

Uniwersytet Warszawski

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Badanie własności fizycznych
i modelowanie pęcherzyków
zewnątrzkomórkowych w nano-skali
z użyciem mikroskopii sił atomowych
oraz analizy śledzenia nanocząstek

Katarzyna Życieńska

Praca doktorska pod opieką naukową
dr. hab. Macieja Kamińskiego, prof. UW
oraz dr. Józefa Gintera

Warszawa 2025

Podziękowania

Nie mądrość świata jest najważniejsza, ale Miłość. Dążąc do prawdziwego Celu życia zdobywajmy jedno i drugie!

Dziękuję wszystkim wspaniałym ludziom, których spotkałam w trakcie pracy nad moją rozprawą doktorską. Chcę podziękować przede wszystkim moim Promotorom, którzy zawsze byli dla mnie wsparciem i na których nieocenioną pomoc zawsze mogłam liczyć, czego mogłam szczególnie doświadczyć w najtrudniejszych chwilach. Dziękuję z całego serca!

Dziękuję wszystkim pracownikom Zakładu Fizyki Biomedycznej za tworzenie niepowtarzalnej atmosfery i wielką życzliwość. Dziękuję, że mogłam z Wami pracować. W szczególności dziękuję Beacie Pszczołkowskiej-Kępie i Idzie Wiśniewskiej za wsparcie swoją pracą w laboratorium.

Dziękuję prof. Sławomirowi Sękowi i jego zespołowi za wskazówki i dobre rady oraz udostępnienie i naukę pracy na mikroskopie sił atomowych. Dziękuję za to, że miał Pan Profesor dla mnie czas i mogłam zapytać, kiedy miałam problem z obrazowaniem. Dziękuję dr Damianowi Dziubakowi za udostępnienie procedury przygotowania liposomów i służenie pomocą.

Dziękuję dr Wioletcie Olejarz i zespołowi z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr hab. Grażynie Mosieniak prof. inst. oraz jej zespołowi z Instytutu im. Nenckiego PAN za pomoc w aspektach biologicznych i wykonane pomiary NTA.

Dziękuję też dr hab. Maciejowi Lisickiemu, prof. UW za owocną dyskusję.

Dziękuję Rodzinie za wielkie wsparcie.

Dziękuję wszystkim jeszcze raz!

Streszczenie

Celem pracy była analiza własności fizycznych pęcherzyków lipidowych w nanoskali. Aby to osiągnąć opracowano metodologię badań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na mikroskopie sił atomowych (AFM) i porównano te wyniki z danymi otrzymanymi metodą analizy śledzenia nanocząstek (NTA). Badania tego rodzaju mogą być przydatne ze względu na zastosowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w procedurach diagnostycznych jak i do wykorzystania ich jako nośników leków.

Dane i metodologia. Badano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z hodowanych w Zakładzie Fizyki Biomedycznej UW komórek nowotworu prostaty PC3 oraz odtworzone liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z tej samej linii komórkowej. Dodatkowo porównano wyniki ze sztucznie utworzonymi nanopęcherzykami — liposomami. Przeprowadzono eksperymenty z użyciem AFM oraz NTA oraz porównano wyniki eksperymentalne z modelowaniem komputerowym. Wykorzystano dwa modele komputerowe: Pierwszy z nich, stworzony wspólnie przez nasz zespół, służył do opisu kształtu i sztywności pęcherzyka osadzonego na powierzchni miki i bazował na teorii Canham–Helfricha. Drugi opisywał osadzanie się pęcherzyków na podłożu, bazując na teorii ruchów Browna w kropli cieczy.

Wyniki. Opracowano procedurę obrazowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na AFM w cieczy, w szczególności efektywny sposób uzyskiwania pozbawionego zanieczyszczeń podłoża mikowego o dodatnim ładunku powierzchniowym. Badano również kąt przylegania pęcherzyków do podłoża i zaobserwowano jego malejącą zależność od średnicy pęcherzyka. Zapostulowano nową metodę badania błony lipidowej w oparciu o parametry geometryczne nanopęcherzyków, z wykorzystaniem modelowania. Zaobserwowano wzrost średnich średnic pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w czasie od nałożenia próbki na podłoże. Porównanie wielkości pęcherzyków uzyskanych różnymi metodami pokazało, że większe są średnice hydrodynamiczne (z NTA) niż geometryczne (z AFM).

Zasadnicze osiągnięcia i nowatorskie rezultaty uzyskane podczas pracy nad doktorem obejmowały: ustalenie metodologii obrazowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na AFM, zaobserwowanie i zamodelowanie zwiększania się średnic geometrycznych wraz z czasem od nałożenia próbki na podłoże, zaproponowanie współczynnika skalowania AFM-NTA jako cechy charakteryzującej dany typ pęcherzyków, zauważenie i modelowe potwierdzone zależności zwiększania kąta przylegania i powiązanego z nim

współczynnika wysokość / promień krzywizny (H/R_c) dla mniejszych pęcherzyków oraz zaproponowanie szybkiej procedury szacowania modułu zginania na podstawie geometrii pęcherzyków i ograniczonej liczby spektroskopii sił. Można liczyć, że praca przyczyni się zarówno do wzbogacenia metodologii badań nanopęcherzyków za pomocą AFM i NTA, jak i posłuży lepszemu poznaniu własności pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Słowa kluczowe: pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, liposomy, mikroskopia sił atomowych, AFM, analiza śledzenia nanocząstek, NTA, moduł zginania

Abstract

The aim of this work was to analyze the physical properties of lipid vesicles at the nanoscale. To achieve this, a methodology was developed to study extracellular vesicles using atomic force microscopy (AFM) and to compare these results with data obtained by nanoparticle tracking analysis (NTA). This type of research may be useful for the application of extracellular vesicles in diagnostic procedures and for their use as drug carriers.

Data and Methodology. Extracellular vesicles from PC3 prostate cancer cells cultured at the Department of Biomedical Physics, University of Warsaw, were studied, as well as reconstituted, lyophilized extracellular vesicles from the same cell line. In addition, results were compared with those for artificially created nanovesicles—liposomes. Experiments were conducted using AFM and NTA, and the experimental results were compared with computational modeling. Two computational models were used: the first, developed by our team was used to describe the shape and stiffness of a vesicle attached to a mica surface and was based on Canham–Helfrich theory. The second described the settling of vesicles on a substrate, based on the theory of Brownian motion in a liquid droplet.

Results. A procedure for imaging extracellular vesicles by AFM in liquid was developed, including an effective method for obtaining a contaminant-free mica substrate with a positive surface charge. The vesicle-substrate contact angle was also studied and it was observed to decrease with increasing vesicle diameter. A new method for studying lipid membranes was proposed, based on the geometric parameters of nanovesicles and informed by computational modeling. An increase in the average diameter of extracellular vesicles was observed over time after the sample was deposited on the substrate. A comparison of vesicle sizes obtained by different methods showed that the hydrodynamic diameters (from NTA) were larger than the geometric diameters (from AFM).

The principal achievements and innovative results obtained during my doctoral work included: establishing a methodology for imaging extracellular vesicles with AFM, observing and modeling the increase in geometric diameters over time after sample deposition on the substrate, proposing an AFM–NTA scaling factor as a characteristic of a given vesicle type, observing and modeling the relationship between the increasing contact angle and the related height / radius of curvature (H/R_c) ratio for smaller

vesicles, and proposing a rapid procedure for estimating the bending modulus based on vesicle geometry and a limited number of force spectroscopy measurements. It is hoped that this work will contribute to enriching the methodology for studying nanovesicles using AFM and NTA and to a better understanding of the properties of extracellular vesicles.

Keywords: extracellular vesicles, liposomes, atomic force microscopy, AFM, nanoparticle tracking analysis, NTA, bending modulus

Spis treści

I	Wstęp	13
1	Skrócony opis pracy nad pęcherzykami	13
2	Pęcherzyki lipidowe	16
2.1	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	16
2.2	Liposomy	18
3	Używane metody analizy nanocząstek	19
3.1	Wstęp o mikroskopii sił atomowych	20
3.2	Wstęp o analizie śledzenia nanocząstek	23
II	Metodologia eksperymentalna	23
4	Pozyskiwanie materiału badawczego	24
4.1	Pęcherzyki z hodowli komórkowej	25
4.2	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe liofilizowane	26
4.3	Liposomy	26
5	Metodologia obrazowania AFM	27
5.1	Podłoże mikowe	27
5.1.1	Procedura uzyskiwania czystego podłoża	28
5.2	Obrazowanie AFM	29
5.2.1	Refleksje osobiste	29
5.2.2	Sondy użyte do obrazowania mikroskopią sił atomowych	31
5.2.3	Tryby obrazowania	31
5.3	Artefakty obrazowania AFM	32
5.3.1	Wstępne filtrowanie obrazów AFM	33
6	Metodologia analizy śledzenia nanocząstek (NTA)	33
III	Parametry geometryczne pęcherzyków	34

7	Wyznaczanie parametrów geometrycznych H, R_c, FWHM	34
7.1	Wyszukiwanie obiektów na obrazie	34
7.2	Wyznaczenie wysokości i szerokości połówkowej	34
7.3	Używana poprawka na H	37
7.4	Dwa sposoby wyznaczania R_c	37
8	Wyznaczanie średnicy pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (d^{geom})	39
9	Sposób wyboru pęcherzyków do dalszej analizy	41
9.1	Odpowiednia wysokość	41
9.2	Okrągłość	43
9.3	Regularność — podobieństwo R_c z dopasowania do R_c wyliczonego z FWHM i H	43
10	Wyniki parametrów geometrycznych dla różnych pęcherzyków	45
10.1	Liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3	45
10.1.1	Histogramy H	45
10.1.2	Histogramy FWHM	45
10.1.3	Histogramy R_c	48
10.1.4	Histogramy d^{geom}	48
10.1.5	Dyskusja	50
10.2	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3	52
10.3	Parametry geometryczne liposomów	53
IV	Model przylegania do podłoża	53
11	Kąt przylegania do podłoża (α)	56
11.1	Hipoteza o stałym kącie przylegania	56
11.2	Wyniki — wykresy α vs d^{geom}	57
12	Numeryczny model pęcherzyka	59
12.1	Opis modelu pęcherzyka przyczepionego do podłoża	59
12.2	Minimalizacja energii swobodnej pęcherzyka	60
12.3	Wykresy α od średnicy pęcherzyka — wyniki dla modelu	63
12.4	Wykresy H/R_c	64

12.5 Dopasowanie parametrów modelu do wyników eksperymentu	65
V Badanie sztywności pęcherzyków i wyznaczanie modułu zginania	67
13 Krzywa spektroskopii sił	70
14 Sztywność	74
14.1 Uzyskane spektroskopie pęcherzyków	75
15 Model pęcherzyka wciśniętego	79
15.1 Tworzenie pęcherzyka i naciskanie	79
15.2 Modelowanie spektroskopii sił	79
16 Wyznaczenie modułu zginania	81
16.1 Wyznaczanie modułu zginania we współczesnych badaniach	82
16.2 Wyznaczenie modułu zginania korzystając z modelu	83
16.3 Znaleziony moduł zginania	85
17 Dyskusja	86
VI Uwzględnienie poruszania się pęcherzyków w cieczy	87
18 Porównanie średnic geometrycznych i hydrodynamicznych	87
18.1 Rozkłady log-normalne	88
18.2 Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic geometrycznych . . .	90
18.3 Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych .	90
18.4 Porównanie średnic geometrycznych i hydrodynamicznych	93
19 Zmiany średniego rozmiaru w czasie	96
19.1 Porównanie histogramów średnic w zależności od czasu od nałożenia próbki	96
19.2 Symulacja ruchów Browna	96
19.2.1 Metodologia	97
19.2.2 Wyniki symulacji	99
19.2.3 Dyskusja	102

Część I

Wstęp

1 Skrócony opis pracy nad pęcherzykami

W naszym zespole, i z tego co wiem również na Uniwersytecie Warszawskim, nikt wcześniej nie zajmował się mikroskopią sił atomowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pierwsze badania własności fizycznych nanopęcherzyków z wykorzystaniem AFM i NTA wymagały opracowania metodologii od podstaw. Okazały się dużo trudniejsze w praktyce niż początkowo się wydawało — świat nano na pograniczu biologii, chemii i fizyki kryje mnóstwo zagadek, które naukowcy próbują rozwiązywać, jednak bardzo często bez uzyskania konsensusu co do sposobu prowadzenia badań i interpretacji wyników. Dlatego — wbrew pierwotnemu pomysłowi — całość swojej pracy nad doktoratem poświęciłam zagadnieniom metodologicznym.

Wybranie odpowiedniej linii komórkowej do badań

Pierwotnym założeniem pracy było to, żeby opisać własności fizyczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek nowotworu prostaty. Miało to służyć rozróżnieniu pęcherzyków z komórek zdrowych i nowotworowych. Zdecydowałam się w pierwszym kroku zająć pęcherzykami z komórek nowotworowych, gdyż było to związane z badaniami zespołu, ponadto były one łatwiejsze w hodowli (komórki nowotworowe niestety lubią podział) oraz z tego względu, że w przypadku nowotworu komórki produkują więcej pęcherzyków od komórek zdrowych. Właśnie ze względu na uzyskanie odpowiedniej koncentracji pęcherzyków wybrano linię nowotworu prostaty PC3, a nie Du145, które również sprawdzaliśmy w naszym zespole, ale koncentracja ich była za mała do badania pod mikroskopem sił atomowych.

Opanowanie technicznych aspektów sprzętu

Prócz zagadnień metodologii badań samych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych istotne było również opanowanie techniki pomiarów mikroskopem sił atomowych i poznania wielu jego technicznych aspektów. W porównaniu z mikroskopami optycznymi jest to bardziej wymagający i czasochłonny sprzęt. Badanie własności fizycznych nanopęcherzyków jest trudne i wymagające dużej interdyscyplinarności, dlatego niewiele grup na

świecie zajmuje się tym tematem, zwłaszcza na tle wielkiej liczby grup badających ich własności biochemiczne.

Przygotowanie podłoża do badań AFM

Zaczęłam więc obrazować pęcherzyki z komórek PC3, okazało się jednak, że było widać mało tych pęcherzyków, a obrazowanie nie miało zbyt dobrej rozdzielczości. Wydawało się, że sonda ciągnie trochę pęcherzyki, co powodowało, że miały one nienaturalnie wydłużone kształty. Aby temu przeciwdziałać zastosowałam modyfikację podłoża (3-aminopropylo)trietoksysilanem (APTES-em). Dzięki temu pęcherzyki chętniej przyczepiały się do podłoża i mocniej się na nim trzymały.

Potem jednak odkryłam, że część obiektów obrazowanych to nie są pęcherzyki pochodzące z próbki. Dlatego wprowadziłam do procedury za każdym razem przed nałożeniem próbki obrazowanie podłoża celem weryfikacji jego czystości. Szukałam różnych sposobów, aby uzyskać czystą mikę pokrytą APTES-em. Po wielu próbach doprowadziło to do opracowania procedury pozwalającej w bardzo szybki sposób uzyskać podłoże do obrazowania pozbawione zanieczyszczeń, co niestety można było wykorzystać dopiero w ostatniej części moich badań.

Wpływ czasu obrazowania AFM na jego wynik

Kolejnym pytaniem w opracowaniu metodologii było: jaki wpływ ma czas między nałożeniem próbki a obrazowaniem AFM? W literaturze można spotkać różne podejścia do tego zagadnienia. Aby odpowiedzieć sobie na to pytanie postanowiłam wykonać dwukrotne obrazowanie tej samej próbki po krótszym i dłuższym czasie. Za każdym razem można było zobaczyć, że średnia szerokość pęcherzyków rośnie z czasem. Czy jest to wynik ich rozplaszczania na podłożu? Zaczęłam przeliczać jaką miałyby średnicę pęcherzyki swobodnie pływające w cieczy przy założeniu stałej powierzchni i okazało się, że ta wielkość również rośnie w czasie. Pojawiło się wtedy kolejne pytanie badawcze: czemu te średnice rosną w czasie?

Parametry geometryczne rosły z czasem. Czemu?

Dla wyjaśnienia zaobserwowanego zjawiska postawiłam dwie hipotezy: pierwszą było rozciąganie błony, a drugą, że może większe pęcherzyki docierają później do podłoża. Wprowadziłam modelowanie numeryczne, aby spróbować odpowiedzieć na te pytania.

Zaproponowałam model komputerowy wpływu ruchów Browna na osadzanie się pęcherzyków na podłożu, który pozwolił wyjaśnić zjawisko poprzez połączenie obu hipotez. Wynik ten opublikowałam w artykule naukowym.

Hipoteza o skalowaniu liniowym między średnicami z NTA i AFM, zależnym od własności fizycznych.

Jednocześnie, aby dokładniej zbadać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 wraz z zespołem zrobiliśmy badanie przy użyciu analizy śledzenia nanocząstek. Średnice z AFM (dalej zwane geometrycznymi) okazały się mniejsze od średnic z analizy śledzenia nanocząstek (średnice hydrodynamiczne). Zaproponowałam dopasowanie rozkładów log-normalnych do rozkładu średnic, co pozwoliło zauważyć, że pomimo dwukrotnej różnicy między medianami tych rozkładów, współczynniki kształtu rozkładu miały podobne wartości. Postawiłam hipotezę, że jeden rozkład pochodzi z drugiego przez skalowanie liniowe, którego współczynnik prawdopodobnie zależy od właściwości fizycznych pęcherzyków. Był to drugi z wyników opublikowanych we wspomnianym wcześniej artykule.

Czy na podstawie obrazowania AFM można wnioskować o własnościach fizycznych pęcherzyków?

Dostępne oprogramowanie mikroskopu Dimension Icon pozwala bezpośrednio w ciągu obrazowania na uzyskanie obrazów wielkości nanomechanicznych (np. moduł Younga, adhezja). Początkowo chciałam użyć właśnie tych obrazów do określenia własności mechanicznych, jednak okazało się to nie przynosić pożądaných rezultatów. Wobec tego zaczęłam zastanawiać nad tym, czy z uzyskanych geometrycznych parametrów (których miałam zebraną odpowiednią dla statystyki ilość) da się bezpośrednio wnioskować np. o sztywności pęcherzyków. Takie podejście zaprezentował w swojej pracy Ridolfi badając kąt przylegania do podłoża. Postanowiłam sprawdzić, czy dla moich danych również widać stały kąt przylegania. Zaobserwowałam pewną zależność: kąt przylegania dla mniejszych pęcherzyków był większy. Nie było stałego kąta przylegania. Czemu kąt przylegania rośnie dla małych pęcherzyków? Czy to kwestia zanieczyszczenia (jak postulował Ridolfi i in. (2020))? Czy może to zależność, którą można potwierdzić? Taki efekt był widoczny również dla liposomów. Wraz z Promotorem stworzyliśmy model komputerowy bazujący na modelu Canhama–Helfricha pęcherzyków, które osadzają się na podłożu. Model potwierdził obserwacje pochodzące z eksperymentu, że mniejsze pę-

cherzyki mogą mieć większy kąt przylegania. Niezwłocznie po złożeniu pracy doktorskiej postaram się opublikować ten wynik w artykule naukowym.

Możliwości wyznaczenia modułu zginania na podstawie porównania wyników spektroskopii sił na AFM z ich symulacją komputerową.

Kontynuując szukanie własności fizycznych pęcherzyków chciałam opracować sposób ustalania modułu zginania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, który w literaturze uchodzi za wielkość charakterystyczną dla określonego ich rodzaju. Istnieje metodologia wyznaczania modułu zginania opracowana przez Vorselena, która bazuje na wykonaniu bardzo wielu pomiarów spektroskopii sił. Podjęłam próbę uzyskania wielu pomiarów spektroskopii sił, jednak okazało się to bardzo czasochłonne i niejednoznaczne. Stworzony przez nas komputerowy model pęcherzyka daje możliwość wyznaczenia na podstawie geometrii dużej liczby pęcherzyków wartości modułu zginania (wraz z ciśnieniem osmotycznym i współczynnikiem adhezji) z dokładnością do przemnożenia przez stałą skalującą. Zaproponowałam procedurę szacowania modułu zginania przez porównanie spektroskopii z eksperymentu z jej symulacją, na co również pozwala opracowany model komputerowy. Metoda ta pozwala wykorzystać geometrię pęcherzyków z obrazowania oraz niewielką liczbę udanych pomiarów spektroskopii do szacowania modułu zginania, zwłaszcza w sytuacji, gdy dysponujemy małymi pęcherzykami. Artykuł naukowy opisujący ten wynik jest w przygotowaniu.

2 Pęcherzyki lipidowe

2.1 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

W pracy badane będą pęcherzyki produkowane przez komórki, tzw. pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Wyróżniamy wiele różnych typów tych pęcherzyków takich jak egzosomy, ektosomy, mikropęcherzyki (ang. microvesicles), czy ciała apoptotyczne (Grzybowska i in., 2019; Liu i Wang, 2023; Kumar i in., 2024). Wydzielanie ich przez komórki jest powszechnym zjawiskiem i zachodzi zarówno u organizmów eukariotycznych jak i prokariotycznych (Kumar i in., 2024). W niniejszej pracy skupiono się głównie na małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, a w szczególności na egzosomach. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są otoczone dwuwarstwą lipidową, zawierają w sobie dużą ilość białek i lipidów, a nawet kwasów nukleinowych (np. miRNA, mRNA) (Kumar i in., 2024).

Egzosomy różnią się od pozostałych wymienionych tym, w jaki sposób powstają — w procesie egzocytozy (Grzybowska i in., 2019). Mają one średnicę między 30 a 150 nm (Doyle i Wang, 2019). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe naturalnie znajdują się w płynach ustrojowych człowieka np. ślinie, moczu, krwi, a także mleku, którym matki karmią dzieci (Kumar i in., 2024). Możliwe jest również pozyskanie ich z hodowli komórkowej, gdzie znajdują się w medium, w którym żyją komórki. Wtedy o tyle jest to korzystne, że wiadomo jaki typ komórek je wytworzył, są więc wtedy mniej różnorodne. Ich zawartość oraz skład błony zależą od komórki, z której pochodzą (Sharma, LeClaire i Gimzewski, 2018). Odgrywają one istotną rolę w procesie przenoszenia informacji między komórkami na duże odległości oraz w rozwoju niektórych chorób, zwłaszcza nowotworów (Osaki i Okada, 2019; Becker i in., 2016).

Mężczyźni w wieku powyżej 50 lat, kiedy prawdopodobieństwo zachorowalności na raka prostaty znacząco wzrasta (Rawla, 2019), zazwyczaj nie są skłonni do przeprowadzania pogłębionych badań zdrowotnych, dlatego poszukuje się metod łatwego, nieinwazyjnego badania przesiewowego u starszych mężczyzn (por. Lehmann i in. 2008). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, znajdujące się w płynach ustrojowych człowieka, dają nadzieję na bycie dobrymi biomarkerami nowotworów. W przypadku nowotworu prostaty (Soekmadji, Russell i Nelson, 2013; Vlaeminck-Guillem, 2018; Lorenc i in., 2020) może mieć to duże znaczenie, ponieważ z różnych powodów nie jest łatwo go zdiagnozować. Właśnie małym pęcherzykom zewnątrzkomórkowym z komórek z nowotworu prostaty (linia komórkowa PC3) przyjrzymy się najbardziej w tej pracy.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą pełnić również rolę przy odpowiedzi na działanie promieniowania jonizującego, którego używa się np. podczas radioterapii nowotworu. Komórki nowotworowe poddane działaniu promieniowania wytwarzają egzosomy o zmienionej zawartości, mogąc prowadzić do radioodporności utrudniającej terapię i ułatwiać przerzuty. Mogą też zmieniać funkcjonowanie zdrowych komórek z otoczenia i stymulować odpowiedź odpornościową (Ni i in., 2019). Promieniowanie może zmieniać liczbę i zawartość wytwarzanych przez komórki nowotworowe egzosomów, których analiza może być narzędziem prognostycznym w radioterapii.

W płynach ustrojowych, w których naturalnie znajdują się egzosomy, lub w przypadku hodowli komórkowej w medium komórkowym występują różnego rodzaju pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz w zależności od płynu ustrojowego szereg innych obiektów. Aby wyizolować egzosomy używa się różnych metod w tym wirowania, kolumny chromatograficznej, czy wyłapywania pęcherzyków zawierających w swojej błonie konkretne białka (De Sousa i in., 2023). Izolacja różnymi metodami wpływa na póź-

niejsze cechy biofizyczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Sharma i in., 2020; De Sousa i in., 2023). Nie ma ustandaryzowanej procedury izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Doyle i Wang, 2019). Ponieważ nie jest pewne, że wszystkie otrzymane drogą izolacji pęcherzyki pochodzą z procesu egzocytozy, mimo że w wielu artykułach lub opisach produktów komercyjnych (np. liofilizowanych pęcherzyków) było używane określenie egzosomy (również w artykule mojego autorstwa (Życieńska i in., 2022)), postanowiono w niniejszej pracy zgodnie z zaleceniem MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles) stworzonym przez International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) (Welsh i in., 2024) używać nazwy małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. small extracellular vesicles, small EVs). W pracy dla uproszczenia pominięto słowo „małe” i używano nazwy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, gdyż badano tylko te obiekty, których średnice nie przekraczały 200 nm.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z zasady wytwarzane są w sposób naturalny w ludzkich tkankach, stanowią więc przede wszystkim materiał do badań diagnostycznych wytwarzających je komórek. Pracuje się jednak również nad metodami sztucznego ładowania do EVs substancji leczniczych, aby następnie użyć je do terapii celowanej nastawionej na określony rodzaj komórek np. nowotworowych (Fu i in., 2022). EVs mogą nawet pokonywać barierę krew-mózg (Di Bella, 2022). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nośniki leków znajdują też zastosowanie w medycynie estetycznej (Pinto i Sánchez-Vizcaíno Mengual, 2024).

2.2 Liposomy

Można również podawać do krwi leki zamknięte w sztucznie wytworzonych pęcherzykach lipidowych zwanych liposomami (w wypadku obiektów o podobnej wielkości jak egzosomy mówić można o nanoliposomach). Są one otoczone podwójną błoną lipidową, która może być wzbogacona o inne związki, takie jak np. białka przeciwciał pasujących do antygenów obecnych w interesujących nas komórkach. Podawanie leków zamkniętych w tak zwanych nanokapsułkach lipidowych (Lombardo i Kiselev, 2022) może przeciwdziałać ich degradacji we krwi, jak również może być sposobem dostarczenia ich do określonych komórek, np. komórek rakowych. Na ich wchłanianie przez komórki mają wpływ nie tylko własności biochemiczne, ale również własności fizyczne, takie jak sztywność (Guo i in., 2018).

3 Używane metody analizy nanocząstek

Badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych koncentrują się w dużej mierze na ich składzie biochemicznym oraz ich roli w komunikacji międzykomórkowej (Osaki i Okada, 2019). Specyficzne antygeny w błonach pozwalają na znakowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych środkami fluorescencyjnymi i obserwację pod mikroskopem optycznym (Panagopoulou i in., 2020). Metodami optycznymi takimi jak DLS (ang. dynamic light scattering), NTA (ang. nanoparticle tracking analysis) lub cytometria można uzyskać niektóre informacje statystyczne o rozkładzie wielkości pęcherzyków (Panagopoulou i in., 2020). Obrazowanie mikroskopowe pojedynczego pęcherzyka można przeprowadzić za pomocą szeroko stosowanej do tego celu mikroskopii elektronowej (Gardiner i in., 2016). Istnieje również jej modyfikacja cryo-EM, gdzie badana próbka jest zamrażana. Dzięki tej metodzie zamrożenia można było zobaczyć bardziej okrągły kształt pęcherzyków (na początku przy obserwacji za pomocą TEM wydawały się one wklęsłe, gdyż próbka wymagała znaczącej preparacji przed obrazowaniem) (Sharma, LeClaire i Gimzewski, 2018). Istnieją standardy analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) transmisyjną mikroskopią elektronową TEM, chociaż są one zależne od osoby przeprowadzającej badanie i obranego protokołu (Rikkert i in., 2019).

Mikroskopia sił atomowych (AFM) dostarcza najwięcej informacji o wielkości, morfologii 3D, właściwościach biofizycznych, takich jak adhezja, elastyczność i odkształcalność dla pojedynczego pęcherzyka. Istnieje wiele modów obrazowania AFM (Dufrêne i in., 2017). Modyfikacja końcówki sondy specyficznym przeciwciałem umożliwia mapowanie topografii siły molekularnej wiązania chemicznego i ustalenie lokalizacji antygenów pęcherzyków na obrazie (Stroh i in., 2004). Nadal nie ma konsensusu co do strategii badania własności fizycznych pęcherzyków na AFM (Parisse i in., 2017). Według przeglądu (Gardiner i in., 2016), tylko 10% publikacji dotyczących EVs używało AFM jako metody do analizy pęcherzyków. Zainteresowanie analizą AFM wzrosło w ostatnich latach, ale nadal nie ma zbyt wielu publikacji, w których szczegółowo badane są właściwości biofizyczne małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych metodą AFM. Co za tym idzie ograniczona jest liczba typów zbadanych komórek, np. właściwości fizyczne pęcherzyków pochodzących z komórek raka prostaty PC3 nie były szczegółowo badane za pomocą AFM. Były one co prawda obrazowane (patrz Dean i in. (2017)), ale nie znalazłam badania ich sztywności, geometrii, czy modułu zginania. Nadal nie istnieje standard analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pod AFM, co stanowi cel niektórych badań (np. Skliar i Chernyshev (2019)). Również mój projekt doktorski

weźmie udział w tym procesie.

Théry i in. (2018) w zaleceniu MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles) podaje, że powinno się używać dwóch uzupełniających się metod do badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W tej pracy zostały użyte analiza śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA) oraz mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM), co jest zgodne z tymi zaleceniami. Zarówno NTA jak i AFM mają tę zaletę, że badają konkretny pęcherzyk. NTA „śledzi” jego przemieszczenie w funkcji czasu, natomiast AFM pozwala dotknąć pojedynczego pęcherzyka i zmierzyć szereg jego parametrów mechanicznych. Z obu metod można pośrednio zbadać geometrię pęcherzyków. Obie metody potrzebują zastosowania przebiegów, aby wnioskować o średnicach badanych obiektów.

3.1 Wstęp o mikroskopii sił atomowych

Mikroskop sił atomowych (AFM) to mikroskop skaningowy, w którym topografię powierzchni uzyskuje się z badania próbki przesuwając sondę nad próbką i skanując wybrany obszar linii po linii. Pierwszym tego typu mikroskopem skaningowym był mikroskop tunelowy, opierający się na zjawisku tunelowania elektronów (Gavara, 2017). Zasadniczo AFM składa się z kilku elementów. Elementem mającym kontakt z podłożem jest sonda, której końcówka ma kształt ostrza o różnym kształcie w zależności od modelu sondy i bardzo małym promieniu krzywizny rzędu kilku do kilkudziesięciu nanometrów. Sonda ta jest przyczepiona do dźwigni, na którą pada światło lasera, następnie odbijając się pada ono na fotodetektor. Ma on cztery pola (kwadraty) na których niezależnie można odczytać wytworzone napięcie.

Procedura przygotowania aparatury na używanym w tej pracy sprzęcie firmy Bruker Dimension Icon jest następująca: najpierw ustawia się pozycję lasera w taki sposób, żeby jego światło padało na dźwignię; widać to jako podłużny cień na podłożu (laser pada od góry na dźwignię). Następnie kierunek wiązki ustala się tak, aby napięcie między diodami fotoczułymi było jak najbliższe zeru. Dzięki temu później będzie możliwe odczytanie wygięcia dźwigni na podstawie zmian napięcia na polach fotodetektora (Gavara, 2017). Aby możliwa była dokładna zmiana położenia sondy o bardzo małe odległości, wykorzystuje się piezoelektryki, które mają tę własność, że pod wpływem zmiany przyłożonego do nich napięcia kurczą się lub rozszerzają. Często stosuje się po jednym piezoelektryku w każdym z trzech kierunków, co umożliwia przemieszczenie sondy o odległość nawet mniejszą niż nanometr (Gavara, 2017).

Istnieje kilka trybów obrazowania AFM. Pierwszym jest tryb kontaktowy w którym sonda stale dotyka powierzchni. W trakcie skanowania, wraz z przemieszczaniem się sondy w kierunkach poziomych X-Y, układ sprzężenia zwrotnego tak modyfikuje położenie pionowe Z, aby zachować stałą siłę oddziaływania między sondą i badaną próbką. Ten sposób obrazowania z powodzeniem może być stosowany do badania twardych substancji, np. kryształów. Jednak do obrazowania miękkich obiektów pochodzenia biologicznego, takich jak komórki lub pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, tryb ten nie bardzo się sprawdza. Z jednej strony sonda „szorująca” po powierzchni łatwo może uszkodzić miękką błonę lipidową, z drugiej strony może też przesuwac (ciągnąć za sobą) pęcherzyk po powierzchni podłoża, na którym próbka została położona. Do obiektów biologicznych zwykle lepiej sprawdza się tryb przerywanego kontaktu (ang. tapping mode), w którym sonda wykonuje kontrolowane drgania, na przemian zbliżając się do próbki na odległość, na której następuje silne odpychanie sondy i oddalając się na odległość, gdzie siły oddziaływania między próbką i sondą spadają do zera. Stosuje się też czasem tryb bezkontaktowy, w którym sonda znajduje się cały czas w odległości kilku nanometrów od powierzchni próbki, przyciągana przez nią siłą adhezji (siłami van der Waalsa).

W swojej pracy używam trybu PeakForce Tapping, który jest modyfikacją trybu przerywanego kontaktu wprowadzoną przez firmę Bruker, gdzie sonda oscyluje z częstością 2 kHz lub 1 kHz, daleką od swojej częstości rezonansowej (zwykle kilkadziesiąt kHz) (Xu i in., 2018). W tym wypadku układ sprzężenia zwrotnego dąży do utrzymania stałej amplitudy oscylacji sondy w trakcie skanowania, podczas gdy piezoelektryk poruszający dźwignią w kierunku pionowym otrzymuje sinusoidalne napięcie o stałej amplitudzie. Gdy sonda najeżdża na wznoszący się obszar próbki, amplituda maleje, więc układ kontrolny sondę podnosi. Gdy skanowany obszar obniża swoją wysokość, amplituda drgań wzrasta, więc sonda jest obniżana. Wśród parametrów przekazywanych układowi kontrolnemu istotne znaczenie może odgrywać maksymalna siła oddziaływania sondy z podłożem — trzeba zadbać, by algorytm sterujący obrazowaniem nie próbował uzyskiwać lepszej jakości obrazu poprzez zastosowanie zbyt dużej siły, która mogłaby doprowadzić do pęknięcia pęcherzyków (powyżej ok. 2-5 nN) LeClaire, Gimzewski i Sharma (2021).

W trakcie obrazowania zapisywane są krzywe zależności wychylenia dźwigni od jej położenia, które dzięki odpowiedniej kalibracji przeliczane są na zależność siły od odległości. Pierwszym krokiem jest kalibracja czułości wygięcia sondy (ang. deflection sensitivity). Technicznie zbliża się sondę do płaskiej, twardej powierzchni i obserwuje się jak zachowuje się przy dotknięciu do podłoża. Czułość wygięcia sondy jest odwrot-

nością nachylenia w regionie, gdzie sonda dotyka podłoża (mierzona w nm/V). Dzięki temu można przeliczyć sygnał na fotodiodzie na ugięcie dźwigni (Gavara, 2017).

Następnym ważnym krokiem jest kalibracja sztywności dźwigni. Robi się to na różne sposoby, często poprzez wykorzystywanie zjawiska termicznych fluktuacji wychylenia dźwigni na skutek uderzeń cząsteczek cieczy. Na podstawie widma częstości drgań i dopasowania do niego krzywej ustala się sztywność dźwigni — według modelu przyjętego w oprogramowaniu mikroskopu (Gavara, 2017; Bruker, 2011).

Na podstawie analizy zebranych danych można przedstawić mapę różnych interesujących wielkości na obrazowanym obszarze. Pierwszą z nich jest surowa wartość wysokości podstawy dźwigni. Drugą wartością jest odchylenie amplitudy ruchów sondy od ustawionej wartości (PeakForce error). Kiedy sonda najeżdża na wzgórze, odchylenie jest ujemne, a układ sprzężenia zwrotnego podnosi sondę, gdyż mierzona wysokość jest za mała. Odwrotnie zaś jest z drugiej strony, gdy sonda zjeżdża ze wzgórza. Co ciekawe, często można w artykułach zobaczyć, że autorzy chętnie przedstawiają obraz błędu amplitudy (np. (Dujardin i in., 2019)), ponieważ daje on wrażenie trójwymiarowej powierzchni oświetlonej z jednej strony. Na podstawie wysokości podstawy dźwigni oraz innych pomiarów wylicza się rzeczywistą wysokość próbki nad podłożem w funkcji położenia X-Y. Tworzy się osobne obrazy wysokości dla dwóch kierunków skanowania, różnice między tymi obrazami mogą między innymi obrazować, jak sonda delikatnie pociąga za sobą pęcherzyki na podłożu.

Sonda porusza się ruchem oscylacyjnym w dół i w górę, można więc każde jej dotknięcie próbki (ang. tap) podzielić na dwa etapy: ruch w dół zwany podejściem (ang. trace) oraz ruch w górę zwany odejściem (ang. retrace). Na podstawie krzywej podejścia, stosując wybrany przez badacza model zachowania próbki pod wpływem nacisku na nią, wylicza się moduł Younga, prezentowany przez oprogramowanie mikroskopu pod nazwą sztywności (ang. stiffness), chociaż słowo to często używane jest też na określenie pochodnej siły względem wysokości w punkcie styku sondy z próbką — i w takim znaczeniu będzie używane w dalszych rozdziałach niniejszej pracy. Na podstawie krzywej odejścia prezentuje się obrazy adhezji (adhesion), które pokazuje wartość bezwzględną minimum siły na tej krzywej — jakiej siły trzeba użyć, aby oderwać sondę od próbki. W ogólności wielkości mechaniczne takie jak sztywność i adhezja mogą zależeć od innych parametrów obrazowania, w szczególności od prędkości ruchu sondy (Lima i in., 2024). W tej pracy jednak do ustalania tych wartości nie stosuje się obrazów uzyskiwanych w trakcie obrazowania (było to próbowane, ale nie przyniosło dostatecznie dobrych rezultatów), ale inne podejście, w którym sonda porusza się tylko pionowo i dużo wolniej.

Zostanie to opisane w rozdziale 13.

3.2 Wstęp o analizie śledzenia nanocząstek

Analiza śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA) wykorzystuje w swoim działaniu ruchy Browna. Są to chaotyczne ruchy, którym podlegają cząstki zawieszone w roztworze, wywołane zderzeniami z cząsteczkami cieczy. Jeśli mamy do czynienia z nanopęcherzykami zawieszonymi w wodzie lub soli fizjologicznej to będą one się w niej widocznie poruszały, co można sfilmować za pomocą specjalnej, odpowiednio czulej kamery. Ich średnicę można opisać korzystając z modelu Einsteina–Stokesa na stałą dyfuzji:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d^{\text{hydro}}} \quad (1)$$

gdzie D to stała dyfuzji, k_B to stała Boltzmanna, T to temperatura, η to współczynnik lepkości cieczy, d^{hydro} to średnica obiektu podlegającego ruchom Browna (Einstein, 1905; Srivastava i Khanna, 2009).

Natomiast stała dyfuzji w dwuwymiarowym przypadku (mającym miejsce w NTA) przemieszczania się w kierunku x i y w czasie t można opisać wzorem $\langle(x, y)^2\rangle = 4Dt$, gdzie $\langle(x, y)^2\rangle$ oznacza wariancję przemieszczeń dla danej cząstki w kolejnych klatkach filmu (Foreman-Ortiz i in., 2022). Łącząc te dwa wzory można zauważyć, że przy tych samych parametrach, ale różnych średnicach obiektów, te z mniejszą średnicą będą poruszały się szybciej. Wzory te pozwalają na podstawie ruchu cząstki wnioskować o jej wielkości. Właśnie z tego zjawiska korzysta NTA. Oświetla się próbkę laserem i kamerą rejestruje obraz mikroskopowy pod kątem prostym do kierunku padania światła. W praktyce widać na tych obrazach przemieszczające się kropki powstałe od rozpraszania światła lasera (patrz rys. 1), przy czym ich wielkości na tym obrazie nie odzwierciedlają ich rzeczywistej wielkości (na ogół badane nanocząstki są dużo mniejsze od długości fali światła), ale istotne jest to, jak one się poruszają. Na zarejestrowanych obrazach dwuwymiarowych znajdowane są poszczególne obiekty, a następnie śledzone jest ich położenie w czasie (stąd nazwa metody) i na tej podstawie wyznaczana jest ich średnica. Jeśli chce się obrazować tylko jeden typ cząstek, można zastosować ich wybiórcze barwienie luminescencyjne i obserwować świecenie przy oświetlaniu odpowiednią długością fali światła.



Rysunek 1: Pojedyncza klatka z filmu powstałego korzystając z analizy śledzenia nanocząstek. Na białą są widoczne obiekty odbijające światło lasera. W tym badaniu analizowano rozmiar pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3.

Część II

Metodologia eksperymentalna

4 Pozyskiwanie materiału badawczego

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe naturalnie występują w płynach ustrojowych człowieka. Jednym ze sposobów ich pozyskania jest więc pobranie tych płynów np. próbki krwi, moczu, śliny itp. Można też użyć pęcherzyków z hodowli danej linii komórkowej. Wiemy wówczas, że badane pęcherzyki pochodzą z konkretnej linii komórkowej i wobec tego mamy mniejszą ich różnorodność.

Zarówno nanopęcherzyki pozyskane z płynów ustrojowych jak i te z hodowli komórkowej trzeba poddać procesowi izolacji, aby oddzielić je od innych obiektów będących czy to w medium komórkowym, czy to w płynach ustrojowych. Niestety nie ma obecnie ustandaryzowanej procedury izolacji i wielu naukowców używa różnych metod izolacji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co wpływa później na dalszą analizę (np. (Gámez-Valero i in., 2016) pokazuje, że różne sposoby izolacji wpływają chociażby na samo badanie wielkości pęcherzyków i białka w nich występujące).

Do przedstawionych badań oprócz pęcherzyków uzyskanych z komórek hodowanych w Zakładzie Fizyki Biomedycznej użyto wyprodukowanych komercyjnie liofilizowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Pochodzenie takich pęcherzyków liofilizowanych

jest takie samo jak opisane powyżej — pochodzą z izolacji z medium z hodowli komórkowej lub z płynów ustrojowych. W niniejszej pracy do badań użyto pęcherzyków pozyskanych z hodowli komórkowej (zarówno jeśli chodzi o te z hodowli komórkowej jak i te liofilizowane).

4.1 Pęcherzyki z hodowli komórkowej

Ważnym etapem hodowli komórkowej jest zapewnienie odpowiednich warunków dla hodowanych komórek. W przeprowadzonych badaniach używano linii komórkowej PC3 z przerzutów do kości nowotworu prostaty (American Type Culture Collection, ATCC CRL-1435). Są to komórki o dużej inwazyjności z IV stadium nowotworu (Stachurska, Wronka i Kowalczyńska, 2006).

Szczegóły procesu hodowli i izolacji zostały opisane w (Życieńska i in., 2022). Hodowano komórki w inkubatorze używając pożywki Eagle’a Dulbecco (DMEM-F12) z 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 2,0% roztworem penicyliny i streptomycyny. Pozyskiwanie pęcherzyków zachodziło w dwóch etapach: hodowli komórkowej i izolacji pęcherzyków. Komórki wyrzucają pęcherzyki na zewnątrz siebie i właśnie z płynu w którym są, izoluje się te pęcherzyki. Komórkom trzeba zapewnić dogodne warunki, żeby mogły się dzielić. Hodowane były w inkubatorze w temperaturze 37°C z dostępem do dwutlenku węgla w stężeniu 5%. Istotnym aspektem było, by na 4 dni przed izolacją zmienić podłoże dla komórek na podłoże bez płodowej surowicy bydlęcej FBS (czyli został sam DMEM-F12 i 2% roztwór penicyliny ze streptomycyną). Dzięki temu nie poddano procesowi izolacji bydlęcych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych znajdujących się w FBS.

Następnym krokiem po przeprowadzeniu hodowli komórkowej była izolacja komórkowa. W naszym przypadku składała się ona z dwóch głównych etapów: wirowania oraz przepuszczenia próbki przez kolumnę chromatograficzną. Wirowano dwukrotnie, aby pobrać pęcherzyki o odpowiedniej gęstości. Następnie przefiltrowano próbkę przez mikrofiltr 0,22 μm w celu usunięcia fragmentów komórek, ciałek apoptotycznych i większych mikropęcherzyków. Ważnym krokiem było przepuszczenie próbki przez kolumnę chromatograficzną mini-SEC, dzięki czemu pobierając odpowiednią frakcję (4-tą) zebrano pęcherzyki o odpowiedniej wielkości. Wyizolowane pęcherzyki zamrożono w -80°C i rozmrożono przed prowadzonymi badaniami. Hodowlą oraz izolacją zajmowała się w naszym zespole mgr Beata Pszczółkowska.

Sprawdzono również za pomocą NTA zawartość białek charakterystycznych dla eg-

zosomów CD63, CD9 i CD81, aby potwierdzić, że są one obecne w badanej próbce wyizolowanych z hodowli komórkowej pęcherzyków. Potwierdzono tym badaniem obecność CD9.

4.2 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe liofilizowane

Do badań wykorzystano dostępne komercyjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 nowotworu prostaty firmy Hansa BioMed. Użyto tej samej linii co z hodowli, aby łatwiejsze było ich porównanie.

Pęcherzyki rekonstruowano za pomocą procedury opublikowanej przez producenta (HansaBioMed, 2025). W przeprowadzonych eksperymentach użyto następujących kroków. Do próbki zawierającej 100 μg liofilizowanych pęcherzyków dolano 300 μl wody dejonizowanej. Wymieszano próbkę pipetując w górę i w dół, a następnie wymieszano używając wortexu (ang. vortex mixer) przez 1 min. W procedurze pominięto tylko etap wirowania, który miał na celu zebranie pęcherzyków na dnie próbki. Tak odtworzone pęcherzyki albo od razu obrazowano, albo mrożono w temperaturze -80°C .

4.3 Liposomy

Liposomy to sztucznie tworzone pęcherzyki lipidowe. Swoją strukturą błony przypominają małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Do ich wytworzenia używane są odpowiednie lipidy — w tym przypadku były to DOPC (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina) oraz DPPC (1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina). Okazało się, że chociaż łatwiejsze w pozyskaniu, gdyż można je samemu wytworzyć, to jednak w przeciwieństwie do naturalnie występujących pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są mniej stabilne i mają większą tendencję do niszczenia się na podłożu i tworzenia warstwy lipidowej. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że nie zawierają w sobie białek czy cholesterolu, które to sprawiają, że naturalne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są bardziej trwałe. Dodanie cholesterolu do tworzonych liposomów zwiększa ich stabilność Briuglia i in. (2015). W badaniach liposomów zastosowano wodny roztwór sukrozy 200 mMol, aby zwiększyć ich stabilność i ułatwić obrazowanie na mikroskopie sił atomowych.

Wytworzenie liposomów składało się z trzech głównych etapów: tworzenia roztworu lipidów w chloroformie, odparowywaniu roztworu, dodaniu wody dejonizowanej i wystawieniu próbki na działanie ultradźwięków. Na początku odmierzane było 4 mg wybranych lipidów do których dodano 4 ml chloroformu. Po 1 ml nalewano do ependorfów.

Następnym etapem było odparowanie ich w środowisku zawierającym głównie gaz szlachetny jakim jest argon, a później wkładano pod próżnię na 1 h. Tak przygotowane próbki mrożono w temperaturze -20°C . W dniu badania do probówek dodawano 1 ml wody dejonizowanej i na 1 h wystawiano na działanie ultradźwięków. Następnie całość filtrowano przez filtr $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Ich wytworzeniem zajmowała się mgr Ida Wiśniewska (członek zespołu), która też uczestniczyła w ich badaniu.

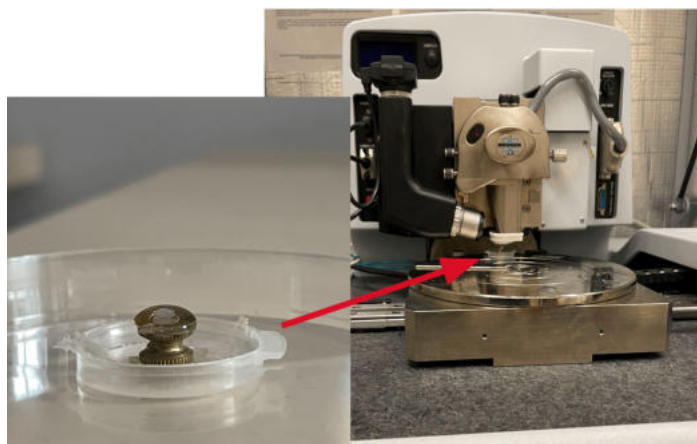
5 Metodologia obrazowania AFM

5.1 Podłoże mikowe

Jako podłoże do obrazowania został użyty dysk mikowy o średnicy 1 cm. Pokryty został on (3-aminopropyl)trietoksylsilanem (APTES), aby wywołać przyciąganie elektrostatyczne nanopęcherzyków do podłoża. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mają ładunek powierzchniowy ujemny, dzięki czemu chcą przyciągać się do podłoża pokrytego APTESem (Kikuchi i in., 2020; Vorselen i in., 2020; Midekessa i in., 2020; Dobhał i in., 2023). Zastosowano roztwór APTESu z toluenem $0,03\%$ v/v jak w pracy Kikuchi i in. (2020).

Ostateczna procedura przygotowania podłoża mikowego wyglądała następująco:

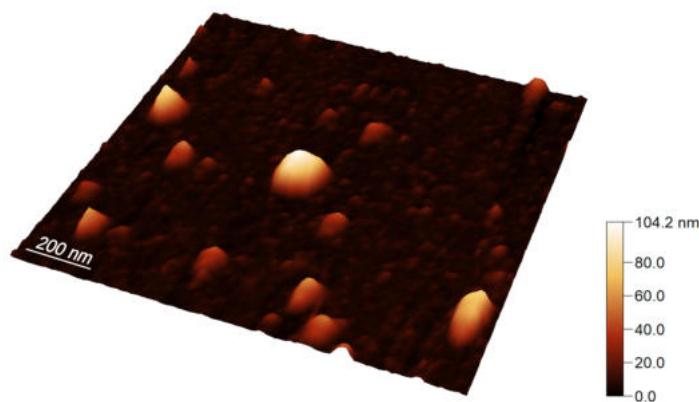
1. Przygotowanie podestu na mikę (przyklejenie do podstawki, patrz rys. 2) i przyczepienie dwustronną taśmą klejącą do niego krążka miki o średnicy 1 cm.
2. Zerwanie warstwy miki taśmą klejącą i sprawdzenie, czy warstwa miki oderwana pokrywa całość krążka (a nie zerwał się tylko kawałek).
3. Nałożenie $30\text{ }\mu\text{l}$ roztworu APTES-toluen na mikę na 3 min ($0,03\%$ v/v APTES. $3\text{ }\mu\text{l}$ APTESu w 10 ml toluenu). Mika została następnie przykryta szkiełkiem. Było to przeprowadzone pod wyciągiem.
4. Osuszenie miki sprężonym powietrzem.
5. Nałożenie kropli cieczy w której będzie przebiegać obrazowanie (woda dejonizowana lub PBS).
6. Sprawdzenie czystości podłoża poprzez obrazowanie na AFM, ustalono, że jeśli mika zawiera więcej niż 1 nanoobiekt/ μm^2 mika jest odrzucana. Jeśli mika okazała się brudna, powtórzenie kroków 2-5 do uzyskania czystego podłoża.



Rysunek 2: Z lewej strony widać próbkę nałożoną na podłoże mikowe ustawioną na podwyższeniu i na podstawce. Strzałką zaznaczono miejsce gdzie była ustawiana. Z prawej widać mikroskop sił atomowych Dimension Icon.

5.1.1 Procedura uzyskiwania czystego podłoża

Na samym początku badań próbki od razu po nałożeniu na mikę były obrazowane, bez sprawdzenia czystości podłoża mikowego. Jeśli nie stosuje się APTEsu, faktycznie praktycznie za każdym razem podłoże nie zawierało żadnych nanoobjektów, a czyszczenie mechaniczne poprzez odrywanie taśmą wierzchniej warstwy miki zapewniało czystość. Jednak nałożenie APTEsu, a później na niego kropelki wody lub PBSu, powodowało występowanie nanoobjektów i to co gorsza o wielkości podobnej do badanych pęcherzyków. Bardzo długo podczas badań problem stanowiło uzyskanie czystego podłoża (jeszcze przed nałożeniem próbki). Stosowano bardzo dużo prób mających na celu pozbycie się zanieczyszczeń. Ustawiono mikę na podwyższeniu, aby uniknąć możliwości dostania się cząsteczek kleju, którym była ona przyczepiona do plastikowej podstawki lub uniknięcia występowania jakichkolwiek zanieczyszczeń z tej podstawki (co mogłoby się dzieć, jeśli ciecz rozlałaby się na podstawkę, patrz rys. 2). Patrzono, czy za każdym razem odrywana jest warstwa miki zawierająca całą powierzchnię. Próbowano sposobu czyszczenia sondy w chloroformie, etanolu i wodzie. Po nałożeniu APTEsu przyskano na niego mocnym strumieniem wody dejonizowanej, aby zmyć pozostałości nieprzyrzepionych cząsteczek. Ostatni opisany sposób częściowo działał i pozwalał uzyskać czyste podłoże, jednak nie zawsze. Nadal były momenty w których zanim położy się próbkę, trzeba najpierw przygotować trzy miki próbne, zanim uzyska się tę jedną pozbawioną zanieczyszczeń. Wszyscy korzystający z mikroskopu sił atomowych wiedzą jak dodatkowe obrazowanie wydłuża jego proces (trzeba ustawiać laser, znaleźć dźwignię sondy,



Rysunek 3: Trójwymiarowa reprezentacja obrazu wysokości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 z mikroskopu sił atomowych (Życieńska i in., 2022).

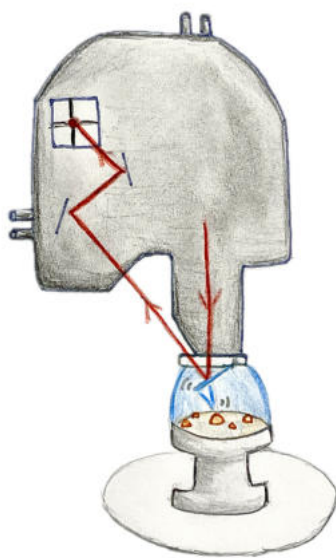
obniżyć się odpowiednio do próbki, nakładać słup wody itd.). Czasem zdarzało się, że dopiero po trzech godzinach można było zacząć obrazowanie. Problem powstawania zanieczyszczeń finalnie został rozwiązany dopiero niedawno poprzez zdmuchiwanie roztworu APTEsu sprężonym powietrzem w spreju, co okazało się przynosić bardzo dobre rezultaty. Stawiamy w Zespole hipotezę, że zanieczyszczenia te pochodziły z polimeryzacji APTEsu w wodzie dejonizowanej (patrz Lecoq i in. (2013) i Chen i in. (2009)).

5.2 Obrazowanie AFM

Obrazowanie zostało wykonane na mikroskopie sił atomowych Dimension Icon wyprodukowanym przez Bruker Instruments (Santa Barbara, CA, USA). Rys. 3 przedstawia trójwymiarową reprezentację przykładowego obrazowania za pomocą AFM pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowanych w Zakładzie Fizyki Biomedycznej komórek PC3.

5.2.1 Refleksje osobiste

Pierwszym etapem przed obrazowaniem jest nałożenie sondy na uchwyt (ang. holder). Jest to praca mogłabym powiedzieć zegarmistrzowska, gdyż trzeba pęsetką nałożyć małą lutkę obiekt tak, żeby wszedł pod poprzeczny drucik. Jest to proces trudny. Zegarmistrz, jeśli upuści małą śrubkę, ma szansę jeszcze ją podnieść i wsadzić, a przy upuszczeniu sondy, w zasadzie można mieć pewność, że ulegnie ona zniszczeniu — jest na tyle mała i delikatna. Dodatkowo nakładaniu sondy towarzyszy dodatkowy czynnik — sonda jest droga. Szczególnie te małe do badań biologicznych to koszt kilkuset złotych. Nakładając



Rysunek 4: Schemat eksperymentu z obrazowaniem na mikroskopie sił atomowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Na czerwono przedstawiono wiązkę światła lasera, która pada na dźwignię, a następnie odbijając się od luster pada na fotodetektor. Budowa sprzętu na podstawie Bruker (2011).

sondę trzeba starać się o tym nie myśleć. Opanowanie techniki nakładania zajęło mi trochę czasu, jednak po wielu nałożeniach staje się to już łatwiejsze, ale i tak nie jest to proste i czasem się nie udaje, chociaż teraz już stosunkowo rzadko. Później trzeba ustawić laser na dźwignię, a następnie napięcie tak, żeby pomiędzy czterema fragmentami fotodiody było bliskie zeru. Ten proces też robi się ręcznie. Na początku zdarzało się tak, że nie tak łatwo było znaleźć dobre położenie lasera. A i pierwsze sondy czasem słabiej odbijały światło i ciężko było uzyskać odpowiednie, niezbędne do obniżenia sondy napięcie, szczególnie jeśli była już ona używana. Czasem na ten problem pomagało zmoczenie dźwigni, przez co laser zaczynał się lepiej odbijać. Następnie niezbędne było obniżenie się do próbki. I tu ciekawa sprawa. Normalnie przy przybliżaniu zaczyna być widoczna powierzchnia miki i trzeba ustawić się trochę dalej niż jak jest ona ostro widoczna. Z niewiadomych powodów u nas często zdarzało się tak, że nie było jej widać lub widać bardzo słabo. W takich wypadkach trzeba więc było zbliżyć się do podłoża patrząc na odległość sondy od próbki. Lepiej było ustawić się trochę dalej od próbki, niż za blisko. Nie można było jednak zrobić tego za daleko, bo automatyczne opuszczenie nie było wtedy w stanie dotknąć podłoża. Jeśli było się natomiast za blisko, to sonda mogła się uszkodzić i trzeba było wtedy zaczynać cały proces od nowa, włącznie z na-

łożeniem sondy. Zresztą też czasem, szczególnie przy uruchamianiu spektroskopii sił, mikroskop lub cały komputer potrafił się zaciąć. Wtedy również trzeba było wszystko robić od początku. Jak już się zbliżyło do podłoża trzeba było utworzyć słup cieczy, tak, żeby cała sonda z dźwignią aż do uchwytu były zanurzone. Następnie, ponieważ współczynnik załamania światła w cieczy jest inny niż w powietrzu, trzeba było ponownie ustawić laser (technicznie po jakimś czasie odkryłam, że trzeba najpierw pokręcić prawym górnym pokrętkiem w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara, patrz rys. 4). Po ponownym ustawieniu różnicy napięć na fotodetektorze bliskiej zeru można było opuścić sondę i zacząć obrazowanie. Jak więc widać z samego opisu proces obrazowania jest bardzo długi i zawiera szereg technicznych aspektów, które poznaje się dopiero z czasem.

5.2.2 Sondy użyte do obrazowania mikroskopią sił atomowych

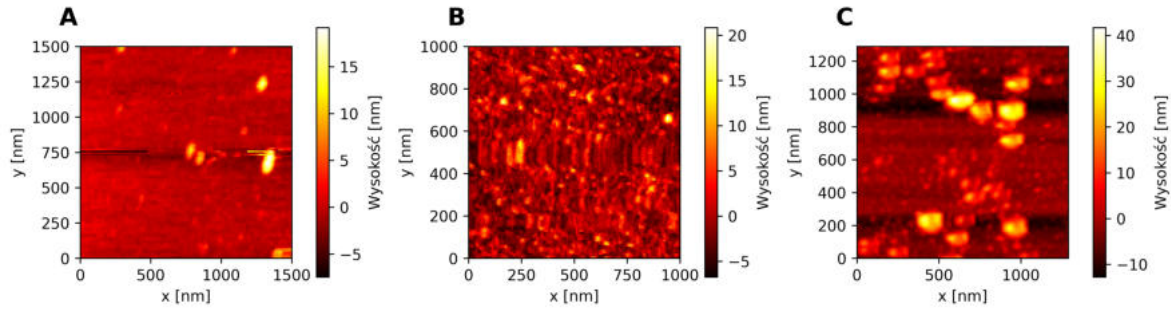
W przedstawianych badaniach zostały użyte sondy o promieniu 1 nm oraz 10 nm. Pierwszą używaną w badaniach sondą była sonda służąca typowo do obrazowania w cieczy danych biologicznych PEAKFORCE-HIRS-F-A firmy Bruker mająca promień 1 nm (maksymalnie 2 nm) oraz stałą sprężystości 0,35 N/m. Sondy te ze względu na mały promień pozwalały uzyskać dobrą rozdzielczość obrazowania. Ze względu na późniejsze użycie sondy do spektroskopii sił, przy której zaleca się używanie sond o większych promieniach (10–15 nm (Vorselen i in., 2020)), została ona zastąpiona najpierw sondą DNP-S10 (firmy Bruker) o promieniu 10 nm i z możliwością wyboru czterech sond o stałych sprężystości 0,35 N/m, 0,12 N/m, 0,24 N/m oraz 0,06 N/m. Stała sprężystości sondy za każdym razem była ustalana poprzez kalibrację termiczną (Thermal tune) dostępną w oprogramowaniu Nanoscope.

5.2.3 Tryby obrazowania

Do uzyskania obrazów topograficznych używano trybu PeakForce QNM. Ten tryb jest najbardziej podobny do trybu przerywanego kontaktu, ale sonda w nim drga w częstotliwości dalekiej od rezonansowej. Umożliwia on stosunkowo szybkie (jak na mikroskop sił atomowych) uzyskanie obrazów wysokości. Ponieważ pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i liposomy są dość miękkimi pęcherzykami, ustawiano stałą siłę obrazowania na około 600 pN, nie przekraczając siły 1 nN.

Tabela 1: Warunki obrazowania AFM pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz liposomów.

nazwa danych	nazwa sondy	promień	moment obrazowania
pęcherzyki liofilizowane z komórek pc3 „a”	dnp-s10	10 nm	od razu po odtworzeniu pęcherzyków
pęcherzyki liofilizowane z komórek pc3 „b”	dnp-s10	10 nm	zamrożone w -80°C obrazowane następnego dnia
pęcherzyki liofilizowane z komórek pc3 „c”	dnp-s10	10 nm	zamrożone w -80°C obrazowane następnego dnia
pęcherzyki z hodowli komórkowej pc3 po 1 h	peakforce-hirs-f-a	1 nm	zamrożone w -80°C obrazowane po 1 h od rozmrożenia
pęcherzyki z hodowli komórkowej pc3 po 20 h	peakforce-hirs-f-a	1 nm	zamrożone w -80°C obrazowane po 20 h od rozmrożenia
liposomy dopc	dnp-s10	10 nm	po utworzeniu z filmu lipidowego
liposomy dppc	dnp-s10	10 nm	po utworzeniu z filmu lipidowego



Rysunek 5: Obrazy artefaktów. A) Obiekty wydłużone w jednym kierunku B) Obraz AFM przedstawiający wyciągnięte obiekty dla y od 400 nm do 600 nm C) Obiekty mają ten sam powtarzający się kształt.

5.3 Artefakty obrazowania AFM

Skanująca sonda może ciągnąć małe słabo przyczepione do powierzchni obiekty. W efekcie czasami można było zobaczyć, że obiekty robiły się nienaturalnie podłużne w jednym kierunku. Przykładowy obraz tego zjawiska przedstawiony jest na obrazie 5A. Zwykle pomocne w tej sytuacji było dobranie odpowiednich prędkości skanowania poziomo i pionowo. Dodatkowo na tym obrazie można zobaczyć poziome linie. Jest to bardzo znany artefakt występujący w większości mikroskopów skaningowych. Linie były usuwane we wstępnym filtrowaniu obrazów, ale nie we wszystkich sytuacjach przynosi to odpowiedni skutek. Rys. 5B zawiera prawdopodobnie problem chwilowo niejednorodnej prędkości w kierunku pionowym, skutkujący pionowym wydłużeniem obiektów.

Obraz 5C prawdopodobnie przedstawia artefakt zabrudzenia sondy. Sprawia wrażenie jakby powstawały „pieczątki” wszystkie w podobnym kształcie. Kształt ten jest odbiciem kształtu zabrudzenia, który się splata z powierzchnią próbki. Obrazy, które miały duże artefakty nie były brane pod uwagę.

5.3.1 Wstępne filtrowanie obrazów AFM

Do analizy obrazów AFM używano języka Python oraz darmowego oprogramowania Gwyddion. Do wczytania obrazów i wstępnego filtrowania obrazów korzystano z biblioteki pySPM (Scholder, 2019). Wstępne filtrowanie obrazów przed dalszą analizą polegało na pozbyciu się linii charakterystycznych dla mikroskopów skaningowych, sprowadzeniu płaszczyzny podłoża do wartości 0, odrzuceniu obrazów na których widać wyraźne artefakty obrazu.

Korekcja linii polegała na odjęciu średniej każdego „wiersza”. Sprowadzanie do poziomu zero miało miejsce poprzez dopasowanie płaszczyzny do danych, a następnie odjęcie tej płaszczyzny od danych. Zdarzało się na obrazach AFM, że obrazy zawierały poziome linie nie będące na całych ich długościach. Zostały one usunięte za pomocą funkcji `filter_scars_removal` z pakietu pySPM (Scholder, 2019).

6 Metodologia analizy śledzenia nanocząstek (NTA)

Do wykonania pomiarów NTA dla pęcherzyków z hodowli komórkowej korzystano z ZetaView device (Particle Metrix, Ammersee, Germany). Używano oprogramowania Software ZetaView (wersja 8.05.11). Badania były wykonane we współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym. Dla pęcherzyków liofilizowanych i liposomów korzystano z NanoSight NS300. Laser NanoSight miał długość fali 488 nm, użyto oprogramowania w wersji 3.4.4. Przed wykonaniem pomiaru urządzenie kalibrowano kulkami polistyrenowymi o średnicy 100 nm. Badania przeprowadzono w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. W obu wypadkach zadbane o odpowiednie rozcieńczenie próbki przed badaniem oraz kalibrację sprzętu.

Z badań NTA uzyskaliśmy wykresy i statystyki wygenerowane przez oprogramowanie urządzenia. Dla badań NanoSight uzyskałam szczegółową analizę poszczególnych cząstek, co pozwoliło zastosować własne napisane w języku Python skrypty do ich dalszej obróbki. Dla badań ZetaView sytuacja była bardziej skomplikowana, gdyż nie przekazano szczegółowej analizy, a jedynie raport w formie pdf. Dlatego rozkład wielko-

ści pęcherzyków został odczytany z wykresu, a następnie sztucznie wytworzono zestaw parametrów pęcherzyków pasujący do odczytanego rozkładu.

Część III

Parametry geometryczne pęcherzyków

7 Wyznaczanie parametrów geometrycznych H , R_c , FWHM

7.1 Wyszukiwanie obiektów na obrazie

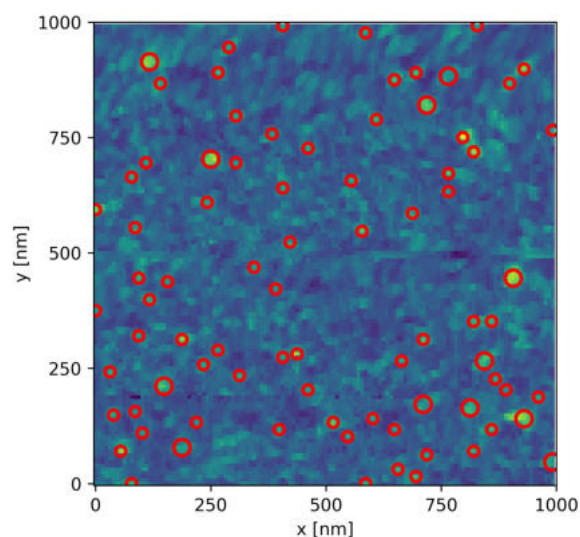
Segmentacja pęcherzyków na obrazie z AFM rozpoczyna się od znalezienia obiektów, które mogłyby być pęcherzykami. Szukanie zachodzi poprzez użycie skryptu napisanego w języku Python, korzystając z funkcji `blob_dog` z biblioteki `skimage` z parametrami `max_sigma=100`·wielkość piksela w nm (gdyż działam na pikselach) i `threshold=3`. Funkcja ta znajduje środki okrągłych obiektów korzystając z szukania kształtów podobnych do dwuwymiarowej funkcji Gaussa (metoda nosi nazwę *Difference of Gaussian* (image, 2025)). Przykładowy obraz takiego wyszukiwania przedstawiono na rys. 6. Podejście takie daje na ogół rozsądne wyniki, aczkolwiek w sytuacji, kiedy wiele pęcherzyków znajduje się bardzo blisko siebie, funkcja może ich nie potrafić rozdzielić.

W istocie obraz AFM nanopęcherzyka spoczywającego na podłożu mikowym nie jest ściśle funkcją Gaussa, w praktyce jest jednak do niej trochę podobny. Wynika to z tego, że promień zakończenia sondy jest tego samego rzędu co promień obrazowanej czaszy i wobec tego w pobliżu styku pęcherzyka z podłożem kształt profilu ulega rozmyciu.

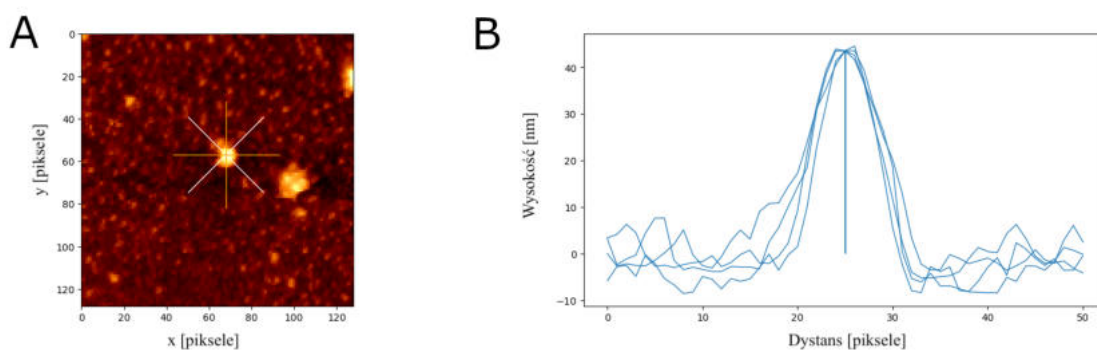
7.2 Wyznaczenie wysokości i szerokości połówkowej

Dla każdego znalezionej obiektu znajdowano cztery profile wysokości: pionowo i poziomo (profile wyznaczone przez linie koloru żółtego na rys. 7A oraz dwa ukośne pod kątem 45° oraz 135° (profile zaznaczone kolorem białym)).

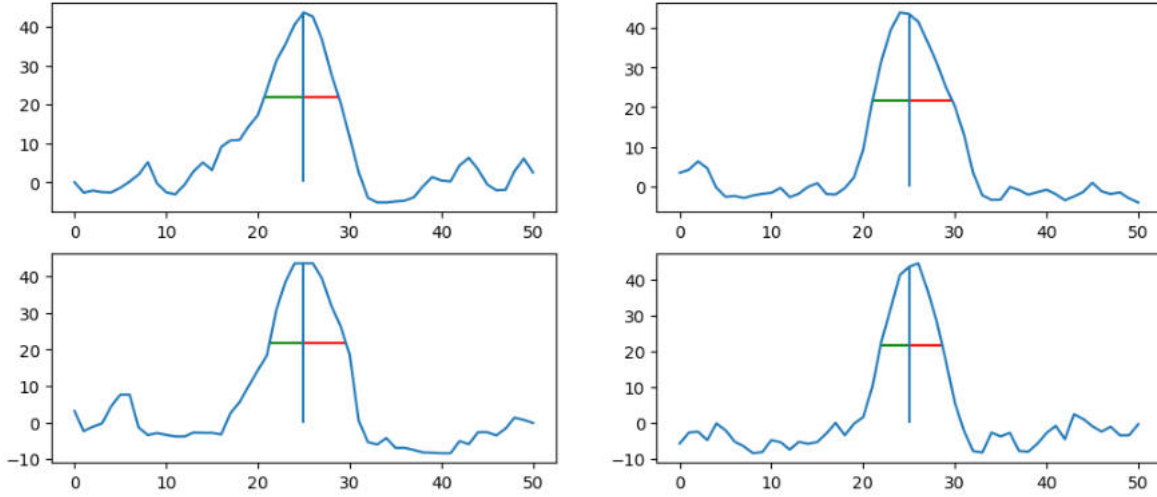
Korzystanie ze sposobu znajdowania dwuwymiarowych gaussowskich kształtów i wyznaczanie środka pęcherzyka w środku dopasowanej funkcji Gaussa na obrazie AFM (opisane w poprzednim rozdziale 7.1) sprawiło, że profile wzdłuż czterech kierunków



Rysunek 6: Obraz przedstawia znalezione obiekty korzystając z metody Difference of Gaussian. Pęcherzyki zostały oznaczone czerwonymi okręgami.



Rysunek 7: A) Obraz topograficzny AFM. Wartości na osiach x oraz y podane zostały w pikselach. Białymi i żółtymi liniami zaznaczone kierunki, wzdłuż których rysowane są profile wysokości. B) Nałożone na siebie cztery profile wysokości wzdłuż linii zaznaczonych na A. Niebieską pionową linią oznaczona została wysokość pęcherzyka.



Rysunek 8: Profile wysokości pęcherzyka wzdłuż czterech kierunków. Dla każdego z profili wyznaczona jest wysokość (pionowa niebieska linia) oraz na czerwono prawa część szerokości połówkowej, a na zielono lewa część szerokości połówkowej. Na osi odciętych odległość w pikselach. Na osi rzędnych wysokość w nm.

w przybliżeniu się pokrywają, kiedy je na siebie nałożymy względem wyznaczonego środka. Można to zaobserwować na rys. 7B.

Wysokość pęcherzyka wyznaczona jest jako wartość na obrazie AFM w środku znajdującego obiektu (patrz pionowa niebieska linia na rys. 7B). Wysokość ta jest liczona od punktu zero wyznaczonego tak, jak opisano w rozdziale 5.3.1.

Dla każdego profilu wyznaczona została wartość H_p wynosząca połowę wysokości znajdującego obiektu. Następnie zostaje znaleziony indeks i dla pierwszego punktu na profilu, dla którego wartość jest mniejsza niż H_p zarówno z lewej jak i z prawej strony od środka pęcherzyka. Z twierdzenia Talesa obliczona została wartość lewej i prawej części szerokości połówkowej.

Prawa część szerokości połówkowej wyznaczona była ze wzoru:

$$\text{odl} = (x_i - x_{i-1}) * (y_{i-1} - H_p) / (y_{i-1} - y_i) + x_{i-1}$$

gdzie x_i jest odległością i -tego punktu (liczoną w nm) od środka pęcherzyka. W taki sam sposób została wyznaczona lewa część szerokości połówkowej.

Szerokość połówkowa dla jednego profilu wyznaczona została jako suma z prawej i lewej części szerokości połówkowej. Ostatecznie do dalszych obliczeń dla danego pęcherzyka szerokość połówkowa wyznaczona była jako średnia szerokości połówkowych ze

wszystkich profili.

7.3 Używana poprawka na H

Jeśli na obrazie występuje wiele pęcherzyków, mają one wpływ na to, że znaleziona wartość zero jest zawyżona, ponieważ wykorzystany algorytm w pakiecie pySPM (Scholder, 2019) wykorzystuje do tego wysokość na obrazie z AFM za równo dla pikseli stanowiących, jak i pikseli należących do pęcherzyków. Z tego względu wprowadzono poprawkę na wartość wysokości.

Dla każdego z obiektów na obrazie zostają znalezione piksele w promieniu maksymalnej szerokości połówkowej uzyskanej ze wszystkich czterech profili wysokości. Wartości wysokości dla wszystkich takich pikseli jest sumowana dla wszystkich obiektów na obrazie i dzielona przez całkowitą liczbę pikseli na obrazie. Omawiane piksele jako należące do obiektów wznoszących się ponad powierzchnię substratu nie powinny być wliczane do jego średniej wysokości, nie można tego jednak było zrobić we wstępnym przetwarzaniu obrazu, kiedy jeszcze nie było wiadomo, gdzie są obiekty, które mają zostać uwzględnione w analizie. Uzyskana wartość poprawki jest dodawana do wcześniejszej obliczonej wysokości (ponieważ — inaczej mówiąc — wartość zerowa jest o tyle pomniejszana).

7.4 Dwa sposoby wyznaczania R_c

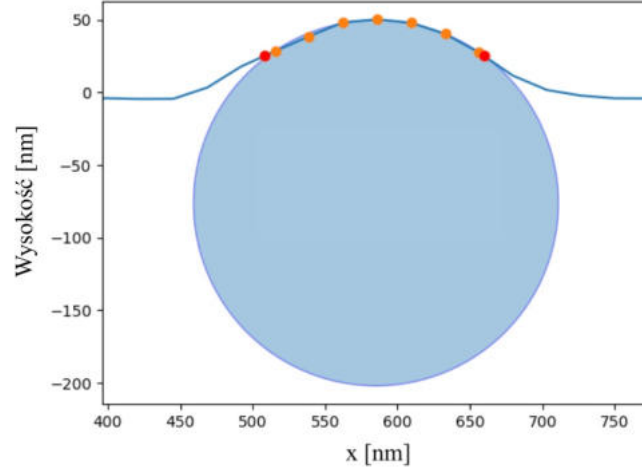
Trzecim z parametrów geometrycznych charakteryzujących pęcherzyk przyczepiony do podłoża jest promień krzywizny jego górnej części, oznaczany jako R_c . Jest to promień kuli stycznej do pęcherzyka w jego najwyższym punkcie.

W pracy zostały przedstawione dwa sposoby obliczania R_c . Pierwszy sposób bazuje na założeniu, że kształt analizowanego obiektu w przybliżeniu jest sferyczną czaszą i korzysta z własności geometrycznych tej bryły. Korzystając z H i FWHM pęcherzyka można obliczyć R_c zgodnie ze wzorem:

$$R_c = \frac{\text{FWHM}^2 + H^2}{4H} \quad (2)$$

gdzie H to wysokość pęcherzyka, FWHM to szerokość w połowie wysokości.

We wzorze 2 nie jest jeszcze uwzględniona poprawka na wielkość sondy. Aby ją uzyskać od R_c odejmuje się promień sondy R_t :



Rysunek 9: Dopasowanie okręgu do profilu wysokości. Punkty pomarańczowe to punkty leżące powyżej połowy wysokości pęcherzyka. Na czerwono zaznaczono interpolowane liniowo punkty leżące w połowie wysokości pęcherzyka.

$$R_c = \frac{\text{FWHM}^2 + H^2}{4H} - R_t \quad (3)$$

(Vorselen i in., 2020) Wynika ona z przybliżonego założenia, że koniec sondy ma kształt kuli o promieniu R_t , natomiast środek tej kuli w trakcie obrazowania pęcherzyka wędruje po krzywej o promieniu wynoszącym $R_c + R_t$.

Alternatywnym sposobem, który został użyty w niniejszej pracy, jest dopasowywanie R_c od razu do analizowanych profili wysokości pęcherzyków. Zaletą tego podejścia jest to, że wynik jest niezależny od tego, czy prawidłowo zostały wyznaczone parametry H i FWHM, oraz nie zakłada, że pęcherzyk na podłożu przyjmuje dokładnie kształt sferycznej czaszy (co — jak zostanie pokazane w rozdziale 12 zwłaszcza dla małych pęcherzyków — może nie do końca być spełnione). Przykładowe takie dopasowanie można zobaczyć na rys. 9. W napisanym skrypcie wykorzystywane jest `standardLSQ` z pakietu `circle_fit`, który dopasowuje okrąg metodą najmniejszych kwadratów (Klear i in., 2023). Do dopasowania zostały uwzględnione punkty powyżej połowy wysokości pęcherzyka.

To, że oba sposoby obliczania R_c dają na ogół podobne wartości możemy zaobserwować na wykresie 10. Zieloną przerywaną linią narysowana jest prosta przebiegająca w punktach, gdzie pierwszy sposób wyliczania dawałby wynik dokładnie równy drugiemu. Na osi rzędnych przedstawione R_c uzyskane z dopasowania okręgów do profili

(oznaczone jako R_{c2}). używane jest R_{c2} uzyskane z dopasowania okręgów. W rozważaniach w dalszej części pracy będzie wykorzystywana tylko wartość R_{c2} dla uproszczenia nazywana R_c . Widać, że R_c z dopasowania ma czasem tendencję do bycia większym niż R_c z FWHM i H (oznaczonego jako R_{c1}). Może być to spowodowane tym, że wartość połowy wysokości ustalona została na podstawie wysokości przed ustaleniem poprawki do wysokości z rozdziału 7.3, przez co jeśli dla niektórych pęcherzyków wartość H była zaniżona to również FWHM było zaniżone. Jednak przy bliższej analizie okazuje się, że pęcherzyki oddalone od prostej $R_{c1} = R_{c2}$ charakteryzują się na ogół również tym, że nie są osiowo symetryczne — prawdopodobnie na skutek artefaktów obrazowania — co zdaje się być bardziej istotne. Jednak ponieważ na R_{c2} z dopasowania okręgu nie wpływa dobrze ustalona wysokość H i FWHM, zdecydowano parametr R_{c2} używać do dalszej analizy.

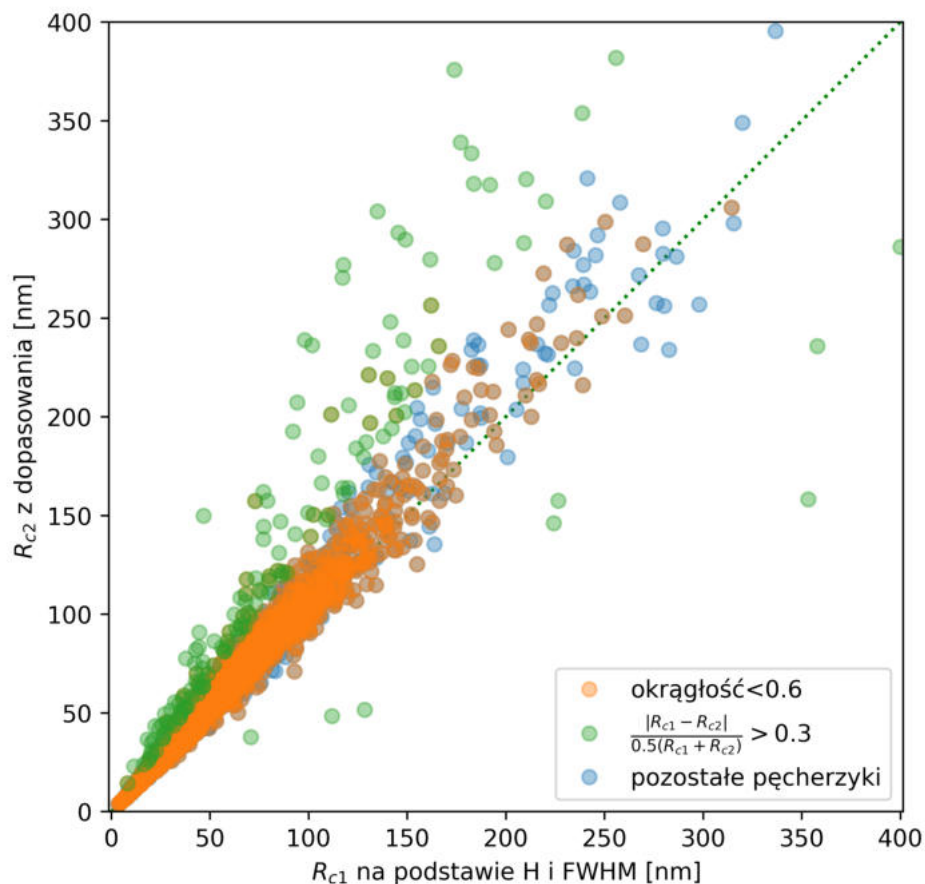
Czasami zdarzało się, że algorytm dopasowywał okrąg powyżej punktów, a nie poniżej, jak to powinno mieć miejsce. Takie pęcherzyki, których środek dopasowanego okręgu do profilu został dopasowany powyżej ich wysokości, zostały wykluczone z analizy. Zadbano też, aby odcięta środka dopasowanego okręgu znajdowała się między skrajnymi punktami (punkty zaznaczone na czerwono na rys. 9). Było również sprawdzane, czy dopasowywany promień nie jest zbyt mały. Zastosowano warunek: $2R_c > H$, żeby uniknąć brania pod uwagę pęcherzyków, które są zbyt wysokie względem swojej szerokości, żeby mogły być leżącymi pęcherzykami o kształcie czaszy sferycznej.

8 Wyznaczanie średnicy pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (d^{geom})

Z mikroskopii sił atomowych możemy odczytać wysokość i szerokość pęcherzyka przyczepionego do podłoża. Szczególnie interesujące jest jednak, jaką średnicę miał pęcherzyk w swoim naturalnym środowisku — swobodnie pływający w cieczy.

Zakłada się, że taki pęcherzyk przyczepiony do powierzchni ma w przybliżeniu kształt sferycznej czaszy. Przyjmuje się również, że błona pęcherzyka jest mało rozciągliwa, a pęcherzyk po przyczepieniu zachowuje stałe pole swojej powierzchni, nie zaś objętość (Vorselen i in., 2020). Na podstawie tych założeń z geometrii możliwe jest wyznaczenie średnicy pęcherzyka (oznaczanej dalej d^{geom}), jaką miałby, gdyby swobodnie pływał w cieczy.

Do wyznaczenia średnicy geometrycznej używany jest dopasowany wcześniej pro-



Rysunek 10: Porównanie dwóch sposobów liczenia R_c . Zieloną przerywaną linią narysowana prosta przebiegająca w punktach, gdzie pierwszy sposób wyliczenia jest równy drugiemu. Na osi odciętych R_{c1} obliczone z H i FWHM. Na osi rzędnych przedstawione R_{c2} uzyskane z dopasowania okręgów do profili. Okrągłość na tym wykresie obliczona została z FWHM (patrz rozdział 9.2). Dane zawierają złączone eksperymenty na pęcherzykach liofilizowanych PC3.

mień R_c oraz wysokość H według wzoru:

$$d^{\text{geom}} = \sqrt{4R_c H - H^2} \quad (4)$$

(por. (Vorselen i in., 2020))

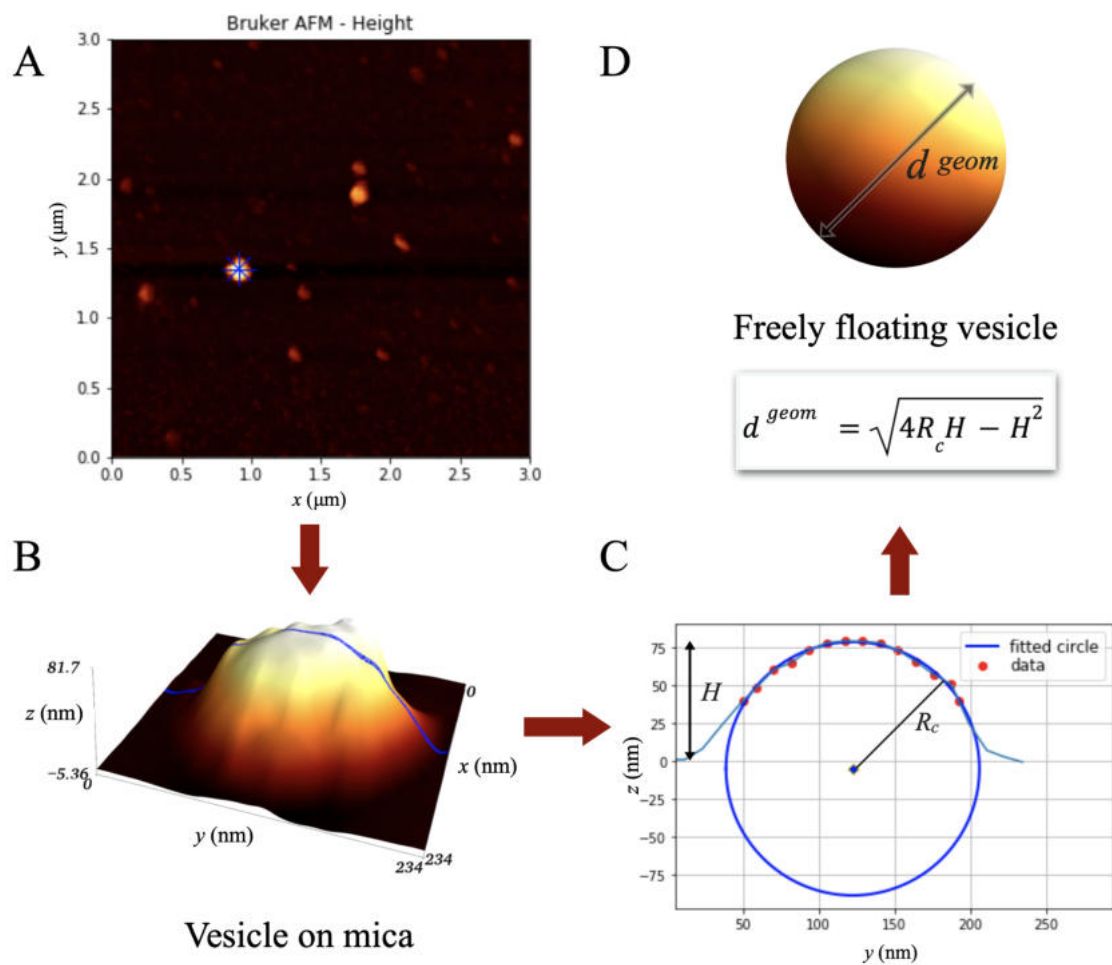
Finalnie cały schemat wyznaczania średnicy geometrycznej, włącznie ze znalezieniem R_c , został przedstawiony na rysunku 11 pochodzącym z artykułu (Życieńska i in., 2022). Na początku znajdowane są pęcherzyki (rys. 11A) metodą opisaną w rozdziale 7.1. Następnie dla wybranego pęcherzyka (rys. 11B) wyznaczane są profile wysokości (rys. 11C) wzdłuż czterech kierunków (kierunki zaznaczone niebieskimi liniami na rys. 11A). Do tych profili dopasowywane są okręgi. Dla znalezionych wartości wysokości H i promienia krzywizny R_c wyliczana jest średnica geometryczna d^{geom} pęcherzyka swobodnie pływającego w wodzie (rys. 11D).

Można zauważyć interesującą zależność geometryczną, że jeśli przyjąć R_t bardzo małe i R_c zostanie wyliczone ze wzoru 2 (bez odjęcia R_t), a d^{geom} ze wzoru 4, to zachodzi zależność $d^{\text{geom}} = \text{FWHM}$. Pozwala to na proste przybliżone oszacowanie wielkości swobodnie pływającego pęcherzyka na podstawie jego profilu na obrazie AFM prawie bez obliczeń. Jeśli uwzględnimy promień sondy R_t to $d^{\text{geom}} = \sqrt{\text{FWHM}^2 - 4R_t H}$. Widać więc, że wpływ FWHM jest duży, szczególnie, jeśli mamy do czynienia z małym promieniem sondy. Do obrazowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 hodowli komórkowej została użyta sonda o promieniu równym 1 nm, dlatego w tym badaniu pominięte zostało odjęcie wpływu sondy.

9 Sposób wyboru pęcherzyków do dalszej analizy

9.1 Odpowiednia wysokość

Pęcherzyki zbudowane są z podwójnej błony lipidowej. Rozmiar tej błony może być różny w zależności od lipidów budujących błonę. Zasadniczo uważa się, że ma ona grubość między 4 a 5 nm (Regan i in., 2019). Z tego powodu zakładając, że pęcherzyk jest całkowicie pozbawiony środka, ze względu na sam rozmiar błony leżący na podłożu nie może być mniejszy niż 8 nm. (Ridolfi i in., 2020) w swojej pracy do analizy bierze pęcherzyki wyższe od 10 nm. Początkowo dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 z hodowli komórkowej przyjęto wartość 10 nm. Ponieważ zauważono, że stosowany algorytm wyznaczania zera ma tendencję do zaniżania wysokości, w dalszych



Rysunek 11: Obliczenie średnicy geometrycznej pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (Życieńska i in., 2022).

badaniach pęcherzyków liofilizowanych oraz liposomów ustalono próg na 8 nm. Wyklucza to obiekty, które są zbyt małe, aby mogły być pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi.

9.2 Okrągłość

Można zakładać, że pęcherzyki osadzające się na podłożu powinny być okrągłe (mieć symetrię obrotową względem swojego środka). W praktyce jednak na obrazie AFM często nie do końca spełniają ten warunek. Może być to spowodowane sklejeniem dwóch lub więcej pęcherzyków leżących obok siebie, lub też jakimś artefaktem. Uwzględnienie takich zdeformowanych obiektów w obliczeniach mogłoby prowadzić do zaburzenia wyników. Dlatego bazując na pomiarach czterech wartości szerokości połówkowej w różnych kierunkach zdefiniowano parametr okrągłość_{FWHM}:

$$\text{okrągłość}_{\text{FWHM}} = \frac{\max(\text{FWHM}_p) - \min(\text{FWHM}_p)}{\text{FWHM}}, \quad (5)$$

gdzie $\max(\text{FWHM}_p)$ to maksymalna wartość FWHM z 4 profili wysokości, $\min(\text{FWHM}_p)$ to minimalna wartość FWHM, a FWHM jest średnią wartością z profili.

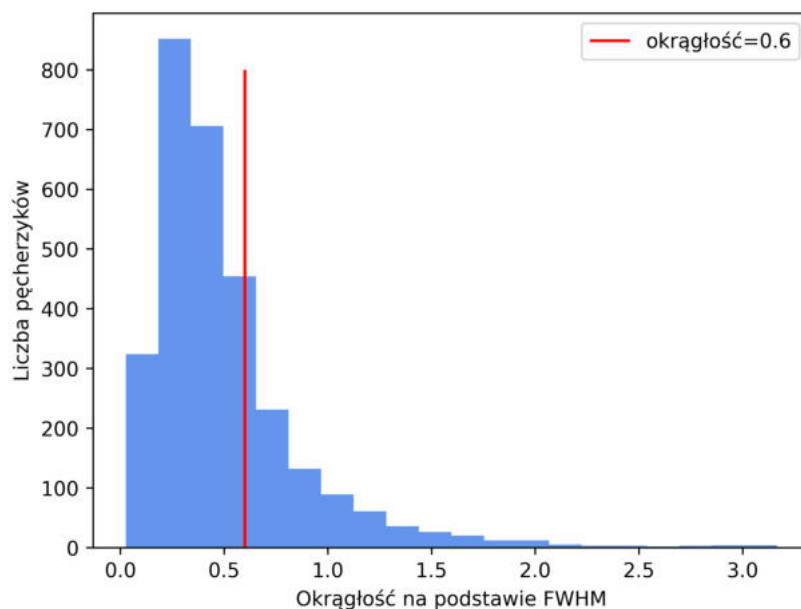
Początkowo w badaniach dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórkowej przyjęto próg 0,6. Aby zachować spójność porównania z następnymi badaniami zachowano tę samą wartość progu okrągłości. Aby to zobrazować można policzyć, że przykładowo dla obiektu widzianego jako elipsa dwukrotnie wyciągnięta w kierunku poziomym parametr ten miałby wartość 0,65. Dla koła wynosiłby oczywiście 0. Wartość progu 0,6 została wybrana arbitralnie na podstawie oglądania histogramu, tak aby zostawić większość pęcherzyków. Przykładowy histogram z progiem znajduje się na rys. 12). Jego dokładne wybranie wymaga dalszych badań.

9.3 Regularność — podobieństwo R_c z dopasowania do R_c wyliczonego z FWHM i H

Na rys. 10 można zauważyć, że dla niektórych punktów R_{c2} wyliczone z dopasowania nie pokrywa się z tym obliczonym z R_{c1} z FWHM i H . Ustalono parametr nieregularności na:

$$\text{nieregularność} = \frac{|R_{c1} - R_{c2}|}{0,5(R_{c1} + R_{c2})},$$

gdzie R_{c2} to R_c wyliczone z dopasowania okręgu (patrz promień okręgu na rys. 9), a R_{c1} z FWHM i H (patrz wzór 2).



Rysunek 12: Histogram wartości okągłości dla złączonych eksperymentów na liofilizowanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych z komórek PC3. Na czerwono zaznaczono próg powyżej którego pęcherzyki zostają wykluczone z dalszej analizy.

Wstępnie próg został ustalony na 0,3. Na rys. 10 możemy zobaczyć zielonymi punktami zaznaczone pęcherzyki spełniające warunek, że nieregularność $> 0,3$, natomiast pomarańczowymi spełniające warunek okągłości na podstawie FWHM na $< 0,6$ (patrz rozdział 9.2). Można zauważyć, że na wykresie 10 pęcherzyki, które są okągłe (okągłość $< 0,6$), czyli we wszystkich kierunkach mają podobne FWHM, na ogół są dość regularne (spełniają również warunek nieregularności $< 0,3$), czyli że R_{c1} wyliczone z FWHM i R_{c2} wyliczone z dopasowania są podobne, co tym bardziej świadczy o tym, że ich kształt zbliżony jest do kształtu sferycznej czaszy. Z tego względu dalszy dobór pęcherzyków nie uwzględniał już warunku regularności, tylko okągłość.

Tabela 2: Średnie, mediany i odchylenia standardowe wysokości dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

Eksperyment	średnia [nm]	mediana [nm]	odchylenie standardowe [nm]
pęcherzyki liofilizowane „A”	15,5	13,9	8,7
pęcherzyki liofilizowane „B”	11,3	9,9	6,9
pęcherzyki liofilizowane „C”	9,9	9,2	3,6

10 Wyniki parametrów geometrycznych dla różnych pęcherzyków

10.1 Liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3

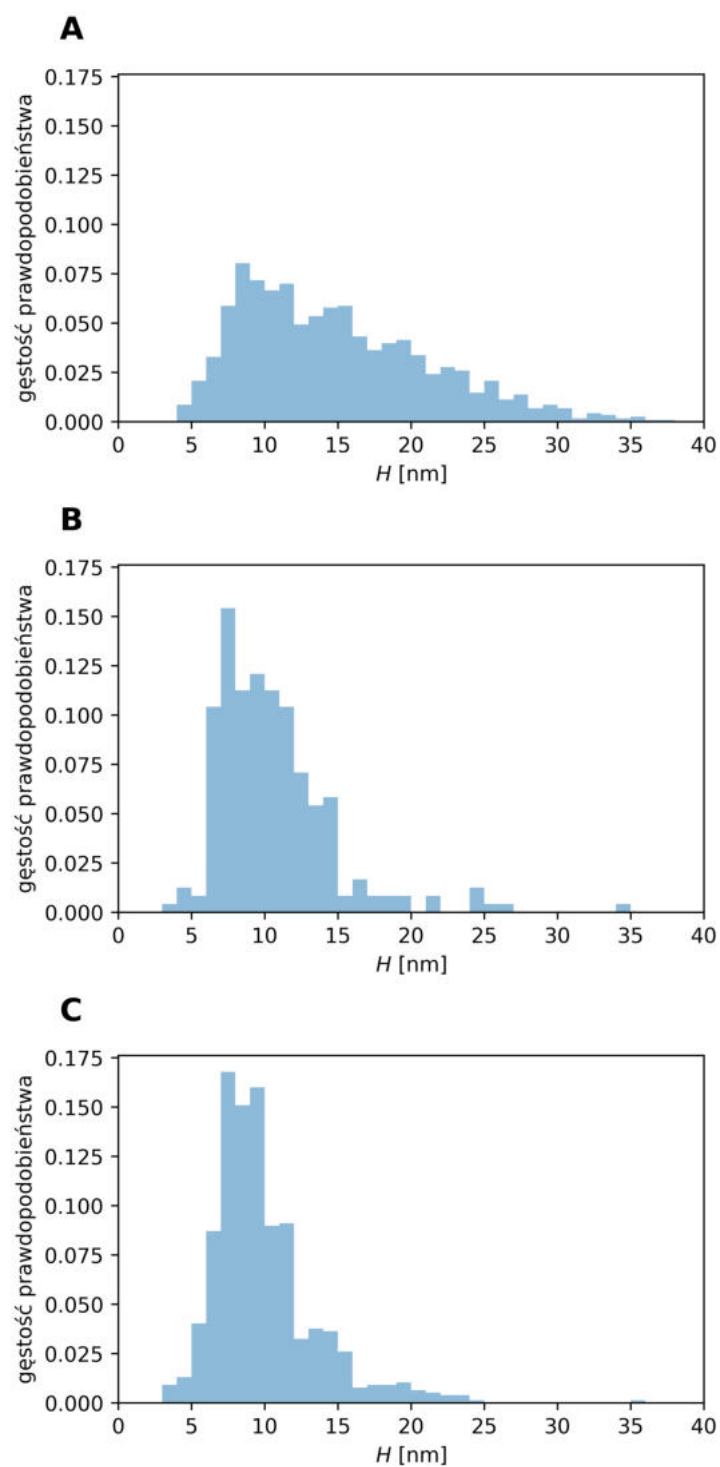
10.1.1 Histogramy H

Dla histogramów wysokości, przedstawionych na wykresie 13, zastosowano jedynie próg wysokości na poziomie 3 nm w trakcie obliczania geometrii pęcherzyków. Mimo tego widać, że we wszystkich przypadkach pęcherzyki są w większości większe niż 7 nm. Wysokość ich nie była jednak duża. W tabeli 2 przedstawiono średnie, mediany i odchylenia standardowe dla pęcherzyków liofilizowanych. Największą średnią zaobserwowano dla danych „A”, równa była 15,5 nm, natomiast najniższą dla danych „C” równą 9,9 nm. Mediany rozkładów „B” i „C” były bardzo podobne i wynosiły odpowiednio 9,9 nm oraz 9,2 nm. Dane „B” i „C” zawierały niższe pęcherzyki niż dane „A”. Aby jeszcze lepiej porównać te rozkłady narysowano je na oddzielnym histogramie 14. Rozkłady „B” i „C” wyglądają jakby pochodziły z tego samego rozkładu, natomiast „A” sprawia wrażenie rozciągniętego do większych wartości, chociaż najwyższy pierwszy pik leży w tym samym miejscu co dla „B” i „C”.

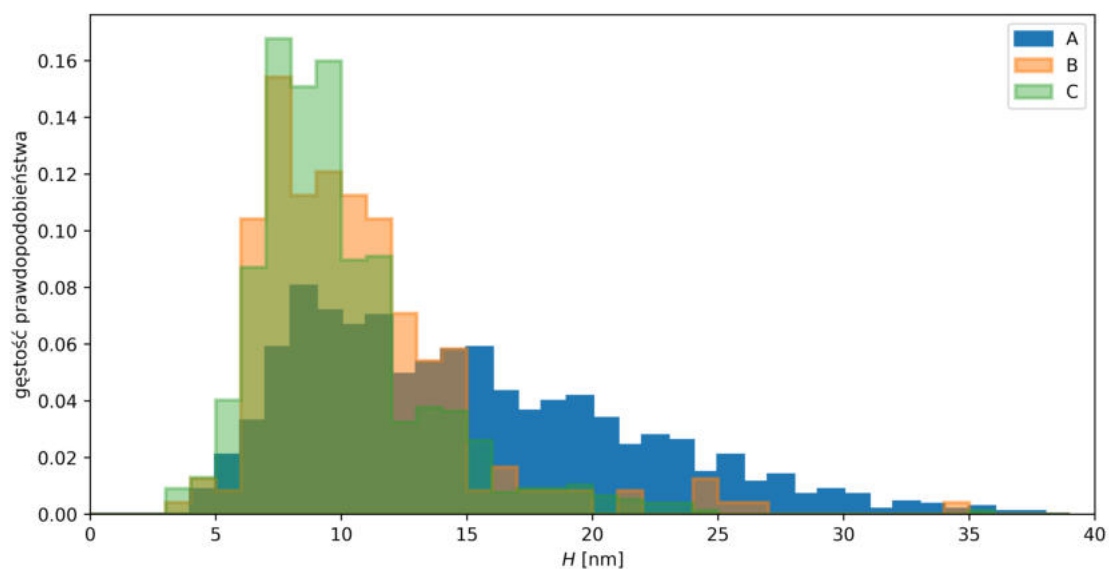
10.1.2 Histogramy FWHM

Dla pęcherzyków liofilizowanych wartości szerokości połówkowej są największe dla danych „A” (patrz tabela 3 oraz wykres 15). Należy pamiętać, że wartości te mogą być nieco zaniżone, gdyż wartość połowy wysokości została ustalona przed uwzględnieniem poprawki na wysokość opisanej w rozdziale 7.3.

Tak samo jak dla wysokości przy oglądaniu histogramu szerokości połówkowej mo-



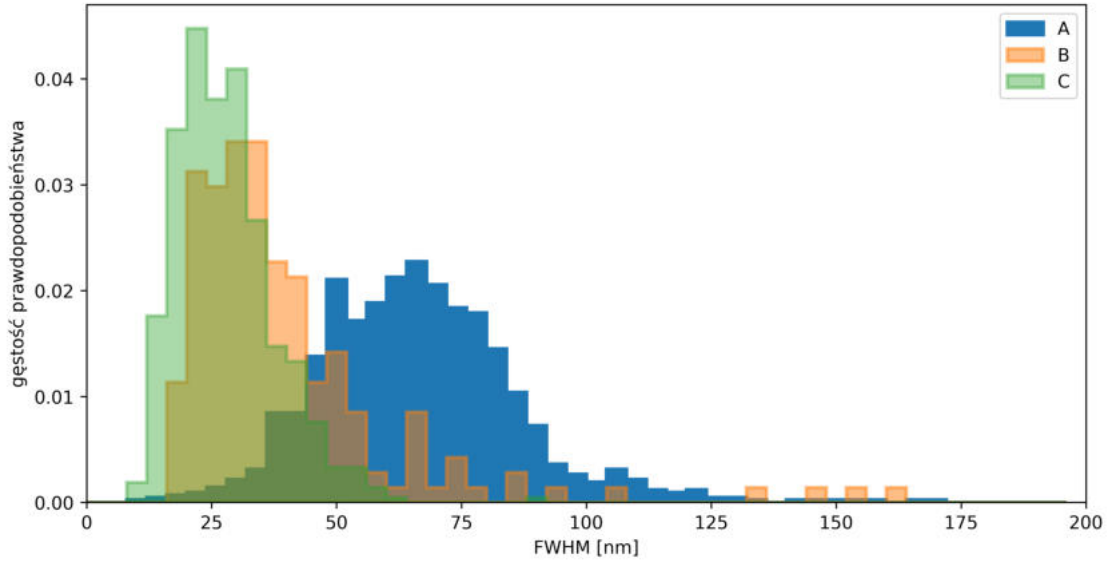
Rysunek 13: Histogramy wysokości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych liofilizowanych z komórek PC3. Odpowiednio wykres A, B i C przedstawia histogramy wysokości dla danych „A”, „B” oraz „C”.



Rysunek 14: Histogramy wysokości pęcherzyków liofilizowanych.

Tabela 3: Średnie, mediany i odchylenia standardowe szerokości połówkowej dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

Eksperyment	średnia [nm]	mediana [nm]	odchylenie standardowe [nm]
pęcherzyki liofilizowane „A”	66,8	65,0	22,4
pęcherzyki liofilizowane „B”	40,2	34,3	22,9
pęcherzyki liofilizowane „C”	27,8	26,3	9,9



Rysunek 15: Histogramy szerokości połówkowej pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

żemy zobaczyć większe podobieństwo danych „B” do „C”. Dane „A” są w tym zestawieniu mniej podobne. Przy danych „B” można zauważyć przesunięcie wartości FWHM ku większym wartościom, gdzie na wykresie wysokości różnica między danymi „B” i „C” była prawie niezauważalna. Z pęcherzyków liofilizowanych dane „C” są bardziej „skoncentrowane” wokół swojego piksu i nie zawierają większych wartości co można zobaczyć po ich najmniejszym odchyleniu standardowym, który wynosi 9,9 nm.

10.1.3 Histogramy R_c

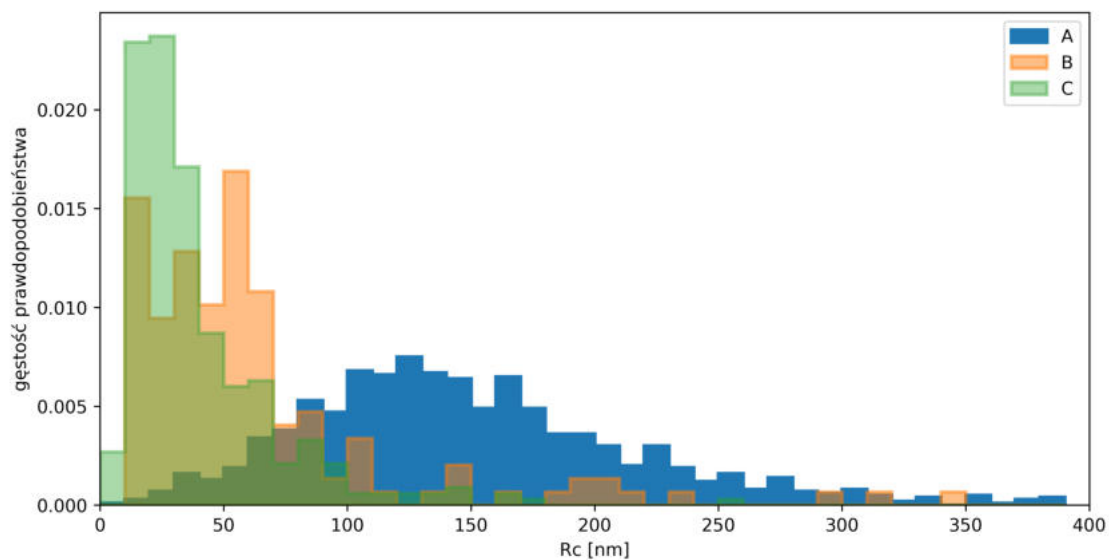
Na rys. 16 przedstawiono histogramy R_c pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. Uwzględniono poprawkę i od wartości R_c odjęto promień sondy $R_t = 10$ nm. Mają one podobny charakter jak histogramy szerokości połówkowych, tylko rozciągnięte dwukrotnie. Z założenia nie mogą być one mniejsze niż połowa wysokości, więc ich najmniejsza wartość to w przybliżeniu 4 nm.

10.1.4 Histogramy d^{geom}

W tabeli 5 przedstawiono średnie, mediany oraz odchylenia standardowe dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. Z przyczyn, o których mowa w rozdziale 8, histogramy są z konieczności prawie identyczne jak dla FWHM, a niewielkie różnice wynikające z poprawki na promień sondy dotyczą głównie małych pęcherzyków. Z pę-

Tabela 4: Średnie, mediany i odchylenia standardowe R_c dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

Eksperyment	średnia [nm]	mediana [nm]	odchylenie standardowe [nm]
pęcherzyki liofilizowane „A”	78,6	70,3	41,1
pęcherzyki liofilizowane „B”	37,8	26,3	44,4
pęcherzyki liofilizowane „C”	20,1	15,5	15,9



Rysunek 16: Histogramy R_c pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

cherzyków liofilizowanych pęcherzyki z danych „A” miały największe średnice geometryczne. Z tego samego powodu, co dla ustalonego progu wysokości, ze względu na to, że błona pęcherzyków ma powyżej czterech nanometrów, d^{geom} nie mogą wychodzić poniżej 8 nm. Przyjęte warunki okrągłości i progu wysokości spełniło 1027 pęcherzyków z analizowanych 1655 pęcherzyków z danych „A”, 152 z 336 z danych „B” i 333 z 988 z danych „C”.

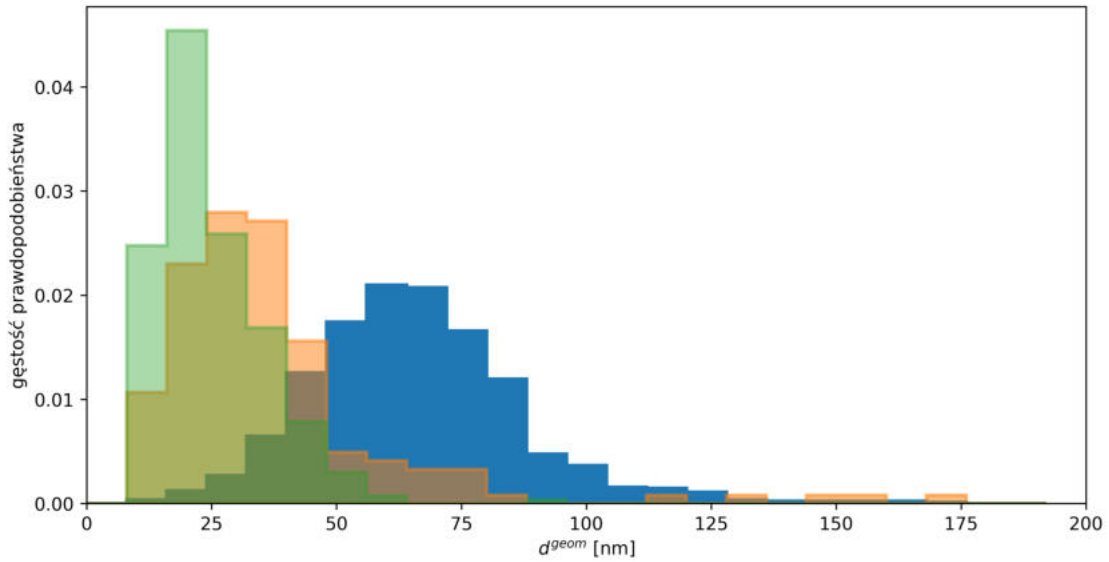
10.1.5 Dyskusja

Dla pęcherzyków liofilizowanych na wszystkich histogramach (wysokości, szerokości połówkowej, R_c oraz d^{geom}) dane „B” oraz „C” były do siebie podobne. Najmniejsze pęcherzyki można było zaobserwować w danych „C”, natomiast największe w danych „A”. Jedną z hipotez dlaczego różnią się te dane, jest to, że być może zamrożenie wpłynęło na usunięcie większych pęcherzyków. Dane „A” były obrazowane od razu po rekonstrukcji pęcherzyków liofilizowanych, natomiast dane „B” oraz „C” były zamrożone w -80°C , a następnego dnia obrazowane mikroskopem sił atomowych. Faktem jest, że małe pęcherzyki zawierają procentowo mniej wody niż duże, ponieważ istotną częścią ich objętości stanowi błona lipidowa. Jest to jednak hipoteza wątpliwa, bo jak podaje producent, zamrożenie pęcherzyków w -80°C przez pół roku nie powinno znacząco wpłynąć na ich wielkość (HansaBioMed, 2025). Inna hipoteza mogłaby sugerować, że materiał zakupiony komercyjnie już od początku — to znaczy na etapie izolacji — nie spełniał warunku jednorodności.

Powstaje zasadnicze pytanie: czy mamy do czynienia z różnorodnością w ramach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jednego rodzaju, co w biologicznych próbkach się zdarza, czy też są to populacje dwóch różnych rodzajów pęcherzyków? Mamy za mało danych, aby na to pytanie odpowiedzieć, jednak dla dalszych rozważań należy założyć jakąś hipotezę, w świetle której dokonamy interpretacji wyników. Wydaje się sensowne, aby przyjąć, że zakupione pęcherzyki we wszystkich próbkach rzeczywiście są tego samego rodzaju, ale na etapie izolacji w jednym wypadku została zebrana nieco inna frakcja pęcherzyków, albo też na etapie mrożenia i rozmrażania z niezrozumiałego do końca powodu w dwóch próbkach większe pęcherzyki popękały lub akurat została pobrana pipetą partia mniejszych pęcherzyków. Wobec tego może mieć sens dalsza zbiorcza analiza ich własności.

Tabela 5: Średnie, mediany i odchylenia standardowe d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

Eksperyment	średnia [nm]	mediana [nm]	odchylenie standardowe [nm]
pęcherzyki liofilizowane „A”	66,2	64,3	23,2
pęcherzyki liofilizowane „B”	37,3	32,2	25,0
pęcherzyki liofilizowane „C”	25,1	22,97	11,0



Rysunek 17: Histogramy d^{geom} pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.

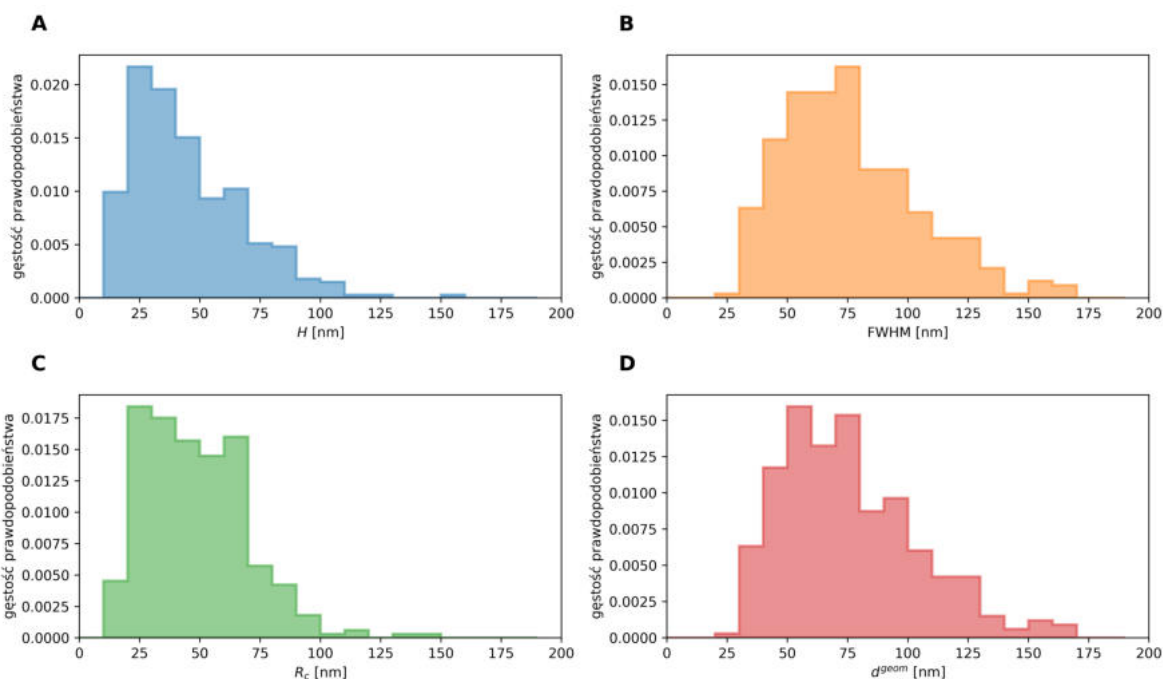
Tabela 6: Parametry geometryczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowanych komórek PC3

		obrazowane po 1 h	obrazowane po 20 h
H [nm]	średnia	44,7	52,0
	std	23,0	32,2
	mediana	39,3	45,8
FWHM [nm]	średnia	76,1	84,6
	std	28,1	31,8
	mediana	72,1	79,8
R_c [nm]	średnia	49,4	53,9
	std	29,5	24,9
	mediana	47,8	50,4
d^{geom} [nm]	średnia	75,8	85,2
	std	28,1	31,9
	mediana	70,8	81,0

10.2 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3

W tym rozdziale przedstawiono pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 hodowanych w Zakładzie Fizyki Biomedycznej. Ze względu na to, że były to pierwsze nasze badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, niezbędne było najpierw wprowadzenie odpowiedniej metodologii — w tym np. ustalenia po jakim czasie najlepiej jest obrazować próbkę pęcherzyków. Z tego względu postanowiono obrazować próbkę po około 1 h oraz po około 20 h od nałożenia na podłoże mikowe. Wyniki z tego obrazowania przedstawiono na rys. 18 i 19 oraz w tabeli 6. W tej tabeli przedstawione jest odchylenie standardowe, aczkolwiek ze względu na niesymetryczność rozkładów nie jest to najlepsza miara niepewności statystycznej. Inne podejście do tego tematu przedstawiono w rozdziale 18. Tym niemniej z przedstawionych wartości widać, że wszystkie badane pomiary wykazują wzrost po 20 h. Głębiej temu przyjrzymy się w rozdziale 19, gdzie zostanie przedstawiona próba wyjaśnienia tego zjawiska. W porównaniu do pęcherzyków liofilizowanych mają większą średnicę i bliżej im do danych „A” niż danych „B” i „C”. Obrazowanie było wykonywane sondą o promieniu 1 nm, którego wpływ był bardzo mały, dlatego został pominięty w obliczeniach.

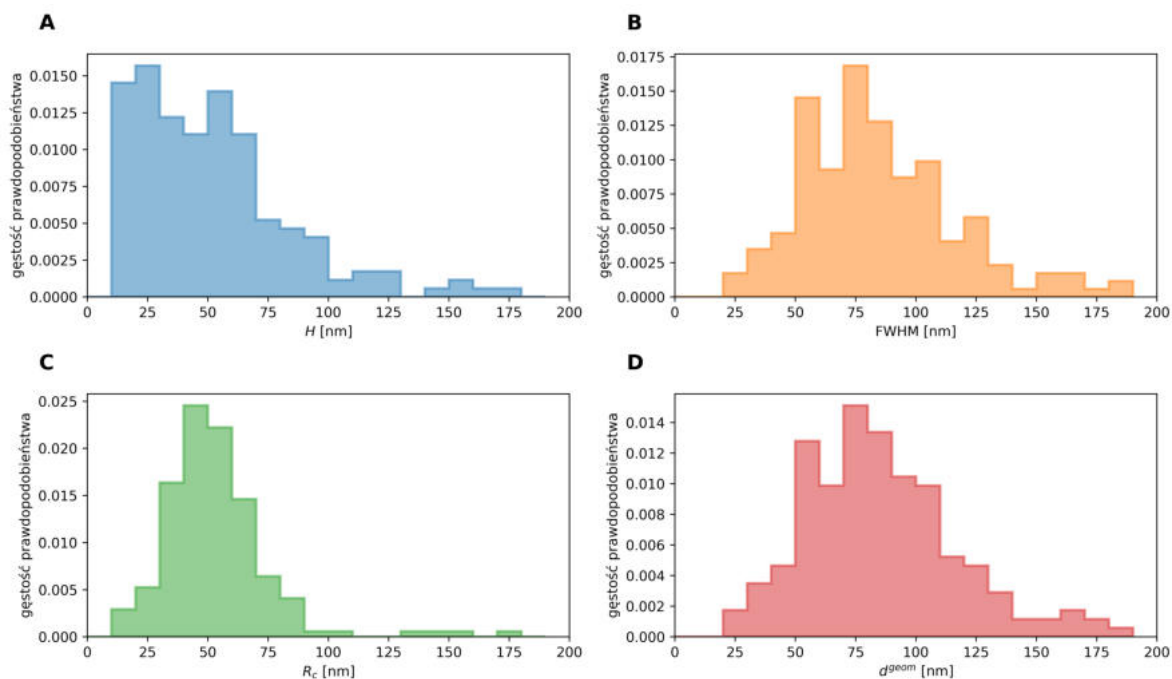
Próg wysokości pęcherzyków branych do obliczeń był postawiony na poziomie 10 nm. Postawiono również ograniczenie na maksymalną wartość okrągłości równą 0,6. Spowodowało to, że dla obrazów uzyskanych po 1 h pozostawiono 332 z 521 obiektów, zaś dla obrazów po 20 h zostawiono 172 z 452 znalezionych obiektów.



Rysunek 18: Parametry geometryczne pęcherzyków z komórek PC3 obrazowanych po 1 h od nałożenia na mikę. A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.

10.3 Parametry geometryczne liposomów

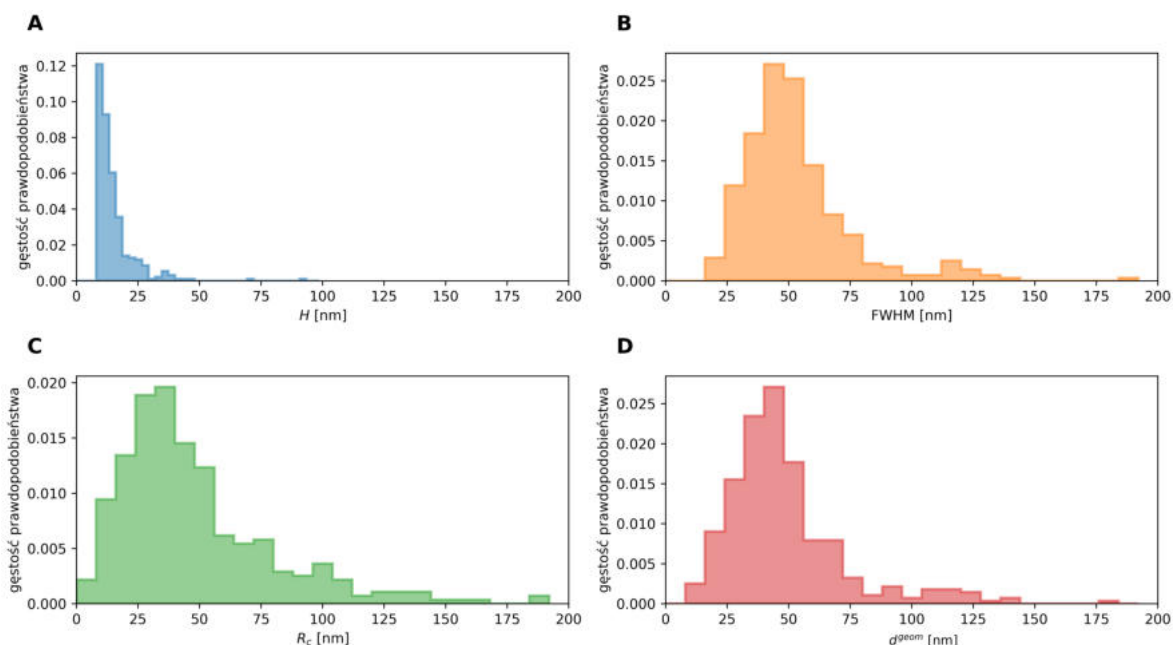
Wykonano podobną analizę obrazów z mikroskopii sił atomowych dla liposomów DPPC i DOPC. Badania były wykonane wraz z mgr Idą Wiśniewską. Analizowano 481 pęcherzyków z liposomów DPPC i 411 pęcherzyków z DOPC. Z nich warunki na okrągłość oraz minimalną wysokość spełniły odpowiednio 347 (DPPC) i 315 (DOPC). Wyniki parametrów geometrycznych dla tych pęcherzyków przedstawiono w tabeli 7 oraz na histogramach 20 (DPPC) i 21 (DOPC). Z danych przedstawionych w tabeli 7 można zauważyć, że mają one dość podobną do siebie geometrię, jednak liposomy DPPC są trochę większe od liposomów DOPC. Są one też mniejsze niż pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 oraz liofilizowanych pęcherzyków z komórek PC3 z danych „A”. Histogramy 20 i 21 również wyglądają podobnie dla tych pęcherzyków, jednak dla DPPC histogram FWHM oraz d^{geom} jest bardziej skośny w prawo niż ma to miejsce dla DOPC.



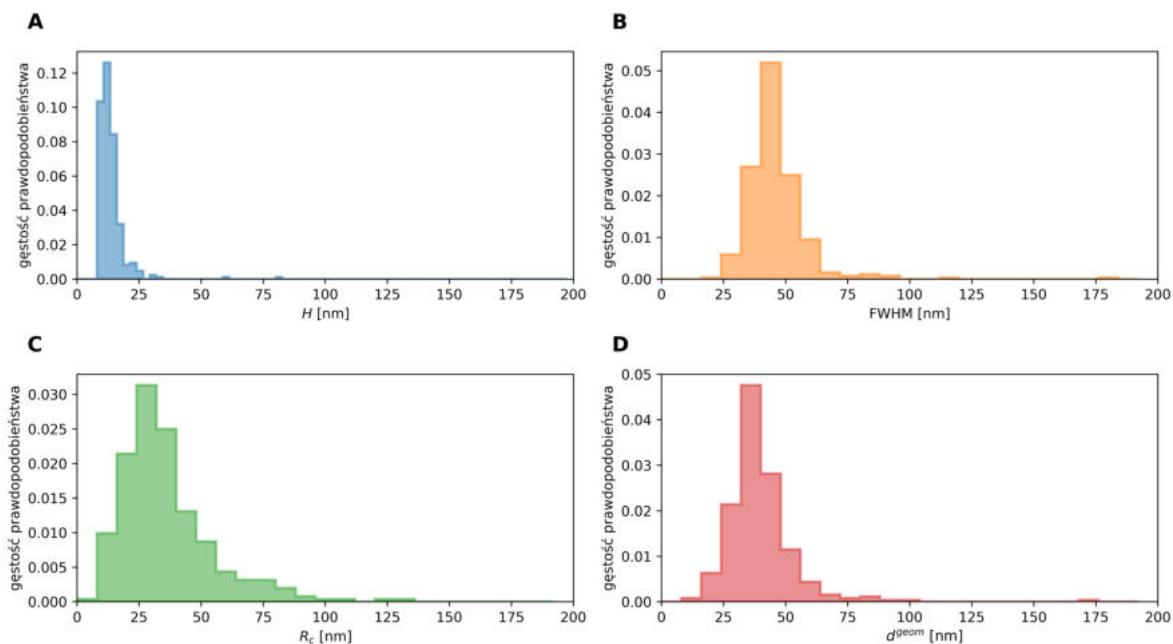
Rysunek 19: Parametry geometryczne pęcherzyków z komórek PC3 obrazowanych po 20 h od nałożenia na mikę. A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.

Tabela 7: Parametry geometryczne liposomów

		DPPC	DOPC
H [nm]	średnia	14,8	13,4
	std	8,4	6,0
	mediana	12,3	12,3
$FWHM$ [nm]	średnia	53,3	46,1
	std	24,3	12,9
	mediana	48,7	44,4
R_c [nm]	średnia	49,5	36,0
	std	36,6	18,7
	mediana	39,4	31,8
d^{geom} [nm]	średnia	48,7	39,6
	std	26,0	13,7
	mediana	43,1	37,4



Rysunek 20: Parametry geometryczne liposomów DPPC A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.



Rysunek 21: Parametry geometryczne liposomów DOPC A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.



Rysunek 22: Schematyczny pęcherzyk o kształcie sferycznej czaszy. Zaznaczono kąt przylegania (α) pęcherzyków do podłoża. W tym wypadku jest on mniejszy od 90° (porównaj suplement do Ridolfi i in. (2020)).

Część IV

Model przylegania do podłoża

11 Kąt przylegania do podłoża (α)

Kąt przylegania jest liczony ze wzoru:

$$\alpha = 90^\circ - \arcsin\left(\frac{R_c - H}{R_c}\right) \quad (6)$$

(patrz suplement do (Ridolfi i in., 2020)). Dla pęcherzyka bardzo płaskiego mamy R_c dużo większe od H , wówczas $\alpha \approx 90^\circ - \arcsin(1) = 0^\circ$. Dla pęcherzyka kulistego $R_c = \frac{1}{2}H$, $\alpha \approx 90^\circ - \arcsin(-1) = 180^\circ$ (por. rys. 22).

Trzeba jednak zauważyć, że Ridolfi i in. (2020) trochę inaczej wylicza promień krzywizny pęcherzyka. U niego R_{cap} jest promieniem czaszy sferycznej, zaś w naszym wypadku nie zakładamy, że pęcherzyk jest dokładnie sferyczną czaszą. W niniejszej pracy R_c liczone jest na podstawie dopasowania okręgów, a w Ridolfi i in. (2020) na podstawie wysokości i promienia maksymalnej szerokości pęcherzyka (a w zasadzie rzutu najszerszego miejsca pęcherzyka na podłoże).

11.1 Hipoteza o stałym kącie przylegania

W swojej pracy Ridolfi i in. (2020) przedstawia hipotezę, że kąt przylegania pęcherzyków do podłoża charakteryzuje konkretny rodzaj pęcherzyków w określonych warunkach (stężenia roztworu i siły przyciągania do podłoża). Swoje wyniki przedstawia dla różnego rodzaju liposomów oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych m.in. z glisty świńskiej (*Ascaris suum*) oraz pozyskanych z surowego mleka krowiego. Ridolfi i in. (2020) przedstawia, że kąt przylegania α nie zależy od średnicy geometrycznej pęcherzyka.

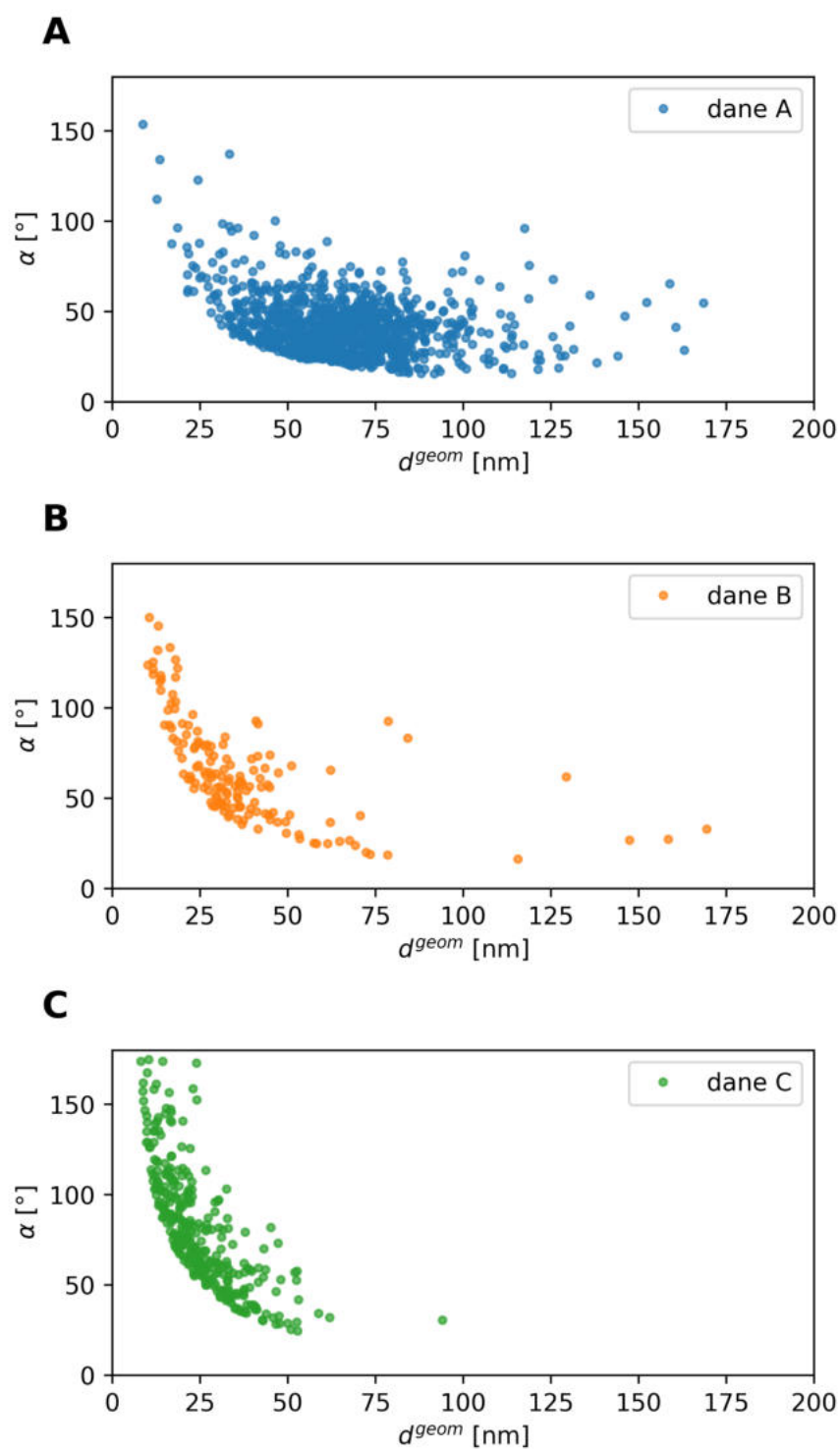
Na wykresie α od średnicy pęcherzyka pęcherzyki mniejsze, mające większe wartości kąta przylegania, są traktowane przez autora jako zanieczyszczenia. Dodatkowo autor wskazuje, że im sztywniejsze pęcherzyki, tym większy kąt przylegania

11.2 Wyniki — wykresy α vs d^{geom}

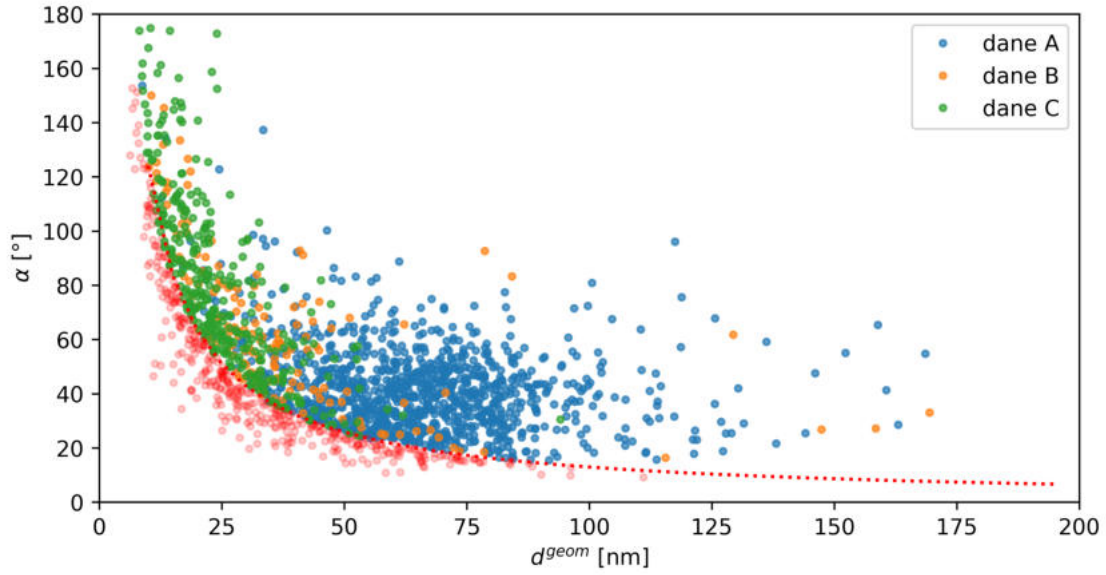
Jak można zauważyć na wykresach 23 uzyskane dane nie mają stałego kąta przylegania. Dla mniejszych pęcherzyków wartości kąta przylegania są mniejsze dla wszystkich zestawów danych pęcherzyków liofilizowanych. Względnie o stałym kącie można jeszcze mówić dla danych „A” (rys. 23A), aczkolwiek i tak dla tych danych widać, że mniejsze pęcherzyki mają większy kąt przylegania. Jest to zjawisko dość zrozumiałe. Intuicyjne wydaje się, że duże pęcherzyki będą miały możliwość zmienić swój kształt na bardziej płaski, podczas gdy małe pęcherzyki pozostaną raczej bliżej kształtu kuli. W szczególności pęcherzyki o minimalnej możliwej średnicy geometrycznej ($d^{\text{geom}} = 8$ nm) w ogóle nie powinny w sobie mieścić cieczy i nie mogłyby mieć innego kształtu niż kula.

Można zauważyć na wykresach 23, że dane są ograniczone od dołu. Ograniczenie to wynika z zastosowanego progu wysokości, ustawionego na 8 nm. Przekształcając wzór 4 otrzymujemy ograniczenie na R_c dla danej średnicy geometrycznej dane równością: $R_c^{\text{min}}(d^{\text{geom}}) = \frac{(d^{\text{geom}})^2}{4\text{prógH}} + \frac{\text{prógH}}{4}$, gdzie prógH to wartość progu wysokości pęcherzyka równa 8 nm. Finalnie kąt przylegania musi spełniać nierówność: $\alpha > 90^\circ - \arcsin\left(\frac{R_c^{\text{min}} - \text{prógH}}{R_c^{\text{min}}}\right) = 90^\circ - \arcsin\left(\frac{(d^{\text{geom}})^2 - 3\text{prógH}^2}{(d^{\text{geom}})^2 + \text{prógH}^2}\right)$. Pęcherzyki znajdujące się poniżej tego progu (odrzucone, ponieważ dla nich zmierzona wysokość była poniżej przyjętego progu wysokości) przedstawiono na wykresie 24 czerwonymi punktami. Można zauważyć, że dla wszystkich zestawów danych większość pęcherzyków leży powyżej przerywanej linii. Jednocześnie na tym wykresie można zauważyć, że dane „A”, „B” i „C” nakładają się na siebie.

Ridolfi i in. (2020) również w swoich danych dla mniejszych pęcherzyków uzyskiwał większe wartości kąta przylegania. Wskazał on jednak, że wynika to z zanieczyszczenia próbki. Przedstawił, że dla zanieczyszczonej próbki widać, że mniejsze pęcherzyki uzyskują większe wartości α , a dla niezanieczyszczonej to zjawisko nie zachodzi. Czy w takim razie przedstawione wyniki wskazują na zanieczyszczone próbki? Aby odpowiedzieć na to pytanie został stworzony został numeryczny model pęcherzyka przyczepionego do podłoża. Został on przedstawiony w następnym rozdziale 12.



Rysunek 23: Wykresy średnicy geometrycznej kąta przylegania α od d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. A), B) i C) to odpowiednio wykresy dla danych „A”, „B” i „C”. Im mniejsze wartości średnicy geometrycznej, tym w większości większy kąt przylegania do podłoża.



Rysunek 24: Wykresy średnicy geometrycznej d^{geom} od kąta przylegania α dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. Czerwoną przerywaną linią zaznaczono linię ograniczoną progiem wysokości równym 8 nm. Czerwonymi punktami zaznaczono pęcherzyki mające wysokość < 8 nm.

12 Numeryczny model pęcherzyka

12.1 Opis modelu pęcherzyka przyczepionego do podłoża

Istotnym parametrem określającym pęcherzyki jest ich średnica d^{geom} jaką mają, kiedy swobodnie pływają w cieczy. Ta średnica była wykorzystywana jako podstawowa cecha pęcherzyka w opracowanym modelu. Następnie w modelu zakładana była stała powierzchnia pęcherzyka, po przyczepieniu do podłoża taka sama jak przed przyczepieniem (Vorselen i in., 2020). Bazuje to na stwierdzeniu, że błona lipidowa jest słabo rozciągliwa, natomiast jest półprzepuszczalna dla roztworów wodnych. Założono, że pęcherzyk jest symetryczny względem swojego środka i modelowany krzywą długości S . Przykładowy modelowany pęcherzyk narysowano na rys. 25 w dwóch możliwych przedstawieniach: $\phi(s)$ będącym podstawą do obliczeń oraz $z(x)$ pokazującym rzeczywisty profil pęcherzyka. Przyczepiony pęcherzyk dotyka podłoża kołem o promieniu l_1 (patrz rys. 25B). Wielkości l_1 , l_2 i l_3 na tym rysunku to fragmenty długości obwodu (po obrocie względem środkowej osi wyznaczają one fragmenty powierzchni) pęcherzyka. Pęcherzyki leżące na podłożu mają w przybliżeniu kształt sferycznej czaszy. Jednak zastosowanie dokładnie takiego kształtu jest niefizyczne i wymagałoby nieskończenie małego promie-

nia krzywizny przy miejscu zetknięcia pęcherzyka z podłożem. Dlatego postanowiono miejsce styku pęcherzyka z podłożem również modelować wycinkiem mniejszego niż górna część okręgu. Jak widać na rys. 25B ustalone zostały cztery czerwone punkty (nazwijmy je s_0 , s_1 , s_2 i s_3). Górna część (której długość przed obrotem to l_3) od punktu s_2 do s_3 byłaby sferyczną czaszą. S niech będzie całkowitą drogą od środka podstawy pęcherzyka (punktu s_0) do jego najwyższego punktu s_3 . Postawiony został warunek, że w punktach s_0 kąt ϕ jest równy 0° , a w s_3 jest równy 180° , czyli $\phi(s_1) = 0^\circ$ i $\phi(s_2) = 180^\circ$. Funkcję $\phi(s)$ (rys. 25A) można przeliczyć na $z(x)$ (rys. 25B) według wzorów:

$$x(s) = \int_0^s \cos \phi(s') ds'$$

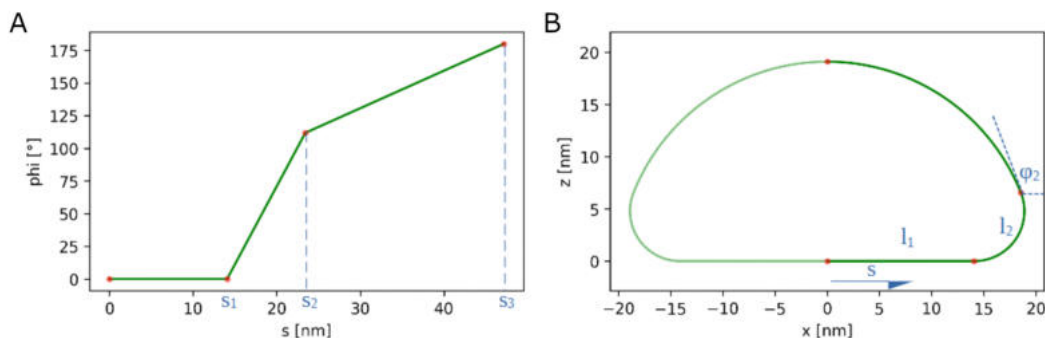
$$z(s) = \int_0^s \sin \phi(s') ds'$$

Kształt pęcherzyka zdefiniowano używając jego średnicy d^{geom} (w praktyce w napisanym kodzie używany jest promień pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy) oraz poprzez stosunki długości $\frac{l_1}{S}$ i $\frac{l_2}{S}$. Stosunek $\frac{l_3}{S}$ można już ustalić na podstawie średnicy d^{geom} i założenia o stałej powierzchni pęcherzyka przyczepionego do podłoża.

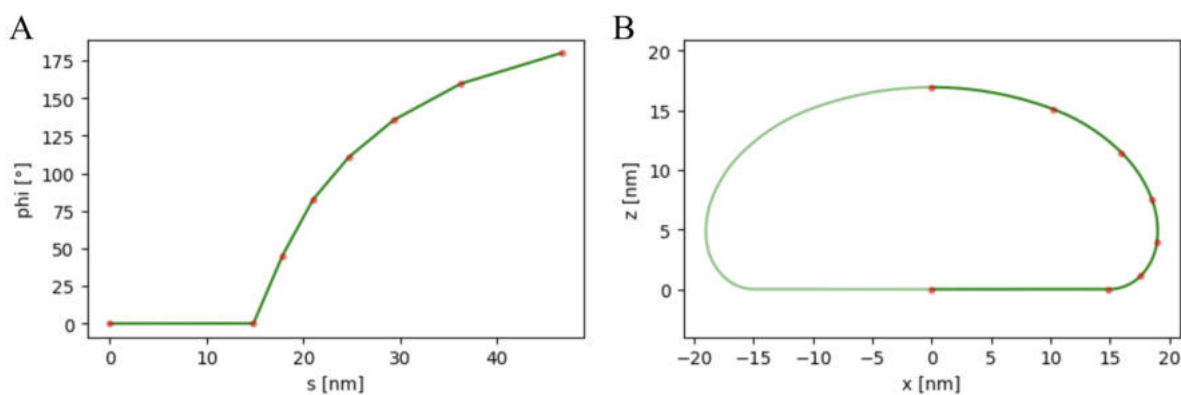
Zaproponowane powyżej podejście do modelowania pęcherzyka jest wystarczające do rozważań jakościowych. Jednak aby uzyskać dokładny, minimalizujący energię swobodną, kształt pęcherzyka, należy pozwolić na więcej stopni swobody w dopasowaniu krzywej $\phi(s)$. W tym celu zwiększono liczbę punktów z których składa się pęcherzyk (patrz rys. 26).

12.2 Minimalizacja energii swobodnej pęcherzyka

Jako zmianę energii swobodnej pęcherzyka będziemy rozumieć pracę sił zewnętrznych, jaką powinny one wykonać w stałej temperaturze, aby zmienić jego kształt od kształtu optymalnego do innego — w jakiś sposób wymuszonego (np. przez jego wciskanie). Na energię swobodą będą składały się składniki opisujące energię potencjalną oraz praca w pewnej przemianie termodynamicznej. Pęcherzyki osiadając na podłożu układają się tak, żeby zminimalizować swoją energię swobodną. Na to jak się dokładnie układają, wpływają zarówno warunki zewnętrzne np. ciśnienie na zewnątrz pęcherzyka, jak również właściwości samych pęcherzyków.



Rysunek 25: Modelowany pęcherzyk o średnicy 32 nm przyczepiony do podłoża. A) Wykres kąta ϕ od drogi s wzdłuż brzegu przekroju pęcherzyka. B) Kształt pęcherzyka. Aby wyobrazić sobie cały pęcherzyk, trzeba obrócić go wokół prostej przebiegającej od s_0 do s_3 (czyli jego wysokości). Wielkość l_1 przedstawia drogę, jaką trzeba pokonać od punktu s_0 do s_1 (analogicznie dla l_2). Narysowano kąt ϕ_2 , który jest w punkcie s_2 .



Rysunek 26: Modelowany pęcherzyk o średnicy 32 nm przyczepiony do podłoża, ze zwiększoną liczbą punktów. A) Wykres zależności kąta ϕ od drogi s wzdłuż brzegu przekroju pęcherzyka. B) Kształt pęcherzyka. Aby wyobrazić sobie cały pęcherzyk, trzeba obrócić go wokół prostej przebiegającej pionowo przez jego środek.

W niniejszym modelu minimalizowana jest energia swobodna pęcherzyka składająca się z trzech członów: energii potencjalnej wynikającej z charakterystycznej dla danej błony pęcherzyka reakcji na zginanie, pracy sił ciśnienia osmotycznego działającego na ścianki pęcherzyka oraz energii potencjalnej wynikającej z elektrostatycznego przyciągania pęcherzyka do podłoża.

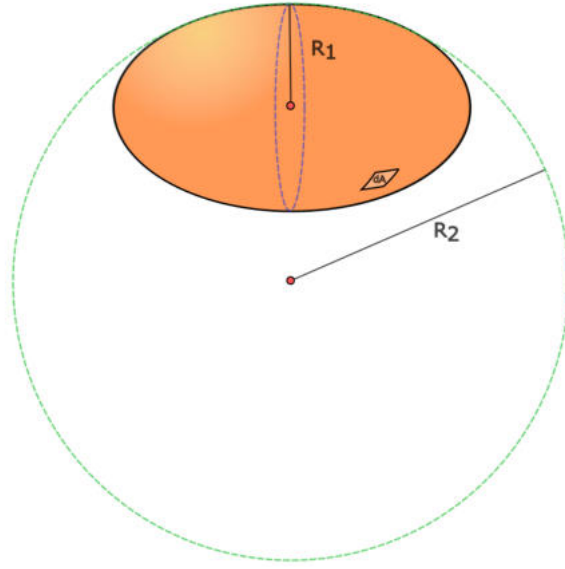
Energia ta będzie równa:

$$E = \frac{1}{2}\kappa \int \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 dA + \int_{V_0}^V \Delta\Pi(V') dV' - \gamma A_3 \quad (7)$$

gdzie κ to moduł zginania błony pęcherzyka, R_1 i R_2 to promienie krzywizny pęcherzyka (promienie stycznych do powierzchni okręgów) w płaszczyznach wyznaczonych przez normalną oraz dwie prostopadłe styczne do powierzchni pęcherzyka w danym punkcie (poglądowy przykład tej koncepcji przedstawiono na rys. 27), V to objętość pęcherzyka przyczepionego do podłoża, a A_1 to powierzchnia styku pęcherzyka z podłożem (w modelu równa πl_1^2 , porównaj wzór z Tang i in. (2020)). $\Delta\Pi(V) = \frac{\Pi_0 V_0}{V} - \Pi_0$ to różnica między ciśnieniem osmotycznym wewnątrz pęcherzyka przyczepionego do podłoża o objętości V a ciśnieniem osmotycznym na zewnątrz pęcherzyka (lub wewnątrz niego, kiedy był kulką o objętości $V_0 = \frac{1}{6}\pi(d^{\text{geom}})^3$). Założono, że zmiana objętości zachodzi powoli i w stałej temperaturze, więc spełnione jest $\Pi V = \text{constans}$. Przyjęto też przybliżenie, że roztwór dla swobodnie pływających pęcherzyków jest izotoniczny, jak również, że struktura błony jest na tyle jednorodna, że najniższą energię krzywizny przyjąłaby ona, gdyby była płaska.

Pierwszy człon wzoru 7 wynika z energii krzywizny pęcherzyka. Moduł zginania κ jest to charakterystyczna cecha błony lipidowej danego typu pęcherzyków. Mówi jak trudno jest zgiąć błonę pęcherzyka. Jest on współczynnikiem proporcjonalności we wzorze na energię potencjalną krzywizny elementu powierzchni dA . Drugi człon opisuje wpływ ciśnienia osmotycznego na pęcherzyk, jest to wzór na pracę w przemianie izotermicznej. Natomiast trzeci człon opisuje wpływ przyciągania pęcherzyka do podłoża miki.

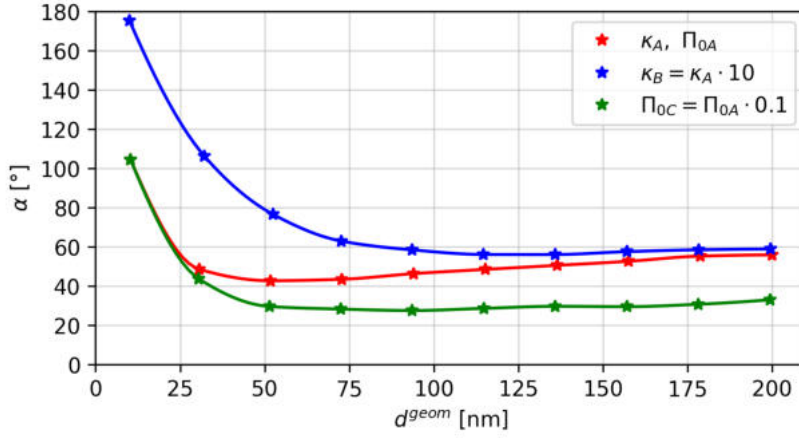
Założmy, że interesuje nas kształt pęcherzyka, opisany przez jego wysokość i szerokość. W tych samych warunkach, jeśli błona będzie bardziej sztywna (będzie miała większy moduł zginania), pęcherzyki będą miały większą wysokość względem szerokości, gdyż trudniej im będzie ulec zginaniu. Natomiast jeśli siła elektrostatyczna będzie mocniej przyciągać ten sam pęcherzyk, będzie on miał tendencję do bycia bardziej płaskim i szerszym.



Rysunek 27: Przedstawienie promieni krzywizny R_1 i R_2 (odpowiednio niebieskiego i zielonego okręgu) dla pomarańczowej elipsoidy w jej najwyższym punkcie. Na schemacie zaznaczono element powierzchni dA .

12.3 Wykresy α od średnicy pęcherzyka — wyniki dla modelu

Kształt pęcherzyka minimalizującego energię swobodną zależy od doboru parametrów modelu: κ , Π_0 i γ oraz od wielkości pęcherzyka przed przyłączenia do podłoża d^{geom} . Przyjmijmy, że kształt pęcherzyka na podłożu może być opisany dwiema wartościami: wysokością H oraz promieniem krzywizny w najwyższym punkcie R_c . Co za tym idzie można dla niego wyliczyć kąt przylegania do podłoża na podstawie wzoru 6 (choć interpretacja, czym dokładnie jest w tym wypadku kąt przylegania nie jest jasna). Na wykresie 28 przedstawiono przykładowe kształty zależności α od średnicy pęcherzyka d^{geom} dla różnych parametrów modelu. Krzywe A (czerwona) i B (niebieska) różnią się tylko wartością modułu zginania. Natomiast krzywe A i C (zielona) różnią się tylko wartością ciśnienia osmotycznego. Jak widać, na kształt krzywych dla pęcherzyków o średnicy geometrycznej poniżej 50 nm wpływa głównie moduł zginania, podczas gdy wartości kąta przylegania osiągane dla pęcherzyków większych niż 150 nm zależą przede wszystkim od przyjętego początkowego ciśnienia osmotycznego. Wyniki z modelowania potwierdzają, że dla większych pęcherzyków założenie o niezależności kąta od średnicy geometrycznej może być całkiem dobrze spełnione, podczas gdy dla małych pęcherzyków zależność wcale nie musi być spełniona (analogicznie do danych eksperymentalnych na rys. 23).



Rysunek 28: Modelowany wykres zależności α od średnicy pęcherzyka d^{geom} dla różnych parametrów modelu. Krzywe A (czerwona) i B (niebieska) różnią się tylko wartością modułu zginania, B ma 10 krotnie większy moduł zginania. Krzywe A (czerwona) i C (zielona) różnią się wartością ciśnienia osmotycznego — C ma 10 krotnie niższe ciśnienie.

Warto zauważyć, że z własności modelu i wzoru 7 wynika, że jeśli wszystkie wartości κ , Π_0 i γ pomnożymy przez tę samą wartość, to nie zmieni kształtu pęcherzyk, który minimalizuje wzór na energię swobodną (nie zmieniają się jego parametry H , R_c , α). Natomiast sama wartość energii swobodnej zostanie pomnożona przez tę wartość. Zatem na podstawie kształtu pęcherzyków możemy próbować wnioskować o wartościach parametru modelu, pamiętając, że mogą one być pomnożone przez nieznaną stałą. W następnym rozdziale zostanie przedyskutowany sposób odkrycia tej stałej. Wartości parametrów modelu przedstawione na wykresie 28 są poglądowe (aby wyjaśnić model) i nie odpowiadają fizycznym wartościom.

12.4 Wykresy H/R_c

Wprowadzony model nie opisuje pęcherzyka jako dokładnie czaszę sferyczną. Kąt zetknięcia z podłożem w modelu jest zawsze równy zero. Wobec tego interpretacja kąta przylegania nie jest jasna. Kąt α w pracy Ridolfi i in. (2020) (patrz wzór 6) jest skomplikowaną funkcją H i R_c . Okazuje się, że podobny charakter zależności od d^{geom} uzyskuje dużo prostsza wielkość H/R_c , również opisująca kształt pęcherzyka o znanej średnicy geometrycznej. Sam parametr H/R_c używany jest w badaniach, chociażby w Ye i in. (2021) i Piontek i Roos (2022), na ogół podawane jest w jakim zakresie się znajduje. Na wykresie 29 pokazano zależność H/R_c od d^{geom} dla tych samych pęcherzyków co na wykresie 23. Widać, że wykresy $H/R_c(d^{\text{geom}})$ mają bardzo podobny charakter do

$\alpha(d^{\text{geom}})$. Dla H/R_c tak samo jak przy kącie istnieje ograniczenie górne. Kąt przylegania może wynosić maksymalnie 180° . Jeśli pęcherzyk traktowany jako czasza sferyczna osiągnąłby tę wartość kąta przylegania, to znaczyłoby wtedy, że pęcherzyk byłby kulą stykającą się w jednym punkcie z podłożem. Natomiast H/R_c może wynosić maksymalnie 2 w identycznym przypadku. Jako mniej skomplikowanego do analizy i bardziej zrozumiałego w interpretacji parametru użyto wykresów zależności H/R_c od d^{geom} do porównania z modelem, choć dla porządku również sprawdzono zależność α od d^{geom} .

Przekształcając wzór 4 możemy zauważyć, że jeśli minimalna wysokość pęcherzyka wynosi $H_{\min}$, to dla danej średnicy d^{geom} , minimalna wartość $H/R_c = \frac{4}{(d^{\text{geom}}/H_{\min})^2 + 1}$. Kształt tej krzywej stanowi dolne ograniczenie dla punktów na wykresie 29, w tym wypadku przyjęto $H_{\min} = 8 \text{ nm}$. Dla $d^{\text{geom}} = H_{\min}$ dostajemy minimalną wartość $H/R_c = 2$, czyli jest to pęcherzyk, który nie może ulec rozplaszczeniu, lecz musi pozostać kulisty.

12.5 Dopasowanie parametrów modelu do wyników eksperymentu

Jako miarę dopasowania modelu do danych użyto nieskorelowanego współczynnika determinacji (R^2). Przyjmuje on wartości maksymalnie do wartości 1, gdzie 1 to maksymalnie dobre dopasowanie. Pokazuje on jak dobrze model wyjaśnia dane eksperymentalne.

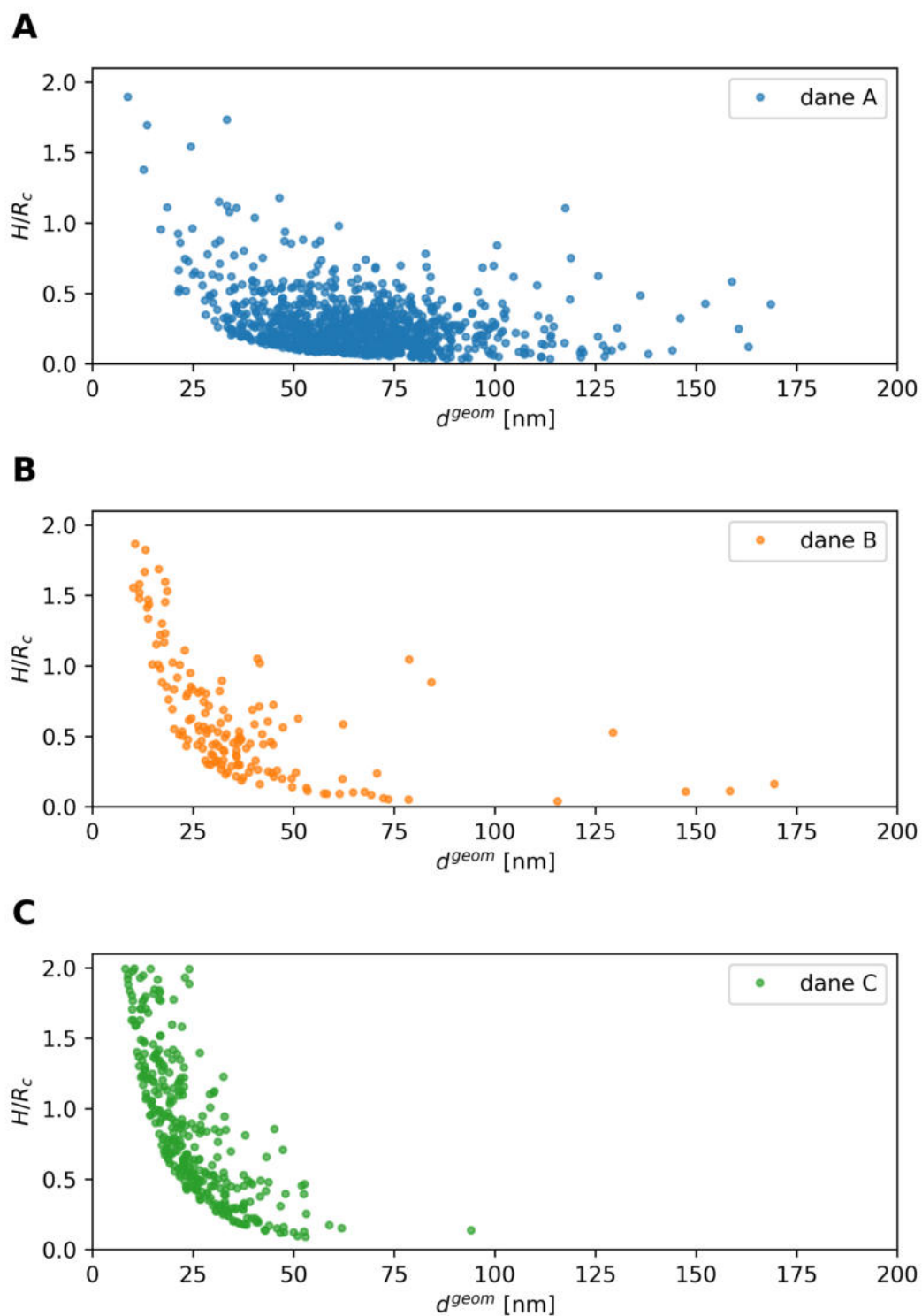
Można go obliczyć za pomocą wzoru:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

gdzie y_i — dane eksperymentalne, $\hat{y}_i$ — przewidywane dane modelu, $\bar{y}$ — średnia wartości danych eksperymentalnych (Scikit-learn, dostęp 17-09-2025).

Wartości R^2 mogą być ujemne jeśli samo zastosowanie średniej jest lepsze niż dopasowana funkcja (licznik jest wtedy większy od mianownika). W dalszej części pracy patrzono na same wartości większe od zera i szukano takich parametrów modelu κ , Π_0 i γ , aby uzyskać jak największy R^2 z dopasowania zależności H/R_c od d^{geom} dla modelowanych pęcherzyków o energetycznie optymalnym kształcie do punktów eksperymentalnych na płaszczyźnie $d^{\text{geom}}-H/R_c$.

Ponieważ, jeśli wymnożymy wszystkie parametry modelu przez tę samą wartość, kształt pęcherzyka się nie zmieni (patrz rozdział 12.3), przedstawiono wyniki dopaso-



Rysunek 29: Wykresy średnicy geometrycznej kąta przylegania H/R_c od d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. A), B) i C) to odpowiednio wykresy dla danych „A”, „B” i „C”. Im mniejsze wartości średnicy geometrycznej, tym na ogół większa wartość H/R_c .

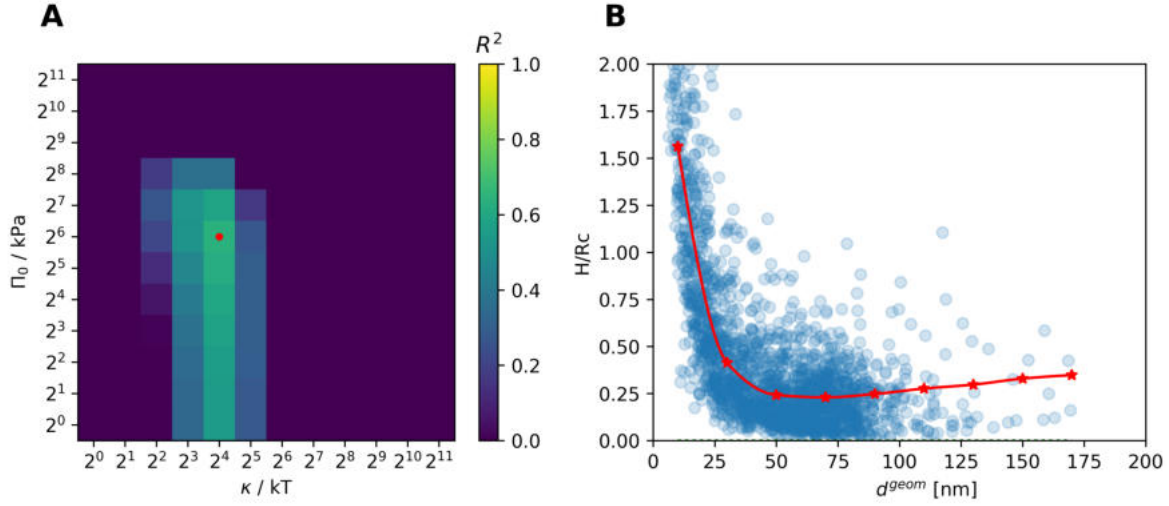
wania (rys. 30A) przy stałym parametrze $\gamma = 10 \text{ mJ/m}^2$ i zmieniających się κ oraz Π_0 (na osiach κ podzielone przez stałą Boltzmanna (k_B) wymnożoną przez temperaturę (T), na drugiej osi Π_0 mierzone w kPa). Na tym rysunku czerwoną kropką oznaczono parametry dla których model jest najbliżej danych eksperymentalnych. Na początku nie postawiono prognozy na wysokość, gdyż nie było wiadomo, czy odcięcie to nie będzie mieć zbyt dużego wkładu do wyboru najlepszych parametrów modelu. Jak się jednak okazało nie zmieniło to istotnie wartości dopasowanych parametrów modelu. Dla $\gamma = 10 \text{ mJ/m}^2$ wynosiły one w obu przypadkach $\kappa = 16 k_B T$ i $\Pi_0 = 64 \text{ kPa}$ (w ramach przyjętej rozdzielczości obliczeń). Wykres z prognozą wysokości możemy zobaczyć na rys. 31. Aby uzyskać jeszcze bardziej dokładne wartości parametrów κ i Π_0 , interpolowano wartości H i R_c (wyliczone wcześniej na logarytmicznie równomiernie rozłożonej siatce dla parametrów κ i Π_0 oraz liniowo równomiernie rozłożonych wartościach d^{geom}) i dla tych nowych wartości modelowanych pęcherzyków wyliczono R^2 . Wyniki dopasowania po interpolacji przedstawiono na rys. 32. Dla tej interpolacji najlepszą energię uzyskano dla trochę wyższego κ i niższego Π_0 , wynoszących odpowiednio $\kappa = 22 k_B T$ i $\Pi_0 = 58 \text{ kPa}$. Jak można zaobserwować na wykresach 30A, 31A i 32A, dla pęcherzyków liofilizowanych wyższe wartości R^2 można osiągnąć dla w miarę podobnych wartości κ natomiast dla szerokiego przedziału wartości Π_0 (podłużny pionowy kształt na wykresie 30A).

Analogiczne badanie przeprowadzono dla liposomów DOPC i DPPC, również uzyskując pionowy kształt maksimum określonego lepiej dla κ niż dla Π_0 . Dla DOPC maksimum zostało znalezione dla wartości $\kappa = 25,6 k_B T$ i $\Pi_0 = 57,7 \text{ kPa}$ (patrz rys. 33), natomiast dla DPPC maksimum zostało znalezione dla wartości $\kappa = 18,5 k_B T$ i $\Pi_0 = 93,9 \text{ kPa}$ (patrz rys. 34). Wartości te zostały dopasowane również przy założeniu $\gamma = 10 \text{ mJ/m}^2$.

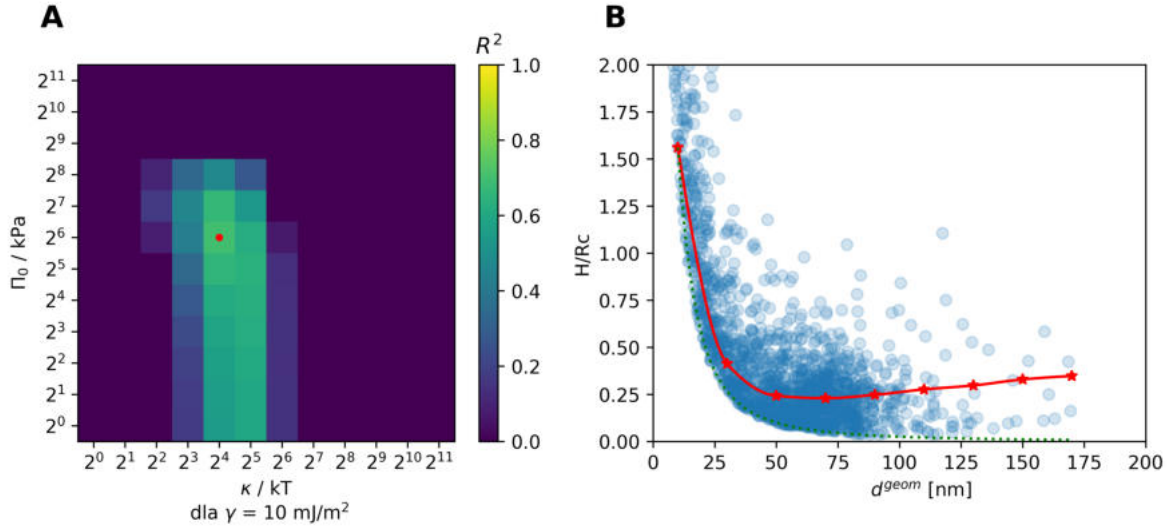
Część V

Badanie sztywności pęcherzyków i wyznaczanie modułu zginania

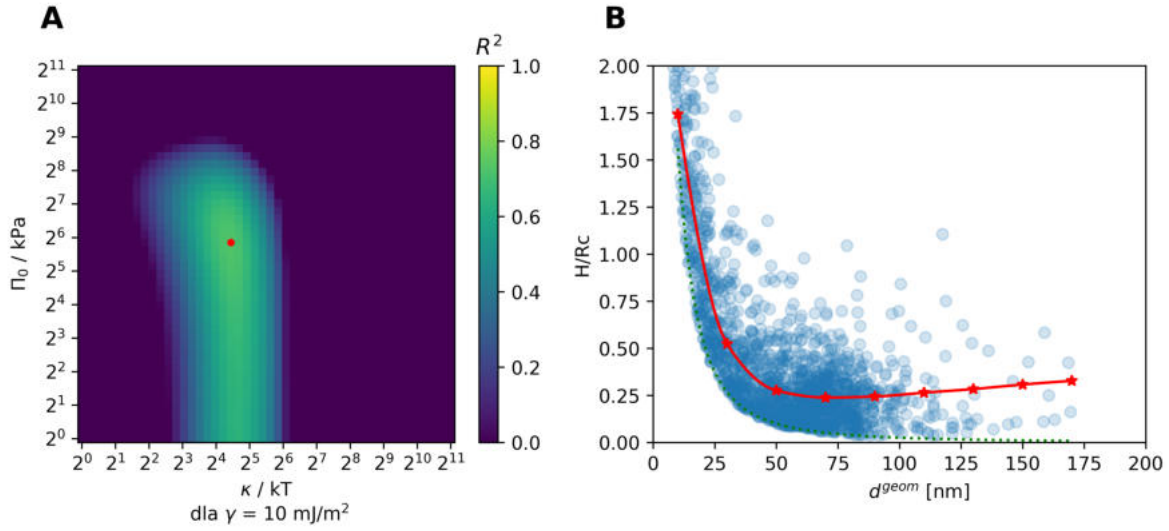
Badanie własności nanomechanicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest istotne z punktu widzenia zarówno badań podstawowych jak i chociażby ich zastosowań jako nośników leków. Wchłanianie przez komórki nanopęcherzyków zależy nie tylko od ich



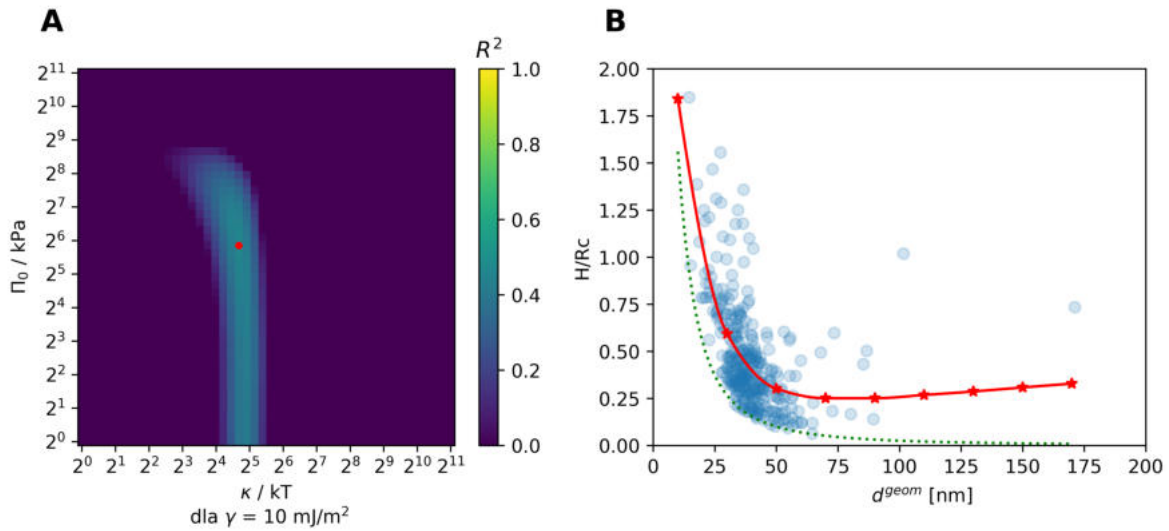
Rysunek 30: Dopasowanie modelu do złączonych danych „A”, „B” i „C” pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3 bez zastosowania progu wysokości. A) Macierz R^2 dla różnych wartości κ oraz Π_0 przy założeniu stałej $\gamma = 10 \text{ mJ/m}^2$. Czerwoną kropką zaznaczono model z maksymalnym R^2 . B) Wykres zależności H/R_c od d^{geom} . Czerwonymi gwiazdkami zaznaczono przewidywania dla najlepszego modelu (z maksymalnym R^2). Czerwoną krzywą interpolowano wartości między tymi punktami.



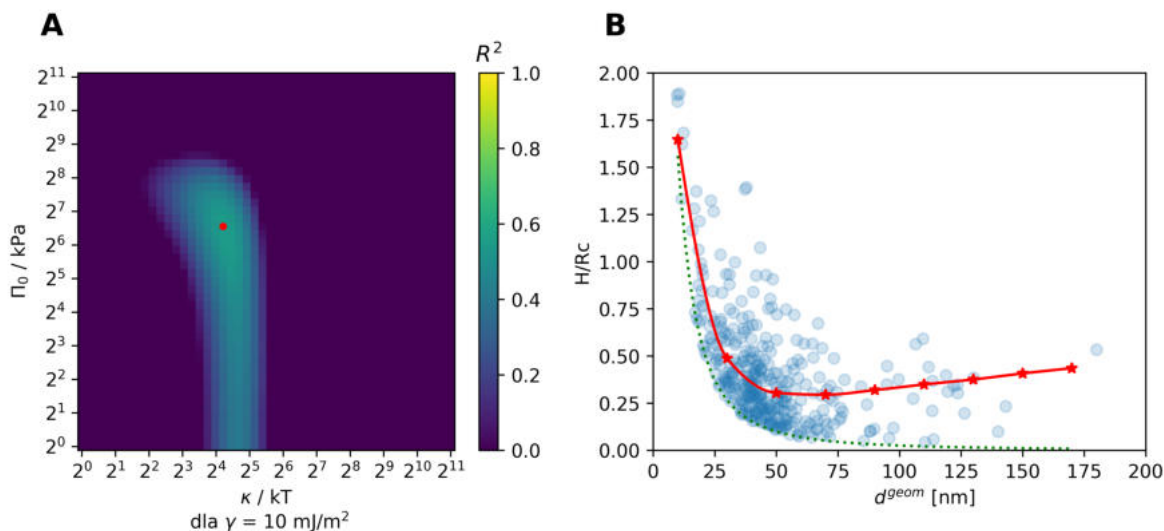
Rysunek 31: Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 30 dla tych samych danych, tylko ze zmienionym progiem wysokości na 8 nm. Przerywaną linią zieloną zaznaczono próg, gdzie wysokość pęcherzyka jest równa 8 nm.



Rysunek 32: Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 31 dla tych samych danych, z tym samym profilem wysokości, tylko macierz R^2 została uzyskana z interpolowanych danych H i R_c dla większej liczby możliwych wartości κ oraz Π_0 .



Rysunek 33: Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 32 dla liposomów DOPC.



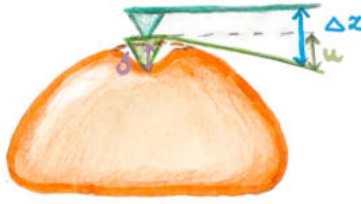
Rysunek 34: Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 32 dla liposomów DPPC.

rozmiaru, ale też od tego, czy są bardziej lub mniej miękkie (Guo i in., 2018).

13 Krzywa spektroskopii sił

Do badania sztywności posłużyła krzywa uzyskana z powolnej spektroskopii sił (zwaną czasem nanoindentacją — z ang. nanoindentation). W powolnej spektroskopii sił naciskamy na pęcherzyk znacznie wolniej niż ma to miejsce w zwykłym obrazowaniu AFM. Przykładowo naciskamy z częstotliwością 1 Hz w jakieś jedno miejsce na próbce, czyli sonda opuszcza się i podnosi w ciągu jednej sekundy. Dzięki temu można uzyskać dokładniejsze krzywe, z mniejszą ilością szumu czy drgań niż ma to miejsce, kiedy wykonuje się szybką spektroskopię sił metodą PeakForce QNM, dla której typowa częstotaść drgania sondy to 1-2 kHz. Niesie to jednak trochę wad. W szczególności jest nią ilość czasu, którą zużywa się na wykonanie spektroskopii. Drugim problemem może być trudność w dokładnym ustaleniu miejsca na obrazie AFM, w którym wykonywana jest spektroskopia (ze względu na ograniczoną precyzję działania piezoelektryka przemieszczającego sondę poziomo). Używany sprzęt do obrazowania Bruker Dimension Icon, umożliwiał ustawienie progowej siły do której naciskany jest pęcherzyk, która typowo może być istotnie większa niż ta używana do obrazowania.

Pierwotnie rejestrowana jest krzywa opisująca siłę działającą na sondę względem przemieszczenia sondy, która zamieniana jest na krzywą opisującą siłę względem odległości sondy od próbki. W trakcie naciskania na pęcherzyk, dźwignia, na której za-



Rysunek 35: Schematyczne przedstawienie działania sondy na pęcherzyk.

mocowana jest sonda ulega ugięciu. Nazwijmy to ugięcie u . Schematycznie zjawisko to przedstawiono na rysunku 35. Według prawa Hooke'a zakłada się, że ugięcie to jest liniowo proporcjonalne do działającej siły i wyraża się wzorem:

$$F_s = k_s u \quad (8)$$

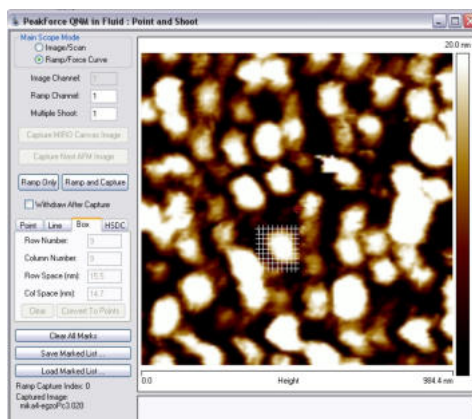
gdzie F_s to siła jaka działa na sondę, k_s to stała sprężystości sondy, a u to ugięcie dźwigni sondy.

Zgodnie z trzecią zasadą dynamiki Newtona siła jaka działa na sondę F_s jest równa sile, jaką sonda działa na pęcherzyk F_p . Dla pęcherzyka zakładając analogicznie $F_p = k_p d$, gdzie d to głębokość wciśnięcia sondy w próbkę (ang. indentation), jest ona równa odległości sonda-próbka wziętej z przeciwnym znakiem (patrz rys. 35). Ta głębokość jest równa przemieszczeniu sondy Δx od chwili, gdy dotknęła próbki, minus ugięcie dźwigni δ (czyli w sumie $d = \Delta x - \delta$). Ze wzoru 8 $\delta = \frac{F_s}{k_s}$ i $F_p = F_s$, więc finalnie zmiana z krzywej siła-przemieszczenie sondy na krzywą zależności siły od głębokości wciśnięcia sondy w próbkę można uzyskać zmieniając oś odciętych według wzoru:

$$\delta = \Delta z - \frac{F_p}{k_s}$$

(porównaj wzór w Vorselen i in. (2020)).

Urządzenie z którego korzystano podczas wykonywania spektroskopii sił (korzystano z funkcji Point and Shoot) pozwala najpierw zeskanować obszar szybkim obrazowaniem i obejrzeć topografię, a następnie wybrać punkt lub zestaw punktów w których będzie robiona spektroskopia sił. Nietrywialnym problemem w nanoindentacji jest jednak trafienie w pęcherzyk, poruszamy się przecież w nanoskali. Podniesienie i opuszczenie sondy sprawia, że zawsze się ona trochę przemieści. Nawet samo szybkie skanowanie, jeśli zacznie się je od góry, to po dotarciu do dołu i skanowaniu od dołu do góry, daje obraz

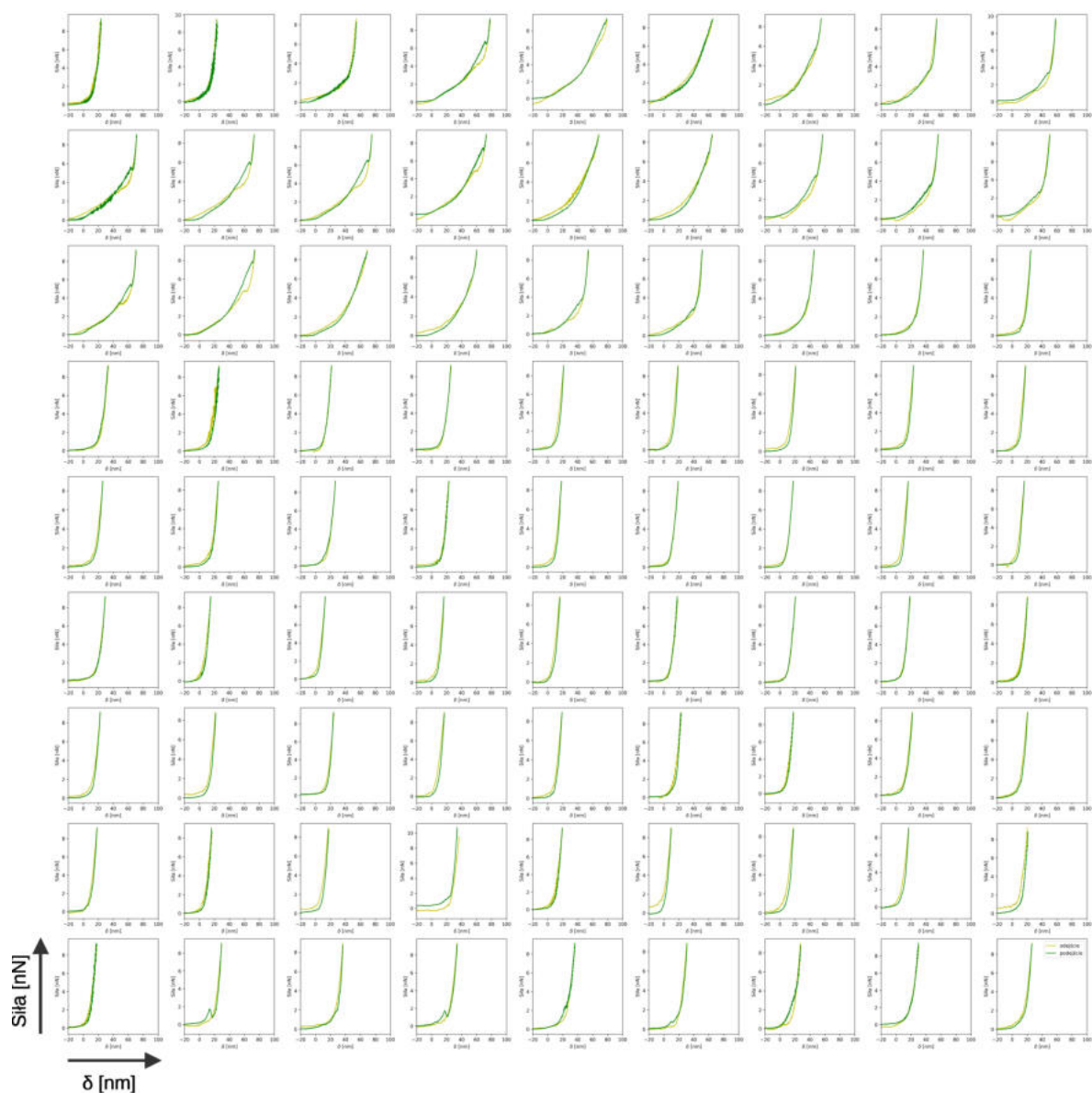


Rysunek 36: Przykładowy wybór punktów do spektroskopii sił z użyciem funkcji Point and Shoot wykonanych w programie Nanoscope. Obraz powstał z użyciem szybkiego skanowania. Białymi krzyżykami zaznaczono miejsca, gdzie wykonano później spektroskopię.

lekko przesunięty. Nie jest więc możliwe dokładne stwierdzenie, czy na pewno uderzono w pożądane miejsce (w tym wypadku w środek pęcherzyka). Postanowiono więc, aby podobnie, jak opisano to w artykule Ridolfi i in. (2020), robić spektroskopię w wielu punktach umieszczonych na siatce prostokątnej (w przybliżeniu kwadratowej)

Białymi krzyżykami na rys. 36 zaznaczono punkty w których była później wykonana spektroskopia. Dzięki temu można było zobaczyć, że w niektórych miejscach spektroskopia trafia w podłoże (krzywe były bardziej pionowe), a w innych trafia w pęcherzyk. Wyrysowywano krzywe (uzyskane w miejscach białych krzyżyków), aby zorientować się, gdzie dokładnie leży pęcherzyk. Jak się spodziewano, środek pęcherzyka, mimo wybrania go w środku kwadratu w którym obrazowano, ostatecznie znalazł się w innym miejscu, niż wynikałoby to z obrazowania. Przykładowo na rys. 37 krzywe w górnej części znacznie różnią się nachyleniem od tych znajdujących się poniżej. Można więc przypuszczać, że w tym górnym obszarze natrafiliśmy na pęcherzyk. Widać więc, że sonda przemieściła się pionowo względem wybranego obszaru trochę inaczej niż zostało to zaplanowane. Do dalszej analizy wybrano krzywą, która jest najbliżej środka pęcherzyka (reprezentującą największą wysokość pęcherzyka licząc od punktu kontaktu sondy z błoną). Wybraną krzywą z rys. 37 można zobaczyć na rys. 40.

Aby uzyskać krzywe spektroskopii wykonywano w wybranym obszarze szereg nanoindentacji (patrz białe krzyżyki na rys. 36), przy czym po jej wykonaniu w jednym punkcie na siatce, sonda przesuwała się do następnego punktu, w którym wykonywała kolejny pomiar.



Rysunek 37: Uzyskane spektroskopie dla wybranego obszaru w którym znajdował się pęcherzyk dla pęcherzyków liofilizowanych z danych „B”. Mimo iż pęcherzyk był wybrany w środku tego obszaru, z krzywych wynika, że znajduje się on na górze. Widać to po tym, że siła rośnie wolniej, gdyż sonda natrafiła na miększy obszar, a nie od razu na twarde podłoże miki. Na zielono narysowano krzywe podejścia, na żółto krzywe odejścia.

W analizie krzywej spektroskopii istotną i nietrywialną kwestią było wyznaczenie poziomu zerowej siły (na osi pionowej), jak również punktu kontaktu sondy z pęcherzykiem (na osi poziomej). Aby wyznaczyć punkt kontaktu, najpierw brano była połowa punktów od początku krzywej, gdzie sonda jeszcze nie dotyka do pęcherzyka. Z tych punktów (stanowiących obszar odniesienia) liczone było odchylenie standardowe, a następnie sprawdzane było w którym momencie sonda przekracza trzykrotność odchylenia standardowego. Aby znaleźć zero sprawdzano wartość średnią na odcinku, gdzie sonda jeszcze nie dotyka pęcherzyka i odejmowano tę średnią od siły. W niektórych przypadkach zdarzało się, że pojawiał się trend rosnący, bądź malejący. Ten trend również odejmowano od danych, najpierw dopasowując prostą do wartości z obszaru odniesienia. Analogiczne podejście w znajdowaniu zer zastosowano w artykule Offroy i in. (2020).

Trzeba dodać, że w analizie krzywych spektroskopii ostatecznie posłużono się nieco inną kalibracją stałej sprężystości sondy niż ta, którą dostarczało oprogramowanie mikroskopu. Przyjęto, że przy spektroskopii sił wykonanej na czystej mice, krzywa powinna dążyć do prawie pionowej — i na tej podstawie zmodyfikowano stałą sprężystości sondy.

14 Sztywność

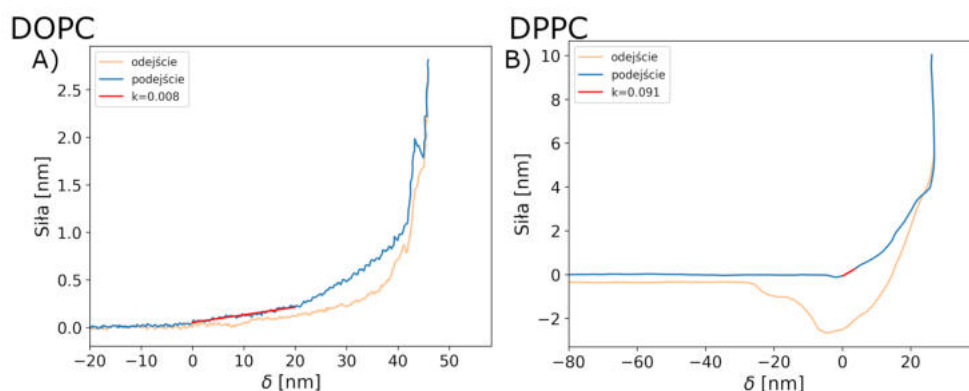
Przy badaniu różnych materiałów najczęściej zakłada się nieliniową zależność siły od głębokości wciśnięcia (indentacji) sondy. Często w modelach stosuje się proporcjonalność siły do indentacji w potęgę $3/2$ lub 2 . Przykładowo model Hertza (rozwinęty przez Sneddona) w zależności od kształtu końcówki sondy zakłada właśnie takie potęgi (Kontomaris, Malamou i Stylianou, 2022). Jego zastosowanie jest bardziej odpowiednie dla twardych obiektów (Tang i in., 2020). Dzięki temu modelowi możliwe jest wyznaczenie modułu Younga. W stosunku do komórek i pęcherzyków lipidowych jednym z pomysłów na opisanie ich reakcji na wciskanie sondy jest model Canhama–Helfricha w którym zależność siły od indentacji jest liniowa (Tang i in., 2020; Ridolfi i in., 2020). W praktyce zwykle tylko fragment krzywej jest liniowy dla małych głębokości wciśnięcia. Wówczas tangens nachylenia liniowego fragmentu krzywej określa się sztywnością i oznacza literą k , przez analogię do stałej sprężystości sprężyny. Sztywność ta jest zależna od szeregu różnych czynników, warunków w jakich się znajduje pęcherzyk, czy chociażby samej wielkości pęcherzyka.

14.1 Uzyskane spektroskopie pęcherzyków

Jak podaje Vorselen i in. (2020), w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych na krzywej zależności siły od głębokości wciśnięcia powinno być widać dwa przebicia warstwy lipidowej. Te miejsca przebicia można poznać po spadku siły po przebicciu przez błonę. Jednak w danych uzyskanych na potrzeby niniejszej pracy na ogół nie było widać podwójnego przebicia błony. Podobne zachowanie można zobaczyć na wykresach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w pracy Ye i in. (2021). Autor uważa, że może być to spowodowane dociśnięciem warstw i przebicciem obu na raz. Jest to prawdopodobna wersja, która być może zaszła również w uzyskanych w naszym zespole danych. Tym bardziej jest to prawdopodobne ze względu na to, że używana sonda (choć wymiarów porównywalnych do tych w Vorselen i in. (2020)) była ostro zakończona i wbijała się łatwiej (jak „igła”) w pęcherzyk przebijając od razu dwie warstwy. Jednak aby to potwierdzić niezbędne byłoby ponowne uzyskanie spektroskopii sił z mniej ostrą końcówką sondy.

Warto również zauważyć, że często przebicie miało miejsce dla różnej wartości siły. Szczególnie widać to jak porówna się liposomy uzyskane sztucznie wytworzone w naszym zespole z dwóch różnych lipidów: DPPC oraz DOPC (patrz rys. 38). Dla wytworzonych z DPPC, które powinny być sztywniejsze niż te z DOPC, nie widać było wyraźnego przebicia nawet dochodząc do siły 10 nN i być może sonda wciskając pęcherzyk nie osiągała kontaktu z podłożem. DPPC w temperaturze pokojowej występuje w fazie żelowej, podczas gdy DOPC w fazie płynnej. W zależności od typu pęcherzyka przebicie występowało dla mniejszych lub większych wartości siły. Podobne zachowanie można zauważyć w pracy Saavedra V. i in. (2020), gdzie przebicie za pomocą sondy o podobnym promieniu krzywizny (10 nm) ostrza z azotku krzemu dla warstw lipidowych zbudowanych z DOPC występowało dla wartości siły do 5 nN (ze średnią ok. 2,5 nN), a dla DPPC między 15 a 25 nN (ze średnią ok. 18 nN). W niniejszych badaniach nie używano aż tak dużej siły i dla liposomów z tego ostatniego lipidu nie zaobserwowano wyraźnego przebicia. Aby potwierdzić hipotezę, że przebicie ma miejsce dla większych wartości siły, wymagane jest przeprowadzenie ponownie spektroskopii dla liposomów DPPC dla większych wartości siły.

Na rys. 39 przedstawiono jedną spektroskopię sił dla liposomu DOPC, która wydaje się pasować do opisu oddziaływania sondy z pęcherzykiem mającym podwójną błonę lipidową. Widać na nim podwójne przebicie błony, w odległości ok. 5 nm jedno od drugiego. Jednak ten pęcherzyk wydaje się w tym miejscu bardzo niski. Prawdopodobnie

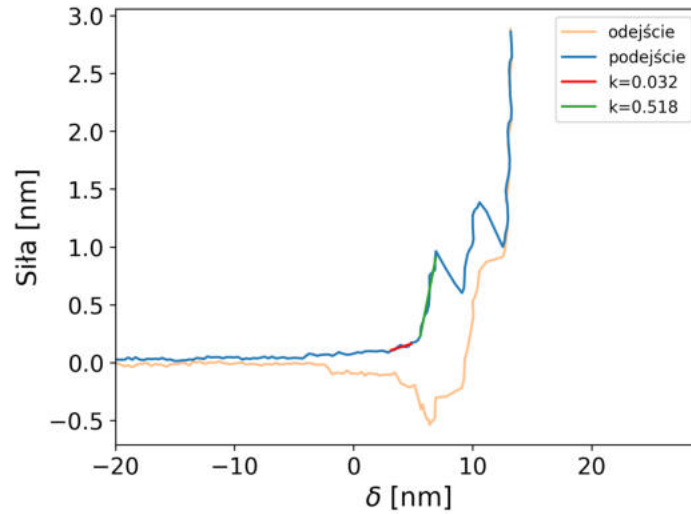


Rysunek 38: Spektroskopia liposomu z DOPC (A) i DPPC (B). Na A widać przebicie przez błonę liposomu przy ok. 2 nN. Dla DPPC nie zostało zaobserwowane wyraźne przebicie, choć być może nastąpiło ono dla ok. 4 nN. Na czerwono zaznaczono fragmenty krzywych wykorzystane do oszacowania sztywności.

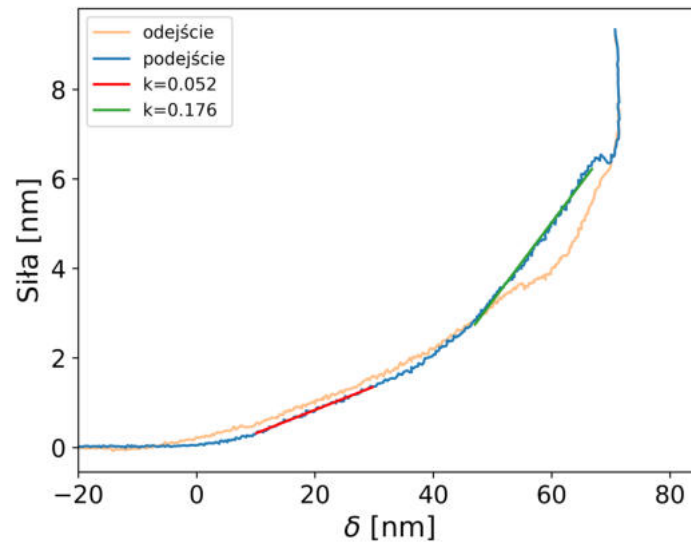
pęcherzyk nie został tu naciśnięty na środku, tylko gdzieś na brzegu. Rysunek ten został przedstawiony jako dość rzadki w moich danych przykład wyraźnego przebicia najpierw górnej, a później dolnej części błony.

Ye i in. (2021) w swojej pracy zwracają uwagę, na parę rejonów krzywej spektroskopii siły przeprowadzanej na pęcherzykach. Przedstawia, że najpierw sonda naciska na pęcherzyk, następnie tworzy się wiązanie sondy z lipidami błony, później sonda przebija błonę pęcherzyka, następnie wbija się w pierwszą, potem w drugą błonę i dociska obie warstwy do podłoża. W swoich krzywych obserwują najpierw mocniej rosnącą krzywą, a następnie wolniej. Jest to przeciwne zjawisko do zaobserwowanego w przedstawianych w niniejszej pracy spektroskopii (patrz rys. 40), gdzie po początkowym wolniejszym wzroście siły, siła na ogół zaczyna rosnąć szybciej.

Wartości sztywności wyznaczono dla pierwszego liniowego obszaru. W większości obserwowano dwa w miarę linowe obszary (patrz rys. 40). Niestety mimo wykonania wielu spektroskopii, niewiele nadawało się do dalszej analizy. Często problemem były występujące szumy, brak widocznego przebicia błony pęcherzyka, brak wyraźnego liniowego obszaru do którego można dopasować sztywność lub nietrafienie w region z pęcherzykiem. Żeby móc powiedzieć o typowej sztywności lub analizować dokładniej różnorodność wyników, potrzeba więcej krzywych. Uzyskanie ich jest jednak bardzo czasochłonne, a w niniejszej pracy skupiono się bardziej na metodologii i modelowaniu w kontekście sztywności i wyznaczania modułu zginania. Niezbędne jest uzyskanie większej liczby danych spektroskopii pęcherzyków, aby móc dobrze przetestować prezen-



Rysunek 39: Podwójne przebicie błony lipidowej liposomu DOPC przy ok. 1 nN.



Rysunek 40: Spektroskopia sił pęcherzyka liofilizowanego z danych „B” uzyskana z nanoindentacji. Linia niebieską zaznaczona krzywa podejścia (kiedy sonda zbliża się do pęcherzyka), natomiast linią pomarańczową narysowana jest krzywa odejścia (kiedy sonda oddala się od pęcherzyka). Czerwoną i zieloną linią zaznaczono pierwsze i drugie liniowe dopasowanie. Dla pierwszej czerwonej linii uzyskano sztywność równą $0,052 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, natomiast dla fragmentu zaznaczonego zieloną linią $0,176 \frac{\text{N}}{\text{m}}$.

Tabela 8: Wartości sztywności oraz parametrów geometrycznych pęcherzyków liofilizowanych dla danych „A” i „B”. d^{geom} to średnica pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (wyliczenie patrz rozdział 8), H_{spektro} to wartość wysokości ze spektroskopii sił atomowych, H_{obr} to wysokość wyliczona z obrazów topograficznych na mikroskopii sił atomowych.

	sztywność k [N/m]	d^{geom} [nm]	H_{spektro} [nm] ze spektroskopii	H_{obr} [nm] z obrazowania
Pęcherzyk 1. z danych „A”	0.059	50,6	38,5	16,9
Pęcherzyk 2. z danych „A”	0.052	120,2	70,7	25,9
Pęcherzyk 3. z danych „B”	0.032	46,3	30,3	16,1
Pęcherzyk 4. z danych „B”	0.031	122,7	33,9	11,6

towany w niniejszej pracy model. Przykładowe wyniki przedstawiono w tabeli 8. Przedstawiono tam dwa większe i dwa mniejsze liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek nowotworowych PC3. Wartości sztywności wynosiły między $0,031 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ a $0,059 \frac{\text{N}}{\text{m}}$. W literaturze dla tego typu pęcherzyków nie znaleziono wyznaczonej sztywności, natomiast porównując do wartości innych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w pracy Ridolfi i in. (2020), czy w przeglądowej pracy LeClaire, Gimzewski i Sharma (2021) są podobne co do rzędu wielkości (przytaczane wartości średnie znajdowały się między $0,011 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ a $0,049 \frac{\text{N}}{\text{m}}$).

Zaobserwowano, że wartości wysokości pęcherzyków uzyskane ze spektroskopii są wyższe niż te uzyskane z obrazów topograficznych powierzchni (patrz tabela 8). Bardzo podobne spostrzeżenie przekazują Ye i in. (2021) twierdząc, że badane przez nich wysokości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uzyskane ze spektroskopii były o 19 ± 6 nm wyższe niż te z obrazów topograficznych. Jest to tym bardziej niepokojące, ponieważ mówimy o bardzo małych pęcherzykach jakimi są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Efekt ten może bowiem wpłynąć znacząco na wyliczenie średnicy geometrycznej pęcherzyka. Ma to wpływ szczególnie do problemu opisanego w rozdziale 12.5, gdyż zakładając to, że wysokość pęcherzyka jest zaniżona, można ustawić niższy próg wysokości, który spowodowałby mniejsze odcięcie na wykresach (porównaj rys. 31 z progiem wysokości z rys. 30 bez progu wysokości). Rodzi to również pytanie, czy wartości wysokości wyznaczone ze spektroskopii można używać w zastosowanym modelu? Oraz z czego wynika taka różnica, która zarówno w przedstawionych wynikach jak i u Ye i in. (2021) jest dość

duża? Ponieważ model był dopasowywany do danych pochodzących z szybkiego obrazowania, zdecydowano się na użycie wysokości obliczonej na podstawie obrazu. Rodzi to niestety dodatkowy problem, gdyż nie ma wtedy 100% pewności, że trafiony został pęcherzyk, który się wybrało (znajdujący się w wybranym kwadracie).

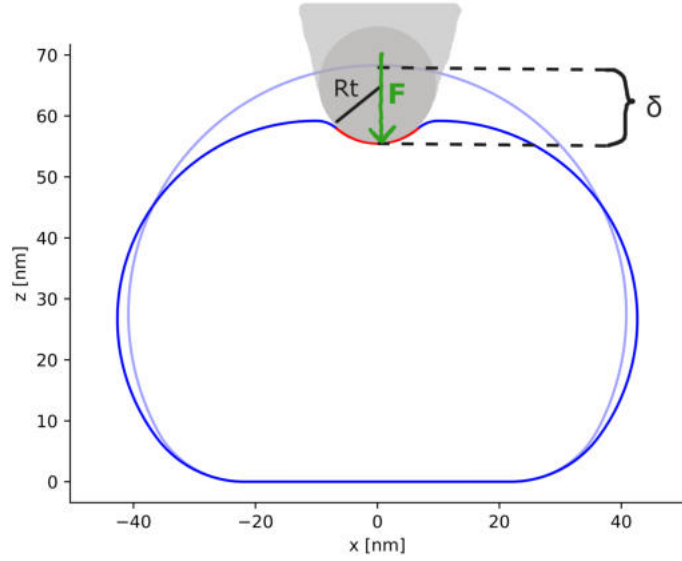
15 Model pęcherzyka wciśniętego

15.1 Tworzenie pęcherzyka i naciskanie

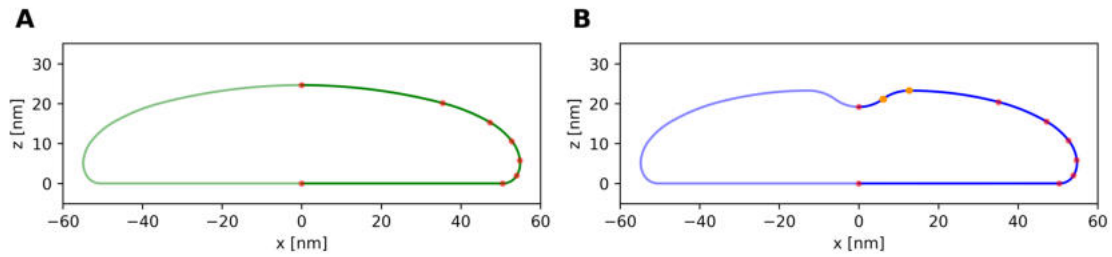
Przy tworzeniu modelu wciśniętego pęcherzyka założono, że końcówka sondy, która na niego naciska, jest kształtu kuli o promieniu równym R_t . Ponieważ w badaniach eksperymentalnych końcówka sondy miała nominalny promień krzywizny równy 10 nm (choć prawdopodobnie inny kształt) w przedstawionych wynikach modelu również użyto tej wartości. Założono, że wciśnięcie sondy powoduje powstanie na górze w środku w pęcherzyku dołka o kształcie i promieniu krzywizny sondy (patrz czerwony obszar na rys. 41). Aby to uzyskać dodano dodatkowe dwa wycinki okręgów (więc i dwa dodatkowe węzły, zaznaczone kolorem pomarańczowym na rys. 42B). Porównanie pęcherzyka „stacjonarnego” przyczepionego do podłoża do tego samego pęcherzyka, ale wciśniętego, przedstawiono na rys. 42. Podobnie jak było to dla modelowania stacjonarnego kształtu pęcherzyka przyczepionego do podłoża, model wciśniętego pęcherzyka jest tworzony tak, aby minimalizował energię swobodną ze wzoru 7 i aby jego pole powierzchni było równe polu powierzchni swobodnie pływającego kulistego pęcherzyka o zadanej średnicy d^{geom} (patrz rozdział 12.2). W praktyce optymalizacja pozostałych węzłów poza drugim licząc od środka dodanym węzłem była potrzebna tylko niewielka gdyż modyfikowano pęcherzyk już optymalny. Dobór położenia pierwszego od środka dodanego węzła wynikał jednoznacznie z głębokości wciśnięcia sondy i promienia krzywizny R_t .

15.2 Modelowanie spektroskopii sił

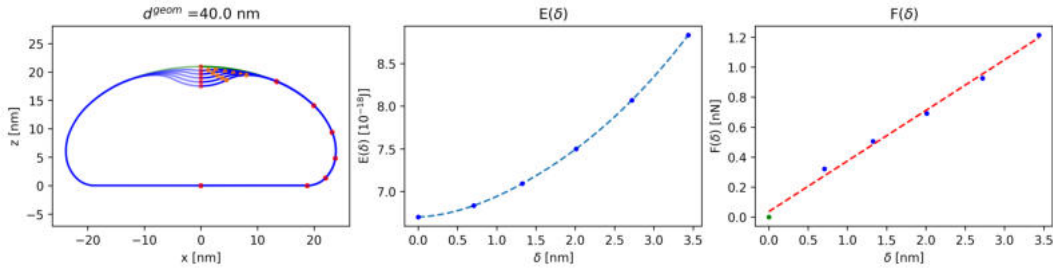
Zamodelowano jak zmienia się energia swobodna po coraz mocniejszym wciśnięciu pęcherzyka. Następnie dokonano interpolacji krzywej $E(\delta)$ między punktami, dla których obliczono wartości energii, za pomocą fragmentów funkcji kwadratowych sklejonych w danych punktach z warunkiem gładkiej pierwszej pochodnej. Użyto do tego funkcji CubicSpline z pakietu `scipy.interpolate` w języku Python. W ten sposób znaleziono przybliżoną wartość pochodnej w każdym z tych punktów, która jest równa wartości



Rysunek 41: Modelowanie wciśnięcia pęcherzyka przyczepionego do podłoża. Czerwonym kolorem zaznaczono miejsce styku sondy o promieniu R_t . Przedstawiono wciśnięcie sondy na odległość δ . Szarym kolorem przedstawiono sondę. Siła F ma ilustrować, że pęcherzyk był wciskany przez sondę.



Rysunek 42: A) Pęcherzyk przyczepiony do podłoża. Czerwonymi kropkami zaznaczono węzły pomiędzy kolejnymi odcinkami okręgów. B) Wciśnięty sondą o promieniu krzywizny 10 nm pęcherzyk przyczepiony do podłoża. Na pomarańczowo zaznaczono dodatkowe węzły, które nie występowały w A.



Rysunek 43: Modelowanie wciskania dla pęcherzyka o średnicy 40 nm. A) Przykładowy pęcherzyk o średnicy 40 nm. B) Zależność energii od wgłębienia sondy δ . C) Zależność siły od δ . Wybrane wartości parametrów modelu κ , Π_0 i γ , a co za tym idzie wartości siły i energii w tym wypadku nie oddają jeszcze wartości, które mogły panować podczas przeprowadzonego eksperymentu.

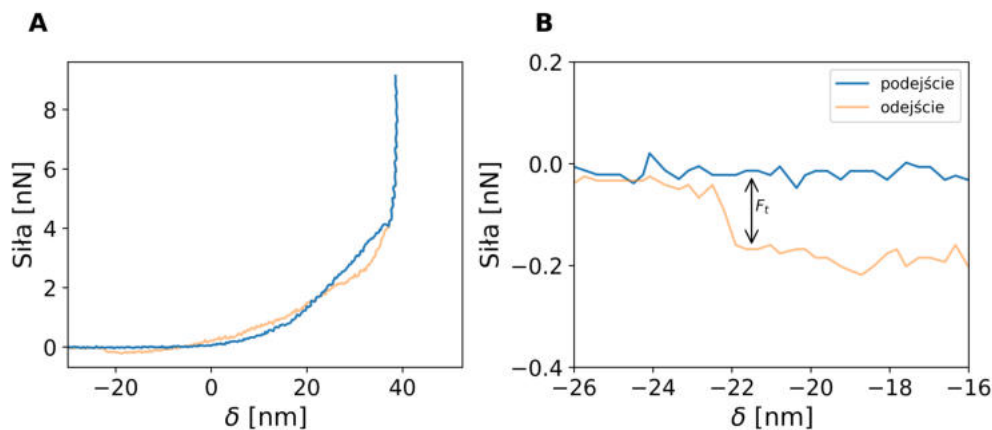
siły $F(\delta)$. Przykładowy wynik działania modelu wciskającego pęcherzyk można zobaczyć na rys. 43. Jak widać, model prezentuje w przybliżeniu liniową zależność siły od wciśnięcia (rys. 43C). Jak się wydaje, nie całkiem liniowe ułożenie punktów na prostej może być wynikiem niedoskonałego algorytmu optymalizacji. Na wykresie wartości siły są nierealnie duże, co wynika z dobranych parametrów modelu κ , Π_0 i γ , które jak opisano w rozdziale 12.3, jeśli pomnożone zostaną przez tę samą wartość, nie zmieniają kształtu pęcherzyka, ale wymnożą energię (co za tym idzie również siłę) przez tę wartość. Omówienie znajdowania fizycznych wartości na podstawie porównania modelu i wyników eksperymentu przedstawiono w następnym rozdziale.

16 Wyznaczenie modułu zginania

Jak przedstawiono we wzorze 7 moduł zginania (κ) jest współczynnikiem proporcjonalności we wzorze na energię potencjalną krzywizny elementu powierzchni dA . Opisuje on, jak trudno zgiąć błonę pęcherzyka. Im mniejsza wartość modułu zginania, tym pęcherzyk ma większą tendencję do zginania swojej błony i rozplaszczania się na podłożu w wyniku przyciągania. W odróżnieniu od sztywności (k) nie zależy on od wielkości pęcherzyka, ale mają na niego wpływ własności błony pęcherzyka. Jest więc wartością, która może charakteryzować dany typ nanopęcherzyków lipidowych.

16.1 Wyznaczanie modułu zginania we współczesnych badaniach

Obecnie dominującą metodą wyznaczania modułu zginania pęcherzyków jest procedura opisana w artykule Vorselen i in. (2020). Jest to metoda bardzo czasochłonna. Bazuje ona na analizie spektroskopii sił pęcherzyków. Podejście to korzysta z siły wiązania F_t (ang. tether force) sondy do błony pęcherzyka. Jest to siła, którą można zaobserwować przy odchodzeniu sondy, często wówczas tworzy się łańcuch lipidowy łączący błonę lipidową z końcówką sondy znajdującą się już ponad pęcherzykiem. Można tę siłę zaobserwować na krzywej odejścia przez to, że siła po oddaleniu od pęcherzyka nie schodzi od razu do zera, dopiero w pewnej odległości widać gwałtowny powrót do zerowej siły (patrz F_t na rys. 44B, który przedstawia uzyskaną spektroskopię pęcherzyka liofilizowanego z komórek PC3). Autorzy Vorselen i in. (2020) stwierdzają, że siła wiązania według jest równa $F_t = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa}$, gdzie σ to naprężenie błony, a κ to moduł zginania. Natomiast z równania Younga-LaPlace’a $\Delta\Pi = 2\sigma R_c^{-1}$, gdzie $\Delta\Pi$ to różnica ciśnień osmotycznych na zewnątrz i wewnątrz pęcherzyka, R_c to promień krzywizny pęcherzyka przyczepionego do podłoża. Łącząc te dwa wzory ze sobą Vorselen i in. (2020) otrzymują $\Delta\Pi = F_t^2(4\pi R_c\kappa)^{-1}$. Podejście to polega na znalezieniu takich wartości κ , aby punkty na wykresie znormalizowanego modułu zginania i ciśnienia znalazły się jak najbliżej krzywej teoretycznej wyznaczonej przez model numeryczny opisany w Vorselen i in. (2017). Jest to model numeryczny opisujący wzajemną zależność sztywności, ciśnienia osmotycznego i modułu zginania. Energię wciśniętego pęcherzyka wylicza za pomocą opracowanego modelu komputerowego, w którym opisuje końcówkę sondy jako kształtu paraboloidy (w mojej pracy stosowana jest kula) i nie uwzględnia przyciągania podłoża. Podejście to wymaga dość dużej próby pęcherzyków z wyznaczonymi ich promieniami krzywizny R_c i znalezionymi wartościami F_t . Nie zawsze jednak widać tak wyraźne F_t jak przedstawione na rys. 44B. Czasami pojawia się nie jeden „schodek”, a więcej. Ridolfi i in. (2020) również zwrócił uwagę na to, że nie zawsze wyznaczenie F_t było łatwe oraz że podejście przedstawione w pracy Vorselen i in. (2020) jest podejściem bardzo czasochłonnym. W niniejszej pracy nie sprawdzono tego podejścia ze względu na zbyt małą liczbę krzywych spektroskopii, które były charakterystyczne dla pęcherzyków, i nie uzyskano by dobrej statystyki, która w wypadku opisanej wyżej metody jest całkowicie niezbędna do wykonania jakichkolwiek obliczeń. Ciekawe byłoby w przyszłości porównanie obu metod wyznaczania κ .



Rysunek 44: Przykładowa krzywa spektroskopii sił podejścia i odejścia dla pęcherzyka liofilizowanego komórek PC3. A i B prezentują tę samą krzywą. Na niebiesko zaznaczono krzywą podejścia, na pomarańczowo krzywą odejścia. Na B zaznaczono siłę wiązania F_t .

16.2 Wyznaczenie modułu zginania korzystając z modelu

W naszym wypadku mamy do dyspozycji dużą statystykę kształtów pęcherzyków uzyskaną na podstawie obrazowania, natomiast dysponujemy mocno ograniczoną liczbą prawidłowych spektroskopii. Poniżej zostanie przedstawiona procedura, która może pozwolić na oszacowanie modułu zginania nawet na podstawie tylko jednej spektroskopii, przy posiadaniu wyżej opisanych danych z obrazowania. Załóżmy, że dla danego eksperymentu z obrazów uzyskanych z AFM mamy wyznaczone parametry geometryczne pęcherzyków takie jak ich wysokość i promień krzywizny oraz wyliczona na tej podstawie średnica geometryczna. Dane te można zebrać z szybkiego skanowania sondą większego obszaru, co odbywa się dużo szybciej niż wykonywanie spektroskopii sił. Z jednego obrazu uzyskuje się w zależności od gęstości pęcherzyków na mice, kilka lub kilkanaście pęcherzyków. Natomiast ze spektroskopii w jakimś obszarze można raczej powiedzieć o jednym pęcherzyku (pod warunkiem, że się go trafi). Z takiej statystyki można za pomocą metody opisanej w rozdziale 12.5 wyznaczyć najbardziej prawdopodobne wartości κ_{mod} , γ_{mod} i $\Pi_{0\text{mod}}$ z dokładnością do stałej przez którą trzeba je przemnożyć. Ale jak znaleźć tę stałą? Można w tym celu skorzystać z pojedynczej spektroskopii pęcherzyka na której wyznaczona zostanie sztywność k_{eksp} poprzez dopasowanie liniowego obszaru do krzywej spektroskopii. Następnie dla modelu z wyznaczonymi wcześniej parametrami κ_{mod} , γ_{mod} i $\Pi_{0\text{mod}}$ zostanie wyznaczony pęcherzyk modelowy, który ma średnicę geometryczną taką, jak ten z eksperymentu. Poprzez symulację wciskania przy para-

metrach modelu κ_{mod} , γ_{mod} i $\Pi_{0\text{mod}}$ wyznaczona zostanie jego sztywność k_{mod} . Wartość k_{eksp} jest porównywana do k_{mod} i wyznaczana jest stała, przez którą trzeba by pomnożyć κ_{mod} , aby sztywność modelowanego pęcherzyka była równa sztywności zmierzonej w eksperymencie.

Procedura wyznaczania modułu zginania κ mogłaby wyglądać następująco:

1. Z obrazów AFM wyznaczyć średnice geometryczne d^{geom} i wartości H/R_c dla wszystkich dobrze zobrazowanych pęcherzyków.
2. Zrobić diagram zależności $H/R_c(d^{\text{geom}})$ z danych eksperymentalnych.
3. Przy założeniu dowolnej arbitralnej wartości parametru γ_{mod} , znaleźć parę pozostałych parametrów modelu ($\kappa_{\text{mod}}, \Pi_{0\text{mod}}$) dla których zależność $H/R_c(d^{\text{geom}})$ uzyskana z modelu pasuje najlepiej do danych eksperymentalnych.
4. Ze spektroskopii sił AFM wyznaczyć stałą sprężystości k_{eksp} pęcherzyka.
5. Z symulacji spektroskopii sił w modelu wyznaczyć stałą sprężystości k_{mod} pęcherzyka w warunkach opisanych parametrami ($\kappa_{\text{mod}}, \gamma_{\text{mod}}, \Pi_{0\text{mod}}$).
6. Moduł zginania κ dla tego pęcherzyka wynosi $\kappa = \kappa_{\text{mod}} \cdot k_{\text{eksp}}/k_{\text{mod}}$.
7. ... punkty 4, 5, 6 powtórzyć dla wielu pęcherzyków.

Jakie zalety niesie to podejście względem podejścia omówionego w 16.1? Załóżmy, że w tamtym podejściu do wyznaczenia modułu zginania κ niezbędne jest posiadanie dużej liczby spektroskopii sił dla pęcherzyków, dla których wyznaczone zostanie F_t , k i R_c (Vorselen i in. (2020) wskazuje na minimalną liczbę 50). Natomiast w przedstawionym podejściu wstępne wartości κ są określane, natomiast sztywność k ze spektroskopii służy znalezieniu stałej kalibracyjnej przez którą zostanie wymnożona κ . Oczywiście im więcej pęcherzyków będzie miało zbadaną sztywność, tym dokładniej będzie można wyznaczyć stałą kalibracyjną. Dlatego robiono również spektroskopię samej miki z APTESem. Warto zwrócić uwagę, że razem z wyznaczeniem modułu zginania pęcherzyków, zostają też wyznaczone pozostałe dwa parametry — ciśnienie osmotyczne swobodnie pływającego pęcherzyka oraz współczynnik adhezji do podłoża. Metoda ta zakłada, że wszystkie badane pęcherzyki są tego samego rodzaju — mają więc podobne wartości parametrów (κ, γ, Π_0). Jeśli na podstawie geometrii można byłoby sądzić, że mamy

do czynienia z różnymi rodzajami badanych obiektów, należałoby je odseparować przed przeprowadzeniem obliczeń.

16.3 Znaleziony moduł zginania

Zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim rozdziale 16.2, wyznaczono moduł zginania dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3 przedstawionych w rozdziale 14.1. Aby uzyskać wartości początkowe parametrów modelu (które potem są przeskalowane), skorzystano z wartości przedstawionych na wykresie 32: założono $\gamma_{\text{mod}} = 10 \text{ mJ/m}^2$ i wyznaczono optymalne wartości ($\kappa_{\text{mod}} = 21,8 k_B T$, $\Pi_{0\text{mod}} = 57,7 \text{ kPa}$). Dla pęcherzyków, którym udało się zrobić spektroskopię sił, wyznaczono ich średnicę geometryczną i zakładając powyższe parametry modelu wyznaczono k_{mod} . Następnie porównano wartościami sztywności wyznaczone z modelu z tymi wyznaczonymi ze spektroskopii, aby uzyskać ostateczne wartości κ . Dla tych pęcherzyków wyliczono wartość średnią $\kappa = (22,98 \pm 7,35) k_B T$. W literaturze nie znaleziono wartości dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek nowotworowych prostaty PC3. Natomiast dla innych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wartości znajdowały się na ogół między 13 a 33 $k_B T$ (Ye i in., 2021; Sorkin i in., 2018; Stridfeldt i in., 2025; Vorselen i in., 2018) co byłoby dość zgodne z uzyskanymi wynikami, a w każdym wyszedł podobny jak tych przedstawionych w literaturze.

Można zauważyć, że znając κ i F_t można obliczyć $\Delta\Pi$ (różnicę ciśnień osmotycznych na zewnątrz i wewnątrz pęcherzyka) korzystając z opisanego w rozdziale 16.1 wzoru $\Delta\Pi = F_t^2(4\pi R_c \kappa)^{-1}$. Obliczono tę wartość dla pęcherzyka nr 1, dla którego akurat udało się zmierzyć F_t , i uzyskano $\Delta\Pi \approx 173 \text{ kPa}$. W naszym podejściu różnicę ciśnień osmotycznych można wyliczyć jako $\Delta\Pi = \Pi_0(V_0/V - 1) \approx 63 \text{ kPa}$, co jest wartością ok. 3 razy mniejszą. Warto jednak zaznaczyć, że przedstawiona w tym rozdziale metoda znajdowania κ i Π_0 , jak można zobaczyć na wykresie 32, dla prezentowanych danych wyznacza dużo dokładniej wartość κ niż Π_0 , co ma wpływ też na niedokładność wyznaczenia $\Delta\Pi$.

Uzyskane wartości κ , γ i $\Delta\Pi$ są podobnego rzędu wielkości jak rozważane w pracy (Tang i in., 2020). Jest rzeczą pewną, że nie są to wartości dokładne, zachęcające jest jednak stwierdzenie, że zastosowanie zupełnie nowego podejścia do obliczeń nie spowodowało uzyskania wyników istotnie odbiegających od tych, które zwykle są uzyskiwane innymi metodami.

Na końcu tabeli 9 zostały dodane wartości parametrów wyliczone dla pojedynczych

Tabela 9: Wyliczone z modelu wartości κ , γ , Π

	szttywność k [N/m] eksperyment	d^{geom} [nm]	κ [$k_B T$]	κ [10^{-20} J]	γ [mJ/m ²]	Π_0 [kPa]	$\Delta\Pi$ [kPa]
Pęcherzyk 1. z danych „A”	0,059	50,6	25,11	10,4	11,5	66,27	63,41
Pęcherzyk 2. z danych „A”	0,052	120,2	33,33	13,8	15,3	87,98	106,51
Pęcherzyk 3. z danych „B”	0,032	46,3	13,11	5,43	6,0	34,61	30,70
Pęcherzyk 4. z danych „B”	0,031	122,7	20,37	8,43	9,3	53,77	65,30
Liposom DOPC	0,008	83,1	5,03	2,08	1,96	11,28	13,28
Liposom DPPC	0,091	129,8	57,14	23,66	30,8	288,60	277,33

liposomów DOPC i DPPC, dla których wydawało się, że udało się uzyskać akceptowalną spektroskopię. Jednak ich dokładność jest bardzo wątpliwa, ponieważ w ogóle nie udało się uzgodnić wysokości uzyskanych na podstawie obrazowania z tymi, które wynikałyby ze spektroskopii.

17 Dyskusja

W tej części zaproponowano metodę wykorzystania porównania modelowania spektroskopii sił z eksperymentalną spektroskopią. Wyliczone wartości parametrów mechanicznych pęcherzyków można traktować tylko jako poglądowe. Trudności eksperymentalne okazały się wprowadzać bardzo duże ograniczenia do zastosowania w praktyce tej metody.

Jedną jak się wydaje bardzo istotną trudnością jest niedopasowanie wysokości pęcherzyków uzyskiwanych z obrazowania i ze spektroskopii. Fakt ten spotykany jest też w literaturze Ye i in. (2021) i wymaga z jednej strony zrozumienia skąd się to bierze, z drugiej strony znalezienia skutecznego rozwiązania. Jednym z możliwych wyjaśnień mogłoby być to, że obszar na obrazie traktowany jako podłoże, jest często pokryty lipidami nie wchodzącymi w skład pęcherzyków, ale wywołującymi pozorne obniżenie pęcherzyków. Charakterystyczne dla krzywych spektroskopii wykonanych na podłożu, przy uwzględnieniu sprzętowej kalibracji sondy, jest to że krzywa ta jest pochylona, a nie pionowa jak można by się spodziewać dla zetknięcia sondy z twardym podłożem

mikowym. Jest to jednak tylko hipoteza, która też nie jest oczywista.

Zastosowany model ma wiele ograniczeń. Pierwszym z nich jest przyjęcie a priori, że ciśnienie początkowe w swobodnie pływającym pęcherzyku jest jednakowe jak otoczenia. W wypadku liposomów może być to całkiem uzasadnione ze względu na proces ich wytwarzania (zawierają tę samą ciecz, w której pływają). Ale dla innych pęcherzyków jest to tylko przybliżenie, które w dalszej pracy nad rozwojem modelu należałoby usunąć. Oczywiście w modelu nie została uwzględniona nigdzie grubość błony, jak również jej hipotetyczna rozciągliwość. Również przedmiotem dyskusji jest przekonanie, że w trakcie indentacji pęcherzyka woda jest w stanie przeniknąć przez błonę półprzepuszczalną. Stridfeldt i in. (2025) uważa, że czas na zajście tego zjawiska powinien być traktowany jako dużo dłuższy. Niemniej model Vorselen i in. (2017) zakłada, że czas robienia pojedynczej spektroskopii jest wystarczająco długi.

Zaproponowana metoda wydaje się działać w sytuacji, gdy część pęcherzyków jest bardzo mała. Jest to również duże ograniczenie dla tej metody.

Część VI

Uwzględnienie poruszania się pęcherzyków w cieczy

18 Porównanie średnic geometrycznych i hydrodynamicznych

Omawiane w niniejszej pracy pęcherzyki są zbyt małe, aby można było zobaczyć je pod zwykłym mikroskopem optycznym — są one mniejsze niż długość fali światła widzialnego. Aby zobaczyć ich strukturę, czy chociażby rozmiar, trzeba posłużyć się innego rodzaju metodami, które de facto rekonstruują ich własności. Trzeba zdawać sobie sprawę, co dokładnie mierzą dane urządzenia, żeby można było powiedzieć, jaki jest faktyczny rozmiar danego typu pęcherzyków. Średnica bowiem jest jedna konkretna, a jednak korzystając z różnych metod uzyskiwane wartości potrafią się znacząco od siebie różnić. Jedną z klasycznych metod pomiaru rozmiaru małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest analiza śledzenia nanocząstek. Używając transmisyjnej mikroskopii

elektronowej (TEM) sądzono na początku, że egzosomy (rodzaj pęcherzyków zewnątrzkomórkowych) są wklęsłe. Okazało się jednak, że to co widziane było jako wgłębienie, spowodowane było dehydratacją przy obrazowaniu TEM (Woo, Sharma i Gimzewski, 2016).

W poprzednich rozdziałach omówiono średnice geometryczne d^{geom} pęcherzyków uzyskane z obrazów AFM poprzez przeliczenie opisane w rozdziale 8. Rozmiary na obrazie topografii powierzchni z AFM należy przełożyć na możliwą średnicę pęcherzyka swobodnie pływającego w roztworze, zanim spadł on na powierzchnię. Jest więc to pośredni sposób wnioskowania o tym jaką średnicę mają pęcherzyki w swoim naturalnym środowisku — w naturalnych warunkach przemieszczają się w cieczy. W metodzie analizy śledzenia nanocząstek nie ma takiego problemu, gdyż bada się pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, kiedy swobodnie poruszają się w cieczy. Nie trzeba więc ich unieruchamiać, czy odpowiednio przygotowywać próbki przed wykonaniem pomiaru. Jednak średnice uzyskiwane są również pośrednio przez badanie, jak zmienia się położenie nanoobiektów (jak opisano w rozdziale 3.2). Nazwijmy średnicę uzyskaną z tego sprzętu średnicą hydrodynamiczną d^{hydro} , gdyż wartości tej średnicy, jak zresztą w wielu innych badaniach nie tylko pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, różnią się od średnic d^{geom} uzyskanych z mikroskopu sił atomowych. Nie istnieją jeszcze metody mówiące, jak dokładnie przeliczyć średnicę hydrodynamiczną na geometryczną, chociaż jedną z hipotez możliwego przeliczenia sugeruję w moim artykule Życieńska i in. (2022) i przedstawię w następnych rozdziałach. NTA zwykle kalibruje się na nanokulkach polistyrenowych, których wielkość jest zatem później znajdowana zgodna z innymi metodami mikroskopowymi, jednak pęcherzyki lipidowe mają inne własności hydrodynamiczne, co powoduje, że zmierzona tą metodą średnica hydrodynamiczna może być istotnie zawyżona w stosunku do ich geometrycznego rozmiaru.

18.1 Rozkłady log-normalne

Jak można było zaobserwować na histogramach przedstawionych w rozdziale 10, wiele parametrów nanopęcherzyków, w tym ich średnice, pochodzą z rozkładów silnie skośnych. Jest to zjawisko znane w przyrodzie, tam gdzie badany parametr nie może mieć wartości ujemnej (np. wzrost lub wiek), a co za tym idzie, nie może zostać w ścisły sposób opisany rozkładem normalnym, który przypisuje niezerowe prawdopodobieństwo również ujemnym wartościom.

Do opisanego rozkładu takich biologicznych parametrów przydatne może być zdefi-

niowanie rozkładu logarytmiczno-normalnego (dalej nazywany będzie log-normalnym). Gęstość funkcji prawdopodobieństwa zmiennej losowej x dla takiego rozkładu opisywana jest wzorem:

$$f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \text{ dla } 0 < x < \infty,$$

gdzie $\ln(x)$ jest zmienną pochodzącą z rozkładu normalnego ze średnią μ i wariancją σ^2 . Rozkład log-normalny ze swojej natury jest dodatnio skośny Mateu-Figueras i Olea (2020). Często podaje się medianę danych pochodzących z rozkładu log-normalnego $\mu^* = e^\mu$ i parametr kształtu $\sigma^* = e^\sigma$, gdyż są łatwiejsze w interpretacji (Limpert, Stahel i Abbt, 2001).

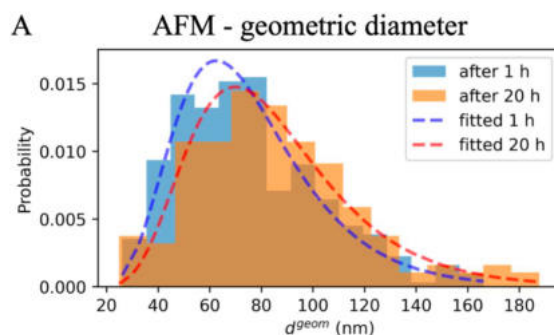
Do dopasowania rozkładu log-normalnego do danych empirycznych wykorzystano wzory podane przez Lisicki i in. (2019):

$$\mu = \frac{M_1^2}{\sqrt{M_2}}$$

$$\sigma = \sqrt{\ln\left(\frac{M_2}{M_1^2}\right)},$$

gdzie tak zwane momenty M_1 i M_2 dla średnicy i -tego pęcherzyka równej d_i i liczbie wszystkich pęcherzyków równej N są równe: $M_1 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i$, $M_2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i^2$.

W publikacjach możemy spotkać dopasowanie rozkładu Gaussa do wyliczonych średnic geometrycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Vorselen i in., 2018; Sharma i in., 2020). Często jednak znacznie lepiej do danych biologicznych, które zawierają małe i dodatnie wartości, dopasowuje się do danych rozkład log-normalny (Lisicki i in., 2019; Limpert, Stahel i Abbt, 2001). Widać bowiem, że wiele z prezentowanych w publikacjach rozkładów nie jest symetrycznych. Kurtjak i in. (2022) dopasowują rozkład log-normalny do średnic pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jednak w pracy nie są podawane parametry kształtu σ^* , tylko średnia, odchylenie standardowe i współczynnik wariancji, obliczany tak, jak według Canchola (2017) nie powinno się go liczyć dla rozkładu log-normalnego. Parametry te są wygodne do opisu symetrycznych rozkładów, zwłaszcza rozkładu Gaussa. Jednak wydaje się, że w wypadku pęcherzyków zewnątrzkomórkowych rozkład średnic zarówno d^{geom} , jak i d^{hydro} ma inny charakter. Poniżej prezentuję porównanie dopasowania rozkładu Gaussa do dopasowania rozkładu log-normalnego dla uzyskanych średnic geometrycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3. Wartości niepewności zostały ustalone na podstawie testu



Rysunek 45: Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 po jednej godzinie i po 20 godzinach (Życieńska i in., 2022).

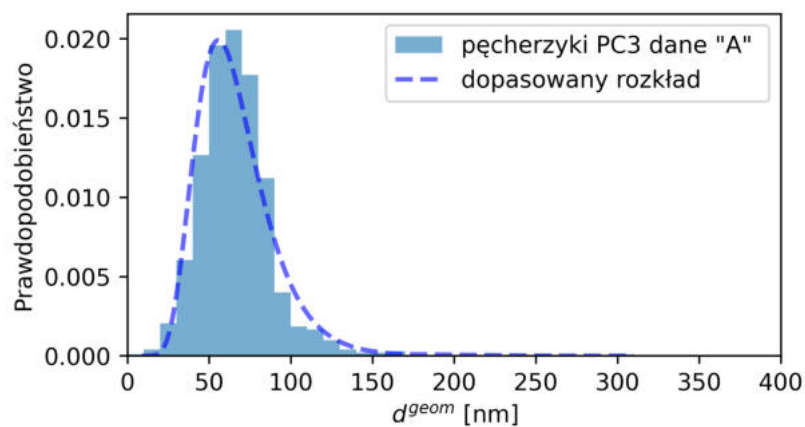
bootstrap dla 100000 powtórzeń losowania pęcherzyków dla przedziału ufności 95%. W technice bootstrap losowana była z powtórzeniami próba o tej samej liczebności co była badana.

18.2 Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic geometrycznych

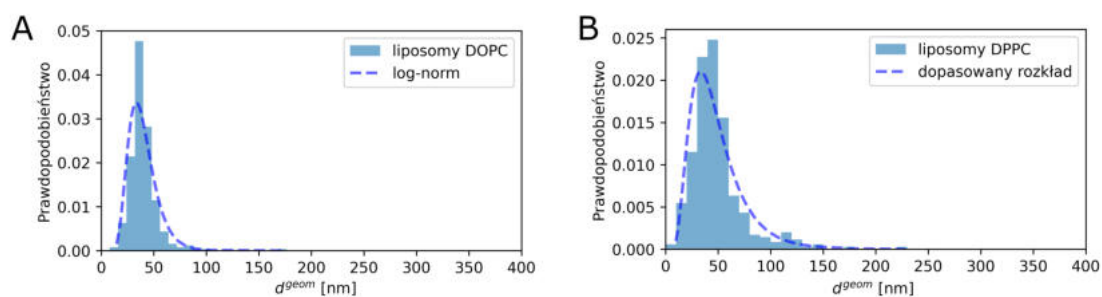
Jak widać na rys. 45 histogram średnic geometrycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ma podobny kształt do rozkładu log-normalnego. W tabeli 10 przedstawiono dopasowania rozkładu log-normalnego dla d^{geom} pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 (obrazowanych po 1 h od nałożenia na mikę oraz po 20 h od nałożenia na mikę, szerzej omawiane w rozdziale 19), odtworzonej liofilizowanej wersji tych pęcherzyków oraz liposomów DOPC i DPPC. Rozkłady średnic pęcherzyków z hodowli i liofilizowanych z danych „A” mają podobny kształt (patrz wartości σ^* w tabeli 10), jednak te liofilizowane są trochę mniejsze od tych z hodowli. Co ciekawe, liposomy również mają kształt rozkładu podobny, ale wartości mediany wyraźnie mniejsze. Dopasowania dla EVs liofilizowanych przedstawiono na rys. 46, zaś dla liposomów na rys. 47.

18.3 Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych

W tabeli 11 przedstawiono parametry dopasowania rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych uzyskanych z analizy śledzenia nanocząstek. Kształt rozkładów jest



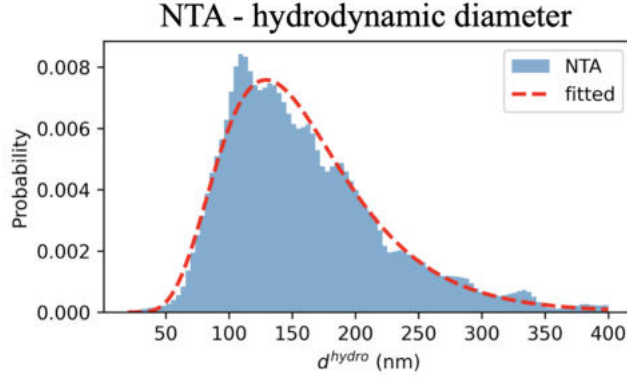
Rysunek 46: Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych pęcherzyków liofilizowanych ze zbioru „A”.



Rysunek 47: Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych liposomów DOPC (A) i liposomów DPPC (B).

Tabela 10: Wyniki dopasowania rozkładu log-normalnego dla średnic geometrycznych. Granice ustalono na podstawie przedziału ufności 95% ustalonego za pomocą testu bootstrap. Badania NTA i AFM dla liposomów DPPC zostały wykonane na próbkach zrobionych innego dnia, dlatego zostały przedstawione w tabeli kursywą.

	μ_{AFM}^* [nm]	σ_{AFM}^* [nm]
pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 (obrazowane po 1 h od nałożenia na mikę)	71,1 [−2,8; +3,0]	1,431 [−0,035; +0,033]
pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 (obrazowane po 20 h od nałożenia na mikę)	79,8 [−4,5; +4,7]	1,436 [−0,054 ; +0,050]
liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 dane “A”	62,4 [−1,3;+1,3]	1,405 [−0,050; +0,058]
liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 dane “B”	31,0 [−2,4;+ 2,9]	1,837 [−0,222; + 0,162]
liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 dane “C”	22,96 [−1,03; + 1,08]	1,521 [−0,061; + 0,069]
liposomy DOPC	37,4 [−1,1; +1,2]	1,399 [−0,103;+0,122]
liposomy DPPC	<i>42,98 [−2,07; + 2,24]</i>	<i>1,650 [−0,101;+0,101]</i>



Rysunek 48: Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych uzyskanych z NTA dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek PC3 (Życieńska i in., 2022).

podobny dla wszystkich prócz dla liposomów DPPC, dla których współczynnik kształtu jest nieco mniejszy. Tak samo jak dla d^{geom} , dla d^{hydro} mediana μ^* wyszła ciut większa dla liofilizowanych pęcherzyków w porównaniu z tymi z hodowli komórkowej, a dla liposomów mediana wyszła wyraźnie mniejsza. Rys. 48 przedstawia dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek PC3.

18.4 Porównanie średnic geometrycznych i hydrodynamicznych

Cieńko porównać wartości dopasowania rozkładu do danych w literaturze, gdyż niewielu autorów dopasowuje rozkłady log-normalne do danych z AFM. Przykładem, który dopasowuje jest Kurtjak i in. (2022). Mimo tego, że tym artykule nie została podana wartość σ^* dla dopasowania AFM na podstawie wykresów odtworzyłam dopasowanie log-normalne. Co ciekawe σ_{NTA}^* oszacowana na podstawie wykresu w tym artykule wychodzi bardzo podobna (1.454) jak dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z PC3, mimo że w Kurtjak i in. (2022) badane są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z płynu mózgowo rdzeniowego, a tutaj przedstawione są z nowotworu prostaty PC3. Wartości σ_{NTA}^* i σ_{AFM}^* odtworzone z tego artykułu nie wychodzą takie same, ale ciężko wnioskować o średnicach AFM, gdyż Kurtjak i in. (2022) podaje średnice Maximum Martin, a nie wyliczone średnice geometryczne, co nie ma takiego fizycznego sensu jak d^{geom} .

Jak można zauważyć, średnice geometryczne różnią się od średnic hydrodynamicznych. W przypadku pęcherzyków zewnątrzkomórkowych μ_{NTA}^* od μ_{AFM}^* różni się ponad

Tabela 11: Wyniki dopasowania rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych uzyskanych z NTA. Granice ustalono na podstawie przedziału ufności 95% ustalonego za pomocą testu bootstrap. Badania NTA i AFM dla liposomów DPPC zostały wykonane na próbkach zrobionych innego dnia, dlatego zostały przedstawione w tabeli kursywą.

	μ_{NTA}^* [nm]	σ_{NTA}^* [nm]
pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3	149,2 [−2,3; +2,3]	1,461 [−0,014; +0,014]
liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 z danych „A”	143,1 [−1,9; +1,9]	1,410 [−0,016; +0,015]
liposomy DOPC	134,2 [−1,7; +1,7]	1,412 [−0,018; +0,018]
liposomy DPPC	<i>116,7 [−1,2; +1,3]</i>	<i>1,339 [−0,016; +0,017]</i>

2-krotnie, a dla liposomów ponad 3-krotnie. Podobną zależność widać np. w pracy Skliar i in. (2018), który postuluje, że w przypadku pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wynika to również z obecności szeregu białek, które wpływają na wolniejsze ich poruszanie się w cieczy. Nie wyjaśnia to jednak różnicy w średnicach geometrycznych i hydrodynamicznych dla liposomów, które takich białek nie zawierają. Prawdopodobnie odbicie cząsteczek cieczy od ścianek pęcherzyków nie jest całkowicie sprężyste (Shringi i Sharma, 2017) oraz pęcherzyki mogą być przyciągane przez cząsteczki wody, co spowalnia ich ruchy (Skliar i Chernyshev, 2019). Shringi i Sharma (2017) podaje, że ruchy Browna mogą zależeć od sztywności. Można postulować, że DOPC są najmniejsze z przedstawionych pęcherzyków (według Ridolfi i in. (2020)), chociaż nie znaleziono w literaturze sztywności pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3, ale można założyć, że wartość ich jest mniej więcej porównywalna z innymi tego typu pęcherzykami czyli byłoby im bliżej sztywnością do liposomów DPPC niż do DOPC. W naszym wypadku dla liposomów DPPC niestety nie można porównywać parametrów μ^* rozkładów uzyskanych na podstawie AFM i NTA, gdyż parametr kształtu σ^* nie wyszedł dla nich taki sam w przedziale ufności 95%. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że badania NTA i AFM dla liposomów DPPC zostały wykonane na próbkach zrobionych innego dnia (dlatego zostały przedstawione w tabelach kursywą). Dla danych przedstawionych w tabeli 11 dla średnic hydrodynamicznych i w tabeli 10 dla średnic geometrycznych, tylko liposomy DPPC w przedziale ufności 95% (uzyskanego z testu bootstrap dla 100000 powtórzeń losowania pęcherzyków) nie wykazały takiego samego

Tabela 12: Wartości współczynnika skalowania $\mu_{\text{NTA}}^*/\mu_{\text{AFM}}^*$ dla badanych pęcherzyków.

	$\mu_{\text{NTA}}^*/\mu_{\text{AFM}}^*$
pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 (obrazowane po 1 h od nałożenia na mikę)	2,1 $\pm$ 0,1
pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 (obrazowane po 20 h od nałożenia na mikę)	1,9 $\pm$ 0,1
liofilizowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 z danych „A”	2,3 $\pm$ 0,1
liposomy DOPC	3,6 $\pm$ 0,2
liposomy DPPC	(2,7 $\pm$ 0,2)

kształtu σ_{NTA}^* i σ_{AFM}^* . Wielkość pęcherzyków na podstawie NTA układa się w tej samej kolejności co ze średnic geometrycznych (prócz liposomów DPPC), jednak różnice te procentowo z d^{hydro} są mniejsze niż d^{geom} .

Parametr σ^* dla rozkładów log-normalnych dopasowanych do średnic geometrycznych i hydrodynamicznych wyszły równe w przedziale ufności 95%. Wskazuje to, że jeden z rozkładów mógł powstać z drugiego poprzez skalowanie liniowe, a konkretnie mnożąc średnice geometryczne pęcherzyków przez stosunek median z NTA do AFM $\frac{\mu_{\text{NTA}}^*}{\mu_{\text{AFM}}^*}$. Nazwijmy ten stosunek współczynnikiem skalowania. Wartości $\frac{\mu_{\text{NTA}}^*}{\mu_{\text{AFM}}^*}$ przedstawiono w tabeli 12. Porównując wartości współczynnika skalowania można zobaczyć, że dla pęcherzyków liofilizowanych i pęcherzyków z hodowli (porównuję tutaj te obrazowane po 1 h, gdyż były obrazowane w podobnym czasie od nałożenia na mikę co te liofilizowane) wartości te mieszczą się w granicach niepewności. Natomiast dla liposomów DOPC współczynnik ten wychodzi większy, co mogłoby być zgodne z hipotezą Shringi i Sharma (2017), że sztywność wpływa na poruszanie się pęcherzyków w cieczy. Przytoczone dane mogłyby wskazywać, że im mniejsze pęcherzyki, tym współczynnik ten byłby większy. Z przedstawionych danych wydaje się, że współczynnik skalowania $\frac{\mu_{\text{NTA}}^*}{\mu_{\text{AFM}}^*}$ można traktować jako interesujący parametr fizyczny charakteryzujący różne typy pęcherzyków. Konieczne byłyby dalsze badania, aby sprawdzić, czy to odkrycie ma charakter ogólny, czy też odnosi się tylko do tych populacji pęcherzyków.

19 Zmiany średniego rozmiaru w czasie

Przy okazji badań średnic geometrycznych różnego rodzaju pęcherzyków za pomocą AFM przez nasz zespół, zauważyliśmy powtarzającą się tendencję do zwiększania się w czasie ich średniej wielkości. W niniejszym rozdziale przedstawiona zostanie próba systematycznego zbadania tego zjawiska wraz z propozycją rozważenia, w jakim stopniu dałoby się je wyjaśnić w oparciu o teorię ruchów Browna. Podsumowana tutaj koncepcja przedstawiona została w artykule Życieńska i in. (2022).

19.1 Porównanie histogramów średnic w zależności od czasu od nałożenia próbki

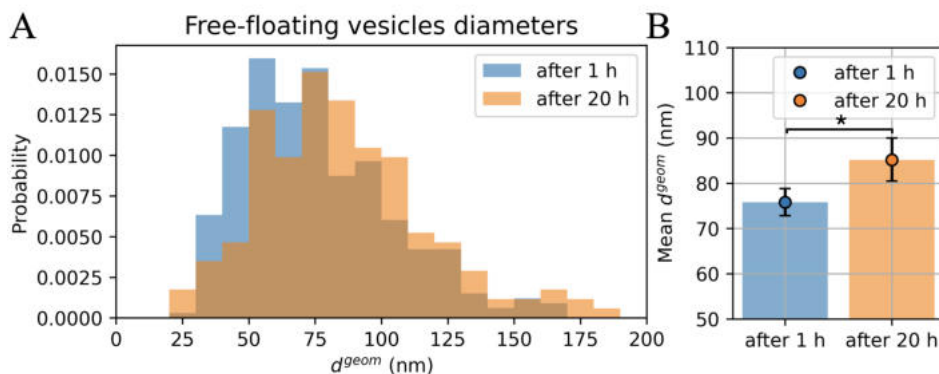
Obrazowano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z komórek PC3 na mikroskopie sił atomowych po około 1 godzinie od nałożenia próbki oraz po około 20 godzinach. Ponieważ samo obrazowanie za każdym razem trwało parędziesiąt minut, trudno jest mówić o dokładnym czasie badania. Aby wykonać drugie obrazowanie, zobrazowaną raz próbkę zostawiono na noc w formie tej samej kropli na micy w temperaturze pokojowej, w warunkach dużej wilgotności pod przykryciem, aby zapobiec ewentualnemu wyschnięciu lub zanieczyszczeniu kropli.

Jak można zobaczyć na wykresie 49A histogram średnic geometrycznych z czasem przesuwa się ku większym wartościom średnic geometrycznych. Można to również zaobserwować w średnich wartościach d^{geom} (wykres 49B). Niepewność wyznaczenia wartości średniej oszacowano metodą bootstrap dla przedziału ufności 95%. Średnia wartość d^{geom} po godzinie od nałożenia próbki wyniosła $75,8 [-3,0; +3,1]$ nm, a po 20 godzinach od nałożenia próbki $85,2 [-4,7; +4,8]$ nm.

Postawiono dwie możliwe hipotezy przemieszczania się histogramów średnic w czasie: 1) mniejsze pęcherzyki docierają do podłoża i przyczepiają się do niego szybciej niż większe pęcherzyki, gdyż zgodnie z teorią ruchów Browna poruszają się szybciej, 2) błona pęcherzyka przyczepionego do podłoża ulega niewielkiemu rozciągnięciu w czasie. Aby to sprawdzić postanowiono przeprowadzić symulację ruchów Browna i zasymulować również lekkie rozciągnięcie błony.

19.2 Symulacja ruchów Browna

Cząstki zawieszone w cieczy podlegają chaotycznym ruchom zwanymi ruchami Browna. Przeprowadzona została symulacja osadzania się pęcherzyków na micy w czasie po do-

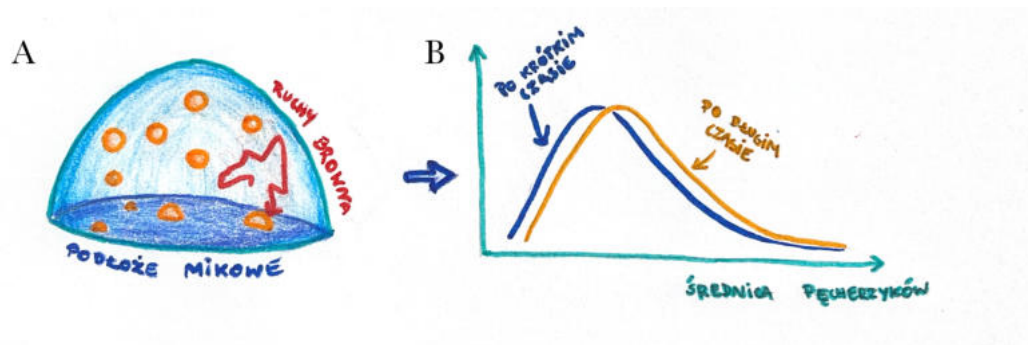


Rysunek 49: A) Histogram średnic geometrycznych (d^{geom}) pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 uzyskane na podstawie obrazów AFM po 1 godzinie (na niebiesko) i po 20 godzinach (zaznaczono na pomarańczowo) od nałożenia na podłoże miki pokrytej APTESem; B) Średnie wartości d^{geom} (zaznaczone kropkami na analogicznie na niebiesko i pomarańczowo) wraz z przedziałem ufności 95% uzyskanym metodą bootstrap; * oznacza, że w przedziale ufności 95% dwa wyniki nie pokrywają się (Życieńska i in., 2022).

tarcia do podłoża ruchami Browna. Następnie sprawdzano histogram średnic modelowanych pęcherzyków po 1 h i po 20 h od nałożenia na mikę, aby sprawdzić hipotezę przemieszczania się histogramu ku większym wartościom średnic pod wpływem samych ruchów Browna. Schematycznie przedstawione na rysunku 50.

19.2.1 Metodologia

Aby zasymulować ruchy Browna pęcherzyków w kropli, nie jest wystarczająca znajomość ich średnic geometrycznych, gdyż jak było to pokazane w rozdziale 18, nie potrafimy tylko na ich podstawie przewidzieć ich stałej dyfuzji. Za to analiza śledzenia nanocząstek dostarcza nam średnice hydrodynamiczne pojedynczych pęcherzyków. Średnica hydrodynamiczna w tym wypadku określała jej stałą dyfuzji i pozwalała zasymulować chwilową prędkość przemieszczania się nanocząstki w cieczy. Jak przedstawiono w rozdziale 18.4 średnice hydrodynamiczne wychodzą większe niż średnice geometryczne. Mimo, że nie ma ogólnej metody przeliczenia tym średnic (choć pewna metoda została zapostulowana w rozdziale 18.4), można założyć, że im większe d^{hydro} , tym większe d^{geom} (co byłoby zgodne z wynikami z części 18), więc jakościowo symulacja z użyciem d^{hydro} odzwierciedla również d^{geom} . Symulację ruchów przeprowadzono zgodnie ze wzorem 1 z rozdziału 3.2. Metodą Monte Carlo symulowano losowe przemieszczanie się pęcherzyków w jednym wymiarze wzdłuż osi z , zgodnie ze wzorem określającym wa-



Rysunek 50: A) Schematyczne przedstawienie osadzania się pęcherzyków w kropli na mice pod wpływem ruchów Browna. Na czerwono zaznaczono hipotetyczną drogę nanoobiektu od początkowej pozycji do przyczepienia do podłoża B) Hipoteza o przesuwaniu się histogramu w czasie ku większym wartościom średnic pod wpływem ruchów Browna.

riancję położenia $\langle z^2 \rangle = 2Dt$, gdzie D to stała dyfuzji (ze wzoru 1), a t to czas. Warto zwrócić uwagę, że kiedy mówimy o czasie w NTA, jako czas w podobnym wzorze traktujemy odstęp czasowy między klatkami filmu, natomiast tutaj interesuje nas całkowity czas, jaki upłynął od początku symulacji. Niemniej wzór byłby równie prawdziwy, gdyby jako z rozumieć przemieszczenie w pojedynczym kroku czasowym symulacji, zaś jako t czas trwania tego kroku. Fakt ten jest wykorzystywany w teorii działania analizy śledzenia nanocząstek.

Na początku symulacji losowano położenia $2 \cdot 10^6$ pęcherzyków z rozkładu jednorodnego w położeniach $(0, z_{\max})$, gdzie $z_{\max}$ to wysokość kropli pęcherzyka. d_k^{dybro} pęcherzyka (o numerze k) została wylosowana z rozkładu prawdopodobieństwa średnic pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 uzyskanego z NTA. Rozkład ten uzyskany został z uśrednienia trzech rozkładów tego samego typu pęcherzyków. Założono, że jeśli pęcherzyk dotknie podłoża (osiągnie $z_k = 0$), to przyczepi się do niego. Taki przyczepiony pęcherzyk nie bierze udziału w dalszej symulacji ruchów Browna. Z drugiej strony, jeśli pęcherzyk osiągnie maksymalną wartość wysokości kropli $z_k = z_{\max}$, jest traktowany jakby się odbijał od niej. W każdym kroku czasowym symulacji pozycje pęcherzyków zmieniały się poprzez dodawanie do nich losowych wartości z rozkładu Gaussa o odchyleniu standardowym $\sigma_k = \sqrt{2D_k \Delta t}$, gdzie D_k była obliczana zgodnie ze wzorem 1 z rozdziału 3.2, a Δt to krok czasowy, którego użyto do symulacji, w tym wypadku przyjęto $\Delta t = 10$ s. Kropla z pęcherzykami na mice była traktowana jako walec o wysokości $h_{\text{drop}} = 1$ mm, nie symulowano jej sferycznego kształtu. Wysokość tego walca była obliczana ze średniej wysokości kropli o kształcie sferycznej czaszy o wysokości

h_{drop} i podstawie promienia równej promieniowi miki $r_{\text{drop}} = 5$ mm. Wysokość walca wyznaczono ze wzoru:

$$h_{\text{cylinder}} = \frac{1}{2}h_{\text{drop}} + \frac{1}{6}\frac{h_{\text{drop}}^3}{r_{\text{drop}}^2}$$

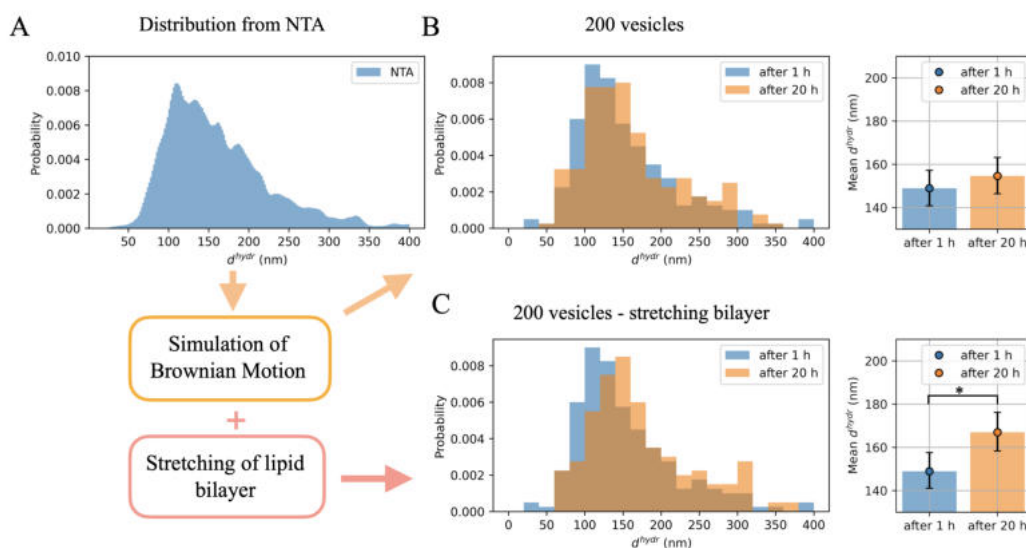
Jako lepkość cieczy, w której pływały pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, przyjęto lepkość wody (w tym wypadku w eksperymencie używana była woda dejonizowana). Sumowano ruchy Browna pęcherzyków w cieczy w czasie od 0 do 20 h od nałożenia próbki na mikę.

Wykonano również symulację dla różnych wysokości kropli (0,5 mm, 1 mm i 2 mm) oraz dla różnej liczby pęcherzyków (10^6 , $2 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^6$), co miało odzwierciedlić różne możliwe stężenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, podobnego rzędu do tych, z którymi mieliśmy do czynienia w eksperymencie.

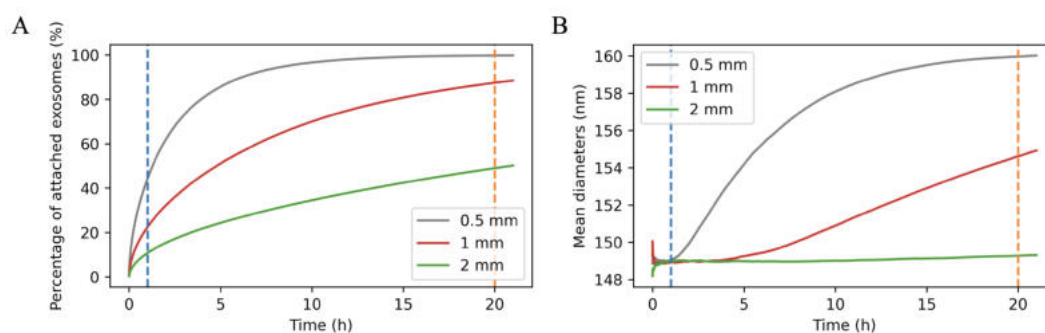
19.2.2 Wyniki symulacji

Przeprowadzono symulację, aby sprawdzić jak zmienia się histogram średnic w czasie po nałożeniu kropli na mikę. Rysunek 51A przedstawia rozkład średnic użyty do symulacji ruchów Browna. Na rys. 51B przedstawiono histogram średnic stworzony z losowo wybranych 200 pęcherzyków z tych, które po czasie 1 h (na niebiesko) i 20 h (na pomarańczowo) osadziły się na mice. Średnia średnica pęcherzyków po czasie 1 h wynosiła 75,8 [−3,0; +3,1] nm, a po 20 h 85,2 [−4,7; +4,8] nm. Niepewności te zostały wyznaczone metodą bootstrap w przedziale ufności 95%. Jakościowo wyniki te są podobne do wyników eksperymentalnych, średnie średnice po czasie 20 h wychodzą większe niż po czasie 1 h, jednak różnica ta mieści się w granicach niepewności statystycznej. Zaproponowano więc dodanie niewielkiego liniowego rozciągnięcia błony pęcherzyków. Okazało się, że przy rozciągnięciu o 8% uzyskuje się istotną statystycznie różnicę średnich średnic dla 1 h i 20 h odpowiednio 148,9 [−7,9; +8,6] nm i 167,0 [−8,7; +9,2] nm (patrz rys. 51C). Przyjmując koncepcję liniowego skalowania opisaną w rozdziale 18, można by sądzić, że stanowi to obraz odpowiadający zmierzonemu wzrostowi średniej wartości średnic geometrycznych.

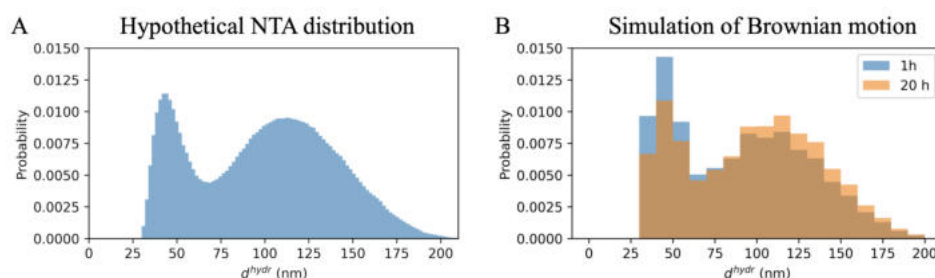
Wykonano symulację średniej średnicy pęcherzyków dla różnej wysokości kropli 0,5 mm, 1 mm oraz 2 mm. Wyniki przedstawiono na rys. 52. Procent pęcherzyków osadzonych na podłożu w każdym wypadku rósł z czasem (patrz rys. 52A), tak samo jak rosła ich średnia średnica (rys. 52B). Dla wysokości kropli równiej 1 mm (co najbardziej



Rysunek 51: Wyniki symulacji Monte Carlo ruchów Browna dla kropli o wysokości 1 mm. A) Rozkład średnic d^{hydro} użytych do symulacji. B) Histogram średnic wybranych losowo 200 pęcherzyków z tych, które osadziły się na podłożu miki po czasie 1 h (na niebiesko) oraz 20 h (na pomarańczowo). Z prawej strony przedstawiono średnie średnice z niepewnościami wyznaczonymi testem bootstrap dla przedziału ufności 95%. C) Histogram średnic wybranych losowo 200 pęcherzyków z tych, które osadziły się po czasie 1 h (na niebiesko) oraz 20 h (na pomarańczowo) z dodanym 8% liniowym rozciągnięciem błony pęcherzyka. Analogicznie jak na B) z prawej przedstawiono średnie średnice pęcherzyków. * wskazuje istotną dla przedziału 95% różnicę statystyczną (Życieńska i in., 2022).



Rysunek 52: Wyniki symulacji osadzania się na mierce pęcherzyków w kropli o wysokości odpowiednio 0,5 mm (szara krzywa), 1 mm (czerwona krzywa) oraz 2 mm (zielona krzywa). Przerywaną linią niebieską oznaczono czas równy 1 h, natomiast pomarańczową czas równy 20 h. A) Procent przyczepionych pęcherzyków w funkcji czasu B) Wyniki średniej średnicy pęcherzyków w czasie od nałożenia na mikę (Życieńska i in., 2022).



Rysunek 53: Symulacja Monte Carlo hipotetycznego rozkładu dwumodalnego średnic hydrodynamicznych. A) Hipotetyczny rozkład dwumodalny użyty do symulacji B) Histogram średnic pęcherzyków osadzonych po 1 h (niebieski) i po 20 h (pomarańczowy) od nałożenia na mikę (Życieńska i in., 2022).

odpowiadało eksperymentowi) po 1 h osadziło się ok. 20% pęcherzyków, natomiast po 20 h ponad 80 % pęcherzyków.

Hipotetyczny rozkład dwumodalny Wpływ ruchów Browna mógłby mieć jeszcze większy wpływ, gdyby rozkład średnic pęcherzyków byłby dwumodalny (jak np. pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w pracy Mrowczyński i in. (2018)). Aby to sprawdzić przeprowadzono symulację ruchów Browna dla hipotetycznego rozkładu dwumodalnego (uzyskanego z połączenia dwóch rozkładów Gaussa). Jak można zauważyć na rys. 53B w tym wypadku po 1 h od nałożenia próbki stounek liczby małych pęcherzyków do większych mogłyby zostać przeszacowane.

19.2.3 Dyskusja

Wpływ ruchów Browna jest na ogół nie omawiany w kontekście badań AFM pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Typowo wykonuje się pomiary po nałożeniu próbki na podłoże mikowe (np. Ridolfi i in. (2020), Yurtsever i in. (2021) i Bairamukov i in. (2021)). Jednak zakładając, że im większe d^{hydro} , tym większe d^{geom} , to można zauważyć wzrost średnich średnic pęcherzyków w czasie. Mniejsze pęcherzyki docierają do podłoża wolniej. Eksperymentalnie dla ok. 200 pęcherzyków po 20 h od nałożenia próbki na mikę w stosunku do 1 h widać było wzrost średnich średnic o 10 nm, co było istotnym statystycznie. Jednak symulacja dla 200 pęcherzyków, dla których wzrost średniej średnicy wyniósł około 6 nm, nie pokazała istotnej statystycznie różnicy. Zmiana była istotna statystycznie dla symulacji 2000 pęcherzyków. Aby uzyskać istotną statystycznie różnicę w średnich średnicach dla 200 pęcherzyków trzeba było jeszcze uwzględnić zwiększenie ich rozmiaru o 8%, prawdopodobnie spowodowane rozciągnięciem błony. Warstwa dwulipidowa uważana jest w większości obliczeń za słabo rozciągliwą, jednak możliwe jest lekkie rozciągnięcie lipidów Vorselen i in. (2020) i Needham i Nunn (1990). W eksperymencie mogłoby spowodować takie rozciągnięcie siły adhezji do podłoża (mika była modyfikowana APTESem, żeby mieć dodatni ładunek powierzchniowy i przyciągać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe) lub hipotoniczny roztwór na zewnątrz pęcherzyków (ze względu problemów z uzyskaniem czystego podłoża miki te pęcherzyki były obrazowane z dodaniem wody dejonizowanej). Podane czynniki mogłyby wytworzyć ciśnienie osmotyczne między wnętrzem i zewnątrz pęcherzyka. Zmiana powierzchni pęcherzyków byłaby spowodowana wnikaniem cieczy do pęcherzyka. Jak możemy zauważyć w tabeli 6 w rozdziale 10.2 nastąpił zarówno wzrost wysokości jak i promienia krzywizny. Wydaje się więc bardziej prawdopodobne, że pęcherzyki nie tyle rozpląszczyły się na powierzchni i rozciągnęły w skutek adhezji co raczej na skutek ruchów Browna większe pęcherzyki dotarły do podłoża później. Dodatkowo na skutek chłonięcia wody błona mogła ulec lekkiemu rozciągnięciu przez co wszystkie parametry geometryczne uległy zwiększeniu.

Przeprowadzona symulacja wskazywałaby, że aby nie zaniżać średnic pęcherzyków, dobrze by było obrazować je po paru godzinach. Skliar i Chernyshev (2019) też postuluje obrazowanie po 12-18 h od nałożenia próbki na mikę. Byłoby to słuszne, gdyby założyć, że nie istnieją inne czynniki prócz ruchów Browna wpływające na zmianę kształtu pęcherzyków. Z tego względu, że występują również inne siły działające na pęcherzyk (np. przyciąganie do podłoża) nie wydaje się, aby było warto stosować protokół obrazowania

po długim czasie, ale warto pamiętać, że średnice geometryczne z obrazowania w krótkim czasie od nałożenia na mikę mogą być trochę zaniżone. Z symulacji również wynika, że warto na mikę nakładać mało cieczy z próbką, żeby uzyskać niską wysokość kropli, a tym samym szybsze docieranie większych pęcherzyków do podłoża miki. Można by również rozważyć zastosowanie innych metod przyspieszających ruch pęcherzyków, np. wywołując konwekcję w cieczy poprzez jej nierównomierne delikatne podgrzanie.

Najważniejsze osiągnięcia uzyskane w pracy

Zasadnicze osiągnięcia i nowatorskie rezultaty uzyskane podczas pracy nad doktoratem obejmowały:

1. Dobór optymalnych parametrów działania mikroskopu sił atomowych do obrazowania i spektroskopii sił oraz metodologię szybkiego przygotowania podłoża pod obrazowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.
2. Zaobserwowanie i wyjaśnienie zwiększania się średnicy geometrycznej obrazowanych pęcherzyków wraz z czasem od nałożenia próbki na podłoże (patrz Życieńska i in. (2022)).
3. Zastosowanie rozkładu log-normalnego do opisu średnic geometrycznych i hydrodynamicznych oraz zaproponowanie współczynnika skalowania AFM-NTA jako cechy charakterystycznej dla pęcherzyków (patrz Życieńska i in. (2022)).
4. Zaobserwowanie wzrostu kąta przylegania dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i liposomów oraz uzasadnienie wyników eksperymentalnych modelowaniem komputerowym.
5. Zaproponowanie szybkiej procedury szacowania modułu zginania z wykorzystaniem symulacji w modelu komputerowym na podstawie geometrii pęcherzyków oraz niewielu (w stosunku do metod dotychczasowych) pomiarów spektroskopii sił.
6. Opublikowanie pierwszoautorskiego artykułu na temat metodologii badań własności fizycznych nanopęcherzyków, przygotowanie drugiego artykułu do opublikowania wkrótce, współautorstwo w dwóch innych artykułach związanych z badaniami mikroskopowymi w nanoskali (Życieńska i in., 2022; Akuwudike i in., 2023; Pszczółkowska i in., 2022).

Bibliografia

- Akuwudike, Pamela i in. (2023). “Mechanistic insights from high resolution DNA damage analysis to understand mixed radiation exposure”. W: *DNA Repair* 130, s. 103554. ISSN: 1568-7864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103554>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786423001088>.
- Bairamukov, Viktor i in. (2021). “Biomechanical Properties of Blood Plasma Extracellular Vesicles Revealed by Atomic Force Microscopy”. W: *Biology* 10.1. ISSN: 2079-7737. DOI: 10.3390/biology10010004. URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/1/4>.
- Becker, Annette i in. (2016). “Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis”. W: *Cancer Cell* 30.6, s. 836–848. ISSN: 1535-6108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610816304962>.
- Briuglia, Maria-Lucia i in. (czer. 2015). “Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release.” eng. W: *Drug delivery and translational research* 5.3. Place: United States, s. 231–242. ISSN: 2190-3948 2190-393X. DOI: 10.1007/s13346-015-0220-8.
- Bruker (2011). *Dimension Icon User Guide*. dostep: 2025-09-22. URL: https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/DIcon_webhelp_Left.htm.
- Canchola, Jesse (list. 2017). “Correct Use of Percent Coefficient of Variation (for Log-Transformed Data)”. W: *MedCrave Online Journal of Proteomics & Bioinformatics* 6, s. 1–3. DOI: 10.15406/mojpb.2017.06.00200.
- Chen, Song i in. (2009). “Sol-Gel Synthesis and Microstructure Analysis of Amino-Modified Hybrid Silica Nanoparticles from Aminopropyltriethoxysilane and Tetraethoxysilane”. W: *Journal of the American Ceramic Society* 92.9, s. 2074–2082. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03135.x>. eprint: <https://ceramics.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1551-2916.2009.03135.x>. URL: <https://ceramics.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1551-2916.2009.03135.x>.
- De Sousa, Karina P. i in. (2023). “Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy”. W: *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 15.1, e1835. DOI: <https://doi.org/10.1002/wnan.1835>. eprint: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wnan.1835>. URL: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wnan.1835>.

- Dean, Ivory i in. (2017). “The secretion and biological function of tumor suppressor maspin as an exosome cargo protein”. W: *Oncotarget* 8.5, s. 8043–8056. ISSN: 1949-2553. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13302>. URL: <https://www.oncotarget.com/article/13302/>.
- Di Bella, Maria Antonietta (2022). “Overview and Update on Extracellular Vesicles: Considerations on Exosomes and Their Application in Modern Medicine”. W: *Biology* 11.6. ISSN: 2079-7737. DOI: 10.3390/biology11060804. URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/6/804>.
- Dobhal, Garima i in. (2023). “Isolation and substrate dependence on extracellular vesicle characterisation using atomic force microscopy”. W: *Nano Express* 4.3, s. 035003. DOI: 10.1088/2632-959X/aceb7d. URL: <https://dx.doi.org/10.1088/2632-959X/aceb7d>.
- Doyle, Laura M. i Michael Zhuo Wang (lip. 2019). “Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis.” eng. W: *Cells* 8.7. Place: Switzerland. ISSN: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells8070727.
- Dufrêne, Yves F. i in. (kw. 2017). “Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology”. W: *Nature Nanotechnology* 12.4, s. 295–307. ISSN: 1748-3395. DOI: 10.1038/nnano.2017.45. URL: <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>.
- Dujardin, Antoine i in. (mar. 2019). “Automated multi-sample acquisition and analysis using atomic force microscopy for biomedical applications”. W: *PLOS ONE* 14.3, s. 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0213853. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213853>.
- Einstein, A. (1905). “Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen”. W: *Annalen der Physik* 322.8, s. 549–560. DOI: <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/andp.19053220806>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.19053220806>.
- Foreman-Ortiz, Isabel U. i in. (2022). “Nanoparticle tracking analysis and statistical mixture distribution analysis to quantify nanoparticle–vesicle binding”. W: *Journal of Colloid and Interface Science* 615, s. 50–58. ISSN: 0021-9797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.01.141>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197972200159X>.

- Fu, Wei i in. (2022). “Research Progress in Exosome-Based Nanoscale Drug Carriers in Tumor Therapies”. W: *Frontiers in Oncology* Volume 12 - 2022. ISSN: 2234-943X. DOI: 10.3389/fonc.2022.919279. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.919279>.
- Gardiner, Chris i in. (2016). “Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey”. W: *Journal of Extracellular Vesicles* 5.1, s. 32945. DOI: <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>. eprint: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3402/jev.v5.32945>. URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3402/jev.v5.32945>.
- Gavara, Núria (2017). “A beginner’s guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics”. W: *Microscopy Research and Technique* 80.1, s. 75–84. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.22776>. eprint: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jemt.22776>. URL: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.22776>.
- Grzybowska, Aleksandra i in. (sierp. 2019). “EGZOSOMY JAKO NOŚNIKI INFORMACJI W KOMUNIKACJI MIĘDZY KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI”. W: *Prospects in Pharmaceutical Sciences* 17, s. 6–13. DOI: 10.56782/pp.32.
- Guo, Peng i in. (sty. 2018). “Nanoparticle elasticity directs tumor uptake.” eng. W: *Nature communications* 9.1. Place: England, s. 130. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-017-02588-9.
- Gámez-Valero, Ana i in. (wrz. 2016). “Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles’ characteristics compared to precipitating agents”. W: *Scientific Reports* 6.1, s. 33641. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep33641. URL: <https://doi.org/10.1038/srep33641>.
- HansaBioMed (2025). *Lyophilized Exosome Standards*. dostęp: 2025-07-05. URL: <https://hbm.best/view.php?uuid=3efd5a8a-a6d6-42e9-a4d3-d3a442caeec2>.
- image, scikit (2025). *Blob Detection*. URL: https://scikit-image.org/docs/0.25.x/auto_examples/features_detection/plot_blob.html (term. wiz. 25.08.2025).
- Kikuchi, Yousuke i in. (2020). “Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging”. W: *Nanoscale* 12 (14), s. 7950–7959. DOI: 10.1039/C9NR10850E. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C9NR10850E>.

- Klear, Michael i in. (2023). *A Circle Fitting Library for Python*. URL: <https://github.com/AlliedToasters/circle-fit>.
- Kontomaris, S.V., A. Malamou i A. Stylianou (2022). “The Hertzian theory in AFM nanoindentation experiments regarding biological samples: Overcoming limitations in data processing”. W: *Micron* 155, s. 103228. ISSN: 0968-4328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2022.103228>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432822000245>.
- Kumar, Mudasir A. i in. (lut. 2024). “Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases”. W: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9.1, s. 27. ISSN: 2059-3635. DOI: 10.1038/s41392-024-01735-1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>.
- Kurtjak, Mario i in. (2022). “Unveiling the Native Morphology of Extracellular Vesicles from Human Cerebrospinal Fluid by Atomic Force and Cryogenic Electron Microscopy”. W: *Biomedicines* 10.6. ISSN: 2227-9059. DOI: 10.3390/biomedicines10061251. URL: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/6/1251>.
- LeClaire, Michael, James Gimzewski i Shivani Sharma (2021). “A review of the biomechanical properties of single extracellular vesicles”. W: *Nano Select* 2.1, s. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1002/nano.202000129>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/nano.202000129>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/nano.202000129>.
- Lecoq, Elodie i in. (2013). “Plasma Polymerization of APTES to Elaborate Nitrogen Containing Organosilicon Thin Films: Influence of Process Parameters and Discussion About the Growing Mechanisms”. W: *Plasma Processes and Polymers* 10.3, s. 250–261. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppap.201200108>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ppap.201200108>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ppap.201200108>.
- Lehmann, Brian D. i in. (wrz. 2008). “Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells”. W: *Cancer Research* 68.19, s. 7864–7871. ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6538. eprint: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/68/19/7864/2597684/7864.pdf>. URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6538>.
- Lima, I.V.M. i in. (2024). “Measuring the viscoelastic relaxation function of cells with a time-dependent interpretation of the Hertz-Sneddon indentation model”. W: *Heliyon* 10.10, e30623. ISSN: 2405-8440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.>

- 2024.e30623. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024066544>.
- Limpert, Eckhard, Werner A. Stahel i Markus Abbt (maj 2001). “Log-normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues: On the charms of statistics, and how mechanical models resembling gambling machines offer a link to a handy way to characterize log-normal distributions, which can provide deeper insight into variability and probability—normal or log-normal: That is the question”. W: *BioScience* 51.5, s. 341–352. ISSN: 0006-3568. DOI: 10.1641/0006-3568(2001)051[0341:LNDATS]2.0.CO;2. eprint: <https://academic.oup.com/bioscience/article-pdf/51/5/341/26891292/51-5-341.pdf>. URL: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0341:LNDATS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0341:LNDATS]2.0.CO;2).
- Lisicki, Maciej i in. (2019). “Swimming eukaryotic microorganisms exhibit a universal speed distribution”. W: *eLife* 8. Red. Arup K Chakraborty i Matthew Herron, e44907. ISSN: 2050-084X. DOI: 10.7554/eLife.44907. URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.44907>.
- Liu, Ya-Juan i Cheng Wang (kw. 2023). “A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication”. W: *Cell Communication and Signaling* 21.1, s. 77. ISSN: 1478-811X. DOI: 10.1186/s12964-023-01103-6. URL: <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01103-6>.
- Lombardo, Domenico i Mikhail A. Kiselev (2022). “Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application”. W: *Pharmaceutics* 14.3. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030543. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/3/543>.
- Lorenc, Tomasz i in. (2020). “Exosomes in Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy”. W: *International Journal of Molecular Sciences* 21.6. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21062118. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2118>.
- Mateu-Figueras, M. Glòria i Ricardo A. Olea (2020). “Lognormal Distribution”. W: *Encyclopedia of Mathematical Geosciences*. Red. B.S. Daya Sagar i in. Cham: Springer International Publishing, s. 1–4. ISBN: 978-3-030-26050-7. DOI: 10.1007/978-3-030-26050-7_441-1. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-030-26050-7_441-1.
- Midekessa, Getnet i in. (lip. 2020). “Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability.” eng. W: *ACS*

- omega* 5.27. Place: United States, s. 16701–16710. ISSN: 2470-1343. DOI: 10.1021/acsomega.0c01582.
- Mrowczynski, Oliver D. i in. (list. 2018). “Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer.” eng. W: *Oncotarget* 9.90. Place: United States, s. 36083–36101. ISSN: 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.26300.
- Needham, David i Rashmi S Nunn (1990). “Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol”. W: *Biophysical journal* 58.4, s. 997–1009.
- Ni, Jie i in. (2019). “Exosomes in Cancer Radioresistance”. W: *Frontiers in Oncology* Volume 9 - 2019. ISSN: 2234-943X. DOI: 10.3389/fonc.2019.00869. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00869>.
- Offroy, Marc i in. (2020). “Fast automated processing of AFM PeakForce curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of turgescient cells”. W: *RSC Adv.* 10 (33), s. 19258–19275. DOI: 10.1039/D0RA00669F. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/D0RA00669F>.
- Osaki, Mitsuhiro i Futoshi Okada (2019). “Exosomes and Their Role in Cancer Progression”. W: *Yonago Acta Medica* 62.2, s. 182–190. DOI: 10.33160/yam.2019.06.002.
- Panagopoulou, Maria S. i in. (2020). “Phenotypic analysis of extracellular vesicles: a review on the applications of fluorescence”. W: *Journal of Extracellular Vesicles* 9.1, s. 1710020. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1710020>. eprint: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/20013078.2019.1710020>. URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/20013078.2019.1710020>.
- Parisse, P. i in. (grud. 2017). “Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles”. W: *European Biophysics Journal* 46.8, s. 813–820. ISSN: 1432-1017. DOI: 10.1007/s00249-017-1252-4. URL: <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1252-4>.
- Pinto, Hernán i Elena Sánchez-Vizcaíno Mengual (lip. 2024). “Exosomes in the Real World of Medical Aesthetics: A Review”. W: *Aesthetic Plastic Surgery* 48.13, s. 2513–2527. ISSN: 1432-5241. DOI: 10.1007/s00266-023-03844-8. URL: <https://doi.org/10.1007/s00266-023-03844-8>.
- Piontek, Melissa C. i Wouter H. Roos (2022). “Lipoprotein particles exhibit distinct mechanical properties”. W: *Journal of Extracellular Biology* 1.12, e68. DOI: <https://doi.org/10.1002/jex2.68>. eprint: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jex2.68>. URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jex2.68>.

- Pszczółkowska, Beata i in. (list. 2022). “Exosome secretion and cellular response of DU145 and PC3 after exposure to alpha radiation”. W: *Radiation and Environmental Biophysics* 61.4, s. 639–650. ISSN: 1432-2099. DOI: 10.1007/s00411-022-00991-5. URL: <https://doi.org/10.1007/s00411-022-00991-5>.
- Rawla, Prashanth (2019). “Epidemiology of Prostate Cancer”. W: *World Journal of Oncology* 10.2. ISSN: 1920-454X. URL: <https://www.wjon.org/index.php/wjon/article/view/1191>.
- Regan, David i in. (paź. 2019). “Lipid Bilayer Thickness Measured by Quantitative DIC Reveals Phase Transitions and Effects of Substrate Hydrophilicity”. W: *Langmuir* 35.43. Publisher: American Chemical Society, s. 13805–13814. ISSN: 0743-7463. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02538. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02538>.
- Ridolfi, Andrea i in. (sierp. 2020). “AFM-Based High-Throughput Nanomechanical Screening of Single Extracellular Vesicles”. en. W: *Analytical Chemistry* 92.15, s. 10274–10282. ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05716. URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b05716> (term. wiz. 27.08.2024).
- Rikkert, L. G. i in. (2019). “Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent”. W: *Journal of Extracellular Vesicles* 8.1, s. 1555419. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1555419>. eprint: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/20013078.2018.1555419>. URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/20013078.2018.1555419>.
- Saavedra V., Oscar i in. (2020). “Compression, Rupture, and Puncture of Model Membranes at the Molecular Scale”. W: *Langmuir* 36.21. PMID: 32427478, s. 5709–5716. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c00247. eprint: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00247>. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00247>.
- Scholder, Olivier (kw. 2019). *scholi/pySPM v0.2.20*. Wer. v0.2.20. DOI: 10.5281/zenodo.2650457. URL: <https://doi.org/10.5281/zenodo.2650457>.
- Scikit-learn (dostęp 17-09-2025). *R² score, the coefficient of determination*. URL: https://scikit-learn.org/stable/modules/model_evaluation.html#r2-score.
- Sharma, S, M LeClaire i J K Gimzewski (2018). “Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles”. W: *Nanotechnology* 29.13, s. 132001. DOI: 10.1088/1361-6528/aaab06. URL: <https://dx.doi.org/10.1088/1361-6528/aaab06>.

- Sharma, Shivani i in. (sierp. 2020). “Impact of isolation methods on the biophysical heterogeneity of single extracellular vesicles”. W: *Scientific Reports* 10.1, s. 13327. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-020-70245-1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70245-1>.
- Shringi, S. i N. N. Sharma (2017). “Analysis of Brownian particle considering nonrigidity of matter — A Langevin equation approach”. W: *2017 IEEE 17th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*, s. 204–207. DOI: 10.1109/NANO.2017.8117256.
- Skliar, Mikhail i Vasilij S. Chernyshev (2019). “Imaging of Extracellular Vesicles by Atomic Force Microscopy”. W: *JoVE* 151, e59254. DOI: doi:10.3791/59254.
- Skliar, Mikhail i in. (2018). “Membrane proteins significantly restrict exosome mobility”. W: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 501.4, s. 1055–1059. ISSN: 0006-291X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.107>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18311707>.
- Soekmadji, Carolina, Pamela J. Russell i Colleen C. Nelson (2013). “Exosomes in Prostate Cancer: Putting Together the Pieces of a Puzzle”. W: *Cancers* 5.4, s. 1522–1544. ISSN: 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers5041522. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/5/4/1522>.
- Sorkin, Raya i in. (2018). “Nanomechanics of Extracellular Vesicles Reveals Vesiculation Pathways”. W: *Small* 14.39, s. 1801650. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201801650>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/smll.201801650>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.201801650>.
- Srivastava, Rajat i K. N. Khanna (maj 2009). “StokesEinstein Relation in Two- and Three-Dimensional Fluids”. W: *Journal of Chemical & Engineering Data* 54.5. Publisher: American Chemical Society, s. 1452–1456. ISSN: 0021-9568. DOI: 10.1021/je800698t. URL: <https://doi.org/10.1021/je800698t>.
- Stachurska, Anna, Michał Wronka i Hanna Maria Kowalczyńska (2006). “Rak gruczołu krokowego w badaniach in vitro: charakterystyka linii komórkowych PC3, DU145 i LNCaP”. W: *Postępy biologii komórki* 33.2, s. 257–272.
- Stridfeldt, Fredrik i in. (2025). “Force spectroscopy reveals membrane fluctuations and surface adhesion of extracellular nanovesicles impact their elastic behavior”. W: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 122.16, e2414174122. DOI: 10.1073/pnas.2414174122. eprint: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.2414174122>. URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2414174122>.

- Stroh, C. i in. (2004). “Single-molecule recognition imaging microscopy”. W: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.34, s. 12503–12507. DOI: 10.1073/pnas.0403538101. eprint: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.0403538101>. URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0403538101>.
- Tang, Xingyi i in. (2020). “Nanomechanical characterization of pressurized elastic fluid nanovesicles using indentation analysis”. W: *Extreme Mechanics Letters* 34, s. 100613. ISSN: 2352-4316. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eml.2019.100613>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352431619302810>.
- Théry, Clotilde i in. (2018). “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines”. W: *Journal of Extracellular Vesicles* 7.1, s. 1535750. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>. eprint: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/20013078.2018.1535750>. URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- Vlaeminck-Guillem, Virginie (2018). “Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management”. W: *Frontiers in Oncology* Volume 8 - 2018. ISSN: 2234-943X. DOI: 10.3389/fonc.2018.00222. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00222>.
- Vorselen, Daan i in. (2017). “Competition between Bending and Internal Pressure Governs the Mechanics of Fluid Nanovesicles”. W: *ACS Nano* 11.3. PMID: 28273422, s. 2628–2636. DOI: 10.1021/acsnano.6b07302. eprint: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07302>. URL: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07302>.
- Vorselen, Daan i in. (list. 2018). “The fluid membrane determines mechanics of erythrocyte extracellular vesicles and is softened in hereditary spherocytosis”. W: *Nature Communications* 9.1, s. 4960. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-018-07445-x. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07445-x>.
- Vorselen, Daan i in. (2020). “Mechanical Characterization of Liposomes and Extracellular Vesicles, a Protocol”. W: *Frontiers in Molecular Biosciences* Volume 7 - 2020. ISSN: 2296-889X. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00139. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2020.00139>.
- Welsh, Joshua A. i in. (2024). “Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches”. W: *Journal of Extracellular Vesicles* 13.2, e12404. DOI: <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>. eprint: <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>.

- [//isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jev2.12404](https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jev2.12404).
URL: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jev2.12404>.
- Woo, JungReem, Shivani Sharma i James Gimzewski (2016). “The Role of Isolation Methods on a Nanoscale Surface Structure and its Effect on the Size of Exosomes”. W: *Journal of Circulating Biomarkers* 5.1. DOI: 10.33393/jcb.2016.2079. URL: <https://journals.aboutscience.eu/index.php/jcb/article/view/2079>.
- Xu, Ke i in. (2018). “Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience”. W: *Nanotechnology Reviews* 7.6, s. 605–621. DOI: doi:10.1515/ntrev-2018-0086. URL: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0086>.
- Ye, Siyuan i in. (2021). “Quantitative Nanomechanical Analysis of Small Extracellular Vesicles for Tumor Malignancy Indication”. W: *Advanced Science* 8.18, s. 2100825. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202100825>. eprint: <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/advs.202100825>. URL: <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/advs.202100825>.
- Yurtsever, Ayhan i in. (2021). “Structural and mechanical characteristics of exosomes from osteosarcoma cells explored by 3D-atomic force microscopy”. W: *Nanoscale* 13 (13), s. 6661–6677. DOI: 10.1039/D0NR09178B. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/D0NR09178B>.
- Życieńska, Katarzyna i in. (2022). “Brownian Motion Influence on AFM Exosomes’ Size Measurements”. W: *International Journal of Molecular Sciences* 23.17. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms231710074. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10074>.

Spis rysunków

1	Pojedyncza klatka z filmu powstałego korzystając z analizy śledzenia nanocząstek. Na białe są widoczne obiekty odbijające światło lasera. W tym badaniu analizowano rozmiar pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3.	24
2	Z lewej strony widać próbkę nałożoną na podłoże mikowe ustawioną na podwyższeniu i na podstawie. Strzałką zaznaczono miejsce gdzie była ustawiana. Z prawej widać mikroskop sił atomowych Dimension Icon. .	28
3	Trójwymiarowa reprezentacja obrazu wysokości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 z mikroskopu sił atomowych (Życieńska i in., 2022).	29
4	Schemat eksperymentu z obrazowaniem na mikroskopie sił atomowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Na czerwono przedstawiono wiązkę światła lasera, która pada na dźwignię, a następnie odbijając się od luster pada na fotodetektor. Budowa sprzętu na podstawie Bruker (2011). . .	30
5	Obrazy artefaktów. A) Obiekty wydłużone w jednym kierunku B) Obraz AFM przedstawiający wyciągnięte obiekty dla y od 400 nm do 600 nm C) Obiekty mają ten sam powtarzający się kształt.	32
6	Obraz przedstawia znalezione obiekty korzystając z metody Difference of Gaussian. Pęcherzyki zostały oznaczone czerwonymi okręgami. . . .	35
7	A) Obraz topograficzny AFM. Wartości na osiach x oraz y podane zostały w pikselach. Białymi i żółtymi liniami zaznaczone kierunki, wzdłuż których rysowane są profile wysokości. B) Nałożone na siebie cztery profile wysokości wzdłuż linii zaznaczonych na A. Niebieską pionową linią oznaczona została wysokość pęcherzyka.	35
8	Profile wysokości pęcherzyka wzdłuż czterech kierunków. Dla każdego z profili wyznaczona jest wysokość (pionowa niebieska linia) oraz na czerwono prawa część szerokości połówkowej, a na zielono lewa część szerokości połówkowej. Na osi odciętych odległość w pikselach. Na osi rzędnych wysokość w nm.	36
9	Dopasowanie okręgu do profilu wysokości. Punkty pomarańczowe to punkty leżące powyżej połowy wysokości pęcherzyka. Na czerwono zaznaczono interpolowane liniowo punkty leżące w połowie wysokości pęcherzyka. .	38

10	Porównanie dwóch sposobów liczenia R_c . Zieloną przerywaną linią narysowana prosta przebiegająca w punktach, gdzie pierwszy sposób wyliczenia jest równy drugiemu. Na osi odciętych R_{c1} obliczone z H i FWHM. Na osi rzędnych przedstawione R_{c2} uzyskane z dopasowania okręgów do profili. Okrągłość na tym wykresie obliczona została z FWHM (patrz rozdział 9.2). Dane zawierają złączone eksperymenty na pęcherzykach liofilizowanych PC3.	40
11	Obliczenie średnicy geometrycznej pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (Życieńska i in., 2022).	42
12	Histogram wartości okrągłości dla złączonych eksperymentów na liofilizowanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych z komórek PC3. Na czerwono zaznaczono próg powyżej którego pęcherzyki zostają wykluczone z dalszej analizy.	44
13	Histogramy wysokości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych liofilizowanych z komórek PC3. Odpowiednio wykres A, B i C przedstawia histogramy wysokości dla danych „A”, „B” oraz „C”.	46
14	Histogramy wysokości pęcherzyków liofilizowanych.	47
15	Histogramy szerokości połówkowej pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	48
16	Histogramy R_c pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	49
17	Histogramy d^{geom} pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	51
18	Parametry geometryczne pęcherzyków z komórek PC3 obrazowanych po 1 h od nałożenia na mikę. A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.	53
19	Parametry geometryczne pęcherzyków z komórek PC3 obrazowanych po 20 h od nałożenia na mikę. A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.	54
20	Parametry geometryczne liposomów DPPC A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.	55
21	Parametry geometryczne liposomów DOPC A) Histogram wysokości B) Histogram szerokości połówkowej C) Histogram promienia krzywizny D) Histogram średnicy geometrycznej.	55

22	Schematyczny pęcherzyk o kształcie sferycznej czaszy. Zaznaczono kąt przylegania (α) pęcherzyków do podłoża. W tym wypadku jest on mniejszy od 90° (porównaj suplement do Ridolfi i in. (2020)).	56
23	Wykresy średnicy geometrycznej kąta przylegania α od d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. A), B) i C) to odpowiednio wykresy dla danych „A”, „B” i „C”. Im mniejsze wartości średnicy geometrycznej, tym w większości większy kąt przylegania do podłoża.	58
24	Wykresy średnicy geometrycznej d^{geom} od kąta przylegania α dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. Czerwoną przerywaną linią zaznaczono linię ograniczoną progiem wysokości równym 8 nm. Czerwonymi punktami zaznaczono pęcherzyki mające wysokość < 8 nm.	59
25	Modelowany pęcherzyk o średnicy 32 nm przyczepiony do podłoża. A) Wykres kąta ϕ od drogi s wzdłuż brzegu przekroju pęcherzyka. B) Kształt pęcherzyka. Aby wyobrazić sobie cały pęcherzyk, trzeba obrócić go wokół prostej przebiegającej od s_0 do s_3 (czyli jego wysokości). Wielkość l_1 przedstawia drogę, jaką trzeba pokonać od punktu s_0 do s_1 (analogicznie dla l_2). Narysowano kąt ϕ_2 , który jest w punkcie s_2	61
26	Modelowany pęcherzyk o średnicy 32 nm przyczepiony do podłoża, ze zwiększoną liczbą punktów. A) Wykres zależności kąta ϕ od drogi s wzdłuż brzegu przekroju pęcherzyka. B) Kształt pęcherzyka. Aby wyobrazić sobie cały pęcherzyk, trzeba obrócić go wokół prostej przebiegającej pionowo przez jego środek.	61
27	Przedstawienie promieni krzywizny R_1 i R_2 (odpowiednio niebieskiego i zielonego okręgu) dla pomarańczowej elipsoidy w jej najwyższym punkcie. Na schemacie zaznaczono element powierzchni dA	63
28	Modelowany wykres zależności α od średnicy pęcherzyka d^{geom} dla różnych parametrów modelu. Krzywe A (czerwona) i B (niebieska) różnią się tylko wartością modułu zginania, B ma 10 krotnie większy moduł zginania. Krzywe A (czerwona) i C (zielona) różnią się wartością ciśnienia osmotycznego — C ma 10 krotnie niższe ciśnienie.	64
29	Wykresy średnicy geometrycznej kąta przylegania H/R_c od d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3. A), B) i C) to odpowiednio wykresy dla danych „A”, „B” i „C”. Im mniejsze wartości średnicy geometrycznej, tym na ogół większa wartość H/R_c	66

30	Dopasowanie modelu do złączonych danych „A”, „B” i „C” pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3 bez zastosowania progu wysokości. A) Macierz R^2 dla różnych wartości κ oraz Π_0 przy założeniu stałej $\gamma = 10 \text{ mJ/m}^2$. Czerwoną kropką zaznaczono model z maksymalnym R^2 . B) Wykres zależności H/R_c od d^{geom} . Czerwonymi gwiazdkami zaznaczono przewidywania dla najlepszego modelu (z maksymalnym R^2). Czerwoną krzywą interpolowano wartości między tymi punktami.	68
31	Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 30 dla tych samych danych, tylko ze zmienionym progiem wysokości na 8 nm. Przerywaną linią zieloną zaznaczono próg, gdzie wysokość pęcherzyka jest równa 8 nm.	68
32	Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 31 dla tych samych danych, z tym samym progiem wysokości, tylko macierz R^2 została uzyskana z interpolowanych danych H i R_c dla większej liczby możliwych wartości κ oraz Π_0	69
33	Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 32 dla liposomów DOPC. . . .	69
34	Wykresy A i B analogiczne jak na rys. 32 dla liposomów DPPC. . . .	70
35	Schematyczne przedstawienie działania sondy na pęcherzyk.	71
36	Przykładowy wybór punktów do spektroskopii sił z użyciem funkcji Point and Shoot wykonanych w programie Nanoscope. Obraz powstał z użyciem szybkiego skanowania. Białymi krzyżykami zaznaczono miejsca, gdzie wykonano później spektroskopię.	72
37	Uzyskane spektroskopie dla wybranego obszaru w którym znajdował się pęcherzyk dla pęcherzyków liofilizowanych z danych „B”. Mimo iż pęcherzyk był wybrany w środku tego obszaru, z krzywych wynika, że znajduje się on na górze. Widać to po tym, że siła rośnie wolniej, gdyż sonda natrafiła na mniejszy obszar, a nie od razu na twarde podłoże miki. Na zielono narysowano krzywe podejścia, na żółto krzywe odejścia.	73
38	Spektroskopia liposomu z DOPC (A) i DPPC (B). Na A widać przebicie przez błonę liposomu przy ok. 2 nN. Dla DPPC nie zostało zaobserwowane wyraźne przebicie, choć być może nastąpiło ono dla ok. 4 nN. Na czerwono zaznaczono fragmenty krzywych wykorzystane do oszacowania sztywności.	76
39	Podwójne przebicie błony lipidowej liposomu DOPC przy ok. 1 nN. . .	77

40	Spektroskopia sił pęcherzyka liofilizowanego z danych „B” uzyskana z nanoindentacji. Linia niebieską zaznaczona krzywa podejścia (kiedy sonda zbliża się do pęcherzyka), natomiast linią pomarańczową narysowana jest krzywa odejścia (kiedy sonda oddala się od pęcherzyka). Czerwoną i zieloną linią zaznaczono pierwsze i drugie liniowe dopasowanie. Dla pierwszej czerwonej linii uzyskano sztywność równą $0,052 \frac{\text{N}}{\text{m}}$, natomiast dla fragmentu zaznaczonego zieloną linią $0,176 \frac{\text{N}}{\text{m}}$	77
41	Modelowanie wciśnięcia pęcherzyka przyczepionego do podłoża. Czerwonym kolorem zaznaczono miejsce styku sondy o promieniu R_t . Przedstawiono wciśnięcie sondy na odległość δ . Szarym kolorem przedstawiono sondę. Siła F ma ilustrować, że pęcherzyk był wciskany przez sondę. . .	80
42	A) Pęcherzyk przyczepiony do podłoża. Czerwonymi kropkami zaznaczono węzły pomiędzy kolejnymi odcinkami okręgów. B) Wciśnięty sondą o promieniu krzywizny 10 nm pęcherzyk przyczepiony do podłoża. Na pomarańczowo zaznaczono dodatkowe węzły, które nie występowały w A. . .	80
43	Modelowanie wciskania dla pęcherzyka o średnicy 40 nm. A) Przykładowy pęcherzyk o średnicy 40 nm. B) Zależność energii od wgłębienia sondy δ . C) Zależność siły od δ . Wybrane wartości parametrów modelu κ , Π_0 i γ , a co za tym idzie wartości siły i energii w tym wypadku nie oddają jeszcze wartości, które mogły panować podczas przeprowadzonego eksperymentu.	81
44	Przykładowa krzywa spektroskopii sił podejścia i odejścia dla pęcherzyka liofilizowanego komórek PC3. A i B prezentują tę samą krzywą. Na niebiesko zaznaczono krzywą podejścia, na pomarańczowo krzywą odejścia. Na B zaznaczono siłę wiązania F_t	83
45	Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 po jednej godzinie i po 20 godzinach (Życieńska i in., 2022).	90
46	Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych pęcherzyków liofilizowanych ze zbioru „A”.	91
47	Dopasowanie rozkładu log-normalnego do średnic geometrycznych liposomów DOPC (A) i liposomów DPPC (B).	91
48	Dopasowanie rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych uzyskanych z NTA dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek PC3 (Życieńska i in., 2022).	93

49	A) Histogram średnic geometrycznych (d^{geom}) pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek PC3 uzyskane na podstawie obrazów AFM po 1 godzinie (na niebiesko) i po 20 godzinach (zaznaczono na pomarańczowo) od nałożenia na podłoże miki pokrytej APTESem; B) Średnie wartości d^{geom} (zaznaczone kropkami na analogicznie na niebiesko i pomarańczowo) wraz z przedziałem ufności 95% uzyskanym metodą bootstrap; * oznacza, że w przedziale ufności 95% dwa wyniki nie pokrywają się (Życieńska i in., 2022).	97
50	A) Schematyczne przedstawienie osadzania się pęcherzyków w kropli na mice pod wpływem ruchów Browna. Na czerwono zaznaczono hipotetyczną drogę nanoobiektu od początkowej pozycji do przyczepienia do podłoża B) Hipoteza o przesuwaniu się histogramu w czasie ku większym wartościom średnic pod wpływem ruchów Browna.	98
51	Wyniki symulacji Monte Carlo ruchów Browna dla kropli o wysokości 1 mm. A) Rozkład średnic d^{hydro} użytych do symulacji. B) Histogram średnic wybranych losowo 200 pęcherzyków z tych, które osadziły się na podłożu miki po czasie 1 h (na niebiesko) oraz 20 h (na pomarańczowo). Z prawej strony przedstawiono średnie średnice z niepewnościami wyznaczonymi testem bootstrap dla przedziału ufności 95%. C) Histogram średnic wybranych losowo 200 pęcherzyków z tych, które osadziły się po czasie 1 h (na niebiesko) oraz 20 h (na pomarańczowo) z dodanym 8% liniowym rozciągnięciem błony pęcherzyka. Analogicznie jak na B) z prawej przedstawiono średnie średnice pęcherzyków. * wskazuje istotną dla przedziału 95% różnicę statystyczną (Życieńska i in., 2022).	100
52	Wyniki symulacji osadzania się na mice pęcherzyków w kropli o wysokości odpowiednio 0,5 mm (szara krzywa), 1 mm (czerwona krzywa) oraz 2 mm (zielona krzywa). Przerywaną linią niebieską oznaczono czas równy 1 h, natomiast pomarańczową czas równy 20 h. A) Procent przyczepionych pęcherzyków w funkcji czasu B) Wyniki średniej średnicy pęcherzyków w czasie od nałożenia na mikę (Życieńska i in., 2022).	101
53	Symulacja Monte Carlo hipotetycznego rozkładu dwumodalnego średnic hydrodynamicznych. A) Hipotetyczny rozkład dwumodalny użyty do symulacji B) Histogram średnic pęcherzyków osadzonych po 1 h (niebieski) i po 20 h (pomarańczowy) od nałożenia na mikę (Życieńska i in., 2022).	101

Spis tabel

1	Warunki obrazowania AFM pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz liposomów.	32
2	Średnie, mediany i odchylenia standardowe wysokości dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	45
3	Średnie, mediany i odchylenia standardowe szerokości połówkowej dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	47
4	Średnie, mediany i odchylenia standardowe R_c dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	49
5	Średnie, mediany i odchylenia standardowe d^{geom} dla pęcherzyków liofilizowanych z komórek PC3.	51
6	Parametry geometryczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowanych komórek PC3	52
7	Parametry geometryczne liposomów	54
8	Wartości sztywności oraz parametrów geometrycznych pęcherzyków liofilizowanych dla danych „A” i „B”. d^{geom} to średnica pęcherzyka swobodnie pływającego w cieczy (wyliczenie patrz rozdział 8), H_{spektro} to wartość wysokości ze spektroskopii sił atomowych, H_{obr} to wysokość wyliczona z obrazów topograficznych na mikroskopii sił atomowych.	78
9	Wyliczone z modelu wartości κ , γ , Π	86
10	Wyniki dopasowania rozkładu log-normalnego dla średnic geometrycznych. Granice ustalono na podstawie przedziału ufności 95% ustalonego za pomocą testu bootstrap. Badania NTA i AFM dla liposomów DPPC zostały wykonane na próbkach zrobionych innego dnia, dlatego zostały przedstawione w tabeli kursywą.	92
11	Wyniki dopasowania rozkładu log-normalnego dla średnic hydrodynamicznych uzyskanych z NTA. Granice ustalono na podstawie przedziału ufności 95% ustalonego za pomocą testu bootstrap. Badania NTA i AFM dla liposomów DPPC zostały wykonane na próbkach zrobionych innego dnia, dlatego zostały przedstawione w tabeli kursywą.	94
12	Wartości współczynnika skalowania $\mu_{\text{NTA}}^*/\mu_{\text{AFM}}^*$ dla badanych pęcherzyków. 95	