

# STUDIUM MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ S VYUŽITÍM MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

J. Malohlava, K. Tománková, P. Kolář, H. Kolářová

Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

## Abstrakt

*Mikroskopie atomárních sil (AFM) se řadí mezi moderní zobrazovací techniky, které poskytují obraz v subnanometrickém rozlišení. Na rozdíl od ostatních technik ji lze použít i v kapalinách, které imitují přirozené prostředí, což je obzvláště výhodné při studiu biologických vzorků. Od roku 1986 se vyvinula v univerzální nástroj, který kromě výškového zobrazení poskytuje mapy elastických a viskoelastických vlastností. Naše práce má za úkol představit nové techniky zabývající se studiem mechanických vlastností buněk – Peak Force Tapping a Stiffness tomography. Oba přístupy reprezentují jedinečný způsob práce se silovými křivkami, které jsou základem pro určení mechanických vlastností.*

## Klíčová slova

*mikroskopie atomárních sil, mechanické vlastnosti, Peak Force Tapping, Stiffness tomography*

## Úvod

Obecně přijímané tvrzení je, že struktura buňky určuje její funkci. Nicméně struktura není jediný definující faktor, patří mezi ně i chemické složení a mechanické vlastnosti. Buňka během svého života interaguje s vnějším prostředím např. změnou složení buněčných membrán [1] či reorganizací cytoskeletálního systému [2], které se projevují změnou mechanických vlastností [3-5]. Ke správnému určení mechanických vlastností je však potřeba použít vhodný nástroj. Jedním z nejúčinnějších je mikroskop atomárních sil (AFM) [6, 7]. AFM umožňuje více než jen topografické zobrazení zkoumaného vzorku, ale také detekci mechanických vlastností za fyziologických podmínek. AFM může být použito k dynamickému sledování změn tvaru buňky a změny mechanických vlastností například v průběhu farmakologické terapie [8, 9]. K měření mechanických vlastností je možné použít i jiné techniky, jako jsou mikropipety či optické tweezy [10-12].

Princip AFM není komplikovaný. AFM využívá silové interakce mezi ostrým hrotem umístěným na pružném nosníku a povrchem vzorku. Tyto interakce jsou během skenu zaznamenávány a na jejich základě je rekonstruován výsledný obraz. Pro zobrazení buněčných částí i celých buněk se nejčastěji používají dva zobrazovací módy [13]. V prvním, kontaktním módu, je hrot v přímém kontaktu s povrchem vzorku. Jejich vzájemná interakce způsobuje ohnutí nosníku,

které je následně detekováno optickým systémem. Tento signál je využit ve zpětnovazební smyčce, která usměrňuje napětí na piezoelektrických prvcích a reguluje tak vzájemné silové působení. V druhém, poklepovém (tapping) módu kmitá hrot blízko své rezonanční frekvence. Během skenu dochází k útlumu jednotlivých oscilací, jež jsou závislé na silové interakci mezi vzorkem a hrotem. Pomocí zpětnovazební smyčky je obnovována jejich amplituda. Výhodou tapping módu je redukce laterálních sil, neboť dochází pouze k letmému dotyku s povrchem [13, 14].

V makroskopickém měřítku jsou mechanické vlastnosti podstatné pro funkci jednotlivých tkání, jako jsou kosti, šlachy nebo zuby. Lze tedy předpokládat, že mají vliv i na mikroskopické úrovni. Určením vlastností jednotlivých biomolekul lze zjistit vliv na samotný celek. Je také známo, že aktuální fyziologický stav systému se projevuje v jednotlivých buněčných charakteristikách. Mělo by tedy být možné korelovat změnu mechanickou se změnou strukturální [15].

Nanoindentace patří mezi běžné metody používané ke zjištění mechanických vlastností. Během tohoto procesu je vtlačena tuhá a ostrá hrot do vzorku, přičemž je zaznamenávána použitá síla a hloubka vrypu [16]. Na měření má vliv geometrie hrotu, hloubka penetrace a rychlost průtlaků. Záznam těchto vrypů, tzv. forcedisplacement curves ( $F-d$  křivky), je vyhodnocován pomocí mnoha různých teoretických a empirických modelů. Velmi rozšířená je Hertzova teorie [17], která

předpokládá kontakt dvou sférických těles. Pro její platnost je třeba zohlednit několik aspektů: nedochází zde ke tření, oblast kontaktu je malá vzhledem k celkovým rozměrům těles a stlačitelnost je minimální. Jeden z nejdůležitějších předpokladů je absence adhezivních či povrchových sil [18]. Působící síla je definována jako:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{3/2}, \quad (1)$$

kde  $\delta$  je hloubka vrypu,  $\nu$  Poissonův poměr,  $R$  poloměr zakřivení hrotu a  $E$  je modul pružnosti. Kromě Hertzova modelu se často využívá i jeho modifikace pro kónický tvar hrotu, také znám jako Sneddonův model [19]

$$F = \frac{2}{\pi} \tan \alpha \frac{E}{1-\nu^2} \delta^2, \quad (1)$$

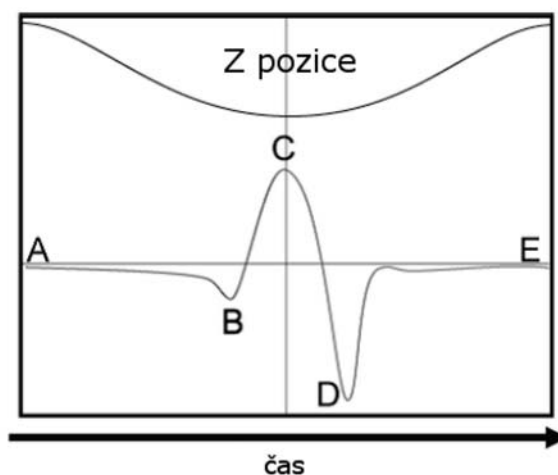
kde  $\alpha$  je vrcholový úhel hrotu. Mezi modely, jež započítávají adhezi, patří Johnson-Kindal-Roberts (JKR) [20], Dejaguin-Müller-Toporov (DMT) [21] či Oliver-Pharr [22]. Při určení elasticity je potřeba věnovat pozornost typu kontaktu, správnému určení konstanty pružnosti hrotu a přesnému určení geometrie hrotu.

## Peak Force Tapping

Peak Force Tapping je nový operační mód vyvinutý firmou Bruker. Stejně jako jeho předchůdce HarmoniX dokáže pracovat s širokou nabídkou standartních hrotů. Peak Force Tapping zobrazuje vzorek relativně rychle, podobně jako u poklepového módu, přičemž si zachovává vysokou rozlišovací schopnost. Primárně hrot osciluje v z-piezu s frekvencí 2 kHz, je však možné navolit i nižší frekvenci – 1, 0,5 a 0,25 kHz, a s amplitudou až 2 000 nm. Typický průběh jednoho cyklu znázorňuje obrázek 1. V bodě A, kdy hrot je dostatečně vzdálen od povrchu, působí jen nepatrné síly. Při přibližování hrotu k povrchu začnou na hrot působit přitažlivé síly (van der Waalsovy, elektrické a kapilární). V bodě B se hrot dotýká povrchu vzorku, přičemž hrot je stále na sestupné dráze a síla působící na vzorek se zvyšuje až do bodu C. Bod C je tzv. Peak Force. Hrot se začíná odtahovat a působící síla klesá, než dosáhne svého minima v bodě D. Z tohoto bodu je určena adheze vzorku. Hrot přestává být v kontaktu s povrchem vzorku a dále na něj působí pouze dalekosáhlé síly. Konstantní hodnota síly v bodě C je udržována zpětnovazebnou smyčkou. Závislost působící síly a Z-ové pozice lze porovnat s běžnou  $F-d$  křivkou, která se používá pro měření mechanických vlastností. Peak Force Tapping je mnohem rychlejší než běžná nanoindentace, kde jeden cyklus probíhá s frekvencí 0,5–10 Hz [23]. Obrázek zobrazuje způsob získávání jednotlivých charakteristik jako je modul pružnosti, adheze, disipační energie a maximální deformace. Takto získané informace se zobrazují pomocí barevných

map jednotlivých vlastností v určitém datovém kanálu [24, 25].

Peak Force Tapping byl použit ke studiu různých biologických vzorků – amyloidních vláken [23, 26], rozsvivky [27], živých a fixovaných buněk osteosarkomu (U2-OS) [28], bakterií *S. aureus* [29]. Dle Sweerse a kol. jsou nanoindentace, HarmoniX a Peak Force Tapping zaměnitelné operační módy, neboť poskytují velmi blízké hodnoty elasticity [23]. Výhodou Peak Force Tappingu je možnost jejího užití pro různé vzorky, souběžné získání mechanických vlastností a topografie bez nutnosti dodatečného zpracování získaných dat, a nízké silové působení jen několik pN [26].



Obr. 1: Průběh jednoho cyklu při Peak Force Tapping. V horní části pohyb vůči ose Z, ve spodní části silové působení v závislosti na čase. Upraveno z [24].

## Modul pružnosti

Modul pružnosti (Youngův modul) v Peak Force Tapping (obr. 3A) je získán fitováním oddalující se křivky na model Derjaguin-Müller-Toporov (DMT model) [21]:

$$F - F_{adh} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R(d - d_0)^3}, \quad (1)$$

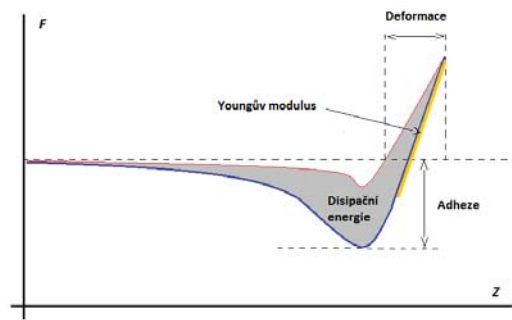
kde  $F - F_{adh}$  je interakční síla v závislosti na adhezi,  $R$  je poloměr hrotu,  $d - d_0$  je deformace vzorku a  $E^*$  je redukovaný Youngův modul. Pokud je znám Poissonův poměr, software přímo vypočítá Youngův modul dle

$$E^* = \left[ \frac{1-\nu_s^2}{E_s} + \frac{1-\nu_{tip}^2}{E_{tip}} \right]^{-1}, \quad (1)$$

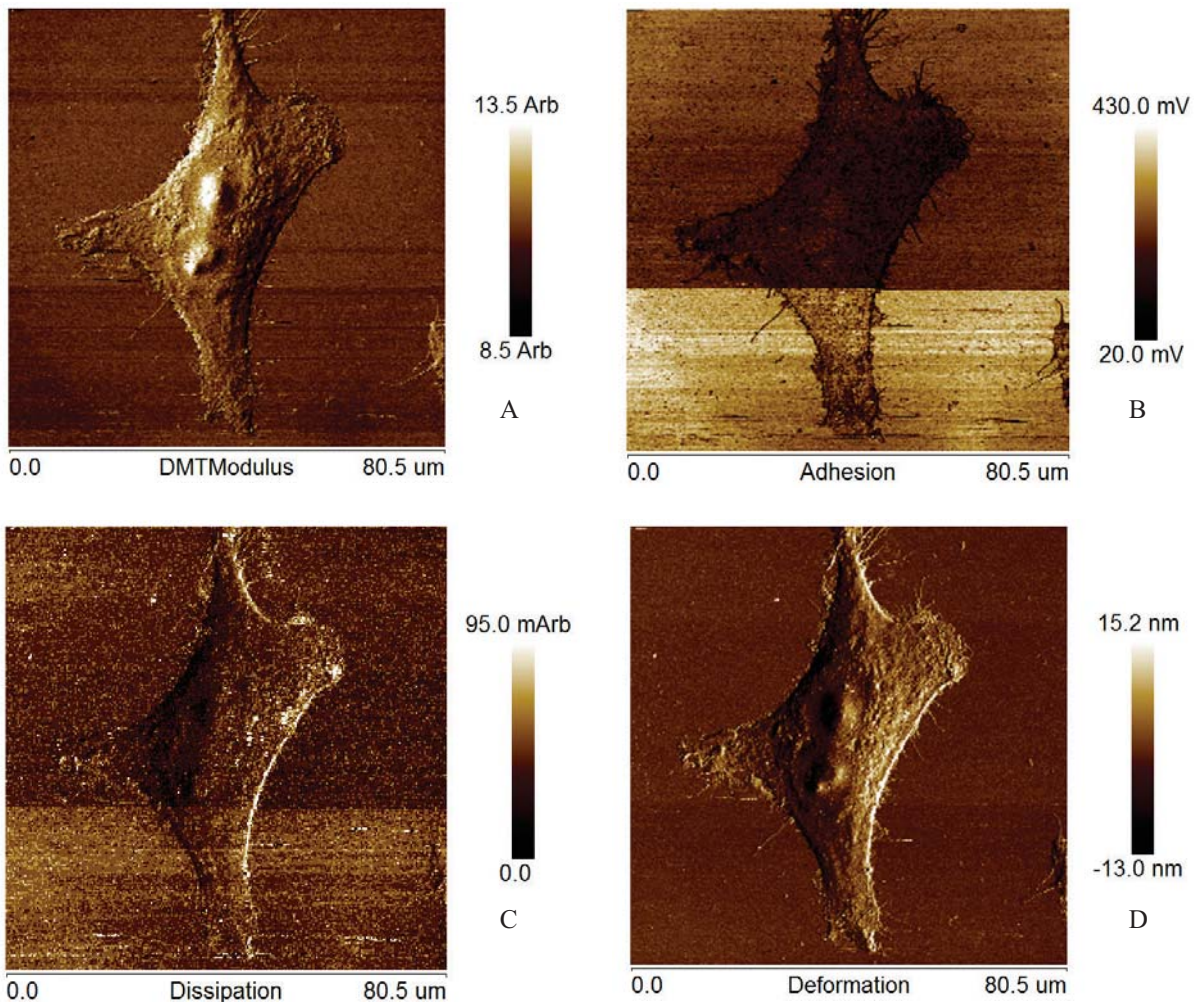
kde  $\nu_s$  je Poissonův poměr vzorku,  $\nu_{tip}$  je Poissonův poměr hrotu,  $E_s$  je Youngův modul vzorku a  $E_{tip}$  je Youngův modul hrotu. Pro buňky je Poissonův poměr volen 0,5 (dokonale nestlačitelné).

## Adheze

Adhezní síly (obr. 3B) patří vedle modulu pružnosti k často stanovaným charakteristikám. Jak již bylo zmíněno, adheze je určena minimem na obrázku 2. Podstata adheze spočívá v jakékoli přitažlivé síle mezi hrotem a vzorkem. Pokud je hrot modifikován, podstata adhezních sil se mění a odráží chemické složení vzorku.



Obr. 2: Závislost působící síly na pozici na ose Z – F-d křivka (červená křivka – přibližování, modrá – oddalování), a určení jednotlivých vlastností z F-d křivky během jednoho cyklu Peak Force Tapping. Upraveno z [24].



Obr. 3: Mapy mechanických vlastností buněčné linie HeLa fixované 2% glutaraldehydem po dobu 20 min v samostatných kanálech v průběhu měření pomocí Peak Force Tapping A) Youngův modul s využitím DMT modelu, B) adheze, C) disipační energie, D) deformace. Zobrazeno na vzduchu, velikost 80,5×80,5  $\mu\text{m}$ , rozlišení 256 px, rychlost skenu 0,1 Hz s využitím AFM Bioscope Catalyst a hrotu ScanAsyst Air (Bruker).

## Disipační energie

Disipační energie (obr. 3C) je dána součinem síly a rychlosti integrovaná po dobu jednoho cyklu Peak Force

$$W = \int \vec{F} \cdot d\vec{Z} = \int_0^T \vec{F} \cdot \vec{v} dt, \quad (1)$$

kde  $W$  je disipační energie jednoho cyklu,  $F$  je silová interakce a  $dZ$  je posunutí ve směru osy  $z$ . Z důvodu opačného směru vektorů pohybu ve směru osy  $z$  a rychlosti může být integrace nulová, pokud křivky přiblížení a oddálení se překrývají, proto je disipační energie rovna hysterezi mezi křivkami.

## Deformace

Deformace (obr. 3D) je definovaná jako hloubka vrypu hrotu do povrchu vzorku v momentě největšího silového působení (peak force). Hodnota deformace obsahuje plastický i elastický příspěvek. Se znalostí jednotlivých parametrů hrotu a kontaktní oblasti lze tuto hodnotu deformace přepočítat na tuhost.

## Stiffness tomography

Kromě nového způsobu získání  $F-d$  křivek je možné pro získání mechanických vlastností inovovat způsob jejich zpracování. Roduit a kol. [30, 31] přišli právě s takovou analýzou – stiffness tomography.

$F-d$  křivka, záznam změny  $z$ -ové souřadnice hrotu v závislosti na působící síle, umožňuje určit Youngův modul pružnosti, pokud je znám tvar hrotu a Poissonův poměr měřeného vzorku. Systematickým rozdělením  $F-d$  křivky a aplikováním vhodného matematického modelu na každý segment lze získat mechanické vlastnosti napříč hloubkou vrypu. Během indentace lze pozorovat změnu tuhosti, a pokud tento proces aplikujeme na celý force volume sken, sken při kterém je v každém bodě zaznamenávána  $F-d$  křivka, lze kromě topografie vzorku získat informaci o pružnosti pod povrchem.

Pro provedení analýzy stiffness tomography je nejdříve potřeba získat  $F-d$  křivku, kdy hrot AFM je vtlačován do vzorku a je zaznamenávána změna ohybu nosníku. Poté je získaná křivka odečtena od křivky naměřené na tvrdém, nedeformovatelném povrchu jako je např. safírová destička. Následně je křivka rozdělena na jednotlivé segmenty, přičemž uživatel může volit velikost segmentů. Posledním krokem je fitování vhodně zvoleného teoretického modelu na jednotlivé segmenty křivky.

Hlavním rozdílem mezi standardní analýzou  $F-d$  křivek a stiffness tomography je aplikace teoretického modelu. U standardní analýzy je model fitován na

celou křivku, u stiffness tomography je křivka nejdříve rozdělena a pak na každou část aplikován vybraný model. Takto získaná data představují 3D mapu pružnosti zkoumaného objektu. Mohou být zvýrazněny struktury, které by zanikly použitím standardní analýzy.

Roduit a kol. použili stiffness tomography k určení struktur pod povrchem fibroblastů (buněčná linie 293T) a makrofágů z linie monocytů THP-1 a jejich příspěvi k celkové tuhosti [31]. U makrofágů bylo zjištěno, že po podání cytochalasinu klesla tuhost na okraji buňky ze 132 kPa na 28 kPa (4,7 krát). Longo a kol. aplikovali stiffness tomography na bakterie *E. coli*, kde na buněčných membránách rozpoznali několik oblastí, které jsou tužší než okolní a Youngův modulus dosahuje až 20 MPa [32]. Umístění těchto tužších oblastí se však liší u jednotlivých bakterií.

## Závěr

Během posledního desetiletí se AFM stalo široce používaným nástrojem ke studiu mechanických vlastností napříč různými vědeckými obory včetně oblasti živých systémů. Komplexnost biologických struktur však představuje nejednu výzvu při propojování experimentálních dat s teoretickými modely. Další faktory, které je třeba brát v úvahu, jsou geometrie hrotu a oblast kontaktu se vzorkem. Spolu s rostoucím počtem důkazů o propojení mechanických a chemických vlastností s biologickými funkcemi je potřeba zpřesnit jejich získání a následnou analýzu.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena projekty LF\_2012\_019, LF\_2013\_006 a Ústavem Molekulární a Translační Medicíny CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

## Reference

- [1] Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., Meister, J. J. *Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells*. Journal of Biomechanics 2002, 35, 177-187.
- [2] Petroll, W. M., Cavanagh, H. D., Jester, J. V. *Dynamic three-dimensional visualization of collagen matrix remodeling and cytoskeletal organization in living corneal fibroblasts*. Scanning 2004, 26, 1-10.
- [3] Chen, Q. A., Xiao, P., Chen, J. N., Cai, J. Y., Cai, X. F., Ding, H., Pan, YL. *AFM Studies of Cellular Mechanics during Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Fluid-derived Stem Cells*. Analytical Science 2010, 26, 1033-1037.
- [4] Lulevich, V., Zink, T., Chen, H. Y., Liu, F. T., Liu, G. Y. *Cell mechanics using atomic force microscopy-based single-cell compression*. Langmuir 2006, 22, 8151-8155.
- [5] Milovanovic, P., Potocnik, J., Djonic, D., Nikolic, S., Zivkovic, V., Djuric, M., Rakocevic, Z. *Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level:*

- Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM.* Experimental Gerontology 2012, 47, 154-159.
- [6] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. *Atomic force microscope.* Physical Review Letters 1986, 56, 930-933.
- [7] Rico, F., Roca-Cusachs, P., Gavara, N., Farré, R., Rotger, M., Navajas, D. *Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips.* Physical Review E 2005, 72, 021914.
- [8] Rotsch, C., Radmacher, M. *Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study.* Biophysical Journal 2000, 78, 520-535.
- [9] Li, M., Liu, L. Q., Xi, N., Wang, Y. C., Dong, Z. L., Xiao, X. B., Zhang, W.J. *Drug-Induced Changes of Topography and Elasticity in Living B Lymphoma Cells Based on Atomic Force Microscopy.* Acta Physico-Chimica Sinica 2012, 28, 1502-1508.
- [10] Puech, P. H., Poole, K., Knebel, D., Muller, D. J. *A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM.* Ultramicroscopy 2006, 106, 637-644.
- [11] Starodubtseva, M. N. *Mechanical properties of cells and ageing.* Ageing Research Reviews 2011, 10, 16-25.
- [12] Suresh, S. *Biomechanics and biophysics of cancer cells.* Acta Biomaterialia 2007, 3, 413-438.
- [13] Franz, C. M., Puech, P. H. *Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics.* Cellular and Molecular Bioengineering 2008, 1, 289-300.
- [14] Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., Zhdanov, R.I. *Atomic force microscopy probing of cell elasticity.* Micron 2007, 38, 824-833.
- [15] Kasas, S., Dietler, G. *Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells.* Pflügers Archiv – European Journal of Physiology 2008, 456, 13-27.
- [16] Withers, J. R., Aston, D. E. *Nanomechanical measurements with AFM in the elastic limit.* Advances in Colloid and Interface Science 2006, 120, 57-67.
- [17] Hertz, H. *Über die Berührung fester elastischer Körper.* Journal für die Reine und Angewandte Mathematik 1881, 92, 156-171.
- [18] Kurland, N. E., Drira, Z., Yadavalli, V. K. *Measurement of nanomechanical properties of biomolecules using atomic force microscopy.* Micron 2012, 43, 116-128.
- [19] Sneddon, I. *The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile.* International Journal of Engineering Science 1965, 3, 47-57.
- [20] Johnson, K. L., Kendall, K., Roberts, A. D. *Surface energy and contact of elastic solids.* Proceedings of the Royal Society of London Series A – Mathematical and Physical Science 1971, 324, 301.
- [21] Derjaguin, B. V., Müller, V. M., Toporov, Y. P. *Effect of contact deformations on adhesion of particles.* Journal of Colloid and Interface Science 1975, 53, 314-326.
- [22] Oliver, W. C., Pharr, G. M. *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments.* Journal of Materials Research 1992, 7, 1563-1583.
- [23] Sweers, K., van der Werf, K., Bennink, M., Subramaniam, V. *Nanomechanical properties of alpha-synuclein amyloid fibrils: a comparative study by nanoindentation, harmonic force microscopy, and Peakforce QNM.* Nanoscale Research Letters 2011, 6, 270.
- [24] Pittenger, B., Erina, N., Su, C. *Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM.* Bruker Application Note #128 2010.
- [25] Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L. *Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells.* Journal of Structural Biology 2012, 178, 1-7.
- [26] Adamcik, J., Berquand, A., Mezzenga, R. *Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy.* Applied Physics Letters 2011, 98, 193701.
- [27] Pletikapic, G., Berquand, A., Radic, T. M., Svetlicic, V. *Quantitative nanomechanical mapping of marine diatom in seawater using Peak Force Tapping Atomic Force Microscopy.* Journal of Phycology 2012, 48, 174-185.
- [28] Berquand, A., Roduit, C., Kasas, S., Holloschi, A., Ponce, L., Hafner, M. *Atomic Force Microscopy Imaging of Living Cells.* Microscopy Today 2010, 18, 8-14.
- [29] Wang, Y., Subbiahdoss, G., Swartzes, J., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Libera, M. *Length-Scale Mediated Differential Adhesion of Mammalian Cells and Microbes.* Advanced Functional Materials 2011, 21, 3916-3923.
- [30] Roduit, C., Sekatski, S., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., Kasas, S. *Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy.* Biophysical Journal 2009, 97, 674-677.
- [31] Roduit, C., Longo, G., Benmessaoud, I., Volterra, A., Saha, B., Dietler, G., Kasas, S. *Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages.* Journal of Molecular Recognition 2012, 25, 241-246.
- [32] Longo, G., Rio, L. M., Roduit, C., Trampuz, A., Bizzini, A., Dietler, G., Kasas S. *Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes.* Journal of Molecular Recognition 2012, 25, 278-284.

Jakub Malohlava, Mgr.  
 Ústav lékařské biofyziky  
 Lékařská fakulta  
 Univerzita Palackého v Olomouci  
 Hněvotinská 3, Olomouc 775 15  
 E-mail: jakub.malohlava@upol.cz  
 Tel.: +420 585 632 200