

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szemészeti Klinikájának
(igazgató: Berta András egyetemi tanár)¹ és Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének
(igazgató: Damjanovich Sándor egyetemi tanár, akadémikus)² közleménye

Új vizsgálómódszer a szemészeti alapkutatásban: az atomerő-mikroszkópia

MÓDIS LÁSZLÓ,¹ NAGY PÉTER,² BISTEY TAMÁS,² JENEI ATTILA²

Célkitűzés: Az atomerő-mikroszkóp (AFM=atomic force microscope) bemutatása. Kemény kontaktlencse felszínének vizsgálata viselés előtt és után.

Módszerek: Hat új és hat, betegek által komplikációmentesen viselt rigid polimetilmetakrilát (PMMA) kontaktlencsét vizsgáltunk AFM-mel. A méréseket a lencsék centrális felszínén végeztük, minden lencse esetében 15 különböző pontban.

Eredmények: A viseletlen kontaktlencsék sima, egyenletes felszínt mutattak. A felületükön lévő barázdák átlagos mélysége 28,6 nm (SD=13,3) volt. A használt lencséken hasonló szerkezetű és mélységű (30,8 nm, SD=12,7) barázdák voltak láthatók. Ezeken a lencséken diszkrét, gömb és ovális alakú objektumokat mutattunk ki, átlagosan 351,4 nm (SD=171,2) átmérővel és 45 nm (SD=16,6) magassággal.

Következtetések: Az AFM-mel természetes közegükben nagy felbontású képek nyerhetők kemény kontaktlencse felszínéről, melyeken a felszíni struktúrák magassága nanométeres pontossággal meghatározható. A használt PMMA lencsék felszínén az általunk észlelt depozitumok magassága lényegesen kisebb volt annál, mint amit lágy kontaktlencsénél megfigyeltek. Az AFM nagymértékben elősegíti a lerakódások pontosabb elemzését és fontos szerepet kaphat az ideális kontaktlencse kifejlesztésében is.

Kulcsszavak: atomerő-mikroszkóp, kontaktlencse, felszíni depozitumok

NEW METHOD IN BASIC OPHTHALMIC RESEARCH: ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Aim: To describe the atomic force microscope (AFM). To analyze surfaces of unworn and worn hard contact lenses.

Methods: Six new and six used polymethylmethacrylate (PMMA) contact lenses after uncomplicated wear were studied by AFM. Measurements were taken on the central surfaces of the lenses on 15 different points in each case.

Results: The unworn contact lenses disclosed smooth and even surface. The main depth of the surface grooves was 28.6 nm (SD=13.3). The worn lenses showed similar grooves in structure and depth (30.8 nm, SD=12.7). Discrete, round- and oval-shaped objects were present on the surface of these lenses, generally 351.4 nm (SD=171.2) in diameter and 45 nm (SD=16.6) in height.

Conclusions: The AFM is capable for providing high resolution images on hard contact lens surfaces in their natural environment. The height of topographical structures can be determined with nanometer accuracy. The height of the surface deposits on PMMA lenses measured in this study was much less than those observed on soft contact lens surfaces. AFM is of great help in more precise analysis of the deposits and may also be important in developing the ideal contact lens.

Keywords: atomic force microscope, contact lens, surface deposits

A biológiai minták hagyományosnak mondható mikroszkópokkal való vizsgálhatóságának korlátja Abbe óta (1873) jól ismert: különböző sugarak (pl. fény) fókuszálása során az adott sugárzás hullámhosszának felénél kisebb objektumok a vizsgáló számára láthatatlanokká válnak. Ezt a gátat értelemszerűen sem az elektron-, sem a lézersugár segítségével működő mikroszkópok nem léphették át. Az Abbe-korlát megkerülésére egy évszázadot kellett várni. A nyolcvanas években kisméretű apertúrák és a piezoelektromos vezérlés alkalmazásával megépítették az első, összefoglaló néven pásztázó szondás mikroszkópokat (scanning force [probe] microscopes).⁴

Ezen új mikroszkópcsalád első példánya a pásztázó alagút-mikroszkóp volt. A vizsgálat során a mikroszkóp he-

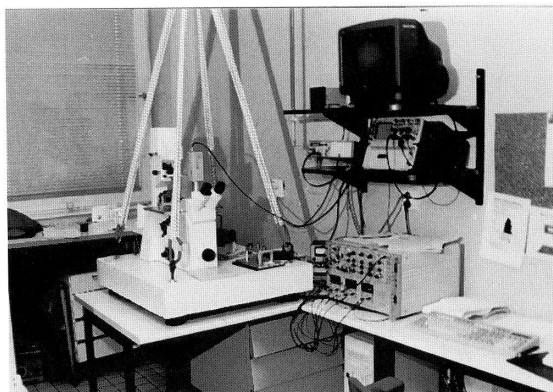
gye és a minta közé feszültséget kapcsolnak. A hegy atomi méretű csúcsának és a minta felszínének elektronfelhője átfedve egymást alagútáramot kelt. Piezoelektromos mintavezérléssel az alagútáram váltakozásából a felszínről háromdimenziós topográfiai kép nyerhető, közel nanométeres felbontásban.

Ennek a mikroszkópnak nagy hátránya, hogy segítségével csak elektromosan vezető anyagok vizsgálhatók, ezért a biológiai preparátumok vizsgálata igen korlátozott. Ennek kiküszöbölésére és a felbontás további növelésére fejlesztették ki az atomerő-mikroszkópot (AFM=atomic force microscope), amely a kilencvenes évektől kereskedelmi forgalomban is kapható.

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében 1994-től áll rendelkezésre AFM, amelyet a Twente-i Egyetemen készítettek (Applied Optics Group, University of Twente, Twente, Hollandia) (1. ábra). Ezen új mikroszkóp működési elvét, előnyeit, hátrányait, szemészeti alapkutatásban való felhasználhatóságát kívánjuk bemutatni. Tanulmányunkban ehhez új és használt kemény (rigid) kontaktlencsét használtunk, azok felszíni sajátságait vizsgáltuk és hasonlítottuk össze.

Módszerek

A mikroszkóp felépítése és működési elve egyszerűsítve a következő. Egy fém vizsgálókar végén egy piramis alakú szilícium-nitridből készült atomi méretű hegygel tapogatja le a minta felszínét. Ennek során a vizsgálandó anyag és a tű között atomok közötti kontaktus, az elektronfelhők közötti taszítás alakul ki (és nem alagútáram). Ez az interakció a vizsgálókar elhajlását okozza a vizsgálat során (egyszerűsítve úgy szemléltethető, mint egy hagyományos lemezjátászó működése). A kar elhajlása optikai módszerekkel, lézersugár segítségével detektálható. A lézerfény érzékelése egy kvadránsdiódával történik, amely egy visszacsatoló rendszerrel is összeköttetésben áll (2. ábra). Ezen utóbbi rendszer a lézerfény elhajlásakor egy piezoelektromos vezérlőt hoz működésbe, amely a mintát nemcsak az x, y, hanem a z tengely mentén is mozgatja úgy, hogy a kar elhajlása állandó maradjon. Ezáltal – optikai lencsék kihagyásával – atomi felbontásban térképezhető fel, többek között, a biológiai minták felszíne. A minták száraz és nedves közegben is vizsgálhatók. A vizes közeg segítségével csökkenthetők a szennyeződések okozta műtermékek és az adhéziós erők által okozott nem kívánt mellékhatások. A jel képpé alakítása után a mikroszkóp saját szoftvere segítségével különböző mérések (pl. kerület, terület, átmérő, képanalízis) végezhetőek.⁹

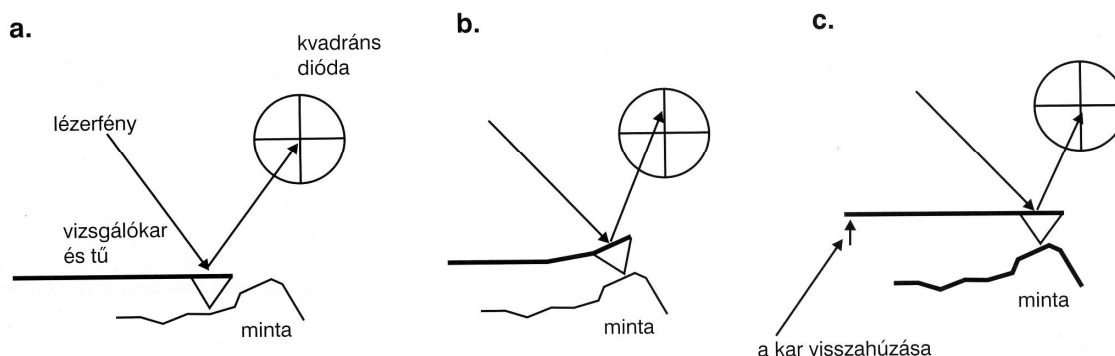


1. ábra. A Biofizika Intézetben működő AFM

Tanulmányunkban hat új és hat használt rigid polimetilmetakrilát (PMMA) kontaktlencsét vizsgáltunk AFM-mel, száraz közegben. A méréseket a lencsék centrális részén végeztük, minden lencse esetében 15 különböző pontban. A lencsék a Györfly által kifejlesztett préselési technikával készültek a Semmelweis Egyetem I. sz. Szemészeti Klinika Kontaktlencse Laboratóriumában. Az újonnan készített lencsék nem kerültek illesztésre, páciensek szemével nem érintkeztek. A használt lencsét a betegek különböző fénytörési hibák miatt komplikációmentesen viselték. A viselési periódus leteltével (átlagosan 1 év), rutinszerű lencsecseré után a kontaktlencsét új tároló dobozba helyezve kaptuk vizsgálatra, szintén a fenti intézettől. A lencsét szélükön csipesszel megfogva helyeztük az AFM vizsgálóasztalára és kezdtük meg a méréseket.

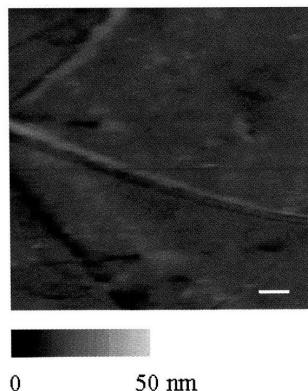
Eredmények

Az új, használatra még nem került kontaktlencsék sima, egyenes felszínt mutattak. A felületükön csak a készítés-



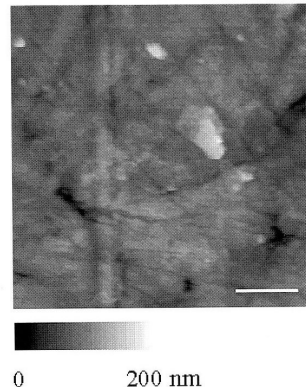
2. ábra. Az AFM működését bemutató egyszerűsített, vázlatos rajz.

- A tű hegye és a minta között atomi kontaktus alakul ki. A tű felszínéről visszaverődő lézerfény a kvadránsdióda közepére jut.
- A tű felszíni akadályba ütközik, ezért meghajlik. A meghajlás következtében a tű felszínéről visszaverődő lézerfény nem a kvadránsdióda közepére jut.
- A visszacsatoló elektronika addig távolítja el a tűt a minta felszínétől, ameddig a lézerfény ismét a kvadránsdióda közepére jut. A tű visszahúzásának mértéke nanométeres pontossággal megadja a felszíni objektum magasságát



3. ábra. Használatlan kemény kontaktlencse felszíne, jól látható barázdával.

A kép a kontaktlencse $10 \times 10 \mu\text{m}$ -es részletét ábrázolja 500×500 pixeles feloldásban. Az ábrán látható fehér vonal hossza $1 \mu\text{m}$. A képen a felszíni egyenetlenségek magassága a feltüntetett skálának megfelelően lett kódolva



4. ábra. Használt kemény kontaktlencse felszíne barázdákkal és depozitumokkal.

A kép a kontaktlencse $5 \times 5 \mu\text{m}$ -es részletét ábrázolja 500×500 pixeles feloldásban. Az ábrán látható fehér vonal hossza ebben az esetben is $1 \mu\text{m}$

ből, megmunkálásból származó barázdák voltak kimutathatóak (3. ábra). A barázdák átlagos mélysége $28,6 \text{ nm}$ ($\text{SD}=13,3$) volt. A lencsék felszínén lerakódások nem voltak.

A használt, betegek által viselt lencséken ugyancsak jelen voltak a préselési barázdák, amelyek átlagosan hasonló mélységűek voltak ($30,8 \text{ nm}$, $\text{SD}=12,7$), mint az új lencséken és közöttük szignifikáns különbség nem volt ($p=0,39$; kétmintás t-próba). A használt lencséken azonban körülrít, diszkrét, gömb és ovális alakú objektumok voltak láthatóak (4. ábra). Ezen depozitumok átlagos átmérője $351,4 \text{ nm}$ ($\text{SD}=171,2$), z tengely irányú magassága pedig 45 nm ($\text{SD}=16,6$) volt.

Megbeszélés

A pásztázó szondás mikroszkópok családjába tartozó, az optikát nélkülöző atomerő-mikroszkóppal kemény kontaktlencse felszínét jól vizsgálhatók. Ezen mikroszkópok közös jellemzője, hogy minimális mintaelőkészítés után nagy felbontású topográfiai képet adnak a preparátum felszínéről.^{1,2,3,6,9} A vizsgálatok során az atomi szerveződés szintjén nyerhető kép olyan módon, hogy a minta természetes közegében, a natívhoz közeli állapotban kerül megfigyelésre, elhanyagolható szerkezetváltozással.^{1,2,3,6,9} A felbontás mellett ez az AFM másik nagy előnye.

A pásztázó (scanning) elektronmikroszkóppal (SEM) való vizsgálat során a minta nem természetes közegében kerül vizsgálatra, sok, szerkezetet roncsoló előkészítésen megy át, mint pl. vákuumozás, ezüst-, aranyfüsttel való bevonás. Ezek miatt a SEM kontaktlencsefelszínének vizsgálatára nem alkalmas, nem lehet elkülöníteni, hogy a látott kép valódi elváltozás vagy csak műtermék.⁷ Ezzel szemben megemlítendő, hogy az AFM nagyságrendekkel drágább, mint az elektronmikroszkóp és használata nagy szakértelmet kíván.

Az AFM-mel végzett kontaktlencsefelszíni vizsgálatok és közlések száma igen kevés és azok is kizárólag lágy lencséről szólnak.^{1,2,3} Új, viseletlen lágy lencse (Essilor, Essilor International, Franciaország) felszínén az előállítástól származó, átlagosan $50\text{--}150 \text{ nm}$ mélységű és magasságú felszíni egyenetlenséget figyeltek meg.² Az általunk vizsgált, teljesen más eljárással előállított kemény PMMA lencséken a préselési barázdák mind az új, mind a már betegek által használt lencséken egyaránt 30 nm között változott. Ez az adat azt is jelzi, hogy normális lencseváltási periódusban a lencsék felszíne nem károsodott. Ugyanakkor ismert, hogy a PMMA lencsék felszínén már néhány hónapos viselés után esetenként szabad szemmel, de réslámpával mindenképpen látható karcolások alakulnak ki. Mivel hasonló szerkezetű és mélységű barázdákat mutattunk ki a használt és használatlan lencséken, valószínű, hogy az AFM tüje ezeket az elváltozásokat elkerülte.

Eseteinkben a használt lencsék felszínén diszkrét, átlagosan $351,4 \text{ nm}$ átmérőjű és 45 nm magasságú depozitumok voltak jelen. Ugyancsak betegek által viselt lencséken (Essilor) a saját megfigyeléseinkkel hasonló szerkezetű lerakódásokat mutattak ki AFM-mel.¹ Ezek az irreguláris diszkrét objektumok átlagosan $190\text{--}375 \text{ nm}$ közötti magasságúak voltak és ezt II-es típusú depozitumnak nevezték el. Ezenkívül a lencsék felszínét vékonyan és egyenletesen borító $7,5\text{--}136,5 \text{ nm}$ vastagságú réteg is jelen volt (I-es depozitum). Saját méréseink szerint a használt PMMA lencsék felszínén ilyen lerakódás nem volt kimutatható. Gélelektroforézissel a depozitumok összetételét illetően különböző könnyfehérjék jelenlétét igazolták, a II-es típusban mukoprotein-túlsúllyal.¹ A kontaktlencsefelszínén ezenkívül lerakódhatnak lipidek, mucinok, valamint különböző mikroorganizmusokból és ásványi anyagokból álló depozitumok. Az általunk kimutatott lerakódások azonban mind méretükben mind morfológiájukban a II-es depozitumokhoz voltak hasonlatosak.

A használatlan Acuvue (Vistakon, USA) és NewVues (CIBAvision, USA) lágy kontaktlencsék sima felszínét mu-

tattak, az előállításkor keletkezett pórusok mélysége AFM-mel mérve 100 és 200 nm között változott.³ Hasonló elváltozásokat mutattak a Surevue (Vistakon, USA) és SeeQuence (Bausch & Lomb, USA) lágy lencsék is.³ Viselés után, normális lencseváltási periódust követően egyetlen lencsefelszínt figyeltek meg, mind a négy lencse esetében átlagosan 1000 nm körüli depozitummagasságokkal. A morfológiai elváltozások Surevue és SeeQuence lencsék esetében kifejezettebbek voltak. A használt lágy kontaktlencséken lévő depozitumok tehát sokkal jobban kiemelkedtek a lencse felszínéről, mint a saját PMMA lencséink esetében. Átmérőre vonatkozó adatok az említett forrásokban nem szerepelnek.

A lerakódások kialakulását elősegítheti a nem megfelelő illesztés, a lencse és a tárolódoboz szakszerűtlen tisztítása, a higiénés szabályok be nem tartása; befolyásolhatja a könny minősége, összetétele, pH-ja és a kontaktlencse anyaga.^{3,5} A kemény (elsősorban gázpermeábilis) lencséken kevesebb depozitum rakódik le, és azok általában egy tisztítás alkalmával eltávolíthatóak, ellentétben a lágy lencsékkel.^{8,10}

Az ideális kontaktlencse anyaga kiváló oxigénáteresztő, megfelelő mértékben nedvesedő, felszínén depozitumok minimális mennyiségben, míg baktériumok egyáltalán nem rakódnak le.³ Az AFM-mel végzett kísérletek és tanulmányok kifejezetten elősegítik ezen törekvések megvalósítását. Valószínűleg az AFM a szemészeti alapkutatások más területein is nélkülözhetetlen szerepet kap a jövőben, mint pl. a kollagénszálak finomabb szerkezetének vizsgálata.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Dr. Nádray Ágnes adjunktusnőnek és a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar I. sz. Szemészeti Klinika Kontaktlencse Laboratórium dolgozóinak, amiért a lencséket rendelkezésükre bocsátották.

Irodalom

1. Baguet J., Sommer F., Claudon-Eyl V., Duc T.M.: Characterization of lacrymal component accumulation on worn soft contact lens surfaces by atomic force microscopy. *Biomaterials* 16, 3–9 (1995).
2. Baguet J., Sommer F., Duc T.M.: Imaging surfaces of hydrophilic contact lenses with the atomic force microscope. *Biomaterials* 14, 279–284 (1993).
3. Bhatia S., Goldberg E.P., Enns J.B.: Examination of contact lens surfaces by Atomic Force Microscope (AFM). *CLAO J* 23, 264–269 (1997).
4. Binning G., Quate C., Gerber C.: Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56, 930–933 (1986).
5. Boot N., Kok J., Kijlstra A.: The role of tears in preventing protein deposition on contact lenses. *Curr Eye Res* 8, 185–188 (1989).
6. Damjanovich S., Vereb Gy., Schaper A., Jenei A., Matkó J., Starink J.P., Fox G.Q., Arndt-Jovin D.J., Jovin T.M.: Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1122–1126 (1995).
7. Deg J.K., Binder P.S.: Electron microscopic features of never-worn soft contact lenses: deposits or artifacts? *Curr Eye Res* 5, 27–36 (1986).
8. Fowler S.A., Korb D.R., Finnemore V.M., Allansmith M.R.: Surface deposits on worn hard contact lenses. *Arch Ophthalmol* 102, 757–759 (1984).
9. Fullwood N.J., Hammiche A., Pollock H.M., Hourston D.J., Song M.: Atomic force microscopy of the cornea and sclera. *Curr Eye Res* 14, 529–535 (1995).
10. Key J.E. 2d: Are hard lenses superior to soft? Arguments in favor of hard lenses. *Cornea* 9(Suppl1), S9–11; discussion S151 (1990).

A szerző levelezési címe: Dr. Módos László
 Debreceni Egyetem OEC, Szemészeti Klinika
 4012 Debrecen, Nagyterdei krt. 98
 E-mail: lmodos@dragon.klte.hu