

Bildgestützte Analyse der *in vitro*-Sedimentation agglomerierter Nanopartikel

Darius Schippritt¹, Martin Wiemann^{2,3}, Hans-Gerd Lipinski¹

¹Biomedical Imaging Group, FB Informatik, Fachhochschule Dortmund

²Physiologisches Institut, Universität Duisburg-Essen

³Institut für Biologische Emissionsbewertung (IBE), Marl

darius.schippritt@gmx.de

Kurzfassung. Es wurde eine Bildanalyse-Methode entwickelt, mit der *in vitro* Untersuchungen zur Nanopartikel-Exposition unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden können. Die dafür notwendige Kenntnis über die zeitliche Verteilung der Anzahl agglomerierter Partikel lässt sich aus digitalen Mikroskopie-Aufnahmen gewinnen. Mit Hilfe einer Modellannahme können Prozess bestimmende Parameter definiert und experimentell aus den Bilddaten bestimmt werden, wobei die experimentell gewonnenen Werte dieser Parameter vollständig reproduzierbar sind. Auf diese Weise lässt sich die *in vitro* Analyse standardisieren, welches eine wichtiges Instrumentarium zum grundsätzlichen Verständnis der Wechselwirkungen von Nanostäuben und dem Immunsystem darstellt.

1 Einleitung

Sowohl tierexperimentelle Untersuchungen als auch klinische Befunde weisen darauf hin, dass Luft getragene Nanopartikel („Nanostäube“) zunehmend als erhebliches Gesundheitsrisiko einzustufen sind [1, 2]. Über die Verteilung solcher Stäube im Lungengewebe und die Auswirkung auf das Immunsystem ist bis heute jedoch nur wenig bekannt. In der Zellkultur lassen sich die toxischen Partikelwirkungen experimentell an Alveolarmakrophagen der Lunge untersuchen [3]. Eine OECD-konforme Standardisierung dieser *in vitro*-Versuche könnte dabei die Anzahl erforderlicher Tierversuche erheblich einschränken [4]. Dazu ist es aber notwendig, Makrophagen unter definierten *in vitro* Bedingungen Partikel zur Phagozytose anzubieten. Um solche standardisierten Verfahren zu etablieren, ist es unerlässlich, den charakteristischen Zeitverlauf der Partikelsedimentation unter Zellkulturbedingungen zu erfassen und mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung zu analysieren.

2 Material und Methoden

Böhmit-Partikel (AlOOH, 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Primärpartikelgröße: 40 nm) wurden in Serum freiem MEM-Medium suspendiert und in ein Zellkulturschälchen („Mes-

skammer“, 2 cm hoch) homogen verteilt gegeben. Die Sedimentation der Partikel und deren Agglomerate wurde bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Phasenkontrast (Nikon-Biostation® IM; Mikroskopfokus = Messkammerboden) bei 20facher Vergrößerung fortlaufend registriert (Rate: 1 Bild/min über 240 min) und unmittelbar nach der Bilderzeugung ausgewertet. Einzelne Nanopartikel sind so zwar nicht nachweisbar, jedoch sind die Agglomerate, die unter den experimentellen Bedingungen >99 % der Masse bilden, im Phasenkontrast-Mikroskop sichtbar (Abb. 1A). Die erzeugten Bilddaten wurden zunächst geglättet und anschließend mit Hilfe eines einfachen Schwellwert-Verfahrens so binärisiert, dass die sichtbaren Agglomerate der Nanopartikel als Objekte im Binärbild erschienen (Abb. 1B). Von den Binärobjekten wurden die Objektkanten extrahiert und zur visuellen Kontrolle den Agglomeraten im Originalbild überlagert (Abb. 1C). Anschließend wurden die Bilddaten mit dem Ziel ausgewertet, geeignete Parameter zur Erfassung der Sedimentation zu finden.

3 Ergebnisse

Ausgewertet wurde die zeitliche Verteilung der Größe $G(t)$ und der Anzahl der Agglomerate $N(t)$ auf dem Messkammerboden, wobei $N(t)$ durch einen einfachen Zählalgorithmus aus den erzeugten Binärbildern gewonnen wurde. Zunächst nahm die Anzahl der Agglomerate im Bild mit fortlaufendem Sedimentationsvorgang zu. Mit der Zeit überlagerten sich jedoch mehr und mehr Partikel am Messgefäßboden, so dass zwar die scheinbare Partikelgröße G mit der Zeit zunahm und auch die Zahl der zählbaren Partikel zunächst einem Maximum zustrebte, danach aber mit der Zeit wieder abfiel, bis eine (nahezu) konstante Partikelzahl N_0 zu beobachten war. Dieser Prozess lässt sich empirisch durch das folgende kinetische Modell sehr gut annähern

$$N(t) = \begin{cases} N_{\infty} \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t}) \cdot e^{-\beta \cdot t}, & \text{falls } t < t^* \\ N(t^*) = N_0, & \text{falls } t \geq t^* \end{cases} \quad (1)$$

wobei der Parameter α den Sedimentationsprozess und der Parameter β die teilweise Überlagerung der Partikel am Gefäßboden charakterisiert. Die Größe



Abb. 1. Mikroskopiebild sedimentierter, agglomerierter Nanopartikel (AlOOH); A: Originalaufnahme; B: binärisiertes Bild; C: Originalaufnahme mit überlagerten Kante.

N_∞ stellt die fiktive sedimentierte Gesamt-Partikelzahl bei vollständiger Nicht-Überlagerung (Fall $\beta = 0$) dar, während N_0 die am Boden der Messkammer tatsächlich zählbare Partikelzahl am Ende des Sedimentationsprozesses ist. Die Abb. 2 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf von $N(t)$ (Modell und tatsächlich gezählte Partikel) für ein Experiment mit agglomerierten nanoskalierten ALOOH-Partikeln. Mit Hilfe üblicher Least-Square-Approximationsverfahren wurden die Parameter der Modellfunktion (N_0 , N_∞ , α und β) an die Messdaten angepasst. Besonders wichtig ist dabei die Kenntnis darüber, zu welchem Zeitpunkt t^* der Wert N_0 erreicht ist (Ende des Sedimentationsprozesses). Er kann aus der zeitlichen Verteilungsfunktion $N(t)$ ermittelt werden.

Aus der Zeitreihenanalyse von $N(t > t^*)$ kann man zudem auf die Einflüsse von Konvektionen am Boden des Gefäßes schließen, weil sich durch Konvektionsbewegungen die eigentlich konstante Gesamtpartikelzahl N_0 scheinbar zyklisch geringfügig mit der Zeit ändert (Partikel wandern zeitweise aus der Fokusebene des Mikroskops; das Phänomen tritt übrigens während des gesamten Messvorgangs auf). Diese zeitlichen Variationen von N_0 lassen sich gut durch eine Normalverteilung $N(N_0, \sigma_0^2)$ approximieren, deren Varianz ein Maß für die Konvektion am Gefäßboden ist. Schließlich lässt sich mit Hilfe der Zeit t^* auch die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit \bar{v} schätzen. Sie ist definiert als Quo-

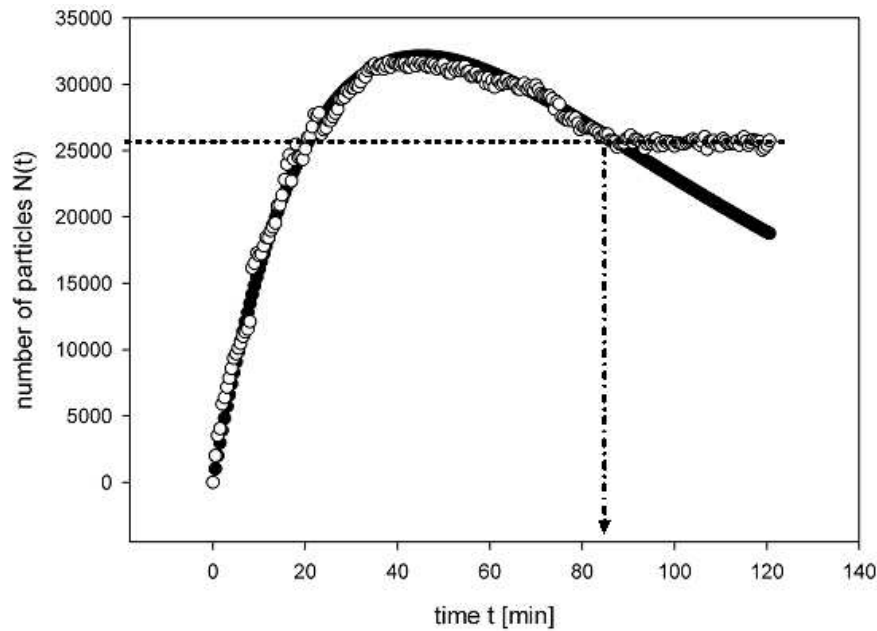


Abb. 2. Zahl agglomerierter Nanopartikel N in Abhängigkeit von der Zeit t .
 Modell: ●; korrespondierende gemessene Zellzahlen: ○;
 Parameter: $t^* = 85$ min (Pfeil); $N_0 = 25850$; $\alpha = 0,0273 \text{ min}^{-1}$; $\beta = 0,0112 \text{ min}^{-1}$;
 $N_\infty = 75267$; $\bar{v} = 235 \mu\text{m}/\text{min}$; $\sigma_{N_0}^2 = 362$.

tient von Messkammerhöhe h und Zeit t^* . Da h eine Apparatekonstante ist, wird \bar{v} letztlich nur durch t^* bestimmt.

Die Überprüfung der Modellannahmen erfolgte unter gleichbleibenden experimentellen Bedingungen (z.B. Nanopartikelsorte, mittlere Größe der Agglomerate, Temperatur), wobei alle Experimente mehrfach wiederholt durchgeführt und die Prozess-Parameter nach den beschriebenen Verfahren ermittelt wurden. Dabei zeigte sich, dass die gewonnenen Parameterwerte N_0 , N_∞ , α , β , \bar{v} bzw. t^* normal-verteilt waren, wobei die maximale Abweichung vom jeweiligen Parameter-Mittelwert höchstens 5% betrug.

4 Diskussion

Für *in vitro* Untersuchungen zur Nanopartikelexposition unter kontrollierten Bedingungen konnten mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung eine Reihe von kinetischen Parametern identifiziert werden, die sich mit Hilfe eines geeigneten Modells aus der gemessenen Anzahl sedimentierter Partikel reproduzierbar bestimmen lassen. Empirisch haben sich insbesondere vier Parameter als wichtig erwiesen: die Gesamtsedimentationszeit t^* , die daraus abgeleitete mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit \bar{v} , die final am Messgefäßboden verfügbare Partikelzahl N_0 sowie die fiktive Zahl N_∞ . Diese Parameter erlauben es, eine standardisierbare experimentelle Ausgangsbasis zu schaffen, so dass Wechselwirkungen dieser Nanopartikel mit vitalen Makrophagen unter kontrollierten *in vitro*-Bedingungen untersucht werden können.

Danksagung. Das Forschungsprojekt wurde mit Mitteln des Ministeriums für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes NRW gefördert.

Literaturverzeichnis

1. Xia T, Li N, Nel A. Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health*. 2009;30:137–50.
2. Song Y, Li X, Du X. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J*. 2009;34:559–67.
3. Bruch J, Rehn S, Rehn B, et al. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207:203–16.
4. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009;460:208–12.