

Instytut Fizyki Jądrowej  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
Polska Akademia Nauk



Rola sił mechanicznych generowanych przez macierz  
zewnątrzkomórkową w rozwoju raka prostaty

Katarzyna Pogoda

*Praca na stopień doktora nauk fizycznych wykonana pod kierunkiem  
Pani dr hab. Małgorzaty Leckiej*

Kraków 2015

*„Nie tylko sztuka i wiedza,  
ale także cierpliwość  
musi być częścią dzieła.”*

*– Johann Wolfgang Goethe*

## Podziękowania

*Napisanie podziękowań jest procesem niełatwym, gdyż chcąc wymienić każdą osobę, z którą w ciągu ostatnich pięciu lat skrzyżowały się moje naukowe drogi – a w wyniku owego skrzyżowania powstał przyczynek do niniejszej pracy – jej objętość przekroczyłaby znacznie wszystkie obowiązujące normy. Z konieczności ograniczam się więc do imiennego podziękowania osobom wybranym, ale każdemu, kto choć w małym stopniu udzielił mi pomocy, poświęcił swój czas służąc radą czy też wsparciem z całego serca dziękuję.*

*Pani dr hab. Małgorzacie Lekkiej – za wprowadzenie mnie w świat fizyki eksperymentalnej, wspólne żeglugi po nieznanym wodach nauki, a przede wszystkim pełnienie roli promotora w moim przewodzie doktorskim – serdecznie dziękuję.*

*Pani Joannie Wiltowskiej-Zuber i Pani Joannie Pabijan – za perfekcyjne zabezpieczanie zaplecza laboratoryjnego.*

*Kolegom i koleżankom z Pracowni Badań Mikroukładów Biofizycznych, a szczególnie Pani mgr Justynie Bobrowskiej – za pomoc, wsparcie, wspaniałą atmosferę i cierpliwość.*

*Pani dr hab. Czesławie Paluszkiwicz – za możliwość przeprowadzenia badań spektroskopii w podczerwieni, pomoc w analizie danych i ogromną życzliwość.*

*Pani dr Joannie Mystkowskiej – za możliwość przeprowadzenia pomiarów reologicznych na Politechnice Białostockiej.*

*Panu Prof. dr hab. Robertowi Buckiemu – za wszystko, a w szczególności niezliczone dyskusje, inspiracje i dodawanie otuchy.*

*Panu Prof. Paulowi Janmey'owi – za ciepłe przyjęcie, możliwość pracy na Uniwersytecie w Pensylwanii, liczne i płodne dyskusje naukowe.*

*Panu Prof. dr hab. Wojciechowi M. Kwiatkowi oraz całemu zespołowi Zakładu 52 w IFJ PAN – praca z Państwem była dla mnie zaszczytem!*

*Wspaniałym przyjaciółom, którymi los tak szczerze mnie obdarza.*

*Najukochańszym rodzicom i rodzinie, bez których największe nawet odkrycie naukowe straciłoby sens.*

Badania zawarte w niniejszej pracy były częściowo finansowane przez  
Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu pt. „Wykorzystanie mikroskopii sił atomowych  
w nanomedycynie” – kierownik Małgorzata Lekka

UMO-2011/01/M/ST3/00711

oraz

„Badanie wpływu struktury chemicznej i topograficznej powierzchni polimerowych na  
wielkość adhezji komórek biologicznych linii metastatycznego (WM 266-4)  
i niemastatycznego (WM115) czerniaka skóry” – kierownik Szymon Prauzner-Bechcicki

UMO-2011/01/N/ST3/02255

Doktorantka uzyskała środki finansowe z  
Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta  
na odbycie stażu naukowego na Uniwersytecie w Filadelfii  
(Junior Advanced Research Award 2012 – 2013)

Doktorantka uzyskała środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej w ramach  
stypendium ETIUDA przyznawanego przez Narodowe Centrum Nauki

UMO-2014/12/T/NZ1/00527

## Abstract

Cells sense and actively respond to mechanical signals transmitted from their external microenvironment. In the physiological conditions, cells adhere to solid tissues that range in stiffness from very soft of ~100 Pa for brain to more rigid of ~100 000 Pa for soft cartilage. Mechanosensitivity, which can be understood as the ability to transduce mechanical signal into biochemical information, plays a crucial role in cell spreading, proliferation and migration. Interest in constructing compliant cell culture platforms is increasing over past years as researchers seek to investigate mechanical interactions between extracellular matrix (ECM) and cells under various physicochemical conditions. Cell stiffness sensing is urgent especially in context of cancer invasion to soft tissues, which is typically associated with an increase in rigidity due to local accumulation of a dense, crosslinked protein network, allowing detection of the tumor by physical palpation.

Motivated by the rapidly expanding amount of literature showing that mechanical alternations in cell–microenvironment properties leads to migration, invasion and metastasis of cancer, by the limited existing knowledge regarding the mechanosensing contribution to cancerogenesis, and by potential implications in therapeutic pathways that this knowledge can bring, the main objective of presented thesis was to examine the effect of substrate stiffness on mechanical behavior of prostate cells.

The studied cell lines were derived from healthy prostate gland (PZ-HPV-7), as well as from brain (Du145), and bone metastases (PC-3). In order to mimic native ECM viscoelastic properties, soft polyacrylamide hydrogels were used. Strain rheometry, atomic force microscopy, and FTIR-ATR spectroscopy were employed to characterize chemical and physical properties of the hydrogels. Atomic force and fluorescent microscopes were applied to quantify elastic properties, cytoskeleton organization and spreading area of prostate cells as well as population doubling time. To quantify the variability in cancer cells mechanosensing two parameters –  $A_R$  (area rate) and  $S_R$  (stiffness rate) were introduced.

The results show that prostate cancer cells behave differently depending on substrate stiffness and have unsettled mechanosensitivity comparing to healthy cells. These findings open a large window for new studies on altered mechanosensing of cancer cells and their response to matrix–derived forces during prostate cancer metastasis.

## Streszczenie

Komórki cechuje zdolność do percepcji i reakcji na sygnały mechaniczne docierające z ich otoczenia. W żywym organizmie komórki są elementami tkanek, których sztywność może wynosić zaledwie  $\sim 100$  Pa dla mózgu, ale aż  $\sim 100\ 000$  Pa dla miękkiej chrząstki. Mechanoczułość, rozumiana jako zdolność do przekształcenia bodźca fizycznego na sygnał biochemiczny, odgrywa kluczową rolę w procesie rozplaszczania się komórek, podziale komórkowym oraz migracji. Liczne próby eksperymentalnego zbadania oddziaływań mechanicznych występujących między komórką, a jej natywnym otoczeniem doprowadziły do opracowania protokołów syntezy podłoży hydrożelowych o własnościach lepkosprężystych podobnych do tkanek ludzkiego organizmu. Zbadanie wpływu bodźców mechanicznych na aktywność fizjologiczną komórek wydaje się być szczególnie interesujące w kontekście chorób nowotworowych, którym często towarzyszą lokalne zmiany sztywności tkanek, palpacyjnie wyczuwalne jako guzy.

Prezentowane w niniejszej pracy badania prowadzone były dla komórek prawidłowych, pochodzących z obwodowej strefy gruczołu krokowego (PZ-HPV-7), oraz komórek rakowych, wywodzących się z przerzutów raka prostaty do mózgu (Du145) i kości (PC-3). Manipulacja sztywnością otoczenia komórek była możliwa dzięki zastosowaniu hydrożeli polimerowych wykonanych z polikarylamidu. Własności chemiczne i fizyczne hydrożeli zostały zweryfikowane przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej z transformatą Fouriera, reometru rotacyjnego oraz mikroskopu sił atomowych. W celu opisanie własności elastycznych komórek, organizacji ich cytoszkieletu oraz pola powierzchni zastosowano mikroskopię fluorescencyjną oraz mikroskopię sił atomowych. Jakościowa analiza mechanoczułości poszczególnych linii komórkowych była możliwa dzięki wprowadzeniu dwóch parametrów –  $A_R$  (będącego miarą szybkości zmian pola powierzchni komórek w funkcji sztywności otoczenia) oraz  $S_R$  (będącego miarą szybkości zmian elastyczności komórek w funkcji sztywności otoczenia).

Uzyskane wyniki pokazują modulującą rolę bodźców mechanicznych docierających do komórek z ich otoczenia. Ponadto, mechanoczułość komórek prawidłowych i nowotworowych przejawia odmienny charakter. Różnice są widoczne zarówno w morfologii komórek, ich własnościach elastycznych jak i tempie podziału komórkowego.

## Wykaz stosowanych skrótów

ECM – (ang. *extracellular matrix*) macierz zewnątrzkomórkowa

BPH – (ang. *benign prostatic hyperplasia*) łagodny przerost prostaty

PCa – (ang. *prostate cancer*) rak prostaty

PAA – poliakrylamid (lub poliakryloamid)

bis-akrylamid – N,N'-metylenobisakrylamid

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

FTIR – ATR – (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*)  
spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni

AFM – (ang. *Atomic Force Microscopy*) mikroskopia sił atomowych

PSPD – (ang. *PhotoSensitive PhotoDiode*) współczynnik czułości detektora

PBS – (ang. *Phosphate-buffered saline*) roztwór soli fizjologicznej

Sulfo-SANPAH – sulfosukcynimidyl-6-(4-azydo-2-nitrofenyloamino)heksanian

# Spis treści

Rozdział 1 – Wprowadzenie i cel pracy .....	1
1.1 Parametry opisujące własności elastyczne .....	1
1.1.1 Moduł Younga (elastyczności).....	3
1.1.2 Moduł Kirchhoffa (ścianania).....	4
1.1.3 Moduł Helmholtza (ściśliwości) .....	5
1.1.4 Relacje pomiędzy modułami elastyczności, ścianania i ściśliwości.....	6
1.2 Techniki pomiarowe stosowane w badaniach biomechanicznych .....	6
1.3 Wpływ bodźców mechanicznych na rozwój nowotworów .....	12
1.3.1 Molekularne podstawy odpowiedzi mechanicznej komórki.....	13
1.3.2 Rola oddziaływań mechanicznych w rozwoju nowotworów .....	18
1.3.3 Rak prostaty.....	19
1.4 Cel pracy.....	21
1.5 Literatura .....	22
Rozdział 2 - Własności chemiczne i fizyczne podłoży poliakrylamidowych .....	28
2.1 Wstęp .....	28
2.2 Materiały i metody.....	29
2.2.1 Synteza żeli poliakrylamidowych .....	29
2.2.2 Przygotowanie podłoży z żeli poliakrylamidowych .....	31
2.2.3 Spektroskopia w zakresie podczerwieni .....	32
2.2.4 Reometria .....	35
2.2.5 Mikroskopia Sił Atomowych .....	37
2.3 Uzyskane wyniki i ich dyskusja .....	44
2.3.1 Własności chemiczne powierzchni żelu poliakrylamidowego.....	44
2.3.2 Makroskopowe własności mechaniczne żelu poliakrylamidowego.....	47
2.3.3 Lokalne własności mechaniczne żelu poliakrylamidowego .....	53
2.3.4 Relacja modułów elastyczności $E$ i ścianania $G$ dla żelu poliakrylamidowego ...	55
2.3.5 Topografia powierzchni żelu poliakrylamidowego.....	56
2.4 Wnioski.....	57
2.5 Literatura .....	59
Rozdział 3 – Elastyczność komórek prostaty rosnących na powierzchni szkła.....	63
3.1 Wstęp .....	63
3.2 Materiały i metody.....	65
3.2.1 Hodowla komórkowa .....	65



3.2.2	Mikroskopia fluorescencyjna .....	67
3.2.3	Analiza wielkości i kształtu komórek .....	68
3.2.4	Mikroskopia Sił Atomowych .....	68
3.2.5	Analiza własności mechanicznych komórek.....	69
3.2.6	Wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek.....	70
3.2.7	Statystyka .....	70
3.3	Uzyskane wyniki i ich dyskusja .....	72
3.3.1	Morfologia komórek prostaty rosnących na szkle .....	72
3.3.2	Elastyczność komórek prostaty rosnących na szkle.....	76
3.3.3	Czas podwojenia populacji komórek prostaty rosnących na szkle .....	81
3.4	Wnioski.....	82
3.5	Literatura. ....	83
Rozdział 4 – Elastyczność komórek prostaty rosnących na podłożach o różnej sztywności .		87
4.1	Wstęp.....	87
4.2	Materiały i metody.....	88
4.2.1	Sieciowanie powierzchni podłoży poliakrylamidowych.....	88
4.2.2	Immobilizacja fibronektyny na powierzchni podłoży poliakrylamidowych.....	91
4.2.3	Hodowle komórkowe .....	91
4.2.4	Ocena depozycji fibronektyny na powierzchni podłoży poliakrylamidowych ..	91
4.2.5	Znakowanie fluorescencyjne komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych.....	92
4.2.6	Elastyczność komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych.....	93
4.2.7	Czas podwojenia populacji komórek na podłożach poliakrylamidowych .....	93
4.2.8	Statystyka .....	94
4.3	Uzyskane wyniki .....	94
4.3.1	Rozkład fibronektyny na powierzchni podłoży poliakrylamidowych .....	94
4.3.2	Morfologia komórek prostaty rosnących na podłożach poliakrylamidowych ...	95
4.3.3	Elastyczność komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych.....	100
4.3.4	Czas podwojenia populacji komórek na podłożach poliakrylamidowych .....	107
4.4	Wnioski.....	109
4.5	Literatura .....	110
Rozdział 5 – Podsumowanie .....		114
Spis Rysunków.....		118
Spis Tabel.....		123

## Rozdział 1 – Wprowadzenie i cel pracy

Tematyka odpowiedzi komórkowej na bodźce mechaniczne jest zagadnieniem badawczym z pogranicza fizyki i biologii komórki. Badanie procesów fizycznych związanych z funkcjonowaniem obiektów żywych wymaga znajomości podstawowych pojęć i praw fizyki oraz zagadnień związanych z funkcjonowaniem komórek, tkanek i narządów. Wyznaczenie ścisłej granicy pomiędzy dwoma powyższymi dziedzinami nie jest możliwe, skutkiem czego interpretacja uzyskanych wyników wymaga kompleksowej analizy. Poniższy rozdział został podzielony na trzy części, które wprowadzają czytelnika w następujące tematy:

- Parametry opisujące własności elastyczne materii miękkiej oraz ich wzajemne relacje.
- Metody badawcze stosowane do pomiarów własności elastycznych żywych komórek i tkanek.
- Znaczenie własności elastycznych komórek i tkanek w chorobie nowotworowej.

Zakończeniem rozdziału jest opis celu pracy oraz zwięzłe przedstawienie jej poszczególnych etapów.

### 1.1 Parametry opisujące własności elastyczne

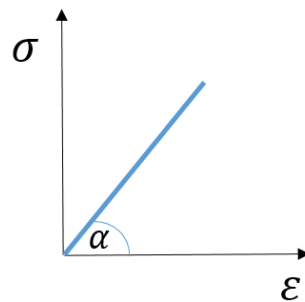
Własności mechaniczne możemy podzielić na różne grupy w zależności od charakteru odpowiedzi materiału ulegającego odkształceniu pod wpływem działania siły zewnętrznej. Ciała mogą ulegać odkształceniom odwracalnym ustępującym po usunięciu działania sił zewnętrznych, zwanym odkształceniami sprężystymi lub elastycznymi (wtedy materiał jest nazywany *ciałem idealnie elastycznym*). Inne rodzaje odkształceń, to odkształcenia częściowo odwracalne oraz trwałe (po usunięciu działania sił zewnętrznych wytworzone odkształcenie pozostaje w materiale, który jest wtedy nazywany *ciałem idealnie plastycznym*). Większość znanych materiałów rzeczywistych to materiały ulegające odkształceniom częściowo odwracalnym klasyfikującym je pomiędzy ciałami idealnie elastycznymi i plastycznymi. W zależności od wielkości siły zewnętrznej działającej na dany materiał, w pewnym zakresie odkształceń mogą one być traktowane jako materiały idealnie elastyczne, w których po

przekroczeniu pewnej wartości naprężenia wytworzonego przez zewnętrzną siłę (tzw. *granicy sprężystości*), zaczynają dominować własności plastyczne.

Jednym z pierwszych praw mechaniki, opisujących zależność pomiędzy naprężeniem  $\sigma$  a odkształceniem  $\varepsilon$  jest sformułowane około roku 1676 **prawo Hooke'a**. Mówi ono, że dla niewielkich naprężeń, odkształcenie jest proporcjonalne do naprężenia, a współczynnikiem proporcjonalności jest moduł elastyczności  $E$  (Rys. 1):

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1)$$

gdzie naprężenie  $\sigma$  jest zdefiniowane jako wielkość siły  $F$  działającej na jednostkę powierzchni odkształcanego materiału  $S$ . Jeśli siła ta jest prostopadła do powierzchni ciała, to naprężenie nazywamy normalnym, jeśli jest styczna do powierzchni, to naprężenie nazywamy stycznym lub ścinającym.



Rysunek 1. Zależność naprężenia  $\sigma$  od odkształcenia  $\varepsilon$  dla ciała podlegającego prawu Hooke'a.

Stan naprężenia zależy tylko od geometrii odkształcanego materiału i wielkości siły odkształcającej natomiast nie zależy od własności materiału, z którego odkształcane ciało jest wykonane. Własności materiału są wyznaczane na podstawie zależności naprężenia od odkształcenia. Wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje odkształceń:

1. Wydłużenie normalne powstałe w wyniku rozciągania lub ściskania.
2. Odkształcenie postaciowe obserwowane na skutek ścinania.
3. Odkształcenie objętościowe powstające w wyniku równomiernego ściskania za pomocą ciśnienia hydrostatycznego.

Każde z tych odkształceń może być wyznaczone na podstawie zmiany wymiarów ciała w odniesieniu do wymiarów początkowych czyli jako wydłużenie, przesunięcie poprzeczne lub zmiana objętości. I tak, dla rozciągania (ściskania) wyznacza się wydłużenie, dla ścinania – przesunięcie poprzeczne, a dla ściskania hydrostatycznego – zmianę objętości. Odkształcenia

te są odkształceniami sprężystymi, czyli mają charakter nietrwały, tzn. ustępują po usunięciu siły wywołującej naprężenia. Dla każdego typu odkształceń istnieją liniowe związki pomiędzy naprężeniem i odkształceniem:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (2)$$

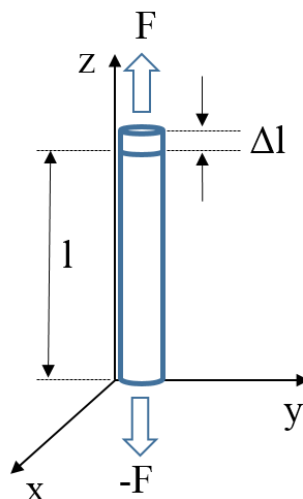
$$\tau = G \cdot \gamma \quad (3)$$

$$p = -K \cdot \vartheta \quad (4)$$

gdzie  $\sigma$ ,  $\tau$ ,  $p$  są odpowiednio naprężeniami występującymi podczas wydłużania (ściskania), ścinania i ściskania hydrostatycznego;  $\varepsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\vartheta$  są odpowiadającymi im odkształceniami. Współczynnikami proporcjonalności są moduły elastyczności zwane modułem Younga ( $E$ ), Kirchhoffa ( $G$ ) i Helmholtza ( $K$ ). Moduły te mają wymiar ciśnienia (Pa). Im wyższe wartości modułów sprężystości, tym trudniej jest odkształcić badany materiał.

### 1.1.1 Moduł Younga (elastyczności)

Moduł Younga jest podstawową wielkością opisującą własności elastyczne badanego materiału. Wyznacza się go jako stosunek przyrostu naprężenia  $\Delta\sigma$  do powstałego na jego skutek przyrostu wydłużenia sprężystego  $\Delta\varepsilon$ . Rysunek 2 ilustruje ideę wyznaczania modułu Younga dla przypadku jednoosiowego rozciągania pręta.



Rysunek 2. Wydłużenie pręta pod wpływem działania siły rozciągającej.

Pręt o długości początkowej  $l$  jest poddawany rozciąganiu (przyłożone zostają siły działające wzdłuż osi  $z$ ,  $F$  oraz  $-F$ ). Na skutek powstałego naprężenia pojawia się odkształcenie, czyli zmiana długości pręta o  $\Delta l$ . Dla małych wydłużeń (tzn. kiedy jest spełnione prawo Hooke'a) możemy zapisać:

$$\frac{F}{S} = E \cdot \frac{\Delta l}{l} \quad (5)$$

gdzie,

$F, -F$  – siły działające na pręt o długości  $l$  wzdłuż jego osi  $z$  [N],

$S$  – pole przekroju poprzecznego pręta [ $\text{m}^2$ ],

$E$  – moduł Younga [Pa],

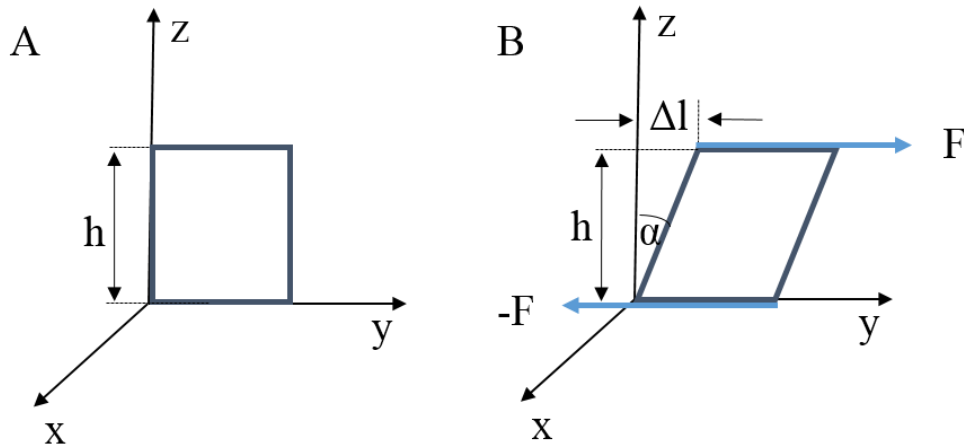
$\frac{\Delta l}{l}$  – względne wydłużenie pręta.

Naprężenie  $\sigma$  jest wyznaczane jako stosunek działającej siły  $F$  do pola powierzchni przekroju poprzecznego  $S$ , a odkształcenie  $\varepsilon$  to wartość  $\Delta l/l$ . Dla przypadku  $\Delta l = l$  równanie (5) przyjmuje postać  $\sigma = E$ , z którego wynika, moduł Younga jest równy naprężeniu, dla którego następuje dwukrotny wzrost długości ciała.

Podczas jednoosiowego rozciągania ciał rzeczywistych obserwowane jest zmniejszenie pola przekroju poprzecznego (mierzone w kierunku prostopadłym do działającej siły), które nie zostało uwzględnione w powyższym rozumowaniu. Stosunek zmiany pola przekroju poprzecznego (spowodowany przykładowo zwężeniem pręta podczas rozciągania) do jego względnego wydłużenia nosi nazwę *współczynnika Poissona*  $\mu$  i jest wielkością charakterystyczną dla danego materiału. Współczynnik Poissona jest bezwymiarowy i określa sposób w jaki materiał ulega odkształceniu.

### 1.1.2 Moduł Kirchhoffa (ścianania)

Moduł sprężystości poprzecznej (inaczej moduł odkształcalności postaciowej lub moduł Kirchhoffa) jest zdefiniowany jako stosunek naprężenia ścinającego działającego stycznie do powierzchni ciała oraz odkształcenia postaciowego jakie to naprężenie powoduje (Rys. 3).



Rysunek 3. Powstawanie odkształceń podczas działania sił ścinających: (A) przed i (B) po działaniu sił stycznych do powierzchni.

Miarą odkształcenia powstałego w wyniku działania naprężenia ścinającego  $\tau$  jest tangens kąta  $\alpha$  będący stosunkiem  $\Delta l/h$ . Jeśli deformacja nie jest duża, wtedy  $\tan \alpha$  jest równy w przybliżeniu samemu kątowi. Ponownie możemy zapisać:

$$\frac{F}{S} = G \cdot \frac{\Delta l}{h} \quad (6)$$

Współczynnik proporcjonalności  $G$  [Pa] nazywany jest modułem sprężystości poprzecznej (modułem Kirchhoffa). Dla małych wartości kątów  $\alpha$  zachodzi relacja:

$$\sigma = G \cdot \alpha \quad (7)$$

### 1.1.3 Moduł Helmholtza (ściśliwości)

Trzecim podstawowym typem odkształceń jest takie, które zostało wytworzone poprzez równomierne działanie ciśnienia hydrostatycznego. Zgodnie z prawem Pascala, jeśli na ciecz znajdującą się w zbiorniku zamkniętym działa ciśnienie zewnętrzne, to ciśnienie wewnątrz zbiornika rozchodzi się we wszystkich kierunkach jednakowo oraz jest równe ciśnieniu zewnętrznemu w każdym punkcie. Zmiana ciśnienia  $\Delta p$  jest proporcjonalna do względnej zmiany objętości:

$$\Delta p = -K \frac{\Delta V}{V} \quad (8)$$

gdzie współczynnikiem proporcjonalności jest  $K$ , czyli moduł ściśliwości.

Moduł ściśliwości określa odporność na zmianę objętości ciała pod wpływem zmiany ciśnienia. Znak minus oznacza zmniejszanie objętości ciała przy zwiększaniu ciśnienia. Analogicznie jak w przypadku modułu elastyczności oraz modułu ścinania, mniejsza wartość  $B$  oznacza większą ściśliwość. W przypadku żywych komórek nie rozważa się odkształceń związanych ze zmianą objętości, co prowadzi do założenia wartości współczynnika Poissona wynoszącej 0.5, charakterystycznej dla materiałów nieściśliwych.

#### 1.1.4 Relacje pomiędzy modułami elastyczności, ścinania i ściśliwości

Rozważane powyżej moduły elastyczności, ścinania i ściśliwości to stałe opisujące własności mechaniczne danego materiału. Dla ciał idealnie elastycznych i izotropowych są one powiązane ze sobą poniższymi relacjami:

- pomiędzy modułem ścinania  $G$  oraz modułem elastyczności  $E$ :

$$G = \frac{E}{2(1+\mu)} \quad (8)$$

- pomiędzy modułem ściśliwości  $K$  oraz modułem elastyczności  $E$ :

$$K = \frac{E}{2(1-2\mu)} \quad (9)$$

## 1.2 Techniki pomiarowe stosowane w badaniach biomechanicznych

Pomiar własności mechanicznych tkanek może być źródłem informacji na temat różnic strukturalnych obszarów zdrowych i patologicznie zmienionych, a w perspektywie stać się czułą metodą diagnostyczną zarówno w badaniach *in vivo* jak i *ex vivo* [1]. Ponadto, może pomóc w zrozumieniu mechanizmów patogenezы schorzeń, konstruowaniu ich modeli i opisu matematycznego. Umożliwi to symulację przebiegu procesu chorobotwórczego uwzględniającego zjawiska mechanobiologii. Próby zastosowania takiego opisu są już powszechne w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej, gdzie możliwość określenia parametrów fizykochemicznych otoczenia jest sprawą kluczową przy podejmowaniu decyzji o rodzaju stosowanych w leczeniu implantów [2]–[4].

W badaniach własności mechanicznych próbek biologicznych wyróżnia się dwa główne podejścia eksperymentalne. W pierwszym z nich czyli podejściu makroskopowym, badany

materiał jest traktowany jako ośrodek ciągły. W takim pomiarze siła powodująca odkształcenie próbki jest przykładana globalnie, a uzyskiwana informacja jest wypadkową własności mechanicznych wszystkich składników strukturalnych badanej próbki. Drugim podejściem jest podejście mikroskopowe, w którym pomiar jest przeprowadzany lokalnie, co pozwala na uzyskanie odpowiedzi mechanicznej każdego elementu strukturalnego próbki.

Pierwsze dane literaturowe dotyczące metod pomiaru własności mechanicznych tkanek pochodzą z lat 70-tych ubiegłego stulecia [5], [6]. W roku 1987 ukazała się książka autorstwa Fredericka Silvera opisująca własności mechaniczne tkanek i struktur związanych z narządem ruchu – ścięgien, chrząstek, kości, skóry oraz naczyń krwionośnych [7]. Stosowane ówczesnie techniki pomiarowe obejmowały wiskozymetrię rotacyjną, metody dynamicznego rozpraszania światła, wyznaczanie współczynnika dyfuzji oraz techniki umożliwiające przeprowadzenie różnorodnych testów wytrzymałościowych (jak np. rozciąganie, ściskanie, zginanie, skręcanie). Z tego samego roku pochodzi pionierska praca Thomasa Krouskopa i wsp., pokazująca zastosowanie ultrasonografu wykorzystującego efekt Dopplera (tzw. dopplerowskie USG) do oceny różnic gęstości tkanek rozrostowych. W pracy tej przedstawiono procedurę wyznaczania elastyczności mięśni ud oraz przedramienia w oparciu o pomiar prędkości przejścia fali ultradźwiękowej o różnej częstotliwości [8].

Pomimo rosnącego zaplecza eksperymentalnego, większość badań nad własnościami mechanicznymi tkanek prowadzona była dla tych części ludzkiego organizmu, które z fizjologicznego punktu widzenia są poddawane ciągłemu działaniu bodźców mechanicznych, jak mięśnie (rozciąganie), naczynia krwionośne (przepływ krwi), płuca (zmiany objętości podczas wymiany gazowej), skóra (dotyk) czy kości i chrząstki (ucisk). Bardzo mało uwagi poświęcano tkankom, które bezpośrednio nie brały czynnego udziału w aktywności mechanicznej organizmu (np. gruczoły wydzielania wewnętrznego). Dopiero w roku 1990 ukazała się praca Parkera i wsp. w której zostały przedstawione wyniki pomiarów elastyczności gruczołu prostaty oraz jej łagodnego przerostu, wątroby oraz raka wątroby z użyciem elastografii ultrasonograficznej [9]. W końcu lat dziewięćdziesiątych ukazała się kolejna praca Thomasa Krouskopa i wsp. w której sukcesywnie przebadano dwa typy tkanek zdrowych – piersi i prostaty – oraz wywodzących się z nich nowotworów, pochodzących z różnych stadiów zaawansowania. *Tabela 1* przedstawia wartości modułu elastyczności tkanek prostaty uzyskane w tych pomiarach. Ponadto, wszystkie próbki poddano trzem różnym szybkościom odkształcania (0.1, 1.0 oraz 4.0 Hz) oraz dwóm różnym stopniom wstępnej kompresji. Pomiar



elastyczności tkanek został wykonany *in vitro* przy użyciu maszyny wytrzymałościowej (Instron), a każda z tkanek po pomiarze poddana analizie histopatologicznej [10].

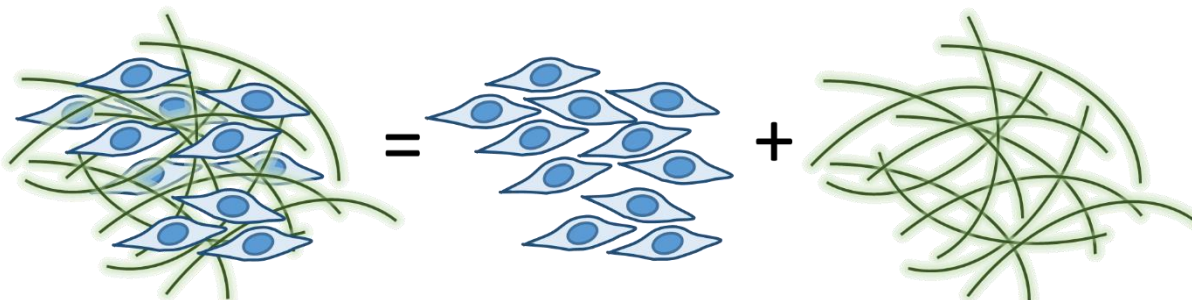
*Tabela 1. Moduł elastyczności prawidłowych oraz nowotworowych tkanek prostaty wyznaczony z użyciem różnych technik badawczych.*

<i>Typ tkanki</i>	<i>Technika pomiaru</i>	<i>Moduł elastyczności [kPa]</i>	<i>Typ pomiaru</i>	<i>Źródło</i>
<i>prostata prawidłowa</i>	maszyna wytrzymałościowa	55.0 ± 14.0*	<i>in vitro</i>	[10]
	elastografia ultrasonograficzna	3.8 ± 1.8*	<i>in vivo</i>	[11]
	AFM	brak danych	<i>in vitro</i>	[12]
<i>BPH**</i>	maszyna wytrzymałościowa	38.0 ± 8.0*	<i>in vitro</i>	[10]
	elastografia ultrasonograficzna	4.8 ± 6.2	<i>in vivo</i>	[12]
	AFM	3.0 ± 0.6	<i>in vitro</i>	[12]
<i>rak prostaty</i>	maszyna wytrzymałościowa	96.0 ± 19.0*	<i>in vitro</i>	[10]
	elastografia ultrasonograficzna	7.8 ± 3.3*	<i>in vivo</i>	[11]
	elastografia ultrasonograficzna	25.6 ± 10.2	<i>in vivo</i>	[12]
	AFM	1.7 ± 1.2	<i>in vitro</i>	[12]

\* pomiar wykonano dla częstotliwości obciążania wynoszącej 0.1 Hz; \*\* BPH – ang. *benign prostatic hyperplasia* – łagodny przerost prostaty.

Zainteresowanie pomiarami własności mechanicznych tkanek oraz próba ich korelacji ze zmianami patologicznymi tych tkanek trwają nieprzerwanie od czasów pierwszych publikacji Parkera i Krouskopa (*Tabela 1* przedstawia literaturowe wartości modułu elastyczności tkanek prostaty uzyskane w pomiarach przy użyciu różnych technik). W chwili obecnej obserwowany jest postęp nie tylko w modelach teoretycznych stosowanych do opisu własności elastycznych tkanek, ale także prowadzone są prace mające na celu skonstruowanie nowych technik badawczych [13].

Tkanki, to elementy składowe narządów, które posiadają złożoną strukturę (*Rys. 4*). Tworzy je zespół wyspecjalizowanych komórek, o podobnym pochodzeniu oraz funkcji. Przestrzenną organizację komórek zapewnia macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix, ECM*), zbudowana głównie z białek oraz cukrów, powiązanych ze sobą w zwartą sieć (wyjątek stanowi osocze krwi).



Rysunek 4. Ilustracja struktury tkanek, którą tworzy zespół wyspecjalizowanych komórek (kolor niebieski) oraz otaczająca je macierz zewnątrzkomórkowa (kolor zielony).

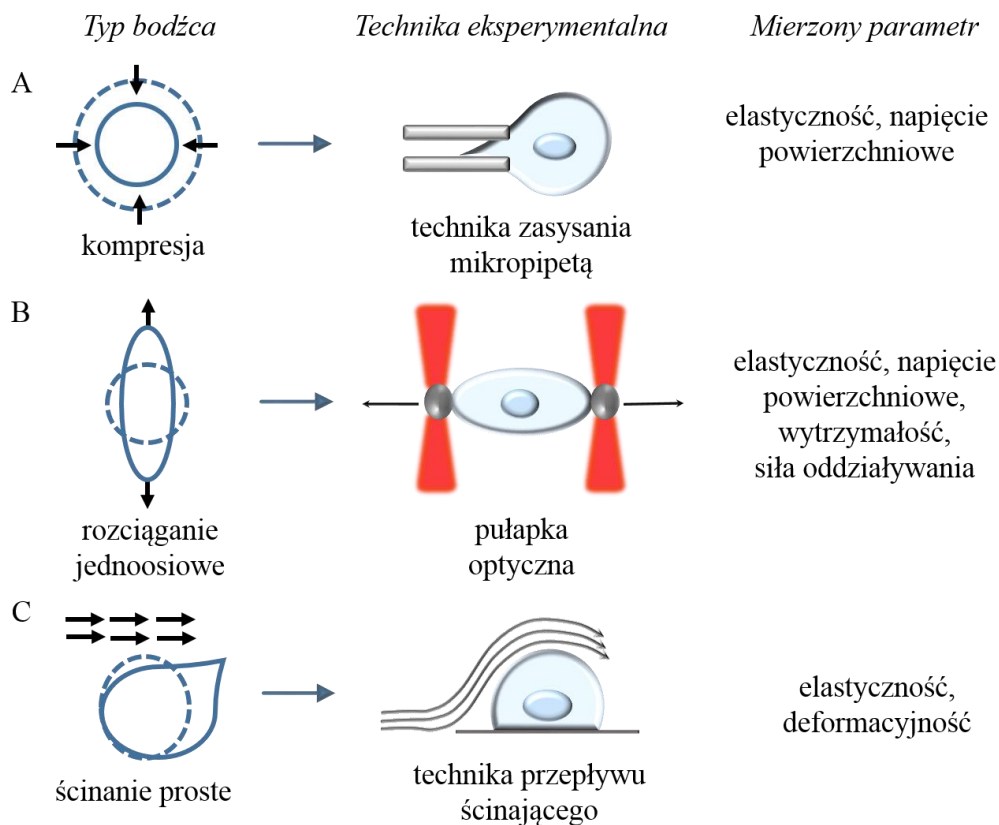
Każdy z elementów budujących tkanki (zarówno komórki jak i macierz zewnątrzkomórkowa) posiada unikalne własności mechaniczne takie jak elastyczność, plastyczność, lepkość czy wytrzymałość na rozciąganie. Wypadkowa tych własności determinuje odpowiedź mechaniczną tkanki na działanie zewnętrznych bodźców mechanicznych.

Wyznaczenie wartości parametrów opisujących własności mechaniczne pojedynczych komórek stało się możliwe dzięki rozwojowi takich metod pomiarowych jak technika zasysania mikropipetą (ang. *micropipette aspiration*, [14], [15]), technika szczypiec optycznych (ang. *optical tweezers* lub *optical stretcher* [16], [17]), metody opierające się na pasywnej (tj. śledzenie ruchów termicznych pojedynczych molekuł) i aktywnej mikroreologii (czyli śledzenie ruchów pojedynczych molekuł wywołanych na skutek działania zewnętrznych sił, np. pola magnetycznego), [18], [19], czy metod pomiaru odkształcalności komórek pod wpływem działania siły zewnętrznej [20], [21].

Podczas uczestnictwa w regulacji procesów fizjologicznych, komórki są narażone na działanie różnorodnych bodźców mechanicznych, takich jak zmiany ciśnienia czy występowanie sił ściskających lub rozciągających (Rys. 5). Dodatkowo, proces nowotworzenia powoduje wzrost oddziaływań fizycznych pojedynczych komórek na skutek ich zwiększonej ruchliwości, przyspieszonego podziału i zmienionej adhezji [22]. Rolą wielu technik badawczych jest symulacja konkretnego bodźca działającego na pojedyncze komórki, a następnie śledzenie odpowiedzi komórkowej.

Przykładowym efektem działania zmian ciśnienia na komórki mogą być zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej prowadzące zarówno do jej puchnięcia jak i kompresji (Rys. 5A). W wyniku utraty dużych ilości sodu z przestrzeni międzykomórkowych może dojść do tzw. *odwodnienia hipotonicznego*. Oznacza to, że powstały gradient osmotyczny powoduje

zwiększone przenikanie wody do wnętrza komórek a w rezultacie zwiększenie ich objętości (puchnięcie). Odwrotnością tego zjawiska jest tzw. *odwodnienie hipertoniczne*, podczas którego w przestrzeniach międzykomórkowych stężenie jonów sodu znacznie przewyższa jego stężenie wewnątrzkomórkowe. Gradient osmotyczny jest wtedy przeciwnie skierowany, a w wyniku utraty wody komórka zmniejsza swoją objętość (ulega kompresji). Technika umożliwiającą badanie własności mechanicznych komórek poddanych kompresji jest technika zasysania mikropipetą. Wykorzystuje ona mikrokapilary o niewielkiej średnicy (mniejszej niż średnica pojedynczej komórki), do których jednostronnie przykładana jest siła ssąca, powodująca wciągnięcie komórki do wnętrza mikrokapilary. Pomiar taki pozwala na uzyskanie informacji na temat elastyczności komórek oraz napięcia powierzchniowego ich błony [23].



*Rysunek 5. Techniki służące do pomiaru własności mechanicznych pojedynczych komórek, imitujące rodzaje bodźców mechanicznych na które komórki są narażone.*

Występowanie jednoosiowego rozciągania jest najlepiej widoczne podczas pracy mięśni poprzecznie prążkowanych (Rys. 5B). Obserwowane podczas skurczu ślizganie filamentów aktynowych pomiędzy filamenty miozynowe powoduje jednoosiową zmianę długości sarkomerów. Technika umożliwiającą symulowanie rozciągania jednoosiowego jest pułapka

optyczna (nazywana też szczypcami optycznymi), umożliwiająca pułapkowanie i przemieszczanie mikroskopowych obiektów przy pomocy skupionej wiązki światła laserowego. Rozciąganiu można poddać nie tylko pojedyncze komórki, ale także białka i nici DNA [24], [16]. W wyniku pomiaru można uzyskać informację na temat elastyczności badanego obiektu, jego napięcia powierzchniowego, wytrzymałości na rozciąganie oraz oddziaływań pomiędzy pojedynczymi molekułami [25], [26].

Komórki śródbłonna wyścielające wnętrze naczyń krwionośnych są nieustannie narażone na działanie naprężeń ścinających (*ang. shear stress*), których źródłem jest płynąca w naczyniach krew (Rys. 5C). Siły te działają stycznie do powierzchni komórek i zależą od prędkości przepływu. Ponadto, ten sam przepływ jest źródłem siły działającej prostopadle do powierzchni komórek – tj. naprężenia rozciągającego (*ang. tensile stress*) wynikającego z ciśnienia tętniczego krwi wywieranego na ściany naczyń. Technika umożliwiającą badanie komórek w warunkach ścinania prostego jest technika przepływu ścinającego. Umożliwia ona formowanie przepływów o różnej szybkości i lepkości, a nawet uwzględnienie pulsacyjnego charakteru przepływu, a następnie ocenę zmian morfologicznych naczyń lub komórek wyścielających sztuczne kanały przepływowe. Pozwala to na uzyskanie informacji na temat elastyczności naczyń i deformacyjności komórek [27]–[29].

Komórki są również narażone na działanie bodźców mechanicznych o zasięgu lokalnym, angażujących pojedyncze białka, kompleksy białkowe czy błonę komórkową i powodujących deformację jedynie fragmentu komórki. I tak maksymalna siła generowana przez filament aktynowy podczas przemieszczania się komórki wynosi około 5-7 pN [30]. Z kolei siła potrzebna na oderwanie pojedynczej komórki czerniaka złośliwego od warstwy komórek śródbłonna wynosi około 50 pN [31]. Siła skurczu generowana przez cytoszkielet komórek nierozpłaszczonych, o małym polu powierzchni wynosi około 10 nN, podczas gdy ta sama siła generowana przez cytoszkielet komórek rozpłaszczonych, o dużym polu powierzchni może wynosić nawet 30 nN [32].

Techniką umożliwiającą lokalne pomiary własności mechanicznych zarówno błony komórkowej, jak również głębszych warstw cytoszkieletu jest mikroskopia sił atomowych (AFM). Technika ta zasługuje na szczególną uwagę, ze względu na możliwość pomiaru oddziaływań w szerokim zakresie sił – od oddziaływań pojedynczych kompleksów białkowych na powierzchni komórki rzędu kilkudziesięciu pN, aż po deformację sztywnej ściany bakteryjnej siłami rzędu kilkunastu nN. Mikroskopia AFM jest obecnie jedną z najszerszej stosowanych technik do oceny zmian elastyczności cytoszkieletu komórkowego. Polega ona na

rejestracji oddziaływania sondy zakończonej ostrzem z powierzchnią próbki w funkcji odległości sondy od próbki. Szeroki wybór sond skanujących pozwala na łatwą zmianę zakresu sił oraz geometrii skanującego ostrza [33].

Zmiany elastyczności cytoszkieletu komórkowego, wyznaczone przy użyciu AFM, zostały zaobserwowane dla komórek w wielu jednostkach chorobowych takich jak miażdżyca, cukrzyca i wiele typów nowotworów [34]–[37]. Mikroskopia sił atomowych może również służyć do oceny zmian własności mechanicznych pojedynczych komórek w następstwie działania substancji chemicznych oraz leków [38]–[40]. Dodatkowo, dzięki możliwości prowadzenia pomiarów w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, można sprawdzić jak zmieniają się własności mechaniczne komórek w różnych warunkach zewnętrznych.

### 1.3 Wpływ bodźców mechanicznych na rozwój nowotworów

Do końca lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia opis wpływu czynników mechanicznych na żywy organizm ograniczał się do rejestracji sygnałów wywołanych zmianami drgań mechanicznych, przyspieszeń czy ciśnienia [41]. Spośród drgań mechanicznych główną uwagę skupiano na ultradźwiękach (fala dźwiękowa o częstotliwości wyższej niż górna granica słyszalności ucha ludzkiego, >20 kHz) oraz drganiach wibracyjnych (drgania o częstotliwości z zakresu poniżej kilkunastu Hz). Działanie biologiczne tych bodźców klasyfikowano w zależności od ich natężenia i czasu trwania. Zaobserwowano, że małe natężenia mogą prowadzić do zmiany przepuszczalności błon biologicznych, natomiast duże natężenia mogą skutkować deformacją jąder, przerwaniem błony komórkowej i śmiercią komórek [42]–[44]. Przyspieszenia uznawane były za czynniki mechaniczne związane z ruchem ciała, a ich bezpośrednią konsekwencją było pojawienie się sił bezwładności powodujących przemieszczanie płynów ustrojowych oraz narządów i tkanek w organizmach żywych [45]. Zmiany ciśnienia jako czynnika mechanicznego dyskutowane były głównie w kontekście jego wpływu na procesy oddechowe organizmu [46], [47].

W końcu lat dziewięćdziesiątych ugruntowane zostało przekonanie, że bodźce mechaniczne mogą być silnymi regulatorami funkcji życiowych tkanek i komórek [48]–[51]. Wnikliwa analiza struktur budujących tkanki pokazała, że żywe obiekty tworzą silnie uporządkowane systemy, których architektura jest utrzymywana dzięki działaniu sił rozciągających i ściskających będących w dynamicznej równowadze. Taki rodzaj

samostabilizacji obiektów żywych, określane mianem architektury tensegralnej, został po raz pierwszy zaproponowany przez Donalda Ingbera [52], [53]. Zastosowanie modelu tensegralnego pozwoliło wytłumaczyć zdolność komórek do szybkiej zmiany kształtu w odpowiedzi na zewnętrzne bodźce mechaniczne o wartości co najmniej progowej (tj. najniższej wartości bodźca niezbędnej do wywołania odpowiedzi komórki).

Obecnie wiele uwagi poświęca się zaburzeniom w równowadze mechanicznej oraz badaniom nad odpowiedzią komórek na bodźce mechaniczne - tzw. mechanoczułości<sup>1</sup> - tkanek i komórek na skutek progresji nowotworowej [54]. Istnieją publikacje pokazujące, że proces przemieszczania się komórek nowotworowych jest oparty o oddziaływania fizyczne. Przykładowo, gęsto upakowana masa komórek raka jajnika toruje sobie drogę, pozostawiając widoczną wyrwę w warstwie nabłonka [55]. Rola oddziaływań mechanicznych podczas metastazy pojedynczych komórek nowotworowych oderwanych od masy pierwotnej guza jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy, a jej zrozumienie rodzi nadzieję na powstanie nowych, przeciwnowotworowych metod terapeutycznych [22].

### 1.3.1 Molekularne podstawy odpowiedzi mechanicznej komórki

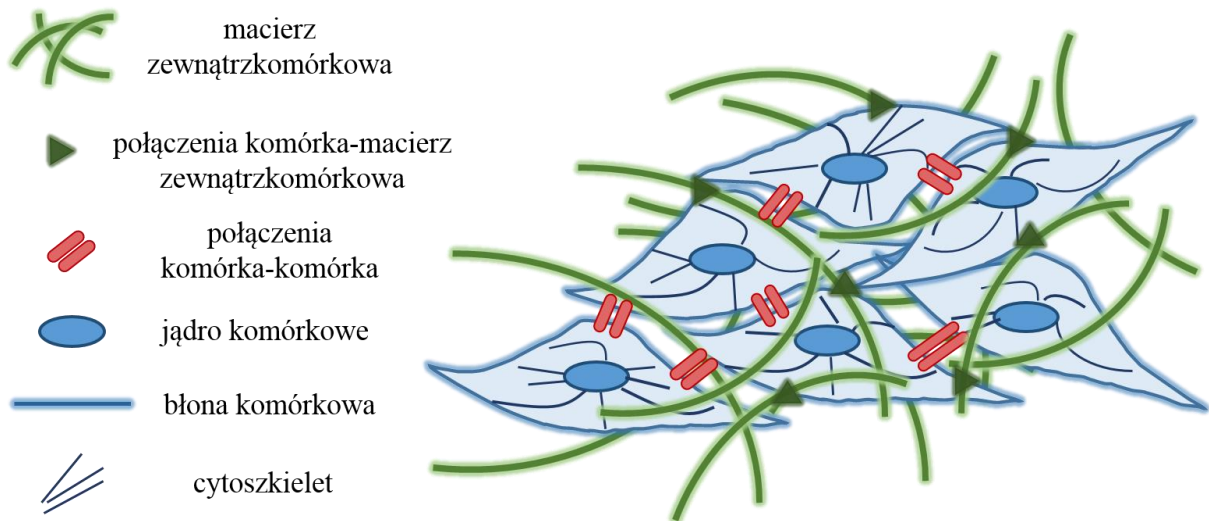
Różne typy komórek (bakteryjne, roślinne, zwierzęce) wytworzyły różnorodne strategie kontaktu z otoczeniem za pośrednictwem wyspecjalizowanych elementów strukturalnych. Wiele spośród tych struktur jest narażonych na działanie bodźców mechanicznych o różnej intensywności. Żyjące w roztworach wodnych bakterie są nieustannie wprawiane w drgania poprzez ruchy Browna, dzięki którym utrzymują się w zawieszynie. Powoduje to ich przypadkowe zderzenia oraz nieprzerwane bombardowanie ich błony przez cząsteczki wody. Komórki roślinne, tworzące ukierunkowaną strukturę, muszą dostosować swoje położenie w odpowiedzi na grawitację. W zależności od położenia w obrębie organizmu, komórki zwierzęce są selektywnie ekspozowane na działanie bodźców mechanicznych. Mogą to być przykładowo drgania o wysokiej częstotliwości w uchu środkowym, gradienty ciśnienia osmotycznego w naczyniach krwionośnych czy ciśnienie parcjalne powietrza w pęcherzykach płucnych. Monitorowanie i selektywne reagowanie na zewnętrzne bodźce mechaniczne wymaga współistnienia wielu szlaków sygnalizacyjnych, receptorów oraz mediatorów, które

---

<sup>1</sup> Mechanoczułość definiuje się jako zdolność do prawidłowej percepcji, przetworzenia, a następnie odpowiedzi komórki na działanie zewnętrznych bodźców mechanicznych.

pozwolą na wyodrębnienie sygnału mechanicznego i jego przetworzenie na konkretną informację biochemiczną.

Pojedyncza komórka posiada wyspecjalizowane struktury umożliwiające jej oddziaływanie mechaniczne z otoczeniem (Rys. 6).



Rysunek 6. Elementy strukturalne biorące udział w odbiorze i odpowiedzi mechanicznej w żywych komórkach.

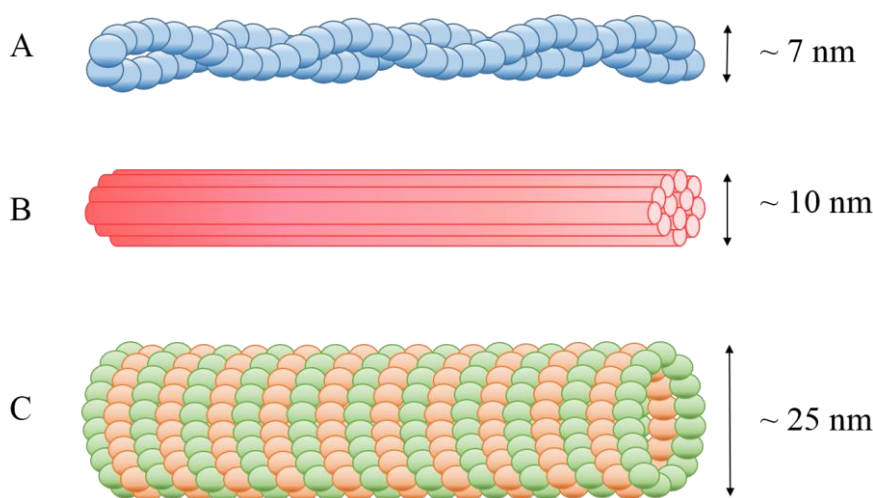
Głównymi elementami strukturalnymi biorącymi udział w odbiorze i odpowiedzi mechanicznej komórek są:

- błona komórkowa,
- cytoszkielet komórkowy,
- jądro komórkowe,
- połączenia komórka – macierz zewnątrzkomórkowa,
- połączenia komórka – komórka.

Jedną z najprostszych struktur komórkowych biorących udział w odpowiedzi mechanicznej komórki jest błona komórkowa – czyli półprzepuszczalna dwuwarstwa lipidowa oddzielająca wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego. Grupa bodźców mechanicznych, na które odpowiada błona komórkowa jest bardzo różnorodna – od zmiany płynności błony w wyniku ruchów termicznych poszczególnych molekuł, aż po gradienty ciśnienia osmotycznego działające w poprzek błony. Dlatego też, w toku ewolucji błona komórkowa została wyspecjalizowana, aby stanowić barierę przed potencjalnie szkodliwym działaniem bodźców mechanicznych. Jednocześnie, struktura ta umożliwia komórkom kontakt ze środowiskiem

zewnętrznym i przy jej udziale komórki wchodzi w interakcje z otoczeniem. Błona komórkowa nadaje komórce określony kształt i zapewnia selektywny transport substancji pomiędzy komórką a środowiskiem zewnętrznym. Zakłada się, że dwuwarstwa lipidowa otaczająca komórkę jest nieściśliwa i nie zmienia swojej gęstości pod działaniem sił odkształcających występujących w warunkach fizjologicznych [56], [57].

Strukturą tworzącą rodzaj wewnętrznego rusztowania oraz zapewniającą funkcjonalność komórki jest *cytoszkielet*. Podstawowymi elementami tworzącymi go są filamenty aktynowe (inaczej mikrofilamenty, *Rys. 7A*), filamenty pośrednie (*Rys. 7B*) oraz mikrotubule (*Rys. 7C*).



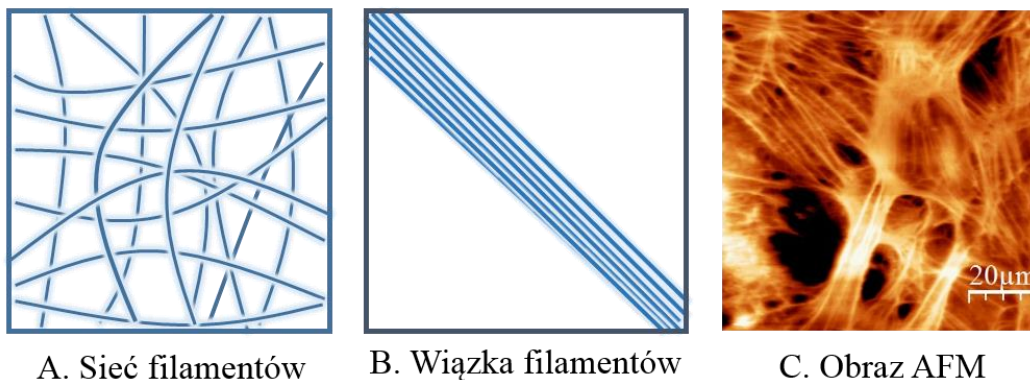
*Rysunek 7. Trzy typy filamentów białkowych tworzących cytoszkielet komórki: (A) filamenty aktynowe, (B) filamenty pośrednie, (C) mikrotubule (zaadaptowane z [58]).*

Dynamiczna sieć białkowych polimerów jest w charakterystyczny sposób rozlokowana w komórce: filamenty aktynowe są zakotwiczone w błonie komórkowej, filamenty pośrednie są równomiernie rozłożone w całej objętości komórki, natomiast mikrotubule rozchodzą się promieniście z centralnego miejsca w pobliżu jądra komórkowego. Ułożenie poszczególnych typów elementów cytoszkieletu zależy w dużym stopniu od ich rodzaju oraz pełnionej funkcji [59].

Podstawową jednostką budulcową tworzącą filamenty aktynowe jest aktyna. Występuje ona w komórkach jako pojedyncze białko globularne (G-aktyna) lub jako liniowy łańcuch złożony z monomerów G-aktyny. Tylko połowa występujących w komórce monomerów G-aktyny jest związana w sieć aktynową, reszta występuje w postaci wolnej i może zostać użyta do budowy łańcuchów w zależności od zapotrzebowania [60]. Filamenty aktynowe to najcieńsze struktury



budujące cytoszkielet. Ich średnica wynosi ok. 7 nm [61]. W większości komórek eukariotycznych włókna aktynowe są rozlokowane w warstwie leżącej pod błoną komórkową (tworząc tzw. cytoszkielet aktynowy, *ang. cortex*). Stąd też, uważa się, że to cytoszkielet aktynowy nadaje komórkom mechaniczną wytrzymałość. Siatka krótkich filamentów jest zakotwiczona w błonie komórkowej dzięki odpowiednim białkom wiążącym aktynę (*ang. actin-binding proteins*, w skrócie *ABPs*) [62]. Białka te są obecne w procesie formowania i wzrostu włókien aktyny, generując ich różnorodne kształty w zależności od lokalizacji. I tak, część białek wiąże aktynę w pęczki utrzymując poszczególne nici w ułożeniu równoległym, tworząc tzw. włókna naprężeniowe lub włókna stresu (*ang. stress fibers*). Inne białka wiążą filamente krzyżowo w żelopodobną sieć giętkich i krótkich filamentów (*Rys. 8*).



*Rysunek 8. Przykłady organizacji filamentów aktynowych w komórkach. (A) Struktura usieciowana, (B) równoległa wiązka filamentów, (C) topografia AFM filamentów aktynowych w żywej komórce w hodowli in vitro.*

Bogata w aktynę warstwa przypowierzchniowa komórki generuje siły potrzebne komórce na przemieszczanie się, a dynamiczny montaż i demontaż sieci aktynowej popycha do przodu wiodący koniec komórki. Dodatkowo, filamente aktynowe wraz z białkami towarzyszącymi, (głównie integrynami) tworzą miejsca kotwiczenia komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej, tzw. ogniska kontaktu [63].

Filamenty pośrednie to najbardziej wytrzymały element cytoszkieletu komórki. Wyglądem przypominają linę splecioną z kilku nici (podjednostek filamentów pośrednich), a średnica takiej liny to ok. 10 nm (*Rys. 7B*). Tak zorganizowana struktura wiąże się z ich główną rolą, jaką jest przenoszenie naprężeń mechanicznych w komórce. W zależności od rodzaju białek z których są zbudowane wyróżnia się kilka typów filamentów pośrednich. Część z nich jest zbudowana z białek zwanych laminami. Ich funkcją jest wzmacnianie wewnętrznej

powierzchni błony jądrowej. Inne, tzw. cytoplazmatyczne filamenty pośrednie występujące w komórkach nabłonka, są zbudowane z białka keratyny. W komórkach tkanki łącznej składają się z białka wimentyny, a w komórkach nerwowych tworzą tzw. neurofilamenty [64].

Mikrotubule to długie, wydrążone w środku cylindry utworzone z dimerów tubuliny ( $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny, białka globularne), (Rys. 7C). Przekrój poprzeczny mikrotubuli jest pierścieniem o zewnętrznej średnicy ok. 25 nm. W przeciwieństwie do pozostałych filamentów tworzących cytoszkielet, mikrotubule posiadają swoje centrum organizacyjne – tzw. centrosom – będący ośrodkiem nukleacji. Zwykle jest on umiejscowiony w pobliżu jądra komórkowego, a jeden z końców mikrotubuli jest w nim zakotwiczony. Drugi z końców penetruje promieniście przez cytoplazmę w kierunku błony komórkowej. Tak utworzona struktura organizuje wnętrze i podtrzymuje kształt komórki [65].

Jądro komórkowe stanowi rezerwuuar materiału genetycznego komórki, niezbędny do podtrzymania procesów życiowych. Jest również miejscem krzyżowania się kaskad sygnałowych stanowiąc „główne centrum dowodzenia”. Jądro komórkowe odbiera transmitowany przez cytoszkielet sygnał mechaniczny i zamienia go na biochemiczną informację. Informacja taka może być dla komórki sygnałem do rozpoczęcia podziału, zmiany trajektorii ruchu czy kształtu [66].

Ważną klasą cząsteczek biorących udział w odpowiedzi mechanicznej komórek są białka należące do rodziny *integrin*. Białka te tworzą połączenia pomiędzy cytoszkieletem aktynowym a macierzą zewnątrzkomórkową, dlatego też często określa się je mianem miejsc przylegania lub ognisk kontaktu. Związanie cytoszkieletu komórkowego z otaczającą macierzą umożliwia komórkom przyleganie do otoczenia oraz wymianę informacji. Integriny pełnią bardzo ważną rolę w przenoszeniu naprężeń pomiędzy cytoszkieletem, a otoczeniem komórki, stanowiąc ważny element w odpowiedzi mechanicznej komórki [67]. Prawidłowa sygnalizacja z użyciem połączeń komórka – macierz zewnątrzkomórkowa warunkuje prawidłowy przebieg podstawowych procesów życiowych.

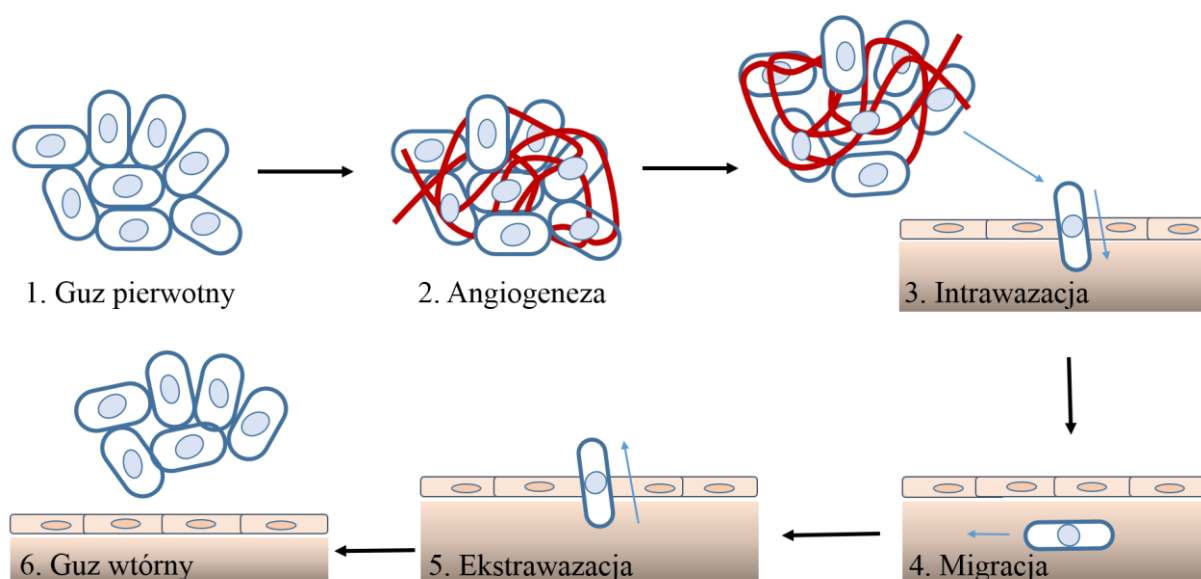
Inną klasą białek uczestniczących w transmisji bodźców mechanicznych są białka powierzchniowe *kadheryny*, tworzące połączenia międzykomórkowe. Połączenia te utrzymują ciągłość tkanek nabłonkowych oraz umożliwiają komórkom bezpośrednią sygnalizację. Białka kadheryny pośredniczą w mechanicznym połączeniu komórek między sobą, a więc również

stanowią drogę przenoszenia naprężeń mechanicznych występujących pomiędzy komórkami [68], [69].

### 1.3.2 Rola oddziaływań mechanicznych w rozwoju nowotworów

W ostatnich latach zwraca się dużą uwagę na zmiany własności mechanicznych tkanek w procesie powstawania przerzutów nowotworowych. Szerokie dyskusje dotyczą głównie zmiany sztywności macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wzrostu ciśnienia śródmiąższowego wewnątrz guzów [70]. Pomimo wyraźnych związków między zmianami własności mechanicznych, a stanem zaawansowania nowotworu, w dalszym ciągu badania nad mechanizmem powstawania i progresji tego schorzenia skupiają się głównie na określeniu roli czynników genetycznych i biochemicznych. Pomiary własności mechanicznych komórek i tkanek pozwalają spojrzeć na nowotwór jak na dynamiczny narząd, którego rozwój i wzrost w dużym stopniu zależy od działania bodźców mechanicznych.

Mechanizm tworzenia przerzutów przedstawia schemat na *Rysunku 9*. Komórki guza pierwotnego tworzą heterogenną, gęsto upakowaną strukturę, wyraźnie odgraniczoną od reszty zdrowych komórek. Aby umożliwić wzrost i rozprzestrzenianie się guza niezbędne jest powstanie nowych naczyń krwionośnych, pozwalających na transport substancji odżywczych do jego wnętrza. Proces ten nosi nazwę angiogenezy. Dodatkowo, unaczynienie guza otwiera komórkom nowotworowym drogę do migracji.



*Rysunek 9. Mechanizm powstawania przerzutów nowotworowych.*

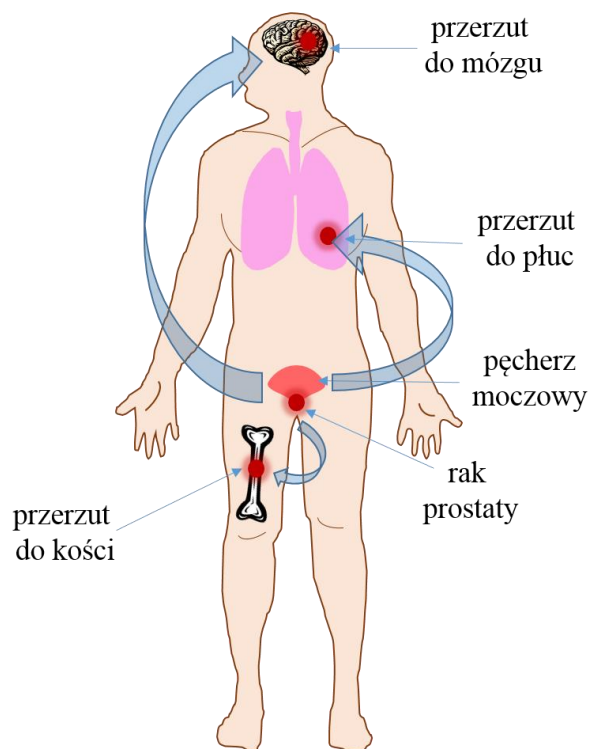
Gęsto upakowane w guzie pierwotnym komórki ulegają rozluźnieniu, co umożliwia im odrywanie się od masy guza i inwazję otaczających tkanek. W tym celu komórki muszą przekroczyć błonę podstawną, warstwę komórek śródbłonka wyściełającą naczynia krwionośne i dotrzeć do światła naczynia. Przenikanie komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych określa się mianem intrawazacji (wejścia). Komórki, które przedostały się do układu krwionośnego mają zdolność szybkiej migracji do najodleglejszych miejsc organizmu. Zanim jednak osiedlą się ponownie, tworząc wtórne ognisko przerzutowe, konieczna jest ponowna adhezja oraz migracja przez ściany naczyń krwionośnych – tzw. ekstrawazacja (wyjście). W miejscu przerzutu komórki proliferują, ponownie indukują angiogenezę i tworzą kolejne ogniska przerzutowe [71]–[73].

### 1.3.3 Rak prostaty

Gruczoł krokowy (inaczej prostata lub stercz) to narząd będący częścią męskiego układu płciowego. Znajduje się on poniżej pęcherza moczowego i otacza górną część cewki moczowej. Jego główną rolą jest współwytwarzanie płynnej wydzieliny będącej nośnikiem męskich gamet, niezbędnych w procesie zapłodnienia. U 50% męskiej populacji po przekroczeniu ok. 50 roku życia, gruczoł krokowy powiększa się, co w medycynie określane jest mianem łagodnego przerostu stercza (*ang. benign prostate hyperplasia, w skrócie BPH*) [74]. Jest to patologiczny rozrost tkanki gruczołowej (inaczej gruczolak), której przyczyną jest najprawdopodobniej proces starzenia się organizmu. Powiększenie objętościowe prostaty jest związane ze wzrostem liczby komórek gruczołowych oraz włókien białkowych w jej obrębie. Na tym etapie wzrostu gruczolak nie ma charakteru nowotworu złośliwego, ale fizycznie zaczyna wywierać ucisk na cewkę moczową, co powoduje zwężenie jej światła, a w rezultacie utrudnione oddawanie moczu.

Łagodny przerost gruczołu krokowego może przerodzić się w nowotwór złośliwy gruczołu krokowego (*ang. prostate cancer, w skrócie PCa*), ale przebieg tego procesu jest trudny do przewidzenia. Na ogół, tak jak jest to obserwowane w wielu innych typach nowotworów, choroba rozpoczyna się od pojedynczego ogniska pierwotnego, zlokalizowanego w obrębie narządu (tzw. stadium ograniczone do narządu). Z czasem nowotwór rozrasta się naciekając tkanki okołosterczowe. Proces naciekania okolicznych tkanek skutkuje przedostaniem się komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych i limfatycznych,

umożliwiają tworzenie wtórnych ognisk nowotworowych – tzw. przerzutów, które są główną przyczyną prowadzącą do zgonów pacjentów cierpiących na raka [75].



*Rysunek 10. Drogi tworzenia przerzutów w raku prostaty. Komórki rakowe mają zdolność do naciekania tkanek różniących się własnościami elastycznymi, takimi jak tkanka mózgową czy macierz kości.*

Powstawanie wtórnych ognisk nowotworowych jest procesem wieloetapowym, zachodzącym wskutek zmian genotypowych<sup>2</sup>, a w następstwie fenotypowych<sup>3</sup> pojedynczych komórek podlegających transformacji nowotworowej. Podczas tego procesu komórka nabywa takich własności jak zdolność do migracji, nieograniczonego podziału, czy zdolność do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, których komórka prawidłowa nie posiada. Podobnie jak dla innych typów nowotworów, rak prostaty przerzutuje w określone miejsca organizmu. W zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej występowanie wtórnych ognisk raka stwierdza się w tkankach o różnych własnościach elastycznych, jak węzły chłonne (0.12 kPa), mózg (0.4 kPa), wątroba (0.64 kPa), płuca (5–6 kPa) czy macierz kości ( $\sim 10^6$  kPa),

<sup>2</sup> Zmian zachodzących w zbiorze genów danego osobnika.

<sup>3</sup> Zmian zachodzących w zespole cech osobniczych takich jak anatomia, morfologia, fizjologia.

(Rys. 10) [76], [77]. W chwili obecnej nie dysponujemy pełnym wytłumaczeniem molekularnego mechanizmu powstawania przerzutów raka prostaty z uwzględnieniem jego kierunkowości. Istniejące hipotezy zakładają, że adhezja i namnażanie komórek następuje w miejscu, gdzie lokalnie wystąpiły warunki sprzyjające rozwojowi.

#### 1.4 Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli jaką bodźce mechaniczne transmitowane z otoczenia komórki odgrywają w rozwoju raka prostaty. Transmisja bodźców mechanicznych odbywa się z powierzchni komórki do jej wnętrza. Umieszczenie komórki w otoczeniu o różnej sztywności powoduje zmianę wielkości transmitowanej siły, na którą komórka będzie musiała odpowiedzieć zmianą pewnych procesów życiowych. Zdolność do prawidłowej adaptacji w odpowiedzi na zewnętrzne sygnały mechaniczne określa się mianem mechanoczułości. Komórki nowotworowe, mające zdolność do migracji w odległe miejsca ludzkiego organizmu i adoptowania się do otoczenia o skrajnych własnościach mechanicznych (jak tkanka mózgu i macierz kości), muszą charakteryzować się zaburzoną mechanoczułością. Chcąc określić stopień mechanoczułości komórek zdrowych i zmienionych nowotworowo przeprowadzono poniższą, trójetapową analizę.

1. W celu wywołania zmiany wielkości siły transmitowanej z otoczenia komórki zaplanowano syntezę podłoży do hodowli komórkowych o różnej sztywności, których własności chemiczne i fizyczne zostały dokładnie scharakteryzowane. Podłoża te miały za zadanie imitowanie własności lepkosprężystych tkanek, które fizjologicznie są miejscami metastazy raka prostaty. Technikami eksperymentalnymi wykorzystanymi w tej części pracy była spektroskopia absorpcyjna z transformatą Fouriera, reometr rotacyjny oraz mikroskop sił atomowych.
2. Planowana charakterystyka dotyczyła komórkowego układu modelowego raka prostaty, którego własności zostały uprzednio opisane w hodowli na powierzchni twardej, tj. na powierzchni szkła ( $E \sim 70$  GPa). Analiza obejmowała wyznaczenie takich parametrów jak pole powierzchni komórek, obwód oraz sferyczność, a następnie własności elastyczne pojedynczych komórek oraz tempo ich podziału. Narzędziami umożliwiającymi powyższą charakterystykę była mikroskopia fluorescencyjna oraz mikroskopia sił atomowych.

3. Zasadniczą częścią pracy a zarazem realizacją postawionego celu było prowadzenie hodowli komórkowych na podłożach o różnej sztywności, z zakresu od 0.4 kPa do 41 kPa. Komórki poddane zostały dokładnej charakterystyce mikroskopowej, wyznaczono parametry opisujące pole powierzchni oraz elastyczność komórek w funkcji zmian sztywności otoczenia. Aby określić stopień mechanoczułości komórek wprowadzone zostały parametry odzwierciedlające tempo zmian pola powierzchni i elastyczności zależnych od sztywności otoczenia. Dodatkowo zbadany został wpływ bodźców mechanicznych na tempo podziału komórkowego, które odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu.

## 1.5 Literatura

- [1] M. Lekka, "Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 11, pp. 691–2, Nov. 2012.
- [2] F. H. Silver, Y. P. Kato, M. Ohno, and A. J. Wasserman, "Analysis of mammalian connective tissue: relationship between hierarchical structures and mechanical properties.," *J. Long. Term. Eff. Med. Implants*, vol. 2, no. 2–3, pp. 165–98, Jan. 1992.
- [3] C. E. Misch, Z. Qu, and M. W. Bidez, "Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: Implications for dental implant treatment planning and surgical placement," *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 57, no. 6, pp. 700–706, Jun. 1999.
- [4] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants," *J. Mater. Res.*, vol. 13, no. 01, pp. 94–117, Jan. 2011.
- [5] C. H. Brown, *Structural materials in animals*. London: Pitman, 1975.
- [6] J. W. G. S.A. Wainwright, W.D. Biggs, J.D. Currey, *Mechanical Design in Organisms*. Princeton University Press, 1976.
- [7] F. Silver, *Biological Materials: Structure, Mechanical Properties and Modeling of Soft Tissues*. New York University Press, 1987.
- [8] T. A. Krouskop, D. R. Dougherty, and F. S. Vinson, "A pulsed Doppler ultrasonic system for making noninvasive measurements of the mechanical properties of soft tissue.," *J. Rehabil. Res. Dev.*, vol. 24, no. 2, pp. 1–8, Jan. 1987.
- [9] K. J. Parker, S. R. Huang, R. A. Musulin, and R. M. Lerner, "Tissue response to mechanical vibrations for 'sonoelasticity imaging,'" *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 241–246, Jan. 1990.

- [10] T. A. Krouskop, T. M. Wheeler, F. Kallel, B. S. Garra, and T. Hall, “Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression.,” *Ultrason. Imaging*, vol. 20, no. 4, pp. 260–74, Oct. 1998.
- [11] K. Hoyt, B. Castaneda, M. Zhang, P. Nigwekar, P. A. di Sant’agnese, J. V Joseph, J. Strang, D. J. Rubens, and K. J. Parker, “Tissue elasticity properties as biomarkers for prostate cancer.,” *Cancer Biomark.*, vol. 4, no. 4–5, pp. 213–25, Jan. 2008.
- [12] X. Wang, J. Wang, Y. Liu, H. Zong, X. Che, W. Zheng, F. Chen, Z. Zhu, D. Yang, and X. Song, “Alterations in mechanical properties are associated with prostate cancer progression.,” *Med. Oncol.*, vol. 31, no. 3, p. 876, Mar. 2014.
- [13] D. T. N. Chen, Q. Wen, P. A. Janmey, J. C. Crocker, and A. G. Yodh, “Rheology of Soft Materials,” *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, vol. 1, no. 1, pp. 301–322, Aug. 2010.
- [14] R. M. Hochmuth, “Measuring the Mechanical Properties of Individual Human Blood Cells,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 115, no. 4B, p. 515, Nov. 1993.
- [15] R. M. Hochmuth, “Micropipette aspiration of living cells,” *J. Biomech.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–22, Jan. 2000.
- [16] D. G. Grier, “A revolution in optical manipulation.,” *Nature*, vol. 424, no. 6950, pp. 810–6, Aug. 2003.
- [17] M. Dao, C. T. Lim, and S. Suresh, “Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers,” *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 51, no. 11–12, pp. 2259–2280, Nov. 2003.
- [18] C. Wilhelm, “Out-of-Equilibrium Microrheology inside Living Cells,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 101, no. 2, p. 028101, Jul. 2008.
- [19] D. Robert, T.-H. Nguyen, F. Gallet, and C. Wilhelm, “In vivo determination of fluctuating forces during endosome trafficking using a combination of active and passive microrheology.,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, p. e10046, Jan. 2010.
- [20] G. Bao and S. Suresh, “Cell and molecular mechanics of biological materials.,” *Nat. Mater.*, vol. 2, no. 11, pp. 715–25, Nov. 2003.
- [21] C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek, “Mechanical models for living cells--a review.,” *J. Biomech.*, vol. 39, no. 2, pp. 195–216, Jan. 2006.
- [22] D. Wirtz, K. Konstantopoulos, and P. C. Searson, “The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 7, pp. 512–22, Jul. 2011.
- [23] C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek, “Mechanical models for living cells - A review,” *J. Biomech.*, vol. 39, pp. 195–216, 2006.
- [24] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, “Stretching DNA with optical tweezers.,” *Biophys. J.*, vol. 72, no. 3, pp. 1335–46, Mar. 1997.



- [25] S. Kuo and M. Sheetz, “Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers,” *Science* (80-. ), vol. 260, no. 5105, pp. 232–234, Apr. 1993.
- [26] J. Liphardt, B. Onoa, S. B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante, “Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force.,” *Science*, vol. 292, no. 5517, pp. 733–7, Apr. 2001.
- [27] P. F. Davies, “Flow-mediated endothelial mechanotransduction,” *Physiol Rev*, vol. 75, no. 3, pp. 519–560, Jul. 1995.
- [28] P. F. Davies, “Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology.,” *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2009.
- [29] K. A. Barbee, P. F. Davies, and R. Lal, “Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy,” *Circ. Res.*, vol. 74, no. 1, pp. 163–171, Jan. 1994.
- [30] A. Mogilner and G. Oster, “Polymer Motors: Pushing out the Front and Pulling up the Back,” *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 18, pp. R721–R733, Sep. 2003.
- [31] P.-H. Puech, K. Poole, D. Knebel, and D. J. Muller, “A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM.,” *Ultramicroscopy*, vol. 106, no. 8–9, pp. 637–44, Jan. 2006.
- [32] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, “Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 4, pp. 1484–9, Feb. 2003.
- [33] C. M. Franz and P.-H. Puech, “Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics,” *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 1, no. 4, pp. 289–300, Dec. 2008.
- [34] M. Lekka, M. Fornal, G. Pyka-Fościk, K. Lebed, B. Wizner, T. Grodzicki, and J. Styczeń, “Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope.,” *Biorheology*, vol. 42, no. 4, pp. 307–17, Jan. 2005.
- [35] S. Suresh, “Biomechanics and biophysics of cancer cells,” *Acta Mater.*, vol. 55, no. 12, pp. 3989–4014, Jul. 2007.
- [36] M. Lekka, D. Gil, K. Pogoda, J. Dulińska-Litewka, R. Jach, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, K. Okoń, and P. Laidler, “Cancer cell detection in tissue sections using AFM,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 518, pp. 151–156, 2012.
- [37] K. Kliche, P. Jeggle, H. Pavenstädt, and H. Oberleithner, “Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium.,” *Pflugers Arch.*, vol. 462, no. 2, pp. 209–17, Aug. 2011.

- [38] C. Rotsch and M. Radmacher, “Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study.,” *Biophys. J.*, vol. 78, no. 1, pp. 520–35, Jan. 2000.
- [39] J. Wang, Z. Wan, W. Liu, L. Li, L. Ren, X. Wang, P. Sun, L. Ren, H. Zhao, Q. Tu, Z. Zhang, N. Song, and L. Zhang, “Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 4, pp. 721–7, Dec. 2009.
- [40] K. Pogoda, J. Jaczewska, J. Wiltowska-Zuber, O. Klymenko, K. Zuber, M. Fornal, and M. Lekka, “Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data.,” *Eur. Biophys. J.*, vol. 41, no. 1, pp. 79–87, Jan. 2012.
- [41] M. P. Murray, A. Seireg, and R. C. Scholz, “Center of gravity, center of pressure, and supportive forces during human activities,” *J Appl Physiol*, vol. 23, no. 6, pp. 831–838, Dec. 1967.
- [42] F. Wu, W.-Z. Chen, J. Bai, J.-Z. Zou, Z.-L. Wang, H. Zhu, and Z.-B. Wang, “Pathological changes in human malignant carcinoma treated with high-intensity focused ultrasound,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1099–1106, Aug. 2001.
- [43] A. H. Mesiwala, L. Farrell, H. J. Wenzel, D. L. Silbergeld, L. A. Crum, H. R. Winn, and P. D. Mourad, “High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 28, no. 3, pp. 389–400, Mar. 2002.
- [44] L. J. M. Juffermans, O. Kamp, P. A. Dijkmans, C. A. Visser, and R. J. P. Musters, “Low-intensity ultrasound-exposed microbubbles provoke local hyperpolarization of the cell membrane via activation of BK(Ca) channels.,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 34, no. 3, pp. 502–8, Mar. 2008.
- [45] R. F. Chandler, C. E. Clauser, J. T. McConville, H. M. Reynolds, and J. W. Young, “Investigation of Inertial Properties of the Human Body,” Mar. 1975.
- [46] J. Mead and J. L. Whittenberger, “Physical Properties of Human Lungs Measured During Spontaneous Respiration,” *J Appl Physiol*, vol. 5, no. 12, pp. 779–796, Jun. 1953.
- [47] J. Mead, “Control of respiratory frequency,” *J Appl Physiol*, vol. 15, no. 3, pp. 325–336, May 1960.
- [48] R. J. Pelham and Y. -l. Wang, “Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 25, pp. 13661–13665, Dec. 1997.
- [49] R. J. Pelham and Y. -l. Wang, “High Resolution Detection of Mechanical Forces Exerted by Locomoting Fibroblasts on the Substrate,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 935–945, Apr. 1999.
- [50] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang, “Cell movement is guided by the rigidity of the substrate.,” *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pp. 144–52, Jul. 2000.

- [51] L. A. Flanagan, Y.-E. Ju, B. Marg, M. Osterfield, and P. A. Janmey, “Neurite branching on deformable substrates.,” *Neuroreport*, vol. 13, no. 18, pp. 2411–5, Dec. 2002.
- [52] D. E. Ingber, “Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton.,” *J. Cell Sci.*, vol. 104 ( Pt 3, pp. 613–27, Mar. 1993.
- [53] D. E. Ingber, “Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 59, pp. 575–99, Jan. 1997.
- [54] D. T. Butcher, T. Alliston, and V. M. Weaver, “A tense situation: forcing tumour progression.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 108–22, Mar. 2009.
- [55] M. P. Iwanicki, R. A. Davidowitz, M. R. Ng, A. Besser, T. Muranen, M. Merritt, G. Danuser, T. A. Ince, T. Ince, and J. S. Brugge, “Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium.,” *Cancer Discov.*, vol. 1, no. 2, pp. 144–57, Jul. 2011.
- [56] E. A. Evans and R. M. Hochmuth, *Membrane Properties: Mechanical Aspects, Receptors, Energetics and Calcium-Dependence of Transport*, vol. 10. Elsevier, 1978.
- [57] O. P. Hamill and B. Martinac, “Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells,” *Physiol Rev*, vol. 81, no. 2, pp. 685–740, Apr. 2001.
- [58] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Molecular Biology of the Cell.” Garland Science, 2002.
- [59] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, “Cell mechanics and the cytoskeleton,” *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 485–492, Jan. 2010.
- [60] A. Hall, “Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton,” *Science (80-. )*, vol. 279, no. 5350, pp. 509–514, Jan. 1998.
- [61] K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch, “Atomic model of the actin filament.,” *Nature*, vol. 347, no. 6288, pp. 44–9, Sep. 1990.
- [62] J. H. Hartwig and D. J. Kwiatkowski, “Actin-binding proteins,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 87–97, Feb. 1991.
- [63] D. R. Critchley, “Focal adhesions – the cytoskeletal connection,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 133–139, Feb. 2000.
- [64] P. M. Steinert and D. R. Roop, “Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments,” Nov. 2003.
- [65] J. W. J. Kerssemakers, E. L. Munteanu, L. Laan, T. L. Noetzel, M. E. Janson, and M. Dogterom, “Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution.,” *Nature*, vol. 442, no. 7103, pp. 709–12, Aug. 2006.
- [66] P. Isermann and J. Lammerding, “Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease.,” *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 24, pp. R1113–21, Dec. 2013.

- [67] N. Wang, J. Butler, and D. Ingber, “Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton,” *Science* (80-. ), vol. 260, no. 5111, pp. 1124–1127, May 1993.
- [68] M. A. Schwartz and D. W. DeSimone, “Cell adhesion receptors in mechanotransduction.,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 551–6, Oct. 2008.
- [69] M. Smutny and A. S. Yap, “Neighborly relations: cadherins and mechanotransduction.,” *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 7, pp. 1075–7, Jun. 2010.
- [70] K. Pogoda, L. Chin, P. C. Georges, F. J. Byfield, R. Bucki, R. Kim, M. Weaver, R. G. Wells, C. Marcinkiewicz, and P. a Janmey, “Compression stiffening of brain and its effect on mechanosensing by glioma cells,” *New J. Phys.*, vol. 16, p. 075002, 2014.
- [71] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [72] I. J. Fidler, “The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 453–8, Jun. 2003.
- [73] G. P. Gupta and J. Massagué, “Cancer metastasis: building a framework.,” *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 679–95, Nov. 2006.
- [74] D. G. Bostwick, W. H. Cooner, L. Denis, G. W. Jones, P. T. Scardino, and G. P. Murphy, “The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate,” *Cancer*, vol. 70, no. S1, pp. 291–301, Jul. 1992.
- [75] P. Mehlen and A. Puisieux, “Metastasis: a question of life or death.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 449–58, Jun. 2006.
- [76] L. Bubendorf, A. Schöpfer, U. Wagner, G. Sauter, H. Moch, N. Willi, T. C. Gasser, and M. J. Mihatsch, “Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients,” *Hum. Pathol.*, vol. 31, no. 5, pp. 578–583, May 2000.
- [77] I. Levental, P. C. Georges, and P. A. Janmey, “Soft biological materials and their impact on cell function,” *Soft Matter*, vol. 3, no. 3, p. 299, Feb. 2007.

## Rozdział 2 - Własności chemiczne i fizyczne podłoży poliakrylamidowych

### 2.1 Wstęp

Hydrożele polimerowe znajdują zastosowanie w bardzo wielu dziedzinach naszego życia, poczynając od przemysłu żywnościowego, tworzyw sztucznych, kosmetologii, aż po zastosowania biomedyczne jako nośniki leków czy substancje stosowane w inżynierii tkankowej. Tak szerokie zastosowanie hydrożeli jest możliwe z uwagi na łatwość przygotowania oraz modyfikacji ich własności chemicznych oraz fizycznych [1], [2]. Hydrożele otrzymuje się najczęściej w wyniku polimeryzacji, polikondensacji lub poliaddycji monomerów w obecności inicjatorów redoksowych [3].

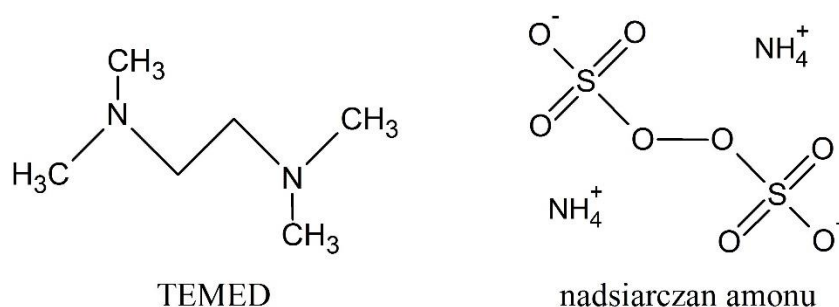
W ostatnim dziesięcioleciu, hydrożele poliakrylamidowe stały się popularnym podłożem do badania oddziaływań komórek z ich środowiskiem zewnętrznym [4]–[6]. Posiadają one liczne, korzystne przy pracy z kulturami komórkowymi właściwości fizyczne i chemiczne przemawiające za ich użyciem. W szczególności wytwarzają liniowe odkształcenie w odpowiedzi na szeroki zakres przyłożonego naprężenia oraz wykazują szybkie i całkowite odzyskanie kształtu po usunięciu siły odkształcającej. Ponadto, można łatwo manipulować ich sztywnością przez zmianę stężenia i wzajemnych proporcji monomerów akrylamidu oraz czynnika sieciującego *bis*-akrylamidu. Dzięki możliwości kowalencyjnego łączenia z białkami adhezyjnymi mogą posłużyć jako podłoża do hodowli komórkowych, a dodatkowo są transparentne i niefluorescencyjne, co pozwala na łatwą wizualizację znajdujących się na nich komórek [7].

Przedmiotem badań niniejszego rozdziału są własności fizyczne i chemiczne żeli poliakrylamidowych, które zostały wykorzystane jako podłoża do hodowli komórkowej w eksperymentach *Rozdziału 4* niniejszej pracy. W pierwszym kroku przygotowanie podłoży wymagało przeprowadzenia syntezy żeli poliakrylamidowych, a następnie charakterystyki własności chemicznych uzyskanych podłoży za pomocą spektroskopii absorpcyjnej z transformatą Fouriera. Szczegółowa analiza własności mechanicznych przeprowadzona została z użyciem reometru rotacyjnego oraz mikroskopu sił atomowych (AFM). Uzyskana informacja o własnościach chemicznych i fizycznych podłoży została wykorzystana w badaniach oddziaływań żywych komórek prostaty z otoczeniem.

## 2.2 Materiały i metody

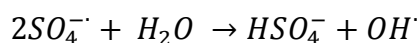
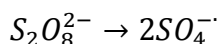
### 2.2.1 Synteza żeli poliakrylamidowych

Poliakrylamid (inaczej poliakryloamid, w skrócie *PAA*) to polimer powstały w wyniku wolnorodnikowej polimeryzacji monomerów akrylamidu (inaczej akryloamidu) oraz czynnika sieciującego N,N'-metylenobisakrylamidu (w skrócie *bis*-akrylamidu) w obecności dwóch inicjatorów – nadsiarczanu amonu i N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (w skrócie *TEMED*) [8].



Rysunek 1. Inicjatory polimeryzacji poliakrylamidu będące źródłem wolnych rodników.

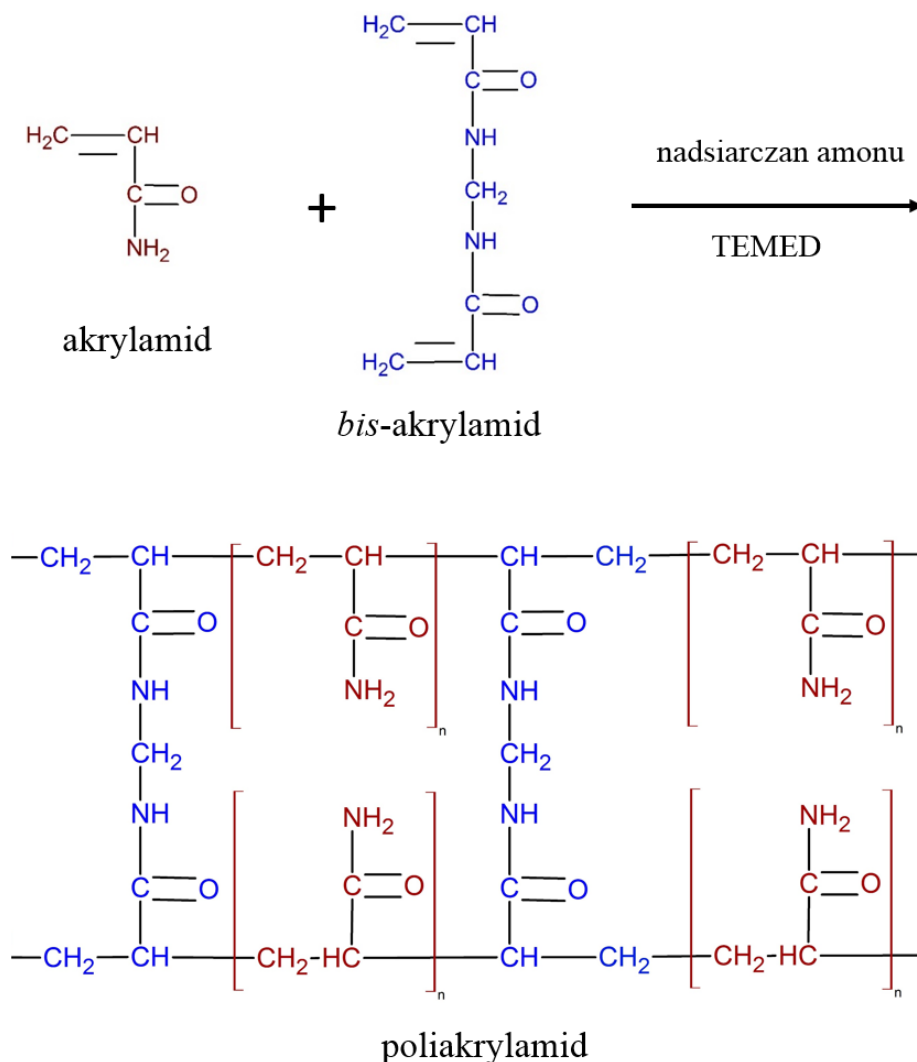
Pierwszy z inicjatorów reakcji – TEMED, indukuje powstawanie wolnych rodników z wodnego roztworu nadsiarczanu amonu (*Rys. 1*).



Powstałe z rozkładu nadsiarczanu amonu rodniki hydroksylowe  $OH^{\cdot}$  rozpoczynają dalszą reakcję chemiczną. Polega ona na aktywacji cząsteczek monomerów akrylamidu w wyniku dołączania się wolnych rodników do podwójnego wiązania węgla  $C=C$  (*Rys. 2*). Rozpoczyna to wzrost łańcucha składającego się z monomerów akrylamidu sieciowanych<sup>4</sup> przez *bis*-akrylamid. Powstałe łańcuchy polimerowe tworzą porowatą strukturę w formie żelu. Porowatość żelu poliakrylamidowego będzie zatem zależeć od dostępności monomerów

<sup>4</sup> Sieciowanie – poprzeczne wzajemne powiązanie liniowych lub rozgałęzionych makrocząsteczek i utworzenie struktury zwanej siecią przestrzenną, która może być zarówno dwu- jak i trzywymiarowa (B. Saville and A. A. Watson “Structural Characterization of Sulfur-Vulcanized Rubber Networks”, *Rubber Chemistry and Technology*: March 1967, Vol. 40, No. 1, pp. 100-148)

i czynnika sieciującego oraz ich wzajemnych proporcji [9], [10]. W przypadku braku czynnika sieciującego, monomery akrylamidu utworzyłyby długie, rozpuszczalne w wodzie liniowe łańcuchy.



Rysunek 2. Reakcja wolnorodnikowej polimeryzacji poliakrylamidu. Jest to polimeryzacja addycyjna, w wyniku której redukowane są wiązania wielokrotne występujące pomiędzy atomami węgla w cząsteczkach akrylamidu i bis-akrylamidu.

Zmiana wzajemnych proporcji akrylamidu i bis-akrylamidu generuje nie tylko zmianę porowatości struktury, ale także jej elastyczności. Tym samym, wytworzenie żeli poliakrylamidowych o różnej sztywności nie wymaga wprowadzenia dodatkowych czynników chemicznych [11]–[13].

## 2.2.2 Przygotowanie podłoży z żeli poliakrylamidowych

Żele poliakrylamidowe przeznaczone do hodowli komórkowych zostały przygotowane w oparciu o protokół opracowany przez Pelhama i Wanga opisany w 1998 roku [5]. Polimeryzacja żeli odbywa się pomiędzy dwoma szkiełkami nakrywkowymi, których własności powierzchniowe są celowo zmienione. Pierwsze szkiełko musi zostać zmodyfikowane w celu zwiększenia przylegania żelu do jego powierzchni, co ułatwia manipulację próbką. Drugie szkiełko powinno uniemożliwiać przyleganie żelu do jego powierzchni tak, aby po zakończeniu polimeryzacji mogło być z łatwością oderwane od żelu nie naruszając jego struktury. Pozwala to na uzyskanie płaskiej powierzchni do dalszej funkcjonalizacji lub bezpośredniego pomiaru.

### *Zwiększanie przylegania żelu do powierzchni szkła*

Szkiełka nakrywkowe (o średnicy 15 mm, Thermo Scientific) zostały włożone do statywu umieszczonego w eksykatorze równocześnie z szalką Petriego zawierającą około 100 ml (3-aminopropyl)-trietoksyilanu (APTES, Sigma). Po odpompowaniu powietrza z eksykatora szkiełka nakrywkowe pozostawały przez 1 godzinę w parach silanu osiadających na ich powierzchni. Tak przygotowane szkiełka nakrywkowe były zanurzane w 0.5% roztworze wodnym glutaraldehydu (SIGMA) przez 1 godzinę i suszone w komorze laminarnej (NUAIRE), która zapewniała przepływ powietrza poprzez filtr HEPA.

### *Zmniejszanie przylegania żelu do powierzchni szkła*

Zmniejszenie przylegania żeli poliakrylamidowych do powierzchni szkła realizowano poprzez zastosowanie 5% roztworu cieczy silikonowej (SurfaSil, Fisher Scientific) w acetonie. Zanurzona w cieczy silikonowej powierzchnia szkiełek nakrywkowych (22 mm x 22 mm, Thermo Scientific) charakteryzowała się zwiększoną hydrofobowością. Każde szkiełko było zanurzane na ok. 5-10 sekund w roztworze cieczy silikonowej, a następnie przepłukane w acetonie oraz metanolu i wysuszone w komorze laminarnej.

### *Wytwarzanie podłoży z żeli poliakrylamidowych*

Pierwszym krokiem procedury wytwarzania podłoży z żeli poliakrylamidowych o różnych własnościach mechanicznych było przygotowanie wodnych roztworów akrylamidu i *bis*-akrylamidu o wyjściowym stężeniu odpowiednio 40% i 2%. Na bazie tych roztworów sporządzono mieszaniny akrylamidu i *bis*-akrylamidu w taki sposób, aby końcowa objętość mieszaniny wynosiła 1 ml (*Tabela 1*).



Tabela 1. Przygotowanie roztworów akrylamidu i bis-akrylamidu do polimeryzacji żeli poliakrylamidowych.

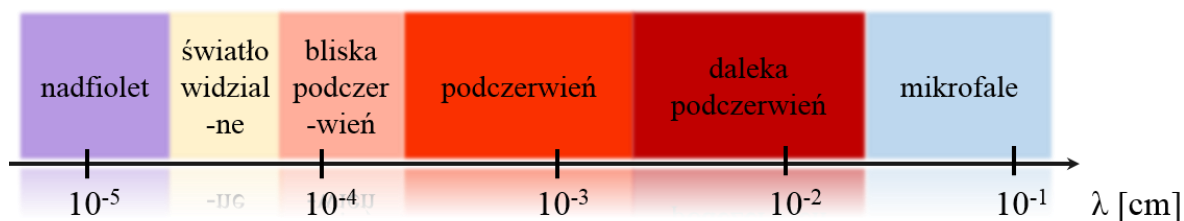
[%] w/v akrylamid/bis-akrylamid	40% akrylamid [ $\mu$ l]	2% bis-akrylamid [ $\mu$ l]	dH <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]
3%/0.4%	75	200	725
5%/0.4%	125	200	675
7%/0.4%	175	200	625
10%/0.4%	250	200	550
12%/0.4%	300	200	500
15%/0.4%	375	200	425

dH<sub>2</sub>O – oznacza wodę dejonizowaną (pH = 5.0, oporność 18  $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Roztwory wodne akrylamidu i bis-akrylamidu każdorazowo odgazowywano, aby obecność tlenu cząsteczkowego nie spowodowała zwolnienia wolnorodnikowej reakcji polimeryzacji. Do objętości 1 ml mieszanin dodawano inicjalizatory w następujących proporcjach – 10  $\mu$ l nadsiarczanu amonu (Fluka) oraz 1.5  $\mu$ l TEMED-u (Fisher Scientific). Następnie 60  $\mu$ l mieszaniny umieszczano pomiędzy zmodyfikowanymi powierzchniami dwóch szkiełek nakrywkowych i pozostawiano na ok. 20 min do spolimeryzowania. Po tym czasie szkiełko o zwiększonej hydrofobowości odrywano, a żel przyklejony do silanizowanej powierzchni szkła umieszczano w wodzie dejonizowanej. Tak przygotowane podłoża mogą być przechowywane przez kilka dni w temperaturze 4°C. Możliwa jest również dehydratacja żeli i ponowne ich uwodnienie.

### 2.2.3 Spektroskopia w zakresie podczerwieni

Spektroskopia jest dziedziną nauki zajmującą się oddziaływaniem materii z falą elektromagnetyczną o różnej długości i energii. W zależności od zakresu promieniowania elektromagnetycznego wykorzystanego w poszczególnych metodach mamy do czynienia ze spektroskopią w nadfiolecie i świetle widzialnym (ang. *Ultra Violet/VISible*, w skrócie UV/VIS), spektroskopią w podczerwieni (ang. *InfraRed*, w skrócie IR), czy spektroskopią jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, w skrócie NMR).



Rysunek 3. Widmo promieniowania elektromagnetycznego.

Pomimo szerokiego zakresu promieniowania podczerwonego (Rys. 3), w spektroskopii IR wykorzystywany jest zakres od około  $2.5 \cdot 10^{-4}$  cm do  $2.5 \cdot 10^{-3}$  cm, który odpowiada liczbom falowym  $\lambda$  z zakresu  $4000 \text{ cm}^{-1} - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

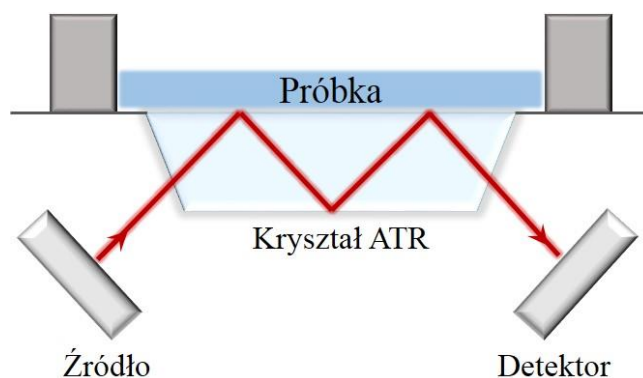
Gdy cząsteczki związku chemicznego zostaną poddane działaniu promieniowania elektromagnetycznego, energia o określonej długości fali zostanie przez ten związek zaabsorbowana. Warunkiem absorpcji jest aby częstość promieniowania odpowiadała częstości drgań własnych cząsteczki. Zaabsorbowanie promieniowania IR powoduje zmianę amplitudy drgań cząsteczki i występowanie dyskretnych poziomów energetycznych związanych z absorpcją. Analizując widmo absorpcyjne (w którym oś  $x$  odpowiada liczbie falowej lub długości fali, a oś  $y$  intensywności absorpcji lub transmitancji) można stwierdzić jakiego typu wiązania chemiczne występują w danej cząsteczce, gdyż każda z absorbowanych częstości promieniowania odpowiada konkretnym drganiom w obrębie cząsteczki.

Drgania oscylacyjne w cząsteczce klasyfikuje się w zależności od tego, czy w drganiach dominuje zmiana długości wiązań (*i*), czy też zmiana kątów między wiązaniami (*ii*). Rozróżniamy zatem:

- i.* drgania rozciągające (*ang. stretching*), oraz
- ii.* drgania deformacyjne (*ang. bending*).

Drgania rozciągające oznacza się symbolem  $\nu$ , a drgania deformacyjne symbolami  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\rho$ ,  $\omega$  oraz  $\tau$ . Drgania deformacyjne związane ze zmianą kątów między wiązaniami mogą mieć charakter drgań nożycowych ( $\delta$ ), szkieletowych ( $\gamma$ ), wahadłowych ( $\rho$ ), wachlarzowych ( $\omega$ ) oraz skręcających ( $\tau$ ). Stosuje się także podział na drgania w płaszczyźnie (*ang. in plane*) i poza płaszczyzną (*ang. out of plane*) molekuly lub grupy atomów. Ważną cechą drgań jest także ich symetria, gdyż mogą one być symetryczne lub asymetryczne względem elementów symetrii molekuly lub grupy atomów.

Technika spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*, w skrócie FTIR–ATR) została wykorzystana w niniejszej pracy do oceny własności chemicznych powierzchni żeli poliakrylamidowych utworzonych poprzez mieszanie w różnych proporcjach monomerów akrylamidu i czynnika sieciującego. Technika FTIR–ATR pozwala na przeprowadzenie pomiaru zarówno warstw polimerowych jak i próbek ciekłych, niosąc informację o chemicznych własnościach powierzchni badanej próbki.



*Rysunek 4. Schemat eksperymentu ATR. Wiązka promieniowania IR po wprowadzeniu do kryształu ATR ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu. Próbka dociśnięta jest do zewnętrznej strony kryształu, przez co energia wiązki promieniowania IR może zostać częściowo zaabsorbowana.*

Technika FTIR–ATR wykorzystuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (Rys. 4). W układzie pomiarowym kluczową rolę odgrywa kryształ, przez który wprowadzana jest do układu wiązka promieniowania IR. Wiązka promieniowania IR padając na wewnętrzną powierzchnię kryształu, ulega wielokrotnemu całkowitemu wewnętrznemu odbiciu, a po wyprowadzeniu z ośrodka rejestrowana jest jej energia i natężenie. Próbka dociśnięta do zewnętrznej strony kryształu może częściowo zaabsorbować energię odbijającej się wiązki promieniowania IR, co spowoduje zmianę amplitudy drgań cząsteczek próbki.

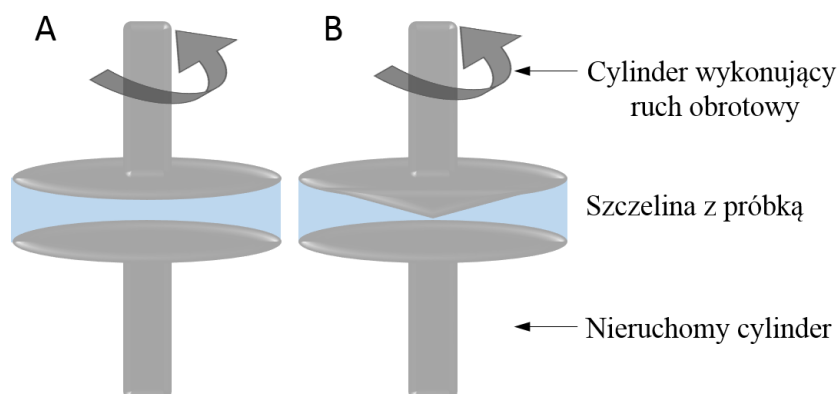
#### *Przebieg eksperymentu i analiza danych*

Analizie spektroskopowej poddano roztwory akrylamidu i *bis*-akrylamidu oraz żele poliakrylamidowe znajdujące się w warunkach wodnych. Zarejestrowane zostały także widma wody dejonizowanej oraz inicjalizatorów polimeryzacji – nadsiarczanu amonu i TEMED-u. Badania przeprowadzone zostały przy użyciu systemu Nicolet iS5 (Thermo Scientific) z przystawką iD3 ATR na kryształach ZnSe (kąt padania  $45^\circ$ ), w zakresie środkowej podczerwieni tj.  $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$ . Zdolność rozdzielcza wynosiła  $8\text{ cm}^{-1}$ . Każde widmo jest uśrednieniem

64 skanów. Widma analizowane były przy użyciu oprogramowania OMNIC Spectra Software (Thermo Scientific). Do wszystkich widm zastosowana została korekta ATR (liczba odbić równa 1) oraz korekta linii bazowej. System Nicolet iS5 (Thermo Scientific) z przystawką iD3 ATR znajduje się w zakładzie Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych IFJ PAN.

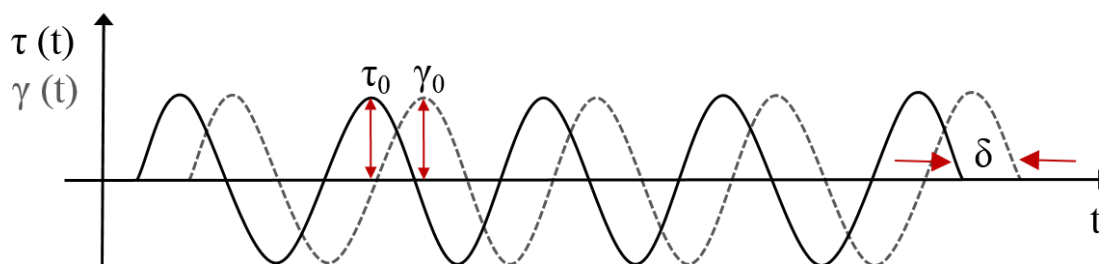
#### 2.2.4 Reometria

Reometr rotacyjny jest urządzeniem służącym do wyznaczania własności reologicznych zarówno ciał stałych jak i cieczy. Głównym elementem reometru rotacyjnego jest współosiowy układ cylindrów tworzących szczelinę, w której umieszczana jest próbka (Rys. 5). Ścinanie próbki następuje na skutek ruchu obrotowego jednego z cylindrów, podczas gdy drugi cylinder pozostaje nieruchomy. W wyniku pomiaru uzyskuje się informację na temat momentu skręcającego pochodzącego od obracającego się cylindra przy znanej częstotliwości jego obrotów. Umożliwia to wyznaczenie szybkości ścinania badanego materiału oraz odpowiadające jej naprężenie styczne.



Rysunek 5. Główne elementy tworzące reometr rotacyjny pracujący w geometrii (A) płytka-płytki i (B) stożek-płytki.

Badanie własności reologicznych podłoży wytworzonych z żeli poliakrylamidowych przeprowadzono metodą oscylacyjną, w której podłoże poddawano periodycznemu działaniu naprężenia  $\tau$  i rejestrowano wynikowe zmiany odkształcenia  $\gamma$ . Wprowadzony ruch oscylacyjny ma postać drgań sinusoidalnych (Rys. 6). Jeśli badana próbka ma charakter lepkosprężysty to ruch oscylacyjny będzie powodował powstanie składowej zmiennej momentu obrotowego powodującego odkształcenie próbki. Będzie ona przesunięta w fazie w stosunku do naprężenia o kąt fazowy  $\delta$ .



Rysunek 6. Przedstawienie zależności pomiędzy naprężeniem, a odkształceniem w pomiarze metodą oscylacyjną. Dla materiałów lepkosprężystych są one przesunięte w fazie o kąt  $\delta$ . Amplitudy naprężenia oraz odkształcenia są oznaczone odpowiednio symbolami  $\tau_0$  i  $\gamma_0$ .

Metoda oscylacyjna umożliwia obliczenie modułu sprężystości  $G'$  oraz modułu stratności  $G''$  na podstawie następujących relacji:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (1)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (2)$$

gdzie  $\delta$  jest kątem opóźnienia fazowego pomiędzy przyłożonym naprężeniem, a odkształceniem badanego układu. Wzajemna relacja pomiędzy modułem sprężystości i stratności jest opisana poniższym wzorem:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (3)$$

Jeśli materiał przejawia charakter idealnie lepki to kąt fazowy  $\delta$  jest równy  $90^\circ$ , a moduł sprężystości  $G'$  jest równy 0. W przypadku substancji idealnie elastycznych kąt fazowy  $\delta$  jest równy  $0^\circ$  natomiast moduł stratności  $G''$  jest równy 0.

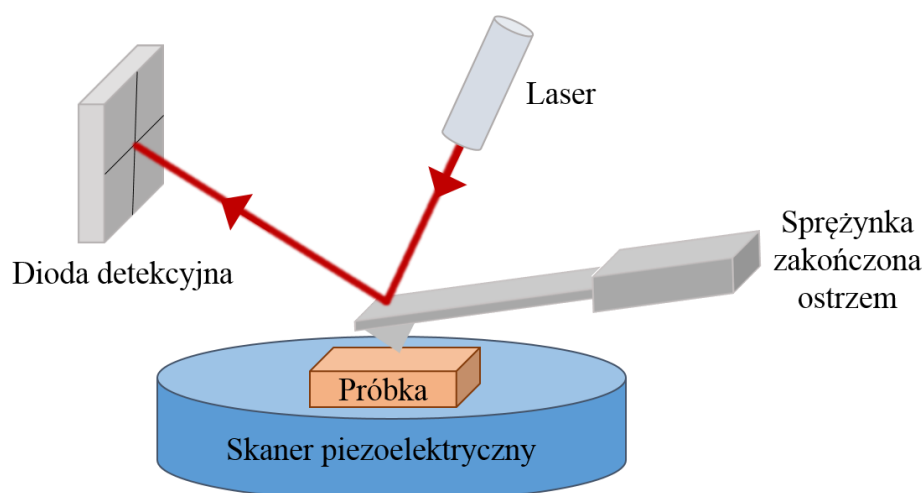
#### Przebieg eksperymentu i analiza danych

Makroskopowe pomiary modułu sprężystości oraz modułu stratności dla podłoży wykonanych z żeli poliakrylamidowych zostały przeprowadzone reometrem rotacyjnym RheoStress 6000 (Thermo Haake), z użyciem cylindrów o geometrii stożek-płytki, średnicy 50 mm i kącie rozwarcia  $1^\circ$ . Przedstawione w Tabeli 1 roztwory akrylamidu i bis-akrylamidu o objętości 1 ml polimeryzowane były w szczelinie pomiędzy cylindrami reometru. Liniowy zakres lepkosprężystości dla żelu poliakrylamidowego został sprawdzony w zakresie naprężeń ścinających od 0.1 Pa do 1000 Pa oraz w zakresie częstotliwości oscylacji od 1 Hz do 100 Hz. Właściwy pomiar modułów  $G'$  oraz  $G''$  od momentu inicjalizacji polimeryzacji, aż do jej

zakończenia przeprowadzony został przy oscylacji stałej w czasie dla naprężenia 1 Pa i częstotliwości 1 Hz w temperaturze 21°C. Każdy pomiar trwał 20 minut i został wykonany w trzech powtórzeniach. Wartości modułu sprężystości oraz modułu stratności zaprezentowano jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe. Pomiary reologiczne zostały przeprowadzone na Wydziale Mechanicznym Politechniki Białostockiej dzięki uprzejmości Pani dr Joanny Mystkowskiej.

### 2.2.5 Mikroskopia Sił Atomowych

Przyleganie pojedynczej komórki do podłoża oraz proces jej rozplaszczania się zachodzi w dużej mierze w oparciu o specjalne struktury białkowe zwane ogniskami kontaktu lub miejscami przylegania (*ang. Focal Adhesion*, w skrócie FAs), których rozmiar waha się od 0.1 do 0.5  $\mu\text{m}^2$  [14]. Obszary te służą komórce jako sondy reagujące na lokalne zmiany elastyczności jej otoczenia (dokładniejszy opis jak komórki oddziałują z otoczeniem znajduje się we wstępie do niniejszej pracy). Technika umożliwiającą lokalny pomiar własności mechanicznych materiału jest mikroskopia sił atomowych (*ang. Atomic Force Microscopy*, w skrócie AFM). Jest to odmiana mikroskopii skaningowej bliskiego pola, w której próbująca sonda AFM w postaci ostrza znajdującego się na końcu płaskiej sprężynki ulega wychyleniom na skutek oddziaływań z powierzchnią próbki. Wychylenie sprężynki rejestrowane jest przy użyciu układu laser – dioda detekcyjna (Rys. 7). Wiązka laserowa zogniskowana na końcu sprężynki (ponad próbującą powierzchnię igłą) odbija się od jej powierzchni, a następnie jest rejestrowana przez detektor, którym jest pozycyjnie czuła dioda.

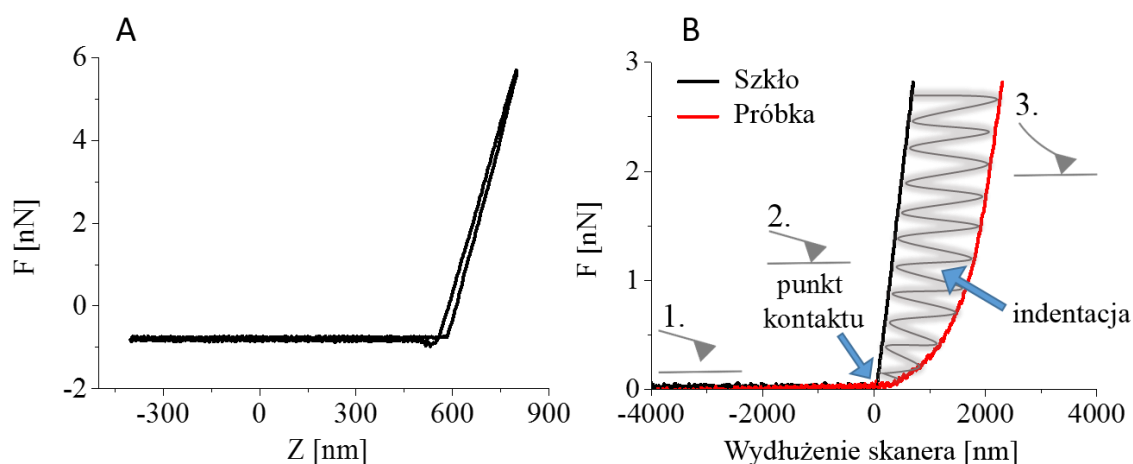


Rysunek 7. Podstawowe elementy tworzące mikroskop sił atomowych.

Kiedy oddziaływanie z badaną powierzchnią jest zaniedbywalne (odpowiada temu brak mierzalnego wychylenia sprężynki), dioda detekcyjna ustawiona jest w taki sposób, aby wiązka laserowa padała dokładnie na jej środek, czyli różnica napięć pomiędzy dolnymi, a górnymi oraz lewymi i prawymi kwadrantami wynosiła zero. Pojawienie się oddziaływań pomiędzy sondą AFM, a powierzchnią próbki powoduje wychylenie sprężynki i tym samym zmianę pozycji wiązki laserowej w obszarze czynnym diody detekcyjnej. Zmiana położenia odbitej plamki wiązki laserowej jest proporcjonalna do wychylenia sprężynki, a także do wielkości działającej na sprężynkę siły.

Poruszanie i skanowanie próbki jest realizowane przez skaner piezoelektryczny oraz silnik krokowy. Do zgrubnego ruchu służy silnik krokowy, natomiast skaner piezoelektryczny umożliwia precyzyjne przemieszczanie próbki podczas pomiaru.

Pojedynczy pomiar własności elastycznych materiału polega na rejestrowaniu sygnału tj. wychylenia sprężynki w funkcji położenia skanera w osi prostopadłej do powierzchni badanej próbki (wychylenie skanera w płaszczyźnie próbki jest wyłączone). Zależność pomiędzy wychyleniem sprężynki, a położeniem skanera jest nazywana krzywą „siła-odległość” (Rys. 8A).



Rysunek 8. (A) Krzywa „siła-odległość” przedstawiająca zależność pomiędzy wychyleniem sprężynki, które jest przeliczane na wartość działającej siły, a położeniem Z skanera piezoelektrycznego rejestrowana podczas jednego cyklu zbliżania, naciskania, a następnie oddalania sondy AFM od powierzchni próbki. (B) Zasada wyznaczania własności elastycznych materiałów z użyciem mikroskopii sił atomowych. W wyniku odjęcia krzywej kalibracyjnej (kolor czarny) oraz pochodzącej z próbki (kolor czerwony) otrzymywana jest zależność siła nacisku – ugięcie materiału (indentacja).

Własności elastyczne wyznacza się poprzez analizę krzywej „siła – odległość” rejestrowanej podczas naciskania powierzchni próbki sondą AFM. Wyróżnia się trzy charakterystyczne obszary obserwowane podczas naciskania (obszary oznaczone numerami 1-3 na *Rysunku 8B*) tj.:

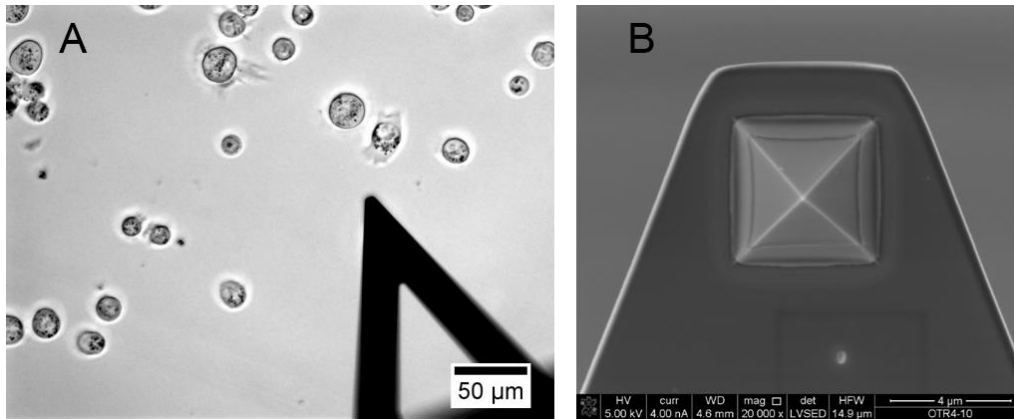
1. zbliżanie powierzchni próbki do ostrza, w trakcie którego brak jest mierzalnego oddziaływania pomiędzy próbującą sondą AFM, a powierzchnią badanej próbki;
2. punkt kontaktu próbującej sondy AFM z powierzchnią próbki;
3. obszar wzrastającego wychylenia sprężynki powstałego na skutek oddziaływania pomiędzy sondą AFM, a powierzchnią badanej próbki.

W celu wyznaczenia własności elastycznych badanego materiału konieczne jest zebranie krzywych z powierzchni referencyjnej (np. szkło, krzem lub mika), dla których zależność wychylenia sprężynki od położenia jest liniowa (tzw. krzywa kalibracyjna). Następnie rejestruje się krzywe „siła-odległość” dla próbki, która ulega deformacji pod wpływem siły nacisku. Krzywe kalibracyjna i pochodząca z próbki są odejmowane, co pozwala na uzyskanie zależności siła nacisku – ugięcie materiału, czyli indentacja. Zależność ta jest podstawą do wyznaczenia wartości modułu Younga.

#### *Pomiar elastyczności przy użyciu AFM*

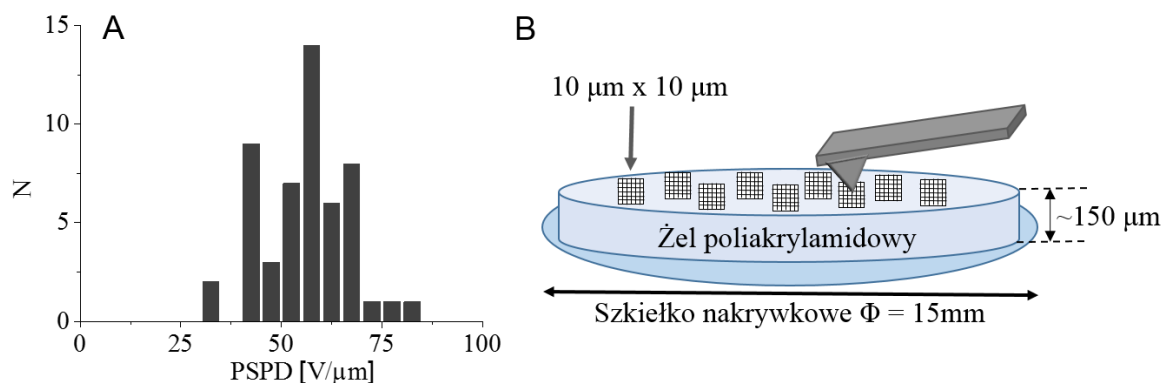
Pomiary elastyczności podłoży wykonanych z żeli poliakrylamidowych zostały przeprowadzone z użyciem mikroskopu sił atomowych Xe120 (Park Systems, Korea) znajdującego się w Laboratorium Badań Mikroukładów Biofizycznych IFJ PAN. Zastosowano sondy AFM typu OTR4 (Bruker). W sondach tego typu sprężynka jest postaci trójkątnej – tj. dwóch ramion spotykających się w miejscu, w którym znajduje się próbujące ostrze o kształcie czworobocznej piramidy (*Rys. 9*). Nominalna wartość stałej sprężystości  $k$  dla sond OTR4 wynosi 0.02 N/m, a odpowiadająca jej nominalna wartość częstotliwości rezonansowej 13 kHz. Rzeczywiste wartości tych wielkości różnią się pomiędzy pojedynczymi sondami AFM, dlatego też, przed wykonaniem każdego pomiaru dokonywano kalibracji stałej sprężystości sprężynki.





Rysunek 9. (A) Obraz trójkątnej sondy AFM zarejestrowany w mikroskopie optycznym. (B) Obraz ostrza próbkującego w sondach AFM typu OTR4 uzyskany przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej (dzięki uprzejmości dra Piotra Bobrowskiego, IMIM PAN).

Kalibrację przeprowadzano w następujący sposób. W pierwszej kolejności ogniskowano wiązkę laserową na końcu wybranej sprężynki i mierzono jej częstotliwość rezonansową w powietrzu. Następnie sondę AFM zbliżano na odległość kilku milimetrów od powierzchni próbki zanurzając ją w cieczy nad powierzchnią szkła. Powierzchnia szkła nie ulega deformacji w zakresie sił stosowanych w AFM, dlatego też może być wykorzystywana jako powierzchnia kalibracyjna. Na takiej powierzchni rejestrowane są krzywe „siła-odległość”. W tym przypadku, wychylenie sprężynki będzie odpowiadało wydłużeniu skanera piezoelektrycznego. Dzięki temu możliwe jest wyznaczenie współczynnika pozwalającego zamienić wielkość rejestrowanego napięcia (mierzonego w woltach (V)), na wychylenie sprężynki w nanometrach (nm). Wyznaczany w ten sposób współczynnik jest nazywany współczynnikiem czułości detektora (ang. *PhotoSensitive PhotoDiode*, w skrócie *PSPD*). Otrzymane wartości PSPD są przedstawione w postaci histogramu na *Rysunku 10A*. Wielkość wychylenia sprężynki jest następnie przeliczana na wielkość działającej na próbkę siły (wyrażonej w naniutonach (nN)) przy założeniu znajomości wartości stałej sprężystości sprężynki (wyznaczonej z pomiaru częstotliwości rezonansowej).



Rysunek 10. (A) Wartości współczynnika czułości detektora PSPD uzyskane dla wszystkich pomiarów. (B) Schemat pomiaru własności elastycznych żeli poliakrylamidowych. Krzywe „siła – odległość” rejestrowano w obrębie map o rozmiarze  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  w losowo wybranych obszarach na powierzchni żelu.

Po wykonaniu kalibracji przeprowadzany jest pomiar elastyczności badanych próbek (w tym przypadku podłoży z żelu poliakrylamidowego), czyli rejestracja krzywych „siła-odległość” w kilku obszarach na powierzchni próbki. Dla każdego typu badanego podłoża rejestrowano po ok. 10 map, zawierających 36 krzywych. Próbkowany obszar ma kształt kwadratu o boku  $10\ \mu\text{m}$  (Rys. 10B).

#### Wyznaczanie wartości modułu Younga

Wyznaczenie wartości modułu elastyczności (tzw. modułu Younga) zostało przeprowadzone w oparciu o oprogramowanie własne (programy Force i JJ) oraz program OriginLab 9.0.

W prowadzonej analizie istotnym krokiem jest wyznaczenie tzw. „punktu kontaktu” – tj. miejsca, w którym próbkujące ostrze zaczyna dotykać badanej powierzchni. Po wyznaczeniu punktu kontaktu następuje odjęcie krzywej kalibracyjnej od krzywej zarejestrowanej na badanym materiale, co prowadzi do wyznaczenia zależności siła nacisku – indentacja. Do tej zależności jest dopasowywana funkcja postaci:

$$F(\Delta) = D\Delta z^2 \quad (4)$$

gdzie,

$F$  – siła [nN],

$\Delta$  – głębokość indentacji [nm],

dla modelu zakładającego stożkowy kształt ostrza. Sondy AFM stosowane podczas pomiaru AFM posiadają kształt czworobocznej piramidy o kącie rozwarcia  $\alpha = 35^\circ$ , dlatego też, moduł Younga został wyznaczony przy założeniu, że kształt próbki igły AFM można opisać stożkiem. W wyniku dopasowania *równania (4)* otrzymuje się wartość współczynnika  $D$  powiązanego z modułem Younga czyli  $E_{próbki}$ , zależnością:

$$E_{próbki} = \frac{\pi(1-\mu^2)\tan\alpha}{2} D \quad (5)$$

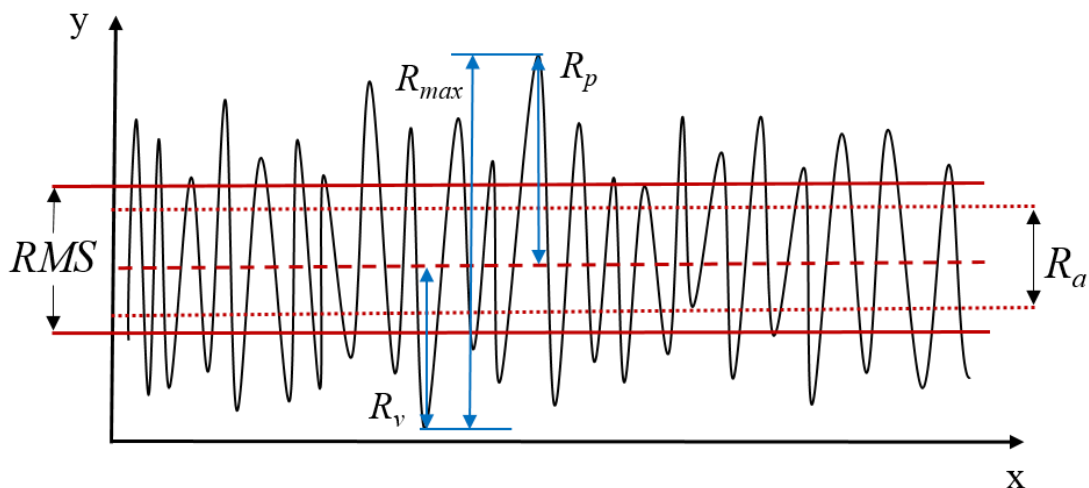
gdzie  $\mu$  jest współczynnikiem Poissona mówiącym o ściśliwości badanego materiału, mieszczącym się w zakresie 0 - 0.5. Współczynnik Poissona dla żeli poliakrylamidowych został po raz pierwszy wyznaczony przez Geisslera i Hechta przy użyciu techniki nieelastycznego rozpraszania światła oraz pęcznienia osmotycznego [15]. Zależnie od sposobu jego wyznaczania wartości literaturowe  $\mu$  mieszczą się w zakresie 0.3 ÷ 0.5. Zakładając, że przeprowadzany test mechaniczny (techniką AFM oraz reometrem), nie powoduje wypychania cieczy z żelowego networku, założono, że wartość współczynnika Poissona dla żelu poliakrylamidowego wynosi 0.5 [15]–[17].

#### *Topografia powierzchni*

Mikroskop sił atomowych jest techniką stosowaną głównie do obrazowania powierzchni badanych próbek. Jednym z parametrów służących do ilościowego opisu własności morfologicznych powierzchni jest jej chropowatość. Parametr ten odgrywa ważną rolę w procesach adhezji i proliferacji wielu typów komórek, m.in. osteoblastów, komórek nerwowych, mięśniowych czy pochodzenia nabłonkowego [18]–[20]. Chropowatość powierzchni może zostać scharakteryzowana poprzez podanie następujących parametrów statystycznych [21]:

- $R_p$  – odległość od najwyższego punktu wzniesienia profilu do linii średniej,
- $R_v$  – odległość od najniższego punktu wgłębienia profilu do linii średniej,
- $R_{max}$  – suma wysokości wzniesienia i głębokości wgłębienia jednego profilu,
- $R_a$  – średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości od linii średniej,
- $R_q$  (*RMS*) - średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości od linii średniej.

Linia średnia profilu chropowatości to linia, która wskazuje wartość średnią profilu. *Rysunek 11* przedstawia schematyczną reprezentację parametrów opisujących chropowatość powierzchni.



Rysunek 11. Schematyczna reprezentacja parametrów opisujących morfologię powierzchni. Linia przerywaną zaznaczono linię średnią profilu chropowatości. Parametry  $R_p$  i  $R_v$  to odpowiednio odległość od najwyższego wzniesienia i najniższego wgłębienia profilu od linii średniej, a  $R_{max}$  to ich suma.  $R_a$  reprezentuje średnie arytmetyczne, a  $RMS$  średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości od linii średniej.

Średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości od linii średniej ( $R_a$ ) jest parametrem opisującym zmiany w wysokości powierzchni. Parametr ten w niewielkim stopniu uwzględnia ekstremalne wzniesienia i wgłębienia profilu, dlatego średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości od linii średniej ( $RMS$ ) jest uznawane za bardziej reprezentatywne:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N z^2(i,j)} \quad (7)$$

gdzie,

$M$  – liczba linii,

$N$  – liczba punktów w linii,

$Z_{ij}$  – odchylenie wysokości profilu od wartości średniej w pozycji  $(i,j)$  obrazu AFM.

Wartość  $RMS$  dostarcza bardziej wiarygodnego opisu morfologii powierzchni w porównaniu z  $R_a$ . Dla próbek podłoży wykonanych z żelu poliakrylamidowego, współczynnik  $RMS$  został wyznaczony na podstawie obrazów AFM zarejestrowanych w obszarach  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ . Wyniki zaprezentowano jako wartość średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z minimum trzech obrazów. Obliczenia zostały wykonane z użyciem darmowego oprogramowania WSxM 5.0 Develop 3.0 (Nanotec) [22].

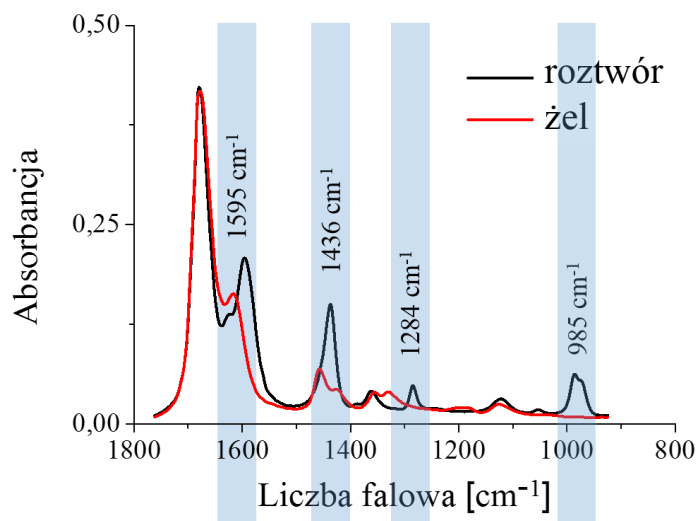
## 2.3 Uzyskane wyniki i ich dyskusja

### 2.3.1 Własności chemiczne powierzchni żelu poliakrylamidowego

Własności chemiczne powierzchni podłoży wykonanych z żelu poliakrylamidowego zostały wyznaczone przy użyciu techniki FTIR-ATR. Technika ta pozwala na pomiary próbek ciekłych, dzięki czemu możliwa była rejestracja widm roztworów akrylamidu i *bis*-akrylamidu oraz żelu powstałego z ich polimeryzacji. *Rysunek 12* przedstawia widma absorpcyjne (i) roztworu zawierającego 15% w/v monomerów akrylamidu i 0.4% w/v czynnika sieciującego *bis*-akrylamidu oraz (ii) żelu poliakrylamidowego uzyskanego z tego roztworu. Z uwagi na fakt, że widma absorpcyjne nawet prostych związków o niewielkiej różnorodności grup funkcyjnych składają się z wielu pasm absorpcyjnych, analizę otrzymanych widm rozpoczęto od określenia charakterystycznych pasm grup funkcyjnych biorących udział w procesie polimeryzacji. Obecność wiązań wielokrotnych w cząsteczce z całą pewnością będzie prowadzić do pojawienia się w widmie pasm charakterystycznych dla tych wiązań oraz do zmian położenia pasm grup bezpośrednio sąsiadujących z tymi wiązaniami. Jak przedstawiono na *Rysunku 2* (paragraf 2.2.1 *Synteza żeli poliakrylamidowych*), w wyniku reakcji polimeryzacji poliakrylamidu zredukowane są wiązania wielokrotne występujące pomiędzy atomami węgla cząsteczek monomerów i czynnika sieciującego. Analiza widm przeprowadzona była w pełnym zakresie liczb falowych tj.  $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$  natomiast ocenę zmian zachodzących podczas polimeryzacji przeprowadzono w zakresie  $1800\text{ cm}^{-1} - 900\text{ cm}^{-1}$ , ponieważ w tym zakresie widoczne są pasma absorpcyjne pochodzące od drgań deformacyjnych wiązań wielokrotnych  $\text{C}=\text{C}$  oraz wiązań węgiel-wodór grupy  $\text{C}=\text{H}$  oraz  $\text{C}=\text{H}_2$ <sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Pasma absorpcyjne pochodzące od symetrycznego i asymetrycznego rozciągania grupy  $\text{C}=\text{H}_2$ , są obserwowane w zakresie  $2960 - 2850\text{ cm}^{-1}$ . W ich intensywności nie zaobserwowano jednak znacznych zmian (dane nie pokazane).



Rysunek 12. Widmo FTIR-ATR roztworu zawierającego 15% w/v akrylamidu i 0.4% w/v bis-akrylamidu oraz żelu powstałego po polimeryzacji tego roztworu. Niebieskim kolorem zaznaczono położenie pasm, dla których obserwowane są największe różnice pomiędzy widmem roztworu, a spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym.

Na Rysunku 12 odczytano położenie pasm dla których występują największe różnice pomiędzy widmem roztworu, a spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym. Identyfikację pasm przedstawiono w Tabeli 2. Pasma położone w pozycji  $1595\text{ cm}^{-1}$  jest odpowiedzialne za drgania rozciągające wiązania podwójnego węgiel–węgiel. W wyniku polimeryzacji żelu poliakrylamidowego obserwuje się znaczny spadek jego intensywności, co jest wynikiem redukowania wiązań podwójnych w celu dołączenia kolejnej cząsteczki monomeru lub czynnika sieciującego.

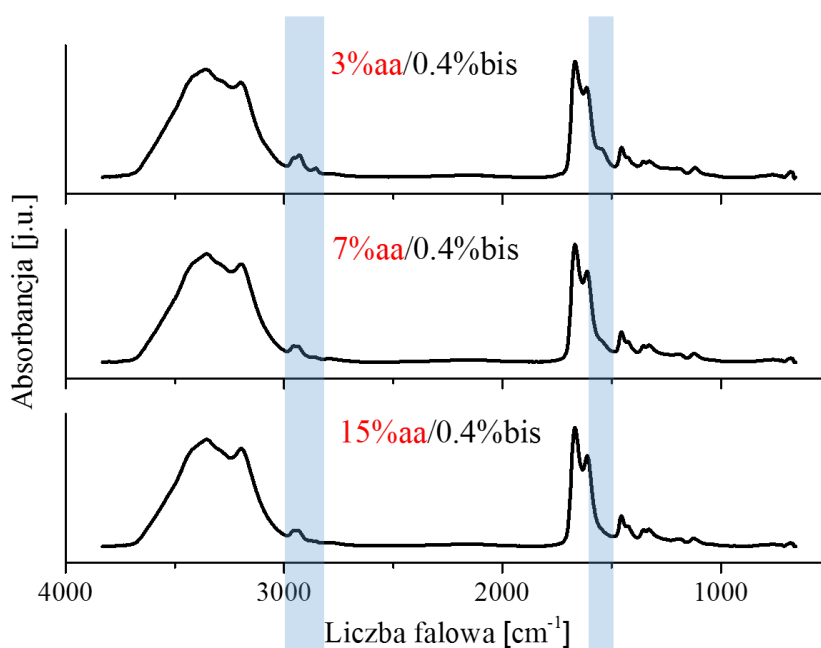
Tabela 2. Identyfikacja pasm absorpcyjnych odpowiedzialnych za polimeryzację żeli poliakrylamidowych;  $\nu$  – drgania rozciągające,  $\delta$  – drgania deformacyjne nożycowe,  $\gamma$  – drgania deformacyjne szkieletowe.

	Położenie pasma	Przypisanie	Literatura
1	$1595\text{ cm}^{-1}$	$\nu\text{C}=\text{C}$ (sprzężone z $\text{C}=\text{O}$ )	[23],[24]
2	$1436\text{ cm}^{-1}$	$\delta\text{CH}_2$	[23],[24],[25]
3	$1284\text{ cm}^{-1}$	$\gamma\text{C}-\text{C}$ (szkieletowe)	[23],[25]
4	$985\text{ cm}^{-1}$	$\gamma\text{CH}$ (sprzężone z $\text{C}-\text{C}$ )	[23],[25]

Pasma położone w pozycji  $1436\text{ cm}^{-1}$  jest odpowiedzialne za drgania deformacyjne C–H grupy  $-\text{C}=\text{CH}_2$ , którego intensywność znacznie spada w wyniku polimeryzacji żelu. Pasma to nie zanika, ale zmienia się jego położenie. Drgania obserwowane w pozycji  $1284\text{ cm}^{-1}$  i  $985\text{ cm}^{-1}$

pochodzą od szkieletu węglowego cząsteczek akrylamidu i *bis*-akrylamidu oraz grup –CH, które nie biorą bezpośredniego udziału w procesie polimeryzacji, ale swoboda ich drgań zostaje ograniczona po usieciowaniu.

Techniki spektroskopii w podczerwieni są z powodzeniem wykorzystywane nie tylko do identyfikacji, ale również do śledzenia modyfikacji polimerów i kompozytów. W celu sprawdzenia czy zmiana proporcji monomerów i czynnika sieciującego w żelu poliakrylamidowym prowadzi do zmian w strukturze chemicznej powierzchni, zanalizowano próbki o zmiennej zawartości akrylamidu (od 3% do 15% w/v).



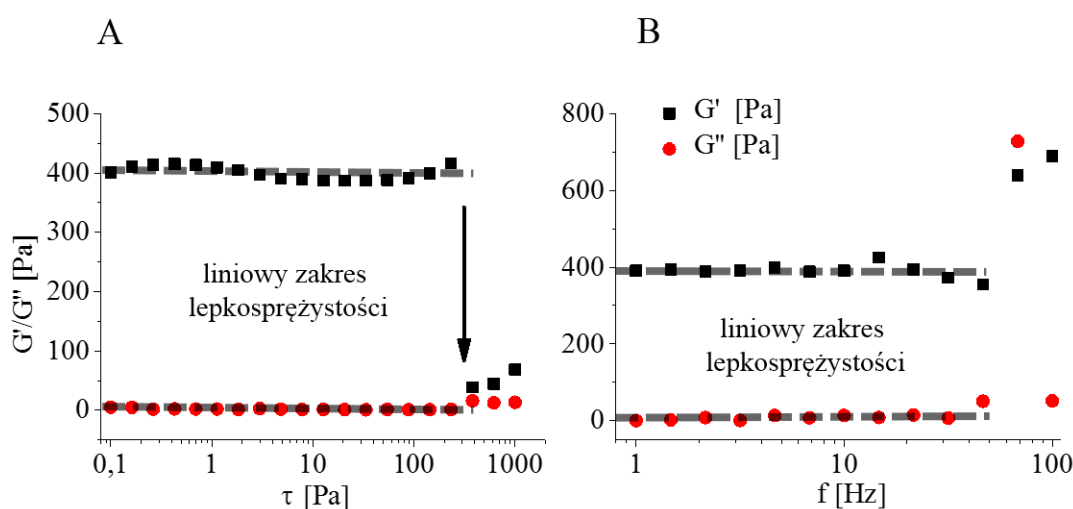
Rysunek 13. Widmo FTIR-ATR żeli poliakrylamidowych o stałym udziale czynnika sieciującego (*bis*) i zmiennym udziale monomerów akrylamidu (*aa*), równych 3%, 7% i 15% w/v. Niebieskim kolorem zaznaczono pasma, w których obserwuje się różnice pomiędzy żelami.

Widma absorpcyjne żeli poliakrylamidowych o zmiennej zawartości akrylamidu 3%, 7% i 15% i stałej zawartości *bis*-akrylamidu 0.4% zostały przedstawione na Rysunku 13. Charakter widm nie ulega zmianie wraz ze wzrostem stopnia usieciowania struktury żelu natomiast obserwuje się spadek intensywności pasm w położeniach  $2940\text{ cm}^{-1}$  i  $1560\text{ cm}^{-1}$  (obszary te zaznaczono kolorem niebieskim, Rys.13). Obserwowane zmiany są prawdopodobnie wynikiem obecności reszkowych ilości inicjatorów polimeryzacji, których zużycie będzie najmniejsze dla żelu powstałego z roztworu 3%aa/0.4%bis, a największe dla żelu 15%aa/0.4%bis co jest zgodne z faktem, że zanik pasm  $2940\text{ cm}^{-1}$  i  $1560\text{ cm}^{-1}$  następuje wraz ze wzrostem stężenia akrylamidu.

Pasmo znajdujące się w położeniu  $2940\text{ cm}^{-1}$  pochodzi od drgań rozciągających asymetrycznych grupy  $-\text{CH}_3$  cząsteczek TEMED-u, natomiast pasmo w położeniu  $1560\text{ cm}^{-1}$  jest pasmem wynikającym z drgań deformacyjnych grupy  $\text{N}-\text{H}$  nadsiarczanu amonu<sup>6</sup>.

### 2.3.2 Makroskopowe własności mechaniczne żelu poliakrylamidowego

Własności mechaniczne wytworzonych podłoży z żelu poliakrylamidowego były wyznaczone za pomocą reometru rotacyjnego. Technika ta jest jedną z metod oceny własności mechanicznych materiałów polimerowych w szerokim zakresie przykładanych naprężeń ścinających. Umożliwia ona również śledzenie procesów zachodzących w materiałach w skali czasowej rzędu dziesiątek sekund, minut, a nawet godzin. Pomiarów modułu sprężystości oraz modułu stratności w wyniku działania sił ścinających rozpoczęto od sprawdzenia zależności tych wielkości od zmian naprężeń ścinających przykładanych w zakresie  $0.1\text{ Pa} - 1000\text{ Pa}$  oraz częstotliwości oscylacji od  $1\text{ Hz}$  do  $100\text{ Hz}$ . Dzięki takim pomiarom, został wyznaczony liniowy zakres lepkości sprężystości badanych żeli poliakrylamidowych (Rys. 14).

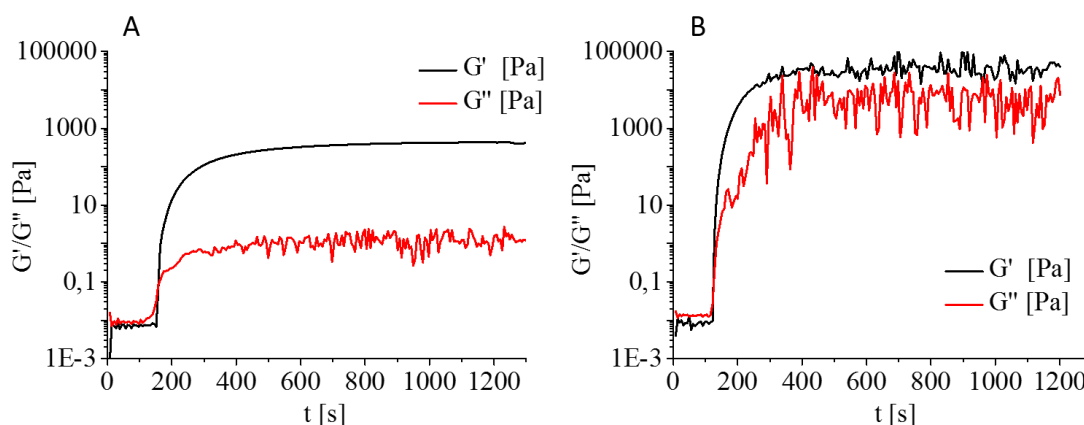


Rysunek 14. Zależność modułów sprężystości  $G'$  i stratności  $G''$  od (A) naprężenia ścinającego oraz (B) częstotliwości oscylacji zmierzona dla podłoży wykonanych z żelu poliakrylamidowego o stężeniu 3% akrylamidu i 0.4% bis-akrylamidu. Testy zostały przeprowadzone dla wszystkich badanych żeli poliakrylamidowych o stężeniu akrylamidu od 3% w/v do 15% w/v.

<sup>6</sup> Widma absorpcyjne nadsiarczanu amonu i TEMED-u zostały zarejestrowane w osobnym eksperymencie (dane nie pokazane).



Dla żelu o 3% zawartości monomerów akrylamidu i 0.4% zawartości *bis*-akrylamidu wartości modułu sprężystości oraz modułu stratności utrzymują się na stałym poziomie, aż do wartości naprężenia równej 380 Pa. Powyżej tej wartości usieciowana struktura żelu poliakrylamidowego ulega uszkodzeniu. Podobnie jest w przypadku zmian częstotliwości oscylacji, gdzie zależność  $G'$  i  $G''$  pozostaje liniowa w funkcji  $f$ , aż do wartości 68 Hz. Zależności te zostały zarejestrowane dla wszystkich zawartych w Tabeli 1 proporcji akrylamidu i czynnika sieciującego. Do dalszej analizy przyjęto stałą wartość naprężenia równą 1 Pa i częstotliwości równą 1 Hz.



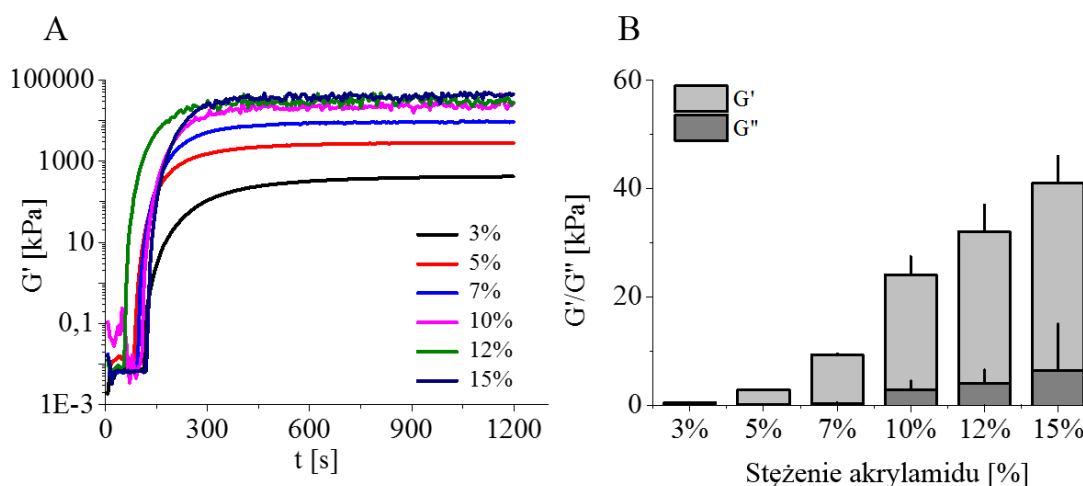
Rysunek 15. Pojedynczy pomiar modułu  $G'$  i  $G''$  przy stałych wartościach naprężenia (1 Pa) i częstotliwości (1 Hz) w czasie polimeryzacji żelu o zawartości (A) 3% akrylamidu i (B) 15% akrylamidu oraz stałej ilości 0.4% *bis*-akrylamidu.

Rysunek 15 przedstawia charakter zmian modułu sprężystości i modułu stratności zachodzących podczas polimeryzacji żelu poliakrylamidowego w szczelinie reometru. W pojedynczym pomiarze, 1 ml roztworu mieszaniny akrylamidu i *bis*-akrylamidu umieszczano pomiędzy współosiowymi cylindrami, szczelnie otoczonymi osłoną zapobiegającą wysychaniu żelu podczas pomiaru. Proces polimeryzacji trwa ok. 20 minut. W tym czasie można zaobserwować wzrost modułów  $G'$  i  $G''$ , aż do osiągnięcia ich stabilnego poziomu po zakończeniu polimeryzacji. Tabela 3 zawiera wartości liczbowe obu modułów, które zostały również przedstawione na wykresie kolumnowym (Rys. 16B).

Tabela 3. Wartości  $G'$  i  $G''$  żeli poliakrylamidowych o różnej zawartości monomerów akrylamidu zmierzone metodą oscylacyjną ( $\bar{x}$  – wartość średnia;  $SD$  – odchylenie standardowe).

[%] w/v akrylamid/bis-akrylamid	$G'$ [kPa] $\bar{x} \pm SD$	$G''$ [kPa] $\bar{x} \pm SD$
3%/0.4%	$0.40 \pm 0.01$	$0.002 \pm 0.001$
5%/0.4%	$2.82 \pm 0.04$	$0.013 \pm 0.007$
7%/0.4%	$9.30 \pm 0.23$	$0.274 \pm 0.130$
10%/0.4%	$24.03 \pm 3.96$	$2.855 \pm 1.606$
12%/0.4%	$32.00 \pm 4.99$	$4.036 \pm 2.440$
15%/0.4%	$40.82 \pm 5.01$	$5.319 \pm 8.659$

Można zauważyć, że wraz ze zwiększaniem stężenia monomerów akrylamidu obserwowany jest wzrost sztywności żeli poliakrylamidowych. Jest to wynikiem zwiększenia się stopnia usieciowania, tj. wzrostu gęstości żelu poliakrylamidowego. W początkowym etapie polimeryzacji wartości modułów sprężystości i stratności są porównywalne (Rys. 16A), ale wraz z postępem procesu polimeryzacji moduł sprężystości żelu osiąga wartość kilkukrotnie większą od modułu stratności. Oznacza to, że udział własności lepkich jest znacząco mniejszy w porównaniu do własności sprężystych. Dlatego też, własności mechaniczne żeli poliakrylamidowych są na ogół opisywane przy pomocy modułu sprężystości  $G'$  [26], [27].



Rysunek 16. (A) Pomiar modułu  $G'$  w czasie polimeryzacji żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu akrylamidu i stałym stężeniu czynnika sieciującego. (B) Stosunek wartości modułu sprężystości  $G'$  do modułu stratności  $G''$  dla żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu akrylamidu.

Rysunek 16A przedstawia wykresy zmian wartości modułu sprężystości w czasie polimeryzacji żeli poliakrylamidowych dla różnych stężeń monomerów akrylamidu. Ponieważ dynamika zmian wartości  $G'$  zależy od dostępności substratów podczas polimeryzacji, obserwowane są różnice w jej przebiegu dla różnych proporcji akrylamidu i *bis*-akrylamidu [28].

Szeroki zakres liniowej lepkości oraz zdolność do odwracalnej deformacji pod działaniem naprężeń ścinających, ściskających i rozciągających pozwala zaklasyfikować poliakrylamid jako elastomer [29], [30]. Moduł sprężystości sieci polimerowej odkształcającej się w sposób elastyczny może zostać opisany przy pomocy statystycznej teorii elastyczności<sup>7</sup> [31]. Przy założeniu, że ścinanie proste elastomeru jest związane jedynie ze zmianą entropii układu, relacja pomiędzy naprężeniem ścinającym, a odkształceniem jest powiązana następującym współczynnikiem proporcjonalności [32]:

$$\tau = \frac{RTn}{V} \cdot \gamma \quad (8)$$

gdzie,

$R$  – stała gazowa [ $\frac{\text{J}\cdot\text{mol}}{\text{K}}$ ],

$T$  – temperatura [K],

$n$  – liczba elastycznie aktywnych punktów sieciowania biorących udział w odpowiedzi mechanicznej [mol],

$V$  – objętość [ $\text{m}^3$ ].

Oznacza to, że teoretycznie wyznaczony moduł sprężystości  $G'$  żelu poliakrylamidowego jest równy:

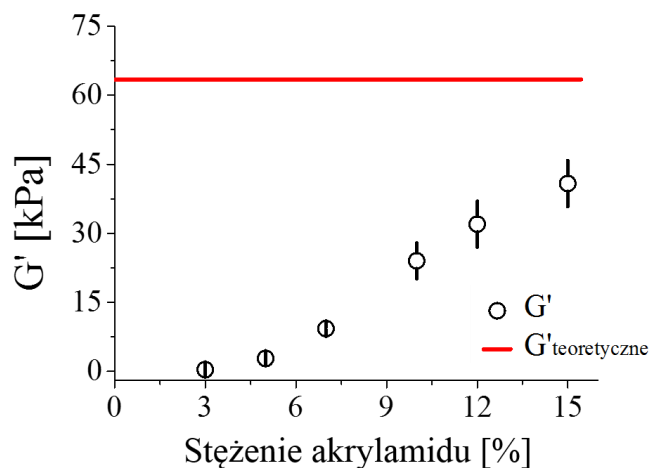
$$G'_{\text{teoretyczne}} = \frac{RTn}{V} \quad (9)$$

W powyższym ujęciu, przy założeniu stałej wartości temperatury  $T$ , moduł sprężystości żelu poliakrylamidowego zależy jedynie od liczby elastycznie aktywnych punktów sieciowania utworzonych przez *bis*-akrylamid, natomiast nie zależy od ilości monomerów dostępnych w reakcji.

---

<sup>7</sup> Statystyczna teoria elastyczności została opracowana z lat 1930 – 1950 przez Mayera (1932), Kuhna, Marka, Gutha (1934), Walla (1942), Flory'ego, Rehnera, Treloara (1943).

Punkty sieciowania w żelu poliakrylamidowym są tworzone przez czynnik sieciujący *bis*-akrylamid. Dla stężenia *bis*-akrylamidu równego 0.4% w/v, przy założeniu, że każda cząsteczka czynnika utworzyła elastycznie aktywny punkt sieciowania, wartość teoretyczna  $G'_{teoretyczne}$  wynosi 63.45 kPa (Rys. 17). Równanie (9) jest również podstawą do wyznaczenia teoretycznej granicy sztywności żeli poliakrylamidowych, jaką można otrzymać dla różnych stężeń czynnika sieciującego [33].



Rysunek 17. Wartości modułu sprężystości  $G'$  dla różnych stężeń monomerów akrylamidu i stałego stężeniu czynnika sieciującego *bis*-akrylamidu (0.4% w/v). Linia czerwona zaznacza teoretyczną wartość  $G'$  przy założeniu, że wszystkie cząsteczki czynnika sieciującego zostały związane.

Przedstawione na Rysunku 17 wartości modułów sprężystości dla stężeń monomerów akrylamidu z zakresu 3% – 15% w/v i stałej ilości *bis*-akrylamidu 0.4% w/v mieszczą się poniżej wyznaczonej teoretycznie wartości  $G'$ . Oznacza to, że ilość monomerów akrylamidu nie była wystarczająca aby związać wszystkie cząsteczki czynnika sieciującego, a co za tym idzie utworzyć aktywne punkty sieciowania. Podstawiając do równania (9) wyznaczone eksperymentalnie wartości  $G'$  możemy wyznaczyć liczbę moli *bis*-akrylamidu tworzących punkty sieciowania oraz oszacować stopień przereagowania czynnika sieciującego. W tym celu należy obliczyć stosunek ilości substratu, który uległ przereagowaniu do jego początkowej ilości według następującego wzoru:

$$\alpha = \frac{n_r}{n_p} \cdot 100\% \quad (10)$$

gdzie,

$\alpha$  – stopień przereagowania [%],

$n_r$  – liczba moli *bis*-akrylamidu tworzących aktywne elastyczne punkty sieciowania [mol],

$n_p$  – początkowa liczba moli *bis*-akrylamidu [mol].

Aby wyznaczyć liczbę moli *bis*-akrylamidu tworzących aktywne elastyczne punkty sieciowania należy przekształcić *równanie (9)* do postaci:

$$n = \frac{G'V}{RT} \quad (11)$$

i podstawić wartości  $G'$  uzyskane w pomiarze reometrem rotacyjnym. Początkowa liczba moli *bis*-akrylamidu może zostać wyznaczona dzięki znajomości jego masy molowej.

*Tabela 4. Szacunkowy stopień przereagowania bis-akrylamidu  $\alpha$  w reakcji polimeryzacji z monomerami akrylamidu o różnym stężeniu.*

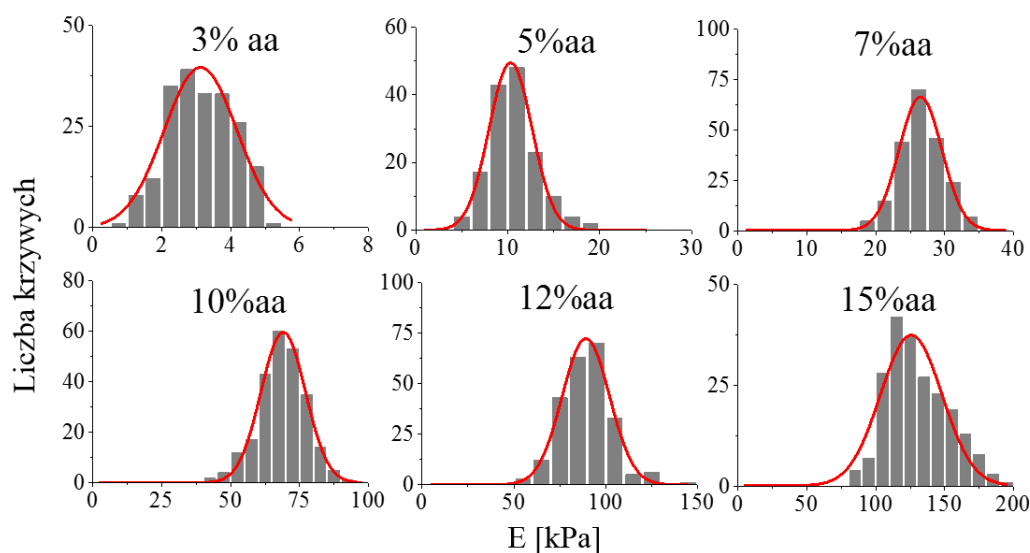
[%] w/v akrylamid/bis-akrylamid	$\alpha$ [%]
3%/0.4%	0.6
5%/0.4%	4.5
7%/0.4%	14.7
10%/0.4%	38.4
12%/0.4%	50.5
15%/0.4%	64.4

Wyniki zamieszczone w *Tabeli 4* wskazują, że stopień przereagowania *bis*-akrylamidu dla stężenia akrylamidu równego 3% w/v wynosi jedynie 0.6% i rośnie wraz ze wzrostem dostępności monomerów. Dla stężenia akrylamidu 15% stopień przereagowania jest najwyższy i wynosi 64.4%.

Statystyczna teoria elastyczności może być stosowana do analizy własności reologicznych, stopnia usieciowania oraz wydajności sieciowania elastomerów syntetycznych [34], [35]. Ma też zastosowanie w przemyśle żywniowym, gdzie powiązanie struktury sieci przestrzennej biopolimerów z właściwościami reologicznymi pozwala na ocenę ich praktycznej przydatności [36], [37].

### 2.3.3 Lokalne własności mechaniczne żelu poliakrylamidowego

Pomiar elastyczności przy użyciu mikroskopii sił atomowych dostarcza informacji na temat lokalnych własności mechanicznych próbki. Wartość modułu Younga wyznaczana była dla podłoży poliakrylamidowych o różnym stosunku akrylamidu do *bis*-akrylamidu, przy założeniu, że współczynnik Poissona  $\mu = 0.5$ . Nominalna stała sprężystości sond AFM użytych w eksperymencie wynosiła 0.02 N/m, co pozwoliło na uzyskanie maksymalnej indentacji 200 nm dla podłoży o 15% i 12 % w/v akrylamidu. W związku z powyższym, moduł Younga został wyznaczony na głębokości 200 nm dla wszystkich badanych próbek. *Rysunek 18* przedstawia rozkłady uzyskanych wartości modułu Younga.



*Rysunek 18. Rozkłady wartości modułu Younga dla żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu monomerów akrylamidu.*

Uzyskane wartości średnie modułu Younga wynoszą  $3.12 \pm 0.78$  kPa,  $10.69 \pm 2.04$  kPa,  $26.56 \pm 2.69$  kPa,  $68.64 \pm 7.48$  kPa,  $89.41 \pm 11.10$  kPa i  $130.49 \pm 14.84$  kPa odpowiednio dla podłoży o zawartości akrylamidu 3%, 5%, 7%, 10%, 12% i 15% w/v. Wzrost ilości monomerów akrylamidu powoduje spadek elastyczności podłoży poliakrylamidowych, a więc wzrost modułu Younga. Wyznaczone wartości średnie oraz ich odchylenia standardowe zostały przedstawione w *Tabeli 5*. Obserwowane różnice we własnościach mechanicznych podłoży wynikają ze wzrostu stopnia usieciowania i gęstości żeli poliakrylamidowych w wyniku zwiększenia się ilości substratów dostępnych podczas polimeryzacji. Otrzymany zakres wartości modułu Younga jest porównywalny z wartościami uzyskiwanymi dla innych

materiałów polimerowych stosowanych do hodowli komórkowej takich jak żelatyna czy agaroz [38]–[40].

Wartości modułu Younga żeli poliakrylamidowych o tych samych proporcjach akrylamidu i *bis*-akrylamidu mogą różnić się w zależności od kształtu ostrza próbkującego użytego w pomiarach oraz od głębokości na której wyznaczano wartość modułu Younga. Przykładowo, w pracy Englera i wsp., moduł Younga dla poliakrylamidu o stężeniu 5% w/v akrylamidu i 0.3% w/v *bis*-akrylamidu zmierzony przy użyciu ostrza sferycznego o średnicy  $\phi = 2.5 \mu\text{m}$  wynosił  $8.10 \pm 0.01 \text{ kPa}$  [41]. Późniejsze prace podają już inną wartość modułu elastyczności równą  $8.73 \pm 0.79 \text{ kPa}$  dla żelu poliakrylamidowego o tych samych proporcjach akrylamidu do *bis*-akrylamidu. W pomiarach tych własności elastyczne wyznaczono w oparciu o eksperymenty wykonane ostrzem sferycznym o średnicy  $6 \mu\text{m}$  [42]. W niniejszej pracy wartość modułu Younga dla podłoża z 5% w/v akrylamidu i 0.4% w/v *bis*-akrylamidu wyniosła  $10.7 \pm 2.0 \text{ kPa}$ .

Kolejnym źródłem rozbieżności wartości modułu Younga może być założona wartość współczynnika Poissona. Jak wspomniano w *paragrafie 2.2.5*, w literaturze obserwowany jest rozrzut tej wartości w zakresie 0.3 – 0.5 dla żelu poliakrylamidowego. *Tabela 5* przedstawia wartości modułu Younga jeśli za współczynnik Poissona przyjmie się odpowiednio wartość 0.3, 0.4 i 0.5.

*Tabela 5. Wartości modułu Younga podłoży poliakrylamidowych o różnej zawartości monomerów akrylamidu wyznaczone dla współczynnika Poissona o wartości 0.3, 0.4, i 0.5.*

[%] w/v akrylamid/ <i>bis</i> -akrylamid	$\bar{E} \pm SD \text{ [kPa]}$ $\mu = 0.3$	$\bar{E} \pm SD \text{ [kPa]}$ $\mu = 0.4$	$\bar{E} \pm SD \text{ [kPa]}$ $\mu = 0.5$
3%/0.4%	$3.79 \pm 0.95$	$3.50 \pm 0.88$	$3.12 \pm 0.78$
5%/0.4%	$12.97 \pm 2.47$	$11.97 \pm 2.29$	$10.69 \pm 2.04$
7%/0.4%	$32.24 \pm 3.27$	$29.76 \pm 3.02$	$26.56 \pm 2.69$
10%/0.4%	$83.27 \pm 9.08$	$76.87 \pm 8.38$	$68.64 \pm 7.48$
12%/0.4%	$108.47 \pm 13.46$	$100.12 \pm 12.43$	$89.41 \pm 11.10$
15%/0.4%	$158.30 \pm 17.96$	$146.12 \pm 16.57$	$130.49 \pm 14.84$

*Moduł Younga został wyznaczony dla wartości indentacji równej 200 nm.*

Zmiana wartości współczynnika Poissona w zakresie 0.3 – 0.5 powoduje zmianę wartości modułu Younga o 18%. Według Englera i wsp., zmiana współczynnika Poissona w powyższym zakresie powoduje zmianę wartości modułu Younga o 10% dla igieł posiadających kształt

czworobocznej piramidy, przy założeniu, że moduł Younga został wyznaczony na głębokości 5 – 50 nm [43]. Niepewność wartości średnich modułu Younga uzyskiwanych w eksperymencie AFM plasuje się na poziomie około 10% dla mniej elastycznych żeli poliakrylamidowych i około 25% dla żeli bardzo elastycznych (Tabela 5). Błąd wynikający z uwzględnienia wartości współczynnika Poissona z zakresu 0.3 – 0.5 nie powoduje więc przesunięcia się wartości powyżej standardowego błędu pomiarowego.

#### 2.3.4 Relacja modułów elastyczności $E$ i ścinania $G$ dla żelu poliakrylamidowego

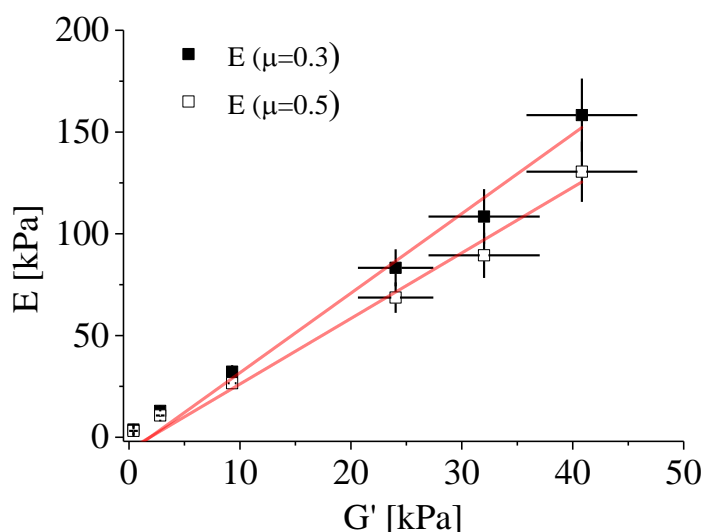
Relacja wiążąca moduł elastyczności (tj. moduł Younga) z modułem ścinania ma następującą postać:

$$G = \frac{E}{2(1 + \mu)} \quad (11)$$

Dla współczynnika Poissona równego 0.5 powyższa relacja upraszcza się do równania:

$$E = 3 \cdot G \quad (12)$$

W celu sprawdzenia zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami modułu Younga otrzymanymi przy użyciu techniki AFM, a wartościami modułu sprężystości wyznaczonymi przy użyciu reometru rotacyjnego sporządzono wykres zależności  $E$  [kPa] w funkcji  $G'$  [kPa] (Rys. 19).



Rysunek 19. Wartości modułu Younga otrzymane przy użyciu techniki AFM dla współczynników Poissona równych 0.3 i 0.5 w funkcji modułu sprężystości otrzymanego przy użyciu reometru rotacyjnego.



Wyznaczona z nachylenia linii prostej eksperymentalna relacja przyjmuje postać:

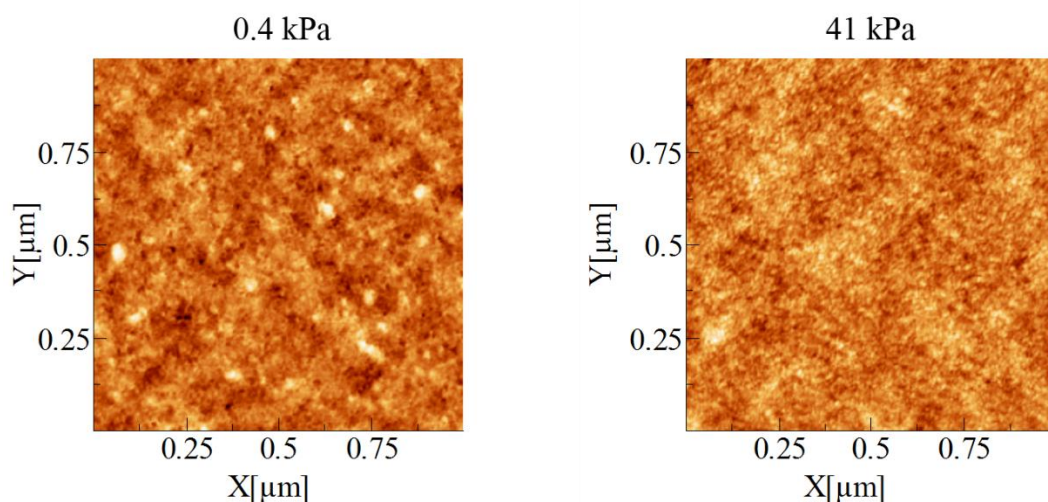
$$E = (3.2 \pm 0.2)G' \quad (13)$$

i mieści się w zakresie zależności teoretycznej dla współczynnika Poissona równego 0.5. Jeśli wartość współczynnika Poissona będzie wynosiła 0.3, to *równanie (12)* przyjmuje postać  $E = 2.6 G'$ . Zastosowanie wartości współczynnika Poissona 0.3 do wyznaczenia eksperymentalnej relacji pomiędzy modułem Younga, a  $G'$  powoduje sprowadzenie *równania (13)* do postaci:  $E = (3.9 \pm 0.41)G'$ .

Pomimo niewielkich rozbieżności literaturowych, dotychczasowe wyniki pomiarów własności mechanicznych żeli poliakrylamidowych prowadzonych przy użyciu różnych technik wskazują, że założenie wartości współczynnika Poissona równego 0.5 jest prawidłowe. Uzyskane wartości modułu Younga i modułu sprężystości są zbieżne z wynikami otrzymanymi przez inne grupy badawcze nie tylko przy użyciu mikroskopu sił atomowych czy reometru, ale także dzięki takim technikom jak zasysanie mikropipetą czy testy za pomocą maszyny wytrzymałościowej [41], [44]–[46].

### 2.3.5 Topografia powierzchni żelu poliakrylamidowego

Głównym celem analizy topograficznej było sprawdzenie, jak wzrost stopnia usieciowania żeli poliakrylamidowych wpływa na ich własności powierzchniowe. Różnice w topografii powierzchni pomiędzy podłożami o większej elastyczności (0.4 kPa) i mniejszej elastyczności (41 kPa) mogą mieć wpływ na wzrost komórek. Pomiar topografii powierzchni podłoży poliakrylamidowych został przeprowadzony przy użyciu mikroskopu sił atomowych pracującego w trybie obrazowania. W celu oszacowania morfologii powierzchni podłoży użyto parametru RMS, będącego miarą chropowatości profilu powierzchni. Analizie poddano obrazy o wymiarach  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  zebrane dla podłoży o skrajnych sztywnościach 0.4 kPa i 41 kPa, które uprzednio poddano dehydratacji. Pomiar uwodnionych podłoży poliakrylamidowych nie był możliwy, zarówno w trybie kontaktowym jak i bezkontaktowym.



Rysunek 20. Topografia powierzchni podłoża poliakrylamidowych po dehydratacji.

Wysuszone podłoża poliakrylamidowe mają relatywnie gładką powierzchnię o współczynniku chropowatości wynoszącym  $0.34 \pm 0.04$  nm dla żelu o elastyczności 0.4 kPa i  $0.29 \pm 0.02$  nm dla żelu o elastyczności 41 kPa. Brak w literaturze informacji na temat chropowatości podłoża poliakrylamidowych wyznaczonej na podstawie pomiaru mikroskopią AFM (głównie ze względu na trudność w uzyskaniu czytelnego obrazu powierzchni). Pomiar wysuszonych podłoża poliakrylamidowych daje pośrednią informację na temat rozmiaru porów w żelowej sieci przestrzennej. Wysuszone podłoża umieszczone ponownie w roztworze wodnym wykazują zdolność do ponownego pęcznienia, odzyskując swoje własności elastyczne (dane nie pokazane). Skuteczne zobrazowanie powierzchni żelu poliakrylamidowego bez uprzedniej dehydratacji wydaje się być możliwe jedynie przy użyciu techniki skaningowej mikroskopii elektronowej z przystawką w warunkach ciekłego azotu (cryo-SEM). Obrazy powierzchni podłoża poliakrylamidowych uzyskanych przy użyciu techniki cryo-SEM zostały opublikowane przez Trappmanna i wsp. [47]. Przedstawiony średni rozmiar porów w żelach poliakrylamidowych waha się w zakresie od 15 nm do 2.5 nm dla modułu elastyczności od 0.5kPa do 115 kPa (moduł elastyczności wyznaczony z użyciem mikroindentera Instron 5544).

## 2.4 Wnioski

Informacje uzyskane dzięki charakterystyce chemicznej i fizycznej podłoża poliakrylamidowych mogą zostać podsumowane w następujący sposób:

- i. Powierzchniowe własności chemiczne podłoży poliakrylamidowych nie zmieniają się wraz ze wzrostem stężenia monomerów akrylamidu dostępnych w reakcji polimeryzacji.
- ii. Wzrost stężenia akrylamidu podczas reakcji polimeryzacji żelu poliakrylamidowego, przy stałym stężeniu czynnika sieciującego, powoduje zwiększenie się stopnia usieciowania poliakrylamidu, czego przejawem jest wzrost jego sztywności.
- iii. Sztywność żeli poliakrylamidowych może zostać zmierzona techniką oscylacyjną przy pomocy reometru rotacyjnego. Moduł sprężystości  $G'$  żelu poliakrylamidowego przyjmuje wartość kilkukrotnie wyższą od modułu stratności  $G''$ , dlatego też sztywność żelu jest na ogół opisywana przy pomocy modułu  $G'$ .
- iv. Wartość modułu  $G'$  może zostać wyznaczona teoretycznie przy użyciu statystycznej teorii elastyczności. Dla żelu poliakrylamidowego o stężeniu 0.4% w/v czynnika sieciującego, przy założeniu, że każda cząsteczka czynnika utworzyła elastycznie aktywny punkt sieciowania, wynosi ona 63.45 kPa.
- v. Uzyskane eksperymentalnie wartości modułu  $G'$  mieszczą się w zakresie 0.4 kPa – 41 kPa i są niższe od wartości wyznaczonej teoretycznie (63.45 kPa). Oznacza to, że ilość monomerów akrylamidu nie była wystarczająca aby związać wszystkie cząsteczki czynnika sieciującego.
- vi. Oszacowany stopień przereagowania czynnika sieciującego dla proporcji akrylamidu i *bis*-akrylamidu wykorzystanych w niniejszej pracy mieści się w zakresie 0.6% – 64.4%.
- vii. Lokalny pomiar własności mechanicznych podłoży poliakrylamidowych pozwolił na wyznaczenie wartości modułu Younga, która dla przebadanych podłoży mieści się w zakresie 3 kPa – 131 kPa, przy założeniu, że współczynnik Poissona dla poliakrylamidu wynosi 0.5.
- viii. Teoretyczna relacja pomiędzy modułem Younga i modułem sprężystości dla żelu poliakrylamidowego wynosi  $E = 3G$ , jeśli za współczynnik Poissona zostanie przyjęta wartość 0.5. Wyznaczona eksperymentalnie zależność pokrywa się z relacją teoretyczną przyjmując następującą formę:  $E = (3.2 \pm 0.2) G'$ .
- ix. Topografia powierzchni podłoży poliakrylamidowych scharakteryzowana przy pomocy parametru chropowatości nie różni się znacząco dla podłoży o sztywności 0.4 kPa i 41 kPa (dla próbek dehydratowanych).

## 2.5 Literatura

- [1] K. Pal, A. K. Banthia, and D. K. Majumdar, "Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications," *Des. Monomers Polym.*, Apr. 2012.
- [2] J. Jagur-Grodzinski, "Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications," *Polym. Adv. Technol.*, p. n/a–n/a, 2009.
- [3] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications," *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, Jul. 2013.
- [4] R. J. Pelham and Y. -l. Wang, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 25, pp. 13661–13665, Dec. 1997.
- [5] Y. L. Wang and R. J. Pelham, "Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells.," *Methods Enzymol.*, vol. 298, pp. 489–96, Jan. 1998.
- [6] H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang, "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 279, pp. C1345–C1350, 2000.
- [7] C. E. Kadow, P. C. Georges, P. a. Janmey, and K. a. Beningo, "Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics: Steps Toward Optimization and Alternative Uses," *Methods Cell Biol.*, vol. 83, no. 07, pp. 29–46, 2007.
- [8] B. Chen and A. Chrambach, "Estimation of polymerization efficiency in the formation of polyacrylamide gel, using continuous optical scanning during polymerization.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 1, no. 2, pp. 105–16, May 1979.
- [9] A. Chrambach and D. Rodbard, "Polyacrylamide gel electrophoresis.," *Science*, vol. 172, no. 3982, pp. 440–51, Apr. 1971.
- [10] C. E. Kadow, P. C. Georges, P. A. Janmey, and K. A. Beningo, "Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses.," *Methods Cell Biol.*, vol. 83, pp. 29–46, Jan. 2007.
- [11] R. J. Pelham and Y. -l. Wang, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 25, pp. 13661–13665, Dec. 1997.
- [12] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, and D. Discher, "Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses," *Biophys. J.*, vol. 86, no. 1, pp. 617–628, Jan. 2004.
- [13] J. R. Tse and A. J. Engler, "Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, no. June, pp. 1–16, 2010.

- [14] U. Horzum, B. Ozdil, and D. Pesen-Okvur, "Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions," *MethodsX*, vol. 1, pp. 56–59, 2014.
- [15] E. Geissler and A. M. Hecht, "The Poisson Ratio in Polymer Gels," *Macromolecules*, vol. 13, no. 5, pp. 1276–1280, Sep. 1980.
- [16] E. Geissler and A. M. Hecht, "The Poisson ratio in polymer gels. 2," *Macromolecules*, vol. 14, no. 1, pp. 185–188, Jan. 1981.
- [17] Y. Li, Z. Hu, and C. Li, "New method for measuring poisson's ratio in polymer gels," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 50, no. 6, pp. 1107–1111, Nov. 1993.
- [18] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength," *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2000.
- [19] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, "Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–67, Jan. 2011.
- [20] S. Prauzner-Bechcicki, J. Raczowska, E. Madej, J. Pabijan, J. Lukes, J. Sepitka, J. Rysz, K. Awsiuk, A. Bernasik, A. Budkowski, and M. Lekka, "PDMS substrate stiffness affects the morphology and growth profiles of cancerous prostate and melanoma cells.," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 41, pp. 13–22, Jan. 2015.
- [21] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. A. Maksoud, I. M. Elewa, and H. H. Soliman, "Roughness parameters," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 123, no. 1, pp. 133–145, Apr. 2002.
- [22] I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, and A. M. Baro, "WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology.," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, no. 1, p. 013705, Jan. 2007.
- [23] R. Murugan, S. Mohan, and A. Bigotto, "FTIR and polarised Raman spectra of acrylamide and polyacrylamide," *J. ...*, 1998.
- [24] B. Wojtkowiak and M. Chabanel, *Spektrochemia molekularna*. Warszawa: PWN, 1984.
- [25] P. Zbiorowa, *Metody spektroskopowe i ich zastosowania do identyfikacji związków organicznych*. Warszawa: WNT, 1995.
- [26] A. Basu, Q. Wen, X. Mao, T. C. Lubensky, P. A. Janmey, and A. G. Yodh, "Nonaffine Displacements in Flexible Polymer Networks," *Macromolecules*, vol. 44, no. 6, pp. 1671–1679, Mar. 2011.
- [27] C. A. Grattoni, H. H. Al-Sharji, C. Yang, A. H. Muggeridge, and R. W. Zimmerman, "Rheology and Permeability of Crosslinked Polyacrylamide Gel.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 240, no. 2, pp. 601–607, Aug. 2001.

- [28] A. Buxboim, K. Rajagopal, A. E. X. Brown, and D. E. Discher, “How deeply cells feel: methods for thin gels.,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 22, no. 19, p. 194116, May 2010.
- [29] K. S. Anseth, C. N. Bowman, and L. Brannon-Peppas, “Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination,” *Biomaterials*, vol. 17, no. 17, pp. 1647–1657, Jan. 1996.
- [30] D. T. N. Chen, Q. Wen, P. A. Janmey, J. C. Crocker, and A. G. Yodh, “Rheology of Soft Materials,” *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, vol. 1, no. 1, pp. 301–322, Aug. 2010.
- [31] L. R. Treloar, *The Physics of Rubber Elasticity*, 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1975.
- [32] P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1953.
- [33] T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey, “Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion.,” *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 60, no. 1, pp. 24–34, Jan. 2005.
- [34] P. D. Wu and E. Van Der Giessen, “On improved network models for rubber elasticity and their applications to orientation hardening in glassy polymers,” *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 41, no. 3, pp. 427–456, Mar. 1993.
- [35] J. S. Bergström and M. C. Boyce, “Deformation of Elastomeric Networks: Relation between Molecular Level Deformation and Classical Statistical Mechanics Models of Rubber Elasticity,” *Macromolecules*, vol. 34, no. 3, pp. 614–626, Jan. 2001.
- [36] R. Bale and H. G. Muller, “Application of the statistical theory of rubber elasticity to the effect of heat on wheat gluten,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 5, no. 3, pp. 295–300, Jun. 2007.
- [37] A. J. M. Segeren, J. V. Boskamp, and M. van den Tempel, “Rheological and swelling properties of alginate gels,” *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 57, p. 255, Jan. 1974.
- [38] H. Haga, S. Sasaki, M. Morimoto, K. Kawabata, E. Ito, K. Abe, and T. Sambongi, “Imaging Elastic Properties of Soft Materials Immersed in Water Using Force Modulation Mode in Atomic Force Microscopy,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 37, no. Part 1, No. 6B, pp. 3860–3863, Jun. 1998.
- [39] T. Nitta, H. Haga, K. Kawabata, K. Abe, and T. Sambongi, “Comparing microscopic with macroscopic elastic properties of polymer gel,” *Ultramicroscopy*, vol. 82, no. 1–4, pp. 223–226, Feb. 2000.
- [40] V. I. Uricanu, M. H. G. Duits, R. M. F. Nelissen, M. L. Bennink, and J. Mellema, “Local Structure and Elasticity of Soft Gelatin Gels Studied with Atomic Force Microscopy,” *Langmuir*, vol. 19, no. 20, pp. 8182–8194, Sep. 2003.
- [41] A. J. Engler, L. Richert, J. Y. Wong, C. Picart, and D. E. Discher, “Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte

- multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion,” *Surf. Sci.*, vol. 570, no. 1–2, pp. 142–154, Oct. 2004.
- [42] J. R. Tse and A. J. Engler, “Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties,” *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. Chapter 10, p. Unit 10.16, Jun. 2010.
- [43] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, and D. Discher, “Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses,” *Biophys. J.*, vol. 86, no. 1, pp. 617–628, Jan. 2004.
- [44] L. A. Flanagan, Y.-E. Ju, B. Marg, M. Osterfield, and P. A. Janmey, “Neurite branching on deformable substrates,” *Neuroreport*, vol. 13, no. 18, pp. 2411–5, Dec. 2002.
- [45] T. Boudou, J. Ohayon, C. Picart, and P. Tracqui, “An extended relationship for the characterization of Young’s modulus and Poisson’s ratio of tunable polyacrylamide gels,” *Biorheology*, vol. 43, no. 6, pp. 721–8, Jan. 2006.
- [46] S. R. Peyton and A. J. Putnam, “Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 1, pp. 198–209, Jul. 2005.
- [47] B. Trappmann, J. E. Gautrot, J. T. Connelly, D. G. T. Strange, Y. Li, M. L. Oyen, M. A. Cohen Stuart, H. Boehm, B. Li, V. Vogel, J. P. Spatz, F. M. Watt, and W. T. S. Huck, “Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate,” *Nat. Mater.*, vol. 11, no. 7, pp. 642–9, Jul. 2012.

## Rozdział 3 – Elastyczność komórek prostaty rosnących na powierzchni szkła

### 3.1 Wstęp

Zasadniczym celem prowadzenia hodowli komórkowych jest odtworzenie istniejącego *in vivo* środowiska komórkowego w układzie doświadczalnym *ex vivo*, który pozwala na ścisłą kontrolę warunków zewnętrznych, stwarza możliwość łatwej modyfikacji mikrośrodowiska komórkowego oraz wszechstronną analizę aktywności fizjologicznej komórek [1]. Hodowle kultur komórkowych prowadzi się w ściśle określonych, właściwych dla każdej linii komórkowej warunkach, jak najbardziej zbliżonych do tych panujących w żywym organizmie. Głównym zadaniem niniejszego rozdziału była charakterystyka układu modelowego raka prostaty *in vitro*, który posłuży do dalszych badań nad rolą, jaką bodźce mechaniczne odgrywają w jego rozwoju. Zanim hodowane komórki będą przeniesione na opisane w *Rozdziale 2* podłoża poliakrylamidowe o różnej sztywności, celem interpretacji wyników konieczna jest obserwacja i charakterystyka tych komórek w hodowli konwencjonalnej, tj. na szkłe.

Na wstępie ważny jest wybór metod eksperymentalnych, które posłużą do opisu zachowania się komórek. Szereg metod biologii molekularnej, biochemii czy genetyki pozwala na ścisłą charakterystykę profilu ekspresji genów, wielkości metabolizmu czy obecności białkowych markerów nowotworowych [2], [3]. Niniejsza praca doktorska skupia się jednak na własnościach mechanicznych żywych komórek, przez co metody eksperymentalne zostały wybrane w taki sposób, aby możliwe było wyznaczenie parametrów związanych przede wszystkim z morfologią (kształt), organizacją wnętrza (cytoszkielec), oraz elastycznością komórek.

Pole powierzchni, objętość oraz kształt komórek może różnić się znacząco dla komórek zdrowych i zmienionych nowotworowo [4], [5]. Pokazano korelację pomiędzy kształtem przyjmowanym przez komórki, a zmianą ekspresji genów, sygnalizacji komórkowej i żywotności komórek [6], [7]. Stopień rozpląszczenia komórek oraz ich kształt determinuje kierunek różnicowania się komórek macierzystych [8]. Liczne prace autorstwa Ingbera i wsp. pokazują, że procesy życiowe takie jak podział, wzrost czy śmierć są kontrolowane w komórkach z uwzględnieniem parametrów geometrycznych [9]–[12]. Morfologia



przyjmowana przez komórki zdrowe i nowotworowe jest ściśle powiązana z organizacją ich struktury wewnętrznej, głównie cytoszkieletu komórkowego [13], [14]. To białkowe rusztowanie pełni kluczową rolę w regulowaniu podstawowych procesów życiowych komórek, takich jak migracja czy podział [15]–[17]. Zaobserwowano, że zmiana organizacji cytoszkieletu komórkowego podczas transformacji nowotworowej pozwala na deregulację tych procesów promując rozwój choroby. Obserwacja ta stanowiła punkt wyjścia do opracowania terapii przeciwnowotworowych na bazie leków o działaniu hamującym polimeryzację cytoszkieletu [18]. Cytoszkielet komórkowy jest również narzędziem służącym do transmisji bodźców mechanicznych docierających do komórki z zewnątrz oraz generowanych w jej wnętrzu [19]. W efekcie przestrzenna sieć białkowych filamentów może być traktowana jak materiał biopolimerowy ulegający deformacjom i stanowiący o wytrzymałości mechanicznej komórki [20]. W związku z powyższym możliwe jest zastosowanie teorii sprężystości oraz metod reologicznych do oceny własności mechanicznych pojedynczych komórek [21]. Metodą umożliwiającą lokalny pomiar własności mechanicznych cytoszkieletu komórkowego jest mikroskopia sił atomowych (AFM). Wyniki otrzymane z wykorzystaniem tej metody wskazują jednoznacznie, że własności mechaniczne komórek zdrowych i nowotworowych różnią się znacząco [22]–[24].

Wyniki zawarte w poniższym rozdziale przedstawiają charakterystykę morfologiczną trzech typów linii komórkowych prostaty tj. linii komórek prawidłowych (PZ-HPV-7) oraz dwóch linii nowotworowych pochodzących z przerzutu do mózgu (Du145) i kości (PC-3). Charakterystyka morfologiczna obejmuje wyznaczenie parametrów opisujących pole powierzchni komórek ( $A$ ), obwód ( $O$ ) oraz sferyczność ( $S$ ). Ponadto przeprowadzono charakterystykę nanomechaniczną żywych komórek z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych. Pomiar ten pozwolił na wyznaczenie wartości modułu Younga komórek, będącego miarą ich elastyczności. Wartość modułu Younga została określona dla różnych głębokości ugięcia układu błona komórkowa – cytoszkielet i skorelowana ze stopniem inwazyjności badanych linii komórkowych. Ostatecznie, dzięki obserwacjom prowadzonym w mikroskopie optycznym możliwa była ocena tempa podziału komórkowego dla komórek hodowanych na szkle.

## 3.2 Materiały i metody

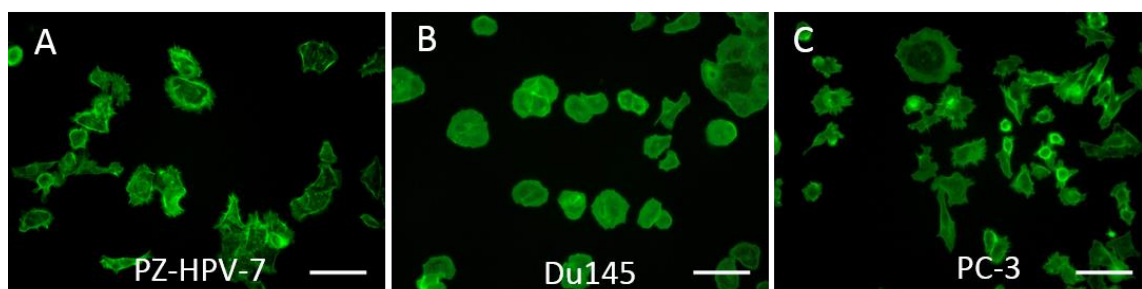
### 3.2.1 Hodowla komórkowa

W badaniach *in vitro* nad mechanizmem powstawania i metastazy raka gruczołu krokowego wykorzystuje się linie komórkowe pochodzące z różnych stadiów procesu chorobowego – od komórek wyizolowanych z prawidłowej tkanki gruczołu, poprzez wyizolowane w fazie łagodnego przerostu, aż po komórki pochodzące z wtórnych ognisk raka (przerzutów) [25]. W literaturze opisano dotychczas właściwości kilkudziesięciu linii komórkowych, które są wykorzystywane jako układy modelowe w badaniach nad powstawaniem raka prostaty [26], [27]. Trzy spośród nich zostały wybrane do prezentowanych tu badań – linia prawidłowa i dwie linie komórek rakowych pochodzące z różnych stadiów zaawansowania raka:

**PZ-HPV-7** – prawidłowa linia komórek nabłonkowych wyizolowanych ze strefy obwodowej prostaty 70-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej (Rys. 1A). Komórki te zostały unieśmiertelnione z użyciem wirusa brodawczaka ludzkiego (*ang. human papilloma virus*, w skrócie *HPV*). Linia PZ-HPV-7 nie wykazuje zdolności do tworzenia guzów nowotworowych, a w modelach *in vitro* raka prostaty uznawana jest za linię referencyjną [28].

**Du145** – linia komórkowa pochodząca z przerzutów raka prostaty do mózgu (Rys. 1B). Linia ta została wyizolowana i po raz pierwszy opisana w 1978 r. przez Stone`a i innych [29]. Dawcą był 69-letni mężczyzna rasy kaukaskiej cierpiący na raka prostaty z rozległymi przerzutami do kości udowej, kręgosłupa, wątroby, płuc i mózgu. W modelach *in vitro* linia Du145 uznawana jest za linię komórkową charakteryzującą się umiarkowaną inwazyjnością.

**PC-3** – linia komórkowa wyizolowana z przerzutu raka prostaty do kości (Rys. 1C), która została wyizolowana i opisana w roku 1979 przez Kaighna i innych [30]. Jej dawcą był 62-letni mężczyzna rasy kaukaskiej cierpiący na raka prostaty o wysokim stopniu agresji i rozległych przerzutach, w tym do kości. W modelach *in vitro* komórki linii PC-3 uznawane są za charakteryzujące się wysokim stopniem agresji.



Rysunek 1. Komórki prostaty (A) PZ-HPV-7, (B) Du145 i (C) PC-3. Obrazy fluorescencyjne przedstawiające cytoszkielet aktynowy, wybarwiony przy użyciu falloidyny znakowanej fluoroforem Alexa Fluor 488. Skala równa 80  $\mu\text{m}$ .

Komórki wyżej opisanych linii wykazują morfologię charakterystyczną dla komórek pochodzenia nabłonkowego (Rys. 1), jednak linie PC-3 i Du145 cechuje szybszy wzrost i brak inhibicji kontaktowej (tj. zahamowania wzrostu komórki w odpowiedzi na zetknięcie się z powierzchnią innej komórki) [31].

Komórki linii PC-3 oraz Du145 hodowane były w medium RPMI 1640 (*ang. Roswell Park Memorial Institute*, Sigma) z 10% dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (FBS, *ang. Fetal Bovine Serum*, Sigma), 1% L-glutaminy, 10 mM HEPES (*kw. 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy*, Sigma), 1 mM pirogronianu sodu (Sigma), 2.5 g/L glukozy (Sigma), 100 U/ml penicyliny oraz 0.1 mg/ml streptomycyny (Sigma). Komórki linii PZ-HPV-7 hodowane były w medium Keratinocyte-SFM (*ang. Serum Free Medium*, GIBCO) z dodatkiem 0.2 ng/ml EFG (*ang. Epidermal Growth Factor*, GIBCO) oraz 30 mg/ml bydlęcej surowicy przysadkowej (GIBCO). Komórki namnażane były w plastikowych butelkach hodowlanych i pasażowane po uzyskaniu pełnej konfluencji (ok. 3-4 dni dla Du145 i PC-3, oraz 5-7 dni dla PZ-HPV-7). Do pomiaru komórki wysiewano na sterylne szkiełka nakrywkowe (o średnicy 15 mm, Thermo Scientific). Zawiesina zawierała 30.000 komórek/mL medium. Pomiaru wykonywano dla trzech punktów czasowych – po 24 h, 48 h i 72 h od wysiania w przypadku mikroskopii fluorescencyjnej oraz mikroskopii sił atomowych. Tempo podziału komórek badano dla 4 punktów czasowych – po 24 h, 48 h, 72 h i 96 h. Przez cały okres trwania hodowli komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze o 5% stężeniu CO<sub>2</sub> i dużej wilgotności (> 98%).

### 3.2.2 Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna jest odmianą mikroskopii świetlnej, która dzięki zastosowaniu znacznika zdolnego do emisji sygnału fluorescencyjnego po wzbudzeniu światłem o odpowiedniej długości fali pozwala na identyfikację struktur subkomórkowych [32]. W niniejszej pracy mikroskopia fluorescencyjna została zastosowana w celu wizualizacji cytoszkieletu aktynowego oraz jądra komórkowego.

Komórki wyhodowane na szkiełkach nakrywkowych płukano roztworem PBS (*ang. Phosphate Buffered Saline*, Sigma) przez 2 minuty, a następnie inkubowano z 3.7% roztworem paraformaldehydu (Sigma) przez 20 minut w celu ich utrwalenia. Po zakończeniu inkubacji każdy preparat płukano trzykrotnie roztworem PBS. Kolejnym krokiem była permabilizacja błony komórkowej, która umożliwiła wniknięcie barwników fluorescencyjnych do wnętrza komórki. W tym celu utrwalone preparaty inkubowano z 0.2% roztworem Triton X-100 (Sigma) w temperaturze 4°C przez 5 min. Następnie preparaty trzykrotnie płukano PBS. Falloidyna znakowana fluoroforem Alexa Fluor 488 (Invitrogen) została wykorzystana w celu wizualizacji filamentów aktynowych komórki, natomiast odczynnik Hoechst (Invitrogen) posłużył do wybarwienia jąder komórkowych. Falloidyna (1 U/ml) inkubowana była z komórkami przez 30 min, a odczynnik Hoechst (0.001 mg/ml) przez 5 min. Po zakończeniu inkubacji każdy z preparatów kilkakrotnie przepłukano w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek barwnika.

Obrazy fluorescencyjne rejestrowano przy użyciu dwóch mikroskopów: Olympus IX71 wyposażony w lampę LED i Olympus IX51 wyposażony w 100 W lampę rtęciową równomiernie oświetlającą cały obszar próbki (mikroskopy dostępne są w Pracowni Badań Mikroukładów Biofizycznych IFJ PAN). W każdym z mikroskopów rejestrację sygnału fluorescencyjnego umożliwiały dwa filtry: U-MWIG2 ( $\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 530 - 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisji}} = 590 \text{ nm}$ ) do rejestracji sygnału w zakresie światła zielonego oraz U-MNB2 ( $\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 470 - 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisji}} = 520 \text{ nm}$ ) do rejestracji sygnału w zakresie światła niebieskiego. Mikroskop IX71 wyposażony jest w kamerę cyfrową XC10 (Olympus, 1376 px  $\times$  1032 px), natomiast mikroskop IX51 w kamerę cyfrową XC30 (Olympus, 2080 px  $\times$  1544 px), które umożliwiają rejestrację obrazów. Wszystkie obrazy zarejestrowano z użyciem programu CellSense Dimensions (Olympus) przy pomocy obiektywów z 20 $\times$ , 40 $\times$ , 60 $\times$  oraz 100 $\times$  powiększeniem.

### 3.2.3 Analiza wielkości i kształtu komórek

Jak przedstawiono we wstępie do niniejszego rozdziału, wielkość i kształty przyjmowane przez komórki są ściśle powiązane z pełnioną przez nie funkcją i mogą ulegać modyfikacjom w stanach patologicznych organizmu. Często występującymi w literaturze parametrami opisującymi morfologię komórek są pole powierzchni, obwód oraz sferyczność [33], [34].

Analizę obrazów fluorescencyjnych przeprowadzono z użyciem darmowego oprogramowania do analizy obrazu mikroskopowego NIH ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Kształt każdej z komórek obrysowywano ręcznie, przeliczając ilość rejestrowanych pikseli na ilość odpowiadających im mikrometrów. Pole powierzchni komórek ( $A$ ) przedstawione jest w [ $\mu\text{m}^2$ ], obwód komórek ( $O$ ) w [ $\mu\text{m}$ ], natomiast sferyczność ( $S$ ) jest parametrem bezwymiarowym zdefiniowanym jako:

$$S = 4\pi \frac{\text{Pole powierzchni komórki}}{[\text{Obwód komórki}]^2} \quad (1)$$

Parametr  $S$  osiąga wartość 1.0 dla idealnego koła a zbliża się do wartości 0.0 ze wzrostem wydłużenia komórki. Tylko pojedyncze komórki zostały poddane analizie.

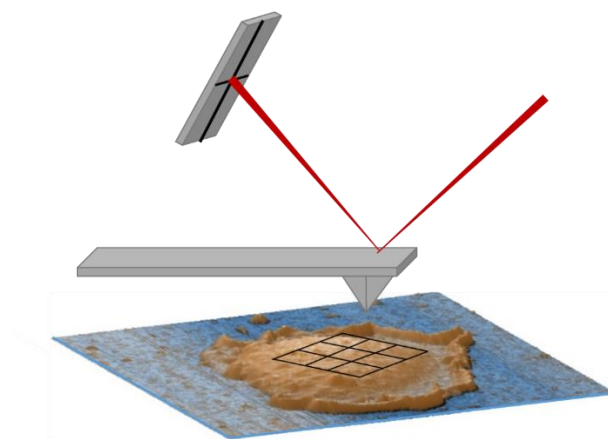
### 3.2.4 Mikroskopia Sił Atomowych

Pomiar elastyczności przy użyciu mikroskopu sił atomowych jest źródłem informacji na temat lokalnych własności lepkosprężystych badanej próbki. Niewątpliwą zaletą tego eksperymentu jest możliwość prowadzenia pomiaru w cieczy, co pozwala na utrzymanie komórek w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Charakterystyka nanomechaniczna układu modelowego raka prostaty stanie się punktem wyjścia do badań odpowiedzi mechanicznej komórek rosnących na podłożach o różnej sztywności w kolejnym rozdziale.

Pomiar elastyczności żywych komórek przy użyciu mikroskopu sił atomowych (Xe120, Park Systems, znajdujący się w Pracowni Badań Mikroukładów Biofizycznych IFJ PAN), prowadzony był w medium hodowlanym właściwym dla każdej linii komórkowej. Przed przystąpieniem do pomiaru szkiełka z komórkami były dwukrotnie przepłukiwane w medium w celu usunięcia komórek słabo związanych z powierzchnią szkła. Przygotowaną próbkę umieszczano na skanerze piezoelektrycznym, zwracając szczególną uwagę, aby komórki

znajdowały się cały czas w cieczy. Do pomiarów własności mechanicznych komórek wybrano sondy typu OTR4 (Bruker) posiadające ostrza próbujące o geometrii czworobocznej piramidy. W pierwszej kolejności dokonywano kalibracji analogicznej jak przed pomiarem elastyczności podłoży poliakrylamidowych, a następnie rozpoczynano pomiar<sup>8</sup>. Procedura obejmowała następujące etapy:

- pomiar częstotliwości rezonansowej sprężynki,
- rejestracja kalibracyjnej krzywej siła-odległość na szkle, w miejscu wolnym od komórek,
- wyznaczenie współczynnika czułości detektora,
- rejestracja krzywych siła-odległość na pojedynczych komórkach.



*Rysunek 2. Pomiar krzywych siła-odległość w mikroskopie sił atomowych (rysunek nie w skali).*

Dla każdego preparatu mierzono ok. 30 komórek, rejestrując 36 krzywych z każdej komórki w obszarze kwadratu o boku 5  $\mu\text{m}$  (Rys. 2).

### 3.2.5 Analiza własności mechanicznych komórek

Dane pomiarowe opracowywano z użyciem oprogramowania własnego Laboratorium Badań Mikroukładów Biofizycznych oraz programu OriginLab 9.0. Po wyznaczeniu punktu kontaktu sondy AFM z powierzchnią komórki odejmowano krzywą kalibracyjną od krzywej zarejestrowanej na komórce. Uzyskana zależność siła nacisku – indentacja była dopasowywana

---

<sup>8</sup> Dokładny opis budowy mikroskopu sił atomowych, zasada jego działania i prowadzenia pomiaru własności elastycznych próbek zostały przedstawione w *Rozdziale 2*.

z użyciem funkcji opisanej w *Rozdziale 2* (model zakładający stożkowy kształt próbkującego ostrza). Następnie wyznaczano względną wartość modu Younga  $E_{komórki}$ , przy założeniu, że współczynnik Poissona jest równy 0.5. Założenie to jest słuszne w przypadku żywych komórek, które mogą być traktowane jak materiał nieściśliwy.

### 3.2.6 Wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek

Przy założeniu, że każda komórka dzieli się na dwie potomne, możliwe jest wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek  $t_d$  [35]. W tym celu, przez cztery kolejne dni trwania hodowli komórkowej rejestrowano obrazy fluorescencyjne z użyciem obiektywu o niewielkim powiększeniu (10×). Liczbę komórek zliczano i odkładano na wykresie jako wartość średnią ± odchylenie standardowe. Następnie do punktów dopasowywano funkcję postaci:

$$y(t) = y_0 e^{kt} \quad (6)$$

gdzie  $y_0$  oznacza liczbę komórek w czasie  $t_0$ ,  $k$  to stała wzrostu komórek, a  $t$  czas. Czas podwojenia  $t_d$  wyznaczany jest z zależności:

$$t_d = \frac{\ln 2}{k} \quad (7)$$

Do wyznaczenia niepewności pomiarowej użyta została różniczka zupełna postaci:

$$\sigma(t_d) = \frac{\ln 2}{k^2} \sigma(k) \quad (8)$$

### 3.2.7 Statystyka

Obserwowane rozkłady wartości pola powierzchni, obwodu oraz sferyczności komórek są rozkładami niesymetrycznymi. Aby zanalizować je w sposób ilościowy, histogramy opisano rozkładem logarytmicznie normalnym. Gęstość tego rozkładu przedstawia funkcja:

$$y = y_0 + \frac{1}{\sqrt{2\pi}wx} e^{-\frac{[\ln \frac{x}{xc}]^2}{2w^2}} \quad (9)$$

gdzie  $xc$  oznacza wartość średnią, a  $w$  odchylenie standardowe tej wartości. Dodatkowo, w celu opisanego kształtu rozkładów użyto dwóch parametrów – skośności i kurtozy. Współczynnik

skośności (*Skew*, ang. *skewness*), będący miarą asymetrii rozkładu, przyjmuje wartość 0 dla rozkładu symetrycznego, wartości ujemne dla rozkładów o lewostronnej asymetrii i wartości dodatnie dla rozkładów o prawostronnej asymetrii. Znak współczynnika asymetrii wskazuje na jej kierunek, natomiast jego wartość bezwzględna określa siłę asymetrii. Skośność (*Skew*) wyraża się następującym wzorem:

$$Skew = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_i - \bar{x}}{sd} \right)^3 \quad (10)$$

gdzie,  $x_i$  to kolejne wartości zmiennej,  $\bar{x}$  i  $sd$  to odpowiednio wartość średnia i odchylenie standardowe, a  $n$  liczebność próby. Wzór na błąd standardowy współczynnika skośności  $SE_{Skew}$  ma postać:

$$SE_{Skew} = \sqrt{\frac{6n(n-1)}{(n-2)(n+1)(n+3)}} \quad (11)$$

Kurtoza ( $K$ , ang. *kurtosis*), tzw. współczynnik skupienia, jest traktowana jako miara koncentracji wyników wokół wartości centralnej  $x_c$ . Kurtoza przyjmuje wartość 3 dla rozkładu normalnego (mezokurtycznego). Dla rozkładów wysmukłych (leptokurtycznych) jest większa od 3, a dla rozkładów spłaszczonych (platykurtycznych) przyjmuje wartości mniejsze od 3. Kurtoza wyraża się następującym wzorem:

$$K = \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_i - \bar{x}}{sd} \right)^4 - \frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)} \quad (12)$$

gdzie,  $x_i$  są kolejnymi wartościami zmiennej,  $\bar{x}$  i  $sd$  oznaczającymi odpowiednio wartość średnią i odchylenie standardowe, a  $n$  jest liczebnością próby. Wzór na błąd standardowy kurtozy  $SE_K$  ma postać:

$$SE_K = 2 \cdot SE_{Skew} \sqrt{\frac{n^2-1}{(n-3)(n+5)}} \quad (13)$$

Analizie poddano nie mniej niż 100 komórek w przypadku każdej linii komórkowej.

Wartości średnie modułu elastyczności, wraz z odchyleniem standardowym wyznaczono dla głębokości próbkowania z zakresu 100 nm – 600 nm. Dla każdej linii komórkowej wykonano trzy niezależne pomiary. Moduł Younga był wyznaczony dla ok. 90 komórek z każdej linii komórkowej. W celu weryfikacji istotności statystycznej obserwowanych różnic w parametrach opisujących kształt komórek oraz ich elastyczność wykonano t-test Studenta dla zmiennych niepołączonych z przedziałem ufności równym 95%.

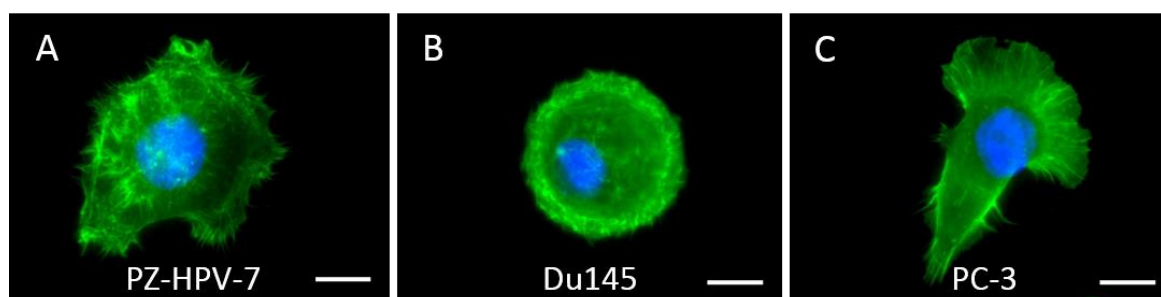


Oznaczenie istotności statystycznej stosowane w pracy: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, bs – brak różnic istotnych statystycznie.

### 3.3 Uzyskane wyniki i ich dyskusja

#### 3.3.1 Morfologia komórek prostaty rosnących na szkle

Pole powierzchni zajmowane przez przylegającą do podłoża komórkę oraz jej kształt są wynikiem dynamicznej interakcji pomiędzy błoną komórkową, poszczególnymi elementami cytoszkieletu i miejscami adhezji komórki z podłożem [11], [36]. Istotnym parametrem stosowanym do opisu morfologii komórki jest jej wielkość wyznaczana na podstawie zarejestrowanych obrazów optycznych. Może ona zostać przedstawiona jako pole powierzchni (A) zajmowane przez komórki, co pozwoli na porównanie ich wzajemnych rozmiarów (Rys. 3).



Rysunek 3. Morfologia komórek linii PZ-HPV-7 (A), Du145 (B) i PC-3 (C) w hodowli na szkle. Obrazy fluorescencyjne przedstawiają cytoszkielet aktynowy (kolor zielony), wybarwiony przy użyciu falloidyny znakowanej fluoroforem Alexa Fluor 488 oraz jądro komórkowe (niebieski) zabarwione odczynnikiem Hoechst. Skala wynosi 10  $\mu$ m.

Wartość pola powierzchni nie opisuje jednak w pełni morfologii badanych komórek. W celu uzyskania dokładniejszej informacji na temat kształtu przyjmowanego przez komórki konieczne jest wprowadzenie dodatkowych parametrów uzupełniających opis morfologiczny komórek. Takimi parametrami są obwód komórki ( $O$ ) i jej sferyczność ( $S$ ). Tabela 1 przedstawia wartości średnie, a Rysunek 4 rozkłady wartości tych parametrów wyznaczonych dla linii komórkowych PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 po 24 h ich wzrostu na powierzchni szkła. Środek rozkładu został wyznaczony na podstawie dopasowania funkcji logarytmicznie normalnej. Warto zwrócić uwagę nie tylko na wartości liczbowe uzyskane z dopasowania

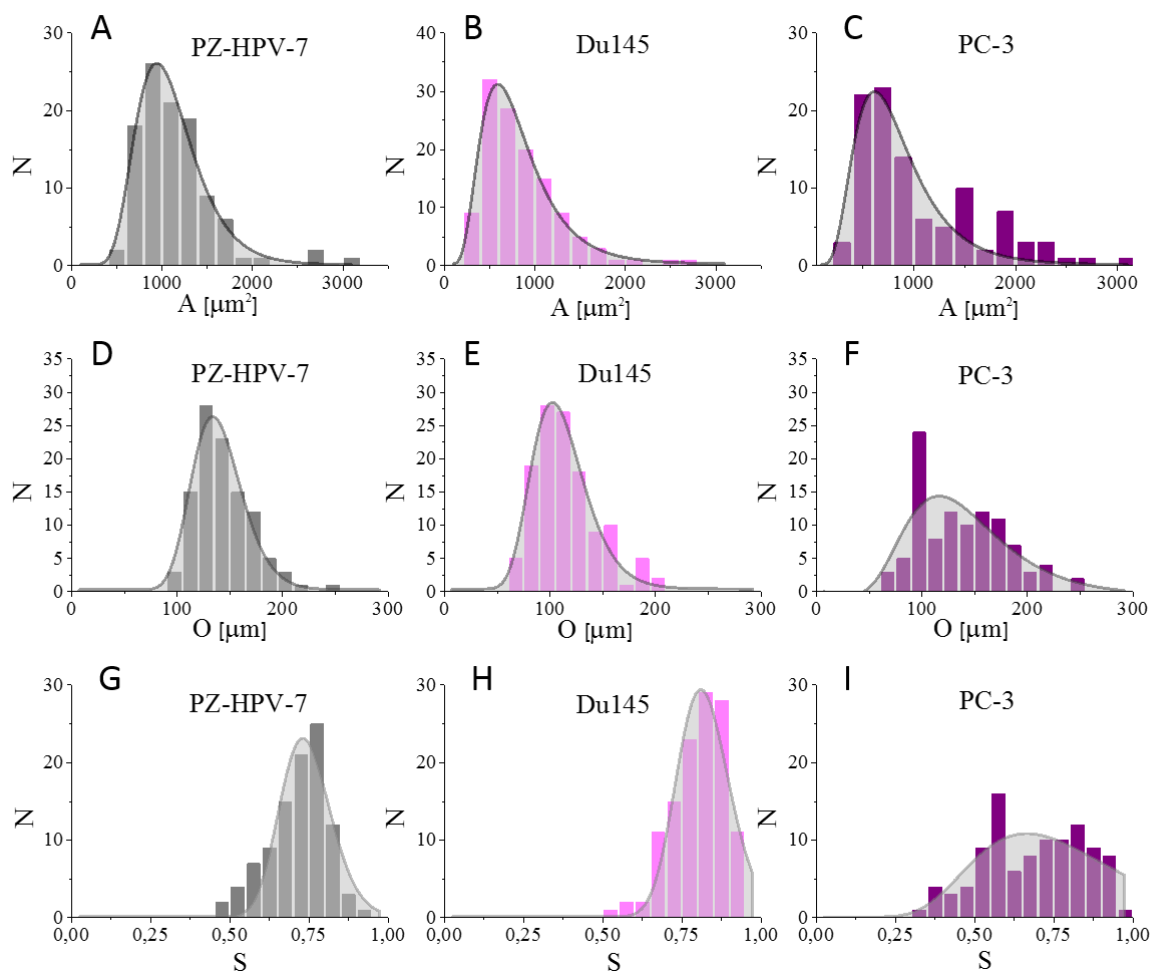
funkcji, ale także na kształt histogramów, gdyż jego charakter niesie informację na temat niejednorodności badanej populacji.

*Tabela 1. Wartości pola powierzchni, obwodu i sferyczności komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 zaprezentowane jako wartość średnia  $\pm$  SD wyznaczonych z dopasowania funkcji logarytmicznie normalnej.*

	<i>Pole powierzchni</i> $A [\mu\text{m}^2]$	<i>Obwód komórki</i> $O [\mu\text{m}]$	<i>Sferyczność</i> $S$
<i>PZHPV-7</i>	$1053 \pm 17$	$139 \pm 1$	$0.74 \pm 0.11$
<i>Du145</i>	$745 \pm 15$	$109 \pm 1$	$0.82 \pm 0.10$
<i>PC-3</i>	$764 \pm 47$	$132 \pm 8$	$0.74 \pm 0.32$

Podobnie jak dla innych typów nowotworów, komórki prawidłowe prostaty PZ-HPV-7 charakteryzują się większym polem powierzchni niż obie badane linie nowotworowe. Taka relacja pomiędzy komórkami prawidłowymi, a zmienionymi nowotworowo jest obserwowana zarówno w przypadku raka piersi [37] jak i skóry [38]. Pola powierzchni wyznaczone dla komórek PC-3 i Du145 są nierozróżnialne w granicy błędu eksperymentalnego (*Tab. 1*). Nie oznacza to jednak, że kształty przyjmowane przez komórki są podobne. Komórki linii Du145 posiadają kształt zbliżony do idealnej kuli o parametrze sferyczności równym  $0.82 \pm 0.10$ , natomiast komórki linii PC-3 posiadają kształt wydłużony, zbliżony do elipsy. Parametr sferyczności dla tych komórek wynosi  $0.74 \pm 0.32$ .

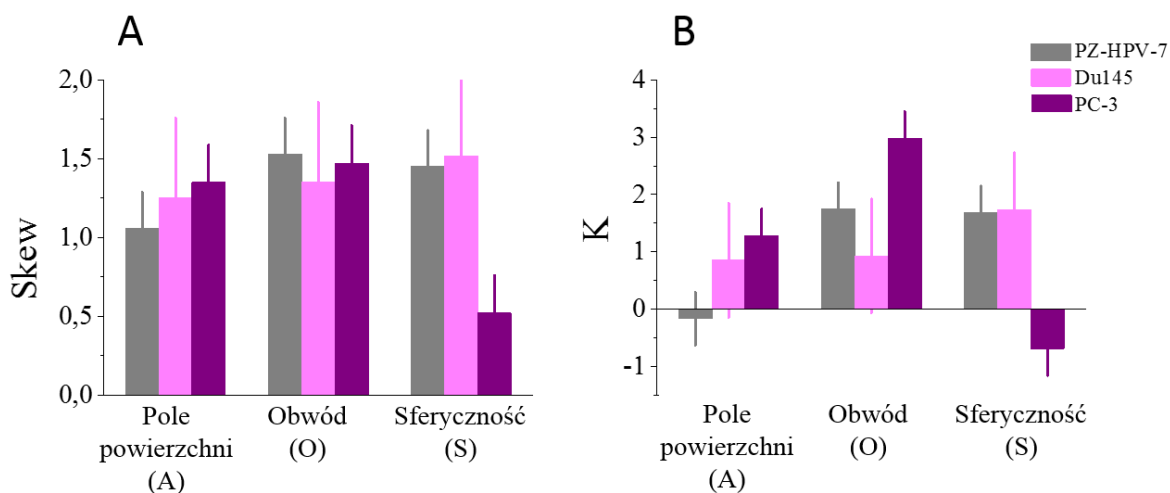
Obwód komórek PZ-HPV-7 i PC-3 wynosi odpowiednio 139  $\mu\text{m}$  i 132  $\mu\text{m}$ , podczas gdy komórki linii Du145 mają najmniejszy obwód równy 109  $\mu\text{m}$ . Wartości średnie parametru sferyczności zamieszczone w *Tabeli 1* sugerują, że komórki linii PZ-HPV-7 oraz PC-3 przybierają podobny kształt (mają równy parametr sferyczności). Obrazy morfologiczne dla tych komórek przedstawiają jednak różne kształty, komórki PC-3 mają kształt bardziej wydłużony niż komórki PZ-HPV-7.



Rysunek 4. Rozkłady wartości pola powierzchni, obwodu oraz sferyczności komórek prostaty rosnących na szkle wyznaczone po 24 h hodowli. Panel A-C przedstawia rozkład pola powierzchni komórek, panel D-F rozkład obwodu komórek, a panel G-I rozkład ich sferyczności.

Komórki linii PC-3 charakteryzuje niejednorodny kształt z dużą ilością wypustek i pofałdowań, podczas gdy komórki linii PZ-HPV-7 przyjmują kształt bardziej jednorodny. Pochodzące z obwodowej strefy gruczołu krokowego komórki PZ-HPV-7 wykazują morfologię charakterystyczną dla zdrowych komórek nabłonkowych. Komórki tworzące odległe, wtórne ogniska nowotworowe na ogół morfologicznie nie przypominają komórek tkanki z której się wywodzą. Środowiskiem komórek PC-3 wyizolowanych z przerzutu raka prostaty do kości nie jest tkanka nabłonkowa, ale tkanka kostna, zbudowana z białek macierzy zewnątrzkomórkowej i komórek osteoblastów. Pole powierzchni komórek PC-3 jest znacznie mniejsze od osteoblastów, ale obie linie komórkowe posiadają charakterystyczny, elipsoidalny kształt z licznymi wypustkami [39].

Zarówno obrazy fluorescencyjne na *Rysunku 3* jak i rozkłady na *Rysunku 4* pozwalają stwierdzić, że zakres przyjmowanych przez komórki kształtów jest specyficzny dla każdej linii komórkowej. Interpretację uzyskanych wyników wzbogacają parametry charakteryzujące kształt analizowanych rozkładów – skośność (*Skew*) i kurtoza (*K*), (*Rys. 5*).



*Rysunek 5. Wartości miar kształtu histogramu, tj. kurtozy i skośności wyznaczonych dla rozkładów przedstawionych na Rysunku 4 opisujących morfologię badanych komórek.*

W przypadku rozkładów pola powierzchni zajmowanego przez komórki histogramy uzyskane dla wszystkich trzech linii komórkowych są skośne prawostronnie. Oznacza to, że w przebadanych populacjach wielkość większości komórek jest wyższa od wartości średniej. Najniższą wartość kurtozy wykazuje rozkład pola powierzchni dla komórek linii PZ-HPV-7, a najwyższą rozkład komórek linii PC-3. Takie wartości kurtozy sugerują, że wielkość komórek linii prawidłowej (PZ-HPV-7) cechuje rozkład stosunkowo płaski, ale najmniej asymetryczny, natomiast największa asymetria rozkładu występuje dla komórek o największej inwazyjności (PC-3). Komórki linii Du145 posiadają rozkład pola powierzchni o umiarkowanej asymetryczności i spłaszczeniu. Siła asymetrii rozkładu obwodu komórek jest w zakresie błędu eksperymentalnego porównywalna dla wszystkich badanych linii komórkowych. Tak jak w przypadku rozkładów pola powierzchni są one skośne prawostronnie, co oznacza występowanie wartości większych od wartości średniej.

Rozkład sferyczności, wskazującej na podłużny lub sferyczny kształt komórek, również wykazuje charakter dodatnio skośny. Wyraźnie mniejszą asymetrię przejawia rozkład dla komórek linii PC-3. Rozkłady wartości sferyczności komórek linii PZ-HPV-7 i Du145 charakteryzują się porównywalną skośnością. Porównywalna w zakresie błędu

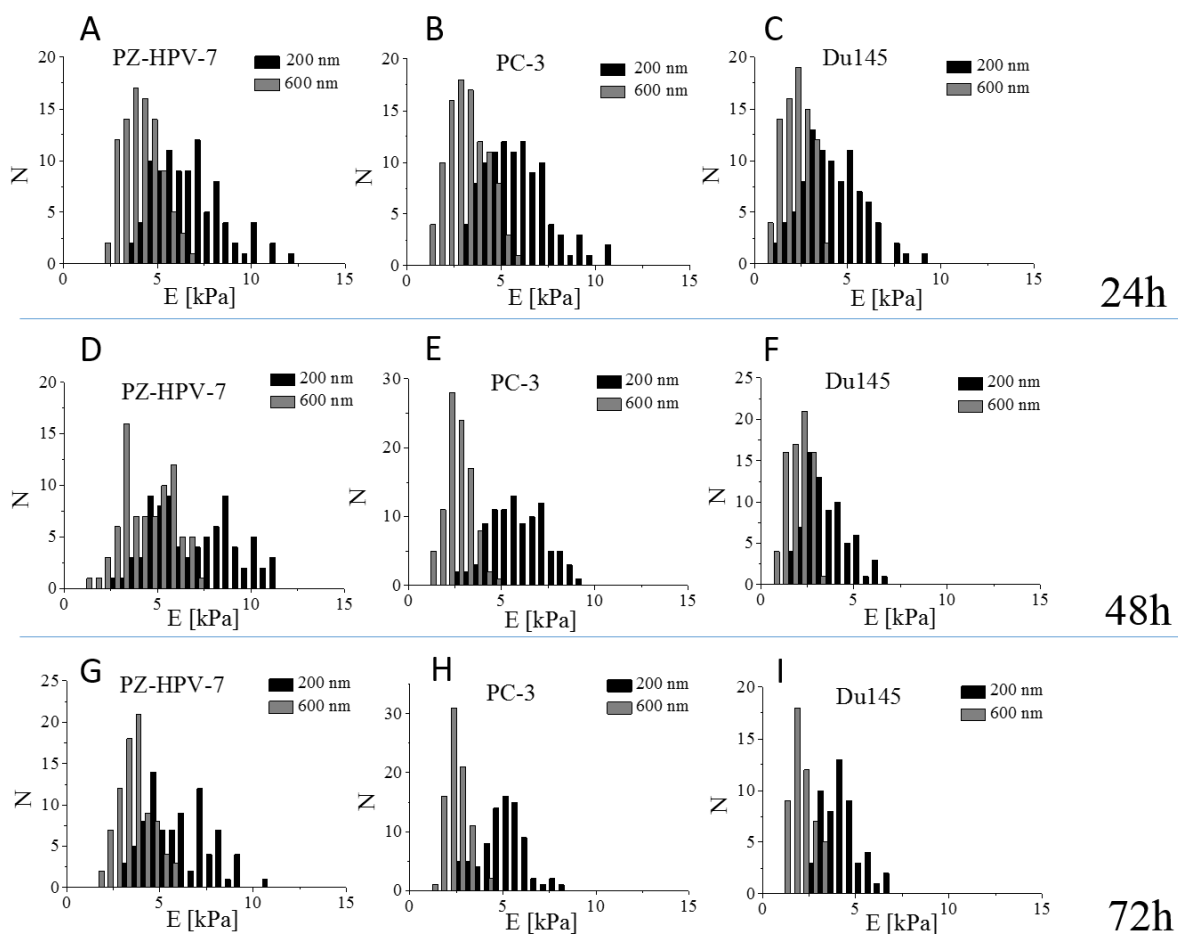
eksperymentalnego jest też dla powyższych linii komórkowych wartość kurtozy, z dużym odstępstwem w przypadku inwazyjnej linii PC-3, której ujemna wartość kurtozy oznacza silne spłaszczenie rozkładu sferyczności (Rys. 4G, 4H, 4I).

### 3.3.2 Elastyczność komórek prostaty rosnących na szkle

Pomiary elastyczności komórek prostaty rosnących na szkle zostały przeprowadzone w trzech punktach czasowych: po 24 h, 48 h i 72 h od rozpoczęcia hodowli. Miały one na celu ocenę organizacji cytoszkieletu komórkowego w zależności od (i) typu badanych komórek, tj. prawidłowe i nowotworowe, (ii) głębokości nacisku próbkującej sondy AFM, (iii) czasu wzrostu komórek. Struktura cytoszkieletu aktynowego w żywych komórkach PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 może zostać zwizualizowana przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej (Rys. 3). Pomimo wysokiej rozdzielczości w płaszczyźnie próbki, uzyskany obraz fluorescencyjny nie pozwala na ocenę przestrzennej organizacji cytoszkieletu. Badając stopień ugięcia cytoszkieletu w odpowiedzi na przyłożoną zewnętrzną siłę można w sposób pośredni otrzymać informację na temat jego wytrzymałości i usieciowania. Ponadto, moduł Younga odzwierciedlający własności elastyczne badanego materiału, może zostać wyznaczony dla różnych głębokości indentacji. Pozwoli to na ocenę zmian organizacji cytoszkieletu w różnych jego warstwach, począwszy od filamentów znajdujących się tuż pod błoną komórkową (na głębokości około 100 nm), aż po obszary zlokalizowane na głębokości kilkuset nanometrów.

W niniejszej pracy własności elastyczne komórek zostały wyznaczone dla głębokości indentacji z zakresu od 100 nm do 600 nm. Założenie początkowego punktu analizy na głębokości 100 nm jest związane z faktem, że dla mniejszych wartości wyznaczenie punktu kontaktu sondy AFM z powierzchnią komórki jest obarczone dużym błędem. Maksymalna głębokość indentacji 600 nm jest podyktowana ograniczeniem siły, jaką można zastosować podczas rejestracji krzywych siła–odległość przy użyciu ostrzy OTR4, z powodu ich niewielkiej stałej sprężystości ( $k = 0.02 \text{ N/m}$ ).

Rysunek 6 przedstawia rozkłady wyznaczonych wartości modułu Younga otrzymane dla dwóch różnych głębokości próbkowania – 200 nm i 600 nm, dla komórek rosnących przez 24 h, 48 h i 72 h od momentu wysiania. Oś rzędnych przedstawia wartości modułu Younga ( $E$ ), natomiast oś odciętych liczbę zmierzonych komórek ( $N$ ).

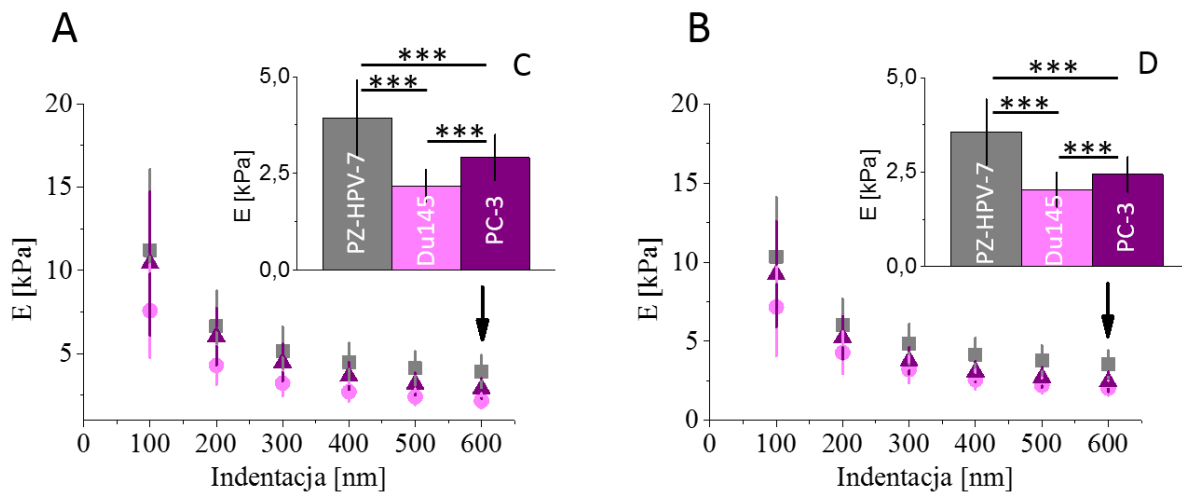


Rysunek 6. Rozkłady wartości modułu Younga dla linii komórkowych PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 dla niewielkiej głębokości indentacji 200 nm oraz dla dużej głębokości indentacji 600 nm. Wykresy A, B, C przedstawiają komórki po 24 h hodowli, D, E, F – po 48 h hodowli, a G, H, I po 72 h hodowli.

W przypadku niewielkiej wartości głębokości indentacji jaką jest 200 nm, odpowiedź mechaniczna komórki jest związana głównie z powierzchniową warstwą cytoszkieletu aktynowego, zakotwiczonego w błonie komórkowej. Dla głębokości 600 nm odpowiedź mechaniczna komórki będzie pochodziła z głębszych warstw cytoszkieletu. Dodatkowo pole kontaktu powierzchni z ostrzem AFM na głębokości indentacji 200 nm jest znacząco mniejsze niż dla głębokości 600 nm. Oznacza to, że mniejsze głębokości indentacji będą źródłem odpowiedzi pochodzącej z mniejszej objętości komórki.

Próbkowanie własności elastycznych komórek na głębokości 200 nm pozwala na uwypuklenie lokalnych niejednorodności cytoszkieletu, czego przejawem są szerokie rozkłady wartości modułu Younga na Rysunku 6 (kolor czarny). Wraz ze wzrostem indentacji obserwowane jest znaczące zwężenie rozkładów oraz przesunięcie środka ciężkości w stronę

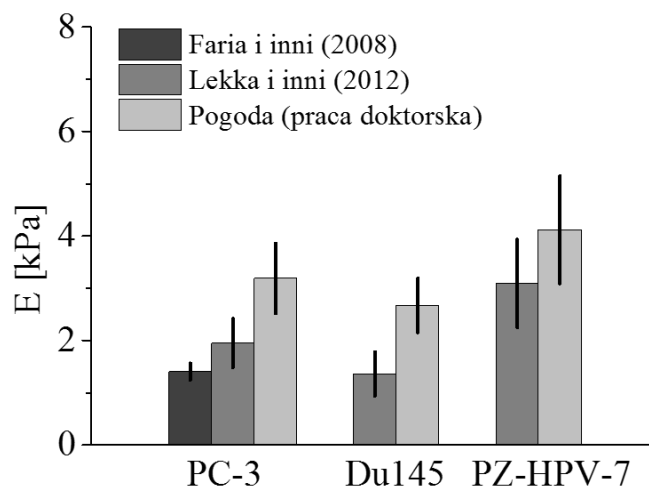
niższych wartości (kolor szary). Oznacza to, że zwiększenie głębokości nacisku sondy AFM uniemożliwia zobrazowanie subtelnych niejednorodności i odzwierciedla uśrednioną podpowierzchnię cytoszkieletu związaną ze zwiększeniem się pola kontaktu ostrza AFM z powierzchnią próbki.



Rysunek 7. Zależność modułu Younga w funkcji głębokości indentacji dla komórek linii PZ-HPV-7 (kwadraty), Du145 (koła) i PC-3 (trójkąty) po 24 h (A), oraz 72 h hodowli (B). (C, D) relacje wartości modułu Younga dla linii PZ-HPV-7, Du145 oraz PC-3 wyznaczone na maksymalnej głębokości indentacji 600 nm po 24 h (C), oraz 72 h hodowli (D). Istotność statystyczna  $***P < 0.001$  została potwierdzona przy użyciu *t*-testu Studenta.

Rysunek 7 przedstawia wartości modułu Younga wyznaczone dla trzech badanych linii komórkowych prostaty po 24 h i 72 h od rozpoczęcia hodowli komórkowej. Wartość modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7 wynosi  $3.93 \pm 0.98$ , dla komórek linii Du145  $2.18 \pm 0.41$ , a dla komórek linii PC-3  $2.91 \pm 0.59$  po 24 h od posiewu. Wartości te nie ulegają znaczącej zmianie w przypadku, gdy komórki hodowane są przez 72 h. Wyznaczone średnie wartości modułu Younga wynoszą wtedy  $3.56 \pm 0.87$ ,  $2.04 \pm 0.46$  i  $2.44 \pm 0.46$  odpowiednio dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3. Relacja modułów Younga komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 wyznaczonych na głębokości indentacji 600 nm przyjmuje następującą postać:  $E_{PZ-HPV-7} > E_{PC-3} > E_{Du145}$  i nie ulega zmianie w kolejnych dniach wzrostu komórek.

Niniejsza praca nie jest pierwszą próbą poszukiwania korelacji pomiędzy własnościami mechanicznymi komórek raka prostaty o różnym potencjale metastatycznym hodowanych na szkle. Opublikowana w roku 2008 praca autorstwa Farii i wsp., pokazała różnice w wartościach modułu Younga mierzonych przy użyciu mikroskopu sił atomowych [40].



Rysunek 8. Porównanie wartości modułu Younga wyznaczonych w niniejszej pracy z wartościami literaturowymi.

Kolejna praca autorstwa Lekka i wsp., jest przykładem wnikliwej analizy własności mechanicznych komórek wyizolowanych z pięciu różnych typów nowotworów w tym nowotworu prostaty [41]. Prezentowane w literaturze wartości modułu elastyczności uzyskane dla tego samego typu komórek różnią się między sobą (Rys. 8). Potencjalnymi źródłami obserwowanych różnic mogą być: (i) inne metody kalibracji sond pomiarowych, (ii) różna geometria ostrzy użytych do pomiaru, (iii) zmienna głębokość wyznaczenia wartości modułu Younga (w pracy Farii i wsp. 3000 nm, w pracy Lekka i wsp. 500 nm). Ponadto, powodem rozbieżności mogą być inne warunki prowadzenia hodowli komórkowej, skład pożywek hodowlanych oraz odczynników. Praca autorstwa Dochevy i wsp., przedstawia zmianę wartości modułu Younga oraz pola powierzchni komórek raka prostaty w zależności od białka (kolagen I lub fibronektyna), którym pokryte zostały szkiełka nakrywkowe użyte do hodowli [42]. Rosnące na szkiełkach pokrytych kolagenem I komórki PC-3 mają wartość modułu Younga równą  $\sim 4.3$  kPa, natomiast komórki rosnące na szkle pokrytym fibronektyną  $\sim 3.2$  kPa.

Cytoszkielek komórkowy jest zbudowany z elastycznych filamentów o różnej długości i grubości, a zgodnie z modelem tensegralnym odpowiada za utrzymanie napięcia w strefie korowej komórki [43]. Wyznaczając elastyczność cytoszkieletu komórkowego w zakresie kilkuset nanometrów od błony komórkowej, możemy założyć, że cytoszkielek aktynowy jest główną składową odpowiedzialną za reakcję mechaniczną komórki [44], [45]. Obserwowane na Rysunku 7 zmiany wartości modułu Younga towarzyszące wzrostowi indentacji od 100 nm

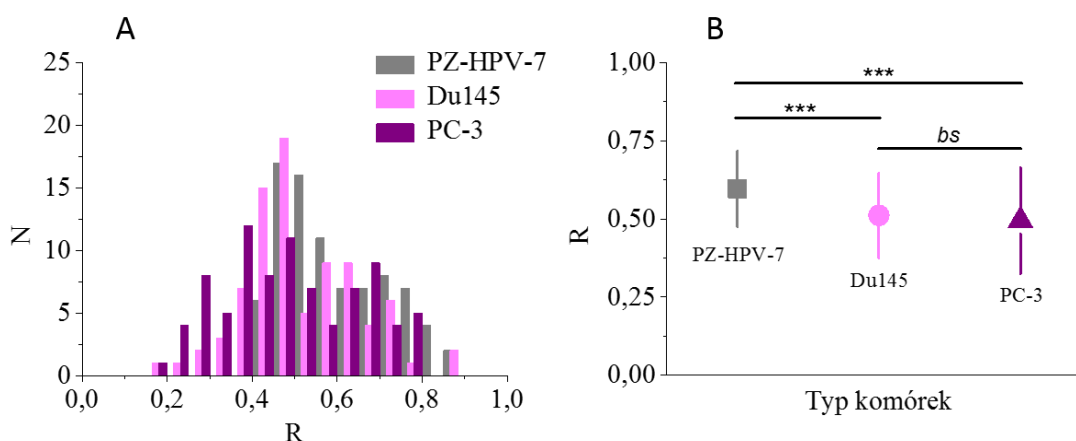


do 600 nm wynikają ze zmiany organizacji cytoszkieletu w różnych warstwach komórki oraz ze zwiększenia się pola kontaktu ostrza AFM z powierzchnią komórki.

Zależna od głębokości indentacji różnica w odpowiedzi mechanicznej komórek została zaobserwowana dla fibroblastów, erytrocytów oraz komórek pęcherza moczowego [45], [46]. W celu ilościowego oszacowania wielkości obserwowanych zmian został wykorzystany parametr  $R$ , zdefiniowany jako stosunek wartości modułu Younga dla małej i dużej wartości indentacji. W przypadku komórek prostaty wybrano dwie wartości – 200 nm i 600 nm<sup>9</sup>.

$$R = \frac{E_{200}}{E_{600}} \quad (14)$$

Takie podejście pozwala na uniezależnienie się od wartości początkowej modułu wyznaczonej dla niewielkiej indentacji, która zwykle jest obciążona dużym błędem. Ponadto umożliwia uwidocznienie różnic w niejednorodności struktury cytoszkieletu w gradiencie głębokości.



Rysunek 9. (A) Rozkład wartości parametru  $R$  dla trzech linii komórkowych PZ-HPV-7, Du145, PC-3. (B) Wartość średnia parametru  $R$  oraz jej odchylenie standardowe dla badanych typów komórek wynosi odpowiednio:  $0.60 \pm 0.12$  dla PZ-HPV-7,  $0.51 \pm 0.13$  dla Du145 oraz  $0.48 \pm 0.17$  dla PC-3. Oznaczenie istotności statystycznej: \*\*\* $P < 0.001$ , bs – brak różnic istotnych statystycznie.

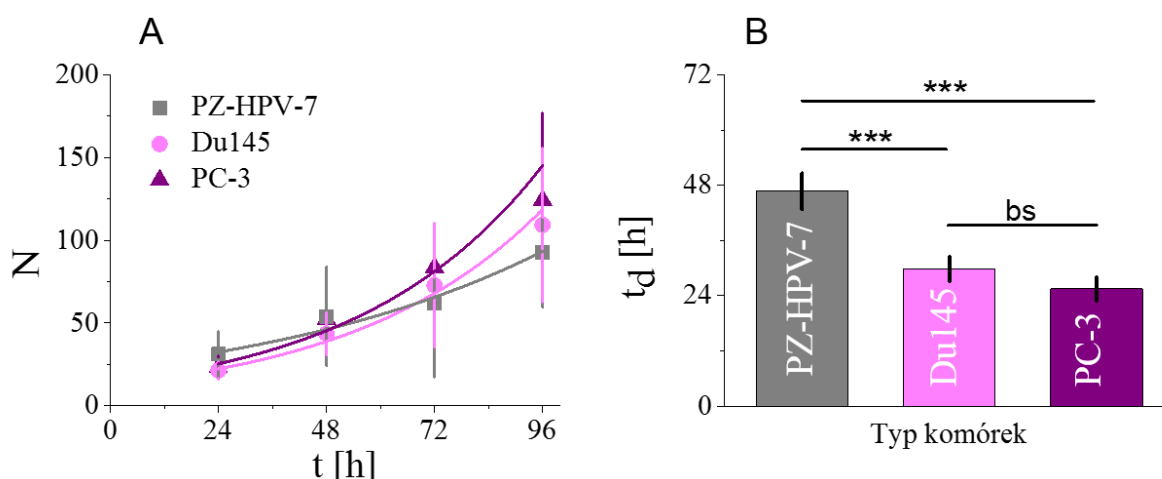
Widoczne na Rysunku 9B wartości parametru  $R$  świadczą o większej przestrzennej jednorodności cytoszkieletu komórek linii prawidłowej PZ-HPV-7 w porównaniu z komórkami pochodzącymi z przerzutu do mózgu (Du145) oraz kości (PC-3). Wartość parametru  $R$  dla

<sup>9</sup> Parametr  $R$  został po raz pierwszy wprowadzony w pracy magisterskiej K. Pogody „Własności reologiczne cytoszkieletu aktynowego w żywych komórkach” (WBBiB UJ, 2010). Wyniki pracy magisterskiej zostały opublikowane w pracy Pogoda i wsp. "Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data." *European Biophysics Journal* 41.1 (2012): 79-87.

komórek prawidłowych wynosi  $0.60 \pm 0.12$ , a dla komórek z przerzutu raka prostaty do mózgu i kości odpowiednio  $0.51 \pm 0.13$  i  $0.48 \pm 0.17$ .

### 3.3.3 Czas podwojenia populacji komórek prostaty rosnących na szkle

Tempo podziału komórkowego jest istotnym parametrem w kontekście badań nad nowotworami. Wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 było możliwe dzięki rejestracji obrazów fluorescencyjnych jąder komórkowych w czterech punktach czasowych: po 24 h, 48 h, 72 h i 96 h od rozpoczęcia hodowli. Zliczanie komórek odbywało się manualnie. Średnia liczba komórek została odłożona na osi rzędnych w funkcji czasu trwania hodowli komórkowej. Dopasowanie funkcji eksponencjalnej opisanej w paragrafie 3.2.6 umożliwiło wyznaczenie czasu podwojenia populacji.



Rysunek 10. Wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek na podstawie zdjęć fluorescencyjnych rejestrowanych w czterech kolejnych punktach czasowych. (A) Dopasowanie równania (6) do wyznaczonej eksperymentalnie średniej liczby komórek. (B) Czas podwojenia dla komórek linii prawidłowej PZ-HPV-7 jest najdłuższy i wynosi  $46.7 \pm 3.9$  [h], krótszy dla komórek Du145  $29.8 \pm 2.6$  [h], i najkrótszy dla komórek PC-3  $25.5 \pm 2.5$  [h]. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę ( $***P < 0.001$ ) pomiędzy czasem podwojenia populacji komórek linii prawidłowej, a liniami nowotworowymi oraz brak istotnej statystycznie różnicy (bs) pomiędzy linią komórek PC-3, a linią Du145<sup>10</sup>.

Zgodnie z tendencją obserwowaną powszechnie w literaturze, czas podwojenia komórek pochodzących z wtórnych ognisk nowotworowych jest krótszy niż dla komórek prawidłowych. Czas podwojenia populacji komórek linii Du145 i PC-3 jest w granicy błędu

<sup>10</sup> Graniczny poziom istotności wyniósł  $P = 0.1079$ .

eksperymentalnego nierozróżnialny i wynosi odpowiednio  $29.8 \pm 2.6$  i  $25.5 \pm 2.5$ . Komórki prawidłowe PZ-HPV-7 potrzebują  $46.7 \pm 3.9$  h na podwojenie swojej liczby w populacji (Rys. 10).

### 3.4 Wnioski

W niniejszym rozdziale przedstawiona została charakterystyka własności mechanicznych trzech linii komórkowych, stanowiących układ modelowy do badań raka prostaty – referencyjna linia PZ-HPV-7, pochodząca z przerzutu raka prostaty do mózgu Du145 oraz wywodząca się z przerzutu do kości PC-3. We wszystkich zaprezentowanych eksperymentach hodowle komórkowe prowadzone były w sposób konwencjonalny z użyciem szkiełek nakrywkowych jako substratów hodowlanych. Populacja komórek linii PZ-HPV-7 cechuje się jednorodną morfologią, najwolniejszym wzrostem oraz najwyższą wartością modułu Younga. Zarówno obrazy fluorescencyjne jak i pomiary wykonane przy użyciu mikroskopu sił atomowych potwierdzają wysoki stopień organizacji cytoszkieletu aktynowego tej linii w porównaniu z liniami raka prostaty posiadającymi zdolność do metastazy.

Otrzymane wyniki można podsumować następująco:

- i.* Stwierdzono, że komórki linii PZ-HPV-7 charakteryzują się największym polem powierzchni w porównaniu z komórkami linii Du145 oraz PC-3. Zmniejszenie pola powierzchni komórek rakowych jest obserwowane również w innych typach nowotworów.
- ii.* Przebadane linie wykazują kształt zbliżony do komórek pochodzenia nabłonkowego, ale dla komórek rakowych widoczne są preferencje, wynikające z kierunku metastazy – komórki linii Du145 są bardziej sferyczne, a komórki linii PC-3 bardziej wydłużone.
- iii.* W oparciu o analizę kształtu komórek stwierdzono, że największa niejednorodność populacji występuje dla komórek linii PC-3 o najwyższym stopniu agresji.
- iv.* Analiza własności mechanicznych komórek prostaty potwierdza obserwowane wcześniej relacje w ich elastyczności, tj.  $E_{PZ-HPV-7} < E_{PC-3} < E_{Du145}$ . Efekt ten utrzymuje się w kolejnych dniach trwania hodowli komórkowej.
- v.* Przeprowadzenie pomiarów elastyczności w funkcji głębokości ugięcia cytoszkieletu aktynowego pozwoliło na uzyskanie informacji na temat jego niejednorodności w kolejnych warstwach poniżej błony komórkowej. Wyznaczony parametr  $R$  pokazuje, że cytoszkielet komórek prawidłowych PZ-HPV-7 cechuje większa przestrzenna

jednorodność niż komórek pochodzących z przerzutów raka prostaty do mózgu (Du145) i kości (PC-3).

- vi. Tempo podziału komórek jest charakterystyczne dla każdej z badanych linii komórkowych, przy czym komórki rakowe dzielą się znacznie szybciej niż komórki prawidłowe.

### 3.5 Literatura.

- [1] S. Stokłosa, *Hodowla komórek i tkanek*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2011.
- [2] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Aksten, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein, "Molecular portraits of human breast tumours.," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–52, Aug. 2000.
- [3] C. R. Leemans, B. J. M. Braakhuis, and R. H. Brakenhoff, "The molecular biology of head and neck cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 9–22, Jan. 2011.
- [4] S. A. Fuhrman, L. C. Lasky, and C. Limas, "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma.," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 6, no. 7, pp. 655–63, Oct. 1982.
- [5] A. I. Baba and C. Câtoi, "Tumor Cell Morphology." The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- [6] A. Ben-Ze'ev, "Animal cell shape changes and gene expression.," *Bioessays*, vol. 13, no. 5, pp. 207–12, May 1991.
- [7] R. Singhvi, A. Kumar, G. Lopez, G. Stephanopoulos, D. Wang, G. Whitesides, and D. Ingber, "Engineering cell shape and function," *Science (80-. )*, vol. 264, no. 5159, pp. 696–698, Apr. 1994.
- [8] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 483–495, Apr. 2004.
- [9] C. S. Chen, "Geometric Control of Cell Life and Death," *Science (80-. )*, vol. 276, no. 5317, pp. 1425–1428, May 1997.
- [10] D. E. Ingber, "Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, no. 9, pp. 3579–3583, May 1990.
- [11] N. Wang and D. E. Ingber, "Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension.," *Biophys. J.*, vol. 66, no. 6, pp. 2181–9, Jun. 1994.

- [12] S. Huang and D. E. Ingber, "Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks.," *Exp. Cell Res.*, vol. 261, no. 1, pp. 91–103, Nov. 2000.
- [13] J. Sims, S. Karp, and D. Ingber, "Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape," *J. Cell Sci.*, vol. 103, no. 4, pp. 1215–1222, Dec. 1992.
- [14] T. D. Pollard and J. A. Cooper, "Actin, a central player in cell shape and movement.," *Science*, vol. 326, no. 5957, pp. 1208–12, Nov. 2009.
- [15] T. Stossel, "On the crawling of animal cells," *Science (80-. )*, vol. 260, no. 5111, pp. 1086–1094, May 1993.
- [16] D. A. Lauffenburger and A. F. Horwitz, "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process," *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 359–369, Feb. 1996.
- [17] Y.-W. Heng and C.-G. Koh, "Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, no. 10, pp. 1622–33, Oct. 2010.
- [18] M. A. Jordan and L. Wilson, "Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 123–130, Feb. 1998.
- [19] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, "Cell mechanics and the cytoskeleton," *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 485–492, Jan. 2010.
- [20] K. E. Kasza, A. C. Rowat, J. Liu, T. E. Angelini, C. P. Brangwynne, G. H. Koenderink, and D. A. Weitz, "The cell as a material.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 101–7, Feb. 2007.
- [21] S. Suresh, "Biomechanics and biophysics of cancer cells," *Acta Mater.*, vol. 55, no. 12, pp. 3989–4014, Jul. 2007.
- [22] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, and A. Z. Hryniewicz, "Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy," *Eur. Biophys. J.*, vol. 28, no. 4, pp. 312–316, May 1999.
- [23] Q. S. Li, G. Y. H. Lee, C. N. Ong, and C. T. Lim, "AFM indentation study of breast cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 374, no. 4, pp. 609–13, Oct. 2008.
- [24] M. Lekka and P. Laidler, "Applicability of AFM in cancer detection.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 2, p. 72; author reply 72–3, Feb. 2009.
- [25] M. M. Webber, S. T. Quader, H. K. Kleinman, D. Bello-DeOcampo, P. D. Storto, G. Bice, W. DeMendonca-Calaca, and D. E. Williams, "Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression.," *Prostate*, vol. 47, no. 1, pp. 1–13, Apr. 2001.
- [26] P. J. Russell and E. A. Kingsley, "Human prostate cancer cell lines.," *Methods Mol. Med.*, vol. 81, pp. 21–39, Jan. 2003.

- [27] A. van Bokhoven, M. Varella-Garcia, C. Korch, W. U. Johannes, E. E. Smith, H. L. Miller, S. K. Nordeen, G. J. Miller, and M. S. Lucia, "Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines.," *Prostate*, vol. 57, no. 3, pp. 205–25, Nov. 2003.
- [28] P. C. Weijerman, J. J. König, S. T. Wong, H. G. Niesters, and D. M. Peehl, "Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 21, pp. 5579–83, Nov. 1994.
- [29] K. R. Stone, D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey, and D. F. Paulson, "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).," *Int. J. Cancer*, vol. 21, no. 3, pp. 274–81, Mar. 1978.
- [30] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, and L. W. Jones, "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).," *Invest. Urol.*, vol. 17, no. 1, pp. 16–23, Jul. 1979.
- [31] L. Liu, B. Sun, J. N. Pedersen, K.-M. Aw Yong, R. H. Getzenberg, H. A. Stone, and R. H. Austin, "Probing the invasiveness of prostate cancer cells in a 3D microfabricated landscape.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 17, pp. 6853–6, Apr. 2011.
- [32] "Microscopy Resource Center." [Online]. Available: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>.
- [33] J. H. Lee and K. J. McLeod, "Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields.," *Bioelectromagnetics*, vol. 21, no. 2, pp. 129–36, Feb. 2000.
- [34] H. Yu, K. P. Lim, S. Xiong, L. P. Tan, and W. Shim, "Functional morphometric analysis in cellular behaviors: shape and size matter.," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, no. 9, pp. 1188–97, Sep. 2013.
- [35] D. Maret, E. Gruzglin, M. S. Sadr, V. Siu, W. Shan, A. W. Koch, N. G. Seidah, R. F. Del Maestro, and D. R. Colman, "Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion.," *Neoplasia*, vol. 12, no. 12, pp. 1066–80, Dec. 2010.
- [36] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment.," *Dev. Cell*, vol. 6, pp. 483–495, 2004.
- [37] M. J. Paszek, N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver, "Tensional homeostasis and the malignant phenotype.," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 3, pp. 241–54, Sep. 2005.
- [38] J. Gostek, S. Prauzner-Bechcicki, B. Nimmervoll, K. Mayr, J. Pabijan, P. Hinterdorfer, L. A. Chtcheglova, and M. Lekka, "Nano-characterization of two closely related melanoma cell lines with different metastatic potential.," *Eur. Biophys. J.*, vol. 44, no. 1–2, pp. 49–55, Feb. 2015.

- [39] A. Hunter, C. W. Archer, P. S. Walker, and G. W. Blunn, "Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use," *Biomaterials*, vol. 16, no. 4, pp. 287–295, Mar. 1995.
- [40] E. C. Faria, N. Ma, E. Gazi, P. Gardner, M. Brown, N. W. Clarke, and R. D. Snook, "Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM.," *Analyst*, vol. 133, no. 11, pp. 1498–500, Nov. 2008.
- [41] M. Lekka, K. Pogoda, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, J. Wiltowska-Zuber, J. Jaczewska, J. Lekki, and Z. Stachura, "Cancer cell recognition - Mechanical phenotype," *Micron*, vol. 43, no. 12, pp. 1259–1266, 2012.
- [42] D. Docheva, D. Padula, M. Schieker, and H. Clausen-Schaumann, "Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 402, no. 2, pp. 361–6, Nov. 2010.
- [43] N. Wang, K. Naruse, D. Stamenović, J. J. Fredberg, S. M. Mijailovich, I. M. Tolić-Nørrelykke, T. Polte, R. Mannix, and D. E. Ingber, "Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 14, pp. 7765–70, Jul. 2001.
- [44] C. Rotsch and M. Radmacher, "Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study.," *Biophys. J.*, vol. 78, no. 1, pp. 520–35, Jan. 2000.
- [45] K. Pogoda, J. Jaczewska, J. Wiltowska-Zuber, O. Klymenko, K. Zuber, M. Fornal, and M. Lekka, "Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data," *Eur. Biophys. J.*, vol. 41, pp. 79–87, 2012.
- [46] J. R. Ramos, J. Pabijan, R. Garcia, and M. Lekka, "The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process.," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 447–57, Jan. 2014.

## Rozdział 4 – Elastyczność komórek prostaty rosnących na podłożach o różnej sztywności

### 4.1 Wstęp

Dotychczasowe badania prowadzone *in vitro* wykazały, że aktywność fizjologiczna komórek może być modulowana pod wpływem zewnętrznych sił działających w ich otoczeniu z udziałem białkowych receptorów powierzchniowych zwanych *integrynami* [1]–[3]. Przekaz (czyli transmisja) sił zewnętrznych, może zostać wywołany poprzez zmianę sztywności otoczenia komórki [4], [5]. Pierwsze doniesienia literaturowe na temat reakcji komórek na zmianę własności mechanicznych otoczenia dotyczyły morfologii komórek prawidłowych, takich jak fibroblasty i komórki macierzyste. Jednym z podstawowych parametrów opisujących morfologię pojedynczej komórki jest pole powierzchni. Zmiany pola powierzchni komórek przylegających do podłoża o różnej sztywności zostały zaobserwowane dla wielu ich typów, zarówno pochodzenia nabłonkowego, mezenchymalnego jak i nerwowego [6]–[8]. Warto podkreślić, że tempo podziału komórkowego jest parametrem wrażliwym na zmiany sztywności otoczenia komórki [9], [10]. Ponadto, obserwuje się istotne modyfikacje w charakterze oraz tempie migracji komórek [11], [12]. Zmiany własności mechanicznych podłoża hodowlanego wpływają również na różnicowanie się komórek macierzystych, co oznacza, że transmisja bodźców mechanicznych z otoczenia komórki do jej wnętrza ma wpływ na procesy zachodzące podczas wczesnego rozwoju zarodkowego [13]–[15]. Zmiana struktury wewnętrznej komórki w odpowiedzi na sztywność otoczenia (w wyniku której obserwowane są zmiany pola powierzchni i kształtu komórek), może zostać opisana w sposób jakościowy dzięki pomiarom własności elastycznych komórek [16]–[20]. Moduł Younga, będący miarą elastyczności komórek odzwierciedla zmiany zachodzące w organizacji ich wnętrza – głównie cytoszkieletu komórkowego [21]. Reorganizacja cytoszkieletu komórkowego jest procesem dynamicznym, zachodzącym w sposób ciągły w odpowiedzi na bodźce mechaniczne docierające do komórki z zewnątrz oraz generowane w jej wnętrzu [22]–[24]. Prawidłowa percepcja, przetworzenie, a następnie reakcja na te czynniki są podstawą prawidłowego funkcjonowania komórek i narządów [3], [25], [26]. Konsekwencją niewłaściwej odpowiedzi



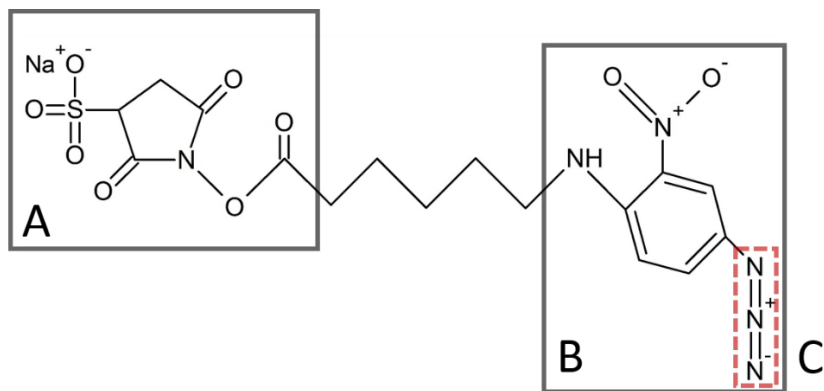
na bodźce mechaniczne mogą być zmiany patologiczne zachodzące w obrębie komórki, następnie tkanki, a ostatecznie całego organizmu [27], [28].

Wyniki zawarte w poniższym rozdziale przedstawiają zmiany własności elastycznych pojedynczych komórek rosnących na podłożach o różnej sztywności. Pomiary zostały przeprowadzone dla trzech linii komórkowych prostaty tj. jednej linii komórek prawidłowych (PZ-HPV-7) oraz dwóch rakowych pochodzących z przerzutów do mózgu (Du145) i kości (PC-3). Zmiany morfologii, tempa podziału i własności elastycznych komórek zostały ilościowo opisane za pomocą takich parametrów jak pole powierzchni pojedynczej komórki (odzwierciedlające morfologię pojedynczej komórki), czas podwojenia populacji komórek (związany ze zdolnością komórek do podziału) oraz moduł Younga (opisujący własności mechaniczne komórek). Parametry te zostały wprowadzone i dokładnie opisane w *Rozdziale 3* zawierającym wyniki uzyskane dla komórek rosnących na podłożu twardym, którym była powierzchnia szkła (o module elastyczności  $\sim 70$  GPa). Podłoża o sztywności od 0.4 kPa do 41 kPa, odzwierciedlającej sztywność tkanek tworzących ludzki organizm wykonano z żeli poliakrylamidowych (ich produkcja została opisana w *Rozdziale 2*). Podłoża poliakrylamidowe pokryto fibronektyną – białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwiającym adhezję komórek do podłoża.

## 4.2 Materiały i metody

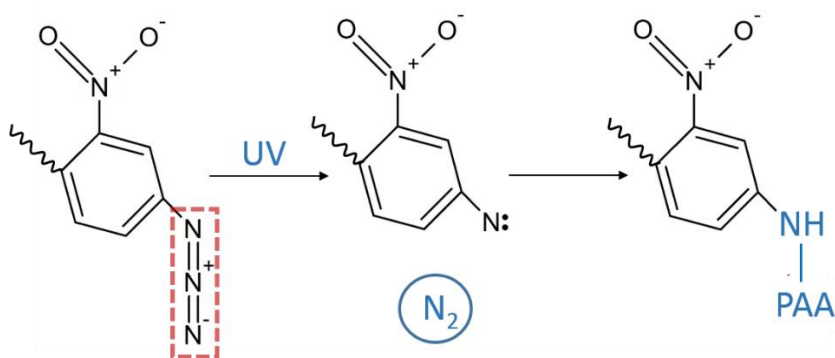
### 4.2.1 Sieciowanie powierzchni podłoży poliakrylamidowych

Powierzchnia czystego żelu poliakrylamidowego nie wykazuje zdolności do adsorpcji białek, skutkiem czego komórki, które podczas wzrostu przylegają do podłoża nie mogą wytworzyć stabilnych miejsc kontaktu na powierzchni żelu [29]. Aby umożliwić przyleganie oraz wzrost komórek na podłożach poliakrylamidowych konieczna jest chemiczna funkcjonalizacja ich powierzchni. W tym celu stosowany jest aktywowany światłem UV czynnik sieciujący, którym jest sulfosukcynimidyl-6-(4-azydo-2-nitrofenyloamino) heksanian, tzw. Sulfo-SANPAH. Jego struktura chemiczna jest przedstawiona na *Rysunku 1*.



Rysunek 1. Struktura chemiczna czynnika sieciującego Sulfo-SANPAH. (A) ester sulfo-N-hydroksybursztynoimidowy łączący się z pierwszorzędową grupą aminową białka oraz (B) pierścień azydku nitroaniliny łączący się z poliakrylamidem.

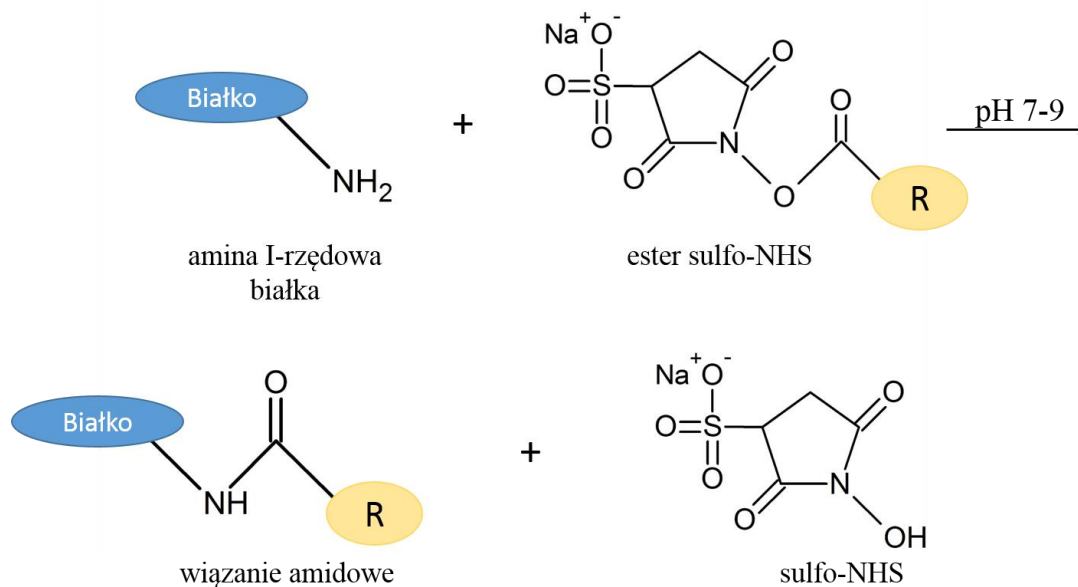
Sulfo-SANPAH posiada w swojej strukturze aktywny ester sulfo-N-hydroksybursztynoimidowy (w skrócie ester sulfo-NHS, Rys. 1A) oraz pierścień nitroaniliny (Rys. 1B) zawierający przyłączony anion azydkowy ( $N_3^-$ , Rys. 1C). Pod wpływem działania promieniowania UV grupa azydkowa przechodzi w nitren z wydzieleniem cząsteczkowego azotu ( $N_2$ ). Przyłączanie się związku Sulfo-SANPAH do powierzchni żeli poliakrylamidowych zachodzi dzięki reakcji nitrenu, będącego silnym nukleofilem, z atomami węgla poliakrylamidu (jak schematycznie pokazano na Rysunku 2). Optymalna fotoliza grupy azydkowej zachodzi dla promieniowania UV z zakresu 320 – 350 nm.



Rysunek 2. Pierścień nitroaniliny zawierający przyłączony fotoreaktywny anion azydkowy. W wyniku działania promieniowania UV grupa azydkowa przechodzi w nitren, który łączy się z atomami węgla poliakrylamidu. Reakcji towarzyszy wydzielenie cząsteczkowego azotu.

Drugi koniec cząsteczki czynnika sieciującego Sulfo-SANPAH zawiera grupę aktywnego estru sulfo-N-hydroksybursztynoimidowego. Estry sulfo-NHS reagują z pierwszorzędową grupą aminową białka (tzw. nukleofilami, w których występuje nadmiar elektronów zdolny do

utworzenia nowego wiązania) tworząc stabilne wiązanie amidowe z jednoczesnym uwolnieniem reszty sulfo-NHS (Rys. 3).



Rysunek 3. Ester sulfo-NHS reaguje z pierwszorzędową grupą aminową znajdującą się na powierzchni białka tworząc stabilne wiązanie amidowe z jednoczesnym uwolnieniem reszty sulfo-NHS. R oznacza resztę czynnika sieciującego połączoną z powierzchnią żelu poliakrylamidowego.

Prędkość hydrolizy oraz reaktywność grup aminowych wzrasta z podwyższeniem wartości pH, dlatego reakcja ta jest prowadzona w roztworach o pH mieszczącym się w zakresie 7–9.

W praktyce, powierzchnia żeli poliakrylamidowych jest sieciowana w następujący sposób. Roztwór czynnika sieciującego otrzymano poprzez rozpuszczenie 0.5 mg sulfo-SANPAH (Pierce) w 1  $\mu$ l DMSO (dimetylosulfotlenek, SIGMA). Powstały roztwór został dopełniony 1 mililitrem 80 mM buforu HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy, SIGMA) o pH równym 8.0. Na powierzchnię podłoża z żelu poliakrylamidowego nakrapiano 100  $\mu$ l roztworu sulfo-SANPAH, a następnie naświetlano przez 10 minut promieniowaniem UV o długości fali 365 nm umieszczając podłoża w odległości ok. 50 cm od źródła światła<sup>11</sup>. Po naświetleniu podłoża płukano trzykrotnie w 1 ml buforu HEPES w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek czynnika sieciującego.

<sup>11</sup> Lampa rtęciowa model UVLS-28 firmy UVP Upland o mocy 8 Wat (CA, USA).

#### 4.2.2 Immobilizacja fibronektyny na powierzchni podłoża poliakrylamidowych

Podłoża poliakrylamidowe z powierzchnią usieciowaną czynnikiem Sulfo-SANPAH inkubowano przez 2 h z 0.1 mg/ml roztworem fibronektyny (MP Biomedicals) rozpuszczonej w roztworze PBS (MP Biomedicals, pH = 7.4). Duże stężenie białka ma na celu wysycenie wszystkich cząsteczek czynnika sieciującego [30]. Po zakończeniu inkubacji z fibronektyną podłoża płukano trzykrotnie w 1 ml roztworu PBS w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek białka. Podłoża umieszczano w sterylnych 12–dołkowych płytkach do hodowli (Sarstedt) zanurzone w roztworze PBS na 12 h przed rozpoczęciem hodowli komórkowej.

#### 4.2.3 Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe linii prostaty tj. PZ-HPV-7, Du145 oraz PC-3 prowadzone były analogicznie do opisu przedstawionego w *Rozdziale 3*. Po namnożeniu w plastikowych butelkach hodowlanych (Sarstedt) połączenia komórek z podłożem trawiono w obecności trypsyny i uzyskaną zawiesinę komórek wysiewano na podłoża poliakrylamidowe pokryte fibronektyną (podłoża były uprzednio przepłukane medium hodowlanym). Zawiesina komórek zawierała około 30 000 komórek/ml medium. Hodowle komórkowe prowadzono przez cztery doby tj. od 24 h do 96 h po wysianiu. Analizę pola powierzchni i elastyczności komórek prowadzono przez trzy doby wzrostu komórek, a tempo podziału komórkowego wyznaczano w oparciu o czterodobową obserwację liczby komórek w kolejnych dniach hodowli.

#### 4.2.4 Ocena depozycji fibronektyny na powierzchni podłoża poliakrylamidowych

Jedną z pierwszych analiz przeprowadzonych w ramach badań niniejszego rozdziału było sprawdzenie w jaki sposób białko rozkłada się na powierzchni żelu poliakrylamidowego usieciowanego czynnikiem Sulfo-SANPAH. W tym celu wykorzystano fibronektynę znakowaną fluorescencyjnie barwnikiem Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Fibronektyna została

wyzolowana z osocza krwi rybiej, a następnie znakowana fluorescencyjnie<sup>12</sup>. Tak przygotowana fibronektyna była inkubowana na powierzchni usieciowanego żelu poliakrylamidowego.

Obrazy fluorescencyjne rejestrowano przy użyciu mikroskopu Leica DMIRE2 (Leica, IL, mikroskop znajduje się na Uniwersytecie w Pensylwanii, USA) wyposażonego w lampę rtęciową o mocy 100 W. Sygnał fluorescencyjny pochodzący z kompleksu fibronektyna-Alexa Fluor 488 był rejestrowany z wykorzystaniem filtra GFP ( $\lambda_{wzbudzenia} = 460 - 500$  nm,  $\lambda_{emisji} = 510$  nm), oraz obiektywu 100× z imersją olejową. Obrazy fluorescencyjne były rejestrowane przy pomocy cyfrowej kamery typu EM-CCD C9100 (512 px × 512 px, Hamamatsu, Japan), a analiza obrazów została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Leica FW4000.

#### 4.2.5 Znakowanie fluorescencyjne komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych

Komórki prostaty rosnące na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności znakowano fluorescencyjnie w analogiczny sposób jak komórki rosnące na powierzchni szkła (szczegółowy opis znajduje się w *Rozdziale 3*). Aby zobrazować pole powierzchni zajmowane przez pojedynczą komórkę, włókna aktynowe zostały wybarwione fluorescencyjnie barwnikiem falloidyna-Alexa Fluor 488. Obrazy fluorescencyjne rejestrowano przy użyciu mikroskopu optycznego IX 71 Olympus (znajdującego się w Pracowni Badań Mikroukładów Biofizycznych IFJ PAN w Krakowie) wyposażonego w filtr U-MWIG2 do rejestracji sygnału w zakresie światła zielonego oraz U-MNB2 do rejestracji sygnału w zakresie światła niebieskiego, obiektywy o powiększeniu 20×, 40×, 60×, 100× oraz kamerę cyfrową XC10 (Olympus, 1376 px × 1032 px). Analizę pola powierzchni komórek przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ImageJ. Obrazy fluorescencyjne komórek rejestrowano w trzech punktach czasowych tj. po 24 h, 48 h i 72 h. Każdorazowo rejestrowano minimum 10 obrazów fluorescencyjnych dla podłoża poliakrylamidowego o zadanej sztywności (0.4 kPa, 2.8 kPa, 9.3 kPa, 24 kPa, 32 kPa i 41 kPa) i dla każdej linii komórkowej.

---

<sup>12</sup> Izolacja fibronektyny oraz jej znakowanie fluorescencyjne została przeprowadzona w Instytucie Medycyny i Inżynierii znajdującym się na Uniwersytecie w Pensylwanii (USA) przez pracowników laboratorium prowadzonego przez prof. P. Jamney'a.

#### 4.2.6 Elastyczność komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych

Własności mechaniczne komórek prostaty rosnących na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności zostały zmierzone przy użyciu mikroskopu sił atomowych (Xe120, Park Systems, znajdujący się w Pracowni Badań Mikroukładów Biofizycznych IFJ PAN w Krakowie), analogicznie do sposobu opisanego szczegółowo w *Rozdziale 2 i 3*. Własności elastyczne komórek były mierzone z użyciem sond AFM typu OTR4 (Bruker) w trzech punktach czasowych po 24 h, 48 h i 72 h od rozpoczęcia hodowli. Pomiar realizowano poprzez rejestrację krzywych „siła – odległość” dla około 30 komórek, rejestrując na każdej komórce 36 krzywych w obszarze kwadratu o boku 5  $\mu\text{m}$ . Równoległe do pomiaru elastyczności komórek przeprowadzono pomiar sztywności podłoża poliakrylamidowego znajdującego się w odległości kilku mikrometrów od komórki. Dzięki temu można było sprawdzić czy prowadzenie kilkudniowej hodowli komórkowej może powodować zmiany sztywności podłoża poliakrylamidowych.

Własności elastyczne zostały wyznaczone w oparciu o własne oprogramowanie znajdujące się w Laboratorium Badań Mikroukładów Biofizycznych (programy Force i JJ) oraz program OriginLab 9.0.

#### 4.2.7 Czas podwojenia populacji komórek na podłożach poliakrylamidowych

Czas podwojenia populacji komórek prostaty został wyznaczony poprzez dopasowanie funkcji eksponencjalnej do punktów pomiarowych określających średnią liczbę komórek w kolejnych dniach hodowli komórkowej (procedura ta jest szczegółowo opisana w *Rozdziale 3*) prowadzonej na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności. Dopasowywana funkcja miała postać:

$$y(t) = y_0 e^{kt} \quad (1)$$

gdzie  $y_0$  oznacza liczbę komórek w czasie  $t_0$ ,  $k$  to stała wzrostu komórek, a  $t$  czas.

#### 4.2.8 Statystyka

Rozkłady wartości pola powierzchni pojedynczych komórek rosnących na podłożach o różnej sztywności dopasowano funkcją opisującą rozkład logarytmicznie normalny. Analizie poddano około 100 komórek dla każdej linii komórkowej (PZ-HPV-7, PC-3 i Du145) hodowanej na podłożu poliakrylamidowym o zadanej sztywności.

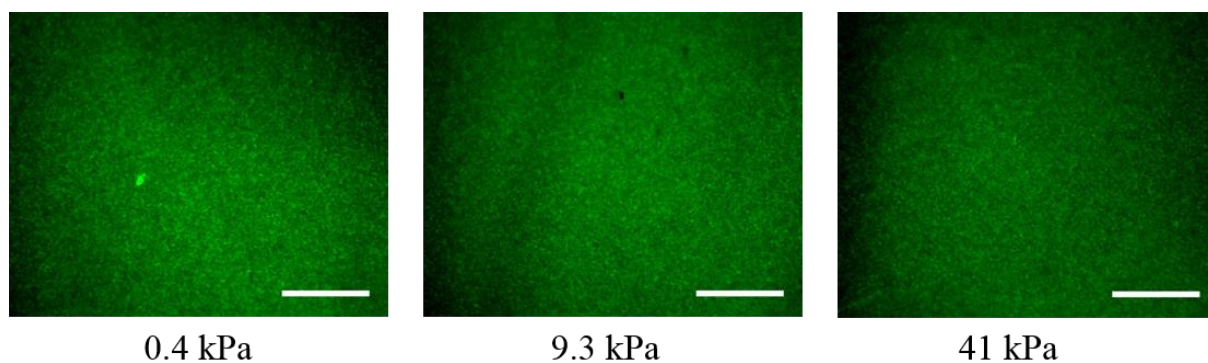
Wartości średnie modułu Younga oraz odchylenia standardowe wyznaczane były dla każdego typu komórek w trzech punktach czasowych (po 24 h, 48 h i 72 h od wysiania), hodowanych na podłożu poliakrylamidowym o zadanej sztywności. Moduł Younga był wyznaczony dla sześciu wartości ugięcia powierzchni komórki (indentacji) z zakresu od 100 nm do 600 nm. Każdorazowo badano ok. 90 komórek aby uzyskać jeden punkt pomiarowy. Dla każdego punktu pomiarowego wykonano trzy niezależne powtórzenia.

Istotność statystyczna różnic w uzyskanych wynikach była zweryfikowana przy użyciu testu t-Studenta dla zmiennych niepołączonych z zadaniem przedziałem ufności 95%. Oznaczenie istotności statystycznej stosowane w pracy: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, bs – brak różnic istotnych statystycznie.

### 4.3 Uzyskane wyniki

#### 4.3.1 Rozkład fibronektyny na powierzchni podłoży poliakrylamidowych

Celem sprawdzenia w jaki sposób fibronektyna jest rozłożona na usieciowanej czynniku Sulfo-SANPAH powierzchni żeli poliakrylamidowych o różnej sztywności zobrazowano fluorescencyjnie cząsteczki barwnika Alexa Fluor 488 związane z tym białkiem. Obrazy fluorescencyjne zarejestrowane dla trzech wybranych sztywności podłoży poliakrylamidowych nie pokazują znaczących różnic w rozkładzie białka (Rys. 4).



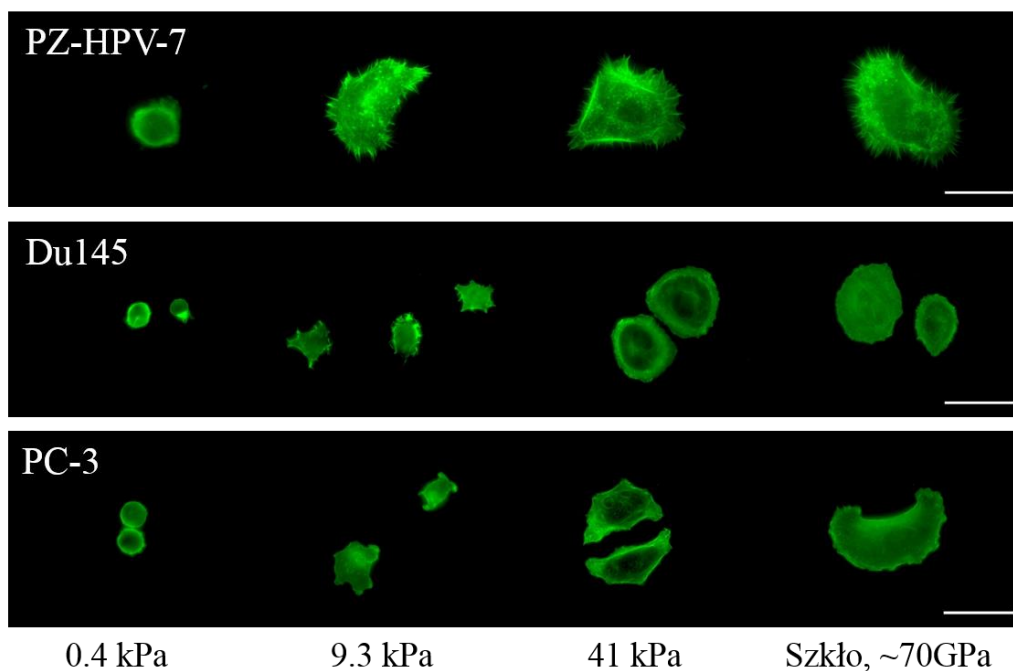
*Rysunek 4. Obrazy fluorescencyjne fibronektyny znakowanej barwnikiem Alexa Fluor 488, immobilizowanej na powierzchni usieciowanego czynnikiem Sulfo-SANPAH żelu poliakrylamidowego o sztywności 0.4 kPa, 9.3 kPa i 41 kPa (skala wynosi 30  $\mu$ m).*

Kontrola jednorodności rozkładu fibronektyny na powierzchni podłoża poliakrylamidowych ma na celu wykazanie, że zmiany w zachowaniu się komórek wynikają ze zmiennej sztywności ich otoczenia, a nie ilości białka dostępnego w procesie adhezji komórkowej.

#### 4.3.2 Morfologia komórek prostaty rosnących na podłożach poliakrylamidowych

Komórki prostaty, jako komórki pochodzenia nabłonkowego przylegają do podłoża, co warunkuje ich prawidłowe funkcjonowanie. W organizmie żywym, komórki przylegają do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz komórek sąsiadujących czemu towarzyszy przyjęcie przez nie specyficznego kształtu [2]. W zależności od struktury i lokalizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, jej moduł elastyczności waha się od kilkuset Pa dla mózgu i węzłów chłonnych, kilku kPa dla tkanki płuc, aż do kilkuset kPa dla miękkiej chrząstki [31]. Prowadzenie hodowli komórkowych na powierzchni szkła odbiega zatem znacznie od warunków fizjologicznych. Badanie procesu adaptacji komórki do otoczenia o różnej sztywności można rozpocząć od monitorowania zmian jej kształtu. Obrazy fluorescencyjne (cytoszkieletu aktynowego znakowanego falloidyną z barwnikiem Alexa Fluor 488) komórek badanych linii komórkowych prostaty hodowanych na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności są przedstawione na *Rysunku 5*.



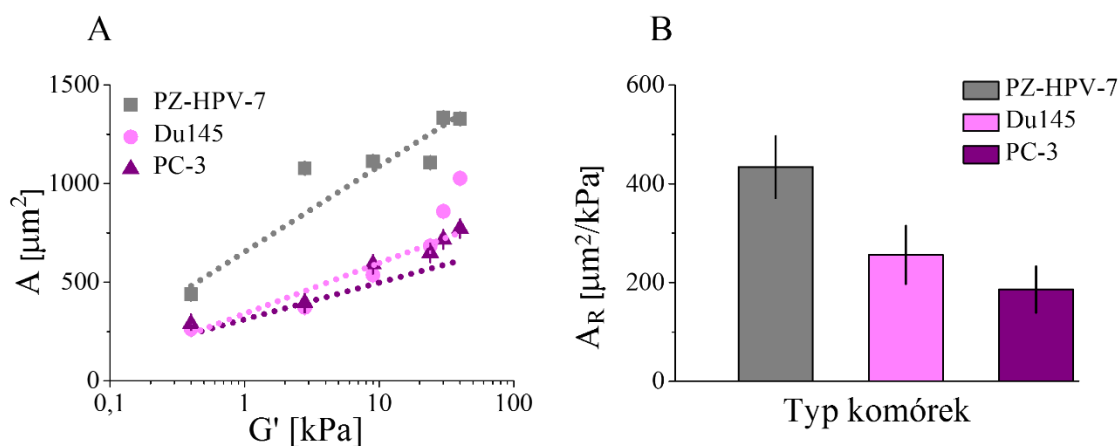


Rysunek 5. Obrazy fluorescencyjne cytoszkieletu aktynowego komórek linii prawidłowej prostaty PZ-HPV-7, oraz dwóch linii rakowych Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa, 9.3 kPa, 41 kPa oraz na szkle po 24 h hodowli (skala wynosi 30  $\mu\text{m}$ ).

Wszystkie trzy typy badanych komórek rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa pozostają nierozpłaszczone zachowując sferyczny kształt. Wzrost sztywności podłoża powoduje, że komórki coraz bardziej się rozplaszczają, co świadczy o tworzeniu się coraz większej ilości punktów kontaktu z podłożem. Konsekwencją tego zjawiska jest wzrost pola powierzchni pojedynczej komórki. Na podłożu poliakrylamidowym o sztywności 41 kPa komórki osiągają kształt zbliżony do komórek rosnących na twardej powierzchni szkła (o module  $\sim 70$  GPa), a ich pole powierzchni osiąga wartość zbliżoną do wartości obserwowanej dla komórek hodowanych na powierzchni szkła. Komórki prawidłowe prostaty (tj. linia PZ-HPV-7) rozplaszczają się na podłożach o mniejszej sztywności (9.3 kPa). Ich zachowanie jest odmienne w porównaniu z komórkami rakowymi obu badanych linii (PC-3 i Du145), które na powierzchni żelu poliakrylamidowego o sztywności 9.3 kPa pozostają nadal sferyczne, ale z widocznymi elementami wskazującymi na postępujący proces rozplaszczania się (obecność licznych wypustek). Największy wzrost pola powierzchni dla prawidłowych komórek PZ-HPV-7 odbywa się w zakresie sztywności od 0.4 kPa do 9.3 kPa. Efekt dynamicznego wzrostu komórek prawidłowych w tym zakresie został już opisany dla fibroblastów, dla których zaobserwowano trzykrotny wzrost pola powierzchni w zakresie sztywności od 2 kPa do 10 kPa [7]. Analogiczna obserwacja dotyczy aortalnych komórek

mięśni gładkich, dla których wzrost pola powierzchni jest najbardziej dynamiczny w zakresie sztywności od 1 kPa do 8 kPa [6]. Komórki rakowe Du145 (pochodzące z przerzutu do mózgu) oraz PC-3 (pochodzące z przerzutu do kości) ulegają rozplaszczeniu porównywalnemu do komórek hodowanych na powierzchni szkła tylko dla podłoży poliakrylamidowych o wyższych sztywnościach (32 kPa i 41 kPa). Taki charakter wzrostu pola powierzchni w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych pokrywanych fibronektyną został pokazany dla komórek czerniaka złośliwego [30].

Aby opisać tempo obserwowanych zmian pola powierzchni dla badanych komórek (PZ-HPV-7, Du145 i PC-3), do zależności pola powierzchni ( $A$ ) od logarytmu sztywności podłoży poliakrylamidowych ( $G'$ ) dopasowano funkcję liniową (Rys. 6A). Nachylenie dopasowanej prostej  $A_R$  (ang. *area rate*) mówi o szybkości zmian pola powierzchni komórek.



Rysunek 6. (A) Pole powierzchni komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych, wyrażonej jako moduł sprężystości  $G'$  24 h po wysianiu. (B) Nachylenie prostej  $A_R$  (wyznaczone poprzez dopasowanie funkcji liniowej do zależności na Rys. 6A) odzwierciedla szybkość zmian pola powierzchni komórek w funkcji sztywności podłoża.

Porównując szybkość zmiany pola powierzchni dla badanych linii komórkowych prostaty (Rys. 6B) można zauważyć, że po 24 h prowadzenia hodowli na zmianę sztywności otoczenia najszybciej reagują prawidłowe komórki prostaty (PZ-HPV-7), dla których nachylenie prostej  $A_R$  wynosi  $434 \pm 63 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.9$ ). Dla komórek linii Du145 (przerzut do mózgu) charakteryzującej się umiarkowaną inwazyjnością,  $A_R$  wynosi  $256 \pm 59 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.78$ ), a więc o 41% mniej niż dla komórek linii prawidłowej. W przypadku komórek linii PC-3 (przerzut do kości) uznawanych za komórki o wysokim stopniu agresywności w modelach *in vitro*, szybkość zmian pola powierzchni ze wzrostem sztywności podłoża jest o 57%

wolniejsza niż dla komórek prawidłowych i wynosi  $186 \pm 47 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.74$ ). Liczbowe wartości pola powierzchni pojedynczych komórek znajdują się w Tabeli 1.

*Tabela 1. Wartości średnie pola powierzchni (A) komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności.*

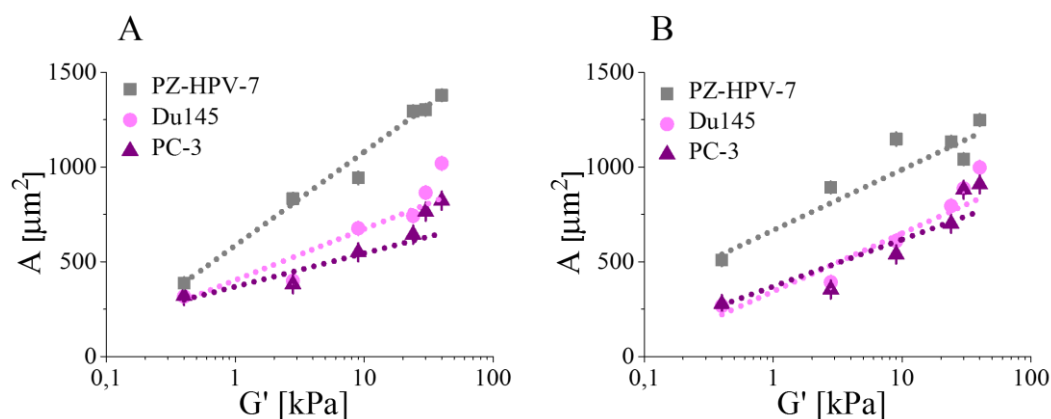
$G'$ [kPa]	$A_{PZ-HPV-7}$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	$A_{Du145}$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	$A_{PC-3}$ [ $\mu\text{m}^2$ ]
0.4	$440 \pm 12$	$264 \pm 6$	$289 \pm 5$
2.8	$1078 \pm 22$	$373 \pm 8$	$395 \pm 6$
9.3	$1113 \pm 25$	$537 \pm 31$	$591 \pm 9$
24	$1106 \pm 22$	$684 \pm 24$	$649 \pm 18$
32	$1334 \pm 24$	$859 \pm 24$	$718 \pm 17$
41	$1328 \pm 23$	$1027 \pm 27$	$773 \pm 16$

Engler i wsp. sugerują, że zmiana pola powierzchni komórek w funkcji sztywności podłoża powinna zostać opisana przy użyciu funkcji hiperbolicznej lub potęgowej [6]. Pozwala to na znalezienie granicznej sztywności podłoża, poniżej której tempo rozplaszczania komórek jest bardzo szybkie, a powyżej której wolniejsze, aż do osiągnięcia wartości pola powierzchni na szkle. Takie dopasowanie nie niesie jednak informacji na temat tempa zmiany pola powierzchni komórek w gradiencie sztywności podłoża. Ponadto, odzwierciedla zachowanie się komórek prawidłowych, które cechuje zmienna dynamika adaptacji do środowiska zewnętrznego (dynamiczna zmiana w zakresie małych sztywności podłoża i jej późniejszy spadek). Dla komórek rakowych nie obserwuje się wartości granicznej sztywności, a wzrost pola powierzchni jest liniowy.

Analiza wzrostu kilkunastu linii komórek rakowych na żelach poliakrylamidowych o różnej sztywności została przeprowadzona również przez Tilghmana i wsp. [32]. Eksperymenty przeprowadzone przez tę grupę badawczą polegały na pięciodniowej obserwacji wzrostu komórek na podłożach o dwóch sztywnościach, 0.15 kPa oraz 9.6 kPa. Wyniki prezentowane w pracy pokazują, że komórki linii PC-3 mają zdolność do rozplaszczania się już na podłożach o sztywności 0.15 kPa. Autorzy sugerują, że komórki te nie są wrażliwe na zmianę sztywności ich otoczenia. Wniosek ten kontrastuje z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy, a źródłem otrzymanych rozbieżności jest prawdopodobnie typ ligandu użytego do usieciowania powierzchni podłoża poliakrylamidowych – w pracy Tilghmana i wsp. jest to kolagen, natomiast w niniejszej pracy fibronektyna. Zmiana ligandu obecnego na powierzchni podłoża skutkuje zmianą rodzaju receptorów integrynowych zaangażowanych w procesy adhezji komórkowej. Znaczne różnice w adaptacji komórek w zależności od typu ligandu

obecnego na powierzchni podłoży poliakrylamidowych zostały zaobserwowane także dla komórek czerniaka złośliwego [30].

Aby sprawdzić czy komórki prostaty zachowują swoje zdolności adaptacyjne w czasie, analiza pola powierzchni pojedynczych komórek została przeprowadzona również dla dłuższego czasu hodowli tj. 48 h i 72 h (Rys. 7).



Rysunek 7. Pole powierzchni komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych, wyrażonej jako moduł sprężystości  $G'$  po (A) 48 h, (B) 72 h od wysiania.

Po 48 h wzrostu komórki linii PZ-HPV-7 w dalszym ciągu charakteryzują się szybszą zmianą pola powierzchni ( $A_R = 494 \pm 18 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$ ,  $R^2 = 0.99$ ), w porównaniu do komórek rakowych Du145 ( $A_R = 270 \pm 50 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$ , ( $R^2 = 0.85$ )) oraz PC-3 ( $176 \pm 44 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.75$ )). W przypadku jeszcze dłuższej hodowli tj. 72 h, prawidłowe komórki prostaty zaczynają się wolniej adaptować do podłoży poliakrylamidowych o różnej sztywności ( $A_R$  wynosi  $320 \pm 45 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.91$ )). Wartość parametru  $A_R$  dla komórek PZ-HPV-7 jest w dalszym ciągu nieco wyższa niż dla komórek Du145 (przerzut do mózgu), która wynosi  $306 \pm 55 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.86$ ). Różnica w szybkości zmian pola powierzchni w porównaniu z pomiarem dokonany po 24 h i 48 h dla komórek PC-3 (przerzut do kości) jest większa, gdyż  $A_R$  wynosi  $248 \pm 46 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$  ( $R^2 = 0.85$ ).

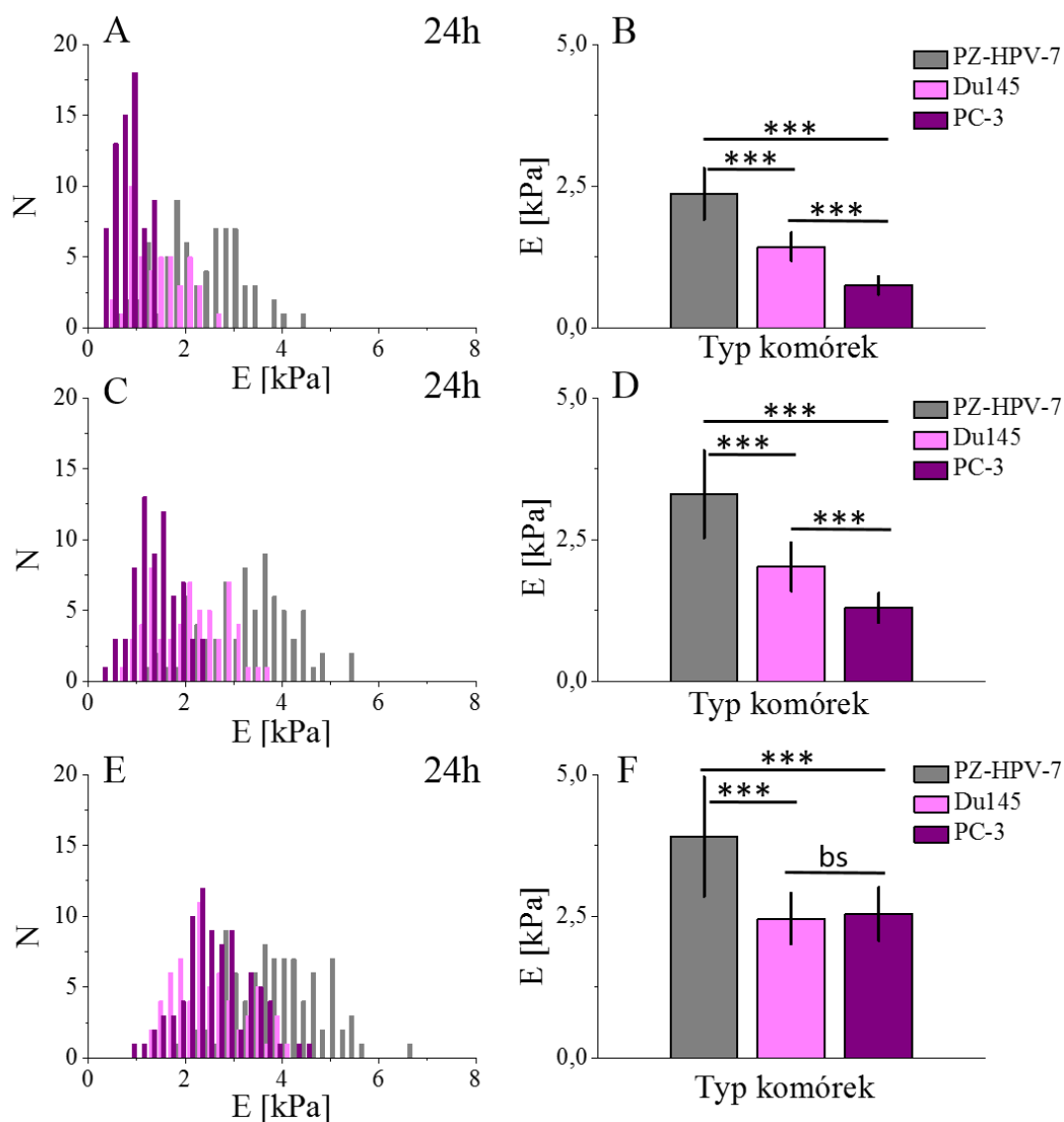
Uzyskane wyniki można podsumować stwierdzeniem, że w czasie 48 h hodowli komórki prawidłowe PZ-HPV-7 wykazują najszybsze zmiany pola powierzchni, komórki Du145 pochodzące z przerzutu do mózgu umiarkowane, a komórki PC-3 pochodzące z przerzutu do kości zmieniają swój kształt najwolniej pomimo wzrostu sztywności otoczenia. Po 72 h hodowli komórkowej zmiany pola powierzchni komórek prostaty charakteryzują się

zbliżonymi wartościami nachylenia prostej wskazującej na podobny charakter procesu rozplaszczania się komórek. Może to wynikać ze znacznego zwiększenia się liczby komórek po trzech dobach hodowli, co w znacznym stopniu może zmieniać uruchamiane szlaki sygnalizacji komórkowej i procesy adaptacyjne komórek.

#### 4.3.3 Elastyczność komórek prostaty na podłożach poliakrylamidowych

Podłoża poliakrylamidowe o różnej sztywności posłużyły do badań roli jaką bodźce mechaniczne odgrywają w funkcjonowaniu komórek prostaty. Każdorazowo, równolegle do pomiaru własności elastycznych komórek prowadzono pomiar elastyczności podłoża poliakrylamidowego w ich sąsiedztwie. Takie badanie pozwoliło stwierdzić czy zmiany własności elastycznych komórek w kolejnych dniach hodowli nie wynikają z lokalnych zmian sztywności podłoża.

*Rysunek 8* przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących przez jedną dobę na podłożach poliakrylamidowych o trzech wybranych sztywnościach: 0.4 kPa, 9.3 kPa i 41 kPa. Na podłożu o sztywności 0.4 kPa wartości modułu Younga są najmniejsze i wynoszą odpowiednio  $2.36 \pm 0.45$  kPa,  $1.43 \pm 0.25$  i  $0.75 \pm 0.16$  dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3. Wzrost sztywności podłoża hodowlanego do wartości 9.3 kPa powoduje spadek elastyczności komórek, tj. wzrost wartości modułu Younga. Osiąga on wartość  $3.3 \pm 0.77$  kPa dla komórek PZ-HPV-7, co jest równe wzrostowi sztywności o ok. 40%. Komórki linii Du145 również stają się mniej elastyczne osiągając wartość modułu Younga równą  $2.02 \pm 0.43$ , co również oznacza wzrost sztywności o ok. 41%. Największa zmiana elastyczności komórek pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa obserwowana jest dla komórek linii PC-3, których moduł Younga wynosi  $1.3 \pm 0.26$ , co jest równe zmianie o ok. 73%. Dziesięciokrotny wzrost sztywności podłoża poliakrylamidowych skutkuje wzrostem modułu Younga o 65% dla komórek linii PZ-HPV-7 ( $E = 3.9 \pm 1.05$ ), 72% dla komórek linii Du145 ( $E = 2.46 \pm 0.45$ ) oraz aż 239% dla komórek linii PC-3 ( $E = 2.54 \pm 0.47$ ), (*Tab. 2*).

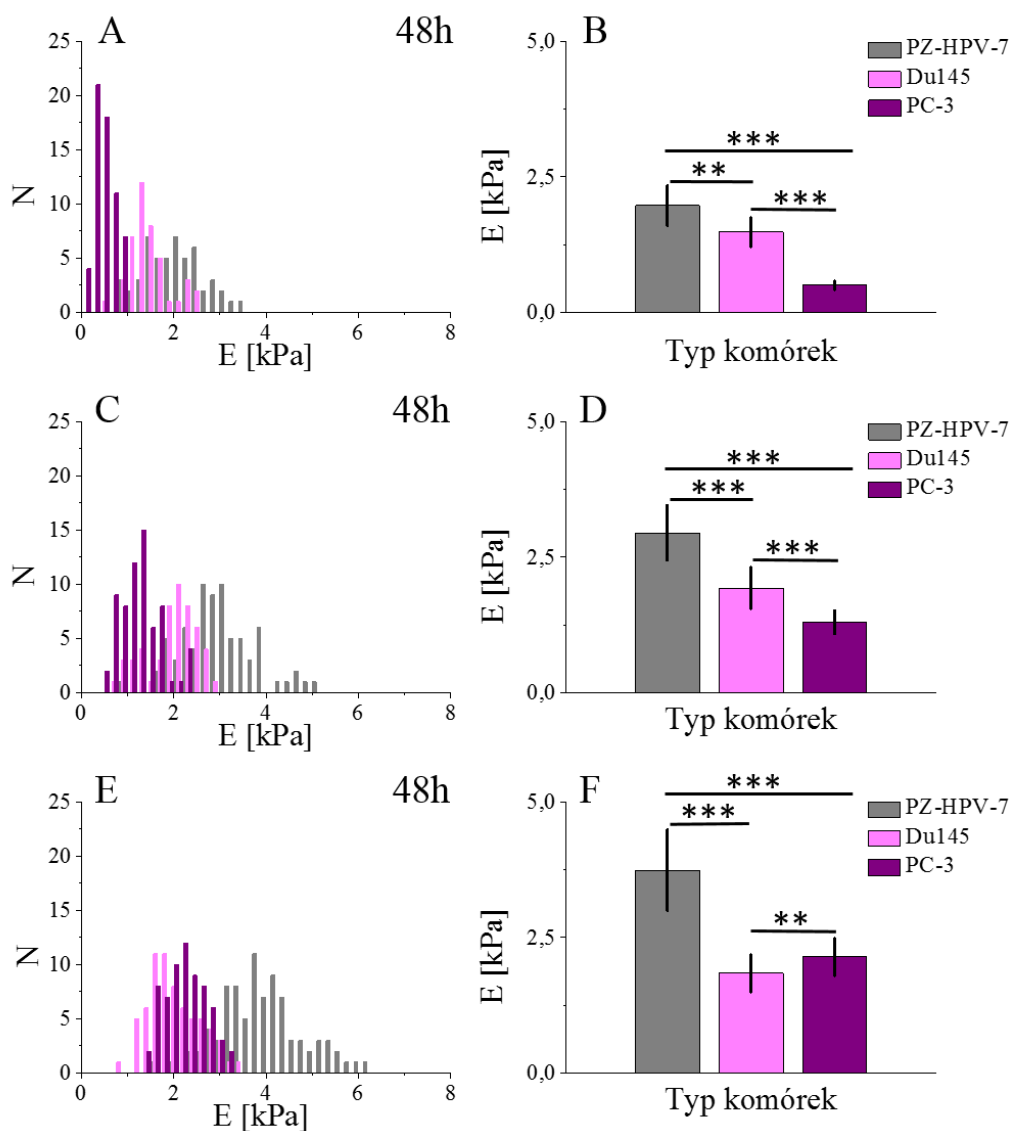


Rysunek 8. Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 24 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: \*\*\* $P < 0.001$ , bs – brak różnic istotnych statystycznie<sup>13</sup>.

Tabela 2. Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (24 h).

	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/9.3 kPa	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/41 kPa
PZ-HPV-7	40%	65%
Du145	41%	72%
PC-3	73%	239%

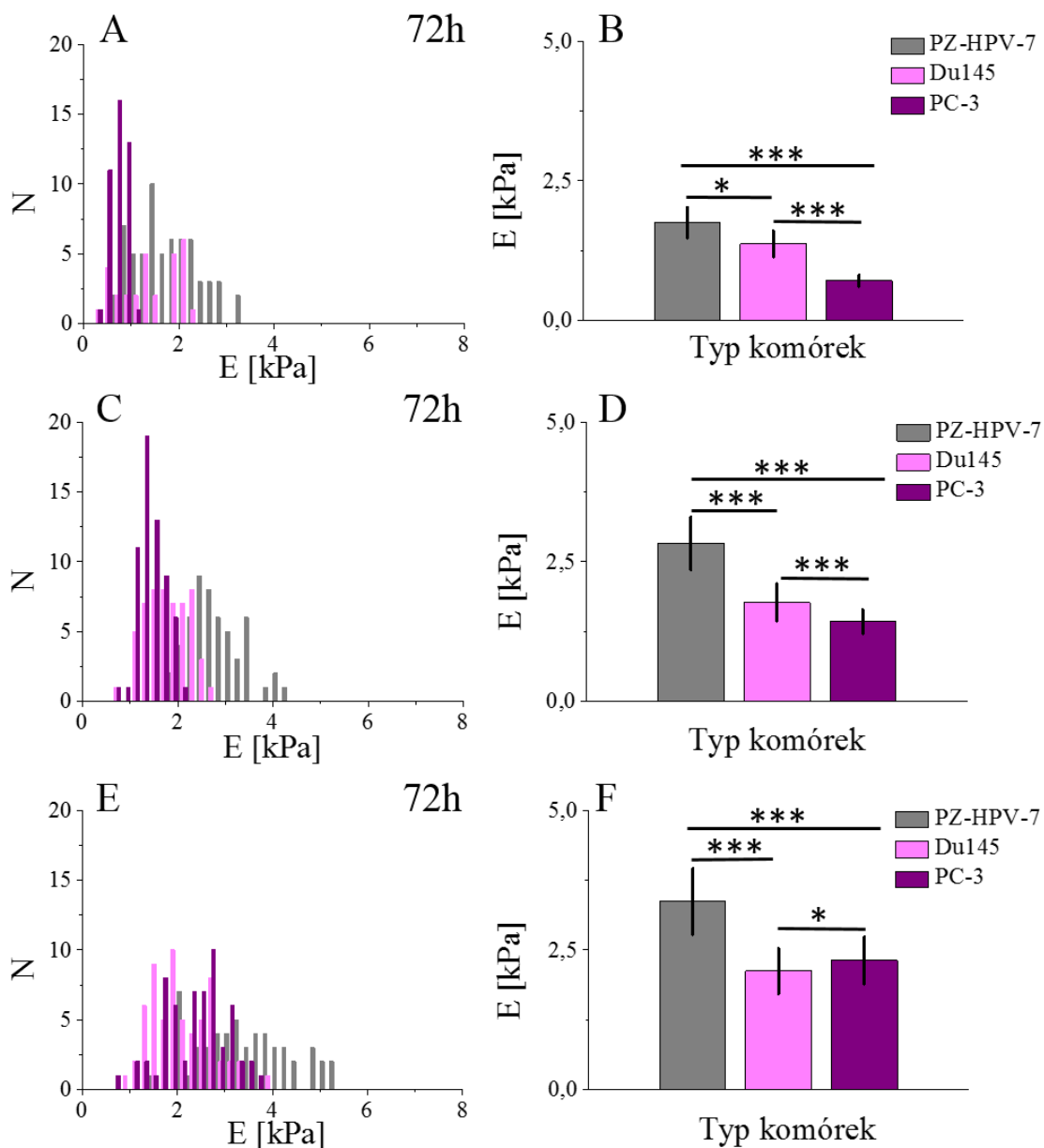
<sup>13</sup> Graniczny poziom istotności wyniósł  $P = 0.49$ .



Rysunek 9. Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 48 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .

Tabela 3. Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (48 h).

	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/9.3 kPa	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/41 kPa
PZ-HPV-7	50%	90%
Du145	30%	25%
PC-3	160%	328%



Rysunek 10. Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 72 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ .

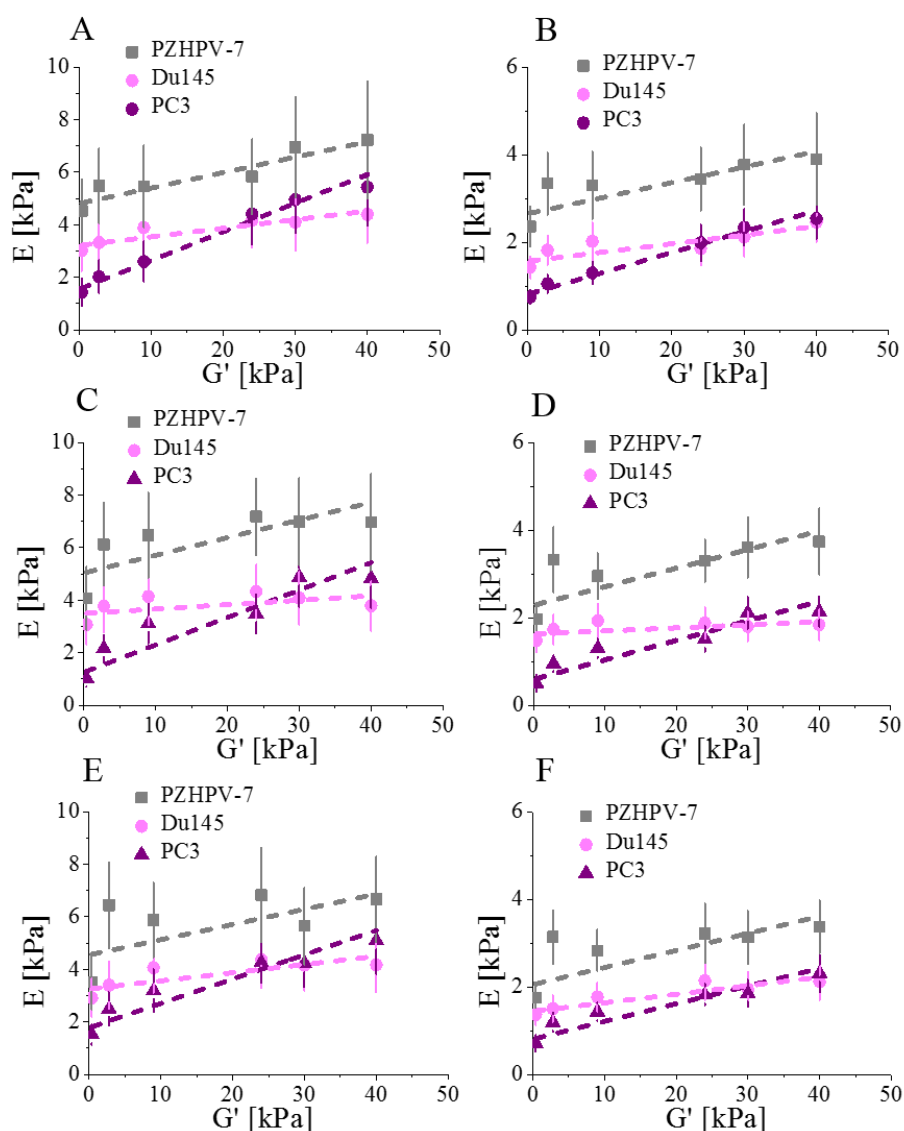
Tabela 4. Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (72 h).

	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/9.3 kPa	[%] wzrostu E [kPa] 0.4 kPa/41 kPa
PZ-HPV-7	62%	93%
Du145	30%	55%
PC-3	101%	225%



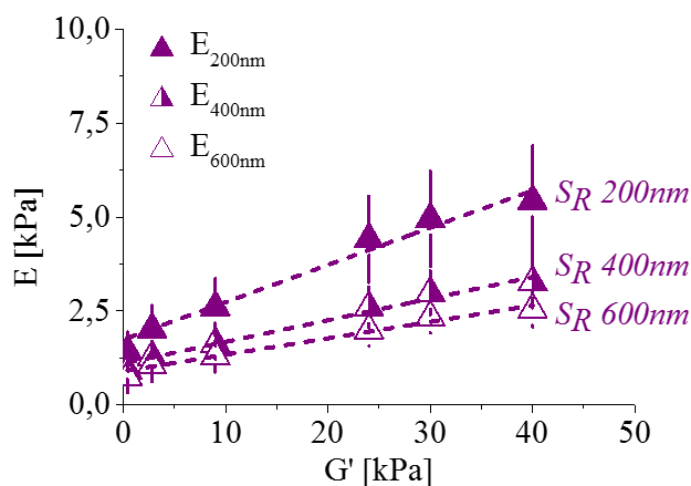
Sukcesywny wzrost wartości modułu Younga towarzyszący wzrostowi sztywności podłoży poliakrylamidowych jest obserwowany dla trzech badanych linii komórkowych również w kolejnych dniach trwania hodowli komórkowej (Rys. 9, Rys. 10, Tab. 3, Tab. 4).

Jak przedstawiono w *Rozdziale 3*, wartość modułu Younga jest zależna od głębokości nacisku sondy AFM. W związku z tym przeprowadzono analizę zależności elastyczności komórek rosnących na podłożach o różnej sztywności w funkcji głębokości indentacji z zakresu 100 nm do 600 nm (Rys. 11).



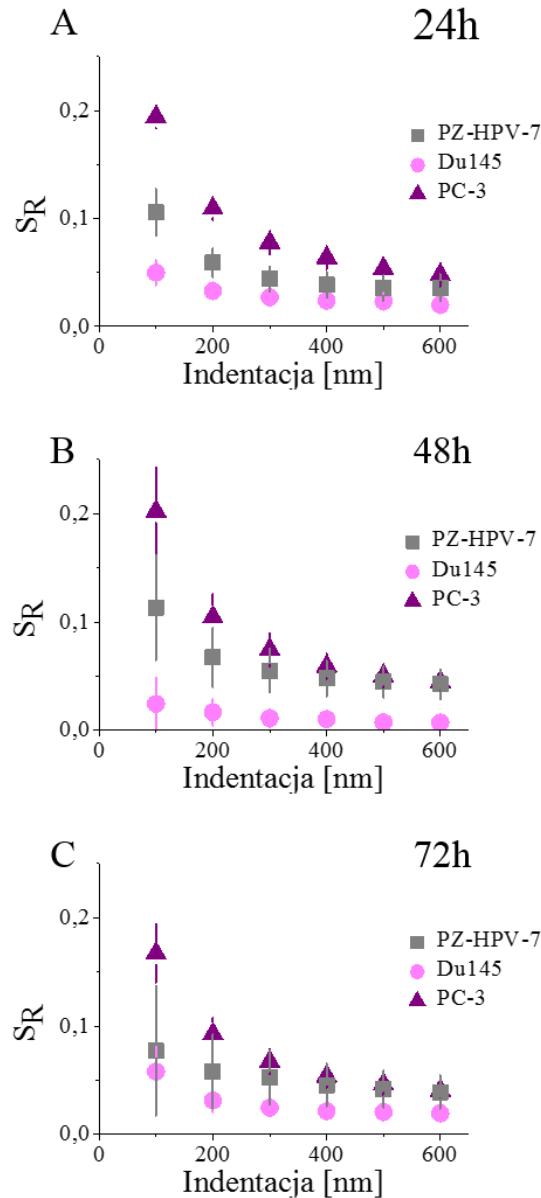
Rysunek 11. Wartość modułu Younga w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych (wyrażona jako  $G'$ ). Wartości modułu Younga wyznaczone odpowiednio na głębokości indentacji 100 nm (A), 200 nm (B), 300 nm (C), 400 nm (D), 500 nm (E) i 600 nm (F). Powyższe wartości uzyskano dla komórek zmierzonych po 24 h hodowli. Analogiczna analiza została przeprowadzona dla komórek rosnących przez 48 h i 72 h (dane nie pokazane).

Wyznaczony w pomiarze elastyczności przy użyciu AFM moduł Younga niesie informację na temat własności elastycznych badanych komórek i odzwierciedla organizację cytoszkieletu aktynowego. Aby opisać zmiany organizacji cytoszkieletu komórek dla różnych głębokości indentacji wprowadzono parametr  $S_R$  (ang. *stiffness rate*), będący miarą szybkości zmian elastyczności komórek w funkcji sztywności podłoża. Parametr  $S_R$ , został wyznaczony dla różnych głębokości jak ideowo przedstawiono na Rysunku 12.



Rysunek 12. Idea wyznaczania parametru  $S_R$  dla różnych głębokości indentacji na przykładzie linii komórkowej PC-3.

Funkcja liniowa ważona odchyleniami standardowymi została dopasowana do wartości modułu Younga komórek rosnących na podłożach o sztywności z zakresu 0.4 kPa – 41 kPa. Miarą szybkości zmian elastyczności komórek w funkcji zmian sztywności podłoża jest więc nachylenie prostej – parametr  $S_R$ . Na jego podstawie można ocenić w jakich warstwach cytoszkieletu komórkowego zachodzą największe zmiany adaptacyjne do otoczenia. Parametr  $S_R$  został wyznaczony dla wszystkich badanych linii komórkowych podczas trzech kolejnych dni hodowli.



Rysunek 13. Parametr  $S_R$  wyznaczony jako nachylenie prostych z Rysunku 11, odzwierciedlający szybkość zmian elastyczności komórek w funkcji sztywności podłoża dla (A) 24 h, (B) 48 h i (C) 72 h od wysiania.

Parametr  $S_R$  jest miarą wrażliwości komórek na zewnętrzne bodźce mechaniczne transmitowane przez podłoża poliakrylamidowe o różnej sztywności. Jak widać na Rysunku 13, wartość parametru  $S_R$  zależy od głębokości indentacji, co oznacza, że wpływ zewnętrznych bodźców mechanicznych transmitowanych do cytoszkieletu nie jest jednorodny we wszystkich jego warstwach. Z przedstawionych wykresów wynika, że komórki trzech badanych linii różnią się mechanoczułością. W przypadku komórek prawidłowych parametr  $S_R$  osiąga wartość  $0.11 \pm 0.02$  ( $R^2 = 0.82$ ), dla powierzchniowej warstwy cytoszkieletu (100 nm), ale wraz ze

wzrostem głębokości indentacji (600 nm) maleje do wartości  $0.04 \pm 0.01$  ( $R^2 = 0.59$ ). Komórki wyizolowane z przerzutu raka prostaty do mózgu charakteryzuje najmniejsza zmiana parametru  $S_R$ , dla głębokości 100 nm wynosi  $0.05 \pm 0.01$  ( $R^2 = 0.78$ ), a dla głębokości 600 nm  $0.02 \pm 0.01$  ( $R^2 = 0.66$ ). Komórki linii PC-3, pochodzące z przerzutu raka prostaty do kości wykazują największe zmiany parametru  $S_R$ , który dla głębokości 100 nm osiąga największą wartość  $0.19 \pm 0.01$  ( $R^2 = 0.99$ ), a następnie spada ze wzrostem głębokości indentacji aż do wartości  $0.05 \pm 0.01$  ( $R^2 = 0.97$ ).

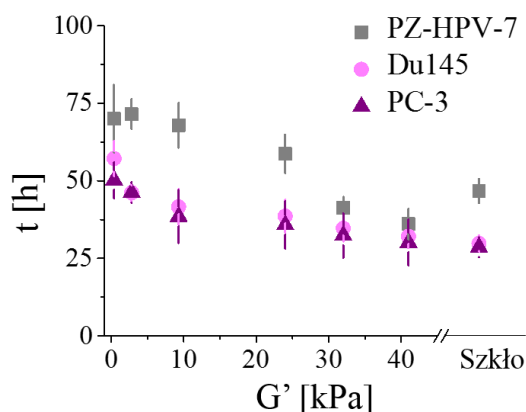
Dla badanych linii komórkowych można zapisać następującą relację mechanoczułości:

$$S_{R \text{ PC-3}} > S_{R \text{ PZ-HPV-7}} > S_{R \text{ Du145}}$$

Powyższa relacja jest zachowana dla komórek rosnących również przez 48 h i 72 h od wysiania na podłoża poliakrylamidowe.

#### 4.3.4 Czas podwojenia populacji komórek na podłożach poliakrylamidowych

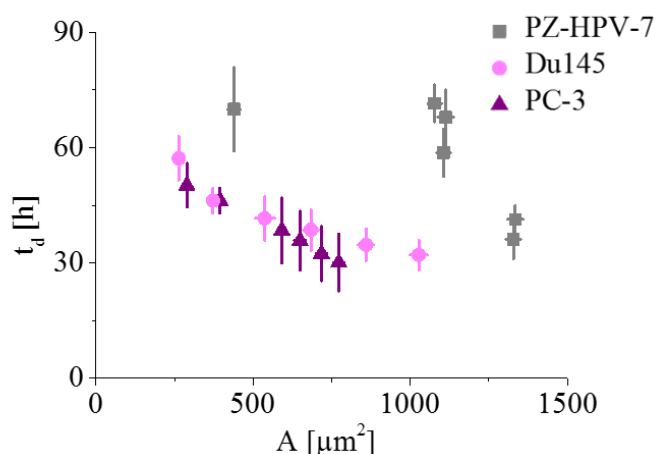
Podłoża wykonane z żelu poliakrylamidowego zostały wykorzystane do zbadania wpływu sztywności otoczenia komórek zdrowych i zmienionych nowotworowo na tempo podziału komórkowego. Jak wspomniano we wstępie niniejszej pracy, komórki nowotworowe nabywają zdolności do nieograniczonego podziału, przez co w hodowli *in vitro* na szkle obserwuje się, że czas potrzebny na podwojenie populacji komórek nowotworowych jest znacznie krótszy niż dla komórek pochodzących z tkanek zdrowych.



Rysunek 14. Czas podwojenia populacji komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoża hodowlanego (wyrażonej jako wartość  $G'$ ) oraz w hodowli na szkle.

Umieszczenie komórek na podłożach o różnej sztywności powoduje zmiany w tempie ich podziału, zarówno w przypadku komórek zdrowych jak i nowotworowych. Największe różnice w czasie potrzebnym na podwojenie populacji komórek są obserwowane dla podłoża o sztywności 9.3 kPa. Komórki PZ-HPV-7 potrzebują aż  $68 \pm 7$  h, podczas gdy komórki Du145 pochodzące z przerzutu do mózgu i komórki PC-3 pochodzące z przerzutu do kości odpowiednio  $42 \pm 6$  h i  $39 \pm 8$  h. Z kolei na podłożu poliakrylamidowym o największej sztywności 41 kPa różnice w tempie podziału komórek zanikają i wynoszą  $36 \pm 5$  h,  $32 \pm 4$  h i  $30 \pm 7$  h odpowiednio dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3. Warto zauważyć, że na podłożu o sztywności 0.4 kPa, czyli odpowiadającej najbardziej miękkim tkankom ludzkiego organizmu (jak np. tłuszcz, mózg, węzły chłonne) zarówno komórki zdrowe jak i nowotworowe nie tracą zdolności do podziału komórkowego (Rys. 14).

W przypadku komórek prawidłowych, czas podwojenia populacji jest silnie skorelowany z polem powierzchni zajmowanym przez komórki. Uważa się, że aby komórka była zdolna do przeprowadzenia cyklu podziałowego, musi osiągnąć odpowiedni rozmiar, którego miarą może być jej objętość, pole powierzchni czy też masa [33]–[35]. Rysunek 15 przedstawia zależność czasu podwojenia komórek prawidłowych PZ-HPV-7 i rakowych Du145 oraz PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych. Ośią odciętych nie jest w tym wypadku sztywność podłoża, ale pole powierzchni jakie komórki na danym podłożu osiągają.



Rysunek 15. Czas podwojenia populacji komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji pola ich powierzchni.

Można zauważyć, że gdy komórki prawidłowe osiągną pole powierzchni powyżej około  $1100 \mu\text{m}^2$  ich czas podwojenia ulega znacznemu skróceniu i wynosi między 30, a 40 godzin, tj. około 50% szybciej niż dla komórek prawidłowych o mniejszym polu powierzchni.

W przypadku komórek nowotworowych taka graniczna wartość pola powierzchni nie jest obserwowana i zależność czasu podwojenia liczby komórek od ich rozmiaru jest liniowa.

#### 4.4 Wnioski

Podłoża wykonane z żeli poliakrylamidowych o różnej sztywności mogą posłużyć do badania oddziaływań komórek z ich otoczeniem oraz do poszukiwania informacji na temat roli jaką bodźce mechaniczne transmitowane z otoczenia komórki pełnią w rozwoju stanów patologicznych organizmu. Jednym z procesów chorobowych, którym towarzyszy zmiana własności mechanicznych otoczenia komórkowego oraz zaburzenia w transmisji bodźców zewnętrznych są nowotwory. Gruczoł prostaty jest narażony na gradienty ciśnienia docierające ze znajdującego się nad nim pęcherza moczowego. Przerost gruczołu krokowego, poprzedzający przejście łagodnej zmiany w nowotwór złośliwy, powoduje zwiększenie ciśnienia śródmiąższowego wewnątrz gruczołu. Czynniki te, są źródłem lokalnych zmian sztywności otoczenia komórek i mogą zaburzać ich mechanoczułość. W kolejnym etapie rozwoju choroby pojedyncze komórki rakowe zlokalizowane wewnątrz guza nabywają zdolności do tworzenia wtórnych ognisk przerzutowych w miejscach tak odległych i o tak różnych własnościach mechanicznych jak mózg oraz kość. Prowadzenie hodowli komórkowych na podłożach o różnej sztywności pozwoliło na imitację zmieniających się podczas progresji raka własności lepkosprężystych otoczenia. Komórki linii prawidłowej PZ-HPV-7 oraz dwóch rakowych – Du145 (przerzut do mózgu) i PC-3 (przerzut do kości) posłużyły jako układ modelowy. Możliwość śledzenia zmian własności mechanicznych komórek w procesie adaptacji do zmieniających się warunków otoczenia pozwoliło na wyciągnięcie następujących wniosków:

- i.* Morfologia komórek zdrowych oraz pochodzących z zaawansowanych stadiów raka zależy od sztywności podłoża hodowlanego.
- ii.* Prawidłowe komórki linii PZ-HPV-7 mają zdolność do rozplaszczania się na podłożach o mniejszej sztywności niż komórki obu badanych linii rakowych.
- iii.* Miarą tempa zmian pola powierzchni ( $A$ ) komórek w funkcji sztywności podłoża poliakrylamidowego może być parametr  $A_R$  (*ang. stiffness rate*) wyznaczony z nachylenia prostej dopasowanej do punktów eksperymentalnych.

- iv. Wartość parametru  $A_R$  jest największa dla komórek prawidłowych i wynosi  $434 \pm 63 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$ , podczas gdy dla komórek pochodzących z przerzutu do mózgu  $A_R$  osiąga wartość  $256 \pm 59 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$ . Szybkość zmian pola powierzchni jest najwolniejsza dla komórek pochodzących z przerzutu do kości i wynosi  $186 \pm 47 \mu\text{m}^2/\text{kPa}$ .
- v. Komórki prostaty zachowują swoje zdolności adaptacyjne w czasie 24 h i 48 h hodowli, ale w kolejnej dobie różnice w szybkości zmian pola powierzchni nie są już tak wyraźne.
- vi. Własności elastyczne komórek prostaty, opisywane modułem Younga zależą od sztywności podłoża hodowlanego.
- vii. Największe zmiany elastyczności, a więc reorganizacji cytoszkieletu aktynowego są obserwowane dla komórek linii PC-3. Zmiany elastyczności komórek PZ-HPV-7 i Du145 są łagodniejsze.
- viii. Miarą zmian elastyczności komórek w funkcji sztywności podłoża poliakrylamidowego może być parametr  $S_R$  (*ang. stiffness rate*) wyznaczony z nachylenia prostej dopasowanej do punktów eksperymentalnych.
- ix. Parametr  $S_R$  odzwierciedla zmianę elastyczności komórek i jest zależny od głębokości indentacji. Parametr  $S_R$  może służyć do oszacowania stopnia mechanoczułości komórek.
- x. Wyznaczona przy pomocy parametru  $S_R$  relacja mechanoczułości przybiera następującą postać:  $S_R_{PC-3} > S_R_{PZ-HPV-7} > S_R_{Du145}$  i była zachowana przez trzy doby trwania hodowli komórkowej.
- xi. Czas podwojenia populacji komórek zależy od sztywności podłoża hodowlanego. Na podłożach o małej sztywności komórki dzielą się wolniej niż na podłożach o dużej sztywności.
- xii. Czas podwojenia populacji jest skorelowany z polem powierzchni zajmowanym przez komórki. Komórki prawidłowe muszą osiągnąć wartość graniczną pola powierzchni, aby zwiększyć tempo podziału o około 50%. Z kolei komórki rakowe wykazują liniową zależność czasu podwojenia od zajmowanego pola powierzchni.

#### 4.5 Literatura

- [1] N. Wang, J. Butler, and D. Ingber, "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton," *Science* (80-. ), vol. 260, no. 5111, pp. 1124–1127, May 1993.

- [2] D. E. Discher, P. Janmey, and Y.-L. Wang, "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate.," *Science*, vol. 310, no. 2005, pp. 1139–1143, 2005.
- [3] V. Vogel and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 265–75, Apr. 2006.
- [4] R. J. Pelham and Y. -l. Wang, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 25, pp. 13661–13665, Dec. 1997.
- [5] Y. L. Wang and R. J. Pelham, "Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells.," *Methods Enzymol.*, vol. 298, pp. 489–96, Jan. 1998.
- [6] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, and D. Discher, "Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses," *Biophys. J.*, vol. 86, no. 1, pp. 617–628, Jan. 2004.
- [7] J. Solon, I. Levental, K. Sengupta, P. C. Georges, and P. A. Janmey, "Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates.," *Biophys. J.*, vol. 93, no. 12, pp. 4453–61, Dec. 2007.
- [8] J. P. Califano and C. A. Reinhart-King, "Substrate Stiffness and Cell Area Predict Cellular Traction Stresses in Single Cells and Cells in Contact.," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 3, no. 1, pp. 68–75, Mar. 2010.
- [9] R. G. Wells, "The role of matrix stiffness in regulating cell behavior.," *Hepatology*, vol. 47, no. 4, pp. 1394–400, Apr. 2008.
- [10] T. A. Ulrich, E. M. de Juan Pardo, and S. Kumar, "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 10, pp. 4167–74, May 2009.
- [11] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang, "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate.," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pp. 144–52, Jul. 2000.
- [12] S. R. Peyton and A. J. Putnam, "Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 1, pp. 198–209, Jul. 2005.
- [13] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–89, Aug. 2006.
- [14] K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V Schaffer, and K. E. Healy, "Substrate modulus directs neural stem cell behavior.," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 9, pp. 4426–38, Nov. 2008.
- [15] N. D. Evans, C. Minelli, E. Gentleman, V. LaPointe, S. N. Patankar, M. Kallivretaki, X. Chen, C. J. Roberts, and M. M. Stevens, "Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells.," *Eur. Cell. Mater.*, vol. 18, pp. 1–13; discussion 13–4, Jan. 2009.



- [16] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, and A. Z. Hryniewicz, “Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy,” *Eur. Biophys. J.*, vol. 28, no. 4, pp. 312–316, May 1999.
- [17] K. E. Kasza, A. C. Rowat, J. Liu, T. E. Angelini, C. P. Brangwynne, G. H. Koenderink, and D. A. Weitz, “The cell as a material,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 101–7, Feb. 2007.
- [18] Q. S. Li, G. Y. H. Lee, C. N. Ong, and C. T. Lim, “AFM indentation study of breast cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 374, no. 4, pp. 609–13, Oct. 2008.
- [19] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, “Cell mechanics and the cytoskeleton,” *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 485–492, Jan. 2010.
- [20] A. Buxboim, K. Rajagopal, A. E. X. Brown, and D. E. Discher, “How deeply cells feel: methods for thin gels,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 22, no. 19, p. 194116, May 2010.
- [21] K. Pogoda, J. Jaczewska, J. Wiltowska-Zuber, O. Klymenko, K. Zuber, M. Fornal, and M. Lekka, “Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data,” *Eur. Biophys. J.*, vol. 41, pp. 79–87, 2012.
- [22] T. Mizutani, H. Haga, and K. Kawabata, “Cellular stiffness response to external deformation: tensional homeostasis in a single fibroblast,” *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 59, no. 4, pp. 242–8, Dec. 2004.
- [23] C. Revenu, R. Athman, S. Robine, and D. Louvard, “The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 635–46, Aug. 2004.
- [24] S. Chien, “Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 292, no. 3, pp. H1209–24, Mar. 2007.
- [25] V. W. Wong, S. Akaishi, M. T. Longaker, and G. C. Gurtner, “Pushing Back: Wound Mechanotransduction in Repair and Regeneration,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, no. 11, pp. 2186–2196, Jul. 2011.
- [26] P. Isermann and J. Lammerding, “Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease,” *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 24, pp. R1113–21, Dec. 2013.
- [27] D. E. Jaalouk and J. Lammerding, “Mechanotransduction gone awry,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 63–73, Jan. 2009.
- [28] A. Parekh and A. M. Weaver, “Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 3, no. 3, pp. 288–292, Oct. 2014.
- [29] C. E. Kadow, P. C. Georges, P. A. Janmey, and K. A. Beningo, “Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses,” *Methods Cell Biol.*, vol. 83, pp. 29–46, Jan. 2007.

- [30] F. J. Byfield, Q. Wen, I. Levental, K. Nordstrom, P. E. Arratia, R. T. Miller, and P. A. Janmey, “Absence of filamin A prevents cells from responding to stiffness gradients on gels coated with collagen but not fibronectin.,” *Biophys. J.*, vol. 96, no. 12, pp. 5095–102, Jun. 2009.
- [31] I. Levental, P. C. Georges, and P. A. Janmey, “Soft biological materials and their impact on cell function,” *Soft Matter*, vol. 3, no. 3, p. 299, Feb. 2007.
- [32] R. W. Tilghman, C. R. Cowan, J. D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J. K. Slack-Davis, B. R. Blackman, D. J. Tschumperlin, and J. T. Parsons, “Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype.,” *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e12905, Jan. 2010.
- [33] M. Cook and M. Tyers, “Size control goes global,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 18, no. 4, pp. 341–350, 2007.
- [34] A. Tzur, R. Kafri, V. S. LeBleu, G. Lahav, and M. W. Kirschner, “Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells.,” *Science*, vol. 325, no. 5937, pp. 167–171, 2009.
- [35] B. A. Edgar and K. J. Kim, “Cell biology. Sizing up the cell.,” *Science*, vol. 325, no. 5937, pp. 158–159, 2009.

## Rozdział 5 – Podsumowanie

Tkanki tworzące ludzki organizm to materiały lepkosprężyste zbudowane z grupy wyspecjalizowanych komórek otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową. Komórki te są nieustannie poddawane działaniu endogennych i egzogennych bodźców mechanicznych. W stanach patologicznych często obserwuje się lokalne zmiany własności mechanicznych tkanek, np. w procesie włóknienia wątroby czy w czasie tworzenia nowotworowego nacieku węzłów chłonnych. Wiele procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach prawidłowych odbywa się w oparciu o tzw. mechanoczułość, czyli zdolność do odbioru, przetworzenia, a następnie odpowiedzi na zewnętrzny bodziec mechaniczny. Komórki nowotworowe, zdolne do tworzenia odległych przerzutów cechuje zaburzona mechanoczułość i umiejętność efektywnej migracji oraz podziału w środowisku o odmiennych w stosunku do wyjściowej tkanki własnościach lepkosprężystych.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka odpowiedzi mechanicznej komórek wywodzących się z prostaty oraz raka prostaty w zmiennych warunkach otoczenia. Próby takiego opisu były podjęte wcześniej przez Halla i wsp. (2002), którzy badali tempo podziału oraz migracji komórek linii PC-3 (przerzut raka prostaty do kości), hodowanych na elastycznych podłożach kolagenowych w obecności komórek zrębu prostaty [1]. W 2009 roku ukazała się praca Bakera i wsp., w której przebadano własności mechaniczne komórek linii PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych oraz kolagenowych przy użyciu pasywnej mikroreologii [2]. Rok później ukazała się praca Tilghmana i wsp., w której obserwacji poddano komórki linii PC-3 oraz Du145 rosnące na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności [3]. Prezentowane eksperymenty skupiały się głównie na wyznaczeniu tempa podziału komórek, zmian pola powierzchni oraz zdolności do migracji. W 2012 roku ukazała się praca Sieha i wsp., w której obiektem badań była linia komórek LNCaP, wywodząca się z przerzutu raka prostaty do węzłów chłonnych. Analizie poddano profil wzrostu tych komórek umieszczonych przez 28 dni na hydrożelach o różnej sztywności wykonanych z poli(tlenku etylenu) [4]. Wszystkie powyższe prace pokazywały modulujący wpływ własności mechanicznych otoczenia komórkowego na rozwój raka prostaty.

Niniejsza praca jest wedle wiedzy autorki pierwszą próbą systematycznego przebadania odpowiedzi mechanicznej pojedynczych komórek prawidłowych oraz rakowych prostaty

rosnących na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności. Aby oszacować spodziewane zaburzenia w mechanoczułości komórek zmienionych nowotworowo przygotowano podłoża poliakrylamidowe o sześciu sztywnościach z zakresu 0.4 kPa – 41 kPa. Własności chemiczne i fizyczne podłoża zostały scharakteryzowane z użyciem techniki spektroskopii absorpcyjnej z transformatą Fouriera, reometru rotacyjnego oraz mikroskopii sił atomowych. Otrzymane wyniki zostały przedyskutowane w świetle statystycznej teorii elastyczności oraz w oparciu o istniejącą wiedzę literaturową. Wybór komórkowego układu modelowego został podyktowany potrzebą obserwacji komórek wywodzących się z różnych etapów procesu chorobowego, dlatego by zrealizować cel pracy przebadano trzy linie komórkowe – prawidłową PZ-HPV-7 oraz wywodzącą się z przerzutów raka prostaty do mózgu linię Du145 i do kości PC-3, które w hodowlach *in vitro* różnią się stopniem agresywności. Własności mechaniczne komórek rosnących na szkle zostały przebadane przy użyciu mikroskopu sił atomowych pracującego w trybie spektroskopii siły. Analizę uzupełniła obserwacja pola powierzchni oraz preferencji kształtu przyjmowanego przez komórki. Z uwagi na duże znaczenie obserwowanych w chorobie nowotworowej zmian tempa podziału komórkowego, parametr ten był monitorowany równoległe z powyższymi eksperymentami. Istotą pracy było prowadzenie hodowli komórkowych na żelach poliakrylamidowych oraz ocena stopnia mechanoczułości komórek z różnych etapów procesu nowotworzenia.

Stopień mechanoczułości komórek prawidłowych i rakowych został wyznaczony (*i*) w oparciu o obserwację zmian pola powierzchni komórek oraz (*ii*) zmian własności mechanicznych komórek w gradiencie sztywności podłoża poliakrylamidowych. Wprowadzone parametry  $A_R$  i  $S_R$  opisują odpowiednio tempo zmian pola powierzchni i elastyczności komórek w funkcji sztywności ich otoczenia. Ich wartość jest charakterystyczna dla każdej linii komórkowej. Najbardziej dynamiczna zmiana pola powierzchni zajmowanego przez komórki w wyniku wzrastającej sztywności ich otoczenia występuje dla komórek prawidłowych PZ-HPV-7. Obserwowany charakter zmian jest typowy dla komórek prawidłowych i został już wcześniej opisany dla fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich. Zgodnie z przewidywaniami odpowiedź na zmienne warunki otoczenia komórek rakowych linii Du145 i PC-3 różni się od odpowiedzi komórek prawidłowych, a tempo zmian pola powierzchni w gradiencie sztywności otoczenia jest mniejsze. Świadczy to o modyfikacji procesów adaptacji do zmiennych warunków ich zewnętrznego mikrośrodowiska na skutek procesu nowotworzenia. Wyznaczenie parametru  $A_R$  dla badanych linii komórkowych doprowadziło do następującej relacji:

$$A_R \text{ PZ-HPV-7} > A_R \text{ Du145} > A_R \text{ PC-3}$$

Tempo zmian własności elastycznych komórek zostało wyznaczone na podstawie wartości ich modułu Younga, otrzymanego z pomiarów mikroskopii sił atomowych. Parametr  $S_R$ , odzwierciedlający szybkość zmian elastyczności komórek w odpowiedzi na zmienne warunki otoczenia został określony dla różnych głębokości ugięcia kompleksu błona komórkowa – cytoszkielet. Dzięki temu, możliwe było oszacowanie zakresu propagacji bodźców mechanicznych w różnych warstwach komórki. Otrzymane wyniki pokazują, że komórki linii rakowej PC-3 charakteryzują się najszybszymi zmianami organizacji cytoszkieletu, a zmiany te są silnie skorelowane z głębokością próbkowania, liczoną jako odległość od powierzchni komórki do jej wnętrza. Komórki prawidłowe PZ-HPV-7 wykazują mniejszą mechanoczułość, czego przejawem jest niższa wartość parametru  $S_R$ . Z kolei komórki rakowe linii Du145 charakteryzuje najniższa wartość parametru  $S_R$  oraz najmniejsza jego zmiana dla wzrastającej głębokości indentacji. Otrzymane wyniki można zapisać w postaci następującej relacji:

$$S_R \text{ PC-3} > S_R \text{ PZ-HPV-7} > S_R \text{ Du145}$$

Warto zauważyć, że niezależnie od badanej linii komórkowej, największe wartości parametru  $S_R$  są obserwowane dla niewielkich głębokości indentacji, tj. 100 nm – 200 nm. Oznacza to, że adaptacja komórek w odpowiedzi na zewnętrzne bodźce mechaniczne ma miejsce głównie w powierzchniowych warstwach cytoszkieletu. Może to sugerować, że rolą korowej warstwy cytoszkieletu aktywnego jest odbiór sygnału mechanicznego, jego odfiltrowanie i dalsze przesłanie do jądra komórkowego w formie zmodyfikowanej.

Przedstawione relacje parametrów  $A_R$  i  $S_R$  różnią się między sobą. Oznacza to, że nie zaobserwowano korelacji w tempie zmiany pola powierzchni i elastyczności komórek w funkcji sztywności ich otoczenia. Prace Gawara i Ramosa sugerują, że nie pole powierzchni zajmowane przez komórki ma wpływu na ich własności elastyczne, ale całkowita ilość i stopień polaryzacji aktyny w ich wnętrzu [5], [6]. W niewielkim stopniu na sztywność komórek może wpływać również sposób organizacji włókien aktynowych. Oznacza to, że rozplaszczanie się komórek i zmiana ich sztywności to procesy którymi kierują dwa niezależne mechanizmy.

Dodatkowo zaobserwowano modulujący wpływ sztywności otoczenia komórek na tempo ich podziału. Dla podłoży o sztywności z zakresu 2.4 kPa – 24 kPa tempo podziału komórek prawidłowych jest znacząco wolniejsze od tempa podziału komórek rakowych, ale przy wzroście sztywności otoczenia różnice te ulegają zatarciu. Tempo podziału komórkowego

jest również zależne od pola powierzchni zajmowanego przez komórki, a charakter tej zależności różni się dla komórek prawidłowych i rakowych.

#### Literatura

- [1] J. A. Hall, N. J. Maitland, M. Stower, and S. H. Lang, “Primary prostate stromal cells modulate the morphology and migration of primary prostate epithelial cells in type 1 collagen gels.,” *Cancer Res.*, vol. 62, no. 1, pp. 58–62, Jan. 2002.
- [2] E. L. Baker, R. T. Bonnecaze, and M. H. Zaman, “Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer.,” *Biophys. J.*, vol. 97, no. 4, pp. 1013–21, Aug. 2009.
- [3] R. W. Tilghman, C. R. Cowan, J. D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J. K. Slack-Davis, B. R. Blackman, D. J. Tschumperlin, and J. T. Parsons, “Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype.,” *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e12905, Jan. 2010.
- [4] S. Sieh, A. V Taubenberger, S. C. Rizzi, M. Sadowski, M. L. Lehman, A. Rockstroh, J. An, J. A. Clements, C. C. Nelson, and D. W. Huttmacher, “Phenotypic characterization of prostate cancer LNCaP cells cultured within a bioengineered microenvironment.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e40217, Jan. 2012.
- [5] J. R. Ramos, J. Pabijan, R. Garcia, and M. Lekka, “The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process.,” *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 447–57, Jan. 2014.
- [6] N. Gavara and R. S. Chadwick, “Relationship between cell stiffness and stress fiber amount, assessed by simultaneous atomic force microscopy and live-cell fluorescence imaging.,” *Biomech. Model. Mechanobiol.*, Jul. 2015.

# Spis Rysunków

## Rozdział 1

<b>Rysunek 1.</b> Zależność naprężenia $\sigma$ od odkształcenia $\varepsilon$ dla ciała podlegającego prawu Hooke'a. ....	2
<b>Rysunek 2.</b> Wydłużenie pręta pod wpływem działania siły rozciągającej. ....	3
<b>Rysunek 3.</b> Powstawanie odkształceń podczas działania sił ścinających: (A) przed i (B) po działaniu sił stycznych do powierzchni. ....	5
<b>Rysunek 4.</b> Ilustracja struktury tkanek, którą tworzy zespół wyspecjalizowanych komórek (kolor niebieski) oraz otaczająca je macierz zewnątrzkomórkowa (kolor zielony). ....	9
<b>Rysunek 5.</b> Techniki służące do pomiaru własności mechanicznych pojedynczych komórek, imitujące rodzaje bodźców mechanicznych na które komórki są narażone. ....	10
<b>Rysunek 6.</b> Elementy strukturalne biorące udział w odbiorze i odpowiedzi mechanicznej w żywych komórkach. ....	14
<b>Rysunek 7.</b> Trzy typy filamentów białkowych tworzących cytoszkielet komórki: (A) filamety aktynowe, (B) filamety pośrednie, (C) mikrotubule (zaadoptowane z [58]). ....	15
<b>Rysunek 8.</b> Przykłady organizacji filamentów aktynowych w komórkach. (A) Struktura usieciowana, (B) równoległa wiązka filamentów, (C) topografia AFM filamentów aktynowych w żywej komórce w hodowli <i>in vitro</i> . ....	16
<b>Rysunek 9.</b> Mechanizm powstawania przerzutów nowotworowych. ....	18
<b>Rysunek 10.</b> Drogi tworzenia przerzutów w raku prostaty. Komórki rakowe mają zdolność do naciekania tkanek różniących się własnościami elastycznymi, takimi jak tkanka mózgowa czy macierz kości. ....	20

## Rozdział 2

<b>Rysunek 1.</b> Inicjatory polimeryzacji poliakrylamidu będące źródłem wolnych rodników. ....	29
<b>Rysunek 2.</b> Reakcja wolnorodnikowej polimeryzacji poliakrylamidu. Jest to polimeryzacja addycyjna, w wyniku której redukowane są wiązania wielokrotne występujące pomiędzy atomami węgla w cząsteczkach akrylamidu i bis-akrylamidu. ....	30
<b>Rysunek 3.</b> Widmo promieniowania elektromagnetycznego. ....	33
<b>Rysunek 4.</b> Schemat eksperymentu ATR. Wiązka promieniowania IR po wprowadzeniu do kryształu ATR ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu. Próbkę dociśnięta jest do zewnętrznej strony kryształu, przez co energia wiązki promieniowania IR może zostać częściowo zaabsorbowana. ....	34
<b>Rysunek 5.</b> Główne elementy tworzące reometr rotacyjny pracujący w geometrii (A) płytka-płytki i (B) stożek-płytki. ....	35

<b>Rysunek 6.</b> Przedstawienie zależności pomiędzy naprężeniem, a odkształceniem w pomiarze metodą oscylacyjną. Dla materiałów lepkosprężystych są one przesunięte w fazie o kąt $\delta$ . Amplitudy naprężenia oraz odkształcenia są oznaczone odpowiednio symbolami $\tau_0$ i $\gamma_0$ .	36
<b>Rysunek 7.</b> Podstawowe elementy tworzące mikroskop sił atomowych.	37
<b>Rysunek 8.</b> (A) Krzywa „siła-odległość” przedstawiająca zależność pomiędzy wychyleniem sprężynki, które jest przeliczne na wartość działającej siły, a położeniem Z skanera piezoelektrycznego rejestrowana podczas jednego cyklu zbliżania, naciskania, a następnie oddalania sondy AFM od powierzchni próbki. (B) Zasada wyznaczania własności elastycznych materiałów z użyciem mikroskopii sił atomowych. W wyniku odjęcia krzywej kalibracyjnej (kolor czarny) oraz pochodzącej z próbki (kolor czerwony) otrzymywana jest zależność siła nacisku – ugięcie materiału (indentacja).	38
<b>Rysunek 9.</b> (A) Obraz trójkątnej sondy AFM zarejestrowany w mikroskopie optycznym. (B) Obraz ostrza próbkującego w sondach AFM typu OTR4 uzyskany przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej (dzięki uprzejmości dra Piotra Bobrowskiego, IMIM PAN).	40
<b>Rysunek 10.</b> (A) Wartości współczynnika czułości detektora PSPD uzyskane dla wszystkich pomiarów. (B) Schemat pomiaru własności elastycznych żeli poliakrylamidowych. Krzywe „siła – odległość” rejestrowano w obrębie map o rozmiarze $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ w losowo wybranych obszarach na powierzchni żelu.	41
<b>Rysunek 11.</b> Schematyczna reprezentacja parametrów opisujących morfologię powierzchni. Linia przerywaną zaznaczono linię średnią profilu chropowatości. Parametry $R_p$ i $R_v$ to odpowiednio odległość od najwyższego wzniesienia i najniższego wgłębienia profilu od linii średniej, a $R_{max}$ to ich suma. $R_a$ reprezentuje średnie arytmetyczne, a RMS średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości od linii średniej.	43
<b>Rysunek 12.</b> Widmo FTIR-ATR roztworu zawierającego 15% w/v akrylamidu i 0.4% w/v bis-akrylamidu oraz żelu powstałego po polimeryzacji tego roztworu. Niebieskim kolorem zaznaczono położenie pasm, dla których obserwowane są największe różnice pomiędzy widmem roztworu, a spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym.	45
<b>Rysunek 13.</b> Widmo FTIR-ATR żeli poliakrylamidowych o stałym udziale czynnika sieciującego (bis) i zmiennym udziale monomerów akrylamidu (aa), równych 3%, 7% i 15% w/v. Niebieskim kolorem zaznaczono pasma, w których obserwuje się różnice pomiędzy żelami.	46
<b>Rysunek 14.</b> Zależność modułów sprężystości $G'$ i stratności $G''$ od (A) naprężenia ścinającego oraz (B) częstotliwości oscylacji zmierzona dla podłoży wykonanych z żelu poliakrylamidowego o stężeniu 3% akrylamidu i 0.4% bis-akrylamidu. Testy zostały przeprowadzone dla wszystkich badanych żeli poliakrylamidowych o stężeniu akrylamidu od 3% w/v do 15% w/v.	47
<b>Rysunek 15.</b> Pojedynczy pomiar modułu $G'$ i $G''$ przy stałych wartościach naprężenia (1 Pa) i częstotliwości (1 Hz) w czasie polimeryzacji żelu o zawartości (A) 3% akrylamidu i (B) 15% akrylamidu oraz stałej ilości 0.4% bis-akrylamidu.	48



<b>Rysunek 16.</b> (A) Pomiar modułu $G'$ w czasie polimeryzacji żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu akrylamidu i stałym stężeniu czynnika sieciującego. (B) Stosunek wartości modułu sprężystości $G'$ do modułu stratności $G''$ dla żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu akrylamidu. ....	46
<b>Rysunek 17.</b> Wartości modułu sprężystości $G'$ dla różnych stężeń monomerów akrylamidu i stałego stężeniu czynnika sieciującego bis-akrylamidu (0.4% w/v). Linia czerwona zaznaczona teoretyczną wartość $G'$ przy założeniu, że wszystkie cząsteczki czynnika sieciującego zostały związane.....	51
<b>Rysunek 18.</b> Rozkłady wartości modułu Younga dla żeli poliakrylamidowych o różnym stężeniu monomerów akrylamidu. ....	53
<b>Rysunek 19.</b> Wartości modułu Younga otrzymane przy użyciu techniki AFM dla współczynników Poissona równych 0.3 i 0.5 w funkcji modułu sprężystości otrzymanego przy użyciu reometru rotacyjnego.....	55
<b>Rysunek 20.</b> Topografia powierzchni podłoży poliakrylamidowych po dehydratacji. ....	57

### Rozdział 3

<b>Rysunek 1.</b> Komórki prostaty (A) PZ-HPV-7, (B) Du145 i (C) PC-3. Obrazy fluorescencyjne przedstawiające cytoszkielet aktynowy, wybarwiony przy użyciu falloidyny znakowanej fluoroforem Alexa Fluor 488. Skala równa 80 $\mu\text{m}$ .....	66
<b>Rysunek 2.</b> Pomiar krzywych siła-odległość w mikroskopie sił atomowych (rysunek nie w skali). ....	69
<b>Rysunek 3.</b> Morfologia komórek linii PZ-HPV-7 (A), Du145 (B) i PC-3 (C) w hodowli na szkle. Obrazy fluorescencyjne przedstawiają cytoszkielet aktynowy (kolor zielony), wybarwiony przy użyciu falloidyny znakowanej fluoroforem Alexa Fluor 488 oraz jądro komórkowe (niebieski) zabarwione odczynnikiem Hoechst. Skala wynosi 10 $\mu\text{m}$ . ....	72
<b>Rysunek 4.</b> Rozkłady wartości pola powierzchni, obwodu oraz sferyczności komórek prostaty rosnących na szkle wyznaczone po 24 h hodowli. Panel A-C przedstawia rozkład pola powierzchni komórek, panel D-F rozkład obwodu komórek, a panel G-I rozkład ich sferyczności. ....	74
<b>Rysunek 5.</b> Wartości miar kształtu histogramu, tj. kurtozy i skośności wyznaczonych dla rozkładów przedstawionych na Rysunku 5 opisujących morfologię badanych komórek. ....	75
<b>Rysunek 6.</b> Rozkłady wartości modułu Younga dla linii komórkowych PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 dla niewielkiej głębokości indentacji 200 nm oraz dla dużej głębokości indentacji 600 nm. Wykresy A, B, C przedstawiają komórki po 24 h hodowli, D, E, F – po 48 h hodowli, a G, H, I po 72 h hodowli. ....	77
<b>Rysunek 7.</b> Zależność modułu Younga w funkcji głębokości indentacji dla komórek linii PZ-HPV-7 (kwadraty), Du145 (koła) i PC-3 (trójkąty) po 24 h (A), oraz 72 h hodowli (B). (C, D) relacje wartości modułu Younga dla linii PZ-HPV-7, Du145 oraz PC-3 wyznaczone na maksymalnej głębokości indentacji 600 nm po 24 h (C), oraz 72 h hodowli (D). Istotność statystyczna $***P < 0.001$ została potwierdzona przy użyciu t-testu Studenta. ....	78

<b>Rysunek 8.</b> Porównanie wartości modułu Younga wyznaczonych w niniejszej pracy z wartościami literaturowymi. ....	79
<b>Rysunek 9.</b> (A) Rozkład wartości parametru R dla trzech linii komórkowych PZ-HPV-7, Du145, PC-3. (B) Wartość średnia parametru R oraz jej odchylenie standardowe dla badanych typów komórek wynosi odpowiednio: $0.60 \pm 0.12$ dla PZ-HPV-7, $0.51 \pm 0.13$ dla Du145 oraz $0.48 \pm 0.17$ dla PC-3. Oznaczenie istotności statystycznej: $***P < 0.001$ , bs – brak różnic istotnych statystycznie.....	80
<b>Rysunek 10.</b> Wyznaczenie czasu podwojenia populacji komórek na podstawie zdjęć fluorescencyjnych rejestrowanych w czterech kolejnych punktach czasowych. (A) Dopasowanie równania (6) do wyznaczonej eksperymentalnie średniej liczby komórek. (B) Czas podwojenia dla komórek linii prawidłowej PZ-HPV-7 jest najdłuższy i wynosi $46.7 \pm 3.9$ [h], krótszy dla komórek Du145 $29.8 \pm 2.6$ [h], i najkrótszy dla komórek PC-3 $25.5 \pm 2.5$ [h]. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę ( $***P < 0.001$ ) pomiędzy czasem podwojenia populacji komórek linii prawidłowej, a liniami nowotworowymi oraz brak istotnej statystycznie różnicy (bs) pomiędzy linią komórek PC-3, a linią Du145.....	81

## Rozdział 4

<b>Rysunek 1.</b> Struktura chemiczna czynnika sieciującego Sulfo-SANPAH. (A) ester sulfo-N-hydroksybursztynoimidowy łączący się z pierwszorzędową grupą aminową białka oraz (B) pierścień azydku nitroaniliny łączący się z poliakrylamidem. ....	89
<b>Rysunek 2.</b> Pierścień nitroaniliny zawierający przyłączony fotoreaktywny anion azydkowy. W wyniku działania promieniowania UV grupa azydkowa przechodzi w nitren, który łączy się z atomami węgla poliakrylamidu. Reakcji towarzyszy wydzielenie cząsteczkowego azotu.....	89
<b>Rysunek 3.</b> Ester sulfo-NHS reaguje z pierwszorzędową grupą aminową znajdującą się na powierzchni białka tworząc stabilne wiązanie amidowe z jednoczesnym uwolnieniem reszty sulfo-NHS. R oznacza resztę czynnika sieciującego połączoną z powierzchnią żelu poliakrylamidowego. ....	90
<b>Rysunek 4.</b> Obrazy fluorescencyjne fibronektyny znakowanej barwnikiem Alexa Fluor 488, immobilizowanej na powierzchni usieciowanego czynnikiem Sulfo-SANPAH żelu poliakrylamidowego o sztywności 0.4 kPa, 9.3 kPa i 41 kPa (skala wynosi 30 $\mu$ m). ....	95
<b>Rysunek 5.</b> Obrazy fluorescencyjne cytoszkieletu aktynowego komórek linii prawidłowej prostaty PZ-HPV-7, oraz dwóch linii rakowych Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa, 9.3 kPa, 41 kPa oraz na szkłe po 24 h hodowli (skala wynosi 30 $\mu$ m).....	96
<b>Rysunek 6.</b> (A) Pole powierzchni komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoża poliakrylamidowych, wyrażonej jako moduł sprężystości $G'$ 24 h po wysianiu. (B) Nachylenie prostej $A_R$ (wyznaczone poprzez dopasowanie funkcji liniowej do zależności na Rys. 6A) odzwierciedla szybkość zmian pola powierzchni komórek w funkcji sztywności podłoża. ....	97

<b>Rysunek 7.</b> Pole powierzchni komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych, wyrażonej jako moduł sprężystości $G'$ po (A) 48 h, (B) 72 h od wysiania. ....	99
<b>Rysunek 8.</b> Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 24 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: *** $P < 0.001$ , bs – brak różnic istotnych statystycznie.....	101
<b>Rysunek 9.</b> Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 48 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: *** $P < 0.001$ , ** $P < 0.01$ .....	102
<b>Rysunek 10.</b> Własności elastyczne komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o sztywności 0.4 kPa (A,B), 9.3 kPa (C,D) i 41 kPa (E,F) po 72 h hodowli. Lewy panel (A, C, E) przedstawia rozkłady wartości modułu Younga dla wszystkich komórek. Prawy panel (B, D, F) przedstawia wartości średnie modułu Younga oraz ich odchylenia standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: *** $P < 0.001$ , * $P < 0.05$ .....	103
<b>Rysunek 11.</b> Wartość modułu Younga w funkcji sztywności podłoży poliakrylamidowych (wyrażona jako $G'$ ). Wartości modułu Younga wyznaczono odpowiednio na głębokości indentacji 100 nm (A), 200 nm (B), 300 nm (C), 400 nm (D), 500 nm (E) i 600 nm (F). Powyższe wartości uzyskano dla komórek zmierzonych po 24 h hodowli. Analogiczna analiza została przeprowadzona dla komórek rosnących przez 48 h i 72 h (dane nie pokazane). ....	104
<b>Rysunek 12.</b> Idea wyznaczania parametru $S_R$ dla różnych głębokości indentacji na przykładzie linii komórkowej PC-3.....	105
<b>Rysunek 13.</b> Parametr $S_R$ wyznaczony jako nachylenie prostych z Rysunku 11, odzwierciedlający szybkość zmian elastyczności komórek w funkcji sztywności podłoża dla (A) 24 h, (B) 48 h i (C) 72 h od wysiania.....	106
<b>Rysunek 14.</b> Czas podwojenia populacji komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji sztywności podłoża hodowlanego (wyrażonej jako wartość $G'$ ) oraz w hodowli na szkle.....	107
<b>Rysunek 15.</b> Czas podwojenia populacji komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 w funkcji pola ich powierzchni. ....	108

# Spis Tabel

## Rozdział 1

**Tabela 1.** Moduł elastyczności prawidłowych oraz nowotworowych tkanek prostaty wyznaczony z użyciem różnych technik badawczych..... 8

## Rozdział 2

**Tabela 1.** Przygotowanie roztworów akrylamidu i bis-akrylamidu do polimeryzacji żeli poliakrylamidowych. .... 32

**Tabela 2.** Identyfikacja pasm absorpcyjnych odpowiedzialnych za polimeryzację żeli poliakrylamidowych;  $\nu$  – drgania rozciągające,  $\delta$  – drgania deformacyjne nożycowe,  $\gamma$  – drgania deformacyjne szkieletowe. .... 45

**Tabela 3.** Wartości  $G'$  i  $G''$  żeli poliakrylamidowych o różnej zawartości monomerów akrylamidu zmierzone metodą oscylacyjną ( $x$  – wartość średnia;  $SD$  – odchylenie standardowe). .... 49

**Tabela 4.** Szacunkowy stopień przereagowania bis-akrylamidu  $a$  w reakcji polimeryzacji z monomerami akrylamidu o różnym stężeniu. .... 52

**Tabela 5.** Wartości modułu Younga podłoży poliakrylamidowych o różnej zawartości monomerów akrylamidu wyznaczone dla współczynnika Poissona o wartości 0.3, 0.4, i 0.5. .... 54

## Rozdział 3

**Tabela 1.** Wartości pola powierzchni, obwodu i sferyczności komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 zaprezentowane jako wartość średnia  $\pm$   $SD$  wyznaczonych z dopasowania funkcji logarytmicznie normalnej. .... 73

## Rozdział 4

**Tabela 1.** Wartości średnie pola powierzchni ( $A$ ) komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 rosnących na podłożach poliakrylamidowych o różnej sztywności. .... 98

**Tabela 2.** Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (24 h)..... 101

**Tabela 3.** Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (48 h)..... 102

**Tabela 4.** Procentowa zmiana wartości modułu Younga dla komórek linii PZ-HPV-7, Du145 i PC-3 pomiędzy podłożami o sztywności 0.4 kPa i 9.3 kPa oraz 0.4 kPa i 41 kPa (72 h)..... 103

