



# INŽENÝRSKÁ MECHANIKA 2005

NÁRODNÍ KONFERENCE

s mezinárodní účastí

Svratka, Česká republika, 9. - 12. května 2005

---

## INFLUENCE OF CELL COMPONENTS' STIFFNESS ON THE RESULTS OF THE SIMULATED INDENTATION TEST

R. Lebiš, J. Burša<sup>1</sup>

**Summary:** *Mechanical stimuli represent a very important factor influencing cellular processes and functions. The knowledge about mechanical properties of cells is necessary for understanding how cells response to mechanical load. A 3D finite element model of adherent cell for computational simulation of indentation test is presented in this paper. Our model considers all significant structural cellular components, i.e. actin cortex, deep cytoskeleton, cytoplasm and nucleus. The geometry model is based on experimental observations of a spreading fibroblast. Actin cortex was modelled as a thin membrane meshed with 4-node shell elements, cytoplasm and nucleus was modelled as linear isotropic homogeneous continuum, meshed with 8-node hexahedral solid elements and deep cytoskeleton was created as a six-struts tensegrity structure, consisting of six compression struts and twenty four tension cables, representing microtubules and microfilaments, respectively. We carried out a sensitivity analysis of influence of each cellular component on results of the computational simulation. Young's modulus of each cellular component was alternated in the range 50% - 200% of original values.*

### 1. Úvod

Je známo, že mechanické zatížení významně ovlivňuje procesy, probíhající v živých tkáních. Dochází zde k přeměně mechanických signálů na signály biochemické (mechanotransdukce). Jako příklad lze uvést vyztužování cévní stěny v reakci na zvýšený krevní tlak, nebo řídnutí kostí při dlouhodobém pobytu kosmonautů ve vesmíru v důsledku absence gravitace. Porozumění mechanismům, kterými dochází k této přeměně a možnosti využití těchto poznatků v klinické praxi při léčení některých závažných onemocnění, je v současné době předmětem mnoha výzkumů. Mezi závažná onemocnění, která zřejmě úzce souvisí s mechanickým namáháním patří onemocnění kardiovaskulárního systému. Vlivem změny zatížení tkání cévní stěny (např. při hypertenzi, ateroskleróze, použití cévních náhrad) dochází k jejich remodelaci, při které jsou mj. tvořena a reorganizována výztužná vlákna v tkáni. Tato remodelace tkání probíhá na úrovni buněk hladkého svalstva cévní stěny, proto se pozornost výzkumu v poslední době zaměřuje právě na tyto buňky.

---

<sup>1</sup> Ing. Jiří Burša, Ph.D, Ing. Radek Lebiš, Inst. of Solid Mechanics, Mechatronics and Biomechanics, Brno University of Technology, Technická 2, 616 69, Brno, [bursa/janicek@fme.vutbr.cz](mailto:bursa/janicek@fme.vutbr.cz), [r.lebis@post.cz](mailto:r.lebis@post.cz).

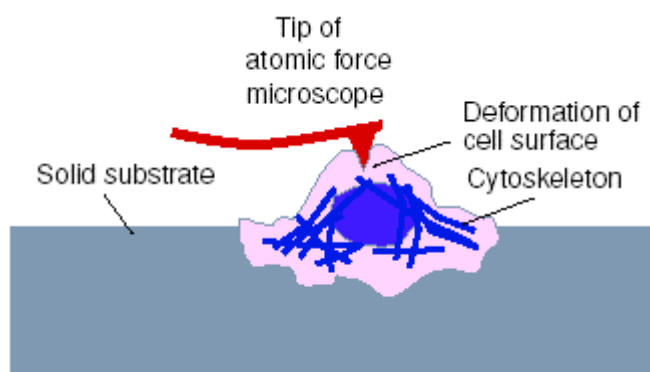
Jedna z možností přeměny mechanických signálů na biochemický spočívá v přenosu sil, působících na membránové receptory buňky, prostřednictvím cytoskeletárního aparátu do řídicího centra, které v závislosti na tomto mechanickém signálu vydá příkaz k příslušné reakci (např. syntetizace prokolagenu, modulace fenotypu). Abychom byli schopni porozumět tomu, jak je mechanický stimul přenášen z povrchu buňky do jejího centra, je nutné znát vnitřní strukturu buňky a mechanické vlastnosti komponent, které se podílí na tomto přenosu. Jedním z nástrojů, které má moderní věda k dispozici pro řešení těchto problémových situací, je výpočtové modelování.

K určování mechanických vlastností buněk se provádí celá řada experimentů (např. tahová zkouška, tlaková zkouška, aspirační test mikropipetou, zkouška průniku). V [3] jsme se zabývali tvorbou 3D MKP modelu buňky a testovali možnost jeho využití při výpočtové simulaci zkoušky průniku. Při zkoušce průniku se významně projevují především lokální elastické vlastnosti buňky. Lze tedy předpokládat, že největší vliv na silovou odezvu buňky při této zkoušce bude mít především membránový skelet. K ověření tohoto předpokladu je třeba provést citlivostní analýzu vlivu konstitutivních parametrů buněčných komponent na výsledky výpočtové simulace, což je náplní tohoto příspěvku

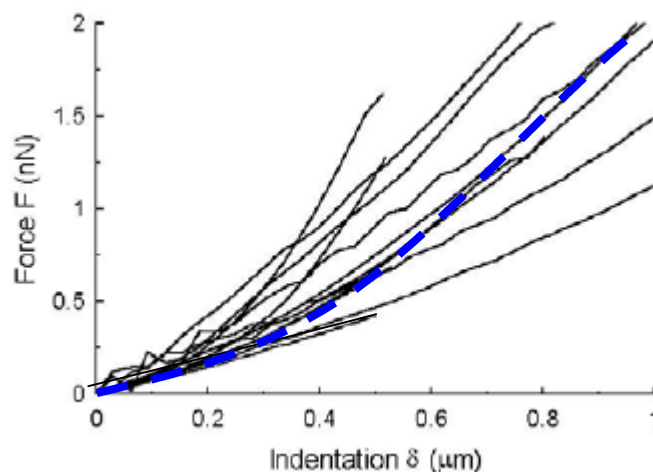
## **2. Určování mechanických vlastností buněk zkouškou průniku**

Zkouška průniku je v podstatě měření silové odezvy buňky na průnik ostrého hrotu do jejího povrchu. Nejčastěji se tato zkouška provádí pomocí mikroskopie atomové síly (atomic force microscopy, AFM). Jedná se o moderní experimentální metodu, umožňující snadnou charakterizaci povrchů pevných látek. Tato metoda využívá malé sondy, která v těsné blízkosti povrchu mapuje topografii vzorku; zařazuje se do skupiny rastrovacích sondových mikroskopických metod. U AFM jsou k detekci vzdálenosti sondy od povrchu využity meziatomární síly, které způsobují nepatrné deformace držáku sondy. Pomocí optické detekce laserovým paprskem je pak vyhodnocována poloha této sondy a topografie povrchu je dále softwarově zpracovávána.

AFM může pracovat v několika režimech. Jedním z nich je vyhodnocování deformace povrchu a velikosti působící síly (tzv. bodová spektroskopie). Jedná se o měření závislosti reakční síly na poloze hrotu, pronikajícího do povrchu zkoumaného materiálu, čehož se využívá při měření mechanických vlastností buněk (obr. 1).



Obr.1: Princip měření mechanických vlastností buněk pomocí AFM [4]



Obr.2: Porovnání experimentálních křivek síla-deformace buněk hladkého svalstva cévní stěny japonského králíka měřené pomocí AFM [5] a křivky určené výpočtovou simulací (čárkovane).

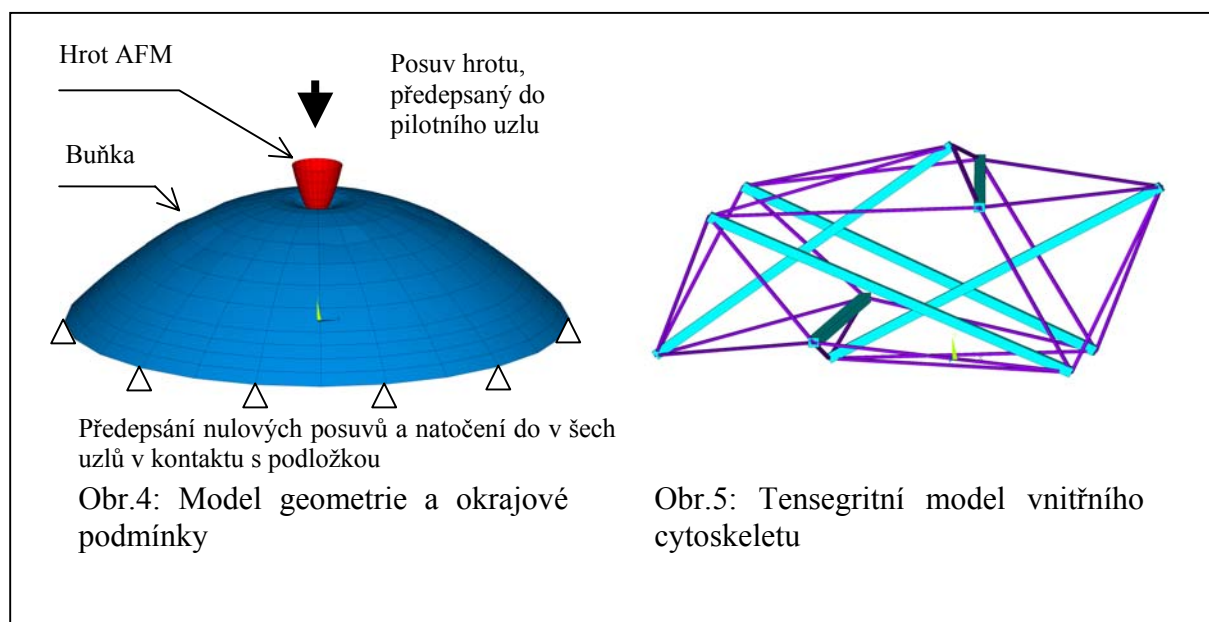
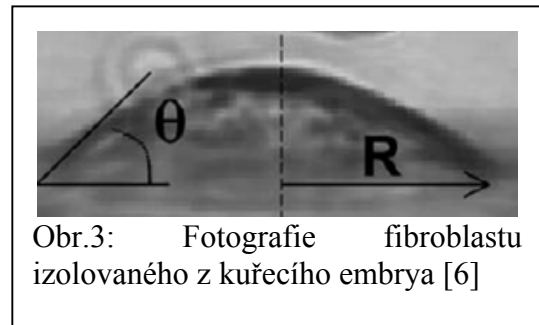
Vzhledem k tomu, že hrot na pružném držáku je mnohonásobně tužší než buňka, dojde při pohybu hrotu směrem do buňky k deformaci buněčné membrány. AFM umožňuje vyhodnotit závislost mezi hloubkou průniku hrotu do buňky a její silovou odezvou. Výstupem tohoto experimentu je tedy závislost mezi silou působící na hrot a hloubkou průniku hrotu do buňky v určitém bodě jejího povrchu (obr.2). Tímto způsobem lze vyhodnotit lokální tuhost v libovolném bodě buňky.

Naším cílem bylo vytvořit MKP výpočtový model vhodný k simulaci tohoto experimentu a otestování tohoto modelu. Měl by sloužit k identifikaci konstitutivních parametrů základních buněčných komponent (cytoskelet, membrána, cytoplasma, jádro).

### 3. Tvorba MKP modelu

#### 3.1 Model geometrie

Při AFM se nejčastěji pracuje s uměle kultivovanými buňkami, které mají zploštělý tvar a jsou přilnuté k pevné podložce (obr.3). Geometrie MKP modelu je založena na tomto tvaru. Model geometrie se skládá z buňky a



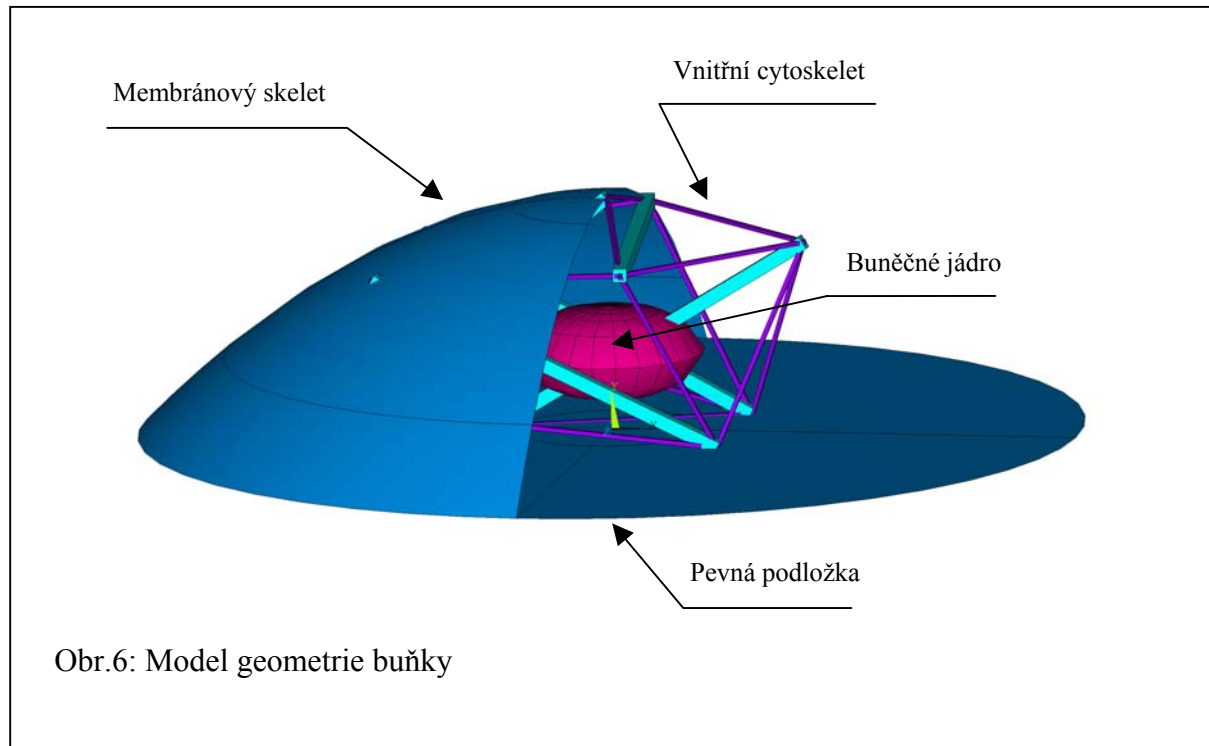
z hrotu AFM (obr.4). Geometrie hrotu je tvořena rotačním paraboloidem, který se svými rozměry blíží skutečnému hrotu používanému při experimentech.

MKP model buňky zahrnuje tyto buněčné komponenty: membránový skelet, vnitřní cytoskelet (endoskelet), cytoplasmu a buněčné jádro. Membránový skelet (společně s mechanicky nepodstatnou buněčnou membránou) je modelován 4-uzlovými skořepinovými prvky jako plocha rotačního paraboloidu, rozměrově odpovídající skutečným rozměrům buňky.

Vnitřní cytoskelet je modelován tensegritní strukturou. Tensegritní model buňky předpokládá, že celá buňka je tvořena tensegritní strukturou. Tažné síly vznikají v mikrofilamentech a intermediárních filamentech. Tyto síly jsou vyváženy tlakovými silami v mikrotubulových tyčích a připojenou extracelulární strukturou (ECM). Předpětí stabilizující celou buňku je zajištěno obvykle kontraktilním actomyosinovým aparátem.

Biofyzikální studie izolovaných filamentů a mikrotubulů ukázaly, že první přenášejí tahové síly, zatímco duté mikrotubuly se uplatňují spíše jako kompresní prvky. Izolované mikrotubuly zůstávají pevné a rovné, zatímco izolovaná mikrofilamenta a intermediární filamenta jsou obvykle ohnutá, což koresponduje s přenášeným zatížením. Navíc byl tensegritový model podpořen tím, že buňky se chovají, jako by měly diskrétní síť, ne jako by

vytvářejí mechanické viskoelastické kontinuum. Tensegritní modely se liší od modelů buněk na bázi kontinua v chování po aplikaci místních tlaků na buněčný povrch. Tlak může způsobit přímou deformaci celé struktury, v závislosti na tom, jak síť vypadá a kde je zatížení aplikováno [8].



Vnitřní cytoskelet je ve vytvořeném MKP modelu tedy tvořen šestinosníkovou tensegritní strukturou, skládající se ze tří dvojic tlakových členů, reprezentujících funkci mikrotubulů, a z 24 tahových členů, reprezentujících funkci mikrofilament. Mikrotubuly a mikrofilamenta jsou tvořeny prutovými prvky, přenášejícími pouze tlak, respektive tah (obr.5,6). Spojení membránového a vnitřního cytoskeletu je realizováno ztotožněním vybraných uzlů obou komponent.

Cytoplasma a jádro jsou modelovány jako lineárně elastické homogenní kontinuum pomocí šestistěnných solid prvků a vyplňují vnitřní prostor buňky

### 3.2 Model konstitutivního chování

Materiálové vlastnosti jednotlivých buněčných komponent nejsou přesně známy, lze je pouze odhadnout z různých zdrojů [6]. Identifikace těchto parametrů je cílem našich budoucích prací. Pro modelování všech komponent buňky používáme lineárně elastický konstitutivní model, který vzhledem k malému počtu konstitutivních parametrů usnadňuje jejich identifikaci. Jako výchozí stav pro citlivostní analýzu jsme zvolili model s elastickými parametry z tab.1. Při výpočtové simulaci zkoušky průniku jsme u těchto hodnot dosáhli dobré shody s výsledky experimentů (viz obr. 2).

	Mikrotubulus	Mikrofilamenta	Membránový skelet	Cytoplasma	Jádro
Modul pružnosti [kPa]	4e5	5e5	10	0,25	1
Poissonovo číslo	0.3	0.3	0.3	0.45	0.3

Tab.1 Elastické parametry buněčných komponent, použité pro testovací výpočet

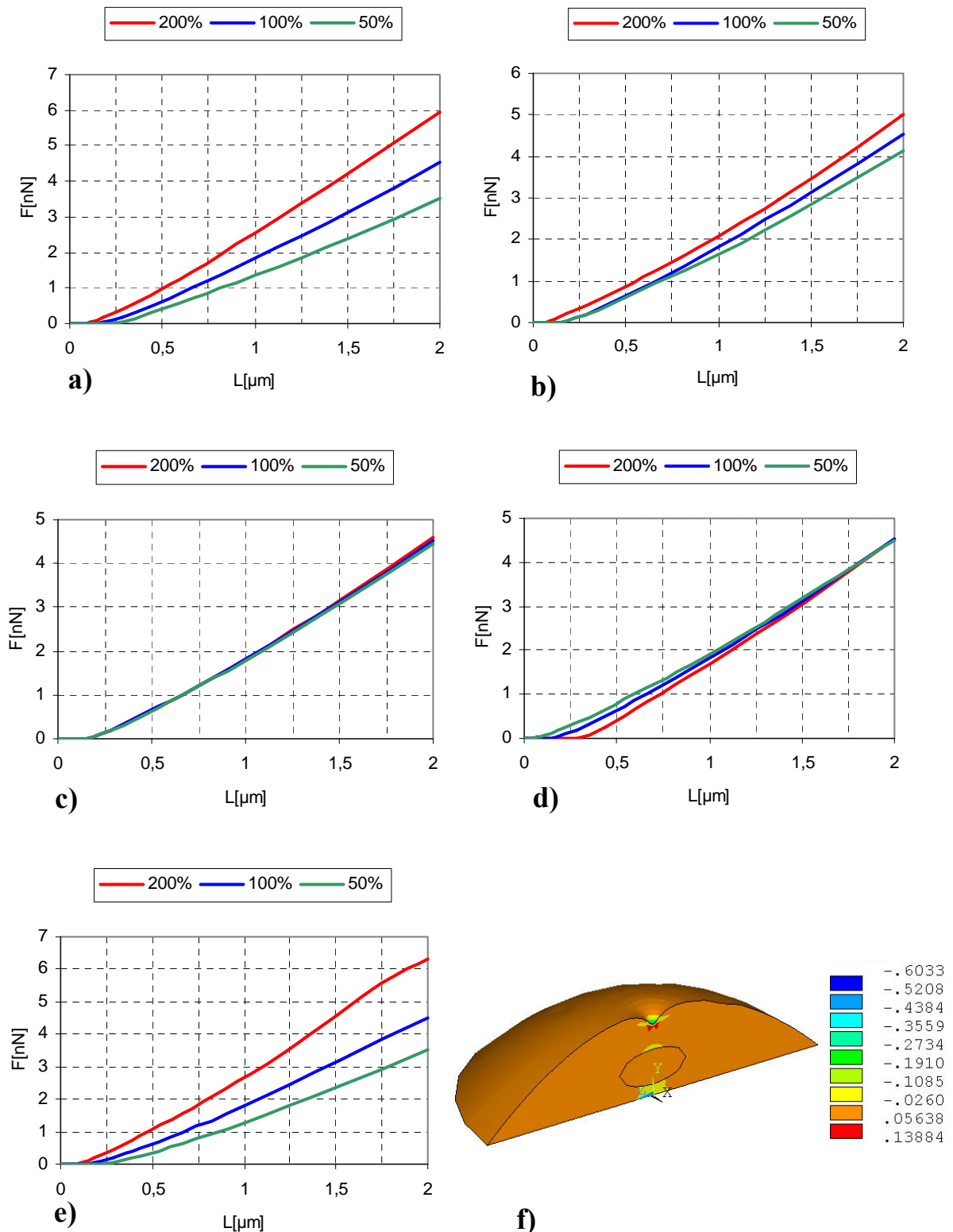
Hrot AFM má o několik řádů vyšší tuhost než buňka, tudíž jej můžeme modelovat jako ideálně tuhé těleso (rigid body), což vzhledem ke kontaktu výrazně urychlí výpočet.

### 3.3 Okrajové podmínky

Přilnutí buňky k pevnému substrátu je realizováno předepsáním nulových posuvů do všech uzlů, které jsou v kontaktu s podložkou. Interakce mezi hrotem AFM a buňkou je realizována prostřednictvím kontaktních prvků. Průnik hrotu do buňky je realizován předepsáním posuvu do pilotního uzlu hrotu ve směru kolmém na podložku. V tomto pilotním uzlu je vyhodnocována reakční síla ve směru posuvu, která reprezentuje mechanickou odezvu buňky (obr.4). Funkce actomyosinového kontraktálního aparátu, který zajišťuje předpětí cytoskeletu a tím tvarovou stabilitu celé buňky, je zajištěna předepsáním počátečního přetvoření do elementů reprezentujících mikrofilamenta.

### 4. Výsledky analýzy

Výsledky výpočtové simulace zkoušky průniku jsou vyhodnocovány prostřednictvím závislosti reakční síly v pilotním uzlu hrotu AFM na hloubce průniku hrotu do buňky (obr.7). Náplní tohoto příspěvku bylo provést citlivostní analýzu vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky na silovou odezvu při výpočtové simulaci zkoušky průniku. V prvním kroku jsme zvolili elastické konstanty buněčných komponent (tab.1) tak, aby se výsledek výpočtové simulace přibližně shodoval s výsledky experimentu (obr.2). Tyto hodnoty jsme uvažovali jako výchozí. Poté jsme měnili modul pružnosti každé z komponent (cytoplasma, membrána, jádro, mikrofilamenty, mikrotubuly) v rozsahu 50% - 200% výchozí hodnoty a prováděli výpočtové simulace s cílem zjistit, která z buněčných komponent má největší vliv na výsledky simulace.



Obr.7 Výsledky analýzy vlivu tuhosti jednotlivých komponent buňky na závislost síly  $F$  na hloubce průniku  $L$  při výpočtové simulaci zkoušky průniku. Vliv: a) cytoplasmy, b) membrány, c) jádra, d) mikrofilament, e) mikrotubulů. f) Rozložení 1. hlavního napětí v cytoplasmě a jádře (kPa)

## 5. Závěr

Cílem výpočtových simulací experimentů prováděných na buňkách je určení konstitutivních parametrů jednotlivých buněčných komponent. Při zkoušce průniku se významně projevují především lokální elastické vlastnosti buněk. Předpokládali jsme, že největší vliv na silovou odezvu při této zkoušce bude mít především membránový skelet. K ověření tohoto předpokladu byla provedena analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent buňky na výsledky výpočtové simulace. Z výsledků (obr.7) vyplývá, že naopak největšího rozptylu křivek síla-hloubka průniku bylo dosaženo změnou tuhosti cytoplazmy a mikrotubulů. Nejmenší vliv oproti tomu vykazuje změna tuhosti jádra a mikrofilament. Podstatný vliv cytoplazmy může být způsoben její stále ještě příliš vysokou tuhostí oproti realitě (v porovnání s membránovým skeletem), ale pro nižší hodnoty modulu pružnosti cytoplazmy se nepodařilo dosáhnout konvergence výpočtu. Pro lepší věrohodnost výsledků výpočtové simulace zkoušky průniku by bylo vhodné rovněž vytvořit realističtější model topologie cytoskeletu (s větším počtem mikrotubulů). Vzhledem k počtu identifikovaných konstitutivních parametrů je však potřebné provést výpočtovou simulaci i jiných typů mechanických zkoušek buněk.

## 6. Literatura

- [1] Burša J., Janíček P., Lebiš R., *Biomechanics of smooth muscle cells*, Biomechanics of Man, Špičák, CR, p.46, 2004
- [2] Lebiš R., Burša J., Janíček P.: *Constitutive model of vascular smooth muscle cells determined using computational simulation*, Engineering Mechanics, Svatka, CR, 2004
- [3] Lebiš R., Burša J., Janíček P.: *Possibilities of FE computational simulation of indentation test of isolated cells*, Aplikovaná mechanika, Hrotovice, CR,
- [4] Lehenkari PP, Charras GT, Nesbitt SA, Horton MA., *New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells*, Expert Rev Mol Med., 2000, Mar 08; 1-19,2000,.
- [5] Robert van Lith, Coaches: L.H.E.H. Snoecky, K. Hayashi, H. Miyazaki, C.V.C. Bouten, : *Force mapping of vascular smooth muscle cells with Atomic Force Microscopy: influence of norepinephrine on local stiffness distribution*, BMTE04.30., Internal Report. ISBN (2004)
- [6] J. McGarry G., Prendergast P.J., *A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell*, European cells and Materials, 27-34, 2004
- [7] Miyazaki, H., Hasegawa, Y., Hayashi, K., *Tensile properties of contractile and synthetic vascular smooth muscle cells.. JSME Int. J.*, Vol. 45, No. 4, pp. 870-879. (2002)
- [8] Vondřejš V., *Tesnegrity ve vědě, technice a umění*, <http://giboda.aodesign.de/Cdpresent/Vondrejscz.html>