



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra biomedicínské techniky**

**Experimentální analýza mechanických  
vlastností buněčné membrány**

**Experimental analysis of cellular membrane  
mechanical properties**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce: Bc. Bohumil Hornát  
Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Otáhal, Ph.D.

---

**Kladno 2018**

## **Zadání práce**

Místo této stránky umístěte (svažte) do prvního výtisku práce podepsaný originál zadání bakalářské nebo diplomové práce. Do dalších výtisků vložte barevnou nebo černobílou kopii tohoto formuláře. Zadání je nezbytnou součástí nerozebíratelné vazby závěrečné práce. Na zadání je uvedena platnost – relevantní jsou pouze platná zadání závěrečných prací. Při hodnocení práce je posuzována míra splnění zadání.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Experimentální analýza mechanických vlastností buněčné membrány“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 17.5.2018

.....

Bc. Bohumil Hornát

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří Ing. Martinu Otáhalu, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych rád poděkoval Studentské vědecké konferenci pořádanou ČVUT (číslo projektu: SVK 45/17/F7) a Studentské grantové soutěže (číslo projektu: SGS17/157/OHK4/2T/17).

## **ABSTRAKT**

### **Experimentální analýza mechanických vlastností buněčné membrány**

Studium buněčného prostředí může odhalit možnosti využití nanočástic v biomedicíně. Stav buněčné membrány může být v korelaci s vitalitou buňky. Membrána, jako vnější obálka buňky, má polo-tekutý charakter s proteiny a molekuly lipidů, které jsou v neustálém pohybu. Předkládaná práce je zaměřena na tvorbu a ověření metodiky měření mechanických vlastností (Youngův modul, adheze) živých buněk. Mikroskopie atomárních sil (AFM) byla vybrána pro sledování mechanických vlastností buňky, konkrétně bylo použito módu silové spektroskopie (FS). Tato práce představuje dosažené výsledky porovnání pomocí různých tipů hrotů a ověření na několika typech buněk. Rozdílné povrchy byly vytvářeny pomocí potažení skla tenkou vrstvou, případně navázání konkrétních látek na měřicí hrot – funkcionalizace hrotu. Práce pojednává o možnostech navázání EMC proteinu na měřicí hrot a měření adheze membrány a proteinu. Testování se živými buňkami vyžaduje specifický přístup ve všech částech výzkumu. Výsledkem je porovnání souboru zdravých živých CT26 a 3T3 buněk se souborem fixovaných CT26 a 3T3. Velká část diskuze se věnuje samotné volbě hrotu, která je brána jako klíčová část nastavení daného experimentu. V neposlední řadě jsou v diskuzi pojednávány veškeré potíže, které při experimentu nastaly. Na základě zjištění z této práce bychom měli být schopni zjistit, zda daná choroba ovlivňuje samotnou membránu a naopak.

### **Klíčová slova**

Mikroskopie atomárních sil, silová spektroskopie, buněčná membrána, mechanické vlastnosti

## **ABSTRACT**

### **Experimental analysis of cellular membrane mechanical properties**

The study of cell-environment can reveal the possibilities of using nanoparticles in biomedicine. The condition of the cell membrane can tell about the condition of the cell. The membrane as the outer envelope of the cell has a semi-fluid character, and the proteins and lipid molecules are in constant motion. The presented work is focused on creating and verification of methodology for measuring mechanical properties (Young's modulus, adhesion) of living cells. Atomic force microscopy was selected for exploration mechanical properties of a cell, force spectroscopy mod was used. This work presents achieved results of comparison using different tips of cantilevers and verification on several types of cells. Different surfaces are creating by coating of glass, or binding of specific substances to the measuring tip - the functionalization of the tip. The thesis discusses with the possibilities of a EMC protein binding on the tip of cantilever and measurement of adhesion of membrane and the protein. Working with living cells claims specific approach in all parts of the research. The result is a comparison of a set of healthy living CT26 and 3T3 cells with a set of fixed CT26 and 3T3 cells. A large part of the discussion deals with the choice of the tip, which is taken as the key part of the setup of the experiment. Last but not least, all the difficulties encountered during the experiment are discussed. Based on the findings from this work, we should be able to tell if the disease affects the membrane itself and vice versa.

### **Keywords**

Atomic force microscopy, force spectroscopy, cell membrane, mechanical properties

# Obsah

<b>Seznam symbolů a zkratk.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>10</b>
1.1 Teoretická východiska.....	10
1.1.1 Buňka.....	10
1.1.2 Mikroskopie atomárních sil.....	12
1.1.3 Youngův modul pružnosti .....	14
1.1.4 Hertz model .....	15
1.1.5 Adheze.....	18
1.2 Přehled současného stavu.....	18
1.2.1 Epilepsie .....	19
1.3 Cíle práce.....	20
1.3.1 Hypotézy.....	20
1.3.2 Alternativní postup .....	20
<b>2 Metody .....</b>	<b>23</b>
2.1 Použité buňky.....	23
2.1.1 Příprava a kultivace živých buněk.....	23
2.2 Povlakování.....	25
2.2.1 Povlakování skla.....	25
2.2.2 Povlakování hrotu.....	26
2.3 Přístroje .....	26
2.3.1 Nanowizard od firmy JPK Instruments AG .....	27
2.3.2 Hroty.....	27
<b>3 Výsledky.....</b>	<b>30</b>
3.1 AFM zobrazování.....	30
3.1.1 Fixované buňky .....	31
3.1.2 Živé buňky.....	32
3.2 Silová spektroskopie .....	34
3.2.1 Kalibrace na skle .....	35
3.2.2 Youngův modul buňky.....	36
3.3 Adheze.....	38

<b>4</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>42</b>
4.1	Přístroj a hroty.....	42
4.1.1	Volba módu měření AFM .....	42
4.1.2	Volba hrotu a nosníku .....	42
4.2	Zobrazování buněk pomocí AFM .....	43
4.3	Silová spektroskopie .....	43
4.3.1	Kalibrace na skle .....	44
4.3.2	Závislost mechanických vlastností buňky na blízkém okolí .....	44
4.3.3	Měření mechanických vlastností buněčné membrány .....	45
4.4	Povlakování hrotů EMC proteinem.....	45
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>47</b>
	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>48</b>



# Seznam symbolů a zkratek

## Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
-	Ångström [Å]	Jednotka vzdálenosti ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
$F$	Newton [N]	Síla
$k$	[N/m]	Tuhost
$\Delta x$	Metr [m]	Výchylka pružiny
$l$	Metr [m]	Délka tyče
$\Delta l$	Metr [m]	Prodloužení tyče
$E$	Pascal [Pa]	Youngův modul pružnosti
$S$	[m <sup>2</sup> ]	Průřez tyče
$\sigma$	Pascal [Pa]	Napětí (mechanické)/tenzor napětí
$\varepsilon$	%	Relativní prodloužení vzdálenosti tyče
$\eta$	%	Relativní prodloužení průměru tyče
$\mu$	-	Poissonovo číslo
$a$	Metr [m]	Poloměr kontaktní plochy
$\delta$	Metr [m]	Hloubka vniku
$R$	Metr [m]	Poloměr
$w$	Metr [m]	Šířka nosníku
$t$	Metr [m]	Tloušťka nosníku
$L$	Metr [m]	Délka nosníku
$\alpha$	Radián	Vrcholový úhel kuželu
$\alpha$	Radián	Vrcholový úhel jehlanu ke stěně
$\beta$	Radián	Vrcholový úhel jehlanu ke hraně

## Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AFM	Mikroskopie atomárních sil ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
ECM	Extracelulární matrix ( <i>Extracellular Matrix</i> )
FS	Silová spektroskopie ( <i>Force Spectroscopy</i> )
HDC	Vysokohustotní uhlík ( <i>High Density Carbon</i> )
MRD	Metoda redukce dimenzionality ( <i>Method of Reduction of Dimensionality</i> )
PBS	Fosfátový pufr ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PEI	Polyethylenimine ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ ) <sub>n</sub>
PBS	Fosfátový pufr ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PEG	Polyethylenglykol ( $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ ) <sub>n</sub>
ROC	Poloměr zakřivení ( <i>Radius of curvature</i> )
STM	Řádkovací tunelový mikroskop ( <i>Scanning Tunneling Microscope</i> )
DMEM	Živné/kultivační médium DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
FBS	Fetálním bovinním sérum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )

# 1 Úvod

Práce se zabývá vytvořením metodiky pro měření mechanických vlastností membrány buňky pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Všechny buňky byly měřeny v kapalném prostředí. Pro živé buňky byl použit fosfátovým pufr (PBS) a pro fixované byl použit alkohol, popřípadě PBS.

Obsahem je převážně základní výzkum, který je nedílnou součástí pro aplikovaný výzkum například ve farmakologii nebo imunologii. Veškeré zjištěné poznatky z měření pomohou optimalizovat metodu a zkrátit dobu potřebnou pro provedení celého experimentu. Práce se živými buňkami předpokládá specifický přístup ve všech směrech. Ochránit vzorky před kontaminací a udržet pracovníky v bezpečí je jedním ze základních priorit.

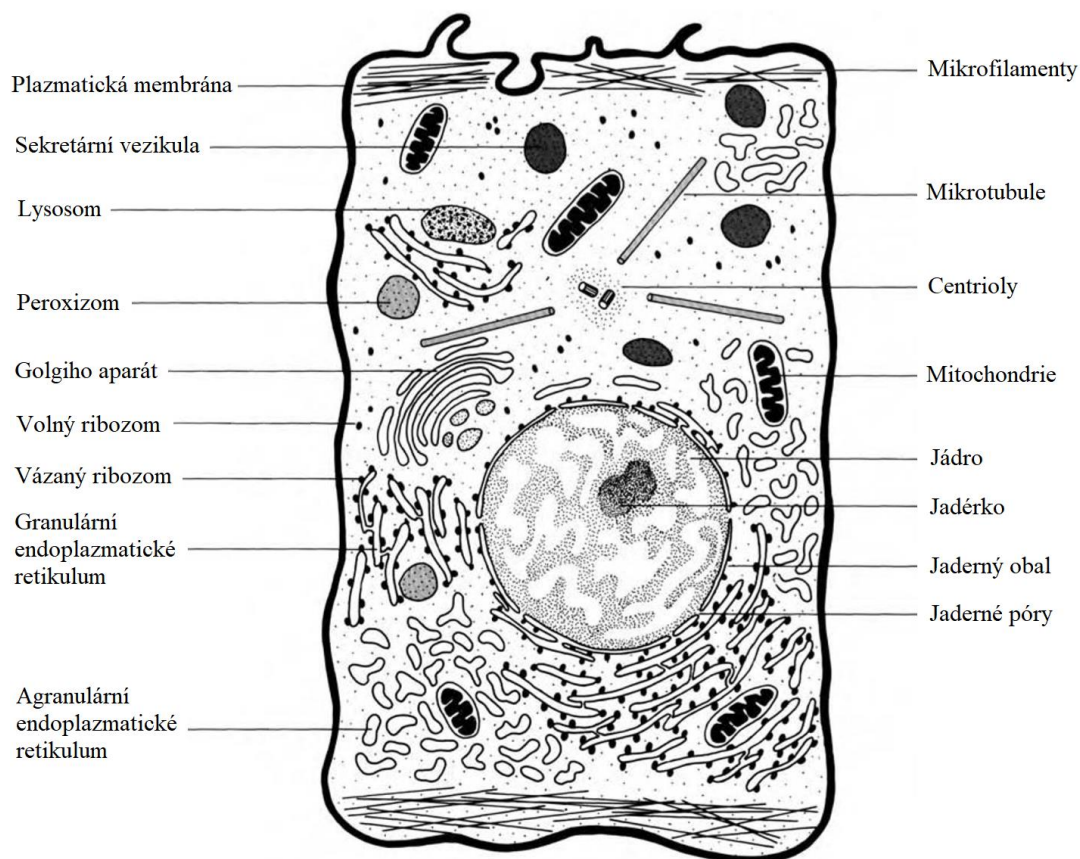
V první kapitole jsou popsány základní teoretická východiska, současný stav problematiky a cíle naší práce. Následující kapitola obsahuje veškeré použité metody a přístroje. Další částí je kapitola obsahující experimentální výsledky. Práce je zakončena diskuzí a souhrnným závěrem.

## 1.1 Teoretická východiska

Živý organismy dělíme na buněčné a nebuněčné (viry, viroidy, virusoidy). Buněčné organismy se vyskytují buď jako jednotlivé prokaryotické buňky (bakterie) nebo soubor eukaryotických buněk, které obsahují buněčné jádro. Buněčná teorie [1] [2] vznikla roku 1838. Buněčný výzkum se stává stále více populární, jelikož porozumění metabolismu buněk a transportu látek je nedílnou součástí pokroku a inteligence. Afinity mezi ligandem a receptorem je velice důležitým parametrem při studiu aktivních látek ve farmakologii [3]. Pokud se v roztoku budou vyskytovat dva ligandy na receptor se bude vázat převážně ten, který má vyšší afinitu [4]. Avidita, tedy síla interakce mezi polyvalentní protilátkou a polyvalentním antigenem vzrůstá s afinitou jednoho vazebného místa [5]. Přímé měření sil mezi molekulou ligandu a molekulou receptoru tvoří důležitou část v dnešním výzkumu.

### 1.1.1 Buňka

Eukaryotická buňka (dále jen buňka) je základním stavebním kamenem všech eukaryot (prvoci, houby, rostliny, živočichové a samozřejmě lidí). Buňky mají společné znaky, a to buněčné jádro a organely oddělené buněčnou membránou od okolí viz Obr. 1.1. Z hlediska mechanických vlastností nás však nejvíce zajímá stavba buňky a složení membrány.



**Obr. 1.1:** Zjednodušené schéma buňky se základními strukturami a orgány [3].

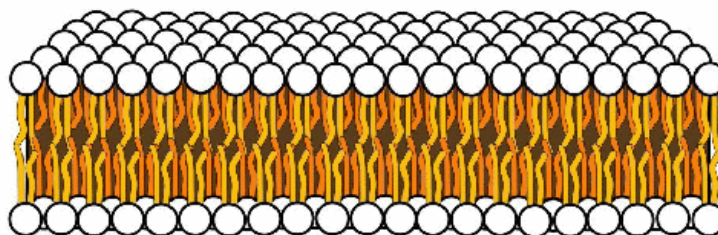
Mezi hlavní části buňky, které se podílejí na mechanické odolnosti, patří cytoskelet složený z filament. Existují tři druhy filament, a to aktinová filamenta někdy nazývána jako mikrofilamenta o průměru 7nm, intermediární (střední) filamenta o průměru 10 nm a mikrotubuly o průměru 25 nm [6]. Vlákna se skládají z jednotlivých proteinů, které mohou polymerovat a tvořit tak řetězce.

Aktinové mikrofilamenta je pružné vlákno tvořeno dvoušroubovicí z proteinů F-aktinu. Mikrofilamenta mají závitový charakter opakující se po 37 nm. Vlákna tvoří terminální síť těsně pod membránou [7]. Intermediální filamenta mají především podpůrnou funkci skeletu buňky, jelikož mají dobrou pevnost v tahu [7]. Mikrotubuly zajišťují převážně mechanickou oporu buňky a slouží pro intercelulární transport, kde umožňují pohyb pro motorické proteiny [7].

### **Buněčná membrána**

Buněčná membrána se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy, která obsahuje proteiny. Fosfolipid je molekula, která se skládá z polární hlavičky a nepolárního konce. Obecně

se polární molekuly jeví jako hydrofilní a nepolární molekuly (většinou uhlíkové řetězce) bývají hydrofobní a ve vodě často nerozpustné. Polarita molekul se určuje podle dipólového momentu. Větší molekuly mohou mít polární a nepolární části. To zajišťuje, že se ve vodním prostředí z lipidů samovolně vytvoří micely s hydrofobní částí skrytou uvnitř viz Obr. 1.2. Právě tvar lipidové dvojvrstvy je základem pro všechny buněčné membrány. Lipidy mohou mít různě dlouhé nepolární části. Tato skutečnost ovlivňuje, jak budou po sobě vrstvy klouzat a samotnou šířku membrány. Obecně je buněčná membrána charakterizována jako polotekutá, dynamická a neustále se přestavující [8]. Propustnost membrány záleží na mnoha faktorech. Malé neutrální molekuly jako plyny jsou propouštěny pomocí difúze, ionty membrána propouští jen pomocí selektivních kanálů, které mohou být regulovány buňkou samotnou [9]. Z důvodu transportu iontů vzniká membránový potenciál. Díky napětí vzniká usnadnění transport některých iontů, který je popsán kinetikou podle Michealis – Mentenové známe jako enzymatická kinetika [10]. Každý typ buňky může mít rozdílnou funkcionalitu, a proto ze složitosti vyplývá, že se každá studie týká jednoho problému.



**Obr. 1.2:** Lipidová dvojvrstva [11]

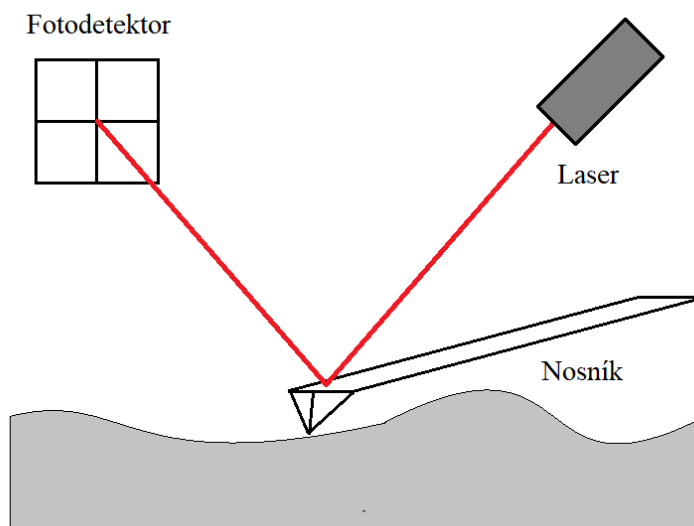
### 1.1.2 Mikroskopie atomárních sil

Metoda mikroskopie atomárních sil (AFM) byla popsána roku 1986 a byla představena jako alternativa řádkovacího tunelového mikroskopu (STM), který byl popsán roku 1982 [12] [13]. Společná vlastnost těchto metod je v měření topografie povrchu. Největší omezení STM je nutnost použití vodivých vzorků avšak hroty je možné připravit v laboratoři pomocí elektrolýzy z tenkých drátků. Metoda AFM disponuje rozlišovací schopností 30 Å (3 nm) v laterálním rozlišení a 1 Ångström ve vertikálním [12]. V dnešní době metoda dosáhla rozlišovací schopnosti až 20 Ångström v laterálním rozlišení a pozorovat opakující se zvlnění na hranici 25 pm [14].

#### AFM princip

Mikroskop atomárních sil je založen na skenování povrchu hrotem, který je připevněn na tenkém nosníku (slangově cantilevr). Tento hrot se pohybuje pomocí piezoelektrických motorů po nebo těsně nad povrchem a působící silou mezi materiálem

a hrotem vychyluje nosník. Výchylka se sleduje pomocí laseru, který po odrazu od nosníku dopadá na fotodetektor [15]. jak je znázorněno na Obr. 1.3. Výpočetní technika pak dopočítá výchylku v daném bodě.



**Obr. 1.3:** AFM princip

Nosníky a hroty se liší tvarem, velikostí a použitým materiálem podle výrobce [16] [17] [18]. Při malé deformaci nosníku se uvažuje platnost Hookova zákona pro oscilátor

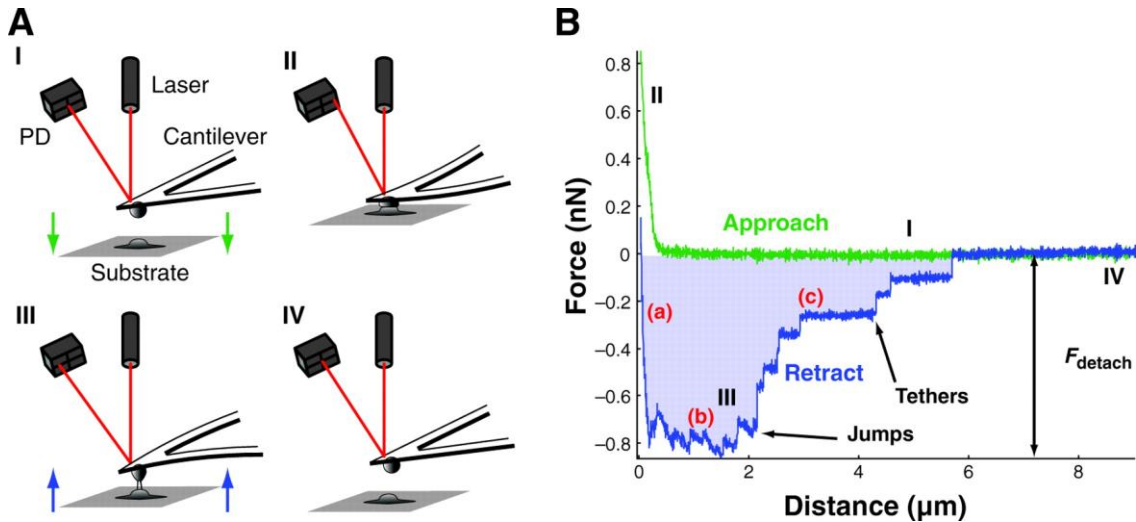
$$F_C = k_C x, \quad (1.1)$$

kde  $F_C$  je statická síla,  $k_C$  je tuhost pružiny a  $\Delta x$  značí výchylku [19].

### Silová spektroskopie

AFM se dále může využít pro studium interakcí mezi jednotlivými molekulami [20]. Tato metoda závisí na sledování deformace nosníku v závislosti na vzdálenosti od vzorku. Název silová spektroskopie (FS) je celkem zavádějící, avšak ve vědecké komunitě se zcela přirozeně používá. Silová spektrometrie může být využita i v jiných částech výzkumu kromě AFM. O FS se mluví i ve spojení s optickými pinzetami [21] a akustickým manipulačním zařízením [22].

Křivky FS se měří typicky ve dvou směrech, a to při přiblížení (angl. approach) a při oddálení (angl. retract) jak je možno pozorovat na převzatém Obr. 1.4 ze článku [23].



**Obr. 1.4:** Část **A**: Schematicky znázorněné fáze přiblížení (I a II) a oddálení (III a IV). Část **B**: Znázorněna typická křivka FS kde jednotlivé fáze I, II, III a IV z části **A** odpovídají křivkám v části **B**. Zeleně je znázorněna křivka přiblížení a modře křivka oddálení. [23]

Samotné měření může být ovlivněno nastavením výchozích parametrů měření. Typicky se nastavuje rychlost přiblížení, startovní a koncová vzdálenost, maximální výchylka nosníku, čas setrvání v kontaktu pod určitou silou nebo pod určitou vzdáleností. Křivku na Obr. 1.4 považujeme za ideální a parametry se nastavují tak, aby výsledné měření mělo obdobní tvar. Velice záleží, aby měření započalo ještě před kontaktem se vzorkem a skončilo po úplném odpojení hrotu od vzorku. Ostatní parametry se nastavují podle typu úlohy. Výrobce doporučuje hloubku průniku hrotu do buňky 10 % její výšky [24].

### 1.1.3 Youngův modul pružnosti

Materiály lze obecně deformovat, při malé deformaci je však většina materiálů pružných a vrátí se do původního stavu. Pro malé deformace se předpokládá lineární závislost mezi působící silou na vzniklé deformaci. Odvození se probírá na nejjednodušším případě, a to na jednoosé napjatosti v tahu nebo tlaku. Působením vnější síly  $F$  na tyč o délce  $l$  a průřezu  $S$  se tyč prodlouží/zkrátí o  $\Delta l$ . Empiricky byla vytvořena rovnice popisující daný jev

$$\Delta l = \frac{Fl}{ES} = \frac{\sigma}{E}l, \quad (1.2)$$

kde koeficient úměrnosti  $E$  je nazýván modulem pružnosti a  $\sigma$  je napětí. Obecně vnější síla  $F$  je vektor a může na materiál působit v různém směru. Napětí  $\sigma$  je tedy obecně tenzor druhého řádu

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}, \quad (1.3)$$

kde základní prvky na diagonále popisují normálová napětí v příslušných směrech a šest zbývajících složek popisuje tečná napětí [25]. Youngův modul pružnosti má obecně různé hodnoty v závislosti na typu deformace (tlak, tah, torze, smyk), pro krystaly jako anizotropní materiály se hodnoty Youngova modulu také liší. Hookův zákon pro jednoosou napjatost (tah i tlak) je vyjádřen v rovnici

$$\sigma = E\varepsilon, \quad (1.4)$$

kde  $\varepsilon$  označuje relativní prodloužení ( $\Delta l/l$ ). Tuhostí je nazývána jednota  $ES/l = F/\Delta l$  jako síla, která způsobí prodloužení o jednotku délky. Při prodloužení materiálu o  $\Delta l$  je uvažováno, že příčný průřez se zúží o  $\Delta d$ . Relativní zúžení  $\eta$  ( $\Delta d/d$ ) je přímo úměrné relativnímu prodloužení  $\varepsilon$  podle rovnice

$$\eta = \mu\varepsilon = \mu \frac{\sigma}{E}, \quad (1.5)$$

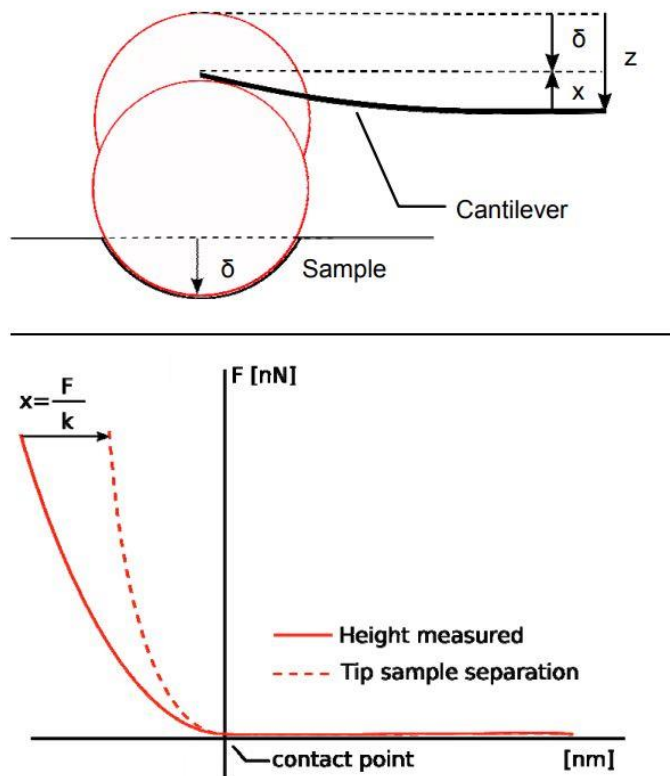
kde konstanta úměrnosti  $\mu$  je nazývána Poissonovým číslem. Pro biologické materiály se standardně uvažuje 0,5 [24].

V našem případě se vyhodnocoval Youngův modul pro zatěžovací křivku do malé hloubky průniku. Tím je předpokládáno, že měříme pouze vlastnosti samotné membrány. Membrány mají složitou strukturu, a polotekutý charakter, takže popis jedním číslem je pouze charakteristika v prvním přiblížení. Hodnoty se mohou měnit i v čase, jelikož je živá buňka aktivní a může interagovat na vnější podněty. Cílem je, aby buňka vydržela několik opakovaných měření, aby bylo možné vytvořit mapu nebo sledovat buňku v závislosti na čase.

#### 1.1.4 Hertz model

Kontaktní mechanika na elastických pevných látkách byla popsána roku 1882 Heindrichem Hertzem [26]. Model popisuje vtláčování předmětů do materiálu, který aproximuje jako izotropní a lineárně elastický. Dále předpokládá, že objekt vtláčovaný do vzorku je nedeformovatelný a neprobíhají zde žádné další interakce mezi objektem a vzorkem. Pokud se tyto podmínky blíží skutečnosti, tak je možno Hertzův model použít.

Při měření pomocí silové spektroskopie AFM se nám zaznamenává výška měřící hlavy od vzorku na ose  $x$ . Jelikož se nám nosník deformuje, je potřeba naměřenou výšku redukovat na skutečnou vzdálenost mezi vtláčovaným objektem a vzorkem, jak je znázorněno na Obr. 1.5.



**Obr. 1.5: Horní:** Skica vtlačení objektu do materiálu. **Dolní:** Schematicky vyznačená korekce naměřené výšky. [24]

Hertzův model je definován pro různé geometrie vtlačovaného objektu. Důležitým parametrem při vtlačování kuličky do vzorku je poloměr kontaktní plochy

$$a = \sqrt{R\delta}, \quad (1.6)$$

roven odmocnině z poloměru vtlačované koule  $R$  vynásoben hloubkou vniku  $\delta$ . Rovnice (1.6) vyplívá z geometrie a je ověřena pomocí metody redukce dimenzionality (MRD) popsané v [27]. Závislost síly  $F$  na hloubce v průniku  $\delta$  popisuje rovnice

$$F = \frac{E}{1 - \mu^2} \frac{4\sqrt{R}}{3} \delta^{3/2}, \quad (1.7)$$

kde je možné nahradit  $R$  poloměrem zakřivení ROC jiného tvaru při malé hloubce průniku. Limitní hloubka vtlačení pro použití rovnice (1.7) je právě rovna poloměru koule. Pro větší hloubku průniku rovnice automaticky popisuje parabolický tvar, což vyplívá z rovnice (1.6). Pro popis pouze vtlačování kuličky by se rovnice musela modifikovat.

Dalším jednoduchým tvarem z hlediska symetrie je kužel. Rovnice pro poloměr kontaktní plochy a je podle geometrie upravena na tvar

$$a = \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta, \quad (1.8)$$



kde  $\alpha$  je vrcholový úhel kuželu. Rovnice pro závislost síly  $F$  na hloubce průniku  $\delta$  pro kuželový hrot se změni na

$$F = \frac{E}{1 - \mu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2, \quad (1.9)$$

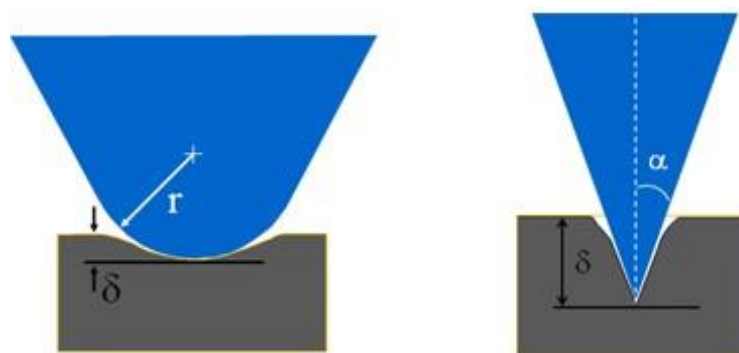
kde s porovnáním s rovnicí (1.7) se liší hlavně ve tvaru dané funkce, a to v mocnině hloubky průniku, proto tato modifikovaná rovnice dostala jiný název, a to Sneddonův model. Grafické porovnání modelů je na **Obr. 1.6**. Mezi další základní tvary patří čtyřboká pyramida. Rovnice pro závislost síly  $F$  na hloubce průniku  $\delta$  je upravena do tvaru

$$F = \frac{E}{1 - \mu^2} \frac{\tan \alpha}{\sqrt{2}} \delta^2, \quad (1.10)$$

kde úhel  $\alpha$  je vrcholový úhel sevřený stěnou. V praxi je možné do výpočetních programů zadat i úhel  $\beta$ , který odpovídá vrcholovému úhlu hrany. Přepočet mezi úhly

$$\tan \beta = \sqrt{2} \tan \alpha \quad (1.11)$$

vyplývá ze základní geometrie jehlanu a goniometrie. Při zjišťování modulu pružnosti využijeme  $E$  jako fitovací parametr, další fitovací parametry jsou bod kontaktu a hodnota základní hladiny (angl. base line). Prokládání matematického modelu naměřenými daty (slangově fitování) FS křivek se doporučuje maximálně do 10 % hloubky dané buňky.



**Obr. 1.6:** Grafické porovnání. Vlevo: Hertzův model, Vpravo: Sneddonův model [28]

### Bod kontaktu

Při aplikaci matematických modelů na naměřená data je potřeba buď kontaktu znát nebo ho zahrnout mezi parametry fitu. Na molekulární úrovni si nelze představit kontakt mezi dvěma tělesy stejně jako v makroskopickém měřítku. Většinu objemu atomu tvoří elektronový obal (přesněji jednotlivé orbitály). Z teorie vzájemného působení částic se předpokládá elektrické interakce elektronového obalu a jader. V praxi to znamená, že není jasně definovaný bod kontaktu.

### 1.1.5 Adheze

Dalším důležitým parametrem z hlediska biomechaniky je přilnavost buněk. Obecně můžeme pomocí AFM měřit adhezní síly mezi hrotem a danou buňkou (buněčnou membránou). Adhezní sílu změříme pomocí silové spektrometrie při oddalování hrotu od vzorku. Adhezní síla  $F_{MAX}$  bude tedy maximální výchylka pod osu  $x$  a adhezní energie  $W_A$  bude plocha pod FS křivkou která obecně vyplývá z rovnice práce

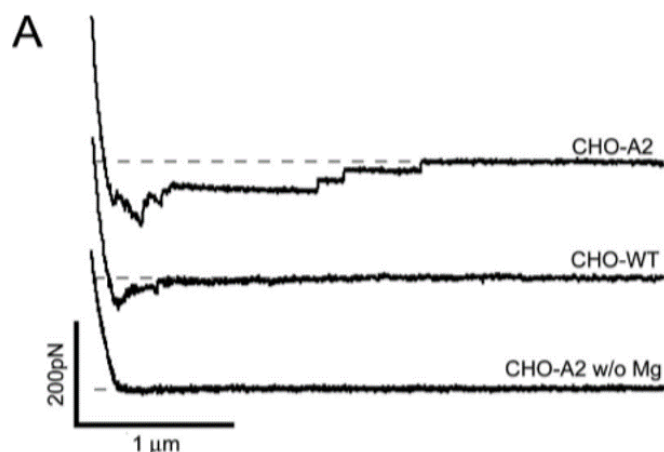
$$W_A = \int_{s_1}^{s_2} \mathbf{F} \cdot d\mathbf{s}, \quad (1.12)$$

kde  $s_1$  je místo kontaktu a  $s_2$  je místo odtržení hrotu od vzorku. Při porovnávání jednotlivých vzorků je potřeba brát v úvahu s tvarem hrotu, který ovlivňuje samotné výsledky. Při funkcionalizaci hrotu, popsané v kapitole 2.2.2 Povlakování hrotu, je možné měřit sílu mezi navázaným proteinem a membránou.

## 1.2 Přehled současného stavu

Buněčná membrána je v kontaktu s mezibuněčným prostorem, ve kterém se nachází materiál nazývaný jako extracelulární matrix (ECM). Odhaduje se, že ECM se skládá z více než 300 druhů proteinů [29]. Při výzkumu se nejčastěji vybírají ty nejzastoupenější a to kolagen, laminin nebo fibronektin. Interakce mezi proteiny extracelulární matrix a membránovými receptory hrají důležitou roli při mnoha procesech [15]. AFM nám umožňuje sledovat přímý kontakt mezi buněčnou membránou a hrotem. Při navázání proteinu na hrot (funkcionalizace hrotu) se přímo sledují silové interakce mezi proteinem a membránou.

Přímé měření síly mezi kolagenovým vláknem typu I a membránovým receptorem je přímým výsledkem aplikace FS na živých buňkách [30]. Výsledkem studie bylo porovnání dvou typů buněk. Modifikovaná buňka měla nadměrné množství integrinových receptorů, které jsou nespíše hlavními receptory pro navázání kolagenu typu I. Předpokládá se, že pro správnou funkci těchto receptorů je zapotřebí hořčíku, a proto další skupina buněk byla kultivována s nedostatkem hořčíku. Výsledky je možné pozorovat na obrázku.



**Obr. 1.7:** Porovnání adheze buněk vaječníku čínského křečka. Shora: buňky s nadbytkem alfa(2)beta(1) receptoru, buňky divokého typu, buňky s nadbytkem alfa(2)beta(1) receptoru s nedostatkem hořčíku [30].

Měření může být ovlivněno časem kontaktu sledované látky s buňkou. Tento parametr je možné použít jako proměnnou. Z pozorování adheze v závislosti na čase kontaktu se získají základní informace o dynamice systému [30].

Adhezní testy za pomoci AFM se dále používají pro identifikaci jednotlivých ligandů u rakovinných buněk, kde byl pozorován základní rozdíl mezi ICAM-1 a MUC1 ligandy [31].

Ve velkém množství případů různých chorob nejsou známy základní mechanismy daných chorob. Studie [15] pojednává o epilepsii, kde se předpokládá, že membrána hraje klíčovou roli. Aplikace léčiv může být založena na transportu účinné látky do buňky, proto je klíčové znát mechanismy dané membrány [32]. Typickými nemocemi tohoto charakteru jsou Alzheimerova choroba [33] a epilepsie.

### 1.2.1 Epilepsie

Epilepsie postihuje miliony lidí na celém světě [34]. V dnešní době neexistuje lék ani možnost prevence vzniku této choroby [15]. Nemoc má několik rizikových faktorů, a to od úrazu hlavy po genetický předpoklad. Při zjištění přesných procesů, co epilepsii vyvolá nebo způsobuje by byla možnost snadnějšího nalezení léku. Jednotlivé teorie je potřeba ověřit a porovnat zdravé neuronové buňky s epileptickými. Aby bylo možné vystavět danou teorii, je potřeba sbírat data z jednotlivých částí buňky. Sodíkové kanály jsou nedílnou součástí při přenosu akčního potenciálu a studie [35] představuje rozdíly těchto akčních potenciálů v závislosti na genetické mutaci daných buněk. Předpokládá se, že plasticita, elasticita a související dynamika výrazně ovlivňují odezvy na síťové výboje [15]. Pro studium interakce mezi ligandem a receptorem se hodí právě AFM, která může sledovat dané procesy.

## 1.3 Cíle práce

Pro účely práce jsme si stanovili následující cíle:

- 1) Vytvořit metodiku pro měření mechanických vlastností buněk.
- 2) Vytvořit metodiku pro měření adheze buněk pomocí funkcionalizovaného hrotu.
- 3) Vytvořit metodiku pro funkcionalizaci hrotu pomocí ECM proteinu.
- 4) Porovnat vliv tvaru hrotu na měření pomocí AFM
- 5) Stanovit vhodný hrot pro měření silové spektroskopie.

### 1.3.1 Hypotézy

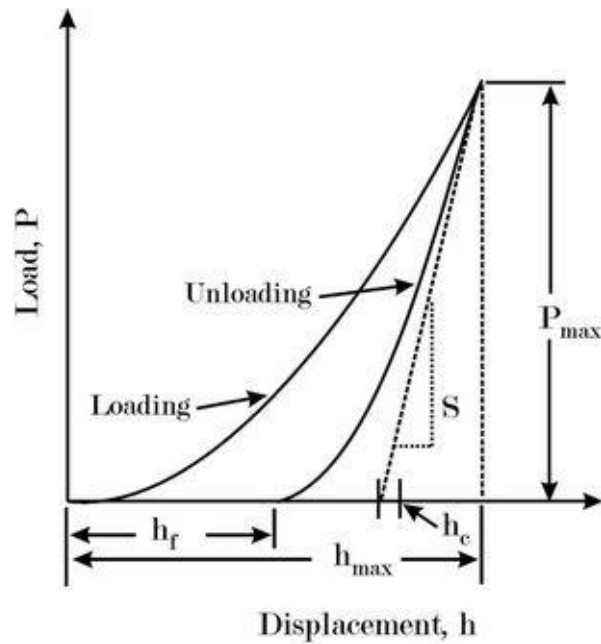
Pro účely této práce jsme si stanovili následující hypotézy:

- 1) Buňky budou lépe přilínat na sklíčka potažené kolagenem než na čistá sklíčka.
- 2) AFM je vhodným nástrojem pro měření mechanických vlastností membrán.
- 3) Hroty s kulovým zakončením jsou vhodné pro silovou spektroskopii
- 4) Oblast pro vyhodnocování FS křivek je maximálně 10 % do hloubky buňky.
- 5) S měkčími nosníky budou vycházet přesnější výsledky.
- 6) Pro malé hloubky vniky (tvrdé materiály) není důležitý tvar hrotu ale jeho ROC, tedy poloměr zakřivení.

### 1.3.2 Alternativní postup

#### Měření nanotvrdosti a moludu pružnosti podle Oliver-Pharr

Nanointendace je řada zkoušek tvrdosti aplikovaných na malé objemy. Ukazuje se, že zatěžovacích křivky materiálů nejsou lineární ani v počátečních stádiích zatěžovací křivky [36]. Základy metody Oliver-Pharr byly původně vytvořeny pro jednofázové materiály v roce 1983 [37] v roce 1992 byla publikována celková studie o této metodě [36]. Metoda Oliver-Pharr je výpočetně složitější, jelikož uvažuje nelineární chování zatěžovacích křivek. Při aplikaci metody Oliver-Pharr na FS křivky je možnost určit Youngův modul pružnosti. Zatěžovací křivky na pevných materiálech mají z obrácenou x-osu proti FS z historických důvodu viz Obr. 1.8.



**Obr. 1.8:** Typická zatěžovací křivka – nanoindentace [38]

Další zdokonalení metody Oliver-Pharr se uvažuje v [39] nazývaný jako invertovaný přístup. Metodika vede k podobným výsledkům, avšak matematicky je to lépe podmíněný problém, což zkracuje výpočetní čas.

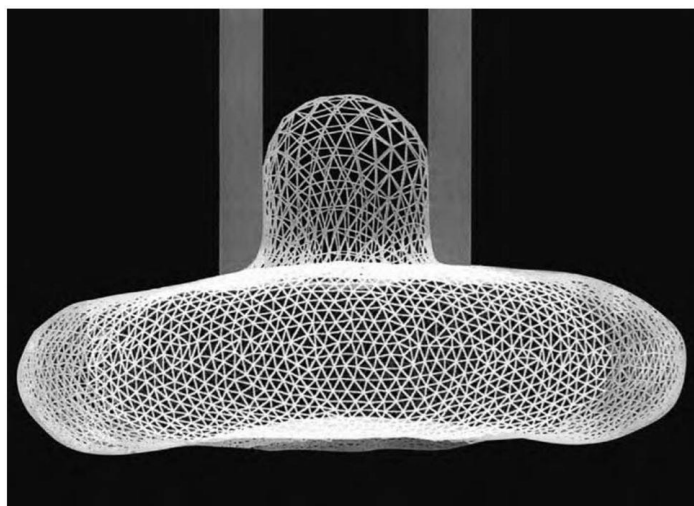
Nanoindentace je přímá metoda pro zjišťování mechanických vlastností materiálu a tloušťky vrstvy [40]. Výsledkem je stanovení mikrotvrlosti (plastické složky) Youngova modulu pružnosti (elastické složky). Grafické znázornění naměřených dat jsou indentační křivky, kde je pozorována závislost síly na hloubce vtisku daného hrotu. Metoda se začala v posledních letech používat i na biologické materiály. V poslední době se vyskytuje název AFM nanoindentace [41], což je v podstatě podmnožina metody silové spektroskopie popsané v této práci. Rozdílné názvosloví záleží především na zjišťovaných parametrech. Pokud je do vyhodnocování zahrnuta i adheze nebo další vlastnosti, tak se mluví o silové spektroskopii. Pro vyhodnocování nanoindentace se může používat nejenom Oliver-Phar, ale samozřejmě i jiné například výše popsaný Hertzův model v kapitole 1.1.4 Hertz model.

## Fluorescence

Studie [33] využívá pro studium mechanismů na membráně fluorescenční mikroskopii a studie [32] využívá fluorescenční korelační spektroskopii a fluorescenční cross-korelační spektroskopii. Fluorescenční metody jsou populární, jelikož je snaha minimalizovat ovlivnění výsledků měřicí metodou. Teoreticky jsou ovlivněny pouze fluorofory označené molekuly nebo molekuly které mají absorpci na dané vlnové délce [42]. Fluorescenční metody se nejvíce rozvinuly s vývojem laserů, detekční techniky a výpočetní techniky.

## Mikropipety

Další možností, jak přímo zjišťovat mechanické síly je využití mikropipet a nasávání membrány. K těmto experimentům se využívají skleněné pipety o tloušťce vnitřním průměru 1 až 10  $\mu\text{m}$ . Buňčinná membrána je nasána do pipety a sleduje se hloubka nasání v závislosti na tlaku nasávání. Výsledkem je porovnání s matematickým modelem viz Obr. 1.9.



**Obr. 1.9:** Matematický model pro červenou krvinku vytvořený z 6110 uzlů [3].

## Optické pinzety

Světlo se skládá z jednotlivých fotonů, které při dopadu na určitou plochu projevuje malou silou. Tato síla je většinou zanedbatelné velikosti ale pro intenzivní fokusované světlo může dosahovat hodnot od jednotek až po stovky pikonewtonů [3]. Díky těmto silám vznikne optická past, pomocí které je možno pohybovat s malými částicemi do velikosti jednotek mikrometrů.

## Mikrorheometrie magnetickou kuličkou

Metoda je založena na rotaci malých magnetických řetězců skládající se z tří až čtyřech nanočástic pod vlivem vnějšího magnetického pole [43]. Zjištění lokální viskozity v cytoplasmě utváří lepší představu o buňce.

## 2 Metody

Kapitola obsahuje metodiku přípravy vzorků na laboratorní sklíčka. Nedílnou součástí této kapitoly je povlakování sklíček a funkcionalizace hrotů proteinem. Na konci kapitoly je představen použitý přístroj AFM a použité hroty.

### 2.1 Použité buňky

Měření v této práci probíhalo na myších fibroblastech, které byly kultivovány v laboratoři z buněčné linie CT26 a 3T3. Pro tento experiment byly použity fibroblasty z důvodu jednoduché kultivace a dobré dostupnosti. Fibroblast hraje hlavní roli v pojivových tkání a produkuje do okolí extracelulární matrix (ECM) [44]. Ve vědecké komunitě se často začíná s výzkumem na fibroblastech. Vlastnosti produkce ECM pomáhá buňce vytvořit přirozené prostředí a zjednodušuje kultivaci [44].

Pro účely experimentu byly použity dva typy buněčných linií, jejichž vlastnosti jsou popsány v tabulce Tabulka 2.1. Buňky byly dostupné v laboratoři biologických vzorků na FBMI ČVUT.

**Tabulka 2.1:** Podrobnosti o použitých buňkách. [45] [46]

Označení	CT26	3T3
Přesný název	CT26.WT (ATCC <sup>®</sup> CRL-2638 <sup>™</sup> )	NIH/3T3 (ATCC <sup>®</sup> CRL-1658 <sup>™</sup> )
Organismus	<i>Mus musculus</i> , myš domácí	<i>Mus musculus</i> , myš domácí
Tkáň	tlusté střevo	embryo
Formát	zmražený	zmražený
Morfologie	fibroblast	fibroblast
Biosafety level	1	1
Choroba	karcinom	zdravý
Věk	N/A	embryo
Kmen	BALB/c	NIH/Swiss

#### 2.1.1 Příprava a kultivace živých buněk

V zásadě byla použita stejná metoda přípravy na všechny biologické vzorky. Fibroblasty CT26 a 3T3 bylo potřeba kultivovat na podložním sklíčku o průměru 25 mm, které je možné vložit do nástavby BioCell<sup>™</sup> od firmy JPK Instruments AG.

Sklička byla nejprve sterilizována a čištěna pomocí 99 % ethanolu ( $C_2H_6O$ ), ve kterém byla ponořena po dobu 10 minut. Poté byla sklička vložena do Petriho misek viz Obr. 2.1, kde se nechala oschnout. Následně proběhlo povlakování sklíček viz kapitola 2.2.1 Povlakování skla.



**Obr. 2.1:** Petriho miska [47]

Buňky byly vyjmuty z mrazícího boxu ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a byly temperovány ve vodní lázni ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Buňky byly z kryozkumavky přepipetovány do centrifugační zkumavky a bylo pomalu přidáváno kultivační médium (DMEM). Následovala centrifugace buněčné suspenze, 5 min, 1100 ot./min. (193 G) a odstranění supernatantu. Tento postup nám zajistí, že se v novém roztoku bude nacházet minimální množství mrazícího roztoku, který sloužil k uchování buněk. Pro tento experiment bylo zapotřebí koncentrace buněk na skličku taková, aby bylo možné najít osamocené buňky. Koncentrace buněk se měří pomocí Bürkerovy komůrky viz Obr. 2.2. Pod mikroskopem se spočítá počet živých buněk v daném objemu a podle toho se roztok s buňkami naředí médiem. Na skličko bylo pipetováno  $50\text{ }\mu\text{m}$  suspenze o koncentraci 500 tisíc buněk/ml. Po 30 minutách se do Petriho misek přidá 1,5 ml kultivačního média. Složení média je popsáno v tabulce Tabulka 2.2. Kultivace buněk probíhala nejméně 24 hodin v termostatickém inkubátoru při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a atmosféře s 5 % frakcí oxidu uhličitého. Před samotným měřením bylo skličko opláchnuto fosfátovým puftrem (pH 7) a při měření byly buňky vloženy do DMEM.



**Obr. 2.2:** Bürkerova komůrka [48], [49]



**Tabulka 2.2:** Složení inkubačního média

Označení	Koncentrace	Přesný název
DMEM	90 %	Živné/kultivační médium DMEM <sup>1</sup> (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s nízkým obsahem glukózy (1000 mg/L) hydrouhličitanu sodného, s L-glutaminem a s fenolovou červení <sup>2</sup> od firmy Sigma Aldrich, USA
FBS	10 %	Fetálním bovinní sérum od firmy Gibco, USA
antibiotika	<1 %	Gentamycin od firmy Sandoz, Švýcarsko

## 2.2 Povlakování

Vitalita buňky může být ovlivněna mnoha faktory. Jedním z faktorů je i kvalita blízkého okolí buňky. Pokud pokryjeme krycí sklíčko materiálem před samotnou inkubací, buňka může vykazovat jiné vlastnosti [50]. Při měření adheze mezi hrotem a buňkou je pozorována vlastnost buněčné membrány přilnout na materiál hrotu. Při pokrytí hrotu určitým materiálem, popřípadě proteinem, se objevuje možnost sledovat vlastnosti buněčné membrány přilnout právě k danému materiálu, popřípadě proteinu.

### 2.2.1 Povlakování skla

Pro úpravu krycích skel o průměru 25 mm byly vybrány dva materiály a to polyethylenimine (PEI) a kolagen typu I.

#### Povlakování pomocí PEI

K povlakování sklíček pomocí PEI byl použit 50 % (hmotnostních procent) roztok polyethyleniminu ve vodě od firmy Sigma-Aldrich s průměrnou molekulovou hmotností  $M_m = 2000 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  označení 408700 [51]. Dále byl připraven borátový pufr (3,1 g kyselina boritá, 4,75 g borax a 1 litr destilované vody 80 °C), kde byla upravena hodnota pH na 8,4 pomocí 1 molární kyseliny chlorovodíkové (HCl). PEI byl rozpuštěn v borátovém pufru na koncentraci 0,05% - 0,1% hmotnostních

V laminárním boxu bylo na čistá sklíčka pipetováno 500  $\mu\text{l}$  roztoku PEI s borátovým puforem. Buňky se inkubovaly při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Poté byly vzorky 10x opláchnuty sterilní destilovanou vodou a sklíčko se nechalo zaschnout. Konečná fáze byla sterilizace pomocí UV světla po dobu 8 hodin.

---

<sup>1</sup> Český překlad se neuvádí. V odborné praxi se používá buď zkratka DME, DMEM nebo živné médium DMEM.

<sup>2</sup> Fenolová červen se používá pro lepší kontrolu stavu média. Při změně barvy je zapotřebí výměna.

## Povlakování pomocí kolageny typu I

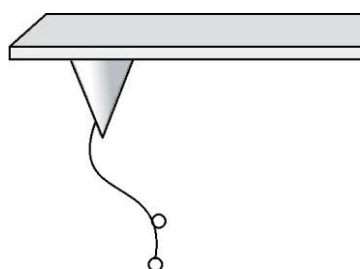
K povlakování sklíčka pomocí kolagenu byl použit kolagen typu I v pevné fázi od firmy Sigma-Aldrich označení C9791 [52]. Kolagen byl rozpuštěn (1 mg/ml) v 0,1 molární kyselině octové na magnetické míchačce po dobu 1 až 3 hodin při pokojové teplotě. Dále bylo 150  $\mu$ l roztoku rozpuštěného kolagenu rozpuštěno 850  $\mu$ l fosfátového pufru (PBS) pH =5,8.

V laminárním boxu byl roztok kolagenu s PBS rozpuštěn ve 20 ml sterilním PBS. Na čistá sklíčka bylo pipetováno 500  $\mu$ l tohoto roztoku. Po 2-3 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C se sklíčka vyndala z roztoku a nechala oschnout. Po oschnutí se sklíčka sterilizovala pomocí UV světla po dobu 8 hodin. Před aplikací buněčné kultury bylo potřeba sklíčka opláchnout fosfátovým pufrům, jelikož na nich zkrystalizovaly zbytky PBS.

### 2.2.2 Povlakování hrotu

Pro úpravu hrotu byl použit protein fibronectin. Pro lepší navázání fibronektinu na hrot se hrot nejprve ponořil do 30  $\mu$ l roztoku o koncentraci 10 mg/ml polyethylenglykol (PEG) po dobu 5 minut. Poté se 4x opláchnul fosfátovým pufrům (PBS). Dále se hrot vložil do 20  $\mu$ l roztoku fibronektinu o koncentraci 1 mg/ml po dobu 1 minuty. Následně se hrot opláchnul 4x pomocí PBS. Pro jednodušší manipulaci s hrotem se využil AFM přístroj, kde možné regulovat posun v jednotkách mikrometrů. To zajistilo namočení převážně hrotu a minimalizuje namočení nosníku, popřípadě měřící hlavy. Pro uvedení hrotu do původní podoby by bylo možné hrot umýt v organickém rozpouštědle například v acetonu, který je rozpustný ve vodě.

Výsledkem funkcionalizace hrotu byl měl být ideálně hrot s jedním navázaným vláknem viz Obr. 2.3.



**Obr. 2.3:** Schéma funkcionalizace hrotu

## 2.3 Přístroje

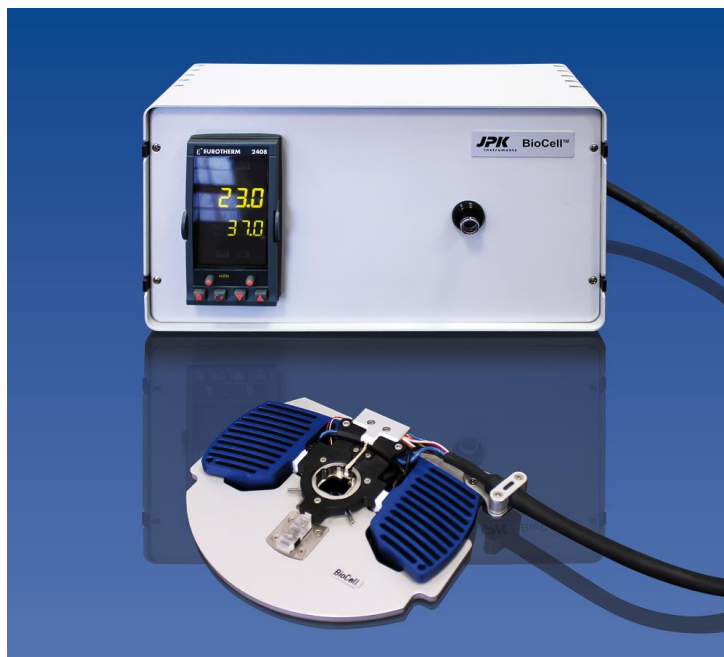
Experiment byl měřen na AFM přístroji od firmy JPK Instruments AG (JPK Instruments AG (Colditzstr. 34-36, Haus 13, Eingang B, 12099 Berlin, Germany) a hroty byly koupené od firmy Applied NanoStructures, Inc. (415 Clyde Avenue, Suite 102,

Mountain View, CA 94043 USA). Obecně se hlavice od AFM přístrojů dělají univerzální, aby bylo možné kombinovat hroty od různých výrobců.

### 2.3.1 Nanowizard od firmy JPK Instruments AG

Přístroj je postaven především k výzkumným účelům v měřítku nanometrů až mikrometrů. Maximální rozsah měření je 100 x 100 x 15  $\mu\text{m}$ , kde nejmenší hodnota odpovídá výšce (maximální měřitelný výchylce nosníku). Pro měření vzorků v kapalině se využívá nástavba BioCell™ viz Obr. 2.4, do které se uchytí sklíčko o průměru 25 mm. Díky této nástavbě se namáčí pouze hlavice s hrotem. Ostatní části přístroje nejsou přizpůsobeny namočení. Nástavba lze připojit k termostatu a udržovat se stabilní teplota v rozsahu od 15 do 50  $^{\circ}\text{C}$  s přesností 0,1  $^{\circ}\text{C}$ . Všechna měření byla prováděna při pokojové teplotě od 22  $^{\circ}\text{C}$  do 24  $^{\circ}\text{C}$ . Přístroj je přimontován na inverzní optický mikroskop s kamerou, která umožňuje vizuální kontrolu samotného hrotu.

Přístroj je dodáván s vlastními pracovními stanicí, která obsahuje počítač se softwaru JPK Instruments pro kontrolu zařízení a záznam dat a JPK Data Processing pro vyhodnocování naměřených dat (AFM a FS). Pro zobrazení AFM dat byl použit freeware program Gwyddion.



Obr. 2.4: Nástavba BioCell™ od firmy JPK Instruments AG [53]

### 2.3.2 Hroty

Hroty byly použity od firmy Applied NanoStructures Inc. Označení a parametry hrotů se nachází v tabulce Tabulka 2.3, kde označení vyplývá z vlastností samotného hrotu/nosníku. Například označení 100 znamená, že nosník je 100  $\mu\text{m}$  dlouhý. Označení

R znamená, že nosník má tvar obdélníka (z anglického rectangular). Označení hrotů závisí na dodavateli. Při výběru hrotu je důležité brát v potaz parametry hrotu i nosníku. Proto je tabulka Tabulka 2.3 rozdělena na dvě části.

**Tabulka 2.3:** Podrobnosti o použitých hrotech. Pro výpočty byly použity průměrné hodnoty.

Označení	HYDRA2R-100N	SHOCONA-B20	HYDRA6R-200NG-SiO2-A
Informace o nosníku			
Materiál	Nitrid křemičitý	Křemík, N-tyt	Nitrid křemičitý
Tvar	Obdélník	Obdélník	Obdélník
Délka	(90 110) μm	(215 235) μm	(190 210) μm
Šířka	(30-40) μm	(41-51) μm	(30-40) μm
Tloušťka	(0,18-0,22) μm	(0,5-1,5) μm	(0,54-0,66) μm
Tuhost <sup>3</sup>	(0,005-0,022) N/m	(0,01-0,60) N/m	(0,019-0,063) N/m
Pokryta reflexní strana	NE	ANO (Al o šířce 50 nm)	ANO (Au o šířce 40 nm)
Informace o hrotu			
Materiál	Křemík	Křemík	SiO <sub>2</sub>
Tvar	Čtyřboká pyramida	Čtyřboká pyramida	Kulička
Výška	(4-6) μm	(14-16) μm	(5-9) μm
ROC <sup>4</sup>	6 nm	6 nm	(5-9) μm
Navázáno na hrotu	NIC	Kulička z Si/HDC <sup>5</sup> o průměru 10-30 nm	NIC

HYDRA hroty jsou používány pro zobrazování měkkých vzorků jak na vzduchu, tak i v kapalině. SHOCONA hroty jsou určeny především pro kontaktní režim a díky reflexní straně poskytují lepší citlivost.

Tuhost nosníku se vypočítá pomocí rovnice dodavatelem

$$k = \frac{E^*wt^3}{4L^3}, \quad (2.1)$$

<sup>3</sup> Tuhost nosníku je počítána pomocí matematického modelu dodavatelem.

<sup>4</sup> ROC je anglická zkratka pro Radius of curvature tedy poloměr zakřivení-

<sup>5</sup> HDC je anglická zkratka pro High Density Carbon tedy vysokohustotní uhlík.

kde  $E^*$  je příslušný modul pružnosti,  $w$  označuje šířku,  $t$  tloušťku a  $L$  délku [54]. Jelikož při výrobě nosníku se používá často krystalický křemík v určité orientaci, tak je potřeba pro anizotropní materiál použít příslušný modul pružnosti pro deformaci v daném směru.

Další možností, jak určit tuhost nosníku je pomocí metody Sader, která využívá rezonanční frekvence nosníku, hustoty prostředí, viskozity prostředí, Q-faktoru, šířky a délky nosníku [55]. Určování tuhosti není předmětem této práce a pro všechny následující výpočty byly použity hodnoty udávané výrobcem.

Pokrytí reflexní strany nosníku zesiluje intenzitu odražených paprsků. Pro měření na vzduchu pokrývání nepředstavuje důležitou roli, avšak při měření v kapalině se paprsek může zeslabit natolik, že to ovlivní samotné měření.

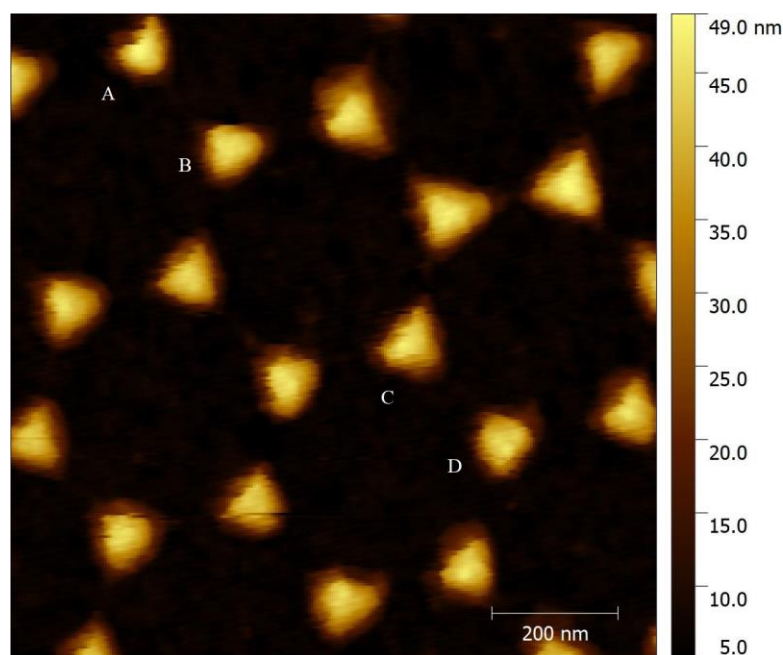
Parametr poloměr zakřivení ROC je důležitý při kontaktu hrotu s materiálem. Při kontaktu ho hloubky menší, než je ROC můžeme tvar hrotu aproximovat kulovou plochou o poloměru ROC.

### 3 Výsledky

Naměřené hodnoty byly vyhodnocovány v komerčně dodávaném programu JPK Data Processing dodávaném k měřicímu přístroji. Obrázky byly zpracovávány v programu Gwyddion. Všechna data byla měřena v kontaktním módu. Všechna měření probíhala nejprve na levnějších hrotech HYDRA2R-100N a poté se postupovalo ke dražším SHOCONA-B20, popřípadě HYDRA6R-200NG-SiO<sub>2</sub>-A.

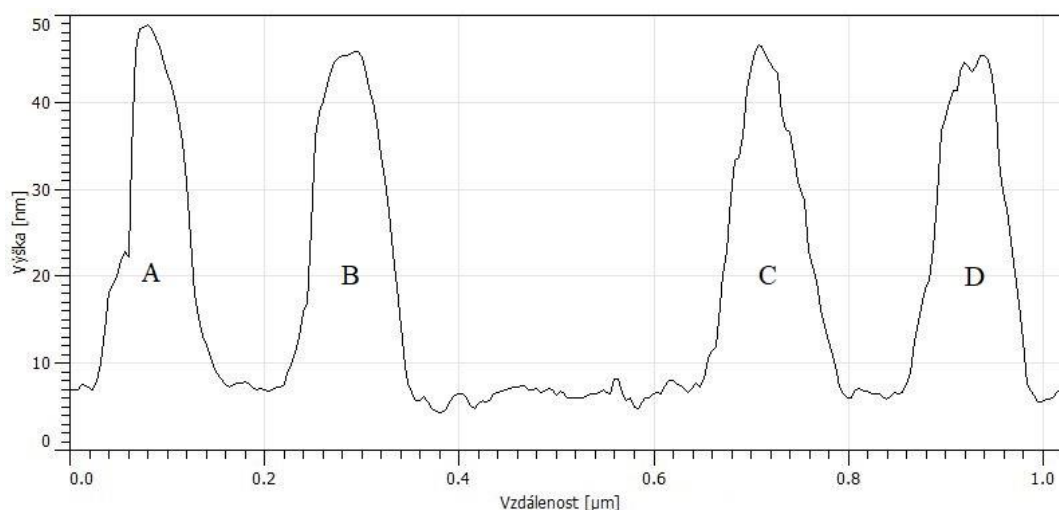
#### 3.1 AFM zobrazování

Jako první experiment bylo zobrazení již známého vzorku viz Obr. 3.1. Pro tyto účely se používá zlatý vzor trojúhelníků. Vzorek se vytváří pomocí deponace tenké vrstvy na vzorek, který je pokrytý skleněnými kuličkami o definovaném průměru. Prvotní měření slouží k seznámení se s přístrojem, popřípadě s novými hroty.



**Obr. 3.1:** Zlatý trojúhelníkový vzor. 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ , 256 x 256 pixelů, měřeno hrotem SHOCONA-B20 v kontaktním módu

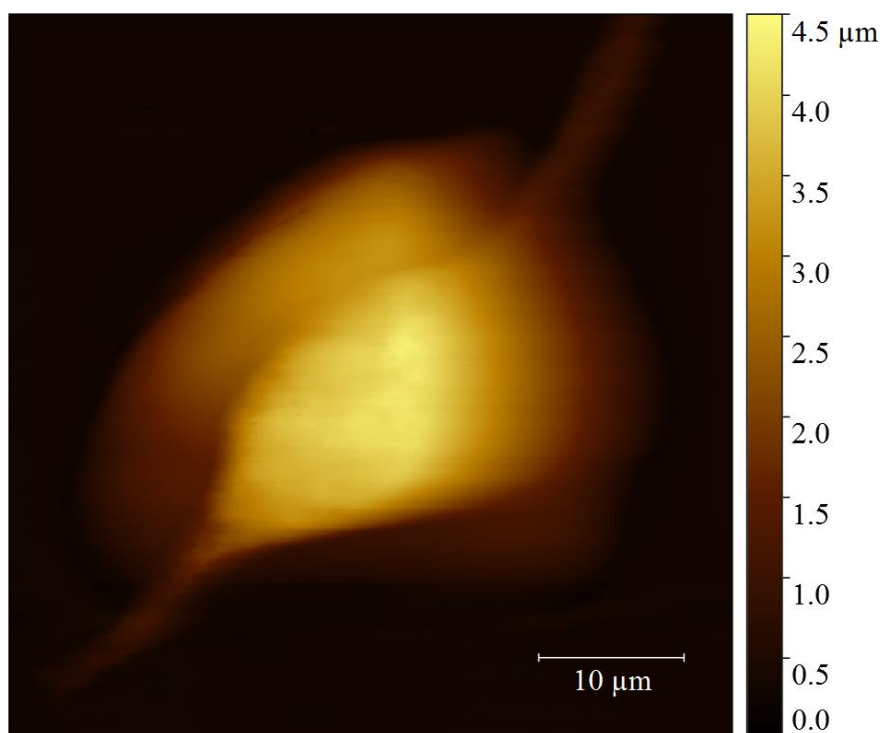
Pro lepší zobrazení výškového profilu byl zobrazen řez čtyřmi vrcholy do Obr. 3.2. Zobrazené vrcholy jsou na obou obrázcích pojmenovány jako A B C a D.



**Obr. 3.2:** Profil zlatého vzoru.

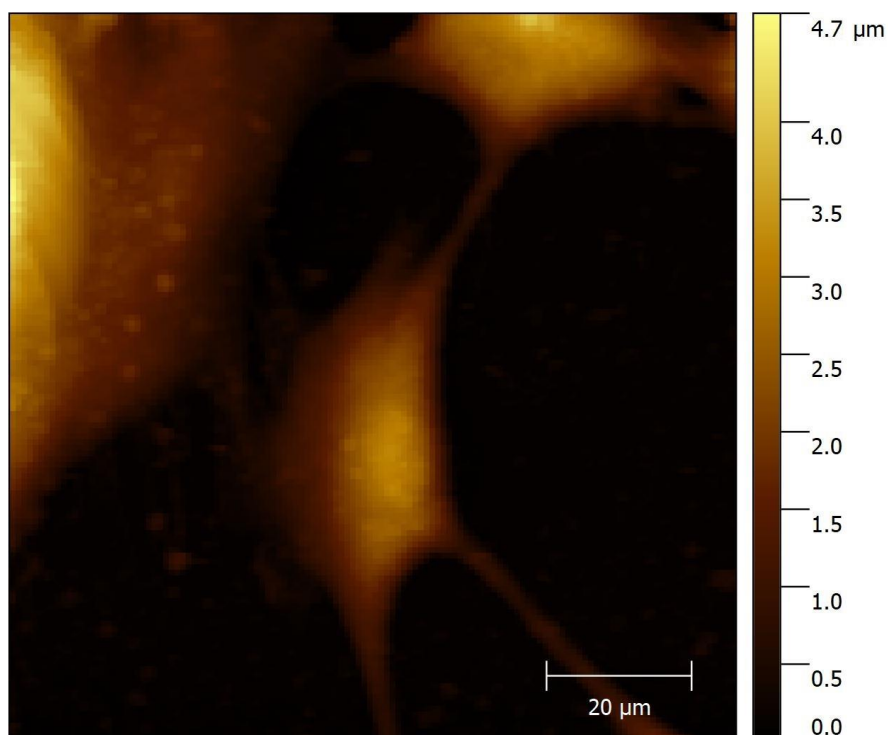
### 3.1.1 Fixované buňky

Další fází experimentu bylo namočení hrotu do kapaliny a měření čistého sklíčka v kapalině. Měření sloužilo pouze k obeznámení změn. První vzorky buněk byly připraveny CT26 a po 48 hodinové inkubaci byly fixovány pomocí alkoholu a vloženy zpět do PBS. Vzorků bylo připraveno 8 a byly uchovány v chladničce. Vzorky sloužily k prvotním měřením na buňkách. První obrázek buňky naměřený hrotem HYDRA2R-100N je možný pozorovat na Obr. 3.3.



**Obr. 3.3:** Fixovaná buňka CT26. 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ , 1024 x 1024 pixelů, měřena hrotem HYDRA2R-100N v kontaktním módu v PBS

Následně byla zobrazena buňka 3T3 fixovaná v alkoholu viz Obr. 3.4. Na okrajích jsou vidět další dvě buňky. Záměrně byly pro měření vybírány osamostatněné buňky.

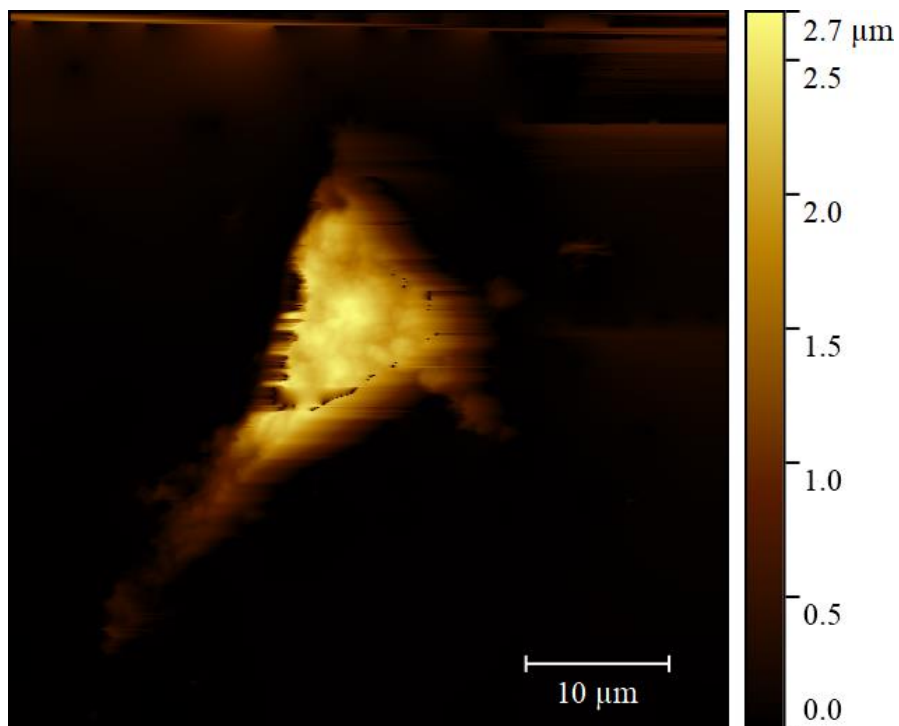


**Obr. 3.4:** Fixovaná buňka 3T3. 100 µm x 100 µm, 256 x 256 pixelů, měřena hrotem HYDRA6R-200NG-SiO<sub>2</sub>-A v kontaktním módu v etanolu

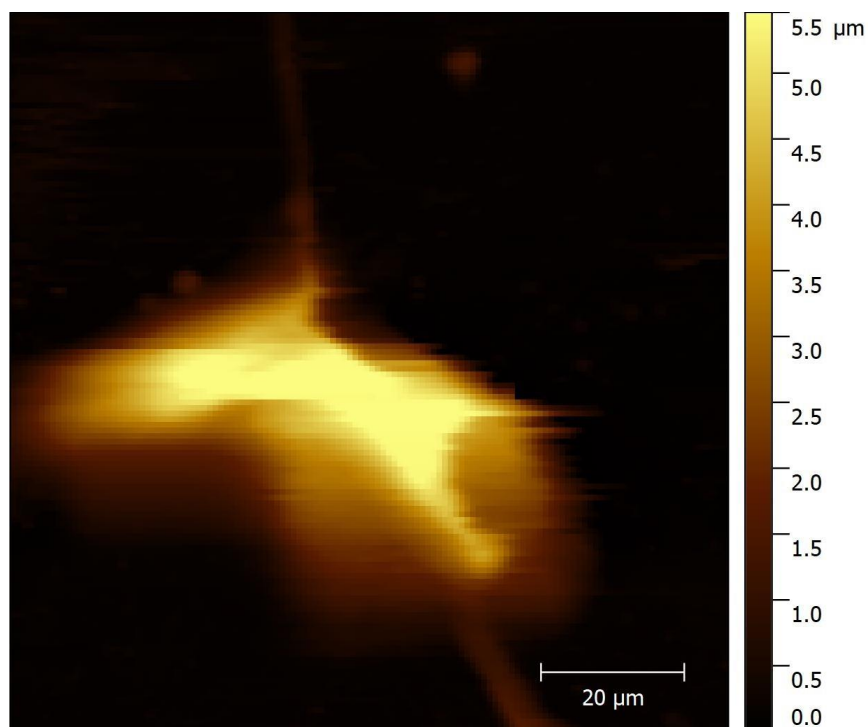
### 3.1.2 Živé buňky

Po seznámení s přístrojem a hroty bylo na čase začít měřit živé buňky. Byly připraveny dvě sady buněk CT26 a 3T3 s rozdílnými povrchy PEI a kolagen typu I. Všechny kombinace byly pozorovány při měření. První měření, které se povedlo realizovat bylo na buňkách 3T3 na kolagenu typu I viz Obr. 3.5. Dále se povedlo realizovat měření živých 3T3 buněk na PEI viz Obr. 3.6. Buňky CT26 se nepovedlo zobrazit, jelikož se během měření vždy poničily samotným hrotem.





**Obr. 3.5:** Živá buňka 3T3.Kultivována na kolagenu typu I 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ , 512 x 512 pixelů, měřena hrotem HYDRA2R-100N v kontaktním módu v PBS



**Obr. 3.6:** Živá buňka 3T3.Kultivována na PEI 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ , 128 x 128 pixelů, měřena hrotem HYDRA6R-200NG-SiO<sub>2</sub>-A v kontaktním módu v PBS

## 3.2 Silová spektroskopie

Křivky byly měřeny s následujícími parametry:

Rychlost přibližování ke vzorku = 1  $\mu\text{m/s}$

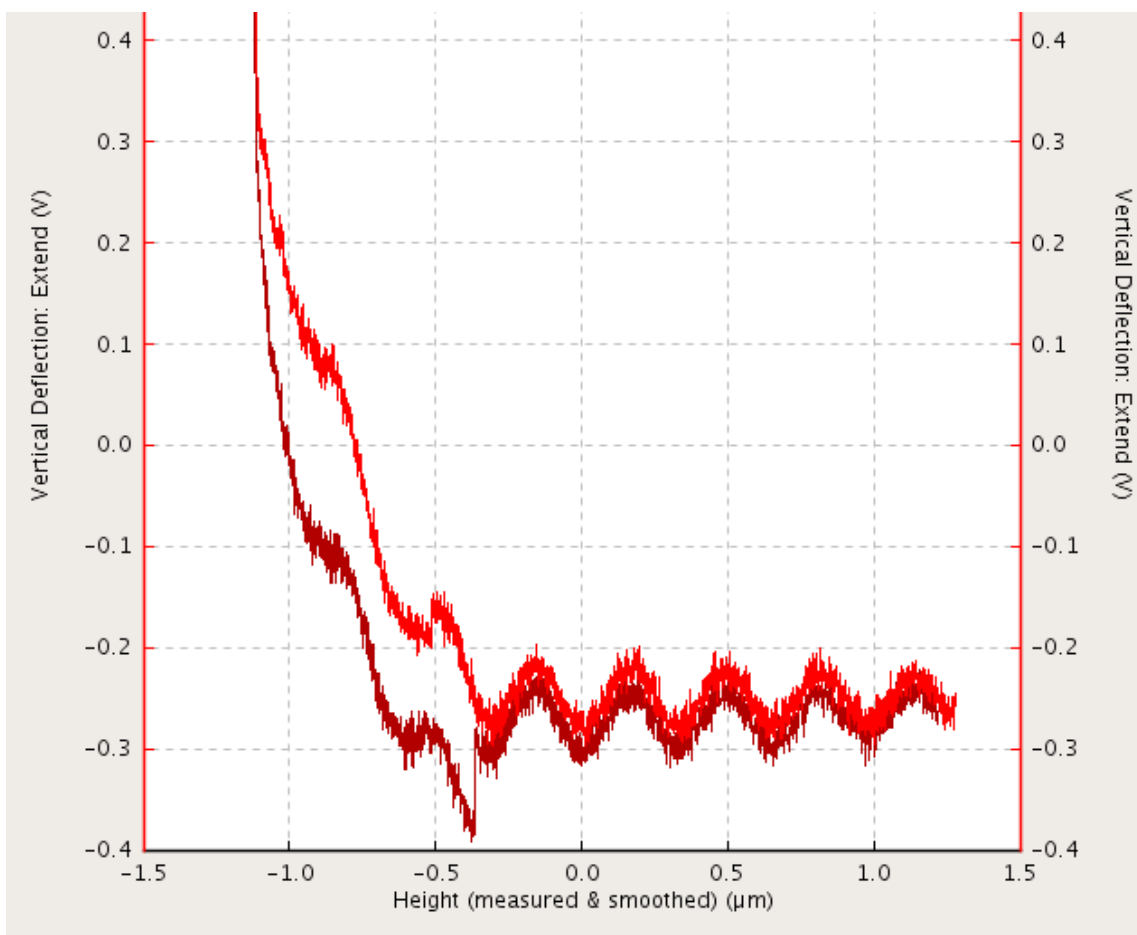
Maximální vertikální prohnutí = 0,8 V

Čas setrvání v kontaktu = 500 ms

Rychlost oddalování od vzorku = 1  $\mu\text{m/s}$

Pauza mezi jednotlivými měření = 0 ms

Nastavení přístroje pro měření silové spektroskopie probíhalo nejprve na hrotech HYDRA2R-100N. Velmi častým jevem, který se objevoval během měření byla sinusová základní křivka viz Obr. 3.7. Během měření bylo často pozorováno neobvyklé chování stopy laserového svazku na fotodiodě (opisování kružnice) při přibližování a oddalování měřící hlavy. Všechna tato data nebyla vyhodnocována.



**Obr. 3.7:** Neobvyklé chování při přibližování a oddalování

### 3.2.1 Kalibrace na skle

Kalibrace probíhala vždy na krycím sklíčku. Byla měřena buď čistá sklíčka nebo s buňkami. Původní záměr změřit různé materiály před měřením živých buněk se neuskutečnil realizovat, jelikož měření jiných materiálů doprovázelo několik komplikací. Nejzásadnější komplikace byl statický náboj na vzorečku, přes který nebylo možné přiblížit hrot ke vzorku. Přístroj Nanowizard od JPK Instruments je především stavěn na tenké vzorky, jelikož je namontován na inverzním mikroskopu, pomocí kterého můžeme sledovat měřící hrot během měření.

#### Porovnání fitování

Na krycím skle bylo naměřeno sto bodů v prostoru  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ . Data byla vyhodnocena pomocí Hertzova modelu, a to konkrétně rovnice (1.7) a (1.10). Parabolický model počítán s  $\text{ROC} = 10\ \text{nm}$  a pro čtyřbokou pyramidu byl použit úhel  $31^\circ$  pro úhel hrany, který byl změřen z obrázku. Výsledná data jsou zobrazena v tabulce Tabulka 3.1.

**Tabulka 3.1:** Porovnání Hertzova modelu na skle – 100 naměřených bodů – hrot: HYDRA2R-100N

Metoda	Paraboloid ( $\text{ROC} = 10\ \text{nm}$ )	Čtyřboká pyramida ( $31^\circ$ )
První kvartil (lower quartile)	655 109 Pa	648 857 Pa
Druhý kvartil (median)	685 401 Pa	711 967 Pa
Třetí kvartil (upper quartile)	702 453 Pa	743 012 Pa
Směrodatná odchylka	33 326 Pa	63 532 Pa

Toto měření bylo zopakováno s jiným hrotem HYDRA2R-100N ze stejné krabičky na stejném sklíčku, avšak pouze na dvou sériích po 16 bodech na ploše  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ . Vyhodnocování proběhlo přesně podle stejného postupu a výsledky jsou zobrazené v tabulce Tabulka 3.2.

**Tabulka 3.2:** Porovnání Hertzova modelu na skle – 2 x 16 naměřených bodů – hrot: HYDRA2R-100N

Metoda	Paraboloid ( $\text{ROC} = 10\ \text{nm}$ )	Čtyřboká pyramida ( $31^\circ$ )
První kvartil (lower quartile)	253 882 Pa	231 910 Pa
Druhý kvartil (median)	258 321 Pa	235 930 Pa
Třetí kvartil (upper quartile)	267 836 Pa	250 018 Pa
Směrodatná odchylka	11 187 Pa	16 977 Pa

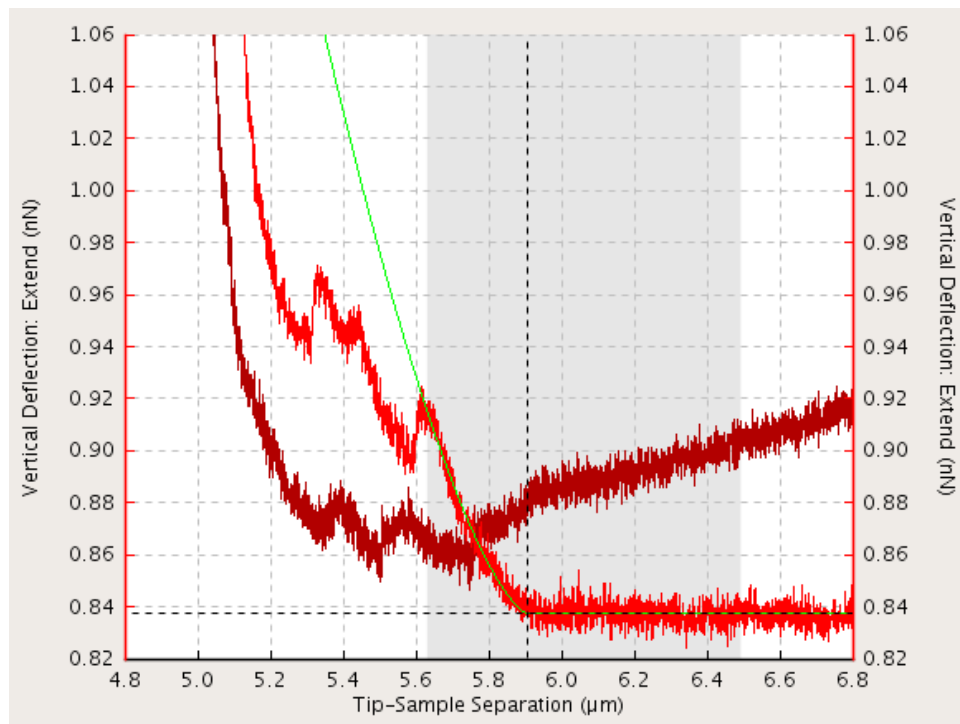
### 3.2.2 Youngův modul buňky

Byly připraveny dvě sady buněk 3T3 a CT26 na dvou různých podložích PEI a kolagen typu I v PBS. Jako kontrolní vzorek byly použity fixované buňky v alkoholu. Byla změřena sada šestnácti FS křivek na vrcholu buňky pro 3T3 a obě podloží. Buňky CT26 nebyly bohužel z časové náročnosti naměřeny. Výsledky jsou zobrazené v tabulce Tabulka 3.3.

**Tabulka 3.3:** Porovnání podloží u buněk 3T3 – 16 bodů – hrot: HYDRA6R-200NG-SiO2-A

Povlakování	Fixované	Kolagen	PEI
První kvartil (lower quartile)	58.00 Pa	30.85 Pa	147.31 Pa
Druhý kvartil (median)	130.97 Pa	58.69 Pa	201.95 Pa
Třetí kvartil (upper quartile)	289.25 Pa	143.54 Pa	268.66 Pa
Směrodatná odchylka	184.57 Pa	86.08 Pa	126.70 Pa

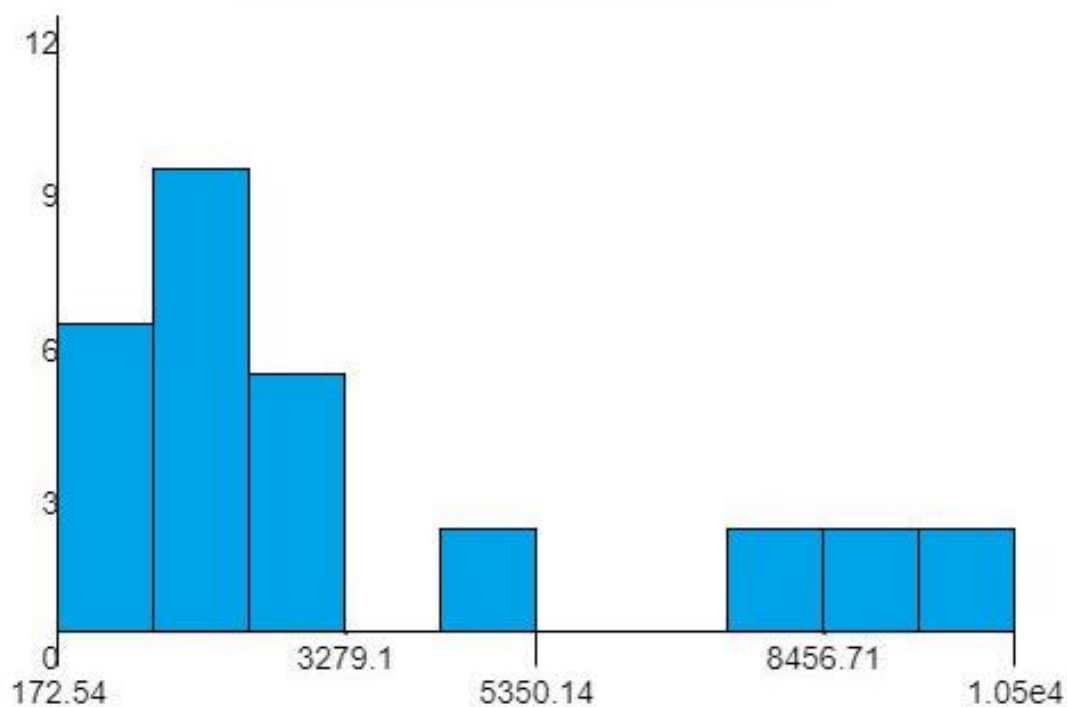
Jako poslední byl použit hrot SHOCONA-B20, který byl opatřen malou kuličkou (20 nm) na konci špičky hrotu. Pro tento hrot bylo využito Hertzova modelu pro paraboloid rovnice (1.7). Při průzkumu dat byl vždy pozorován jeden malý skok hned po kontaktu viz Obr. 3.8. Všechna data byla tedy vyhodnocována pouze do toho skoku. Byly naměřeny dvě buňky rozdílné velikosti stejným hrotem. 3T3 buňky byly záměrně vybrány podle velikosti, avšak jejich obrázky nebyl pořízen. Vypočtený Youngův modul pružnosti z těchto dat je zobrazen v tabulce Tabulka 3.4. Hodnoty mají velký rozptyl, proto zobrazení dat z malé buňky 3T3 byl využit histogram viz Obr. 3.9. Jelikož se několik bodů u malé buňky odchyluje od průměru, byly tyto body vyřazeny a statistika byla spočtena znova v tabulce Tabulka 3.5.



**Obr. 3.8:** Oblast vyhodnocování (šedě) pro hrot SHOCONA-B20

**Tabulka 3.4:** Porovnání buněk 3T3 podle velikosti – 28 bodů – hrot: SHOCONA-B20

Buňka	Malá 3T3	Velká 3T3
První kvartil (lower quartile)	1 360 Pa	265.5 Pa
Druhý kvartil (median)	2 135 Pa	352.5 Pa
Třetí kvartil (upper quartile)	5 069 Pa	426.5 Pa
Směrodatná odchylka	3 038 Pa	126.2 Pa



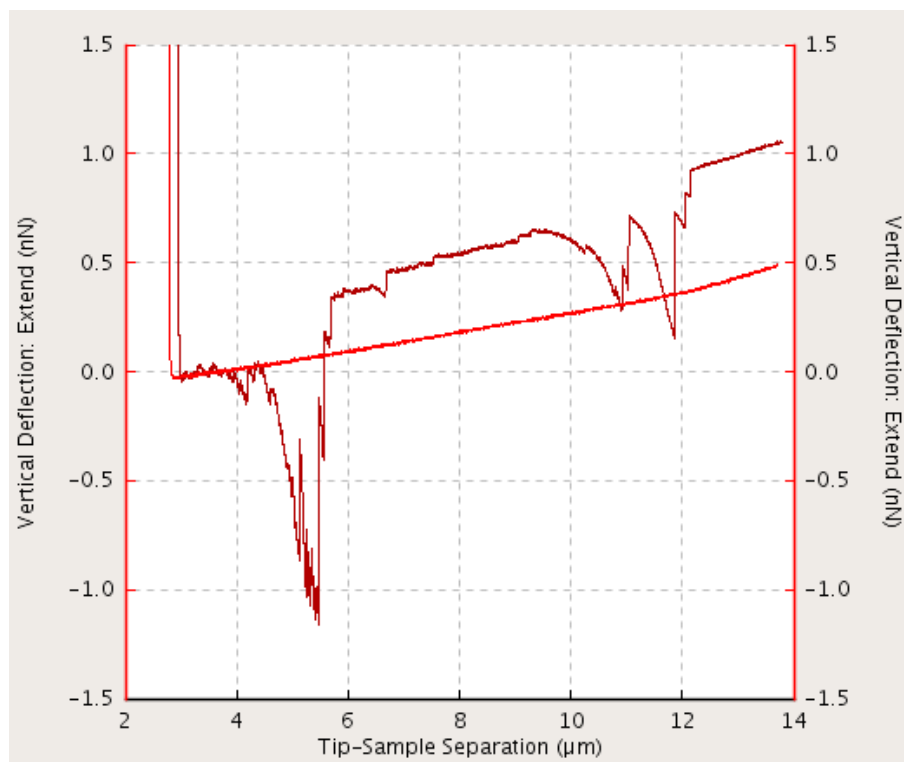
**Obr. 3.9:** Histogram Youngova modulu pružnosti malé buňky 3T3 měřenou hrotem SHOCONA-B20 v PBS

**Tabulka 3.5:** Youngův modul malé buňky – selektivní body podle histogramu (0 až 4000 Pa)

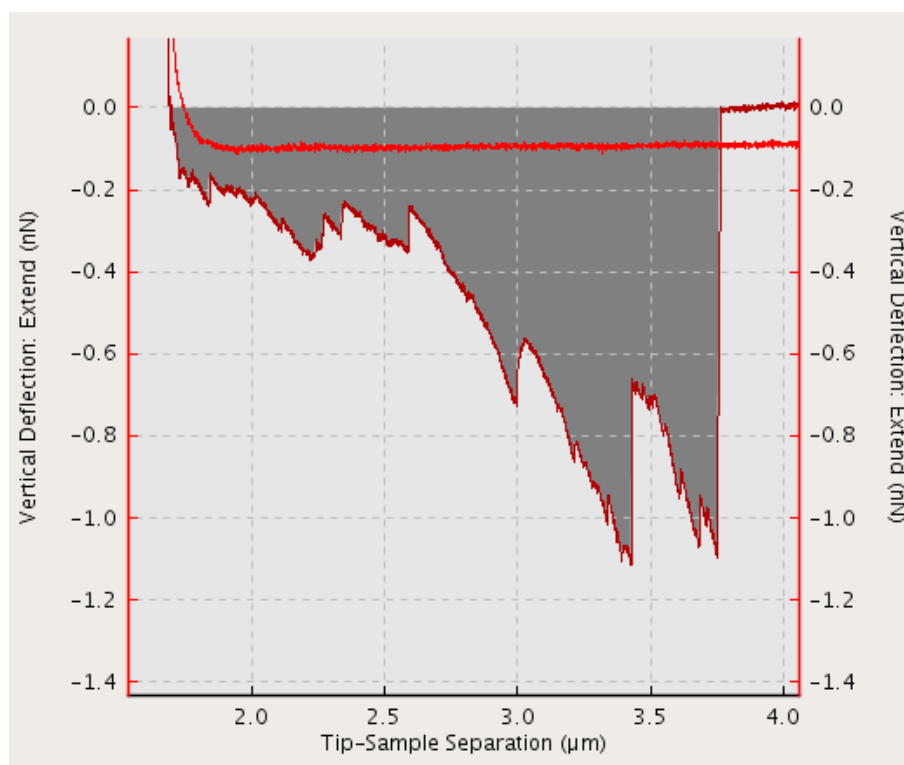
Buňka	Malá 3T3
První kvartil (lower quartile)	1110 Pa
Druhý kvartil (median)	1680 Pa
Třetí kvartil (upper quartile)	2197 Pa
Směrodatná odchylka	641 Pa

### 3.3 Adheze

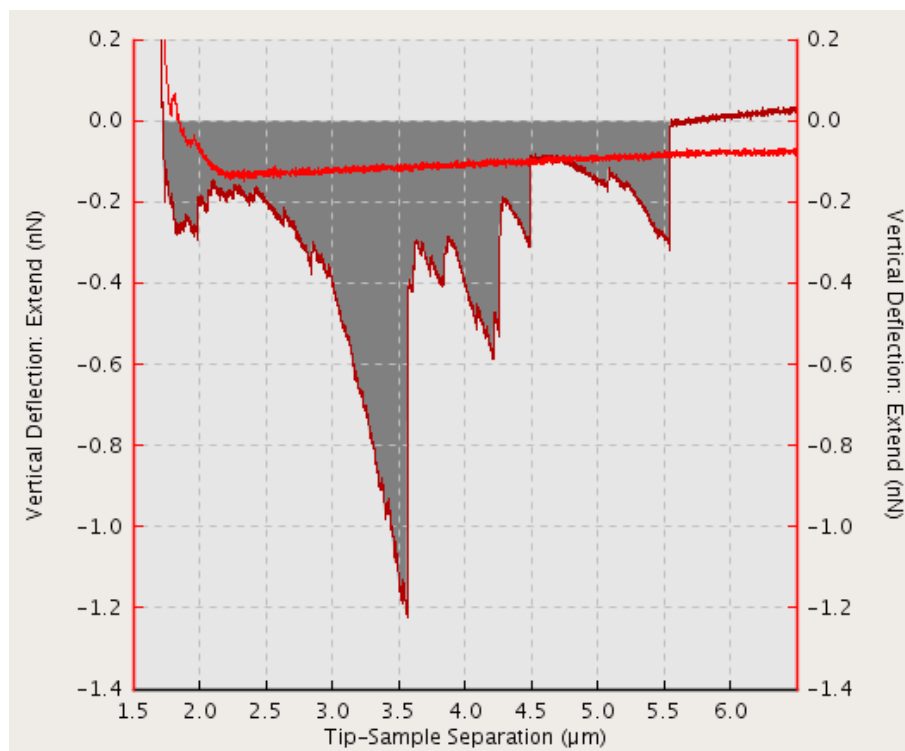
Posledním krokem byla funkcionalizace hrotu SHOCONA-B20 navázáním fibronectinu. Mnoho křivek bylo ovlivněno neznámým faktorem, který zapříčinil, že oddalovací křivka nebyla vodorovná viz Obr. 3.10. Proto měření práce (obsahu po křivkou) nebylo dále vyhodnocováno. Za celé měření se naskytlo změřit dvě ucházející křivky zobrazené na obrázcích Obr. 3.11 a Obr. 3.12. Nakloněné křivky však nebrání výpočtu jednotlivých skoků. Skokem nazýváme jednoduché odtrhnutí u oddalovací křivky (angl. jumps). Ze všech naměřených křivek bylo vyhodnoceno 335 skoků a ty jsou zobrazeny v histogramu viz Obr. 3.13 a v tabulce Tabulka 3.6.



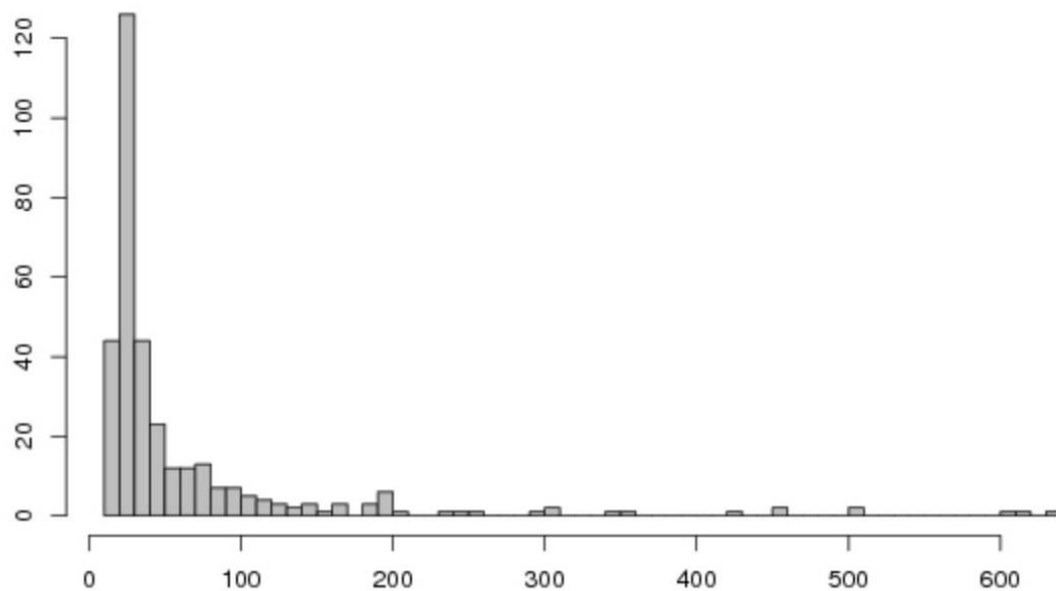
**Obr. 3.10:** Data ovlivněna systematickou chybou – Odtržení hrotu s fibronectinem od buňky 3T3.



**Obr. 3.11:** Fibronectin – 3T3: Práce potřebná pro odtržení funkcionalizovaného hrotu (1,05 fJ)



**Obr. 3.12:** Fibronectin – 3T3: Práce potřebná pro odtržení funkcionalizovaného hrotu (1,24 fJ)



**Obr. 3.13:** Histogram naměřených skoků fibronectinu od buňky 3T3. Interval na ose x = 10 pN



**Tabulka 3.6:** Skoky odtrhávání fibronectinu od buňky 3T3 (pN)

První kvartil (lower quartile)	22,18 pN
Druhý kvartil (median)	29,63 pN
Třetí kvartil (upper quartile)	64,23 pN
Směrodatná odchylka	91,48 pN

## 4 Diskuse

### 4.1 Přístroj a hroty

Seznámení s přístrojem NanoWizard probíhalo pomocí základních měření známých vzorků viz Obr. 3.1. První komplikace přišli s manipulací a upnutím nástavby s hrotem do měřicí hlavy. Přibližování hrotu ke vzorku probíhalo automaticky a nepředstavovalo větší problém. Při měření v kapalinách se musel adjustovat laserový paprsek po ponoření hlavy do kapaliny. Příprava přístroje zabrala maximálně 10 minut pro zkušeného laboranta.

#### 4.1.1 Volba módu měření AFM

Při zobrazování pomocí AFM je možné volit mezi dvěma základními módy, a to kontaktní a nekontaktní (AC). AC mód by měl přinést ostřejší obrázky a nižší opotřebení hrotu. Jelikož měření neprobíhalo na pevných látkách, byla zvolena metoda měření AFM v kontaktním módu.

AC mód je založen na kmitáním nosníku těsně na povrchem. Změna výšky se pozoruje se změnou rezonanční frekvence. Tuhost nosníku a rezonanční frekvence není přesně měřena a je vypočtena od výrobce. V případě, že bychom chtěli měřit v kapalině, tak bychom museli rezonanční frekvenci přepočítat podle viskozity a hustoty dané kapaliny. Pro nastavení přístroje by měla stačit přibližná hodnota frekvence. Přístroj umožňuje zobrazit celé spektrum a zároveň i s fází. Teoreticky je tedy možné měřit ve vodním prostředí v AC módu bez omezení. Praktické ověření toho tvrzení nebylo ověřeno.

Během tohoto experimentu bylo skenováno rychlostmi od 1 vteřiny po 2 vteřiny na jeden řádek. Při vyšších rychlostech nebylo s hrotem dostatečně rychle přivednuto a hrot zavádil tak velkou silou o buňku, že se buňka odtrhla během měření. Tato skutečnost byla zapříčiněná nevhodnou volbou zpětné vazby v kombinaci s hrotem. Zvýšení zpětné vazby zpřesňuje naměřená data do určitého bodu. Při následném zvyšování zpětné vazby se začínou projevovat typické artefakty měření.

#### 4.1.2 Volba hrotu a nosníku

Před měřením je potřeba se zvolit hrot a příslušný nosník. Většina dodavatelů hrotů má možnosti filtrování podle funkce. Obecné požadavky, které byly požadovány při skenování buněk, jsou měkký nosník s nízkou tuhostí. Pokud by byl použit tuhý norník, buňka by nebyla schopna svými mechanickými vlastnostmi vychýlit nosník. Další důležitým parametrem je délka hrotu. Pokud bychom použili hrot s menší délkou, než je výška buňky, buňka by byla utržena samotným nosníkem. V případě utržení buňky se často stávalo, že buňka přilne právě na nosník. V tuto chvíli měření končí, jelikož nelze

měřit další buňky. Očištění nosníku s hrotem nebylo provedeno. Pokud chceme s hrotem měřit i silovou spektroskopii, tak je důležitý dobře definovaný tvar hrotu.

## 4.2 Zobrazování buněk pomocí AFM

Zobrazování buněk v kapalném prostředí bylo naprosto stejné jako měření jiných vzorků. Hlavní rozdíl byl především ve velkých převýšení na malé vzdálenosti. Jak je vidět na obrázku Obr. 3.3 bylo pozorováno převýšení více než 4  $\mu\text{m}$  na vzdálenosti 20  $\mu\text{m}$ . To zapříčinilo že na pravé straně není vidět morfologie a byla pozorována jen nakloněná plocha. Tento artefakt by se dal odstranit pomalejším měřením, avšak tento sken probíhal více než 40 minut. Cíl je spíše zkrátit dobu měření. Možnosti v samotném nastavení měření nebyly nalezeny.

Pro zobrazování buněk bych navrhnul změnit softwarové ovládání měřící hlavy, a to následujícími způsoby. Před samotným skenování by proběhl jeden hrubý sken, který by zjistil, kde jsou největší výškové změny. Tyto změny by byly očekávány a bylo by odstraněno pomalé zpětné vazby, která zřejmě nestíhá reagovat. Další zpřesnění by bylo, kdyby měřící zařízení předpokládalo změnu výšky z předchozího řádku skenu. Obě tyto řešení se dotýkají základu celé metody. Proto navrhuji jednodušší řešení, a to je proměnlivá rychlost skenování. Většina naskenovaných obrázků výše obsahuje velkou rovnou plochu, která je se skenuje se stejnou rychlostí jako složitá morfologie buňky. Na těchto rovných plochách by se mohl ušetřit čas pomocí rychlého skanu. Samotná buňka by se skenovala s nižší frekvencí.

## 4.3 Silová spektroskopie

V první řadě bych chtěl připomenout ztracená data viz Obr. 3.7. Během měření silové spektrometrie se neočekávaně stávalo, že místo rovné úsečky na ose  $x$  se zobrazila vlnovka pravidelné sinového tvaru. Při pozorování aktuální pozice laserového svazku byl vidět krouživý pohyb po fotodiodě. Krouživý pohyb se pak promítnul do jedné osy (vertikální výchylka) jako pravidelný sinus. Příčina tohoto problému nebyla nalezena a projevy se objevovaly včera nahodile. Úprava jednoduchým odečtením nebyla provedena, jelikož jsme nedokázali stanovit hypotézu, která zapříčiňuje tento nepříjemný artefakt. V návodu k přístroji tento problém nebyl nijak zmíněn a ve vyhodnocovacím programu nebyla přednastavená funkce na odečtení složitější základní křivky (base line).

Pro výpočet Youngova modelu pružnosti byl zvolen Hertzův model. Model předpokládá homogenní nekonečnou deformovatelnou polovinu, do které je vtlačována nedeformovatelný hrot tvaru paraboloidu rovnice (1.7). Tato metoda se pro vyhodnocení jeví jako výpočetně nenáročná, jelikož naměřená data proložíme křivkou se třemi volnými parametry (Youngův modul, bod kontaktu a základní hladina).

### 4.3.1 Kalibrace na skle

Před samotným měřením buněk bylo potřeba ověřit měřící zařízení. Kalibraci na známých vzorcích nebyla realizována, jelikož vzorky byly nabity statickou elektřinou a měkký nosníky se prohýbaly při vzdálenosti několika milimetrů. Zbývala tedy kalibrace na skle. Nejprve byly vyhodnocovány data ze skla pro hrot HYDRA2R-100N. Byly použity dvě metody a to Hertzův model pro paraboloid a Sneddonův model pro pyramidu. Výsledný medián Youngova modulu pro obě metody vyšel kolem 700 kPa viz tabulka Tabulka 3.1. Sneddonův model měl větší rozptyl výsledků, což napovídá tomu, že model odpovídá hůře skutečnosti. Experiment byl zopakován s menším počtem dat, avšak se stejnou metodou výpočtu. Měření proběhlo taktéž s hrotem HYDRA2R-100N, který pocházel ze stejné série/krabičky. Výsledky se liší především v absolutní hodnotě Youngova modulu kolem 250 kPa.

Podle očekávání se potvrdilo, že Hertzův model má nižší rozptyl výsledných dat při vtlačování do skla a tím byla potvrzena hypotéza číslo 6 o malých hloubkách průniku. Další část, kterou můžeme pozorovat v tabulkách Tabulka 3.1 a Tabulka 3.2 je že hodnoty mediánů se navzájem liší. Jestliže ROC bylo zadané výrobcem, tak úhel hrany můžeme určit tak, aby se hodnoty mediánů tolik nelišily. Úhel  $31^\circ$  byl změřen z obrázku dodaného od výrobce hrotu.

Pro další výpočty bylo sklíčko považováno jako absolutně tvrdé těleso a senzitivita přístroje byla nastavena tak aby korekce naměřené výšky viz Obr. 1.5 byla absolutně kolmá. Zde se dopouštíme asi jedné z největších chyb a to takové, že sklíčko není absolutně tvrdý předmět, a dále sklíčko není poloprostor, ale je to vrstva, která se může prohnut. Této chyby bylo dopouštěno vědomě, jelikož to přibližně nastavuje absolutní hodnoty. Dalším parametrem, kterým se nezaobíráme je Poissonovo číslo. Hodnota Poissonova čísla se nastavuje 0,5 podle literatury. Změna této hodnoty neovlivní tvar funkce Hertzova modelu rovnice (1.7), ovlivní pouze výslednou hodnotu Youngova modulu.

### 4.3.2 Závislost mechanických vlastností buňky na blízkém okolí

Hypotéza číslo 1 o rozdílných vlastnostech buňky v závislosti na podloží. Během pořizování obrázků se nejvíce odolné buňky jevíly 3T3 na PEI. V tabulce Tabulka 3.3 pozorujeme shodu, kde buňky kultivované na PEI mají dokonce vyšší hodnotu Youngova modulu než buňky fixované. V hypotéze jsme předpokládali, že buňky nejlépe budou přilínat na kolagen, což se nepotvrdilo. Pokud bylo sklíčko pokryto pomocí PEI buňky vykazovaly odolnější vlastnosti.

Další ověřením tohoto tvrzení může být fakt, že skenování fixovaných buněk je více odolné i v řádu několika desítek minut. Při skenování živých buněk je potřeba nastavit nižší rozlišení (kratší měřící čas) pro vygenerování snímku bez poškození buňky. Při

delších časech skenování se vždy živá buňka odtrhla. Buňky kultivované na PEI často vydržely celé skenování viz Obr. 3.6.

### 4.3.3 Měření mechanických vlastností buněčné membrány

Hypotéza číslo 2 o použití AFM a silové spektroskopie byla ověřena až pomocí hrotů SHOCONA-B20, které mají malou kuličku na konci hrotu. Na FS křivkách viz Obr. 3.8 bylo vidět proniknutí hrotu do buňky přibližně po 200 nm deformaci vzorku. AFM s kombinací FS umožnilo naměření jedné buňky na několika místech. Vyhodnocování však nebylo zautomatizováno a musel se každý rozsah pro prokládání nastavovat ručně. Výsledky Youngova modulu pro dvě buňky 3T3 jsou zapsány v tabulce Tabulka 3.4, kde pro malou buňku bylo několik hodnot mimo rozsah. Proto byly se statistiky odebrány a nové výsledky byly zapsány do tabulky Tabulka 3.5. Výšší hodnoty tuhosti byly zřejmě způsobeny lokální individualitou například nacházející se jádro těsně nebo jiná organela pod membránou, popřípadně měření mechanické vlastnosti specifického proteinu, jelikož rozměr špičky hrotu byl pouze 20 nm. Větší buňka tyto nejasnosti ve vyhodnocených datech neobsahovala.

Hypotéza číslo 3 o vhodnosti kulových hrotů je tímto potvrzena a veškerá naměřená data pro hrot SHOCONA-B20 měla nejlepší shodu s experimentem. Otázkou však zůstává výběr nejvhodnější velikosti. Pro větší hroty předpokládáme, že se lokální nejasnosti budou ztrácet.

Hypotéza číslo 4 předpokládá, že vyhodnocování křivek by mělo probíhat pouze do hloubky 10 % z výšky dané buňky. Toto tvrzení dává pouze obecnou představu. Vyhodnocování bychom tedy doporučovali pouze do prvního skoku u zatěžovací křivky.

## 4.4 Povlakování hrotů EMC proteinem

Pro povlakování hrotu byl vybrán EMC protein fibronectin. Při postupu z kapitoly 2.2.2 Povlakování hrotu nastal velice zásadní problém. Hroty HYDRA2R-100N ani HYDRA6R-200NG-SiO<sub>2</sub>-A nevydrželi pevnost fibronectinu a při vytahování z roztoku se nosníky ohnuly. Došlo k trvalé plastické deformaci a pro následné měření nemohli být použity. Proto byl využit pouze hrot SHOCONA-B20 s tuhostí nosníku 0,14 N/m. Tím se dostáváme k hypotéze číslo 5 o přesnějších výsledcích s měkčími nosníky. Dalším problémem i pro tužší nosník představuje rozsah měření pouze 15  $\mu\text{m}$ , Na Obr. 3.10 je možné pozorovat, že kontakt s buňkou proběhl ve výšce přibližně 3  $\mu\text{m}$  a úplné odtržení fibronectinu téměř při 13  $\mu\text{m}$ . To nám udává, že byl pro takto tuhý nosník využit téměř celý rozsah měření. Z těchto poznatků můžeme usoudit závěr, že pro funkcionalizaci hrotu je zapotřebí nosník s minimální tuhostí, která nám zajistí, že měřicí rozsah bude dostatečný. Tato skutečnost závisí převážně na použitém proteinu.

Většina naměřených dat byla zatížena systematickou chybou při oddalování. Program dodávaným výrobcem není schopen odečíst základní hladinu (base line) jako lineární přímkou. Příčina systematické chyby nebyla nalezena.

Posledními vyhodnocenými daty bylo zjištění jednotlivých skoků při oddalování funkcionalizovaného hrotu od buňky 3T3. Výsledky jsou zobrazené v tabulce Tabulka 3.6 a rozdělení dat je znázorněno v histogramu viz Obr. 3.13. Data obsahuje nezanedbatelné množství velkých skoků kolem 200 pN. Největší skoky kolem 600 pN mohou být celočíselným násobkem menších skoků. Hodnoty velkých skoků zapříčinily vysokou hodnotu směrodatné odchylky. Pro přesnější měření by bylo potřeba navázat co nejmenší počet fibronectinu na hrot.

Dalším problémem, se kterým jsme se potýkaly byla hydrofobita měřící hlavy a nosníku. Tento problém konstatujeme v této části, jelikož při namáčení hrotu do různých roztoků jsme zajistili, že při vložení měřící hlavy do kapaliny vznikla vzduchová bublinka mezi nosníkem a měřící hlavou. Pokud bublina byla větší a zpozorována v mikroskopu, tak byla měřící hlava vytažena a vložena zpět. Pokud byla bublinka menší, nemusela být zpozorována a naměřená data mohla být ovlivněna právě touto bublinou.

## 5 Závěr

Při řešení fyzikálních problémů je vždy potřeba aproximovat skutečnost daným modelem. S vývojem výpočetní techniky je možné používat stále složitější modely. Správnost modelu se vždy posuzuje podle shody experimentu s hypotézou.

Stanovené cíle byly splněny a měření mechanických vlastností bylo proměřováno v různých kombinacích.

Vytvoření metodiky pro měření mechanických vlastností buněk bylo popsáno napříč v celé práci. Práce byla zaměřena na porovnání jednotlivých hrotů, matematických modelů a podloží buňky. Velká část diskuze se věnovala kalibraci. Absolutní hodnoty Youngova modulu pružnosti byly zatíženy systematickou chybou a nelze je tedy porovnávat absolutně. Hodnota tuhosti nosníku byla přebrána od dodavatele, který jí vypočetl z rozměrů nosníku. Právě nesprávná hodnota tuhosti mohla být jedním z parametrů, který ovlivnil absolutní výsledky.

Vytvoření metodiky pro měření adheze buněk pomocí funkcionalizovaného hrotu bylo popsáno především ve výsledcích a v diskuzi. Pro zjištění adheze bylo zapotřebí odlehčovací FS křivky. Mnoho dat bylo zatíženo systematickou chybou, která zapříčinila nemožnost vyhodnocování. Jediný parametr, který byl vypočten byl medián skoku při oddalování hrotu s fibronectinem od buňky 3T3. Hodnota byla stanovena na 29,63 pN.

Cíl práce funkcionalizace hrotu pomocí ECM proteinu byl popsán v metodách. Metoda byla aplikována na hroty HYDRA2R a HYDRA6R. Nosníky těchto hrotů neměly dostatečnou tuhost a zničili se během vytahování z roztoku s fibronectinem. Při použití hrotu SHOCONA-B20 nosník vydržel a hrot byl připraven na měření.

Porovnání vlivu tvaru hrotu na měření pomocí AFM Při měření biologických materiálů byly preferovány hroty ze sérií s nižší hodnotou tuhosti nosníku. Dalším významným parametrem je výška hrotu. Výška hrotu by měla být vyšší než výška buňky. Při nedodržení tohoto pravidla bylo nosníkem zadržováno o samotnou buňku, což ovlivnilo veškeré měření, popřípadě danou buňku odtrhlo od podložního sklíčka.

Nakonec byly v diskuzi zmíněné veškeré problémy, které se během měření naskytly. U problémů, kde je známa příčina je navrženo řešení. Avšak problémy bez jasné příčiny nemohou být efektivně vyřešeny a komplikovaly měření. Nevyřešené problémy se vyskytovaly nahodile a nebylo zjištěna systematika, jak problém vyvolat nebo jak ho předpovídat.

Pro budoucí práce byly stanoveny jako nejpoužitelnější hroty SHOCONA-B20, které již byly objednány pro budoucí měření.

Dílní výsledky byly prezentovány na studentských konferencích IMBM 2017 a 2018 a článek s průběžnými výsledky byl přijat na konferenci IUPESM 2018.

## Seznam použité literatury

- [1] JAHN, Ilse., M. SCHLEIDEN, Theodor SCHWANN a Max SCHULTZE. *Klassische Schriften zur Zellenlehre*. 1. Aufl. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1987. ISBN 33-210-0034-2.
- [2] SCHWANN, Theodor. *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Berlin: Verlag der Sander'schen Buchhandlung (G.E. Reimer), 1839.
- [3] ETHIER, C. a Craig SIMMONS. *Introductory biomechanics: from cells to organisms*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. ISBN 9780521841122.
- [4] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [5] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-725-4686-4.
- [6] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany, 2000. ISBN 80-860-2246-3.
- [7] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [8] MERKUNOVÁ, Alena a Miroslav OREL. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2008. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-1521-6.
- [9] POLLARD, Thomas, William EARNSHAW a Jennifer. LIPPINCOTT-SCHWARTZ. *Cell biology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008. ISBN 14-160-2255-4.
- [10] MICHAELIS, L. a M. MENTEN. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*. 1913, **49**, 333--369.
- [11] Obrázek - Datei:Phospholipide in Wasser.svg. In: *Encyklopedie de.wikipedia.org* [online]. autor: Matthias M., 2011 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Phospholipide\\_in\\_Wasser.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Phospholipide_in_Wasser.svg)
- [12] BINNIG, G., C. QUATE a Ch. GERBER. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 1986, **56**(9), 930-933. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.56.930>



- [13] BINNIG, G., H. ROHRER, Ch. GERBER a E. WEIBEL. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*. 1982, **49**(1), 57-61. DOI: 10.1103/PhysRevLett.49.57. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.49.57>
- [14] DAGDEVIREN, Omur, Jan GÖTZEN, Hendrik HÖLSCHER, Eric ALTMAN a Udo SCHWARZ. Robust high-resolution imaging and quantitative force measurement with tuned-oscillator atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 2016, **27**(6), 065703. DOI: 10.1088/0957-4484/27/6/065703. ISSN 0957-4484. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/27/i=6/a=065703?key=crossref.5dfc520d085b41a62e20e01dbd6ec8f5>
- [15] WU, Xin, Mariappan MUTHUCHAMY a Doodipala REDDY. Atomic Force Microscopy Protocol for Measurement of Membrane Plasticity and Extracellular Interactions in Single Neurons in Epilepsy. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016, **8**, 88. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00088. ISSN 1663-4365. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnagi.2016.00088/abstract>
- [16] AFM Probe Catalog. *NanoAndMore AFM Tips, AFM Probes and AFM Cantilevers* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: [http://www.nanoandmore.com/afm\\_probes.php](http://www.nanoandmore.com/afm_probes.php)
- [17] AFM tips for Atomic Force Microscopy. *NanoWorld* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://www.nanoworld.com/afm-probes-catalog>
- [18] Bruker AFM Probes - Probes and Accessories Catalog. *AFM Probes / AFM Cantilever / AFM Tips - Bruker AFM Probes* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://www.brukerafmprobes.com/a-3832-probes-and-accessories-catalog.aspx>
- [19] KOPYCINSKA-MÜLLER, Malgorzata, Roy GEISS a Donna HURLEY. Contact mechanics and tip shape in AFM-based nanomechanical measurements. *Ultramicroscopy*. 2006, **106**(6), 466-474. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2005.12.006>. ISSN 0304-3991.
- [20] HUGEL, Thorsten a Markus SEITZ. The Study of Molecular Interactions by AFM Force Spectroscopy. *Macromolecular Rapid Communications*. 2001, **22**(13), 989-1016. DOI: 10.1002/1521-3927(20010901)22:13<989::AID-MARC989>3.0.CO;2-D.
- [21] JAGANNATHAN, Bharat a Susan MARQUSEE. Protein folding and unfolding under force. *Biopolymers*. 2013, **99**(11), 860-869. DOI: 10.1002/bip.22321.
- [22] SITTERS, Gerrit, Douwe KAMSMA, Gregor THALHAMMER, Monika RITSCH-MARTE, Erwin PETERMAN a Gijs WUITE. Acoustic force

- spectroscopy. *Nature Methods*. 2015, **12**, 47–50. DOI: 10.1038/nmeth.3183. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nmeth.3183>
- [23] HELENIUS, Jonne, Carl-Philipp HEISENBERG, Hermann GAUB a Daniel MULLER. Single-cell force spectroscopy. *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd, 2008, **121**(11), 1785-1791. DOI: 10.1242/jcs.030999. Dostupné také z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.030999>
- [24] Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. *JPK Instruments AG* [online aplikační poznámky]. 2009, -, 9 [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-app-elastic-modulus.14-1.pdf>
- [25] SZABÓ, István. *Mechanika tuhých těles a kapalin: studijní příručka vysokých technických škol*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1967. Teoretická knihnice inženýra.
- [26] HERTZ, Heinrich. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die Reine und Angewandte Mathematik*. 1882, **1882**(92), 156–171. DOI: 10.1515/crll.1882.92.156. ISSN 1435-5345. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/crll.1882.issue-92/crll.1882.92.156/crll.1882.92.156.xml>
- [27] POPOV, Valentin. Method of reduction of dimensionality in contact and friction mechanics: A linkage between micro and macro scales. *Friction*. 2013, **1**(1), 41-62. DOI: 10.1007/s40544-013-0005-3. ISSN 2223-7690. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s40544-013-0005-3>
- [28] Obrázek - Bone biology and Mechanics Labs: BBML. In: *IUPUI* [online]. 2017 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.iupui.edu/~bbml/afmintro.html>
- [29] HYNES, R. a A. NABA. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, **4**(1), 004903-004903. DOI: 10.1101/cshperspect.a004903. ISSN 1943-0264. Dostupné také z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a004903>
- [30] TAUBENBERGER, A., D. CISNEROS, J. FRIEDRICHS, P.-H. PUECH, D. MULLER a C. FRANZ. Revealing Early Steps of  $\alpha 2$ 1 Integrin-mediated Adhesion to Collagen Type I by Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Molecular Biology of the Cell*. 2007, **18**(5), 1634-1644. DOI: 10.1091/mbc.E06-09-0777. ISSN 1059-1524. Dostupné také z: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06-09-0777>

- [31] SUNDAR RAJAN, Vinoth, Valérie LAURENT, Claude VERDIER a Alain DUPERRAY. Unraveling the Receptor-Ligand Interactions between Bladder Cancer Cells and the Endothelium Using AFM. *Biophysical Journal*. 2017, **112**(6), 1246–1257. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.01.033. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349517301649>
- [32] VASCONCELOS, Luís, Tõnis LEHTO, Fatemeh MADANI, Vlad RADOI, Mattias HÄLLBRINK, Vladana VUKOJEVIĆ a Ülo LANGEL. Simultaneous membrane interaction of amphipathic peptide monomers, self-aggregates and cargo complexes detected by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2018, **1860**(2), 491-504. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.024>. ISSN 0005-2736.
- [33] JAMASBI, Elaheh, Mohammed AKHTER HOSSAIN, Marsha TAN, Frances SEPAROVIC a Giuseppe CICCOTOSTO. Fluorescence imaging of the interaction of amyloid beta 40 peptides with live cells and model membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.024>. ISSN 0005-2736.
- [34] BROWNE, Thomas a Gregory HOLMES. Epilepsy. *New England Journal of Medicine*. 2001, **344**(15), 1145-1151. DOI: 10.1056/NEJM200104123441507.
- [35] KAPLAN, David, Lori ISOM a Steven PETROU. Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, **6**(6), 022814. DOI: 10.1101/cshperspect.a022814. ISSN 2157-1422. Dostupné také z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022814>
- [36] OLIVER, W.C. a G.M. PHARR. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*. 1992, **7**(6), 1564-1583. DOI: 10.1557/JMR.1992.1564. ISSN 0884-2914. Dostupné také z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0884291400017039](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0884291400017039)
- [37] PETHICAI, J., R. HUTCHINGS a W. OLIVER. Hardness measurement at penetration depths as small as 20 nm. *Philosophical Magazine A*. Taylor & Francis, 1983, **48**(4), 593-606. DOI: 10.1080/01418618308234914. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01418618308234914>
- [38] TIWARI, Atul. Nanomechanical Analysis of Hybrid Silicones and Hybrid Epoxy Coatings: A Brief Review. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 2012, **2**(1), 11. DOI: DOI:10.4236/aces.2012.21005.
- [39] KOSSMAN, Stephania, Thierry COOREVITS, Alain IOST a Didier CHICOT. A new approach of the Oliver and Pharr model to fit the unloading curve from

- instrumented indentation testing. *Journal of Materials Research*. Cambridge University Press, 2017, **32**(12), 2230–2240. DOI: 10.1557/jmr.2017.120. Dostupné také z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0884291417001200/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0884291417001200/type/journal_article)
- [40] OLIVER, W.C. a G.M. PHARR. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research*. 2004, **19**(1), 3-20. DOI: 10.1557/jmr.2004.19.1.3. ISSN 0884-2914. Dostupné také z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0884291400085800](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0884291400085800)
- [41] RETTLER, Erik, Stephanie HOEPPENER, Bernd SIGUSCH a Ulrich SCHUBERT. Mapping the mechanical properties of biomaterials on different length scales: depth-sensing indentation and AFM based nanoindentation. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, **1**(22), 2789. DOI: 10.1039/c3tb20120a. ISSN 2050-750X. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb20120a>
- [42] WEISS, S. Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science*. 1999, **283**(5408), 1676-1683. DOI: 10.1126/science.283.5408.1676. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.283.5408.1676>
- [43] LUNOV, Oleg, Svetlana BESPALOVA a Vitalii ZABLITSKII. A model for magnetic bead microrheometry. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007, **311**(1), 162-165. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1172. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025686>
- [44] SMITH, R., T. SMITH, T. BLIEDEN a R. PHIPPS. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *The American Journal of Pathology*. 1997, **151**(2), 317-322. ISSN 0002-9440.
- [45] CT26.WT ATCC ® CRL-2638™ Mus musculus colon carcinoma. *ATCC: The Global Bioresource Center* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2638.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2638.aspx?geo_country=cz)
- [46] NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™. *ATCC: The Global Bioresource Center* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo_country=cz)
- [47] Obrázek - Polystyrene-60x15mm-Sterile-Karter-Scientific. In: *Amazon.com* [online]. b.r. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.amazon.com/dp/B078K5JSQQ>

- [48] Obrázek - Counting chamber CE Thoma w/clamps - Tecnylab. In: *Tecnylab* [online]. 2018 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.tecnylab.es/en/cell-counting/4817-camara-ce-burker.html>
- [49] Obrázek - Brand™ Bürker Counting Chambers. In: *Fisher Scientific Sweden: Laboratory Equipment, Consumables & Supplies* [online]. 2018 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-counting-chambers-2/p-8003572>
- [50] YEUNG, Tony, Penelope GEORGES, Lisa FLANAGAN et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2005, **60**(1), 24-34. DOI: 10.1002/cm.20041. ISSN 0886-1544. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cm.20041>
- [51] Poly(ethyleneimine) solution average Mn ~1,800 by GPC, average Mw ~2,000 by LS, 50&nbsp;wt. % in H2O. *Sigma-Aldrich* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/408700?lang=en&region=CZ>
- [52] Collagen from calf skin Bornstein and Traub Type I, solid, BioReagent, suitable for cell culture. *Sigma-Aldrich* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9791?lang=en&region=CZ>
- [53] *Obrázek - Accessories - JPK Instruments* [online]. In: . b.r. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/products/cell-adhesion-cytomechanics/cellhesion-200/accessories/biocell-for-cellhesion>
- [54] YING, Z., Mark REITSMA a Richard GATES. Direct measurement of cantilever spring constants and correction for cantilever irregularities using an instrumented indenter. *Review of Scientific Instruments*. 2007, **78**(6), 063708. DOI: 10.1063/1.2747095. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2747095>
- [55] SADER, John, James CHON a Paul MULVANEY. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 1999, **70**(10), 3967-3969. DOI: 10.1063/1.1150021. ISSN 0034-6748. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1150021>