

Bildanalyse frei diffundierender Nanopartikel in vitro

Thorsten Wagner¹, Dominic Swarat¹, Martin Wiemann², Hans-Gerd Lipinski¹

¹Biomedical Imaging Group, Fachbereich Informatik, Fachhochschule Dortmund

²Institute for Lung Health (IBE R&D gGmbH) Marl

wagner.thorsten@gmx.de

Kurzfassung. Durch eine Laser gestützte Mikroskopiemethode lassen sich Nanopartikel in vitro auch mit Lichtmikroskopen als mobile Objekte visualisieren. Aus Form- und Mobilitätseigenschaften visualisierter Nanopartikel werden mit Bildverarbeitungsmethoden charakteristische Parameter gewonnen, mit deren Hilfe unterschiedliche Nanopartikel-Proben in vitro analysiert und differenziert werden können, um in Folgeexperimenten Aussagen über deren gesundheitsschädigende Wirkungen erzielen zu können.

1 Einleitung

Sowohl für die Industrie als auch für die Biomedizin haben Nanopartikel (NP) als Werkstoffe eine zunehmend größere Bedeutung. Allerdings deuten insbesondere klinische Untersuchungen darauf hin, dass NP beim Menschen auch erhebliche gesundheitliche Probleme auslösen können [1, 2]. Um diese Gesundheitsgefährdung experimentell abschätzen zu können, bieten sich zunächst in vitro Untersuchungen, z.B. an Zellkulturen an [3]. Dazu sind die NP in wässrige Lösungen zu geben, um dann in einem weiteren Schritt deren Wechselwirkungen mit ebenfalls in diesen Lösungen enthaltenen vitalen Zellen zu untersuchen. Da vitale Zellen überwiegend mit der Lichtmikroskopie untersucht werden können, müssen Methoden entwickelt werden, mit denen NP (Durchmesser 20 – 400 nm) auch mit Hilfe der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht, registriert und über deren Bildeigenschaften charakterisiert werden können.

2 Material und Methoden

Werden NP von einem Laserstrahl getroffen, so streuen sie die Strahlung und werden im Mikroskop sichtbar, da ihr scheinbarer Durchmesser um ein Vielfaches größer ist als ihr wirklicher Durchmesser. NP erscheinen als sich unterschiedlich schnell bewegende, unterschiedliche helle und unterschiedlich ausgedehnte Punkte, wobei ihre Bewegung vor allem durch die Brownsche Molekularbewegung bestimmt wird [4]. Die Brownsche Molekularbewegung ist grundsätzlich ein dreidimensionaler zeitabhängiger Prozess. Werden die NP, die sich in einer wässrigen Lösung befinden, jedoch über eine geschickt geführte Lasergeometrie

bestrahlt, dann kann man näherungsweise mit einer zweidimensionalen Bildanalyse den Bewegungsvorgang erfassen (so genanntes *NanoSight*TM-Verfahren). Ein seitlich auf eine Küvette gelenkter Laserstrahl bestrahlt in einem auf einer definierten Tiefe („z-Referenzebene“) beschränkten Areal die sich dort in wässriger Lösung befindenden NP. Das von den NP gestreute Licht gelangt in den Strahlengang eines Mikroskops und wird mit Hilfe einer digitalen Kamera sowie eines PC als zeitliche Bildsequenz (typisch: 20 – 60 s Dauer; 30 Bilder pro Sekunde) fortlaufend registriert. Die Bildebene, in der sich die NP befinden, liegt in der Nähe der z-Referenzebene und kann fokussiert werden. Die NP lassen sich nach ihrer Form und Helligkeit sowie ihrem dynamischen Verhalten (z.B. Tracking und daraus abgeleiteten Diffusionskoeffizient) charakterisieren. Die sichtbare geometrische Form eines NP ist durch die Kompaktheit (circularity) und einem Symmetrie-Parameter zu charakterisieren. Die Dynamik lässt sich durch den Diffusionskoeffizienten jedes einzelnen sichtbaren Partikels sowie über die Form seines dabei zurückgelegten Pfades (z.B. anhand seiner fraktalen Dimension [5]) beschreiben. Der Diffusionskoeffizient kann aus der direkten Vermessung des Pfades („track“) durch Bildung des mittleren Verschiebungsquadrates berechnet werden. Ferner wurde die Diffusion von NP mit Hilfe der Monte-Carlo Methode zwei- bzw. dreidimensional simuliert. Die Erzeugung für die Simulation notwendigen normalverteilten Zufallszahlen erfolgt mit Hilfe des Ziggurat-Algorithmus [6]. Schwachstellen bzgl. der Periodendauer des Ziggurat-Algorithmus wurden berücksichtigt und die Periodendauer, wie von Leong et al. vorgeschlagen [7], erhöht. Der Durchmesser jedes einzelnen NP wird aus dem Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung ermittelt (für einfache Geometrien ist der Partikeldurchmesser reziprok proportional zum Diffusionskoeffizienten).

3 Ergebnisse

Die gemessenen Größen statischer und dynamischer Parameter werden hier am Beispiel von monodispersen Polystyren Partikel (Durchmesser 100 nm) exemplarisch gezeigt. Abbildung 1, links zeigt sechs NP mit unterschiedlicher Form und Helligkeit.

Das sehr hell dargestellte Partikel (d) weist eine runde Struktur auf, während ein etwa gleichhelles Partikel (c) eine elliptische Form besitzt. Die Partikel (b), (e) und (f) sind deutlich dunkler als NP (c) bzw. (d), weisen aber ebenfalls unterschiedliche Rundheiten auf. Da sich Partikel unterschiedlich weit entfernt von der z-Referenzebene befinden können, werden solche eher randständigen Partikel weniger hell strahlen als solche, die sich im Zentrum des Laserstrahls befinden. Das Partikel (a) zeigt zudem eine Doppelstruktur, die sich als Kollision zweier NP deuten lässt. Solche Kollisionen sind überwiegend scheinbare (so genannte visuelle) Kollisionen, weil es hier lediglich zu einer Übereinstimmung in den ebenen Koordinaten kommt. In der Tiefe z können sie sehr weit auseinander liegen. Echte Kollisionen, die zu einer Agglomeration der Partikel führen, sind eher selten, wenn die Partikelkonzentration in der Flüssigkeit niedrig ist (typisch: $10^7 - 10^8$

Partikel/ml). Gleichwohl sind sie identifizierbar, denn der Diffusionskoeffizient der beteiligten Partikel ist vor der Kollision i.A. deutlich höher als der des durch Kollision entstandenen Agglomerates.

Abbildung 1, Mitte zeigt eine Verteilung der diffundierenden NP als das Ergebnis einer Monto-Carlo-Simulation in drei Dimensionen. In der 3D-Graphik haben alle simulierten Partikel die gleiche Helligkeit, aber unterschiedliche Radien, entsprechend der jeweiligen Diffusionskoeffizienten (aus Beobachtungen empirisch zugeordnet). Die Abbildung 1 zeigt rechts eine NP-Simulation, die sich auf die 2D-Auswertemethode des *NanoSight*TM-Prinzip beschränkt, wobei sich der z-Abstand der NP durch unterschiedliche Helligkeiten ausdrückt. Für beide Simulationen wurden ebenfalls die zugehörigen Dichtefunktionen für die Diffusionskoeffizienten und die NP-Durchmesser ermittelt. Typische Ergebnisse der

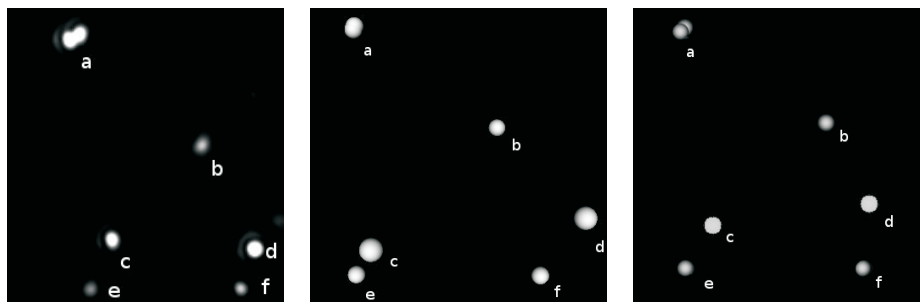


Abb. 1. Momentaufnahme diffundierender Nanopartikel (links: Originalregistrierung; Mitte: äquivalente 3D-Simulation; rechts: korrespondierende 2D-Visualisierung).

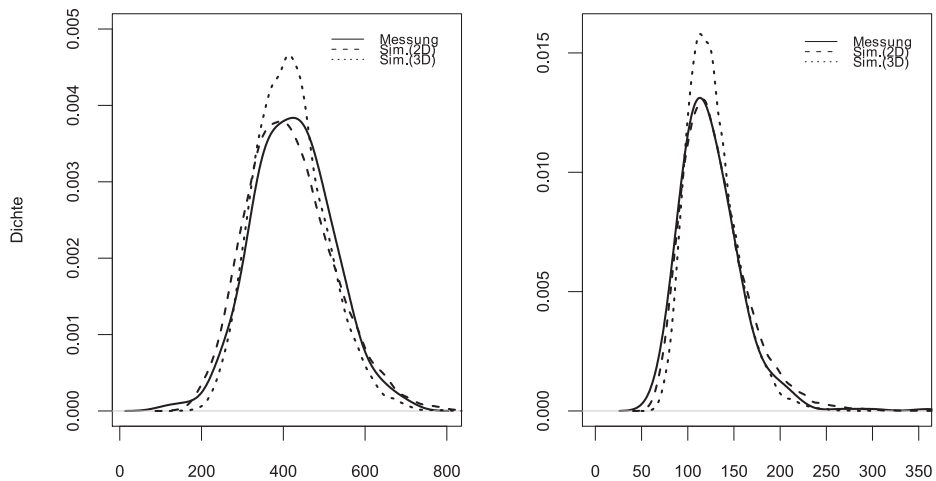


Abb. 2. Dichtefunktionen der gemessenen und simulierten NP-Diffusionskoeffizienten [$10^{(-10)} \text{cm}^2/\text{s}$] (links) NP-Durchmesser [nm] (rechts).

Tabelle 1. Mittelwert und Standardabweichung von NP-Parametern (Durchmesser, simulierter Durchmesser, Diffusionskoeffizient, Kompaktheit, Symmetriefaktor, fraktale Dimension).

	diameter [nm]	simulated diameter [nm]	diffusion coefficient [$10^{-10} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$]	circularity $0 < c < 1$	symmetry factor $0 < s < 1$	fractal dimension $1 < f < 2$
mean	125.6	129.7	423.2	0.813	0.734	1.624
SD	37.9	36.2	96.8	0.071	0.052	0.482

Tabelle 2. Mittelwert und Standardabweichung von NP-Parametern für eine Quarz-Probe.

	diameter [nm]	simulated diameter [nm]	diffusion coefficient [$10^{-10} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$]	circularity $0 < c < 1$	symmetry factor $0 < s < 1$	fractal dimension $1 < f < 2$
mean	215.5	218.2	294.2	0.913	0.866	1.32
SD	58.1	62.5	74.1	0.021	0.023	0.22

Diffusionsanalyse (Abb. 2) zeigen, dass Messung und Simulation kaum Unterschiede aufweisen.

Ein t-Test ergibt, dass es zwischen den Durchmesser-Mittelwerten der Simulation und der Messung keinen signifikanten Unterschied gibt, was die Tabelle 1 belegt. In dieser Tabelle sind die für die Polystyrene-Probe erhobenen Bild charakterisierenden Parameter erfasst. Dazu gehört der mittlere Partikeldurchmesser, der hier mit ca. 126 nm den von der Industrie genannten Wert von 100 nm signifikant überschreitet. Sowohl die 3D- als auch die NanoSight-analoge 2D-Simulation ergaben vergleichbar große Durchmesser. Typisch für die NP-Probe sind Kompaktheitswerte um 0.8 herum, woraus zu schließen ist, dass zahlreiche Partikel im Mikroskopiebild keine perfekte Kreisform aufweisen.

Zudem finden wir häufig Asymmetrien bezüglich der Grauwertverteilung innerhalb des dargestellten NP (ideale Grauwert-Symmetrie würde zu einem Faktor $s = 1$ führen, gemessen wurden hingegen Werte um $s = 0.7$). Die fraktale Dimension der durch die Partikeldiffusion erzeugten Pfade lag mit ca. 1.6 deutlich über dem Wert einer überwiegend geraden Ausbreitungsrichtung ($f = 1$), aber weit unterhalb einer kompakten flächenartigen Ausbreitung ($f=2$). Tabelle 2 enthält die Parameterwerte für eine andere NP-Probe (Quarz). Daraus ergibt sich, dass es zwischen verschiedenen NP-Sorten offenbar charakteristische Unterschiede hinsichtlich der genannten Parameter gibt.

4 Diskussion

Mit Hilfe typischer Bildverarbeitungsmethoden konnten aus Bildsequenzen Parameter identifiziert werden, mit deren Hilfe eine Charakterisierung von solchen NP gelang, deren gesundheitsschädliche Wirkung in Folgeexperimenten unter-

sucht werden soll. Die Gestalt der NP konnte durch Formparameter wie Kompaktheit c und Symmetriefaktor s erfasst werden, während sich die dynamischen Eigenschaften der NP durch den Diffusionskoeffizienten (gewonnen aus gemessenen bzw. simulierten Diffusionen) bzw. der fraktalen Dimension des jeweiligen Bewegungspfades kennzeichnen ließen. Letztlich konnten NP-Durchmesser aus korrespondierenden Diffusionskoeffizienten, die sowohl durch Messung als auch durch Monte-Carlo-Simulationen gewonnen wurden, ermittelt werden.

In den angegebenen Beispielen nehmen die Parameter typische Werte an, mit denen die Proben durch ihre Bildeigenschaften charakterisiert und von anderen Proben unterschieden werden können. Zudem zeigt der Vergleich des mittleren Durchmessers (Messung und Simulation) mit den Herstellerangaben, ob die in der Probe vorhanden NP diese Größe auch wirklich besitzen. Vergleiche von Durchmesser-Dichtefunktionen gemessener und simulierter NP erlauben zusätzlich Rückschlüsse auf die Homogenität von Proben.

Danksagung. Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert (NanoGEM; Fördernummer 03X0105G).

Literaturverzeichnis

1. Xia T, Li N, Nel A. Potential health impact of nano particles. *Annu Rev Public Health*. 2009;30:137–50.
2. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009;460:208–12.
3. Bruch J, Rehn S, Rehn B, et al. Variations of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207:203–16.
4. Toth A, Banky D, Grolmusz V. Mathematical modelling and computer simulation of Brownian motion and hybridization of nanoparticle-bioprobe-polymer complexes in the low concentration limit. *Nanotech*. 2010;3:161–4.
5. Katz MJ. Fractals and the analysis of wave forms. *Comput Biol Med*. 1988;18:145–56.
6. Marsaglia G, Tsang W. The ziggurat method for generating random variables. *J Stat Softw*. 2000; p. 1–7.
7. Leong P, Zhang G, et al. A comment on the implementation of the Ziggurat method. *J Stat Softw*. 2005;12(7):1–4.