

# Stroboskopski sistem za zajem slik fosfolipidnih veziklov za določanje mehanskih lastnosti

Nejc Klanjšček<sup>1</sup>, Samo Penič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorij za fiziko, Fakulteta za Elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška cesta 25, SI-1000 Ljubljana  
E-pošta: samo.penic@fe.uni-lj.si

## Stroboscopic image capture system to determine mechanical properties of phospholipid vesicles

*The biological cell is the basic building block of all life on Earth, so research into cell function involves a multitude of research. The membrane consists mainly of a phospholipid bilayer, which contains additions of other lipids, proteins and other molecules that significantly affect cell function [1]. For research purposes, we often use the simplification of the cell membrane - vesicles, which consist only of a phospholipid double layer and any controlled additives that are the subject of investigations. An important physical property that strongly influences cell function is the elasticity of the membrane that surrounds it.*

*In this paper, we will present the process of making a stroboscopic illumination of a sample containing a quasi-spherical giant unilamellar vesicle, which is part of a system for the analysis of thermal fluctuations with a phase contrast microscope. The improved stroboscopic lighting system enables the capture of sharper shots, because instead of the usual integration time of the camera, the image is captured only during the duration of the light pulse of the stroboscopic lamp. Due to less blurred images due to thermal fluctuations, the bending constant of the membrane can be determined more precisely.*

## 1 Uvod

Biološka celica predstavlja osnovni gradnik vsega življenja na Zemlji, zato se z raziskovanjem delovanja celice ukvarja množica raziskav. Kljub raznolikosti celic, ki jih najdemo v bioloških sistemih, so osnovni gradniki in njihova kemijska sestava večine celic enaki [2, 3, 4]. Celico obdaja membrana, ki ločuje njeno notranjost od zunanosti ter dovoljuje le izmenjavo določenih snovi med celico in medceličnino. Membrana je sestavljena v večji meri iz fosfolipidne dvojne plasti, v kateri so primesi drugih lipidov, proteinov in ostalih molekul, ki pomembno vplivajo na delovanje celice [1].

V raziskovalne namene pogosto uporabljamo poenostavitve celične membrane – vezikle, ki so sestavljeni le iz fosfolipidne dvojne plasti in morebitnih kontroliranih primesi, ki so predmet preiskav. Pomembna fizikalna lastnost, ki močno vpliva delovanje celice je elastičnost membrane, ki jo obdaja.

Fosfolipidno dvojno plast lahko obravnavamo kot dvodimenzionalno tekočino, ker je izjemno mehka, same molekule fosfolipidov pa v membrani difundirajo – se premikajo lateralno po površini dvojne plasti; ter se celo selijo med slojema (t.i. flip-flop efekt) [5]. Molekule okoli celice se gibljejo zaradi Brownovega gibanja, ki je sorazmerno s temperaturo. Ker so membrane tako mehke, so podvržene termičnim fluktuacijam zaradi trkov teh molekul (največkrat se omenjajo kar molekule vode) ob dvo-sloj. Migetanje (utripanje) rdečih krvnih celic je zaznal že Browicz v poznem 19. stoletju z uporabo optičnega mikroskopa. Danes lahko fluktuacije lipidne dvojne plasti opazujemo z izboljšanim faznokontrastnim mikroskopom ter s spektralno analizo teh fluktuacij neinvazivno merimo nekatere ključne lastnosti bioloških celic [6, 7, 8, 9].

Teoretične temelje za spektralno analizo termičnih fluktuacij sta razvila Milner in Safran [6]. Njune izpeljave apliciramo tako na opazovanje tridimenzionalnih oblik veziklov, ki jih pridemo npr. iz računalniških simulacij Monte Carlo [10] ali na obdelavo slik pridobljenih z uporabo kamere priključene na fazno-kontrastni mikroskop. Pri slikah z mikroskopa, opazujemo le ekvatorialni presek vezikla in uporabimo dodatno statistično obdelavo oblik.

Teoretični model Milnerja in Safrana za določanje elastičnih lastnosti bioloških membran z analizo njihovih termičnih fluktuacij [6] temelji na Helfrichovem modelu upogibne energije membrane [11] in vsebuje implicitno predpostavko, da pri termičnih fluktuacijah lipidne dvojne plasti upogibna in natezna deformacija membrane nista sklopljeni in lahko uporabimo približek t.i. povprečnega polja [12]. Rezultat dela Milnerja in Safrana je sistem enačb, ki povezuje vrste koeficientov krogelnih funkcij z upogibno konstanto membrane

$$\langle |u_l^m|^2 \rangle = \frac{kT}{K_c} \frac{1}{(l-1)(l+2)(\bar{\sigma} + l(l+1))}.$$

V enačbi je  $T$  absolutna temperatura,  $k$  Boltzmannova konstanta,  $K_c$  upogibna konstanta membrane,  $\bar{\sigma}$  povprečna lateralna napetost in  $u_l^m$  koeficienti v razvoju oblike membrane po krogelnih funkcijah stopnje  $l$  in reda  $m$ . Stopnja krogelnih funkcij  $l$  v zgornji enačbi mora biti večja od 1 ( $l > 1$ ), red  $m$  pa je znotraj intervala  $[-l, l]$

[6]. Predeterminiran sistem enačb uporabimo za izračun najboljšega prilaganja parametrov  $K_c$  in  $\bar{\sigma}$ .

Iz slik ekvatorialnega preseka vezikla, uporabljamo algoritem, ki izračuna upogibno konstanto  $K_c$ . Najprej sledimo robu vezikla in določimo lokalni radij v ekvatorialni ravnini  $R(\pi/2, \varphi, t)$ , ki je odvisen od kota  $\varphi$  zaradi nepravilne oblike vezikla. V nadaljevanju izračunamo relativen odklik  $r(\pi/2, \varphi, t)$  vezikla od polmera  $R_0$ , ki bi ga imel krog z enako površino kot ekvatorialni presek vezikla ter izračunamo avtokorelacijo relativnega odklika  $\zeta(\gamma, t)$  po kotu  $\gamma$ .

$$\zeta(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} r^*(\pi/2, \varphi + \gamma, t) r(\pi/2, \varphi, t) d\varphi \quad ,$$

Časovno povprečje (povprečje prek večih slik posameznega vezikla) avtokorelacijske funkcije lahko povežemo s koeficienti krogelnih funkcij  $u_l$  preko zveze

$$\zeta(\gamma) = \sum_l \frac{2l+1}{4\pi} \langle |u_l|^2 \rangle P_l(\cos(\gamma)) \quad ,$$

kjer v izrazu nastopajo Legendrovi polinomi  $P_l(\cos(\gamma))$ . Parameter  $l$  je stopnja polinoma, in ima enako vrednost kot stopnja krogelnih funkcij. Upogibno konstanto dobimo enako kot v primeru simulacij z zvezo stopnje krogelnih funkcij in koeficientov krogelnih funkcij

$$\frac{2l+1}{4\pi} \langle |u_l|^2 \rangle = \frac{kT}{K_c} \frac{1}{(l-1)(l+2)(\bar{\sigma} + l(l+1))} \quad .$$

Za dosego natančnejših rezultatov potrebujemo ostre posnetke vezikla. S tem dobimo uporabne rezultate tudi do stopnje  $l = 21$ .

V prispevku bomo predstavili postopek izdelave stroboskopske osvetlitve vzorca, ki vsebuje kvazisferične orjaške fosfolipidne vezikle (angl. *giant unilamellar vesicle* ali *GUV*), ki je del sistem za analizo termičnih fluktuacij s faznokontrastnim mikroskopom. Končni cilj tega razvoja je celostno računalniško krmiljeno eksperimentalno okolje primerno za raziskovalce s področja bioloških znanosti. Predstavljena rešitev je uporabna tudi za mikroskope,

ki ne podpirajo več kanalov osvetlitve. Tak primer je bil mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S, za katerega smo načrtali in izdelali modul, ki je mikroskop razširil za dodaten kanal osvetlitve. Nanj smo poleg obstoječe osvetlitve s halogensko žarnico pritrdili nosilec za dodatno stroboskopsko luč. Uporabljen sistem stroboskopske osvetlitve podjetja Hamamatsu je sestavljen iz 4 modulov: stroboskopske luči L7684 nameščeni v montažno-hladilni enoti, krmilnika stroboskopske luči C6096, zunanje visokonapetostne kondenzatorske baterije E7289. Dodatno smo uporabili običajni stikalni napajalnik za pretvorbo napetosti 230 V na 24 V z največjo tokovno zmogljivostjo 3 A in elektroniko za računalniško krmiljenje in sinhronizacijo stroboskopske luči s kamero na osnovi razvojnega sistema Arduino (slika 1).

Tako izboljšan sistem osvetlitve vzorca s stroboskopsko lučjo omogoča zajem ostrejših posnetkov, saj namesto običajnega integracijskega časa kamere, sliko zajamemo le v času trajanja svetlobnega impulza stroboskopske žarnice. Zaradi manj zabrisanih slik zaradi termičnih fluktuacij lahko natančneje določimo upogibno konstanto membrane. Enostaven uporabniški vmesnik je pripomoček, ki avtomatizirano krmili stroboskopsko osvetlitev, medtem ko se lahko izvajalec meritev osredotoči na "lovljenje" vezikla v vidnem polju mikroskopa.

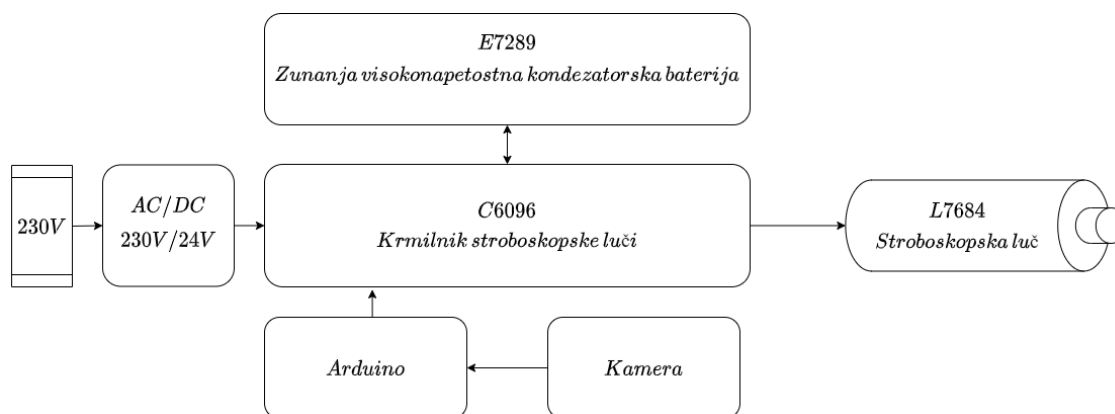
## 2 Metode izdelave

Za izdelavo sestavnih delov modula smo se morali poslužiti različnih načinov obdelave materiala t.i. aditivnih in subtraktivnih metod. Pri aditivnih metodah material dodajamo končnemu modelu (izdelku), v tem ko pri subtraktivnih metodah material odvezujemo. Med aditivne metode spada 3D tisk, medtem ko pod izraz subtraktivne metode uvrščamo rezkanje, struženje, brušenje ...

### 2.1 Metoda 3D Tiska

Pod izraz "3D tisk" uvrščamo različne tehnologije dodajanja materiala. Med najbolj poznanimi metodami se uvrščata metoda "Fused deposition Modelling" ali FDM in "Stereolitografija" ali SLA.

FDM 3D tiskalnik deluje tako, da segreta kovinska glava ekstruderja stali plastiko v filamentu in jo naloži v



Slika 1: Električna blok shema aplikacije

plasteh tankih kolobarjev na model. Mobilna miza se premika v dveh ali treh oseh in s tem omogoča oblikovanje strukture.

Princip delovanja SLA tiskalnika je precej drugačen kot pri FDM tiskalniku. Sestavljen je iz visoko-resolucijskega LCD ekrana z UV osvetlitvijo, ki osvetljuje foto-občutljivo tekočino, katera se strdi ko nanjo padejo UV žarki. Mobilna miza se dviguje ter spušča, pravokotno na LCD zaslon plast za plastjo dokler ne dobimo končnega izdelka.

Prednost SLA tiskalnika je ta, da kvaliteto tiska določa visoka resolucija LCD zaslona, v tem ko kvaliteto tiska pri FDM tiskalniku določajo koračni motorji, ohlapnost vodil in sam korak koračnih motorjev. SLA tiskalniki so počasnejši in izdelki so cenovno dražji kot pri FDM tiskalnikih. Večina plastičnih sestavnih delov je bila izdelana na FDM tiskalniku, izjema je bilo le držalo za ogledlo, kjer je bila potrebna precizna izdelava, zaradi kompleksne izvedbe.

## 2.2 Metoda CNC Rezanja

Glavna prednost aditivnih metod je enostavna izdelava kompleksnejših oz. nemogočih modelov za subtraktivne metode kot so rezkanje oz. struženje. FDM in SLA tiskalniki imajo žal omejen izbor materialov za tiskanje. Pri našem modulu je bilo bistveno togo, močno, nosilno ogrodje in to je bilo težko doseženo z PLA oz. ABS 3D tiskano plastiko, zato smo se odločili za aluminij. Obdelovali smo ga z CNC ali "Computer numerical control" rezkarjem, ki deluje tako da vrteča se glava z vpetim rezkarjem potuje po zastavljeni konturi in z rezkanjem odstranjuje material. Konturo zgenerira CAM ali "Computer aided manufacturing" program in jo zakodira v G-kodo, primerno za CNC rezkar.

## 3 Načrtovanje in izdelovanje

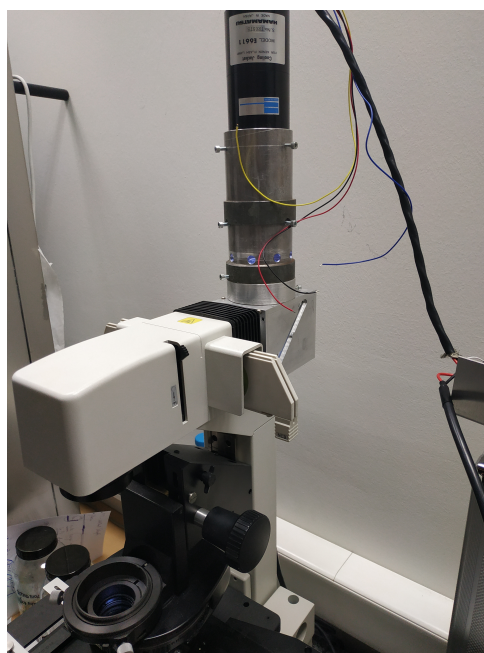
Za načrtovanje in izdelavo 3D modela smo uporabili programsko opremo Solidworks 2021 podjetja Dassault Systemes. Na Sliki 2 je prikazan 3D pogled na sestavljen stroboskopski osvetljevalni modul. Princip delovanja modula je da lahko s pomočjo ogledala, ki je pozicionirano 45° na osnovnico; določamo kakšen vir je vklopjen. Dva vira, ki jih uporabljamo sta halogenska žarnica; za kontinuirano delovanje in stroboskop; za pulzno delovanje. Stroboskopu je bila dodana še zbiralna in koliminarna leča za čim večjo učinkovitost padle svetlobe na naš objekt (celico). Notranjost modula in držalo modula je natisnjeno iz ABS plastike, ki je odpornejša na višje temperature. Pri načrtovanju modula smo upoštevali, da je največja dodatna obremenitev mikroskopskega stojala 5 kg. Končna izvedenka modula skupaj s stroboskopsko lučjo je tehtala okrog 3kg.

Cilinder, ki je pritrjen na čelni plošči je bil del luči ki je predhodno bila vir osvetlitve mikroskopa. Ko je bil celoten fantom načrtovan smo lahko začeli z izdelavo sestavnih delov. Za 3D natisnjene dele smo generirali STL model, za katerega je računalnik avtomatsko generiral G-kodo.



Slika 2: 3D model modula. Modul postavimo na vhod osvetlitve mikroskopa (sprednji del). Z zadnje strani priključimo obstoječo halogensko osvetlitev, z zgornje strani pa ima modul integrirano stroboskopsko osvetlitev. Z izvlečnim zrcalom izbiramo tip osvetlitve, s katerim želimo osvetljevati vzorec.

Za prenos 3D modelov vseh aluminijastih komponent v proizvodnjo smo uporabili program HSM Inventor 2018, podjetja Autodesk. V program smo uvozili 3D model zelenega modela, povedali hitrosti obdelave, hitrost vrtenja rezkarja in debelino rezkarja. Nato smo označili konture po katerih smo želeli da se rezkar premika. Program je nato zgeneriral G-kodo, ki smo jo naložili na CNC rezkar. Pri obdelavi smo morali rezkar konstantno hladiti in podmazovati, da se ta nebi zlomil. Ko smo imeli vse dele izdelane smo jih sestavili v celoto in montirali na stojalo mikroskopa.

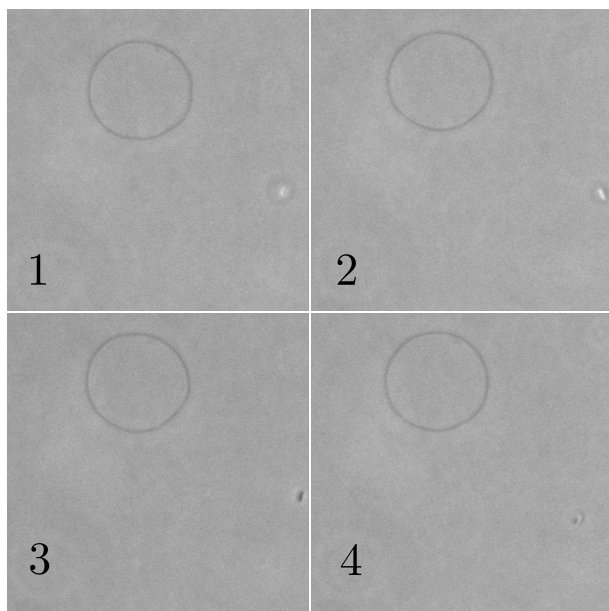


Slika 3: Modul pritrjen na mikroskop

## 4 Razprava in zaključek

Z uporabo metode 3D tiskanja in CNC obdelave smo izdelali modul za zajem ostrejših posnetkov. Uspešno smo zajeli fotografije in generirali video premikov celice vidne na Sliki 4. Sekvenca štirih fotografij prikazuje gibanje orjaškega fosfolipidnega vezikla (oz. njegov ekvatorialni presek) v vidnem polju faznokontrastnega mikroskopa pri 100-kratni povečavi. Fotografije so zajete znotraj intervala 2 s. Na vsaki izmed fotografij je razvidna trenutna oblika vezikla, vključno z odstopanji od idealne krožne oblike ekvatorialnega preseka. Fotografije služijo kot vhodni podatek v algoritmu za zaznavanje konture in izračun Fourierove transformacije oblike ter nadaljno spektralno analizo.

Za občutek časovne dimenzije je na sliki (na vsaki fotografiji, spodaj desno) vidna tudi bakterija, ki se je naključno prikradla v vidno polje mikroskopa. Bakterija se giblje hitreje kot vezikel, vendar je slučajno ob trenutkih zajema slike ostala približno na istem mestu.



Slika 4: Zajete slike s pomočjo stroboskopske osvetlitve.

Soočili smo se z problemi povezanimi z samo mehaniko (ohlajanje stroboskopa, velikost stroboskopa, masa modula). Problemov bi se izognili z nakupom hitre kamere, kateri glavni problem je visoka cena. Cenejša, a težje izvedljiva rešitev je načrtovanje LED luči z hitrimi preklopi. Ta bi zagotavljala prilagajanje intenzivnosti osvetlitve in čas preklopov glede na dane potrebe. Za upravljanje LED luči bi bilo potrebno napisati programsko opremo, v katero bi prek računalnika vnesli čas in moč osvetlitve. Poleg tega bi software potreboval še druge funkcionalnosti, kot so avtomatsko zaznavanje konture membrane in izračun spektralne analize termičnih fluktuacij in tako bi to postalo uporabno orodje za področje raziskovanja delovanja same celice.

## Literatura

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. r. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4 ed., 2002.
- [2] D. Boal, *Mechanics of the Cell*. Cambridge Univ Pr, 2002.
- [3] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot, N. Orme, and H. . Garcia, *Physical biology of the cell*. Garland Science New York, 2009.
- [4] L. Vodovnik, D. Miklavčič, and T. Kotnik, *Biološki sistemi*. Ljubljana: Založba FE in FRI, 1998.
- [5] G. M. Cooper, *The Cell - A Molecular Approach 2nd Edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2 ed., 2000.
- [6] S. T. Milner and S. A. Safran, "Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles," *Physical Review A*, vol. 36, pp. 4371–4379, Nov 1987.
- [7] P. Meleard, C. Gerbeaud, T. Pott, L. Fernandez-Puente, I. Bivas, M. Mitov, J. Dufourcq, and P. Bothorel, "Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content," *Biophysical journal*, vol. 72, no. 6, pp. 2616–2629, 1997.
- [8] J. Pécéréaux, H.-G. Döbereiner, J. Prost, J.-F. Joanny, and P. Bassereau, "Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles," *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, vol. 13, no. 3, pp. 277–290, 2004.
- [9] P. Usenik, T. Vrtovec, F. Pernuš, and B. Likar, "Automated tracking and analysis of phospholipid vesicle contours in phase contrast microscopy images," *Medical and Biological Engineering and Computing*, pp. 1–10, 2011.
- [10] S. Penič, A. Igljč, I. Bivas, and M. Fošnarč, "Bending elasticity of vesicle membranes studied by Monte Carlo simulations of vesicle thermal shape fluctuations," *Soft Matter*, Apr. 2015.
- [11] W. Helfrich *et al.*, "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments," *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 28, no. 11, pp. 693–703, 1973.
- [12] I. Bivas, "Shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles and emulsion droplets," *Physical Review E*, vol. 81, June 2010.