

Izvirni znanstveni članek ■

Populacije orjaških lipidnih veziklov kot model za študij bio-nano interakcij

Giant Lipid Vesicle Populations as a Model for Bio-nano Interaction Studies

Instituciji avtorjev: Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani (JZ), Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani (DD).

Kontaktna oseba: Jernej Zupanc, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana. e-pošta: jernej.zupanc@fri.uni-lj.si.

Prejeto: 15.05.2011. Sprejeto: 15.06.2011.

Jernej Zupanc, Damjana Drobne

Izveček. Vse več študij prihaja do ugotovitev, da interakcije z nanodelci vplivajo na stabilnost celičnih membran. Namesto izpostavljanja živih organizmov se za preučevanje interakcij z nanodelci pogosto uporabljajo lipidni vezikli kot model celičnih membran. Predstavljena računalniško podprta metodologija omogoča zaznavanje in kvantificiranje morfoloških sprememb tisočev veziklov skozi čas izpostavljenosti nanodelcem. Zajema korake od eksperimentalnega protokola preko računalniške obdelave mikrofotografij do analize pridobljenih podatkov. Namen dela je bil ugotoviti morebiten vpliv dveh tipov nanodelcev (C_{60} in $CoFe_2O_4$) na POPC lipidne vezikle s študijo populacije veziklov namesto izoliranih posameznikov. V predstavljenih eksperimentih ugotavljamo, da oba preizkušena tipa nanodelcev vplivata na morfološke spremembe ali pokanje lipidnih veziklov.

Abstract. Recent evidence suggests that nanoparticles affect cell membrane stability and subsequently exert toxic effects. To assess these interactions, research is often conducted on lipid vesicles as substitutes for cells. We present a methodology that enables observing thousands of lipid vesicles and analysing their shape transformations with the use of computerised image processing and data analysis. Our aim was to test whether this approach is appropriate for assessing effects of nanoparticles (C_{60} and $CoFe_2O_4$) on POPC lipid vesicles. In the presented experiments, we show that nanoparticles provoked bursting of vesicles as well as changes in their size and morphology. The novelty of our approach lies in the possibility to investigate a large population of vesicles and generate statistically relevant results. Our data demonstrates that nanoparticles affected lipid membranes and may have a potential to affect cell membranes as well.

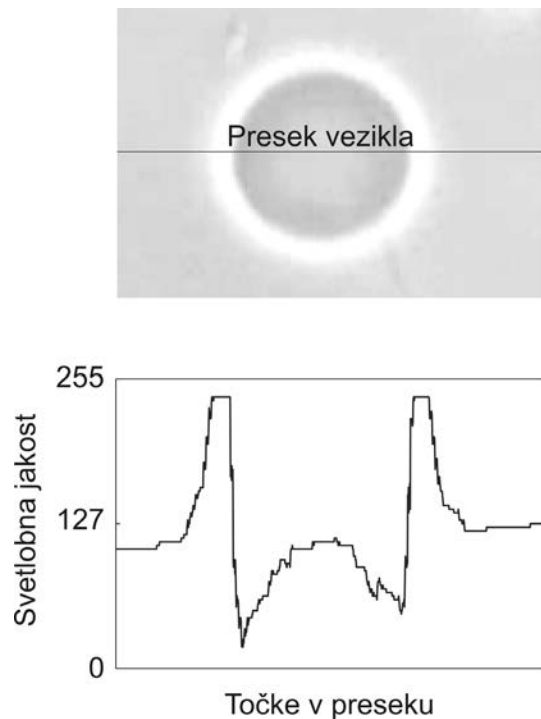
■ **Infor Med Slov:** 2011; 16(1): 1-12

Uvod

Nanotehnologija je panoga, ki razvija, opredeljuje in proizvaja materiale v velikostih 1-100 nanometrov. Materiali v tem velikostnem razredu spremenijo lastnosti v primerjavi z večjimi materiali iste kemijske sestave, kar jih naredi zanimive za širok spekter uporabe v zdravstvu, kozmetični industriji, proizvodih vsakdanje rabe, elektrotehniki, proizvodnji energije idr. Lastnosti nanodelcev hkrati z njihovo veliko reaktivnostjo istočasno predstavljajo možnosti za nove tipe interakcij z biološkimi sistemi. Te interakcije so povsem neznane in zato v zadnjem času v ospredju številnih raziskav.¹ Nedavno je bilo ugotovljeno, da pri interakcijah z živimi bitji nanodelci najprej stopijo v stik s celičnimi membranami in posledično povzročijo verigo celičnih sprememb.² Za natančno preučevanje interakcij med celičnimi membranami in različnimi substancami so uveljavljen model umetni lipidni vezikli.

Lipidni vezikli

Lipidni vezikli so mehurčki, narejeni iz enakih lipidov, kot jih najdemo v celičnih membranah (slika 1). V raziskavah in aplikacijah so pogosto uporabljeni kot poenostavljeni modeli celic.^{3,4} Na širokem področju raziskav celičnih membran, izpostavljenih različnim pogojem, postajajo zelo priljubljen nadomestek celic. Zaradi ustrezne velikosti jih lahko neposredno opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. Običajno raziskovalci osamijo vezikel ali manjšo skupino, jo izpostavijo spremembi okolice ter skozi daljše časovno obdobje spremljajo spremembe, saj je pričakovati specifičen časovno pogojen vpliv.^{5,6}



Slika 1 Zgoraj: orjaški lipidni vezikel premera 10 μm , posnet s faznokontrastnim mikroskopom. Vodoravna črta označuje presek in poteka skozi ozadje mikrografije, obroč vezikla in notranjost vezikla. Spodaj: svetlobna jakost točk v zgoraj označenem preseku. Na vodoravni osi so vrednosti od 0 (črnina) do 255 (belina). Različne svetlobne jakosti delov mikrografije lahko uporabimo za segmentacijo posameznih objektov, v tem primeru vezikla.

Pri proučevanju vpliva nanodelcev je smotrno opazovati večjo skupino veziklov, saj tip interakcij ni poznan niti ni nujno, da je učinek enak pri vseh veziklih. Zaradi specifičnosti nanodelcev in njihovih še neznanih interakcij z lipidnimi membranami⁷ je za proučevanje interakcij zelo primereno opazovanje skupine veziklov namesto osamljenih primerkov. Namen našega dela je bil ugotoviti morebiten vpliv dveh tipov nanodelcev na umetne lipidne vezikle in pokazati uporabnost preučevanja oblik in velikosti veziklov v populacijah tisočih veziklov za študij vpliva nanodelcev na lipidne membrane. Naš pristop je temeljil na zajemanju slike populacije veziklov v določenih časovnih obdobjih. Na podlagi posnetka ob vsakem obdobju smo naredili statistično analizo morfoloških značilnosti veziklov^{8,9,10,11} in

preučevali občutljivost in primernost računalniškega pristopa k zajemu in obdelavi slik veziklov za namene ugotavljanja vplivov nanodelcev na biološke membrane.

Tu predstavljamo računalniško podprto metodologijo za proučevanje populacij lipidnih veziklov in navajamo rezultate, ki smo jih pridobili z njeno uporabo pri ugotavljanju posledic interakcij lipidnih veziklov z različnimi nanodelci. Predstavljena metodologija vključuje protokol za izvedbo poskusa in zajem mikrografij ali mikrografske videoposnetke ter računalniške pristope za analizo populacij veziklov iz pridobljenih posnetkov (slika 2).



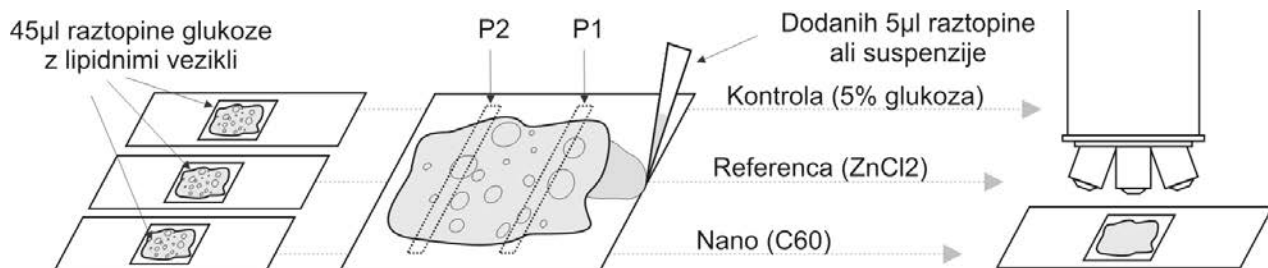
Slika 2 Potek korakov v predstavljeni metodologiji za analizo populacij lipidnih veziklov. Potemnjeni pravokotniki predstavljajo korake, poševni tisk pa njihove izhode.

Eksperimentalni protokol

Prvi korak metodologije je izvedba eksperimenta, v katerem izpostavimo populacije lipidnih veziklov nanodelcem ter naredimo mikrografske posnetke, ki služijo za nadaljno računalniško obdelavo. Izvedli smo dva poskusa s populacijami lipidnih veziklov in različnimi nanodelci. V enem smo raziskovali interakcije veziklov s C_{60} nanodelci (fulereni), v drugem pa s kobalt-feritnimi ($CoFe_2O_4$) nanodelci. Razlike med poskusoma so navedene v tabeli 1, v nadaljevanju pa je predstavljen protokol, ki je enak za oba poskusa.

Orjaški unilamelarni fosfolipidni vezikli so pripravljene iz 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilholina (POPC) in holesterola, zmešanih v razmerju 4:1 na sobni temperaturi s prilagojeno metodo elektroformacije.^{12,13} Po preteku 24 ur od začetka priprave veziklov izvajamo eksperiment. Za vsako populacijo (npr. kontrolno, referenčno, nano) pripravimo po eno objektno stekelce, na katerega namestimo 45 μ l veliko kapljico suspenzije z vezikli. Na vzorec poveznemo manjše objektno stekelce, ob straneh pa prostor z vzorcem zapremo s silikonsko pasto, da preprečimo izhlapevanje.

Na shemi (slika 3) je prikazan potek poskusa s C_{60} , kjer enakim populacijam veziklov dodamo različne aditive. Na vsakem stekelcu določimo sled (P1) v bližini dodanega aditiva, kjer poteka snemanje. Če je sledi več (P1, P2, ...), so izbrane nekaj milimetrov narazen, kar omogoči spremljanje vpliva koncentracijskega gradiena aditiva na vezikle. Nato pod 400-kratno povečavo fazno kontrastnega svetlobnega mikroskopa posnamemo enodimenzionalno sled, v kateri je zajet vzorec populacije veziklov.



Slika 3 Vrstni red korakov v primeru eksperimenta s populacijami lipidnih veziklov in C_{60} nanodelci. Najprej razdelimo enako količino suspenzije glukoze raztopine in lipidnih veziklov na tri stekelca. V naslednjem koraku dodamo vsakemu vzorcu nanodelce ali referenčno kemikalijo (služi kot pozitivna referenca) in glukožno raztopino (služi kot kontrola). Določimo sledi na vzorcu, kjer zajemamo slike ali videoposnetke populacije. Pri eksperimentu s $CoFe_2O_4$ ni bilo populacije z referenčno kemikalijo. Prav tako smo zajeli le P1. Shema ni v merilu.

Snemanje ponovimo večkrat – po preteku določenih časovnih obdobj (za oba poskusa so navedena v tabeli 1), da zajemamo spremembe v populacijah skozi čas. Prvo obdobje zajema je po dodajanju veziklov na objektno steklo, drugo po dodajanju nanodelcev. Poleg tega snemamo populacije veziklov tudi po večdesetminutni izpostavitvi dodanim substancam. Posnete mikrofografije ali videi so osnova, ki jo pozneje računalniško obdelamo, da izločimo podatke o zajetih populacijah veziklov.

Tabela 1 Razlike in podobnosti dveh poskusov z nanodelci in populacijami lipidnih veziklov.

Poskus	Zajem posnetkov	Čas ob zajemanju (min)	Referenčna kemikalija
C_{60}	810 mikrofografij	1; 10; 100	$ZnCl_2$
$CoFe_2O_4$	6 videoposnetkov	1; 90	brez

Pri eksperimentih z nanodelci smo uporabili različna načina snemanja populacij. V eksperimentu s C_{60} smo na vsaki sledi zajeli po 15 mikrofografij, v eksperimentu s $CoFe_2O_4$ pa petminutni videoposnetek. Z zajemom posameznih mikrofografij smo zajeli približno 15 % sledi, videoposnetek pa zajema celotno sled. V primeru posameznih mikrofografij je za analizo populacije potrebna le še segmentacija veziklov, videoposnetek pa moramo najprej zlepiti v veliko sliko (mozaik), iz katere nato segmentiramo vezikle. V naslednjem razdelku je opisan postopek lepljenja videoposnetka v mozaik, ki se nanaša na

eksperiment s $CoFe_2O_4$. Pri eksperimentu s C_{60} ta korak ni bil potreben, saj se iz posameznih mikrofografij (za razliko od videoposnetka) lahko takoj segmentira vezikle.

Računalniško procesiranje

Proučevanje vzorca, ki je večji od vidnega polja na izbrani povečavi pod mikroskopom, kamor spadajo tudi populacije lipidnih veziklov, je izvedljivo z lepljenjem posameznih mikrofografij v veliko sliko – mozaik. Pristop je bil uporabljan med fotografiji že v 19. stoletju, v 20. stoletju pa so ga prevzeli tudi znanstveniki in dandanes je v uporabi na mnogih znanstvenih področjih. V mikroskopiji lahko mozaik večjega opazovanega vzorca naredimo tako, da vzorec premikamo pod mikroskopom in zajemamo delno prekrivajoče mikrofografije. Slednje kasneje zlepimo v mozaik z uporabo komercialnega programskega orodja¹⁴ ali pa razvijemo algoritem, posebej namenjen lepljenju mikrofografij, specifičnih za naš vzorec.¹⁵⁻¹⁹ Poleg slik lahko za lepljenje mozaikov uporabimo tudi mikroskopske videoposnetke,^{20,21} kjer je pristop podoben, a zahtevnejši kot lepljenje iz posameznih slik.

Dinamična narava veziklov zahteva zajem čim večjega vzorca v čim krajšem času, kar lažje dosežemo z videoposnetki kot s posameznimi mikrofografijami. Ker segmentacijo veziklov izvajamo iz slik, je potrebno videoposnetek zlepiti

v veliko sliko – mozaik, ki predstavlja celotno posneto področje.

Pretvorba videoposnetka v mozaik

Pri lepljenju videoposnetka populacije lipidnih veziklov v mozaik, se pojavijo naslednji problemi:

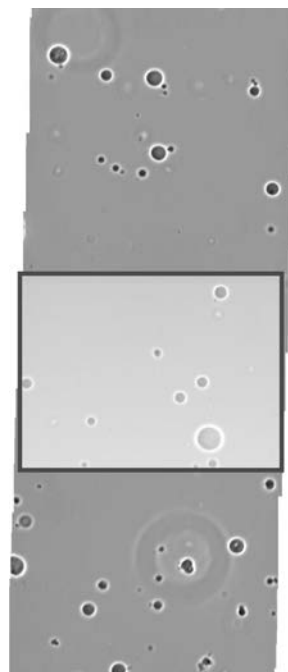
- Odstranjevanje digitalne nečistoče z videoposnetkov. Nečistoča je posledica prašnih delcev v optičnem in snemalnem delu mikroskopa.
- Razrez videoposnetka na manjše dele za pohitritev procesiranja in sestavljanje prvotnega medianskega mozaika,
- detekcija veziklov v mozaiku,
- iskanje najostrejših slik vsakega vezikla v videoposnetku,
- zlivanje najostrejših slik veziklov v končni mozaik.

Vhodni podatek v procesiranje je enorazsežni videoposnetek sledi s populacijo lipidnih veziklov. Zaželeni izhodni podatek je velika slika – mozaik, ki predstavlja celotno posneto področje (slika 4). Vsaka slika vezikla v zaželenem mozaiku mora biti njegova najostrejša slika v videoposnetku.

Za odstranitev digitalne nečistoče z videoposnetkov najprej izdelamo sliko nečistoče. Iz naključnega izbora 300 slik videoposnetka izračunamo za vsako točko časovno mediano vseh istoležnih točk. Točke skupaj sestavljajo sliko nečistoče, ki jo odštejemo od vsake slike videoposnetka, da dobimo slike brez nečistoč.

Za lepljenje slik v mozaik potrebujemo podatek o njihovem medsebojnem prekrivanju. Da bi dobili položaj posamezne slike videoposnetka v mozaiku, uporabimo registracijo slik. Med vsakima zaporednima slikama izračunamo normirano križno korelacijo, iz katere lahko razberemo, v kolikšni meri se prekrivata in kakšen je med njima premik (slika 5). Iz vsote zaporednih premikov

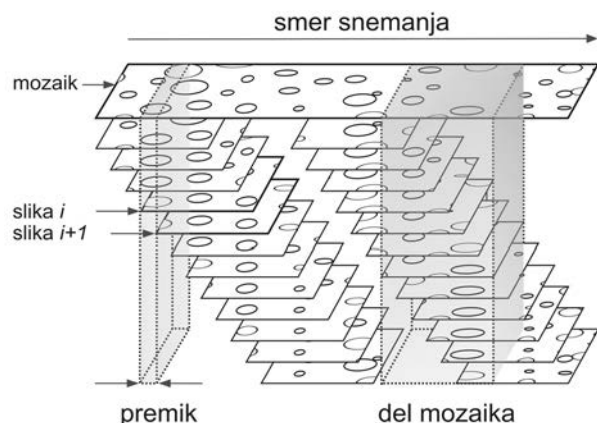
lahko za vsako sliko videoposnetka določimo njen položaj v mozaiku.



Slika 4 Izsek mozaika zlepljenega iz mikroskopskega videoposnetka sledi ene populacije veziklov. Celoten mozaik je približno 33-krat višji. Obrobljeni pravokotnik na sredini prikazuje velikost polja, kot ga lahko na 400-kratni povečavi vidimo pod mikroskopom.

Povprečen videoposnetek posamezne sledi je dolg 5 minut, kar ob 25 slikah na sekundo pomeni 7500 slik. Dimenzije mozaika tako presegajo 40.000×2.000 točk, zaradi česar je procesiranje mozaika časovno zelo zahtevno. Postopek pospešimo tako, da vse korake lepljenja mozaikov (in pozneje tudi detekcijo veziklov) izvajamo le na posameznih delih mozaika naenkrat (slika 5). Za določitev teh delov je potrebno poiskati področja posnetka brez veziklov, kjer bodo potekale meje med deli. Zaradi enorazsežne narave videoposnetka mozaik razrežemo na dele po krajši dimenziji (posnetek, ki poteka navpično kot na sliki 4, režemo vodoravno). Za vrstice razreza izberemo tiste z najmanjšo varianco v svetlobni jakosti. Vrstice, kjer je svetlobna jakost najbolj homogena, so namreč vrstice, kjer vezikli ne nastopajo (ozadje posnetka je homogeno,

svetlobna jakost v območju veziklov pa se spreminja – slika 1). Z razrezi v teh vrsticah zagotovimo, da noben vezikel ni v posameznem delu le polovično, kar bi izničilo verodostojnost končnega mozaika.

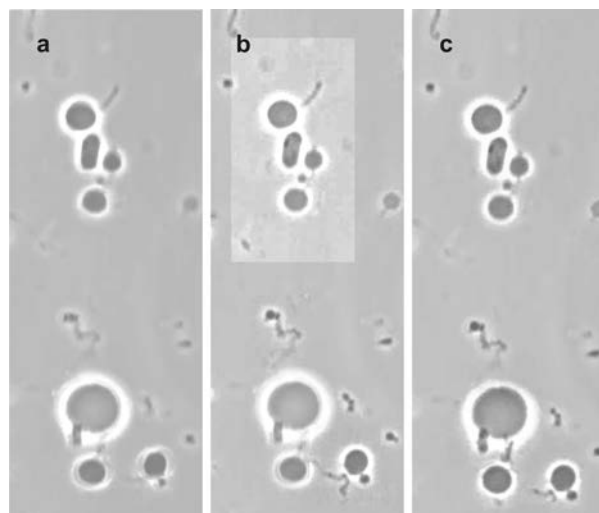


Slika 5 Interpretacija slik videoposnetka. Zgornja puščica označuje smer snemanja, pod njo pa je prikazan zajeti mozaik. Pod mozaikom so nanizane poravnane posamezne slike videoposnetka in v levem zatemnjenem kvadru je posebej označen premik med dvema zaporednima slikama. V desnem zatemnjenem kvadru je del mozaika, ki vsebuje več slik. Pri lepljenju posameznih slik se na medianski mozaik preslika mediana vseh istoležnih točk prekrivajočih se slik.

Da bi dobili mozaik, je potrebno vse slike videoposnetka združiti v celoto. Vsaka točka mozaika se namreč pojavlja tudi v več sto slikah, v katerih ima pogosto različne vrednosti. Za vsako točko mozaika njeno svetlobno jakost izračunamo kot mediano vseh istoležnih točk v slikah videoposnetka. Tako dobimo prvi, "medianski" mozaik (sliki 5 in 6a), ki pa ni najostrejši. Zaradi uporabe časovne mediane (na sliki 5 si lahko predstavljamo, da poteka navpično) so vezikli v mozaiku neostri, kar onemogoča natančno segmentacijo njihovih oblik.

Naslednji koraki so namenjeni izostritvi veziklov v medianskem mozaiku. Najprej na vsakem delu mozaika naredimo detekcijo objektov (večina objektov so vezikli, nekaj pa je tudi delcev zlepljenih fosfolipidov ali drugih tujkov). Detekcija temelji na izračunu gradientov svetlobne jakosti v vsaki točki, povezovanju točk z najočitnejšimi

gradienti v robove (detekcija robov Sobel) in na povezovanju robov, ki so si dovolj blizu, v objekte z uporabo morfoloških operatorjev. Tako zaznamo vse objekte v mozaiku, ki s svojo svetlobno heterogenostjo odstopajo od homogenega ozadja (sliki 1 in 4).



Slika 6 (a) Medianski mozaik; (b) najostrejše slike veziklov, prilepljene na medianski mozaik; (c) najostrejše slike veziklov, zlite v medianski mozaik z gradientnim zlivanjem.

Zaradi inkubacije v tekočini se vezikli v mediju premikajo, kar se pozna tudi na medianskem mozaiku. Tudi ko posamezne slike videoposnetka poravnamo na osnovi izračunanega premika med slikami, ugotovimo, da so posamezni vezikli v slikah neporavnani. Da bi lahko izbrali sliko, na kateri je vezikel najostrejši, je potrebno isti vezikel poravnati v vseh slikah, kjer nastopa. To naredimo z lokalno detekcijo premika. Najprej vsako sliko poravnamo z medianskim mozaikom, tako da so vezikli, ki smo jih našli v prejšnjem koraku, približno istoležni. Za natančno poravnavo izračunamo normalizirano križno korelacijo med območjem okoli vsakega najdenega vezikla in istim območjem v posamezni sliki. Rezultat je lokalni premik vezikla v sliki glede na medianski mozaik. Z uporabo globalnega premika slike in lokalnega premika vezikla lahko slednjega v vsaki sliki natančno poravnamo. Med natančno poravnanimi slikami veziklov je potrebno izbrati najostrejšo. Ta korak je za človeško oko preprost, za avtomatsko

računalniško presojo pa je potrebno slike vezikla pretvoriti v število – mero. Izračunane mere slik vezikla nato med sabo primerjamo in izberemo najostrejšo. Preizkusili smo več mer izostrenosti mikroskopskih slik²² in izbrali mero gradient Brenner, ki se je za določanje ostrine veziklov izkazala kot najprimernejša.

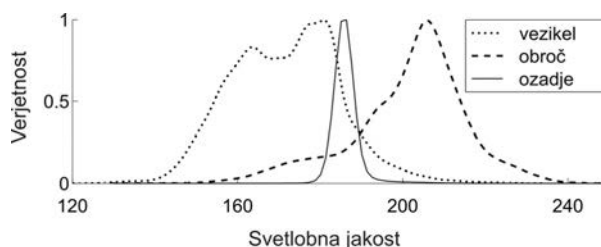
Ko so najostrejše slike posameznih veziklov izbrane, jih je potrebno zlit v medianski mozaik. Če posamezno sliko preprosto prilepimo na mozaik, nastanejo svetlobna neujemanja na robovih lepljenja (slika 6b), zato takšen pristop ni najprimernejši. Takšno neujemanje nastane zaradi različnih nivojev svetlobne jakosti v slikah (medianski mozaik in slika najostrejšega vezikla). V izogib nekonstencam na robovih se za zlivanje slik pogosto uporablja gradientno ali Poissonovo zlivanje.²³ Namesto da bi iz obeh slik vzeli direktno svetlobno jakost, v eni izmed njih izločimo le svetlobni gradient. V primeru veziklov vzamemo svetlobno jakost mozaika in gradient vezikla. Tako iz svetlobnih jakosti na robovih vezikla v mozaiku z uporabo gradienta iz slike najostrejšega vezikla izračunamo nove vrednosti točk vezikla v mozaiku. Rezultat takšne gradientne interpolacije omogoča najostrejše slike objektov v medianskem mozaiku brez vidnih robov, kjer nastopa zlivanje (slika 6c).

Segmentacija veziklov

Ko je videoposnetek zlepljen v mozaik z ostrimi slikami veziklov, nastopi problem segmentacije veziklov. Isti korak je potreben tudi za segmentacijo veziklov iz posameznih mikrografij. Problema segmentacije lipidnih veziklov iz mikroskopskih slik so se v literaturi lotili mnogi, največkrat s pomočjo svetlečega obroča, ki nastane okoli veziklov na slikah, posnetih s faznokontrastnim mikroskopom.^{5,6,24-26} Svetlobna jakost preseka slike vezikla ima na vsaki strani obliko sigmoide (slika 1), saj je notranjost veziklov temnejša od okolice (kemijska sestava medija v okolici veziklov se razlikuje od tiste v notranjosti vezikla). Omenjeno lastnost avtorji uporabijo tako, da njihov algoritem obriše vezikel iz začetne ročne inicializacije njegovega roba. Peterlin *et al.*⁶ so za

segmentacijo vezikla iz slik videoposnetka uporabili prilagodljiv prag svetlobne jakosti v sliki skupaj z detektorjem robov Sobel. Takšni pristopi k segmentaciji veziklov so se izkazali za uspešne, vendar je na tem mestu potrebno dodati, da so se avtorji ukvarjali s segmentacijo enega samega vezikla in pogostokrat z ročno inicializacijo njegovega obroča. Kadar segmentacija ni omejena le na izolirane vezikle, pristopi, ki so vezani na njihovo predvidljivo sferično obliko, odpovedo. Prav tako je neuporabna ročna inicializacija tisočih veziklov.

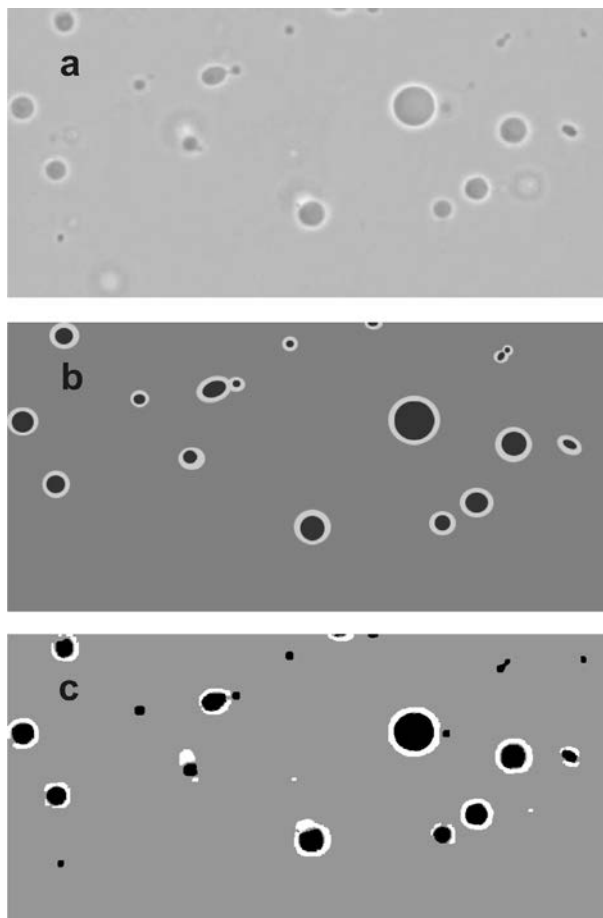
Za našo segmentacijo populacije veziklov smo se zato osredotočili na lastnost veziklov v mikrografijah, ki je skupna vsem, ne glede na njihovo obliko. Porazdelitvi svetlobne jakosti dveh segmentov mikrografij (vezikla in obroča) sta si v vseh primerih zelo podobni. Obroč je svetlejši od ozadja, notranjost vezikla pa temnejša (slika 7). Za segmentacijo populacije veziklov smo izbrali model Markovovega naključnega polja (MRF),²⁷ ki poleg porazdelitev svetlobnih jakosti posameznih segmentov slike upošteva še sosednost točk v slikah.



Slika 7 Porazdelitvena verjetnostna funkcija svetlobne jakosti za tri segmente mikrografij: vezikel, obroč in ozadja mikrografij.

Sliko (posamezno mikrografijo ali mozaik) želimo razdeliti na tri segmente, katerih verjetnostne porazdelitve svetlobnih jakosti se razlikujejo: vezikel, obroč in ozadje. Ideja modela Markovovega naključnega polja je naslednja. Svetlobna jakost vsake točke slike z določeno verjetnostjo pripada enemu izmed segmentov. Naloga je poiskati največjo skupno verjetnost vseh točk z upoštevanjem znanih verjetnostnih porazdelitev svetlobnih jakosti posameznih

segmentov, svetlobnih jakosti posameznih točk in povezav med sosednimi točkami.



Slika 8 (a) Mikrografija z lipidnimi vezikli; (b) ročno segmentirana mikrografija s tremi segmenti: ozadje, obroč, vezikel; (c) mikrografija, avtomatsko segmentirana z metodo Markovovega naključnega polja.

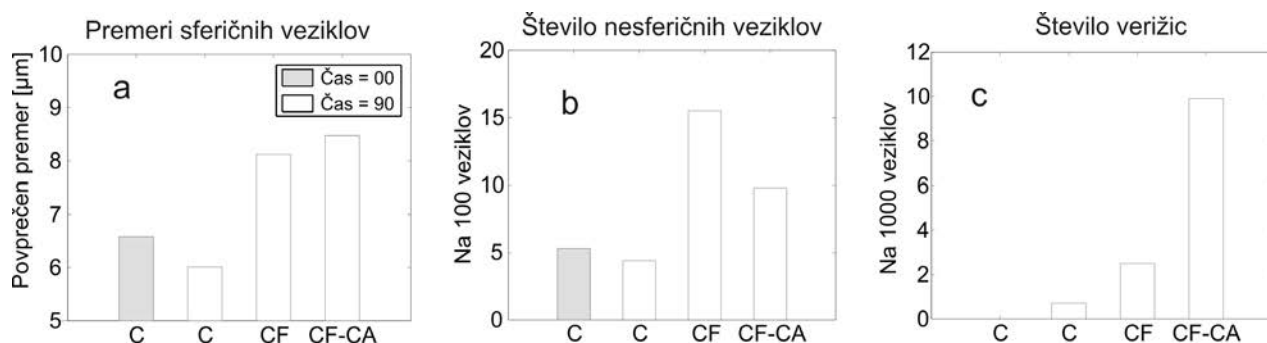
Iskanje rešitve (segmentacije, ki ima največjo verjetnost glede na navedene pogoje) lahko prevedemo v minimizacijo energije, ki jo sestavljata dva člena. Prvi člen je vsota prispevkov vseh posameznih točk, ki je obratno sorazmerna z razdaljo njihove svetlobne jakosti od povprečja jakosti segmenta, ki mu pripada (slika 7). Drugi člen so prispevki homogenosti segmentov, ki jim pripadajo posamezne točke in njeni neposredni (soseščina osmih točk) sosedi. Energijsko funkcijo

sestavimo kot smo opisali drugje,²⁸ rezultat segmentacije pa je viden na sliki 8. Za pospešitev in izboljšanje natančnosti segmentacije MRF segmentacijo izvedemo le na okolici posameznih veziklov in ne na celotni mikrografiji istočasno. Okolico posameznih veziklov detektiramo z uporabo gradientov, robov in morfoloških operatorjev, kot je opisano v prejšnjem razdelku.

Celoten postopek je načrtovan tako, da segmentiramo vse objekte – tako vezikle, kot vse ostalo, kar izstopa iz ozadja. Tako segmentacija ne obsega le veziklov, ampak tudi nekatere tujke, ki so prisotni v vzorcu. Iz mozaikov ali mikrografij z vezikli izločimo vse segmentirane točke in izračunamo površino, ki jo zasedajo. Tako dobimo število veziklov in njihove velikosti. Po računalniški segmentaciji operater pregleda in popravi segmentacijo – večinoma tako, da izbriše vse označbe, ki niso vezikli. S takšno ročno korekcijo, ki zahteva približno osemkrat manj časa kot celotna ročna segmentacija, zagotovimo njeno natančnost in verodostojnost pridobljenih podatkov.

Rezultati in razprava

Naš MRF algoritem segmentira vezikle vseh oblik – ne ločuje med sferičnimi vezikli, hruškami, verižicami in drugimi. V večini vzorcev je več kot 90 % veziklov sferičnih. Če nas zanimajo tudi vezikli ostalih oblik, jih mora operater po avtomatski segmentaciji označiti s posebno barvo. Tako z minimalnim delom operaterja dobimo tudi kategorizacijo veziklov po oblikah. Iz primerjave velikostnih porazdelitev veziklov in njihovega števila v posameznih mozaikih lahko ugotovimo, kako je dodani aditiv vplival na številnost in morfologijo veziklov v populaciji skozi čas. V raziskavi smo analizirali eksperimenta z dvema različnima aditivoma, fullereni (nanodelci C_{60}) in pozitivno nabitimi ter nevtralnimi kobalt-feritnimi nanodelci ($CoFe_2O_4$).



Slika 9 (a) Povprečen premer sferičnih veziklov v kontrolni (C) populaciji ob času 0 in po 90 minutah ter v populacijah z negativno nabitimi (CF-CA) in nevtralnimi (CF) kobalt-feritnimi nanodelci po 90 minutah inkubacije. (b) Število nesferičnih veziklov in (c) število verižic v C, CF in CF-CA populacijah ob časovnem obdobju 0 in po 90 minutah inkubacije z ali brez nanodelcev.

Lipidni vezikli in kobalt-feritni nanodelci (CoFe_2O_4)

V poskusu s kobalt-feritnimi nanodelci je bilo iz štirih mozaikov segmentiranih 9781 veziklov vseh oblik. Tukaj so bile opazovane kontrolna populacija (C) in populaciji izpostavljeni negativno nabitim (CF-CA) in nevtralnimi (CF) kobalt-feritnimi nanodelcem. Primerjava velikosti sferičnih veziklov med populacijami je pokazala, da se je povprečen premer veziklov v neizpostavljeni kontrolni populaciji po 90 minutah inkubacije zmanjšal s $6,5 \mu\text{m}$ na $6 \mu\text{m}$ (slika 9a). V populacijah, izpostavljenih nevtralnimi in negativno nabitim kobalt-feritnim nanodelcem, so se premeri veziklov v povprečju povečali na $8,1 \mu\text{m}$ oziroma $8,5 \mu\text{m}$ (slika 9a). Prav tako smo ugotovili povečano pojavljanje nesferičnih veziklov (5-15 % vseh) v populacijah z dodanimi kobalt-feritnimi nanodelci (slika 9b). Najbolj opazno je pojavljanje verižic, ki je desetkrat večje v populacijah, izpostavljenim negativno nabitim CoFe_2O_4 nanodelcem (slika 9c).

Lipidni vezikli in C_{60} nanodelci

V eksperimentu z nanodelci C_{60} je bilo segmentiranih 7670 veziklov v 810 mikrofotografijah. Kot je predstavljeno v tabeli 1, so bile tukaj opazovane tri populacije: kontrolna (z dodano glukozno raztopino), referenčna (z dodanim ZnCl_2) in nano (z dodanim C_{60}). Ugotovili smo, da

je učinek C_{60} takojšen in da tako kot referenčna kemikalija ZnCl_2 pospeši pokanje veziklov. Najbolj opazen je učinek blizu mesta dodajanja aditiva (P1 na sliki 2), kjer je v nano in referenčni populaciji popokalo 80 % veziklov (slika 10).

Na drugi sledi snemanja, nekaj milimetrov oddaljenem od lokacije dodajanja aditiva, je bil učinek C_{60} manjši od tistega pri ZnCl_2 , spremembe pa so bile opazne šele po 100 minutah inkubacije (slika 10).

Ugotovljen vpliv nanodelcev na vezikle

Pridobljeni rezultati kažejo, da imata testirani koncentraciji tako C_{60} kot tudi detergenta ZnCl_2 vpliv na lipidne vezikle. V večini primerov povzročita pokanje veziklov večjih dimenzij. Morfološke spremembe so se pokazale v primeru dodajanja nanodelcev CoFe_2O_4 , kjer smo ugotovili povečano pojavljanje nesferičnih veziklov, najbolj opazno verižic.

Z rezultati eksperimentov smo pokazali uporabnost metodologije (kombinacije eksperimentalnega protokola, korakov računalniškega procesiranja slik in analize pridobljenih podatkov) za ugotavljanje vpliva nanodelcev na populacije lipidnih veziklov. Vzorec tisočih veziklov je dovolj velik, da smo zajeli tudi statistično zadosti velik delež veziklov, na katerega so nanodelci vplivali. Z opazovanjem malih vzorcev (desetine veziklov)

zaznanih sprememb namreč ni mogoče ločiti od normalne morfološke variabilnosti populacij veziklov.

Lepljenje videoposnetkov v mozaike in avtomatska segmentacija veziklov zagotavljata visoko stopnjo zaupanja v rezultate. Prednost metode je tudi, da je bistveno bolj časovno ugodna za raziskovalce. Pred avtomatizacijo je obdelava mikrografij zahtevala zelo obsežno ročno delo, ki smo ga s predstavljenim pristopom avtomatske segmentacije zmanjšali tudi do osemkrat. V večini primerov lahko operater zdaj že v enem dnevu dobi rezultate, za kakršne je bil prej potreben en teden ročnega dela.

Zaključek

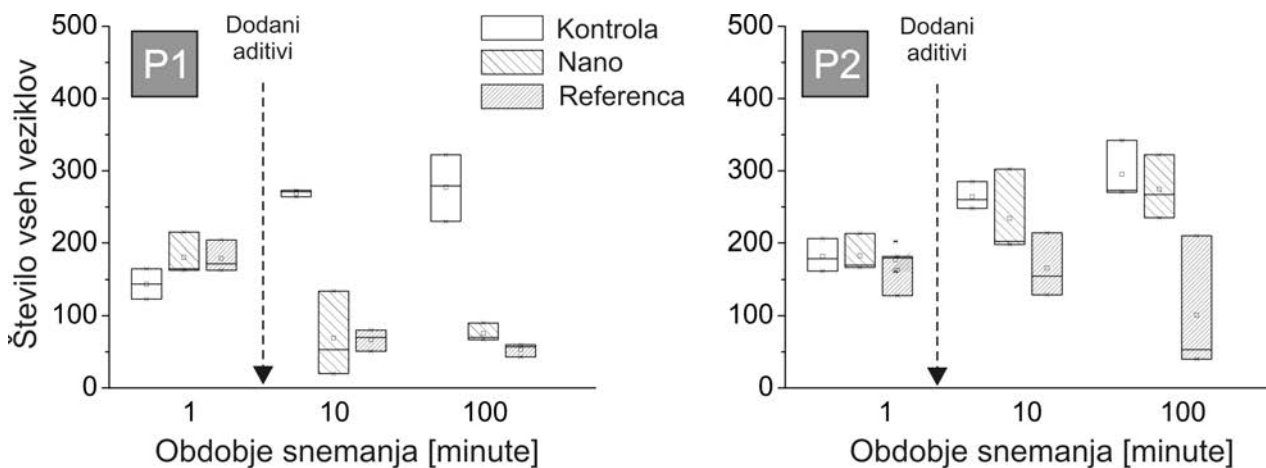
Avtomatiziran pristop pri zajemu in obdelavi slik lipidnih veziklov omogoča analizo tisočih veziklov.

To je zadosti velika populacija, da lahko pridobimo zanesljive statistično podprte rezultate o njihovih morfoloških spremembah kljub raznolikosti populacij veziklov samih. Rezultati analize populacije veziklov so potrdili predpostavko o vplivu nanodelcev na lipidne membrane.

Postavljena metodologija in z njo pridobljeni rezultati so doprinos k razumevanju interakcij med membranami in nanodelci. Kažejo, da imajo slednji potencial, da vplivajo na lipidno komponento biološke membrane. Te ugotovitve so v skladu z domnevami o nano-specifičnem biološkem učinku nanodelcev.²⁹

Zahvala

Raziskovanje je bilo delno podprto s strani ARRS kot status mladega raziskovalca Jerneja Zupanca.



Slika 10 Število vseh veziklov na mestu snemanja (P1) bližje dodajanju aditivov: kontrolna (z dodano glukozno raztopino), referenčna (z dodanim $ZnCl_2$) in nano (z dodanim C_{60}) populacija. Število je podano pred dodajanjem (obdobje 1) in po dodajanju nanodelcev ali referenčne kemikalije (obdobje po 10 in po 100 minutah). Opazno je zmanjšanje števila veziklov v nano in referenčni populaciji takoj po dodajanju aditiva. Desni graf: podobno kot P1, vendar na mestu P2, ki je dlje stran od dodajanja aditiva. Tukaj učinek nanodelcev ni bil tako opazen, referenčna kemikalija pa je zmanjšala število veziklov šele po obdobju 100 minut inkubacije. Na obeh grafih je s puščico nakazan čas, ko sta bila dodana aditiva.

Literatura

1. Dreher KL: Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicol Sci* 2004; 77(1): 3-5.
2. Valant J, Drobne D, Sepcic K, Jemec A, Kogej K, Kostanjsek R: Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay. *J Hazard Mater* 2009; 171(1-3): 160-165.
3. Lipowsky R: The conformation of membranes. *Nature* 1991; 349(6309): 475-481.
4. Dimova R, Aranda S, Bezlyepkina N, Nikolov V, Riske K, Lipowsky R: A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J Phy Condens Matter* 2006; 18(28): S1151-S1176.
5. Pécréaux J, Döbereiner HG, Prost J, Joanny JF, Bassereau P: Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eu Phys J E Soft Matter* 2004; 13(3): 277-290.
6. Peterlin P, Jaklič G, Pisanski T: Determining membrane permeability of giant phospholipid vesicles from a series of videomicroscopy images. *Meas Sci Technol* 2009; 20(5): 055801.
7. Yu Y, Granick S: Pearling of lipid vesicles induced by nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2009; 131(40): 14158-14159.
8. Zupanc J, Valant J, Dobnikar A, Kralj-Iglič V, Iglič A, Drobne D: Interactions of nanoparticles with lipid vesicles: A population based computer aided image analysis approach. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009: 1400-1403.
9. Zupanc J, Bas E, Erdogmus D: Analysis of lipid vesicle populations from microscopy video sequences. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010; 2010: 5050-5053.
10. Zupanc J, Valant J, Drobne D, Kralj-Iglič V, Iglič A: A new approach to analyse effects of nanoparticles on lipid vesicles. *Int J Biomedical Nanoscience and Nanotechnology* 2010; 1(1): 34-51.
11. Zupanc J, Dobnikar A, Drobne D, Valant J, Erdogmus D, Bas E: Biological reactivity of nanoparticles: mosaics from optical microscopy videos of giant lipid vesicles. *J Biomed Opt* 2011; 16(2): 026003.
12. Angelova M, Soleau S, Meleard P, Faucon F, Bothorel P: Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr Colloid Polym Sci* 1992; 89: 127-131.
13. Kralj-Iglič V, Gomišček G, Majhenc J, Arrigler V, Svetina S: Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids Surf A* 2001; 181(1-3): 315-318.
14. Flaberg E, Sabelstrom P, Strandh C, Szekely L: Extended Field Laser Confocal Microscopy (EFLCM): combining automated Gigapixel image capture with in silico virtual microscopy. *BMC Med Imaging* 2008; 8: 1-13.
15. Chow SK, Hakozaiki H, Price DL, MacLean NA, Deerinck TJ, Bouwer JC, Martone ME, Peltier ST, Ellisman MH: Automated microscopy system for mosaic acquisition and processing. *J Microsc* 2006; 222(2): 76-84.
16. Kopf J, Uyttendaele M, Deussen O, Cohen MF: Capturing and viewing gigapixel images. *ACM Trans Graph* 2007; 26(3): 93.
17. Ma B, Zimmermann T, Rohde M, Winkelbach S, He F, Lindenmaier W, Dittmar K: Use of autostitch for automatic stitching of microscope images. *Micron* 2007; 38(5): 492-499.
18. Gareau DS, Li Y, Huang B, Eastman Z, Nehal KS, Rajadhyaksha M: Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 2008; 13(5): 054001.
19. Emmenlauer M, Ronneberger O, Ponti A, Schwarz P, Griffa A, Filippi A, Nitschke R, Driever W, Burkhardt H: XuvTools: free, fast and reliable stitching of large 3D datasets. *J Microsc* 2009; 233(1): 42-60.
20. Vercauteren T, Perchant A, Pennec X, Ayache N: Mosaicing of confocal microscopic in vivo soft tissue video sequences. *Med Image Comput Comput Assist Interv* 2005; 8(1): 753-760.
21. S. D. Backer, F. Cornelissen, and J. Lemeire, "Mosaicing of Fibered Fluorescence Microscopy Video," in Proceedings of the 10th International Conference on Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems. Springer, 2008, pp. 915-923.
22. Duthaler S, Nelson B: Autofocusing Algorithm Selection in Computer Microscopy. *Proc IEEE/RSJ Int Conf on Intelligent Robots and Systems* 2005; 70-76.
23. Perez P, Gangnet M, Blake A: Poisson image editing *ACM Trans Graph* 2003; 22(3): 313-318.
24. Döbereiner HG, Kas J, Noppl D, Sprenger I, Sackmann E: Budding and fission of vesicles. *Biophys J* 1993; 65(4): 1396-1403.
25. Döbereiner HG: *The Budding Transition of Phospholipid Vesicles: A Quantitative Study via Phase Contrast Microscopy* (Ph.D. Thesis). Burnaby 1995: Simon Fraser University.

26. Usenik P, Vrtovec T, Pernuš F, Likar B: Automated Tracking of Vesicles in Phase Contrast Microscopy Images. *ICPR '10 Proceedings* 2010; 2520-2523.
27. Kato Z, Pong T: A Markov random field image segmentation model for color textured images. *Image Vision Comput* 2006; 24(10): 1103-1114.
28. Zupanc J, Drobne D, Ster B. Markov random field model for segmenting large populations of lipid vesicles from micrographs. *J Liposome Res* 2011, Epub ahead of print.
29. Dawson KA, Salvati A, Lynch I: Nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol* 2009; 4(2): 84-85.