

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an international research infrastructure

CERIC

Biomeccanica di tessuti bioptici con Microscopia a Forza Atomica

Loredana Casalis, Elettra Sincrotrone Trieste, NanoInnovation Lab 22/02/2021, PaGES6 Kick-off Meeting

Biomeccanica cellulare e tissutale



Punto d'incontro tra fisica e biologia, la meccanobiologia studia i fondamenti dell' interazione tra cellule e ambiente extra-cellulare, come le forze fisiche esercitate dall'ambiente extra-cellulare vengano registrate dalle cellule e tradotte in comportamenti cellulari (come forma, motilità, differenziazione, adesione) e nella definizione della struttura dei tessuti, sani e malati. Fa parte di quella che si chiama "medicina traslazionale".

> Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Biomeccanica cellulare e tissutale



Per studiare le forse di interazione cellula-matrice e la risposta biochimica cellulare, occorre studiare la struttura del citoscheletro, le proteine di adesione focale e la struttura della matrice con risoluzione molecolare, ovvero nanometrica.

> Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Matrice extracellulare (ECM)





- Protein fibres (collagen, elastin)
- Adhesive protein (laminin, fibronectin)
- Polysaccharides (hyaluronic acid, heparan sulphate)
- Cell adhesion (integrin, cadherin)

ECM forma un microambiente unico che promuove la formazione del tessuto. Le component fondamentali attraverso le quali si controlla il tessuto sono:

- Molecole ECM
- Concentrazione dei Growth Factor
- Topografia
- Proprietà Meccaniche (stiffness)

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Matrice extracellulare (ECM)



- Human Mesenchimal Stem cells
- growth medium or bipotential differentiation medium supportive of both osteogenic and adipogenic fates

CERIC

 Micropost rigidity shifted the balance of hMSC fates: osteogenic lineage was favored on rigid micropost arrays whereas adipogenic differentiation was enhanced on soft ones.

Decouple substrate rigidity from adhesive and surface properties



www.ceric-eric.eu/project/pages



Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure

PaG

Microscopia ottica





CERIC

PaGES

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure

Microscopia ottica



Limite di diffrazione (Abbe):

 $\frac{1}{2n\sin\alpha}$

Potere risolutivo (d=distanza minima tra due oggetti per poterli considerare distinti)

www.ceric-eric.eu/project/pages

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Nuovi microscopi



- Microscopio Elettronico
- Microscopio a Effetto Tunnel
- Microscopio a Forza Atomica
- Microscopi a Raggi X

il microscopio a forza atomica,

inventato in Svizzera nel laboratorio della IBM a Zurigo nel 1986, osserva gli oggetti tastandoli, "alla cieca", cioè come fa una persona quando si trova al buio, con un "nanodito".

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



CERIC



L' AFM è un microscopio nato per fare **immagini 3D del profilo topografico** della superfice di oggetti, sia inorganici che organici e biologici, con **risoluzione nanometrica**, in qualunque ambiente (vuoto, aria, liquido).

Durante la scansione, la sonda nanometrica misura punto per punto le **forze di interazione molecolari** col campione.

www.ceric-eric.eu/project/pages

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Microscopio a Forza Atomica (AFM) in biologia

DNA



Cells





CERIC

PaGES^o





Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Lo strumento si basa su:

1) Una sonda nanometrica (tip)

CERIC

- Un sensore di forza (cantilever)
- Un sistema di detection della forza (laser + fotodiodo)
- 4) Motori di precisione (scanner piezoelettrici) per il controllo del posizionamento della sonda

PaG

5) Un Sistema di retroazione (feedback)



xy and z are mechanically decoupled optical access from below not so fast



CERIC

PaGES





Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure

PaGE

CERIC

Cantilever





La cantilever è di dimensioni micrometriche. La sua **sensitività** dipende dalla **costante elastica k**_c, che a sua volta dipende dal **modulo di Young** E del materiale che la compone (silicio o nitruro di silicio) e dai parametri geometrici: K



 $^{\text{D}}\text{K}_{\text{c}} = \frac{Ewt_{\text{c}}^3}{4L^3}.$

E= Modulo di Young

PaG

Tipici valori di K_c: nN/nm. Tipici valori di forza rilevati: da pN a nN

www.ceric-eric.eu/project/pages

Modulo di Young

Si definiscono due nuove grandezze nella trattazione della deformazione dei solidi: il carico specifico (σ) e la deformazione specifica (ε).

Il carico specifico è dato dal rapporto tra la forza a cui è sottoposto il solido e la sezione perpendicolare alla forza stessa; l'unità di misura è quindi il N/m².

 $\sigma = \frac{F}{C}$

La deformazione specifica invece è data dal rapporto tra l'allungamento lineare del materiale e la sua lunghezza a riposo in assenza di carico. Trattandosi di un rapporto tra lunghezze, ε è un numero puro e non ha unità di misura.

Queste definizioni preliminari ci permettono di scrivere la **definizione di modulo di Young** (o modulo di elasticità), che è dato dal rapporto tra il carico specifico e la deformazione specifica. In una formula:

 $E = -\frac{\sigma}{2}$

 $\varepsilon = \frac{\Delta l}{I}$

Il modulo di Young, detto anche modulo di elasticità, esprime la propensione del materiale ad allungarsi/accorciarsi in risposta alle forze di carico. Si misura in N/m², ovvero come una pressione (Pa).

https://www.youmath.it/lezioni/fisica/dinamica/3032-modulo-di-young.html

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure

PaG



Sbarra sottoposta a una forza di trazione (carico).

Modulo di Young: tessuti umani



ResearchGate

PaGE:

CERIC



Cantilever







La forza applicata alla cantilever in corrispondenza della punta genera una deflessione dZ (verso l'alto se la forza è repulsiva, verso il basso se attrattiva) in prima approssimazione proporzionale alla forza stessa (**legge di Hooke**):

$$F_z = -K_c dZ$$



Cantilever







La cantilever è un **oscillatore** armonico caratterizzato da una **frequenza di risonanza**

$$\omega_0 = \sqrt{k/m} = \sqrt{\frac{Et^2}{l^4\rho}}$$

$$k = \frac{F}{d} = \frac{Ewt^3}{4l^3}$$

E= Young Modulus ρ = densità



Detector (laser + fotodiodo)



Un laser (rosso, infrarosso) colpisce la cantilever nella parte posterior ed è riflesso su un fotodiodo a 4 quadranti. La posizione del riflesso è proporzionale alla deflessione della cantilever. La "leva ottica" funge da amplificatore della piccolo deflessione.

> Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



CERIC

Schiacciando il campione (cellula, tessuto) in modo controllato con la punta dell' AFM si possono avere informazioni sulla rigidità (stiffness modulo di Young) dei campioni biologici. I dati hanno dimostrato che in molte patologie (anemia, diabete, cardiomiopatie, Parkinson's and Alzheimer's, cancer e molte altre) le proprietà meccaniche delle cellule cambiano rispetto alle sane e possono essere considerate indice della malattia.







CERIC









Prima del contatto: la **distanza tra la base della cantilever e il campione** coincide con la **distanza punta e campione.**

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure





Dal punto di contatto in poi:

-Se il materiale ha **rigidità infinita** (come il vetro) la distanza punta-campione rimane zero mentre la distanza tra la base della cantilever e il campione si reduce – la **cantilever di deforma**

-Se il materiale è **soffice**, la punta penetra il materiale, di un valore che è **inversamente proporzionale** alla **stiffness** del campione

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure





Se il materiale è **soffice** quindi, la deflessione della cantilever dal punto di contatto in poi va corretta del valore di penetrazione della punta nel materiale (fig. b) Il valore di penetrazione, o "indentazione" si calcola aggiungendo la deflessione della cantilever al valore z del motore piezoelettrico

www.ceric-eric.eu/project/pages

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure





PaGES

Núria Gavara DOI 10.1002/jemt.22776

CERIC



L'esperimento per determinare le proprietà meccaniche del campione consiste nel registrare, sullo stesso punto, **curve di avvicinamento** - **allontanamento** del sistema **punta-campione**. La non sovrapposizione delle due curve nella zona lontana dal campione (A) indica possibili tilt del sistema che vanno corretti (B).

La non sovrapposizione delle due curve nella zona di contatto (B) indica la natura visco-elastica del campione, come ad esempio una cellula.

Va determinato il **punto di contatto** (C), che viene considerate il punto zero per la misura di indentazione. La forza viene invece calcolata dalla misura di deflessione della cantilever (C).





Misure di biomeccanica cellulare/tissutale si realizzano in genere utilizzando una **sferetta di polistirene** (alcuni micron) al posto della punta, per mediare su zone piu' grandi del campione (cellula: alcune decine di micron di grandezza; tessuti: alcuni mm). Per estrarre il valore di rigidità del campione i dati (curve forza –indentazione) vanno analizzati con dei modelli di fit. Il modello più semplice è il **modello di Hertz.**

> Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure





Ipotesi del modello di Hertz sulla natura del campione da analizzare:

- isotropico (v = 0.5), omogeneo, visco-elastico
- infinitamente spesso
- Non-deformabile
- Nessun altra interazione tra punta e campione

Queste ipotesi sono in genere soddisfatte nel limite di piccole indentazioni (< 10% altezza delle cellule/tessuti)

Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an International Research Infrastructure



Analisi delle caratteristiche biomeccaniche delle diverse alterazioni tissutali con AFM

CERIC



Region analyzed: Intraalveolar septa



Planning, Management and Execution of a Scientific Experiment in an international research infrastructure

CERIC

Thank you

loredana.casalis@elettra.eu

Loredana Casalis, Elettra Sincrotrone Trieste, NanoInnovation Lab 22/02/2021, PaGES6 Kick-off Meeting