

Digital holografi

– innovativ teknik för cellstudier



HoloMonitor M3
– det nya digitala holografiska mikroskopet

AV ANETTE GJÖRLOFF WINGREN
KLINISK LEKTOR/DOCENT
MALMÖ HÖGSKOLA

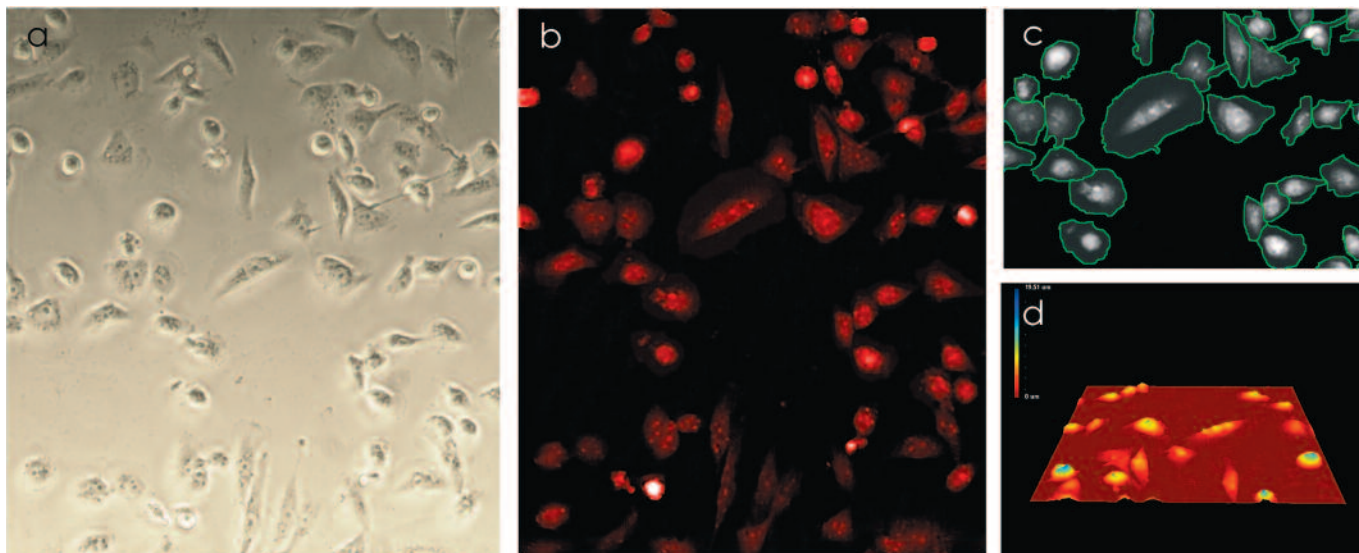
I den här artikeln beskriver vi en metod där vi använder digital holografi och faskontrastmikroskopi för att studera levande celler. Metoden som vi använder skapades av en grupp forskare på avdelningen för Elektrovetenskap på Lunds Tekniska Högskola (LTH), Lunds Universitet, under hösten år 2000. Företaget Phase Holographic Imaging bildades år 2004 i forskarparken Ideon i Lund och finns nu i lokaler i Bioinkubatorn, Biomedicinskt Centrum (BMC), i Lund. Tekniken finns nu

utspridd på flertalet kliniskt inriktade och forskningslaboratorier i Lund och Malmö genom att forskare köpt eller hyrt mikroskopet, som också kallas HoloMonitor M2. Möjligheterna till applikationer på levande celler är oändliga. Hittills har vi och andra framgångsrikt testat metoder för att räkna antal celler, mäta proliferation (celldelning), mäta celldöd (viabilitet) samt fått fram unika morfologiska parametrar på levande celler såsom form (area, tjocklek) och densitet (optisk täthet eller volym). Mätningarna har gjorts parallellt med konventionella analyser för att undersöka om digital holografi är jämförbar med t.ex. manuell cellräkning

med hemocytometer (räkna antal celler samt proliferationsstudier) eller flödes-cytometriska metoder för att mäta apoptos (celldöd). De hittills erhållna resultaten har visat på mycket god jämförbarhet med konventionella metoder.

Bakgrund

1947 upptäckte ungraren Dennis Gabor principerna för holografi, vilket han också fick Nobelpriset för 1971 i fysik. Digital holografi bygger på traditionell holografi och har varit tillgänglig sedan slutet av 1990-talet och har flertalet applikationer, särskilt användbara för analys av tunna, genomskinliga objekt såsom levande celler. Konditionen på



- a) Bröstcancer celler fotograferade med HoloMonitor i faskontrast-mode
 b) Samma celler i "hologram-mode" av HoloMonitor
 c) Holografiska bilder är kvantifierbara och kan segmenteras och ett flertal parametrar analyseras såsom tjocklek, area, volym samt morfologiska parametrar såsom t ex rundhet, oregelbundenhet osv.
 d) Holografier kan användas för att skapa 3D topografiska avbildningar av celler där olika färger sätts beroende på cellernas tjocklek

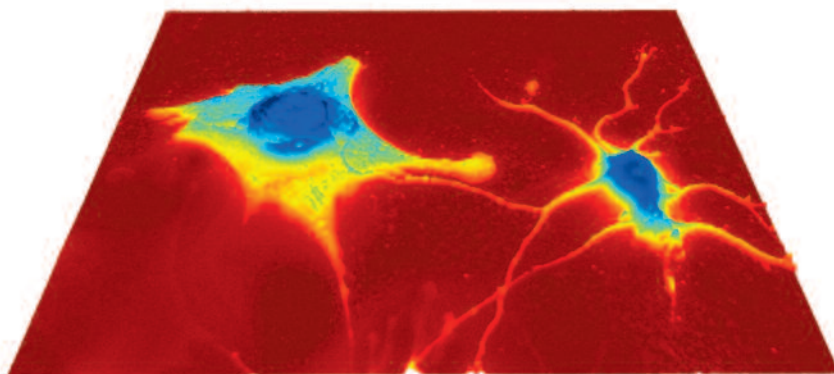
de celler som odlas in vitro i laboratoriet kan analyseras med hjälp av en segmenteringsmjukvara som ger oss möjligheten att bygga upp en databas av celler fotograferade med en CCD (charge coupled device)-kamera. Hologrammen rekonstrueras med hjälp av mjukvaran och numeriska metoder. Det innebär att parametrar såsom cellernas optiska täthet, area och form kan "översättas" till bl a cellkondition, vitalitet och proliferation, genom att använda lämpliga analyser med mjukvaran. Dessutom erhåller man mycket visuella tredimensionella (3D) bilder och man kan välja att fotografera många gånger över en viss tid, vilket ger bildsekvenser som man kan sätta ihop till en film. Även förflyttning (migration) och rörelse (motilitet) av celler kan mätas. Det som också gör denna teknik extra intressant är att den är icke-förstörande för eukaryota celler och används helt utan inmärkning. För traditionell mikroskopi

måste man behandla cellerna på något sätt för att kunna visualisera dem. Många behandlingar är toxiska för cellerna och kan till och med skada eller ta död på dem. Med digital holografi behöver man varken tillsätta färgämnen, antikroppar, fluorokromer, radioaktiva substanser eller andra ämnen för att kunna analysera sina celler, vilket är en stor fördel. Analysen görs direkt på cellerna i deras naturliga tillväxtmiljö. Styrkan med HoloMonitor M2 är att det är ett mycket användbart verktyg för att både visualisera och kvantitativt analysera levande celler.

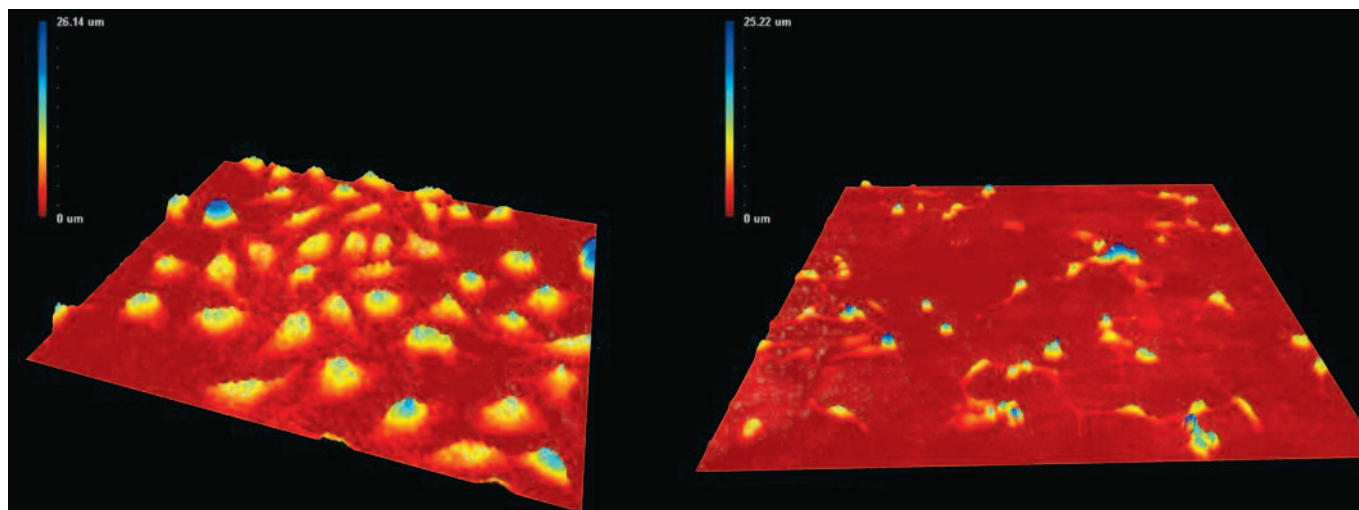
Applikationer

De första försöken som utfördes med HoloMonitor M2 var proliferationsstudier på flera olika humana adherenta cellinjer. Experimenten utfördes i Lund och Malmö i ett samarbete mellan forskare och anställda på företaget Phase Holographic Imaging.

I vår första publikation (Mölder et al, 2008) visade vi att vi kan bestämma cellantal, konfluens ("cellmattans" täthet), optisk täthet och proliferation av adherenta cell på ett enkelt och bekvämt sätt genom att mäta det totala fasskiftet på 15 slumpvis utvalda områden i botten på en cellodlingsflaska eller brunn. Alla bilder (både faskontrast och hologram) sparas automatiskt i en avancerad databas, där alla enskilda parametrar såsom cellantal per bild, cellarea, tjocklek, volym och oregelbundenhet kan räknas fram när som helst. Detta görs på ett smidigt sätt där alla data läggs i en Excel-fil från vilken man enkelt kan göra grafer och beräkningar. Mätningarna i proliferationsstudien gjordes en gång per dag i 4 dagar på rad för att erhålla förändringar i celltillväxt. För att göra analyser med digital holografi behöver man inte trypsinera loss cellerna från cellodlingsflaskan, vilket oftast är nödvändigt för att kunna utföra cellanalyser med andra metoder. Man kan välja att göra holografimätningarna i exakt samma cellodlingsflaska varje dag eller sätta ut så många parallella cellodlingsflaskor så att man kan göra mätningar på en ny flaska varje dag. Det är att rekommendera om man parallellt ska analysera cellerna med en annan teknik för att verifiera metoden. I proliferationsstudien trypsinerade vi cellerna efter holografimätning och räknade dem manuellt med en hemocytometer. Resultaten jämfördes och korrelationen mellan de två metoderna var mycket hög.



Tredimensionellt hologram av gliomceller.



Bröstcancer celler MDA-MB231 ändrar morfologi efter behandling med cycloheximide. Obehandlade celler till vänster och behandlade celler till höger i bilden.

DÅ MAN GJORT några analyser och känner sig säker på att metoden fungerar för den valda celltypen, så kan man gå vidare och tillsätta en substans av intresse och mäta eventuella förändringar i cellpopulationen över tid. Exempelvis kan man tillsätta olika koncentrationer av aktiverande, inhiberande eller toxiska substanser till celler (dos respons) och studera förändringar i cellantal, cellarea, tjocklek och volym över tid. Man kan också studera celler som transfekterats med DNA för att uttrycka nya proteiner eller med siRNA för att inhibera uttryck av ett visst protein. Dessa behandlingar kan påverka cellernas förmåga till proliferation, vitalitet eller migration. Eftersom analyserna med HoloMonitor M2 i sig inte påverkar cellerna är det ett utmärkt verktyg att använda för studier över längre tid, där man kan ta bilder och erhålla mätvärden så ofta man vill.

I VÅR ANDRA STUDIE behandlade vi celler med ämnen som var kända celldöds-inducerande substanser (El-Schish et al, manuskript 2009). Detta gjorde vi för att undersöka om mikroskopet kunde användas för att analysera celldöd samt särskilja mellan levande och döda celler. Vi gick tillväga på samma sätt som i proliferationsstudien, men tillsatte också välkända giftiga substanser till cellerna efter de fått fästa upp i cellodlingsflaskor. Mätningarna gjordes en gång per dag i 3 dagar för att erhålla eventuella förändringar i celltillväxt. Efter holografimätningen trypsinerades cellerna loss och märktes in med Annexin-V och propidiumjodid (PI) för flödescytometrisk celldödsanalys. Även här stämde resultaten erhållna med de två olika metoderna mycket väl

överens. Med HoloMonitor M2 kunde vi efter behandling med giftiga substanser visualisera små, hopkrympta celler och mäta färre antal celler, mindre area och minskad optisk täthet jämfört med obehandlade celler. I den flödescytometrisk analysen erhöles ökad inbindning av Annexin-V och PI i celler som behandlats med gifter, vilket är ett välkänt tecken på ökad celldöd.

I VÅR SENASTE STUDIE analyserar vi hur icke-adherenta lymfocytter (lymfocyter som blivit cancerceller) fäster upp till antikropps-coatade glasytor i en microarray. Vi mäter visuellt vilka antikroppar som lymfocytterna binder till och vi kan, precis som i de tidigare studierna, erhålla mätvärden för cellernas antal, area, tjocklek och volym. Vi ser denna studie som ett sätt att klassificera lymfocytterna med avseende på vilken eller vilka antikroppar de binder till. Nästa steg blir att behandla de uppfästa lymfocytterna med läkemedels-substanser för att avgöra om det finns undergrupper av lymfocytter som svarar olika på samma behandling. Denna studie beräknas vara avslutad nästa år.

Ytterligare exempel på intressanta cellbiologiska applikationer som kan

studeras med holografi är celldifferentiering, subcellulära förändringar inuti celler efter behandling, förändringar i cytoskelettet och kromatinkondensering. Resultaten av den typen av studier hoppas vi se inom de närmaste åren.

DE BESKRIVNA STUDIERNA har gjorts i samarbete mellan Phase Holographic Imaging, Lund, forskarstuderande Zahra El-Schish, Avdelningen för Immunteknologi, LU, Lund, Prof. Pirkko Härkönen, Avdelningen för Tumörbiologi, LU, Malmö, docent Christer Wingren, Avdelningen för Immunteknologi, LU och klinisk lektor/docent Anette Gjørloff Wingren, Malmö högskola, Malmö.

Publikationer:

Mölder A, Sebesta M, Gustafsson M, Gisselsson L, Gjørloff Wingren A, Alm K. "Non-invasive, label free cell counting and quantitative analysis of adherent cells using digital holography." J. of Microscopy, 232:240-7, 2008.

El-Schish Z, Mölder A, Sebesta M, Gisselsson L, Lenart T, Gustafsson M, Härkönen P, Alm K, Gjørloff Wingren A. "Using digital holography for measurements of growth, viability and death of adherent cells". Manuscript 2009.

Exempel på applikationer – nu och i framtiden

- Cellkaraktärisering och klassificering
- Morfologiska studier
- Dos respons studier
- Celldelning över längre tid
- Cellmigration
- siRNA studier
- Transfektionsstudier
- Studier av intracellulära organeller
- Studier av prokaryota celler