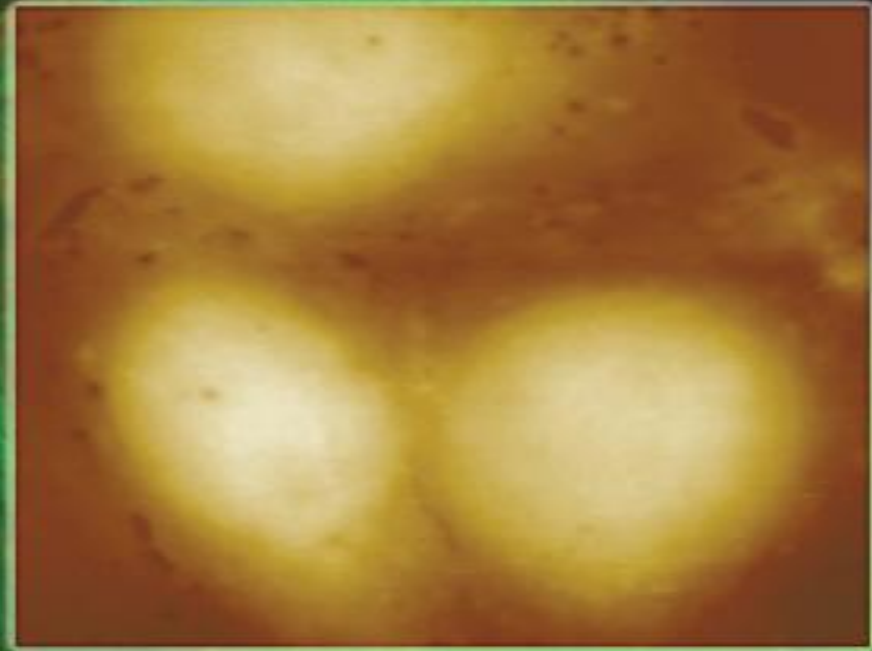


Studium vybraných buněčných linií pomocí mikroskopie atomárních sil s možným využitím v praxi



Petr Kolář, Kateřina Tománková, Jakub Malohlava, Hana Kolářová,

ÚLB Olomouc
2013

AFM - mikroskopie atomárních sil

atomic force microscopy

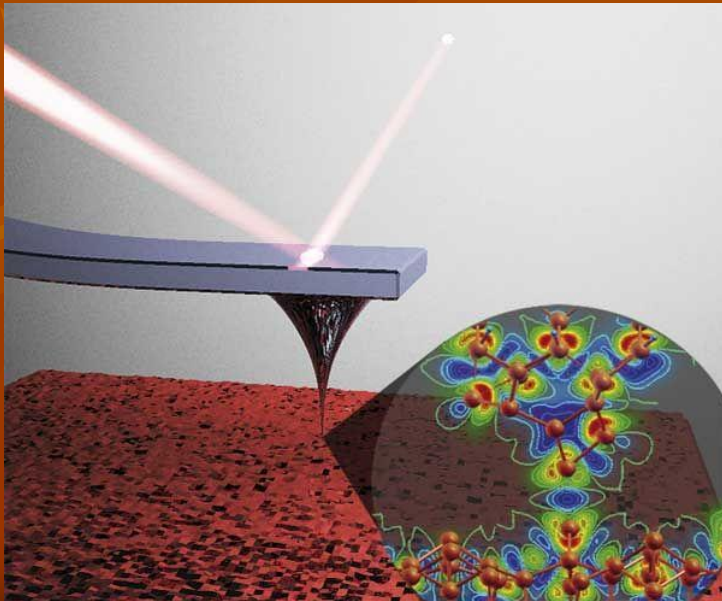
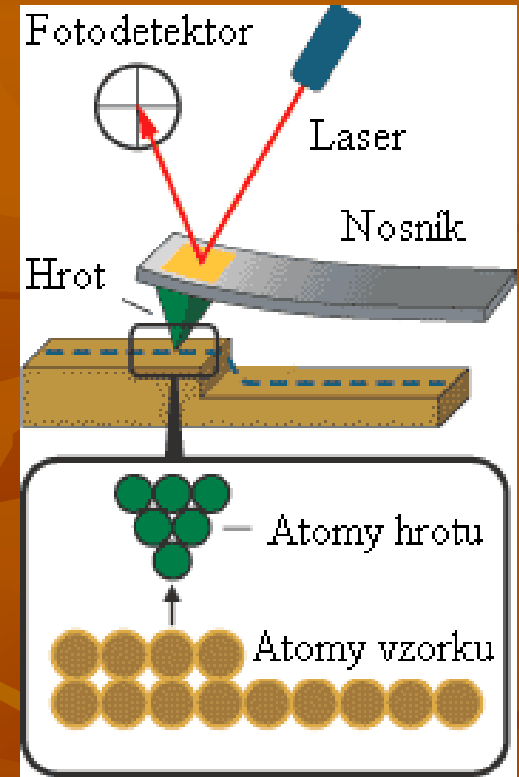
- mikroskopie atomárních sil (AFM) se zdá být vhodným nástrojem nejen pro zobrazení biologických struktur, ale i k jejich manipulaci s nimi v nativním stavu a v přirozeném prostředí
- AFM skenování buňky je účinným nástrojem pro studium membránových a sub-membránových buněčných struktur
- AFM lze efektivně využít při vyšetřování fyzikálních vlastností a dynamiky cytoskeletu, například po poškození fotodynamickou reakcí

Princip AFM

Sonda – skenuje povrch vzorku

Signál - vzniká interakcí povrchu vzorku a sondy

Hrot je upevněný na konci pružného nosníku a těsným přiblížením hrotu k povrchu jsou mapovány povrchové síly, přičemž přitažlivé nebo odpudivé síly ohýbají raménko.



Na konec raménka je fokusován **laserový paprsek**, který se odráží na fotodiodový detektor

Posun hrotu po vzorku zajišťuje skenovací systém, kde jádrem je piezoelektrická keramika

AFM - úvod

- Pomocí AFM je možné vyvolat lokální deformaci povrchu buňky jejím kontaktem s ostrou špičkou, která je umístěná na volném konci nosníku. Použité síly jsou poté odhadnuty snímáním výchylky nosníku pomocí laserového paprsku dopadajícího z konce odrazivé plochy raménka do fotodiody
- Je známo, že Youngův modul nádorové a normální buňky se liší a to díky rozdílné organizaci cytoskeletu
- Metastatická – nádorová buňka je měkčí než zdravá buňka

AFM - materiál a metoda

- HeLa buněčná linie (karcinom děložního hrdla virového původu)
- Skenující prostředí: DMEM (10% fetálního bovinního séra)
- Sensitizer ClAlPcS_2 , LED diody 660 nm pro navození fotodynamického jevu
- Thermanox plastové krycí sklo pokryté poly-L-lysinem pro zvýšení adheze buněk, fixace glutaraldehydem pro zobrazení buněk
- Měření bylo prováděno na AFM Ntegra Aura (NT-MDT), Bioscope Catalyst (Bruker) s inverzním optickým mikroskopem Olympus

AFM - materiál a metoda

PDT – Fotodynamická terapie

- Sensitizer ClAlPcS₂ byl přidán do DMEM media v koncentraci 0 (kontrola) a 5 μM .
- Inkubace byla 24h při 37°C a 5% CO₂.
- Po inkubaci byly buňky opláchnuty PBS a ozářeny 15 J.cm⁻² pomocí LED diod.
- Po ozáření byly buňky inkubovány dalších 6h v čerstvém DMEM médiu.

AFM - materiál a metoda

Příprava buňečných kultur

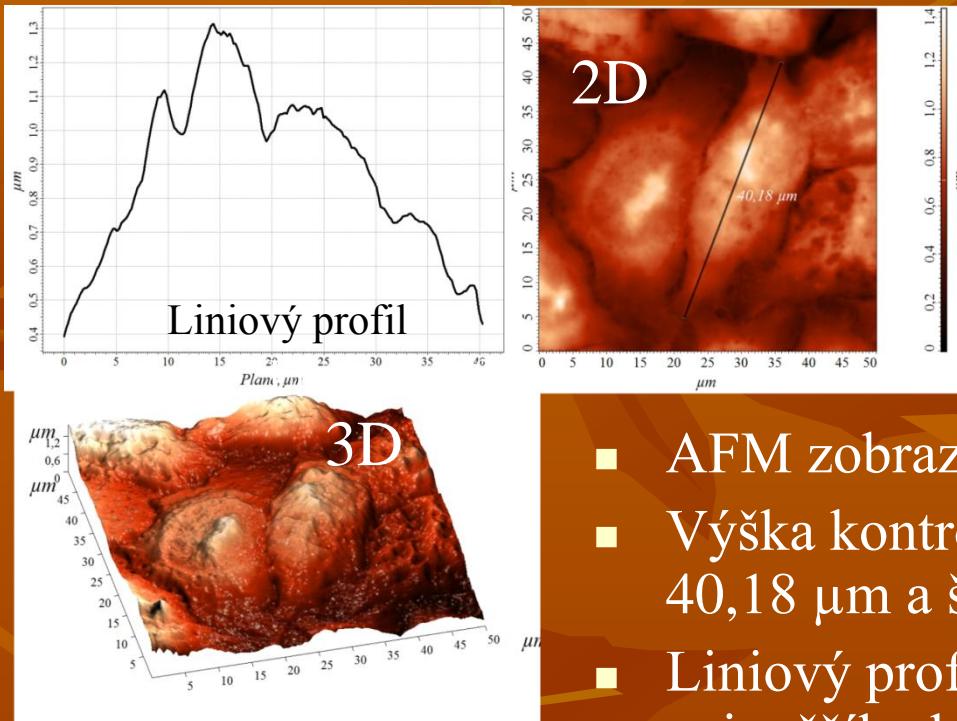
- 100 000 HeLa buněk bylo kultivováno ve 2 ml DMEM media v atmosféře 5% CO₂ po dobu 24h při 37°C na plastových discích Thermanox[®] modifikovaných poly-L-lysinem (0,01% PLL)
- Buňky byly skenovány v čerstvém DMEM médiu maximálně po dobu 2h, aby se zabránilo teplotním poškozením

AFM - materiál a metoda

Mikroskopie atomárních sil

- Skenovací rychlost 0,1 až 0,6 Hz
- Pro zobrazení buněk byl použit hrot NSG10 (NT-MDT) s rezonanční frekvencí 190 - 325 kHz a konstantou tuhosti 0,01 - 0,5 N.m⁻¹
- Pro mechanické mapování elasticity buněk byl použit hrot CSG10 (NT-MDT) s rezonanční frekvencí 8 - 39 kHz a konstantou tuhosti 0,01 – 0,5 N.m⁻¹
- Zobrazení buněk probíhalo v módu semi-kontaktního měření
- Snímky byly zpracovány pomocí SW programu Nova (NT-MDT) a Nanoscope analysis (Bruker)
- *F-d* křivky byly analyzovány programem SPIP (Image metrologie)
- Buňky byly nejprve naskenovány v topografickém módu a poté byl hrot umístěn nad jadernou oblast buňky a oblast cytoplazmy
- Bylo provedeno přibližně 30 měření silových křivek v každé skupině a data následně podrobena statistické analýze

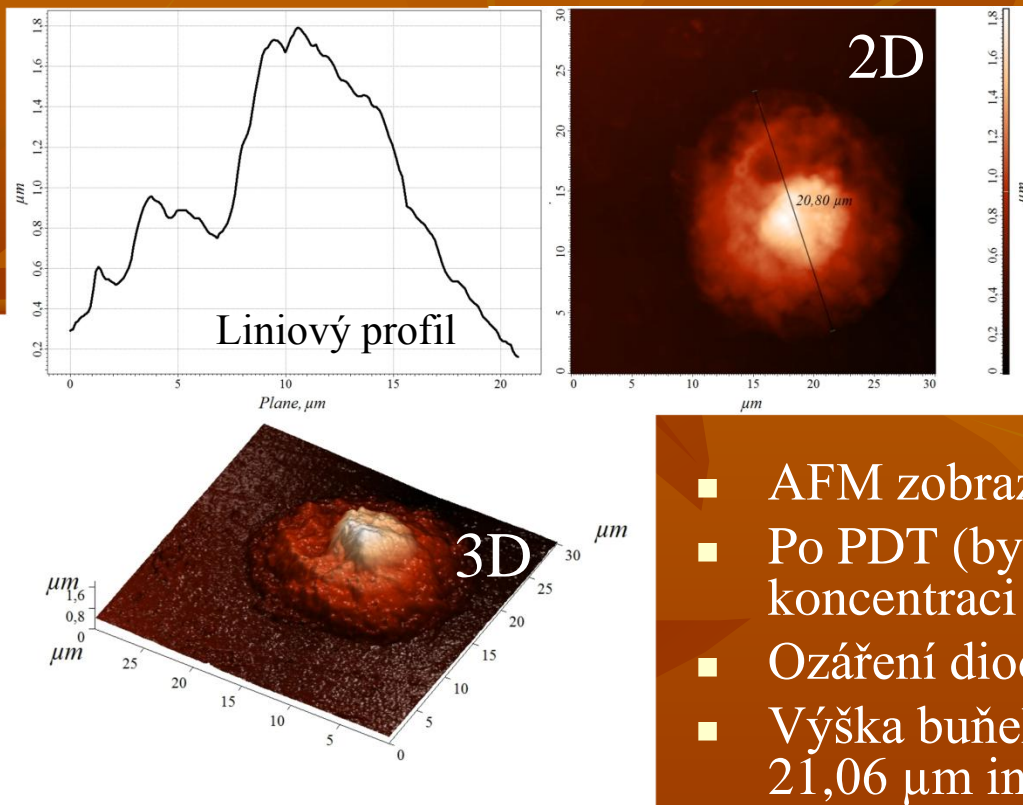
AFM - výsledky



AFM před PDT
Buňky tvoří monovrstvu

- AFM zobrazení HeLa buňčné linie
- Výška kontrolních buňek byla 1,33 μm , délka 40,18 μm a šířka 18,06 μm
- Liniový profil ukazuje oblast buňčného jádra, nejvyššího bodu buňky a oblast mimo jádro
- Youngův modul nepoškozené buňky byl (medián, kvartil²⁵ a kvartil⁷⁵):
- 35,283 (28,061, 50,416) kPa na jádře
- a 107,442 (97,185, 125,270) kPa mimo jádro

AFM - výsledky

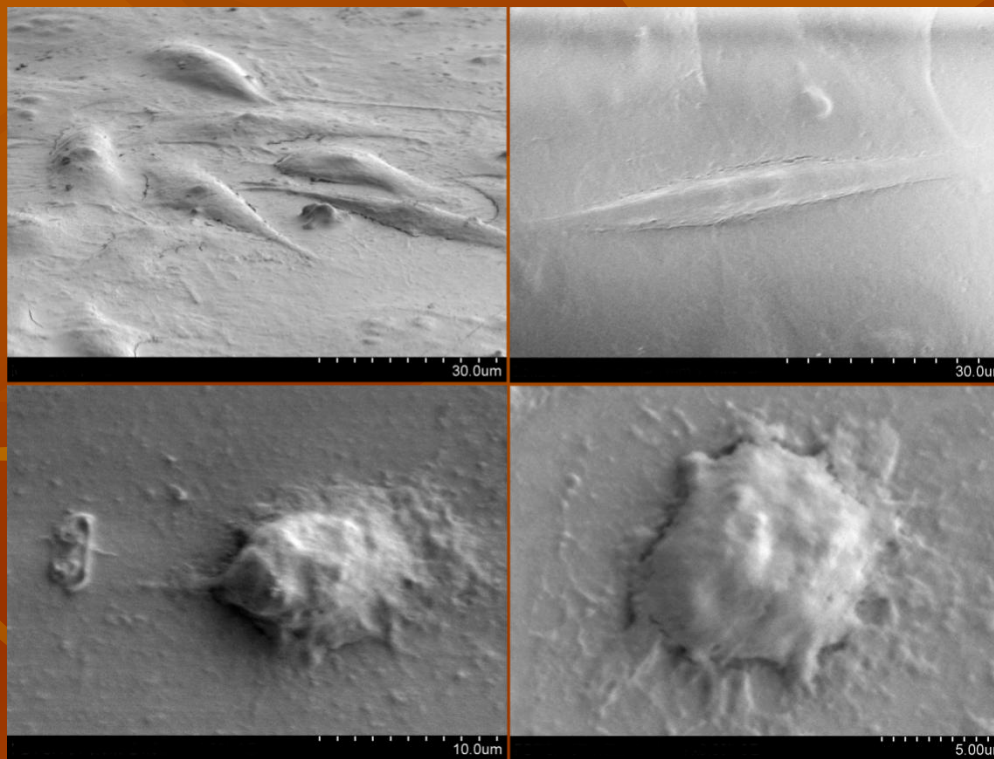


AFM po PDT
Buňky jsou rozprostřeny
individuálně po povrchu
substrátu

- AFM zobrazení HeLa buňčné linie
- Po PDT (byl přidán fotosensitizer ClAlPcS₂ v koncentraci 5 μM)
- Ozáření diodami dávkou 15 J.cm⁻².
- Výška buňek po PDT byla 1,78 μm , délka 21,06 μm in length a šířka 20,8
- Youngův modul fotodynamicky poškozené buňky byl (medián, kvartil²⁵ a kvartil⁷⁵):
- 61.144 (50.814, 88.866) kPa na jádře
- a 193.605 (174.196, 217.614) kPa mimo jádro.

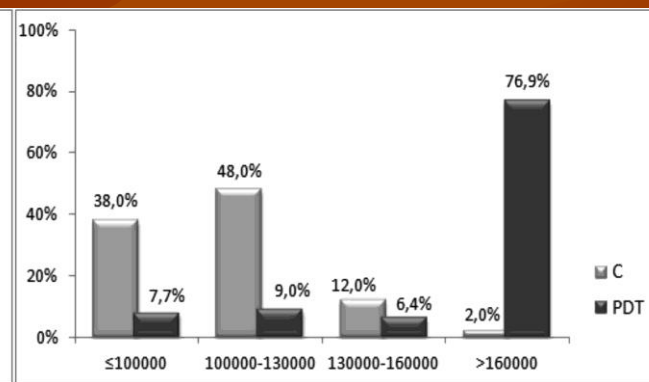
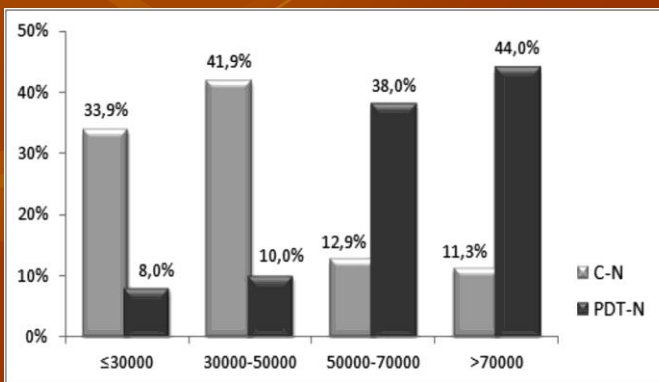
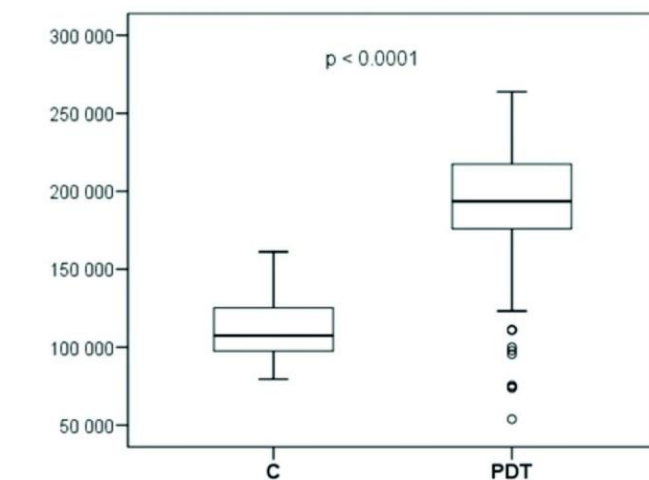
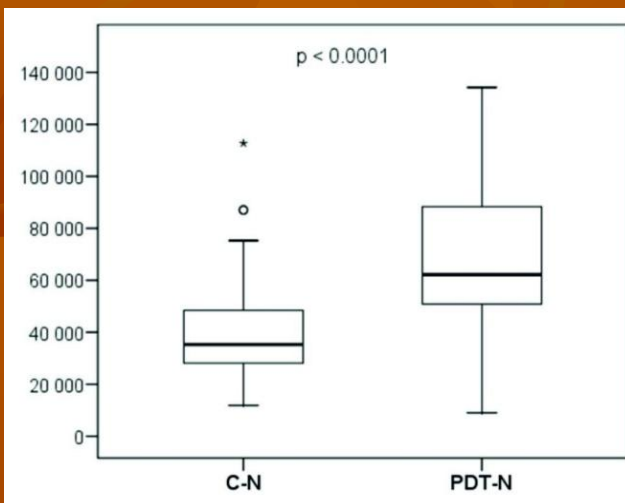
AFM - výsledky

- Obraz a morfologie z AFM koresponduje s morfologií z obrazu SEM
- Buňky po terapii mění svou velikost, 3D topografii i elastické vlastnosti



AFM - výsledky

Distribuce naměřených hodnot pomocí kvartilů. Spodní oblast čtverce je první kvartil, linie uprostřed je medián a horní oblast grafu koresponduje s třetím kvartilem.



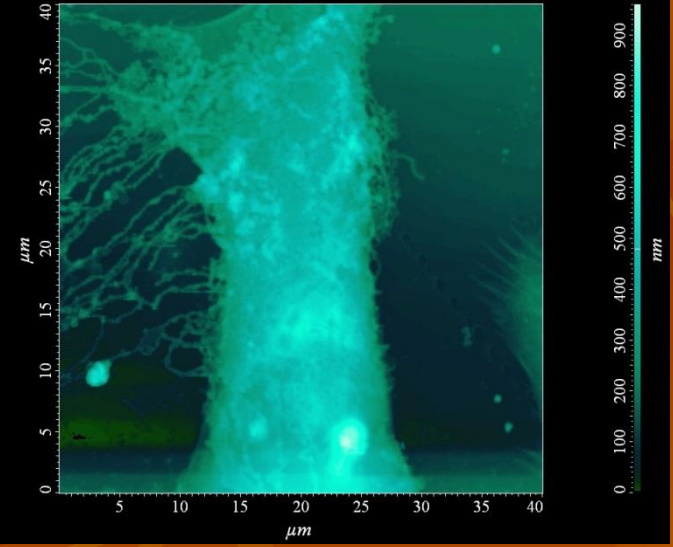
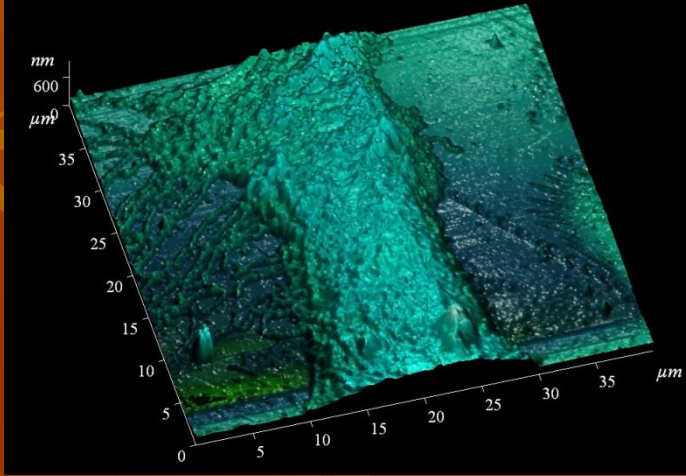
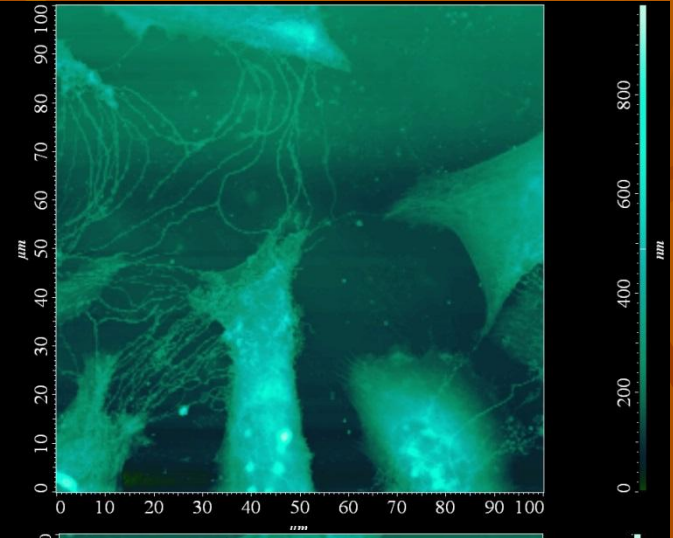
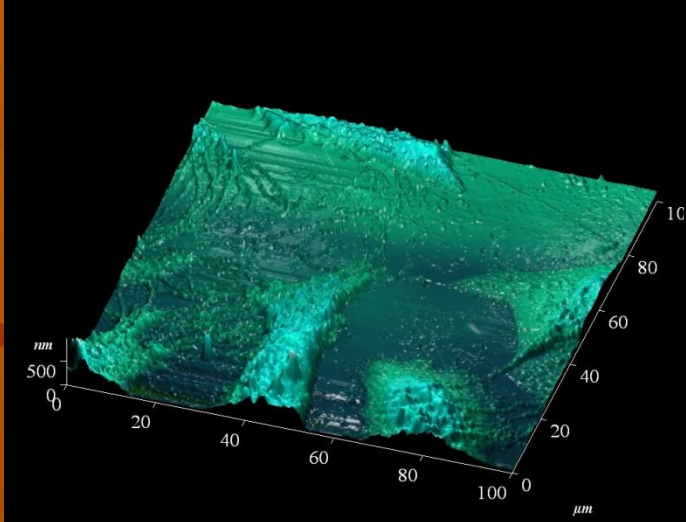
Histogram četností Youngova modulu na jádře (N) a mimo oblast jádra

AFM - ZÁVĚR

- Elastický modulus neporušených (kontrolních) a fotodynamicky narušených buněk ($5 \mu\text{M ClAlPcS}_2$, 15 J.cm^{-2})
- Distribuce naměřených hodnot je určena velkým rozptylem dat a určuje nám, že každá buňka má svou specifickou tuhost i přesto, že se jedná o stejnou buněčnou kulturu.
- Buňky kontrolní skupiny vykazují signifikantně nižší tuhost v jaderné oblasti, než buňky po PDT
- Čím vyšší je Youngův modul, tím je buňka méně elastická a tvrdší.
- Po fotodynamickém narušení buněčné struktury je jaderná oblast i oblast cytoplazmy buňky signifikantně tužší.
- Můžeme tedy pomocí AFM morfologicky klasifikovat vliv fotodynamické terapie na nádorovou buňku
- dále detekovat vliv různých faktorů (fyzikálních, chemických, biologických) na mechanické vlastnosti živých buněk a odhad mechanických vlastností buněk.

AFM - V PRAXI

- Vytvoření katalogu elastických vlastností nádorových a nenádorových buněčných linií a poté využít AFM v diagnostice
- Nadále v praxi využití tvrdosti a tuhosti v kombinaci s adherencí k nanovláknové matrix může v budoucnu nahradit některé chirurgické výkony.
- Náhrady tkání, chrupavek, kostních defektů – ortopedie.



Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Institutu
molekulární a translační medicíny
CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a Ústavu lékařské
biofyziky LF_2013_006

Děkuji za pozornost