Biologické aplikace AFM

Roman Kubínek¹, Milan Vůjtek¹, Zdeňka Zapletalová², Renata Holubová¹, Hana Kolářová³

 1 Katedra experimentální fyziky přírodově
decké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, tř. Svobody 26, 77146
 Olomouc

² I. Stomatologická klinika FN Olomouc, Palackého 12, Olomouc

³ Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Abstrakt: Stále se rozšiřující aplikace SPM přístrojů přinesly možnost zobrazovat bez větších problémů vzorky přímo v kapalných prostředích. Otevřela se tak možnost minimalizovat povrchové síly na velmi jemných vzorcích, sledovat biologické preparáty v podmínkách korespondujících jejich přirozeným prostředím, provádět pozorování v reálném čase a sledovat vývoj povrchových procesů na buňkách a jiných tkáňových kulturách. V neposlední řadě se vytvořily podmínky pro sledování vzorků pod vlivem elektrochemických reakcí. Jednou z odlišností oproti analýzám AFM na suchých vzorcích, je eliminace přitažlivých sil vlivem povrchového napětí. To umožňuje zobrazit povrch vzorku s minimální silou mezi hrotem a povrchem a vyhnout se tak poškození povrchu biologického preparátu. Režimy AFM používané v aplikaci pro kapalné vzorky jsou prakticky totožné s klasickými analýzami AFM. Ve větší míře se však využívá poklepový režim. V článku budou představeny aplikace převzaté z jiných laboratoří a aplikace, na kterých laboratoř AFM přírodovědecké fakulty UP průběžně pracuje, a to: redukce dentinové hypersensitivity a permeability a analýza povrchu kontaktních čoček.

1. Pracovní prostředí mikroskopů se skenující sondou.

Rastrovací sondový mikroskop může pracovat v různých prostředích. V této části zmíníme čtyři:

Ultravysoké vakuum (UHV)

První STM pracovaly především v ultravakuu s atomárně čistými povrchy. Nejčastěji studovaným materiálem byl křemík a rekonstrukce povrchu Si (111) byla brána jako standard STM zobrazení povrchu. Přední aplikací ultravakuové STM je rastrovací tunelovací spektroskopie (STS). STM u atomárně čistých povrchů poskytuje charakteristiku povrchu, jak po stránce topografické, tak i elektronové struktury. Další aplikací je studium materiálových procesů *in–situ*, tedy ve stejných podmínkách, při jakých jsou materiály připravovány. Tímto se může zamezit kontaminaci vzorku.

Vzduch

Uživatelsky jednodušším prostředím a méně náročným na obsluhu je vzduch. Práce STM ve vzduchu je obtížná, protože na většině povrchů se vytváří vrstvy oxidů a dalších nečistot, které negativně ovlivňují tunelové proudy a vedou ke zkreslení. Existují však určité materiály, u kterých není rozhodující, že se STM analýza provádí ve vzduchu. V grafitu, MoS₂, Nb₃Se a některých dalších vrstevnatých materiálech je možné odlupováním získat "čerstvý", nekontaminovaný povrch. Mikroskopie atomárních sil (AFM) nezávisí na vodivosti vzorku, a proto může zobrazovat jakékoliv povrchy vodivých i nevodivých vzorků.

Elektrochemická prostředí

Podobně jako ultravakuum i elektrochemická komora poskytuje kontrolovatelné prostředí pro aplikace SPM. Zpravidla umožňuje zobrazit elektronové a strukturní vlastnosti elektrod, včetně změn indukovaných chemickými a elektrochemickými procesy, fázovými rozhraními, adsorpcí, korozí, stejně jako depozicí organických a anorganických molekul v elektrolytických roztocích.

Kapalná prostředí

Speciální nástavce AFM mikroskopů umožňují práci s kapalnými vzorky a s raménky plně ponořenými do kapaliny. Bez větších problémů se mohou zobrazit "mokré" vzorky. Práce v kapalném prostředí bude redukovat celkovou sílu, kterou hrot působí na vzorek. Proto je kapalné prostředí výhodné v řadě aplikací, zejména v těch, které umožňují studium biologických preparátů, geologických materiálů, korozi nebo studium povrchu překrytého kapalnou vrstvou. V kapalném prostředí mohou být získány obrazy LFM, AFM, FMM, a PDM.

Biologické vzorky studované metodou AFM jsou ve srovnání s jinými druhy vzorků většinou křehké a měkké. To způsobuje obtíže při jejich přichycení pevně k povrchu, aniž by byly poškozeny nebo byla změněna jejich struktura. Z těchto důvodů není kontaktní režim nejvhodnější. Laterální síly působící v kontaktním režimu mohou vzorek narušit, nebo jej dokonce zničit.

Jedno z nabízených řešení je použití poklepového režimu (tapping mód), kdy hrot osciluje nad skenovaným povrchem a přerušovaně se občas dotkne povrchu. V grafu závislosti působících sil na vzdálenosti hrotu od povrchu, viz. obr. 1, je vyznačena oblast "tapping módu". Doba, po kterou je hrot v kontaktu s povrchem, je mnohem kratší než v případě kontaktního režimu. V důsledku toho je také snížena průměrná laterální síla. U buněk je rozlišení v obraze v poklepovém režimu výrazně lepší než v případě režimu kontaktního, viz. obr. 2a, b, kde jsou zobrazeny endoteliální buňky. Raménka, která se používají pro biologické aplikace jsou standardní, určené pro frekvence 150 až 400 kHz (oblast LRF a HRF), viz. obr.3. s křemíkovými hroty s poloměrem křivosti hrotu < 10 nm.



Obrázek 1: Graf působících sil v závislosti na vzdálenosti s vymezením poklepového módu

2. Přednosti AFM oproti EM

Elektronová mikroskopie (EM) je pro zobrazení biologických vzorků široce rozšířenou metodou. Bude proto užitečné zmínit se o přednostech AFM oproti EM.

Největší předností AFM aplikací pro biology je možnost zobrazení biologických vzorků "in vivo". Tím se vyhneme celé řadě artefaktů způsobených dehydratací vzorku. Přes rozvoj "environmentálních" elektronových mikroskopů není dosud možné zobrazit vzorek zcela ponořený do kapaliny. U AFM využívajících skener pro kapalné vzorky je možné pracovat s roztoky sycenými různými plyny (CO_2 , N_2 , Ar, ...). Stejně tak může být regulována teplota za účelem sledování vlivu teploty na vzorek (např. v souvislosti s enzymatickou aktivitou).

Protože zobrazení v AFM je relativně nedestruktivní, mohou být vzorky zobrazovány opakovaně. Například je možné sledovat působení různých léků na tkáňové kultury. Není třeba provádět fyzikální



Obrázek 2: Endoteliální buňky a) kontaktní režim b) nekontaktní poklepový režim



Obrázek 3: Raménko s křemíkovým hrotem (poloměr křivosti < 10 nm)

nebo chemickou fixaci preparátů, ani jejich pokovování pro zajištění lepšího kontrastu nebo vodivosti.

AFM poskytuje věrný topografický 3D obraz povrchu vzorku s vertikálním rozlišením od 0,1 nm a laterálním rozlišením 1 nm (v závislosti na typu vzorku). Vedle topografického obrazu můžeme získat řadu užitečných informací o mechanických vlastnostech biologického vzorku. Spojením AFM s jinými optickými zobrazovacími metodami (fluorescenční a jiné optické techniky) je možné současně získat různé druhy informací o vzorku.

2.1. Hranice možností AFM aplikací v biologii

Větším problémem badatelů, kteří používají AFM, je uchycení biologických vzorků k povrchu. Velmi často se používá slída, která poskytuje atomárně hladký povrch s perfektní čistotou (pokud je čerstvě rozštípnuta). Ostatní povrchy neposkytují dostatečnou přilnavost. Například k navázání molekul DNA na povrch slídy v případě, že jsou oba povrchy nabity záporně, je možné na povrch slídy nanést pufr, který zajistí vazebné můstky mezi molekulami DNA a slídy. K zobrazení proteinů je výhodnější použít pufr s nižším pH. Tím se vytvoří na povrchu proteinů kladný náboj a zajistí se jejich připoutání k záporně nabitému povrchu slídy.

Často jsou nutné další úpravy povrchů. Silanizací slídy je možné na jejím povrchu vytvořit kladný náboj. Další možností je použití křemíku nebo zlata. Zlato umožňuje kovalentní vazbu proteinů.

Následující připomínky se netýkají jen biologů, ale mohou být rozhodující pro další aplikace:

Vertikální rozsah (z-souřadnice) může být pro vyšší vzorky (např. buňky) nedostačující.

Problematická je i kontaminace hrotu biologickým materiálem, kdy se poškozená tkáň pocházející ze samotného vzorku uchytí na hrot. Pro různé typy znečištění je třeba použít různé způsoby očisty hrotu.

Interakce mezi měkkým vzorkem a hrotem se dá jen obtížně popsat. Není vždy zřejmé, do jaké míry hrot naruší povrch vzorku. Je však nezbytné zahrnout vlastnosti povrchu vzorku (stlačení, zkroucení apod.) v důsledku sil působících na hrot a faktory, které není zcela možné předvídat, jako např. tvorba bublinek vzduchu, víry způsobené kmitajícím raménkem apod.

3. Technická realizace - liquid skener

 ${\rm V}$ zásadě se používají klasické konstrukční prvky, ale musí být splněny některé zvláštní požadavky:

Relativně velký skenovací rozsah — u biologických objektů je potřeba skenovat velké plochy, aby se zjistilo v jakém místě se sonda nachází. Navíc bývají objekty rozptýleny značně nerovnoměrně.

Snadná výměna hrotu — u biologických preparátů se hrot lehce kontaminuje skenováním povrchu. Speciálně upravený skener — vlastní skener je ponořený do kapaliny, proto je nutné, vytvořit komůrku

s okénky pro zajištění optické dráhy laserového paprsku, viz. obr. 4.



Obrázek 4: Skener pro kapalná prostředí a) skener trojnožka pro 100 μ m b) skener trubičkový 8 μ m

Vybavení pomocným mikroskopem — obvykle optickým. Optimální je mikroskop invertní, jehož objektivy jsou na opačné straně než skener se vzorkem, viz. obr. 5. Podložka pak musí být průhledná. Rozlišení optického a skenovacího mikroskopu by se měla překrývat. Výjimečně lze kombinovat i AFM s elektronovým mikroskopem.

Kontrola prostředí, především vlhkosti a teploty (může snížit vibrace a boční pohyblivost makromolekul, fázové přechody).



Obrázek 5: Kombinace světelného invertního mikroskopu s AFM

4. Vybrané biologické aplikace AFM

Aplikace AFM v biologii jsou velmi široké. Nabízí se výzkumy od jednotlivých molekul k celým tkáním (v oboru humánní i veterinární medicíny), včetně výzkumu v oblasti biomateriálů. Vedle zobrazení povrchové topografie AFM přináší informace o mechanických vlastnostech molekul a povrchů. Vzorky mohou být statické, ale mohou být i v podobě rostoucích krystalů nebo pulsujících buněk (kardiomyocyty). Příklady některých aplikací jsou uvedeny dále.

4.1. Molekuly

AFM byl použit pro zobrazení velkého množství izolovaných molekul, zejména se jedná o molekuly proteinů a DNA. Pro zobrazení se používá především přerušovaný kontakt [1].

a) Nukleové kyseliny Molekuly DNA patřily mezi první studované objekty v AFM, viz obr. 6. Důvodem může být důležitost DNA molekul v biologii i možnost srovnání AFM analýz s jinými analytickými technikami. Molekuly DNA jsou relativně odolné (ve srovnání např. s proteiny) a většina druhů DNA molekul je komerčně dostupná. Výzkumy ukázaly, že pro připojení DNA molekul (negativní náboj) k povrchu (negativní náboj) je třeba užít vhodné kationty (Ni²⁺, Mg²⁺) přidáním pufrovacího roztoku [2].



Obrázek 6: Shluk DNA molekul (sken 60 nm)

V AFM byly zobrazeny spirálovité molekuly, např. RNA [3]. V přítomnosti propanolu bylo odhaleno stoupání šroubovice DNA 3,4 nm [4], přičemž molekuly byly naneseny na lipidovou vrstvu. Záznam DNA může být zobrazen i v reálném čase. Bylo zjištěno, že se vytváří 0,5 až 2 báze za sekundu.

AFM je rovněž vhodný pro studium interakcí DNA molekul s proteiny. Data AFM přinesla přesnější informaci v 3D uspořádání struktury chromatinových vláken. Závěrem badatelů bylo zjištění nepravidelného řazení nukleosomů [5].

Rozšířené je rovněž studium chromozomů (lidských i rostlinných) metodou AFM. Závěry jsou důležité pro genetické studie [6]. Většina stávajících metod (SM a EM) vyžadovala jejich fixaci.

b) Proteiny Většina proteinů je zobrazována na vzduchu nebo v kapalině, s teplotou okolního prostředí 60 °C – kolagenové molekuly, lysozomy, protilátky, proteáza, albumin, globuliny IgG, viz. obr. 7., myosin, aktin, fibronektin, fibrinogen [7].

Proteiny jsou nanášeny z roztoku na podložky (zpravidla slída). Inkubační doba se pohybuje od 1,5 až do 24 hodin. Poněkud komplikovaný je způsob jejich připoutání k povrchu. Používá se zpravidla zlato, které váže proteiny jejich thiolovými skupinami. Vhodná je např. fosfolipidová dvojvrstva. V současné době se daří s dobrým rozlišením zobrazovat i dva globulární proteiny různých velikostí v těsné blízkosti.



Obrázek 7: Proteiny IgG (sken 250 nm)

c) Polysacharidy Polysacharidy se v médiu zobrazují obtížně. V pufru blízkém fyziologickým hodnotám byla studována struktura očního slizu [8]. Většina autorů však užívá ke srážení polysacharidových molekul před jejich zobrazením alkohol. Obecně lze konstatovat, že užití alkoholu pro zobrazení vzorků v AFM přináší lepší rozlišení. Vzorky jsou tužší, stabilnější a na vzduchu je redukován jejich hydratační obal. Tyto techniky však postrádají výhody práce za podmínek blízkých přirozeným podmínkám.

4.2. Biopolymery

AFM je velmi užitečným nástrojem pro zobrazení biopolymerů. Jde zejména o jejich vytváření v reálném čase. Ideální je ponechat je růst v kapalném prostředí uvnitř mikroskopu a zobrazovat polymery v pravidelných intervalech. Narůstá však problém s tvorbou artefaktů způsobených kontaminovaným hrotem a interpretací takto zobrazeného povrchu. Proto je nutné před každou sekvencí snímků hrot čistit.

Typickým příkladem intenzivně studovaných vláken je kolagen, protože řada procesů je spojována s patologií postihující pojivové tkáně, kostní tkáně, cévní systém, kůži, zuby, klouby apod. Dále popsanou aplikací je i studium polymerních materiálů měkkých kontaktních čoček.

 β -amyloidní proteiny, viz. obr. 8, formující fibrily jsou intenzivně studovány zejména proto, že jsou spojovány s Alzheimerovou nemocí. Mechanismus fibrilizace je výjimečně důležitý pro vysvětlení patogeneze této nemoci a právě AFM může přinést zajímavé údaje s nanometrovým rozlišením [9].



Obrázek 8: β –amyloidní vlákna

4.3. Uspořádané molekuly

a) Podpůrné rovinné dvojvrstvy Podpůrné rovinné dvojvrstvy je možné získat Langmuir-Blodgettovou technikou nebo vesikulární fúzí. V obou případech jsou vrstvy spontánně adsorbované na slídě a jsou při skenování v kapalině stabilní. AFM zobrazuje účinek směšování lipidů ve dvojvrstvě, zvlnění a puchýře na asymetrické dvojvrstvě (phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol) [10].

b) Vesikuly V AFM bylo zobrazeno několik typů váčků (vesikul). Některé typy vesikul mají tendenci slučovat se v případě, že jsou naneseny na povrch slídy. Autoři výzkumů ukázali, že existují rozdíly mezi reorganizací lipidů fosfatidyletanolaminu a fosfatidylcholinu, viz obr. 9. Liposomy DPPC/cholesterolu imobilizované protilátkami jsou připojeny k povrchu zlata a bylo zjištěno, že limit stlačení liposomů je 40 % objemu a neměly by být zobrazeny silami, které jsou vyšší než 1 nN [11].



Obrázek 9: Lipidy na slídě (sken 1500 nm)

c) Membrány

Izolované membrány:

Buněčné membrány nebo membrány jádra mohou být izolovány a naneseny na slídu. Na cytoplasmatické straně buněčné membrány je možné identifikovat vláknitou strukturu danou vlákny aktinu a mřížkovou strukturu. V membránách byly zobrazeny proteiny s průměrem od 8 do 40 nm a rovněž póry.

Touto cestou je možné vyhodnotit působení léků, iontů, hormonů nebo záření *in-vivo*. Jako příklad může být uveden vliv lanthanoidových kationtů na membrány lidských erytrocytů, které v nich vytváří domény a póry. Někteří autoři popisují techniky pro studium elektrických případně transportních membránových dějů [12].

Využitím AFM a dokonalejším topografickým zobrazením membránových komplexů byly rovněž studovány interakce proteinů s membránou. To přispívá například k vývoji biosenzorů [13].

Reorganizace membrán

Po rozpuštění a izolaci mohou membránové proteiny vytvářet dvojrozměrné krystaly, které mohou být zobrazeny s vysokým rozlišením. Těsné uspořádání molekul redukuje jejich laterální pohyb a je dosaženo submolekulární rozlišení. Speciálními technikami bylo možné zobrazit jak extracelulární, tak cytoplasmatickou stranu membrány, viz. obr. 10. Peptidové řetízky je možné zobrazit s laterálním rozlišením okolo 0,5 nm a vertikálním 0,1 nm. Nabízí se možnost provádět konformační změny proteinů silovým působením hrotu na proteiny [14].



Obrázek 10: Vnější strana cytoplasmatické membrány

d) Krystaly Řada poznatků ukazuje, že AFM může zobrazit krystaly s velkým rozlišením a výsledky vykazují dobrou shodu s rentgenovou analýzou, NMR nebo elektronovou mikroskopií. Jedná se například o mikrokrystalky celulózy, krystaly lysosomů, proteinů, katalázy apod. [15].

Metodou AFM byl rovněž studován inzulín, kdy byly zobrazeny inzulín–protaminové krystaly. Tyto komplexy jsou vhodné pro řízení kinetiky uvolňování inzulínu v případě, že komplexy jsou injektovány do krve [16].

Jedním z typů krystalů rostoucích na podložce a vytvářejících dendritické struktury, jsou krystaly NaCl (obr. 11.).



Obrázek 11: Dendritické krystaly na povrchu slídy (sken 40 μ m)

4.4. Buňky

AFM může poskytnout informace o struktuře buněk, které jsou adherentní, tj. uchycené k povrchu. Zvláště je zobrazován jejich cytoskelet a submembránové struktury [17]. Mohou být studovány i vysušené a fixované buňky. Tím se ale ztrácí informace o jejich chování v přirozeném stavu.

V případě, že jsou studovány buňky v kapalině, je nutné je vázat k povrchu vhodného substrátu. Ve většině případů jsou buňky v kultuře účinně přilepené ke dnu Petriho misky. Přidáním kolagenu, lamininu apod. je možné adhezi podpořit. Někteří autoři používají originální způsob jak imobilizovat kvasnicové buňky, a to jejich uchycení v pórech celulózového filtru.

Na ledvinových buňkách bylo dosaženo laterální rozlišení 10 nm. Přitom bylo pracováno v kontaktním režimu s nízkými hodnotami sil (20–50 pN). Detaily membrány odhalily rozdíly v drsnosti povrchu, jejich vláknitý vzhled korespondující se submembránovou strukturou. Malé částice (10–30 nm), vystupující nad povrch membrány korespondují s membránovými proteiny nebo protein-lipidovými komplexy [18].

AFM například odhalil účinek protilátek na bakteriální membránu (splynutí buněk, ztráta původního tvaru, změna členitosti povrchu) [19].

Erytrocyty mohou být jednoduše zobrazeny na vzduchu, ale již po vytažení z kapaliny mají tendenci k resorpci [20].

V AFM je možné zobrazit viry, jak na vzduchu, tak i v kapalině. V kapalině byl zobrazen virus chřipky, který byl uchycen na slídě, viz. obr. 12. Jako kalibrační referenční vzorek pro AFM se používá tabákový mozaikový virus, vzhledem k tomu, že jejich velikost je stálá [21].

4.5. Tkáně

Obecně je možné konstatovat, že tkáně se v AFM zobrazují obtížně. Jsou obvykle velmi měkké a členité a kterákoliv fibrilární struktura (nervová tkáň, extracelulární matrix, apod.) může zachytit hrot.

Úspěšně se podařilo zobrazit uspořádání kolagenových vláken rohovky a sklivce. To je užitečné pro analýzu povrchu rohovky po laserové keratektomii [22].

AFM poskytuje důležité informace o zubní tkáni. Například proces demineralizace, působení bělících past na sklovinu, struktura povrchů výplňových materiálů (obr.13) apod. [23]. Zajímavý výzkum je pro-



Obrázek 12: Virus chřipky (skenovací rozsah 1500 nm)

váděn v souvislosti s desenzibilizací odhalených krčků. Snížení citlivosti je možné dosáhnout zatavením dentinových tubulů laserovým svazkem, viz. obrázky v šesté kapitole.

S pomocí AFM můžeme studovat strukturu vlasů. Vlas může být imobilizován na povrchu epoxidové pryskyřice a zobrazen v kapalině. Takto může být sledován vliv prostředků vlasové kosmetiky, stejně tak jako vliv počasí a atmosférických vlivů za definovaných hodnot vlhkosti vzduchu [24].

Rostlinné tkáně, přestože jsou členité, mají výhodu ve své relativní tvrdosti. Můžeme tak získat informaci o buněčných stěnách, povrchu listu (starší list je členitější než mladší) apod. [25].



Obrázek 13: Struktura povrchu kompozitních výplňových materiálů



Obrázek 14: Profil povrchu kompozitního materiálu

5. Aplikace AFM v biologii jako nezobrazující techniky

AFM je však více než mikroskop, který poskytuje topografická data o vzorku. Pohyb raménka s hrotem může být využit k měření sil s vysokou citlivostí. Existuje široký rozsah aplikací, zahrnující měření intra– a inter–molekulových sil, měření viskoelastických vlastností povrchu atd. Raménko s hrotem může být rovněž citlivým detektorem pohybu vzorků, který je zajímavý pro detekci molekulárního nebo buněčného pohybu.

5.1. Měření sil

Myšlenka použít AFM k měření sil v biologii se objevila v roce 1989, ale intenzivněji je rozpracovávána od roku 1995. Jsou aplikovány následující základní způsoby měření sil: intermolekulární síly, intramolekulární síly a odhady tvrdosti povrchu.

a) Inter– a intra– molekulární síly Jak vyplývá z principu AFM, nabízí se využití silového působení hrotu na povrch k spektroskopickým účelům. K tomu je zapotřebí speciálně upravený hrot, na který musí být navázány molekuly, působící jako ligandy vázající se k receptorům povrchu. Po přiblížení hrotu k povrchu dojde k interakci mezi molekulami a jejich navázání. Při oddalování hrotu se molekuly budou postupně natahovat a způsobovat ohyb raménka až do okamžiku přetržení vazby. To se projeví skokovou změnou na křivce F-d. Ačkoliv měření samotné je relativně jednoduché, jeho interpretace je poměrně složitá, podle toho jak síly závisí například na tažné rychlosti. Měření těchto sil bylo jednou z prvních aplikací podobného druhu. V roce 1992 to byl například odhad vazby streptavidinu k lipidové dvojvrstvě. Vazebné síly mezi vodíkovými atomy byly měřeny rovněž např. mezi molekulami avidinu a biotinu (obr. 15.). V současné době se intenzivně studují interakce mezi jednotlivým stavebními prvky DNA. Autoři připojují na hrot a povrch molekuly oligonukleotidů. Byla změřena adhezní síla 0,83 nN mezi 12 bázovými páry molekul [26].



Obrázek 15: Měření vazebných sil mezi molekulami avidinu a biotinu

Příkladem intermolekulárních měření je interakce mezi acetylcholinesterázou a acetylcholinem a substrátovými proteiny, včetně stability kovalentní vazby. Byly vytipovány molekuly k přesnějšímu studiu specifických domén uvnitř proteinů.

Z měření intramolekulárních sil uveďme příklad dlouhých svalových proteinů (titinu), které byly upevněny jedním koncem k povrchu zlata a druhým koncem molekuly k raménku s hrotem, viz. obr. 16. Síla změřená při různých rychlostech natahování molekuly se měnila od 150 do 300 pN. Data podobného charakteru byla získána z měření DNA mezi vazbami G–C (20 ± 3 pN), A–T(9 ± 3 pN). Z dalších příkladů je možno uvést syntetizované polymery lysosomů, molekuly spektrinu a protein G- β [27]. Nabízí se rovněž mapování funkčních skupin na povrchu organických látek.

b) Mechanické vlastnosti vzorků Vertikální síla na hrot při měření vztahu "síla–vzdálenost" se projeví při přitlačení vznikem prohlubně (v závislosti na mechanických vlastnostech povrchu). V biologii je možné tuto skutečnost využít pro kvantifikaci viskoelastických vlastností vzorků, zejména buněk "in vivo". Důležitý výsledek je určení okamžiku, kdy dojde ke kontaktu hrotu a povrchu měkkého vzorku. V případě kontaktu hrotu s povrchem tvrdého vzorku, se v závislosti F-d projeví charakteristickou smyčkou,



Obrázek 16: Princip měření intramolekulárních sil na svalových proteinech

která se u měkkého vzorku neobjeví. Pro stanovení tohoto okamžiku existují matematické fitovací metody [28].

5.2. Molekulární a buněčný pohyb

Sonda AFM může být rovněž situována nad povrchem buněk nebo molekul a ze záznamu pohybu raménka může být vyhodnocen jejich spontánní pohyb. Objevily se práce detekující aktivitu molekul lysosomu, pohyb ureázy, IgG, mikrotubulů a aktivity draslíkových kanálů [29]. Byl rovněž zachycen entropický pohyb vlasových nervových vláken [30]. Pro tato měření je nezbytné potlačení veškerých vibrací a kontrola tepelného driftu vnějšími čidly.

Někteří autoři zjišťovali pulsaci kardiomyocytů, kdy byly vyhodnoceny různé amplitudy a frekvence pro různé kontrahující se membrány [31].

6. Aplikace AFM Explorer v laboratoři KEF PřF UP v Olomouci

Studium redukce dentinové hypersensibility a permitivity

Dentinová hypersensitivita je stav bolesti, kdy je exponovaný povrch dentinu citlivý k intraorálním stimulům. Známější označení je "citlivé zubní krčky". Mikroskopická vyšetření hypersensitivního dentinu ukazují otevřené dentinové tubuly do vnějšího prostředí, viz. obr. 17. Jejich průměr se pohybuje od 3 do 4 μ m.



Obrázek 17: Povrch dentinu s tubuly (skenovaná oblast 80 μ m)

Podle hydrodynamické teorie je přenos bolestivého stimulu přes dentin zprostředkován pohybem tekutiny v dentinových tubulech. Většina desensibilizačních postupů a prostředků je v současné době zaměřena na pečetění dentinových tubulů pečetivy nebo alterací obsahu tubulů prostřednictvím koagulace, proteinové precipitace apod. Tyto techniky však mají pouze dočasný efekt a jejich aplikace musí být po určité době opakována. K dosažení dlouhodobého efektu se nabízí postupy, které vedou ke zmenšení průměru dentinových tubulů [32–34]. Krátká expozice laserem, nejčastěji Nd:YAG vede k roztavení povrchové vrstvy této tkáně. Roztavený dentin se mění v pevnou hmotu s hladkým neporézním povrchem umožňující další aplikaci dentálních výplňových materiálů.

Pro naše výzkumy byl použit Nd:YAG laser od firmy LASAG. Laser s emisí záření o $\lambda = 1,064 \ \mu m$ pracuje v pulsním režimu s rozsahem frekvencí 1 až 1000 Hz s maximálním průměrným výkonem 150 W. Doba trvání pulsu od 0,1 do 20 ms. Laserový svazek je možné nechat vystupovat z optické hlavy o ohnisku f = 10 cm při průměru svazku 0,3 až 0,4 mm, nebo z optického vlákna o průměru d = 0,4 mm. Pro lepší absorpci laserového záření v povrchové vrstvě je povrch natřen černým inkoustem (indocyaninová zeleň, karmínové indigo, apod.). Důvodem je snaha zabránit hlubší penetraci laserového záření a tím prohřátí zubní dřeně (povoleno je zvýšení max. 5 °C nad pulpální teplotu). Vzhledem k pulsnímu režimu je výkon uváděn v mJ/puls.



Obrázek 18: Redukce průměru dentinových tubulů (skenovaná oblast 100 μ m)

Na snímcích z AFM na obr. 18 a 19, jsou uvedeny příklady redukce průměru dentinových tubulů při použití výkonu 150 mJ/puls a jejich zatavení výkonem 200 mJ/puls. Analýzy AFM byly prováděny kontaktně s hroty z nitridu křemíku.



Obrázek 19: Zatavení dentinových tubulů (skenovaná oblast 80 μ m)

Využití AFM při studiu povrchových vlastností měkkých kontaktních čoček

Vývoj materiálů pro výrobu "moderních" kontakních čoček můžeme datovat k roku 1936, kdy byl použit materiál polymetylmetakrylát (PMMA) vyznačující se výbornou průzračností. V té době nahradil dosud používané sklo. Je zřejmé, že materiály byly nejen tvrdé, ale především nepropustné pro vzdušné plyny a to vedlo k dráždění rohovky.

V roce 1976 nechal patentovat akademik Wichterle hydrofilní gel, poly-hydroxyetylmetakrylát (p-HEMA), který se vyznačoval měkkostí a prostupností vzdušného kyslíku. Od této doby můžeme registrovat vývoj měkkých polymerních materiálů pro výrobu kontaktních čoček. V současné době se používají polysiloxanové hydrogely (PDMS) v kombinaci s hydrofilickými monomery (NVP, p-HEMA). Tyto měkké kontaktní čočky mají výbornou propustnost kyslíku a poměrně vysoký obsah vody > 50%. Při správné aplikaci a ošetřování vhodnými desinfekčními roztoky jsou tyto kontaktní čočky určené pro dlouhodobé nošení [35].

Výzkumy jsou zaměřené na permeabilitu vody a iontů v souvislosti s pohybem kontaktní čočky v oku, chování kontaktních čoček v solných roztocích, zejména v souvislosti s třením a adhezí a studium morfologie siloxanových hydrogelů [36].



Obrázek 20: Změny povrchu hydrofilního gelu při vysychání

Vzhledem k vysokému obsahu vody není možné pozorovat kontaktní čočky v suchém stavu. Při vysušení dochází ke smršťování gelu a k narušení struktury (obr.20.). Bylo tedy nutné použít AFM skener pro kapalné vzorky se speciální komůrkou, která zajišťovala smáčení kontaktní čočky v ošetřovacím roztoku, viz. obr. 21. Tím bylo dosaženo kvalitních snímků, viz. obr. 22, které potvrdily očekávanou uspořádanou strukturu s cylindrickými póry.



Obrázek 21: Komůrka pro analýzu kontaktních čoček

7. Závěr

Z předloženého textu vyplývá, že mikroskopie atomárních sil poskytuje biologickým oborům řadu aplikačních možností. Použití skeneru pro kapalné vzorky umožňuje zobrazit struktury *in-vivo* v rozměrech desítek až stovek nanometrů přímo v přirozeném fyziologickém prostředí vybraných buněk a tkání.

Na základě našich zkušeností je možné konstatovat, že kvalitních reprodukovatelných výsledků jsme dosáhli u tužších vzorků jako jsou dentin nebo materiály měkkých kontaktních čoček.



Obrázek 22: Kvalitně zobrazený povrch kontaktní čočky z materiálu p-HEMA (sken 20 μ m)

Skener pro kapalné vzorky přináší sice nové analytické možnosti, avšak ty jsou spojené s obtížemi při nastavení mikroskopu, se kterými se naše pracoviště teprve vyrovnává. Poznatky, bohužel zejména negativní, zjištěné na našem pracovišti mohou být cenné pro začínající operátory u AFM využívajících skener pro kapalné vzorky.

Poděkování

Publikace vznikla z podpory výzkumných záměrů MSM 153100007 "Přístrojové centrum fyzikálního a chemického výzkumu na PřF UP v Olomouci" a MSM 153100008 "Nová léčiva závažných lidských onemocnění"

Literatura:

[1] Colton, R.J, Engel, A., Frommer, J.E, Gaub, H.E, Gewirth, A.A., Guckenberger, R., Rabe, J., Heckl, W.M., Parkinson, B.: In: *Procedures in Scanning Probe Microscopies.* (1998), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.

[2] Hansma, H.G., Sinsheimer, R.L., Groppe, J., Bruice, T.C., Elings, V.B., Gurley, G., Bezanilla, M., Mastrangelo, I.A., Hough, P.V.C., Hansma, P.K.: *Scanning* **15** (1993), 296-299.

[3] Lyubchenko, Y.L., Gall, A.A., Shlyakhtenko, L.S., Harrinton, R.E., Jacobs, B.L., Oden, P.I., Lindsay, S.M.: J. of Biomolecular Structure&Dynamics, 10 3 (1992), 589-606.

[4] Hansma, H.G., Revenko, I., Kim, K., Laney, D.E., Nucl. Ac. Res. 24 4 (1996), 713-720.

[5] Rivetti, C, Yang G., Guthold M., Zhu X, Rivetti C, Yang G., Thomson N.H, Kasas S, Hansma H.G., Smith, B., Hansma, P.K., Bustamante, C.: *Biophysical J.* 77 (1999), 2284-2294.

[6] Jondle, D.M., Ambrosio, L., Vesenka, J.: Chromosome Research 3 (1995), 239-244.

[7] Lin, H., Lal, R., Do, C.: Biochemistry 39 12 (2000), 3192-3196.

[8] Vuppu, A.K., Garcia, A.A., Vernia, C.: Biopolymers 42 (1997), 89-100.

[9] Wolberg, A.S., Stafford, D.W., Erie, D.A., Human factor IX binds to specific sites on the collagenous domain of collagen IV. J. Biol. Chem., 1997, 27, 16717-16720.

[10] Beckmann, M., Nollert, P., Kolb, H.A.: Manipulation and molecular resolution of a phosphatidylcholine –supported planar bilayer by atomic force microscopy. J. Membrane Biol., 1998, 161, 227-233.

[11] Shibata-Seki. T., Masai, J., Tagawa, T., Sorin, T., Kondo, S.: In-situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a substrate. *Thin Solid Films*, 1996, **273**, 297-303.

[12] Mosbacher, J., Häberle, W., Hörber, H.K.: Studying membranes with scanning force microscopy and patch-clamp technique. *J. of Vac. Sci. B.*, 1996, **14**, 2, 1449-1461.

[13] Puu, G., Gustafon, I., Artursson, E., Ohlsson, P.A.: Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, **10**, 463-476.

[14] Wang, H., Clapham, D.E.: Conformational changes of the in situ nuclear pore complex. *Biophysical J.* 1999, **77**, 241-247.

[15] Baker, A.A., Helbert, W., Sugiyama, J., Miles, M.J.: Surface structure of native cellulose microscystals by AFM. Appl. Phys. A., 1998, 66, S559-S563.

[16] Yip, C.M., Brader, M.L., Frank, B.H., Defilippis, M.R., Ward, M.D.: Structural studies of a crystalline insulin analog complex with protamine by atomic force microscopy. *Biophysical J.*, 2000, **78**, 466-473.

[17] Acad, C.R.: Simultaneous imaging of the surface and the submembraneous cytoskeleton in living cells by tapping mode atomic force microscopy. *Sci III*, 1997, **320**, 8, 637-643.

[18] Grimellec, C., Lesniewska, E., Giocondi, M.C., Finot, E., Vié, V., Goudonnet, J-P.: Imaging of the surface of living cells by low-force contact mode atomic force microscopy. *Biophysical J.*, 1998, **75**, 695-703.

[19] Braga, P.C., Ricci, D.: Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 1998, **42**, 1, 18-22.

[20] Girasole, M., Cricenti, A., Generosi, R., Congiu-Castellano, A., Boffi, F., Arcovito, A., Boumis, G., Amiconi, G.. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after

treatment with a dihydropyridinic drug. Applied Physics Letter, 2000, 76, 24, 3650-3652.

[21] Drygin, Y.F., Bordunova, O.A., Gallyamov, M.O., Yaminsky I.V.: Atomic force microscopy examination of tobacco mosaic virus and virion RNA. *FEBS Lett.*, 1998, **425**, 2, 217-221.

[22] Tsilimbaris, M.K., Lesniewska, E., Lydataki, S., Le Grimellec, C., Goudonnet, J.P., Pallikaris, I.G.: The use of atomic force microscopy for the observation of corneal epithelium surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, **41**, 3, 680-686.

[23] Silikas, N., Watts, D.C., England, K.E.R., Jandt, K.D.: Surface fine structure of treated dentine investigated with tapping mode atomic force microscopy. J. of Dentistry, 1999, 27, 137-144.

[24] Smith, J.R., A quantitative method for analysing AFM images of the outer surfaces of human hair. *J.of Microscopy*, 1998, 191, **3**, 223-228.

[25] Mechaber, W. L., Marshall, D.B., Mechaber, R.A., Jobe, R.T., Chew, F.S.: Mapping leaf surface landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**, 4600-4603.

[26] Zlatanova, J., Lindsay, S. M., Leuba, S.H.: Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microsope. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2000, **74**, 37-61.

[27] Yang, G., Cecconi, C., Baase, W.A., Vetter, I.R., Breyer, W.A., Haack, J.A., Matthews, B.W., Dahlquist, F.W., Bustamante, *C. Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** 1 (2000) 139-144.

[28] Radmacher M. IEE Engineering in medicine and biology. 16 2 (1997) 47-57.

[29] Oberleithner, H., Schneider, S.W., Henderson, R.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 14144-14149.

[30] Brown, H.G., Hoh, H.J.: Biochemistry 36 49 (1997)15035-15040.

[31] Domke, J., Parak, W.J., George, M., Gaub, H.E., Radmacher, M: *Eur. Biophys. J* 28 (1999) 179-186

[32] Gelskey, S.C., White, J.M. Pruthi, V.K.: The Effectivneness of the Nd:YAG Laser in the Treatment of Dental Hypersensitivity. *J.Can.Dent.Assoc.*, 1993, **59**, p.377-386

[33] Lan,W.H.,Liu,H.C.: Sealing of human dentinal tubules by Nd:YAG Laser. J. Clin.Laser.Med.Surg. 1995, 13, p. 329-333.

[34] Lan, W.H., Liu, H.C.: Treatment of Dental Hypersensitivity by Nd:YAG Laser J. Clin. Laser. Med. Surg. 1996, 14, p.89-92.

[35] Nicolson, P.C., Vogt, J.: Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials.* **22**, (2001) p. 3273-3283

[36] Kim, S.H., Opdahl, A., Marmo, Ch., Somorjai, G.A.:AFM and SFG studies of pHEMA-based hydrogel contact lens surfaces in saline solution: adhesion, friction, and the presence of non-crosslinked polymer chains at the surface. *Biomaterials.* **23**, (2002) p. 1657-1666