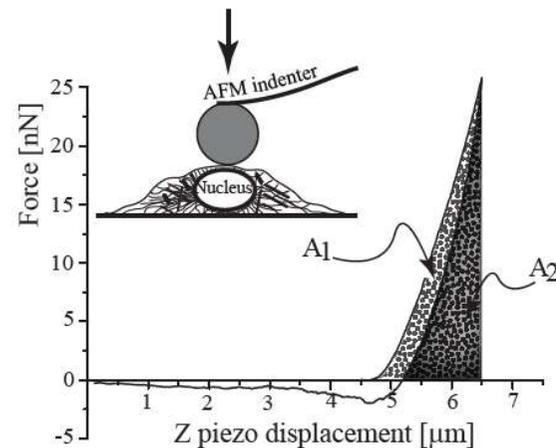


L'indice di plasticità

- Rappresenta una misura della viscoelasticità della cellula a tempi brevi (anche se «plasticità» indica comunemente una deformazione permanente)
- È ottenuta dall'isteresi tra la curva di andata e la curva di ritorno (aree sottese fino al punto di contatto)

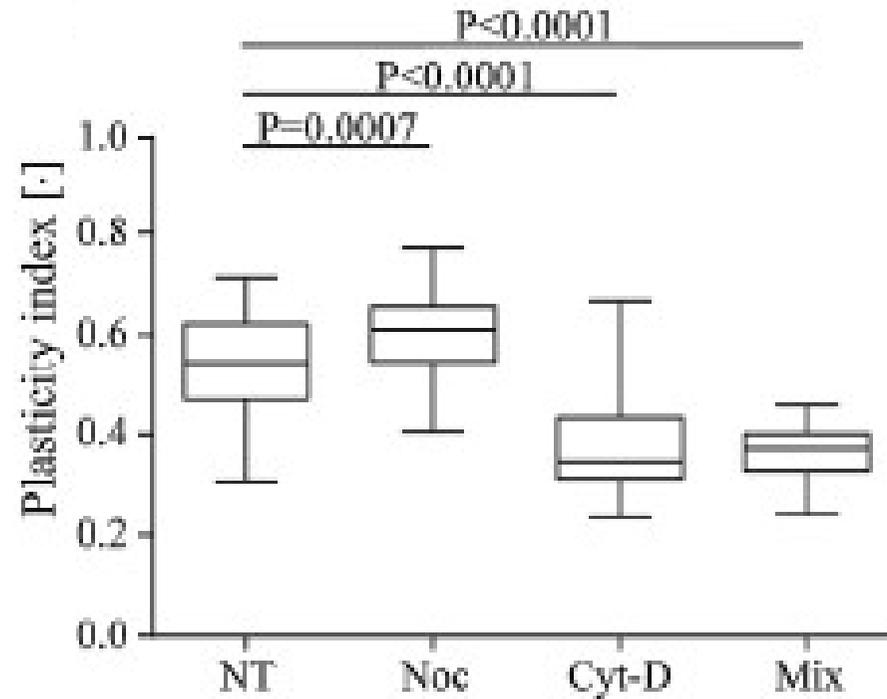


$$\zeta = 1 - (A_2/A_1)$$

- $\zeta = 0$ indica un materiale elastico ($A_1=A_2$)
- $\zeta = 1$ indica un materiale «plastico» ($A_2=0$)
- $0<\zeta<1$ indica un materiale viscoelastico

Esempio di misure di ζ

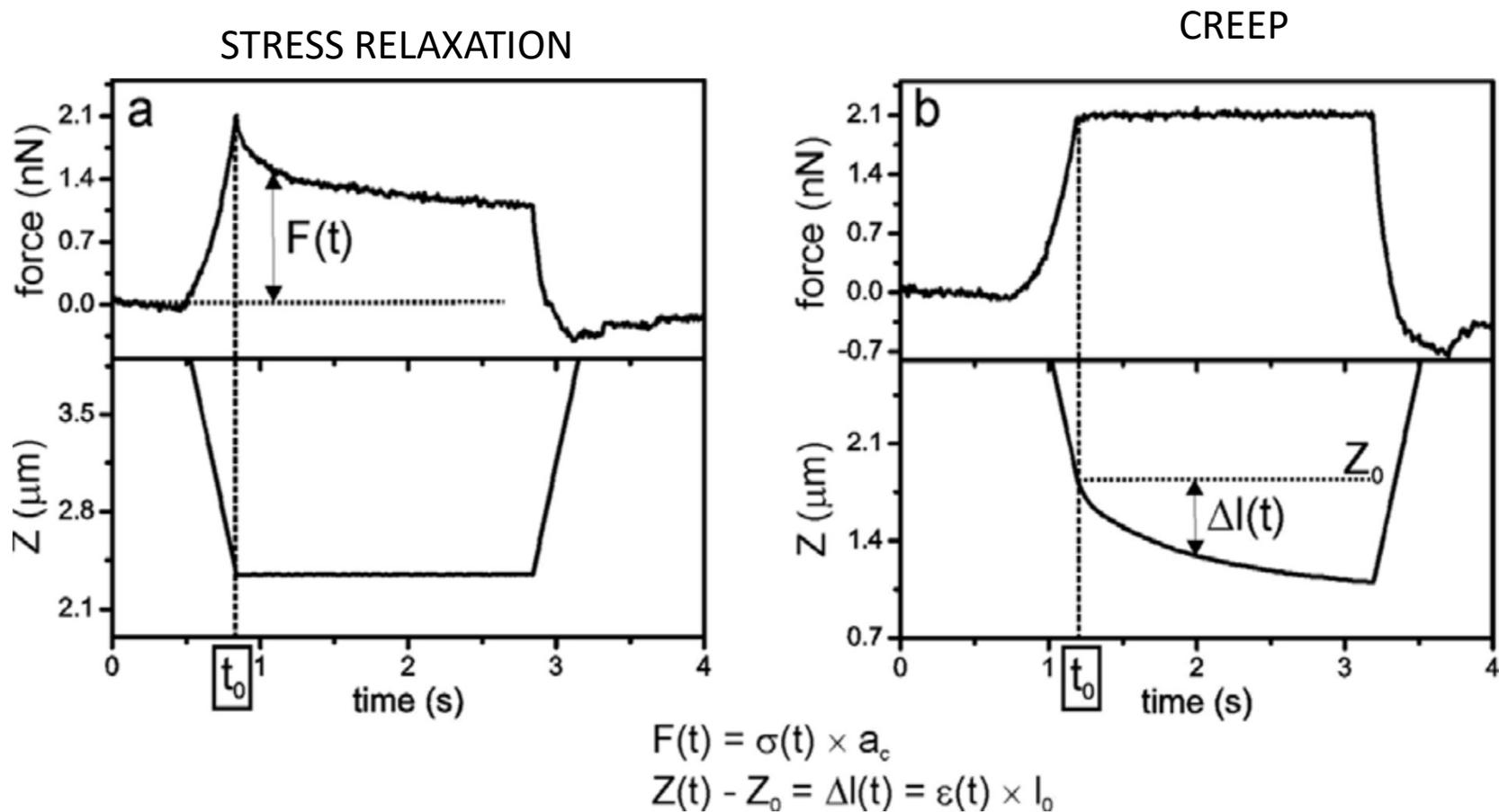
- Effetto del trattamento di depolimerizzazione chimica di microfilamenti di actina (con citocalasina-D) e/o di microtubuli (con nocodazolo) su cellule HeLa (su zona nucleare)



Box plots relative to cell stiffness of HeLa cells after different chemical treatments: NT = Not Treated, Noc = Nocodazole (10 μ M), Cyt-D = Cytochalasin-D (5 μ M), Mix =Mixture 1:1 of nocodazole and cytochalasin-D.

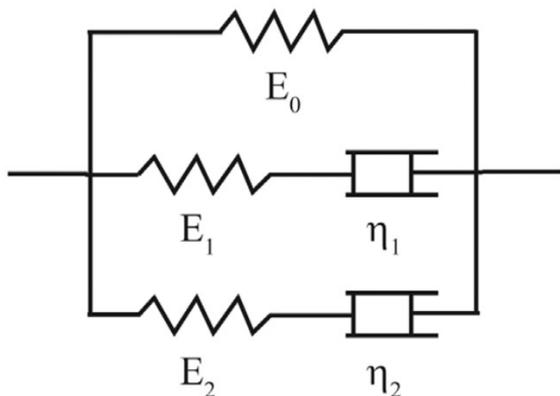
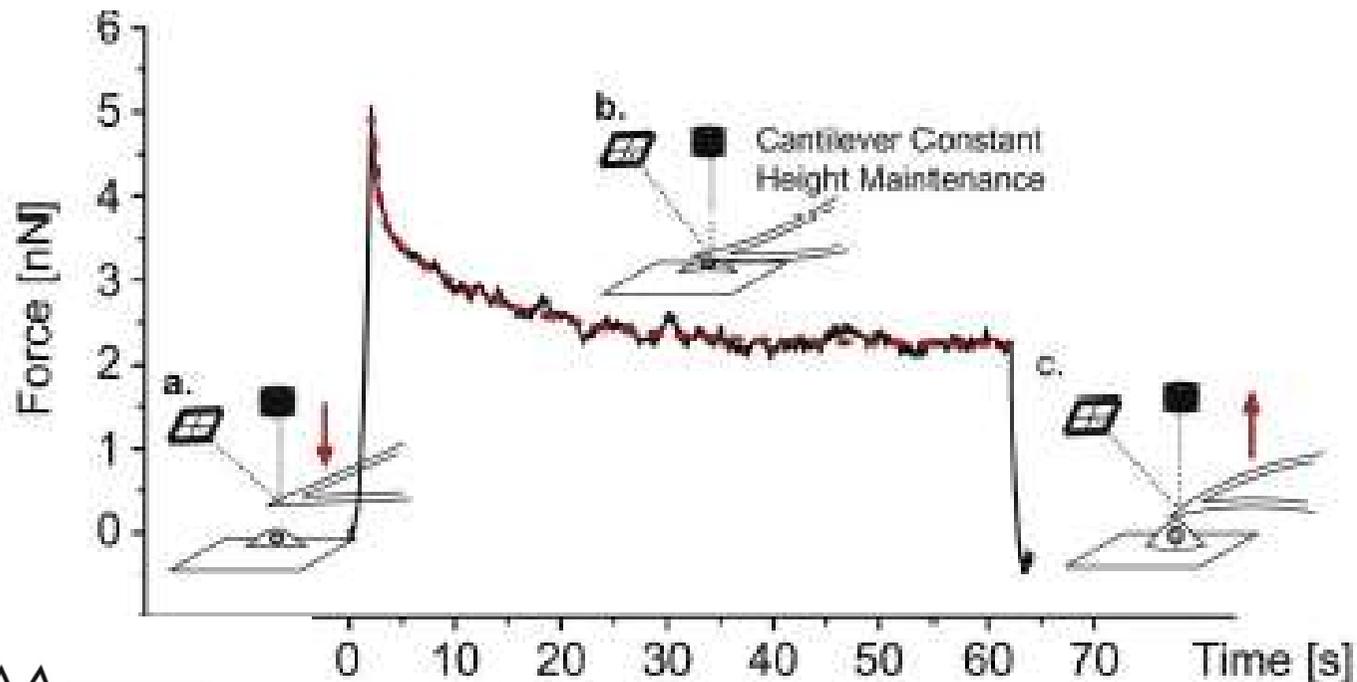
Stress relaxation e creep

- Le prove sono effettuate lasciando il cantilever ad altezza costante (stress relaxation) o a forza costante (creep) per un certo tempo sul campione e misurando la risposta della cellula



Es. stress relaxation su cellule HeLa

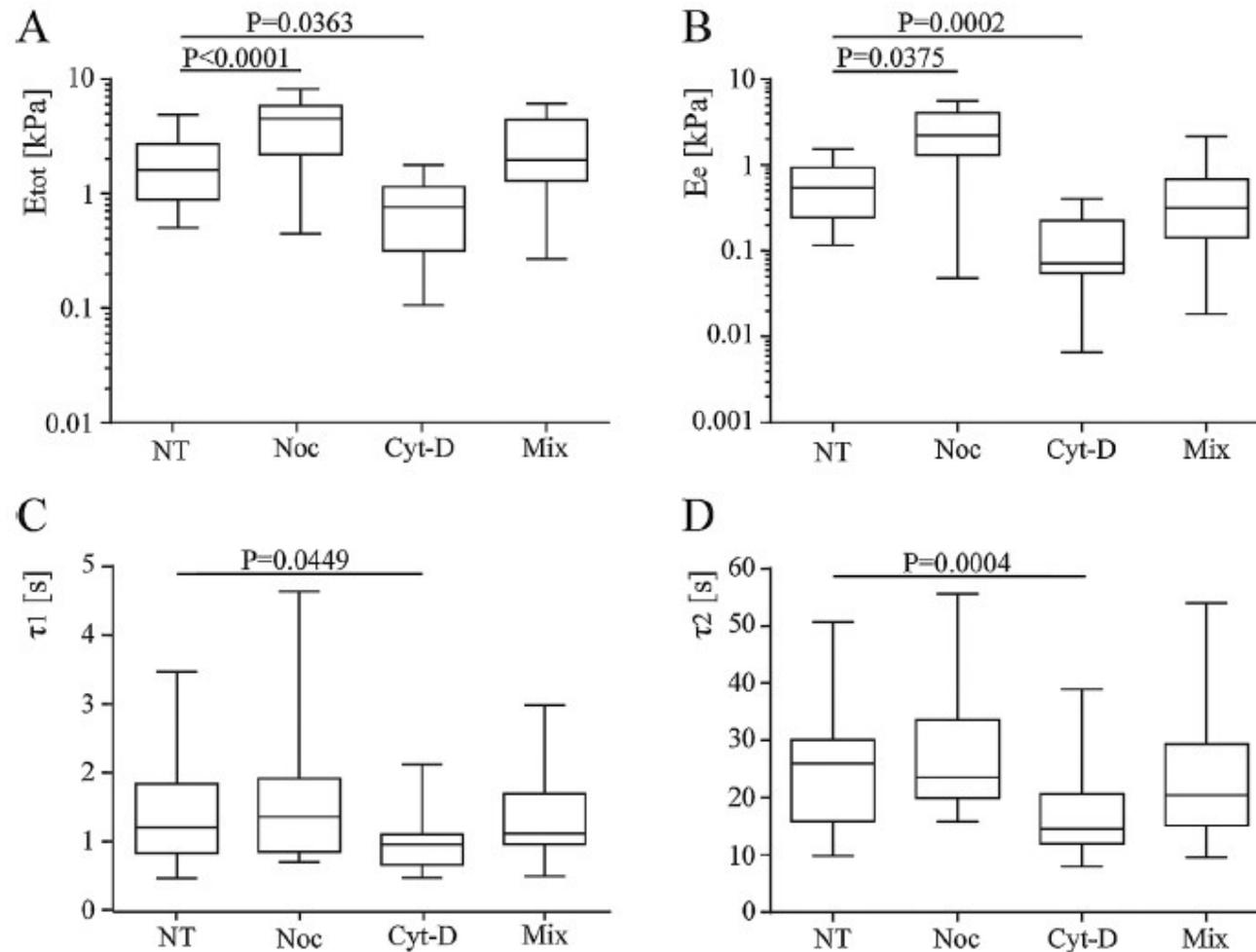
Il profilo di rilassamento di forza, trasformato in modulo di rilassamento (sforzo/deformazione) vs tempo può essere rappresentato da una combinazione di elementi elastici e viscosi (es. modello di Maxwell generalizzato)



$$E(t) = E_e + E_1 e^{-t/\tau_1} + E_2 e^{-t/\tau_2}$$

Es. stress relaxation su cellule HeLa

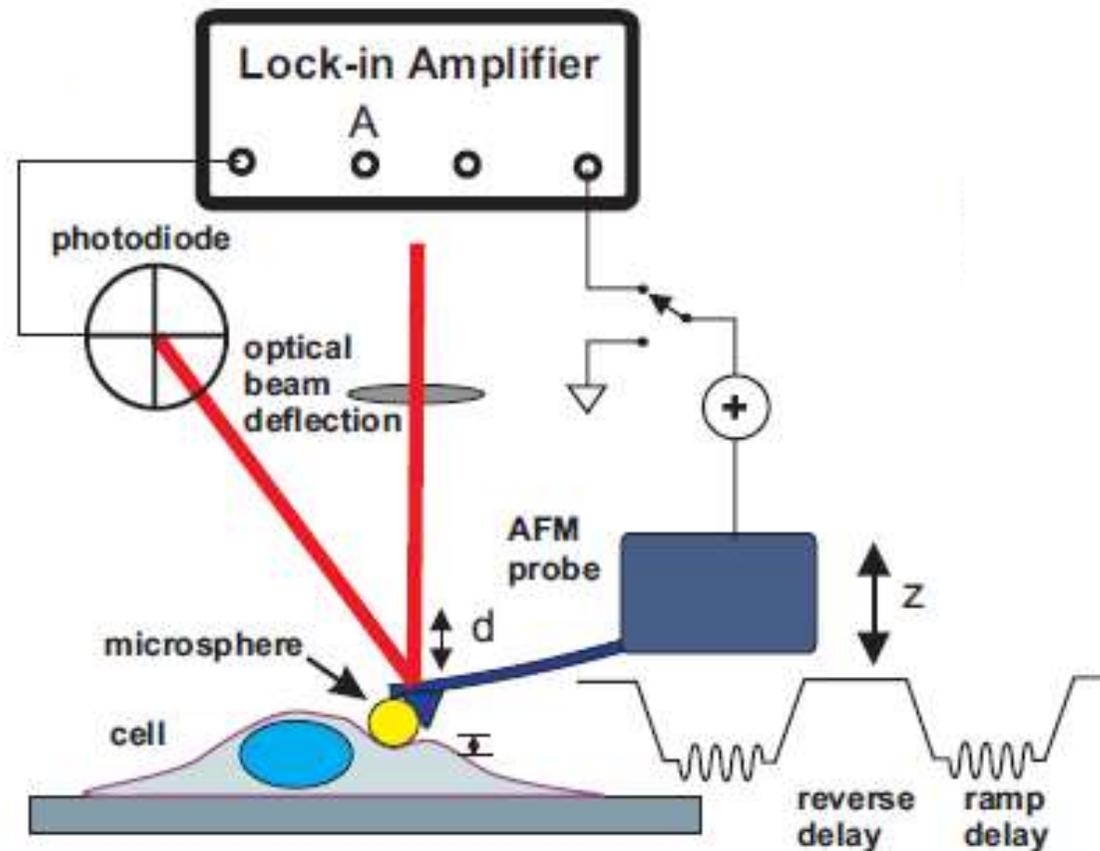
- Effetto del trattamento di depolimerizzazione chimica di microfilamenti di actina (con citocalasina-D) e/o di microtubuli (con nocodazolo) su cellule HeLa (zona nucleare). Indentazione del 30% dell'altezza iniziale



Box plots relative to the elastic moduli $E_{tot} = E_e + E_1 + E_2$ (A) and E_e (B) and the two decay times τ_1 (C) and τ_2 (D) obtained from the stress relaxation tests on HeLa cells after different chemical treatments. NT= Not Treated, Noc = Nocodazole, Cyt-D = Cytochalasin-D, Mix = Mixture of nocodazole and cytochalasin-D. 75

Misure in regime oscillatorio

- Sono ottenute mettendo in contatto la cellula con la sonda e poi imponendo al piezo in z un regime oscillatorio (nm). Il segnale registrato dal fotodiodo fornisce la risposta in oscillatorio del campione



Derivazione dei parametri viscoelastici

Per un indentatore sferico:

$$F = \frac{4R^{1/2}}{3(1-\nu^2)} \left(E_0 \delta_0^{3/2} + \frac{3}{2} E_1 \delta_0^{1/2} \delta_1 \right),$$

- E_0 e δ_0 sono il modulo elastico e l'indentazione senza modulazione
- E_1 è il modulo elastico dipendente dalla frequenza, $E_1 = 2(1+\nu)G^*$
- δ_1 è l'indentazione durante la modulazione

Il modulo complesso di taglio viene calcolato come:

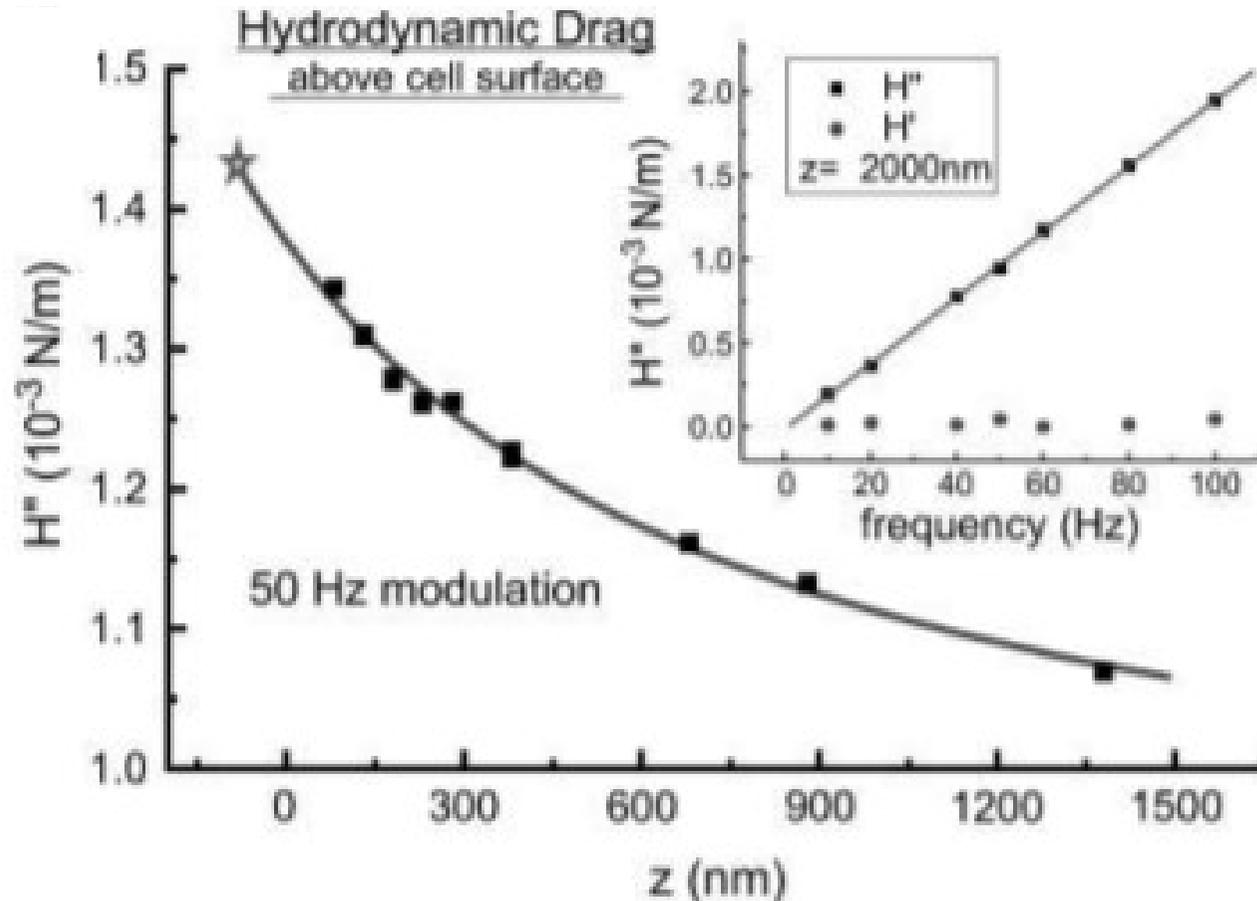
$$G^* = G' + iG'' = \frac{1-\nu}{4(R\delta_0)^{1/2}} \left[\frac{F_1}{\delta_1} - ib(0)f \right].$$

funzione complessa legata
all'oscillazione imposta

resistenza idrodinamica
 $iH'' = ib(h)f$ calcolata in contatto con
la cellula ($h = 0$)

BA Smith et al, Biophysical Journal, Volume 88, Issue 4, April 2005, Pages 2994-3007

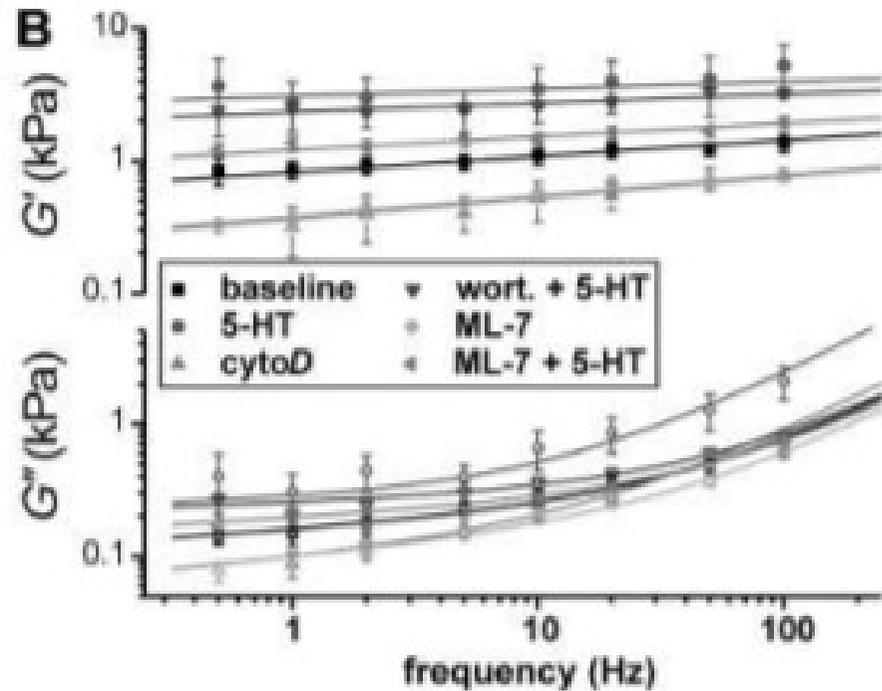
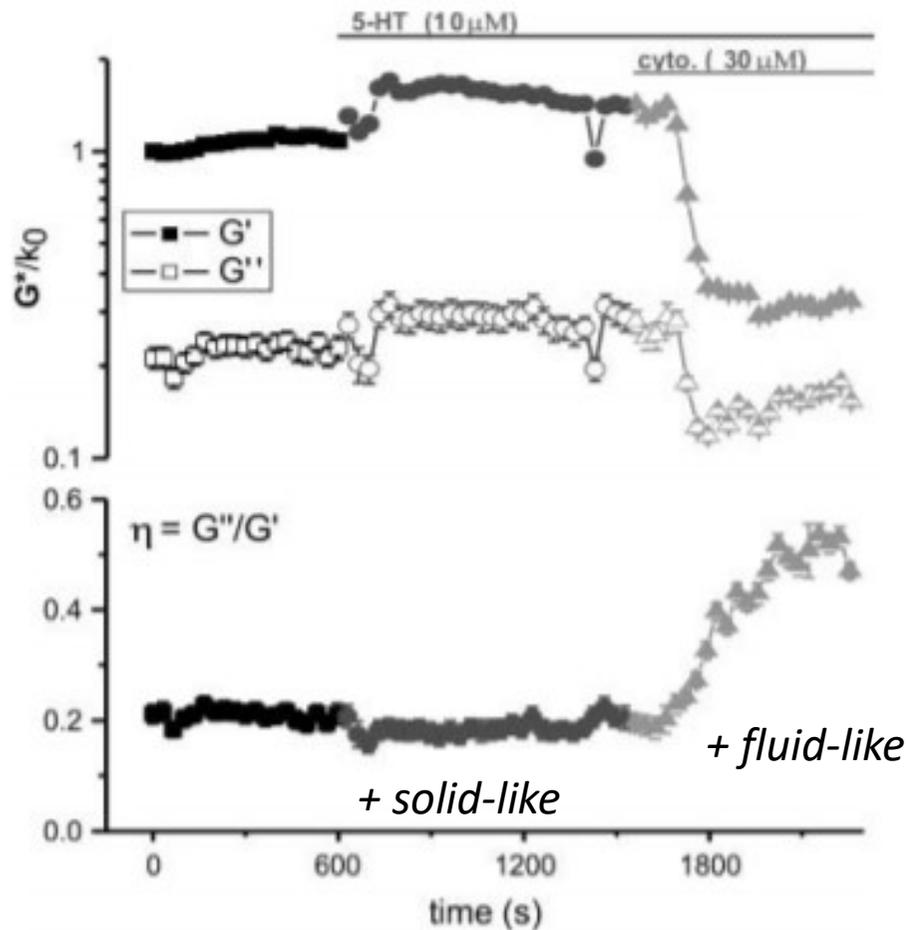
Misura della resistenza idrodinamica



A sample calibration of the hydrodynamic drag on a beaded AFM probe above a cell surface. The fit to the scaled spherical drag function and its extrapolation to surface indentation (q) are shown. The inset shows the linear dependence of the hydrodynamic drag on modulation frequency, and the purely viscous nature of this drag (H' is the in-phase elastic component which is negligible compared to the out-of-phase viscous component, H'')

Esempio applicativo

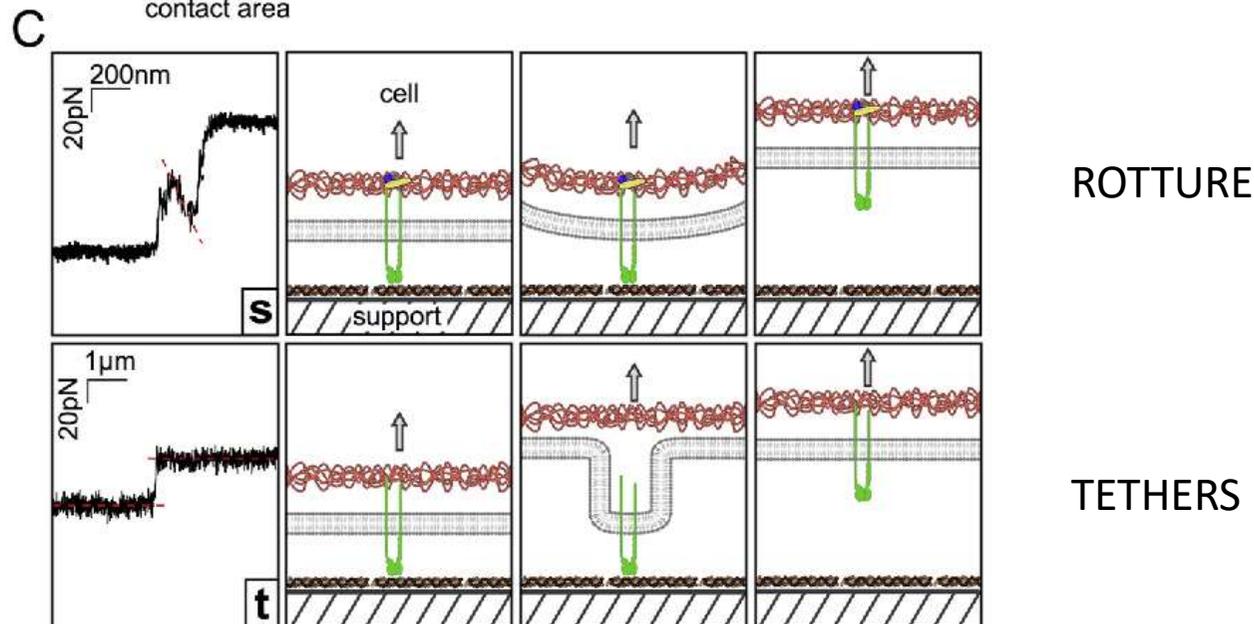
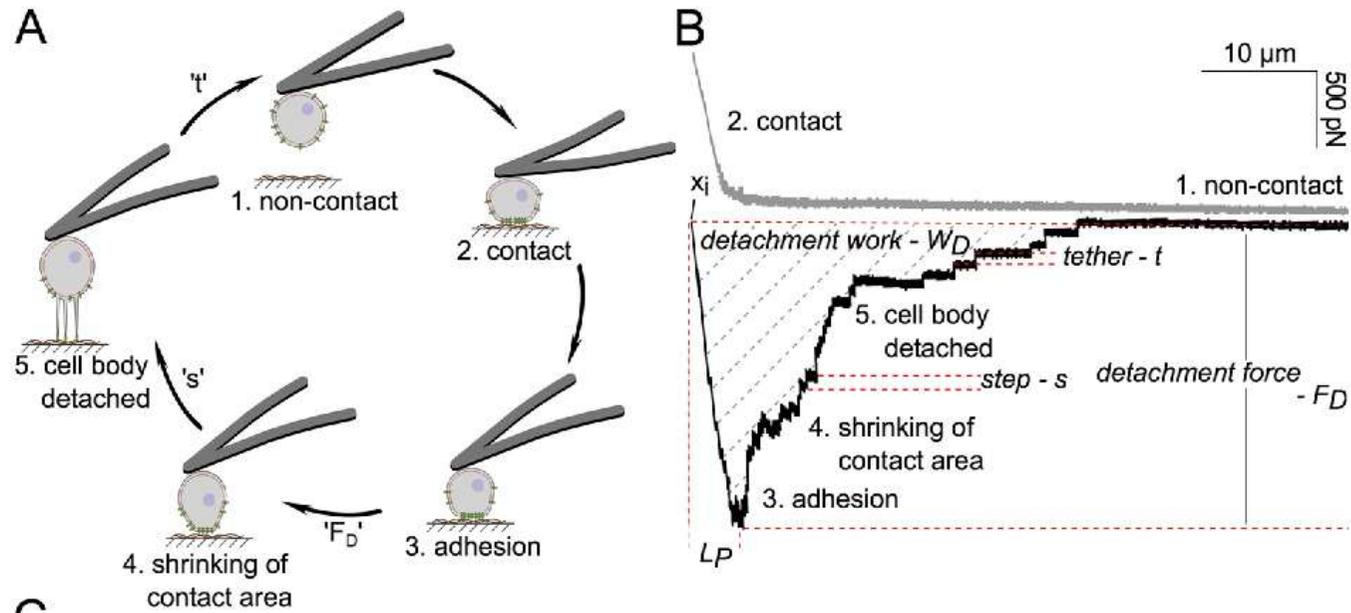
- Comportamento reologico di cellule muscolari lisce delle vie aeree sottoposte ad agonista della contrazione (5-HT) e a depolimerizzazione di F-actina (cytoD)



Proprietà di adesione

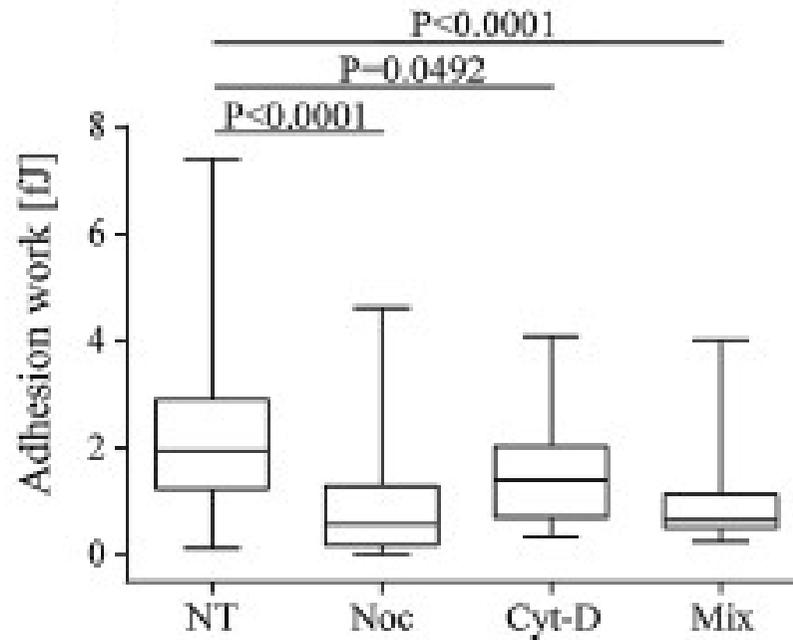
- La curva di ritiro fornisce una misura dell'adesione tra la sonda e il campione
- L'adesione è aspecifica (forze di VdW, interazioni steriche idrofiliche/idrofobiche) nel caso di punte non funzionalizzate
- È possibile funzionalizzare la punta con biomolecole per studiare l'adesione specifica
- È possibile anche far aderire una cellula al cantilever e misurare le interazioni con altre cellule o con il substrato
- Le grandezze considerate sono generalmente:
 - Forza di adesione: Massima forza necessaria al distacco cellula-sonda
 - Energia (lavoro) di adesione: Energia necessaria al distacco cellula-sonda
 - Rotture di legame nell'interazione cellula-sonda
 - Formazione di nanotubi di membrana (tethers)

Es. Adesione cellula-substrato



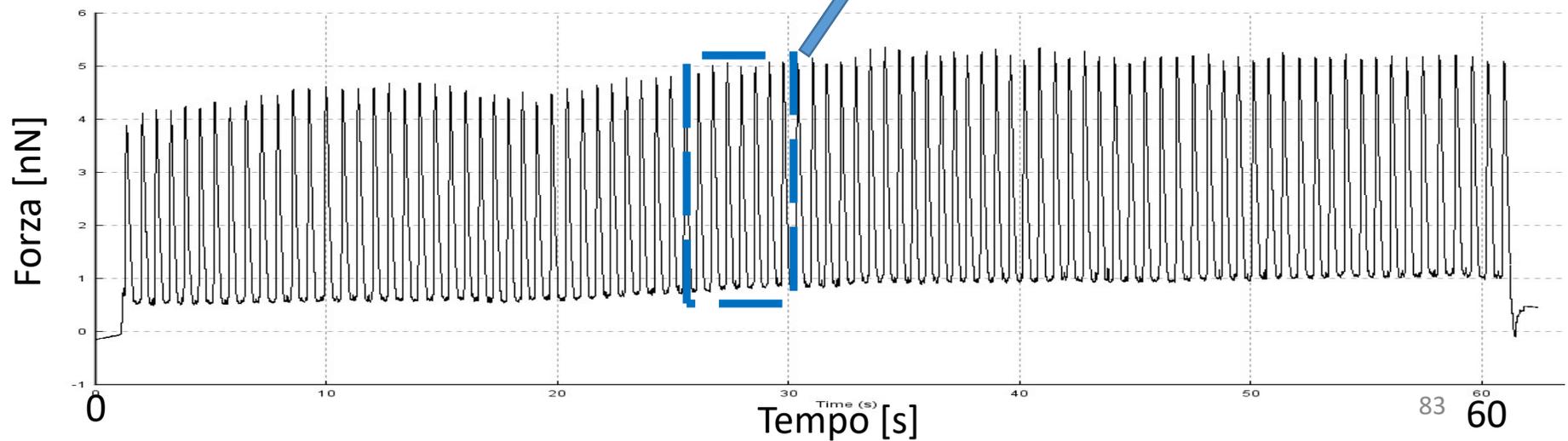
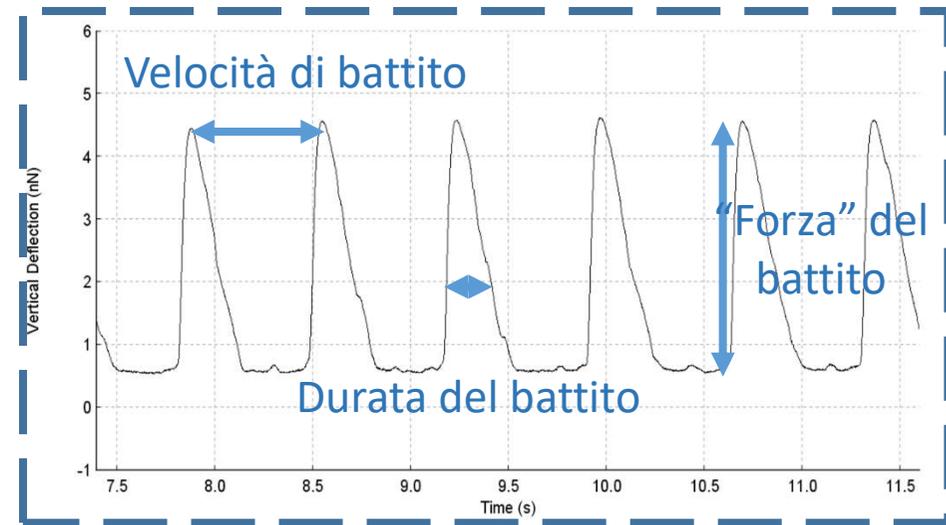
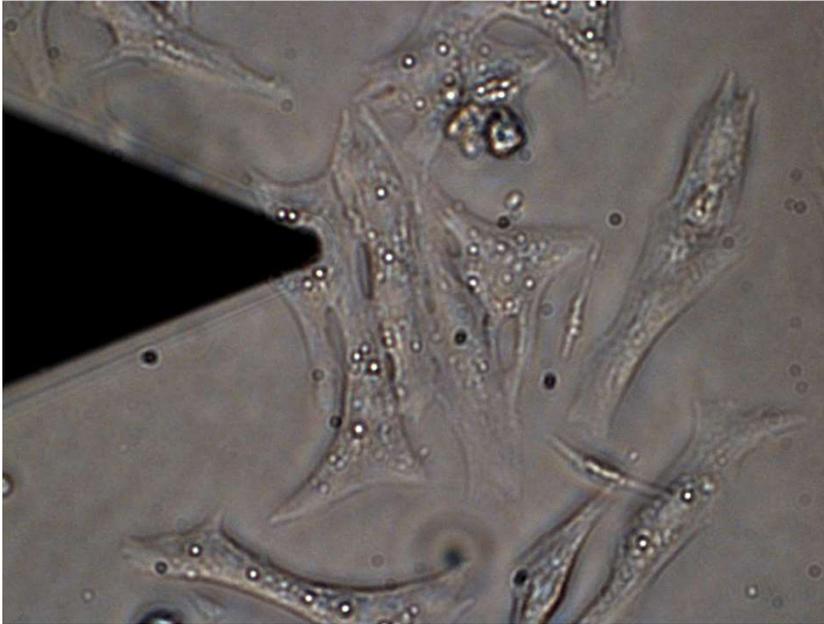
Esempio di adesione sfera-cellula

- Effetto del trattamento di depolimerizzazione chimica di microfilamenti (citocalasina-D) e/o di microtubuli (nocodazolo) su cellule HeLa (adesione non specifica)



Box plots relative to adhesion work of HeLa cells after different chemical treatments: NT = Not Treated, Noc = Nocodazole (10 μ M), Cyt-D = Cytochalasin-D (5 μ M), Mix = Mixture 1:1 of nocodazole and cytochalasin-D.

Caratterizzazione dell'attività contrattile



Misure con l'AFM

<https://www.jove.com/video/50497/measuring-mechanical-properties-living-cells-using-atomic-force>

Vantaggi/svantaggi dell'AFM su cellule

- Vantaggi

- Risoluzione spaziale nanometrica (dipende dalla sonda)
- Range di forza applicabile: 1 pN - 100 nN
- Non necessita preparazione del campione
- Accoppiabile con microscopio ottico/confocale
- Permette controllo ambientale (terreno, T, pH)

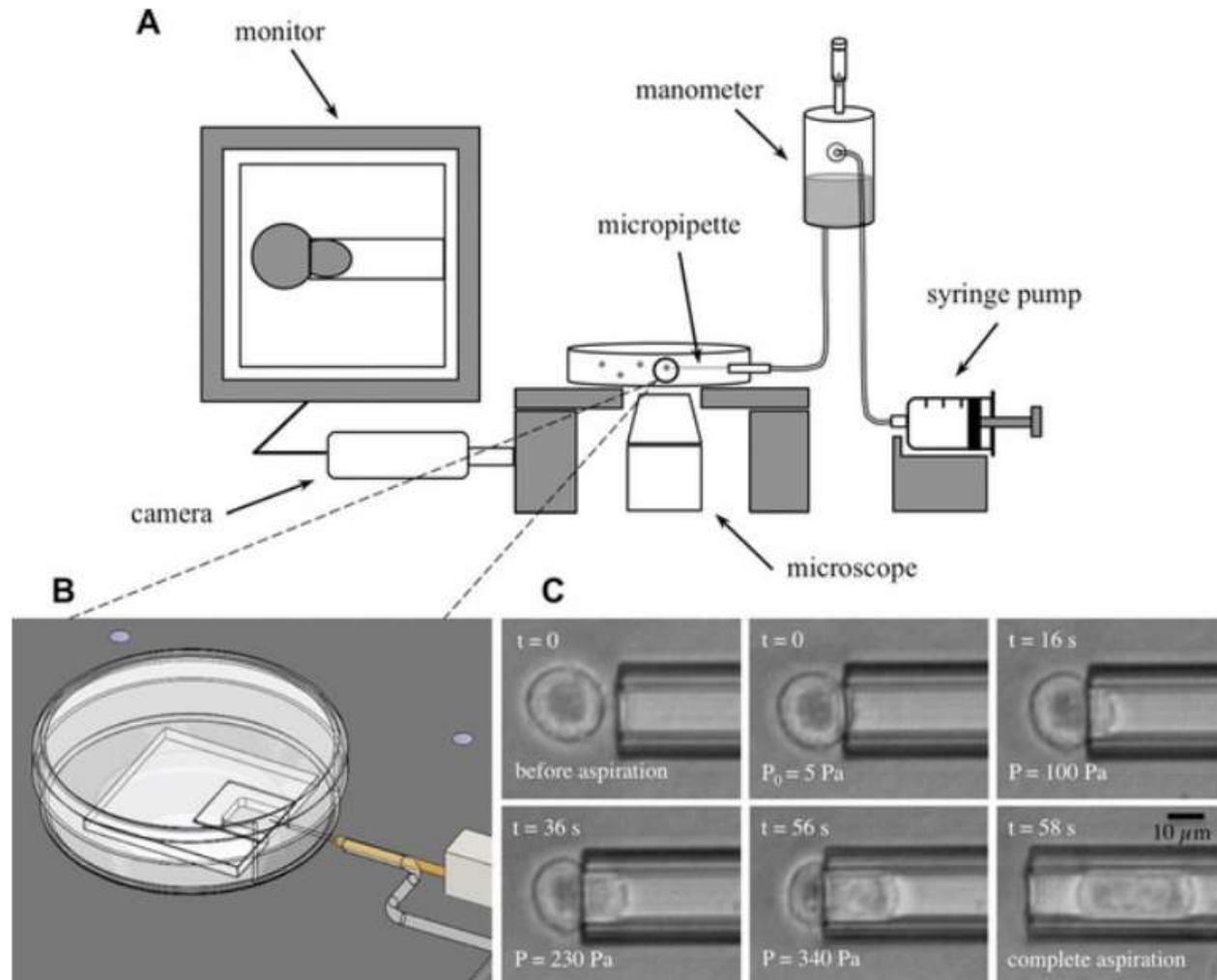
- Svantaggi

- Limitato campo di scansione (soprattutto in Z, solitamente 15 μm)
- Lunghi tempi di misura
- Permette lo studio solamente di campioni adesi al substrato
- I risultati dipendono da condizioni sperimentali (tipo di sonda, zona di misura, velocità di carico/scarico)

Aspirazione con micropipetta

- È una tecnica utilizzata per determinare il comportamento visco-elastico sia dell'intera cellula che di porzioni subcellulari (membrane, nucleo..)
- È utilizzata per la caratterizzazione meccanica sia di cellule **in sospensione** che di cellule **in adesione**
- Vengono utilizzati dei microcapillari in vetro (micropipette) con diametro da 2 a 50 μm .
(<https://www.youtube.com/watch?v=qv3xIMAQSmU>)
- Un micromanipolatore su cui è montato il capillare viene utilizzato per posizionare il capillare in contatto con la cellula, fino a farla aderire
- Attraverso l'applicazione di una pressione negativa, la cellula viene aspirata all'interno del capillare.
- Viene misurata al microscopio ottico la porzione della cellula interna al capillare (spesso le cellule vengono marcate per fluorescenza per aumentare il contrasto)

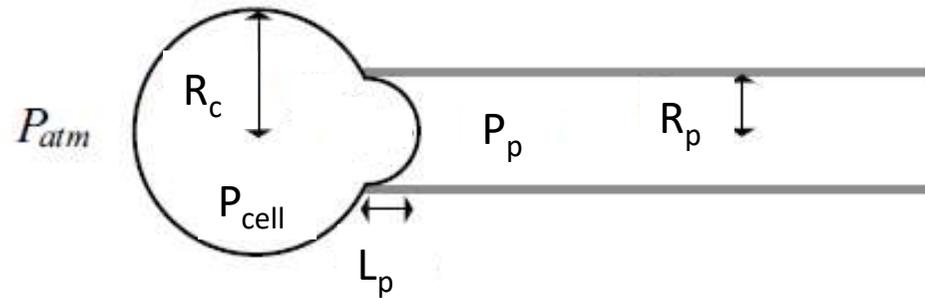
Aspirazione con micropipetta



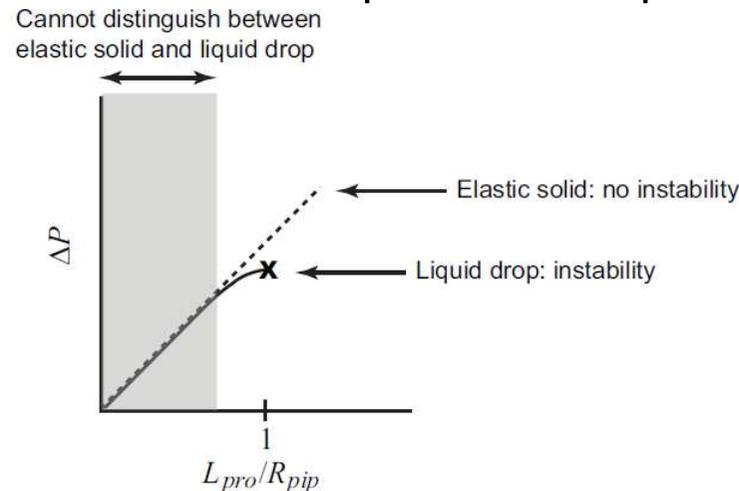
- <http://www.youtube.com/watch?v=ItLeIZOo-QE>

Aspirazione con micropipetta

- Le grandezze in gioco sono:



- se per $\Delta P > \Delta P_c$ ($\Delta P_c = \Delta P$ tale che $L_p = R_p$):
 - la cellula viene completamente aspirata = comportamento "liquido"
 - la cellula si estende dentro il capillare = comportamento "solido"



Aspirazione con micropipetta

- Se cellula liquida:

- tensione di membrana $\Delta P = 2T_c \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_c} \right)$, $\left(\Delta P = \Delta P_c \text{ when } \frac{L_p}{R_p} = 1 \right)$,

- viscosità

$$\eta = \frac{R_p \Delta p}{\left(\frac{dL_p}{dt} \right) m (1 - R_p/R)}$$

- R = raggio della cellula all'esterno della pipetta quando dL_p/dt è misurato
- m=6 (da modelli teorici)

- Se cellula solida:

- modulo elastico $\Delta P = \frac{2\pi}{3} E \frac{L_p}{R_p} \Phi$,

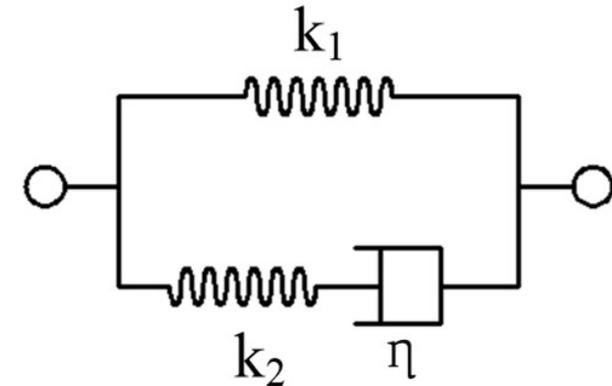
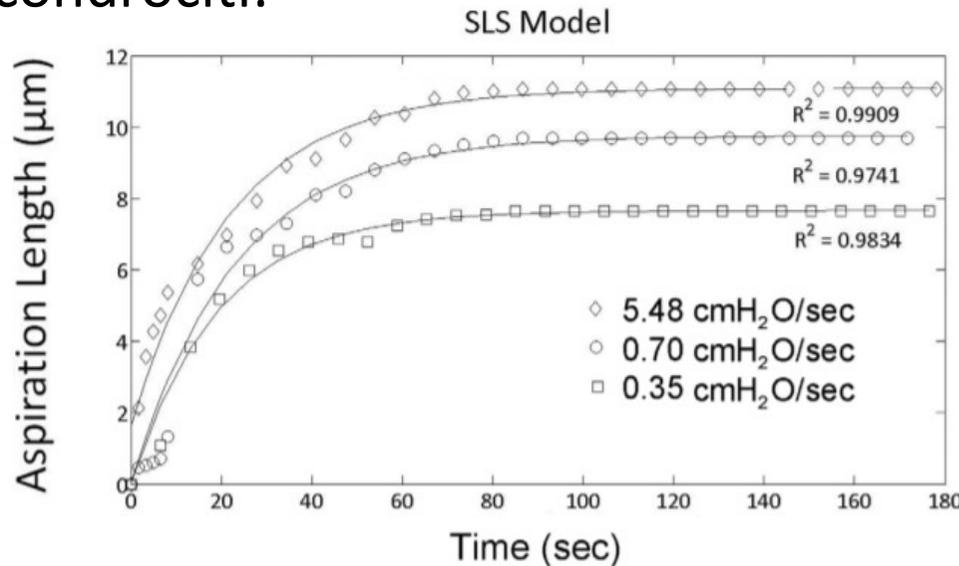
- viscoelasticità (creep compliance)

$$J(t) = \frac{2\pi\Phi}{3} \frac{1}{P} \frac{\Delta L(t)}{R_p}$$

- E = modulo di Young
- Φ = funzione di parete del capillare (=2.1 da modelli teorici)
- J(t) = deformabilità al creep

Parametri viscoelastici

- Es: Applicazione del modello di Solido Lineare Standard (SLS) su condrociti:



$$L(t) = \frac{\phi a \Delta P}{\pi k_1} \left[1 - \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} - 1 \right) e^{-t/\tau} \right]$$

a = diametro interno del capillare
 τ = costante di tempo

Modulo elastico istantaneo

$$E_{in} = \frac{3}{2} (k_1 + k_2)$$

$$E_{eq} = \frac{3}{2} k_1$$

Viscosità

$$\mu = \tau \left(\frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2} \right)$$

Modulo elastico di equilibrio

Pro e contro della tecnica

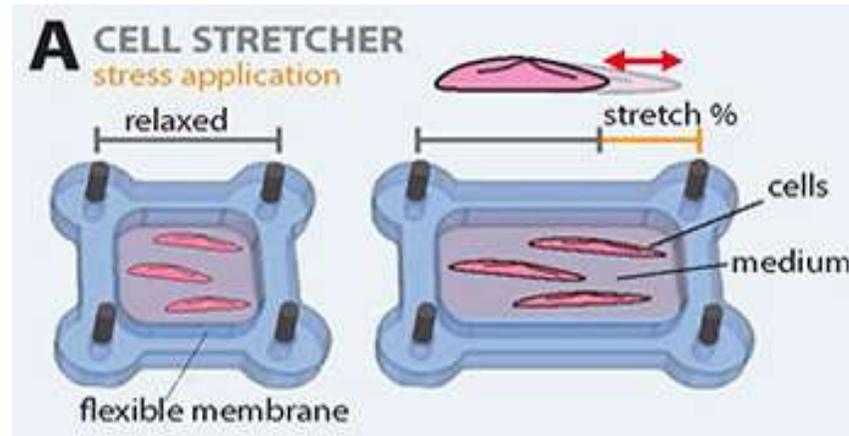
Vantaggi:

- Pressioni applicabili: da 1 Pa fino a $\approx P_{\text{atm}}$
- Forze applicabili: da 10 a 10^4 pN
- Misure sia di cellule adese che in sospensione in condizioni fisiologiche (T, terreno, pH..)
- Tecnica economica, di facile implementazione

Svantaggi:

- La determinazione delle proprietà meccaniche è fortemente basata su modelli teorici
- Lunghi tempi di misura (una cellula alla volta)
- I parametri viscoelastici sono legati alla velocità di applicazione di ΔP

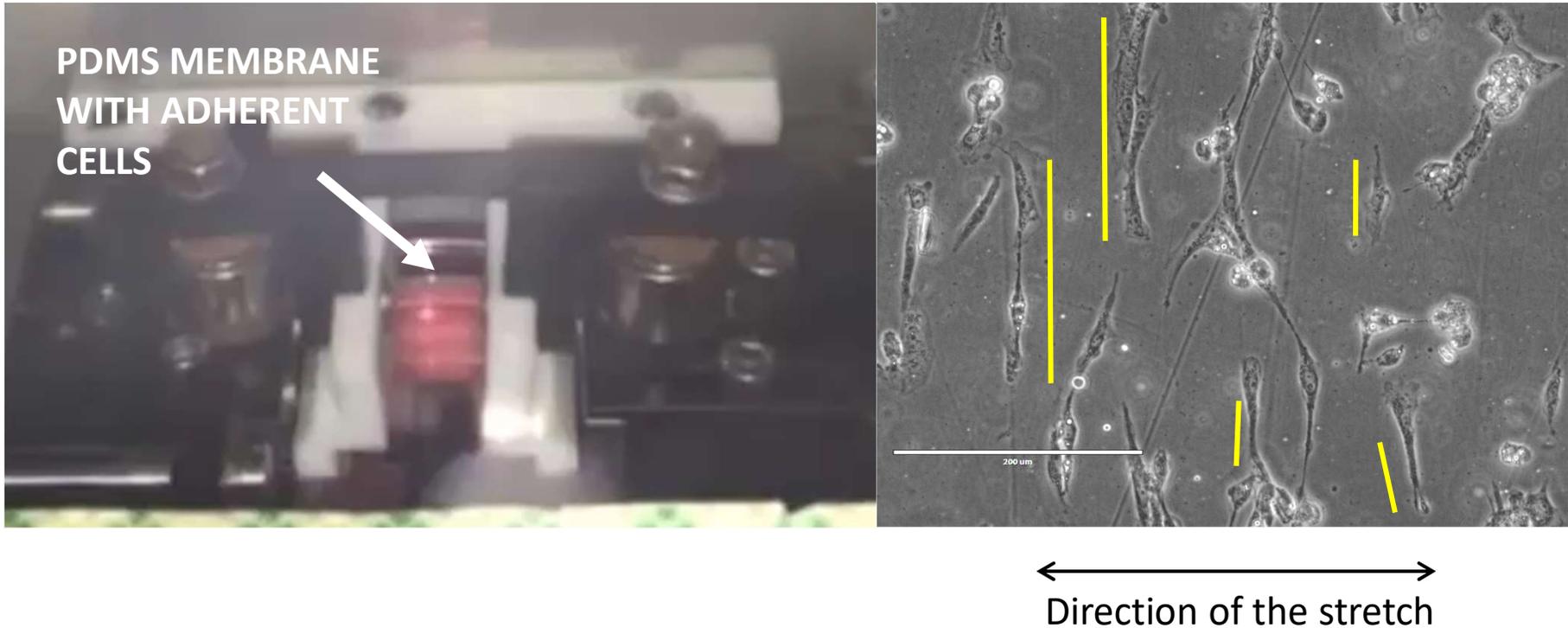
Membrane stretching



- È una tecnica utilizzata per quantificare la deformabilità delle cellule o dei compartimenti subcellulari (ad es. il nucleo)
- Le cellule (spesso marcate per fluorescenza) vengono fatte aderire su una membrana flessibile (es. silicone) ricoperta con componenti della matrice extra-cellulare per migliorarne l'adesione
- La membrana viene stirata meccanicamente (mono-, bi-assiale, radiale) e la deformazione delle cellule viene monitorata tramite microscopia ottica
- La deformazione della cellula o del comparto subcellulare, quantificata tramite analisi d'immagine, è normalizzata per la deformazione imposta alla membrana

Un nostro esempio homemade

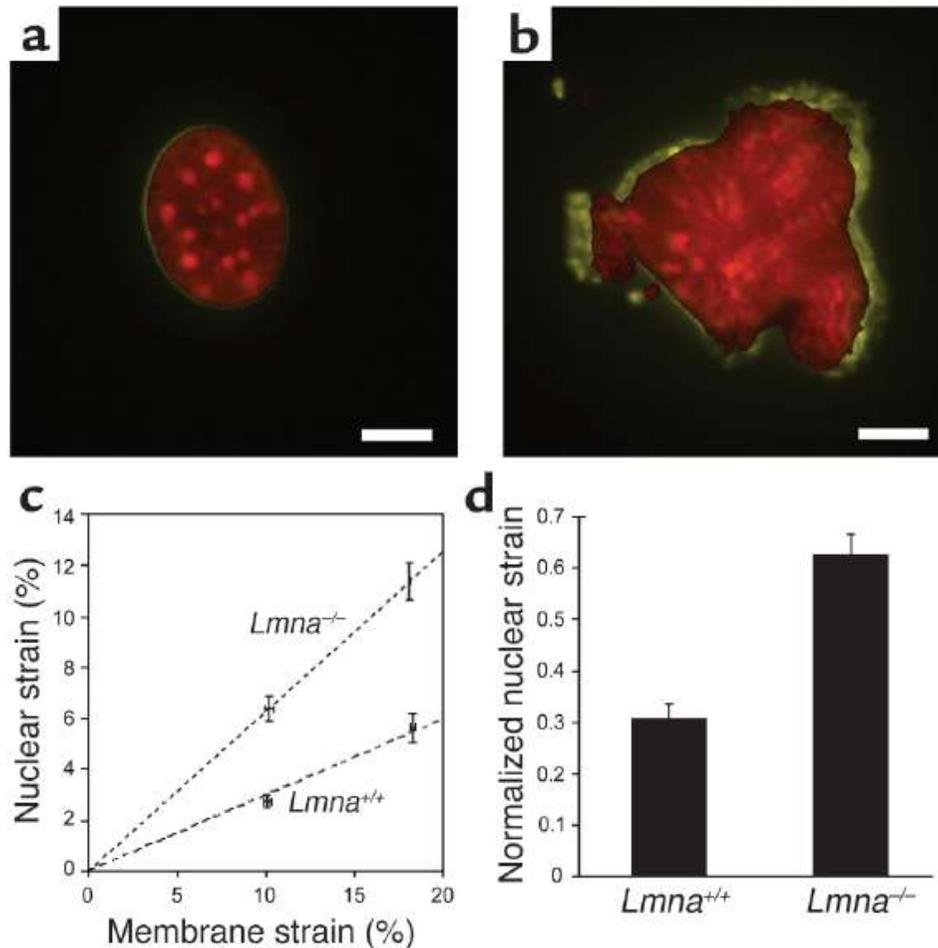
- 1-axis deformation with tunable frequency/membrane elongation



- radial deformation under development

Esempio applicativo

- Effetto della delezione di lamina A ($LMNA^{-/-}$) sulla deformabilità nucleare



Nuclear mechanics is impaired in lamin A/C-deficient cells. (a) Nucleus of WT fibroblast before strain (red) and at 22% strain (yellow). Scale bar: 10 μm . (b) $Lmna^{-/-}$ nucleus before strain (red) and at 19% strain (yellow). Scale bar: 10 μm . (c) Nuclear strain as a function of applied membrane strain. (d) Maximal normalized nuclear strain was significantly increased in $Lmna^{-/-}$ fibroblasts.

Pro e contro della tecnica

Vantaggi

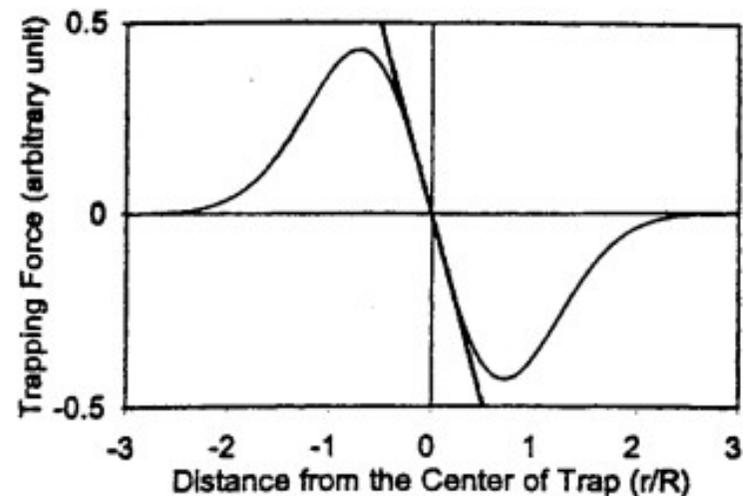
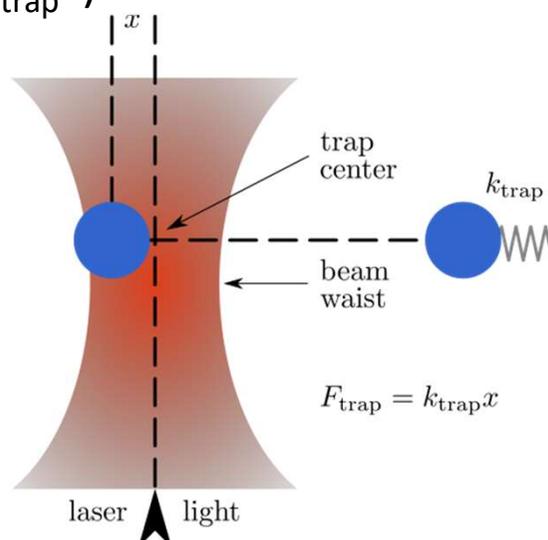
- Quantificazione diretta della deformabilità cellulare e/o nucleare
- Studio applicabile a più cellule contemporaneamente
- Permette di operare in condizioni fisiologiche (T, terreno, stress applicato)
- Possibilità di monitorare gli effetti di stress statici e ciclici anche a livello metabolico

Svantaggi

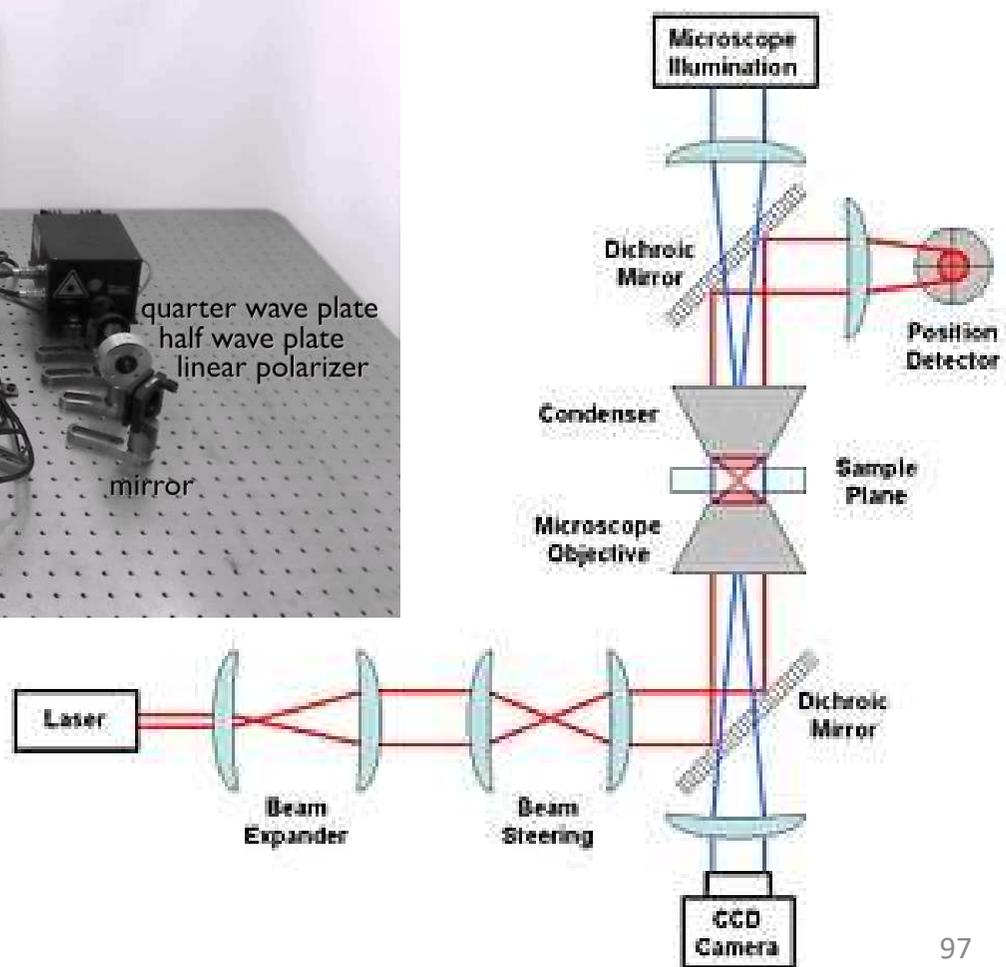
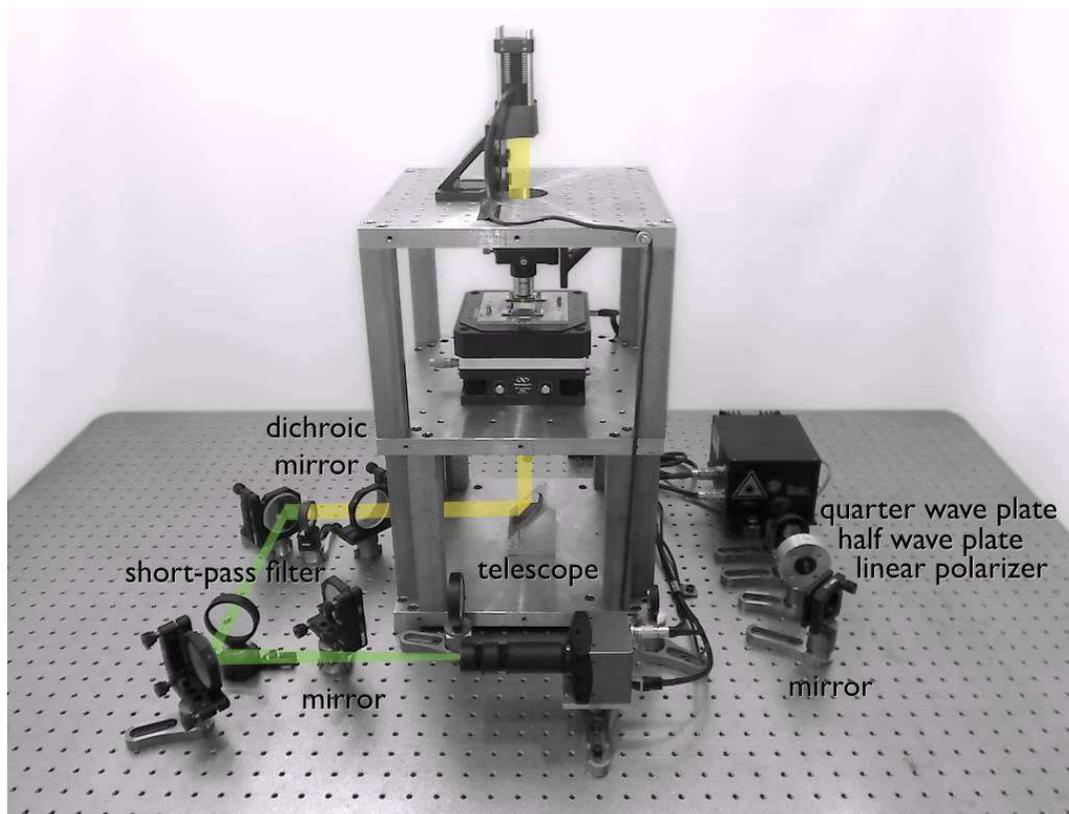
- Metodo poco standardizzabile
- Utilizzabile solo con cellule (ben) adese al substrato
- Difficoltà di ottenere deformazioni omogenee su tutta la membrana
- Difficile quantificazione dell'effettiva forza applicata
- Caratterizzazione meccanica espressa solo come deformabilità rispetto al substrato

Optical tweezers

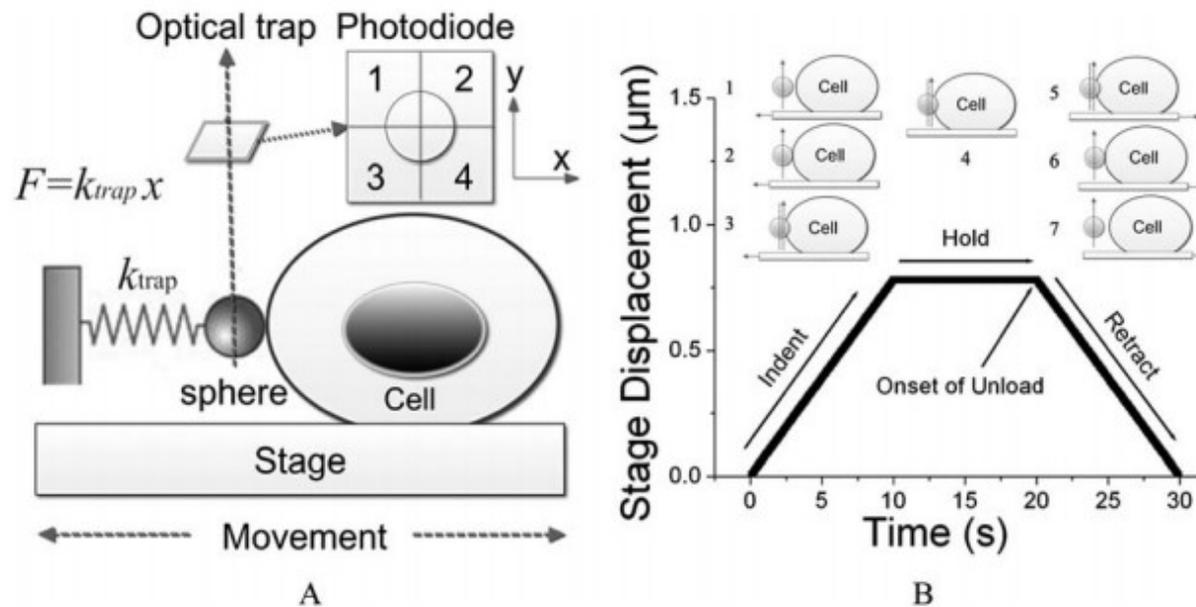
- Rappresenta una tecnica per applicare e misurare forze dell'ordine dei pN
- Una microsfera in materiale dielettrico (es. polistirene) è intrappolata in un fascio laser fortemente focalizzato.
- La posizione della sferetta è la risultante di due diverse forze:
 - Il gradiente di campo elettrico generato dal laser, che tende a portarla verso il centro del fascio (forza proporzionale al gradiente di intensità del campo elettrico)
 - La forza di dispersione del laser (conservazione quantità di moto dei fotoni), applicata nella direzione del fascio (forza proporzionale all'intensità del laser)
- La forza risultante che agisce sulla sfera dipende (per piccoli spostamenti) dallo spostamento rispetto al centro del fascio, secondo la legge di Hooke ($F = -k_{\text{trap}}x$)



Setup ottico (misura in regime statico)



Calibrazione del sistema



- Calibrazione del fotodiode: determina la dipendenza tra lo spostamento della sfera Δx e il segnale del fotodiode $\Delta Dx \rightarrow \Delta x = A \Delta Dx$.
- Calibrazione di k_{trap} :

$$k_{trap} = -\frac{6Vn_1}{cR^2} I_0 \left(\frac{n_2^2 - n_1^2}{n_2^2 + 2n_1^2} \right)$$

V = volume della particella

n_1 = indice di rifrazione del mezzo (liquido)

n_2 = indice di rifrazione della particella

c = velocità della luce nel vuoto

I_0 = intensità del laser

R = raggio del fascio laser focalizzato

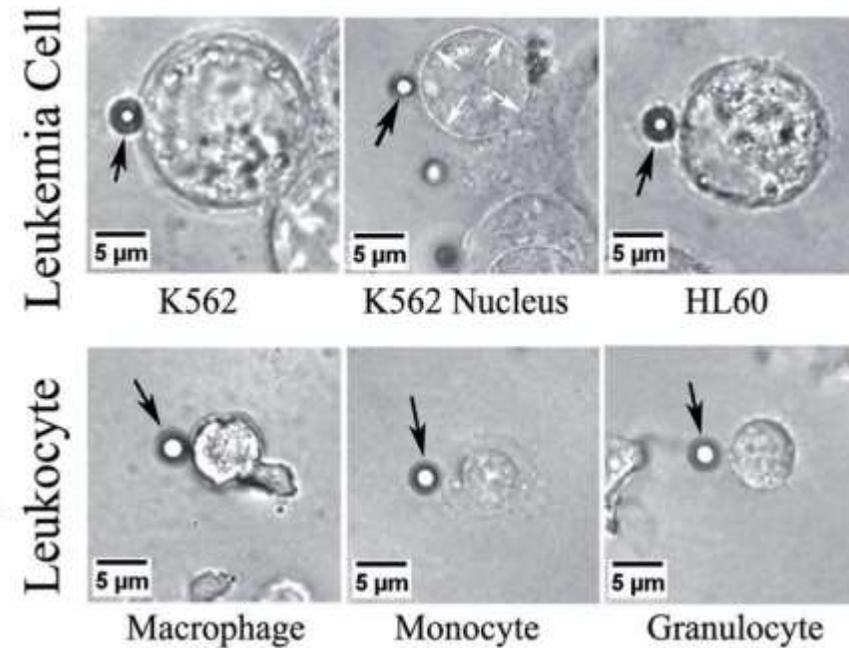
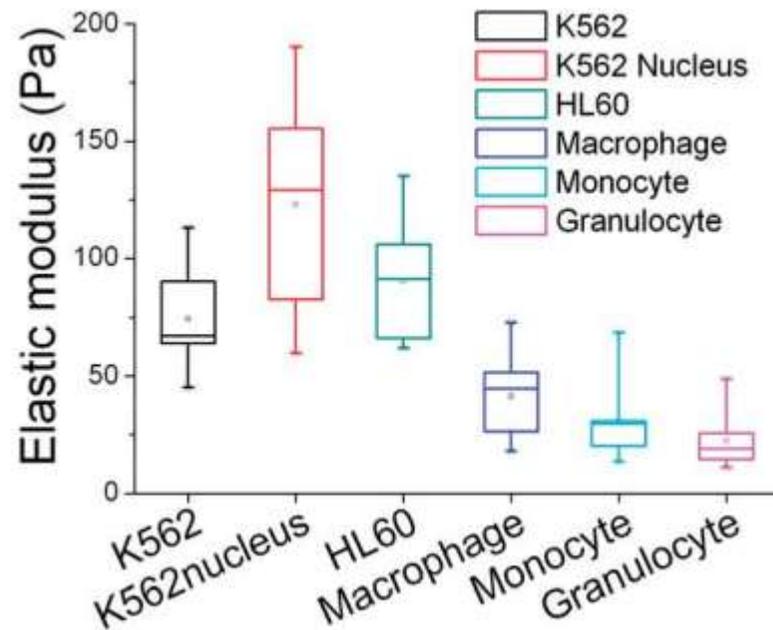
Misura di elasticità cellulare

- La cellula è posta in contatto con la sfera mediante spostamento dello stage (posizione Z_0 , valore del detector D_0)
- Lo spostamento dello stage verso la sfera determina l'indentazione della cellula, h , e lo spostamento della sfera dalla posizione di equilibrio, d
 - $\delta = \text{indentazione} = (Z - Z_0) - d$
 - $d = A(D - D_0)$
 - $F = kd = k A(D - D_0)$
- La curva forza-indentazione è quindi modellata analogamente a quanto visto per l'AFM, ad esempio con il modello di Hertz (sfera)

$$P = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}}$$

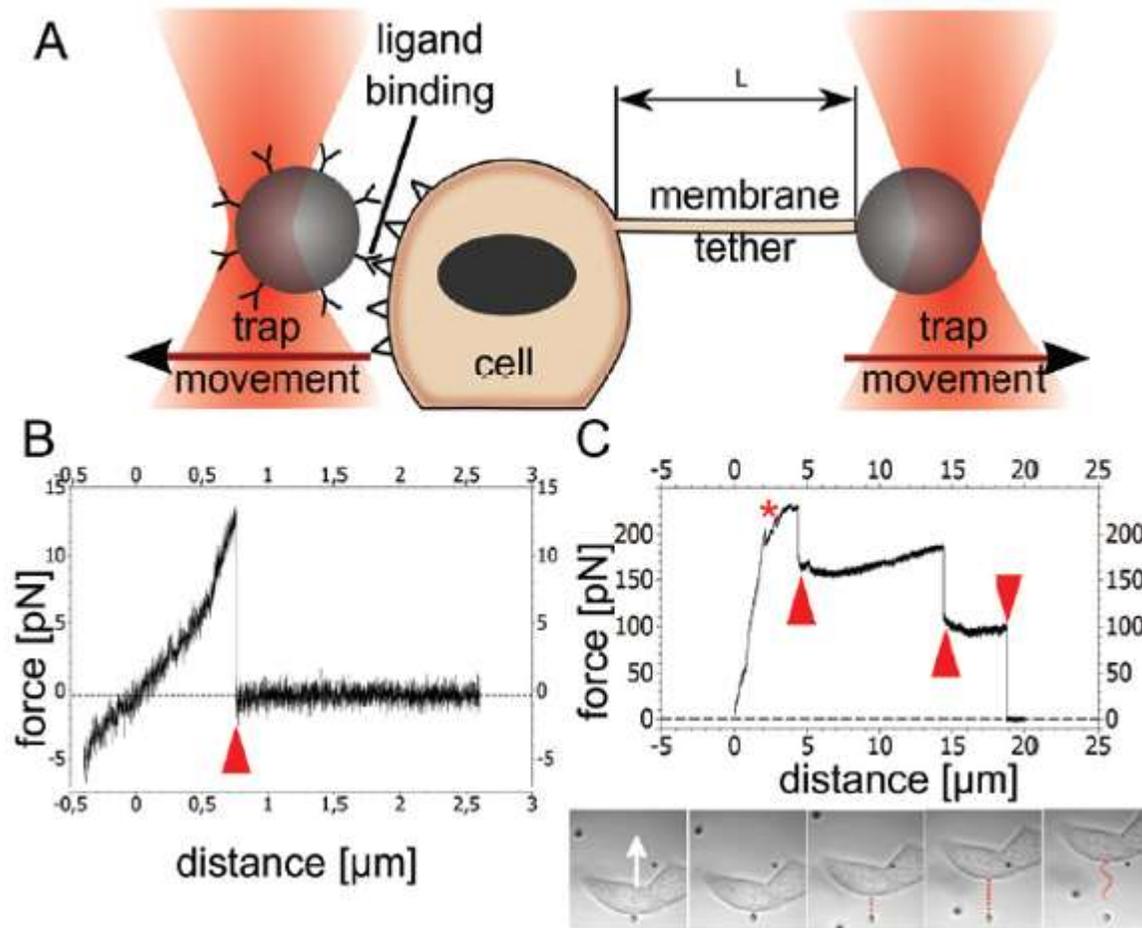
Esempio applicativo

- Confronto dell'elasticità cellulare (e nucleare) di leucociti e cellule leucemiche (Z. L. Zhou et al, RSC Adv. 2014)



Misure di adesione

- Possibilità di funzionalizzazione della sferetta (es anticorpi) o di misurare l'adesione aspecifica



Misure in oscillatorio

- Rispetto al setup in regime statico, la sfera è messa in oscillazione agendo sullo specchio guida (steering mirror) collegato ad un cristallo piezoelettrico, che lo fa muovere ad una certa frequenza
- Il segnale in uscita dal fotodiodo è elaborato da un lock-in amplifier, che lo correla al segnale di attuazione dello specchio (variazione di ampiezza e fase)
- Rispetto alla calibrazione di k_{trap} in regime statico, occorre tenere conto dello sfasamento tra il movimento del laser e quello della particella dovuto alla resistenza viscosa del mezzo, θ
- Nell'ipotesi di particella micrometrica immersa in un liquido newtoniano, si può applicare la relazione di Andersson:

$$k_{trap} = \frac{6\pi\eta}{\tan\theta}$$

η = viscosità dinamica del mezzo
 α = raggio della sfera
 ω = frequenza di attuazione

- la k_{trap} dipende dalla frequenza e dalla potenza del laser

$$G'' = G' + iG''$$

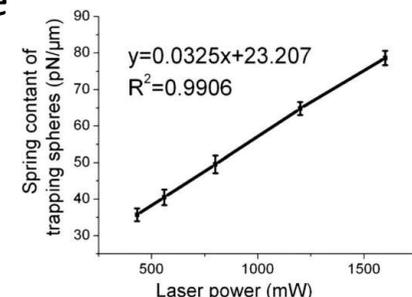


Fig. 2 Spring constant of optical trap on 2.5 μm polystyrene spheres at different laser power.

Pro e contro della tecnica

Vantaggi:

- controllo accurato della posizione della sfera e della forza applicata
- possibilità di indagine su ampio spettro di frequenze (in oscillatorio)
- tecnica economica, facilmente implementabile
- condizioni fisiologiche per la cellula (T, terreno, pH..)
- non richiede preparazione del campione

Svantaggi:

- Possono essere utilizzate solo per bassi valori di forza (max 500 pN) in regime lineare
- Applicabile solo su cellule adese al substrato
- Potenziali problemi di riscaldamento locale e di foto-tossicità dovuta al laser