

Pfadbasierte Identifikation von Nanopartikel-Agglomerationen in vitro

Thorsten Wagner¹, Sven Olaf Lüttmann¹, Dominic Swarat¹,
Martin Wiemann², Hans-Gerd Lipinski¹

¹Biomedical Imaging Group, Fachbereich Informatik, Fachhochschule Dortmund

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

wagner@biomedical-imaging.de

Kurzfassung. Durch eine Laser gestützte Mikroskopietechnik können Licht streuende Nanopartikel (NP) in Suspensionen anhand ihrer Beugungsmuster sichtbar gemacht und ihre Diffusionspfade durch bildanalytische Methoden erfasst werden. Diese Pfade lassen Rückschlüsse auf den Diffusionskoeffizienten und damit auf den hydrodynamischen Durchmesser (HD) der NP zu. Eine sprunghafte Änderung der NP-Größe, die im Beugungsbild keine eindeutigen Veränderungen bewirkt, kann dennoch als Agglomeration identifiziert werden, da es zu einem nicht-stationären Verhalten des HD-Zeitreihe kommt. Nicht-agglomerierende Partikel wie Polystyrol (in H₂O, Durchmesser 100nm) weisen durchweg ein stationäres Zeitreihenverhalten auf, während bei „erzwungener“ Agglomeration bestimmter SiO₂ Partikel (Durchmesser 20nm) nach NaCl-Gabe ein statistisch nachweisbares nicht-stationäres HD-Zeitreihenverhalten vorliegt. Mit diesem indirekten Verfahren lassen sich NP-Agglomerationen aufdecken auch wenn sie nicht direkt mikroskopisch nachweisbar sind.

1 Einleitung

Die Bedeutung von Nanopartikeln (NP) sowohl für die Industrie als auch für die Medizin nimmt stetig zu. Allerdings weisen Studien darauf hin, dass eine NP-Exposition beim Menschen möglicherweise zu gesundheitlichen Problemen führen kann [1, 2]. Unter in vitro-Bedingungen lässt sich u.a. die Wechselwirkung zwischen Immunzellen und NP untersuchen, wobei die NP in ein wässriges Medium gegeben werden, in dem sich die vitalen Immunzellen befinden. Eine NP Tracking-Analyse (NTA; z.B. die NanoSightTM-Methode) ermöglicht es, NP in solchen Suspensionen aufgrund ihrer Lichtstreuung bzw. ihrer Beugungsmuster sichtbar zu machen und ihre Größe über zurückgelegte Diffusionspfade („Tracks“) zu charakterisieren. Offenbar neigen bestimmte Partikelarten zur Agglomeration, wodurch ihre biologische Aktivität oder Toxizität möglicherweise modifiziert wird. Da die Größenänderung von NP durch Agglomeration unter dem Mikroskop kaum direkt beobachtet werden kann, wurde eine bildgestützte Methode entwickelt, mit deren Hilfe Agglomerationen indirekt durch Änderung des dynamischen Verhaltens detektiert werden können.

2 Material und Methoden

Bei der NTA-Technik wird ein Laserstrahl durch eine Flüssigkeitsschicht geführt, welche die Nanopartikel und ggf. auch die Immunzellen enthält. Trifft der Laserstrahl auf ein NP, wird der Strahl gestreut, wobei ein typisches Beugungsmuster erzeugt wird, das mit einem Mikroskop und einer elektronischen Kamera mit 30 Bildern/s registriert wird. Ein ausgewählter NP kann idealerweise über die gesamte Bildserie hinweg verfolgt werden (Abb. 1). Aufgrund seiner Diffusionsbe-

Abb. 1. Aufnahme einer SiO_2 -Suspension mit der NanosightTM-Technik und exemplarisch eingezeichnetem Pfad eines Nanopartikels



wegung entsteht ein charakteristischer Pfad, den man verfolgen und hinsichtlich seines Verlaufs analysieren kann. Anhand dieses Tracks lässt sich das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle r^2 \rangle$ des NP bestimmen, welches die Berechnung des zugehörigen Diffusionskoeffizienten (DC) erlaubt. Die Stokes-Einstein-Beziehung liefert den zum Partikel gehörenden hydrodynamischen Durchmesser (HD) [3]

$$\frac{\langle r^2 \rangle}{4} = D \cdot t = \frac{TK_B}{3\pi\eta d} \quad (1)$$

Unter dem HD d versteht man den Durchmesser einer Kugel, welche die gleichen Diffusionseigenschaften aufweist wie der eigentliche Partikel. Der Parameter T entspricht der absoluten Temperatur der Lösung in Kelvin, η der Viskositäts-Konstante der Lösung und K_B der Boltzmann Konstante. Für die Identifikation von Agglomerationsereignissen ist es notwendig, den zeitlichen Verlauf des HD eines Partikels zu kennen. Dazu werden besonders lange Tracks (≥ 100 Schritte) ausgewählt und in nicht überlappende Teiltracks mit der Länge Θ (Fensterbreite) unterteilt. Mit der Zeitkomponente $t = n \cdot \Theta$ ergibt sich somit der zeitabhängige Durchmesserschätzer durch folgenden Algorithmus:

1. Bestimmung des mittleren Verschiebungsquadrats

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{\Theta} \sum_i [(x_{i+t} - x_{i-1+t})^2 + (y_{i+t} - y_{i-1+t})^2] \quad (2)$$

2. Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers als Zeitfunktion

$$d = d(t) = \frac{T \cdot K_B}{3\pi \cdot \eta} \cdot \frac{4 \cdot \Delta t}{\langle r^2 \rangle} \quad (3)$$

Hierbei sind (x, y) die aktuellen kartesischen Koordinaten des Partikelzentrums und Δt die Zeit zwischen zwei Schritten. Abb. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Durchmesserkurve für einen Polystyrol-Partikel (100nm) in stabiler Suspension in der keine Agglomeration stattfindet. Der zeitliche Verlauf des Durchmessers weist typische Messschwankungen auf, die größtenteils auf die stochastische Natur der Brownschen Molekularbewegung zurückzuführen ist. Dennoch verhält sich die Zeitreihe der Partikel-Durchmesser stationär (Test nach Kwiatkowski et al./KPSS-Test [4]). Im Fall einer Agglomeration verändern sich allerdings der DC und der damit verbundene HD, so dass ein nicht-stationärer “Trend”, in der HD-Zeitreihe zu erwarten wäre. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst ein Monte-Carlo-Modell für die Simulation der NP-Bewegungen entwickelt. Die Verteilung der Schrittlänge s in Abhängigkeit vom DC D ist durch folgenden Ausdruck beschrieben [5]

$$p_d(s) = 2s(4D\Delta t)^{-1} \exp(-s^2(4D\Delta t)^{-1}) \quad (4)$$

Mit Hilfe der Inversionsmethode [6] lassen sich zufällige Schrittlängen dieser Verteilung erzeugen mit denen sich ein Partikelpfad generieren lässt. Ein Agglomerationsereignis wird durch eine schlagartige Verringerung des Diffusionskoeffizienten-Wertes (Halbierung) simuliert, was zu einer Vergrößerung des HD des Partikels führt. Für die Experimenten wurde Partikel aus Polystyrol und SiO_2 eingesetzt. Polystyrol Partikel (NanoSight, Eichstandard 100 nm) lagen in H_2O monodispers vor. Pegylierte SiO_2 -Partikel (BASF, Durchmesser ca. 20-100nm) wurden durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7,9) und Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 0,45% w/v) zur Agglomeration gebracht.

3 Ergebnisse

Auf Basis der Monte-Carlo-Simulation wurde die Leistungsfähigkeit des KPSS-Tests zur Agglomerationsdetektion optimiert und analysiert. Dazu wurden 100

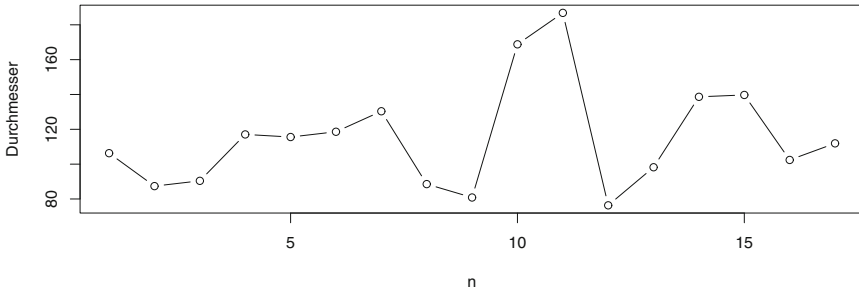


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf eines Polystyrol-Partikel-Durchmessers (Tracklänge: 100 Schritte). Der KPSS-Test klassifiziert den Track als stationär

Schritte umfassende Tracks mit und ohne Agglomeration simuliert, wobei die Agglomeration etwas nach Ablauf der halben Zeit (Schritt 50) simuliert wurde. Zur Optimierung des Verfahrens wurden für verschiedene Fensterbreiten und Signifikanzniveaus die Erkennungsraten für agglomerierte Partikel ermittelt. Durch die Ermittlung der Erkennungsraten für nicht agglomerierte Partikel konnte zusätzlich auch eine False-Positive-Rate (1-Erkennungsrate) angegeben werden. Es zeigte sich, dass die Leistungsfähigkeit der Agglomerationsdetektion abhängig war (1.) von dem Zeitpunkt, zu dem die Agglomeration innerhalb des Tracks simuliert wurde und (2.) von der Länge des Partikeltracks. Abb. 3 zeigt, dass die maximale Erkennungsrate bei einer Fensterbreite von sechs Schritten liegt. Die False-Positive-Rate lag dabei praktisch konstant bei ca. 5%. Weitere Untersuchungen ergaben, dass man eine optimierte Fensterbreite erhält, wenn man die Gesamtlänge des Tracks mit 0,06 multipliziert. Für das Signifikanzniveau (Abb. 3b) gilt: Je größer die Erkennungsrate für agglomerierte Partikel sein soll, desto häufiger werden nicht-agglomerierte Partikel fälschlicherweise als agglomerierte Partikel klassifiziert. Daher wurde für die weiteren Analysen ein Signifi-

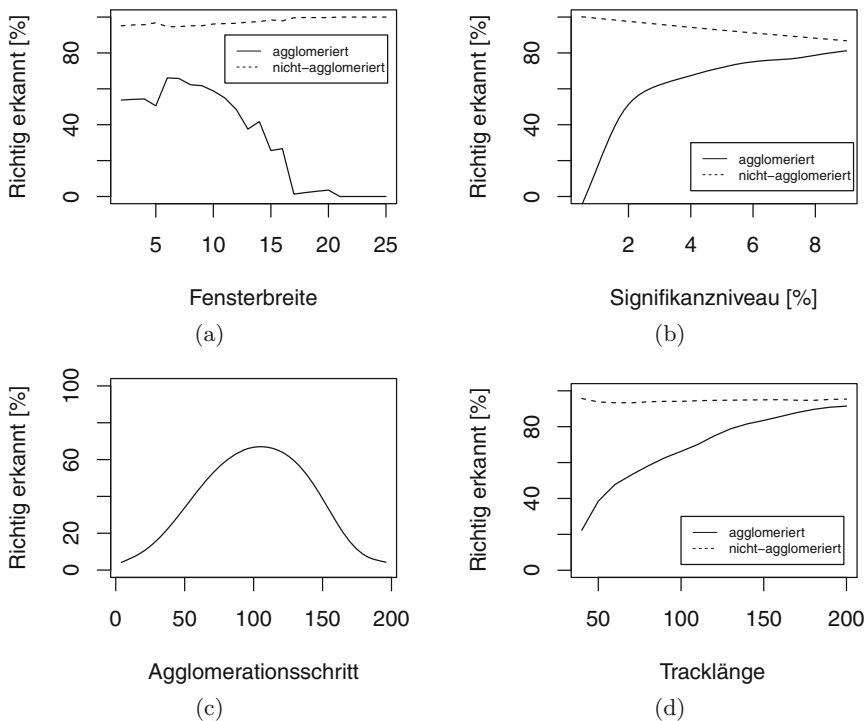


Abb. 3. Analyse Ergebnisse der Optimierungsparameter (a,b) und der Leistungsfähigkeit (c,d). Untersucht wurden die Fensterbreite (a, gemessen in Schritten), das Signifikanzniveau (b), der Agglomerationszeitpunkt (c) und die Länge des Tracks (d)

kannniveau von 4% gewählt, da hier die False-Positive-Rate von 5% noch relativ niedrig ist. Die Abhängigkeit der Leistungsfähigkeit der Agglomerationsdetektion vom Agglomerationszeitpunkt und von der Tracklänge ist in Abb. 3c bzw. 3d gut zu erkennen. Tritt die Agglomeration in der Mitte des Tracks auf liegt die Erkennungsrate bei ca. 75%. Agglomerationen, die am Anfang und am Ende des Tracks auftreten, werden deutlich seltener erkannt. Die Agglomerationsdetektion wurde abschließend mit in Wasser gelösten pegylierten SiO_2 unter Hinzugabe von NaCl getestet. Dabei wurden 8% der Partikel als mögliche Agglomerate klassifiziert. Abb. 4 zeigt exemplarisch den Zeitverlauf des Durchmessers eines solchen Partikels. Der Trend ist dabei gut erkennbar.

4 Diskussion

Es wurde eine bildgestützte Trackinganalyse entwickelt, mit der optisch nicht darstellbare NP-Agglomerationen detektiert werden können. Eine Agglomeration lässt sich durch einen nicht-stationären Verlauf der ermittelten Durchmesser-Zeitreihe nachweisen. Dieses Simulationsergebnis wurde mit Messungen an realen NP experimentell überprüft und bestätigt. Während eine Zeitreihenanalyse von nicht-agglomerierbaren Polystyrol-Partikeln zu stationären Partikelgrößen-Zeitreihen führen, können experimentell forcierte Agglomerationen, wie sie etwa bei SiO_2 -Partikeln nach NaCl-Gabe auftreten, durch ein nicht-stationäres Verhalten der Partikelgrößen-Zeitreihe nachgewiesen werden. Mit der Methode können schnell verlaufende bzw. induzierte Agglomerationen sowie Deagglomerationen dargestellt und untersucht werden.

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

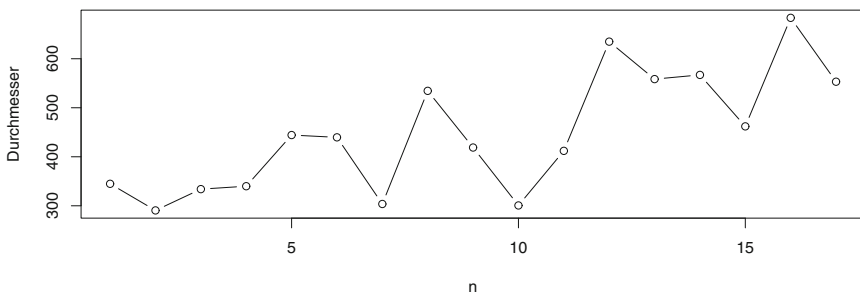


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf des hydrodynamischen Durchmessers [nm] eines offenbar agglomerierten SiO_2 -Partikels, welcher über ca. 100 Schritte beobachtet werden konnte. Der KPSS-Test klassifiziert den zeitlichen Verlauf des HD als nicht-stationär

Literaturverzeichnis

1. Xia T, Li N, Nel A. Potential health impact of nano particles. *Annual Review of Public Health*. 2009;30:137–50.
2. Lam C, James JT, McCluskey R, et al. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36(3):189–217.
3. Nelson P. *Biological Physics*. New York: W.H. Freeman and Company; 2008.
4. Kwiatkowski Peter C, et al. Testing the null hypothesis of stationarity against the alternative of a unit root. *J Econom*. 1992;54(1-3):159–78.
5. Michalet X. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error. *Physical Review E*. 2010;82(4):041914.
6. Rubinstein RY, Kroese DP. *Simulation and the Monte Carlo method*. vol. 707. Wiley-interscience; 2008.