

Digitalholografische Analyse der Substratopografie und deren Einfluss auf die Dynamik von Osteoblasten

Tilman Fiegenbaum*, Markus Dekiff*, Susanne Schäfer**, Ulrich Plate**, Cornelia Denz***, Dieter Dirksen*

*Poliklinik für Prothetische Zahnmedizin und Biomaterialien, Universitätsklinikum Münster

**Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Münster

***Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

mailto: tilman.fiegenbaum@uni-muenster.de

Mit einem digitalholografischen Verfahren wird die Topografie eines Agarosesubstrates für die Zellkultivierung bestimmt. Außerdem wird die Bewegung von Zellen (Osteoblasten) und Polystyrol-Kugeln auf der Substratoberfläche verfolgt. Im Anschluss wird die Topografie mit der beobachteten Bewegung verglichen und der Einfluss des Oberflächenverlaufs auf Richtung und Betrag der Geschwindigkeit untersucht.

1 Einleitung

Osteoblasten (knochenbildende Zellen) bewegen sich auf geeignetem Substrat auf einen gemeinsamen Schwerpunkt zu und bilden sogenannte Mikromassenkulturen (Spheres), die sich möglicherweise im Bereich Tissue-Engineering z. B. für Gewebetransplantate einsetzen lassen [1]. Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist die Beschreibung des Einflusses der Substratopografie auf die Zelldynamik bei der Sphere-Bildung.

Die Topografie des Substrates wird über die digitalholografische Rekonstruktion der Phasenverteilung mit anschließender Umrechnung in Höhenwerte bestimmt. Eine Verifizierung erfolgt mittels einer „depth from focus“-Bestimmung anhand manuell fokussierter Weißlichtaufnahmen von sedimentierten Probeteilchen.

Um den Einfluss der Topografie auf die Zelldynamik zu bestimmen, werden mittels Bildkorrelation Bewegungsvektoren von Zellverbänden ermittelt. Anschließend wird unter anderem der Zusammenhang zwischen dem Schwerpunkt der Zellmigration und der Gestalt der Substratoberfläche sowie zwischen den Geschwindigkeiten der Zellverbände und dem lokalen Gefälle des Substrats untersucht. Zur Einordnung der Ergebnisse erfolgt ein Vergleich mit der Bewegung unbelebter Plastikugeln (sogenannten Beads).

2 Experimentelle Methoden

Die Bestimmung der durch das Substrat hervorgerufenen Phasenverteilung erfolgt mittels digitalholografischer Mikroskopie, wobei die nicht-diffraktive Rekonstruktionsmethode (NDRM) verwendet wird [2]. Die entsprechenden Rekonstruktionsparameter werden dabei anhand einer Kalibrierungsaufnahme ohne Substrat bestimmt, um eine Verfälschung der Verteilung durch den Objektträger zu vermeiden.

Die Höhenverteilung des Substrats wird aus der Phasenverteilung und dem Brechungsindex berechnet, welcher mit einem Refraktometer gemessen wird (hier: 1% Leibowitz Agarose mit $n_o = 1,337$). Die Umrechnung der relativen Phasenwerte in relative Höhenwerte erfolgt dann pixelweise mit $x_{rel} = (\varphi_{rel} / 2\pi) (\lambda / |n_{Luft} - n_o|)$. Das gezeigte Verfahren wird durch einen Vergleich der Ergebnisse mit einer Höhenverteilung validiert, die sich mittels einer „depth from focus“-Methode ergibt (Abb. 1).

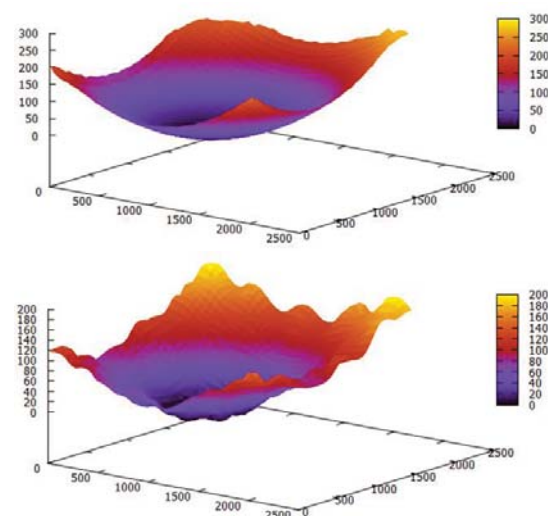


Abb. 1 Konkave Topografie von 5 µl Agarose in einem Multiwellslide (ibidi µ-slide Angiogenesis) als Pseudo-3D-Plot. Oben: Durch digitalholografische Mikroskopie bestimmte Topografie; Unten: Zum Vergleich die durch ein „depth from focus“-Verfahren bestimmte Topografie. Die mittlere Abweichung beträgt außer an den Rändern unter 10 µm.

Für die Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Zellbewegung und Substratopografie ist eine Verfolgung der Zellen erforderlich. Für die Unterscheidung zwischen aktiver und passiver Bewegung werden alternativ auch sogenannte Beads (10 µm durchmessende Polystyrolkugeln) verwendet. Das Tracking dieser Objekte wird mit

einem Autokorrelations-Algorithmus durchgeführt, der in [3] genauer beschrieben wird. In Verbindung mit den Höhendaten aus der Topografieberechnung erlauben die Tracking-Ergebnisse somit eine Korrelation von der Geschwindigkeit der Objekte mit dem Verlauf der Oberfläche des Substrates.

3 Ergebnisse

Es wird der Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Zellen bzw. Beads und dem lokalen Gefälle des Substrates untersucht. Des Weiteren erfolgt ein Vergleich der Bewegung der Zellen mit der der Beads. Die Topografie zweier vergleichbarer Proben (nicht exakt reproduzierbar, nicht wiederverwendbar) wird bestimmt und die Bewegung der Zellen und Beads über einen Zeitraum von 1,5 Stunden verfolgt. Der Schwerpunkt der Bewegung liegt im Zentrum der Kavität des Substrats (Abb. 2).

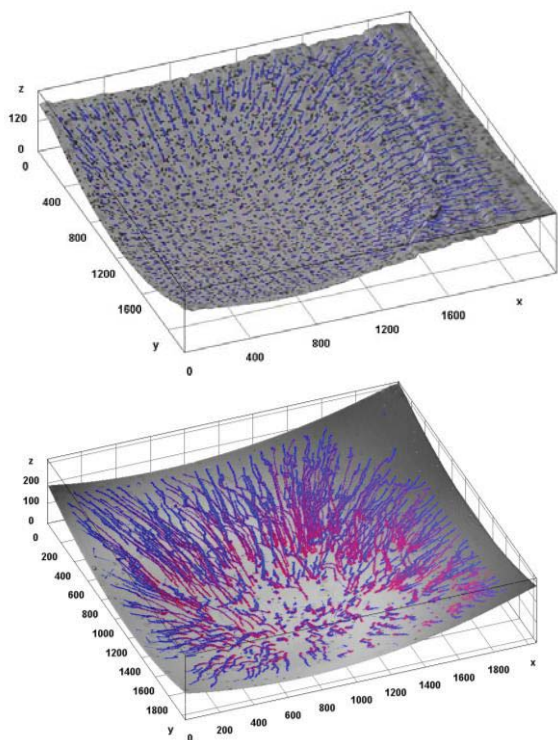


Abb. 2 Überlagerung der Substrattopografie mit dem Ergebnis eines Positionstrackings für einen Zeitraum von 1,5 Stunden. Links das Ergebnis für Beads, rechts das für Osteoblasten (alle Größen in μm).

Die Beads zeigen dabei einen exponentiellen Abfall der mittleren Geschwindigkeit mit der Zeit. Bereits nach einer Beobachtungsdauer von ca. 1000 Sekunden tritt ein nahezu vollständiger Stillstand ein. Die Geschwindigkeit der Osteoblasten bleibt im gesamten Beobachtungszeitraum hingegen relativ konstant. Ein Vergleich der Geschwindigkeiten mit der lokalen Änderung der Topografie zeigt deren Einfluss auf die Bewegung von Zellen und Beads und erlaubt Aufschluss über die Art der Bewegung (Abb. 3).

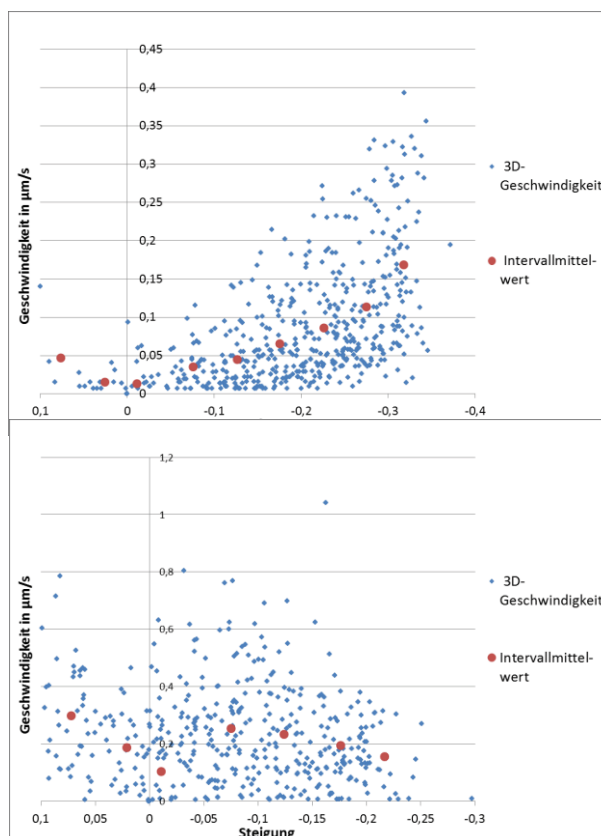


Abb. 3 Geschwindigkeit in Abhängigkeit von dem Gefälle des Substrates für einen Zeitraum von 150 Sekunden nach dem Start der Messung. Links für Beads, rechts für Osteoblasten.

Der Vergleich zeigt für die Beads eine zunehmende mittlere Geschwindigkeit mit zunehmendem Gefälle. Ein entsprechender Zusammenhang ist für die Osteoblasten nicht zu beobachten. Insgesamt deutet dies auf eine aktive Eigenbewegung der Zellen auf dem Substrat hin, die zwar in der Richtung, aber nicht in der Geschwindigkeit durch die Substrattopografie beeinflusst wird. Dies entspricht den Erwartungen einer Eigenbewegung durch fokale Adhäsion. Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob und inwieweit sich die gezeigten Methoden dafür eignen, eine bessere Kontrolle der Sphärebildung für die Gewebekultivierung zu ermöglichen.

Literatur

- [1] K. Brickwedde: *Osteoblasten-Mikromassenkultur*, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2007.
- [2] M. Liebling, T. Blu, E. Cucho, P. Marquet, C. Depeursinge, M. Unser: "A Novel Non-Diffractive Reconstruction Method for Digital Holographic Microscopy" in: Proc. of the IEEE, S. 625 – 628, 2002
- [3] S. Schäfer, M. Dekiff, U. Plate, T. Szuwart, C. Denz, D. Dirksen: "Quantitative analysis of dynamic behavior of osteoblasts during in vitro formation of micro-mass cell cultures" in: J. Biophoton., 6:637–644, 2013