Imaging door huid en haar

Door Els van den Brink, Gepubliceerd in C2W Life Sciences op 29 september 2007

Proefdieren laten zich steeds beter in de kaart kijken. Met lasermicroscopie zijn zelfs intracellulaire processen zichtbaar te maken. Hiervoor moet er nog wel een trukendoos open. Sommige wetenschappers isoleren weefsel buiten het proefdier, anderen kijken liever door een raampje.

"Lasermicroscopie levert een verrassend hoge resolutie op van een paar honderd nanometer", vertelt Timo ten Hagen, onderzoeker aan het Erasmus MC in Rotterdam (afdeling Chirurgische Oncologie) en tevens verbonden aan het Optical Imaging Center aldaar. Daardoor kun je in levende muizen echt op orgaanniveau naar cellulaire processen kijken, bijvoorbeeld in tumoren of bloedvaten. "Met andere optische technieken zie je ergens op het lichaam van een muis wel fluorescentie, maar je kunt vaak niet zeggen vanuit welk orgaan het precies afkomstig is. De resolutie is dan maar een paar millimeter."
Lasermicroscopie is een relatieve nieuwkomer op het terrein van biologische *imaging*, zeker als het gaat om de beeldvorming van levende dieren. De twee belangrijkste technieken hiervoor zijn multifoton laser scanning microscopie en confocale laser scanning microscopie. In beide gevallen scant een laser punt voor punt het focale vlak (het 'plakje' dat je wilt bekijken) van een monster af. Daar veroorzaakt het laserlicht fluorescentie, dat goed te detecteren is. Hoewel de technieken werken volgens verschillende principes (zie kader), leveren ze uiteindelijk vergelijkbare plaatjes op.
Je hebt echter wel enige kunstgrepen nodig om levend weefsel of levende dieren met lasermicroscopie te bekijken. De lasermicroscoop kan namelijk niet al te diep in het lichaam kijken, de maximale indringdiepte ligt rond de 200 micrometer, sterk afhankelijk van de golflengte. Een deel daarvan gaat vaak al verloren door de harige muizenhuid. Bovendien ligt een muis nooit helemaal stil, zelfs al is hij onder narcose. Door zijn ademhaling en het kloppen van het hart is er in sommige lichaamsdelen altijd wel wat beweging. Creatieve oplossingen bedenken is dus het devies.
Om geen last te hebben van huid en haar zou je bijvoorbeeld het weefsel net voor de microscopische analyse uit een proefdier kunnen isoleren en het kunstmatig in leven kunnen houden. Op die manier lost Marc van Zandvoort van het Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM) van de Universiteit Maastricht bovengenoemde problemen op. Voor zijn onderzoek naar aderverkalking spant hij bloedvaten, vooral de aorta, tussen twee pipetten in een bakje met speciale vloeistof. Door er vervolgens een druk op te zetten die vergelijkbaar is met de normale bloeddruk, blijft het bloedvat levend en functioneel. Met verschillende fluorescente labels kan Van Zandvoort allerlei biologische processen zichtbaar maken, ook intracellulair. "We zijn nu bijvoorbeeld bezig om te meten hoeveel calcium en stikstofoxide in de verschillende cellen aanwezig is."
In een levend dier naar bloedvaten kijken, kan ook. "We moeten dan wel de halsslagader bestuderen in plaats van de aorta. Als we in de hals een stukje huid wegklappen, kunnen we de slagader direct bekijken en kunnen we dus ook een stukje dieper kijken", vertelt Van Zandvoort. Vanwege de kloppende bloedstroom gaat Van Zandvoort ritmisch te werk en maakt hij elke keer een plaatje op hetzelfde moment in de hartcyclus.

Raamzicht

De Rotterdamse onderzoeker ten Hagen heeft wel heel letterlijk een kunstgreep uitgevoerd om intravitale lasermicroscopie te kunnen toepassen. Hij gebruikt namelijk muizen die permanent een soort raampje met zich meedragen. Zo is de huidbarrière verdwenen en kan de onderzoeker perfect zien wat er onderhuids gebeurt. Ten Hagen bestudeerde daarmee bijvoorbeeld de werking van het chemotherapeuticum Doxil, oftwel doxorubicine verpakt in vetbolletjes (liposomen).
Fluorescente labels in de bloedvaten en de liposomen hielpen hem om te ontdekken dat Doxil heel wat minder efficiënt te werk ging dan altijd werd gedacht. De liposomen bleken zeer beperkt de tumor binnen te dringen, tenzij tegelijkertijd het eiwit *Tumor Necrosis Factor* α (TNFα) werd toegediend (zie afbeelding).

Door in te zoomen op intracellulair niveau ontdekte hij bovendien dat de liposomen in hun geheel door de tumorcellen werden opgenomen en daar pas doxorubicine vrijgaven, en dus niet buiten de tumorcellen zoals altijd werd gedacht. En dat terwijl lang niet alle tumorcellen door de liposomen worden bereikt. Zonder liposomaal omhulsel zou doxorubicine veel dieper de tumor binnen kunnen dringen. Dankzij de beschikbaarheid van verschillende fluorescente labels voor doxorubicine en de omhullende liposomen kon Ten Hagen dit tegenvallende werkingsmechanisme overtuigend aantonen. “We gaan nu liposomen maken die we gecontroleerd kapot kunnen maken voordat ze de tumorcellen ingaan”, vertelt hij.

Autofluorescentie

Kunstgrepen kun je ook uithalen aan de kant van de lasermicroscoop. Dan hoef je met de proefdieren verder geen trucs meer uit te halen, zo lieten Jonathan Palero en Hans Gerritsen van de sectie Moleculaire Biofysica aan de Universiteit Utrecht, zien. Er zijn dan zelfs geen fluorescente labels meer nodig.

Palero bouwde tijdens zijn promotieonderzoek een eigen lasermicroscoop volgens de multifotontechniek, met daarbij een kleurgevoelige detector. Daardoor kon hij van elk punt niet alleen de intensiteit van de autofluorescentie van het weefsel zelf meten, maar ook het lichtspectrum daarvan. “Bijna alle moleculen in de lichaamscellen geven wel een soort autofluorescentie, waardoor je niet per se fluorescentielabels nodig hebt”, legt Palero uit. “Alleen voor het DNA in de kern was de energie van de fotonen niet hoog genoeg om autofluorescentie te veroorzaken.”

Door de gegevens van alle spectra te vertalen in een bepaalde kleur, kon Palero duidelijke plaatjes maken van het huidweefsel van een levende muis. Zo kon hij niet alleen de haarzakjes en huidcellen zien, maar ook lagergelegen fibroblasten (bindweefselcellen) en collageen. In een biopt van een huidtumor kon Palero tumorcellen goed onderscheiden van andere cellen.

De Utrechtse promovendus was bovendien in staat om op basis van de autofluorescentiepatronen verschillende metabole processen te volgen. Een hoge dosis ketamine, een anestheticum dat bij hoge doseringen cytotoxisch is, bleek bijvoorbeeld het niveau van de energiedrager NAD(P)H drastisch te verlagen, waarschijnlijk doordat ketamine de cellen langzaam laat afsterven. Palero verwacht dat nog verder te kunnen uitwerken in een vervolgonderzoek naar huidtumoren.

Beperking

Feit blijft wel dat je met laserspectroscopie hooguit tweehonderd micrometer diep een levend wezen in kan kijken, eigenlijk alleen vlak onder de huid. Imaging expert Clemens Löwik, hoogleraar Endocrinologie aan het LUMC in Leiden, plaatst daarom wel een kritische kanttekening. “Je kunt onder de huid wel borstkankercellen implanteren, maar die groeien daar nooit zoals ze in hun normale omgeving doen. Medicijnen die bij zo’n getransplanteerde borsttumor goed lijken te werken, vallen in de praktijk vaak tegen”, geeft Löwik aan.

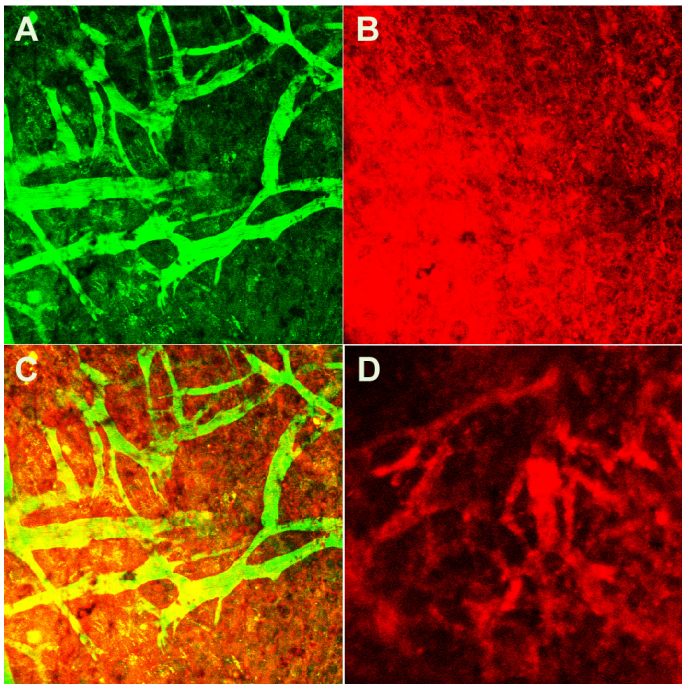
Misschien is dat ook wel de reden dat steeds meer onderzoekers tegelijkertijd hun ogen richten op een gecombineerde aanpak, zoals de combinatie van optische beeldvorming met MRI. Van Zandvoort gebruikt bijvoorbeeld *quantum dots* als fluorescente labels, waaraan hij ook een MRI-contrastmiddel koppelt. “Zo kunnen we met MRI zien waar de labels zich grofweg ophopen, terwijl we met microscopie details van de verdeling op cellulair niveau kunnen visualiseren”, vertelt hij. “Bovendien kunnen we dit gebruiken om betere MRI-contrastmiddelen ontwikkelen.”

Ook Ten Hagen is enthousiast over deze bimodale aanpak. “De combinatie van technieken wint enorme aandacht”, vertelt hij. “Optisch kun je bijvoorbeeld bepaalde structuren goed zien, terwijl je met MRI andere dingen zichtbaar kan maken, zoals de zuurstofspanning.” Hij vergeleek zelf bijvoorbeeld de beeldvorming van een tumor met MRI en met fluorescente bloedmarkers in een confocale lasermicroscoop. In de microscoop zag hij duidelijk een goed doorbloede tumor, terwijl met MRI alleen de omtrek van de tumor zichtbaar was. “Op basis van MRI had je kunnen concluderen dat de tumor bijna was verdwenen. Dan had je er dus flink naast gezeten”, geeft Ten Hagen aan.

Met al die kunstgrepen is de stap naar de kliniek voorlopig nog ver weg. Voor een iets andere imagingtechniek, de intraoperatieve imaging, is die stap onlangs al wel gezet, vertelt Löwik. Zelf heeft hij deze techniek alleen nog

bij proefdieren toegepast, maar binnenkort gaat hij in Boston meekijken bij de eerste operatie waarbij deze techniek ook bij mensen wordt gebruikt. “We spuiten daarvoor een fluorescent gelabeld antilichaam in, die precies de tumor aankleurt. Tijdens de operatie kan de chirurg dat zichtbaar maken, zodat hij precies weet waar hij moet snijden en wat hij wel en niet moet weghalen. Bovendien kunnen ook lokale lymfknoopmetastasen en micrometastasen aangetoond en verwijdert worden.”
Voor lasermicroscopie is het zo ver nog niet. Ten Hagen verwacht dat de techniek in de kliniek vooral endoscopisch zal worden toegepast, wat betekent dat het licht en de detector via een slangetje het lichaam ingaan. “Ik word steeds vaker gebeld door onderzoekers die daarmee aan de slag willen”, vertelt hij. Maar misschien laat de wijdverspreide klinische toepassing wel op zich wachten tot lasermicroscopen (die nu nog met alle bijbehorende onderdelen een kelder kunnen vullen), zijn geminiaturiseerd tot *hand-held* lasermicroscopen.

Confocaal of Multifoton
Een confocale laser scanning microscoop bestookt weefsels met een constante fotonenstroom, afkomstig uit een gaslaser. De fotonen veroorzaken niet alleen fluorescentie in het focale vlak, maar ook daarboven en daaronder. Een diafragma voor de detector zorgt ervoor dat alleen het fluorescentielicht uit het focale vlak de detector bereikt. Multifoton laser microscopie werkt met een ander type laser, namelijk een vaste stoflaser. Die geeft fotonen af in korte pulsen. Deze fotonen hebben een langere golflengte dan de fotonen van gaslasers, en dus een lagere energie. In feite is de energie zo laag dat er twee of meer fotonen nodig zijn om een fluorescente stof in een geëxciteerde toestand te brengen. De kans dat dat gebeurt is zeer klein, zodat fluorescentie alleen optreedt in het focale punt, waar het laserlicht het meest intens is. Multifoton laser scanning microscopie heeft als voordeel dat het in weefsels kan kijken tot een diepte van 150 tot 200 micrometer, terwijl de confocale variant gaat tot een diepte van 40 micrometer.



Het chemotherapeuticum doxorubicine ingepakt in liposomen (Doxil) verspreidt zich 24 uur na injectie dankzij TNFa over de gehele tumor (B). Zonder TNFa blijft Doxil vooral in de bloedvaten van de tumor zitten (D). Links in het groen de bloedvaten (A en C). Foto: T.L.M. ten Hagen

© Copyright: Els van den Brink, Life & Science Producties