

کمی سازی توزیع مولکول های فام ساز نزدیک به سطح در تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی

الهام شیخی¹، بهناز شجاع الدین²، شراره تودد³، محمد امین بصام⁴، حسین نادری منش⁵، بتول سجاد⁶*

1- دکتری، گروه فیزیک، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

2- کارشناسی ارشد، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- محقق پسادکتری، دانشکده فیزیک و اخترشناسی، دانشگاه ادینبورگ، ادینبورگ، بریتانیا

4- دکتری، گروه فیزیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

5- استاد گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

6- دانشیار گروه فیزیک، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

پذیرش: 1399/8/6

دریافت: 1398/9/24

*نویسندگان مسئول:

naderman@modares.ac.ir

bsajad@alzahra.ac.ir

چکیده:

میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی ابزاری کارا، برای مشاهده و ثبت پدیده های رخ داده در فاصله ای کمتر از صد نانومتر است. از این ویژگی منحصر به فرد میکروسکوپ، برای بررسی کیفی اسکلت سلولی، در نزدیکی سطح زیرین سلول استفاده می شود. در این مقاله، توزیع اکتین ها در فاصله کمتر از صد نانومتری از سطح تماس سلول با بستر زیرین، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی برپایه منشور تصویربرداری شده است. کمی سازی اکتین های اسکلت سلولی برای بررسی خزیدن سلول ها از لحظه اتصال اولیه به بستر زیرین تا آغاز حرکت از اهمیت بالایی برخوردار است؛ بدین جهت در این مقاله، با استفاده از محاسبه توزیع سطحی - حجمی مولکول های فام ساز، روشی برای کمی سازی توزیع مولکول های فام ساز در نزدیکی سطح زیرین سلول ارائه شده است. این روش جدید، امکان مطالعه خزیدن سلول براساس تصویربرداری لحظه ای از سطح سلول را از طریق محاسبه توزیع موضعی مولکول های فام ساز در آن ناحیه فراهم می کند.

کلیدواژگان: میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی، کمی سازی، مولکول فام ساز، تابع-توزیع - احتمال، توزیع سطحی - حجمی.

مقدمه

در دو دهه گذشته، با گسترش دقت در ابزارها و روش‌های میکروسکوپی، پژوهشگران حوزه علوم زیستی به بررسی اسکلت داخلی سلول توجه ویژه‌ای کرده‌اند [1-5]. اسکلت داخلی سلول شامل میکرولوله‌های توبولینی، رشته‌های بینابینی و میکروورشته‌های اکتینی است [6]. میکروورشته‌های اکتینی از بسپارش پروتئین‌های اکتین تشکیل یافته‌اند. این رشته‌های اکتینی در خزش سلول نقش اصلی را بازی می‌کنند [6] و [7]. خزش سلول، با قرارگیری و چسبیدن سلول به سطح زیرین خود، آغاز می‌شود و سپس با گسترده شدن سلول روی سطح زیرین، خزیدن سلول آغاز می‌شود [8].

روش‌های میکروسکوپی معمول چون قادر به آشکارسازی شبکه اکتینی در نزدیکی سطح زیرین سلول نیستند، میکروسکوپی فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی¹ (TIRFM) ابزاری کارا، برای مشاهده و ثبت پدیده‌های رخ داده در نزدیکی سطح زیرین سلول است [9-16]. در دهه گذشته با استفاده از تصویر فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی سلول، مطالعه دینامیک و نرخ بسپارش و وابسپارش اکتین‌ها [15] و [16]، مشخصه‌یابی طولانی-شدن رشته‌های اکتین در بازه زمانی معین [17] انجام گرفته است. بررسی کیفی اسکلت داخلی سلول در نزدیک سطح نیز به وسیله تصویر فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی و در عمق به وسیله تصویر فلورسانس بازتابی انجام شده است [18]. پژوهش‌های انجام شده اگرچه داده‌های مفیدی درباره فرایندهای رخ داده در نزدیکی سطح زیرین سلول می‌دهد، ولی با توجه به ویژگی شدت نور در میکروسکوپی فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی که با عمق تغییر می‌کند، فقط گزارشی کیفی از پدیده‌ها به دست پژوهشگران می‌دهد. در این زمینه، یافتن روشی کمی که بتوان برای تصاویر گرفته شده با میکروسکوپی

فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی به کار برد، مهم می‌نماید. تلاش‌های زیادی برای کمی‌سازی اسکلت سلولی انجام شده است [19-22]. در تصویربرداری‌های رایج که از عمق اسکلت سلول انجام می‌شود، محاسبه شدت میانگین فلورسانس گسیلی از مولکول‌های فام‌ساز متصل به اکتین‌ها معادلی مناسب برای کمی‌سازی توزیع اکتین‌ها است [23]؛ اما در تصویر فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی، تغییر در شدت فلورسانس گسیلی می‌تواند به تغییر در موقعیت عمودی مولکول‌های فام‌ساز متصل به اکتین‌ها مربوط باشد (نه تغییر در غلظت مولکول‌های فام‌ساز موجود در سطح). در این صورت اگر برای پردازش تصاویر سطح اسکلت سلولی نیز از محاسبه شدت میانگین فلورسانس گسیلی استفاده شود باید توزیع اکتین در اسکلت سلولی یکنواخت فرض شود که فرضی دقیق نیست [18]. در نتیجه شدت میانگین فلورسانس گسیلی از مولکول‌های فام‌ساز متصل به اکتین‌ها کمیت مناسبی برای گزارش در تصاویر میکروسکوپی فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی نیست. در این مقاله، با استفاده از محاسبه توزیع سطحی-حجمی مولکول‌های فام‌ساز، یک روش جدید برای کمی‌سازی مولکول‌های فام‌ساز نزدیک به سطح سلول ارائه شده است.

سلول‌های سرطان پوست (ملانومای انسانی) روی شیشه نازک، به صورت تک‌سلول رشد داده شده و سپس با اتصال مولکول‌های فام‌ساز به رشته‌های اکتین، توزیع رشته‌های اکتین در میکروسکوپی فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی ثبت تصویر شده است. با پردازش تصویر میدان روشن، مرز سلول، تعیین و از روی مرز، ویژگی‌های هندسی سلول استخراج شده است. در تصویری که میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی از مولکول‌های فام‌ساز موجود در سلول گرفته است و با توجه به مشخصات هندسی سلول (فطر بزرگ و کوچک، و مرکز هندسی)، یک بیضی به سطح مقطع سلول

1. Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscopy

محاط یا محیط شده است. سپس، بیضی به قاچ هایی با زاویه مرکزی برابر تقسیم شده، و توزیع سطحی - حجمی مولکول های فام ساز در هر قاچ به دست آمده است. با معلوم بودن توزیع سطحی - حجمی مولکول های فام ساز در هر قاچ، نمودار تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز در هر تک سلول بر حسب زاویه رسم شده است.

با انتخاب تک سلول هایی که در مراحل مختلف چسبیدن به سطح زیرین یا گسترش هستند، نمودار تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز هر سلول به دست آمده و با یکدیگر مقایسه شده است.

مواد و روش ها

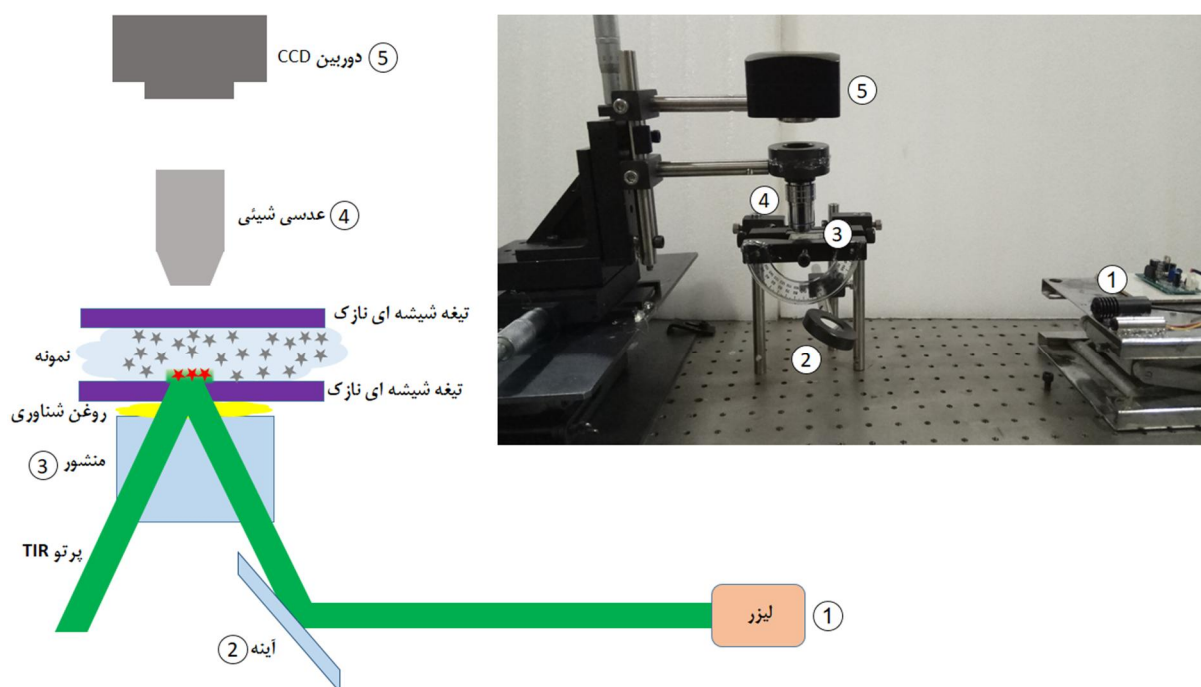
تهیه و رنگ آمیزی سلول های زیستی

سلول های سرطانی پوست با منشأ انسانی (A-375) از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در ترکیبی از DMEM (Gibco)، 10% سرم جنین گاوی (Gibco) و 1% آنتی بیوتیک های پنیسیلین و استرپتومایسین (BIO-IDEA)، و شرایط محیطی دمای 37 درجه سانتی گراد، و 5% دی اکسید کربن رشد داده شدند. سپس، سلول ها با چگالی سطحی تقریبی 3000 سلول بر سانتی متر مربع، روی سطح شیشه های نازکی با پوشش فیبرونکتین قرار داده شدند. شیشه های نازک را داخل محیط کشتی که در بالا گفته شد فرو برده و به مدت 24 ساعت در شرایط دمای 37 درجه سانتی گراد، و 5% دی اکسید کربن نگهداری شده، تا سلول ها به لایه فیبرونکتین چسبیده و برای رنگ آمیزی اسکلت سلولی آماده شوند. برای تثبیت سلول های رشد داده شده روی لایه فیبرونکتین، سلول ها به مدت 30-10 دقیقه در معرض پارافرمالدهید با غلظت حجمی 4% (Sigma-Aldrich) و بعد از شستشو با پی بی اس (فسفات بافر سیلان)، به مدت 3-5 دقیقه در

معرض تریتون x-100 با غلظت حجمی 0/1% (Sigma-Aldrich) قرار داده شدند. بعد از شستشوی مجدد سلول ها با پی بی اس، به مدت 90 دقیقه، در معرض فالویدین کروم فلور 633 (Cruz Santa) با غلظت حجمی 1% (رقیق شده با بافر پی اس ای 1%) قرار داده شدند تا فالویدین به داخل سلول نفوذ و به رشته های اکتین اتصال یک-به-یک پیدا کند. لازم است مرحله رنگ آمیزی در تاریکی انجام شود و سپس سلول ها در محیط خشک و خنک و به دور از تابش نور نگهداری شوند.

تصویربرداری از سلول های زیستی و اسکلت سلولی

تصویربرداری با یک میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی که بر پایه منشور طراحی شده، انجام شده است. چیدمان آزمایشگاهی (شکل 1)، به این ترتیب است که نور لیزر نئودیموم یاگ با طول موج 532 نانومتر و توان اسمی 60 میلی وات با برخورد به آینه تخت بازتاب می یابد. با تنظیم آینه، نور تحت زاویه ای به منشور شیشه ای با ضریب شکست 1/52 تابیده می شود که در مرز نمونه، بازتاب-داخلی-کلی رخ دهد. بدین ترتیب، سطح سلول با استفاده از میدان الکتریکی میرای تولید شده روشن می شود. تابش گسیلی (تابش فلورسانس) مولکول های فام ساز متصل به اکتین ها به وسیله یک عدسی با بزرگنمایی 100 برابر، و عدد گشودگی 1/25 (ACHRO, OIL)، در کانون عدسی جمع آوری می شود. دوربین دیجیتال ToupCam (U3CMOS) در کانون عدسی قرار گرفته و تصویر خاکستری، با تعداد پیکسل 3584x2746 و 8 بیت ثبت شده است. مدت زمان نوردهی به نمونه ها یکسان (0/5 ثانیه، زمان برانگیختگی مولکول فام ساز متصل به فالویدین) در نظر گرفته شده و تصویربرداری در دو حالت میدان روشن و فلورسنت انجام شده است.

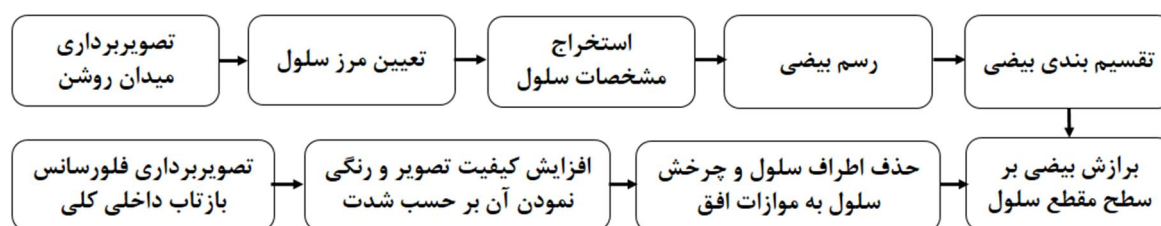


شکل 1 طرح‌واره و چیدمان میکروسکوپی فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی بر پایه منشور

پردازش تصویر اسکلت تک سلول

پردازش تصویرهای میدان روشن، و فلورسنت با نرم افزار متلب انجام شده است. الگوریتم مربوط به مراحل پردازش در شکل 2 نشان داده شده است. در مرحله نخست، با نرم افزار متلب، مرز سلول از روی تصویر میدان روشن به دست آمده و براساس مرز تک سلول، و با

استفاده از نرم افزار متلب، مشخصات هندسی سلول مثل مساحت (A)، محیط (P) و مرکز هندسی (C) به دست می آید. علاوه بر آن، نرم افزار متلب شبیه ترین بیضی را با قطرهای کوچک و بزرگ (قطر کوچک (b)، و قطر بزرگ (a)) بر تک سلول، محاط یا محیط می کند.



شکل 2 الگوریتم پردازش تصویرهای میدان روشن و تصویر تابش، مولکول های فام ساز

با دانستن این موضوع که نزدیک ترین شکل هندسی به سطح مقطع سلول در صفحه تصویر، بیضی است و با دراختیار داشتن مرکز هندسی سلول، و دو قطر کوچک و بزرگ، ویژگی های ظاهری سلول بر اساس سه کمیت

مساحت (A)، خروج از مرکز ($e = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$) و ضریب دایروی بودن سلول ($c = \frac{4\pi A}{P^2}$) بررسی می شود [18] و [24].

خروج از مرکز، میزان کشیدگی سلول را بیان می کند. این کمیت برای سلول های گسترده نشده (سطح مقطع دایره ای شکل) به مقدار صفر میل می کند و برای سلول های گسترده شده، دوکی شکل (سطح مقطع بیضی شکل) به مقدار یک میل می کند. بنابراین، کمیت خروج از مرکز می تواند معیاری برای جداسازی سلول های گسترده شده از سلول های گسترده نشده در نظر گرفته شود.

ضریب دایروی بودن معیار خوبی برای تشخیص میزان نزدیکی و دوری شکل هندسی سطح مقطع سلول به دایره، ضمن در نظر گرفتن "همواری" در محیط آن است. هرچه این کمیت به یک نزدیک تر باشد شکل سطح مقطع سلول به دایره شبیه تر و مرز آن هموارتر است و این یعنی سلول هنوز باز نشده است. با فاصله گرفتن این کمیت از عدد یک، سطح مقطع سلول از شکل دایره دورتر و مرز آن ناهموارتر (دارای گوشه و ضلع) خواهد بود که این امر از گسترده شدن سلول حکایت می کند.

در مرحله بعد، تصویر فلورسانس سلول پردازش می شود. در میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی، تغییرات شدت موج میرا تابعی نمایی از فاصله مرز بازتاب-داخلی-کلی است. اگر شدت موج برانگیزاننده در عمق نمونه، یکنواخت بود، با فرض اینکه بین شدت نور تابش شده به نمونه برای برانگیختگی، با شدت نور تابش شده از مولکول های فام ساز (در اینجا فام سازهای متصل به اکتین) یک تناسب خطی وجود دارد، و شدت نور ثبت شده از مولکول های فام ساز با چگالی حجمی مولکول های فام ساز رابطه خواهد داشت. در حالی که، در میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی، شدت موج برانگیزاننده در عمق نمونه یکنواخت نیست و به صورت نمایی با فاصله از سطح بازتابان (در اینجا محل تماس لایه فیبرونکتین با سلول) رابطه دارد. از این رو، کمیت های "شدت" یا "تباین در شدت"، برای بررسی مولکول های فام ساز و کمی سازی توزیع اکتین ها معیاری

مناسب نیستند. در ادامه، روش دیگری برای کمی سازی مولکول های فام ساز در نمونه معرفی شده است که در آن از مساحت پیکسل های نورخورده به جای مقدار شدت استفاده می شود.

با در نظر گرفتن اینکه در تصویر ثبت شده با میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی، فقط توزیع سطحی مولکول های فام سازی که در یک حجم با ضخامت کمتر از 100 نانومتر حضور دارند ثبت شده است، بنابراین، توزیع فام سازها با تقریب خوبی یک توزیع سطحی در یک حجم ناچیز است که از تعبیر توزیع سطحی-حجمی استفاده خواهیم کرد. با معلوم بودن مرکز هندسی هر سلول و قطره های بیضی محاطی یا محیطی، بیضی رسم شده به قاچ هایی با زاویه های مرکزی برابر تقسیم می شود. به این ترتیب، سطح مقطع سلول نیز به قاچ هایی با زاویه های مرکزی برابر تقسیم و تعداد پیکسل های نورخورده در هر تک قاچ کمی سازی می شود.

تعداد پیکسل های نورخورده با توزیع سطحی-حجمی مولکول های فام ساز در حجم محدود و مؤثر در میکروسکوپ بازتاب-داخلی-کلی متناسب است. بنابراین به جای بررسی اندازه شدت در هر پیکسل و ربط دادن آن با توزیع سطحی-حجمی مولکول های فام ساز در هر پیکسل، توزیع سطحی-حجمی مولکول های فام ساز در یک قاچ بررسی می شود. بدیهی است که هرچه قاچ ها کوچک تر باشند، این کمی سازی، اطلاعات دقیق تری در اختیار قرار خواهد داد. در هر قاچ، نسبت مساحت پیکسل های نورخورده (متناسب با توزیع سطحی-حجمی مولکول های فام ساز) به مساحت سلول در هر قاچ (مساحت محدود شده از سلول در یک قاچ) می تواند به عنوان یک کمیت معنادار در نظر گرفته شود. این کمیت به جای وابستگی به مقدار شدت پیکسل ها، به مساحت و تعداد پیکسل ها وابسته است و در نتیجه دقت و معنای بیشتری در میکروسکوپ فلورسانس بازتاب-داخلی-کلی

دارد. با شمارش تعداد پیکسل‌های نورخورده، و نورنخورده داخل بخش‌هایی از سلول که در هر قاچ محصور شده است و معلوم‌بودن مساحت هر پیکسل از تصویر، می‌توان توزیع سطحی - حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ را به دست آورد. اگر مساحت پیکسل‌های روشن در هر قاچ را که با توزیع سطحی مولکول‌های فام‌ساز در یک قاچ متناسب است با A_{θ}^L و مساحت بخشی از سلول را که در یک قاچ محدود شده است با A_{θ}^T نمایش دهیم، می‌توان رابطه زیر و نسبت آن را به دست آورد:

$$r_{\theta} = \frac{A_{\theta}^L}{A_{\theta}^T} \quad (1)$$

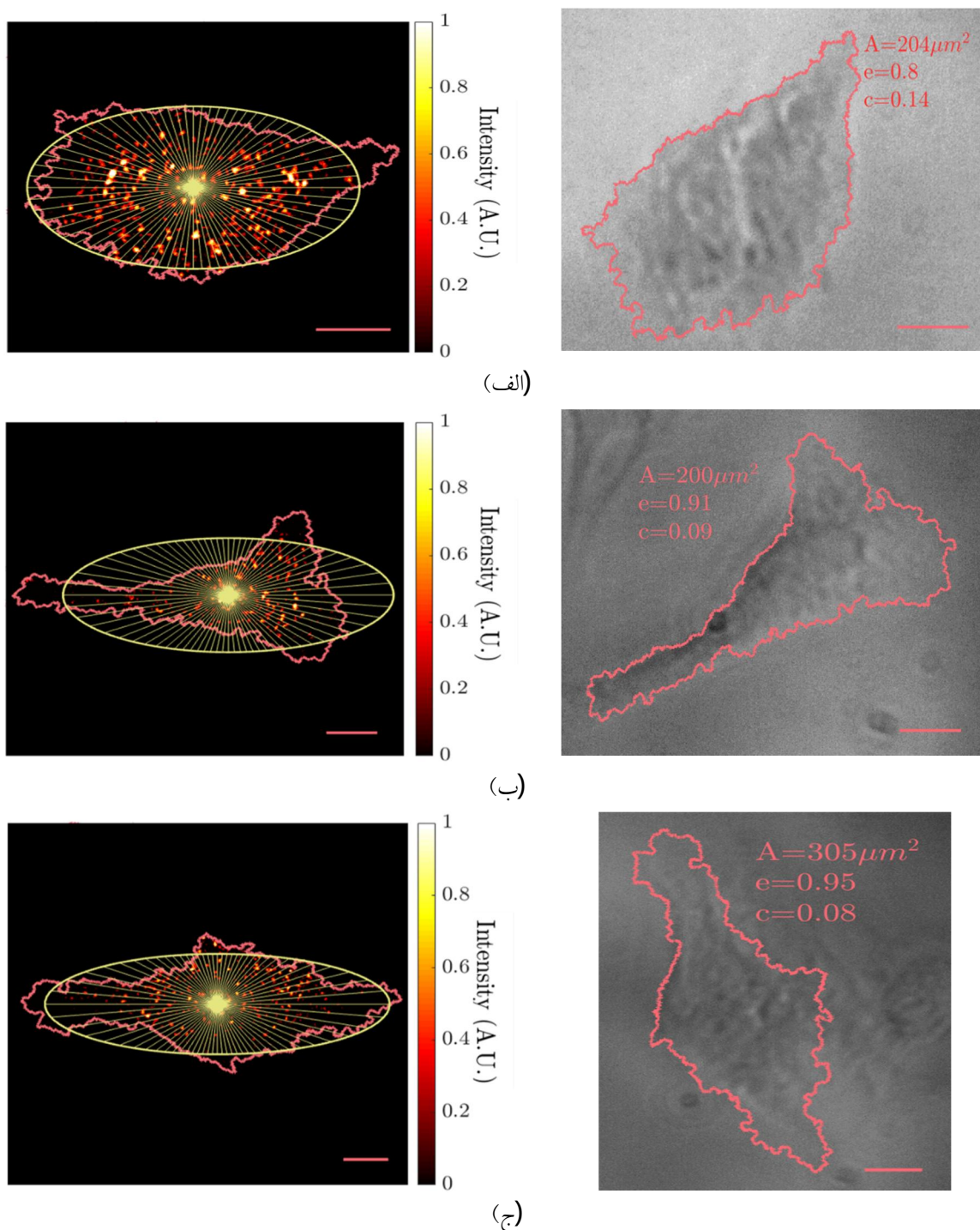
با به دست آوردن توزیع سطحی - حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ (r_{θ})، و برای تمام قاچ‌های بیضی که سطح سلول را جاروب می‌کنند، می‌توان نمودار توزیع سطحی - زاویه‌ای مولکول‌های فام‌ساز را برحسب زاویه‌های مرکزی برابر (θ) رسم کرد. هرچه زاویه مرکزی قاچ‌ها کوچک‌تر باشد، وضوح زاویه‌ای افزایش خواهد یافت و نتیجه دقیق‌تر خواهد بود. اگرچه در این حالت باز هم مساحت قاچ‌ها با یکدیگر مساوی نیستند ولی «هر دو قاچ مجاور به هم» نزدیک‌ترین مقدار مساحت را دارند.

نتایج و بحث

قرارگیری سلول بر سطح زیرین در سه مرحله انجام می‌شود. در اتصال اولیه، سطح مقطع سلول تقریباً دایره‌ای شکل است و در اصطلاح سلول باز نشده است. با گسترده شدن سلول بر سطح زیرین، سطح مقطع سلول به بیضی نزدیک‌تر و سلول نیمه باز می‌شود. در نهایت که

سلول برای حرکت آماده یا در اصطلاح باز و گسترده شده است، سطح مقطعی عموماً چند ضلعی دارد. شکل 3، سه تک سلول را در مراحل مختلف چسبیدن به سطح و نیز نحوه تقسیم بندی زاویه‌ای سطح مقطع سلول‌ها را نشان می‌دهد. مشخصات هندسی سلول - مساحت (A)، خروج از مرکز (e)، و ضریب دایروی بودن (c) هر سلول - گزارش شده است. شکل 3-الف سلولی را نمایش می‌دهد که در اتصال اولیه با بستر زیرین است. این سلول هنوز روی بستر گسترده نشده و سطح مقطع آن به دایره نزدیک‌تر است. شکل 3-ب سلولی را نشان می‌دهد که اتصال بیشتری با بستر زیرین یافته و گسترده تر شده است. مشاهده می‌شود سلول نیمه باز شده، و تقارن دایره‌ای خود را از دست داده است. در مرحله نهایی سلول کامل روی بستر زیرین، باز و برای حرکت آماده می‌شود. همان‌طور که در شکل 3-ج مشاهده می‌شود سلول باز شده، ظاهری کشیده و شبیه بیضی دارد.

برای هر کدام از سلول‌های نمایش داده شده در شکل 3، توزیع سطحی - حجمی مولکول‌های فام‌ساز در هر قاچ (r_{θ})، و برای تمام قاچ‌های بیضی که سطح سلول را جاروب می‌کنند، ارائه شده است. با بهنجار کردن نمودار توزیع سطحی - حجمی بر حسب زاویه، تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول‌های فام‌ساز ($f_{r_{\theta}}$) بر حسب زاویه (θ) در هر سلول به دست می‌آید. در این نمودار، محور شعاعی توزیع سطحی - حجمی مولکول‌های فام‌ساز ($f_{r_{\theta}}$)، و محور قطبی زاویه‌های مرکزی قاچ‌ها ($\square$) نمایش داده شده است.

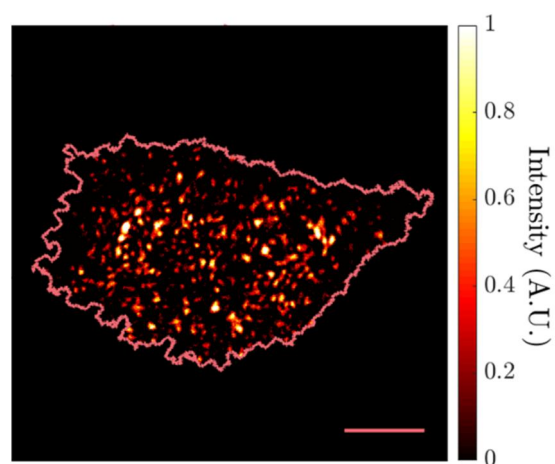
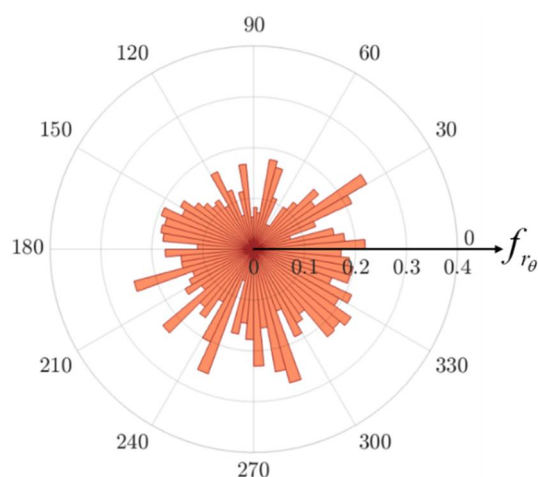


شکل 3 در سمت راست، تصویر میدان روشن سلول (الف) باز نشده، (ب) نیمه باز و (ج) باز شده، همراه مرز تعیین شده و مشخصات هندسی سلول که عبارت است از مساحت (A)، خروج از مرکز (e) و ضریب دایروی بودن (c) قرار دارد و در سمت چپ، بیضی محاط یا محیط شده به 72 قاچ با زاویه های مرکزی مساوی 5 درجه بر سطح مقطع سلول رسم شده است. خط مقیاس 5 میکرومتر را نشان می دهد.

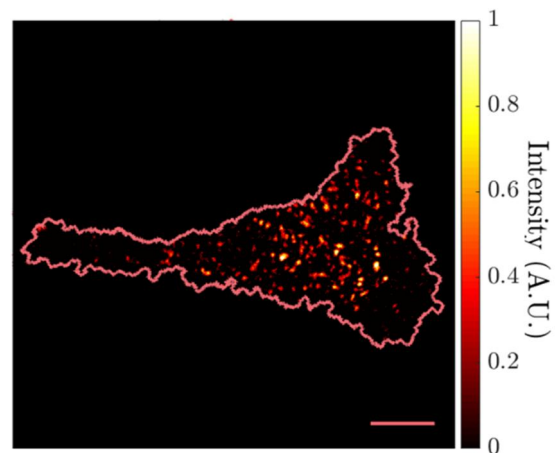
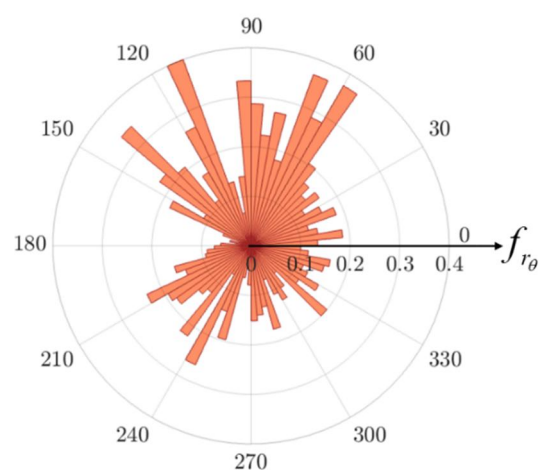
نتیجه گیری

در روش های میکروسکوپی معمول، کمی سازی اکتین های اسکلت سلولی اغلب بر مبنای محاسبه شدت میانگین ثبت شده از مولکول های فام ساز در سلول هاست. در این روش ها، شدت میانگین فلورسانس ثبت شده با غلظت مولکول های فام ساز موجود در حجم سلول متناسب است. غلظت مولکول های فام ساز نیز متناسب با چگالی حجمی اکتین های اسکلت سلولی در نظر گرفته می شود. در حالی - که در میکروسکوپی فلورسانس بازتاب - داخلی - کلی، تغییر شدت در مولکول های فام ساز فقط ناشی از تغییر غلظت مولکول های فام ساز نیست. بلکه فاصله عمودی مولکول های فام ساز از بستر سلول نیز می تواند به کاهش یا افزایش شدت تابش گسیلی از مولکول های فام ساز منجر شود. این پیچیدگی، به علت کاهش نمایی شدت موج میرا (به عنوان میدان برانگیخته کننده مولکول های فام ساز) با فاصله عمودی از بستر سلول است. این مسئله سبب می شود کمی سازی شدت ثبت شده از مولکول های فام ساز معیار مناسبی در بررسی چگالی حجمی اکتین ها نباشد. در این کار، برای رفع این کاستی در روش میکروسکوپی فلورسانس بازتاب - داخلی - کلی روشی ارائه شده است که بتوان احتمال حضور اکتین های سطح سلول را با استفاده از مساحت نسبی فلورسانس ثبت شده در تصویر به دست آورد. به ویژه، در گذر زمان می توان به تابع - توزیع - احتمال - سطحی - حجمی مولکول های فام ساز بر حسب زاویه دست یافت و آن را بررسی و مقایسه کرد.

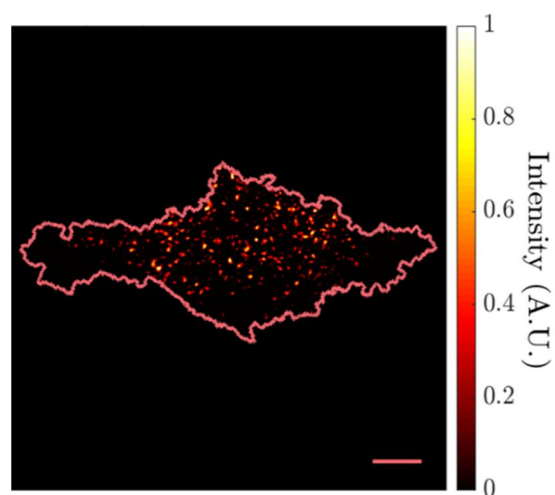
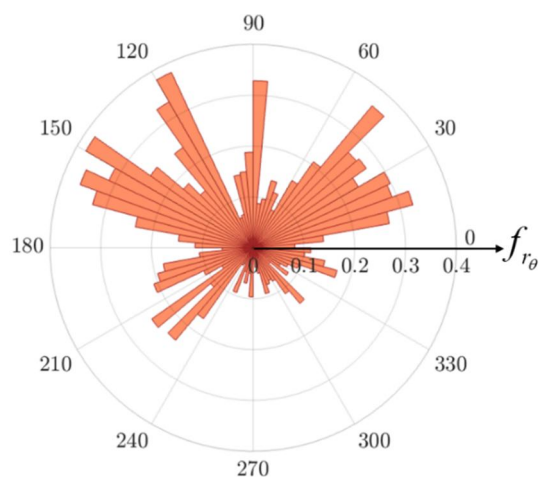
در شکل 4، نمودار تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز بر حسب زاویه هریک از تک سلول های شکل 3 نمایش داده شده است. سلول باز نشده علاوه بر آنکه سطح مقطع تقریباً دایره ای شکل دارد، تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز بر حسب زاویه آن نیز نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول متقارن است (شکل 4- الف). در حالی که برای سلول، نیمه باز شده (شکل 4- ب)، سطح مقطع آن از شکل دایره (که معیاری برای تشخیص آغاز چسبیدن است) خارج و تقارن تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز بر حسب زاویه نیز نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول شکسته شده است. اگرچه مساحت دو سلول باز نشده و نیمه باز شده تقریباً برابر است، ضریب دایروی بودن سلول نیمه باز شده کوچک تر از سلول باز نشده است که این امر نشان دهنده طولانی تر بودن مرز (محیط) سلول نیمه باز شده نسبت به سلول باز نشده است. این تابع، برای سلولی که کامل باز شده و برای حرکت آماده است (شکل 4- ج)، نسبت به قطر بزرگ و قطر کوچک سلول به شدت نامتقارن است. از مقایسه نمودار تابع - توزیع - احتمال سطحی - حجمی مولکول های فام ساز بر حسب زاویه در تک سلول در وضعیت های مختلف نسبت به بستر زیرین که در شکل 4 نشان داده شده است، می توان نتیجه گرفت که تقارن در توزیع سطحی - حجمی مولکول های فام ساز نسبت به قطر کوچک و قطر بزرگ سلول با تغییر وضعیت چسبیدن سلول، شکسته می شود.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل 4 درست راست، تصویر رنگی فلورسانس بازتاب داخلی کلی و در سمت چپ، نمودار دایره ای تابع -توزیع-احتمال توزیع سطحی-زاویه ای مولکول های فام ساز قرار دارد.

سلول الف، باز نشده، سلول ب، نیمه باز و سلول ج، باز شده است. خط مقیاس 5 میکرومتر را نشان می دهد.

11. S. D. Hansen, J. B. Zuchero, and R. D. Mullins, "Cytoplasmic Actin: Purification and Single Molecule Assembly Assays," vol. 1046, A. S. Coutts, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 145–170.
12. M. C. Dos Santos, C. Vézy, and R. Jaffiol, "Nanoscale topography of cells and vesicles in adhesion revealed by quantitative Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy," in *European Microscopy Congress 2016: Proceedings*, vol. 112, no. 483, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, pp. 975–976.
13. Y. Jiang and S. Huang, "Direct Visualization and Quantification of the Actin Nucleation and Elongation Events in vitro by TIRF Microscopy," *Bio-Protocol*, vol. 7, no. 5, 2017.
14. L. Marcotte and M. Tabrizian, "Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials," *Itbm-Rbm*, vol. 29, no. 2–3, pp. 77–88, 2008.
15. I. Fujiwara, S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata, "Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 666–673, 2002.
16. I. Fujiwara, D. Vavylonis, and T. D. Pollard, "Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 21, pp. 8827–8832, 2007.
17. J. R. Kuhn and T. D. Pollard, "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 2, pp. 1387–1402, 2005.
18. J. B. Manneville, "Use of TIRF microscopy to visualize actin and microtubules in migrating cells," *Methods Enzymol.*, vol. 406, no. 2004, pp. 520–532, 2006.
19. K. J. Amann and T. D. Pollard, "Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 15009–15013, 2001.
1. E. T. Spiliotis, E. P. Karasmanis, and L. Dolat, *Fluorescence microscopy of actin- and microtubule-associated septins in mammalian cells*, vol. 136. Elsevier Ltd, 2016.
2. B. A. Smith, J. Gelles, and B. L. Goode, *Single-molecule studies of actin assembly and disassembly factors*, 1st ed., vol. 540. Elsevier Inc., 2014.
3. P. T. Yam *et al.*, "Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility," *J. Cell Biol.*, vol. 178, no. 7, pp. 1207–1221, 2007.
4. J. Weichsel, E. Urban, J. V. Small, and U. S. Schwarz, "Reconstructing the orientation distribution of actin filaments in the lamellipodium of migrating keratocytes from electron microscopy tomography data," *Cytom. Part A*, vol. 81 A, no. 6, pp. 496–507, 2012.
5. S. Basu, C. Liu, and G. K. Rohde, "Localizing and extracting filament distributions from microscopy images," *J. Microsc.*, vol. 258, no. 1, pp. 13–23, 2015.
6. Hohmann and Dehghani, "The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork," *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 362, 2019.
7. M. Melak, M. Plessner, and R. Grosse, "Actin visualization at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 3, pp. 525–530, 2017.
8. S. Na, Z. Sun, G. A. Meininger, and J. D. Humphrey, "On atomic force microscopy and the constitutive behavior of living cells," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 3, no. 2, pp. 75–84, Nov. 2004.
9. M. Cardoso Dos Santos, R. Déturche, C. Vézy, and R. Jaffiol, "Topography of Cells Revealed by Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy," *Biophys. J.*, vol. 111, no. 6, pp. 1316–1327, 2016.
10. H. Colin-York *et al.*, "Cytoskeletal actin patterns shape mast cell activation," *Commun. Biol.*, vol. 2, no. 1, p. 93, Dec. 2019.

- from fluorescence micrographs," *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, pp. 1–14, 2017.
23. Y. Liu, K. Mollaeian, and J. Ren, "An image recognition-based approach to actin cytoskeleton quantification," *Electron.*, vol. 7, no. 12, 2018.
24. M. Schmid, M. Vetterli, and K. Wegener, "Polymer powders for laser-sintering: Powder production and performance qualification," in *AIP Conference Proceedings*, 2019, vol. 2065, no. February, p. 020008.
20. C. L. Asbury, "Data analysis for total internal reflection fluorescence microscopy," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 5, pp. 471–473, 2016.
21. A. Elosegui-Artola *et al.*, "Image analysis for the quantitative comparison of stress fibers and focal adhesions," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, 2014.
22. Z. Zhang, S. Xia, and P. Kanchanawong, "An integrated enhancement and reconstruction strategy for the quantitative extraction of actin stress fibers

Quantification of Superficial Distribution of Fluorophores in a Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscope

Elham Sheykhi¹, Behnaz Shojaedin², Sharareh Tavaddod³, Mohammad Amin Bassam⁴,
Hosein Naderi-Manesh^{5*}, Batool Sajad^{6*}

1- PhD, Department of Physics, Faculty of Physics & Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran

2. MSc, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- PhD, School of Physics and Astronomy, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

4- PhD, Department of Physics, Faculty of Physics, Malek Ashtar University of technology, Tehran, Iran

5- Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

6- Associate Professor, Department of Physics, Faculty of Physics & Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran

Accepted: 2020/10/27

Received: 2019/12/15

*Corresponding authors:
naderman@modares.ac.ir
bsajad@alzahra.ac.ir

Abstract:

Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) is a useful tool to visualize and record the phenomena that happen below 100 nm thickness of the sample surface. This unique property of TIRFM helps to perform a qualitative study of cytoskeleton near the cell-substrate contact. Here, by staining the actins filaments of the human melanoma cell and implementing the prism-based total-internal-reflection fluorescence microscope, a method to quantify distribution of fluorophores at cell-substrate contact is proposed.

Keywords: total-internal-reflection fluorescence microscope, quantification, fluorophore, probability-distribution-function, surface-volume distribution