenzitásban, ezzel ellentétben a normál diétán tartott ob/ob egér kollagén szerkezetére egy markáns degradáció volt jellemző, ami az SHG intenzitás jelentősen csökkenését okozta.

Az *ex vivo* CARS vizsgálatot a kísérlet végén a 30. héten végeztük, ekkor már csak a kontroll és ob/ob – ND csoport mintáit vizsgáltuk. Várakozásainknak megfelelően a kontroll csoport adipocita sejtjeihez képest az elhízott ob/ob – ND adipocita sejtjei szemmel láthatóan nagyobb kiterjedésűek voltak.

A szövettani értékelés során azt tapasztaltuk, hogy az elhízott egerek szubkután zsírsejtjeinek átlagos területe 2,5-szer nagyobb ($3678,06 \mu\text{m}^2 \pm 984,95 \mu\text{m}^2$) volt a kontroll csoport adipocitáinak méretéhez ($1429,1 \mu\text{m}^2 \pm 316,25 \mu\text{m}^2$) képest. A dermisz vastagsága ezzel szemben az ob/ob – ND csoportban közel másfélszeresére csökkent ($115,2 \mu\text{m} \pm 27,35 \mu\text{m}$) a kontroll csoporthoz képest ($210,42 \mu\text{m} \pm 8,4 \mu\text{m}$).

3. Metabolikus szindróma hatása a bőrre – különböző diéták tükrében

A magas zsírtartalmú diétán tartott egerek tömege már a 12. héttől kezdve szignifikánsan magasabb volt, a kontroll csoporthoz képest, míg a HFHF csoport egyedeinek a tömege lassabb, mérsékeltebb növekedést mutatott. A HFru csoport tömegének változása a kontroll csoportéval közel megegyezett.

Az SHG intenzitás értékek jellemzően a HFat és HFHF csoportban mutattak szignifikáns csökkenést a kontroll csoporthoz képest, már a második mérési időpontban. A HFru csoportra vonatkozó SHG intenzitás csak a 24. és

32. héten volt szignifikánsan alacsonyabb a kontrollhoz képest. A kollagén szerkezetének határozott degradációja főleg a HFat csoportban volt megfigyelhető, az elhízás mértékével arányosan. A HFru csoport egereinek kollagén szerkezete egy kevésbé drasztikus változáson ment keresztül, de a 32. hétre itt is megfigyelhető volt a kötőszöveti rostok mennyiségének csökkenése.

Az *ex vivo* CARS felvételek alapján megállapíthattuk, hogy a HFat és HFHF csoporthoz tartozó egerek szubkután zsírszöveti lényegesen nagyobb kiterjedésűek a HFru és kontroll csoporthoz képest.

A szövettani eredmények alapján a dermisz vastagsága a HFat ($120,15 \mu\text{m} \pm 14,56 \mu\text{m}$) és HFru ($141,23 \mu\text{m} \pm 12,65 \mu\text{m}$) csoportban szignifikánsan lecsökkent a kontroll csoporthoz képest ($155,58 \mu\text{m} \pm 12,36 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Az adipociták átlagos kerülete a HFat ($233,15 \mu\text{m} \pm 22,84 \mu\text{m}$) és HFHF ($219,63 \mu\text{m} \pm 21,84 \mu\text{m}$) csoportban szignifikánsan nagyobb kiterjedésű volt, mint a kontroll ($145,13 \mu\text{m} \pm 14,93 \mu\text{m}$) és HFru ($154,05 \mu\text{m} \pm 21,19 \mu\text{m}$) csoportban.

4. Biztonságtechnikai vizsgálatok eredményei

Eredményeink kiértékelése során 60 mW teljesítmény és 750 nm hullámhossz alkalmazása esetén csekély CPD-pozitívítást tapasztaltunk, melynek mennyisége és intenzitása jóval elmaradt a pozitív kontrollhoz képest. A 800 nm és 1030 nm-rel levilágított minták CPD-

negatívak voltak. A *FiberScope* működési paramétereivel megegyező, Yb szállézerrel besugarazott minta szintén CPD negatív volt. Termikus károsodást csak a bőr *in vivo* vizsgálatához (25-50 mW) használt teljesítmények többszörösével tudtunk elérni (100-130 mW). Yb szállézer használata közben nem tudtunk olyan mérési paramétereket beállítani, ahol kavitációt tapasztaltunk volna.

Következtetések

1. Az *in vivo* CARS módszer segítségével úgy gondoltuk, hogy a festékjelölés-mentes DermaVir oldat PEIm komponense nagy hatásfokkal gerjeszthető, így a nanomedicina önmagában azonosíthatóvá válik. A mérések során azonban az epidermiszben jelen levő intracelluláris lipidekből illetve egyéb lipid-tartalmú sejtkomponensekből származó CARS jel az általunk vizsgálni kívánt DermaVir PEIm komponensével átfedett, így a nanopartikulumokból származó CARS szignál nem volt elkülöníthető a többi alkotóelemből származó jeltől. A szállézer fényforrással működő *FiberScope* készülékkel azonban sikeresen azonosítani tudtuk a festékjelölt DermaVir részecskéket amint 1 óra elteltével kirajzolják a bőrben lévő Langerhans sejteket. Ezzel a kísérlettel a készülék használhatóságát demonstráltuk *in vivo* farmakológiai célokra.

2. A leptin deficiens egerek esetén az extrém elhízás a dermális kollagén degradációját, a szubkután adipociták megnagyobbodását, ezáltal a dermisz elvékonyodását okozzák, még a kalória restrikción tartott szintén leptin deficiens csoport egyednél ezeket a jelenségeket nem tapasztaltuk. Munkánk során elsőként sikerült nyomon követni *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS nemlineáris mikroszkópai módszerekkel az elhízás okozta kötőszöveti változásokat. Megfigyelésink a korábban molekuláris biológiai módszerekkel igazolt eredményekkel összhangban voltak.

3. A magas zsír és/vagy fruktóz tartalmú diéták szintén a dermális kollagén mennyiségének csökkenését, és fragmentációját okozzák, különösen a HFat csoportban ahol jelentős súlygyarapodás volt megfigyelhető. A 20% fruktóz tartalmú ivóvíz nem okozott jelentős testtömeg növekedést, de a kollagén degradációja szemmel látható volt. A HFHF csoportban pedig a dermisz vastagsága nem csökkent szignifikánsan, de strukturális változásokat itt is megfigyeltünk. Kísérletünkben ismét bebizonyítottuk, hogy a nemlineáris mikroszkópai módszerek alkalmasak a kötőszöveti változások *in vivo* és *ex vivo* képalkotó módszerrel való megközelítésére. Eredményeink továbbá felhívják a figyelmet a megfelelő táplálkozás és testsúly kontroll jelentőségére is.

4. Bizonyítottuk, hogy a nemlineáris mikroszkópiában használt nagy intenzitású, impulzus üzemű lézer fényforrások megfelelő beállítások mellett biztonságos képalkotást tesznek lehetővé, ezért alkalmas *in vivo* vizsgálatokra. Eredményeink összhangban voltak az irodalomban megjelent biztonságtechnikai vizsgálatokkal, melyek szintén azt a tényt erősítik meg, hogy a femtoszekundumos lézerek által okozott károsodások elhanyagolhatók.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

Kolonics A, Csiszovszki Zs, Tőke ER, Lőrincz O, **Haluszka D**, Szipőcs R. (2014)

In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. *Exp Dermatol*, 23(8): 596-605

Haluszka D, Lőrincz K, Csákányi A, Vass L, Krolopp Á, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál N. (2015)

Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában. *Bőrgyógy Ven Sz*, 91(1): 34-39

Haluszka D, Lőrincz K, Molnár G, Tamás G, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál NM. (2015)

In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit. *Microsc Res Tech*, 78(9):823-30

Az értekezés témájától független publikációk

Bognár P, Németh I, Mayer B, **Haluszka D**, Wikonkál NM, Ostorházi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pásztói M, Buzás EI, Szipócs R, Kolonics A, Temesvári E, Kárpáti S. (2013)

Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134(1): 105-11

Lőrincz K, Bánvölgyi A, **Haluszka D**, Keszeg A, Márton D, Kuroli E, Szipócs R, Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Kárpáti S, Wikonkál N. (2015)

Hosszú távú PUVA kezelés bőroregítő hatásának vizsgálata egereken. *Bőrgyógy Ven Sz* 91(1): 18-22