

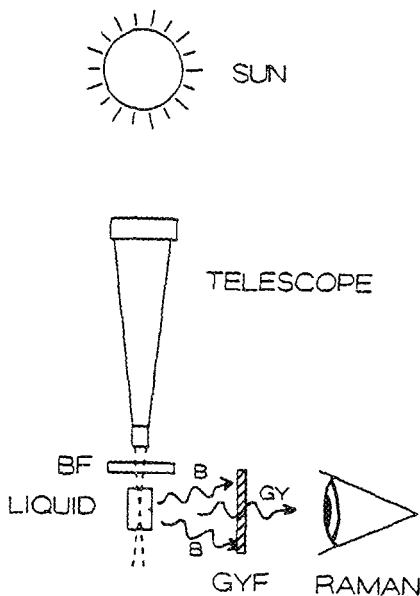
Raman microspectroscopie en Raman imaging: nieuwe technieken voor celbiologisch en biomedisch onderzoek

G.J. Puppels*, N.M. Sijtsma, M.Gron, C.G. de Grauw, T.C. Bakker Schut, C. Otto, C.G. Figdor & J.Greve
Faculteit Technische Natuurkunde, Universiteit Twente,
Postbus 217, 7500 AE Enschede

Inleiding

Het zal een wolkeloze dag geweest zijn, waarop de Indiase onderzoekers Raman en Krishnan in 1928 hun telescoop op de zon richtten. Het ingevangen licht werd gefilterd, waarna het resterende blauwe licht in een cuvet met zeer zuivere glycerine werd gefocuseerd (figuur 1). Toen zij zelf door een groen/geel hoogdoorlaatfilter keken, was de bundel zonlicht in het cuvet zichtbaar en daarbuiten niet. Dit bewees dat het zonlicht inelastisch werd verstrooid, blauw licht werd in het cuvet gedeeltelijk omgezet in groen/geel licht. Korte tijd later lieten Raman en zijn medewerkers in Calcutta en in Rusland de onderzoekers Landsberg en Mandel'shtam zien, dat wanneer monochromatisch licht werd ingestraald, het golflengtespectrum van het verstrooide licht geen continu spectrum was, zoals bijv. in het geval van fluorescentie, maar een lijnspectru. Daarmee was aangetoond, dat fotonen van het invallende licht door hun interactie met moleculen blijkbaar discrete hoeveelheden energie aan deze moleculen afstonden.

Zoals geïllustreerd in het energienivoo-schema in figuur 2, worden door deze energieoverdracht vibraties in een mole-



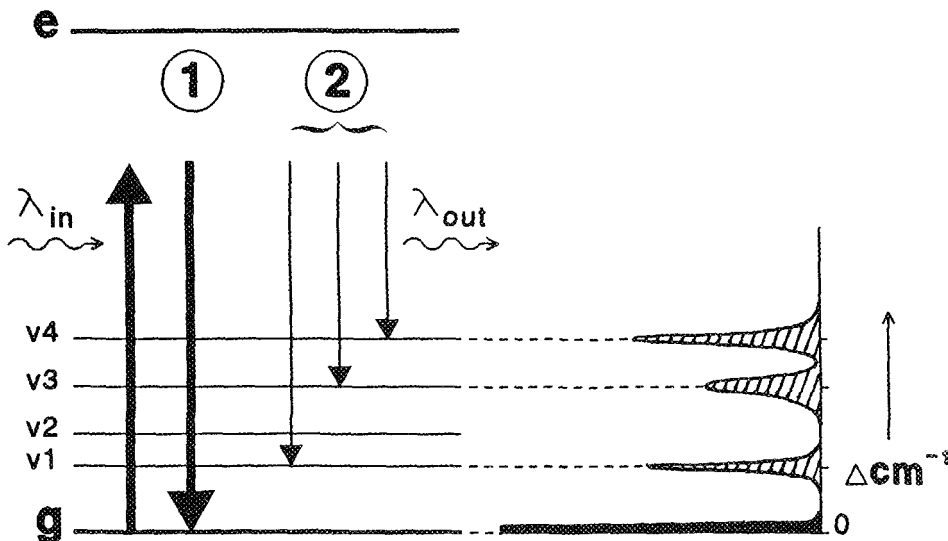
Figuur 1

Het eerste 'Raman'-experiment in 1928. Blauw licht werd gefocuseerd in een cuvet met glycerine, waar een klein gedeelte werd omgezet in groen/geel licht. Afkortingen: BF: blauw filter, GYF: groen/geel filter

* per 1-9-1994:

Faculteit voor Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen

Erasmus Universiteit Rotterdam, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam.



Figuur 2

Ramanverstrooiing. Energienivo-schema van een fictief molecuul: *g*: grondtoestand, *v_i*: geëxciteerde vibratietoestand, *e*: geëxciteerde elektronentoestand. Een Rayleighverstrooiingsproces (proces 1) leidt niet tot uitwisseling van energie tussen foton en molecuul. Na de interactie is het molecuul terug in de initiële toestand. Een Ramanverstrooiingsproces gaat wel gepaard met energieuitwisseling. Na een (Stokes) Ramanproces is het molecuul in een hogere vibratietoestand. De energie van het foton is daarbij afgenomen, hetgeen gepaard gaat met een golflengteverschuiving. De energie(golflengte)verandering wordt uitgedrukt in Δcm^{-1} .

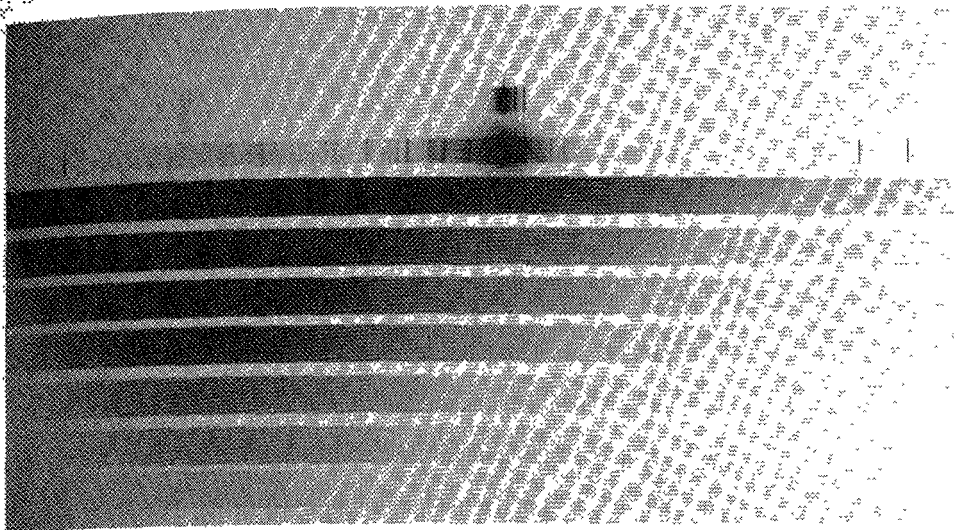
$$\Delta\text{cm}^{-1} = [1/\lambda_{\text{in}} - 1/\lambda_{\text{uit}}] \times 10^7 \quad (\lambda \text{ in nm})$$

overgenomen van ref. 3, copyright 1993 Wiley-Liss)

cuul aangeslagen. Een molecuul van *N* atomen heeft $3N-6$ onafhankelijke vibratiemodes ($3N$ vrijheidsgraden min 3 translaties en 3 rotaties; een lineair molecuul heeft $3N-5$ onafhankelijke vibratiemodes). De precieze hoeveelheid energie die nodig is om een bepaalde vibratie in een molecuul aan te slaan is afhankelijk van de massa's van de atomen welke bij die vibratie betrokken zijn en de sterkte van hun onderlinge chemische binding. Een Raman spectrum laat dus de vibrationele energienivo's van een molecuul "zien" en is daardoor zeer molecuulspecifiek. De voorwaarde voor het "Ramanactief" zijn van een vibratie is dat tijdens de vibratie de dipoolpolariseerbaarheid van het molecuul

verandert. Moleculen met een uitgebreid π -electronensysteem geven daarom i.h.a. een relatief sterk Ramansignaal. (Ter vergelijking, een vibratie kan m.b.v. infraroodabsorptiespectroscopie gedetecteerd worden wanneer deze het dipoolmoment van het molecuul verandert. Voor centro-symmetrische moleculen zijn de voorwaarden voor het Raman- en infraroodactief zijn complementair)

Door haar grote molecuulspecificiteit kan Ramanspectroscopie gebruikt worden voor het herkennen/aantonen van moleculen in een preparaat. Het is ook mogelijk om de secundaire structuur van biologische macromoleculen zoals DNA en eiwitten te bestuderen en informatie te verkrijgen over



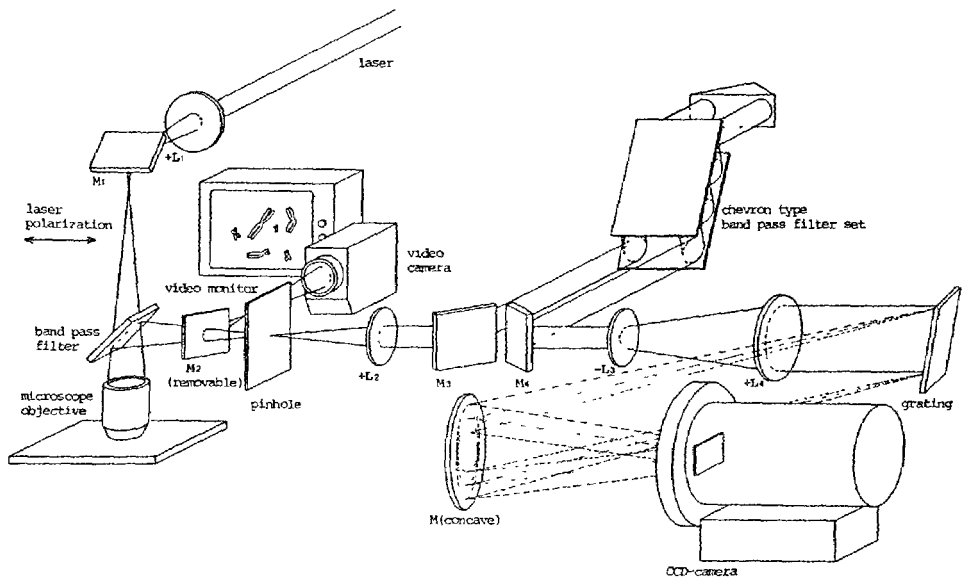
Figuur 3:
Ramanexperiment uit de jaren -50 Het Ramanspectrum van FCIBrPO werd (multi-channel) gemeten m.b.v. een fotografische plaat, welke in dit geval 2 dagen werd belicht. Als excitatiebron werd een gasontladinglamp gebruikt

interakties tussen moleculen. Dit alles zonder het gebruik van labels of probes. Enkele voorbeelden worden later besproken.

De techniek stelt weinig of geen eisen aan het te bestuderen preparaat, zij kan gebruikt worden voor de bestudering van gasen, vloeistoffen en vaste stoffen. Het belangrijkste probleem is dat de intensiteit van het Ramanverstrooide licht erg laag is, voor bijv. vloeistoffen zo'n 3 tot 6 orde-grootten lager dan dat van het elastisch (Rayleigh) verstrooide licht. Figuur 3 kan als illustratie dienen. Het is een in de jaren 50 op een fotografische plaat vastgelegd spectrum van FCIBrPO. De plaat is 2 dagen (!) belicht.

Het zal duidelijk zijn, dat het lage signaal-nivo bijzondere eisen stelt aan de voor Ramanspectroscopie benodigde apparatuur. De intensiteit van het Ramansignaal is evenredig met de intensiteit van het ingestraalde licht. Een laser als lichtbron (in de jaren 50 nog niet voorhanden) is daarom onontbeerlijk, omdat alleen zo de intensiteit van het ingestraalde licht ter plekke

van het te onderzoeken preparaat voldoende hoog gemaakt kan worden om een detecteerbaar Ramansignaal te verkrijgen. In een Ramanmicrospectrometer wordt het laserlicht door een microscoopobjectief op het sample gefocuseerd, tot een diffractiegelimeerde spot (figuur 4) [1]. Hetzelfde objectief vangt verstrooid licht in, dat vervolgens een spectrometer wordt binnengeleid. Deze bestaat uit een filtergedeelte waar de intensiteit van het elastisch verstrooide en gereflecteerde licht sterk wordt onderdrukt (met een factor 10^5 tot 10^8) en een enkelvoudige traliemonochromator welke het Ramanspectrum afbeeldt op een stikstofgekoelde slow-scan CCD-detector. Door elk element (lenzen, spiegels, filters, tralie, beamsplitter) in het instrument zover mogelijk te optimaliseren m.b.t. signaaltransmissie en het gebruik van een back-thinned CCD-chip, kan tot 30% van het door het microscoopobjectief ingevangen licht ook daadwerkelijk gedetecteerd worden. Doordat donkerstroom in cryogeengekoelde CCD-camera's afwezig is kan



Figuur 4

Schema van een moderne confocale Ramanmicrospectrometer. Laserlicht passeert een diëlectrisch nauwbandig transmissiefilter en wordt m b v een microscoopobjectief gefocuseerd op een preparaat. Door het preparaat verstrooid licht wordt ingevangen door hetzelfde objectief. Ramanverstrooid licht, in golf lengte verschoven, wordt gereflecteerd door het nauwbandige transmissiefilter en gefocuseerd op een pinhole (50-100 μm). Dit pinhole, dat de opstelling een confocaal karakter geeft, vormt tevens de ingang van de spectrometer. De spectrometer bestaat uit een filtergedeelte en een dispersiegedeelte. In het filtergedeelte wordt de intensiteit van het Rayleighverstrooid en gereflecteerde licht sterk onderdrukt, m b v. een zgn. holografisch notchfilter (Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI, USA) of met een zelfontwikkelde diëlectrische filterset [19]. Het dispersiegedeelte bestaat uit een éétraps tralimonochromator, welke het Ramanspectrum focuseert op een cryogeen gekoelde slow-scan CCD-camera. M.b.v. het onderbelichtingssysteem van de microscoop (Nikon Optiphot) en een videocamera + monitor waarop preparaat en laserspot zichtbaar zijn kan een cel precies zo in het laserfocus gepositioneerd worden dat van het gewenste celcompartiment een Ramanspectrum verkregen wordt. De ruimtelijke resolutie is $0.45 \times 0.45 \times 1.3 \mu\text{m}^3$ (overgenomen van ref. 3, copyright 1993 Wiley-Liss, Inc)

desnoods urenlang signaal geïntegreerd worden, voor het verkrijgen van een Ramanspectrum van voldoende signaal-ruisnivo. Daar komt bij dat zelfs bij zeer lage signaalnivo's de signaal-ruisverhouding foton-ruis gelimiteerd is (i.e. gelijk aan de wortel uit het aantal gedetecteerde fotonen) omdat de uitleesruis van een CCD-camera slechts enkele elektronen bedraagt (1 electron komt overeen met 1 gedetecteerd foton).

Met een dergelijk instrument is het tegenwoordig mogelijk Ramanspectra op te ne-

men van één enkele levende biologische cel of chromosoom, met een ruimtelijke resolutie van $0.45 \mu\text{m}$ in laterale en $1.3 \mu\text{m}$ in axiale richting [1-4]. Daarbij worden laser vermogens van 0.5 tot 20 mW gebruikt, hetgeen tot hoge intensiteiten in het preparaat leidt ($10^9\text{-}5 \times 10^{10} \text{ W/m}^2$). Om schade aan een preparaat te voorkomen moeten lasergolflengte, laserintensiteit en meettijd goed op elkaar afgestemd worden [5].

Celbiologische toepassingen

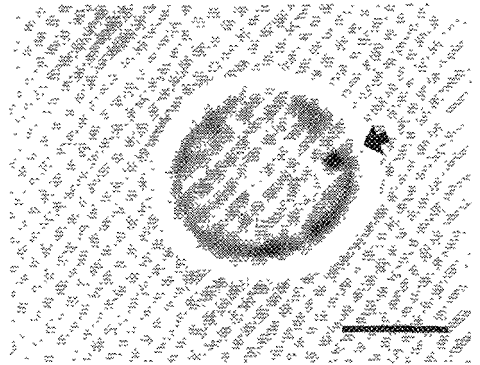
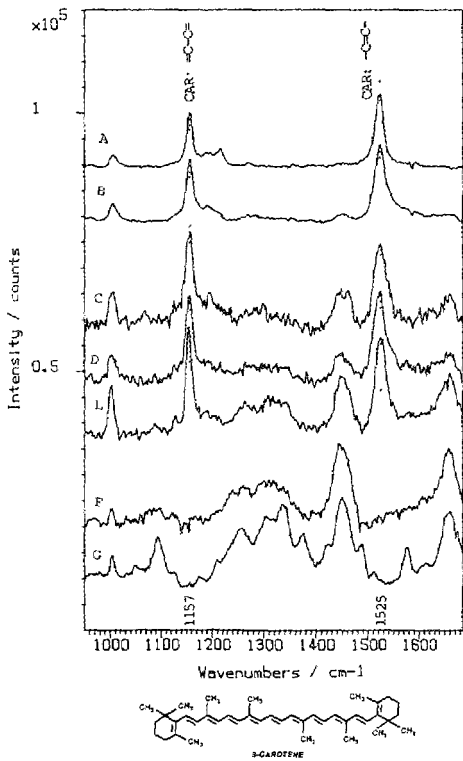
carotenoiden in lymfocyten

Carotenoiden (figuur 5) komen in veel varianten voor en zijn verantwoordelijk voor veel van de oranje-rode kleuren in de natuur (bijv. voor die van wortels, tomaten, zalm en flamingo's). Epidemiologisch onderzoek heeft aangetoond dat zij ook een belangrijke rol zouden kunnen spelen in het voorkomen van tumorontwikkeling. Met name voor longkanker en maagkanker bestaat een duidelijke correlatie tussen de hoeveelheid caroteen in dieet en in bloedplasma enerzijds en het voorkomen van deze vormen van kanker anderzijds, hoe hoger de hoeveelheid caroteen hoe lager de kans op kanker. Nader experimenteel onderzoek heeft aan het licht gebracht, dat caroteen dit op een aantal verschillende manieren zou kunnen bewerkstelligen. Een daarvan is dat het een modulerende werking op het immuunsysteem heeft. De witte bloedcellen, ongeveer 10 μm in diameter, zijn de effectors van het immuunsysteem en met name de lymfocyten spelen een belangrijke rol in de afweer van het lichaam tegen tumorcellen. Het lag daarom voor de hand na te gaan of caroteen in deze cellen zou kunnen worden aangetoond, en zo ja in welke subcellulaire compartimenten en in welke hoeveelheid. Tot voor kort beperkten caroteenbepalingen zich tot bloedplasma en weefsels, waarvoor HPLC en absorptiespectrofotometrie gebruikt werden. Carotenoiden geven echter een relatief sterk Ramansignaal, zodat het mogelijk is gebleken met de hoge ruimtelijke resolutie van een Ramanmicrospectrometer, de locatie van caroteen in verschillende subgroepen van lymfocyten te bepalen en te kwantificeren (figuur 5) [3]. Hieruit volgde dat caroteenlocatie en -hoeveelheid zeer specifiek zijn voor een specifieke lymfocytensubgroep. Omdat elke subgroep zijn eigen specifieke taak heeft in het immuunsysteem is dit op te vatten als een sterke aanwijzing voor een specifieke functie van carotenoiden in het immuunsysteem. In een kleinschalig klinisch onderzoek, waarin wordt samen-

gewerkt met het Medisch Spectrum Twente (Enschede), wordt momenteel nagegaan of de hoeveelheid caroteen in lymfocyten van longkankerpatienten afwijkt van die van gezonde mensen. De eerste resultaten duiden erop dat dit inderdaad zo is.

peroxidasen in granulocyten

Een ander type witte bloedcellen, de granulocyten, kenmerkt zich door een grote hoeveelheid kleine granules ($\sim 1 \mu\text{m}$) in het cytoplasma. Het is de taak van deze cellen bacteriën en parasieten die het lichaam zijn binnengedrongen te doden en op te ruimen. Dit gebeurt d.m.v. fagocytose. Een bacterie wordt a.h.w. opgegeten en komt dan terecht in een vacuole in het cytoplasma van de granulocyt. Vervolgens versmelten granules uit het cytoplasma, gevuld met een voor de bacterie dodelijke cocktail van enzymen en eiwitten, met deze vacuole. Eén van deze enzymen is het peroxidase; myeloperoxidase in neutrofiële granulocyten en eosinofiel peroxidase in eosinofiele granulocyten. Wanneer deze peroxidasen geactiveerd worden produceren ze bleekmiddelachtige stoffen. De "active site" van deze enzymen is een haem-molecuul zoals dat ook in haemoglobine voorkomt (figuur 6). Net als caroteen hebben ook haemmoleculen een relatief sterk Ramansignaal waaruit veel valt op te maken over de structuur van de haemgroep in het eiwit. Informatie wordt verkregen over het type haemmolecuul, de oxidatietoestand en spintoestand van het centrale ijzeratoom, het aantal liganden van het ijzeratoom en de ligging van het ijzeratoom (i.e. in of buiten het vlak van de haemring). Tijdens activatie van het enzym treden hierin veranderingen op. Uit in vitro experimenten zijn modellen naar voren gekomen, welke deze veranderingen beschrijven. Maar het testen daarvan in een levende cel, waarbij veranderingen rechtstreeks gekoppeld worden aan een proces dat zich op dat moment in de cel afspeelt, lijkt pas nu mogelijk te worden, m.b.v. Ramanmicrospectroscopie. Figuur 7 toont twee spectra. Het bovenste is verkregen



Figuur 5

Ramanspectra van β -caroteen, humane T- en B-lymfocyten en Natural Killercellen. Inzet humane helper/inducer-T-lymfocyt met Gall-body (pijl) Het balkje komt overeen met 5 μ m

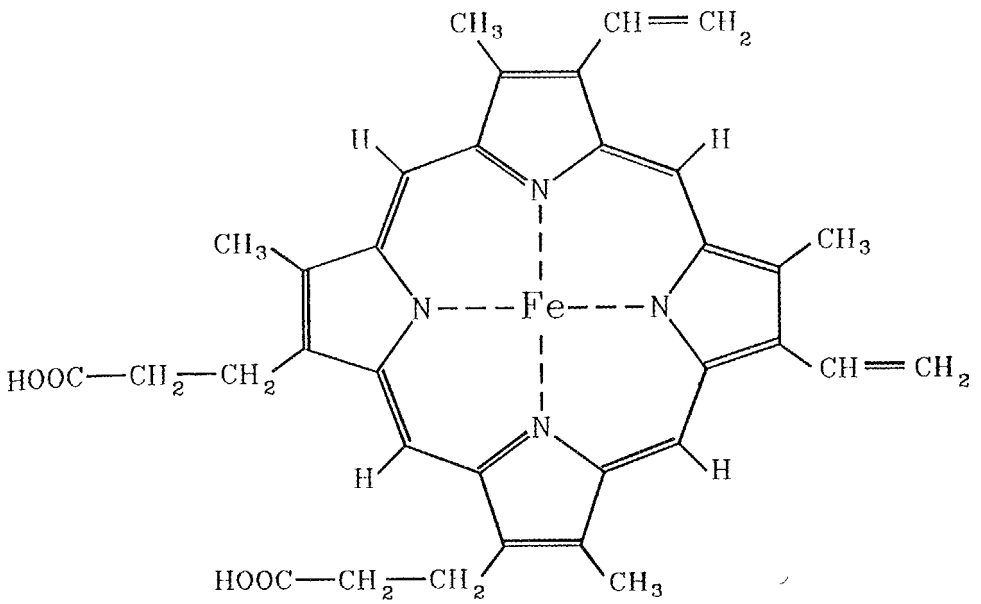
- A) β -caroteenoplossing in chloroform (10^{-3} M)
- B) Helper/inducer-T-lymfocyt (CD4+), gefocuseerd op Gall-body
- C) Natural Killercel (CD16+), gefocuseerd op Golgi-complex
- D) Cytotoxische/suppressor-T-lymfocyt (CD8+), Golgi-complex
- E) Tg/d-lymfocyt, Golgi-complex
- F) B-lymfocyt cytoplasma (gemiddelde van 9 metingen) Alleen eiwit en fosfolipidesignaal
- G) Nucleus lymfocyten (gemiddelde van 10 metingen) Alleen DNA en eiwit signaal

Conditie: laser vermogen 5-6 mW (660 nm). Duur van een meting 30 s. Intensiteitsschaal geldt voor spectra A en B, spectra C-G uitvergroet met factor 8. De intensiteit van het caroteensignaal in celmetingen B-E laat zien dat de caroteenconcentratie in de Gall-body van CD4+ lymfocyten ongeveer 10^{-3} M is en in de andere drie celtypen ongeveer $10 \times$ zo laag. De caroteenconcentratie in bloedplasma is ca. 10^{-6} M (overgenomen van ref. 3, copyright 1993 Wiley-Liss)

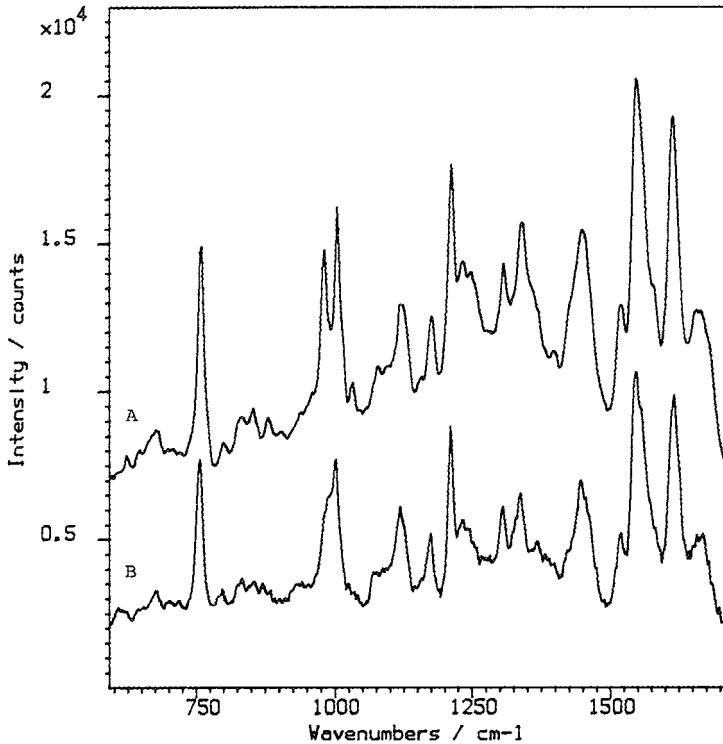
Figuur 7

Raman spectra van eosinofiel peroxidase.

- A) Spectrum verkregen van het cytoplasma van intacte humane eosinofiele granulocyten (gemiddelde van 20 metingen, steeds aan één enkele cel). Laser vermogen 6 mW (660 nm), meettijd: 30 s
 - B) Spectrum van geïsoleerd humaan eosinofiel peroxidase.
- (overgenomen van ref. 20, copyright 1993 Wiley & Sons)



Figuur 6:
Haemgroep van eosinofiel peroxidase (protoporphyrine IX)

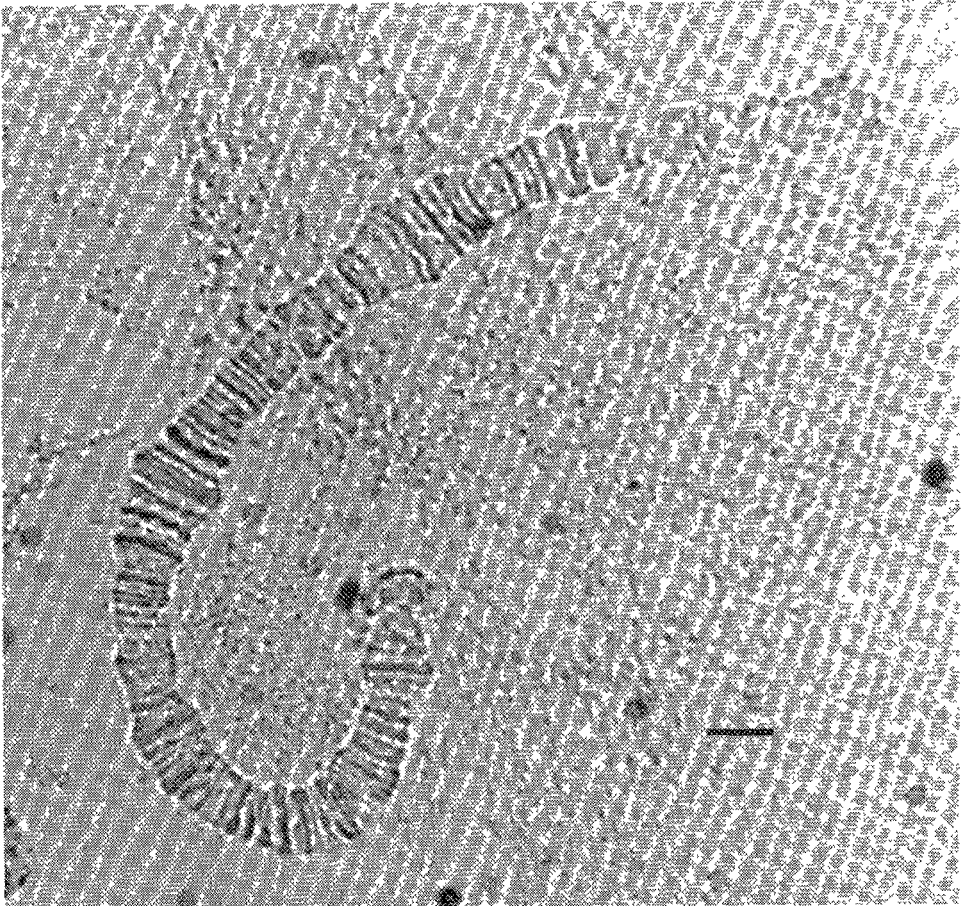


door een meting in het cytoplasma van een levende eosinofiele granulocyt. Het onderste spectrum is dat van geïsoleerd eosinofiel peroxidase. De hoge concentratie EPO in de cel gevoegd bij het relatief sterke Ramansignaal van haem moleculen zorgt ervoor dat het Ramanspectrum van de cel vrijwel geheel bepaald wordt door het aanwezige eosinofiel peroxidase, hetgeen duidelijk maakt dat bestudering van de active site haemgroep van dit enzym in een levende cel mogelijk is [6]. Na een eerste fase in dit onderzoek waarin de opti-

male condities voor metingen aan eosinofiele granulocyten zijn bepaald en de spectra zijn ontleed, loopt momenteel een tweede fase waarin getracht wordt veranderingen in het spectrum vast te leggen die het gevolg zijn van enzymactivatie in de cel.

chromosomale bandenpatronen

Polyteenchromosomen (figuur 8) worden veelvuldig gebruikt in genetisch onderzoek. Deze reuzechromosomen worden o.a. aangetroffen in de speekselklierzellen



Figuur 8:
Polyteen chromosoom 2 van *Chironomus thummi thummi*. Het balkje komt overeen met 10 μm (overgenomen van ref. 1, copyright 1990 MacMillan Magazines Ltd.)

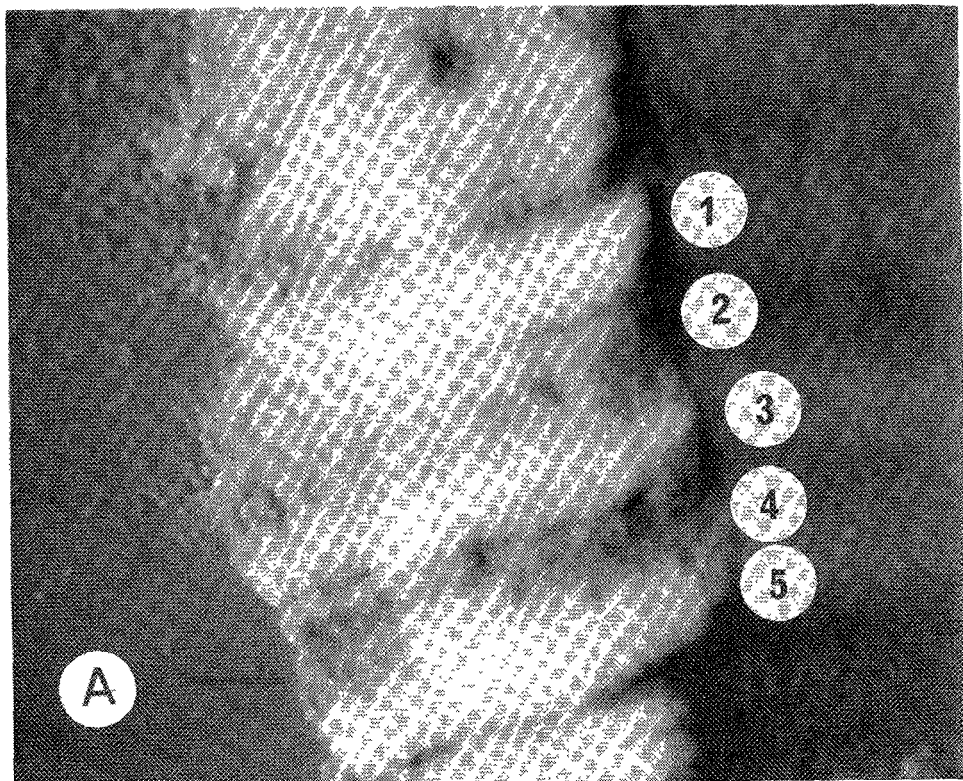
van het fruitvliegje (*Drosophila*). In deze cellen heeft replicatie van het DNA plaats, zonder dat dit wordt gevolgd door een celdeling. 10 of meer van deze replicatierondes kunnen plaatshebben, zodat een speekselklier cel dan 1000 of meer identieke DNA-molekulen bevat. Deze liggen, met eraan gecomplexeerde eiwitten, netjes geordend naast elkaar in de vorm van zogenaamde polyteenchromosomen. Karakteristiek voor deze chromosomen is een bandenpatroon van lichte en donkere banden, haaks op de lengterichting van de chromosomen, dat m.b.v. een lichtmicroscop kan worden waargenomen. Interessant is dat het aantal lichte en donkere banden ongeveer overeenkomt met het geschatte aantal genen. Genetische mutaties leiden i.h.a. tot veranderingen in het bandenpatroon, terwijl bovendien is gevonden dat bepaalde banden ten tijde van intense transcriptie sterk opzwellen ("puffing"). Genen en bandenpatroon lijken daarom iets met elkaar te maken te hebben. M.b.v. Ramanmicrospectroscopie is het mogelijk meer aan de weet te komen over de (verschillen in) moleculaire samenstelling en -structuur van banden en interbanden. Zo kunnen o.a. vrij eenvoudig de DNA- en eiwitconcentraties van banden en interbanden bepaald worden, aan de hand van de intensiteiten van een voor DNA specifieke Ramanlijn bij 1094 cm^{-1} en een voor eiwitten karakteristieke band bij 1450 cm^{-1} (figuur 9) [7]. Gebleken is, dat de totale chromatineconcentratie (DNA + eiwit) in interbanden variabel is maar in alle gevallen lager dan in banden, waar deze concentratie constant is. Bovendien lijkt in interbanden een correlatie te bestaan tussen chromatineconcentratie en eiwit-DNA ratio; hoe hoger deze ratio hoe lager de chromatineconcentratie. Deze verschillen in moleculaire samenstelling correleren met verschillen in ultrastructuur zoals duidelijk te zien is in de Atomic Force microscopische opnamen van dezelfde banden en interbanden als waarvan de Raman-spectra verkregen zijn (figuur 10) [7]. De verschillen in DNA concentratie tussen

banden en interbanden welke gevonden zijn m.b.v. Ramanmicrospectroscopie, blijken bovendien veel minder groot te zijn dan tot nu werd aangenomen op basis van fluorescentiemicroscopische en elektronmicroscopische waarnemingen (~2:1 i.p.v. 20:1). Dit onderstreept nog eens het belang van directe analysetechnieken, waarbij labelingsartefacten vermeden worden.

Naast bestudering van het bandenpatroon wordt onderzoek gedaan naar het voorkomen van DNA in deze chromosomen in een andere dan de normale B-vorm (de welbekende rechtsdraaiende dubbele helix). Recent zijn daarbij sterke aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van guanine-cytosine baseparen in een zgn. Hoogsteen-conformatie, i.p.v. de gebruikelijke Watson-Crick-conformatie [8]. Dergelijke alternatieve DNA-structuren zouden belangrijke regulerende functies kunnen hebben.

Biomedische toepassingen

Behalve voor celbiologisch onderzoek biedt Ramanspectroscopie ook voor biomedisch onderzoek grote mogelijkheden, met name wat betreft het karakteriseren en herkennen van (pathologisch) weefsel. In vivo toepassingen, waarbij gebruik gemaakt wordt van optische fibers voor de geleiding van laserlicht en Ramansignaal naar en van de plaats van onderzoek in het lichaam lijken op termijn mogelijk. Specifieke problemen daarbij zijn, dat het excitierende laserlicht ook in de fiber zelf Ramansignaal opwekt, wat kan leiden tot een hoog achtergrondsignaal en dat focusering van het laserlicht en collectie van het Ramanverstrooide licht veel minder efficiënt zijn dan in een microscoop waar gebruik gemaakt kan worden van geoptimaliseerde afbeeldingsoptiek. Op dit moment worden in een aantal laboratoria verspreid over de wereld de mogelijkheden voor een medisch-diagnostisch gebruik van Raman-spectroscopie onderzocht. Een aantal specifieke toepassingen wordt hieronder kort besproken. In bijna alle gevallen is het

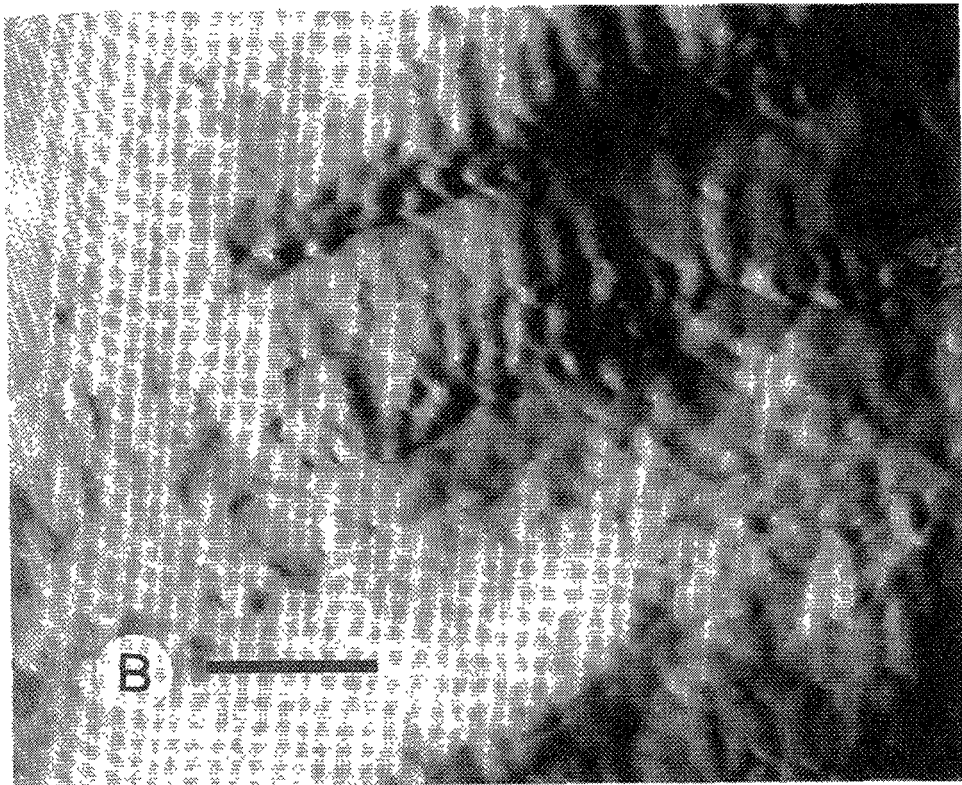


Figuur 9

Raman spectra van banden en interbanden van het polyteenchromosoom, afgebeeld in figuur 10 (nummering van spectra en banden en interbanden in figuur 10 komt overeen) De ratio van de intensiteiten van de Ramanlijnen bij 1450 cm^{-1} (eiwit) en 1094 cm^{-1} verschilt duidelijk tussen banden (1,3,5) en interbanden (2,4) (overgenomen van ref 7, copyright 1993 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers)

noodzakelijk als excitatiebron een NIR-laser te gebruiken om sterke absorptie van laserlicht (en Ramansignaal) door haemoglobine en autofluorescentie van cellen en weefsels te voorkomen. In de meeste gevallen wordt daarom een Nd-Yag-laser gebruikt (λ_{laser} : 1064 nm) Een nadeel daarvan is dat dan geen CCD-camera meer gebruikt kan worden voor signaaldetectie omdat deze boven de 1100 nm niet gevoelig is. Er wordt op kleine schaal geexperimen-

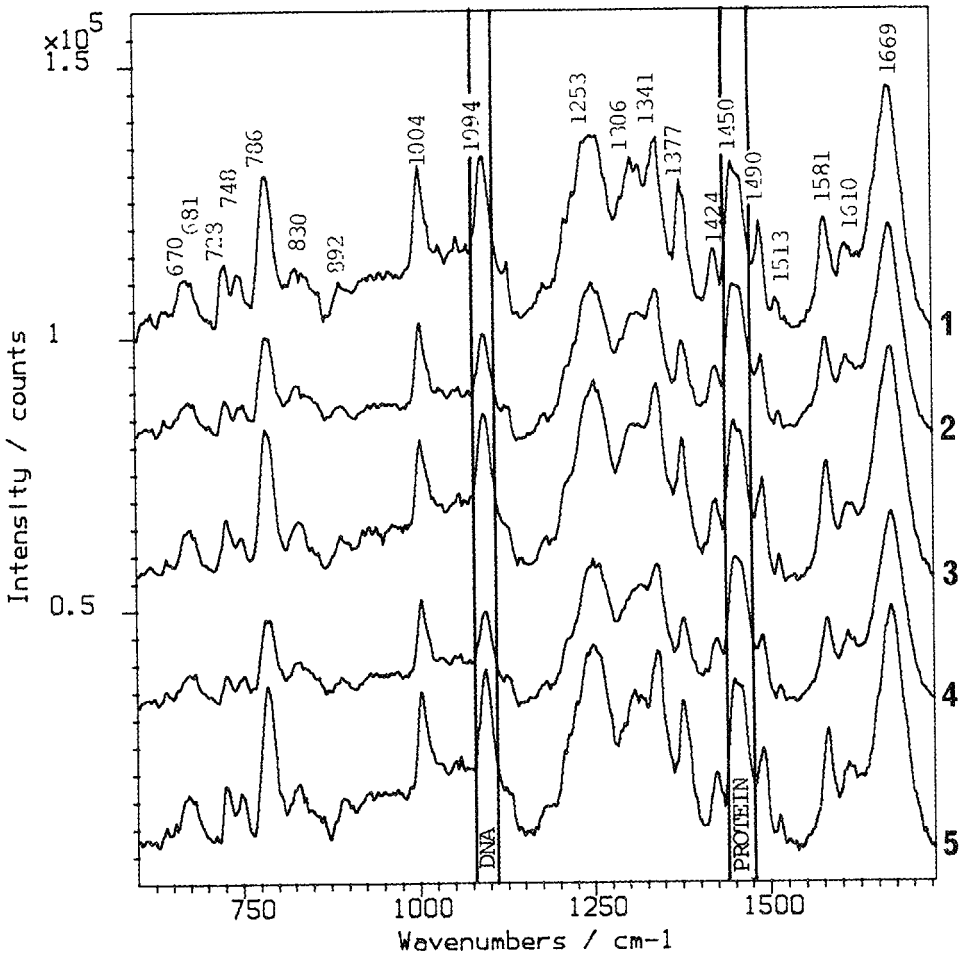
teerd met bijv. InGaAs- en Germanium-multichannel detectors, welke echter een veel grotere detectorruisbijdrage leveren Daarom worden tot nu toe vooral Fourier-Transform Ramanspectrometers in combinatie met NIR-excitatie gebruikt. Op deze manier wordt de invloed van detectorruis op het signaal verkleind Een bijkomend voordeel is het grote spectraal-oplossend vermogen gecombineerd met een groot meetbereik (tot 4000 cm^{-1}).



ooglenzen

Om een beter inzicht te krijgen in het ontstaan van seniel cataract (vertroebeling van de oog lens, welke het zichtvermogen wordt aangetast en tot blindheid kan leiden en welke vooral op hogere leeftijd optreedt) wordt o.a. met Ramanspectroscopie onderzoek gedaan naar de moleculaire samenstelling van de humane oog lens als functie van de plaats. Daarbij wordt vooral gekeken naar wijzigingen hierin als functie van de leeftijd. Informatie wordt verkregen over eiwit-water ratio, eiwitsamenstelling en cholesterolconcentratie (zie hieronder: Ramanlabeling) als functie van de plaats in de lens. Figuur 11 laat het verloop van de eiwit-waterratio zien als functie van de

plaats langs de optische as van een oog lens (in dit geval een konijn lens), bepaald aan de hand van Ramanmetingen [9]. Voor metingen aan oog lenzen kan nog worden volstaan met zichtbaar-licht lasers, alhoewel lenzen een met de leeftijd toenemende autofluorescentie vertonen, welke Ramanmetingen kan bemoeilijken of zelfs onmogelijk maken. Waar bij metingen aan een 1-jarige lens nog gemeten kan worden met 514.5 nm laser excitatie, is het voor metingen aan een 80-jarige lens noodzakelijk uit te wijken naar excitatie van 660 nm of hoger. In meer recent onderzoek zijn ook verschillen aangetoond in de eiwitsamenstelling en -structuur als functie van plaats en leeftijd [10,11].



Figuur 10.

Atomic force microscopische opnamen van de banden en interbanden van het chromosoom, waarvan in figuur 9 de Ramanspectra getoond worden

A) Lage resolutie opname Balkje = 1 μm

B) Hoge resolutie opname van interband 2 en band 3, waarop duidelijk een verschil in structuur tussen band en interband waarneembaar is Balkje = 0,5 μm

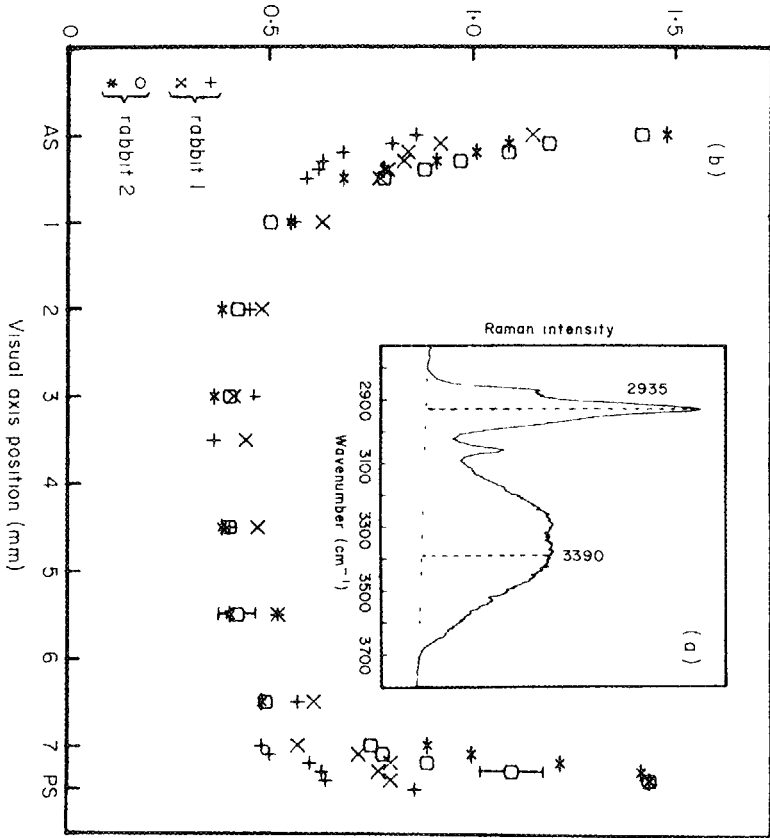
(overgenomen van ref 7, copyright 1993 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers)

vaatwanden

Atherosclerose kenmerkt zich door cholesterol(ester)afzetting in en op de vaatwanden en in een vergevorderd stadium door verkalking van de vaatwanden. Figuur 12 laat spectra zien van een gezonde aorta (A), welke gekenmerkt wordt door Raman-

lijnen welke aan eiwitvibraties kunnen worden toegekend, van een (atheromateuze) aorta met een sterk verhoogde cholesterolconcentratie (B) en van een vaatwand met hydroxyapatiet- en carbonaatapatietafzettingen (C: gekenmerkt door de sterke lijnen bij respectievelijk 960 en 1070 cm^{-1}) [12].

$$R = I(3390) / I(2935)$$



Figuur 11

A) Ramanspectrum van een ongefieerde konijn-oogliens (opgenomen in de nucleus). Laser-
vermogen 25 mW (514.5 nm), meettijd: 60 s

B) Water-ewit ratio (R) als functie van positie langs de optische as van de lens.

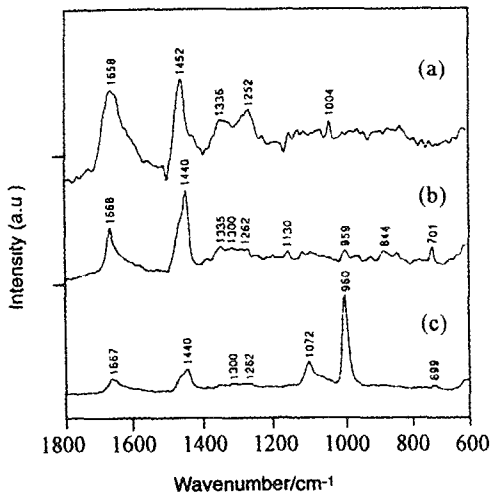
AS. anteriore zijde (voorkant), PS. posterieure zijde +, x, o, * data van 4 verschillende lenzen
(overgenomen van ref 9, copyright 1989 Academic Press Limited)

Er kan dus goed onderscheid gemaakt worden tussen gezond en pathologisch vaatwandweefsel. Dit biedt het vooruitzicht, dat bij laserbehandeling van een verstopt bloedvat, via een optische fiber, eerst een Ramanspectrum van een verdachte plek in het vat wordt gemaakt, zodat alleen

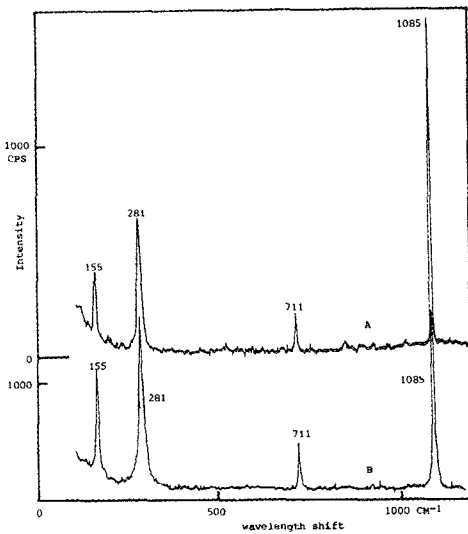
verstoppingen zelf m.b.v. een zeer intense laserpuls worden verwijderd en gezond weefsel intact blijft.

longen

Tot een van de eerste toepassingen van Ramanmicrospectroscopie behoorde het



Figuur 12.
Raman spectra van aorta.
A) Gezonde aorta.
B) Atheromateuze aorta.
C) Atherosclerotische aorta
Laservermogen: 400 mW (~ 1 mm² belicht, 1064 nm) Meettijd: 35 minuten Spectrum A 8x vergroot, spectrum B 4x vergroot (met toestemming overgenomen van ref 12, copyright 1992 Elsevier Sequoia)

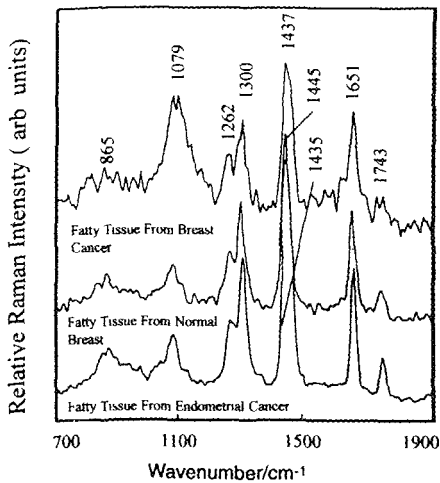


Figuur 13:
A) Ramanspectrum van een longinluitsel (3 μm)
B) Ramanspectrum van calciëet
(overgenomen van ref 13, copyright 1984 Society for Applied Spectroscopy)

karacteriseren van insluitsels in weefsels. Figuur 13 is daarvan een voorbeeld. Spectrum A is het spectrum van een insluitsel (3 μm) in longweefsel van een aan silicose overleden patient. Spectrum B is het Ramanspectrum van een korreltje calciëet, hetgeen weinig twijfel laat bestaan over de aard van het longinluitsel [13].

tumorweefsel

Verkennde metingen hebben ook laten zien dat Ramanspectroscopie kan worden gebruikt voor de herkenning van tumorweefsel. Figuur 14 is hiervan een voorbeeld. Karakteristiek voor het tumorweefsel (in dit geval van een borsttumor en kanker van het endometrium) is de ver-



Figuur 14·
Fourier transform IR Ramanspectra van vetweefsels
A) Vetweefsel (borstkanker)
B) Vetweefsel (gezonde borst)
C) Vetweefsel (kanker van het endometrium)
Laservermogen: 1 W (1064 nm, belicht oppervlak 36 mm²). Alle spectra gemiddeld over 800 scans
(met toestemming overgenomen van ref. 14, copyright 1992 Elsevier Sequoia)

schuiving van een piek naar 1437 cm⁻¹ welke in gezond borstweefsel gevonden wordt bij 1445 cm⁻¹. Een verklaring voor deze verschuiving zou een hogere cholesterolconcentratie in het tumorweefsel kunnen zijn [14].

Het zal duidelijk zijn dat door de aard van de techniek Ramanspectroscopie niet alleen een toekomst heeft als middel om tot een diagnose te komen, maar ook voor fundamenteel onderzoek naar de verschillen tussen normaal en pathologisch weefsel en wellicht kan bijdragen tot een beter begrip van de processen welke leiden tot het ontstaan van pathologieën

Nieuwe technische en methodologische ontwikkelingen

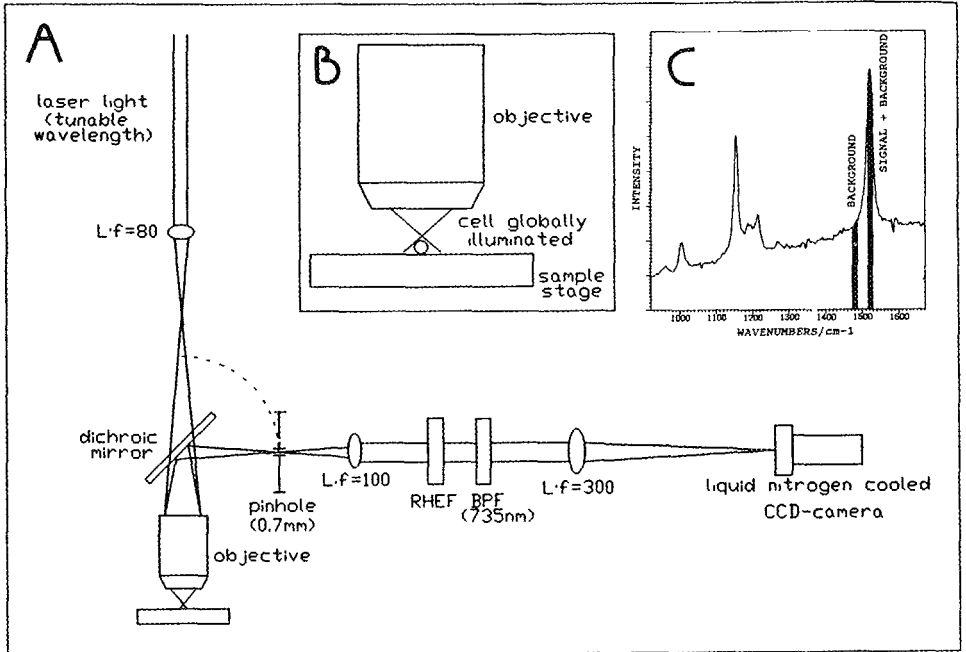
Raman imaging

Een oud idee, dat door de komst van cryogeen gekoelde CCD-camera's uitvoerbaar en toepasbaar is geworden, is dat van het afbeelden in Ramanverstrooid licht [15]. Het principe hiervan is eenvoudig en vertoond in de uitvoering zoals deze in ons laboratorium is gerealiseerd grote overeenkomst met dat van de welbekende epi-illuminatie fluorescentiemicroscopen (figuur 15) [16]. Het preparaat wordt globaal

belicht en er wordt een afbeelding van het preparaat gemaakt op een CCD-detector op basis van het verstrooide licht. Onderweg naar de camera wordt heel nauwbandig één golflengtecomponent van het verstrooide licht, overeenkomend met de golflengte van een Ramanlijn van een in het preparaat aanwezig molecuul, uitgefilterd. Het resultaat is een afbeelding van het preparaat op de camera welke precies de ruimtelijke distributie van dat molecuul in het preparaat weergeeft. Het ruimtelijk oplossend vermogen van een afbeeldende Ramanmicroscop is gelijk aan die van een fluorescentiemicroscop en wordt bepaald door de numerieke apertuur van het microscopobjectief. Figuur 16 en 17 illustreren hoe zo een optisch microscopisch contrastmechanisme wordt verkregen op basis waarvan informatie kan worden verkregen over de chemische samenstelling van een preparaat, zonder het gebruik van labels.

Ramanlabeling

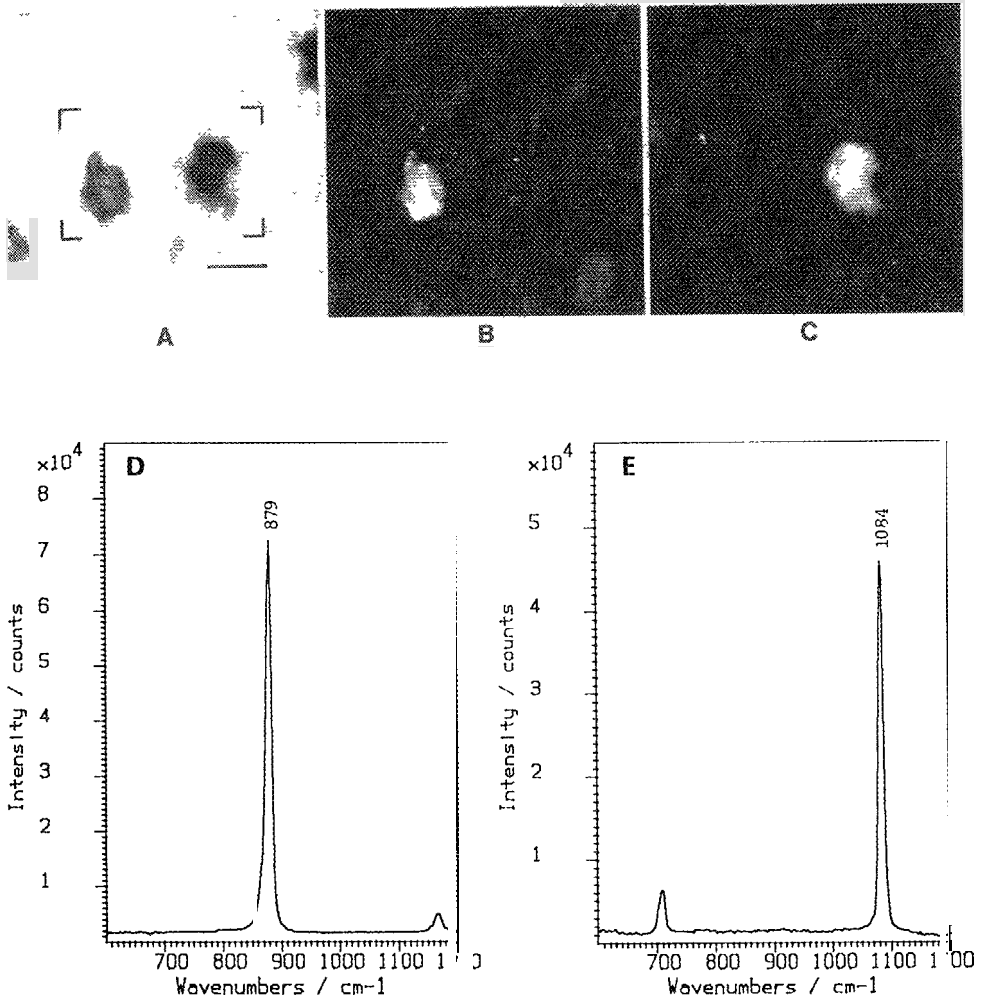
Desondanks is een begin gemaakt met de ontwikkeling van Ramanlabels. Daarbij moet gedacht worden aan moleculen of kleine bolletjes van moleculen met een (zeer) sterk Ramansignaal, welke (eventu-



Figuur 15

Beeldvorming op basis van Ramanverstrooiing.

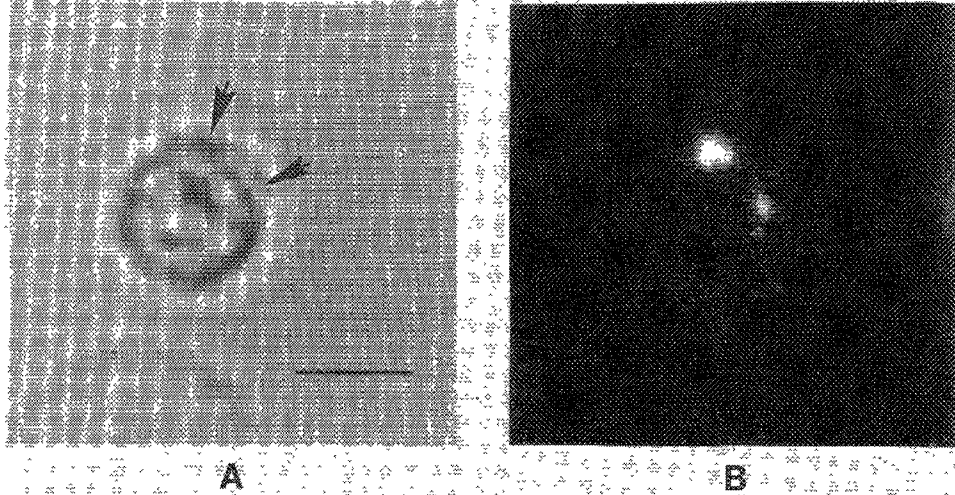
- A) Layout van de Ramanmicroscop. Een preparaat wordt globaal belicht d m v een enigszins gefocuseerde laserbundel. Het preparaat wordt vervolgens afgebeeld op een cryogeen gekoelde slow-scan CCD-camera op basis van terugverstrooid licht, ingevangen door het microscoop-objectief. Onderweg naar de CCD-camera wordt dit licht gefilterd. Allereerst wordt m b.v. een holografisch notchfilter de intensiteit van het niet in golflengte verschoven laserlicht sterk onderdrukt (met een factor 10^5). Daarna volgt een dielektrisch zeer nauwbandig transmissiefilter (FWHM transmissieband 0,5 nm; max transmissie. 60-70%, O D. buiten transmissieband 4). Dit betekent dat alleen licht met de golflengte van de transmissieband van dit laatste filter de detector bereikt. Door nu de golflengte van het exciterende laserlicht zo te kiezen, dat de golflengte van een Ramanlijn (zie uitdrukking voor cm^{-1} -verschuiving in bijschrift figuur 2), welke karakteristiek is voor een bepaald molecuul, samenvalt met de transmissieband van dit filter, ontstaat op de CCD-camera een beeld van de ruimtelijke distributie van dat molecuul over het preparaat.
- B) Globale belichting van het sample. Een alternatief voor het defocuseren van de laserbundel is een klein gefocuseerd laserspotje snel over het preparaat te scannen m b.v. twee scannende spiegels (ref 16). Op die manier wordt een volledig homogene belichting van het preparaat verkregen.
- C) Het intensiteitsnivo van het achtergrondsignaal wordt bepaald d m.v een tweede meting, waarbij een beeld opgenomen wordt bij een cm^{-1} -verschuiving net naast de Ramanlijn van het onderzochte molecuul. Dit achtergrondbeeld wordt vervolgens van de eerste meting afgetrokken.



Figuur 16

Optische microscopie met Ramanverstrooiing als contrastmechanisme

- A) Lichtmicroscopische opname van twee kristalletjes. Links boorzuur, rechts calciet. Balkje = 20 μm .
- B) Ramanbeeld, microscoop afgestemd op 879 cm^{-1} boorzuur-Ramanlijn. Achtergrondbeeld afgetrokken (opgenomen met microscoop afgestemd op 850 cm^{-1}).
- C) Ramanbeeld; microscoop afgestemd op 1084 cm^{-1} calciet-Ramanlijn. Achtergrondbeeld afgetrokken (opgenomen met microscoop afgestemd op 1060 cm^{-1}).
- D) Ramanspectrum boorzuur
- E) Ramanspectrum calciet
- (overgenomen van ref. 16, copyright 1993 Society for Applied Spectroscopy)



Figuur 17:

Bepaling van de subcellulaire locatie van caroteen in een humane lymfocyt m b v Raman-microscopie

A) Lichtmicroscopische opname van een humane lymfocyt. Balkje = 5 μm . Pijltjes geven locatie van caroteen aan (zie figuur B).

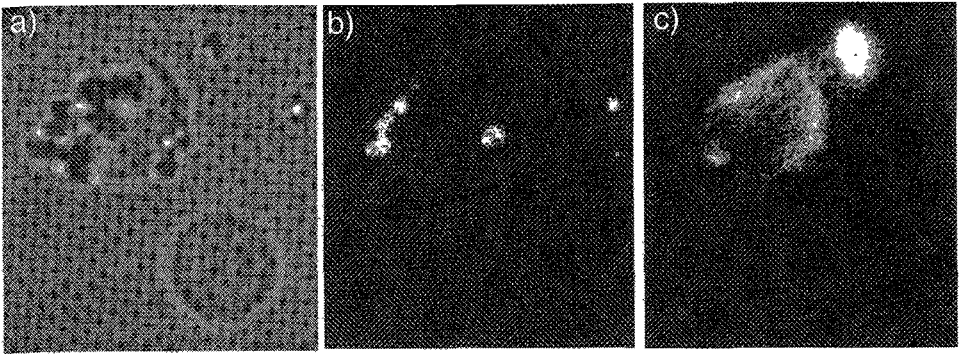
B) Ramanbeeld, microscoop afgestemd op 1525 cm^{-1} caroteenlijn ($-\text{C}=\text{C}$ -strekvibratie) 1500 cm^{-1} achtergrondbeeld afgetrokken

Laservermogen op preparaat. 25 mW (intensiteit $2 \times 10^4 \text{ W/cm}^2$) Meettijd: 150 s.
(overgenomen van ref. 16, copyright 1993 Society for Applied Spectroscopy)

eel d.m.v. antilichamen) specifiek aan een bepaald molecuul in een preparaat binden. Deze kunnen hun dienst bewijzen wanneer het Ramansignaal van het molecuul dat in een preparaat moet worden aangetoond onvoldoende sterk is om om direct gedetecteerd te kunnen worden. Natuurlijk zal in een dergelijk geval in de eerste plaats naar fluorescente labelingstechnieken gegrepen worden. Fluorescentietechnieken leveren nu eenmaal een signaal dat orde-grootten sterker is dan dat van Raman-spectroscopische technieken. Desondanks hebben Ramanlabels enkele duidelijke voordelen. Een fluorescentiesignaal is breedbandig (20-50 nm), waardoor in de praktijk niet meer dan 3 tot 4 fluorescente labels simultaan gebruikt kunnen worden. Een Ramanpiek heeft typisch een spectrale bandbreedte van $\sim 0.5 \text{ nm}$. Dit houdt in dat in principe 10 tot 100 keer meer Ra-

manlabels dan fluorescente labels simultaan gebruikt kunnen worden. Een bijkomend voordeel is dat Ramanlabels in tegenstelling tot fluorescente labels niet bleken. Ook is de keuze van excitatiegolflengte geheel vrij, i.t.t. fluorescentie-excitatie, zodat een golflengte gekozen kan worden waarbij excitatie van autofluorescentie van het preparaat vermeden wordt. Of deze voordelen in de praktijk ook werkelijk uitgebuit kunnen worden is op dit moment onderwerp van onderzoek en hangt af de mogelijkheid Ramanlabels te creëren met een voldoende sterk Raman-signaal.

Figuur 18 toont één van de eerste resultaten die op dit gebied zijn behaald, waarbij twee ontwikkelingen n.l. Raman imaging en Ramanlabeling in combinatie zijn toegepast [17]. Het laat zien dat CD4-positieve lymfocyten herkend kunnen worden op ba-



Figuur 18:

Ramanlabelingsexperiment

- A) Lichtmicroscopische opname van lymfocyten
- B) Ramanbeeld, verkregen door afstemming van de microscoop op de 998 cm^{-1} -polystyreenlijn, waardoor de polystyreenlabels (de bolletjes welke te zien zijn in beeld A), gekoppeld aan anti-CD4-antilichamen zichtbaar worden.
- C) Fluorescentie-opname, welke laat zien dat fluorescent gelabelde anti-CD4-antilichamen alleen aan de cel linksboven binden

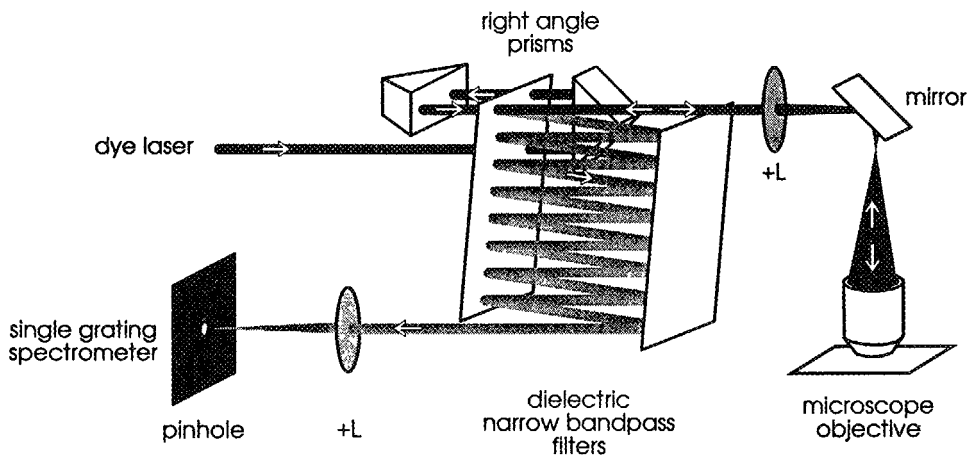
Dit experiment laat zien dat de Ramanlabels aan dezelfde cel binden als de veelgebruikte fluorescente labels en dat het Ramansignaal van deze labels detecteerbaar is, zodat nu gewerkt kan worden aan de verwezenlijking van de in de tekst genoemde voordelen van Ramanlabels

sis van het Ramansignaal (998 cm^{-1}) van polystyreenbolletjes ($0.9\ \mu\text{m}$) welke aan anti-CD4-antilichamen gekoppeld zijn. Ter controle zijn de cellen ook aangekleurd met een fluorescent label (fluoresceïne) gekoppeld aan anti-CD4-antilichamen. Beide labelingsmethoden wijzen de cel linksboven aan als CD4+ en de andere cel als CD4-. Op dit moment wordt van een groot aantal andere polymeren, in de vorm van submicronbolletjes, getest of ze te gebruiken zijn als Ramanlabel. Geprobeerd wordt de bolletjes zo klein mogelijk te houden.

lage cm^{-1} Raman spectroscopie

In het lage cm^{-1} -gebied ($<200\text{ cm}^{-1}$) worden DNA- en eiwitvibraties aangetroffen welke nog slecht gekarakteriseerd zijn. Wanneer als benadering voor een moleculaire vibratie een harmonische oscillatie genomen wordt, dan geldt voor de vibratiefrequentie ω : $\omega = \sqrt{(k/M)}$ (k. krachtconstante, M massa). Vertaalt naar een

macromolecuul betekent dit dat in het lage cm^{-1} -gebied vibraties worden aangetroffen waarbij grote delen van het molecuul (grote M) en zwakke chemische bindingen, zoals waterstofbruggen (kleine k) betrokken zijn. Dit houdt in dat d.m.v. lage cm^{-1} Raman spectroscopie wellicht informatie kan worden verkregen over fluctuaties in de, voor hun biologische functie zo belangrijke, secundaire en tertiaire structuur van DNA en eiwitten. De technische kant van de zaak is het probleem, dat de intensiteit van het niet in golflengte verschoven laserlicht sterk onderdrukt moet worden, terwijl zo mogelijk Ramanverstrooid licht dat $\sim 1\text{ nm}$ of minder in golflengte is verschoven t.o.v. dit laserlicht (bij 660 nm laserexcitatie komt dit overeen met $\sim 20\text{ cm}^{-1}$) efficiënt gedetecteerd dient te worden. Hiervoor is een speciale opstelling ontworpen (figuur 19) [18]. Licht dat van het preparaat komt wordt ingevangen door een microscoopobjectief en vervolgens tussen twee parallel opgestelde dielectrische filters met een door-



Figuur 19

Confocale Ramanmicrospectrometer voor simultane lage cm^{-1} Stokes- en anti-Stokes Ramanmetingen. De filterset onderdrukt de intensiteit van het niet in golflengte verschoven laserlicht en zorgt voor de optische koppeling van microscoop en spectrometer. Zie tekst voor details. (overgenomen van ref. 18, copyright 1994 Society for Applied Spectroscopy)

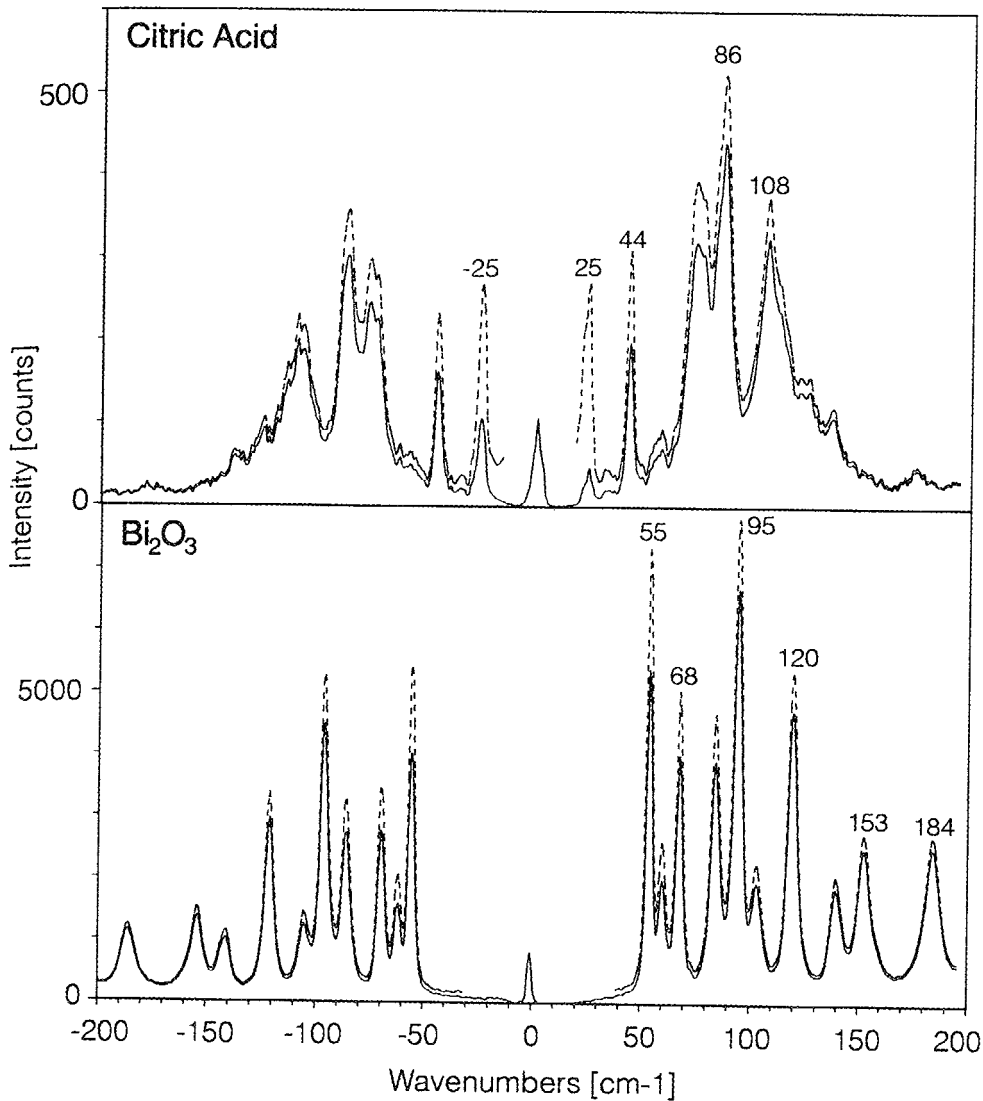
laatband van 0.5 nm (FWHM) en een maximum transmissie van $> 70\%$, heen en weer gereflecteerd. Bij elke "reflectie" verdwijnt zo 70% van het niet in golflengte verschoven laserlicht uit de signaalbundel, terwijl in golflengte verschoven Ramanverstrooid licht steeds met een efficiency oplopend tot 97.5% gereflecteerd wordt. Na 16 reflecties blijft zo $> 70\%$ van het Ramansignaal over, terwijl de intensiteit van het laserlicht onderdrukt is met een factor $> 10^8$. De filterset zorgt ook voor de optische koppeling van microscoop en spectrometer, doordat laserlicht ingekoppeld wordt in de microscoop na passage van een van de dielektrische filters (waardoor een apart bandpass filter (zie figuur 4) niet nodig is). In praktijk passeert het laserlicht dit filter 3 keer, voordat het in de microscoop wordt ingekoppeld. Zo wordt fluorescentie van de dye-laser rondom de laserlijn onderdrukt, welke anders voor een hoge signaalachtergrond zou zorgen in het lage cm^{-1} -gebied. Figuur 20 laat zien dat op deze manier multichannel Ramanmetingen mogelijk zijn tot op 20 cm^{-1} van de laserlijn

en dat Stokes- en anti-Stokes Ramansignaal gelijktijdig gemeten kan worden. Deze opstelling zal worden ingezet voor onderzoek naar laagfrequente vibraties in DNA, cellen en chromosomen.

dedicated instruments

De snelle ontwikkeling van monomode diodelasers, goedkope holografische filters voor laserlijnonderdrukking en gevoelige, eenvoudig te gebruiken detectors, zoals photoncounting avalanche fotodiodes maken het mogelijk Ramanspectroscopie uit de laboratoriumsfeer te halen en toe te passen in compacte dedicated instruments, t.b.v. bijvoorbeeld routinematige metingen en process-control. Figuur 21 laat zien dat ook m.b.v. een diodelaser als lichtbron (Toshiba TOLD 9140 S, 690 nm, $\sim 1 \text{ mW}$ op het preparaat) al een goed Ramanspectrum kan worden opgenomen (in dit geval van caroteen in een gistcel).

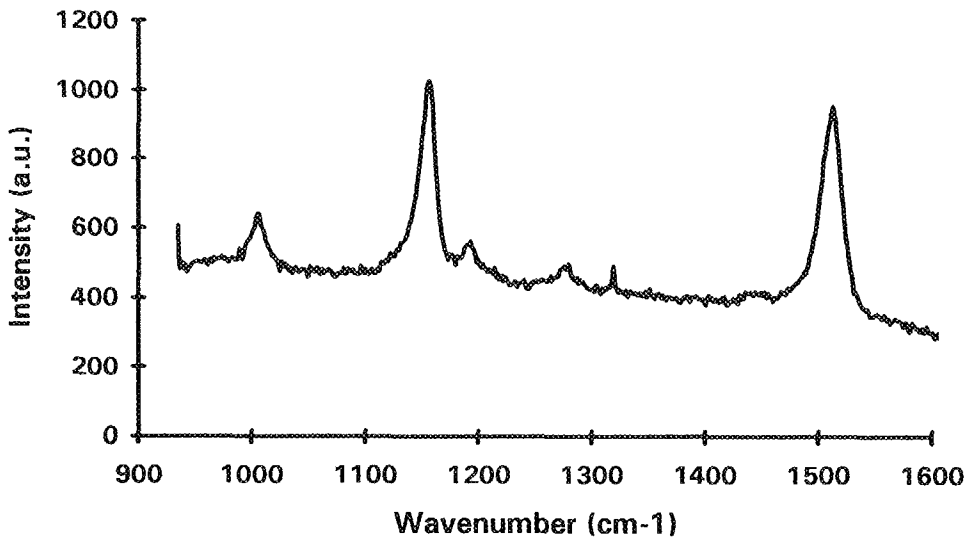
Het hierboven beschreven onderzoek laat zien dat door technische ontwikkelingen, Ramanspectroscopie van een moeilijke,



Figuur 20

Lage cm^{-1} -spectra van citroenzuur (boven) en bismuth-oxide (onder). De onderbroken lijnen zijn de gemeten spectra, gecorrigeerd voor de transmissiecarakteristiek van de filterset. De getrokken lijnen zijn ongecorrigeerde spectra. Stokes- en anti-Stokes-Ramanspectra kunnen simultaan gemeten worden tot op ongeveer 20 cm^{-1} van de laserlijn.

(overgenomen van ref. 18, copyright 1994 Society for Applied Spectroscopy)



Figuur 21

Ramanspectrum van caroteen in een gistcel. Voor deze meting is gebruik gemaakt van een monomode laserdiodo (Toshiba, TOLD 9140 S) voor excitatie van het Ramansignaal. Laser vermogen op de cel ~ 1 mW (690 nm), meettijd 30 s

misschien zelfs wat exotische vorm van spectroscopie, is uitgegroeid tot een breed inzetbare techniek. Dit overzicht heeft zich grotendeels beperkt tot onderzoek zoals dat wordt uitgevoerd aan de Universiteit Twente. Wereldwijd houdt zich een groot en groeiend aantal groepen bezig met het implementeren van Ramanspectroscopische technieken voor (cel)biologisch en biomedisch onderzoek. Een sterke groei in de toepassing daarvan lijkt dan ook slechts een kwestie van tijd.

Het onderzoek aan de Universiteit Twente wordt ondersteund door het Biomedisch Technologisch Instituut van de Universiteit Twente, de Stichting Levenswetenschappen en de Gebiedsraad Medische Wetenschappen van het NWO, de Stichting voor Technische Wetenschappen, het Praeventiefonds en het Haags Oogheelkundig Fonds.

referenties

- [1] G.J. Puppels, F.F.M. de Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D.J. Arndt-Jovin, T.M. Jovin 1990. *Nature* 347, 301-303.
- [2] G.J. Puppels, W. Colier, J.H.F. Olminkhof, F.F.M. de Mul, C. Otto, J. Greve. 1991. *J. Raman Spectrosc.* 22, 217-225.
- [3] G.J. Puppels, H.S.P. Garritsen, J.A. Kummer, J. Greve. 1993. *Cytometry* 14, 251-256.
- [4] G.J. Puppels, H.S.P. Garritsen, G.M.J. Segers-Nolten, F.F.M. de Mul, J. Greve. 1991. *Biophys. J.* 60, 1046-1056.
- [5] G.J. Puppels, J.H.F. Olminkhof, G.M.J. Segers-Nolten, C. Otto, F.F.M. de Mul, J. Greve. 1991. *Exp. Cell Res.* 195, 361-367.

- [6] B.L.N. Salmaso, G.J. Puppels, R. Floris, R. Wever, J. Greve. 1994. *Biophys. J.* in press (juli 1994)
- [7] G.J. Puppels, C.A.J. Putman, B.G. de Grooth, J. Greve 1993 *SPIE* 1922, 145-155.
- [8] G.J. Puppels, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D.J. Arndt-Jovin, T.M. Jovin. 1994. *Biochemistry* 33, 3386-3395.
- [9] A. Huizinga, A.C. Bot, F.F.M. de Mul, G.F.J.M. Vrensen, J. Greve 1989. *Exp. Eye Res.* 48, 487-496.
- [10] I. Siebinga, G.F.J.M. Vrensen, C. Otto, G.J. Puppels, F.F.M. de Mul, J. Greve. 1992. *Exp. Eye Res.* 54, 759-767
- [11] M.H. Smeets, G.F.J.M. Vrensen, C. Otto, G.J. Puppels, J. Greve. 1993. *Biochim. Biophys. Acta* 1164, 236-242.
- [12] R. Manoharan, J.J. Baraga, M.S. Feld, R.P. Rava. 1992. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 16, 211-233
- [13] H. Buiteveld, F.F.M. de Mul, J. Mud, J. Greve. 1984 *Appl. Spectrosc* 38, 304-306.
- [14] C.-H. Liu, B.B. Das, W.L. Sha Glassman, G.C. Tang, et. al 1992. *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 16, 187-209.
- [15] M. Delhaye, P. Dhameincourt 1975. *J. Raman Spectrosc.* 3, 33-43.
- [16] G.J. Puppels, M. Grond, J. Greve. 1993. *Appl. Spectrosc* 47, 1256-1267.
- [17] N.M. Sijtsema, G.J. Puppels, J. Greve. 1994. *Bioimaging*, submitted.
- [18] G.J. Puppels, C.G. de Grauw, M.B.J. te Plate, J. Greve 1994. *Appl. Spectrosc.* submitted.
- [19] G.J. Puppels, A. Huizinga, H.W. Krabbe, H.A. de Boer, G. Gijbbers, F.F.M. de Mul. 1990. *Rev. Scient. Instrum.* 61, 3709-3712.
- [20] J. Greve, G.J. Puppels. 1993. In "Biomolecular Spectroscopy Part A" (R.J.H. Clark, R.E. Hester, editors). Wiley & Sons, Chichester, 231-265.