

# COMPUTATIONAL MODELING OF MECHANICAL BEHAVIOUR OF CELL

# 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. The aim of our research is to develop a credible computational model of the single cell's mechanical behaviour. The results will contribute to solving of the mechanotransduction problems and to identifing of mechanical properties of the cell's components. The summary of obtained results from this branch is presented in this paper. Three different FE models were developed. The continuos nonstructural based model, the structural based model with discrete six-struts tenstegrity structure of cytoskeleton and the structuraly based model with cytoskeleton composed of two 30-struts tensegrity structures.

# 1. Úvod

Je známo, že mechanické zatížení je jedním z faktorů, které významně ovlivňují fyziologické a patologické procesy probíhající v živých tkáních. Chceme-li porozumět podstatě těchto procesů a mechanismům, kterými dochází k jejich ovlivnění mechanickým zatížením, je třeba se ve výzkumu zaměřit na základní funkční a strukturní prvky, na jejichž úrovni jsou tyto procesy iniciovány. Touto základní jednotkou u všech živých organismů je eukaryotická buňka.

Vlivem mechanického zatížení na buněčné procesy se zabývá vědní obor biomechanika buňky. Jedním ze základních problémů, který je v současné době řešen, je mechanismus přeměny mechanického signálu na signál biochemický. Tento proces je označován pojmem "mechanotransdukce". Biomechanika buňky hledá odpovědi zejména na tyto otázky: Jakým způsobem je mechanický signál přenášen z okolí do buňky, jakým způsobem tento signál vyvolá v buňce příslušnou odezvu a jaké složky buněčné strukturu se na tomto přenosu podílejí (Cheng et al.,2000). Porozumění procesu mechanotransdukce by mohlo přispět k řešení řady problémových situací, které úzce souvisí s mechanickým zatížením živých tkání a tyto poznatky by mohly být využity v klinické praxi.

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

Protože buňky jsou strukturně velice složité prvky nepatrných rozměrů (většina laické veřejnosti žije v mylné představě, že buňka tvoří jakýsi balónek z buněčné membrány, vyplněný viskózní cytoplasmou, ve které plavou různé organely), je velice obtížné najít na tyto otázky jednoznačné odpovědi. Řešení problémů biomechaniky buňky proto vyžaduje interdisciplinární přístup, využívající poznatků zejména biochemie, biologie, fyziologie, patologie a mechaniky kontinua.

V našem výzkumu se zabýváme popisem mechanického chování buněk pomocí výpočtového modelování a našim hlavním cílem je vytvořit věrohodný výpočtový model mechanického chování buňky, zahrnující všechny z mechanického hlediska podstatné strukturní složky a identifikace jeho parametrů na základě výpočtových simulací experimentů prováděných na buňkách. Náplní příspěvku je shrnutí námi dosažených výsledků z této oblasti.

#### 2. Formulace problému

Řešení problémů, vyplývajících z problémových situací spojených s ovlivněním buněčných procesů mechanickým faktorem, vyžaduje především studium chování buňky jako mechanické soustavy. To vyžaduje znalosti jednak o struktuře buňky, o jejích interakcích s okolím, o mechanických funkcích jednotlivých strukturních prvků, o vazbách mezi nimi a v neposlední řadě o jejích mechanických vlastnostech. Určováním mechanického chování buněk a jejími mechanickými vlastnostmi se zabývá celá řada výzkumů na významných pracovištích po celém světě. Zde se snaží popsat mechanické chování buněk jednak na základě experimentů a jednak pomocí výpočtového modelování.

Experimentální metody slouží především k určování mechanických či biochemických odezev buňky (případně její části) na deformační zatížení. Výstupem těchto experimentů je nejčastěji jistá závislost mezi deformačním zatížením buňky a její silovou nebo chemickou odezvou. Pomocí těchto experimentů je možno na určité úrovni odhadovat mechanické vlastnosti buněčných populací, samotných buněk, případně jejich lokálních oblastí. K samotnému popsání mechanického chování buňky to ale nestačí, mimo jiné z toho důvodu, že vzhledem k rozměrům buňky nelze tyto experimenty provádět na potřebné úrovni. Jednou z možností jak tuto překážku překonat může být využití právě výpočtového modelování.

Problematika výpočtového modelování mechanického chování buněk zahrnuje zejména úlohy o identifikaci konstitutivních parametrů buněk a jejích komponent (komponentou buňky se zde rozumí její funkční strukturní prvek, např. membrána nebo cytoskelet) na základě výsledků experimentálních metod a úlohy, jejichž cílem je vytvořit komplexní výpočtový model mechanického chování buňky (na základě výsledků experimentů a úloh o identifikaci).

Problém, k jehož řešení by měla tato práce přispět, byl naformulován takto: Identifikovat materiálové vlastnosti buněk a jejích komponent, podílejících se na mechanotransdukci, na základě výpočtového simulování mechanických zkoušek, prováděných na buňkách. Aby mohl být tento problém řešen, je nutno nejdříve vytvořit věrohodný funkční výpočtový model mechanického chování buňky na úrovni současného stavu poznání, pomocí kterého by bylo možné tyto vlastnosti identifikovat. To by mělo přispět k řešení problematiky mechanotransdukce a s ní spojených problémových situací a pozvednout úroveň výpočtového modelování mechanického chování buněk

#### 3. Simulace tahové zkoušky buněk hladkého svalstva cévní stěny

Cílem řešení byla volba konstitutivního modelu a identifikace jeho parametrů na základě zkoušek jednoosým tahem, realizovaných na izolovaných buňkách hladkého svalu, publikovaných v (Miyazaki, H., Hasegawa, Y., Hayashi, K., 2000). Z těchto zkoušek byla jejich autory určována závislost zátěžné síly na protažení buňky, realizovaném pomocí mikropipet přilepených ke stěně buňky. Výsledky nevykazovaly výraznou závislost na směru zatěžování buňky. Aby bylo v této inverzní úloze dosaženo jednoznačnosti řešení, byl jako první krok výpočtového modelování mechanického chování buňky hladkého svalu řešen velmi jednoduchý model, považující buňku za homogenní izotropní elastické kontinuum. Buňky byly pěstovány "in vitro", takže jejich výchozí tvar nebyl vřetenovitý, nýbrž téměř kulový. Ani za výše uvedených předpokladů modelu není možné určovat napěťově deformační křivku materiálu z tahové zkoušky pomocí jednoduchých analytických vztahů. Kromě výrazně proměnného příčného průřezu po délce vzorku k tomu přispívají jeho velká přetvoření, přidávající k **materiálové nelinearitě** i **nelinearitu geometrickou**. Jako konstitutivní model byl vybrán pětiparametrický Mooney-Rivlinův vztah pro měrnou energii napjatosti ve tvaru

$$W = a_1(I_1^{\prime} - 3) + a_2(I_2^{\prime} - 3) + a_3(I_1^{\prime} - 3)^2 + a_4(I_1^{\prime} - 3)(I_2^{\prime} - 3) + a_5(I_2^{\prime} - 3)^2 + \frac{\kappa}{2}(I_3^{\prime} - 1)^2, (1)$$

kde  $I'_i$  jsou modifikované invarianty pravého Cauchy-Greenova tenzoru deformace,  $\kappa$  označuje objemový modul pružnosti a  $a_i$  ostatní materiálové parametry (Mooney-Rivlinovy konstanty).



Parametry konstitutivního modelu byly určovány iteračně. V prvním kroku byla výchozí křivka σ-ε odhadnuta jako běžná smluvní křivka pomocí elementárních analytických vztahů: přetvoření bylo určeno podílem prodloužení jejího buňky а výchozího průměru а napětí jako podíl reakční síly ve vazbě buňky a maximálního jejího výchozího příčného



Obr.2 Porovnání simulované a experimentální charakteristiky hladké svalové buňky

průřezu. Z této odhadnuté křivky byly obvyklým způsobem (tj. metoda nejmenších čtverců) určeny parametry zvoleného konstitutivního modelu. S těmito parametry pak byla simulována tahová zkouška. Výsledná křivka prodloužení-síla byla porovnána s experimentálně zjištěnou opět prostřednictvím sumy kvadrátů odchylek.

V dalších iteračních krocích byly parametry konstitutivního modelu modifikovány, přičemž byla akceptována každá jejich změna, která přinesla snížení sumy kvadrátů odchylek mezi simulovanou а experimentální křivkou. Porovnání obou křivek po ukončení iteračního procesu je na 0. Rozdíl mezi výchozí odhadnutou napětí-přetvoření křivkou а křivkou získanou konečnou iteračním postupem opakovanou výpočtovou simulací zkoušky ukazuje 0.

Rozdíl mezi experimentální a simulovanou křivkou síla-protažení (0) odpovídá obvyklé nepřesnosti v konstitutivním popisu nelineárně elastických materiálů. Výsledná křivka napětí-přetvoření (tj. křivka



Obr.3 Porovnání tahové křivky získané triviálním přepočtem s křivkou získanou iterativní simulací zkoušky

použitá v posledním kroku iterace) představuje konstitutivní popis **homogenního nelineárně** elastického izotropního modelu materiálu buňky (Lebiš et al., 2004),(Burša J., 2005).

## 4. Strukturní model buňky a jeho využití při simulaci zkoušky průniku

Našim cílem bylo vytvořit MKP výpočtový model vhodný k simulaci zkoušky průniku a posoudit možnosti jeho použití při identifikaci konstitutivních parametrů základních buněčných komponent (cytoskelet, membrána, cytoplasma, jádro). Použily jsme strukturní model buňky, podobný modelu publikovanému v práci McGarry G., Prendergast P.J., 2004, který jsme vhodně upravily tak, aby umožňoval výpočtovou simulaci zkoušky průniku. Na tomto modelu jsme následně provedli citlivostní analýzu vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu na výsledky výpočtové simulace.

## > Tvorba MKP modelu

#### Model geometrie

Při zkoušce průniku se nejčastěji používají uměle kultivované buňky, které mají zploštělý tvar a jsou přilnuté k pevné podložce (0). Geometrie MKP modelu je založena na tomto tvaru. Model geometrie se skládá z buňky a z hrotu AFM (0). 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 (0). Jednotlivé spojovací body tensegritní struktury našeho modelu (konce tlakových členů) představují transmembránové integrinové receptory.

Vnitřní cytoskelet je ve vytvořeném MKP modelu 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 tlak, pouze respektive tah. 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

#### Model konstitutivního chování

Materiálové vlastnosti jednotlivých buněčných komponent nejsou přesně známy, lze je pouze odhadnout z různých zdrojů. 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. Při výpočtové simulaci zkoušky průniku jsme u těchto hodnot dosáhli dobré shody s výsledky experimentů.

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.

#### 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 (0). Funkce actomyosinového kontraktilního aparátu, který zajišťuje předpětí cytoskeletu a tím tvarovou stabilitu celé buňky, je zajištěna předepsáním počátečního přetvoření do elementů reprezentujících mikrofilamenta. (Lebiš R., Burša J., 2005)



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) (Lebiš R., Burša J., 2005)

# > Výsledky analýzy a zhodnocení výsledků

Výsledky výpočtové simulace zkoušky průniku jsou vyhodnocovány prostřednictvím závislosti reakční síly v pilotním uzlu hrotu AFM na hloubce průniku hrotu do buňky. Byla provedena citlivostní analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky na silovou odezvu při výpočtové simulaci zkoušky průniku. V prvním kroku jsme zvolili elastické konstanty buněčných komponent tak, aby se výsledek výpočtové simulace přibližně shodoval s výsledky experimentu. 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.

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. Z výsledků vyplývá, že naopak největšího rozptylu křivek síla-hloubka průniku bylo dosaženo změnou tuhosti cytoplasmy a mikrotubulů. Nejmenší vliv oproti tomu vykazuje změna tuhosti jádra a mikrofilament. Podstatný vliv cytoplasmy 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). O tvorbě takového modelu je pojednáno v následující kapitole.

#### 5. Tvorba strukturního modelu buňky s realističtější topologií cytoskeletu

Model cytoskeletu, který jsme použili při simulaci zkoušky průniku je tvořen jednoduchou šestinosníkovou tensegritní strukturou. Použití takového modelu bylo rovněž prezentováno v některých zahraničních publikacích, zabývajících se problematikou výpočtového modelování mechanického chování buněk. Hlavním nedostatkem tohoto modelu je jeho velké zjednodušení oproti realitě. Další nevýhodou tohoto modelu je absence intermediálních vláken, která tvoří podstatnou složku cytoskeletu. Tento model je tvořen pouze šesti mikrotubuly a 24 mikrofilamenty, oproti tomu reálná buňka obsahuje těchto prvků tisíce. Uzlové body tensegritní struktury představují povrchové receptory buňky, citlivé na mechanické vzruchy. V této jednoduché tensegritní struktuře je uzlových bodů pouze dvanáct, což je opět podstatné zjednodušení. Tento fakt významně omezuje použitelnost těchto modelů při výpočtových simulacích mechanických zkoušek prováděných na buňkách. Vzhledem k malému počtu uzlových bodů je například obtížné výpočtově simulovat zkoušky, pomocí kterých se vyhodnocuje odezva lokální oblasti buňky (dostaneme významně rozdílné výsledky, jestliže vyhodnotíme odezvu modelu zatíženého přímo na receptor nebo na jiné místo povrchu buňky). Pro zlepšení úrovně věrohodnosti výpočtového modelování v oblasti biomechaniky buněk je tedy třeba vytvořit složitější model topologie cytoskeletu.

V námi prezentovaném strukturním modelu buňky je model cytoskeletu založen na 30-ti nosníkové tensegritní struktuře a skládá se z několika částí.

#### > Tvorba MKP modelu

Model geometrie zahrnuje stejně jako model prezentovaný v předchozí kapitole všechny z mechanického hlediska podstatné strukturní prvky, tj. cytoplasmu, cytoskelet a jádro. Membrána a membránový skelet nejsou na rozdíl od modelu z předchozí kapitoly modelovány jako skořepina, ale jsou součástí tensegritního modelu cytoskeletu.

Cytoskelet je modelován pomocí nosníkových dvou 30-ti tensegritních struktur, jedna z nich představuje kortikální (membránový) skelet a druhá skelet jádra. Tyto dvě části jsou navzájem propojeny nosníkovými prvky, které představují intermediální vlákna nebo mikrotubuly. Tento model cytoskeletu obsahuje dvakrát 30 tlakových členů, dvakrát 60 tahových a 30 členů spojujících kortikální skelet se skeletem jádra v jejich uzlových bodech, z nichž 30 povrchu buňky, je na kde představují mechanosensitivní receptory.. Spojení cytoskeletu strukturními s ostatními prvky buňky je realizováno sdílením hraničních uzlů.

Při modelování materiálových vlastností všech buněčných



Obr.8 Model cytoskeletu, skládající se z membránového skeletu (vnější tensegritní struktura), nukleárního skeletu (vnitřní tensegritní struktura) a spojovacích prvků (červeně)

komponent používáme z důvodu snadnější identifikace konstitutivních parametrů (viz. Kap.4) lineárně – elastický izotropní homogenní konstitutivní model. Pro testovací výpočty jsme použili hodnoty elastických konstant podobné jako u modelu z předchozí kapitoly. Tyto hodnoty neodpovídají realitě, jejich identifikace je jedním z našich budoucích cílů.

	Mikrotubulus	Mikrofilamenta	Spojovací prvky	Cytoplasma	Jádro
Modul pružnosti [kPa]	4e5	5e5	4e4	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

## > Testovací výpočty

Práce na tomto modelu se prozatím nachází ve stádiu odlaďování a testování, proto pomocí tohoto modelu byly provedeny pouze orientační výpočty při simulaci tahové zkoušky. Parametry konstitutivních modelů byly při těchto výpočtech použity obdobné jako při simulaci zkoušky průniku. Tři testovacích výpočtech jsme vyhodnocovali:

- vliv velikosti předpětí ve složkách cytoskeletárního aparátu na velikost reakční síly v mikropipetách
- vliv spojovacích členů na velikost reakční síly v mikropipetách.

Velikost předpětí cytoskeletu bylo řízeno předepsáním počátečního přetvoření do mikrofilamentových elementů v rozsahu 5 – 20%. Natažení buňky bylo realizováno deformačně, předepsáním posuvů do uzlů v místě předpokládaného styku s mikropipetami podobně jako u modelu popsaného v kap. 3. Velikost natažení při výpočtové simulaci jsme zvolili 3  $\mu$ m, což odpovídá pouze 10% hodnot, dosahovaných při reálné zkoušce. Vyšších hodnot natažení nebylo dosaženo z důvodu nekonvergence výpočtu.



Výsledky testovacích výpočtů ukazují, že při zvětšujícím se počátečním přetvoření v cytoskeletu vzrůstá celková tuhost buňky téměř lineárně. Při analýze vlivu předpětí jednotlivých strukturních složek cytoskeletu bylo zjištěno, že největší vliv na změnu tuhosti tohoto modelu buňky má předpětí membránového skeletu, nejmenší vliv byl zaznamenán u nukleárního skeletu. Vzrůst tuhosti buňky při zvětšujícím se předpětí cytoskeletu byl publikován také v práci McGarry G., Prendergast P.J., 2004, ale na rozdíl od našich výsledků měla závislost tuhosti na přetvoření nelineární průběh. Tento rozpor může být způsoben rozdílným zatěžováním (v práci McGarry G., Prendergast P.J., 2004 byl model zatěžován silově v jediném uzlovém bodě).

10



Při zkoumání vlivu propojovacích členů na reakční sílu v mikropipetách bylo zjištěno, že významně zvyšují tuhost buňky.

#### 6. Závěr

Výše prezentované dosažené výsledky výpočtového modelování mechanického chování buněk představují základní krok k vytvoření věrohodného výpočtového modelu mechanického chování buňky na úrovni současného stavu poznání. Nestrukturní model (kap.3) je velmi zjednodušený; lze jej akceptovat pouze jako první postupný krok ve vytváření dokonalejších modelů hladké svalové buňky a její mechanické interakce s okolím. Jeho hlavním nedostatkem je to, že nezahrnuje vnitřní strukturu buňky, tudíž je pro identifikaci vnitrobuněčných komponent nepoužitelný.

Strukturní model buňky (kap. 4) představuje komplexní model na současné úrovni poznání, vzhledem k velkému počtu neznámých parametrů je však prakticky nemožné věrohodně identifikovat jeho parametry na základě simulace pouze jednoho typu mechanických zkoušek. Rovněž tensegritní model cytoskeletu, použitý v tomto modelu buňky, představuje značné zjednodušení oproti realitě, neboť se skládá z pouze šesti mikrotubulů a na povrchu buňky vytváří v ideálním případě (sférický tvar buňky) pouze 12 transmembránovách receptorů.

Model buňky se složitější topologií cytoskeletu (kap.5) představuje model představuje podstatné vylepšení oproti modelu se šestinosníkovou tensgritní strukturou cytoskeletu 0. Obsahuje větší počet prvků modelujících mikrotubuly, mikrofilamenta i intermediální vlákna, a také větší počet uzlových bodů (receptorů). Tím, že modeluje zvlášť membránový cytoskelet, cytoskelet jádra a jejich propojení, je umožněno vyhodnocování vlivu mechanického zatížení povrchu buňky na deformačně napěťový stav v jádře, což je nezbytné pro studium mechanotransdukce.

## 7. Literatura

Burša J. (2005) Výpočtové modelování problémů mechaniky živých a neživých těles z kompozitních materiálů umožňujících velké deformace. Habilitační práce, VUT v Brně,

Cheng Zhu, Gang Bao, Ning Wang (2000) Cell Mechanics: Mechanical Response, Cell Adhesion, and Molecular Deformation ,Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 2, Pages 189-226

Lebiš R., Burša J. (2005) Influence of cell components' stiffness on the results of the indentation test. Engineering Mechanics 2005, Svratka, CZ, pp.195-196

Lebiš R., Burša J., Hayashi K. (2004) Constitutive model of vascular smooth muscle cells determined using computational simulation. Engineering Mechanics 2004, Svratka, CZ, pp.167-168

McGarry G., Prendergast P.J. (2004) A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell, European cells and Materials,27-34

Miyazaki, H., Hasegawa, Y., Hayashi, K. (2002) Tensile properties of contractile and synthetic vascular smooth muscle cells.. JSME Int. J., Vol. 45, No. 4, pp. 870-879.

12 \_