

Av ZAHRA EL-SCHISH¹, ANNA MÖLDER², MIKAEL SEBESTA² OG ANETTE GJÖRLOFF WINGREN^{1,3}

¹Biomedicinsk Laboratorievetsenskap, Hälsa och samhälle, Malmö högskola, Malmö, Sverige

²Phase Holographic Imaging AB, Lund, Sverige,³ Laboratoriemedicin, Skånes Universitetssjukhus, Sverige.

E-post: Anette.Gjorloff-Wingren@mah.se

Det digitala holografiska mikroskopet – innovativ teknik för analys av levande celler

Bakgrund

Dagligen arbetar ett stort antal forskare och kliniker med analyser av primära cellkulturer och etablerade cellinjer, där de använder en mängd olika cellbiologiska tekniker för att analysera celledelning, aktivering, celldöd, cytotoxicitet, cellcykelreglering, migration, med mera. Levande celler är transparenta i vanliga mikroskop, vilket gör att man ofta måste tillsätta färgämnen som tas upp av cellerna för att möjliggöra detektion. Det digitala holografiska mikroskopet är en ny metod som kombinerar faskontrastmikroskopi med digital holografi (figur 1). Metoden kräver att man har tillgång till laser, digital holografisk uppställning (Fresnel-uppsättning), mikroskopobjektiv, svartvit kamera (CCD) med global slutare, eventuellt faskontrastuppställning och tillhörande faskontrastobjektiv. Det mikroskop som nu använts av författarna är HoloMonitor™ M2. Det nya mikroskopet som kommer att tas i bruk under 2010 heter HoloMonitor™ M3 (figur 2).

Holografi är en metod där man spelar in tre-dimensionell (3D) information från ett objekt med hjälp av interfererande vågfronter. Fältet holografi har nyligen genomgått ett paradigmskifte med användandet av digital holografi där de sparade bilderna processas i en dator istället för att framkallas på en fotografisk plåt. Interferensmönstret som spelas in av bildsensorn komprimerar 3D-informationen av objektet till en enda bild. Digital holografi ger information om fasskiftet (Φ) av det laserljus som har reflekterats eller transmittats genom objektet. Fasskiftet kan översättas till optisk tjocklek (L), vilken kan mätas med en upplösning på nanometernivå och bestäms av

objektets refraktiva index (n), våglängden (λ), tjockleken (t), brytningsindex på djupet i zeta-led, $n(z)$ och delta zeta, dz , enligt formel (1) nedan:

$$(1) \quad \Phi = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot L = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \int_0^t n(z) \cdot dz$$

Digital holografi är när informationen i ett interferensmönster fångas upp på en digital sensor och används för att räkna ut bildinformation med hjälp av en dator. Interferensmönstret uppstår när ljuset från en koherent ljuskälla delas i två delar, där den ena strålen, objektstrålen, får gå genom ett prov, till exempel en cell, medan den andra strålen, referensstrålen, går opåverkad förbi. De två strålarna sammanförs sedan igen och skillnaden mellan de två talar om hur mycket ljuset har bromsats när det passerat genom provet (figur 3). Det finns också varianter där endast en stråle används, så kallad in-line holografi. Informationen i interferensmönstret måste bearbetas för att ge en bild, men när uträkningen är gjord innehåller den färdiga bilden både en bild av ljusets amplitud och av dess fas, något som skiljer digital

Sammendrag

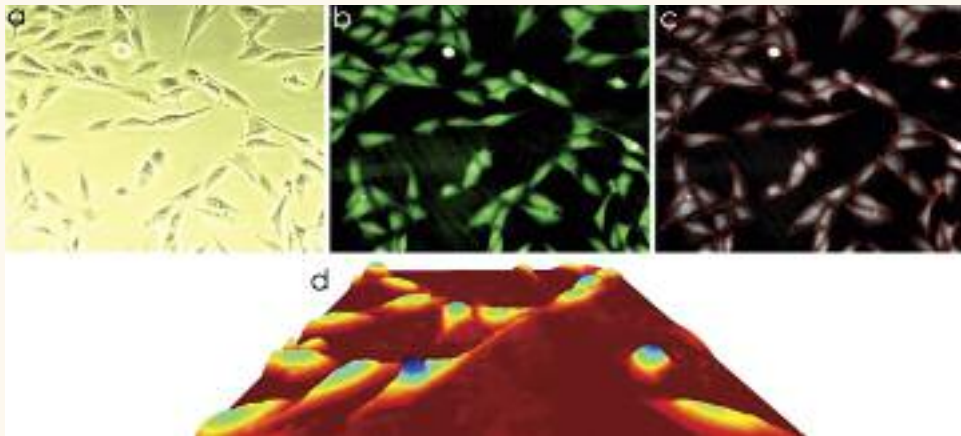
Bakgrund: Digital holografi är en ny teknik som de senaste fem åren använts för att studera levande celler. Tekniken utgör en innovativ, icke-förstörande metod som möjliggör studier av levande celler över tid.

Material och metoder: Litteraturen har valts ut genom att söka på redan kända forskargrupper och företag som arbetar både med digital holografi och cellstudier samt PubMed-sökningar.

Resultat och sammanfattning: Digital holografi ger kunskap om cellernas brytningsindex, som kan ändras under olika förhållanden. De parametrar som kan mätas ger unik information om cellantal, cellernas area, tjocklek och volym, vilket kan omvandlas till proliferation, viabilitet och celldöd. Tekniken är relativt billig, snabb och enkel att använda.

Nyckelord: Digital holografi, cellstudier, cancer, viabilitet, brytningsindex

Bioingenjören er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfelleverdert og godkjent etter Bioingenjøren's retningslinjer.



Figur 1. Adherenta PC3-celler (prostata cancer) som odlats i cellodlingskärl och fotograferats i faskontrast (a), hologram (b), segmenterade celler i hologram (c) samt tredimensionell (3D) bild (d).

holografi från traditionell ljusmikroskopi, som bara ger information om ljusets amplitud. En annan unik egenskap är att bilden som tas i efterhand kan räknas ut på samtliga fokusavstånd, något som gör tekniken väl lämpad för långtidsstudier av prover där omfokusering utgör ett problem. Resultatbilden har också mycket hög upplösning i transversell led eftersom fasinformationen kan bestämmas ner till delar av en våglängd. Fasinformationen i bilden bestäms av hur mycket ljuset har bromsats ner på sin väg genom provet, och är kopplat till både brytningsindex, dess faktiska tjocklek och dess torrmasa.

Holomonitor™ M2 (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Sverige) kombinerar faskontrastmikroskopi med digital holografi. Ljuskällan är en 0.8mW HeNe-laser på 633 nm. Den digitala holografiska uppställningen är monterat på ett faskontrastmikroskop (Nikon). Referensstrålen är placerad i en svag vinkel mot objektstrålen och bildinformationen rekonstrueras med hjälp av en Fresnel-approximation, där bilden först fokuseras i oändligheten och spatialfiltreras för att eliminera den virtuella bilden och nolltermen, och samtidigt sampla ner och centrera den reella bilden.

Digital holografi är helt icke-förstörande för cellerna man studerar, eftersom den har den unika fördelen att man inte behöver tillsätta något färgämne till cellerna före analys. Cellernas kondition analyseras med hjälp av ett segmenteringsprogram som bygger upp en databas av fotograferade celler och därmed får man unika mätvärden på olika cellparametrar såsom cellarea, celltjocklek, form och optisk täthet. Dessa parametrar kan tillsammans med annan information översättas till antalet celler i det fotograferade området, eller konfluens (celltäthet) som mäts i procent. Då man gör mätningar på celler över tid, kan informationen som erhålls från mjukvaran översättas till celledelning (proliferation), celledöd, viabilitet, migration, mm. Det är också intressant att tillsätta en substans och mäta eventuella förändringar i cellpopulationen över tid. Exempelvis kan man tillsätta olika koncentrationer av aktiverande, inhiberande eller toxiska substanser till celler (dosrespons) och



Figur 2. Det digitala holografiska mikroskopet Holomonitor™ M3.

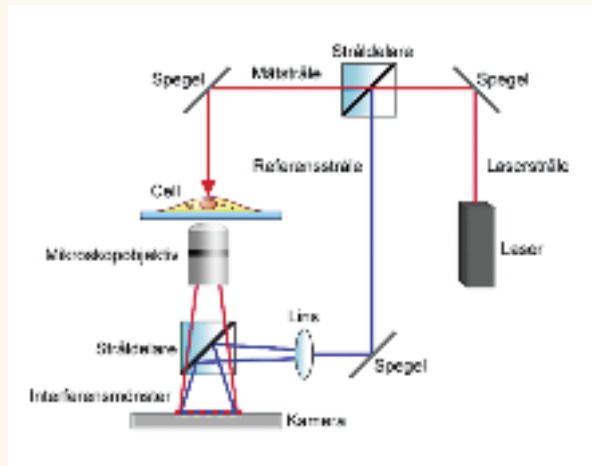
Abstract

Background: Digital holography is a novel technique which has been used for about five years to study living cells. The technique is an innovative, non-destructive method with possibilities to study living cells over time.

Materials and methods: The literature in this paper was selected on the basis of already known research groups and companies in the field working with both digital holography and cell studies, as well as PubMed search.

Results and conclusions: Digital holography is a method that gives us information about the refractive index of cells, which can change under different circumstances. The unique measurable parameters are the cell number, cell area, thickness and volume, which can be transformed to proliferation, viability and cell death. The technique is cheap, fast and simple to use.

Keywords: Digital holography, cell studies, cancer, viability, refractive index



Figur 3. Schematisk bild över strålgången. Ljuset från en laser delas upp i två strålar, en objektstråle (röd) och en referensstråle (blå). Objektstrålen passerar genom provet och ljuset sprids över en kamera (CCD-sensor) med hjälp av ett standard mikroskopobjektiv. Interferensen mellan objekt- och referensstråle bildar ett mönster på kameran.

studera förändringar i cellantal, cellarea, tjocklek och volym över tid. Eftersom analyserna med det digitala holografiska mikroskopet 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.

Material och metod

Huvudförfattaren (A. GW) har arbetat inom området cellbiologi och immunologi sedan 1990 och har varit aktiv med en egen forskargrupp sedan 2002. I tre år har huvudförfattaren även arbetat med att utveckla cellbiologiska tekniker med det digitala holografiska mikroskopet HoloMonitor™ M2.

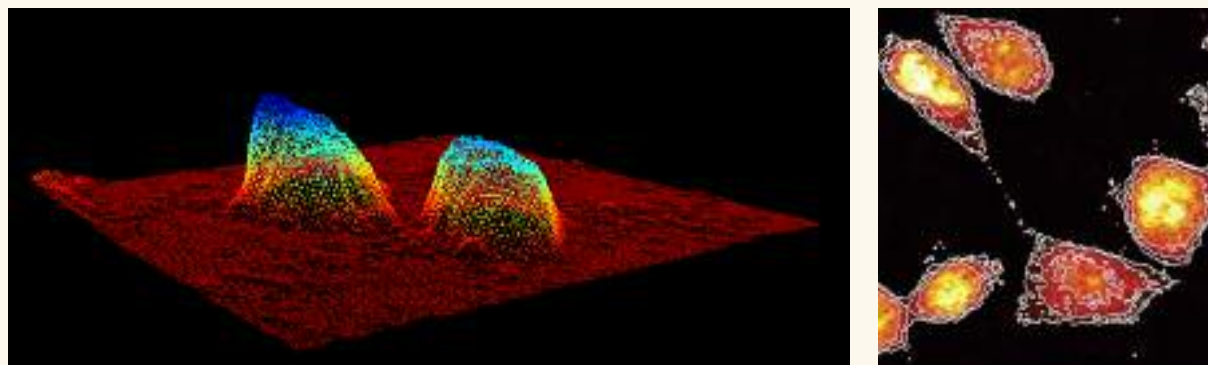
Litteraturen har valts ut genom att söka på redan kända forskargrupper och företag som arbetar med digital holografi och cellstudier samt PubMed-sökningar.

Resultat

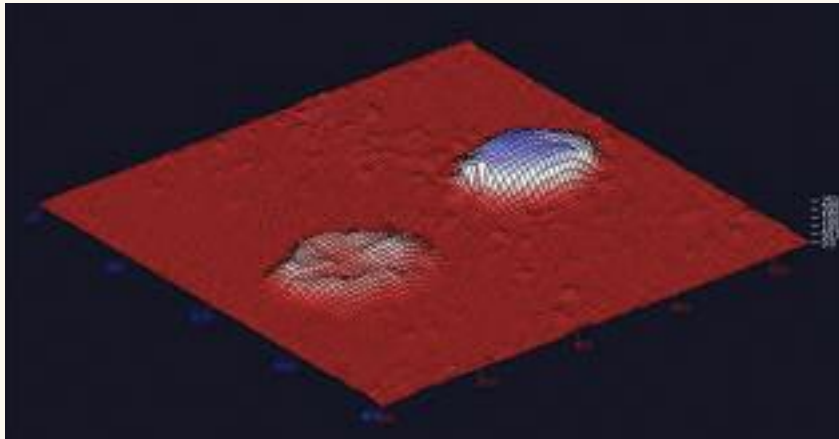
De första experimenten

Holografin upptäcktes av Dennis Gabor som kallade den en ny mikroskopisk princip (1). Digital holografi har använts sedan 1970-talet och principerna för det digitala holografiska mikroskopet har nyligen beskrivits av Kemper och Bally (2). Kortfattat kan man beskriva digital holografi som en metod som skiljer sig från traditionell holografi genom att en digital bildsensor (charge coupled device - CCD) används istället för en fotografisk plåt. Interferensmönstret från objektet komprimeras som information i en enda bild. Digital holografi ger information om fasskiftet hos laserljuset som har reflekterats av eller gått igenom objektet (3). Storleken på fasskiftet bestäms av den optiska tjockleken, vilken beror på både brytningsindex i objektet och objektets tjocklek. Fasskiftet kan mätas med nanometerkänslighet (4). En stor fördel med digital holografi är att man erhåller både kvantitativ och kvalitativ information från ett enda hologram (5-6). Det digitala holografiska mikroskopet utgör en kombination av faskontrastmikroskopi och digital holografi (4, 7-9), och används särskilt inom fältet cellbiologi och analyser av cancerceller (10-17).

En forskargrupp i Schweiz använder det digitala holografiska mikroskopet och kombinerar upplösning på nanometernivå, realtidsanalyser och icke-förstörande 3D observationer för applikationer på framför allt levande celler inom områdena cellbiologi, diagnostik, genomik, proteomik och livsmedels-industri (10, 13, 18). I dessa studier gjordes de första 3D-analyserna bland annat på pollen, amöbor och nervceller. Rappaz et al (13) visade att *in vitro*-odlade primärkulturer av embryonala celler från mus kunde analyseras med digital holografi och presenteras som 3D-bilder efter numerisk rekonstruktion. Då en hypoton lösning applicerades på nervcellerna sjönk signalen som mäter det optiska fasskiftet i den centrala delen av cellkroppen. Samtidigt uppmättes ett ökat fasskifte i de mer perifera delarna av nervcel-



Figur 4A och B. Adherenta mus fibroblastceller L929, odlades i cellodligningsmedium och fotograferades i 3D.



Figur 5. 3D-bild av T leukemi cellinjen Jurkat. Den vänstra cellen är en död cell med minskad volym av cellkärnan, den högra cellen är en levande cell med bibehållen volym av cellkärnan.

lernas cellkropp, vilket förklaras som ett resultat av att cellens yta ökar (sväller) då den utsätts för hypoton stress (13). Mätningarna av cellens tjockleksförändringar kunde göras med en noggrannhet på 1 μm . Ett flertal undersökningar har gjorts på erythrocyter där man bland annat har visat att volymmätningar är jämförbara med teknikerna digital holografi, konfokal mikroskopi och en volymanalysator som mäter elektrisk impedans (vanligt förekommande i hematologiska laboratorier) (19). Dessutom har erythrocyters sedimentering och membranfluktueringar analyserats (20-21).

Cellräkning – analys av prolifererande celler över tid

Automatiska metoder för cellräkning bygger på tekniker för att räkna partiklar eller cellkärnor. För att dessa tekniker ska fungera på adherenta celler måste dessa vanligtvis först behandlas för att lossna från ytan de växer på. Cellräkning är därför ett område som fungerar utmärkt för tekniken digital holografi och har tidigare utförts med det digitala holografiska mikroskopet (22). Metoden visades på flera olika adherenta prolifererande humana cellinjer. Vi utförde analysen genom att en gång per dag i upp till fyra dagar mäta det totala fasskiftet på 15 slumpvis utvalda områden i botten på en cellodlingsflaska. Både faskontrastbilder och hologrambilder (figur 4A och B) från alla mättillfällen sparades automatiskt i en databas, där de enskilda parametrarna såsom cellantal per bild, cellarea, tjocklek, volym och cellernas oregelbundenhet kan räknas fram när som helst. Mätningarna i proliferationsstudien gjordes fyra dagar i rad för att erhålla förändringar i celltillväxt över tid. Parallellt analyserades cellerna manuellt med en hemocytometer för att verifiera metoden. Resultaten jämfördes och korrelationen mellan de två metoderna var mycket hög (22). Vi har även med en cellinje från prostatacancer, DU145, jämfört digital holografi och manuell cellräkning med två andra väl vedertagna proliferationsmetoder, nämligen radioaktiv mätning

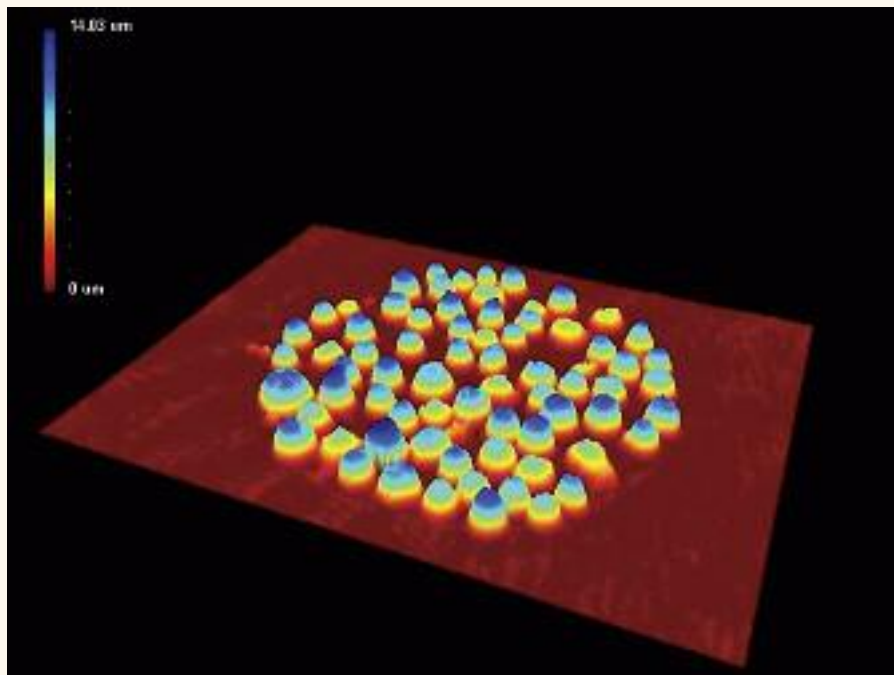
med hjälp av ^3H -thymidine upptag och MTS-assay, baserad på en tetrazoliumförening (Promega Corp., Madison, WI). Då vi jämfört resultaten uppnår vi mycket goda, jämförbara resultat (El-Schish et al, opublicerade resultat).

Migration – analyser av cellrörelse

Rörelse av celler är en central process under såväl embryonal utveckling, sårhäkning samt under ett immunsvär. Tumörbildning och metastaser uppkommer då celler rör sig, migrerar, och att försöka finna läkemedel som förhindrar migration är ett aktuellt och viktigt forskningsområde (23-24). Dubois et al visade att cellkulturer med cancerceller som migrerade i matrixgeler *in vitro* kunde analyseras tredimensionellt med det digitala holografiska mikroskopet (15). Flera andra celltyper i rörelse har analyserats med digital holografi, nämligen sedimenterande erythrocyter, HT-1080 fibrosarkom celler och musfibroblaster (25-26). Fibroblastcellerna i båda studierna växte på och analyserades i kollagen och dess rörelser kunde följas på ett kvantitativt sätt utan någon inmärkning eller infärgning av cellerna.

Celldöd

Celldöd i form av programmerad celldöd, apoptos, utgör ytterligare ett område som passar det holografiska mikroskopiska systemet för inmärkningsfria, kvantitativa analyser av celler och cellorganeller eftersom celler som dör krymper ihop, minskar i storlek och blir mindre kompakta (27). Pankreas cancerceller som behandlades med toxiner uppvisade skillnader i tjocklek jämfört med obehandlade celler (12). Skillnaderna mäts framför allt med hjälp av brytningsindex, vilket föreslås vara mycket användbart för framtida analyser av läkemedelsbehandlade cellers morfologiska förändringar. 3D-bilder visar också tydligt skillnader mellan levande och döda celler. Figur 5 visar två T leukemi celler,



Figur 6. 3D-bild av T leukemi cellinjen Jurkat som binder specifikt till en yta förbehandlad med antikroppar riktade mot ett Lewis x-antigen.

Jurkat, i 3D. Den vänstra cellen med insjunkna kärna är en död cell, medan den högra cellen med en mer omfattande cellkärna är en levande cell.

Vi har nyligen gjort en undersökning för att visa att det digitala holografiska mikroskopet kan användas för att särskilja levande celler från döda celler (El-Schish et al, manuskript 2010). Vi behandlade fyra olika adherenta cancer cellinjer med ämnen som är kända för att inducera celldöd. Mätningarna med det digitala holografiska mikroskopet gjordes en gång per dag i upp till tre dagar direkt i cellodlingsflaskan för att erhålla eventuella förändringar i celltillväxt över tid. Efter holografimätningen trypsinerades cellerna från cellodlingsflaskan och inmärktes med FITC-konjugerat Annexin-V och propidiumjodid (PI) inför en flowcytometrisk celldödsanalys. Med digitala holografiska mikroskopet kunde små, hopkrympta celler detekteras samt färre antal celler, mindre area och minskad optisk täthet i de celler som behandlats med celldödsinducerande reagenser, jämfört med obehandlade celler (El-Schish et al, manuskript 2010). I den flowcytometriska analysen uppmättes en ökad inbindning av Annexin-V och PI i celler som behandlats med gifter, vilket är ett välkänt tecken på ökad celldöd. Vi sammanfattar att resultaten som erhålls med de två teknikerna digital holografi och flowcytometrisk analys är jämförbara. Nästa steg skulle kunna vara att behandla celler med kända ämnen som inhiberar dem i olika faser i cellcykeln. Hittills har Kemper et al visat att cellmassa ("dry mass") och celldensitets förändringar i cell cykeln går att mäta med digital holografi hos jästarten *Schizosaccharomyces pombe* (28).

Antikropsarrayer

Tidigare har ett fåtal forskargrupper använt antikropsarrayer för att analysera och klassificera leukemier och lymfomceller (29-31). Dessa celler klassificeras vanligtvis med hjälp av antikroppar mot "cluster of differentiation" (CD) antigen och analyseras med flowcytometri. Här visar författarna att resultaten med en mikroskopisk metod som kallas DotScan™ är jämförbara med flowcytometri (29-30). Antikropparna sitter på en yta av nitrocellulosa och levande celler fäster specifikt till de olika antikropparna, varvid densiteten av mängden inbundna celler mäts. Även adherenta celler är möjliga att analysera med liknande tekniker. Zhou et al (32) studerar coloncancer celler och visar att olika celltyper binder till olika antikropsprofiler som mäts med "fluorescence multiplexing". Vi har nyligen gjort studier på icke-adherenta leukemi- och lymfomceller och hur de fäster upp till antikrops-coatade glasytor i en antikropsarray-baserad analys (figur 6). Vi undersöker vilka antikroppar som lymfomceller binder till och vi kan, precis som i våra tidigare studier, erhålla mätvärden för cellernas antal, area, tjocklek och volym (opublicerade resultat). Vi ser denna studie både som ett sätt att klassificera cellerna med avseende på vilken eller vilka antikroppar de binder till, men också ett unikt sätt att erhålla information om cellernas antal, area, tjocklek och volym. Då cellerna fäst upp till antikropparna behandlas de med ett celldödsinducerande ämne, etoposide, för att mäta om parametrar såsom cellarea, celltjocklek och volym ändras efter behandling. Preliminära resultat visar att cellinjen

Jurkat minskar i tjocklek efter etoposide-behandling över natt jämfört med obehandlade celler (opublicerade resultat). I planerade fortsatta studier kommer vi att analysera flertalet olika leukemi- och lymfomcellinjer samt tillsätta olika substanser och studera hur de påverkar cellens area, tjocklek och volym. Det är möjligt att med den här tekniken även studera enskilda celler.

Nya tillämpningsområden för digital holografi

Ytterligare exempel på intressanta cellbiologiska applikationer som kan studeras med digital holografi är celldifferentiering, sårhäkning och tillväxt av celler på olika ytor. Man kan också studera detaljerade subcellulära förändringar, eventuella förändringar i 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, viabilitet eller migration. Resultaten av den typen av studier hoppas vi se inom de närmaste åren.

Diskussion

Tiotalet grupper runt om i världen använder nu den unika icke-förstörande tekniken digital holografi för studier av levande celler. Metoden ger ny kunskap om hur framför allt ändringar i cellernas brytningsindex under olika förhållanden över tid kan omvandlas till mätbar information såsom proliferation, viabilitet eller celldöd. De hittills mest välstuderade celltyperna är cancerceller, men metoden passar för alla sorters eukaryota celler inklusive stamceller, primära celler och olika typer av cellinjer. Tekniken kan i framtiden förhoppningsvis konkurrera med dagens konventionella cellbiologiska metoder då den är relativt billig, enkel att använda och ger snabba resultat. En av de vanligaste metoderna för att skapa fasbilder är Nomarski Interference Contrast mikroskopi (differential interference contrast, DIC) (32). Det är en optisk ljusmikroskopmetod som används för att öka kontrasten i ofärgade, genomskinliga prover, som annars är svåra att se med vanligt ljusmikroskop (33). DIC använder interferometrimätning för att erhålla information om provets optiska densitet. Ett komplext ljusmönster producerar en bild så att objektet uppträder i färgerna svart och vitt mot en grå bakgrund. På det sättet kan osynliga föremål bli synliga. DIC kan baseras på konventionell digital holografi (14, 34, 35). Fördelarna med DIC är att metoden ger bättre kontrast och skärpa på bilderna (36, 37). En annan metod som, liksom digital holografi, används för mätningar av adherenta celler i realtid är elektrisk impedans. Roche

Diagnostics (Basel, Schweiz) har utvecklat instrumentet xCELLigence, en realtids cellanalysator som analyserar levande celler utan inmärkning. Med tekniken mäts cellprocesser såsom proliferation, cytotoxicitet, invasion, migration och cellviabilitet (38-40). Även cellantal, morfologi samt graden av adhesion kan analyseras med hjälp av ett antal olika cellbaserade metoder. Likheter med digital holografi är många, då man också kan tillsätta substanser och göra mätningar av eventuella cellförändringar över tid. Digital holografi ger också information om cellens area, tjocklek och volym, samt 3D-bilder, vilket man inte erhåller med elektrisk impedans.

Sammanfattning/konklusion

Tekniken digital holografi för levande celler har använts i cirka fem år och är därför fortfarande en ny teknik. Med flera forskargrupper på gång som använder tekniken hoppas vi på många nya spännande studier och utvecklande av protokoll för cellanalyser.

Tack

Tack till Crafoordska stiftelsen, Magnus Bergwalls stiftelse, Malmö allmänna sjukhus stiftelse för bekämpande av cancer samt till Kersti Alm, Lennart Gisselsson, Emmy Nilsson, Pirkko Härkönen och Christer Wingren.

Inga intressekonflikter existerar.

Referenser

1. Gabor D. A New Microscopic Principle. *Nature*. 1948;161 :777-778.
2. Kemper B, von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied Optics*. 2008;47(4):A52-A61.
3. Sebesta M, Gustafsson M. Object characterization with refractometric digital Fourier holography. *Optic Letters*. 2005;30(5):471-473.
4. Cuche E, Bevilacqua F, Depeursinge C. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging. *Optics Letters*. 1999;24(5):291-293.
5. Parshall D, Kim MK. Digital holographic microscopy with dual-wavelength phase unwrapping. *Applied Optics*. 2006;45(3):451-459.
6. Marquet P, Rappaz B, Magistretti PJ, Cuche E, Emery Y, Colomb T, Depeursinge C. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters*. 2005;30(5):468-470.
7. Gustafsson M, Sebesta M. Refractometry of

- microscopic objects with digital holography. *Applied Optics*. 2004;43(25):4796-4801.
8. Gustafsson M, Sebesta M, Bengtsson B, Pettersson SG, Egelberg P, Lenart T. High-resolution digital transmission microscopy – a Fourier holography approach. *Optics and Lasers in Engineering*. 2004;41(3):553-563.
 9. Ferraro P, Grilli S, Alfieri D, De Nicola S, Finizio A, Pierattini G, Javidi B, Coppola G, Striano V. Extended focused image in microscopy by digital holography. *Optics Express*. 2005;13(18):6738-6749.
 10. Charriere F, Marian A, Montfort F, Kuehn J, Colomb T. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy. *Optic Letters*. 2006;31(2):178-180.
 11. Carl D, Kemper B, Wernicke G, von Bally G. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis. *Applied Optics*. 2004;43(36):6536-6544.
 12. Kemper B, Carl D, Schnekenburger J, Bredebusch I, Schafer M, Domschke W, von Bally G. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2006;11(3):34005.
 13. Rappaz B, Marquet P, Cuhe E, Emery Y, Depeursinge C, Magistretti PJ. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*. 2005;13(23):9361-9373.
 14. Mann CJ, Yu L, Lo CM, Kim MK. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography. *Optics Express*. 2005;13(22):8693-98.
 15. Dubois F, Yourassowsky C, Monnom O, Legros JC, Debeir O, Van Ham P, Kiss R, Decaestecker C. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. *J Biomed Opt*. 2006;11(5):054032.
 16. Yu P, Mustata M, Peng L, Turek JJ, Melloch MR, French PM, Nolte DD. Holographic optical coherence imaging of rat osteogenic sarcoma tumor spheroids. *Appl Opt*. 2004;43(25):4862-4873.
 17. Hernandez-Montes M, Perez-Lopez C, Mendoza Santoyo F. Finding the position of tumor inhomogeneities in a gel-like model of a human breast using 3-D pulsed digital holography. *J Biomed Opt*. 2007;12(2):024027.
 18. Charriere F, Pavillon N, Colomb T, Depeursinge C. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba. *Optics Express*. 2006;14(16):7005-7012.
 19. Rappaz B, Barbul A, Emery Y, Korenstein R, Depeursinge C, Magistretti PJ, Marquet P. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy and impedance volume analyzer. *Cytometry*. 2008;73(10):895-903.
 20. Bernhardt I, Ivanova L, Langehanenberg P, Kemper B, von Bally G. Application of digital holographic microscopy to investigate the sedimentation of intact red blood cells and their interaction with artificial surfaces. *Bioelectrochemistry*. 2008;73(2):92-96.
 21. Rappaz B, Barbul, Hoffmann A, Boss D, Korenstein R, Depeursinge C, Magistretti P, Marquet P. Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy. *Blood Cells Mol. Dis*. 2009;42(3):228-232.
 22. Mölder A, Sebesta M, Gustafsson M, Gisselson L, Gjörlöf Wingren A, Alm K. Non-invasive, label-free cell counting and quantitative analysis of adherent cells using digital holography. *J Microscopy* 2008; 232(2): 240-247.
 23. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17:559-564.
 24. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:737-749.
 25. Langehanenberg P, Ivanova L, Bernhardt I, Ketelhut S, Vollmer A, Dirksen D, Georgiev G, von Bally G. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(1):014018.
 26. Kemper B, Langehanenberg P, Vollmer A, Ketelhut S, von Bally G. Digital holographic microscopy - label-free 3D migration monitoring of living cells. *Imaging and Microscopy*. 2009;4:26-28.
 27. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan, J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16:3-11.
 28. Rappaz B, Cano E, Colomb T, Kuhn J, Simanis V, Magistretti PJ, Marquet P. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):034049.
 29. Belov L, Mulligan SP, Barber N, Woolfson A, Scott M, Stoner K, Chrisp JS, Sewell WA, Bradstock KF, Bendall L, Pascovici DS, Thomas M, Erber W, Huang P, Sartor M, Young GAR, Wiley JS, Juneja S, Wierda WG, Green AR, Keating MJ, Christopherson RI. Analysis of human leukaemias and lymphomas using extensive immunophenotypes from an antibody microarray. *Br J Haematol*. 2006;135(2):184-197.
 30. Ellmark P, Högerkorp CM, Ek S, Belov L, Berglund M, Rosenquist R, Christopherson R I, Borrebaeck

- CAK. Phenotypic protein profiling of different B cell sub-populations using antibody CD-microarrays. *Cancer Letters*. 2008;265(1):98-106.
31. Dexlin L, Ingvarsson J, Frendeus B, Borrebaeck CAK, Wingren C. Design of recombinant antibody microarrays for cell surface membrane proteomics. *J Proteome Res*. 2008;7(1):319-327.
 32. Nomarski G. Differential microinterferometer with polarized light. *J. Phys Radium*. 1955;16:9s-13s.
 33. Pluta M. Specialized methods. Vol 2 of *Advanced light microscopy*. New York: Elsevier, 1989: Kap 7.
 34. Ferraro P, Alfieri D, De Nicola S, De Petrocellis L, Finizio A, Pierattini G. Quantitative phase-contrast microscopy by a lateral shear approach to digital holographic image reconstruction. *Optic Letters*. 2006;31(10):1405-1407.
 35. Popescu G. Quantitative phase imaging of nanoscale cell structure and analysis. I: Jena B, ed. *Methods in Cell Biology*. New York: Elsevier, 2008.
 36. Gonzalez-Melendi P, Fernandez-Pacheco R, Coronade MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueno MC, Marquina C, Ibarra MR, Rubiales D, Perez-de-Luque A. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Ann Bot*. 2008;101(1):187-195.
 37. Hill DB, Macosko JC, Holzwarth GM. Motion-enhanced, differential interference contrast (MEDIC) microscopy of moving vesicles in live cells: VE-DIC updated. *J. Microscopy*. 2008;231(3):433-439.
 38. Atienza JM, Yu N, Kirstein SL, Xi B, Wang X, Xu X, Abassi YA. Dynamic and label-free cell-based assays using real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev Technol*. 2006;4(5):597-607.
 39. Boyd JM, Huang L, Xie L, Moe B, Gabos S, Li XF. A cell-microelectronic sensing technique profiling cytotoxicity of chemicals. *Analytica Chimica Acta*. 2008;615(1):80-87.
 40. Ge Y, Deng T, Zheng X. Dynamic monitoring of changes in endothelial cell-substrate adhesiveness during leukocyte adhesion by microelectrical impedance assay. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009;41(3):256-262.

Med over 140 kontorer i 50 land er World Courier blant de største og mest erfarne innen transport av biologisk materiale. World Courier benyttes i dag av bl.a. laboratorier, sykehus og legemiddelfirmaer verden over for transport av produkter som krever spesialbehandling; f.eks. temperaturkontrollerte forsendelser, produkter som har en begrenset levetid, eller infisert biohazard materiale.

Vi henter og leverer forsendelser 24 timer i døgnet (også i helger og på helligdager), 7 dager i uken, 365 dager i året over hele verden, hvilket gjør at De alltid kan nå oss for booking/konsultasjon.

Uerstattelig?



VIP

Visste du at World Courier sin VIP emballasje (Vacuum Insulation Panels) er blant det sikreste og mest pålitelige på markedet? Våre validerte emballasjetyper kan benyttes til tempererte forsendelser av kliniske prøver, vaksiner, legemidler, og lignende. Konstruksjonen av emballasjetypen er laget slik at innhold vil forbli upåvirket av ytre forhold; som slag/støt og kraftige temperatursvingninger.

Temperatur

World Courier benytter PCM's (phase changing material / temperatur-elementer) som vil holde en konstant temperatur under hele transporten. Vi kan tilby temperaturforhold fra -25 til +35 °C.

Størrelse

World Courier tilbyr VIP-emballasje med rominnhold fra 3 liter og opp til 324 liter. Alle World Courier-kontorer har autoriserte ansatte som vil være behjelpelig med å finne rett type emballasje, og kan være behjelpelig med nedpakking av produkt.

Ta kontakt med oss for uforpliktende råd og veiledning.

**Tlf. 63 94 62 00 eller
email ops@worldcourier.no
www.worldcourier.com**

WORLD COURIER®
A SERVICE NO ONE ELSE CAN DELIVER