

# Digitalholographische Refraktometrie lebender Zellen in Suspension

Sebastian Kosmeier\*, Björn Kemper\*, Patrik Langehanenberg\*, Ilona Bredebusch\*\*,  
Jürgen Schnekenburger\*\*, Andreas Bauwens\*\*\*, Gert von Bally\*

\*Labor für Biophysik, Universität Münster

\*\* Gastrointestinale Molekulare Zellbiologie, Universität Münster

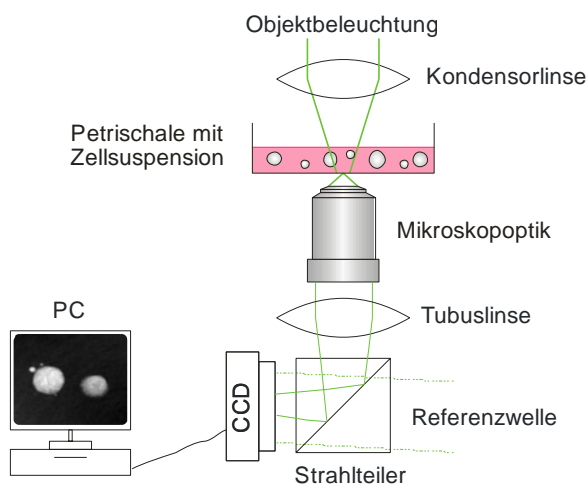
\*\*\* Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Münster

Email: [sebastian.kosmeier@uni-muenster.de](mailto:sebastian.kosmeier@uni-muenster.de)

Um die Zelldicke aus digitalholographischen Phasenkontrastbildern zu ermitteln, ist eine genaue Kenntnis des zellulären Brechungsindex notwendig. Es wird ein digitalholographisches Verfahren vorgestellt, welches den integralen Brechungsindex von sphärischen Suspensionszellen als Parameter der Anpassung eines Modells an digitalholographische Phasendaten ermittelt.

## 1 Einführung

Digitalholographische Verfahren ermöglichen eine quantitative Multifokus-Phasenkontrastmikroskopie, die zur markerfreien dynamischen Lebendzellanalyse geeignet ist [1]. Die Berechnung der Zelldicke aus digitalholographischen Phasenverteilungen erfordert präzise Informationen über den Brechungsindex von Einzelzellen, sowie über dessen statistische Verteilung. Mit dem vorgestellten Algorithmus wird der zelluläre Brechungsindex als Parameter der iterativen Anpassung eines Modells an digitalholographische Phasenverteilungen bestimmt. Voraussetzung hierfür sind ein sphärisches Zellvolumen, ein bekannter Brechungsindex des Zellkulturmediums sowie ein bekannter Abbildungsmaßstab.



**Abb. 1** Durchlicht-Anordnung zur digitalholographischen Mikroskopie. Lichtquelle ist ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ).

## 2 Das Anpassungsverfahren

Das Verfahren nutzt digitalholographisch-mikroskopische Phasenkontrastbilder (Abb. 2, links,

Abb. 3 (a)), wie sie mit einem Aufbau entsprechend Abb. 1 aufgenommen werden. Die Phasenkontrastbilder werden zunächst numerisch untergrundkorrigiert. Für die durch eine Zelle verursachte Phasendifferenz  $\Delta\varphi_Z$  an der Koordinate  $(x, y)$  gilt [2]:

$$\Delta\varphi_Z(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} (n_Z - n_M) \cdot d(x, y). \quad (1)$$

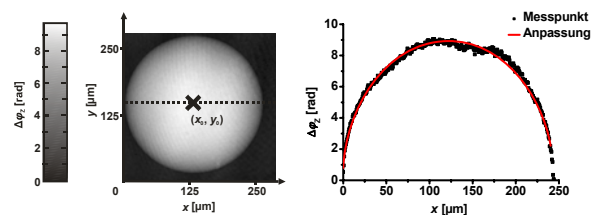
Dabei sind  $n_Z$  und  $n_M$  die Brechungsindizes von Zelle und Medium,  $d(x, y)$  ist die Zelldicke an der Position  $(x, y)$  und  $\lambda$  ist die Wellenlänge des Laserlichts. Mit dem Zellradius  $R$  und dem Zellmittelpunkt  $(x_0, y_0)$  gilt unter der Annahme sphärischer Zellen:

$$d(x, y) = 2 \cdot \sqrt{R^2 - (x - x_0)^2 - (y - y_0)^2}. \quad (2)$$

Einsetzen in (1) liefert:

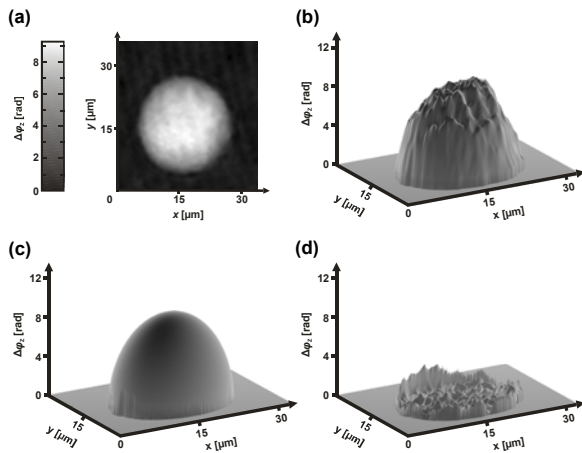
$$\Delta\varphi_Z(x) = \frac{4\pi}{\lambda} (n_Z - n_M) \cdot \sqrt{R^2 - (x - x_0)^2 - (y - y_0)^2}. \quad (3)$$

Gl. (3) wird iterativ nach der Methode der kleinsten Quadrate über die Parameter  $n_Z$ ,  $R$ ,  $x_0$  und  $y_0$  an die Phasenverteilung angepasst. Hierzu wird das Gauß-Newton-Verfahren [3] verwendet. Abb. 2 zeigt die Anpassung von Gl. (3) an den Schnitt durch die gemessene Phasenverteilung eines synthetischen Partikels (bead).



**Abb. 2** Links: Digitalholographisches Phasenkontrastbild eines Bead. Rechts: Profil zum Schnitt entlang der gestrichelten Linie links.

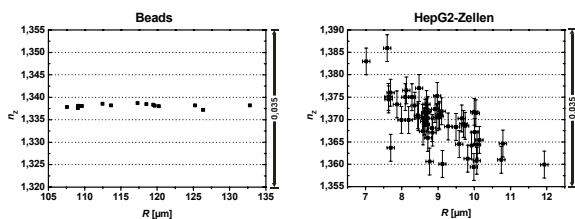
Ein Beispiel für die Anpassung von Gl. (3) an die Phasenverteilung einer Zelle wird in Abb. 3 anhand von Pseudo-3D Darstellungen illustriert. Die Unsicherheit in der Bestimmung des zellulären Brechungsindex  $n_z$  sowie des Zellradius  $R$  wird anhand der Standardabweichung der Ergebnisse an verschiedenen Phasenkontrastbildern ein und derselben Zelle ermittelt.



**Abb. 3** (a) Digitalholographisches Phasenkontrastbild einer Zelle. Die Bilder (b) bis (d) zeigen Pseudo-3D Darstellungen von (b) den Phasendaten, (c) der Anpassung an die Phasendaten gemäß Gl. (3) und (d) des Betrags der Differenz zwischen Phasendaten und Anpassung. Mit  $n_M = 1,337$  ergeben sich  $n_z = 1,373 \pm 0,003$  und  $R = (10,2 \pm 0,1) \mu\text{m}$ .

### 3 Messungen und Ergebnisse

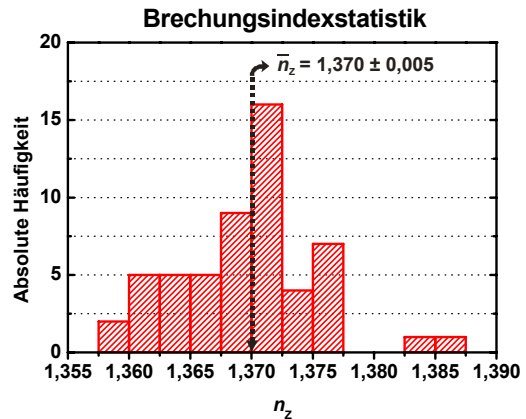
Die Funktionalität des Algorithmus wird durch Untersuchungen an Beads und einer Zelllinie überprüft. Die Messung an Beads ergibt einen radiusunabhängigen Brechungsindex von  $1,3381 \pm 0,0004$  (der angegebene Fehler ist in diesem Fall die Standardabweichung der Brechungsindexverteilung der Beads). Bei Zellen hingegen liefert eine Zunahme des Radius eine Abnahme des integralen Brechungsindex (Abb. 4).



**Abb. 4** Brechungsindex in Abhängigkeit vom Radius. Links: Beads. Rechts: HepG2-Zellen. Der Brechungsindex der beads ist radiusunabhängig, der der Zellen nimmt mit zunehmendem Radius ab.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Wassergehalt der Zellen [4]: Größere Zellen enthalten verhältnismäßig mehr Wasser als kleinere. Ihr Brechungsindex ist daher näher an dem des Zellkulturmediums bzw. an dem von Wasser. Abb. 5 zeigt

die Brechungsindexstatistik von 55 HepG2-Zellen (Lebertumorzellen). Als Mittelwert der Verteilung ergibt sich ein zellulärer Brechungsindex von  $1,370 \pm 0,005$  (Angegebener Fehler: Standardabweichung der Statistik).



**Abb. 5** Brechungsindexstatistik einer Messung von HepG2-Zellen ( $N = 55$ ).

### 4 Zusammenfassung

Vorgestellt wurde ein Verfahren zur Bestimmung des integralen zellulären Brechungsindex aus digitalholographischen Phasenkontrastbildern. Die korrekte Funktionsweise des Algorithmus wurde durch Messungen an Beads demonstriert. An mit einem 63x Objektiv aufgenommenen sphärischen Suspensionszellen erlaubt die Methode die Bestimmung des integralen Brechungsindex mit einer Präzision von etwa 0,003. Die Unsicherheit in der Bestimmung des Zellradius liegt bei ca. 0,1  $\mu\text{m}$ . Das Verfahren ist markerfrei, erfordert keine zusätzliche Probenpräparation und ist somit problemlos in der Lebendzellanalyse einsetzbar. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Brechungsindex von HepG2-Zellen mit der Zellgröße abnimmt.

### Literatur

- [1] G. von Bally, B. Kemper et al., „New ways for marker-free life cell and tumor analysis“, in: J. Popp, M. Strehle (Eds.): Biophotonics: visions for a better health care, Wiley, 301 – 360, 2006.
- [2] B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke, G. von Bally, „Investigations on living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy“, *J. Biomed. Opt.* 11, 034005, 2006.
- [3] Åke Björk, „Numerical Methods for Least Squares Problems“, SIAM, 1996.
- [4] J. Farinas, A. S. Verkman, „Cell Volume and Plasma Membrane Osmotic Permeability in Epithelial Cell Layers Measured by Interferometry“, *Biophys J.* 71, 3511-3522, 1996.

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).