

# In vitro

Emil Boye Kromann, Institut for Sundhedsteknologi, DTU

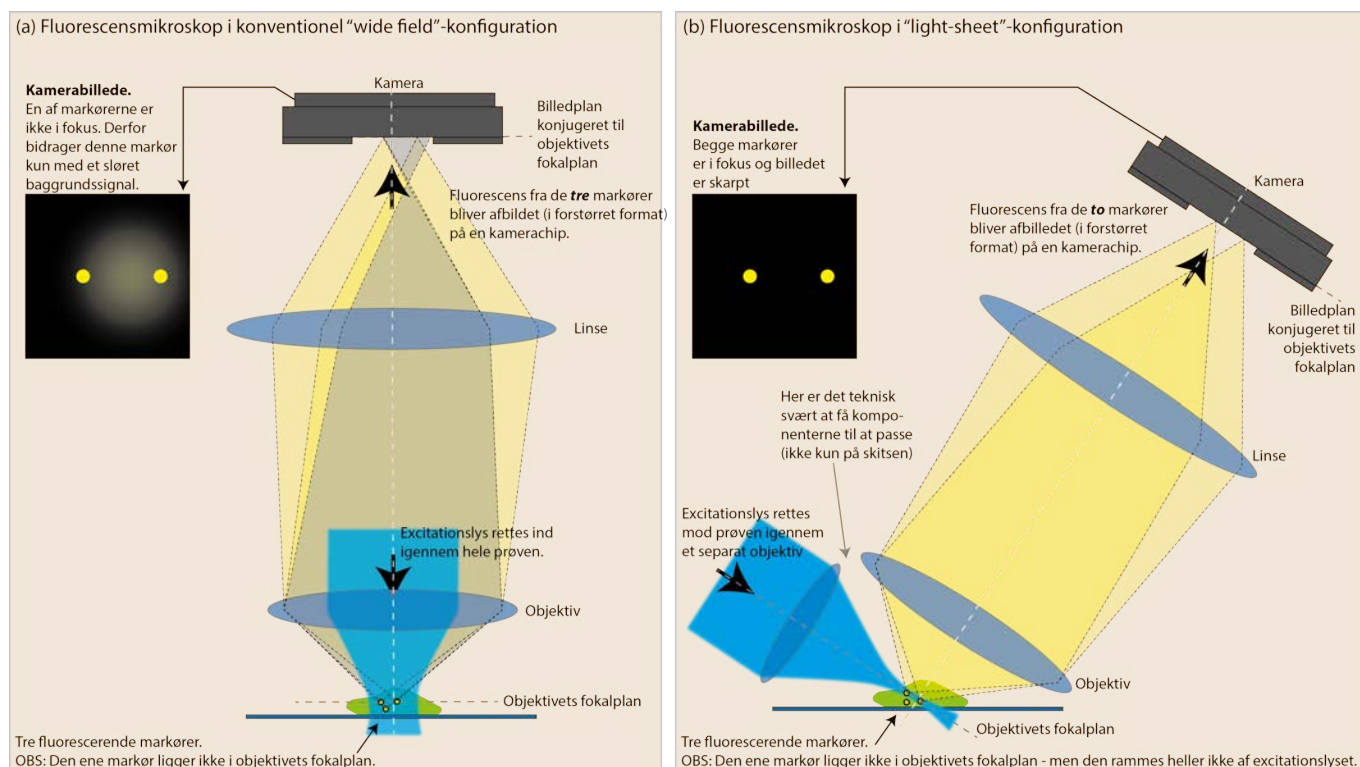
Meget af vores viden om cellebiologi er udledt af klassiske mikroskopbaserede eksperimenter, som har taget udgangspunkt i en simpel prøve: En isoleret celle i en petriskål. Men kan vi regne med, at en isoleret celle i en petriskål opfører sig, som den ville gøre i sit naturlige miljø? – Nej, det kan vi nok ikke altid. Denne artikel belyser ét aspekt af den igangværende mikroskopudvikling – nemlig udviklingen af mikroskoper, som kan observere levende celler i intakte væv.

Kvant er et tidsskrift for fysik og astronomi – et tidsskrift, der behandler “observationer af verdensrummets giganter” og “teleskopteknologi”. Jeg føler mig meget privilegeret og måske lidt fejlcastet, når jeg nu har fået lov til at bringe denne beretning om “observationer af bio-rummets bitte små celler” og “mikroskopeteknologi”. Jeg håber at du, kære læser, er med på at tage et kig igennem den anden ende af teleskopet – nedad og indad.

I min optik er den væsentligste forskel imellem mikroskopi og “teleskopi”, at vi kan ændre og perturbere den prøve, vi undersøger med vores mikroskoper. Fx kan vi få bestemte proteiner i en celle til at lyse op vha. fluorescerende markører, og vi kan observere, hvordan neuroners respons på stimuli ændrer sig, når vi sænker temperaturen. Tænk lige over, hvor effektivt vi ville kunne udforske verdensrummet, hvis vi havde lignende muligheder for at påvirke de objekter og fænomener, som vi forsøger at observere igennem vores teleskoper. Mon ikke vi kunne danne os en hel masse nye indsigter,

hvis vi kunne få exoplaneter til at “lyse op” eller bare se, hvad der sker, når en galakse køles ned. Den luksus har vi desværre ikke, når vi kigger op. Men når vi kigger ned, er det en helt anden sag.

Det er absolut en fordel, at vi kan påvirke de prøver, vi mikroskoperer. Men det er også en faldgrube. Eksempelvis har vi længe været tilfredse med at observere, hvordan levende, eukaryote celler opfører sig i isolation på en glasoverflade (*in vitro*) – altså efter en betydelig perturbation, hvor cellerne er blevet isoleret fra deres naturlige miljø, som typisk består af andre celler samt et hav af signalstoffer. Jeg ville ikke selv opføre mig helt normalt, hvis jeg blev ladet alene på en glasflade – og da slet ikke, hvis jeg blev gennemlyst af en meget kraftig lyskilde, som det ofte er tilfældet for biologiske prøver, der mikroskoperes. I dette lys må vi tage visse forbehold, når vi konkluderer på observationer, som foretages under “unormale” forhold for den biologiske prøve.



**Figur 1.** Reduktion af lysdosis. (a) Et almindeligt fluorescensmikroskop belaster hele prøven med excitationlys og producerer relativt slørede billeder. (b) Et light-sheet-fluorescensmikroskop belyser kun et tværsnit igennem prøven og producerer skarpe billeder. Bemærk, at excitationlyssets strålebane er en smule fortegnet.



Figur 2. Light-sheet konfiguration jf [2].

Mikroskopbrugerne (aka. biologerne) er ikke blinde for denne problematik, og de har længe efterspurgt biobilleddannelsesmetoder, der kan “filme” cellers opførsel i intakte væv – helst hurtigt, helst i tre dimensioner, og helst uden at prøven perturberes af selve billeddannelsesprocessen. Ja, de er ikke kede af det, biologerne. Disse behov har været (og er fortsat) en hård nød at knække for det teknisk-videnskabelige samfund omkring udviklingen af mikroskoper til biologisk billeddannelse – altså den faggruppe, jeg selv tilhører. Vi er slet ikke i mål endnu. Men det går hurtigt fremad. I denne artikel tager vi et kig på nogle af de centrale udfordringer og løsninger, som karakteriserer den igangværende udvikling af fluorescensmikroskoper til billeddannelse af levende væv.

### Udfordring #1: Lysdosis

En af udfordringerne ved fluorescensbaseret billedannelse af levende væv er, at vi må begrænse den lysdosis, vi udsætter vævet for. For at frembringe fluorescens fra en markør i vævet, er det nødvendigt at ramme markøren med lys, typisk fra en laser med en passende fotonenergi, som kan bringe markøren i en exciteret (mere energirig) tilstand. Herefter kan markøren falde tilbage til sin grundtilstand ved at fluorescere. Mere specifikt foregår fluorescens ved, at markøren først afgiver lidt af den tilførte energi til omgivelserne og derefter emitterer en foton med lavere (Stokes-forskudt)

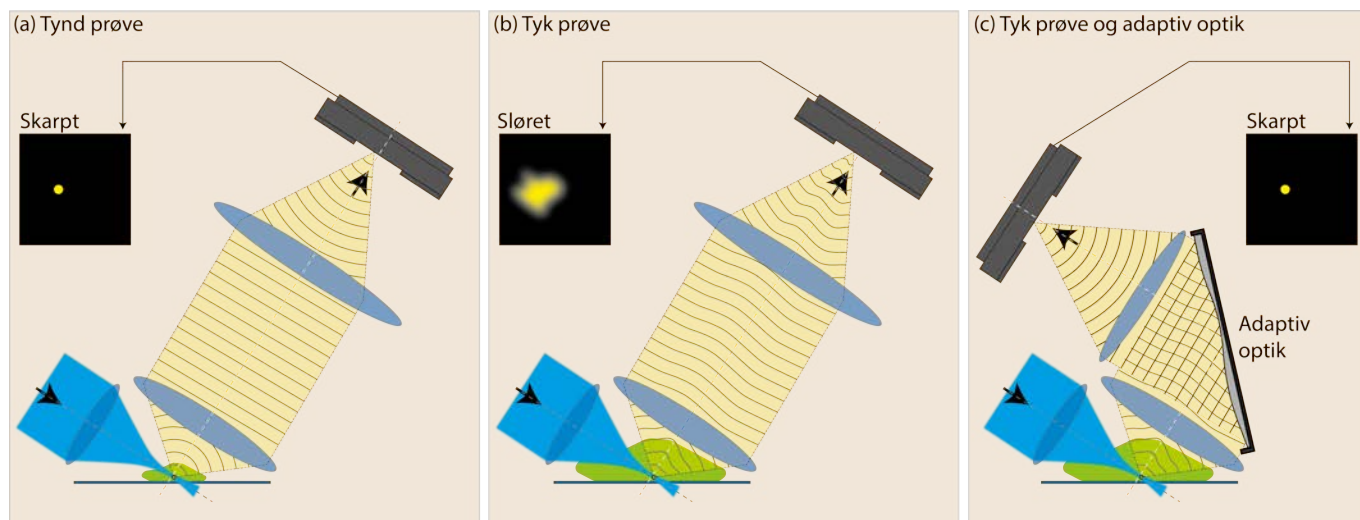
energi, end den blev tilført. Vi kan så være heldige at detektere den emitterede foton med et kamera placeret i et billedplan konjugeret til prøven, som vist i figur 1a. I konventionelle fluorescensmikroskoper indfører vi det exciterende lys gennem det samme mikroskopobjektiv, som vi bruger til at opsamle emitteret lys (fluorescens), herved gennemlyser vi hele prøven og ikke kun det plan i prøven, vi forsøger at tage et billede af.

Denne lysgeometri har to ulemper: For det første er der altid en risiko for, at det exciterende lys interagerer med prøven på destruktiv vis, hvorved de naturlige biokemiske processer i prøven perturberes. Når hele prøven gennemlyses, er der relativt høj risiko for, at sådanne perturbationer manifesterer sig. For det andet exciteres en masse markører uden for billedplanet helt unødigt. Hver gang en markør exciteres, er der en risiko for, at dens kemiske struktur ændres, hvorved markøren kan miste sin evne til at fluorescere. Når de fluorescerende markører gradvist bliver ødelagt, må vi kompensere ved at skrue mere op for excitationslyset – og så ødelægger vi bare endnu flere markører og øger risikoen for at perturbere prøvens naturlige biokemi.

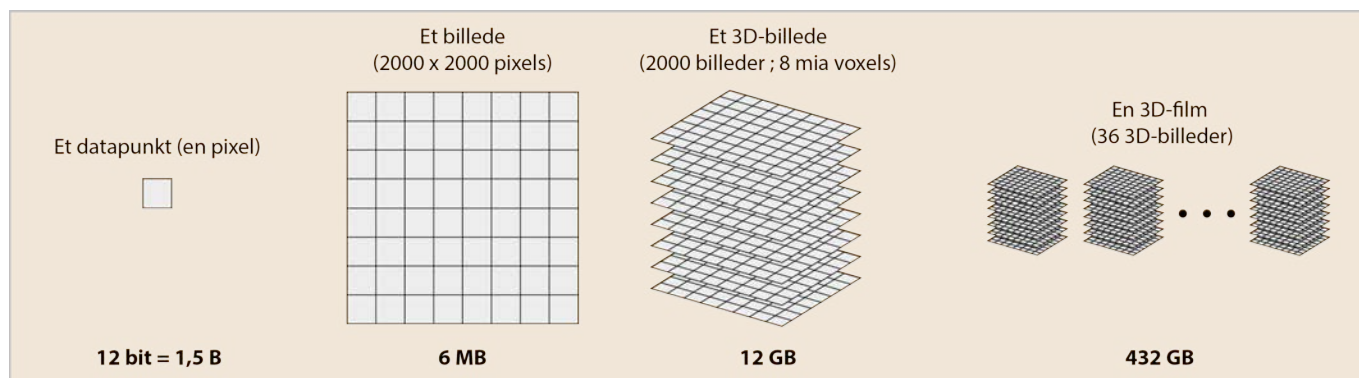
En løsning, som i nogen grad omgår disse to problemer, er “light-sheet”-lysgeometrien, der benytter to objektiver som vist i figur 1b og figur 2 [1,2]. Det ene objektif indfører et smalt tæppe af lys, som kun exciterer markører i ét plan i prøven. Fluorescens emitteret fra markørerne i dette plan afbildes på kameraet via det andet objektif. Ideen bag light-sheet-lysgeometrien er flere årtier gammel, men den er først begyndt at vinde indpas i de seneste år, hvor automatisering og specialfremstillede optiske komponenter har gjort teknologien praktisk anvendelig og tilgængelig.

### Udfordring #2: Strålebaneforvrængninger

En anden stor udfordring er at kigge dybt ind i levende væv, uden at skære det i stykker. Et levende væv består nemlig af mange lommer med forskellige brydningsindeks (fx cellekernen, cytosol, og det ekstracellulære rum). Som sådan kan vi sammenligne et levende væv



Figur 3. Adaptiv optik. (a) Et light-sheet-fluorescensmikroskop og en tynd prøve. Her har vi ingen problemer med strålebaneforvrængninger. (b) En tykkere prøve forvrænger strålebanen imellem markør og kamera. Derfor får vi et sløret billede af markøren. (c) Med adaptiv optik kan vi kompensere for de strålebaneforvrængninger, den tykke prøve inducerer. Den viste adaptive optik (selve komponenten) er et deformerbart spejl (engelsk: deformable mirror) – en computerstyret, reflektiv membran, som kan bøjes i arbitrære former.



**Figur 4.** En hel masse data. En kort 3D-film kan hurtigt sluge 432 GB hukommelse.

med ornamenteret glas, som vi kender det fra gammeldags badeværelsesvinduer: Mediet er rimeligt gennemsigtigt, så vi kan godt tage et billede af et objekt på den anden side. Det er imidlertid svært at få et skarpt billede, fordi mediet forvrænger lysets strålebåne. En fornuftig løsning på dette problem blev faktisk kopieret direkte fra “teleskopien”, hvor man længe har brugt adaptiv optik (engelsk: adaptive optics) til at kompensere for strålebaneforvrængninger forårsaget af “ujævnheder” i Jordens atmosfære [3]. Den mest almindelige form for adaptiv optik er et computerstyret spejl, der kan bøjes i arbitrære former – ligesom spejlene i Tivolis spejlkabinet. Tricket er at bøje spejlet i netop dén form, der modsvarer den strålebaneforvrængning, som indføres af mediet imellem kamera og objekt. Jeg har aldrig brugt adaptiv optik til at kigge igennem badeværelsesvinduer, men det burde i princippet være muligt. Figur 3 viser, hvordan adaptiv optik kan bruges (fornuftigt) til at kompensere for strålebaneforvrængninger fra et væv, hvorved vi får et skarpt billede af fluorescerende strukturer relativt dybt inde i vævet.

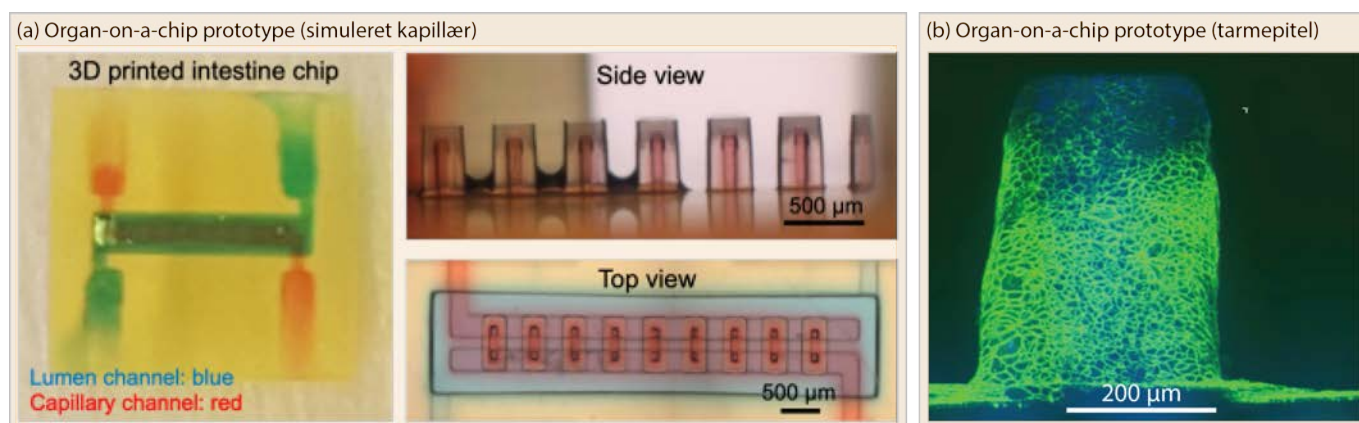
### Udfordring #3: Datamængden

Det har længe været muligt at kortlægge den tredimensionelle fordeling af fluorescerende markører i biologiske strukturer. Rent praktisk gøres dette ved at optage en serie/stak billeder af forskellige tværsnit igennem

prøven, som vist i figur 4. Med nye metoder som light-sheet-mikroskopi kan vi optage et “3D-billede” meget, meget hurtigt – alt for hurtigt, vil nogen sige, på grund af den datamængde, vi så skal håndtere. Med eksisterende teknologier kan vi fx sagtens optage et 3D-billede bestående af 2.000 billeder, hvert bestående af  $2.000 \times 2.000$  pixels. Dette vil give os 8 milliarder datapunkter (voxels). Hvis hvert datapunkt har en bitdybde på 12 bit (svarende til 1,5 byte), så vil vores 3D-billede optage 12 GB hukommelse. Hvis kameraet optager 20 billeder per sekund (det er lavt sat), så tager det 100 sekunder at optage vores 3D-billede. Hvis vi nu skal lave en 3D-film, altså en serie af 3D-billeder, så vil vi efter en time have opsamlet 432 GB data. Vi kan altid købe flere harddiske, så datamængden er egentlig ikke et uoverstigeligt problem i sig selv [4]. Det helt store problem har vi, når vi skal trække meningsfuld og kvantitativ information ud af vores billededata. Heldigvis er 3D/4D-billedanalyse også et felt i hastig udvikling [1].

### Udfordring #4: Den biologiske prøve

Det er relativt simpelt at “tage” bestemte proteiner i isolerede celler med fluorescerende markører. En forholdsvis håndgribelig metode er at indføre “skræddersyet” DNA, som får de isolerede celler til selv at producere proteiner med fluorescerende markører. Dette er langt mere kringlet at gøre i intakte væv eller



**Figur 5.** Organ-on-a-chip-prototyper. (a) Et blødt stillads, som tarmceller skal kunne bruge som udgangspunkt for at forme de børstelignende strukturer, vi kender fra tarmepitelet. Et kunstigt kapillær gennemløber hvert børstehår. I panelet til venstre gennemstrømmes den simulerede tarmlumen og den simulerede blodbane med hhv. en blå og en rød væske. (b) Et andet organ-on-a-chip system, som også simulerer tarmepitelet. Celler (grøn og blå) dækker overfladen af chippens bløde stillads. En kombination af organ-on-a-chip-systemer som disse kan måske hjælpe os til at observere, hvordan bestemte næringsstoffer, medikamenter og toksiner finder vej fra tarmes lumen, igennem tarmepitelet, til blodbanen. Med lidt videre udvikling kan vi også begynde at undersøge samspillet imellem forskellige celletyper og sammenhængen imellem cellernes placering og deres funktion. Tak til Rujing Zhang, Nayere Taebnia og Niels B. Larsen (DTU) for lån af figurer.



hele organismer – ikke umuligt, men svært, dyrt og tidskrævende. Affotograferingen af intakte vævsprøver kompliceres yderligere af, at vævet hurtigt holder op med at fungere, hvis det fjernes fra “moderorganismen” – fx fordi tilførslen af iltet blod ophører. Kort sagt: Hvis vævet ikke er tilgængeligt på organismens yderside, så har vi et problem. En rigtig god løsning på dette problem ligger i horisonten i form af organ-on-a-chip-systemer – altså små kunstige organ-efterlignende biologiske strukturer, som fremdyrkes af fx stamceller, se figur 5 [5]. Denne krydsning imellem en *in vitro*- og *in vivo*-prøve kan hurtigt danne basis for en helt ny måde at undersøge biologien og de mekanismer, der ligger til grund for liv og sygdom [6]. En særligt spændende vinkel på organ-on-a-chip-systemer er, at vi måske vil kunne lave person-specifikke systemer og observere, hvordan det kunstige væv responderer på medicinsk behandling. Men det er en helt anden historie.

Nu fik vi skrabet lidt i overfladen på, “hvad der rører sig” i forbindelse med billeddannelse af levende væv – men der er meget mere at tage fat på. Fx fik jeg slet ikke nævnt superopløsningsmikroskopien (se Nobelprisen i kemi 2014), eller det væld af billeddannelsesmetoder, der kan komplementere fluorescensmikroskopien [7]. Mikroskopiens udvikling foregår i krydsfeltet mellem elektronik, biologi, kemi, optik, mekanik, programmering og sågar kvantefysik. Når ét af disse felter rykker sig markant, så følger mikroskopien ofte trop. Måske er det ikke helt galt, at naturvidenskabsbrikken i Bezzewizzer ser ud, som den gør (eller gjorde, sidst jeg spillede det; dengang viste naturvidenskabsbrikken nemlig et billede af et mikroskop) – og måske er denne artikel alligevel ikke helt malplaceret i tidsskriftet *Kvant*.

## Litteratur

- [1] Y. Wan, K. McDole og P.J. Keller (2019) Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, bind 35, side 655–81.
- [2] T. Liu, S. Upadhyayula m.fl. (2018) Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms, *Science*, bind 360, side eaaq1392.
- [3] M.J. Booth (2014) Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image, *Light Sci. Appl.*, bind 3, side e165.
- [4] A. Andreev og D.E.S. Koo (2020) Practical Guide to Storage of Large Amounts of Microscopy Data, *Microscopy Today*, bind 28, nr. 4, side 42–45.
- [5] R. Zhang og N.B. Larsen (2017) Stereolithographic hydrogel printing of 3D culture chips with biofunctionalized complex 3D perfusion networks, *Lab Chip*, bind 17, side 4273–4282.
- [6] L.A. Low, C. Mummery, B.R. Berridge, C.P. Austin og D.A. Tagle (2020) Organs-on-chips: Into the next decade, *Nat. Rev. Drug Discov.*, doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3.
- [7] J. Alvelid og I. Testa (2019) Fluorescence microscopy at the molecular scale *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, bind 12, side 34–42.



*Emil B. Kromann* er lektor ved DTU, hvor han udvikler nye instrumenter til billeddannelse af levende celler og væv. Hans tidlige studier fandt sted ved DTU og han modtog senere sin ph.d.-grad fra Yale University (USA).

## Kommende foredrag

Dato	Tid	Foredragstitel	Foredragsholder	Forening
<b>Apr 2021</b>				
12/4	19.30	Vacciner i pandemiens tid Efter foredraget er der uddeling af en Ørsted grundskolelærermedalje	Peter Lawætz Andersen	SNU
26/4	19.30	Kan voldsomme klimaforandringer forudsiges? Efter foredraget er der generalforsamling	Peter Ditlevsen	SNU
<b>Maj 2021</b>				
3/5	19.30	The Phenomenon of Superspreading its role as an Achilles Heel for coronavirus Efter foredraget er der uddeling af en Ørsted gymnasielærermedalje	Kim Sneppen og Lone Simonsen	SNU
17/5	19.30	Modeller for galaksedannelse	Troels Haugbølle	SNU
<b>Juni 2021</b>				
7/6	19.30	Ørsted, Faraday & Tesla – om teknologisk udnyttelse af elektromagnetismen	Hans Buhl	SNU

SNU: Aud. 1, H. C. Ørsted Institutet, Universitetsparken 5, 2100 København Ø. Der kan komme ændringer grundet COVID-19 restriktioner, så følg med på [www.naturlaeren.dk](http://www.naturlaeren.dk) eller [facebook.com/SNU1824](https://facebook.com/SNU1824)