

(15)

Zastosowanie mikroskopii sił atomowych (AFM) w okulistyce

Application of atomic force microscopy (AFM) in ophthalmology

Michał Milka¹, Iwona Mróz², Maria Jastrzębska³, Roman Wrzalik⁴, Dariusz Dobrowolski¹, Anna M. Roszkowska⁵, Lucyna Moćko¹, Edward Wylęgała¹

¹ Oddział Okulistyczny Okręgowego Szpitala Kolejowego w Katowicach

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Edward Wylęgała

² Instytut Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Wrocławskiego

Kierownik: prof. dr hab. Antoni Ciszewski

³ Zakład Fizyki Ciała Stałego Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Kierownik: prof. dr hab. Alicja Ratuszna

⁴ Zakład Biofizyki i Fizyki Molekularnej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Ziolo

⁵ Ophthalmology Unit, Department of Surgical Specialities, University of Messina, Italy

Head: Professor Pasquale Aragona, MD, PhD

Streszczenie:

Mikroskop sił atomowych (Atomic Force Microscope – AFM) jest urządzeniem umożliwiającym badanie powierzchni obiektów w skali nano. Celem pracy jest przedstawienie historii wprowadzenia AFM do praktyki badawczej i klinicznej w dziedzinie okulistyki oraz możliwości jego zastosowania. W 1986 r. Binnig skonstruował AFM z myślą o zastąpieniu nim skaningowego mikroskopu tunelowego (STM). Zasada działania AFM opiera się na pomiarze oddziaływań międzyatomowych między sondą skanującą a badaną powierzchnią. Dzięki temu uzyskany trójwymiarowy obraz powierzchni ma rozdzielczość rzędu nanometrów. Jednym z pierwszych naukowców, który zastosował na szeroką skalę AFM w okulistyce, był Yamamoto. Pierwsze próby zastosowania tej techniki podjęto w badaniach nad strukturą włókien kolagenowych rogówki i twardówki. Nasze badania dotyczą analizy powierzchni sztucznych soczewek wewnątrzgałkowych (IOL). W przeciwieństwie do autorów wcześniej publikowanych prac (Lombardo i wsp.), którzy badali natywne IOL, skoncentrowaliśmy się na soczewkach eksplantowanych z oczu ludzkich, które przez określony czas były narażone na działanie wewnątrzgałkowego środowiska wodnego i poddane związanym z nim wpływom, jakie wywołuje oddziaływanie procesów biochemicznych na ich strukturę. Przedstawiamy wstępne wyniki naszych prac w postaci obrazów AFM powierzchni IOL w skali nano, na których obserwujemy odkładanie się różnych depozytów barwnikowo-osadowych oraz tworzenie lokalnych zwapnień. Wierzmy, że AFM jest użyteczną metodą badania struktury powierzchni IOL, a dalsze obserwacje pozwolą wyjaśnić patomechanizm powstawania zmętnienia sztucznych soczewek wewnątrzgałkowych.

Słowa kluczowe:

Summary:

Atomic force microscopy (AFM) allows to examine surface of different biological objects in the nearly physiological conditions at the nanoscale. The purpose of this work is to present the history of introduction and the potential applications of the AFM in ophthalmology research and clinical practice. In 1986 Binnig built the AFM as a next generation of the scanning tunnelling microscope (STM). The functional principle of AFM is based on the measurement of the forces between atoms on the sample surface and the probe. As a result, the three-dimensional image of the surface with the resolution on the order of nanometres can be obtained. Yamamoto used as the first the AFM on a wide scale in ophthalmology. The first investigations used the AFM method to study structure of collagen fibres of the cornea and of the sclera. Our research involves the analysis of artificial intraocular lenses (IOLs). According to earlier investigations, e.g. Lombardo et al., the AFM was used to study only native IOLs. Contrary to the earlier investigations, we focused our measurements on lenses explanted from human eyes. The surface of such lenses is exposed to the influence of the intraocular aqueous environment, and to the related impacts of biochemical processes.

We hereby present the preliminary results of our work in the form of AFM images depicting IOL surface at the nanoscale. The images allowed us to observe early stages of the dye deposit formation as well as local calcinosis. We believe that AFM is a very promising tool for studying the structure of IOL surface and that further observations will make it possible to explain the pathomechanism of artificial intraocular lens opacity formation.

Key words:

Atomic Force Microscopy, intraocular lens (IOL), nanotechnology.

Mikroskop sił atomowych (Atomic Force Microscope – AFM), który należy do rodziny mikroskopów ze skanującą sondą, wynaleźli Binnig i wsp. w 1986 r. (1). Pierwowzorem AFM

był skonstruowany w 1982 r. skaningowy mikroskop tunelowy (Scanning Tunneling Microscope – STM), za wynalezienie którego w 1986 r. Binnig otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie

fizyki. STM i AFM pozwalają na badanie lokalnych własności powierzchni danego materiału. Ich wynalezienie znacznie zwiększyło możliwości badań powierzchni poprzez stworzenie sposobności uzyskania całkowicie nowych informacji o właściwościach fizykochemicznych badanych obiektów w skali nano (10^{-9}). Z tego powodu obrazowanie tą techniką można zaliczyć do nanotechnologii. Za pomocą STM możemy badać tylko te układy, które wykazują właściwości przewodzące (2), AFM natomiast działa według zasady, której podstawą jest pomiar oddziaływań międzyatomowych, dzięki temu możliwe jest również badanie powierzchni materiałów nieprzewodzących, w tym próbek biologicznych (3,4).

Jednym z podstawowych zastosowań mikroskopii sił atomowych jest obrazowanie topografii powierzchni. Metodę tę wykorzystuje się także do badania własności mechanicznych materiałów w skali nano (2,5,6). AFM pozwala m.in. na badanie odkształceń materiału pod wpływem przyłożonej siły, wyznaczenie modułu Younga, pomiary tarcia oraz pomiary sił adhezji między sondą skanującą a próbką. Przegląd zastosowań oraz opis zasady działania AFM przedstawiono w różnych opracowaniach (2-7). Najogólniej mówiąc, podczas każdego pomiaru analizowane są ruchy sondy spowodowane oddziaływaniami między atomami końcówki sondy (ostrza) a atomami próbki. Ostrze jest umieszczone na sprężystej mikrobелce (dźwigni), która ugią się pod wpływem wspomnianych oddziaływań. Precyzyjny pomiar ugięcia mikrobелki jest niezwykle istotny, gdyż pozwala na wyznaczenie wartości oddziaływań ostrze-próbka i dokonanie pomiarów ilościowych badanych wielkości fizycznych. Najpowszechniej stosowaną w praktyce metodą pomiaru ugięcia mikrobелki jest metoda detekcji odchylenia wiązki laserowej (6) (ryc. 1).



Ryc. 1. Pomiar ugięcia mikrobелki za pomocą metody detekcji odchylenia wiązki laserowej [por. np. (2), (5)].

Fig. 1. Measurement of cantilever bend using the laser beam deflection detection method [cf. e.g. (2), (5)].

Na rycinie 2. przedstawiono mikroskop sił atomowych firmy Veeco oraz jego podstawowe elementy konstrukcyjne – autorzy niniejszej pracy wykorzystują go w badaniach soczewek wewnątrzgałkowych. W wielu konstrukcjach mikroskopów AFM ruch próbki względem ostrza odbywa się dzięki umieszczeniu próbki na skanerze piezoelektrycznym, który może wykonywać ruchy w trzech wymiarach (ryc. 2b). Stosuje się również rozwiązania, w których próbka przemieszczana jest za pomocą piezoelektrycznego skanera w kierunkach X–Y (w płaszczyźnie), oddzielny element piezoelektryczny natomiast zmienia położenie igły w osi Z (prostopadle do powierzchni próbki).

W przypadku obrazowania topografii powierzchni próbki zmiany położenia ostrza, które wynikają z kształtu powierzchni materiału, prowadzą do zmian w oświetleniu czterosekto-

wego fotodetektora. Informacja o ugięciu mikrobелki jest przekształcana na prąd elektryczny, który stanowi sygnał zwrotny sterujący ruchem skanera w pionie (niezależnie od jego ruchów w płaszczyźnie poziomej). Elektroniczny układ sprzężenia zwrotnego zmienia napięcie na piezoelemente, który przesuwając sondę w pionie w taki sposób, aby przywrócić ustaloną wartość oświetlenia fotodetektora (5). Wartość przyłożonego napięcia, które steruje piezoelementem, może być łatwo przeliczona na zmianę położenia sondy. Wyznaczanie własności mechanicznych próbki wymaga dodatkowo kontroli ugięcia mikrobелki podczas całego procesu pionowego zbliżania ostrza do powierzchni próbki i jego oddalania od niej (2).



Ryc. 2. Elementy mikroskopu sił atomowych Multimode, Veeco – a.; skaner piezoelektryczny (typ AS-12 „E”), rurka piezoelektryczna pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego wykonuje ruchy w trzech wymiarach. Na szczycie rurki umieszczamy próbkę. Informację o wartości napięcia, które należy przyłożyć do rurki, aparatura uzyskuje, analizując sygnał z fotodetektora – b.; głowica, tu umieszczamy uchwyt z zamontowaną sondą skanującą – c.; uchwyt sondy skanującej z zamontowaną sondą – d. (autorka zdjęć: Justyna Bronowicka).

Fig. 2. Elements of Multimode, Veeco atomic force microscope – a.; piezoelectric scanner (AS-12“E” type), piezoelectric tube making three-dimensional movements under applied voltage. The sample is placed on the top of the tube. The apparatus gets the information about the voltage to be applied to the tube by analysing a signal from the photo detector – b.; head, this is where the holder with the scanning probe is placed – c.; scanning probe holder with the probe mounted – d. (author photo: Justyna Bronowicka).

Porównując możliwości AFM ze znanymi i używanymi na co dzień w medycynie możliwościami, jakie dają metody obrazowania tkanek za pomocą mikroskopii optycznej i elektronowej, możemy zauważyć znaczące różnice. Na przykład graniczna zdolność rozdzielcza mikroskopów optycznych, w zależności od sposobu przeprowadzenia pomiaru, jest rzędu kilkuset nanometrów, gdyż ograniczona jest przez długość fali zastosowanego promieniowania elektromagnetycznego. Poza tym obrazowanie za pomocą klasycznych mikroskopów optycznych jest możliwe tylko w dwóch wymiarach (za pomocą mikroskopów konfokalnych – w trzech). Skaningowy mikroskop elektronowy cechuje się rozdzielczością około tysiąc razy większą niż mikroskop optyczny (8) oraz tym, że umożliwia obrazowanie w trzech wymiarach. Pomiar wymaga jednak spełnienia określonych warunków, takich jak np. umieszczanie badanej próbki w próżni, a to znacznie ogranicza możliwości badań materiałów biologicznych (ryc. 2).

AFM może pracować w próżni, ale również w środowisku gazowym (w powietrzu) oraz w cieczy, to właśnie czyni tę metodę szczególnie przydatną do badań obiektów biologicznych – nie jest wymagane specjalne przygotowanie próbki. Technika AFM umożliwia tworzenie trójwymiarowych obrazów topografii badanej powierzchni. Zdolność rozdzielcza AFM zależy od wielu czynników, m.in. od rodzaju próbki, środowiska, w którym pracuje mikroskop (w cieczy, w próżni itp.), trybu pracy oraz kształtu ostrza. W przypadku twardych, gładkich powierzchni obrazowanych w próżni możliwe jest uzyskanie rozdzielczości atomowej. W przypadku obrazowania próbek miękkich, w powietrzu lub w cieczy, zdolność rozdzielcza w wymiarach poziomych (w płaszczyźnie próbki) wynosi najczęściej kilka nanometrów, a zdolność rozdzielcza w wymiarze pionowym jest rzędu nanometra.

Jak już wspomniano, możliwości pomiarowe AFM, w tym zdolność rozdzielcza, zależą od trybu pracy mikroskopu. W tzw. trybie kontaktowym odległość między ostrzem a próbka jest tak mała, że dominujące staje się krótkozasięgowe oddziaływanie odpychające między atomami ostrza a próbka (4). Tryb ten pozwala także na pomiar sił tarcia, które występują między przesuwającymi się względem siebie ostrzem a próbka. Zastosowanie trybu kontaktowego, chociaż umożliwia odwzorowanie topografii powierzchni z wysoką rozdzielczością, może prowadzić do zniszczenia delikatnych próbek. Z tego względu do obrazowania próbek biologicznych stosuje się często, kosztem zmniejszenia zdolności rozdzielczej, tryb przerywanego kontaktu (tapping mode). Podczas pracy w tym trybie mikrobekła wprawiana jest w drgania, a ostrze uderza w badaną powierzchnię. Eliminuje to działanie sił bocznych, jakie powstają podczas skanowania powierzchni, ale mimo tego miękkie próbki mogą zostać zdeformowane (4). Wydaje się, że rozwiązaniem problemu może być użycie tzw. trybu bezkontaktowego – wykorzystywane są wtedy siły dalekiego zasięgu (m.in. siły przyciągające van der Waalsa) (7). Podczas pomiaru ostrze oscyluje w bliskiej odległości od powierzchni próbki, nie dotykając jej. Wydaje się, że tryb bezkontaktowy jest bardzo korzystny w przypadku badania delikatnych obiektów, chociaż – z uwagi na to, że siły van der Waalsa są siłami słabymi – jest bardzo czuły na zakłócenia. W przypadku próbek biologicznych wciąż konieczne jest prowadzenie prac nad rozwojem tej techniki pomiarowej.

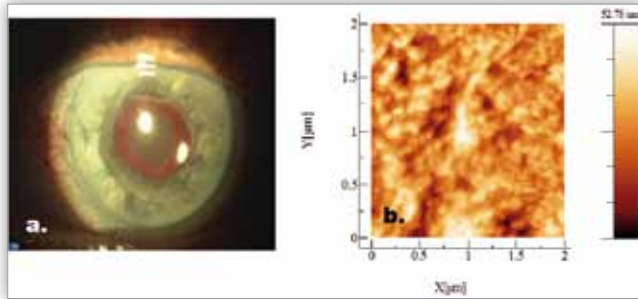
Pierwsze publikacje na temat zastosowania AFM w okuliście pojawiły się w późnych latach 90. XX wieku i na początku XXI wieku. Jednym z pierwszych naukowców, który na szeroką skalę stosował AFM (jak i SEM) w badaniu struktur oka, był Yamamoto. Z tamtego okresu pochodzą bardzo ciekawe prace dotyczące badań nad strukturą włókien kolagenowych rogówki i twardówki, przeprowadzonych za pomocą AFM. Wyniki prac, w których autorom udało się zobrazować w skali nano różnice zarówno w średnicy, jak i strukturze kolagenu rogówki i twardówki, Yamamoto i wsp. opublikowali w 2000 r. (9,10). Rok później Miyagawa i wsp. opublikowali wyniki analizy połączeń rogówkowych i twardówkowych włókien kolagenowych z proteoglikanami (11). Równolegle na Uniwersytecie w Calabrii we Włoszech pod przewodnictwem M. Lombardo prowadzone były badania oceniające wpływ energii lasera excimerowego na strukturę śródbłonna oraz zrębu rogówki. Za pomocą AFM badano powierzchnię ww. struktur i porównywano ją z powierzchnią

zgrupowanych rogówek, na których fotoablacja nie była stosowana. Wyniki badań oraz obrazy uzyskanych za pomocą AFM powierzchni opublikowano w 2005 r. (12). Warta uwagi jest również praca, którą w 2007 r. opublikowali M. Ziebarth i wsp., dotycząca wykorzystania AFM do badania elastyczności soczewek ocznych małp (13).

Badania powierzchni i właściwości fizykochemicznych sztucznych soczewek wewnątrzgałkowych za pomocą AFM zapoczątkowali w 2006 r. Lombardo i wsp., wykazali oni występowanie statystycznie istotnych różnic w szorstkości powierzchni fabrycznie nowych soczewek wykonanych z materiałów różnego typu (14). Powierzchnia PMMA IOL okazała się bardziej szorstka w porównaniu z powierzchniami soczewek pozostałych typów. Powierzchnia soczewek „miękkich” – wykonanych z materiału hydrofobowego – jest bardziej gładka niż powierzchnia soczewek hydrofilnych. Autorzy zwrócili również uwagę na to, jak proces produkcji wpływa na ostateczną strukturę powierzchni IOL (porównano różne parametry soczewek wyprodukowanych z tego samego materiału, ale różnymi technikami). Duży nacisk położono na poszukiwanie korelacji między gładkością powierzchni IOL a migracją komórek zapalnych oraz komórek podtorebkowych w procesie tworzenia się zmętnienia tylnej torebki soczewki (PCO). Dalsze badania nad strukturą powierzchni soczewek prowadzone przez zespół Lombardo zaowocowały w 2009 r. kolejną publikacją (15). Tym razem autorzy za pomocą AFM badali adhezję powierzchni różnych typów sztucznych soczewek (IOL). Rezultaty tych badań wykazały, że w środowisku wodnym największe siły adhezji występują na powierzchni soczewek akrylowych hydrofobowych, znacznie mniejsze – na powierzchni soczewek akrylowych hydrofilnych oraz PMMA, najmniejsze – na powierzchni soczewek silikonowych. Wyniki ww. prac pokazują, jak istotną rolę w oddziaływaniach między powierzchnią IOL a biologicznymi markerami (migrujące komórki, depozyty białkowe, osady barwnikowe) odgrywa rodzaj materiału, z którego wykonana jest IOL, jej kształt (ostra krawędź) oraz właściwości fizykochemiczne (w tym gładkość) powierzchni.

Prace, które przytaczamy, inspirowały nas do dalszych obserwacji i badań nad strukturą powierzchni soczewki. Większość prowadzonych do tej pory badań dotyczących IOL skupiona była na badaniu właściwości soczewek fabrycznie nowych. W ubiegłym roku dzięki współpracy naukowców Uniwersytetu Śląskiego, Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Wrocławskiego oraz lekarzy z Oddziału Okulistycznego Szpitala Kolejowego w Katowicach rozpoczęto badania nad obrazowaniem powierzchni soczewek za pomocą AFM. Nasze badania i obserwacje dotyczą struktury sztucznych soczewek eksplantowanych z oczu ludzkich. Celem tych obserwacji jest badanie, w skali nano, powierzchni sztucznych soczewek, które przez dłuższy czas, wszczepione jako implanty do gałki ocznej, poddawane były różnym wpływom środowiska wodnego i jego elektrolitowym zaburzeniom wewnątrz gałki ocznej. Badamy soczewki hydrofilne i hydrofobowe, akrylowe, PMMA oraz silikonowe. Kładziemy duży nacisk na badanie wpływu inplantacji IOL (zwijanie, kontakt z narzędziami chirurgicznymi) na strukturę jej powierzchni. Dla porównania badamy soczewki fabrycznie nowe. Eksplantacja IOL spowodowana jest zarówno przyczynami optycznymi (utrata przezroczystości, dyslokacje), jak

i mechanicznymi (drażnienie z odczynem zapalnym) (ryc. 3a). Obserwujemy również efekty zmian, które zachodzą w obrębie powierzchni soczewki w wyniku przemian biochemicznych. Bardzo ciekawe jest zobrazowanie licznych złogów występujących w obrębie zmian struktury powierzchni soczewki. Biorąc pod uwagę wielkość elementów komórkowych, możemy wytłumaczyć obecność depozytów barwnikowo-osadowych widocznych podczas biomikroskopii oka. Ryc. 3b przedstawia obraz powierzchni sztucznej soczewki eksplantowanej z oka pacjenta podczas przeszczepu rogówki. Do pomiarów wykorzystujemy mikroskop AFM Multimode (kontrolery: Nanoscope E i Nanoscope IIIa), Veeco (ryc. 2).



Ryc. 3. Zdjęcie przedniego odcinka oka pacjenta, u którego wystąpiła kalcyfikacja sztucznej soczewki (IOL) – a., obraz uzyskany za pomocą AFM, przedstawia powierzchnię IOL (z widocznymi złogami) eksplantowanej z oka pacjenta podczas keratoplastyki – b.

Fig. 3. Photograph of the anterior part of the eye of a patient with IOL calcification – a., the AFM image showing the IOL's surface (with visible deposits) explanted from the patient's eye during keratoplasty – b.

Dalsze badania nad strukturalnymi i mechanicznymi własnościami powierzchni IOL, które nadal prowadzimy w naszym zespole, mogą mieć istotny wpływ na doskonalenie zarówno chirurgicznych procedur wszczepiania IOL do wnętrza gałki ocznej, jak i samej ich produkcji.

Piśmiennictwo:

1. Binning G, Quate CF, Gerber Ch: *Atomic force microscope*. Phys Rev Lett 1986, 56, 930-933.
2. Butt H-J, Cappella B, Kappl M: *Force measurements with atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surf Sci Rep 2005, 59 (1-6), 1-152.
3. Morris VJ, Kirby AR, Gunning AP: *Atomic force microscopy for biologists*. Imperial College Press, London, 2004.
4. Jena BP, Hörber JKH: *Atomic force microscopy in cell biology*. Methods in Cell Biology 2002, vol. 68 (eds.)
5. MultiMode™ SPM Instruction Manual, Version 4.31ce. Digital Instruments Veeco Metrology Group.
6. Capella B, Dietler G: *Force-distance curves by atomic force microscopy*. Surf Sci Rep 1999, 34(1-3), 1-104.
7. Kasas S, Thomson NH, Smith BL, Hansma PK, Miklossy J, Hansma HG: *Biological applications of the AFM: From single molecules to organs*. Int J Imag Syst Tech 1997, 8(2), 151-161.
8. Jaroszyk F (red): *Biofizyka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
9. Yamamoto S, Hashizume H, Hitomi J, Shigeno M, Sawaguchi S, Abe H, Ushiki T: *The subfibrillar arrangement of corneal and scleral collagen fibrils as revealed by scanning electron and atomic force microscopy*. Arch Histol Cytol. 2000 May, 63(2), 127-135.
10. Yamamoto S, Hitomi J, Sawaguchi S, Abe H, Shigeno M, Ushiki T: *Observation of human corneal and scleral collagen fibrils by atomic force microscopy*. Jpn J Ophthalmol. 2002 Sep-Oct, 46(5), 496-501.
11. Miyagawa A, Kobayashi M, Fujita Y, Hamdy O, Hirano K, Nakamura M, Miyake Y: *Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy*. Cornea. 2001 Aug, 20(6), 651-656.
12. Lombardo M, De Santo MP, Lombardo G, Barberi R, Serrao S: *Roughness of excimer laser ablated corneas with and without smoothing measured with atomic force microscopy*. J Refract Surg. 2005 Sep-Oct, 21(5), 469-475.
13. Ziebarth NM, Wojcikiewicz EP, Manns F, Moy VT, Parel JM: *Atomic force microscopy measurements of lens elasticity in monkey eyes*. Mol Vis 2007, 13, 504-510.
14. Lombardo M, De Santo MP, Lombardo G, Barberi R, Serrao S: *Analysis of intraocular lens surface properties with atomic force microscopy*. J Cataract Refract Surg. 2006 Aug, 32(8), 1378-1384.
15. Lombardo M, Carbone G, Lombardo G, De Santo MP, Barberi R: *Analysis of intraocular lens surface adhesiveness by atomic force microscopy*. J Cataract Refract Surg. 2009 Jul, 35(7), 1266-1272.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.02.2011 r. (1280)
Zakwalifikowano do druku 31.12.2011 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

lek. med. Michał Milka
Oddział Okulistyczny Okręgowego Szpitala Kolejowego
ul. Panewnicka 65
40-760 Katowice
e-mail: milkamichal@gmail.com