Malária diagnózisa mágnesesen indukált lineáris dikroizmus révén

Diplomamunka

2012

Butykai Ádám

fizikus hallgató Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

témavezető:

dr. Kézsmárki István

egyetemi docens BME Fizika Tanszék



Nyilatkozat az önálló munkáról

Alulírott, *Butykai Ádám*, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem hallgatója, büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és sajátkezű aláírásommal igazolom, hogy ezt az Msc szakdolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem az általam elvégzett kutatómunka alapján, a felhasznált források egyértelmű megjelölésével.

Budapest, 2012. május 31.

Butykai Ádám

Tartalomjegyzék

1.	A kutatás motivációja				
2.	A m 2.1. 2.2. 2.3. 2.4.	alária diagnosztizálásának lehetősége optikai úton A malária A malária pigment tulajdonságai Kapcsolódó irodalmi eredmények Továbblépés lehetősége a diagnosztika felé	4 4 6 10 10		
3.	A lineáris kettőstörés és dikroizmus spektroszkópia alapjai				
	 3.1. 3.2. 3.3. 	A lineáris dikroizmus jelensége	13 16 19		
4.	A polarizációs spektrométer				
	4.1.	A spektrométer felépítése	23		
	4.2.	A lineáris dikroizmus mértékének kalibrációja	25		
	4.3.	A fotoelektron sokszorozó érzékenységének szabályozása	26		
5.	Eredmények bemutatása és diszkussziója				
	5.1.	Hemozoin szuszpenziók lineáris dikroizmus spektruma	28		
	5.2.	Az effektus mágneses tértől való függése	29		
	5.3.	Az optikai anizotrópia hullámhosszfüggésének mérése	35		
	5.4.	Vérben szuszpendált kristályok vizsgálata	36		
6.	Út a diagnosztika felé				
	6.1.	Mágneses moduláció lehetősége	39		
	6.2.	A forgó mágneses elrendezés	42		
	6.3.	Mérési eredmények, a berendezés érzékenysége	44		
7.	7. Eredmények, jövőbeni tervek				
Fü	ggelé	k	50		
Irc	Irodalomjegyzék				

1. fejezet

A kutatás motivációja

A malária fertőzés ma is népbetegségnek számít Afrikában, Ázsiában és Dél-Amerikában. Ezt bizonyítja a tény, hogy évente mintegy 300 millió megbetegedést regisztrálnak, melyből hozzávetőleg 1 millió halálos kimenetelű [1]. A globális felmelegedés következtében az érintett területek száma növekszik: a dél-európai régió veszélyeztetetté vált és hazánkban is több helyen találtak már malária szúnyogot [2]. A malária kórokozók gyógyszerekkel szembeni egyre növekvő immunitása miatt a megbízható diagnózis létfontosságú. A fejlődő országokban azonban a ma használatos diagnosztikai technikák rendszerint túl költségesek, kis érzékenységűek, vagy megfelelő orvosi szakértelem hiányában nem kivitelezhetőek. Ezért nagy számban lépnek fel rosszul diagnosztizált esetek, melyek súlyos következményekkel járnak.

Kutatásom során egy alternatív, széles körben alkalmazható optikai diagnosztikai eljárás lehetőségét vizsgáltam, mely a malária vérben felhalmozódó melléktermékének, az ún. hemozoin kristályoknak (közismert néven malária pigmentnek) megjelenését mutatná ki. Mivel ezen szerves molekulakristályok csak a maláriával fertőzött egyének vérében találhatók meg, és koncentrációjuk a fertőzés előrehaladásával egyre növekszik, így megfelelő célpontot nyújthatnak a malária diagnózisban. A hemozoin kristályok tulajdonságai – kristálytani, illetve morfológiai anizotrópiájuk következtében fellépő lineáris dikroizmus, valamint a bennük lévő vas ionok magas spinű állapotából fakadó paramágneses viselkedés – felvetik a magneto-optikai méréstechnikával történő detektálás lehetőségét.

Részt vettem egy lineáris és cirkuláris dikroizmus széles spektrumú mérésére alkalmas kísérleti berendezés összeállításában. A tipikusan mikronos méretű – szintetikus úton előállított – hemozoin kristályokból vízes szuszpenziót készítettem, és megmértem a mágneses tér által indukált lineáris dikroizmusát a közeli infravöröstől az ultraibolya tartományig (λ =1300-170nm). A karakteres spektrális viselkedés mellett azt tapasztaltam, hogy az effektus arányos a hemozoin koncentrációval és specifikus mágneses tér függést mutat. Eredményeim megerősítik egy magneto-optikai elven működő nagy érzékenységű diagnosztikai eszköz kifejlesztésének lehetőségét, melynek pontossága megközelíti a laboratóriumi méréseim szintjét. Az eszköz prototípusának megépítése jövőbeni terveim között szerepel.

2. fejezet

A malária diagnosztizálásának lehetősége optikai úton

2.1. A malária

A malária fertőzés kiváltói az emberben a Plasmodium nemének öt különböző fajába sorolt parazita egysejtűk. Ezek közül a legveszélyesebb a Plasmodium falciparum. A Plasmodium vivax, Plasmodium ovale és Plasmodium malariae enyhébb lefolyású megbetegedéseket okoznak és általában nem halálosak. A Plasmodium knowlesi, mely a makákókról terjedhet át emberekre, elsősorban dél-kelet Ázsiában jellemző. A malária fertőzést a főként trópusi éghajlaton honos Anopheles szúnyog nőstény egyedei terjesztik, melyek elsődleges gazdatestet biztosítanak a malária kórokozóknak. A paraziták a szúnyog testében fejlődnek és szaporodnak, majd az újabb fertőzésre képes malária sporozoiták egy következő szúnyogcsípés során az emberi véráramba kerülnek. A sporozoiták – még mielőtt az immunrendszer képes lenne őket antitesttel elpusztítani – 5-10 percen belül eljutnak a májba, és megtámadják a májsejteket. A májon belül gyors szaporodásba kezdenek, és a májsejtek pusztulása közben több millió ún. merozoitát juttatnak újra a vérkeringésbe. Ezek a vörösvértesteket célozzák meg, ahol aszexuális úton tovább szaporodnak, közben megemésztve a hemoglobin fehérjeszerkezetének nagy részét. Csupán ekkor tapasztalhatók a betegség első tünetei. Periodikus időközönként a merozoiták kitörnek a gazdatestjeikből, és új sejteket támadnak meg. Ez a periodicitás, melyet nyomon követhetünk a (2.1) ábrán, jelentkezik a betegség tüneteiben is: a fertőzést ugyanis ciklikusan fellépő, 4-6 órán át tartó magas láz kíséri, ezért a maláriát gyakran váltóláznak is nevezik. További tünetek a fejfájás, fáradékonyság, izületi fájdalmak, komolyabb esetekben a fertőzés kómához, halálhoz vezethet. A vörösvértestekben lévő merozoiták egy része szexuális stádiumba jut, melyek alkalmasak újabb szúnyogok megfertőzésére, ily módon a betegség továbbterjesztésére.

A malária diagnosztizálására jelenleg több eljárás is használatos [3]. A fejlődő országokban azonban, ahol a megfelelő laboratóriumi körülmények nem adottak, a legelterjedtebb módszer ma is a pusztán tünetek alapján történő diagnózis. Legtöbbször a beteg testhőmérsékletének



2.1. ábra. A malária életciklusai. 1. A maláriával fertőzött szúnyog csípése révén a sporozoiták bekerülnek a véráramba. 2. A paraziták a májban szaporodnak és ún. merozoitákat képeznek. 3. A merozoiták kitörnek a véráramba és megemésztik a vörösvértesteket, majd periodikus időközönként újakat támadnak meg. 4. A vörösvértestekben való szaporodás során újabb ivaros paraziták (gameociták) is keletkeznek, melyek a véráramba kerülnek. 5. Egy újabb szúnyogcsípés során a gameociták a szúnyog testébe kerülnek, amely továbbterjeszti a fertőzést.

időbeli változását figyelik, és az alapján következtetnek a betegségre, számos esetben hibásan. Ezen tüneti diagnózis pontossága csupán mintegy 20%-ra becsülhető.

A legmegbízhatóbb eljárás a betegtől vett vérminta fénymikroszkópos elemzése. A paraziták egyes fajtái felismerhetőek a vérben, valamint egymástól is jól megkülönböztethetők. Nagyobb térfogatú vérminta vizsgálatakor a fertőzöttség könnyebben és pontosabban megállapítható, de a plazmódium fajta csak vékonyabb filmréteg elemzésével ismerhető fel. Egy képzett szakember képes 0,0001%-os parazitémiát is detektálni, ami már a megbetegedés korai stádiumának megállapítására is alkalmas. A parazitémia szintje a fertőzött vörösvértestek számarányát jelenti. A fenti szám átlagosan 5 parazitát jelent 1µl vérben, ez a hemozoin koncentrációra nézve $c = 0,003\mu g/ml$ [3]. Sajnos a megfelelő infrastruktúra és szakértelem hiányában ezen módszer éppen az érintett régiókban nem terjedt el.

Léteznek – a fenti módszerrel szemben – könnyen elérhető, kereskedelmi forgalomban kapható maláriát diagnosztizáló tesztek. Ezek antigén segítségével mutatják ki a fertőzést egy csepp vérben, melyet a beteg magától vesz. A teszt eredménye kb. 15-20 perc alatt jelenik meg olyan formában, hogy azt egy nem hozzáértő is értelmezni tudja. A hátránya a módszernek, hogy a kimutatás küszöbszintje sokkal magasabbra, kb. 0,002%-os parazitémiára tehető (azaz $c = 0,06\mu g/ml$, vagy 100 fertőzött vörösvértest $1\mu l$ vérben). A teszt továbbá csak a malária fertőzöttség létét tudja kimutatni, annak előrehaladottságát nem. Ezen ún. gyors malária diagnosztikai tesztek (MRDT), bár könnyen megvásárolhatóak, áruk még mindig túl magasnak számít a szegényebb területeken. Jelenleg többféle maláriát megelőző, illetve gyógyító készítmény van forgalomban, azonban a védőoltás kifejlesztése még várat magára (az a malária elleni oltás, melyet a veszélyeztetett régióba utazva kapunk, nem alakít ki immunitást, csak rövidtávú védelmet biztosít) [6]. Ezen gyógyszerek sajnos nem minden esetben hatékonyak, köszönhetően a paraziták egyre növekvő toleranciájának. Ennél fogva a helyes diagnózis különös fontossággal bír, ugyanis a gyógyszerek túlzott, illetve felesleges használata nemcsak költséges, de a kórokozók rájuk való immunitásának kialakulásához, ezáltal potenciálisan tényleges megbetegedéshez vezethetnek [5].

A továbbiakban egy alternatív diagnosztizálási módszer alkalmazásának lehetőségét vizsgálom meg, mely a fertőzési mechanizmus során keletkező hemozoin optikai úton történő kimutatására irányul.

2.2. A malária pigment tulajdonságai

A malária fertőzés egy speciális mellékterméke a fertőzött vérében felhalmozódó ún. hemozoin, közismertebb nevén malária pigment. Ezen tűszerű kristályok kialakulása a parazitáknak köszönhető. A hemoglobin megemésztése során ugyanis a heme-komponensből (Fe^{II} protoporphyrin) monomerikus α -hematin (Fe^{III} -protoporphyrin) molekulák szabadulnak fel, melyek – nagy reakciókésszégüknél fogva – toxikusak a parazitákra nézve. A kórokozók képesek ezen molekulákat kémiailag közömbös hemozoinná (β -hematinná) alakítani, melyek a vérben oldhatatlan kristályokként csapódnak ki. Az α -heamatin egy heterogyűrűs molekula (porphyrin gyűrű), melynek központi eleme egy Fe^{3+} ion (2.2 a ábra).

Hemozoin képződésekor a porphyrin gyűrűk dimereket alkotnak a központi vas ion és a szomszédos molekula oldalláncának oxigén atomja között létrejövő kötések kialakításával (2.2 *b*, *c*, *d* ábra). Ezek a dimerek hidrogén kötések révén polimerizálódnak [7]. Az összekapcsolódott dimerek egy alacsony szimmetriájú, triklinikus kristályszerkezetet képeznek. Ezek a hosszúkás, tűszerű kristályok egyenként kb. 5-10 millió heme molekulát tartalmaznak [8]. A különböző plazmódium fajok által előállított hemozoin kristályok szerkezete azonos, morfológiájuk azonban kis mértékben eltérő, mint ahogy a 2.3 ábrán bemutatott elektronmikroszkópos felvételeken is látható. Egy-egy hemozoin kristály tipikus mérete kb. $100x100x500nm^3$, azaz egyik irányban jelentősen nagyobb kiterjedésűek, mint a másik kettőben (ezen hozzávetőleges értékek a kristályok nem teljesen homogén méreteloszlása, valamint a kristályok növekedési környezetétől függő morfológia miatt egy vizsgált kristályhalmaz esetén akár 50%-os szórást is mutathatnak). Az egy darab β -hematint tartalmazó elemi cella méretei: a = 1, 22nm, b = 1, 468nm és c = 0, 804nm, $\alpha = 90, 22^{\circ}$, $\beta = 96.80^{\circ}$ és $\gamma = 97, 92^{\circ}$ [9]. Az elemi cella térfogata tehát kb. $V_{ec} = 1, 4nm^3$. A β -hematin moláris tömege M = 1303, 88g/mol.

Ez az alakbeli és kristályszerkezeti anizotrópia hatással van a kristályok optikai tulajdonságaira és jelentős polarizációs effektust eredményezhet. Egyrészt megnyilvánulhat, mint lineáris dikroizmus, illetve kettőstörés, azaz a fény elnyelődése és törése polarizáció függővé válik. Másrészt, mivel a kristály méretei összemérhetőek a látható fény hullámhosszával, polarizáció-



2.2. ábra. a) Porphyrin gyűrű, központjában Fe^{3+} ionnal. b) Hematin dimerek képződése egy központi vas ion és a szomszédos molekula oldalláncán lévő oxigén összekapcsolódásával. c) A dimerek három dimenziós kristállyá való polimerizálódása hidrogén híd kialakításával. d) Hemozoin kristály három dimendziós szerkezete [8]. Az [131] kristálysík, amlely hozzávetőleg párhuzamos a hematin gyűrűkkel, a lap síkjában van.

függő fényszórást is várunk. Ez a három polarizációs effektus keveredik, de a következőkben az egyszerűség kedvéért lineáris dikroizmusként tekintek a jelenségre. Az egyes effektusok elkülönítése későbbi terveim része. Erre például a mérőberendezésben a minta után elhelyezett gyűjtőlencse numerikus apertúrájának változtatásával lehet következtetni. Ha a jelenségben a fényszórás dominál, akkor a numerikus apertúra növelésével csökken az észlelt polarizációs effektus mértéke.

A hemozoin kristályok másik jellegzetessége, hogy a hematin molekulák központjában lévő vas ion magas spínű (S = 5/2), paramágneses állapotban található. Ezt a hemozoinon mért ESR és Mössbauer spektrumok finomszerkezetének vizsgálatával állapították meg [10]. Az alacsony szimmetriájú kristályszerkezet következtében, illetve kis méretük és hosszúkás alakjuk miatt feltételezhető, hogy a hemozoin kristályok mágneses anizotrópiát is mutatnak, azaz a paramágneses szuszceptibilitásuk eltér a kristály különböző tengelyei mentén. Ennek következménye, hogy létezik egy ún. könnyű mágnesezési tengely, melynek irányában álló külső térrel mágnesezve az anyagot, nagyobb mágnesezettség érhető el, mint más irányokban. Ezért, ha egy szuszpenzióban (pl. a vérben) a hemozoin kristályok szabadon elfordulhatnak, akkor az energiaminimumra való törekvés révén – egy külső mágneses tér bekapcsolása után – igyekeznek a könnyű mágnesezési tengelyükkel a tér iránya felé fordulni. A rendeződés mértékét a mágneses tér erőssége, valamint az ezt a rendet szétverni igyekvő fluktuációk (hőmozgás) nagysága határozza meg.



2.3. ábra. Különböző Plazmódium fajtáktól származó hemozoin kristályok elektronmikroszkópos képe [8]. A: szintetikus úton előállított β -hematin, B: hemozoin P.falciparumból, C: P.ovaleból, D: P.vivaxból, E: P.malariaeből, F:P.brasilianumból, G: P.knowlesiből, H: P.yoleiiből. A méretskálát jelölö fehér szakaszok egységesen 200nm hosszúak.

Ha tehát külső mágneses térrel egy irányba rendezzük a kettőstörő hemozoin kristályokat a szuszpenzióban, akkor várhatóan a koncentrációval arányos dikroizmus lép fel. Ez lehetőséget biztosít arra, hogy egy fénynyalábot átbocsátva az szuszpenzión, megmérjük annak mágnesesen indukált lineáris dikroizmus (LD) spektrumát. Mivel a vérben kizárólag a hemozoin bír a fenti jellegzetes tulajdonságokkal – azaz nincs más olyan véralkotó, mely mágnesesen indukált lineáris dikroizmust mutatna –, a módszer alkalmas lehet a hemozoin kimutatására és koncentrációjának mérésére, ezáltal a malária diagnosztizálására.

Mivel a hemozoin kialakulása a paraziták túléléséhez szükséges, a ma használatos malária elleni gyógyszerek (főként klorokvin és kinin) legtöbbször a hemozoin képződését gátolják a hematin molekulák kötő gyökeihez való kapcsolódás révén [4]. A P.falciparum azonban – mutáció következtében – egyre növekvő területen mutat immunitást ezen gyógyszerekre [5]. Ezt a folyamatot fokozza a gyógyszerek túlzott mértékű, vagy hibás diagnózis után felírt szedése. A helyes diagnózis tehát létfontosságú a malária elleni védekezésben.

Kutatásaimhoz szintetikus úton előállított β -hematin kristályokat vizsgáltam, mely legtöbb tulajdonságát (összetétel, szerkezet, mágnesség) tekintve azonos a hemozoinnal [7]. A Fizika Tanszék vegyészmérnökei eredetileg az A.F.G. Slater és szerzőtársai által publikált eljárást [12] követték a szintézis során. 2009-ben megjelent publikációjukban [13] M. Jamarillo és munkatársai egy általuk javasolt új, jól kontrollálható (vízes környezetben végbemenő, sav-katalizált) β -hematin növesztési módszert mutatnak be, összehasonlítva a keletkező kristályok tulajdonságait (kristályméret, morfológia és homogenitás) a plasmodium által előállított természetes hemozoin, valamint két eltérő szintézisből származó kristályok jellemzőivel. A pásztázó elektronmikroszkópos, röntgen diffrakciós és infravörös spektroszkópiai mérések megerősítik, hogy kristályszerkezetben, mágneses és optikai tulajdonságaikban a különböző módon készült kristályok és a Plasmodiumtól származó hemozoin azonosak. Ezzel szemben az új fajta növesztés eredménye – a két másik módon szintetizált β -hematinnal ellentétben – mind kristályméretben, mind morfológiában jobban emlékeztet a természetes hemozoinra.

Méréseim során kezdetben (5.1: lineáris dikroizmus spektrum, 5.2: mágneses térfüggés mérése és 5.3 fejezet: optikai anizotrópia mérése) az első szintézisből származó kristályokat vizsgáltam (ezen szintézisre ezentúl az 1. sorszámmal hivatkozom). Későbbi méréseimben (5.2: SQUID, 5.4: mérés vérben, 6.fejezet: forgó mágneses elrendezés) az újabb eljárással (ezentúl 2. sorszám) készített β -hematint használtam.

A 2. módszerrel szintetizált kristályokról – azok vízes szuszpenziójának fagyasztva törése, valamint rácsra szárítása után – az MTA Kémiai Kutatóközpontban dr. Bóta Attila közreműködésével transzmissziós elektronmikroszkópos képeket készítettünk (2.4 ábra). A kristályok méreteloszlása és morfológiája szemmel láthatóan jól egyezik a P.falciparum által előállított hemozoin kristályokéval (v.ö.: 2.3 A2 ábra).

Összehasonlításképpen közlöm mindkét szintézisből származó β -hematin kristály lineáris dikroizmus spektrumát (a jelenség leírásáról és kapcsolódó mérési eredményeimről a későbbiekben ejtek szót). A 2.5 ábrán látható, hogy a spektrum alakja a két különböző módon előállított kristályra eltér, ami a morfológiai tulajdonságok és a kristályméret eloszlás különbözőségének tulajdonítható. Ezen mérés eredménye felhívja a figyelmet arra, hogy a különböző körülmények között keletkező hemozoin azonos feltételek (pl. azonos koncentráció) mellett is eltérő lineáris dikroizmus jelet mutathat, amit egy diagnosztikai eszköz kalibrálásánál számításba kell venni.



2.4. ábra. Új szintézissel (2.) készült beta-hematin kristályok TEM-es képe fagyasztva tört (felül) és rácsra szárított (alul) szuszpenziókon. A bal felső ábra egy jellemző kristályhalmazt mutat, míg a többi nagyobb méretű kristályokra összpontosít. Az utóbbiakon a kristályok méreteloszlása jellemzően 1 μm köré centrálódik.

2.3. Kapcsolódó irodalmi eredmények

D.M. Newmann és munkatársai vetették fel először a mágnesesen indukált dikroizmus mérésének lehetőségét hemozoinon [3]. Ők monokromatikus fényforrást használva, $\lambda = 660nm$ en sikeresen kimutatták a hemozoin indukált dikroikus hatását. Megvizsgálták az effektus mágneses tértől, valamint a hemozoin koncentrációtól való függését. A várakozásoknak megfelelően a koncentráció függést lineárisnak találták (2.6 *a* ábra), míg a mágneses tér erősségétől való függést a mérések szerint egy specifikus görbe írja le (2.6 *b* ábra).

A fenti cikk szerzői maláriával fertőzött mintákon végzett tesztmérésekkel bizonyítják, hogy a módszer alkalmas a fertőzés laboratóriumi diagnosztizálására. Itt megjegyezném, hogy a mérési ábrák alapján kapott pontosság messze elmarad az általuk állított értéktől, ami egyébként szükséges lenne a betegség korai stádiumban való felismeréséhez.

2.4. Továbblépés lehetősége a diagnosztika felé

Kutatásom egyik célja a hemozoin mágnesesen indukált kettőstörésének egy széles spektrális tartományban ($\lambda = 170 - 1300$ nm) való vizsgálata volt. Ez egyrészt fontos azért, hogy meghatározzuk a jelenség mely hullámhossz tartományban a legerősebb, másrészt a spektrális jelleg specifikus lehet, és információt adhat a hemozoin kristályok anyagi jellemzőiről. Emellett az effektus mágneses tértől való függését vizsgáltam kísérletileg és elméleti modell számításokkal, hogy meghatározzam a hemozoin kristályok optikai és mágneses anizotrópia faktorát. Arra alapozva, hogy a vérben fellépő lineáris dikroizmus mágneses tértől való függése kizárólag a hemozoin jelenlétének tulajdonítható, belekezdtem egy mágneses moduláción alapuló berendezés összeállításába, mely a jelen kutatásaimban alkalmazott polarizáció modulációs technikánál jelentősen olcsób eszközök felhasználásával előállítható, míg a módszer érzékenysége tovább növelhető. Meggyőződésem, hogy sikeres fejlesztés esetén az eszköz széles körben elterjedhet a klinikai diagnosztikában.



2.5. ábra. 1. és 2. módszerrel előállított hemozoin kristályok mágnesesen indukált lineáris dikroizmus spektruma. A különböző eljárások során keletkező kristályok spektrumának jellege eltérő, mivel a fellépő polarizációs effektusok nagyban függhetnek a kristálymérettől és a morfológiától.



2.6. ábra. a) A lineáris dikroizmus hemozoin koncentrációtól való függése. A lineáris összefüggés jól látható a Newmann és munkatársai által mért grafikonokon. BH a szintetizált β hematint, HZ az élő sejtekből kivont hemozoin mintát jelöli b) A lineáris dikroizmus mágneses tértől való függése. Látható, hogy $B \approx 1$ T-nál az effektus telítődéshez közelít (a kristályok feltehetően ekkor teljesen a tér irányába állnak be).

3. fejezet

A lineáris kettőstörés és dikroizmus spektroszkópia alapjai

Ebben a fejezetben a vérben lévő hemozoin kristályok optikai viselkedését tárgyalom egy olyan modell segítségével, melyben a hemozoint tűszerű és ebből adódóan mágnesesen anizotróp és lineárisan kettőstörő kristályoknak tekintem, melyek az oldatban szabadon elfordulhatnak. Noha a valódi kép ennél összetettebb, és vélhetőleg mind a polarizációs effektusok, mind pedig a mágneses anizotrópia fő kiváltó oka a vas ion és általában véve a hematin molekulák anizotróp kristálytani környezetében keresendő, a fenti modell szemléletes magyarázatot nyújt a megfigyelt effektusokra. Jelenleg még nem bizonyos, hogy a kristály morfológiailag kitűntetett hossztengelye korrelál-e az elemi cella hosszanti irányával, mégis a jelenségek szemléltetésekor – a könnyebb érthetőség érdekében – ezt fogjuk feltételezni. A tárgyalás során a kristály hossztengelyét gondolatban bármikor helyettesíthetjük a megfelelő kristálytani tengellyel, a számítások ugyanis csak a könnyű mágnesezési irány létezésére támaszkodnak, és arra a feltételezésre, hogy ez egybeesik az optikai dikroizmus főtengelyével, függetlenül attól, hogy ez kristálytanilag, vagy morfológiailag kitűntetett. A számítások eredményei jól illeszkednek a mérésekre, így feltételezéseink megalapozottnak tekinthetők.

3.1. A lineáris dikroizmus jelensége

Mivel a hemozoinnak egy híg szuszpenziójában a kristályok elhelyezkedése és orientációja véletlenszerű, nincs kitüntetett irány a szuszpenzióban, vagyis a rendszer izotróp. Ha azonban külső mágneses teret alkalmazunk, a paramágneses kristályok hossztengelyükkel (illetve szigorúan véve könnyű mágnesezési tengelyükkel) a tér irányába fordulnak. A tér erősségének növelésével a rendeződés mértéke nő, végül az összes kristály párhuzamosan áll a térrel. Külső mágneses tér jelenlétében tehát a rendszer izotrópiája (teljes forgásszimmetria) sérül, és a következő térbeli szimmetriákkal lesz jellemezhető:

• m_{\parallel} : mágneses térrel párhuzamos normálisú síkra való tükrözés

- m'_{\perp} : mágneses térre merőleges normálisú síkokra való tükrözés és időtükrözés
- C_{\parallel}^{∞} : mágneses térrel párhuzamos tengely körüli tetszőleges szöggel történő forgatás
- *i* : inverzió

A Neumann-elvnek megfelelően a rendszert leíró tenzormennyiségek – így az optikai tulajdonságok leírásában fontos $\hat{\varepsilon}$ dielektromos tenzor is – tükrözik a rendszer szimmetriáit [14]. Ez azt jelenti, hogy a tenzorok elemei nem változnak, invariánsak maradnak, ha az egyes szimmetriaműveleteknek megfelelő transzformációkat elvégezzük az anyagon, azaz a dielektromos tenzor példáján: $\hat{\varepsilon} = \hat{S}^{-1}\hat{\varepsilon}\hat{S}$, ahol \hat{S} a rendszer egy szimmetriáját leíró művelet. Így esetünkben a dielektromos tenzor az alábbi formára egyszerűsödik:

$$\hat{\varepsilon} = \begin{pmatrix} \varepsilon_{yy} & \varepsilon_{xy} & 0\\ -\varepsilon_{xy} & \varepsilon_{yy} & 0\\ 0 & 0 & \varepsilon_{zz} \end{pmatrix}.$$
(3.1)

Ha az oldat optikai tulajdonságait szeretnénk leírni, akkor a Maxwell-egyenleteket kell megoldanunk ebben a közegben:

$$\nabla \mathbf{D} = 0, \tag{3.2}$$

$$\nabla \mathbf{B} = 0, \tag{3.3}$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t},\tag{3.4}$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}.$$
(3.5)

Az egyenletrendszert teljessé a fény-anyag kölcsönhatását leíró anyag-egyenletek teszik, melyek lineáris válasz közelítésben a fenti dielektromos és a mágneses permeábilitás tenzort tartalmazzák:

$$\mathbf{B} = \hat{\mu} \mathbf{H}, \qquad \mathbf{D} = \hat{\varepsilon} \mathbf{E}. \tag{3.6}$$

A Maxwell-egyenletek megoldását a $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i(\mathbf{kr}-\omega t)}$ síkhullám alakban keresve megkapjuk a hullámegyenletet, ha a második Maxwell-egyenlet rotációját behelyettesítjük a negyedik egyenletbe:

$$\mathbf{k} \times \mathbf{k} \times \mathbf{E} + \frac{\omega^2}{c^2} \hat{\mu} \hat{\varepsilon} \mathbf{E} = 0.$$
(3.7)

Ekkor egy lineáris egyenletrendszert kapunk a térerősség vektorra. Az optikai tartományban a mágneses gerjesztések elhanyagolhatóak, így a mágneses permeábilitás tenzort egységnek tekinthetjük ($\hat{\mu} = 1$), és a hullámegyenlet az alábbi formát ölti:

$$\mathbf{k} \times \mathbf{k} \times \mathbf{E} + \frac{\omega^2}{c^2} \hat{\varepsilon} \mathbf{E} = \mathbf{k} (\mathbf{k} \mathbf{E}) - |\mathbf{k}|^2 \mathbf{E} + \frac{\omega^2}{c^2} \hat{\varepsilon} \mathbf{E} = 0.$$
(3.8)

Általános alakú dielektromos tenzor esetén a hullámegyenletet felírhatjuk mátrixos alakban is:

$$\begin{pmatrix} -k_y^2 - k_z^2 + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{yy} & k_x k_y + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{xy} & k_x k_z + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{xy} \\ k_y k_x + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{yx} & -k_x^2 - k_z^2 + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{yy} & k_y k_z + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{yz} \\ k_z k_x + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{zx} & k_z k_y + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{zy} & -k_x^2 - k_y^2 + \frac{\omega^2}{c^2}\varepsilon_{zz} \end{pmatrix} \mathbf{E} = 0.$$
(3.9)

Mivel a rendszer a mágneses tér (z tengely) körüli forgatásra szimmetrikus, a hullámszám vektort az általánosság sérülése nélkül vehetjük az xz-síkban, ahol θ szöget zár be a z-tengellyel. Az anyagbeli fénysebességet a $c' \equiv \frac{\omega}{|\mathbf{k}|} = \frac{c}{\sqrt{\varepsilon}}$ alakban írva (c a vákuumbeli fénysebesség) és a dielektromos tenzor (3.1) alakját behelyettesítve, a fenti megfontolással alábbi egyenletet kapjuk:

$$\begin{pmatrix} \varepsilon_{yy} - \varepsilon \cos^2 \theta & \varepsilon_{xy} & \varepsilon \sin \theta \cos \theta \\ -\varepsilon_{yx} & \varepsilon_{yy} - \varepsilon & 0 \\ \varepsilon \sin \theta \cos \theta & 0 & \varepsilon_{zz} - \varepsilon \sin^2 \theta \end{pmatrix} \mathbf{E} = 0.$$
(3.10)

Akkor kapunk triviálistól különböző megoldást E vektorra, ha a mátrix szinguláris, azaz a determinánsa nulla. Ezen feltételből – a terjedési irány függvényében – megkapjuk a lehetséges ε értékeket, azaz a terjedési irányra jellemző anyagbeli fénysebességet és a polarizáció sajátvektort is. Speciálisan, ha $\theta = \frac{\pi}{2}$ -t választunk, azaz a fény terjedési iránya merőleges az alkalmazott mágneses térre (x tengely irányú). Ez az ún. Voigt konfiguráció, melyben az egyenletrendszer leegyszerűsödik:

$$\begin{pmatrix} \varepsilon_{yy} & \varepsilon_{xy} & 0\\ -\varepsilon_{xy} & \varepsilon_{yy} - \varepsilon & 0\\ 0 & 0 & \varepsilon_{zz} - \varepsilon \end{pmatrix} \mathbf{E} = 0.$$
(3.11)

Két megoldást kapunk, melyekhez tartozó két dielektromos állandó: $\varepsilon_1 = \varepsilon_{zz}$ és $\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{yy}^2 + \varepsilon_{xy}^2}{\varepsilon_{yy}}$. Méréseket végeztem a mágneses térrel párhuzamos fényterjedés esetén (Faraday konfiguráció), melyből azt kaptam, hogy a cirkuláris kettőstörésért/dikroizmusért felelős ε_{xy} elem elhanyagolható, azaz $\varepsilon_{xy} << \varepsilon_{yy}$. Ekkor $\varepsilon_2 \approx \varepsilon_{yy}$ és két tranzverzális polarizációs megoldás adódik. Így Voigt konfigurációban lineáris kettőstörést/dikroizmust tapasztalunk $\tilde{n}_z = \sqrt{\varepsilon_{zz}}$, illetve $\tilde{n}_y = \sqrt{\varepsilon_{yy}}$ komplex törésmutatóval, melyekhez tartozó polarizációs irányok (optikai tengelyek) x irányú terjedés esetén: $\mathbf{E_1} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}$, és $\mathbf{E_2} = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}$.

Amikor transzmisszióban vizsgáljuk az anyagot, a fény áthaladása során a különböző térerősség sajátvektorok az alábbi komplex fázisfaktorokkal szorzódnak:

$$\tilde{t}_{z/y} = e^{i\tilde{n}_{z/y}kd} = e^{-Im\{\tilde{n}_{z/y}\}\frac{\omega}{c}d} e^{iRe\{\tilde{n}_{z/y}\}\frac{\omega}{c}d},$$
(3.12)

ahol a törésmutató képzetes/valós része felelős az amplitúdó/fázis megváltozásáért. Ezt figyelembe véve $\tilde{t}_{z/y}$ a következő formában is felírható:

$$\tilde{t}_{z/y} = t_{z/y} e^{i\theta_{z/y}},\tag{3.13}$$

ahol $t_{z/y} = e^{-Im\{\tilde{n}_{z/y}\}kd}$ és $\theta_{z/y} = Re\{\tilde{n}_{z/y}\}kd$.

A lineáris dikroizmust mérésére használjuk a következő mennyiséget:

$$\frac{\Delta T}{T} \equiv \frac{|\tilde{t}_z|^2 - |\tilde{t}_y|^2}{2(|\tilde{t}_z|^2 + |\tilde{t}_y|^2)}.$$
(3.14)

Ezen mennyiség leírja, hogy mennyi a transzmisszió különbsége a két lineárisan polarizált állapotra. A kísérletek során, a megfelelő mérési elrendezésben közvetlenül ezzel arányos jelet mértem.

3.2. Oldatban úszó kristályok mágneses és optikai anizotrópiájának meghatározása

Hemozoin kristályok szuszpenziójában kialakuló mágnesesen indukált dikroizmus leírása megközelíthető az oldott kristályok statisztikai sokaságának vizsgálatával. Mivel a hemozoin kristályok egyik irányban jelentősen nagyobb kiterjedésűek, mint a másik kettőben, így értelmezhetünk egy orientációs szöget, melyet az egyes kristályok hossztengelye a külső mágneses térrel bezár (pontosabban fogalmazva ez az orientáció minden kristályra a könnyű mágnesezési irány és a mágneses tér iránya közti szög). Mágneses tér nélkül a kristályok a szuszpenzióban rendezetlenek, az orientációjuk véletlenszerű. A mágneses tér bekapcsolásával a mágneses energia értéke az egyes kristályokra azok mágneses anizotrópiája miatt az orientáció szögének függvénye lesz. Így bevezethetünk egy statisztikus szögeloszlás függvényt, mely megadja, hogy az egyes kristályok adott szögű orientációja milyen valószínűségű. A tekintett rendszerre a különböző orientációs szögekhez tartozó állapotok Boltzmann eloszlást követnek. A számításokat C.T. O'Konski és szerzőtársai [15] cikkjében ezen jelenség elektromos analógjának levezetése alapján végeztem el. Az alábbiakban közlöm a fontosabb eredményeket a mágneses esetre vonatkoztatva (SI mértékrendszerben).

A mágneses tér jelenléte miatt kialakuló mágnesezettség egy hemozoin kristályban az egy kristályra jellemző mágneses szuszceptibilitás segítségével fejezhető ki (itt, és a tárgyalás során végig a $\chi = \chi_0 V_{kr}$, azaz az egyetlen kristályra értelmezett szuszceptibilitás a χ_0 dimenziótlan szuszceptibilitás és a kristály térfogatának szorzata, így mértékegysége m^3).

$$\mathbf{m} = \chi \mathbf{H}.\tag{3.15}$$

A hosszúkás kristályokat hengerszimmetrikusnak tekintve, az előző fejezet gondolatmenete szerint az általánosság sérülése nélkül választhatunk a kristály tengelyeihez rögzített koordinátarendszerben xz-síkban elhelyezkedő mágneses térerősség vektort (a z irány a kristály hossztengelye), valamint a Neumann elv alapján megállapíthatjuk, hogy ilyenkor a szuszceptibilitás tenzor diagonális. Ekkor a kristály mágnesezettsége:

$$\mathbf{m} = \begin{pmatrix} \chi_y & 0 & 0 \\ 0 & \chi_y & 0 \\ 0 & 0 & \chi_z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H\sin\theta \\ 0 \\ H\cos\theta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \chi_y H\sin\theta \\ 0 \\ \chi_z H\cos\theta \end{pmatrix}, \quad (3.16)$$

ahol H a mágneses térerősség vektor nagysága, és θ a mágneses tér és a kristály z tengelye között bezárt szög, χ_z és χ_y pedig a kristály mágneses szuszceptibilitása hossztengelyére merőleges és azzal párhuzamos tér esetén. Egy m mágneses momentumú kristálynak a mágneses térrel való kölcsönhatási energiája:

$$U = -\frac{1}{2}\mathbf{mB} = -\frac{1}{2\mu_0}B^2\cos\theta^2(\chi_z - \chi_y) + \frac{1}{2\mu_0}\chi_yB^2 = -\frac{1}{2}B^2\cos\theta^2\frac{(\chi_z - \chi_y)}{\mu_0} + \frac{1}{2\mu_0}\chi_yB^2.$$
(3.17)

A mágneses indukcióvektor kifejezésénél feltételezhetjük, hogy a híg szuszpenzióban a relatív permeábilitás 1. A szögeloszlás függvény a fentiek alapján:

$$f(\theta) = \frac{e^{-U/k_B T}}{2\pi \int_0^\pi e^{-U/k_B T} \sin \theta d\theta},$$
(3.18)

ahol k_B a Boltzmann állandó, T a szuszpenzió hőmérséklete. Látható, hogy a (3.17) képletben a második, szögfüggetlen tag – mivel az exponenciális kifejezés szorzattá alakítható, és a szögfüggetlen tényező kiemelhető az integrál elé – nem ad járulékot, így ezentúl nem vesszük figyelembe.

A lineáris dikroizmus kifejezése, azaz a szuszpenzióra jellemző komplex törésmutató képzetes részének különbsége a két polarizációs irány között [15]:

$$\Delta n = \frac{2\pi}{n} C_v (g_y - g_z) \int_0^\pi f(\theta) \frac{3\cos\theta^2 - 1}{2} 2\pi \sin\theta d\theta, \qquad (3.19)$$

ahol n a közeg törésmutatójának képzetes része, C_v a hemozoin térfogati aránya, $(g_y - g_z)$ a kristályok optikai anizotrópia faktora.

A fenti integrál nem fejezhető ki analitikus formában, viszont megfelelő változó helyettesítésekkel e^{x^2} típusú integrálra vezethető vissza, melynek értékeit integráltáblázatból lehet meghatározni. Az indukált dikroizmus kifejezése tehát explicit alakban:

$$\Delta n(\lambda, B) = 2\pi C_v \frac{g_y(\lambda) - g_z(\lambda)}{n(\lambda)} \Phi(B), \qquad (3.20)$$

ahol $\Phi(B)$ a kristályok orientációját leíró függvény, mely $B \to \infty$ határesetben 1-hez tart, B = 0-nál pedig zérus értékű, ezért $\Phi(B)$ -t a kristályok orientáció fokának nevezzük. Az orientáció fok függvény alakja:

$$\Phi(\gamma) = \frac{3}{4} \left(\frac{e^{\gamma}}{\sqrt{\gamma} E(\sqrt{\gamma})} - \frac{1}{\gamma} \right) - \frac{1}{2}, \tag{3.21}$$

ahol $\gamma = \frac{(\chi_z - \chi_y)}{\mu_0} B^2 / 2k_B T$ és $E(\sqrt{\gamma})$ értéke az e^{x^2} integrálja a $\sqrt{\gamma}$ helyen, melyet integráltáblázatból határoztam meg.

Ezek szerint tehát a törésmutató különbség felírható egy mágneses tértől függő és egy – az optikai anizotrópia faktoron keresztül – hullámhossz függő tényező szorzataként:

$$\Delta n(\lambda, B) = G(\lambda)\Phi(B). \tag{3.22}$$

A fenti cikk szerzői két közelítést közölnek a Φ függvényre, az első $U \ll k_B T$, a második $U \gg k_B T$ esetre ad jó eredményt:

$$\Phi(\gamma) = 2/15\gamma + 4/315\gamma^2, \tag{3.23}$$

$$\Phi(\gamma) = 1 - \frac{3}{2\gamma - 1}.$$
(3.24)

Méréseim során megvizsgáltam a dikroizmus mágneses tértől való függését több különböző hullámhosszon. A mérési adatokra való illesztés a fenti közelítésekkel lehetséges, az illesztés paramétereiként meghatározhatóak az egyetlen, átlagos hemozoin kristályra jellemző $(g_y - g_z)$ optikai és $(\chi_z - \chi_y)$ mágneses anizotrópia faktorok. Ehhez azonban először a mért $\frac{\Delta T}{T}$ értékekből ki kell fejezni a törésmutató különbséget. A (3.12) és (3.14) egyenletek segítségével:

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{|e^{ik\tilde{n}_z d}|^2 - |e^{ik\tilde{n}_y d}|^2}{2(|e^{ik\tilde{n}_z d}|^2 + |e^{ik\tilde{n}_y d}|^2)} = \frac{e^{-2kn_z d} - e^{-2kn_y d}}{2(e^{-2kn_z d} + e^{-2kn_y d})} \approx \frac{4\pi\Delta nd}{4\lambda},$$
(3.25)

ahol $n_{z/y} = Im(\tilde{n}_{z/y})$, $\Delta n = n_y - n_z$, és az exponenciális függvény a számlálóban másodrendig, a nevezőben elsőrendig van sorfejtve. Így a törésmutató képzetes részének különbsége a két lineárisan polarizált komponensre:

$$\Delta n = \frac{\Delta T}{T} \frac{\lambda}{\pi d}.$$
(3.26)

A mérési eredmények fejezetben közlöm a hemozoinon mért lineáris dikroizmus spektrumokat, valamint kiválasztott hullámhosszakon az effektus mágneses tértől való függését. A mágneses tértől való függést ábrázoló grafikonokra a nagy tereknél görbét illesztettem, melyekből meghatároztam a mágneses és optikai anizotrópia faktorokat.

3.3. A polarizáció modulációs méréstechnika

A lineáris dikroizmus nagy pontosságú méréséhez rendkívül érzékeny mérőberendezésre van szükségünk. Egy ilyen eljárást valósíthatunk meg, ha a mintára eső fény polarizációját periodikusan moduláljuk, és a detektor jelében a lineáris dikroizmus által generált harmonikust mérjük. A fény polarizációjának modulációját egy fotoelasztikus modulátorral (továbbiakban PEM) végeztem. A PEM egy nagy mértékben izotróp kristály, melyben egy hozzá kapcsolt, elektromosan vezérelhető piezo-kristály által egy kitüntetett irányban periodikus deformációt hozunk létre. Az ily módon anizotróppá váló kristály, mely a kívánt foton energiatartományban átlátszó, időben periodikus lineáris kettőstörést (fázistolást) mutat. Az eredmény, hogy a PEM-ből kijutó fény polarizációját periodikusan kapcsolgatjuk. Amennyiben az eszközre érkező lineárisan polarizált fény polarizációs síkja az optikai tengelyekkel 45°-ot zár be, és a két lineáris komponens közti fázistolás amplitúdója π , ahogy ezt a 3.1 ábra szemlélteti, úgy éppen a számunkra fontos két merőleges lineáris polarizáció között váltogatunk (a π fázistolás $\lambda/2$ optikai úthosszkülönbséget jelent a két lineáris komponens között). Mivel ezen állapotokra a vizsgált minta abszorpciós tényezője különböző, így azt várjuk, hogy a PEM frekvenciájának második harmonikusán észlelhetjük a mérendő ΔT paramétert a mért fény intenzitásában (lásd 3.1 ábra). A PEM-mel történő mérésekhez az 3.2 ábrán látható elrendezést alkalmazhatjuk [16].



3.1. ábra. A PEM-en áthaladó fény polarizációs állapota az idő függvényében. A maximális optikai úthosszkülönbség a két lineáris állapot között a hullámhossz fele [16].

A kvantitatív elemzéshez kövessük nyomon a fényúton a térerősség vektor amplitúdójának és polarizációjának változását Jones- formalizmusban. A fény terjedési iránya az x tengellyel párhuzamos, a tranzverzális polarizációs állapotok az yz-altér komponensei. A 45°-os polarizátor után a PEM-re eső fény térerősség vektora:

$$\mathbf{E_0} = \begin{pmatrix} 1\\1 \end{pmatrix}. \tag{3.27}$$



3.2. ábra. A PEM-mel történő lineáris kettőstörés mérés elrendezésének elvi vázlata [16].

A PEM által létrehozott polarizáció változás Jones-mátrixa a következő alakú:

$$M = \begin{pmatrix} 1 & 0\\ 0 & e^{i\Phi} \end{pmatrix}, \tag{3.28}$$

ahol a lineáris komponensek közötti harmonikus fázistolás $\Phi = \Phi_0 \sin 2\pi f t$ és a fázismmoduláció amplitúdója Φ_0 .

A PEM-mel 45°-ot bezáró minta Jones-mátrixa a (3.13) definíció segítségével:

$$S = \frac{\sqrt{2}}{2} \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} t_y e^{i\theta_y} & 0 \\ 0 & t_z e^{i\theta_z} \end{pmatrix} \frac{\sqrt{2}}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ -1 & 1 \end{pmatrix}.$$
 (3.29)

Ezek alapján a detektor helyén a térerősség:

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} t_y e^{i\theta_y} & 0 \\ 0 & t_z e^{i\theta_z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ -1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{i\Phi} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}.$$

(3.30)

A detektor által mért intenzitást a térerősség abszolútérték-négyzetének időátlagának kiszámításával kapjuk (a detektor nem képes követni a fény rezgési frekvenciáját, ezért gyakorlatilag időátlagot mér), azaz $I \propto \overline{\mathbf{E}^*\mathbf{E}}$

Ha elvégezzük a kijelölt mátrixszorzásokat, valamint kiszámítjuk a detektorra eső térerősség abszolútérték négyzetét, akkor az intenzitás a következő mennyiséggel arányos:

$$I \propto A \left(1 + 2 \frac{\Delta T}{T} \cos \Phi \right).$$
 (3.31)

A koszinusz függvény argumentumában megjelenő harmonikus időfüggés a J_{2k} páros sorszámú Bessel-függvények szerint Fourier-sorba fejthető:

$$\cos(\Phi_0 \sin 2\pi f t) = J_0(\Phi_0) + 2J_2(\Phi_0) \sin 4\pi f t + \cdots .$$
(3.32)



3.3. ábra. Bessel-függvények: Kék: J_0 ; piros: J_1 ; szaggatott: J_2 .

Az érzékelt intenzitás ezek alapján időfüggés szerint az alábbi egyenáramú komponenst és második harmonikust tartalmazzák:

$$I_{dc} = c_{dc} 2A \left[1 + J_0(\Phi_0) \frac{\Delta T}{T} \right], \qquad (3.33)$$

$$I_{2f} = c_{2f} 8 J_2(\Phi_0) \Delta T, \tag{3.34}$$

ahol c_{dc} és c_{2f} szorzófaktorok a detektor és az azt követő I/V konverter frekvenciafüggő érzékenységét hivatottak kifejezni.

A dc komponensben a kettőstöréssel arányos tag az 1 mellett elhanyagolhatóan kicsiny. Ha a második harmonikust elosztjuk a dc intenzitással, akkor az egyes optikai elemekből származó intenzitáscsökkenések, valamint a fényforrás intenzitásbeli ingadozásai miatti eltéréseket kiküszöböljük. A következő mennyiség mérése célszerű tehát:

$$\frac{I_{2f}}{I_{dc}} \approx \frac{c_{2f}}{c_{dc}} 4J_2(\Phi_0) \frac{\Delta T}{T}.$$
(3.35)

Látható tehát, hogy a várakozásoknak megfelelően a dikroizmussal arányos jel a PEM modulációs frekvenciájának kétszeresével oszcilláló intenzitáskomponensben jelenik meg. Ezen jelet egy lock-in erősítővel mérhetjük, és az arányossági tényező ismeretében közvetlenül megkapjuk a keresett mennyiséget.

A $\frac{c_{2f}}{c_{dc}}4J_2(\Phi_0)$ arányossági tényezőt, mely a modulációs amplitúdó függvénye, és befolyásolhatja a detektor elektronikájának sávszélessége, kalibráció segítségével tudjuk megadni. A kalibrációs konstans meghatározásához tekintsük azt a leegyszerűsített elrendezést, melyből eltávolítjuk a lineárisan kettőstörő mintát – az optikai elemeket is tökéletesen átlátszónak tekintjük –, és a detektor elé helyezünk egy analizátort. Belátható, hogy ez a számolás érvényben marad, ha a minta a fényútban van, illetve az optikai elemek kettőstörését nem hanyagoljuk el. Az analizátor zárjon be α szöget a vízszintessel. Ekkor az analizátorra eső térerősség-vetületet (E_{α}) az alábbi mátrixszorzással kapjuk meg:

$$E_{\alpha} = \left(\cos \alpha \quad \sin \alpha \right) \left(\begin{array}{cc} 1 & 0 \\ 0 & e^{i\Phi} \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right).$$
(3.36)

Az analizátor mögött elhelyezett detektor által érzékelt intenzitás $I \propto |E_{\alpha}|^2$. A kijelölt műveleteket elvégezve, valamint a polarizáció moduláció időfüggését behelyettesítve (3.3) az intenzitásra a következőt kapjuk:

$$I \propto (1 + \sin 2\alpha \cos \left(\Phi_0 \sin 2\pi f t\right)). \tag{3.37}$$

Kihasználva a harmonikus tagban a (3.32) Fourier-sorfejtést, az egyes frekvenciakomponensek intenzitására az alábbi értékek adódnak:

$$I_{2f} = c_{2f} 2J_2(\Phi_0) \sin 2\alpha \approx c_{2f} 4J_2(\Phi_0)\alpha, \qquad (3.38)$$

$$I_{dc} = c_{dc} (1 + J_0(\Phi_0) \sin 2\alpha) \approx c_{dc},$$
(3.39)

ahol az analizátor kis szögű elforgatására felhasználtuk, hogy $\sin 2\alpha \approx 2\alpha$ és a dc intenzitásban szereplő α -val arányos tag az egyhez képest elhanyagolható. A két komponens hányadosa éppen a keresett kalibrációs konstanst adja:

$$\frac{I_{2f}}{I_{dc}} = \frac{c_{2f}}{c_{dc}} 4J_2(\Phi_0)\alpha.$$
(3.40)

Az analizátor behelyezésével tehát elértük, hogy a normált intenzitás az analizátor szögével legyen arányos, és az arányossági tényező a (3.35)-ben megjelenő állandó legyen. Az analizátor kis szögű forgatásával így minden hullámhosszon mérhető és kiszámítható a kalibrációs konstans az alábbi módon:

$$\frac{c_{2f}}{c_0} 4J_2(\Phi_0) = \frac{[I_f/I_{dc}]_{+\alpha} - [I_f/I_{dc}]_{-\alpha}}{2\alpha}.$$
(3.41)

Ugyanezen módszer szintén használható akkor, ha a rendszerben kettőstörő elemek is jelen vannak mindaddig, míg a polarizációs effektusokat elég lineáris rendben figyelembe venni. Ekkor ugyanis a (3.41) egyenletben történő antiszimmetrizálás miatt az analizátor szögétől nem függő tagok (a többi elemtől, illetve a mintától jövő polarizáció változás) kiesnek.

4. fejezet

A polarizációs spektrométer

4.1. A spektrométer felépítése

A bevezetőben ismertetett célok érdekében belefogtam egy polarizáció modulációs elven működő spektrométer építésébe, amely lehetőség szerint a $\lambda = 170 - 1300$ nm hullámhossz-tartományban használható. A megvalósult optikai elrendezésről készült fényképet a 4.1 ábra tartalmazza. Az egyes optikai elemek fizikai adatait a függelékben gyűjtöttem össze.

A széles spektrum eléréséhez két különböző fényforrást – egy halogén, valamint egy Xenon lámpát – használtam, melyek között mozgatható tükör segítségével lehet váltogatni. A $\lambda = 170 - 800 nm$ tartományban a Xenon lámpát, a hosszabb $\lambda = 800 - 1300 nm$ hullámhosszakra pedig a halogén izzót alkalmaztam. A lámpák fényét egy-egy f = 80mm fókusztávolságú lencse (1. és 2.) párhuzamosítja, majd egy f = 260mm fókusztávolságú gyűjtőlencse (3.) egy színszűrőn keresztül az optikai rácsos monokromátor belépő résére képezi. A felhasznált lencsék ömlesztett kvarcüvegből készültek, így a vizsgált hullámhosszakon abszorpciójuk elhanyagolható. A rácsos monokromátor a bejutó fényt holografikus optikai rácsok segítségével választja szét hullámhossz szerint a térben. Az általam használt monokromátor három rácsból áll, így a rácsok váltogatásával a különböző hullámhossztartományokra optimalizálni lehet a színek térbeli elkülönítésének mértékét. A megfelelő rácsról visszaverődött fény végül a kilépő résre jut, melynek szélességét a belépő résével párhuzamosan állítva, a kijutó fény hullámhosszbeli felbontását (azaz a kiválasztott hullámhossz körüli áteresztett tartomány szélességét) lehet rögzíteni. A monokromátor előtt elhelyezett színszűrő használata azért szükséges, mert a rács által másod- és harmadrendben diffraktált (fél és harmad hullámhosszúságú) fény is ugyanazon szögben verődik vissza, mint az általunk kiválasztott hullámhosszúságú, ily módon ezen komponensek hozzákeverednének a résen kijutó fényhez.

A monokromátorból kilépő fényt egy f = 100mm fókusztávolságú lencse (4.) kollimálja, majd egy 45°-ban elhelyezett polarizátoron keresztül jut el a fény a PEM-be. A PEM frekvenciája 50kHz, a fázistolás amplitúdóját pedig a hullámhossz felére állítottam (π fázistolás), hiszen itt van a J_2 Bessel-függvénynek maximuma (3.3 ábra), azaz itt lehet maximális feszültségértékeket mérni az intenzitásban megjelenő második harmonikusra.



4.1. ábra. A magneto-optikai spektrométer a főbb elemek megnevezésével. A felső ábra a fényút monokromátorig terjedő része, az alsó a monokromátor utáni részt mutatja. A számozott lencsék listája ill. az összes elem rövid specifikációja a függelékben található

A PEM-ből kilépő – periodikusan változó polarizációs állapotú – fényt egy f = 50mmes fókusztávolságú lencse (5.) egy speciálisan kialakított mintatartóban elhelyezett küvettára gyűjti. Méréseim során ezen küvettába töltöttem a folyékony állapotban lévő mintát. A csiszolt kvarcküvetta belsejében a fényút hossza d = 2mm. A mintán áthaladó fénysugarakat egy szintén f = 50mm-es fókusztávolságú lencse kollimálja (6.). A méréshez két különböző detektort használtam. Az egyik egy fotoelektron sokszorozó, mely a rövidebb hullámhosszakon (170-900nm), a másik egy félvezető InGaAs detektor, amely a hosszabb hullámhosszakon (800-1600nm) mér. A félvezető detektor egy sínen elmozdítható a fényútból, ily módon lehet váltani a detektorok között. A kollimált nyalábot egy-egy f = 50mm fókusztávolságú lencse (7. és 8.) koncentrálja a detektorok érzékeny felületére.

Polarizátorként egy Rochon prizmát használtam, melyből az ordinárius fénnyaláb egyenes vonalban, az extraordinárius pedig kissé eltérítve (tipikusan 7-15°-ban) lép ki. Az elrendezésnél tehát ügyelni kell arra, hogy a detektorba csak a megfelelő polarizációjú (ordinárius) nyaláb jusson el.

A minta mögött, a sugárnyalábra merőlegesen egy tízed-milliméter beosztású skálával ellátott sínen mozgatható permanens NdFeB rúdmágnest helyeztem el, melynek polaritását a mágnes vízszintes tengely körüli 180°-os forgatásával lehet megcserélni.

A beszűrődő külső fényt a detektorok alapos burkolásával kiküszöböltem ki, valamint a teljes optikai elrendezést egy sötétítő dobozzal fedtem le.

Az egyes frekvenciakomponensek méréséhez egy Keithley típusú dc voltmérőt, valamint egy lock-in erősítőt használtam. A lock-in erősítő referencia frekvenciáját a PEM elektronikus vezérlő egysége által szolgáltatott referencia frekvencia kétszeresére, 100kHz-re állítottam.

A spektrum felvétele egy számítógépes mérőszoftveren keresztül történik, melyet Szaller Dávid és Kocsis Vilmos fejlesztettek Visual Basic programnyelven. A szoftver lépteti a monokromátort megadott hullámhossz egységenként, beállítja a megfelelő szűrőt, valamint a megadott PEM fázistoláshoz tartozó modulációs amplitúdót. A detektorok jeleit a lock-in erősítőn, valamint a Keithley voltmérőn keresztül kérdezi le, és a kétszeres frekvenciakomponenst (3.35) szerint normálja a dc jellel.

4.2. A lineáris dikroizmus mértékének kalibrációja

A (3.35) egyenletben szereplő kalibrációs konstans a detektorokra és a PEM fázistolására jellemző, és független a behelyezett mintától. Ezért (adott PEM beállítás mellett) elegendő minden detektorra egyszer meghatározni ezen állandó értékét. Az alábbiakban ennek a mérésnek az eredményeit közlöm:

Az analizátor szögét $+2^{\circ}$ -ra állítva felvettem a modulációs frekvencia kétszeresén mért intenzitás spektrumot, majd ugyanezt -2° -nál is elvégeztem. A két spektrumot kivonva egymásból, majd elosztva 4° -al a keresett $\frac{c_{2f}}{c_f}4J_2(\Phi_0)$ kalibrációs konstanst kapjuk az adott hullámhosszon. Az így felvett pontokra harmadfokú görbét illesztettem, mely jó közelítéssel megadja a kalibráiciós görbéket az egyes detektorokra (4.2 ábra és 4.1 táblázat).

Az illesztett görbék egyenlete:

$$\frac{c_{2f}}{c_f} 4J_2 = A + B_1 \lambda + B_2 \lambda^2 + B_3 \lambda^3.$$
(4.1)

Az illesztett görbék alapján tehát a következő képlet adja a lineáris kettőstörést (az I intenzitások itt a mért feszültség értékeket jelölik, melyek arányosak a beérkező intenzitással, az arányossági tényező viszont a dc intenzitással való osztással miatt kiesik:

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{I_{2f}/I_{dc}(B)}{A + B_1\lambda + B_2\lambda^2 + B_3\lambda^3}.$$
(4.2)



4.2. ábra. A lineáris kettőstörés kalibrációs görbéje a PMT és InGaAs detektorra a hullámhossz függvényében

4.3. A fotoelektron sokszorozó érzékenységének szabályozása

A kalibráció másik fontos lépése a fotoelektron sokszorozó érzékenységi görbéjének felvétele, melyet – ellentétben a lineáris kettőstörés kalibrációjával – minden új minta behelyezése

PMT			InGaAs		
Paraméter	Érték	Hiba	Paraméter	Érték	Hiba
A	0,01037	8,26423E-4	А	-0,02203	0,00559
B1	3,21214E-5	4,34125E-6	B1	8,95935E-5	1,60748E-5
B2	-4,1737E-8	7,31448E-9	B2	-6,71642E-8	1,52465E-8
B3	1,79056E-11	3,96948E-12	B3	1,44153E-11	4,77503E-12

4.1. táblázat. A lineáris kettőstörés kalibrációs paraméterei a két detektorra

előtt el kell végezni. A PMT érzékenységét egy vezérlő feszültséggel lehet szabályozni. A fotoelektron sokszorozó kimenő jele ezen vezérlő feszültség 6,92-ik hatványával, valamint a beérkező fényintenzitással arányos. A PMT emiatt könnyen túlvezérelhető, és túl nagy fotoáram esetén károsodhat. Ezért érzékenység kalibrációnál a mérőszoftver először a megadott hullámhossz felbontással végiglépteti a monokromátort a spektrumon, és minden lépésben meghatározza azt a maximális vezérlőfeszültséget, amely a fotoelektron sokszorozón 2,6V kimenő feszültséget eredményez. Erre azért van szükség, mert a lámpáknak és optikai elemeknek köszönhetően a rendszer fényessége erősen hullámhosszfüggő. Két mérési pont között, amennyiben a tényleges mérés során az előzőnél nagyobb felbontást állítunk be, a szoftver a vezérlőfeszültség értékét lineáris interpoláció alapján határozza meg. Így a spektrumok mérésekor a program minden hullámhosszon olyan feszültséget ad a PMT-re, hogy annak kimenő feszültsége 2,5-2,6V legyen. Tudjuk, hogy ez nem befolyásolja a mérést, hiszen az I_{dc} , I_{2f} intenzitáskomponensek ily módon egyforma arányban vannak erősítve.

5. fejezet

Eredmények bemutatása és diszkussziója

5.1. Hemozoin szuszpenziók lineáris dikroizmus spektruma

A (3.20) egyenlet szerint a két polarizációs irányra vonatkoztatott képzetes törésmutatók különbsége (azaz a lineáris dikroizmus) három egymástól független fizikai mennyiséget – a hullámhosszat, a mágneses indukciót és a koncentrációt – tartalmazó függvény szorzataként áll elő. Méréseim során szisztematikusan megvizsgáltam az effektus mindhárom mennyiségtől való függését oly módon, hogy minden mérésben két paraméter értékét rögzítve, megmértem a dikroizmust a harmadik függvényében, és ezen mérést megismételtem az egyik rögzített paraméter több különböző értéke mellett is. Ha az effektus (3.20) egyenlet szerinti faktorizációja teljesül, akkor a mért görbéket a változtatott paraméter megfelelő függvényével elosztva, az adott paramétertől való függést kiküszöböljük, a görbék egymásra skálázódnak.

Először az lineáris dikroizmus koncentrációfüggését vizsgáltam. Ehhez tehát rögzített mágneses tér mellett különböző koncentrációjú hemozoin szuszpenziók spektrumát vettem fel. Ezen mérésből egyrészt megállapítható, hogy (3.20)-nek megfelelően valóban lineáris-e a dikroizmus a koncentráció függvényében, másrészt hasznos információt szerezhetünk a hemozoint jellemző spektrum alakjáról.

Kutatásaim jelen fázisában a tanszékünkön szintetikus úton az 1. módszerrel előállított hemozoin kristályok vízes szuszpenzióját vizsgáltam. Először egy viszonylag tömény szuszpenziót készítettem el, melyet mérésenként újra hígítottam. Ily módon nyolc különböző koncentrációjú hemozoin szuszpenzió lineáris dikroizmus spektrumát vettem fel. A méréseket B=400mT mágneses térben végeztem, majd megismételtem zérus mágneses térben. Az így kapott két spektrum kivonásával leválasztottam az optikai elemek tértől független dikroizmusát a szuszpenzió mágnesesen indukált lineáris dikroizmusától.

A különböző koncentrációjú oldatok spektrumát a (5.1 ábra) tartalmazza. A spektrum igen jellegzetes hullámhossz függést mutat. Legerősebb az effektus a látható tartományban, λ =466, 562 és 658nm-nél három maximumot találunk. A lineáris dikroizmus csökken az infravörös és ultraibolya tartomány fele egyaránt, bár λ =220nm-nél egy újabb csúcs jelenik meg. Ezen csúcsok pontos helyének ismerete hasznos lehet a detektálás érzékenységének növelésében.

Az effektus koncentrációtól való lineáris függésének ellenőrzéseként a spektrumokat normáltam a megfelelő koncentráció értékekkel. Az eredmény – mely szerint a normált spektrumok egymásra skálázódtak, (lásd 5.1 ábra) – jól igazolja ezt a feltételezést. Ez a tapasztalat lehetőséget biztosít a hemozoin koncentráció kvantitatív meghatározására és ezáltal az esetleges malária fertőzés stádiumának megállapítására.



5.1. ábra. Bal panel: Különböző koncentrációjú hemozoin oldatok lineáris dikroizmus spektruma a fény terjedésére merőleges irányú B=400mT nagyságú mágneses térben. Jobb panel: A megfelelő koncentrációkkal normált spektrumok egybeesése világosan mutatja, hogy az effektus a koncentráció lineáris függvénye.

5.2. Az effektus mágneses tértől való függése

A mágneses tértől való függés vizsgálatához és a kristályok mágneses anizotrópia faktorának ($\chi_z - \chi_y$) meghatározásához több hullámhosszon is megmértem az kettőstörő effektus értékét a mágneses indukció nagyságának függvényében a legnagyobb töménységű, $c = 56\mu g/ml$ hemozoin szuszpenzión (azaz rögzített koncentrációval, különböző hullámhosszakon vizsgáltam a térfüggést). Ehhez egy sínen mozgattam rúdmágnest, és a mágnes-minta távolságokat a rúdmágnesre korábban meghatározott kalibrációs görbébe helyettesítve meghatároztam a szuszpenzióban a fókuszált fényfolt helyén a mágneses indukciót. A különböző hullámhosszakon mért görbéket közös grafikonon ábrázoltam a mágneses indukció függvényében (5.2 ábra). A grafikonról megállapítható, hogy a különböző hullámhosszon mért görbék jellege hasonló. A megfigyelt dikroizmus kis mágneses terek mellett lineárisnál magasabb hatványkitevővel növekszik, majd egy inflexiós pont után nagy terekre az effektus telítődés felé tart. Ez a tapasztalat értelmezhető, ha a tűszerű kristályok mágneses tér irányába való orientációjára gondolunk. Amennyiben a mágneses tér növelése miatt a kristályok mágneses anizotrópia energiája sokkal nagyobbá válik, mint a kristályok rendjét szétzilálni igyekvő k_BT hőmozgásból származó energiajárulék, akkor lényegében teljes rendezettség alakul ki, a kristályok a térrel párhuzamosan állnak, és a polarizációs effektus eléri maximális értékét. Ennek alapján az az érzésünk, hogy a teljes kristály (10^6 db s=5/2-es vas spin) mágneses anizotrópia energiája a 0,1-1T tartományban válik összemérhetővé a k_BT termikus energiával. Ezt a kérdést kvantitatívan is megvizsgálom.



5.2. ábra. Különböző hullámhosszakon mért lineáris dikroimus a mágneses indukció függvényében.

A mágneses térfüggést leíró görbék elemzéséhez a $\Delta T/T$ értékeket (3.26)-nek megfelelően átszámítottam Δn értékekre, majd a 5.3 ábrán külön-külön ábrázoltam a különböző hullámhosszakon végzett mérések adatait. A telítődésre jellemző (inflexiós pont utáni) mérési tartományra (|B| > 250mT) elvégeztem a (3.24) egyenlet szerinti nagy terekre érvényes görbe illesztését. Az illesztésben két független paraméter (G és K) szerepel:

$$\Delta n = G * \left(1 - \frac{3}{2KB^2 - 1}\right).$$
(5.1)

Láthatóan *G* egy skálafaktor (ami hullámhosszfüggő), míg a térfüggés jellegéért K felelős. Ezen paramétereket az illesztés során minden hullámhosszra meghatároztam. A fenti képlet, valamint (3.24) egyenlet összevetésével a keresett egy kristályra értelmezett optikai és mágneses anizotrópia faktorok az illesztési paraméterekkel kifejezve:

$$g_y - g_z = \frac{n}{2\pi C_V} G,\tag{5.2}$$

$$\chi_z - \chi_y = 2k_B T \mu_0 K. \tag{5.3}$$

A különböző hullámhosszakon mért térfüggő görbékre kapott illesztési paramétereket a (5.3 ábra) tartalmazza. A kapott nagy mágneses terű illesztési paramétereket felhasználva a modell

segítségével (a dikroizmus (3.22) egyenletben szereplő kifejezését és a térfüggő orientáicófok (3.21) alakját használva) kiszámítottam a lineáris dikroizmus értékeit a teljes mágneses tér tartományra. Ezen elméleti görbét szaggatott vonallal ábrázoltam a grafikonon.



5.3. ábra. Különböző hullámhosszakon mért polarizációs effektus a mágneses indukció függvényében. A piros görbe a nagyterű illesztés eredménye, a kék szaggatott vonal az elméti görbét követi, mely a mágneses indukció teljes mérési tartományának diszkrét értékeinél van felvéve az illesztési paraméterekkel.

Az illesztett görbék láthatóan jól közelítik a mért eredményeket, ami megerősíti az elméleti feltételezések helyességét. A térfüggést leíró paraméterre az egyes hullámhosszakon nagy pontossággal ugyanazt az értéket kaptam: ($K = 7 \pm 0.15 \cdot 10^{-6}$). Ez azt jelenti, hogy a kristályok mágneses anizotrópia faktorát és azon keresztül orientáció fokát a kísérletben használt fény hullámhosszától függetlenül meghatározhatjuk annak köszönhetően, hogy a megfigyelt polarizációs effektus térfüggését csak a kristály mágneses jellemzői, míg hullámhosszfüggését az optikai tulajdonságai határozzák meg. Ha tehát (3.22) egyenlet értelmében az egyes hullámhosszakon mért $\Delta n(B, \lambda)$ spektrumokat elosztjuk a megfelelő $G(\lambda)$ értékkel, akkor hullámhosszfüggetlenül megkapjuk a kristályok $\Phi(B)$ orientáció fokának a mágneses indukciótól való univerzális függését, azaz a görbéknek a normálás után egymásra kell skálázódniuk. Ezt megvizsgálva ismét ellenőrizhetjük az elméleti megfontolások helyességét és az illesztés pontosságát. A $\Phi(B)$ orientáció fok függvényre a különböző hullámhosszakon kapott görbéket közös grafikonon (5.6 ábra) ábrázoltam. A grafikonon jól látható, hogy az orientáció fok valóban csak a mágneses indukció nagyságától függ.

5.4. ábra. A hemozoin kristályok orientáció fok függvényének mágneses tértől való függése különböző hullámhosszakon vizsgálva. Az orientáció fok függvény a kristályok hossztengelyének a mágneses térhez viszonyított helyzetét jellemző statisztikus eloszlás.

Ezen eredmény lehetővé teszi az oldott hemozoin kristály mágneses anizotrópiájának nagyságrendi becslését. A mágneses anizotrópia faktor meghatározása az illesztett K paraméterből számítható a (5.3) képlet alapján. A kapott $K = 7 \cdot 10^{-5}$ értéket felhasználva és a hőmérsékletét T = 293K-nek véve egy hemozoin kristály hossztengely és erre merőleges irányú szuszceptibilitásának különbsége:

$$\chi_z - \chi_y \approx 7,11352 \cdot 10^{-25} m^3.$$
 (5.4)

Az itt kapott mérési eredményt vessük össze egy hemozoin kristály becsült átlagos paramágneses szuszceptibilitásával a Curie törvény felhasználásával. Ezen a ponton eltekintek az anizotróp mágnesezhetőség pontos tárgyalásától, melyet a [11] cikkben közölt Hamilton-operátor $(H = \beta BgS + D(S_z^2 - S(S + 1)/3))$ D egyion-anizotrópia tagjával jellemezhetünk, és melyet az operátor numerikus diagonalizálásával, vagy perturbatív közelítéssel számíthatjuk. A pusztán Curie-paramágnesség feltételezésével becsült átlagos szuszceptibilitás szobahőmérsékleten nagyságrendileg helyes eredményt szolgáltat, a pontosabb mágneses modell vizsgálata és mérési eredményeimre való illesztése közeljövőbeli terveim részét alkotják. Egy átlagos $(V_{kr} = 100x100x500nm^3)$ kristályon belül $N_{Fe} = 2 \cdot V_{kr}/V_{ec} \approx 7 \cdot 10^6$ darab Fe^{III} ion található, melyek S=5/2-es spin momentummal rendelkeznek. A szuszceptibilitás kifejezése:

$$\chi = N_{Fe} \frac{(g\mu_B)^2 S(S+1)}{3k_B T} \mu_0, \tag{5.5}$$

ahol g a Landé faktor, mely elektron spinre g=2 értéket vesz fel, μ_B a Bohr magneton (SI mértékrendszerben), k_B a Boltzmann állandó és μ_0 a vákuumpermeábilitás.

Ezen értékeket felhasználva a hemozoin becsült paramágneses szuszceptibilitása szobahőmérsékleten:

$$\chi = 2,23 \cdot 10^{-24} m^3 \pm 50\%,\tag{5.6}$$

Az ily módon becsült átlagos szuszceptibilitás $\chi = \frac{\chi_z + \chi_y}{2}$, körülbelül háromszorosa a két irányra jellemző szuszceptibilitás értékek különbségének, azaz a mágneses anizotrópia $\frac{\chi_z - \chi_y}{\chi} \approx \frac{1}{3}$. A számítás legnagyobb bizonytalanságát a kristályok méretének durva becslése okozza. Itt hasonlóan előállított kristályok irodalomban közölt méretét vettem alapul [8]. Ez a nagy anizotrópia teszi lehetővé, hogy – a hőmozgást legyőzve – a kristályokat már 1*T* mágneses térrel is rendezzük a szuszpenzióban. A mágneses anizotrópiából származó energiát a kristályban jelenlévő S=5/2-es spinek nagy száma (nagyságrendileg 10⁶) erősíti fel, mely így kisebb terekben is összemérhetővé válik a k_BT nagyságrendű termikus energiákkal.

A hemozoin kristályok átlagos szuszceptibilitásának kísérleti meghatározásához pormintán (mely immár a 2. szintézissel készült) SQUID-del (Superconducting Quantum Interference Device) mágnesezettség méréseket végeztem a mágneses térerősség függvényében (m(H), H = 0 - 50kOe) szobahőmérsékleten, valamint a hőmérséklet függvényében (H = 5kOe) állandó mágneses térerősség mellett (m(T), T = 5 - 300K). A porminta tömege 7,28mg volt, a hemozoin moláris tömege 1303,88g/mol, sűrűsége $\rho = 1,45g/cm^3$. A CGS egységrendszerben mért mágnesezettség átszámítása egyetlen kristályra vonatkoztatott szuszceptibilitásra m^3 egységekben a következőképpen lehetséges:

$$\chi^{SI}[m^3] = \chi_0^{SI} V_{kr}[m^3] = 4\pi \chi_0^{CGS} V_{kr}[m^3] = 4\pi \left(\frac{\Delta m}{\Delta H}\right)^{CGS} \frac{\rho[g/cm^3]}{m[g]} V_{kr}[m^3].$$
(5.7)

Az illesztés eredményeképpen az m(H) görbe meredekségére $1, 68 \cdot 10^{-7} \frac{emu}{Oe}$ adódik. Az (5.7) képletből – egy átlagos hemozoin kristály paramétereit behelyettesítve – az egy kristályra vonatkoztatott átlagos szuszceptibilitás értéke: $\chi = 2, 1 \cdot 10^{-24}m^3$, ami konzisztens a Curietörvényből számítással becsült értékkel. A bizonytalanságot az előző számításhoz hasonlóan itt is a kristályok átlagos térfogatának becslése okozza.

5.5. ábra. SQUID-del 300K-en mért mágnesezettség (emu) - mágneses térerősség (Oe) grafikon. Az illesztett egyenes meredekségéből az egy kristályra értelmezett szuszceptibilitás számítható.

A Curie-törvény érvényességének teljesülését a mágnesezettség hőmérséklet függésével vizsgáltam pormintán. A mérési adatpontokra a Curie-Weiss törvény alapján görbét illesztettem: $m = m_0 + A \frac{1}{T-\Theta}$, (ahol Θ paraméter az elektronok közti gyenge kicserélődési kölcsönhatást jellemzi). A minta tömegét és sűrűségét ismerve (lásd m(H) mérés), kiszámítotottam a vas ionok számát a mintában: $N = 2 \frac{m}{M} N_A = 6, 7 \cdot 10^{18}$, ahol a 2-es szorzó az elemi cellában található két vas ion miatt szerepel a képletben. Az illesztett görbe A paraméteréből számolható az S(S+1) értéke, melyet összevetve a vas ionok 5/2-nek feltételezett spin abszolútértékével, megállapítható a Curie-törvény pontossága.

$$m^{CGS} = N \frac{\mu_B^2 g^2 S(S+1)}{3k_B (T-\Theta)} H^{CGS}$$
(5.8)

$$S(S+1) = A \frac{3k_B}{N \cdot g^2 m u_B^2 H}.$$
(5.9)

Az illesztés paraméterei: $A = 0,25721(emu \cdot K), m_0 = -1,54039 \cdot 10^{-4}(emu), \Theta = -2,4K$ (ami gyenge antiferromágneses kölcsönhatásra utal a spinek között). Az (5.9) egyenlet alapján S(S+1) számított értéke 9,42, ami viszonylag jó egyezést mutat a várt 8,75-os értékkel. A modell természetesen jelentős korrekcióra szorul, mégis az ezzel becsült szuszceptibilitás jól közelíti a valóságban pormintán mért átlagos szuszceptibilitást, a mágneses anizotrópiára adott becslés tehát – legalább is nagyságrendileg – helyes.

5.6. ábra. SQUID-del mért mágnesezettség - hőmérséket grafikon 5000 Oe mágnesező tér mellett. Az adatpontokra a Curie-Weiss törvény alapján illesztettem görbét. A belső grafikonon a mágnesezettség – az előző illesztés alapján – az 1/(T + 2, 4K) függvényében szerepel.

Ezen dolgozat készítése közben párhuzamosan SQUID-es méréseket folytatok olyan zselatinba ágyazott hemozoin szuszpenziókon, melyekben a kristályok orientációját a gélesedés előtt nagy mágneses térben rendeztem. Az ily módon fixálódott orientációjú kristályok mágnesezettségét a rendező térrel párhuzamos és merőleges irányban megmérve a mágneses anizotrópia értékére közvetlen eredményt kapunk. A szobahőmérsékletű, valamint a hőmérsékletfüggő mérések kiértékelésével és a mágneses anizotrópiát is figyelembe vevő Hamilton-operátor analízisével a mágneses anizotrópiára pontosabb becslést tervezek nyújtani.

5.3. Az optikai anizotrópia hullámhosszfüggésének mérése

Az optikai anizotrópiával arányos $G(\lambda)$ hullámhosszfüggésének univerzalitását, azaz mágneses tértől való függetlenségét ellenőriztem a legtöményebb, $c = 56 \mu g/ml$ koncentrációjú (1. szintézisből származó) hemozoin szuszpenzión. A mágneses indukció különböző értékei mellett megmértem a dikroizmus $\Delta T/T(B, \lambda)$ spektrumát (5.7 ábra). Ezen spektrumok csak egy térfüggő skálafaktorban különböznek egymástól, ami nagy terek esetén jól egyezik a korábban folytonos térfüggő mérések esetén kapott $\Phi(B)$ orientációfokkal (ez a (3.22) egyenletben megjelenő változók szeparált alakjából következik). A mért Δn spketrumok összeskálázásával éppen a (5.1) összefüggésben definiált $G(\lambda)$ optikai anizotrópiával arányos faktor spektrumát kapjuk (5.7 ábra). A (5.2) egyenlet alapján a mért $G(\lambda)$ spektrum a szuszpenzióra átlagosan jellemző $n(\lambda)$ törésmutató képzetes részének és C_V hemozoin térfogati koncentrációjának ismeretében átszámolható a hemozoin kristályokra jellemző optikai anizotrópia spektrumra. Mivel $n(\lambda)$ -ról nincs pontos információnk (a víz abszorpciója az ultraibolya tartomány felé rohamosan nő), másrészt – mint azt korábban említettem – nem csak dikroizmusról van szó, csak nagyságrandi becslést tehetünk a kristályok hullámhosszfüggő ($g_y - g_z$) anizotrópiájára, mely nagyságrandileg 10-100 között változik.

5.7. ábra. Bal panel: Különböző erősségű mágneses indukció mellett mért lineáris dikroizmus spektrum hemozoin szuszpenzión.

 $\Phi(B)$ -vel normálva a lineáris dikroizmus spektrumokat, az optikai anizotrópiát jellemző spektrumok egymásra skálázódnak. Az itt leolvasható mért G értékekből a közeg törésmutatójának (n) és a szuszpenzió ismert térfogati koncentrációjának (C_V) pontos ismeretében (5.2) alapján számítható a kristályra jellemző ($g_y - g_z$) optikai anizotrópia faktor, ami nagyságrendileg 10-100 között változik.

Megállapíthattuk tehát, hogy a hemozoin kristályok orientáció foka a mágneses indukció függvényében az elmélet alapján várt görbe szerint halad, valamint kiszámítottuk a hemozoin optikai anizotrópiájára jellemző spektrumot, melynek az egyes hullámhosszaknál mért értékei arányosak az egyes kristályok tényleges optikai anizotrópia faktorával. Ezen spektrum a külső mágneses tértől független, pusztán a kristályok optikai tulajdonságaitól függ.

5.4. Vérben szuszpendált kristályok vizsgálata

A hemozoin kristályok vízes szuszpenzióinak vizsgálatával kimutattam, hogy a mágnesesen indukált lineáris dikroizmus mérése alkalmas a hemozoin koncentráció kvantitatív meghatározására. Felmerül a kérdés, hogy mennyiben befolyásolja a detektálhatóságot, illetve a lineáris dikroizmus spektrumot, ha a közeg nevezetesen vér, illetve vérplazma, hiszen a valós diagnózisban eredendően ilyen feltételek adottak. Ezen méréseket már az újabb, 2. szintézisből származó mintákon végeztem.

Prof. Zelles Tivadar, a Semmelweis Egyetem Orálbiológiai Tanszékének professzora biztosított számunkra patkányból származó teljes vért és centrifugálással elválasztott vérplazmát, melyekből előállítottam a kívánt koncentrációjú hemozoin szuszpenziókat. A vérplazma 90%ban vizet tartalmaz, 10%-át a vízben oldott ionok és szerves molekulák teszik ki. A centrifugálás során a vérplazmában marad az ún. fibrinogén fehérje, mely a véralvadásban játszik szerepet. Ha a teljes vért hagyjuk megalvadni, a felszínen elkülönül az ún. vérsavó, vagy szérum, mely összetételében majdnem megegyezik a vérplazmával, de nem tartalmaz fibrinogént, így nem is alvad meg. A vérplazma és a szérum is teljesen áttetsző, ami vélhetőleg megkönnyíti a bennük lévő kristályok detektálását a teljes vérhez képest. Kontroll mérés gyanánt fiziológiás sóoldatba szuszpendált hemozoint használtam. Az azonos koncentrációjú ($10\mu g/ml$ -es), különböző közegben lévő minták spektrumát a (5.8 ábra) szemlélteti.

5.8. ábra. 2. szintézissel készült beta-hematin kristályok szuszpenziójának LD spektruma fiziológiás sóoldatban, teljes vérben és vérplazmában. Megfigyelhető, hogy a vérplazmában szuszpendált hemozoin detektálhatósága azonos a vízes közegbeli kristályokéval, azonban a vérben az érzékenység legalább harmadára csökken, továbbá 600nm-nél rövidebb hullámhosszakra a megnövekedő abszorpció miatt a detektált intenzitás drasztikusan leesik és a jel zajossá válik.

A lineáris dikroizmus spektrumokat elemezve megállapítható, hogy a spektrumok abszolút értéke és relatív zaja közel azonos fiziológiás só oldatban, illetve vérplazmában lévő hemozoin kristályokra, így a detektálás ugyanolyan érzékenységgel elvégezhető vérplazmában is, mint vízben. Ezzel szemben a teljes vérben szuszpendált kristályokon detektált jel amplitúdója kb. harmadára csökkent, ami a teljes vérben történő diagnózis érzékenységének csökkenéséhez vezet, továbbá 600nm-nél rövidebb hullámhosszakra a teljes vér abszorpciója drasztikusan megnő, így lecsökken a transzmittált intenzitás, ami a jel-zaj viszony erős romlását okozza.

A fenti eredmény tehát a következő tanulsággal szolgál: amennyiben elérhető, hogy a szervezetben keletkező hemozoin kristályok nagy részét egyszerű módszerekkel elválasszuk a vörösvértestektől, azaz a kristályok a vérplazmában, illetve a szérumban koncentrálódjanak, úgy a detektálás érzékenysége változatlanul jó maradhat. Ha azonban ez a szeparáció nem megvalósítható, akkor a detektálási küszöb legalább 3-szorosára nő. Teljes vérben a későbbi, monokromatikus fénnyel történő méréskor célszerű a vizsgáló lézer hullámhosszát úgy megválasztanunk, hogy arra vonatkozóan mind a vér transzmissziója, mind pedig a hemozoin mágnesesen indukált lineáris dikroizmusa elegendően nagy legyen. Ez a mérési tapasztalatok szerint a 650nm körüli hullámhossztartományra jól teljesül. A vérplazmából és szérumból kinyerhető hemozoin arányának meghatározása jövőbeli terveim részét képezi.

6. fejezet

Út a diagnosztika felé

6.1. Mágneses moduláció lehetősége

Az előző fejezetekben bemutatott nagy érzékenységű spektrométer használatával sikerült fényt deríteni a hemozoin kristályok alapvető mikroszkopikus tulajdonságaira, valamint bebizonyosodott, hogy a mágnesesen indukált lináris dikroizmus mérése pontos és kvantitatív eszköze lehet a malária diagnózisnak. A klinikai diagnosztikában azonban olyan berendezésre van szükség, amely az érintett, szegényebb területeken is alkalmazható, azaz olcsó alkatrészeket tartalmaz, könnyen, szakértelem nélkül kezelhető és egy diagnosztikai mérés költsége elenyésző. A hemozoin kristályok alapvető mágneses és optikai tulajdonságairól szerzett ismereteim birtokában egy új mérési módszert fejlesztettem ki azok magneto-optikai kimutatására. A módszer teszteléséhez összeállítottam egy berendezést, mely ugyanazon effektus (a mágnesesen indukált lineáris dikroizmus) alapján képes detektálni a hemozoint, azonban a polarizáció modulációt – a költséges PEM használatát kiküszöbölve – az eddigiektől eltérő elven valósítottam meg. Az alábbi fejezetben ezt a technikát mutatom be, majd az újonnan épített berendezéssel végzett tesztmérések eredményeit részletezem.

Amint azt a méréstechnikáról szóló fejezetben kifejtettem, a polarizáció moduláció nagy érzékenységű módszer a polarizációs effektusok kimutatására. Az eddigiekben ezt a célt egy fotoelasztikus modulátor látta el, mely a sztatikus térben rendezett (a hőmérsékleti fluktuációktól eltekintve) sztatikus kristályokra eső fény polarizációs állapotát változtatta meg periodikusan. Ehelyett a beeső fény polarizációját állandónak tartva, a kristályokat használtam "forgó polarizátorként", orientációjukat időben periodikusan változtatva. A lineáris dikroizmus mágneses térfüggését vizsgálva kimutattam, hogy a kristályok – nagy mágneses anizotrópiájuknak köszönhetően – szobahőmérsékleten mintegy 1T mágneses indukciójú térrel a mágneses tér irányába rendezhetők. Ha a mágneses tér irányát változtatjuk, azzal a kristályok irányultsága is megváltozik. Tehát, ha létre tudunk hozni egy a mintatér körül forgó homogén és elegendően nagy indukciójú mágneses teret, megfelelő frekvencián forgatva azt, a kristályokat, mint forgó polarizátorokat képzelhetjük el, melyek periodikusan (a forgás frekvenciájának kétszeresével)

modulálják a bejövő polarizációnak megfelelő és arra merőleges polarizációs síkokban mérhető intenzitást. A kristályok dinamikájának részletesebb tárgyalása és annak kapcsolata az általam mért mennyiségekkel a 6.3. fejezetben található.

Tekintsük a 6.1 ábrán látható összeállítást. A vizsgáló fényt – melyet egy lézerdióda bocsát ki – a vízszinteshez képest 45 fokos síkban polarizáljuk, majd mérjük a mintán áthaladó nyaláb 0°-os és 90°-os polarizációjú komponensének intenzitását. Az egyes intenzitásokat egy kiegyenlített fotodióda-pár detektálja, melynek kimeneti differenciál erősítője a két intenzitás különbségét képezi, ily módon megszabadulva a lézerdióda intenzitásának fluktuációitól és az egyéb polarizációfüggetlen parazita effektusoktól. Amennyiben a vizszintes és függőleges polarizációval a mintára érkező fényre a transzmisszió megegyezik, a detektor kimenő jele zérus, így csak a mágnesesen generált lineáris dikroizmus eredményez véges különbségi jelet. A berendezésben a forgatható mágneses tér előállításához egy ún. Halbach geometriájú mágnest [17] építettem. A gyűrű alakú mágnes egyes szegmensei egymáshoz képest az óramutató járásával megegyező irányban elforgatott mágnesezettségű permanens (Nd) mágnesekből állnak. A cikkek mágnesezettsége a gyűrű körbejárása során kétszer fordul körbe. Ilyen elrendezésben a mágnesgyűrűn belül az egyes alkotó mágnesek viszonylag homogén és erős mágneses indukciót hoznak létre (1,2-1,3T), míg a gyűrűn kívül az indukció közel zérus ($B_{in} = B_{rem} \cdot ln(R_{out}/R_{in})$, ahol B_{rem} a FM anyagbeli remanens fluxussűrűség, R_{in} és R_{out} pedig a gyűrű belső és külső sugara). A mágnesgyűrűt villanymotorral forgatva a mintatérben fellépő mágneses indukció iránya az optikai tengely, azaz a fény terjedési iránya körül egyenletes frekvenciával forgatható.

Kövessük ismét végig a polarizáció megváltozását a fényúton a korábbi tárgyaláshoz hasonlóan Jones formalizmusban! A mintára eső fényben az elektromos térerősség vektora a fény terjedési irányára (x) merőleges (yz) tranzverzális altéren:

$$\mathbf{E}_{\mathbf{0}} = \begin{pmatrix} 1\\1 \end{pmatrix}. \tag{6.1}$$

Tegyük fel, hogy a mintában szuszpendált állapotban lévő kristályok a mágneses indukció irányával minden időpillanatban párhuzamos irányban állnak be (vagy állandó fázissal lemaradva követik azt). Ekkor a vízszinteshez képest $\phi(t) = \omega t$ szögben orientált kristályok transzmissziós mátrixát a kristályok saját bázisában felírt transzmissziós mátrix elforgatottjaként számíthatjuk:

$$S = \begin{pmatrix} \cos(\phi(t)) & -\sin(\phi(t)) \\ \sin(\phi(t)) & \cos(\phi(t)) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} t_y e^{i\theta_y} & 0 \\ 0 & t_z e^{i\theta_z} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(\phi(t)) & -\sin(\phi(t)) \\ \sin(\phi(t)) & \cos(\phi(t)) \end{pmatrix}$$
(6.2)

A mintán áthaladó fény vízszintes és függőleges polarizációjú komponensét egy Rochon prizma választja szét térben. A detektorok helyén fellépő térerősség:

$$\mathbf{E}_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0\\ 0 & 0 \end{pmatrix} S \mathbf{E}_0. \tag{6.3}$$

6.1. ábra. A forgó mágneses terű összeállítás sematikus ábrája. A 45 fokban polarizált lézerfény a forgó mágneses térben orientált kristályokon transzmittálódik, majd a Rochon prizmával szétválasztott vízszintes és függőleges polarizációjú komponensek intenzitásának különbségét detektáljuk egy kiegyenlített fotodióda híd segítségével. A frekvenciaszelektív és fázisérzékeny mérést lock-in erősítő végzi.

$$\mathbf{E}_2 = \begin{pmatrix} 0 & 0\\ 0 & 1 \end{pmatrix} S \mathbf{E}_0. \tag{6.4}$$

A fotodetektorok tehát az alábbi intenzitásokat érzékelik (a fény frekvenciájának megfelelő intenzitás oszcillációt a detektor nem képes követni, ezért az kiátlagolódik):

$$I_{1,2} \propto |\mathbf{E}_{1,2}|^2$$
 (6.5)

A mátrixszorzások és a abszolútérték négyzetre emelés elvégzésével a fotodiódapár érzékelői által mérhető intenzitások:

$$I_{1,2} = \frac{1}{2}(t_y^2 + t_z^2) \pm \frac{1}{2}(t_y^2 - t_z^2)\cos 2\phi(t) - \frac{1}{2}(t_y^2 - t_z^2)\sin 2\phi(t) \mp \frac{1}{4}(t_y^2 + t_z^2 - 2t_yt_z\cos\Delta\Theta)\sin 4\phi(t),$$
(6.6)

ahol $\Delta \Theta = \Theta_y - \Theta_z$. A két intenzitás különbsége, a kristályok szögének időfüggését behelyettesítve:

$$\Delta I = I_2 - I_1 = (t_z^2 - t_y^2) \cos 2\omega t - \frac{1}{2} (2t_y t_z \cos \Delta \Theta) \sin 4\omega t.$$
(6.7)

A fenti képletből kvantitatívan is tükröződik az az intuitív feltevés, hogy a transzmittált intenzitásban a forgatás frekvenciájának kétszeresével jelenik meg a lineáris dikroizmus. Mérjük ugyanis például az I_1 intenzitás dc komponensét egy voltmérővel (elegendően nagy modulációs frekvencia mellett, melyet az egyenáramú mérőműszer nem képes követni, ez egzaktul a dc komponenst adja vissza). A lineáris dikroizmus ekkor definíció szerint (3.14) kifejezhető a mért mennyiségekkel:

$$\frac{\Delta T}{T} \equiv \frac{|\tilde{t}_z|^2 - |\tilde{t}_y|^2}{2(|\tilde{t}_z|^2 + |\tilde{t}_y|^2)} = \frac{\Delta I_{2f}}{4I_{dc}},\tag{6.8}$$

ahol ΔI_{2f} a forgás frekvenciájának kétszeresére állított lock-in méréssel mérhető intenzitáskomponens, I_1 pedig az egyik fotodetektorra kötött dc voltmérő által mért érték.

6.2. A forgó mágneses elrendezés

Az előző fejezetben tárgyalt séma alapján optikai asztalon összeállítottam a forgó mágneses térrel modulált optikai elrendezést (6.2 ábra). A $\lambda = 635nm$ hullámhosszúságú fényt egy lézerdióda (1) bocsátja ki. Ezt a fényt egy polarizátor (2) a vízszinteshez képest 45°-ban polarizálja. Ha a – minta nélküli – fényútban jelen van kettőstörő, vagy dikroikus elem, a polarizátor szögének forgatásával a fotodiódapár különbségi jelét kinullázva, ezek polarizáció forgatása kiküszöbölhető, és a méréskor csak a mágnesesen indukált lineáris dikroizmus hatását észleljük.

A Halbach mágnest (3) 16 db neodímium mágneskorongból vízsugaras vágással kivágott körcikkből ragasztottam egymáshoz. A mágnesgyűrű egy – a tanszék műhelyében gyárttatott – rézperselybe illeszkedik további rögzítés és a csapágyazás céljából. A persely külső peremére szorítható a csapágysor, melynek álló része a külső, teflonból készült gyűrűhöz rögzíthető. A belső, forgó részhez rögzített mágnes így egy villanymotor (4) segítségével forgatható egy O-gyűrű közvetítésével. A motort egy Delta tápegységen keresztül számítógéppel vezéreltem. Tesztméréseim során különböző villanymotorok és áttételek segítségével a 0,1Hz-150Hz tarto-mányban változtattam a motor frekvenciáját. A mágnesgyűrű egyik oldalának felülete 4 egyenlő körcikkben fekete-fehér színezéssel van ellátva, aminek köszönhetően a gyűrűvel szemben elhe-lyezett reflexiós optokapu (6) 5V-os (TTL) négyszögjelet szolgáltat a mágnes fordulatszámának kétszeres frekvenciájával. Ez a négyszögjel szolgál a lock-in erősítő referencia bemenetéül.

A mintán áthaladó fény vízszintes és függőleges polarizációjú komponensét egy Rochon (7) prizma választja ketté vízszintes síkban (a Rochon prizma azonos a spektrométerben felhasznált eszközzel). A térben szétválasztott nyalábok a kiegyenlített fotodióda pár (8) érzékelőire esnek. A készülék beépített elektronikája egy 30x-os műveleti erősítőt tartalmaz, mely a két detektor által mért intenzitások különbségével arányos feszültséget állít elő. Ez a kimenet csatlakozik a lock-in erősítő bemenetére, mely a referencia jellel (2f) azonos frekvenciát szelektálja. Ezen kívül az 1-es fotodióda jelét egy Keithley típusú dc voltmérővel mértem, melyen a legnagyobb, 100 pontos átlagolást állítottam be a modulációból származó alacsonyfrekvenciás időfüggő jelek kiszűrése érdekében.

6.2. ábra. A megvalósult forgó mágneses elrendezés. 1. lézerdióda $\lambda = 635nm$ 2. polarizátor (45°) 3. forgómágnes 4. villanymotor 5. mintatartó (2,3cm fényút) 6. reflexiós optokapu 7.Rochon prizma 8. kiegyenlített fotodióda híd

A mintatartó (5) egy teflon henger, két végén üvegablakkal ellátva, mely a mágnesgyűrű közepébe illeszthető úgy, hogy azzal a mágnes forgását nem akadályozza. A két üvegablak közötti távolság, azaz a mintatartóban a fényút 2,3cm. A hemozoin kristályok vízes szuszpenzióját injekciós tűvel lehet a mintatartóba fecskendezni.

A mérés automatizálásához mérőszoftvert készítettem, mely lépteti a motor frekvenciáját, beolvassa ezen frekvencia második harmonikusával mért jelet a lock-in erősítőről, és ezt a Keithley voltmérő által mért dc feszültséggel normálja. Ily módon az egyes hemozoin szuszpenziók lineáris dikroizmus válaszát mértem a mágneses tér kétszeres forgatási frekvenciájának függvényében a (6.8) képletnek megfelelő módon.

6.3. Mérési eredmények, a berendezés érzékenysége

Az elkészült berendezés minősítéséhez tesztméréseket végeztem különböző koncentrációjú, vízben szuszpendált hemozoin mintákon. A mérések során széles, mintegy 5 nagyságrendet átfogó koncentráció tartományt vizsgáltam. A legtöményebb szuszpenzió $30\mu g/ml$ -es, míg a leghígabb 0, 5ng/ml-es koncentrációjú volt. Ez utóbbi egy nagyságrenddel a ma legpontosabb módszerekkel kimutatható küszöb (5ng/ml) alatt található.

A különböző koncentrációjú hemozoin szuszpenziók LD amplitúdójának és fázisának frekvenciafüggését a (6.3 ábra) tartalmazza. Az egyes görbéket a hozzájuk tartozó koncentrációval normáltam. Jól látható, hogy a normált görbék viszonylag jól egymásra skálázódnak. Az eltérést főként a koncentrációk bemérési pontatlansága okozza (vegyük figyelembe az 5 nagyságrendnyi terjedelmet az átfogott koncentráció tartományban, összehasonlítva a spektrométeres mérés 1 nagyságrendjével). A lineáris koncentrációfüggés teljesülése meggyőző bizonyíték a mérés pontosságára. Megfigyelhető, hogy a legkisebb mért koncentráció (0, 5ng/ml) is még biztonságosan kimutatható. Ezen eljárás tehát rendkívül érzékeny eszközt kínál a malária pigmentek detektálására, így alkalmas lehet a klinikai diagnosztikai felhasználásra.

6.3. ábra. Bal panel: Hemozoin szuszpenziók koncentrációval normált lineáris dikroizmusa $(\Delta T/T)$ a mágnes forgatási frekvenciájának kétszerese függvényében. A szuszpenziók 5 nagyságrendnyi koncentrációtartományt fednek le, a 0,5 ng/ml-es koncentráció is még jó biztonsággal kimutatható. A görbék jellegzetes frekvenciamenete a kristályok közegbeli dinamikájának eredménye.

Jobb panel: Hemozoin szuszpenziók lineáris dikroizmus jelének fázisa a mágnes forgatási frekvenciájának kétszerese függvényében. Jól látható, hogy a széles koncentráció tartomány ellenére a mért jel fázisa független a koncentrációtól és jól reprodukál a különböző mérések során.

A nagyobb töménységű szuszpenziók lineáris dikroizmus válaszát megmértem több motor segítségével szélesebb forgatási frekvencia tartományon is. A rendszer frekvenciafüggő válaszának amplitúdóját és fázisát a (6.4) grafikonok ábrázolják.

6.4. ábra. 0,3 $\mu g/ml$ koncentrációjú hemozoin szuszpenzió lineáris dikroizmus amplitúdó és fázis válasza a motor kétszeres frekvenciájának függvényében (logaritmikus skála). Az effektus 1 Hz alatt frekvenciafüggetlen, magasabb frekvenciákon drasztikusan csökken, mivel a kristályok nem képesek követni a mágneses tér forgását.

A jellegzetes frekvenciafüggést kvalitatívan megérthetjük, ha elképzeljük a folyadékban szuszpendált kristályok mozgását a külső forgó mágneses térben. A mágneses indukció sztatikus esetben meghatározza a kristályok orientációjának eloszlásfüggvényét (lásd: 3.2. fejezet). Periodikus forgatás esetén a rendszer egy gerjesztett rezgéssel analóg, melyben a gerjesztett paraméter a kristályok orientációjának szöge, a gerjesztés a mágneses indukció által a kristályokban indukált mágneses momentumra ható nyomaték, míg a közegellenállás csillapításként jelenik meg. A fázisérzékenyen mért lineáris dikroizmus amplitúdója és – a gerjesztéshez képesti – fázisa lényegében a rendszer komplex válasza ezen gerjesztésre. A fentiek mellett a Brownmozgás egy Langevin-féle zajjal modellezhető egy a kristályok forgását leíró sztochasztikus differenciálegyenletben:

$$\Theta \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = [\mathbf{m}(\phi) \times \mathbf{B}]_z - k \frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathcal{M}(t) = \frac{B^2}{\mu_0} V(\chi_{zz} - \chi_{xx}) \sin\left(4\pi f t - 2\phi\right) - k \frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathcal{M}(t),$$
(6.9)

ahol Θ a kristályok tehetetlenségi nyomatéka, Φ az orientáció szöge, M pedig a Langevinzaj, mely a Brown-mozgásból származik.

Anélkül, hogy a fenti egyenletet numerikusan, vagy az egyenlet linearizálásával megoldanánk, a rendszer viselkedése szemléletesen megérthető. Kis frekvenciákon a kristályok jól tudják követni a mágneses tér változását, lényegében együtt forognak a mágnessel. Ilyenkor a lineáris dikroizmusban maximális amplitúdót mérhetünk (dc határeset) a forgatási frekvencia kétszeresével. Nagyobb fordulatszámon először fáziskésés lép fel a kristályok orientációja és a mágneses indukció iránya közt. Ezen fáziskésés azonban nem befolyásolja az amplitúdó nagyságát, hiszen a kristályok még mindig a gerjesztő frekvenciával forognak, csak egy bizonyos szöggel lemaradva a mágneses térhez képest. Egy kritikus frekvencia után ezzel szemben már nem tudják követni a mágneses indukció forgását, innentől erősen csillapított rezgést végeznek ($\Phi(t) \approx \Phi_0(f) \cos(2\pi ft + \Theta(f))$), melynek amplitúdója, és ezzel a lineáris dikroizmus abszolút értéke a fordulatszám növelésével drasztikusan csökken.

A rendszer modellezéséhez a – Langevin-tagot elhagyva – analitikusan vizsgáltam a differenciál egyenletet alacsony frekvenciás határesetben, ám az a feltételezett geometriai paramétereket és a korábbiakban illesztett szuszceptibilitás anizotrópiát felhasználva a mértnél jóval nagyobb levágási frekvenciát jósol, ezért a megoldást itt külön nem részletezem. A hőmérsékleti fluktuációk modellezését a későbbiekben numerikus szimulációval tervezzük megoldani. Jelen dolgozat célja azonban első sorban a diagnosztika lehetőségének vizsgálata volt, melyet – érzékenység tekintetében – pozitív eredménnyel zárhatunk, és megállapíthatjuk, hogy a módszer alkalmas lehet klinikai használatra.

Mindazonáltal hátra van még egy igen lényeges kérdés megválaszolása: kimutathatók-e a vérben lévő hemozoin kristályok ezen módszerrel? Előzetes próbálkozásaink ezen a téren egyelőre nem jártak sikerrel, mivel a mintatartóban megtett fényúton a lézerdióda fénye nem jut át teljes vérben. Egy megoldásnak kínálkozik a vér vízzel való hígítása. A valóságban mindenképpen szükség van a vörösvértestek hemolízisére (a hemoglobin kiszabadulása a vörösvértestből a vörösvértest membránjának sérülésekor), hogy az esetlegesen a vértesten belül felhalmozódó kristályok is kijussanak a plazmába. A hemolizálást nagyon gyakran éppen desztillált víz hozzáadásával (10-20-szoros hígítással) érik el. Ez megoldást nyújt az átlátszóságra, ugyanakkor koncentrációvesztést, így az érzékenység romlását okozza. Megvizsgáltam, hogy hígított vérben mi az a hemozoin koncentráció, ami még jó biztonsággal kimutatható, és ez a hemolizálást követő, a vér mintegy 20-szoros hígítása előtt mekkora koncentrációnak felelne meg egy betegnél (a szuszpenziók elkészítésénél eredetileg kis mennyiségű vízben elkevert kristályokat használtam, ezért a valódi hígítás 20-nál némileg több – lásd (6.5 ábra) feliratait). Felvettem a különböző töménységű, vérből készített szuszpenziók lineáris dikroizmus amplitúdóját a motor frekvenciájának függvényében, majd azokat a megfelelő koncentrációkkal normáltam. Annak ellenőrzéseképpen, hogy a vér egyéb alkotói nem mutatnak-e hasonló effektust, készítettem egy hígított vérmintát, melybe nem tettem hemozoin kristályt, és ezen folyadék által szolgáltatott alapvonalat is megmértem. A (6.5 ábra) egy töményebb, $c = 0.03 \mu q/ml$ -es, és a leghígabb mérhető minta $c = 0,0012 \mu g/ml$ – koncentrációval normált – LD amplitúdóját tartalmazza, valamint a hemozointól mentes vérminta jelét, melyet az összehasonlíthatóság kedvéért szintén $c = 0,0012 \mu q/ml$ koncentrációval normáltam. Ezen koncentrációk – ha figyelembe vesszük a teljes vér hígulása miatti koncentrációvesztést – megfelelnének a fertőzött vér kiindulási $c = 0.67 \mu q/ml$ és $c = 0.025 \mu q/ml$ koncentrációjának. Ez utóbbi, még továbbra is a gyors diagnosztikai tesztek érzékenységi küszöbe ($c = 0, 06\mu q/ml$) alatt található, vagyis azok pontossága ilyen módon is felülmúlható, továbbá a kvantitatív mérés segítségével a betegség stádiumáról is információt kaphatunk.

6.5. ábra. $c = 0,03\mu g/ml$ és $c = 0,0012\mu g/ml$ koncentrációjú hemozoin szuszpenziók lineáris dikroizmus válaszának – koncentrációval normált – amplitúdója a motor kétszeres frekvenciájának függvényében. Megállapítható, hogy a hígabb szuszpenzió jele is jól elkülönül a tiszta (hemozoin nélküli) vízzel hígított alapvonaltól, és követi a töményebb szuszpenzióra jellemző frekvenciafüggést. Ezen szuszpenziót a tiszta vér 20,8-szoros hígításával állítottam elő, azaz a fertőzött vérben $c = 0,025\mu g/ml$ -es koncentráció még jó biztonsággal kimutatható ezzel az eljárással, ami felülmúlja a gyors diagnosztikai tesztek érzékenységét.

A grafikon adataiból kiderül, hogy a véralkotók jelenléte nem befolyásolja jelentősen a hemozoin által mutatott lineáris dikroizmus jelét, valamint a hemozoint nem tartalmazó hígított vérminta nem mutat mágnesesen indukált lineáris dikroimust. A legkisebb, biztosan mérhető koncentráció hígított vérben alacsonyabb, mint a gyors diagnosztikai tesztek érzékenységi küszöbe, bár a mérés ekkor már meglehetősen zajos. Az érzékenység növelése úgy lehetséges, ha a fertőzött vérből sikerül a hemoglobintól valamilyen módon megszabadulni, és a hemozoin kristályokat a vérplazmában, vagy szérumban elkülöníteni. A közeljövőben ezért azt vizsgálom meg, hogy a teljes vérbe szuszpendált hemozoin kristályok milyen hányada marad szobahőmérsékletű véralvadás és ülepedés során a felszínen keletkező átlátszó szérumban.

Amennyiben a vérben történő detektálás kérdése megoldódik, további lépéseket tervezek tenni a diagnosztikai berendezés fejlesztése irányában. A lock-in erősítőt és a dc voltmérőt kifejezetten az optimális mérési feltételek által behatárolt paraméterekre méretezett, egyszerű és olcsó elektronikával helyettesíteném. Ezek után minden lehetőség adott volna a berendezés prototípusának elkészítésére, és a klinikai tesztelésre.

7. fejezet

Eredmények, jövőbeni tervek

Munkám során összeállítottam egy polarizáció moduláción alapuló magneto-optikai spektrométert, mellyel széles hullámhossztartományban ($\lambda = 170 - 1300nm$) megmértem szintetikus úton előállított malária pigment (hemozoin) vízes szuszpenzióinak mágnesesen indukált lineáris dikroizmus spektrumát. A látható tartományon belül több csúcs is megfigyelhető a spektrumban, mely a hemozoin kristályokra jellemző, így egy több komponensű oldatban (pl. vér) lehetőséget biztosíthat a hemozoin azonosítására. Ezen felül a csúcsok pontos helyének ismerete fontos a maximális érzékenység elérésének érdekében. A dikroizmus spektrumok különböző töménységek mellett történő mérésével megbizonyosodtam róla, hogy a jelenség a koncentráció lineáris függvénye, így mérése alkalmas lehet a malária fertőzés stádiumának megállapítására, tehát megalapozott egy ilyen elven működő orvosi diagnosztikai eszköz fejlesztése. A gyakorlatban ennek megvalósítására egy egyszerűbb és olcsóbb, mágneses moduláción alapuló megoldás tűnik a legmegfelelőbbnek. Tesztméréseim során kiderült, hogy egy ilyen eszköz pontossága meghaladhatja az orvosi gyakorlatban ma használt diagnosztikai eljárásokét. A közeli jövőben ezen berendezés továbbfejlesztését tervezem.

Megvizsgáltam a hemozoin szuszpenziók optikai viselkedését a mágneses tér függvényében. A mérési eredmények amellett, hogy kiváló egyezést mutattak a modell számításokkal (jó példa erre a kristályok orientációjának térfüggése), lehetőséget biztosítottak a hemozoin kristályok alapvető tulajdonságainak, a mágneses és optikai anizotrópiának kvantitatív meghatározására. A tapasztalatom az, hogy a hemozoin kristályok nagy mágneses anizotrópiájuknál fogva $(\frac{\chi_z - \chi_y}{\chi} \approx 1/3)$ a külső mágneses térrel könnyen rendezhetőek a szuszpenzióban. Többek között ez a jelenség nyújthat lehetőséget a hemozoin minden más véralkotótól független kimutatására mágneses modulációt használva.

Jelenleg több irányban is kutatásokat folytatunk a hemozoin mágneses tulajdonságainak még alaposabb feltérképezése érdekében. Először is nagy töménységű hemozoin szuszpenziókat készítettem, melyeket erős mágneses térbe helyezve zselatinnal begélesítettem, ezzel fixálva a kristályok orientációját. Ezen géleken dr. Kiss László Ferenc segítségével az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontban végzünk mágnesezettség méréseket, melyekből pontos és független becslést várunk a mágneses anizotrópiára, valamint annak hőmérsékletfüggésére. A mágneses térben rendezett mintákat továbbá elektronmikroszkópos mérésekkel szeretném vizuálisan is megjeleníteni, ezáltal választ kaphatunk arra a kérdésre, hogy a rendeződés valóban a tűszerű kristályok egyirányú állását jelenti, vagy csak kristálytani értelemben, az elemi cellák rendeződnek egy irányba, és ez az irány független a morfológiailag kijelölt hossztengelytől. Ez utóbbi esetben a lineáris dikroizmus kizárólagos okának a kristálytani (elektronikus) anizotrópiát tulajdoníthatnánk. Ugyanezen célból a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének együttműködésével optikai csipeszes és konfokális mikroszkópos méréseket végzünk hemozoin szuszpenziókon illetve géleken.

Ezen kívül szeretném behatóbban megvizsgálni a hemozoin kristályok dinamikáját folyadékokban, mágneses forgatás hatására. Ehhez elvégeztem a lineáris dikroizmus frekvenciaválaszának mérését különböző viszkozitású közegekben (aceton, víz, metilalkohol, propanol), és a várakozásoknak megfelelően a kisebb viszkozitású folyadékokban a levágási frekvencia magasabb értékek felé tolódik, megfelelően annak, hogy a kisebb csillapítás hatására a kristályok jobban tudják követni a mágneses tér forgását. Az eredmények kvantitatív értelmezésére numerikus számolásokat tervezek elvégezni.

A diagnosztikát tekintve a legaktuálisabb probléma a vérben történő detektálás megoldása. A közeljövőben kísérletet fogok tenni a hemozoin kristályok szérumban történő elkülönítésére. Ez után nyílna lehetőség a diagnosztikai berendezés további fejlesztésére, egy prototípus elkészítésére.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Kézsmárki Istvánnak a kutatásban való iránymutatásaiért és rendkívüli segítőkészségéért.

Köszönet Dr. Tátrainé Szekeres Erzsébetnek a hemozoin kristályok előállításáért, Prof. Zelles Tivadarnak a vérminták biztosításáért és a konzultációkért, Dr. Bóta Attilának az elektronmikroszkóp rendelkezésünkre bocsátásáért és Dr. Kiss László Ferencnek a SQUID mérésekben való közreműködéséért.

Köszönet illeti Szaller Dávidot és Kocsis Vilmost a spektrométer mérőszoftverének fejlesztéséért. Köszönöm Bordács Sándornak a konzultációk során nyújtott hasznos tanácsait. Végül külön köszönöm Orbán Ágnesnek a kísérletekben való segítségét, mellyel nagyban hozzájárult a hatékony munkához.

Függelék

A spektrométerben felhasznált optikai elemek adatai

Fényforrások		Hullámhossztartomány	
	75W Xe	200-800nm	
	100W Halogén	800-1300nm	
Lencsék	Suprasil3		
sorszám	d(mm)	f(mm)	
1	70	80	
2	70	260	
3	25,5	100	
4	25,5	50	
5	25,4	50	
6	25,4	50	
Rácsos spektrométer	Newport-Oriel 74100		
	Hullámhossz(nm)	Rács száma	
	200-320,07	1	
	320,07-640,07	2	
	640,07-1300	3	
Szűrő			
	Hullámhossz(nm)	Szűrő száma	
	0-180	nincs szűrő	
	180-320,07	1	
	320,07-430,07	2	
	430,07-640,07	3	
	640-07-840,07	4	
	840-1300	5	
PEM	PEM-90 i/FS50		
Polarizátor	Rochon prizma, BBO (190-3500nm)		
Detektor		Hullámhossztartomány (nm)	
	PMT	180-800	
	InGaAs	700-1800	

Irodalomjegyzék

- [1] WHO World Malaria Report 2008 [http://www.who.int/malaria/wmr2008]
- [2] J.A. Patz1, M. Hulme, C. Rosenzweig, T.D. Mitchell, R.A. Goldberg, A.K. Githeko, S.Lele, A.J. McMichael, D. Le Sueur: Nature 420 (2002) 627-628
- [3] D.M. Newmann, J. Heptinstall, R.J. Matelon, L. Savage, M.L. Wears, J. Beddow, M. Cox, H.D.F.H. Shallig, P.F. Mens: Biophysical Journal, 95 (2008) 994-1000
- [4] P.M. O'Neill, P.G. Bray, S.R. Hawley, S.A. Ward, B.K. Park: Pharmacol. Ther. 77 (1998) 29-58
- [5] S.R. Vippagunta, A. Dorn, R.G. Ridley, J.L. Vennerstrom: Biochimica et Biophysica Acta 1475 (2000) 133-140
- [6] G.A. Targett, B.M Greenwood: Malaria Journal, 7 (2008) (Suppl 1):S10
- [7] S. Pagola, P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar, S.K. Madsen: Nature 404 (2000) 307-310
- [8] G.S. Noland, N. Briones, D. J. Sullivan Jr. Molecular and Biochemical Parasitology 130 (2003) 9199
- [9] T.J. Egan: Journal of Inorganic Biochemistry 91 (2002.) 19-26.
- [10] D. S. Bohle, P. Debrunner, P. A. Jordan, S. K. Madsen, C. E. Schulz: J. Am. Chem. Soc.
 120 (1998) 8255-8256
- [11] A. Sienkiewicz, J. Krzystek, B. Vileno, G. Chatain, A. J. Kosar, D. S. Bohle, L. Forró : J. Am. Chem. Sos. 128 (2006) 4534-4535
- [12] A.F.G. Slater, W.J. Swiggard, B.R. Orton, W. D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami, G.B. Henderson: Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88 (1991) 325-329
- [13] M. Jaramillo, M. Bellemare, C. Martel, M.T. Shio, A.P. Contreras, M. Godbout, M. Roger,E. Gaudreault, J. Gosselin, D.S. Bohle, M. Olivier: Plos One 4 (2009)

- [14] L.D. Barron, Molecular light scattering and optical activity, Cambridge University Press, (2004).
- [15] C. T. O'Konski, K. Yoshioka, W.H. Orttung: J.Phys.Chem. 63 (1959) 1558-1565
- [16] Hinds Instruments (http://www.hindsinstruments.com/applications/polarization/dichroism/lineardichroism/)
- [17] Wikipedia http://en.wikipedia.org/wiki/Halbach_array