

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>VYMEZENÍ PROBLÉMOVÉ SITUACE, MOTIVACE .....</b>	<b>12</b>
2.1	Vliv mechanických faktorů na procesy v živých tkáních.....	12
2.2	Souvislost mezi mechanickým zatížením a kardiovaskulárními chorobami	14
2.3	Shrnutí.....	15
<b>3</b>	<b>FORMULACE PROBLÉMU, METODA A CÍLE ŘEŠENÍ.....</b>	<b>16</b>
3.1	Formulace problému .....	16
3.2	Metoda řešení.....	16
3.3	Cíle řešení .....	17
<b>4</b>	<b>MIKROANATOMIE A FYZIOLOGIE EUKARYOTNÍ BUŇKY .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Komplexní struktura buňky .....</b>	<b>20</b>
4.1.1	Členění buněk .....	21
4.1.2	Tvar a velikost buněk .....	22
4.1.3	Struktura eukaryotní buňky .....	23
<b>4.2</b>	<b>Struktura a funkce cytoskeletu .....</b>	<b>24</b>
4.2.1	Mikrofilamenta .....	25
4.2.2	Intermediární filamenta (střední filamenta).....	27
4.2.3	Mikrotubuly .....	28
<b>4.3</b>	<b>Okolí buněk – extracelulární matrix .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Buněčné vazby .....</b>	<b>31</b>
4.4.1	Realizace vazeb mezi buňkami.....	31
4.4.2	Realizace vazeb mezi vlákny uvnitř a vně buňky.....	34
<b>4.5</b>	<b>Mechanotransdukce .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ VYŠETŘOVÁNÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ BUNĚK... 37</b>	
<b>5.1</b>	<b>Určování odezev buněčných populací na mechanické namáhání .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Určování mechanických vlastností izolovaných buněk.....</b>	<b>40</b>
5.2.1	Mechanické metody - vtláčovací zkoušky ( <i>Indentation tests</i> ) .....	40
5.2.2	Mechanické metody (tahové, tlakové a smykové zkoušky) .....	43
5.2.3	Aspirační test mikropipetou ( <i>micropipette aspiration</i> ).....	44
5.2.4	Trakční cytometrie ( <i>traction force microscopy</i> ).....	45
5.2.5	Magnetické metody ( <i>magnetocytometrie</i> ).....	46
5.2.6	Optické metody .....	48
<b>5.3</b>	<b>Příklady mechanických parametrů buněk.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>VÝPOČTOVÉ MODELOVÁNÍ MECHANICKÉHO CHOVÁNÍ BUNĚK.....</b>	<b>52</b>
<b>6.1</b>	<b>Kontinuální výpočtové modely .....</b>	<b>53</b>
6.1.1	Přehled publikací, zabývajících se kontinuálními výpočtovými modely .....	54
<b>6.2</b>	<b>Modely založené na tensegritních strukturách.....</b>	<b>62</b>
6.2.1	Definice tensegritních struktur .....	62

6.2.2	Vlastnosti tensegritních struktur.....	66
6.2.3	Tensegritní model buňky .....	67
6.2.4	Poznatky a indicie podporující hypotézu tensegritního modelu.....	68
6.2.5	Ověření souvislostí mezi tensegritními strukturami a buňkami .....	70
6.2.6	Shrnutí výsledků experimentů .....	74
6.2.7	Přehled publikovaných modelů využívajících tensegritní struktury .....	75
<b>6.3</b>	<b>Hodnocení publikovaných prací s ohledem na cíle vlastní práce.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>REALIZACE ŘEŠENÍ .....</b>	<b>79</b>
<b>7.1</b>	<b>Kontinuální model buňky – simulace tahové zkoušky .....</b>	<b>79</b>
7.1.1	Model materiálu.....	80
7.1.2	Model geometrie.....	80
7.1.3	Okrajové podmínky .....	81
7.1.4	Výpočtová simulace tahové zkoušky .....	81
7.1.5	Identifikace konstitutivních parametrů materiálu buňky.....	82
7.1.6	Výsledky.....	84
7.1.7	Závěr.....	85
<b>7.2</b>	<b>Simulace vlačovací zkoušky pomocí strukturního modelu buňky .....</b>	<b>86</b>
<b>7.3</b>	<b>Shrnutí testovacích úloh.....</b>	<b>91</b>
<b>7.4</b>	<b>Návrh modelu se složitější tensegritní strukturou.....</b>	<b>92</b>
7.4.1	Tensegritní model cytoskeletu.....	92
7.4.2	Tvorba strukturního MKP modelu buňky .....	94
7.4.2.1	Model geometrie – sférický tvar.....	94
7.4.2.2	Model geometrie – přilnutý tvar.....	95
7.4.2.3	Model konstitutivního chování.....	96
7.4.2.4	Modelování kontrakce aktinmyozinových motorů.....	96
<b>7.5</b>	<b>Porovnání vlastností modelu s experimentálně získanými poznatky .....</b>	<b>97</b>
7.5.1	Předpětové zpevnění .....	97
7.5.2	Deformační zpevnění.....	99
7.5.3	Efekt vzdáleného důsledku.....	101
7.5.4	Vliv zploštěného tvaru na přenos zatížení u přilnuté buňky .....	103
<b>7.6</b>	<b>Výpočtová simulace vlačovací zkoušky .....</b>	<b>105</b>
7.6.1	Citlivostní analýzy .....	108
<b>8</b>	<b>DISKUSE VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>114</b>
<b>8.1</b>	<b>Shrnutí hlavních cílů disertační práce.....</b>	<b>114</b>
<b>8.2</b>	<b>Zhodnocení úrovně navrženého výpočtového modelu buňky .....</b>	<b>114</b>
<b>8.3</b>	<b>Porovnání vlastností modelu s experimentálně získanými poznatky .....</b>	<b>117</b>
<b>8.4</b>	<b>Využití modelu pro výpočtové simulace mechanických zkoušek.....</b>	<b>118</b>
<b>8.5</b>	<b>Citlivostní analýzy .....</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>121</b>

## 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?
- Jaké složky buněčné struktury se na tomto přenosu podílejí?

Porozumění procesu mechanotransdukce by mohlo přispět k řešení řady problémových situací, které úzce souvisejí s mechanickým zatížením živých tkání a tyto poznatky by následně mohly být využity i v klinické praxi. Protože buňky jsou strukturně velice složité prvky nepatrných rozměrů (není to tedy jen 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.

V této práci se zabýváme popisem mechanického chování buněk pomocí výpočtového modelování. Naším hlavním cílem je navrhnout, vytvořit a otestovat vhodný výpočtový model mechanického chování buňky, který by zahrnoval všechny z mechanického hlediska podstatné strukturní složky a který by pomohl při vyšetřování mechanického chování buněk.

---

\* Eukaryotická buňka je charakteristická tím, že vždy obsahuje samostatné, dvojitou membránou ohraničené jádro, které je nositelem genetické informace. Tento typ buněk mají veškeré organismy náležející do nadříše Eukaryota, tedy veškerí prvoci, živočichové a rostliny. Nicméně, jejich buňky se mezi sebou navzájem ještě dále liší. Eukaryotické buňky jsou oproti prokaryotickým buňkám evolučně vyspělejší, jejich složitější vnitřní strukturovanost jim umožňuje stavbu a výživu výrazně větších buněk a je také předpokladem pro mezibuněčnou spolupráci potřebnou u mnohobuněčných organismů.

# 1 Vymezení problémové situace, motivace

## 1.1 Vliv mechanických faktorů na procesy v živých tkáních

Výzkum v oblasti mechanického zatížení jakožto faktoru, který významně ovlivňuje jak fyziologické, tak i patologické procesy probíhající v živých tkáních, byl po dlouhou dobu v útlumu, zejména v důsledku dominujícího rozvoje v oblasti genetiky a molekulární biologie. Často docházelo k ignorování fyzikální podstaty rozvoje patologických procesů a na místo toho byla snaha tyto procesy vysvětlit výhradně na základě genetiky a molekulární biologie. Přitom jedna z prvních prací, popisující vliv mechanického faktoru na fyziologické procesy byla publikována už v roce 1892 (Y. Wolff definoval zákon popisující remodelaci kostí v závislosti na hlavních směrech zatížení[1]).

Renesance v oblasti mechanobiologie nastala v posledních dvou dekadách. Fyziologové a kliničtí lékaři poznali důležitost vlivu mechanického zatížení na vývoj a funkci plic a srdce, na růst kůže a svalů, obnovu chrupavek a kostí a na etiologii\* různých onemocnění. Výzkum základních mechanismů vnímání a autonomního řízení (sluch, hmat, rovnováha, peristaltika) se také neobešel bez vysvětlení na základě mechaniky. Ve stejné době také biologové zjistili, že mechanický podnět je významným regulátorem i na buněčné a molekulární úrovni, se srovnatelným potenciálem jako např. chemický podnět.

Mnoho *in vitro* a *in vivo* studií potvrdilo, že mechanické zatížení významně ovlivňuje celou řadu buněčných procesů, např. růst buněk, dělení, pohyb, kontraktilitu a apoptózu†. Například bylo prokázáno, že chondrocyty‡, hepatocyty, buňky endotelu a fibroblasty mohou být “přepnuty” ze stádia růstu do stádia dělení snížením tuhosti nebo přilnavosti obklopující extracelulární matrix [2][3][4][5][6]. U endotelových buněk přilnutých k podložce byl také prokázán přechod ze stádia růstu k apoptóze v důsledku vynucené změny tvaru na více zploštělý [8]. Změnou poddajnosti extracelulární hmoty lze ovlivnit rychlost migrace buněk a směr pohybu [7]. Zatížením uměle pěstovaných endotelových buněk tahovými silami v průběhu jejich kultivace bylo docíleno růstu kapilár v kolagenovém gelu [9]. U izolovaných buněk kostí, zatížených malým cyklickým přetvořením o vysoké frekvenci *in vitro* bylo pozorováno zvýšení produkce kostní extracelulární hmoty, stejně jak se to děje v kostech [10]; chondrocyty reagují na zatížení tlakem změnami v produkci proteoglykanů, které tvoří extracelulární matrix chrupavek [11]. Endotelové buňky umí vnímat smykové síly vyvolané tokem kapaliny a reagují expresí proteinů spojených s vázáním lymfocytů a remodelací tkání cévní stěny [12].

Tyto a mnoho dalších studií potvrdily, že mechanický faktor významně ovlivňuje buněčné procesy stejně jako hormony a další chemické regulátory. Je zřejmé, že při ovlivnění buněčných procesů mechanickým faktorem dochází k přeměně mechanického signálu na signál biochemický. Tato přeměna je označována termínem **mechanotransdukce**. Mechanotransdukce je velice složitý proces, na kterém se podílí jak mechanické (fyzické propojení extracelulární hmoty a cytoskeletu), tak biochemické (signální molekuly) mechanismy a její princip dosud není uspokojivě objasněn. Výzkum v této oblasti je zaměřen především na mechanismus této přeměny, na to jaké prvky buněčné struktury tento proces zprostředkovávají a jakým způsobem lze tento proces ovlivnit. Nové poznatky v oblasti mechanobiologie totiž naznačují, že příčiny nebo rozvoj mnoha onemocnění, která zdánlivě nesouvisí s mechanickým zatížením, mohou často úzce souviset

---

\* Nauka o původu a příčinách

† programová buněčná smrt

‡ Chondrocyty - buňky tkáně chrupavky, hepatocyty – jaterní buňky, fibroblasty – vazivové buňky

s abnormální mechanotransdukcí. Přehled těchto onemocnění (téměř ze všech odvětví medicíny), která prokazatelně nebo pravděpodobně souvisí s mechanickým faktorem je uveden v tab.1.

<b>Kardiologie</b>	Angina pectoris	CT
	Ateroskleróza	TM
	Fibrilace síní	M
	Srdeční vady	CTM?
	Hypertense	CTM?
	Intimální hyperplazie	CTM?
	Vady chlopní	T
<b>Dermatologie</b>	Sklerodermie	T
<b>Gastroenterologie</b>	Achalasie	C
	Syndrom IBS	CM?
	Zauzlení střev	CT
<b>Nephrologie</b>	Diabetic nephropathy	CTM?
	Zbytnění ledvin	CTM?
<b>Neurologie</b>	Edém mozku	T
	Vodnatelnost mozku	TC?
	Migréna	CM?
	Mozková mrtvice	CT
	Koktání	C
<b>Onkologie</b>	Rakovina	CTM?
	Metastáze	C
<b>Ortopedie</b>	Zánět obratlů	CT
	Syndrom karpálního tunelu	CT
	Chronická bolest zad	CT
	Osteoporóza	TM
	Osteoartritida	T
	Revmatická artritida	T
<b>Pediatric</b>	Vrozená hluchost	CTM
	PKD	TM
	Plicní hypertenze novorozenců	CTM?
<b>Pneumologie</b>	ARDS	CTM
	Astma	CTM?
	Rozedma plic	T
	Plicní fibróza	T
	Plicní hypertenze	CTM?
<b>Reprodukční medicína</b>	Preeklampsie	CTM?
	Sexuální dysfunkce	CM?
<b>Urologie</b>	Časté močení, inkontinence	CM?

**Tab.1** Přehled (neúplný) onemocnění, která souvisí s projevem abnormální mechanotransdukce. V pravém sloupci je uvedena pravděpodobná mechanická podstata, související se vznikem nebo rozvojem daného onemocnění. C-změny v mechanice buňky, T-změny ve struktuře tkání, M-změny v mechanotransdukcí. “?” značí nemoci, u kterých je změna v mechanotransdukcí zřejmá, ale nebyla vysvětlena. [19]

Mezi nezávažnější a nejvíce život ohrožující onemocnění úzce související z mechanickým namáháním a abnormální mechanotransdukci patří onemocnění kardiovaskulárního systému, proto se jimi podrobněji zabýváme v následující kapitole.

## 1.2 Souvislost mezi mechanickým zatížením a kardiovaskulárními chorobami

Jednu z nejčastějších příčin morbidity\* a mortality† nejen u nás, ale i v celém civilizovaném světě představují onemocnění kardiovaskulárního systému. Mezi nejzávažnější choroby patří zejména ateroskleróza a její orgánové komplikace, tedy infarkt myokardu, mozkové cévní příhody a ischemická choroba dolních končetin. Jednoznačná příčina vzniku aterosklerózy sice není známa, ale je známa řada rizikových faktorů, které se na jejím vzniku podílejí. Mezi nejznámější rizikové faktory patří např. kouření, vysoká hladina cholesterolu, hypertenze a nízká fyzická aktivita. Aterosklerotický proces však nepostihuje rovnoměrně všechna místa krevního řečiště, ale především oblasti zvýšeného mechanického namáhání (zejména oblasti bifurkace velkých tepen). Je tedy zřejmá úzká souvislost mezi vznikem patologických procesů v tepnách a **mechanickým zatížením**.

Cévní stěna je podrobena neustálému zatěžování různého charakteru. Převládají zde dva hlavní způsoby zatěžování. Jedná se o cyklické zatížení, způsobené pulzujícím krevním tlakem a o smykové zatížení, způsobené tokem krve. Nejvýznamnějším zatížením tepny je tlak krve - způsobuje trojosou napjatost ve stěně tepny, která zasahuje všechny typy buněk v tepně. Oproti tomu proudění viskózní tekutiny (krve) vyvolává smykové napětí, působící paralelně s vnitřním povrchem tepny. Je o několik řádů menší než napětí od tlaku a významně ovlivňuje jen endotelové buňky. Změny v těchto zatíženích vyvolávají změny deformačně napěťových stavů ve stěně tepny. Zatímco akutní změny v zatížení cévní stěny způsobují pouze přechodné změny konfigurace tepny, chronické změny vedou k významným změnám v geometrii, struktuře a mechanických vlastnostech stěny tepny. Například trvalé zvýšení krevního tlaku má za následek zvětšení tloušťky cévní stěny a hyperplasiu buněk hladkého svalstva v medii cévní stěny, což v důsledku vede k většímu odporu krevního řečiště [14].

Rozvoj aterosklerózy je doprovázen tzv. remodelací cévní stěny. Remodelace je čistě teleologická (účelová) reakce organismu na změnu fyziologických a mechanických podmínek v postižené oblasti, jejímž účelem je obnovení původního stavu. Například na zvýšení krevního tlaku reaguje organismus tím, že prostřednictvím zvýšené syntézy kolagenu vyztuží stěnu tepny s tendencí dosáhnout původních hodnot napětí a přetvoření. K remodelaci dochází také následkem některých chirurgických zákroků, které jsou v určitých stadiích kardiovaskulárních chorob nevyhnutelné (např. náhrada postižené části tepny cévní protézou, resekce, angioplastika, nebo použití arteriálních stentů). Remodelace v těchto případech často stojí za vznikem patologických stavů, které mají za následek v lepším případě nutnost provádět reoperace. S rozvojem operačních technik se počet těchto invazivních chirurgických zákroků neustále zvyšuje, což má za následek i zvyšující se počet komplikací, s těmito zákroky spojených, a proto je nutné zabývat se příčinami jejich vzniku. Na tomto problému pracuje v současnosti velké množství vědeckých týmů z různých vědních oborů.

**Důležitou funkci při remodelaci cévní stěny plní buňky hladkého svalstva.** Je známo, že tyto buňky se vyskytují ve stěně tepny ve dvou základních fenotypech, a to kontraktilním a syntetickým, jejichž struktura a funkce jsou zcela odlišné. Naprostá většina

---

\* Úmrtnost - demografický ukazatel, udávající podíl zemřelých z určité skupiny za určité časové období

† Nemocnost

hladkých svalových buněk v medii tepen zdravého dospělého jedince jsou fenotypu kontraktilního. Funkcí těchto buněk je především regulovat krevní tlak prostřednictvím kontrakce a relaxace (obsahují velké množství kontraktilních vláken). Oproti tomu buňky syntetického fenotypu jsou důležité při vývoji a regeneraci tepen. Jejich struktura a funkce je podobná fibroblastům - aktivně se dělí, obsahují malé množství kontraktilních vláken, ale velké množství organel, důležitých při syntéze vnitrobuněčných komponent a extracelulární hmoty (např. prokolagen, tropoelastin, proteoglykany).

Právě změna fenotypu buněk hladkého svalstva cévní stěny (fenotypická modulace) je jednou z klíčových událostí, doprovázejících závažná onemocnění kardiovaskulárního systému – aterosklerózu a hypertenzi [15].

Co přesně způsobuje tuto fenotypovou modulaci nebylo dosud objasněno, ale významný podíl je připisován mechanickému faktoru. U buněk hladkého svalstva v tomto případě dochází k přeměně mechanického signálu na biochemickou odezvu. Tento proces je iniciován na buněčné úrovni, ale v konečném důsledku se může projevit až selháním životně důležitých funkcí organismu [16][17][18].

Nejzávažnější situace, při kterých dochází k patologickým procesům v souvislosti s mechanickým namáháním:

- Remodelace tkáně v důsledku změny mechanického zatížení.
- Rozdílné mechanické vlastnosti mezi cévou a umělými cévními protézami.
- Iniciací a růst aterosklerotických plátů.
- Apoptóza (programová smrt) buněk hladkého svalstva v důsledku mechanického poškození při aplikaci angioplastiky, stentů.
- Apoptóza buněk v žilních transplantátech v důsledku změny mechanických podmínek.

### 1.3 Shrnutí

Z výše uvedeného vyplývá, že

- Mechanický podnět je významným regulátorem biochemických procesů v buňkách, stejně významným jako podnět chemický (hormony).
- U buněk dochází k přeměně mechanického signálu na signál biochemický – tzv. mechanotransdukci; mechanismus této přeměny není dosud objasněn.
- Příčina nebo rozvoj mnoha onemocnění, i těch, která zdánlivě nesouvisí s mechanickým zatížením, mohou často úzce souviset s abnormální mechanotransdukci.
- Objasnění mechanismu mechanotransdukce, toho jaké prvky buněčné struktury tento proces zprostředkovávají a jakým způsobem lze tento proces ovlivnit, by mohlo významně rozšířit možnosti léčby souvisejících onemocnění.
- Protože se jedná o velice komplexní proces, při kterém hrají významnou roli jak mechanické tak biochemické mechanismy, studium mechanotransdukce vyžaduje interdisciplinární přístup, využívající poznatků zejména biochemie, biologie, fyziologie, patologie a biomechaniky.

## 2 Formulace problému, metoda a cíle řešení

### 2.1 FORMULACE PROBLÉMU

Pro popis mechanického chování buňky a fyzikální podstaty principu mechanotransdukce je nezbytné zaměřit se na studium živé 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 o jejích mechanických vlastnostech.. Výzkum mechanického chování buněk se provádí jednak na základě experimentů a jednak s využitím **výpočtového modelování**.

Experimentální metody slouží především k určování mechanických vlastností buňky na základě měření mechanických či biochemických odezev buňky (případně její části) na deformační či silové zatížení. Výstupem těchto experimentů je nejčastěji jistá závislost mezi zatížením buňky a její silovou, deformační, případně biochemickou odezvou. Na základě výsledků těchto experimentů je možno na určité úrovni odhadovat mechanické vlastnosti buněk, případně jejich lokálních oblastí a komponent. K dostatečnému popsání mechanického chování buňky to ale nestačí, zejména z toho důvodu, že buňka je velice složitý miniaturní objekt (tvoří hierarchicky uspořádaný systém), navíc objekt živý (tudíž dynamický) se složitou vnitřní strukturou s různorodými mechanickými vlastnostmi.

Jednou z možností, jak se pokusit popsat mechanické chování buňky na základě experimentálních dat, může být využití výpočtového modelování. Nejprve je nutné najít vhodný model, který by se svým mechanickým chováním co možná nejvíce přiblížil chování reálné buňky (toto chování lze odhadnout na základě experimentů) a potom je nutné identifikovat jeho parametry na základě výsledků experimentálního vyšetřování mechanických vlastností buněk.

Dílčí konkrétní problém, který má být řešen v této práci, byl naformulován takto:

**Navrhnout, vytvořit a otestovat výpočtový model mechanického chování buňky na úrovni současného stavu poznání a přizpůsobit tento model pro výpočtové simulace různých mechanických zkoušek, prováděných na buňkách.**

### 2.2 METODA ŘEŠENÍ

Návrh výpočtového modelu bude proveden na základě podrobného studia dostupných informačních zdrojů, týkajících se problematiky fyziologie a anatomie buňky, experimentálního vyšetřování mechanických vlastností buněk a problematiky výpočtového modelování v oblasti biomechaniky buňky. Vytvoření a otestování navrženého výpočtového modelu bude provedeno v MKP programovém systému ANSYS.



### 2.3 CÍLE ŘEŠENÍ

Cílem řešení je vytvoření strukturního výpočtového modelu buňky, umožňujícího provádění výpočtových simulací různých mechanických zkoušek.. K vyřešení tohoto problému je třeba splnit několik dílčích cílů:

- Provést rozbor dostupných informačních zdrojů z oblasti experimentálního vyšetřování mechanického chování buněk.
- Provést rozbor dostupných informačních zdrojů z oblasti výpočtového modelování mechanického chování buněk.
- Navrhnout a vytvořit vhodný výpočtový model buňky, zahrnující z mechanického hlediska podstatné buněčné komponenty.
- Využít vytvořeného modelu buňky pro tvorbu výpočtových modelů k simulování mechanických zkoušek a odladit je.
- Provést citlivostní analýzy vlivu jednotlivých parametrů modelu na výsledky výpočtových simulací za účelem posouzení jeho použitelnosti, případně k upřesnění jeho parametrů.
- Porovnání vlastností modelu s experimentálně zjištěnými poznatky.

### 3 Mikroanatomie a fyziologie eukaryotní buňky

Buňka je základním prvkem mnohobuněčného živého organismu. Je schopna realizovat tyto základní funkce organismu: zrodit se a vyvíjet, realizovat látkovou výměnu, využívat dědičně vrozené vlastnosti a schopnosti, plnit specifické funkce, případně se pohybovat a buněčným dělením se rozmnožovat. Život každé buňky je časově omezený. Nové buňky vznikají dělením a zanikají dalším dělením nebo smrtí. Výjimkou jsou buňky rakovinné, které se mohou dělit neustále. V lidském organismu je cca  $10^{18}$  buněk.

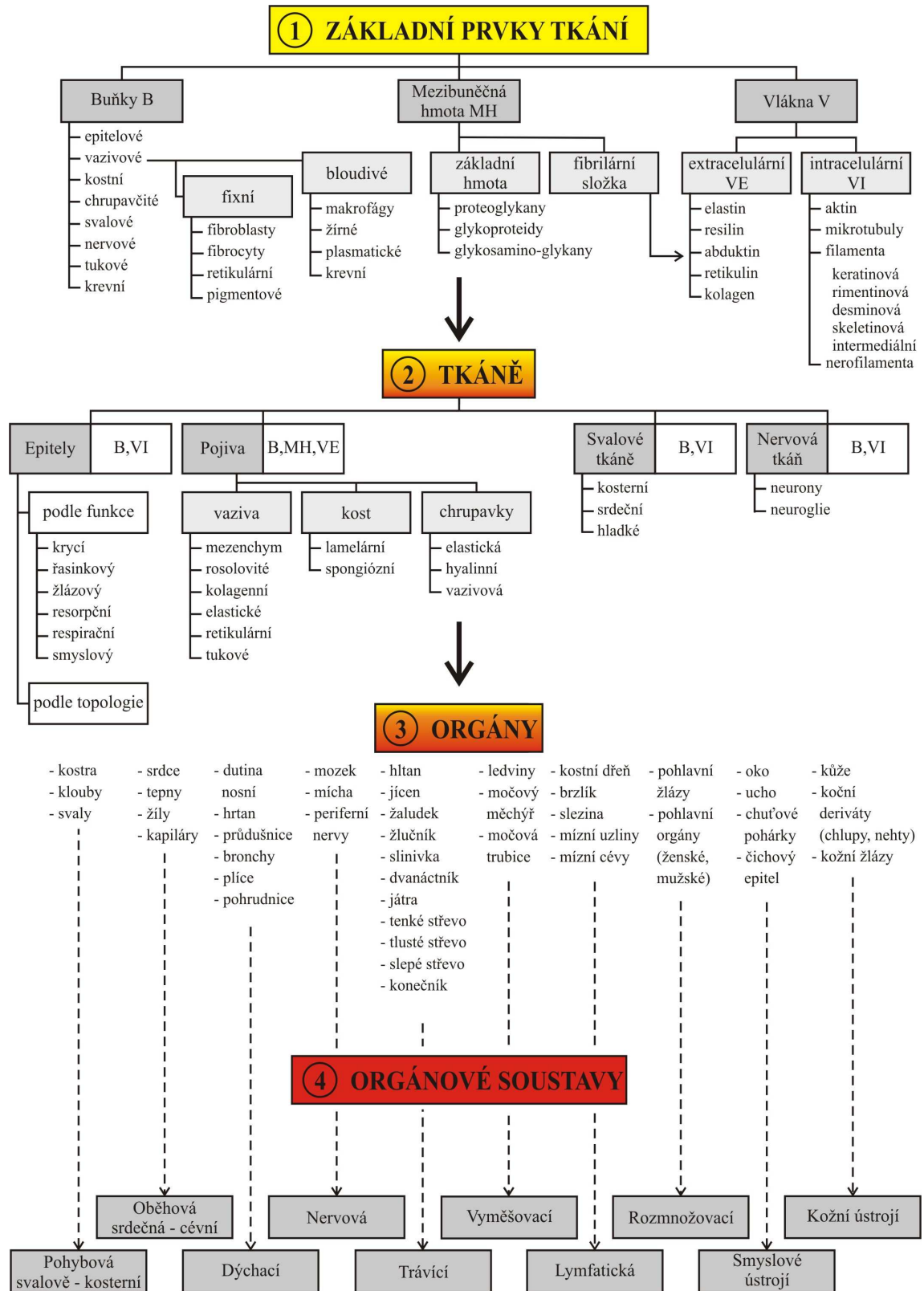
Jednotlivé tkáně, jež jsou základním prvkem různých tělesných orgánů, jsou seskupením různě specializovaných buněk (obr. 1); obecná buňka tedy neexistuje. Specializované buňky mají i svá specifická jména, jejichž základem je řecká slovní částice „*cyto*“, která ve složených slovech vyjadřuje jejich vztah k buňkám živých organismů. Uvedme tyto ilustrativní příklady: buňka kostní tkáně je *osteocyt* (řecké „*osteo*“ vyjadřuje vztah ke kosti), buňka chrupavky je *chondrocyt* (řecké „*chondro*“ vyjadřuje vztah ke chrupavce), *synovialocyt* je buňka synoviální kapaliny, s krevní plazmou jsou spojeny názvy erytrocyty, leukocyty atd. Tento „specializační proces“ se v biologii označuje jako ***buněčná diference***. Základní členění buněk spočívá v tom, zda jejich struktura obsahuje jádro (tzv. *eukaryota*) nebo jádro neobsahuje (tzv. *prokaryota*) s těmito základními charakteristikami:

- ***Eukaryotní buňky*** (eukaryota) obratlovců, do nichž patří i člověk, mají pravé jádro (karuon = jádro). Jak bude analyzováno v dalším textu, eukaryota jsou ohraničena plasmatickou membránou, která odděluje cytoplasmu uvnitř buňky od intersticiální tekutiny nacházející se mimo buňku. Eukaryota obsahují řadu funkčních prvků, tzv. membránových organel.
- ***Prokaryotní buňky*** (prokaryota) neobsahují buněčné jádro a jiné organely. Jejich DNA je obnažena a umístěna v cytoplasmě v útvaru označovaném jako ***nukleotid*** v jediném chromosomu.

Uvedenými konstatováními by kdysi „klasičké“ biomechaniky končily, protože se zabývaly především biomechanikou na makroúrovni. Současné trendy ve vědě způsobují, že o buňky se intenzivněji nezajímají jenom biologové, ale i biomechanici z hlediska jejich deformačně-napětových stavů, mechano-biologického přenosu informací z okolí buňky do jejího vnitřku atd. Zmíněnými trendy jsou:

1. snaha pronikat k podstatám struktur a procesů neživých i živých entit, což je možno pouze na úrovni piko až mikrostruktur,
2. rozvoj nanotechnologií, genetického, tkáňového, enzymového a dalších nano- a mikroinženýrství.

Po tomto nutném a stručném úvodu je možno analyzovat buňku systémově, protože buňka je ***systémovým objektem***. Má svou ***strukturu***, tvořenou membránou, cytoplasmou a buněčnými organelami, ***vazby*** na své okolí (na extracelulární prostor, na jiné buňky) a svá ***cílová chování*** v podobě své funkční specializace. Takto pojaté systémové pojednání o buňce by bylo náplní pro samostatnou publikaci. Vzhledem k omezenému rozsahu této práce je možno zde naznačit pouze některé aplikovatelné atributy, a to atribut strukturovanosti (analýza struktury buňky) a atribut otevřenosti (analýza vazeb buňky na okolí)[20].

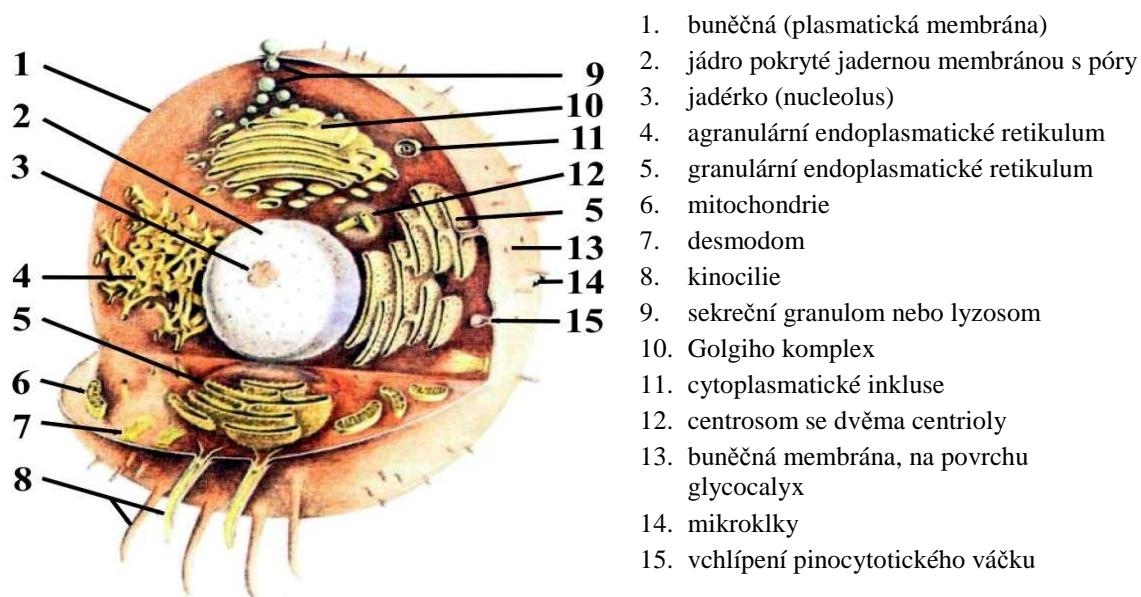


obr. 1 Hierarchická struktura prvků lidského organismu [20]

### 3.1 KOMPLEXNÍ STRUKTURA BUŇKY

Buňka je základním prvkem živých organizmů v tom smyslu, že žádná část její struktury umístěna mimo buňku není schopna samostatného života. Buňka je samostatnou funkční a účelovou soustavou, jejíž detailní strukturu tvoří množina prvků uvedených na obr. 2. Při „hrubším“ členění struktury buňky se jako základní prvky uvádí:

- **Plasmatická (buněčná) membrána**; odděluje vnitřek buňky od jejího okolí.
- **Jádro buňky** – jeho prvky jsou jaderná membrána, chromatin, jadérko a jaderná matrix.
- **Cytoplazma** – ta se skládá z těchto komponent: základní hmoty, buněčných organel, cytoplazmatických inkluzí a cytoskeletu.



obr. 2 Struktura buňky [20]

### 3.1.1 Členění buněk

V lidském organizmu se nachází více než 200 různých typů buněk. Buňky jsou základními prvky struktury čtyř typů „tuhých“ tkání, konkrétně epitelů, pojiva, svalové tkáně a nervové tkáně a lidských tekutin: krve, synoviální tekutiny a lymfy.

V souladu se strukturou tuhých tkání na obr. 1 existují buňky epitelové, vazivové, kostní (osteocyty), buňky chrupavky (chondrocyty), buňky svalové (příčně pruhované, hladké, srdeční), buňky tukové (adipocyty) a buňky nervové. V lidských tekutinách existují buňky krevní (červené krvinky – erytrocyty, bílé krvinky – leukocyty, krevní destičky – trombocyty), buňky synoviální kapaliny (synovialocyty) a buňky v lymfě (lymfocyty). Buněčnou organizaci tkání udržují tyto tři faktory: mezibuněčná komunikace, selektivní mezibuněčná adheze, buněčná paměť.

Buňky lze členit i podle toho, ve kterém orgánu či soustavě se nacházejí. Existují buňky jaterní, v mozku jsou buňky paměťové, v srdci buňky Purkyňovy, obaly nervových vláken jsou ze Schwannových buněk, v zažívacím traktu jsou buňky hlavní, krycí (parietální), gastrinové, mucinózní (produkují hlen), histaminové atd. Se smysly souvisí buňky čichové a chuťové, v imunitní soustavě existují tzv. cytotoxické buňky typu T-killer (buňky zabíjející nezdravé buňky) atd.

Samostatné členění mají buňky vazivové, a to na **buňky fixní** (fibroblasty, fibrocyty, retikulární buňky, tukové buňky, pigmentové buňky) a buňky bloudivé (makrofágy, žírné buňky, plazmatické buňky a v širším smyslu buňky krevní).

**Zárodečné buňky** jsou specializované na založení člověka. Jsou to buňky pohlavní (vajíčko, spermie; společný název je **gamety**), které obsahují poloviční počet chromosomů než ostatní buňky v organizmu. V gametách je 22 autosomů náhodně vybraných z každého z 22 párů chromosomů DNA a 1 pohlavní chromosom.

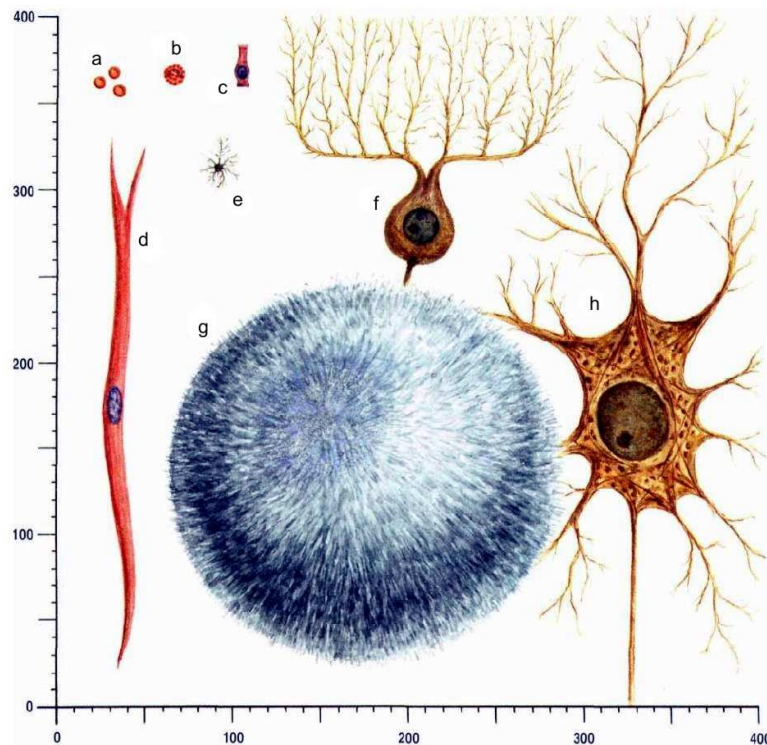
Jeden z X chromosomů je ve vajíčku. Ve spermii je chromosom X nebo Y. Kombinace dvou chromosomů **XX** v buňkách charakterizuje **ženské pohlaví**. **Mužské pohlaví** má kombinaci chromosomů **XY**.

**Kmenové buňky** jsou základními strukturními prvky vícebuněčných organizmů. Mají dvě základní vlastnosti: mohou vytvářet další kmenové buňky, mohou diferencovat ve specializované buňky, např. neurony, krvinky apod. Kmenové buňky lze členit podle toho, jak jsou použitelné a kdy a kde se vytvořily v průběhu vývoje organismu.

**Pluripotentní kmenové buňky** mohou být východiskem pro tvorbu všech typů specializovaných buněk. Nejvhodnějšími jsou embryonální kmenové buňky myši i lidské (embryonic stem cell = ES), protože vykazují neomezené samoobnovování v nediferencované formě a velmi širokou diferenciací schopnost. Podobné vlastnosti mají i embryonální zárodečné buňky (embryonal germ cell = EG). Zástupci ES a EG z blastocysty lidského zárodku se mohou diferencovat na řadu různých typů somatických buněk. Kmenové buňky z tkání dospělých jedinců jsou ve svých schopnostech růstu a diferenciaci více omezeny. Bylo prokázáno, že tyto buňky nejsou tkáňově specifické, a že též mohou diferencovat na buňky různých typů tkání. Např. po transplantaci kostní dřeně byla možná diferenciaci jejich buněk na buňky epitelu plic, střeva, žlučových cest, jater, kůže apod. A naopak, kmenové buňky nervové nebo svalové se diferencovaly na buňky hematopoetické (krvetvorné)[20].

### 3.1.2 Tvar a velikost buněk

Základním tvarem buněk je kulovitý tvar, jak je znázorněno na obr. 2. Tento tvar mají buňky uložené volně v řidším nebo kapalném prostředí. Jsou-li buňky namáhány na tah mění se jejich tvar na vřetenovitý. Vřetenovitý tvar buněk hladkého svalstva v tepnách je zřejmě způsoben předpětím, které v těchto buňkách vzniká během vývoje jedince. Po uvolnění buněk ze stěny tepny nabývají kulovitý tvar. Různé tvary buněk a jejich velikosti jsou znázorněny na obr. 3.



obr. 3 Typy buně - k nejmenším buňkám patří drobné nervové buňky(e), jejichž rozměry jsou kolem 3 µm. Do skupiny malých buněk patří též buňky krve. Krevní destička (a) (trombocyt) má průměr 2 až 4 µm. Červená krvinka (b) (erytrocyt) má průměr 7,4 (± 0,5) µm. Bílé krvinky (c) vytváří celou množinu různých druhů buněk. Lymfocyt má průměr 6 až 8 µm, bazofilní granulocyt 9 až 10 µm, neutrofilní granulocyt 10 až 12 µm a monocyt 15 až 25 µm. Purkyňova buňka mozečku (f) má rozměr cca 60 µm a více. Velké motorické buňky míšni (h) mají velikost až přes 100 µm. Lidské vajíčko(g) má rozměr 200 až 250 µm. Tato „nadměrná“ velikost je dána tím, že obsahuje velké množství výživných látek pro příští plod.

### 3.1.3 Struktura eukaryotní buňky

- **Plasmatická (buněčná) membrána** – odděluje vnitřek buňky, tzv. intracelulární prostor od okolí buňky, tzv. extracelulárního prostoru.
- **Jádro buňky** – jeho prvky jsou jaderná membrána, chromatin, jadérko a jaderná matrix.
- **Cytoplazma** – skládá se z těchto komponent: základní hmoty, buněčných organel, cytoplasmatických inkluzí a cytoskeletu. Ten bývá některými fyziology považován za samostatný prvek struktury buňky.

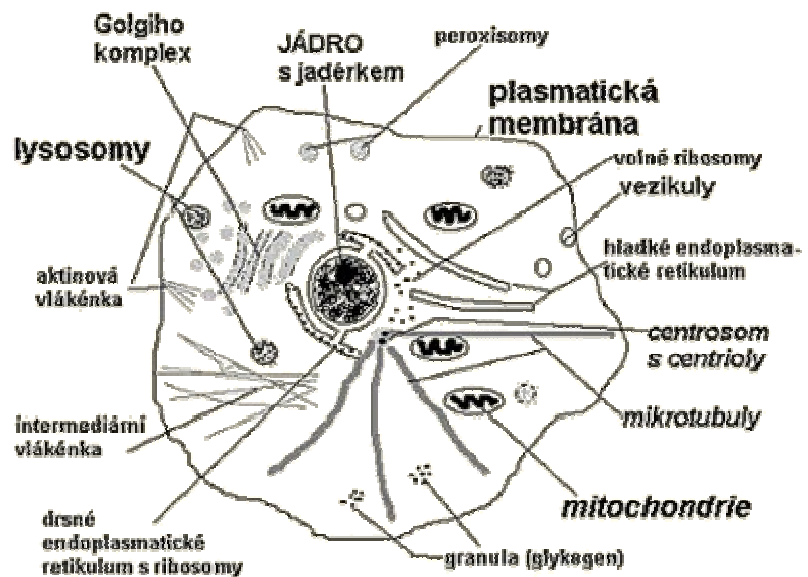
Prvky významné z mechanického hlediska budou dále analyzovány podrobněji.

#### Plasmatická membrána

(též cytoplasmatická membrána, resp. buněčná membrána) - je to strukturně složitý útvar, který ohraničuje tělo buňky, zajišťuje její celistvost a umožňuje vazby s okolím buňky. Průměrná tloušťka této membrány je cca 7 nm.

Základními složkami plasmatické membrány jsou *tuky* (lipidy, především *fosfolipidy* a *cholesterol*), které vytvářejí kolem cytoplazmy „tyčkový plot“ a *proteiny*, které jsou

v tomto plotě, plní funkce „vrat“, jimiž je buňka spojena se svým okolím. Membránové proteiny plní přinejmenším sedm funkcí. Např. jsou součástí iontových kanálů, kterým zajišťují aktivní a spřažený transport látek přes membránu (viz dále), plní funkci receptorů (jsou schopny vázat neurotransmitery a hormony, které v buňce realizují fyziologické změny), mají funkci *antigenů* a slouží k rozlišování vlastních struktur od jiných.



obr. 4 Struktura živočišné buňky (podle [21]).

#### Jádro buňky

Je součástí všech buněk schopných reprodukce (eukaryotní buňky). Tvar jádra je závislý na druhu buňky, může být kulovitý, vřetenovitý, ledvinovitý atd. a jeho rozměry jsou od 3 do 20  $\mu\text{m}$ . Jádro obsahuje genetické informace pro všechny buněčné funkce, včetně autoreprodukce, zakódované v chromosomech. Buňka bez jádra zahyne. Strukturu jádra tvoří tyto prvky: jaderná membrána, jaderná tekutina, chromatin a jadérko.

## Cytoplasma

### ▪ *Buněčné organely*

Jsou součástí cytoplazmy a tvoří je: endoplasmatické retikulum (drsne a hladké), ribosomy, Golgiho komplex, mitochondrie a lyzosomy. Organely tvoří asi polovinu objemu buňky, přičemž jejich povrch je až desetkrát větší než povrch buněčné membrány.

- **Cytoskelet** – Na nejobecnější úrovni lze konstatovat, že cytoskelet je tvořen množinou bílkovinných vláken různých druhů, která jsou rozmístěna v cytoplazmě a plní zde různé funkce. Prvky cytoskeletu zajišťují časovou stálost a současně i proměnnost tvaru buňky (tedy její odpor proti deformaci), slouží k transportu informací tělem buňky, k dynamické organizaci cytoplazmy (přesuny organel a chromosomů v buňce), k pohybu buněk apod. Cytoskeletální množina má tyto základní prvky: mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediální filamenta (střední) [20].

## 3.2 STRUKTURA A FUNKCE CYTOSKELETU

Slovo *cytoskelet* je složeno ze dvou řeckých výrazů: *cyto* ... vyjadřuje ve složených slovech jejich vztah k živočišným nebo rostlinným buňkám, *skelet* znamená kostru. Cytoskelet je tedy kostra buněk. Ze strukturního hlediska je cytoskelet tvořen množinou bílkovinných vláken různých druhů (strukturně, materiálově, vazebně), umístěných na různých místech a v různých směrech v cytoplazmě, kde plní různé funkce související s funkcemi buňky. Podle polohy bílkovinných vláken, ve vztahu k buněčné membráně, bylo zavedeno toto členění:

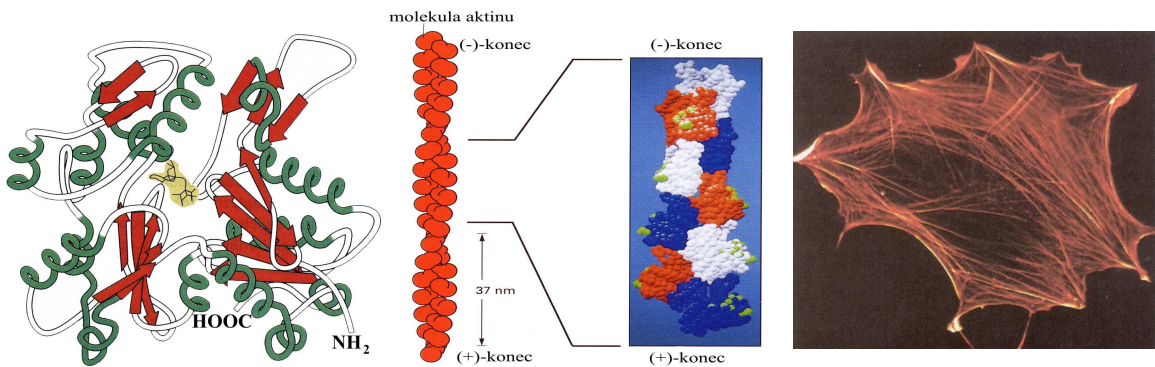
- **Membránový skelet** (actin cortex) – nachází se těsně po buněčnou membránou a je tvořen svazky aktinových vláken (mikrofilamenta). Ta jsou z jedné strany napojena na membránové proteiny buněčné membrány a prostřednictvím tzv. integrinů (viz dále) propojena s mimobuněčným (extracelulárním) prostorem, z druhé strany jsou spojena s prvky endoskeletu.
- **Vnitřní skelet** (endoskelet, deep skeleton) – nachází se uvnitř buňky, tj. v intracelulárním prostoru a převážně je tvořen intermediálními filamenty a mikrotubuly.

Z hlediska funkce cytoskeletu, lze na obecné úrovni konstatovat: Aktinová vlákna membránového skeletu „vyztužují“ buňku po mechanické stránce, u některých buněk se též podílejí na pohybu buňky jako celku, pohybu dceřiných chromosomů při dělení buňky atd. Souhrnně řečeno zajišťují časovou stálost a současně i proměnnost tvaru buňky. Intermediální filamenta plní v buňce taktéž „vyztužující“ funkci, obdobně jako „armovací dráty“ v železobetonu. Zcela odlišná je funkce mikrotubulů, které jsou součástí „dopravní soustavy“ v buňce, konkrétněji jsou „kolejnicemi“, po nichž se pohybují některé molekulové motory (kinesinové a dyneinové). Tyto motory zajišťují v buňce „dopravu“ jednotlivých buněčných organel, vezikul apod. O těchto strukturních prvcích bude nyní pojednáno podrobněji podle [20].



### 3.2.1 Mikrofilamenta

Jsou to velmi tenká vlákna složená z bílkoviny aktinu, jejíž molekula je tvořena 375 aminokyselinami. Struktura molekuly aktinu je na obr. 5. Uprostřed této molekuly je jedno vazebné místo pro ATP (na obr. 5 je vyznačeno žlutě). Nepolymerizovaný aktin se označuje jako **G-aktin**. Molekuly G-aktinu mají schopnost spojovat se ve vlákna, v tzv. **F-aktin**. Mikrofilamenta mají tvar dvoušroubovice, tvořené dvěma okolo sebe obtočenými vlákny F-aktinu se stoupáním 37 nm, tloušťku cca 7 nm a délku až několik  $\mu\text{m}$ . Mezi vlákny F-aktinu existují silné interakce, takže šroubovice se nemůže rozvolnit. Mikrofilamenta jsou polarizována, mají tedy plus-konec (na tomto konci rostou) a minus-konec (zde se odbourávají), obr. 6. Na obr. obr. 7 je snímek z elektronového mikroskopu mikrofilament fibroblastu.

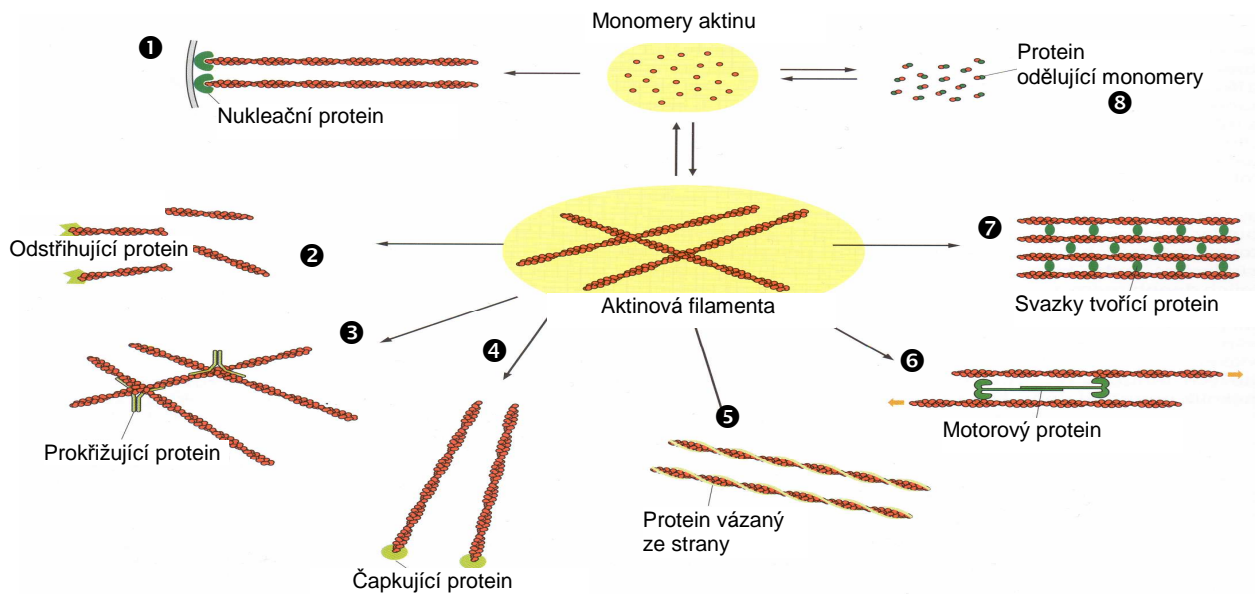


obr. 5 Struktura molekuly aktinu [20]

obr. 6 Aktinové vlákno [20]

obr. 7 Mikrofilamenta ve fibroblastu [20]

V živočišné buňce se aktin nachází ve dvou formách: asi polovina jako volný monomer v cytosolu, druhá polovina ve formě mikrofilament. Existuje mnoho bílkovin (zatím 48), tzv. **asociovaných proteinů** s mikrofilamenty, která se vážou na aktin a vytvářejí entity s různými funkcemi. Některé z těchto vazeb jsou na obr. 8.

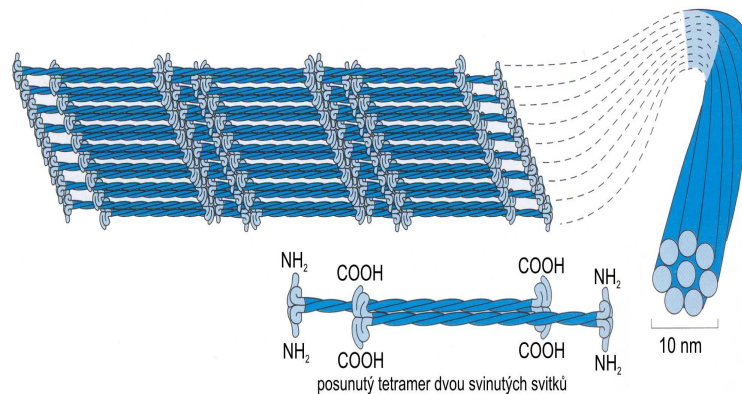


- 1) **Nukleační protein**, který iniciuje vytváření aktinového vlákna z aktinových monomerů – proces vytváření filopodií (výběžků buněk).
- 2) Protein **gelsolin** člení aktinová vlákna na kratší úseky (je to tzv. odstřihující protein), čímž zvyšuje tekutost aktiniových gelů.
- 3) Protein **filamin** spojuje zkřížené vlákna (tvoří příčné spojky) – aplikace: buněčný kortex, ležící těsně pod buněčnou membránou.
- 4) **Čapkový protein** (blokuje konce vláken).
- 5) Protein **tropomyozin** se na aktinové vlákno váže z boku, jako další copánek – aplikace při kontrakci sarkomery svalu.
- 6) Motorový protein **myozin-II**, navazuje se na aktinová vlákna doplněná tropomyozinem a zajišťuje např. kontrakci sarkomery.
- 7) Proteiny **fimbrin**,  **$\alpha$ -aktinin** a **fascin** spojují paralelně uspořádaná aktinová vlákna do svazků – aplikace v mikroklcích.
- 8) Protein oddělující monomery.

obr. 8 Hlavní skupiny bílkovin (proteinů) asociovaných na aktin [20]

### 3.2.2 Intermediární filamenta (střední filamenta)

Jsou to filamenta střední tloušťky (průměr 10-12 nm). Základní stavební jednotkou intermediárních filament je *tetramer*. Ten je základem pro hierarchicky vyšší struktury – *protofilamenta*. Osm protofilament vytváří *intermediární filamentum* (obr. 9). Tato filamenta mají v buňkách stejnou funkci jakou „armovací železo“ v železobetonu. Nejsou tvořena jedním „univerzálním“ proteinem, ale různě diferencované buňky mají intermediární filamenta tvořena různými *základními proteiny*. Tyto se spojují s tzv. *asociovanými proteiny* – obecně jejich funkce není zcela objasněna, některé spojují intermediární filamenta do hrubších svazků, jiné je připojují k cytoskeletu nebo na jiné buněčné struktury.



obr. 9 Intermediární filamentum [20]

#### Základní typy filament

**Cytokeratinová filamenta (cerokeratinová)** – asociovanými proteiny jsou filagrin, plektin, dermoplakin. Keratiny tvoří nejvíce různorodou množinu bílkovin vytvářejících intermediární keratinová filamenta. Jeden typ se nachází v různých epitelích (střevní výstelka). Keratinová vlákna jsou v epitelálních buňkách natažena napříč celou cytoplazmou a filamenta sousedních buněk jsou spojena nepřímo pomocí buněčných kontaktů, tzv. desmosomů. Keratinová vlákna jsou přímo zakotvena v desmodomech a mají zde velký mechanický význam, protože jsou velmi odolná proti přetržení. Při poruše vzniká onemocnění zvané epidermolysis bullosa (křehká kůže). Jiné typy jsou součástí kůže, nehtů, kopyt, peří a šupin živočichů. Peří a šupiny představují pro ně mechanickou a tepelnou ochranu, chrání je před ztrátou vody a maskují je.

**Vimentinová filamenta** – jsou v mezenchymových buňkách, dále v buňkách pojivových tkání, ve svalových a neurogliových buňkách. Nacházejí se též v cytoplasmě vazivových buněk fibroblastů a fibrocytů, v četných epitelových buňkách (např. v cévách).

**Desminová a skeletinová filamenta** – vyskytují se v buňkách hladkého svalstva a v Z-discích příčně pruhovaného kosterního a srdečního svalstva. Desmocollin a desmoglein se vyskytují jako spojovací prvky v desmosomech.

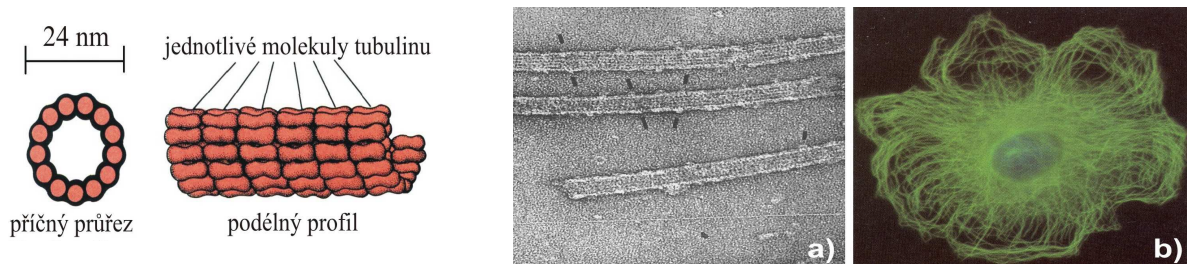
**Neurofilamenta** – jsou přítomny po celé délce axonů v nervových buňkách – vytvářejí zde jejich mechanickou výztuhu.

**Jaderná lamina** – jsou tvořena proteiny zvaných *laminy* – vytvářejí plošnou síť, která vystylá a zpevňuje vnitřní jadernou membránu. **Gliové fibrilární kyselé proteiny** se nacházejí v gliových buňkách.

### 3.2.3 Mikrotubuly

Jsou největšími elementy cytoskeletu, o šířce 30 nm. Jsou tvořeny bílkovinou zvanou *tubulin* (2 typy: A a B). Mikrotubuly jsou pak tvořeny 13 paralelními protofilamenty AB-dimerů, které jsou poskládány tak, že vytvoří dutý válec - mikrotubulus. Poskládání jednotlivých A a B-tubulinů v protofilamentu na sebe se děje opačnými konci; proto jsou mikrofilamenta polárními útvary, a to s plus (narůstajícím) a minus (začínajícím) koncem. Každá molekula tubulinu váže 2 molekuly GTP (guanointrifosfát).

*Funkcí mikrotubulů* je participovat na intra- i extracelulárním pohybu, spojovat se s jinými proteiny jako s *dyneinem* a vytvářet tak kontraktilní sílu pro pohyb řasinek a bičíčků. Mikrotubuly vytvářejí dráhy, po kterých se pohybují intracelulární váčky

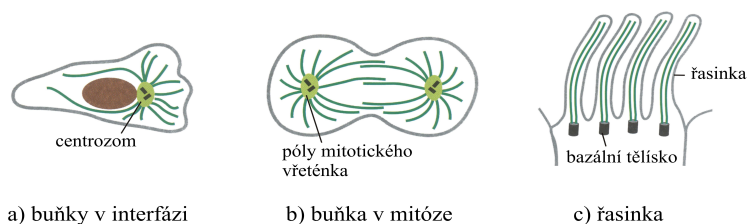


obr. 10 Struktura mikrotubulů[20]. obr. 11 Izolované mikrotubuly (a) a mikrotubuly v buňce (b)[20].

a organely. Tento pohyb vyžaduje energii poskytovanou hydrolyzou ATP a je realizován proteiny zvanými *molekulové motory*: (a) kinesinem, který posunuje váčky z minus-konce na plus-konec mikrotubulu, a (b) proteinem MAP1C, který je podobný dyneinu a který posunuje váčky na opačnou stranu než kinesin. Mikrotubuly hrají též důležitou úlohu při mitotickém dělení tím, že vytvářejí *mitotické vřeténko*.

Na obr. 12 jsou schémata těchto tří typických míst výskytu mikrotubulů:

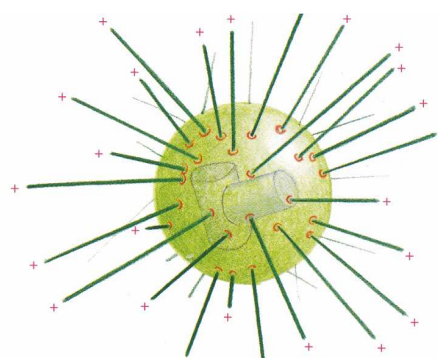
- Je-li buňka v interfázi (období plnění své funkce), pak mikrotubuly vycházejí z organizačního místa, tzv. **centrosomu**, tvořeného dvěma centriolami a vytvářejí množinu drah, podél nichž molekulové motory transportují váčky, organely a další buněčné prvky.
- Když buňka vstupuje do fáze dělení (mitózy), cytoplazmatické mikrotubuly se rozpadají a vytvářejí složitou soustavu, tzv. **dělicí vřeténko** (mitotické), které má dva póly. Dělicí vřeténko obsahuje nástroje, které umožní, aby chromosomy byly rozděleny mezi obě dceřiné buňky.
- Mikrotubuly jsou i „konstrukčními“ prvky centriol, řasinek a bičíčků. U řasinek vyrůstají mikrotubuly z tzv. **bazálních tělísek**.



obr. 12 Místa výskytu mikrotubulů v buňce

### Vytváření mikrotubulů jako proces samoorganizace

Mikrotubuly vyrůstají z tzv. organizačního centra – **centrosomu**, které se obvykle nachází blízko buněčného jádra. Centrosom organizuje svazky mikrotubulů, které prorůstají cytoplazmu a směřují od něho k buněčné membráně. Nukleačními místy, z nichž vyrůstají mikrotubuly, jsou prstencové útvary, tzv.  **$\gamma$ -tubulinové prstence** (na obr. 13 červené kroužky). Centrosom je „továrna“ na výrobu mikrotubulů z bílkoviny **tubulinu**. Součástí centrosomů jsou dvě vzájemně kolmé **centrioly**. Jsou to válcovité struktury (průměr cca 0,15  $\mu\text{m}$ , délka až 0,5  $\mu\text{m}$ ) složené z mikrotubulů. Prvky struktury centriolu tvoří 9 sad mikrotubulárních tripletů (mají tři mikrotubuly – subfibrily A, B, C), přičemž triplety jsou spojeny bílkovinnými spojkami. Dvojice centriolů vytváří tzv. **centriolární komplex** (též **centrosom**), v němž se z tubulinu vytvářejí mikrotubuly.



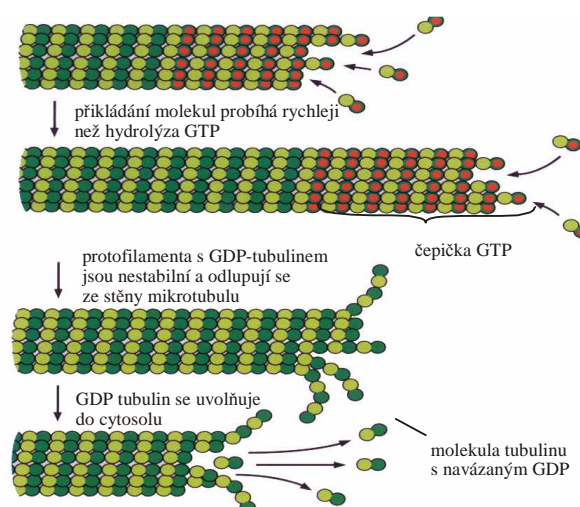
obr. 13 Mikrotubuly vyrůstající z nukleačních míst na centrosomu

Mikrotubulus vykazuje zvláštní chování, tzv. **dynamickou nestabilitu**. Ta spočívá v tom, že mikrotubulus chvíli roste, pak se zkracuje, někdy úplně vymizí a ze stejného místa začne růst nový. Dynamická nestabilita je projevem **samoorganizace**. Mikrotubulus je **reakčně-difuzní soustavou**, v nichž probíhají chemické reakce i difuzní procesy.

Každá tubulinová molekula obsahuje vazební místa pro GTP a GDP, které, z pohledu samoorganizace, mají funkci aktivátoru a inhibitoru. Zkratka GTP označuje ribonukleotid **guanisintrifosfát**. Hydrolýzou se GTP mění na **guanindifosfát** (GDP). Zde je vhodné si uvědomit analogii ze štěpení ATP na ADP.

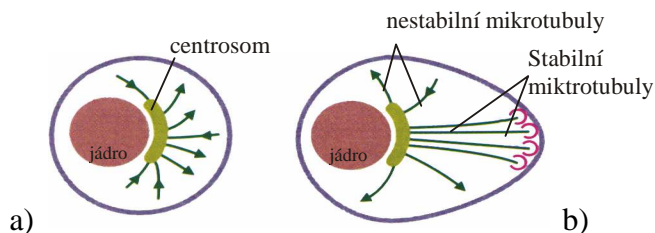
**GTP má** v samoorganizaci mikrofilament **funkci aktivátoru**. Při navázání GTP na molekulu tubulinu vzniká komplex „tubulin-GTP“ a nastává polymerizace, při níž mikrotubuly vznikají a rostou. Naváže-li se na molekulu tubulinu GDP, vznikne komplex „tubulin-GDP“. Jelikož GDP má funkci **inhibitoru**, dochází k hydrolýze, při níž se mikrotubuly rozpadají.

Proces růstu a rozpadu je náhodný a je řízen zpětnou vazbou. Pokud se rostoucí mikrotubulus uchytil na nějakou buněčnou entitu (např. na endoplazmatické retikulum, na buněčnou membránu apod.) prostřednictvím tzv. **čapkovacího proteinu**, nastává relativně stabilní spojení mezi touto entitou a centrosomem. Pokud se neuchytil je dán signál k rozpadu mikrotubulu.



obr. 14 Růst (nahore) a rozpad (dole) mikrotubulu

Na obr. 15 je znázorněna nepolarizovaná buňka (a) s novými mikrotubuly, které vyrůstají z centrosomu zcela náhodně všemi směry. Navázáním mikrotubulu na čapkový protein (b) nastane stabilizace volného plus-konce mikrotubulu. Tato selektivní stabilizace způsobí silnou polarizaci buňky. Je-li to u buňky, která je již



obr. 15 Stabilní a nestabilní mikrotubuly

diferencována do specializovaného buněčného typu a fixována v určité pozici, tak struktura mikrotubulů je bílkoviny stabilizována proti rozpadnutí. Když buňka vstupuje do etapy dělení (mitózy), mikrotubuly se stávají nestabilními, střídavě rostou a smršťují se, tím se přeskupují a vytvářejí mitotické vřeténko (obr. 12).

### 3.3 OKOLÍ BUNĚK – EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Důležitou součástí systémového pojetí určité entity, zde buňky, je ovlivnění probíhajících dějů jejím okolím. V souladu se strukturou na obr. 1 je **okolí buňky** tvořeno **mimobuněčnou hmotou**, tzv. **extracelulární matrix** (ECM), která je produkována buňkami. Lze ji členit na základní hmotu a fibrilární složku. Tyto dvě složky, spolu s fixními a bloudivými buňkami, vytváří pojivovou tkáň.

**Funkce extracelulární matrix** – ECM plní v tkáních několik nezastupitelných funkcí, především tyto:

- *funkce topologicko-geometrická* (ECM udržuje rozložení a tvar tkání v orgánech),
- *funkce vazbová* (propojuje různé tkáně do určitých celků),
- *funkce mechanická* (dává tkáním určité mechanické vlastnosti, zejména pevnost a tuhost; zajišťuje spojitost tkání; orgány se mohou pohybovat jako celek),
- *funkce informační* (podílí se na komunikaci mezi buňkami; detekuje, vytváří nebo koordinuje chemické signály),
- *funkce nutriční* (přísun živin do buněk, odvod metabolitů),
- *funkce obranná* (ECM vytváří bariéru proti pronikajícím mikroorganizmům),
- *funkce léčebná* (účastní se procesu hojení defektů tkání, léčení zánětů).

#### **Prvky základní hmoty ECM**

- *Glykosaminoglykany* – jsou to tyto nevětvené polysacharidy: chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát, keratansulfát, dermatansulfát, heparansulfát, kyselina hyaluronová.
- *Proteoglykany* – jsou to glykosaminoglykany, s výjimkou hyaluronové kyseliny, navázané kovalentní vazbou na centrální bílkovinu.
- *Glykoproteiny* – jsou to sloučeniny s bílkovinnou složkou, ke které jsou kovalentně připoutány cukry (sacharidy). K důležitým glykoproteinům patří: fibronektin, chondronektin, laminin.

#### **Prvky fibrilární složky ECM**

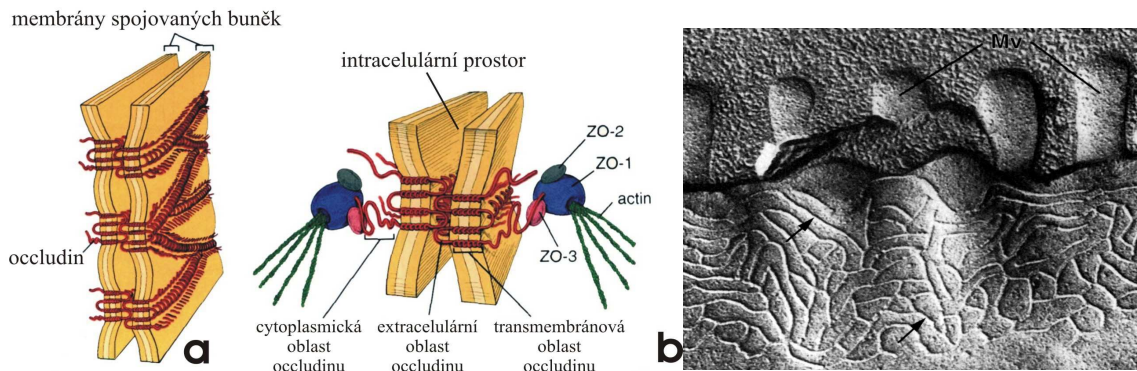
kolagen, elastin, abduktin, retikulín, aktin a další vláknitovorné bílkoviny.

### 3.4 BUNĚČNÉ VAZBY

#### 3.4.1 Realizace vazeb mezi buňkami

Buňky se lidském organismu vyskytují buď jako volné nebo jako vzájemně vázané, čímž vytvářejí vyšší strukturní celky (tkáně). Spojení buněk je realizováno **mezibuněčným vazbami** (spojeními). Vedle **klasického propojení buněk**, které se uskutečňuje zasunutím buněčných výběžků existují i **spojení specializovaná**. Ta jsou rozčleněna na tyto typy: spojení **utěšňující** (zonulae occludentes), spojení **adhezivní** (zonulae adhaerentes, desmosomy) a **spojení komunikační** (nexy). V tomto pořadí jsou v dalším textu jednotlivá spojení velmi stručně popsána. To, co je dále uvedeno má svůj informační potenciál jak pro oblast poznávací biomechaniky (získání poznatků o podstatě spojení), výpočtové biomechaniky (pro vytváření výpočtových modelů kontaktů a spojení buněk), tak pro oblast konstruktérskou.

**Zonula occludens** (těsné spojení – tight junction) – Tento typ spojení se vyskytuje v místech, v nichž je potřebné pevně a těsně navzájem spojit buňky (např. epitelové tkáně v tenkém střevě) nebo je připojit k okolní tkáni. Tkáně jsou k sobě „přišity“ vlákny bílkoviny **occludin**, jak je znázorněno na obr. 16a. Na obr. 16b je boční pohled na toto spojení. Snímek z mikroskopu je na obr. 17 (zvětšení 100 000krát). Termín *occludens* vyjadřuje, že dochází ke splynutí membrán – je to tedy spojení bez mezery mezi membránami (lat. oc-clūdō znamená zavřít).

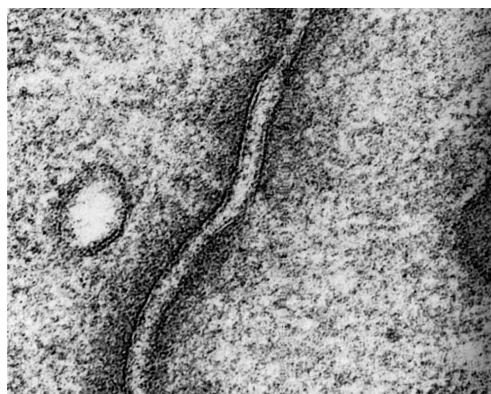
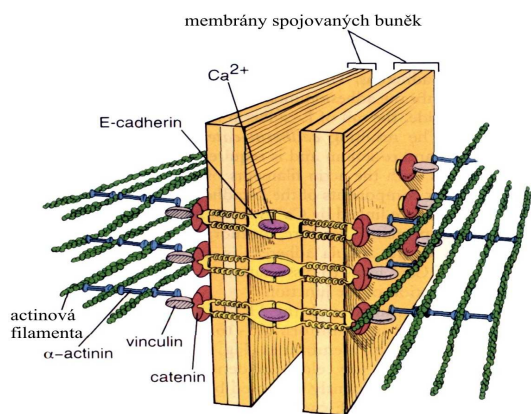


obr. 16 Schéma zonula occludens [20]

obr. 17 Zonula occludens ( $\times 100\ 000$ ) [20]

**Zonula adherens** (anchoring junction) – Je to pevné (kotvící) spojení s mezerou mezi membránami (až 20 nm), založené na iontové soudržnosti dvou molekul bílkoviny typu **E-cadherin**, které jsou v prostoru mezi spojovanými membránami vázány ionty  $\text{Ca}^{2+}$  (obr. 18). Zonula adherens je méně soudržné spojení než mechanické spojení zonula occludens. Významným prvkem v zonule adherens jsou aktinová filamenta, vytvářející tzv. **terminální síť**. Tento typ spojení se vyskytuje u epitelů. Elektronmikrograf spojení je na obr. 19.

**Macula adherens** (též **desmoson**) – Je to pevnější spojení než předcházející zonula adherens, protože místo iontových vazeb mezi spojovacími filenty jsou u tohoto spojení vazby mechanické (bílkoviny desmocollin a desmoglein jsou oboustranně zakotveny ve spojovaných membránách.), obr. 20. Oblast spojení je na obou membránách vyztužena cytoplasmatickou *úponovou ploténkou*, umístěnou na vnitřním povrchu každé z membrán. V těchto ploténkách jsou zakotvena již zmíněná spojovací filenta. Ploténka je složena z nejméně 12 různých proteinů a má rozměry: 400 x 220 x 10 nm. Mezera mezi membrá-

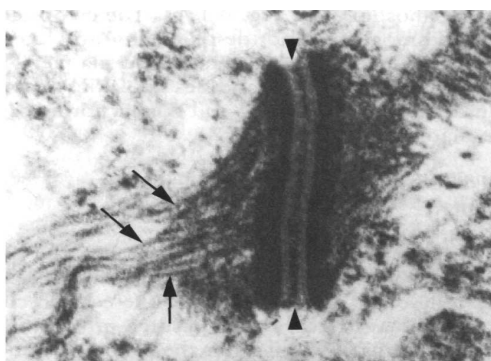
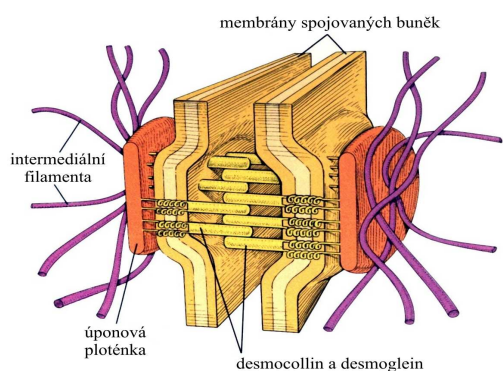


obr. 18 Schéma zonula adherens[20]

obr. 19 Zonula adherens (x 100 000)[20]

nami je větší než u předcházejícího spojení, a to až 30 nm.

Desmosomy se používají všude tam, kde je potřebné vytvořit mezi buňkami pevné mechanické spojení. Jsou např. jediným typem mezibuněčného spojení u plochého vrstevnatého epitelu, který se vyskytuje v močovém měchýři. Desmosomy se nacházejí taktéž v srdečním svalu, kde k sobě vážou sarkomery a zabraňují jim v jejich odtržení při kontrakci. Elektronmikrograf spojení je na obr. 21.



obr. 20 Schéma macula adherens[20]

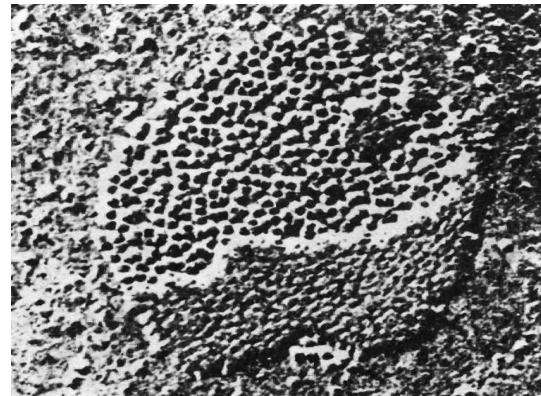
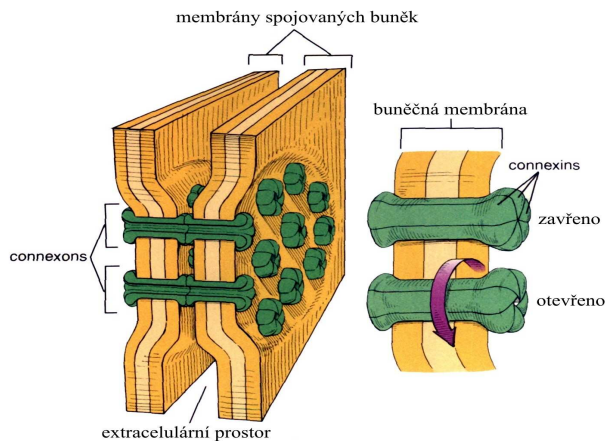
obr. 21 Macula adherens (x 40 000)[20]

**Nexy** (štěrbínové spoje – gap junction, též můstky) – Je to specializované mezibuněčné spojení, které zajišťuje transport z jedné buňky do druhé. V místě spojení je mezibuněčná štěrbinu zúžena cca na 2 nm a jsou zde válcovité bílkovinné útvary, tzv. **konexony** (obr. 22). Konexon je tvořen 6 podjednotkami (lamelami). Každý kanál se skládá ze dvou těsně na sebe napojených konexonů. Jsou-li konexony aktivovány určitou koncentrací **intracelulárního Ca<sup>2+</sup>**, pak vznikne centrální otvor o průměru (1,5 až 2) nm, který umožňuje volně procházet iontům, aminokyselinám sacharidům a roztokům. Velikost



průměru kanálu ovlivňuje koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$ , hodnoty pH a elektrické napětí.

Mechanismus otevírání konexonů není zcela objasněn. Předpokládá se, že lamely k nexonů se natočí, obdobně jako štěrbinová uzávěrka u objektivů fotoaparátů a vznikne otvor. Na obr. 23 jsou zobrazeny nexy v čelním pohledu. Spojení buněk nexy připomíná nýtování plechů. Nexy se vyskytují u těch buněčných seskupení, u nichž je nutná komunikace mezi jednotlivými buňkami. Např. v buňkách srdečního svalu nexy zajišťují koordinovanou srdeční činnost.

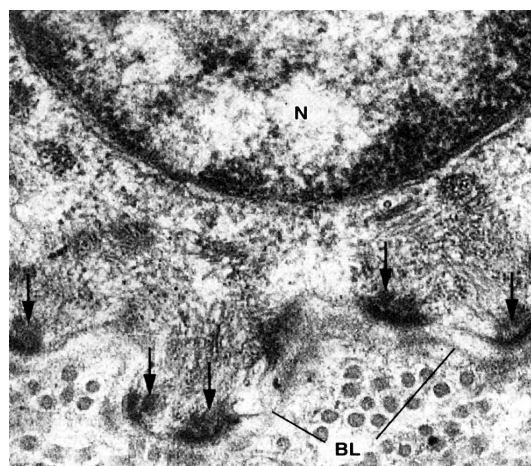
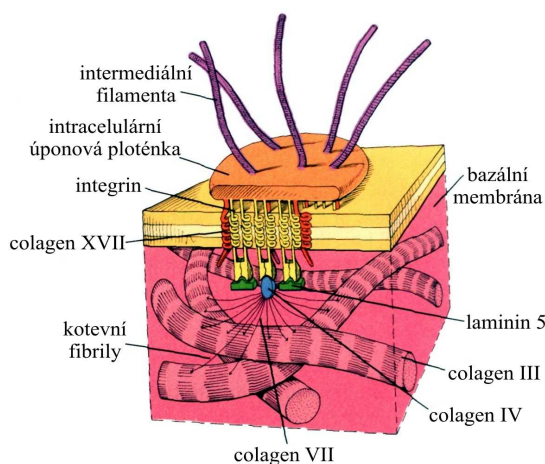


obr. 22 Schéma nexu [20]

obr. 23 Nexus v čelním pohledu (x 45 000) [20]

### 3.4.2 Realizace vazeb mezi vlákny uvnitř a vně buňky

**Hemidezmosomy** – v kontaktní oblasti některých epitelů s jejich bazální membránou, se nacházejí tzv. **hemidezmosomy** (řec. *hemi*, půl + *desmos*, pouto + *soma*, tělo). Po morfolo- gické stránce představují tyto struktury poloviční desmosomy, vytvořené na plazmalemě epitelové buňky (obr. 24). Pozoruhodné je uchycení úponové ploténky prostřednictvím kolagenu XVII a bílkoviny integrinu, která je kotvena lamininem 5. Na některých zakon- čeních integrinu se nacházejí tělíska z kolagenu IV, na něž jsou přichycena kotvící vlákna z kolagenu VII přichycená k silným vláknům z kolagenu III. Tento typ spojení je vytvořen u těch epitelů, které jsou zatíženy smykovými silami, např. epitelu kůže, vaginy, corney apod. Na obr. 25 je znázorněn hemidezmosom elektronovým mikroskopem, (N) je jádro epitelové buňky, (BL) je bazální membrána a šipkami jsou označeny úponové ploténky.

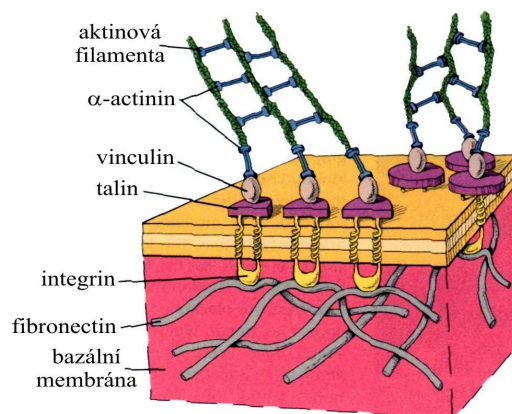


obr. 24 Schéma hemidezmosomu

obr. 25 Hemidezmosom (x 40 000)

**Focal adhesions** – je to „dynamické“ spojení mezi aktinovými vlákny, která jsou součástí buněčného cytoskeletu a extracelulární bílkovinnou základní hmotou (matrix). Termín dynamický znamená, že toto spojení se uplatňuje v závislosti na čase, konkrétně v dobách, když dochází k „opravám“ epitelové tkáně po jejím zranění.

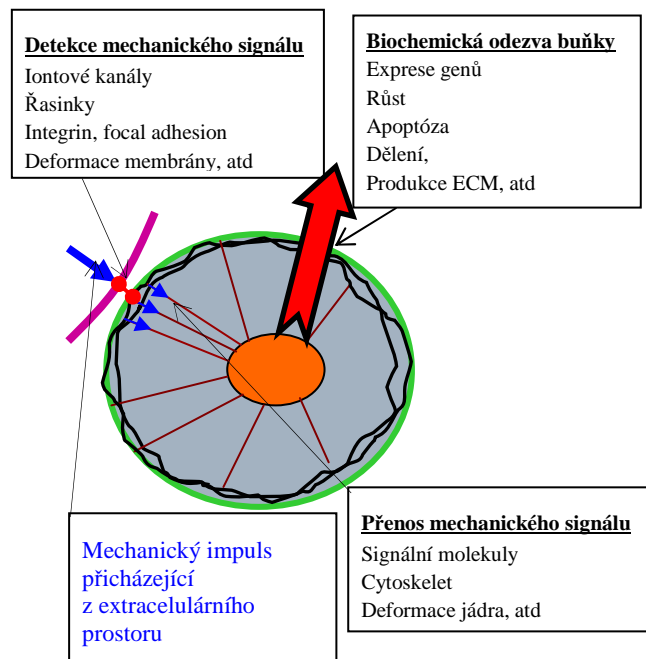
Toto spojení realizuje vazbu mezi aktinovými vlákny nacházejícími se uvnitř buňky a vlákny nacházejícími se mimo buňku, obvykle s lamininem a fibronectinem, jež jsou součástí základní mimobuněčné hmoty. Spojovacími prvky jsou vinculin, talin a integrin (obr. 26). Integri- nu se připisuje schopnost přenášet informace, které se týkají migrace, růstu a diference buňky, a to z extra- do intracelulárního prostoru buňky, tj. směrem dovnitř buňky.



obr. 26 Schéma focal adhezion

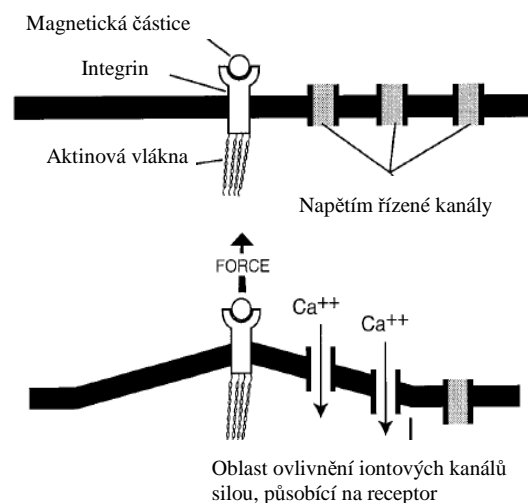
### 3.5 MECHANOTRANSDUKCE

Mechanické zatížení ovlivňuje širokou škálu fyziologických procesů. Jako příklad můžeme uvést vysoce specializované buňky vnitřního ucha, citlivé na hluk, buňky endotelu, citlivé na změny smykového napětí, vyvolaného proudící krví, osteoblasty, osteocyty a osteoklasty zodpovědné za remodelaci kostí v závislosti na změnách zatížení, buňky hladkého svalstva, reagující na zvýšení krevního tlaku, nebo fibroblasty, produkující komponenty extracelulární matrix v závislosti na tahovém namáhání. Mechanický podnět může ovlivňovat téměř všechny druhy buněčných procesů - růst, dělení, migraci, genovou expresi, syntézu proteinu a apoptózu (programově řízená smrt buňky) [25][26].



obr. 27 Schéma přeměny mechanického signálu na biochemický.

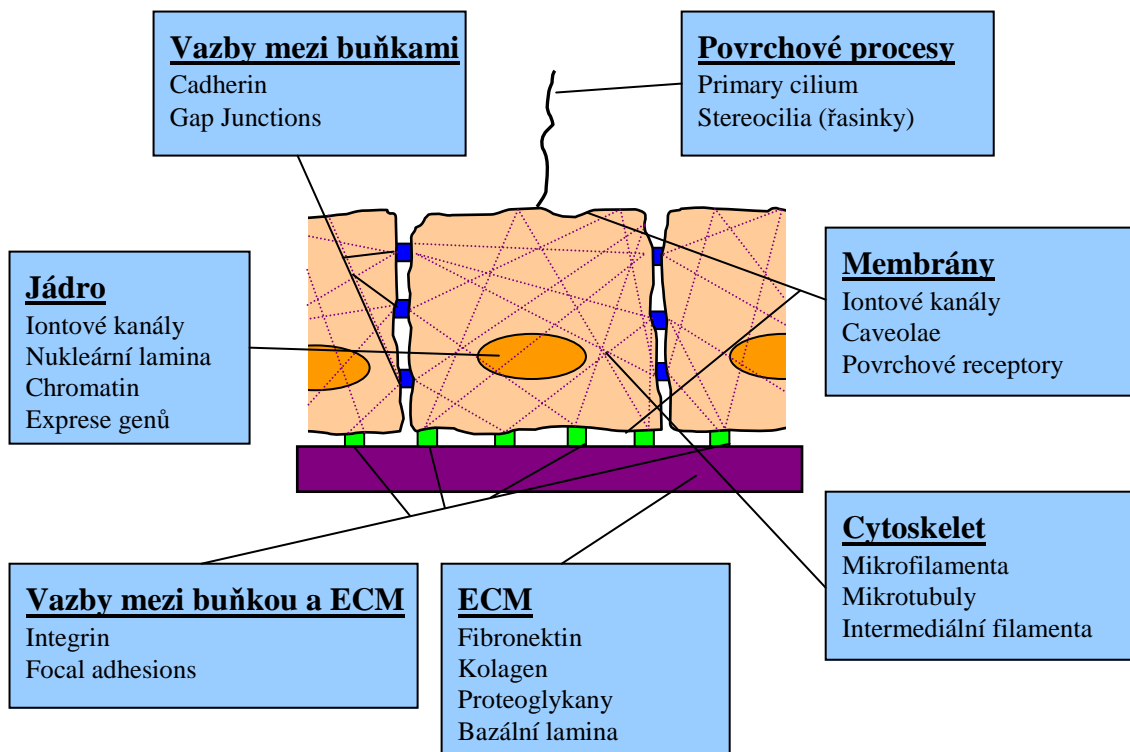
Pojmem **mechanotransdukce** se rozumí složitý proces, pomocí kterého buňky dokáží detekovat mechanický signál přicházející z extracelulárního prostoru, tento signál přenést do buňky a vyvolat příslušnou biochemickou odezvu (obr. 27). Výzkum v oblasti mechanotransdukce je zaměřen především na identifikaci klíčových mechanosensitivních molekul a buněčných komponent, které tuto přeměnu zprostředkovávají. Jako první byly identifikovány mechanickým napětím řízené iontové kanály (obr. 28), vyskytující se na buněčné membráně. Tyto kanály regulují tok iontů přes buněčnou membránu v závislosti na jejím mechanickém zatížení. Bylo však zjištěno, že funkčnost těchto iontových kanálů je závislá na propojení s cytoskeletem [45]. Ten se jeví jako jeden z nejvýznamnějších mediátorů při procesu mechanotransdukce, zajišťuje spojení mezi jádrem buňky a jejím povrchem, stejně jako vazby mezi buňkou a jejím okolím (prostřednictvím spojovacích proteinů).



obr. 28 Aktivace iontových kanálů mechanickým zatížením (podle [47]).

Později byla identifikována celá řada intracelulárních komponent a molekul, které hrají roli při procesu mechanotransdukce (iontové kanály, caveolae, integrin, cadherin, myosinové motory, cytoskeletální vlákna, jádro, extracelulární matrix a mnoho dalších komponent a signálních molekul, viz obr. 29)[46]. Co však zůstává neznámé, je mechanismus, jakým všechny tyto rozdílné mediátory dokáží společně řídit proces mechanotransdukce ve

strukturní hierarchii od makroúrovně po nanoúroveň (tělo-orgány-tkáně-buňky-subcelulární prvky). Budoucím cílem výzkumů je proto porozumění tomuto procesu na všech úrovních hierarchické struktury organismu.



obr. 29 Mediátory mechanotransdukce[46]

## 4 Experimentální vyšetřování mechanických vlastností buněk

Protože buňky jsou vystaveny neustálému působení vnějších sil a podílí se na řadě mechanických procesů, znalosti jejich mechanických vlastností jsou důležité pro pochopení jejich biologických funkcí.

Na rozdíl od rostlinných buněk a bakterií s tuhou buněčnou stěnou, jejichž mechanické vlastnosti jsou převážně definovány vlastnostmi této stěny, jsou mechanické vlastnosti živočišných buněk definovány převážně jejich vnitřní bílkovinnou polymerovou strukturou – cytoskeletem. Cytoskelet není mechanicky významný pouze pro pasivní materiálové vlastnosti, ale také hraje důležitou roli při detekci externích zatížení a následné biochemické reakci buňky na tato zatížení. Jak bude buňka reagovat na dané zatížení, nezávisí pouze na specifických molekulárních senzorech a signálních drahách, ale také na jejich vnitřních mechanických a reologických vlastnostech. Tyto vlastnosti jsou určující pro deformačně-napěťovou odezvu buňky na vnější silové působení.

Rozsah zatížení, kterému jsou buňky různých tkání přirozeně vystavovány, je poměrně velký. Například u chondrocytů vyvolá změny v expresi glycominoglykanů a ostatních složek hmoty chrupavky napětí kolem 20 MPa [22]. Oproti tomu endotelové buňky reagují i na smyková napětí menší než 1 Pa [23]. Velikost napětí ovšem není jediný faktor mechanického vzruchu, který ovlivňuje buněčné reakce. Záleží také na geometrických podmínkách zatěžování (např. šlachy jsou namáhány převážně jednoosým tahem, tudíž zatížení v tomto směru je pro buněčné odezvy rozhodující, zatímco endotelové buňky jsou citlivé převážně na smyková napětí) a na časovém průběhu zatěžování. Některé druhy buněk totiž reagují spíše na časově závislé změny v zatížení, než na určitou hodnotu napětí.

Bylo zjištěno, že mechanické chování buněk vykazuje jak elastické, tak viskózní projevy. Také bylo zjištěno, že buňky vykazují lineární materiálové chování pouze v oblasti malých přetvoření (do 10%), pro větší hodnoty přetvoření už je odezva buňky významně nelineární (tato nelinearita se může projevovat například deformačním zpevněním). K vyšetřování těchto vlastností buněk se využívají různé typy experimentálních metod, jejichž přehled a popis je náplní následujících podkapitol.

## ***Přehled experimentálních metod používaných k určování mechanických vlastností buněk***

Experimentální metody pro vyšetřování mechanických vlastností buněk lze klasifikovat podle různých kritérií. V literatuře jsou nejčastěji uváděny dvě základní skupiny:

### **Určování mechanických vlastností buněčných populací (cell population)**

- *Zatížení deformací podložky (membrane stretch)*
- *Zatížení fluidními smykovými silami (Fluid flow)*

### **Určování mechanických vlastností izolované buňky (single cell)**

- Mechanické metody
  - *Vtlačovací zkoušky*
  - *Tahová zkouška*
  - *Micropipette aspiration*
  - *Microplates manipulation*
  - *Trakční cytometrie*
- Magnetické metody
  - *Magnetic twisting cytometry*
  - *Magnetická pinzeta*
- Optické metody
  - *Optická pinzeta*
  - *Optical stretcher*

*Poznámka: U některých názvů experimentálních metod se mi nepodařilo nalézt vhodný český ekvivalent, z tohoto důvodu používám v některých případech původní anglické názvy. V tomto přehledu nejsou uvedeny úplně všechny experimentální metody (např. starší metody, založené na difúzi nebo sedimentaci mikroskopických částic), ale jsou zde popsány zejména moderní metody, které jsou potenciálně využitelné pro identifikaci materiálových vlastností buněk na základě výpočtového modelování.*

#### 4.1 URČOVÁNÍ ODEZEV BUNĚČNÝCH POPULACÍ NA MECHANICKÉ NAMÁHÁNÍ

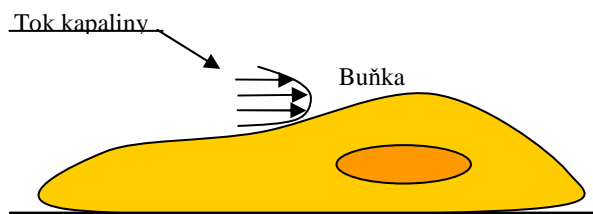
Pomocí těchto metod nejsou zkoumány přímo mechanické vlastnosti buněk, ale převážně biochemické odezvy na mechanický podnět. Tyto metody byly vyvinuty tak, aby umožňovaly zkoumání odezvy celých buněčných populací v prostředí napodobujícím realitu. Mezi typická zatížení, aplikovaná na buněčné populace patří zatížení tahem, tlakem nebo smykovými silami od proudící kapaliny. Tyto metody jsou všeobecně dobře zavedené, protože jsou používány již více než deset let, existuje mnoho variant a publikovaných výsledků.

##### *Zatížení deformací podložky (membrane stretch)*

Této metody se používá ke zkoumání biochemických reakcí buněčných populací na deformační zatížení. Buněčná populace je kultivována (pěstována) na elastické podložce (substrátu), která je potažena fibronektinem nebo kolagenem, aby byla zajištěna dostatečná adheze buněk s podložkou. Tato podložka je následně deformačně zatížena (běžně používané hodnoty přetvoření se pohybují v rozmezí 1%-30%). Zatížení může být jednoosé, nebo dvouosé, tahové i tlakové. Jednoosé zatížení lze použít například pro zkoumání reorientace buněk (přizpůsobení tvaru a růstu buněk směru působícího zatížení), podrobených jednoosému přetvoření, při dvouosém zatížení jsou zkoumány různé biochemické odezvy buněk, např. aktivace mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) u buněk hladkého svalstva [26].

##### *Zatížení fluidními smykovými silami (Fluid flow)*

Některé typy buněk, jako například vaskulární endotelové buňky v oběhovém systému a určité buňky kostí, jsou pravidelně vystaveny působení fluidních smykových sil. Tyto buňky dokáží citlivě vnímat smykové zatížení a jejich odezva je důležitá v mnoha regulačních procesech v tkáních. Při zkoumání mechanických vlastností těchto buněk



obr. 30 Zatížení buňky proudící kapalinou.

a jejich odezvy na smykové síly vyvolané tokem kapaliny se využívá zkoušky **Fluid flow** (obr. 30). Princip: jednoduchá vrstva buněk přilnutá k povrchu průtokové komory je vystavena působení toku kapaliny, přičemž je měřena jejich biochemická odezva (např. uvolňování prostaglaninů) nebo deformace. Vzhledem k neznalosti deformačně-napěťových charakteristik buněk lze pomocí této metody určovat pouze přetvoření, ne napětí. Použití této metody při určování biochemické odezvy (zvýšení produkce kalcia z intracelulárních zásob) buněk ledvinového epitelu je podrobně popsáno v [45].

## 4.2 URČOVÁNÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ IZOLOVANÝCH BUNĚK

Výhodou těchto metod je, že na rozdíl od zkoušek na buněčných populacích může být zatížení aplikováno buď na celou samostatnou buňku, na určité místo buněčného povrchu izolované buňky, nebo i přímo na určité receptory na buněčném povrchu (pomocí sond potažených ligandy\* vázícími se na požadovaný receptor). Velikost silového zatížení se většinou pohybuje v rozsahu 1 pN až 10 nN. Pro porovnání: tíha sférické buňky o průměru 10  $\mu\text{m}$  je přibližně 40 pN.

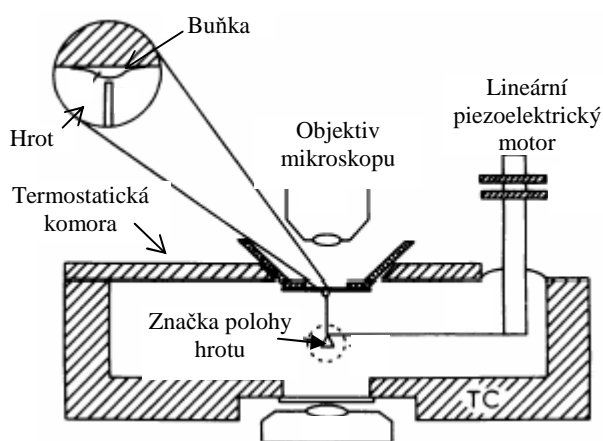
Metod určování mechanických vlastností izolovaných buněk je celá řada a jsou založeny na různých principech [26]. Přehled nepoužívanějších metod bude uveden v následujícím textu, přičemž podrobněji bude pojednáno o zkouškách, jejichž výsledky budou využity při výpočtovém simulování.

### 4.2.1 Mechanické metody - vtláčovací zkoušky (*Indentation tests*)

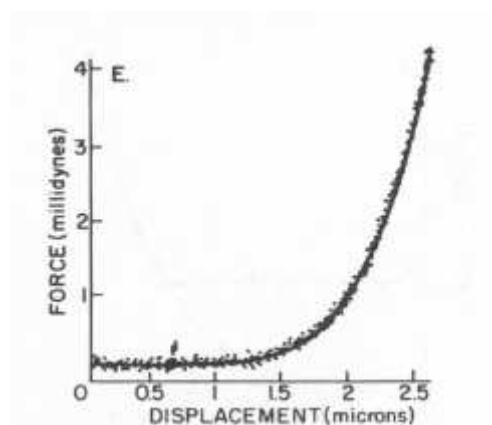
Tyto metody jsou založeny na měření elastické nebo viskoelastické odezvy buněk na vtláčování ostrého předmětu do jejího povrchu. Vtláčovacích zkoušek se využívá zejména pro určování lokálních mechanických vlastností buněk.

#### *Cell poking (vpichování)*

Metoda založená na vpichování skleněné jehly do povrchu buňky. Na obr. 31 je schematické znázornění zařízení Cell poker, publikované v [27], jehož hlavní části jsou: piezoelektrický lineární motor, ocelový držák se známou tuhostí, skleněná mikro-jehla, objektiv mikroskopu a sklíčko s přilnutou buňkou. Pomocí piezoelektrického motoru je řízen vertikální posuv jehly. Když dojde ke kontaktu jehly s buňkou, tak při vtláčování jehly do jejího povrchu dochází k průhybu ocelového držáku. Tento průhyb je opticky měřen a ze známé tuhosti držáku lze stanovit velikost zatěžovací síly působící na buňku. Rozlišovací schopnost tohoto zařízení umožňuje vyhodnocovat i síly o velikosti kolem 10 nN a posuvy



obr. 31 Zařízení cell poker [27]



obr. 32 Typická závislost mezi hloubkou vtláčení a silovou odezvou erythrocytu [28]

\* *ligandem se v biochemii rozumí látka, která se specificky a vratně váže na biopolymer, ligandem může být hormon, který má vazbu na receptor, inhibitor, který má vazbu na enzym, kyslík, který má vazbu na hemoglobin či antigen, který má vazbu na protilátku*



řádu 100 nm. Výstupem této zkoušky je tedy závislost silové odezvy buňky  $F$  na hloubce vtlačení jehly  $d$  do jejího povrchu. Typická křivka  $F$ - $d$  erythrocytu je na obr. 32. Protože hrot jehly je podstatně menší než průřez buňky, je možné touto metodou určovat mechanické vlastnosti v různých místech buňky. Při prvotních studiích byly zjištěny významné rozdíly v tuhosti buněk v závislosti na místě působení hrotu.

Pro homogenní isotropní elastický materiál lze z výsledků této zkoušky při známé geometrii hrotu jehly stanovit lineární elastické konstanty (modul pružnosti  $E$  a Poissonovo číslo  $\mu$ ) na základě Hertzova zákona:

- Pro sférický tvar hrotu:

$$F_{sphere} = \frac{4}{3} \frac{E}{(1-\mu)} R^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}}$$

F.....Síla  
 E.....Youngův modul pružnosti  
 R.....Poloměr hrotu  
 $\mu$ .....Poissonovo číslo  
 $\delta$ .....Hloubka vtlačení  
 $\alpha$ .....Úhel kužele

- Pro kónický tvar hrotu:

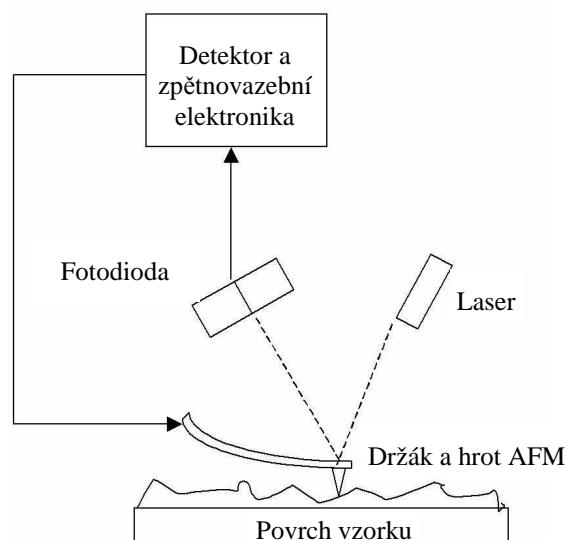
$$F_{cone} = \frac{\pi}{2} \frac{E}{(1-\mu)} \tan(\alpha) \delta^2$$

Při použití Hertzova zákona pro určování elastických konstant materiálu buňky z výsledků vtlačovací zkoušky však dochází ke snížení věrohodnosti, minimálně z těchto tří důvodů:

1. Hertzův zákon neplatí v případě, že tloušťka buňky není výrazně větší než hloubka vtlačení.
2. Materiál buňky a cytoskeletu není isotropní homogenní lineárně pružný.
3. Zatížení buňky spouští biochemické a další aktivní reakce buňky, které mohou mít vliv na mechanické vlastnosti [28].

### Atomic force microscopy

Pomocí zařízení Atomic force microscopy (AFM) lze měřit lokální mechanické vlastnosti buněk na velmi dobré rozlišovací úrovni. AFM je moderní zařízení, primárně určené pro měření topografie povrchů pevných látek na velmi vysoké rozlišovací úrovni. Při skenování povrchu se využívá sondy (ostrý hrot nejčastěji kónického tvaru), připevněné na pružném držáku, která se pohybuje buď těsně nad povrchem zkoumaného vzorku (bezkontaktní režim), nebo po povrchu (kontaktní režim). V případě bezkontaktního režimu, kdy se hrot pohybuje těsně nad povrchem vzorku

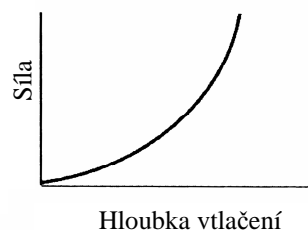
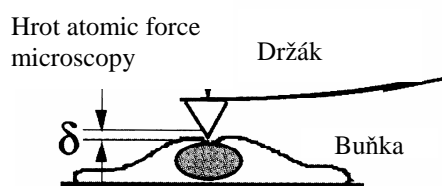


obr. 34 Princip AFM

dochází k průhybu pružného držáku vlivem působení meziatomárních sil (odtud název *atomic force*). Tento průhyb je opticky měřen laserovým paprskem a pomocí zpětné vazby se mění vertikální poloha držáku sondy (piezoelektrickým motorem) tak, aby byl tento průhyb konstantní. Průběh vertikální polohy

držáku sondy potom odpovídá geometrii povrchu zkoumaného vzorku. Výhodou bezkontaktního módu je to, že při snímání nedochází k poškozování povrchu. Při kontaktním módu je sonda v kontaktu se vzorkem a kopíruje jeho povrch, v důsledku nerovností se mění průhyb nosníku a geometrie povrchu se vyhodnocuje na základě výchylky laserového paprsku (viz obr. 34)

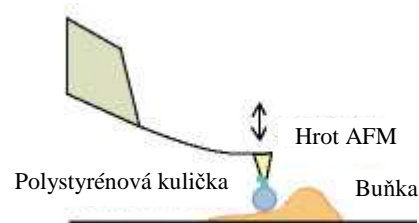
Kontaktního módu se využívá právě při měření lokálních mechanických vlastností buněk podobně jako u metody *cell poking*, ale s mnohem lepší rozlišovací schopností (viz obr. 35). Při vtlačování hrotu AFM dochází v důsledku toho, že hrot je mnohonásobně tužší než buňka, k deformaci povrchu buňky. Z velikosti průhybu držáku lze (při známé



obr. 35 Měření mechanických vlastností buněk pomocí AFM [30]      obr. 36 Typická křivka síla-hloubka vtláčení změřená AFM [30]

tuhosti držáku) určit velikost síly, působící na hrot AFM. Hloubka vtláčení je definována rozdílem mezi posuvem držáku v místě styku s konstrukcí zařízení AFM (piezoelektrickým akčním členem) a relativním posuvem hrotu AFM vůči akčnímu členu (průhybem držáku). Tímto způsobem lze určit závislost mezi hloubkou vtláčení a silovou odezvou v libovolném bodě na povrchu buňky (obr. 36).

Elastické konstanty materiálu buňky lze odvodit stejně jako u metody *cell poking* pomocí Hertzovy teorie. U metody AFM je však ještě více diskutabilní věrohodnost takto určených elastických konstant, protože vzhledem k vysoké rozlišovací schopnosti se více projevuje nehomogenita buněčné struktury. Pokud například hrot AFM působí v místě vysoké koncentrace aktinových vláken, buňka se bude jevit mnohem tužší, než v místě bez těchto vláken. Při kvazistatickém nebo nízkofrekvenčním zatěžování také dochází k aktivní odezvě buňky na silové zatížení, tudíž naměřené charakteristiky nereflktují pouze pasivní chování materiálu buňky, ale také její aktivní odezvu. Pomocí Hertzovy teorie také nelze věrohodně určit materiálové konstanty na periferii buněk z důvodu malé tloušťky vzhledem k hloubce vtláčení. Pro homogenizaci vlastností povrchu buňky se někdy používá místo ostrého hrotu sonda s polystyrénovou kuličkou (obr. 37) s přesně definovaným poloměrem, výrazně větším, než je poloměr hrotu AFM. [29]



obr. 37 Použití sondy AFM s polystyrénovou kuličkou [120]

Pomocí AFM lze měřit síly o velikosti v řádu několika pN při rozlišení posuvů 0.1 nm. Díky této vynikající rozlišovací schopnosti lze pomocí AFM měřit např. vazebné síly mezi proteiny, ligandy a receptory, mezi buňkami nebo mezi buňkou a jejím okolím. Byly publikovány hodnoty vazebných sil mezi proteiny v rozsahu 15-250 pN.[31] Pomocí AFM lze také měřit vazbové síly mezi jediným receptorem na povrchu buňky a jeho ligandem.

Lze toho dosáhnout tím, že se hrot AFM “obalí” specifickým vazebným proteinem (např. fibronektin), který se váže na určitý receptor [31] [32][33][34][35][36].

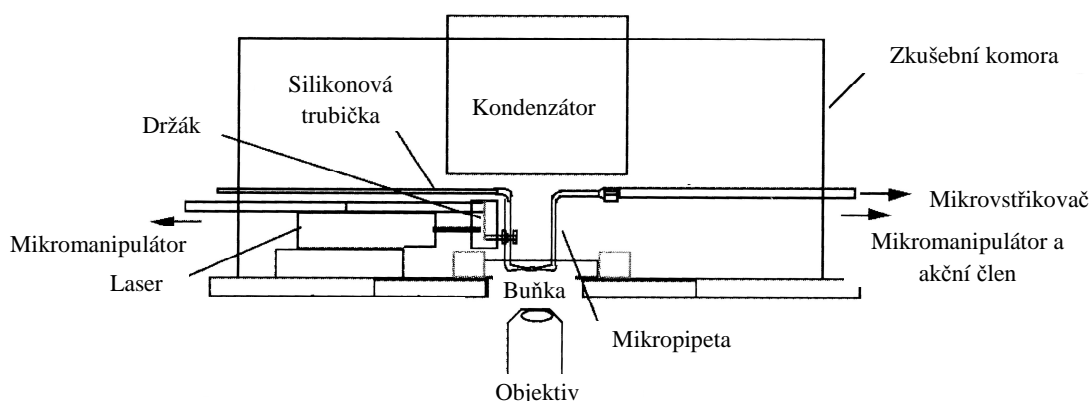
#### 4.2.2 Mechanické metody -tahové, tlakové a smykové zkoušky

Měření materiálových vlastností se provádí na základě zatěžování buňky jednoosým tahem, tlakem, nebo smykem. Pomocí těchto metod se určuje převážně globální mechanická odezva buněk.

##### *Tahová zkouška*

Zkouška jednoosým tahem je užitečná při určování základních mechanických vlastností buněk. Glerum a kol. v [37] určovali tahové vlastnosti buněk hladkého svalstva močového měchýře prasete a lidské dělohy. Postupovali tak, že uchytili konce buňky ke hrotům dvou mikropipet a tahové zatížení aplikovali posuvem jedné mikropipety. Vzhledem k použité uchopovací technice (vázání) buněk k mikropipetě, bylo možno tímto způsobem vyšetřovat tahové vlastnosti pouze relativně dlouhých buněk.

V [38] Miyazaki a kol. vyvinuli nové zařízení pro tahovou zkoušku, použitelné pro různé druhy buněk a pomocí tohoto zařízení určovali tahové vlastnosti fibroblastů, buněk hladkého svalstva a endotelových buněk cévní stěny. Zařízení pro tahovou zkoušku se



obr. 38 Schéma zařízení na provádění tahové zkoušky buněk [15].

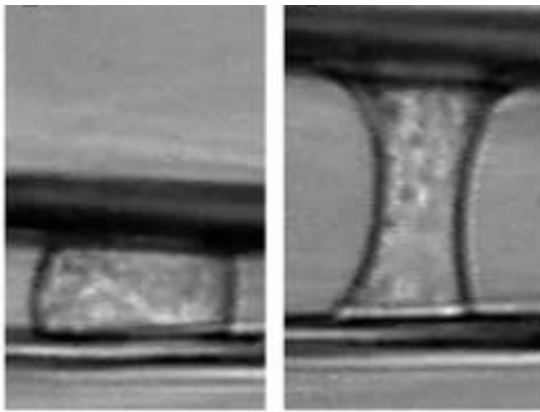
skládá z těchto základních prvků: termostatická zkušební komora, inverzní mikroskop s CCD kamerou, dva mikromanipulátory, lineární akční člen, snímač síly a optický analyzátor posuvů. Buňka je uchycena ke hrotům dvou mikropipet pomocí speciálního lepidla, jedna z mikropipet je napojena na mikromanipulátor, pomocí kterého je řízeno natahování buňky. Druhá mikropipeta je napojena na konzolový snímač síly, z jehož průhybu je vyhodnocována síla působící na buňku. Protážení buňky je určováno ze vzdálenosti hrotů mikropipet pomocí CCD kamery a VDA.

Toto zařízení umožňuje maximální protažení 10mm a rychlost zatěžování je možno zvolit v rozsahu  $1\mu\text{m/s}$  -  $6\mu\text{m/s}$ . Přesnost měření je u síly  $+0.05\mu\text{N}$  a u posuvu  $0.24\mu\text{m}$ .

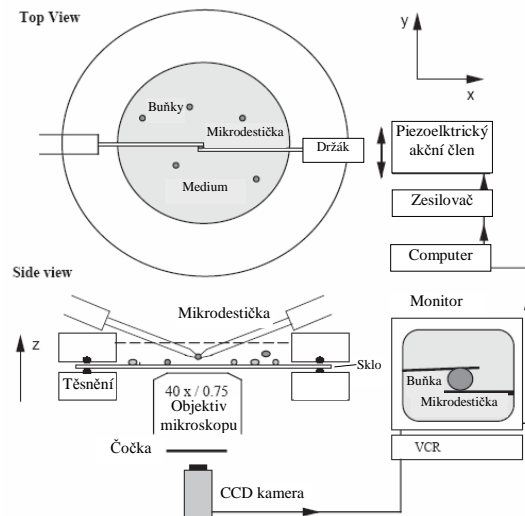
Výsledkem tohoto experimentu je závislost reakčních sil v mikropipetách na protažení buňky. Výhodou tohoto experimentu je, že díky lepení mikropipet na buňku dochází v porovnání s jinými způsoby uchycení k minimálnímu mechanickému ovlivnění částí buňky ve styku s mikropipetami [15][39].

### Microplate manipulation

Elegantní ale technicky náročná metoda pro vyšetřování buněk, schopných adheze k podložce. Princip: Buňka je uchycena mezi dvě skleněné mikrodestičky (obr. 39). Jedna (tužší) mikrodestička je napojena přes piezoelektrický akční člen (translátor) na řídicí počítač, druhá (poddajnější) slouží jako snímač síly, kterou lze určit z jejího průhybu (obr. 40). Piezoelektrický akční člen zajišťuje řízený pohyb tuhé mikrodestičky ve směru osy Y, což umožňuje aplikovat na vyšetřovanou buňku tlakové i tahové zatížení, statické nebo cyklické. Pomocí této metody je možno zjišťovat elastickou dominantní odezvu, charakterizovanou závislostí napětí-přetvoření, nebo viskoelastické parametry buňky jako celku. Některá zařízení umožňují i posuv pohyblivé mikrodestičky ve směru osy X a tím i zatěžování buňky smykem. O použití této metody je podrobně pojednáno v [57].



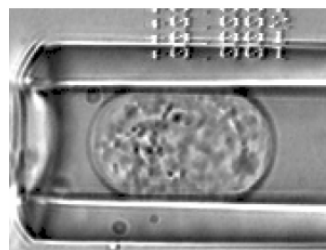
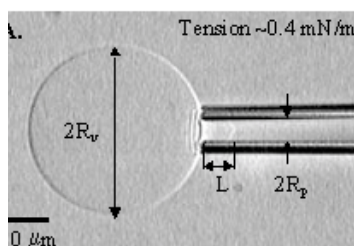
obr. 39 Deformovaná buňka při stlačování a natahování mikrodestičkami (podle [57]).



obr. 40 Schéma zařízení pro zkoušky s mikrodestičkami (podle [57]).

#### 4.2.3 Aspirační test mikropipetou (micropipette aspiration)

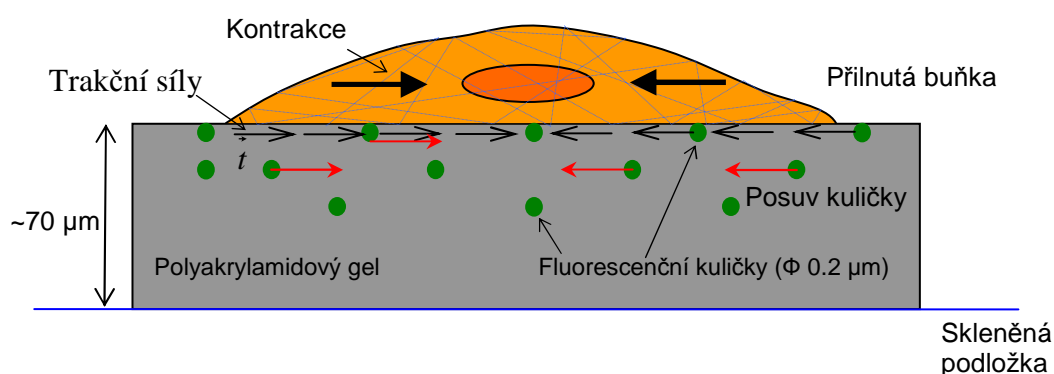
Micropipette aspiration je významná metoda pro měření viskozity a elastické odezvy buněk. Použití této metody bylo poprvé publikováno už v roce 1954 [40]. Princip je založen na nasávání buňky nebo její části pomocí podtlaku do mikropipety (s vnitřním průměrem několika mikrometrů), přiložené k jejímu povrchu (obr. 41). Ze zaznamenané změny geometrie buňky v průběhu nasávání (tj. zatěžování) a odlehčení buňky lze odvodit elastické vlastnosti buňky. Pomocí této metody lze vyšetřovat mechanické vlastností jak buněk suspendovaných v roztoku (nepřilnutých), tak buněk přilnutých k podložce. Díky schopnosti vyšetřovat nepřilnuté buňky je tato metoda používána zejména při vyšetřování viskoelasticity krevních buněk (erytrocytů, leukocytů a monocytů). Nevýhodou této metody je nemožnost aplikace zatížení přímo na membránové receptory [41].



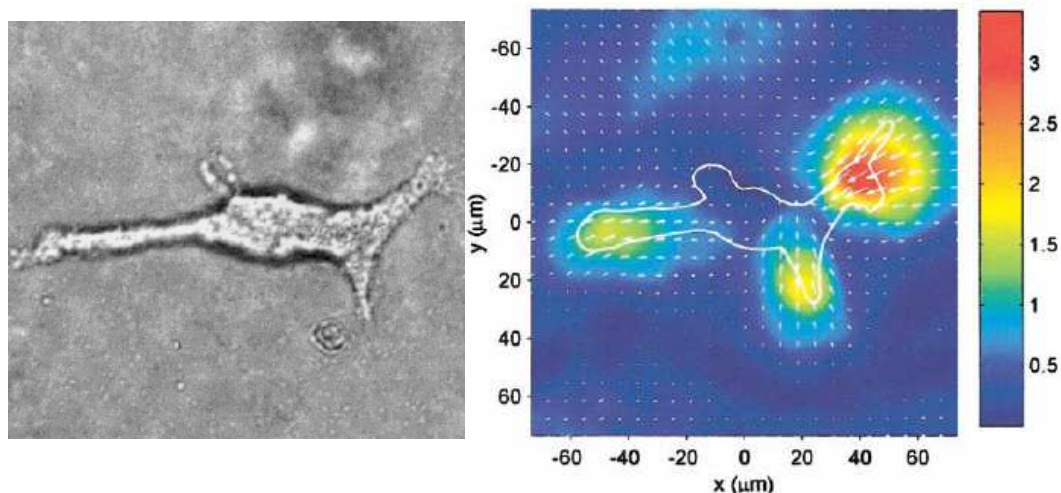
obr. 41 Nasávání buňky a její části do mikropipety při aspiračním testu (podle [41]).

#### 4.2.4 Trakční cytometrie (*traction force microscopy*)

Metoda, používaná k měření trakčních sil, kterými přilnutá buňka působí na podložku. Trakčními silami jsou zde myšleny síly působící na rozhraní buňky a podložky (ke které je buňka přilnuta) ve směru rovnoběžném (tečném) s tímto rozhraním (viz obr. 42). Toto silové působení buňky na podložku vzniká při různých buněčných procesech, např. při kontrakci, pohybu (*crawling*), nebo zplošťování (*spreading*). Princip metody spočívá v měření pole posuvů gelové podložky, na které je buňka je přilnutá. Z hodnot posuvů je potom díky známé tuhosti podložky počítáno pole trakčních sil. Pole posuvů se měří pomocí miniaturních fluorescenčních kuliček (o průměru  $0.2\ \mu\text{m}$ ), které jsou zapuštěné v gelové podložce (obr. 43). Posuvy kuliček jsou snímány pomocí mikroskopu [42].



obr. 42 Princip metody trakční cytometrie



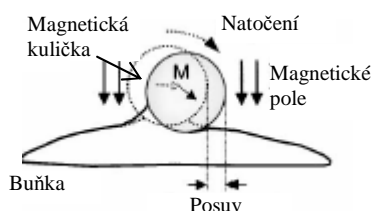
obr. 43 Buňka hladkého svalstva dýchacích cest a vizualizace pole posuvů vyvolaných kontrakcí buňky, změřené pomocí metody trakční cytometrie. [42]

#### 4.2.5 Magnetické metody (magnetocytometrie)

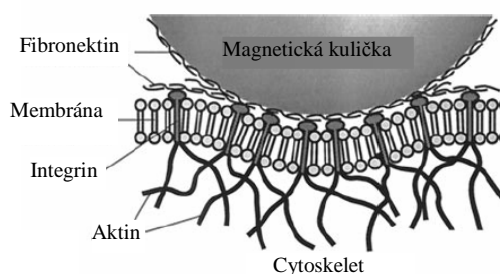
Tyto metody jsou založeny na mikromanipulaci feromagnetických nebo paramagnetických částic (kuliček) nepatrných rozměrů přilnutých k buňce pomocí magnetického pole. Tyto kuličky lze zatěžovat buď momentem (twisting cytometry), nebo silou (magnetická pinzeta, lze použít pouze paramagnetické částice). Výhodou těchto metod je možnost aplikace větších lokálních zatěžovacích sil (než např. AFM).

##### *Magnetic twisting cytometry*

Tato metoda je založena na momentovém zatížení magnetických částic, přilnutých k povrchu buňky. Feromagnetické nebo paramagnetické kuličky potažené pojivovým proteinem o rozměrech několika mikrometrů jsou pevně spojeny s membránou buňky prostřednictvím povrchových receptorů (obr. 45). V prvním kroku experimentu jsou tyto kuličky zmagnetizovány v horizontálním směru intenzivním krátkodobým působením pulzního magnetického pole. Na takto zmagnetizované kuličky je následně aplikováno vertikální homogenní magnetické pole, což způsobí rotaci a translaci těchto kuliček a tím i deformaci povrchu buňky (obr. 44). Pomocí výkonné zobrazovací techniky jsou následně vyhodnocovány posuvy a rotace částic, jejich hodnoty jsou statisticky zpracovány. Z naměřených hodnot posuvů a rotací kuliček a ze vstupních údajů (geometrie kuliček, velikost vnoření kuliček do buňky, intenzita magnetického pole) lze pak odvodit některé mechanické vlastnosti buňky, např. její lokální tuhost, související mj. s vlastnostmi buněčné membrány a kortikálního cytoskeletu.



obr. 44 Princip zkoušky magnetické cytometrie (podle [49]).



obr. 45 Uchycení kuličky k integrinovým receptorům na povrchu buňky [50].

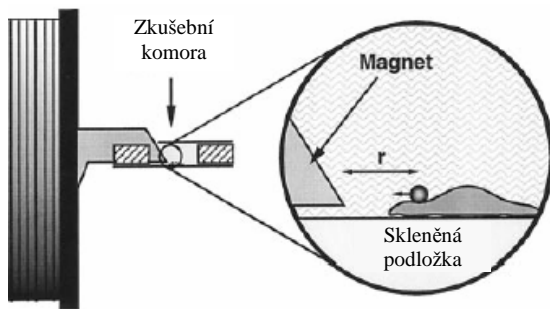
Tato metoda může být použita jak pro jednu izolovanou buňku, tak pro celou buněčnou populaci.

Výhody MTC spočívají v tom, že umožňuje

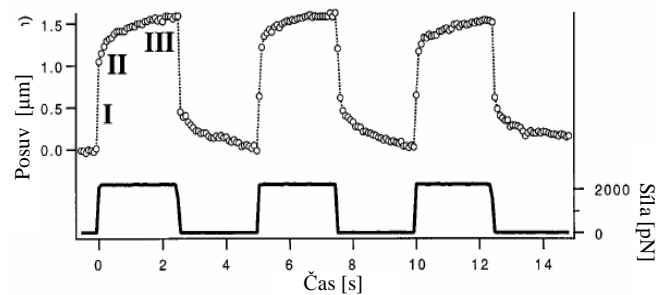
- jednoduše řídit (magnetickým polem) zatížení aplikované na buňku,
- vyhodnocovat adhezní síly v receptorech,
- analyzovat propojení mezi povrchovými receptory a cytoskeletem,
- určovat mechanické vlastnosti cytoskeletu,
- zkoumat vnitrobuněčné strukturní změny, např. remodelaci cytoskeletu. [49]

### ***Magnetická pinzeta (Magnetic tweezer)***

Tato metoda je založena na silovém zatížení magnetických částic, přilnutých k povrchu buňky. Paramagnetická kulička potažená vrstvičkou fibronektinu je navázána na integrinové receptory v buněčné membráně. Tato kulička je následně zatížena tangenciální (statickou nebo pulsující) magnetickou silou, prostřednictvím hrotu magnetu, který tvoří jádro cívky (obr. 46). Velikost silového zatížení může být řízena elektrickým proudem, procházejícím cívkou. V závislosti na tomto silovém zatížení dochází k posuvu kuličky a tím k deformaci povrchu buňky. Použití této metody pro měření viskoelastických parameterů fibroblastů bylo publikováno v [50]. Paramagnetická kulička (průměr 4.5  $\mu\text{m}$ ) přilnutá k povrchu fibroblastu pomocí fibronektinu byla pulzně zatěžována tangenciální silou 500-2500 pN a byla měřena creepová a relaxační odezva buňky (obr. 47).



obr. 46 Princip metody magnetická pinzeta (podle [50]).

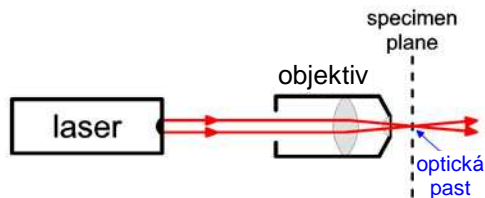


obr. 47 Naměřená závislost reakční síly a posuvu kuličky na čase (podle [50]).

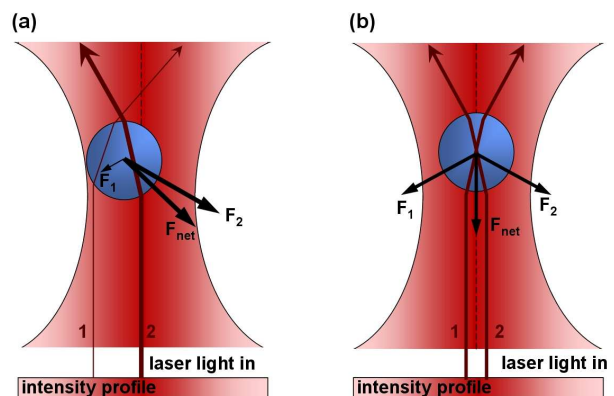
#### 4.2.6 Optické metody

Optické metody měření materiálových vlastností buněk jsou založeny na principu tzv. optické pasti, která dokáže zachytit pomocí zaostřeného laserového paprsku miniaturní dielektrické částice v ohnisku (obr. 48). Pokud jsou rozměry částice větší než vlnová délka paprsku, lze princip optické pasti vysvětlit na základě optiky (v případě, že rozměry objektu jsou srovnatelné nebo menší než vlnová délka, chová se částice jako dipól v nehomogenním elektrostatickém poli).

Na částici vystavenou laserovému paprsku (nejčastěji s Gaussovým rozložením intenzity) působí dva druhy sil. Jednak jsou to síly vyvolané odrazem a rozptylem světla a jednak síly vyvolané lomem světla. Paprsek laseru se v důsledku rozdílného indexu lomu mezi částicí a okolním prostředím láme když vstupuje do částice a když ji opouští. Opouští tedy těleso v jiném směru, než do tělesa vstupovalo, což znamená že mění svoji hybnost. Podle zákona o zachování hybnosti je tato hybnost předána částici, což se projevuje silovým působením na částici v opačném směru, než v jakém dochází k lomu paprsku. Pokud se částice nachází mimo osu ohniska paprsku, tak v důsledku Gaussova rozložení intenzity laserového paprsku má výsledná síla způsobená lomem laseru směr k ose ohniska (obr. 49a). Síla způsobená rozptylem a odrazem od částice je také způsobena změnou hybnosti odrážejícího se paprsku a má směr shodný se směrem paprsku. Když je částice přemístěna do ohniskové osy, výslednice síly způsobené lomem je v laterálním směru je nulová a ve směru paprsku působí opačně než síla způsobená rozptylem a odrazem (obr. 49b). Tímto způsobem je částice “chycena” v optické pasti. Pokud dojde k vychýlení částice z ohniska paprsku, tak síly začnou zase působit a mají snahu vrátit částici zpět, takže optická past funguje podobně jako pružina.[121][122]



obr. 48 Vytvoření optické pasti zaměřeným laserovým paprskem (podle [122]).



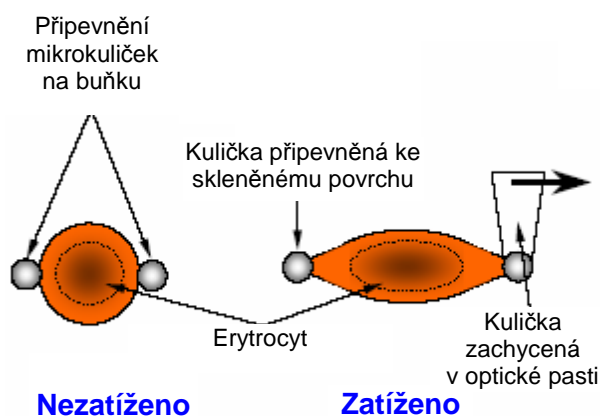
obr. 49 Síly působící na částici, zachycené v optické pasti[121].



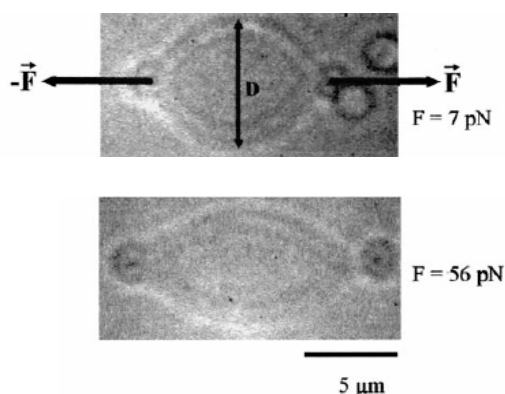
### Optická pinzeta (optical tweezer)

Dielektrická částice (kulička, obvykle o průměru 0,5-10 $\mu\text{m}$ ) pevně přilnutá na buněčnou membránu je zachycena do optické pasti. Vychýlení laserového paprsku vyvolá silové zatížení částice a tím deformaci povrchu buňky podobně jako u metody magnetická pinzeta. Nevýhodou této metody je obtížnost vyvinutí silových zatížení větších než přibližně 100 pN, což je výrazně méně v porovnání s AFM nebo mikropipetami. Při použití laseru s velkým výkonem totiž dochází k nežádoucímu zahřívání vyšetřovaného objektu. Tato metoda umožňuje detekci sil a posuvů interferometrickými metodami s velmi dobrou přesností (síly menší než 1 pN a posuv menší než 1 nm). Z tohoto důvodu je optická pinzeta vhodná pro měření mechanických vlastností např. proteinových vláken a molekulárních motorů, nebo lineárních materiálových parametrů buněk. [28]

Optické pinzety se využívá i při zatěžování buňky prostřednictvím více než jedné částice, čehož lze použít k určování mechanické odezvy celé buňky na tahové zatížení. Na protilehlé konce buňky se pomocí spojovacích proteinů připevní dvě kuličky, jedna je fixovaná na skleněném povrchu a druhá je zachycena do optické pasti (případně může být použito dvou optických pastí). Vychylováním laserového paprsku je řízeno protahování buňky (obr. 50). V práci [51] bylo publikováno použití tohoto principu ke zkoumání mechanických vlastností erytrocytů, které byly zatěžovány silami v rozsahu 0-56 pN. Bylo zjištěno, že při relativně rychlém cyklu zatěžování a odlehčování nedocházelo k hystereznímu tvarovému chování erytrocytu. Při delším cyklu zatížení erytrocytu (15 min) už bylo pozorováno zpevnění.



obr. 50 Vytvoření optické pasti zaměřeným laserovým paprskem (podle [52]).

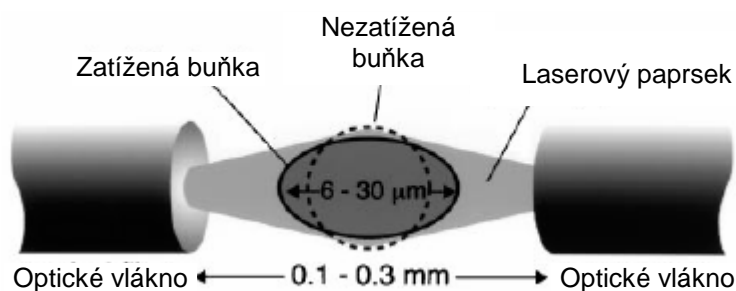


obr. 51 Natahování buňky pomocí optické pinzety (podle [51]).

### *Optical stretcher*

Metoda využívající rovněž principu optické pasti. Princip: Zkoumaný objekt je uchycen mezi dva protisměrné nepatrně divergentní laserové paprsky (díky efektu optické pasti). Takovéto uchycení je stabilní, jestliže výsledná síla působící na objekt je nulová. Tato

podmínka je splněna, jestliže index lomu objektu je větší než index lomu okolí a jestliže šířka paprsků je větší než velikost zkoumaného objektu. Na rozhraní mezi objektem a okolím dochází vlivem rozdílných indexů lomu k reflexi a difrakci laserových paprsků, což znamená, že paprsky ztratí část své hybnosti, která je přenesena na povrch objektu. Tato změna hybnosti v důsledku zákona zachování hybnosti způsobí silové zatížení. I když je celková síla působící na objekt nulová (paprsky jsou symetrické), silové zatížení, vyvolané změnou hybnosti paprsků způsobí protažení objektu ve směru osy působení laserových paprsků (obr. 52). Použití této metody je přehledně popsáno v [53]. Výhodou optického stretcheru je to, že laserové paprsky nejsou zaostřovány na vyšetřovanou buňku. To výrazně snižuje riziko jejího poškození (a tím možného ovlivnění výsledků) ozářením a umožňuje tak použití větších výkonů laserových paprsků.



obr. 52 Natahování buňky pomocí optického stretcheru [53].

### 4.3 PŘÍKLADY MECHANICKÝCH PARAMETRŮ BUNĚK

Následující tabulka uvádí na základě provedených literárních rešerší příklady mechanických parametrů buněk zjištěných různými experimentálními metodami.

Metoda	Typ buňky	Měřená veličina	Hodnota	Literatura
<i>Cell poking</i>	Erytrocyty	2D tuhost	0.75 - 2.5 mdy/ $\mu\text{m}$	[54]
<i>AFM</i>	Endotelové buňky	Youngův modul pružnosti	2 kPa	[55]
<i>AFM</i>	Fibroblasty	Youngův modul pružnosti	2.23 kPa	[56]
<i>AFM</i>	Buňky hladkého svalstva cévní stěny	2D tuhost	5 N/m	[30]
<i>Tahová zkouška</i>	Buňky hladkého svalstva cévní stěny	2D tuhost	0.17 N/m	[30]
<i>Tahová zkouška</i>	Fibroblasty	2D tuhost	0.02 N/m	[30]
<i>Tahová zkouška</i>	Endotelové buňky	2D tuhost	0.04 N/m	[30]
<i>Microplate manipulation</i>	Fibroblasty	Youngův modul pružnosti	1000 Pa	[28]
<i>Micropipette aspiration</i>	Chondrocyty	Poissonovo číslo	0.38	[62]
<i>Magnetic twisting cytometry</i>	Epitelové buňky dýchacích cest	Smykový modul pružnosti	50 Pa	[28]
<i>Magnetic tweezers</i>	Fibroblasty	Smykový modul pružnosti	20 - 40 kPa	[50]
<i>Magnetic tweezers</i>	Fibroblasty	Viskozita	kPa s	[50]
<i>Optical tweezers</i>	Erytrocyty	2D tuhost	2,5 $\mu\text{N/m}$	[51]
<i>Optical stretcher</i>	Erytrocyty	2D tuhost	6 - 9 $\mu\text{N/m}$	[56]

Tab. 2 Mechanické parametry buněk, zjištěné různými experimentálními metodami

## 5 Výpočtové modelování mechanického chování buněk

K vyšetřování mechanického chování živých buněk se využívá různých experimentálních metod, využívajících různých fyzikálních principů (viz předchozí kapitola). Všechny tyto metody jsou založeny na pozorování (měření) určité odezvy buňky (statické, dynamické, biochemické...) na určité mechanické podráždění (globální, lokální, statické, cyklické atd.). Z těchto změřených závislostí mezi mechanickým zatížením a buněčnou odezvou není možné ve většině případů přímo určit mechanické vlastnosti buňky, ale lze je na určité úrovni odvodit pomocí vhodných výpočtových modelů. Dalším krokem, nutným k popisu mechanického chování buněk, je tedy vytvoření vhodného výpočtového modelu buňky a identifikace jeho parametrů (na základě poznatků z experimentů). Na úrovni zvoleného výpočtového modelu (a na možnostech identifikace jeho parametrů) potom závisí kvalita a kvantita informací, které jsme schopni získat z experimentálních dat. Náplní této kapitoly je přehled a popis různých přístupů v oblasti výpočtového modelování na buněčné úrovni s důrazem na oblasti úzce související s tématem této práce.

### *Přehled výpočtových modelů mechanického chování buněk*

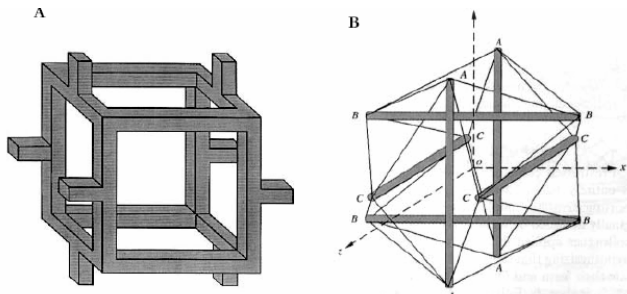
**Kontinuální modely** - všechny strukturální složky buňky jsou modelovány jako homogenní izotropní kontinuum. Tyto modely lze rozdělit na:

- *Lineárně nebo nelineárně elastické modely*
- *Viskoelastické modely*
- *Vícefázové modely*

**Diskrétní strukturální modely** – komponenty vnitrobuněčné struktury jsou modelovány jako soustavy diskrétních prvků, nejčastěji pruty, lany nebo nosníky. Mezi diskrétní modely patří :

- *“Open cell foam network“* modely – buňky je modelovány jako síť propojených elastických prutů, které se při deformaci prohýbají (obr. 53A).
- *“Prestressed cable nets“* modely – předpokládají, že struktura buňky má podobné vlastnosti jako síťované struktury složené z předepnutých lan (např. pavoučí síť)
- *Tensegritní modely* – modely založené na tzv. tensegritních strukturách (obr. 53B).

Složitějšími reologickými modely (např. *“soft glassy material“* modely, gelové a polymerové modely) jsme se v této práci nezabývali, zejména z důvodu jejich složitosti a z ní plynoucí obtížnosti využití těchto modelů pro výpočtové modelování. Při řešení stanovených cílů disertace je nejvíce využíváno modelů kontinuálních a tensegritních, proto se jimi budeme zabývat podrobněji v následujících kapitolách.



obr. 53A – *“open cell foam network“* model, B – *tensegritní model*[28]

## 5.1 KONTINUÁLNÍ VÝPOČTOVÉ MODELY

Tyto modely byly vytvořeny hlavně za účelem zjištění materiálových parametrů buněk na základě porovnání výsledků experimentálních mechanických zkoušek a jejich výpočtových simulací.

Kontinuální výpočtové modely buňky představují podstatné zjednodušení reality (homogenizace buněčné mikrostruktury). Tyto modely jsou akceptovatelné v případě, kdy nás zajímají především makroskopické vlastnosti buněk nebo jejich strukturních prvků. Kontinuálních modelů se využívá zejména při výpočtových simulacích mechanických zkoušek s prostorovou rozlišovací schopností významně horší, než jsou běžné vzdálenosti mezi jednotlivými prvky buněčné mikrostruktury. Například při tahové zkoušce nebo při nasávání buňky do mikropipety se projevují především makroskopické mechanické vlastnosti buněk, takže při výpočtovém simulování těchto zkoušek za účelem identifikace těchto makroskopických vlastností je kontinuální model vyhovující. Stejně tak při magnetocytometrických metodách, kdy rozměry magnetické kuličky přilnuté k povrchu buňky jsou výrazně větší, než je hustota sítě proteinových vláken cytoskeletu, je zbytečné při modelování uvažovat prostorovou nehomogenitu povrchu buňky. Na základě takových mechanických zkoušek není možné získat dostatek vstupních parametrů pro tvorbu a identifikaci parametrů složitějšího výpočtového modelu.

Vypovídací schopnost kontinuálních modelů je silně závislá na úrovni použitých modelů konstitutivního chování materiálu. Konstitutivní modely nejčastěji používané v současnosti v kontinuálních modelech jsou izotropní:

- lineárně elastický model
- nelineárně elastický (hyperelastický) model
- viskoelastický model

Tyto relativně jednoduché konstitutivní modely jsou používány hlavně z důvodu snadnější identifikace jejich parametrů na základě výpočtových simulací mechanických zkoušek. Složitější konstitutivní vztahy by sice uměly lépe popsat vlastnosti materiálu buněk, ale vzhledem k velkému počtu neznámých parametrů těchto složitějších konstitutivních modelů je obtížná jejich identifikace.

Kontinuální modely lze rozdělit na strukturní a nestrukturní podle toho, jestli zohledňují vnitřní strukturu buňky. U nestrukturních modelů je celý model buňky tvořen jedním kontinuem se stejnými materiálovými vlastnostmi v celém objemu. U strukturních modelů je model buňky tvořen z několika částí, reprezentujících určité prvky buněčné struktury (jádro, membrána, cytoskelet..) s odlišnými materiálovými vlastnostmi.

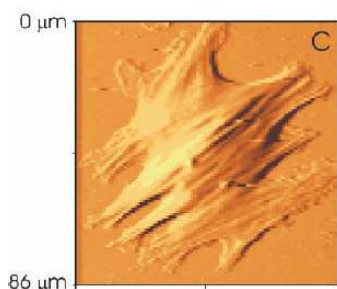
## 5.1.1 Přehled publikací, zabývajících se kontinuálními výpočtovými modely

### 5.1.1.1

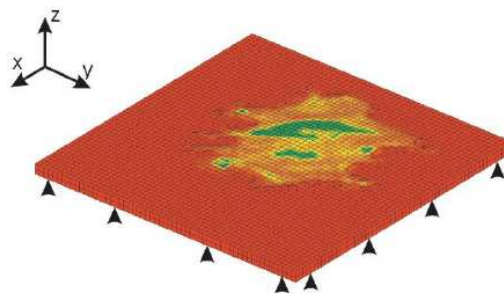
T. Charras a kol. se v práci [58] zabýval výpočtovým simulováním různých mechanických zkoušek buněk. Využívá metodu konečných prvků k tvorbě výpočtových modelů jak celých buněk, tak jejich lokálních oblastí. Výpočtové modely, použité v této práci spadají do kategorie modelů strukturních kontinuálních.

#### Celobuněčný model

Model geometrie buňky byl vytvořen na základě informací získaných skenováním povrchu a elasticity osteoblastů, přilnutých k pevné podložce, metodou AFM (obr. 55). Materiál buňky byl modelován jako lineárně-elastické izotropní kontinuum, přičemž buňka byla na základě informací z elastického mapování povrchu pomocí AFM rozdělena na deset podoblastí s rozdílnou tuhostí. Přilnutí buňky k podložce bylo realizováno předepsáním nulových posuvů do uzlů ve styku s podložkou. Na tomto modelu byly výpočtově simulovány tyto mechanické zkoušky buněk: zatížení deformací podložky (*membrane stretch*), zatížení hydrostatickým tlakem a fluidními smykovými silami. Byl vyhodnocován vliv modulu pružnosti buňky, Poissonova čísla, velikosti příslušného zatížení, směru zatížení, tloušťky buňky a kinematické viskozity omývající kapaliny (při zatěžování smykovými silami) na velikost přetvoření buňky.



obr. 54 3D fotografie osteoblastu, pořízená pomocí AFM (podle [58])



obr. 55 3D MKP model osteoblastu, přilnutého k pevné podložce (podle [58])

#### Modely lokálních oblastí buněk

Dále se autoři [58] zabývali výpočtovou simulací mechanických zkoušek pro určování vlastností buněk lokálního charakteru - magnetická pinzeta, magnetic twisting cytometry (MTC) a vlačovací zkouška. Byla modelována pouze malá oblast buňky, která podléhala mechanickému ovlivnění.

### Magnetická pinzeta

Tato metoda je založena na silovém působení magnetického pole na malou sférickou částici přilnutou k povrchu buňky (kap. 4.2). Oblast buňky byla modelována s využitím dvojnásobné symetrie jako kvádr a rozměrech  $2 \times 2 \times 3 \mu\text{m}$  z jednoho materiálu - izotropní homogenní lineárně elastický model materiálového chování (modul pružnosti byl zvolen  $E=1 \text{ kPa}$  a Poissonovo číslo  $\mu=0,3$ ). Sférická kulička nebyla v modelu zahrnuta, její funkce byla modelována předepsáním silového zatížení na plochu, která by byla v kontaktu s touto částicí. Celková síla působící na kontaktní plochu měla velikost  $4 \text{ pN}$  a působila kolmo na povrch směrem ven z buňky.

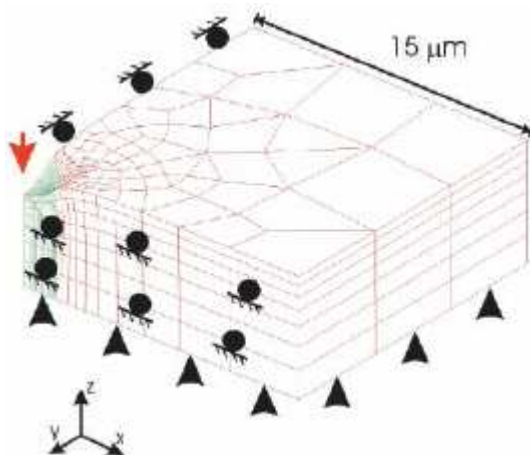
### MTC

Podstata metody: magnetické pole působící na částici, přilnutou k povrchu buňky, způsobuje její natáčení. Model byl podobný jako u magnetické pinzety, jediný rozdíl byl v zatížení kontaktní plochy. V tomto případě bylo zatížení aplikováno deformačně předepsáním posuvů do uzlů kontaktní. Z velikosti reakčních sil bylo potom vyhodnocováno silové působení.

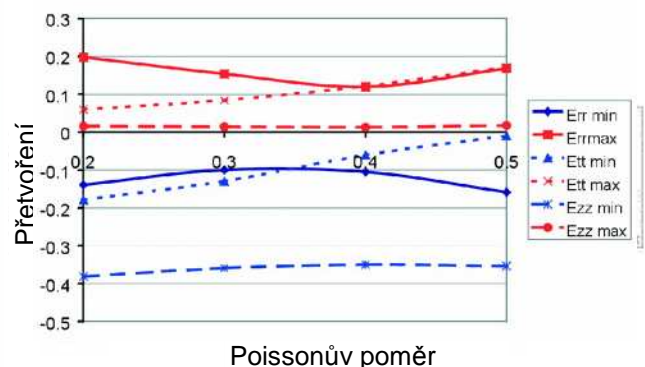
### Vtlačovací zkouška

Vtlačovací zkouška je měření silové odezvy buňky na průnik ostrého předmětu do jejího povrchu. V tomto případě byl výpočtově simulován průnik ideálně tuhé mikropipety se sférickým hrotem o poloměru  $1,5\text{-}3 \mu\text{m}$ . Model geometrie a materiálu byl stejný jako v předchozích případech, lišil se pouze rozměrově - kvádr  $15 \times 4 \times 4 \mu\text{m}$  (obr. 56). Průnik hrotu do buňky byl realizován deformačně, předepsáním posuvů do uzlů kontaktní plochy ve směru kolmém na povrch.

U všech těchto modelů byly prováděny parametrické studie vlivu modulu pružnosti, Poissonova čísla, velikosti zatížení a velikosti kontaktní plochy (vtlačovací zkouška) na přetvoření.



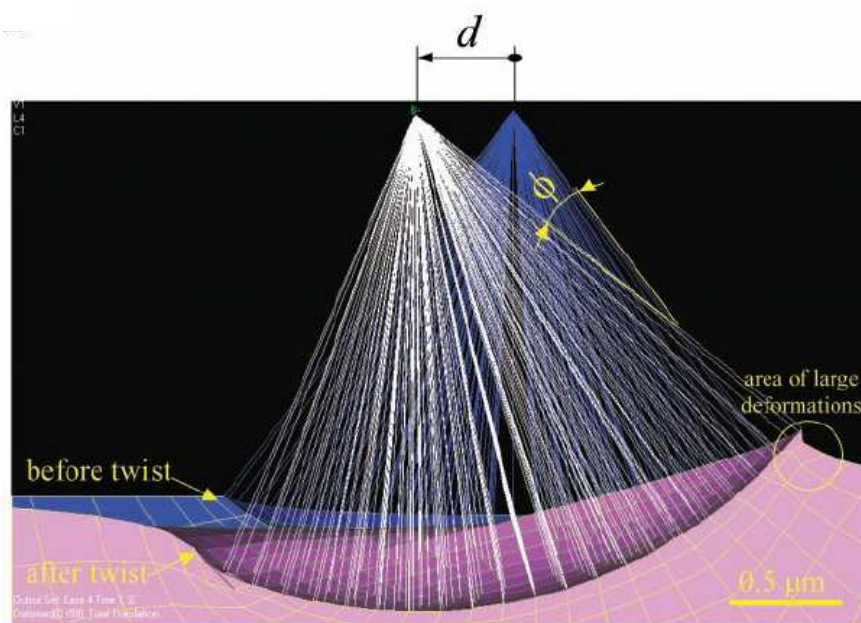
obr. 56 MKP model buňky, použitý při vtlačovací zkoušce (podle [58])



obr. 57 Vliv poissonova poměru na přetvoření při výpočtové simulaci vtlačovací zkoušky [58]

### 5.1.1.2

Mijailovich, Srboljub M. se v [59] zabývali výpočtovou simulací experimentů využívajících metodu magnetic twisting cytometry metodou konečných prvků (nestrukturní kontinuální model). Model se skládal z buňky (modelována jako čtvercová deska s konstantní tloušťkou o délce hrany rovnající se 50ti průměrům kuličky) a feromagnetické kuličky sférického tvaru a průměru  $4,5\mu\text{m}$ , částečně vnořené do povrchu buňky. Materiál buňky byl modelován jako homogenní lineárně elastické izotropní kontinuum (smykový modul pružnosti  $G = 1 \text{ kPa}$  a Poissonovo číslo  $\mu=0,49$ ) a kulička byla modelována jako ideálně tuhé těleso. Kontakt mezi buňkou a částicí byl modelován jako ideálně pevný (sdílení uzlů na rozhraní mezi buňkou a částicí), bez vzájemných prokluzů kontaktních ploch (na základě předpokladu, že kulička je potažena pojivovým proteinem a je tedy navázána na integrinové receptory). Kulička byla zatížena tzv. specifickým momentem  $T_s=60\text{Pa}$ , který je definován jako objemová hustota momentu magnetického pole  $T_m$  působícího na částici ( $T_s = T_m/V$ , kde  $V$  je objem kuličky). Pohyb kuličky v důsledku jejího zatížení při daných okrajových podmínkách lze rozložit na dvě složky-rotace kolem středu ( $\Phi$ ) a translace ve směru tečném k povrchu buňky ( $d$ ) (obr. 58). Byla zavedena veličina normalizovaná translace  $d^*=d/R$ , kde  $R$  je poloměr kuličky. Dále byly definovány zdánlivé tuhosti buňky  $G_\Phi = T_s/\kappa\Phi$  a  $G_d = T_s/\kappa d^*$ , kde  $\kappa$  tvarový součinitel, pro sférickou částici  $\kappa=6$ .



obr. 58 Deformace povrchu buňky při MKP výpočtové simulaci magnetic twisting cytometry (model kuličky není zobrazen) (podle [59])

Při výpočtových simulacích bylo zjištěno, že tyto zdánlivé tuhosti významně závisí na tloušťce modelu buňky a méně významně na velikosti vnoření kuličky. Dále byl zjišťován vztah mezi skutečným smykovým modulem buňky  $G$  a zdánlivými tuhostmi  $G_\Phi$  a  $G_d$ . Byly definovány koeficienty  $\alpha$  a  $\beta$  jako poměry zdánlivé tuhosti ke skutečné ( $\alpha = G_\Phi/G$ ,  $\beta = G_d/G$ ). Tyto koeficienty byly počítány z výpočtových simulací jako funkce vnoření kuličky a tloušťky buňky. Hlavním přínosem této práce je to, že byly určeny dva koeficienty  $\alpha$  a  $\beta$  které nám umožňují z výsledků měření MTC určit modul pružnosti buňky v místě působení kuličky, jestliže známe velikost vnoření kuličky, tloušťku buňky v místě působení kuličky, geometrii kuličky a zátěžný moment. Dále byl určen limitní úhel



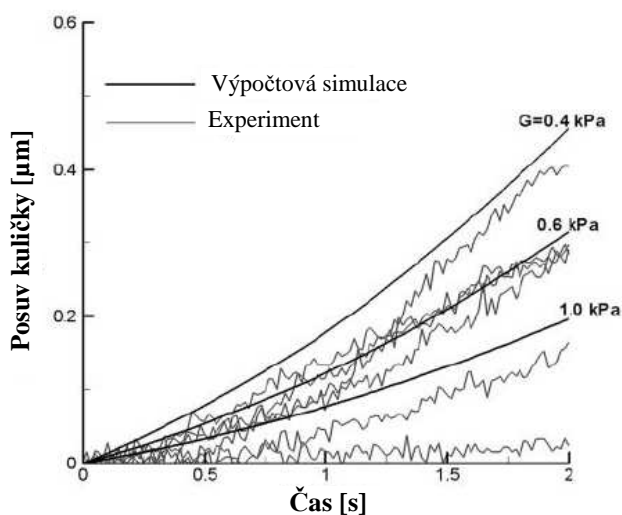
natočení kuličky v závislosti na vnoření, pro který je výpočet lineární (bez velkých přetvoření).

### 5.1.1.3

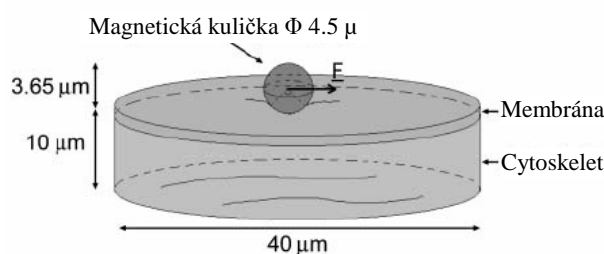
V práci [60] se Karcher a kol. zabývají výpočtovou simulací experimentů založených na metodě *magnetic tweezer* užitím metody konečných prvků. Model se skládá z buňky a magnetické kuličky. Geometrie buňky je modelována válcem, který reprezentuje lokální zatěženou oblast buňky. Na rozdíl od [59] se model buňky skládá ze dvou vrstev – vlastní objem válce představuje hluboký cytoskelet (modelovaný objemovými prvky) a na jeho povrchu je tenká vrstva (modelovaná skořepinovými prvky), představující membránový skelet buňky; jedná se tedy o strukturně založený kontinuální model (obr. 60).

Materiál cytoskeletu je modelován jako nestlačitelné izotropní homogenní viskoelastické kontinuum (Maxwellův model) s parametry: smykový modul  $G = 100 \text{ Pa}$  a viskozita  $\mu = 100 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ . Membránový skelet je modelován jako rovinná skořepina z nestlačitelného izotropního homogenního viskoelastického materiálu (Maxwellův model) s parametry: ohybová tuhost  $K_b = 2 \cdot 10^{-18} \text{ Nm}$  a viskozní konstanta  $\mu' = 3 \cdot 10^{-7} \text{ N}\cdot\text{m}\cdot\text{s}$ .

Magnetická kulička je modelována jako homogenní izotropní lineárně elastické kontinuum s modulem pružnosti o několik řádů vyšším než buňka (není specifikováno). Interakce mezi cytoskeletovou a membránovou vrstvou je realizována sdílením hraničních uzlů. Stejným způsobem je realizována vazba mezi částicí a membránovým skeletem (bez kontaktních prvků). Zátěžná síla byla aplikována v těžišti kuličky ve směru tečném k povrchu buňky (stejně jako při experimentu). Byly prováděny výpočtové simulace s lineární závislostí zátěžné síly na čase (125-2500 pN/s) a se sinusovým průběhem zátěžné síly (0-250 pN při frekvenci 1 Hz). Výpočtovými simulacemi bylo kromě rozložení napětí a deformací v buňce zjišťováno, jaký vliv na posuv kuličky má tuhost cytoskeletu, tloušťka buňky a rychlost zatěžování. Za hlavní přínos této práce lze považovat respektování viskoelastických vlastností buněk, respektování buněčné struktury (dvouvrstvý model)



obr. 59 Porovnání časových závislostí posuvu středu kuličky, určených experimentálně a výpočtově (podle [60])



obr. 60 Model geometrie buňky a magnetické kuličky, použitý při výpočtové simulaci zkoušky magnetická pinzeta podle ([60])

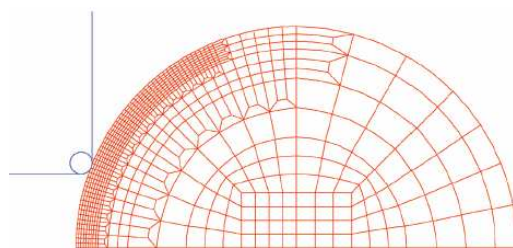
a určování mechanické odezvy buňky při časově závislém silovém zatížení. Bylo dosaženo dobré shody mezi závislostí posuvu kuličky na čase, určenou výpočtovou simulací a experimentálně (obr. 59).

#### 5.1.1.4

Výpočtovým simulováním aspiračního testu mikropipetou se zabýval Baaijens a kol. v [61]. Princip této metody spočívá v nasávání buňky nebo její části do mikropipety pomocí podtlaku. Cílem jejich práce bylo

1. vyšetřit, zda mechanické chování chondrocytů při této zkoušce je způsobeno jejich viskoelastickými vlastnostmi, dvoufázovým složením (kapalina-pevná látka), nebo jejich kombinací,
2. analyzovat vliv poměru mezi průměrem buňky a vnitřním průměrem mikropipety na výsledky experimentu.

K řešení bylo použito výpočtové simulace aspiračního testu mikropipetou, opět s využitím metody konečných prvků (nelineární úloha, velká přetvoření). Byly vytvořeny tři různé modely materiálového chování – nestruturní viskoelastický Maxwellův model, strukturní dvoufázový (kapalina-pevná látka) elastický model a dvoufázový viskoelastický model. Všechny tyto modely materiálového chování byly stlačitelné nebo nestlačitelné, homogenní izotropní s nelineární závislostí napětí-přetvoření (Neo-Hookovský model). Buňka byla modelována jako koule s využitím rotační symetrie (obr. 61). Mikropipeta byla modelována jako ideálně tuhé těleso. Interakce mezi buňkou a mikropipetou byla realizována kontaktními prvky. Buňka byla zatížena podtlakem v mikropipetě, stejně jako při experimentu. Byly prováděny citlivostní analýzy závislosti “velikost nasátí-podtlak“ na stlačitelnosti, na poměru průměrů buňky a mikropipety a na typu modelu materiálového chování. Dále byla zjišťována závislost velikosti nasátí na čase. Z dosažených výsledků podle [61] vyplývá, že dvoufázový elastický model není vhodný k modelování mechanického chování chondrocytů. Oproti tomu viskoelastický model a dvoufázový viskoelastický model vykazovaly při výpočtových simulacích podobné chování, jaké bylo pozorováno při experimentech.



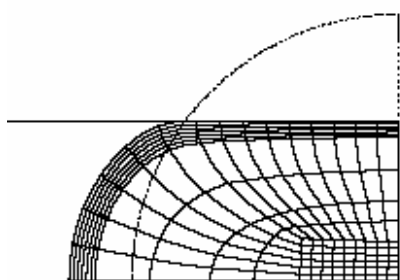
obr. 61 2D MKP síť modelu buňky, použitá při výpočtové simulaci aspiračního testu mikropipetou podle ([61])

#### 5.1.1.5

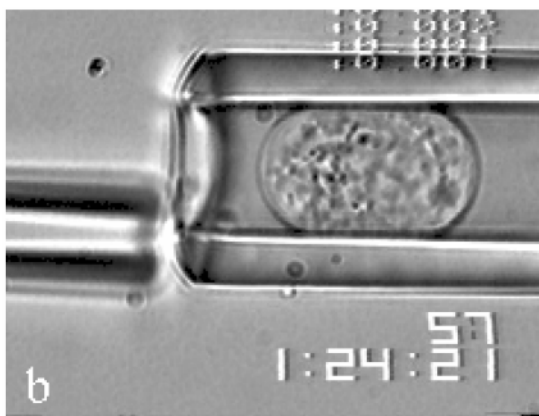
Výpočtovým simulováním aspiračního testu mikropipetou se zabýval také Trickey a kol. v [62]. Při nasávání celých chondrocytů (buňka chrupavky) do mikropipety a následném odlehčení bylo zjištěno, že buňka při takovém zatížení zmenšuje svůj objem a není tedy nestlačitelná. Příčinou této stlačitelnosti může být to, že při velké deformaci buňky dochází k vytlačování vody přes buněčnou membránu. Cílem jejich práce bylo, na základě výpočtového simulování tohoto experimentu určit elastické a viskoelastické vlastnosti chondrocytů, především Poissonovo číslo, a to z tkáně zdravé a postižené osteoartritidou. Při výpočtech byly použity dva modely materiálového chování – nestruturní viskoelastický

ký model a strukturní dvoufázový (kapalina-pevná látka) model. Materiál byl u obou těchto modelů považován za izotropní homogenní stlačitelný. Buňka byla modelována jako čtvrtkruh (s využitím rotační a rovinné symetrie úlohy), mikropipeta byla modelována jako ideálně tuhé těleso (obr. 62). Interakce mezi buňkou a mikropipetou byla realizována kontaktními prvky.

Při simulaci nebyl uvažován proces nasávání buňky do mikropipety, buňka byla zatěžována a odlehčována deformačně - zmenšováním a zvětšováním průměru mikropipety. Porovnáním výsledků experimentu a výpočtových simulací bylo stanoveno, že Poissonovo číslo chondrocytů je přibližně 0,4. Nebyl zaznamenán významný rozdíl mezi buňkami ze zdravé tkáně a z tkáně postižené artritidou. Dále bylo zjištěno, že oba použité modely materiálového chování jsou vhodné k popisu chování chondrocytů při tomto experimentu.



obr. 62 Deformovaná MKP síť modelu buňky při simulaci nasávání buňky do mikropipety[62]

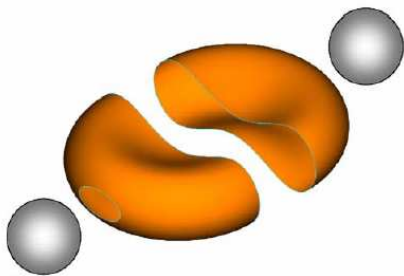


obr. 63 Fotografie chondrocytu nasátého do mikropipety (pro porovnání, podle [62])

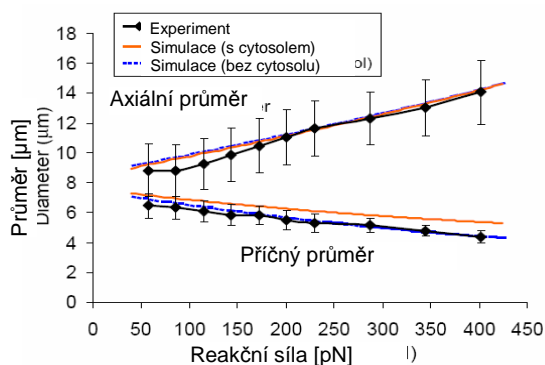
### 5.1.1.6

Dao se v [52] zabýval výpočtovým simulováním (metodou konečných prvků) mechanického chování erytrocytů při natahování optickou pinzetou. Při této zkoušce je buňka natahována pomocí dvou částic, umístěných na protilehlých stranách buňky. Byl vytvořen strukturní trojrozměrný model geometrie buňky (bikonkávní disk), tvarově a rozměrově (průměr přibližně 8  $\mu\text{m}$ ) odpovídající skutečnému erytrocytu (obr. 64). Model buňky se skládal z membrány a cytosolu (tekutá složka cytoplazmy). Membrána byla modelována jako nestlačitelná homogenní izotropní elastická skořepina s nelineární závislostí napětí-přetvoření (Neo-Hookovský hyperelastický konstitutivní model), podléhající velkým přetvořením, cytosol byl modelován jako ideální nestlačitelná kapalina. Kuličky byly modelovány jako ideálně tuhá tělesa, připevněná na protilehlých stranách buňky pomocí tuhého kontaktu. Kontaktní plochy mají oválný tvar o rozměrech 1-2  $\mu\text{m}$ . Zatížení bylo realizováno předepsáním síly v rozmezí 0-450 pN (odpovídající experimentu) do těžiště kuličky ve směru natahování. Materiálové parametry membrány: ohybová tuhost membrány  $K_b = 2 \cdot 10^{-19} \text{ Nm}$  byla určena z literatury a počáteční membránový smykový modul  $\mu_0 = 22,5 \mu\text{N/m}$  byl identifikován na základě výsledků výpočtové simulace a experimentu iterační metodou. Výstupem výpočtové simulace a experimentu je závislost mezi velikostí zátěžné síly a rozměry buňky[52]. Byly prováděny citlivostní analýzy této závislosti na různé parametry modelu – porovnávání výsledků simulace pro model s cytosolem a bez

cytosolu, určování vlivu průměru buňky, porovnání bikonkávního modelu se sférickým, vliv velikosti vnitřního objemu buňky, vliv velikosti kontaktních ploch mezi buňkou a částicí, nebo vliv viskozity membrány.



obr. 64 MKP model geometrie erythrocytu a silikonových částic při výpočtové simulaci natahování optickou pinzetou (podle [52])



obr. 65 Závislosti reakční síly v částici na posuvu kuličky, porovnání experimentu s výpočtovou simulací (podle [51])

### 5.1.1.7

Ananthakrishnan se v [63] zabýval vyšetřováním mechanických vlastností fibroblastů a vlivu komponent cytoskeletu buňky (fibroblastu) na její odezvu při natahování optickým strečem (natahování buňky v jednom směru působením laserových paprsků) s využitím výpočtového simulování. Při zkoumání mechanických odezev fibroblastů optickým strečem bylo zjištěno, že při nízkých časech zatížení (0,2s) je odezva čistě elastická, zatímco při vyšších časech (>1s) byla odezva významně viskoelastická. Tato práce byla zaměřena na zkoumání elastických vlastností.

Byly vytvořeny dva strukturně odlišné modely buňky.

- Nestrukturní analytický model kortikálního skeletu
- Třívrstvý strukturní model celé buňky
  - Analytický model
  - MKP model

#### Analytický model kortikálního skeletu

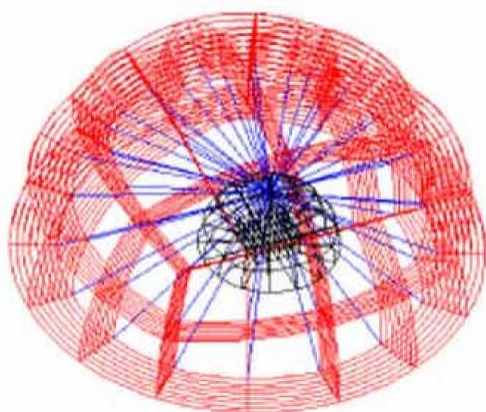
Tento model byl založen na předpokladu, že největší vliv na mechanickou odezvu buňky má kortikální skelet. Ostatní strukturní komponenty buňky nebyly v modelu zahrnuty. Kortikální skelet byl tedy modelován jako kontinuum ve tvaru duté sférické elastické izotropní skořepiny o relativně velké tloušťce. Tento model měl sloužit k určení smykového modulu pružnosti této skořepiny. Při znalosti tloušťky membrány, její radiální deformace a rozložení napětí na povrchu buňky je možno pomocí momentové teorie skořepin určit její tuhost. Tloušťka kortikálního skeletu a radiální deformace byly určeny z experimentu a rozložení napětí na povrchu buňky vyvolané laserovými paprsky bylo spočítáno numericky. Hodnoty modulu pružnosti ve smyku kortikálního skeletu fibroblastů, určené tímto způsobem, byly přibližně 200 Pa při Poissonově čísle 0,5.

### Třívrstvý analytický model celé buňky

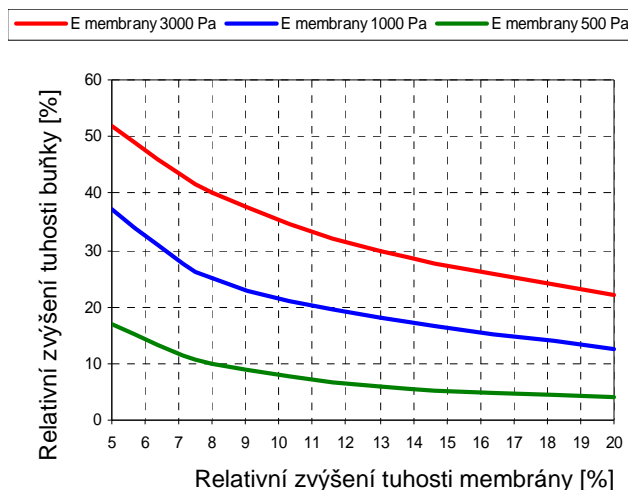
Model buňky je tvořen třemi vrstvami s rozdílnou tuhostí - vnější (kortikální skelet), prostřední (vnitřní cytoskelet) a vnitřní vrstva (jádro). Všechny vrstvy jsou modelovány jako homogenní lineárně elastické izotropní kontinuum. K řešení je použito podobných analytických rovnic, jako v případě modelu kortikálního skeletu. Každá vrstva může být řešena individuálně jako momentová skořepina, v případě jádra jako koule, s vhodnými okrajovými podmínkami na rozhraní mezi vrstvami. Pomocí tohoto modelu byl vyšetřován vliv tuhosti jednotlivých vrstev na deformaci buňky. Výpočty bylo zjištěno, že vliv kortikálního skeletu je výrazně vyšší, než ostatních vrstev.

### Strukturní MKP model

MKP model zahrnuje tři strukturní prvky buňky-kortikální skelet, mikrotubuly a jádro. Kortikální skelet je modelován jako skořepina, jádro je modelováno jako homogenní izotropní lineárně elastická koule a mikrotubuly jsou modelovány jako duté elastické pruty o vnějším průměru 12 nm a tloušťce stěny 5 nm. Mikrotubuly zajišťují spojení mezi jádrem a kortikálním skeletem (obr. 66). Počet mikrotubulů je ~1500. Pomocí tohoto modelu byl vyšetřován vliv mikrotubulů na celkovou tuhost modelu buňky a vliv tuhosti vnitrobuněčných komponent na celkovou tuhost buňky. Bylo zjištěno, že v porovnání s analytickým modelem kortikálního skeletu vzrostla tuhost buňky vlivem mikrotubulů přibližně o 20%. Také bylo zjištěno, že při vzrůstající tloušťce a tuhosti kortikálního skeletu tento vliv mikrotubulů klesá exponenciálně (obr. 67).



obr. 66 Strukturní MKP model fibroblastu pro simulaci zkoušky optickým stretcherem [63]



obr. 67 Vliv mikrotubulů a modulu pružnosti membrány na tuhost buňky (podle [63])

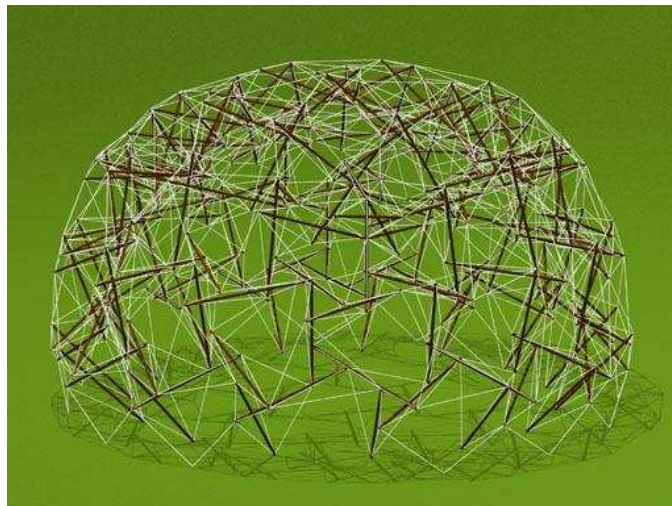
## 5.2 MODEL Y ZALOŽENÉ NA TENSEGRITNÍCH STRUKTURÁCH

Nový model mechanického chování buňky navrhl v osmdesátých letech Donald Ingber [64], který se pokoušel vysvětlit, jakým mechanismem dochází u přilnutých buněk k ovlivnění buněčných procesů prostřednictvím tvarových změn. Na základě poznatků z experimentálních vyšetřování mechanických vlastností buněk vyslovil **hypotézu, že mechanické chování buněk odpovídá tzv. tensegritnímu principu, tzn. struktura buňky (uspořádání a vlastnosti mechanicky podstatných vnitrobuněčných prvků, extracelulárních prvků a interakcí s okolím) má charakter tensegritní struktury.** Protože tensegritní modely využíváme při tvorbě vlastních výpočtových modelů, rozebereme nyní tuto problematiku podrobněji.

### 5.2.1 Definice tensegritních struktur

Slovem tensegrity se obecně rozumí architektonický princip, který je založen na stabilizaci vlastní struktury prostřednictvím rovnováhy mezi spojitě rozloženými prvky zatíženými tahovými silami a nespojitě rozloženými prvky zatíženými tlakovými silami. Integrita takové struktury je tedy zajišťována převážně tahovými silami. Odtud také pochází původ slova *tensegrity*, které vzniklo spojením slov *tensional integrity*. Tensegritní princip se tak liší od “klasického“ stavitelského principu, ve kterém je stabilita struktur zajištěna pomocí spojitých tlakových sil, vyvolaných gravitační účinkem země, jako např. kamenná kopule, kde každý element kopule v důsledku gravitace působí tlakově na své okolí (mezi klasické struktury patří téměř všechny lidské stavby). Obecně lze říci, že **tensegritní struktura je taková, jejíž integrita (stabilita) je zajištěna silovou rovnováhou mezi spojitými předeprnutými čistě tahovými prvky a nespojitými (izolovanými) tlakovými prvky.** Jako čistě tahové prvky se rozumí prvky, které nejsou schopny přenášet jiná zatížení než tahová, např. lano. Tyto prvky v tensegritní struktuře tvoří spojitou síť, tzn. jsou vzájemně propojeny a přenášejí zatížení spojitě do celé struktury. Oproti tomu tlakové prvky (vzpěry) jsou prvky, které v tensegritní struktuře přenášejí tlaková zatížení, přičemž nejsou vzájemně propojeny (tzn. jsou v rámci tensegritní struktury nespojitě) a tudíž nemohou mezi sebou přenášet zatížení. Zatížení se na tlakové prvky přenášejí pouze prostřednictvím spojitě sítě tahových členů. Tlakové prvky jsou obecně takové, které nejsou čistě tahové, tzn. mohou přenášet i jiná zatížení než tah. [124]

Tensegritní princip byl poprvé popsán v padesátých letech dvacátého století. Za vynálezce tohoto principu jsou považováni tři vědci: Richard Buckminster Fuller, David Georges Emmerich and Kenneth D. Snelson, ačkoliv všichni tři tvrdí, že byli první. Od té doby mnoho autorů publikovalo různé definice tensegritních struktur (podrobný přehled je uveden v práci [65]), které se různě odlišují v kritériích toho, jaké struktury lze považovat za tensegritní. Podle některých autorů lze za tensegritní považovat pouze struktury, skládající se z přímých tlakových a tahových členů (vzpěr a lan, viz obr. 68), zatímco jiní autoři považují za tensegritní struktury všechny, jejichž integrita je zajištěna rovnováhou mezi spojitě působícími tahovými silami a izolovanými tlakovými silami.



obr. 68 Tensegritní struktura tvořená vzpěrami a lany [124]

Jednu z nejobecnějších a všeobecně nejuznávanějších definic publikoval v roce 1975 Anthony Pugh : "A tensegrity system is established when a set of discontinuous compressive components interacts with a set of continuous tensile components to define a stable volume in space." [66], neboli

- **Tensegritní systém vzniká tehdy, jestliže nespojitá soustava tlakových prvků v interakci se spojitou soustavou tahových prvků vytváří stabilní a prostorově definovaný systém.**

V souladu s touto definicí jsou i definice z pozdější doby, které publikoval roku 2003 René Motro v [67]. Formuloval dvě definice tensegritních struktur – *patentovou* a *rozšířenou*. Patentová definice (vychází z patentů Fuhllera, Emmericha a Snelsona): "Tensegrity systems are spatial reticulate systems in a state of self-stress. All their elements have a straight middle fibre and are of equivalent size. Tensioned elements have no rigidity in compression and constitute a continuous set. Compressed elements constitute a discontinuous set. Each node receives one and only one compressed element.", neboli

- **Tensegritní systém je samo-předepnutý prostorový síťovaný systém, tvořený pouze přímými prvky ekvivalentní velikosti. Tahové prvky nejsou schopny přenášet tlak a tvoří spojitou soustavu, zatímco tlakové prvky tvoří nespojitou soustavu, přičemž každý uzel může příslušet pouze jednomu tlakovému prvku.**

Druhá definice je podobná definici, kterou publikoval Pugh, ale obsahuje podmínky toho, že tlakové prvky musí být uvnitř soustavy tahových prvků a že celý systém musí být ve stavu samo-rovnovážné stability. " Tensegrity system is a system in a stable self-equilibrated state comprising a discontinuous set of compressed components inside a continuum of tensioned components.", neboli:

- **Tensegritní systém je systém ve stabilním samo-rovnovážném stavu, skládající se z nespojitě soustavy tlakových komponent uvnitř spojitě soustavy tahových komponent.**

Motro definuje pojmy použité v definici následovně:

- **System** – Tensegritní struktury lze považovat za systém, obsahující dva druhy komponent (tahové a tlakové), relativní strukturu (tvořená komponentami stejného druhu), celkovou strukturu zahrnující relativní struktury s charakteristikami komponent a tvar.
- **Stabilní samo-rovnovážný stav** – stabilní, protože v systému vždy dojde k obnovení rovnovážného stavu po zatížení, samo-rovnovážný, protože tento stav je nezávislý na externích silových podmínkách (např. na gravitaci) a na vazbách s okolím.
- **Komponenty** – Motro v definici používá místo prvků pojem komponenty. Těmito komponentami mohou být pruty, lana, membrána atd., nebo také spojení několika těchto elementárních prvků. Tyto komponenty jsou dvou druhů – tlakové a tahové.
- **Spojité tah a nespojité tlak** – tlakové komponenty musí být nespojité, zatímco tahové komponenty musí tvořit spojitou síť. Soustava nespojitých tlakových komponent se musí nacházet uvnitř spojitě soustavy tahových komponent. Soustava tlakových komponent leží uvnitř systému, jestliže leží uvnitř všechny prvky této soustavy. Tlakový prvek leží uvnitř tehdy, jestliže spojnice jeho konců nenáleží hranici systému. Na základě toho Motro rozlišuje tzv. pravé (*pure*) tensegrity a nepravé (*false*) tensegrity.



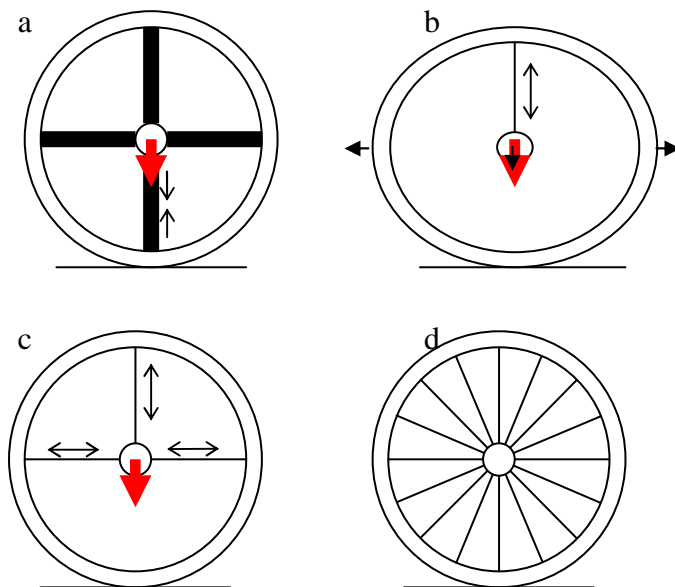
obr. 69 Nepravá tensegritní struktura[65] obr. 70 Pravá tensegritní struktura[65]

Tensegritního principu se využívá např. ve stavebnictví při tvorbě rozlehlých kopulovitých staveb, kde je to ekonomicky výhodné, nebo závěsných mostů. Díky vlastnostem tensegritních struktur je možné použít v konstrukci méně stavebního materiálu, než v klasických konstrukcích, při srovnatelné únosnosti a spolehlivosti. Je to dáno především tím, že velká část zatížení, kterou konstrukce přenáší, je rozložena v tahových členech u kterých nedochází k tvarové nestabilitě (buckling) jako u členů namáhaných na tlak.

Rozdíl mezi tensegritní a netensegritní strukturou je v literatuře často vysvětlován na příkladu dřevěného kola od vozu a kola bicyklu (i když kolo bicyklu patří ve smyslu definice mezi nepravé tensegritní struktury). U vozového kola (integrity kola je zajištěna obvodovou kovovou obručí, která stlačuje rám a loukotě ke středu, tyto jednotlivé prvky jsou tedy tlakově předepnuty) je střed uchycen k rámu pomocí tuhých loukotí (obr. 71a).



Při geometrické konfiguraci jako je na obrázku dochází při přenášení zatížení od nápravy na rám kola k významnému tlakovému zatížení loukotě, která se nachází v ose síly nápravy a přenáší většinu zátěže, zatímco ostatní loukotě jsou namáhány minimálně. Zatížení od nápravy je tedy přenášeno na rám kola pomocí tlakově zatížené loukotě (musí být dostatečně odolná proti ztrátě tvarové stability) v ose zatížení nápravy.



obr. 71 Netensegritní a tensegritní struktura na příkladu kola od vozu a bicyklu

Oproti tomu konstrukce kola bicyklu je založena na principu uchycení středu na rám pomocí tahově předepnutých tenkých drátů, tedy prvků schopných přenášet pouze tahová zatížení. Na obr. 71b je znázorněn zjednodušený případ zavěšení středu k rámu pomocí

jednoho drátu. V tomto případě, když dojde k zatížení nápravy kola, je toto zatížení přeneseno na rám v místě uchycení tahově zatíženého drátu, což má za následek deformaci rámu v naznačených směrech. Tyto deformace lze omezit přidáním dalších dvou tahových členů (obr. 71c), čímž dojde k omezení deformací v horizontálním směru a přenesení zatížení od nápravy na rám kola ve více místech. Dráty představují čistě tahové členy, zatímco střed a rám kola jsou schopny přenášet obojí zatížení, tedy i tlak). Přidáním dalších drátů je dosaženo stability struktury pro všechny geometrické konfigurace kola vzhledem k zatížení od nápravy (obr. 71d). Takovéto drátěné kolo lze považovat za nepravou tensegritní strukturu (rám kola tvoří hranici systému), skládající se ze dvou izolovaných tlakových členů (střed a rám) a dvou spojitých sítí tahových členů (dráty). Zatížení jednoho izolovaného tlakového členu (střed kola) je přeneseno pomocí spojitých sítí tahových členů na zbývající tlakové členy (rám).

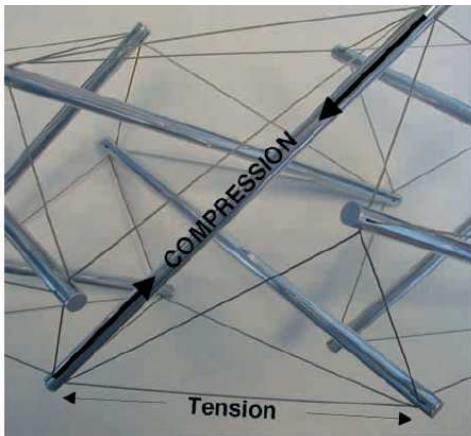
### 5.2.2 Vlastnosti tensegritních struktur

- Existence předpětí – komponenty tensegritní struktury jsou předepnuté, mechanická stabilita struktury je zajištěna vnitřním předpětím diskretních nosných členů.
- Tuhost tensegritní struktury je proporcionálně závislá na velikosti předpětí.
- Nelineární odezva na externí zatížení – při zatížení dochází k geometrické reorganizaci jednotlivých prvků tensegritní struktury a v důsledku této geometrické nelinearity dochází k efektu deformačního zpevnění.
- Globální odezva na aplikované lokální zatížení – Při mechanickém zatížení v určitém místě tensegritní struktury dochází prostřednictvím spojitě sítě tahových členů k přenosu tohoto zatížení na ostatní prvky struktury, tedy k přenosu i do míst vzdálených od působiště (tzv. vzdálený důsledek - *action at the distance* [69]).
- Synergetické chování – Mechanické vlastnosti struktury jako celku jsou odlišné od vlastností jejích izolovaných komponent.
- Stabilita struktury není závislá na vazbách s okolím.
- Statická neurčitost – tensegritní struktury jsou minimálně jedenkrát staticky neurčité. V případě že mají pouze jeden stupeň statické neurčitosti, nepovažují se žádné jejich prvky za redundantní ("nadbytečné"), protože jejich počet je minimální nutný k tomu, aby se jednalo o tensegritní soustavu.

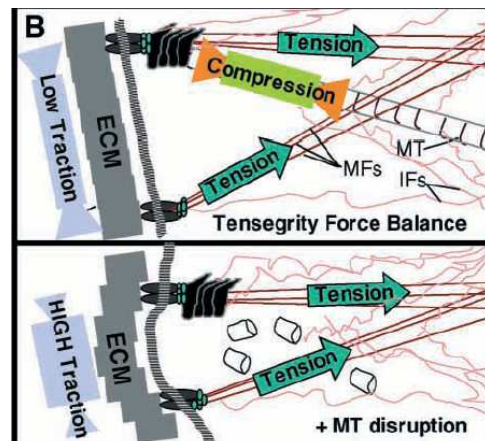
### 5.2.3 Tensegritní model buňky

Tensegritní model buňky je založen na předpokladu, že tvarová stabilita buňky (schopnost odolávat vnějšímu zatížení) je zajišťována prostřednictvím mechanicky aktivního systému, tvořeného předepnutou spojitou sítí tahových prvků a tlakových prvků, které toto předpětí vyrovnávají, podobně jako je tomu u tensegritních struktur. Tímto mechanicky aktivním systémem, který zajišťuje stabilitu buňky, je cytoskelet a extracelulární matrix.

Kontraktilní mikrofilamentová vlákna jsou považována za prvky přenášející pouze tahová zatížení (čistě tahové členy tensegritní struktury). V těchto tahových členech také dochází ke generování předpětí prostřednictvím aktomyozinových kontraktilních motorů. Toto tahové předpětí je vyrovnáváno intracelulárními a extracelulárními tlakovými prvky. Za intracelulární tlakové prvky jsou považovány mikrotubuly a silné svazky zesíťovaných aktinových vláken, které vyvažují část předpětí, generovaného v mikrofilamentech. Zbývající část předpětí je vyvažována prostřednictvím extracelulární matrix, která je fyzicky propojena s cytoskeletem přes focal adhesions. Třetí základní složkou cytoskeletu jsou intermediální vlákna, která podle D. Ingbera [70] plní funkci integrátorů, zprostředkovávajících mimo jiné vzájemné propojení jak mezi mikrotubuly a kontraktilními mikrofilamenty, tak mezi povrchem buňky a buněčným jádrem. Všechny tyto prvky dohromady podle [70] tvoří synergetický, mechanicky stabilizovaný systém.



obr. 72 Tahové a tlakové členy v tensegritní struktuře (podle [102])



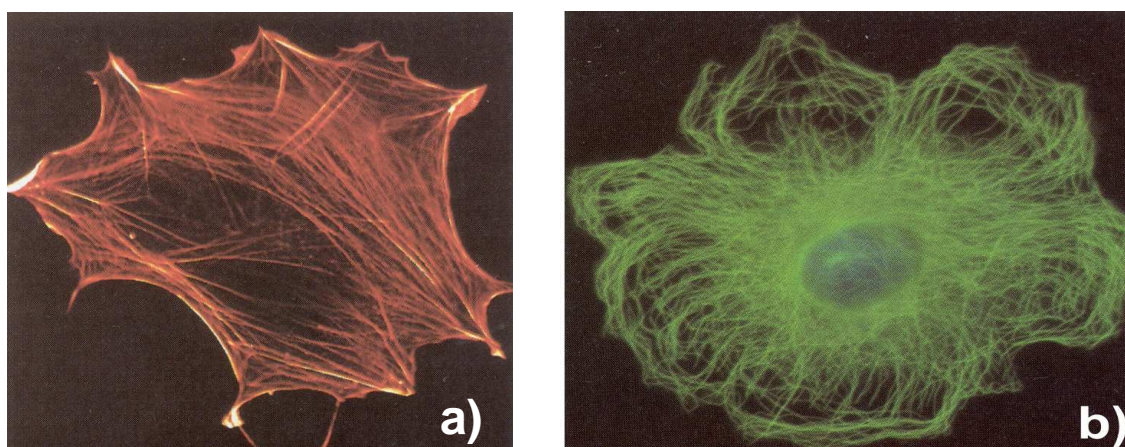
obr. 73 Funkce složek cytoskeletu a extracelulární hmoty v buněčné tensegritní struktuře (podle [102])

Tensegritní model buňky je tedy založen na předpokladu, že buňka tvoří (se svými intra- a extracelulárními strukturními prvky) tensegritní strukturu, a že tedy pomocí tensegritního modelu buňky je možné vysvětlit (popsat) některé vlastnosti mechanického chování buněk, které nelze popsat pomocí jiných modelů. Náplní další kapitoly je rozbor poznatků a indicií (nepřímých důkazů), které podporují tuto hypotézu tensegritního modelu. mechanického chování buněk a rozbor experimentálních studií, které byly provedeny za účelem ověření této hypotézy.

## 5.2.4 Poznatky a indicie podporující hypotézu tensegritního modelu

### ➤ *Role mikrotubulů a aktinových vláken jako tlakových, resp. tahových členů tensegritní soustavy cytoskeletu*

Z experimentálních dat, získaných *in vitro* z biofyzikálních měření izolovaných aktinových vláken a mikrotubulů [71][72][73][74] bylo zjištěno, že aktinová vlákna jsou částečně ohebná, zakřivená, s vysokým modulem pružnosti (1 GPa), s persistentní délkou (veličina charakterizující tuhost polymerových molekul, vyjadřuje střední hodnotu zakřivení molekuly pro určitou teplotu) přibližně 10  $\mu\text{m}$ , zatímco mikrotubuly se jeví jako přímé rigidní trubice s přibližně stejným modulem pružnosti jako aktinová vlákna, ale s mnohem větší persistentní délkou (1000  $\mu\text{m}$ ). Na základě těchto skutečností by aktinová vlákna v nezátížené buňce měla být zakřivená a mikrotubuly přímé. Avšak imunofluorescenční\* pozorování cytoskeletu v živých buňkách ukazují pravý opak – aktinová vlákna jsou



obr. 74 Imunofluorescenční snímky mikrofilament (a) a mikrotubulů (b) v živé buňce

přímá, zatímco mikrotubuly zakřivené (obr. 74).[75] To naznačuje, že na tato vlákna působí v buňce určité mechanické síly, tahové na aktinová vlákna, způsobující jejich narovnávání, a tlakové na mikrotubuly, způsobující jejich ohýbání v důsledku ztráty tvarové stability (buckling). Výsledky v rozporu s touto hypotézou publikovali Satcher a kol. [76], kteří zjistili, že u endotelových buněk je velikost pórů aktinového skeletu mnohem menší než je persistentní délka aktinových vláken. To naznačuje, že přímost aktinových vláken je pouze zdánlivá a vyplývá z velmi malé délky vzhledem k jejich persistentní délce.

---

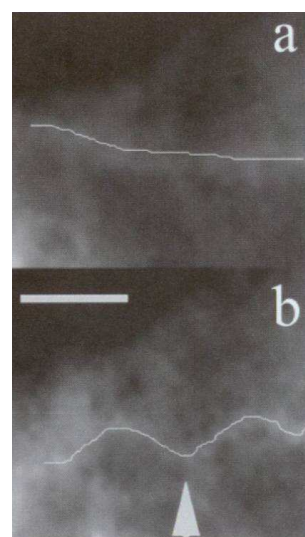
\* Imunofluorescenční mikroskopie je imunohistochemická technika na detekci a lokalizaci antigenů po jejich reakci s protilátkami označenými fluorescenčními látkami. Fluoreskující imunokomplexy v tkáních nebo na buňkách je možné pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu.

### ➤ *Předepnutí cytoskeletu*

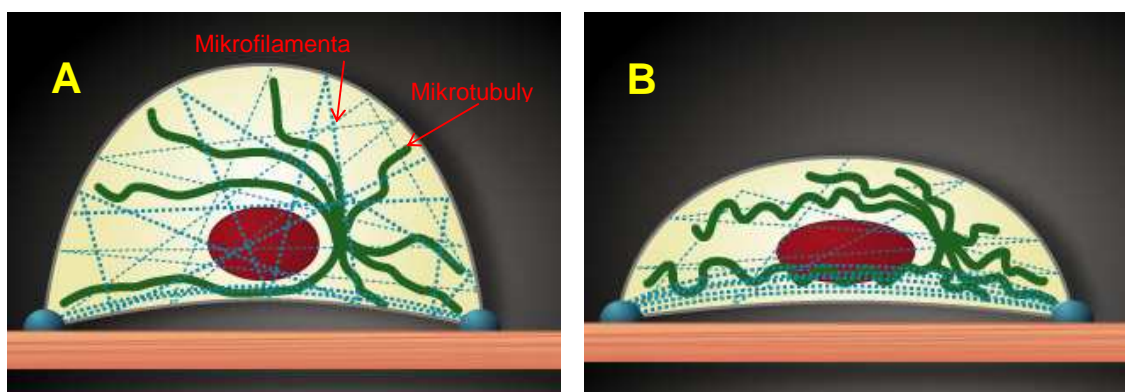
Je dobře známo, že mechanické napětí, generované v cytoskeletu, je přenášeno na podklad (podložku, na které je buňka uchycena) prostřednictvím transmembránových integrinových receptorů. Harris a kol.[77] to prokázal při experimentu, kdy kultivoval fibroblasty na pružné silikonové podložce. Při kontrakci fibroblastových buněk pozoroval zvrásnění pružné podložky. Podobné výsledky s fibroblasty kultivovanými na polyakrylamidové podložce publikoval i Pelham a Wang [78]. Sims a kol. [79] publikoval výsledky experimentu, při kterém bylo pozorováno rychlé smrštění endotelových buněk přilnutých k podložce, v důsledku rozrušení buněčných vazeb focal adhesion pomocí trypsinu, což naznačuje, že cytoskelet je v předepnutém stavu a toto předpětí je přenášeno a vyrovnáváno trakčními silami, působícími v místech ukotvení k podložce.

### ➤ *Mechanické interakce mezi tahovými a tlakovými členy v cytoskeletu*

Výsledky experimentálních studií naznačují existenci mechanických interakcí mezi tahovými a tlakovými členy cytoskeletu. Tahové síly vyvolané kontrakcí vláken aktinové sítě se přenášejí jako tlakové síly na mikrotubuly, analogicky se synergeticky působícími tahovými a tlakovými prvky tensegritních systémů (obr. 76). Například při kontrakci migrujících kultivovaných epitelových buněk bylo pozorováno boulení mikrotubulů v oblasti lamellipodia (výběžek, umožňující pohyb buňky po podložce), v reakci na působení kontraktlních sil vygenerovaných aktinovým skeletem [80]. Wang a kol. [81] při zkoumání endotelových buněk zjistily, že u mikrotubulů, které byly v relaxovaném stavu relativně přímé, došlo při kontrakci buňky k boulení (obr. 75). Podobné výsledky publikoval i Heidemann a kol. [82][83], který ale zakřivený tvar mikrotubulů přisuzoval spíše fluidnímu chování mikrotubulů, protože pozoroval pomalou rychlost relaxace (narovnávání) mikrotubulů po mechanickém rozrušení povrchu buňky. Oproti tomu Wang a kol. [81] pozorovali relativně velkou rychlost relaxace mikrotubulů následkem rozrušení struktury buňky.



obr. 75 Boulení mikrotubulů v endotelových buňkách: a) relaxovaný stav, b) kontrahovaný stav[81]



obr. 76 Mechanismus kontrakce buňky a následného boulení mikrotubulů podle tensegritního modelu buňky. A – relaxovaná buňka, B – kontrahovaná buňka. [125]

### ➤ *Deformační zpevnění*

Při vyšetřování mechanických vlastností buněk různými experimentálními metodami bylo zjištěno, že se vzrůstajícím mechanickým zatížením vzrůstá i tuhost buňky, z čehož vyplývá, že buňky vykazují nelineární závislost mezi napětím a přetvořením (deformační zpevnění) [54][84][85]. V diskrétních strukturách (např. tensegritních) je tato nelinearita primárně způsobena geometrickou rekonfigurací a natáčením strukturních prvků ve směru působícího zatížení (spíše než nelineárním chováním individuálních strukturních prvků) [86]. D. Ingber a kolegové zabývající se touto problematikou považovali ve svých dřívějších studiích toto deformační zpevnění za klíčový důkaz, podporující tensegritní princip pro popis mechanického chování buněk, protože různé fyzikální [49] a výpočtové tensegritní modely [86] vykazují za jistých zatěžovacích podmínek toto mechanické chování. Ukazuje se ovšem, že tento důkaz není dostatečně věrohodný. Nepodporuje, ani neodporuje tensegritnímu modelu buňky z několika důvodů: 1) Efekt deformačního zpevnění vykazují i některé materiály, které nemají žádnou souvislost s tensegritními strukturami. 2) Deformační zpevnění není nejpodstatnější vlastností tensegritních struktur, za jistých zatěžovacích podmínek mohou tyto struktury vykazovat deformační změkčení, nebo lineární závislost mezi napětím a přetvořením [87]. 3) Při nedávných studiích hladkých svalových buněk dýchacích cest bylo zjištěno, že tyto buňky vykazují lineární závislost mezi napětím a přetvořením při velkém rozsahu zatížení. [88][89]

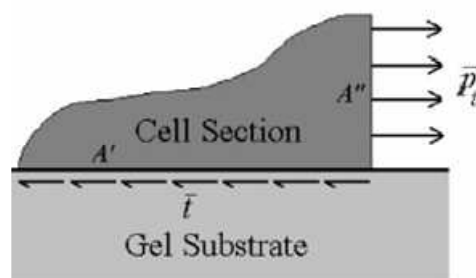
### 5.2.5 **Ověření souvislosti mezi tensegritními strukturami a buňkami**

Protože výše uvedené indicie (nepřímé důkazy), podporující tensegritní model buňky, nejsou jednoznačné a umožňují i jiné interpretace, byly provedeny studie, které měly za cíl ověřit další souvislosti mezi vlastnostmi tensegritních soustav a buněk. Jedná se zejména o vztah mezi tuhostí buňky a úrovní předpětí v cytoskeletu, efekt *action at a distance*, kvantitativní odhad podílu podložky a mikrotubulů na vyrovnávání předpětí cytoskeletu u přilnutých buněk a také o roli intermediálních vláken v kontextu s tensegritním modelem buňky. Nové pokroky ve vývoji cytometrických metod umožňují provádět přímá experimentální vyšetřování těchto vlastností.

### ➤ *Předpět'ové zpevnění*

Základní vlastností všech předepjatých struktur je to, že jejich tuhost je téměř přímo úměrná velikosti předpětí [90]. Tento efekt byl pozorován při mnoha experimentálních studiích, prováděných na různých typech buněk. Bylo zjištěno, že mechanické [91][92], farmakologické a genetické modulace cytoskeletálního předpětí způsobují změnu tuhosti buňky [89][91][92]. Experimentálním ověřením závislosti mezi předpětím v cytoskeletu a tuhostí buňky se zabývali např. Wang a kol. v [93]. V této práci vyšetřovali vztah mezi předpětím v cytoskeletu buněk hladkého svalstva dýchacích cest (předpětí bylo ovlivňováno kontrakcí a relaxací, prostřednictvím aktivace a deaktivace aktinmyozinových kontraktálních aparátů histaminem a isoproterenolem) a tuhostí těchto buněk. Předpětí v cytoskeletu bylo určováno pomocí techniky *traction cytometry*. Pomocí této metody lze vyhodnocovat trakční síly, kterými působí buňka na podložku, ke které je přilnutá.

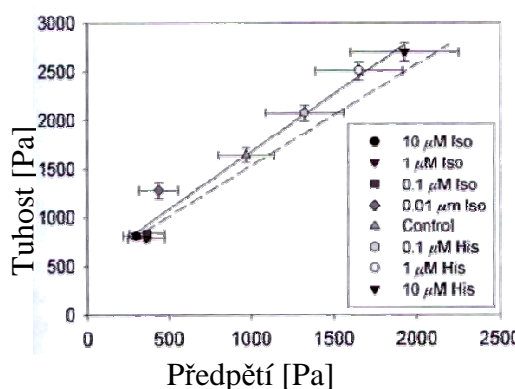
Předpětí v cytoskeletu bylo pak určováno ze silové rovnováhy mezi trakčními silami, kterými buňka působí na podložku a předpětím v cytoskeletu (obr. 77). Trakční síly  $t$  působící na rozhraní buňky a podložky (plocha  $A'$ ) musí být v rovnováze s vnitřním předpětím  $p_i$ , působícím na průřezu  $A''$ . Tedy musí platit  $\bar{p}_i A'' = \bar{t} A'$ , kde  $\bar{t}$  je průměrná hodnota trakčních sil přes plochu  $A'$ , ( $\bar{t} = (1/A') \int_{A'} \vec{t} n dA$ ,



obr. 77 Síly působící na uvolněnou buňku. [93]

$\vec{t}$  -vektor trakční síly,  $\vec{n}$  -normála plochy  $A'$ ) a  $\bar{p}_i$  je průměrná hodnota vnitřních sil přes plochu  $A''$ . Protože velikost ploch a trakčních sil lze změřit přímo, ze silové rovnováhy lze dopočítat velikost předpětí  $p_i$ . Tuhost buňky byla měřena metodou *magnetic twisting cytometry*.

Bylo zjištěno, že tuhost buňky se zvyšujícím se předpětím vzrůstá téměř lineárně (viz obr. 78). Ačkoliv tento vztah mezi tuhostí a předpětím buňky nevylučuje jiné interpretace, **jedná se o charakteristickou vlastnost struktur, u kterých je stabilita zajišťována prostřednictvím předpětí.**



obr. 78 Závislost mezi předpětím v buňce a tuhostí. [93]

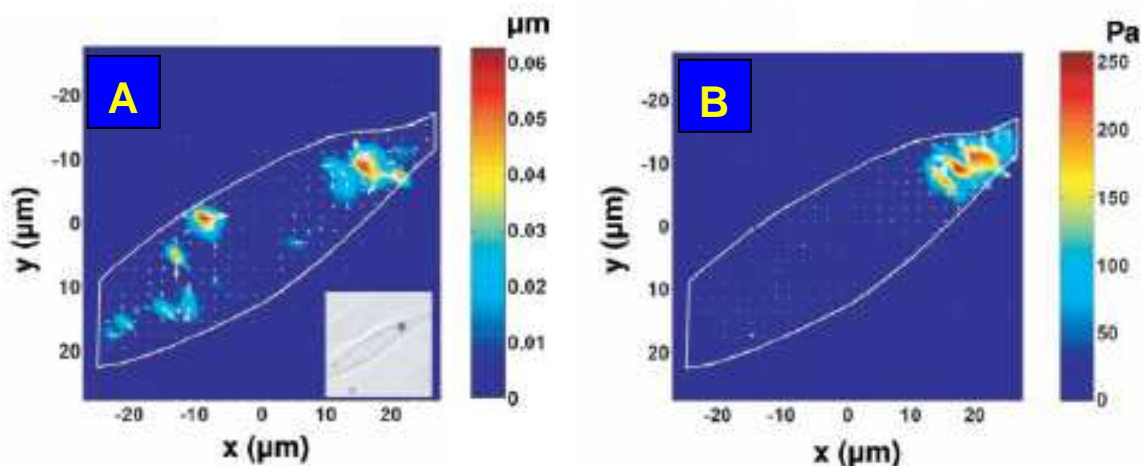
Jednou ze dvou možných interpretací, alternativních k tensegritní hypotéze, toho, proč dochází u buněk k předpětí, je polymerizace aktinové sítě. Je známo, že farmaka, způsobující generování tahových sil prostřednictvím kontraktilních aktinmyozinových motorů, způsobují také polymerizaci aktinové sítě, takže zvýšení předpětí a tuhosti buňky může být způsobeno pouze touto polymerizací. Výsledky nedávných studií na buňkách hladkého svalstva dýchacího ústrojí [28] jsou však v rozporu s touto interpretací. Při zablokování generování kontraktilních sil v aktinmyozinových motorech pomocí různých látek nebylo pozorováno zvýšení tuhosti buňky v reakci na látku vyvolávající kontrakci, přičemž polymerizaci aktinu zabráněno nebylo.

Druhým potenciálním mechanismem, díky kterému může docházet k předpětí, je rostoucí počet příčných můstků v aktinmyozinových motorech. Ze studií izolovaných proužků hladkého svalstva podrobených jednoosému tahovému zatížení bylo zjištěno, že tuhost svalu a velikost síly, generované svaem, jsou přímo úměrné počtu zapojených příčných můstků. Proto proporcionalita mezi tuhostí buňky a předpětím může být pouze důsledkem zvyšujícího se počtu příčných můstků, vyvolaného farmakologickou stimulací. Proti této alternativě však hovoří odlišná frekvenční odezva svalu a buňky. Tuhost svalu se zvyšující se frekvencí zatěžování roste, dokud nedojde k dosažení a překonání frekvence cyklu příčných můstků, potom už tuhost nenarůstá, buňka však tuto frekvenční závislost typickou pro svalová vlákna nevykazuje [28].

➤ *Efekt prostorově vzdáleného důsledku (Action at a distance)*

Jednou z podstatných vlastností tensegritních struktur je globální odezva na aplikované lokální zatížení (tzv. vzdálený důsledek - *action at a distance* [69]). Pro vyšetření toho, zda cytoskelet vykazuje tento efekt, provedli Maniotis a kol.[44] následující experiment: hrot skleněné mikropipety, potažený fibronectinem, byl uchycen na integrinové receptory endotelové buňky a následně tažen směrem od buňky. Protože integrinové receptory jsou fyzicky spojeny s cytoskeletem, tak v případě, že cytoskelet je organizován jako diskrétní tensegritní struktura, by tahové zatížení integrinových receptorů mělo vyvolat pozorovatelné deformace v místech vzdálených od bodu zatížení. Při tomto experimentu byly skutečně pozorovány deformace hranice buněčného jádra ve směru tažení mikropipety, což odpovídá existenci efektu (prostorově) *vzdáleného důsledku*.

Mnohem přesvědčivější důkaz pro tento jev přinesli Hu a kol. v [94]. Tito vědci vyvinuli intracelulární tomograf, který umožňuje pozorovat rozložení posuvů uvnitř buňky v reakci na lokálně aplikované smykové zatížení. Při zatížení buňky hladké svaloviny dýchacích cest metodou *magnetic twisting cytometry* bylo pozorováno významné posuvy



obr. 79 **A**-rozložení posuvů v buňce, vyvolané smykovým zatížením pomocí *magnetic twisting cytometry* (poloha feromagnetické kuličky je znázorněna černou tečkou na přiložené černobílé fotografii). Vysoké hodnoty posuvů se nachází i v místech vzdálených od působíště přes 20  $\mu\text{m}$ . **B**-rozložení napětí (přepočítáno z hodnot posuvů) ve stejné buňce po rozrušení aktinového skeletu pomocí cytochalasinu D.[94]

i v místech vzdálených 20  $\mu\text{m}$  od působíště zatížení (obr. 79a). Při rozrušení aktinového skeletu pomocí cytochalasinu D efekt vzdáleného důsledku zanikl (obr. 79b), což nasvědčuje tomu, že aktinový skelet je důležitý pro přenos mechanických signálů v buňce.

Efekt vzdáleného důsledku byl také pozorován v neuronech [83] a endotelových buňkách [96]. Oproti tomu Heidemann a kol. [82] nepozorovali tento efekt při zatěžování fibroblastů různými mechanickými vzruchy pomocí skleněné mikropipety na povrchu buňky přes integrinové receptory. Byly pozorovány pouze lokální deformace. Nicméně autoři neověřili, zda došlo v místech aplikace externího zatížení k zformování vazeb focal adhesion, což je podstatné pro přenos zatížení mezi povrchem buňky a vnitřním cytoskeletem [83].



### ➤ *Podíl mikrotubulů na přenosu tlakového zatížení*

Pomocí fluorescenční vizualizace mikrotubulů v živých buňkách bylo zjištěno, že u mikrotubulů dochází ke ztrátě tvarové stability (boulení) vyvolané kontrakcí aktinové sítě (obr. 75). Není však jednoznačně prokázáno, zda se toto tlakové zatížení (přenášené mikrotubuly a způsobující jejich boulení) významně podílí na vyrovnávání části tahového předpětí v cytoskeletu, jak předpovídá tensegritní model. Pro ověření této skutečnosti provedl Stamenovič a kol. [95] energetickou analýzu boulení mikrotubulů v buňkách hladkého svalstva dýchacích cest. Tato analýza byla založena na předpokladu, že energie, která je uložena v mikrotubulech při kontrakci buněk přilnutých k podložce, by po rozrušení mikrotubulů měla být přenesena na podložku. Po rozrušení mikrotubulů by tedy mělo dojít k nárůstu elastické energie akumulované v podložce a tento přírůstek by měl odpovídat energii akumulované v mikrotubulech v důsledku komprese před jejich rozrušením.

Elastická energie akumulovaná v substrátu byla určována pomocí metody *traction cytometry* jako práce vykonaná trakčními silami během kontrakce buňky, vyvolané histaminem. Bylo zjištěno, že po rozrušení mikrotubulů colchicinem došlo ke zvýšení elastické energie v podložce průměrně o 30% (přibližně 0.13 pJ) [95] vzhledem ke stavu před rozrušením. Protože v buňkách aktivovaných histaminem nedochází následkem colchicinu ke zvyšování produkce intracelulárního kalcia, ani ke zvýšení fosforylace\* lehkých myozinových řetězců, autoři předpokládají, že nárůst elastické energie v podložce je způsoben právě přenosem energie akumulované v mikrotubulech před jejich rozrušením. Výsledky této analýzy tedy podporují hypotézu funkce mikrotubulů jako prvků, přenášejících tlakové zatížení v cytoskeletu, v souladu s předpokladem tensegritního modelu.

Při pozdější studii ([98]) bylo zjištěno, že příspěvek mikrotubulů při vyrovnávání předpětí v cytoskeletu je závislý na úrovni zploštění přilnuté buňky. Pomocí metody *traction cytometry* bylo u buněk hladkého svalstva dýchacích cest zjištěno, že s rostoucí plochou přilnutí buňky k podložce dochází ke zmenšení nárůstu elastické energie podložky po rozrušení mikrotubulů. Například při zvýšení plochy přilnutí z 500 na 800  $\mu\text{m}^2$  došlo ke snížení přírůstu elastické energie podložky na pouhých cca 20% maximální hodnoty. Protože se však buňky ve svém přirozeném životním prostředí vyskytují jen zřídka ve vysoce zploštělé formě, podíl mikrotubulů na vyrovnávání předpětí buňky nemůže být přehlížen [98][28].

### ➤ *Role intermediálních vláken*

Podle D. Ingbera [49] se intermediální vlákna v buňce podílí na přenášení předpětí a na mechanickém propojení jádra s periferií buňky a cytoskeletem. Tuto hypotézu podporují např. poznatky publikované v [99]. Bylo zjištěno, že fibroblasty, u kterých byl geneticky rozrušen vimentin (základní protein intermediálních vláken fibroblastů) vykazují sníženou schopnost kontrakce a sníženou schopnost přenosu trakčního zatížení na podložku

---

\* Enzymově katalyzovaná tvorba esterů, amidů či anhydridů kyseliny fosforečné. Nejčastějším způsobem fosforylace je přenos zbytku kyseliny fosforečné z ATP na podložku (např.  $\text{ATP} + \text{glukosa} \rightarrow \text{ADP} + \text{glukosa-6-fosfát}$ ); tuto reakci katalyzují fosfotransferasy zvané kinasy. Fosforylace se významně podílí na regulaci biologických dějů. Opačný děj (defosforylace), tj. odstranění fosfátové skupiny z organické molekuly, je zprostředkován skupinou enzymů zvaných fosfatasy. Velmi významné jsou fosforylace, jimiž se syntetizuje ATP z ADP.

v porovnání z normálními fibroblasty. Bylo také zjištěno, že samotná síť intermediálních vláken je schopna přenést mechanické zatížení z povrchu buňky do oblasti jádra v buňkách s rozrušenými aktinovými vlákny a mikrotubuly [44]. Na základě těchto poznatků lze předpokládat, že intermediální vlákna hrají významnou roli při přenosu kontraktálního předpětí buňky na podložku a při přenosu mechanického zatížení na větší vzdálenosti, což jsou podstatné vlastnosti tensegritního modelu buňky.

Dále bylo zjištěno, že rozrušení intermediálních vláken má za následek snížení tuhosti buňky [49] [99] [104] a porušení cytoplazmy následkem vysokých hodnot přetvoření [44]. Brodland a Gordon [100] také předpokládají, že intermediální vlákna plní i funkci postranních podpor mikrotubulů při jejich boulení následkem kontrakce aktinového skeletu. Tento předpoklad je v souladu s experimentálními daty [95][28].

### 5.2.6 Shrnutí výsledků experimentů

Výsledky experimentálních studií naznačují, že mechanické chování buňky odpovídá buněčnému tensegritnímu modelu. Bylo zjištěno:

- Tuhost buňky vzrůstá přímo úměrně vzrůstajícímu předpětí cytoskeletu, způsobenému aktivací kontraktálních elementů.
- Mikrotubuly přenáší tlakové zatížení a vyrovnávají podstatnou část tahového předpětí cytoskeletu. Podíl mikrotubulů na vyrovnávání tohoto předpětí je mnohem menší u vysoce zploštělých buněk (jednotky procent) než u méně zploštělých (~50%).
- Většina studií, zabývajících se efektem vzdáleného účinku naznačuje, že buňky vykazují tento typ chování, pokud je mechanické zatížení aplikováno na integrinové receptory na povrchu buňky a pokud v tomto místě došlo ke zformování vazeb focal adhesion.
- Intermediální vlákna hrají významnou roli při přenosu mechanického zatížení z povrchu buňky do oblasti jádra. Podle [100] tvoří intermediální vlákna mechanické podpory mikrotubulů.

Na základě rozboru výše uvedených prací lze konstatovat, že **experimentálně získané poznatky podporují použitelnost tensegritního modelu pro modelování mechanického chování buňky. Ačkoliv výsledky některých experimentálních studií nevyklučují i jiné interpretace, alternativní k tensegritnímu modelu, neexistuje zatím jiný jednoduchý model mechanického chování buňky, který dokáže popsat všechny výše uvedené vlastnosti [28].**

## 5.2.7 Přehled publikovaných modelů využívajících tensegritní struktury

### 5.2.7.1

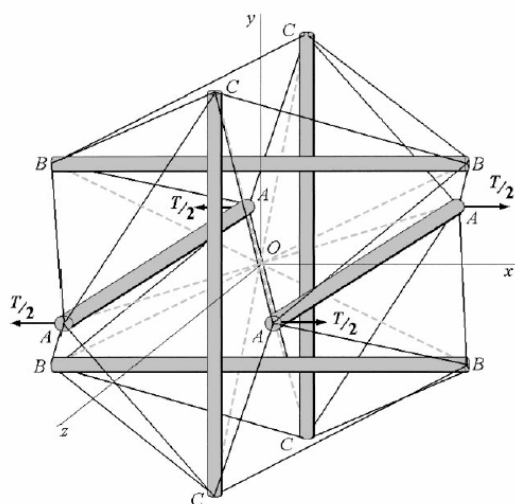
Tvorbou výpočtových modelů, založených na tensegritních strukturách se zabýval Stamenovič. V práci [103] publikoval statickou elastickou odezvu buňky, modelované jednoduchou tensegritní strukturou, tvořenou 6 tlakovými (mikrotubuly) a 24 tahovými členy (mikrofilamenta). Materiál tlakových i tahových členů byl modelován jako nestlačitelný homogenní lineárně elastický. Model byl zatěžován jednoosým tahem (předepsání sil do koncových bodů paralelních tlakových členů (obr. 80)). Analytickým výpočtem určená křivka síla-posuv byla přepočítána na křivku napětí-přetvoření pro buňku jako kontinuum a z počátečního sklonu této křivky byl počítán modul pružnosti buňky jako celku. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se předpětím v tahových členech tensegritní struktury tuhost buňky vzrůstala lineárně a se zvyšující se délkou členů při stejném průřezu tuhost klesala.

### 5.2.7.2

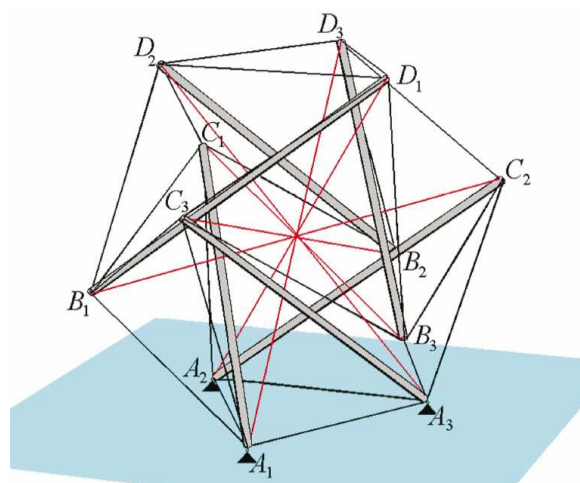
V [104] byl za použití stejného výpočtového modelu vyhodnocován vliv intermediálních vláken na deformační zpevnění a tuhost buňky. Intermediální vlákna (IF) byla modelována jako tahové členy (lana), spojující uzlové body se středem modelu (obr. 80). Bylo zjištěno, že při zahrnutí intermediálních filament do modelu buňky jsou hodnoty tuhosti i deformačního zpevnění vyšší, než když IF nejsou v modelu zahrnuta. Tyto výsledky jsou v souladu s experimentem – u buněk, vystavených působení látek, rozrušujících intermediální vlákna, byl rovněž zaznamenán pokles tuhosti.

### 5.2.7.3

V práci [105] byla za použití podobného výpočtového modelu řešena odezva buňky na časově proměnné buzení. Byly vyšetřovány závislosti dynamického modulu ve smyku a jeho ztrátové složky (dané viskoelastickým charakterem chování materiálu) na předpětí v členech tensegritní struktury a na frekvenci zátěžné síly. Zátěžná síla byla aplikována v těžišti tlakového členu B1D1 (obr. 81), měla vertikální směr a sinusový průběh.



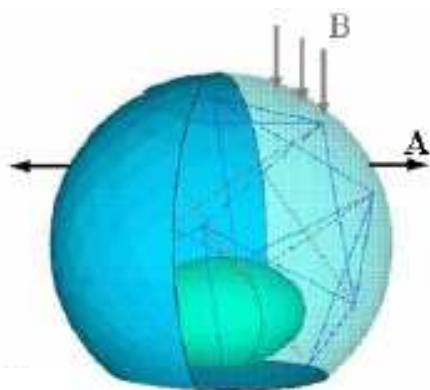
obr. 80 Tensegritní model buňky, použitý k určení statické elastické odezvy v [103],[104].



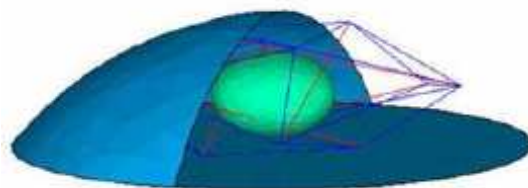
obr. 81 Tensegritní model, použitý při určování odezvy buňky na časově proměnné zatížení (podle [105]).

### 5.2.7.4

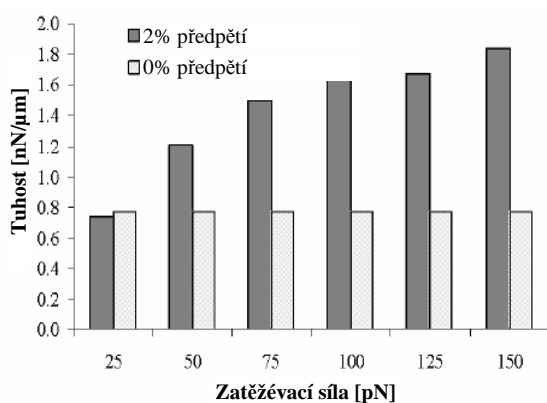
V práci [106] McGarry a Prendergast prezentovali konečnoprvkový model eukaryotní buňky přilnuté k podložce, tvořený jak kontinuálními, tak diskretními strukturami. Model respektuje tyto buněčné prvky: membránu, cytoplazmu, mikrotubuly, mikrofilamenta a jádro. Membrána je modelována skořepinovými prvky, cytoplazma a jádro jako lineárně-elastické kontinuum a cytoskelet je modelován šestivzpěrovou tensegritní strukturou. Tlakové členy reprezentují mikrotubuly a tahové členy mikrofilamenta. Materiály všech komponent jsou modelovány jako homogenní izotropní lineárně elastické s rozdílnými hodnotami elastických konstant. Bylo vytvořeno šest geometrických konfigurací buňky ve styku s podložkou, lišících se velikostí kontaktní plochy a výškou. Tyto modely (obr. 82) byly zatěžovány vertikálními a horizontálními silami (100 pN) v uzlech tensegritní struktury i v jejich blízkém okolí (tyto uzly představují membránové receptory buňky). Na těchto modelech byly prováděny parametrické studie závislosti tuhosti buňky na předpětí cytoskeletu, velikosti



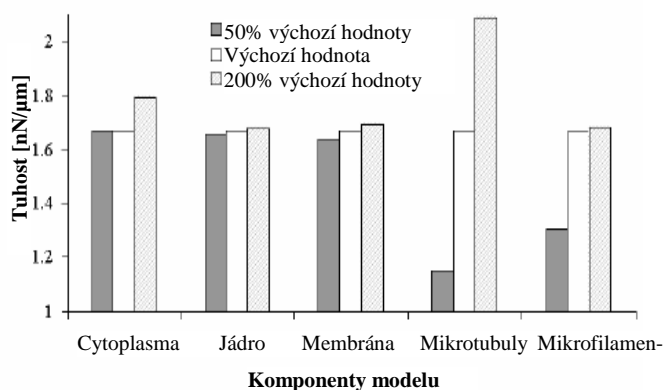
obr. 82 MKP strukturní model buňky, použitý v [106].



obr. 83 Jedna z geometrických konfigurací modelu přilnuté buňky (podle [106]).



obr. 84 Vliv velikosti zatěžovací síly na tuhost buňky (podle [106]).



obr. 85 Vliv tuhosti jednotlivých komponent buňky na celkovou tuhost (podle [106]).

zatěžovacích sil, geometrické konfiguraci a tuhosti jednotlivých buněčných komponent. Bylo dosaženo těchto hlavních výsledků: se vzrůstajícím předpětím v tahových členech vzrůstá tuhost buňky nelineárně, nelineárně rovněž roste tuhost buňky se vzrůstající zatěžovací silou (obr. 84). Při absenci předpětí cytoskeletu k tomuto zpevnění nedošlo. Efekt tohoto deformačního zpevnění je ve shodě s experimentálním pozorováním. Vzhledem k tomu, že všechny materiály v tomto výpočtovém modelu jsou modelovány jako lineární, toto nelineární zpevnění je nejspíše způsobeno prostorovou rekonfigurací při deformaci tensegritní struktury cytoskeletu. Dále bylo zjištěno, že největší vliv na celkovou tuhost buňky mají mikrotubuly, o něco menší vliv byl pozorován u mikrofilament a cytoplazmy (obr. 85). Vliv membrány a jádra byl vzhledem k ostatním komponentám zanedbatelný.

### 5.3 HODNOCENÍ PUBLIKOVANÝCH PRACÍ S OHLEDEM NA CÍLE VLASTNÍ PRÁCE

Z uvedeného rozboru literatury lze, s ohledem na cíle této práce, říci, že v oblasti výpočtového modelování mechanického chování izolovaných buněk existuje dostatek prací, zabývajících se výpočtovým simulováním experimentů, ze kterých lze na určité úrovni identifikovat konstitutivní vlastnosti buňky a jejich z mechanického hlediska podstatných komponent. V přehledu nejsou uvedeny úplně všechny práce zabývající se touto problematikou, ale zejména práce simulující různé typy mechanických zkoušek a využívající tensegritních modelů. V uvedeném přehledu výpočtových modelů lze najít jak zástupce nejjednodušších nestrukturně koncipovaných modelů, tak složitých strukturních modelů, kombinujících kontinuální a diskrétní komponenty, případně vícefázové modely. Důraz při výběru jednotlivých prací byl kladen zejména na aktuálnost.

Z uvedeného přehledu lze také vyvodit jednu podstatnou věc: použité modely konstitutivního chování buněk a jejich komponent jsou ve většině případů nejjednodušší lineárně elastické izotropní homogenní modely. Další skupinu tvoří jednoduché viskoelastické konstitutivní modely a v jednom případě se jedná o hyperelastický model. Protože buňka je strukturně velice složitý prvek (navíc živý), popis jejího konstitutivního chování pomocí těchto jednoduchých modelů nebude nejpřesnější. V současnosti však nelze přesněji měřit materiálové vlastnosti buněk a jejich komponent (jednak vzhledem k jejím rozměrům a jednak vzhledem k tomu, že buněčné komponenty vykazují jiné vlastnosti jako součást buňky, než když jsou izolovány), proto tyto vlastnosti často vstupují do výpočtových modelů jako neznámá. Při uvažování složitějšího konstitutivního modelu bychom potom měli příliš velký počet neznámých parametrů, které by nebylo možno pomocí výpočtové simulace experimentu identifikovat. I v naší práci se z tohoto důvodu omezíme na výše uvedené jednodušší konstitutivní modely. Většina prací z tohoto výčtu se zabývá výpočtovou simulací určitého experimentu, která slouží k identifikaci konstitutivních vlastností modelu buňky nebo jejích komponent na základě výsledků právě tohoto experimentu. Nepodařilo se mi však nalézt publikaci, ve které by identifikace konstitutivních parametrů modelu buňky byla prováděna na základě výsledků výpočtových simulací více experimentů pro stejný výpočtový model.

**Při tvorbě modelů, sloužících k výpočtovým simulacím různých mechanických zkoušek, se nejčastěji využívá kontinuálních modelů, a to zejména kvůli jejich relativní jednoduchosti a malému počtu nutných vstupních parametrů, což usnadňuje jejich identifikaci. Jako nejuniverzálnější model se dle rozboru dostupných informačních zdrojů jeví model tensegritní, který dokáže dobře modelovat podstatné mechanické vlastnosti buněk. Při návrhu vlastního výpočtového modelu budeme tedy vycházet z kombinace těchto dvou druhů výpočtových modelů buňky. Ostatními, méně obvyklými druhy výpočtových modelů (*soft glassy model*, *gelové modely*) jsme se v této práci podrobněji nezabývali, zejména z důvodu časového omezení, omezeného množství dostupných informačních zdrojů a nedostupnosti potřebného softwaru pro jejich řešení.**

## 6 Realizace řešení

Hlavním cílem této práce je navrhnout, vytvořit a otestovat výpočtový model buňky, umožňující výpočtové simulace různých mechanických zkoušek. Protože se jedná o první práci tohoto druhu (z oblasti biomechaniky buňky) na Ústavu mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky, VUT FSI v Brně a tudíž nejsou k dispozici žádné podobné práce a zkušenosti, na které by bylo možno navázat, byly nejprve řešeny jednodušší úlohy, s cílem ověřit, zda je možné v požadovaném termínu a za pomoci dostupných prostředků (software) hlavní cíl splnit. Tyto testovací úlohy byly:

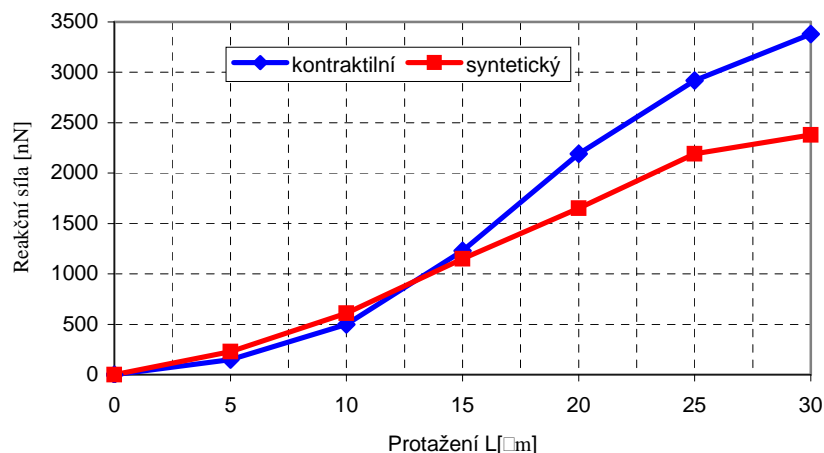
- Tvorba kontinuálního modelu buňky a jeho využití při identifikaci materiálových vlastností buněk hladkého svalstva cévní stěny pomocí výpočtové simulace tahové zkoušky
- Tvorba strukturního modelu buňky se šestivzpěrovým tensegritním modelem cytoskeletu a jeho využití při výpočtové simulaci vlačovací zkoušky.

Na základě poznatků, získaných při řešení těchto jednodušších úloh a na základě provedené rešerše problematiky výpočtového modelování mechanického chování buňky byl potom navržen a vytvořen vlastní model mechanického chování buňky.

### 6.1 KONTINUÁLNÍ MODEL BUŇKY – SIMULACE TAHOVÉ ZKOUŠKY

Cílem řešení byla volba konstitutivního modelu a identifikace jeho parametrů na základě zkoušek jednoosým tahem, realizovaných na izolovaných buňkách hladkého svalu, publikovaných v [15]. Z těchto zkoušek byla jejich autory určována závislost zátěžné síly na protažení buňky, realizované pomocí mikropipet přilepených ke stěně buňky (viz. kap. 4). 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 pro experimenty 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.

Máme k dispozici vstupní údaje, popisující geometrii buňky a její aktivaci (natažení) při experimentu a odezvu na tuto aktivaci v podobě závislosti výsledné reakční síly působící na mikropipety na protažení buňky (viz obr. 86). Vstupní materiálové charakteristiky buňky neznáme, určení konstitutivního modelu materiálu buňky je tedy inverzní úlohou.



obr. 86 Experimentálně určená závislost síla-protažení při tahové zkoušce buněk hladkého svalstva cévní stěny kontraktilního a syntetického fenotypu.

### 6.1.1 Model materiálu

Důležitým předpokladem pro věrohodnost výsledků výpočtové simulace je volba vhodného modelu konstitutivního chování, který by postihoval všechny podstatné vlastnosti reálného materiálu. Pro schůdnost výpočtu jsme materiál buňky modelovali jako homogenní nelineárně izotropní kontinuum, což sice neodpovídá realitě, ale vzhledem k absenci jakýchkoliv informací o mechanických vlastnostech strukturních prvků buňky se nám identifikace parametrů komplikovanějšího modelu jejího chování jevila v dané situaci jako neschůdná.

Jako konstitutivní model byl vybrán pětiparametrický Mooney-Rivlinův vztah pro měrnou energii napjatosti ve tvaru

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

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).

### 6.1.2 Model geometrie

Buňka byla v nezatíženém stavu modelována jako koule o průměru 30μm, mikropipety byly modelovány jako duté nepoddajné válce o vnějším průměru 20μm a vnitřním průměru 4μm (obr. 87a), které byly umístěny na protilehlých stranách buňky. Spoj mezi buňkou a mikropipetami byl realizován jako slepený bez vzájemných posuvů.

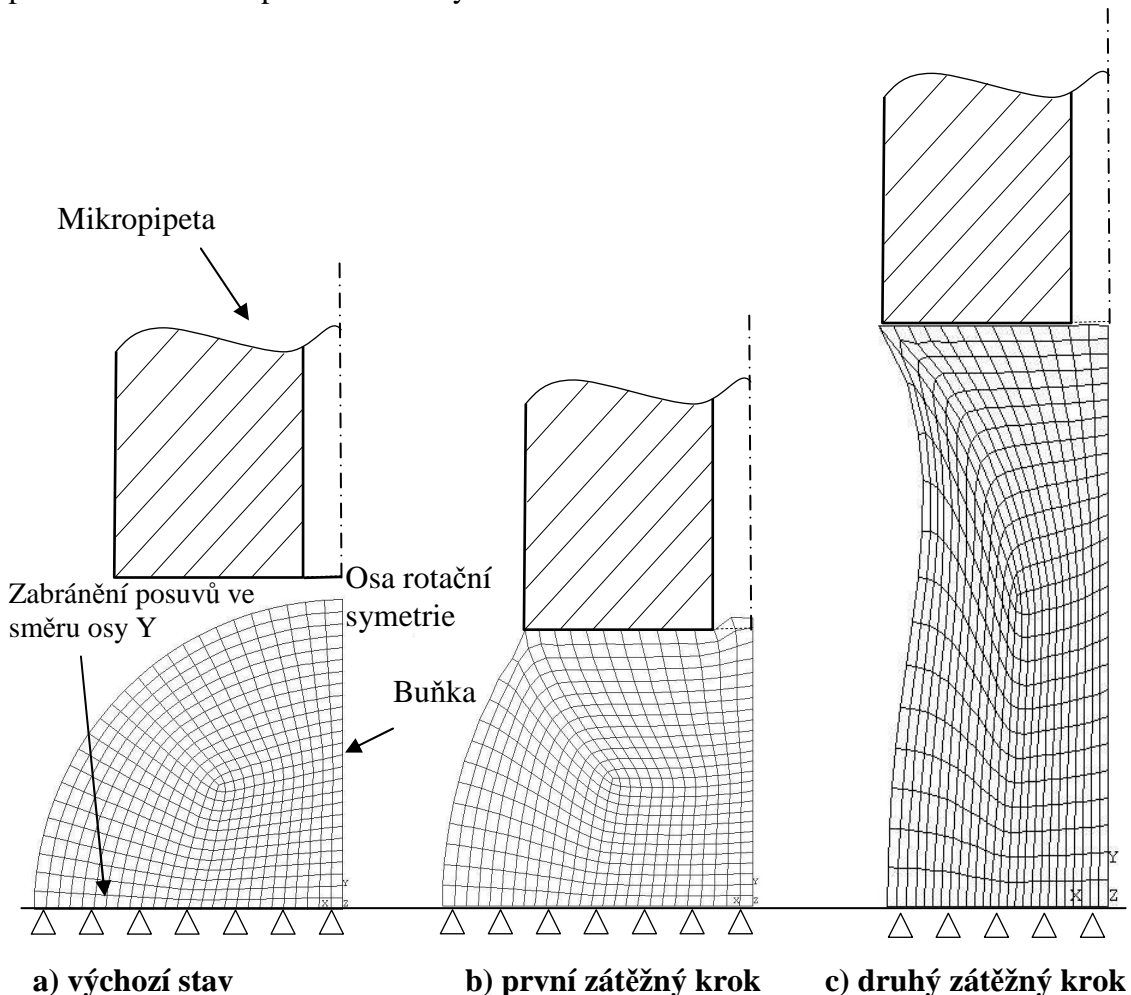


### 6.1.3 Okrajové podmínky

Rotačně symetrická geometrie nám umožňuje řešit problém v systému ANSYS jako 2D úlohu v rotační symetrii. Model je zatížen stejně jako v experimentu posuvem pohyblivé mikropipety. Protože mikropipety jsou modelovány jako nepoddajné, nejsou zahrnuty v MKP modelu a jejich funkce je zajištěna deformačně předepsáním posuvů do těch uzlů buňky, které by byly s mikropipetou v kontaktu.

### 6.1.4 Výpočtová simulace tahové zkoušky

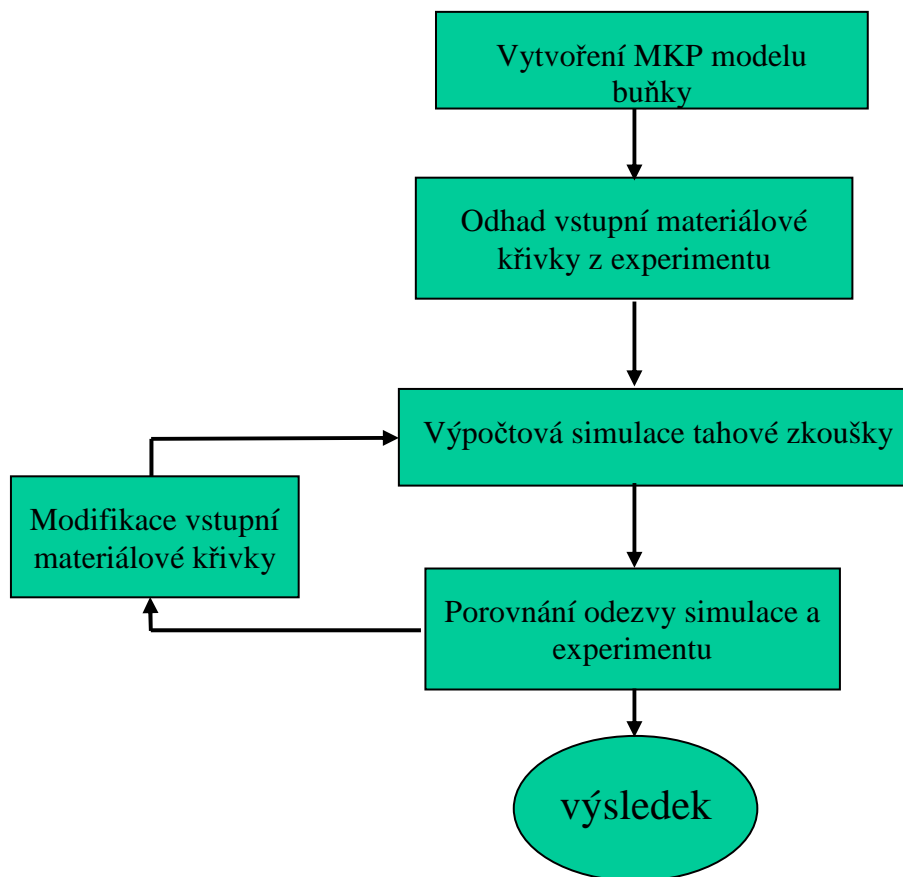
Výpočtová simulace tahové zkoušky byla prováděna ve dvou zátěžných krocích. Při prvním zátěžném kroku bylo simulováno spojení mikropipety s buňkou (viz obr. 87b) a byla nalezena rovnovážná poloha (vertikální souřadnice uzlů v kontaktu s mikropipetou, při které byla výsledná reakční síla v těchto uzlech nulová), která byla považována jako výchozí při následném natahování buňky. Při druhém zátěžném kroku byly předepsány do uzlů ve styku s mikropipetou takové posuvy, aby rozsah natažení odpovídal experimentu (obr. 87c). Ze sil v těchto uzlech byl také počítán průběh výsledné reakční síly v mikropipetě v závislosti na protažení buňky.



obr. 87 Model geometrie a okrajových podmínek, výpočtová simulace

### 6.1.5 Identifikace konstitutivních parametrů materiálu buňky

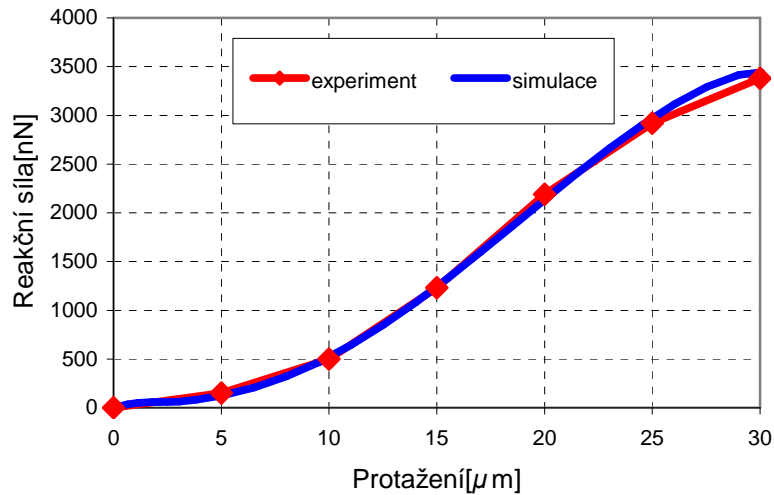
Parametry konstitutivního modelu byly určovány iteračně (algoritmus iteračního procesu je znázorněn na obr. 88). V prvním kroku byla výchozí křivka  $\sigma$ - $\epsilon$  odhadnuta jako běžná smluvní křivka pomocí elementárních analytických vztahů: přetvoření bylo určeno podílem prodloužení buňky a jejího výchozího průměru a napětí jako podíl reakční síly ve vazbě buňky a jejího maximálního výchozího příčného 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 metody nejmenších čtverců.



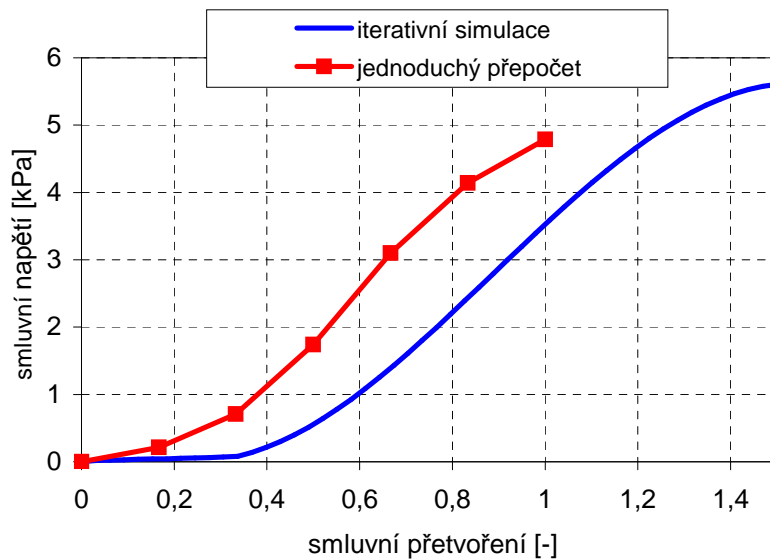
obr. 88 Algoritmus výpočtové identifikace materiálové křivky buňky hladkého svalstva cévní stěny

V dalších iteračních krocích byly parametry konstitutivního modelu modifikovány, přičemž byla akceptována každá jejich změna, která přinesla snížení sumy kvadrátů odchylek mezi simulovanou a experimentální křivkou. Porovnání obou křivek po ukončení iteračního procesu je na obr. 89. Rozdíl mezi výchozí odhadnutou křivkou napětí-přetvoření a konečnou křivkou získanou iteračním postupem opakovanou výpočtovou simulací zkoušky dosahuje např. pro hodnotu přetvoření 0,8 přibližně 100% (obr. 90).

Rozdíl mezi experimentální a simulovanou křivkou síla-protažení (obr. 89) odpovídá obvyklé nepřesnosti v konstitutivním popisu nelineárně elastických materiálů. Výsledná křivka napětí-přetvoření (tj. křivka použitá v posledním kroku iterace) představuje konstitutivní popis homogenního nelineárně elastického izotropního modelu materiálu buňky [110][107].

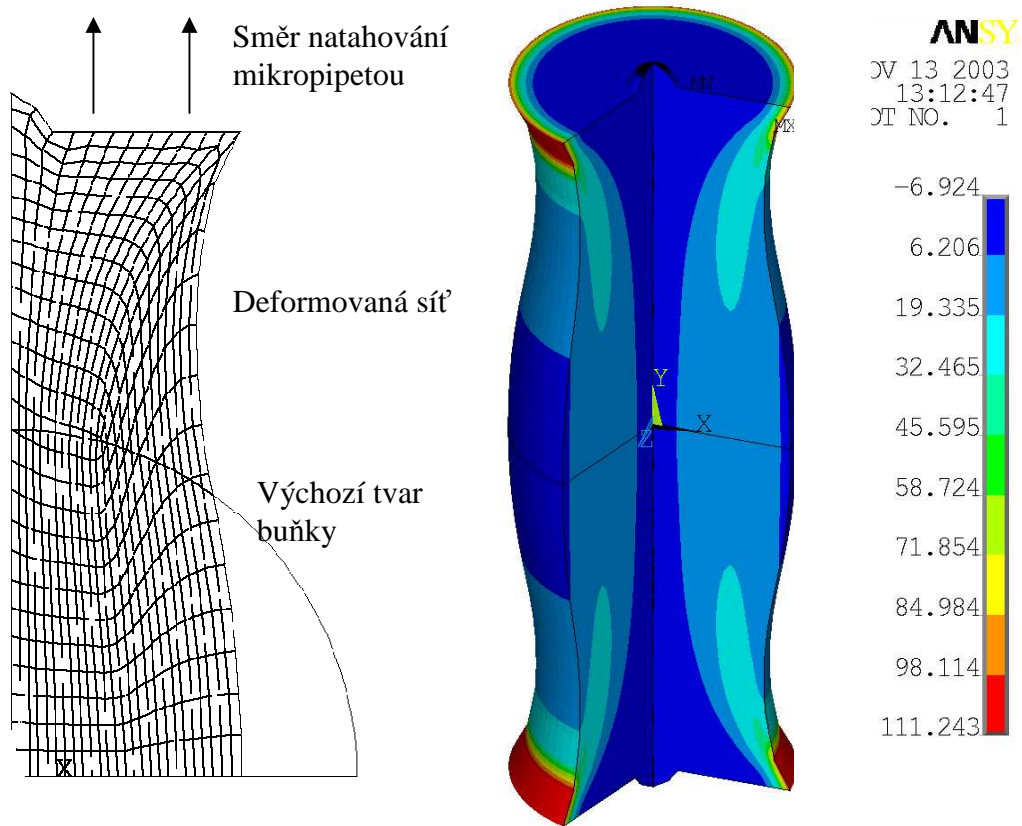


obr. 89 Porovnání výpočtově simulované a experimentální charakteristiky hladké svalové buňky

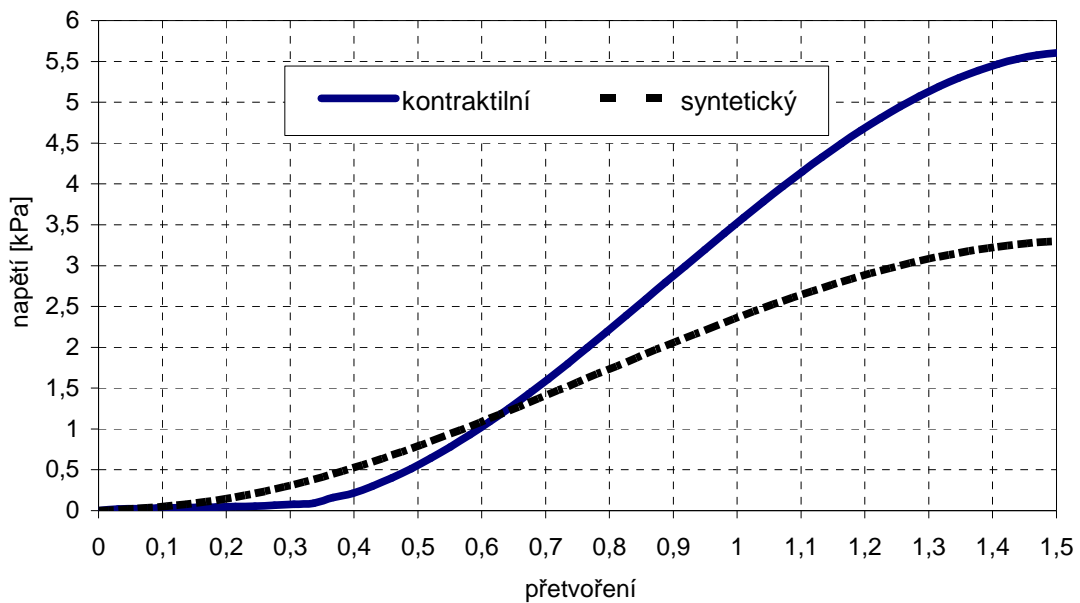


obr. 90 Porovnání tahové křivky získané triviálním přepočtem s křivkou získanou iterativní simulací zkoušky (kontraktilní phenotyp).

## 6.1.6 Výsledky



obr. 91 Výpočtový model homogenní izotropní buňky a izoplochy axiálních napětí [kPa] v tomto modelu



obr. 92 Materiálové křivky  $\sigma$ - $\epsilon$  (ve smluvních hodnotách) buněk kontraktilního a syntetického fenotypu, určené výpočtovou simulací experimentu

Mooney-Rivlinovy konstanty	Kontraktilní fenotyp	Syntetický fenotyp
a <sub>1</sub>	-3,529955	0,0792873
a <sub>2</sub>	3,862332	-0,01529048
a <sub>3</sub>	-0,9832718	-0,3066485
a <sub>4</sub>	3,146998	0,8768383
a <sub>5</sub>	-0,433546	-0,1151485

**Tab.3** Konstanty Mooney-Rivlinova konstitutivního modelu buněk hladkého svalstva kontraktilního a syntetického fenotypu, určené výpočtovou simulací

### 6.1.7 Závěr

Bylo dosaženo velmi dobré shody mechanické odezvy mezi experimentem a jeho výpočtovou simulací pomocí MKP (obr.4.1,4.2). Ve shodě s experimentem vykazuje materiál buněk kontraktilního fenotypu větší tuhost. V oblasti, kde křivka je téměř lineární (pro rozmezí smluvních přetvoření 0,5-1) lze vyhodnotit jeho inkrementální modul pružnosti (směrnice tečny ke křivce,  $E=5,9\text{kPa}$ ), zatímco u syntetického fenotypu je tato hodnota nižší ( $E=3.3\text{kPa}$ ). Výsledné křivky  $\sigma$ - $\epsilon$ , určené simulací, mají nelineární zpevňující průběh, typický pro materiál cévní stěny. Při přetvoření okolo 100% dochází ke změně charakteru křivek z konvexního na konkávní a tedy k poklesu tuhosti. Tento jev může být způsoben tím, že při experimentu docházelo v některých případech k porušování vazby mezi buňkou a mikropipetou už při protažení kolem  $25\mu\text{m}$ . Křivky  $\sigma$ - $\epsilon$  v oblastech přetvoření větších než 100% mohou být tímto jevem zkreslené, takže odpovídají realitě jen pro menší hodnoty přetvoření. Konstitutivní model, určený výpočtovou simulací experimentu, lze použít při tvorbě MKP výpočtových modelů deformačně napěťových stavů buněk hladkého svalstva cévní stěny, sloužících k pochopení dějů probíhajících v tepnách.

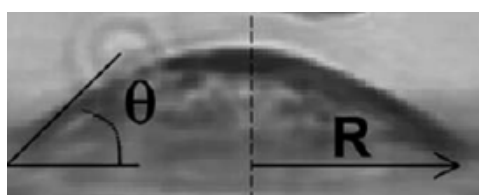
## 6.2 SIMULACE VTLAČOVACÍ ZKOUŠKY POMOCÍ STRUKTURNÍHO MODELU BUŇKY

Cílem této úlohy bylo vytvořit strukturní model buňky, odladit jej pro výpočtovou simulaci vtláčovací zkoušky a posoudit možnosti jeho použití při identifikaci konstitutivních parametrů základních buněčných komponent (cytoskelet, membrána, cytoplazma, jádro). Při tvorbě modelu jsme vycházeli z modelu buňky, publikovaného v [106], který využívá šestivzpěrové tensegritní struktury pro modelování cytoskeletu. Tento model jsme vhodně upravili tak, aby umožňoval výpočtovou simulaci vtláčovací zkoušky. Na tomto modelu jsme následně provedli citlivostní analýzu vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu na výsledky výpočtové simulace.

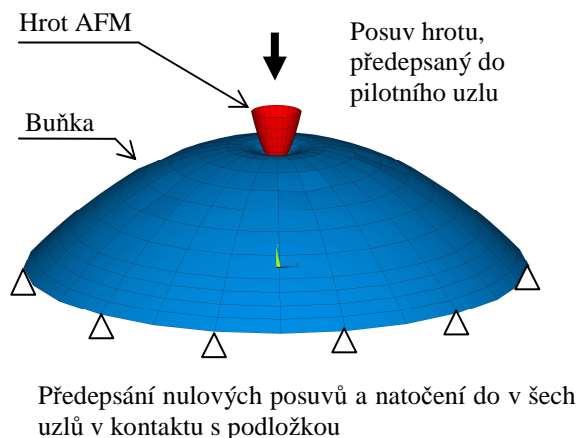
### ➤ *Tvorba MKP modelu*

#### Model geometrie

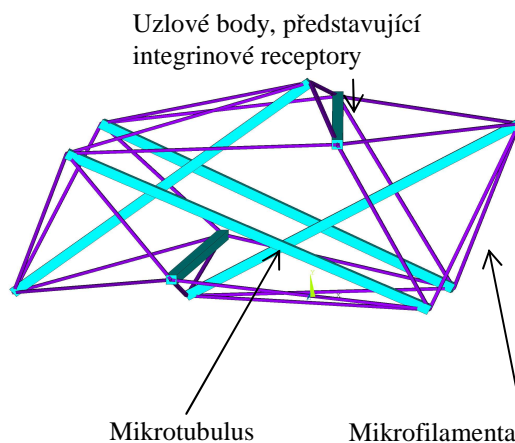
Při vtláčovací zkoušce se nejčastěji používají uměle kultivované buňky, které mají zploštělý tvar a jsou přilnuté k pevné podložce (obr. 93). Geometrie MKP modelu je založena na tomto tvaru. Model geometrie se skládá z buňky a z hrotu AFM (obr. 94). Geometrie hrotu je tvořena rotačním paraboloidem, který se svými rozměry blíží skutečnému hrotu používanému při experimentech.



obr. 93 Fotografie fibroblastu izolovaného z kuřecího embrya (podle [106])



obr. 94 Model geometrie a okrajové podmínky

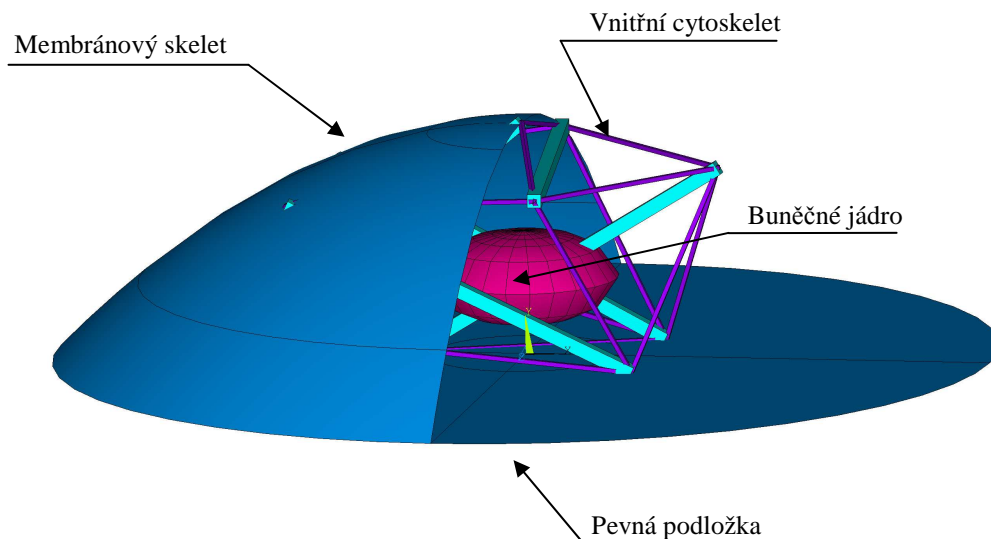


obr. 95 Tensegritní model vnitřního cytoskeletu

Model struktury buňky zahrnuje tyto buněčné komponenty: membránový skelet, vnitřní cytoskelet (endoskelet), cytoplazma 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 (obr. 94). Vnitřní cytoskelet je modelován tensegritní strukturou. Jednotlivé spojovací body tensegritní struktury našeho modelu (konce tlakových členů) představují transmembránové integrinové receptory (obr. 95).

Tensegritní model buňky je založen na předpokladu, že celá buňka má charakteristické vlastnosti tensegritní struktury. 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 aktin-myozinovým aparátem.



obr. 96 Strukturální MKP model geometrie buňky přiluté k pevné podložce

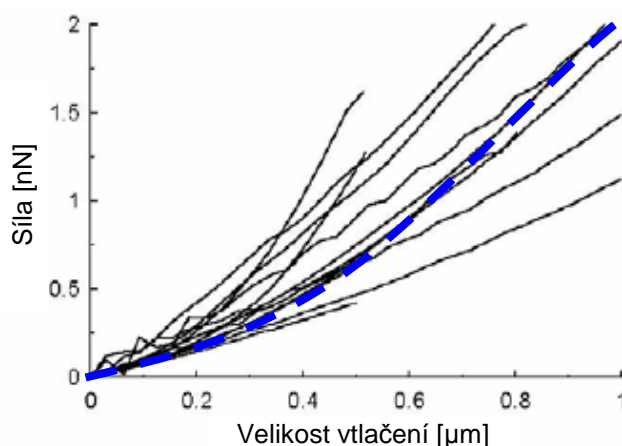
Vnitřní cytoskelet je ve vytvořeném MKP modelu tedy tvořen šestinosníkovou tensegritní strukturou, skládající se ze tří dvojic tlakových členů, reprezentujících funkci mikrotubulů, a z 24 tahových členů, reprezentujících funkci mikrofilament. Mikrotubuly a mikrofilamenta jsou tvořeny prutovými prvky, přenášejícími pouze tlak, respektive tah. 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 vyplňujících vnitřní prostor buňky

#### Model konstitutivní závislosti buňky

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. Jako výchozí stav pro citlivostní analýzu jsme zvolili model s elastickými parametry z tab.4. Tyto hodnoty jsou zvolené tak, že bylo dosaženo dobré shody mezi výpočtovou simulací a výsledky experimentu (obr. 97). 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.

	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.4** Elastické parametry buněčných komponent, použité jako výchozí pro citlivostní analýzu



obr. 97 Porovnání experimentálně určených křivek síla-deformace [108] a křivky určené výpočtovou simulací (čárkovaně)

### Model vazeb

Přilnutí buňky k pevné podložce 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 (obr. 94) je odečítána reakční síla ve směru posuvu, která reprezentuje mechanickou odezvu buňky. Funkce actin-myozinového kontraktálního aparátu, který zajišťuje předpětí cytoskeletu a tím tvarovou stabilitu celé buňky, je zajištěna předepsáním počátečního přetvoření do elementů reprezentujících mikrofilamenta.

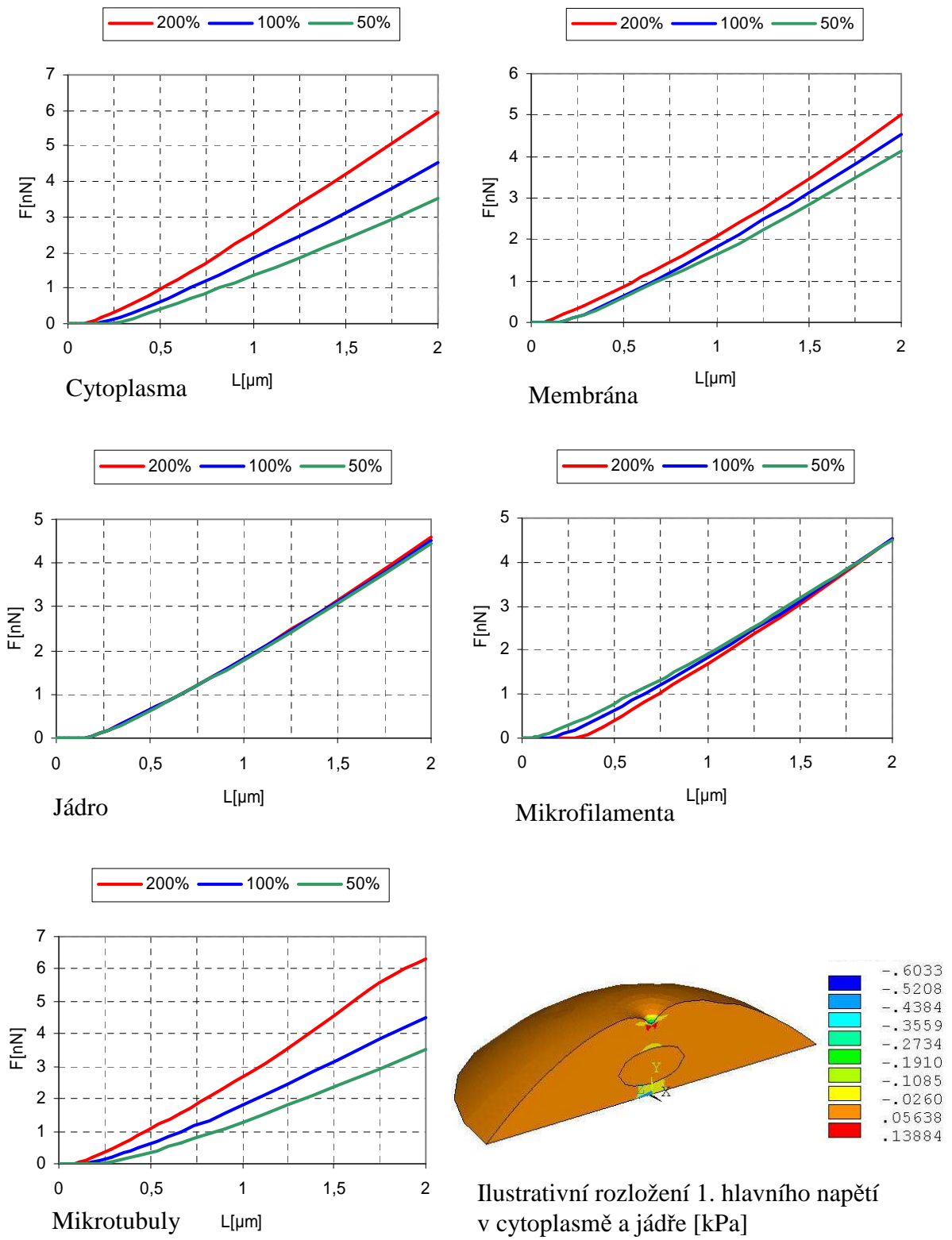
### **Výsledky analýzy a zhodnocení výsledků**

Výsledky výpočtové simulace vlačovací zkoušky jsou vyhodnocovány prostřednictvím závislosti reakční síly v pilotním uzlu hrotu AFM na hloubce vtláčení hrotu do buňky. Náplní této práce bylo provést citlivostní analýzu vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky na silovou odezvu při výpočtové simulaci vlačovací zkoušky. V prvním kroku jsme zvolili elastické konstanty buněčných komponent tak (viz tab.5), aby se výsledek výpočtové simulace přibližně shodoval s výsledky experimentu (obr. 97). Tyto hodnoty jsme uvažovali jako výchozí. Poté jsme měnili modul pružnosti každé z komponent (cytoplasma, membrána, jádro, mikrofilamenta, mikrotubuly) v rozsahu 50%



- 200% výchozí hodnoty a prováděli citlivostní analýzu s cílem zjistit, která z buněčných komponent má největší vliv na výsledky simulace.

Při vlačovací zkoušce 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 výše popsaná citlivostní analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent buňky na výsledky výpočtové simulace. Z výsledků (obr. 98) vyplývá, že naopak největších změn v průběhu křivek síla-hloubka vlačení 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 vlačovací zkoušky 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 (viz [112][113]).



obr. 98 Výsledky analýzy vlivu tuhosti jednotlivých komponent buňky na závislost síly  $F$  na hloubce vtažení  $L$  při výpočtové simulaci vtačovací zkoušky

### 6.3 SHRNU TÍ TESTOVACÍCH ÚLOH

Výše prezentované výsledky výpočtového modelování mechanického chování buněk představují první krok k dosažení stanoveného cíle, tj. vytvoření výpočtového modelu buňky. Hlavním přínosem těchto výsledků je ověření toho, že jsme schopni pomocí výpočtového modelování simulovat mechanické zkoušky, prováděné na buňkách a tudíž řešit problémy biomechaniky buňky.

Nestrukturní model, použitý při identifikaci tahových vlastností buněk hladkého svalstva cévní stěny, je velmi zjednodušený a lze ho použít pouze pro identifikaci materiálových vlastností buňky jako celku; lze jej akceptovat pouze jako první postupný krok ve vytváření dokonalejších modelů buňky a její mechanické interakce s okolím. Jeho hlavním nedostatkem je to, že nezahrnuje vnitřní strukturu buňky, tudíž je pro identifikaci vlastností vnitrobuněčných komponent nepoužitelný.

Strukturní model buňky představuje z hlediska struktury komplexní model na současné úrovni poznání, vzhledem k velkému počtu neznámých parametrů je však prakticky nemožné věrohodně a jednoznačně 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) 24 transmembránových receptorů.

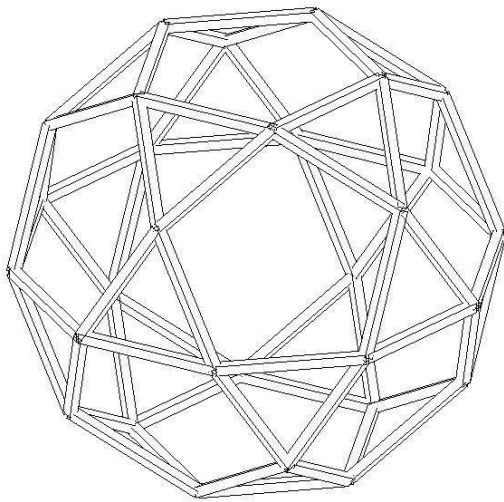
Pro lepší věrohodnost by bylo vhodné vytvořit realističtější model topologie cytoskeletu, například prostřednictvím složitějších tensegritních struktur. Takový model dosud nebyl publikován, proto je jeho vytvoření a otestování jedním z hlavních cílů disertační práce.

## 6.4 NÁVRH MODELU SE SLOŽITĚJŠÍ TENSEGRITNÍ STRUKTUROU

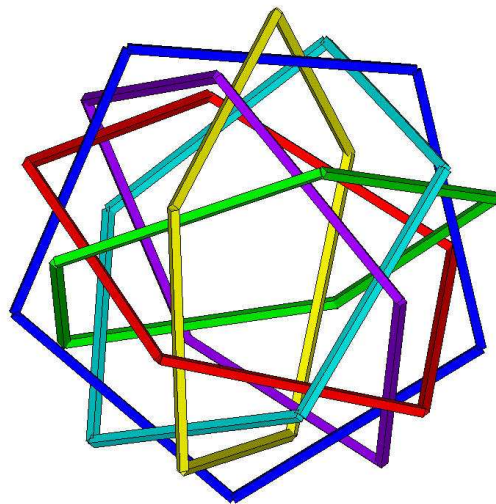
Na základě rozboru dostupné literatury a zkušeností získaných při řešení testovacích úloh byl navržen strukturní výpočtový model buňky, jehož hlavní součástí je tensegritní model cytoskeletu, tvořený pomocí dvou třicetivzpěrových tensegritních struktur. Ostatní strukturní složky buňky jsou modelovány jako kontinuum. Podstatným vylepšením oproti modelu publikovanému v [106] (a použitým při simulaci vlačovací zkoušky, viz kap. 6.2) je realističtější model topologie cytoskeletu (více diskrétních členů tensegritní struktury, více povrchových receptorů) a modelování mechanického propojení povrchu buňky s jádrem pomocí prvků cytoskeletu.

### 6.4.1 Tensegritní model cytoskeletu

Výchozím geometrickým útvarem při tvorbě tensegritního modelu cytoskeletu je tzv. *icosidodecahedron*. Jedná se o kvaziregulární mnohostěn (dvacet trojúhelníkových stěn, dvanáct pětiúhelníkových stěn) se třiceti vrcholy a šedesáti identickými hranami (obr. 100). Do tohoto útvaru bylo vepsáno šest pravidelných pětiúhelníků vzájemně prostorově pootočených. Tyto pětiúhelníky nejsou vzájemně propojeny a představují tlakové členy tensegritní struktury (viz obr. 101). Tlakové členy (vzpěry) jsou spojeny spojitou sítí tahových členů (lan), které jsou identické s hranami *icosidodecahedronu* (viz . obr. 102), čímž dojde k vytvoření pravé tensegritní struktury v souladu s definicí (Motró[67], viz. kap.5.2.1). Taková tensegritní struktura se skládá ze třiceti tlakových členů a šedesáti členů tahových. Každý vrchol (uzlový bod) pětiúhelníku tlakových členů je spojen čtyřmi tahovými členy se sousedními vrcholy.

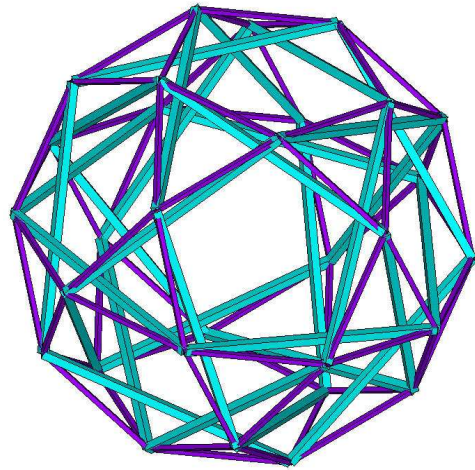


obr. 100 Icosidodecahedron

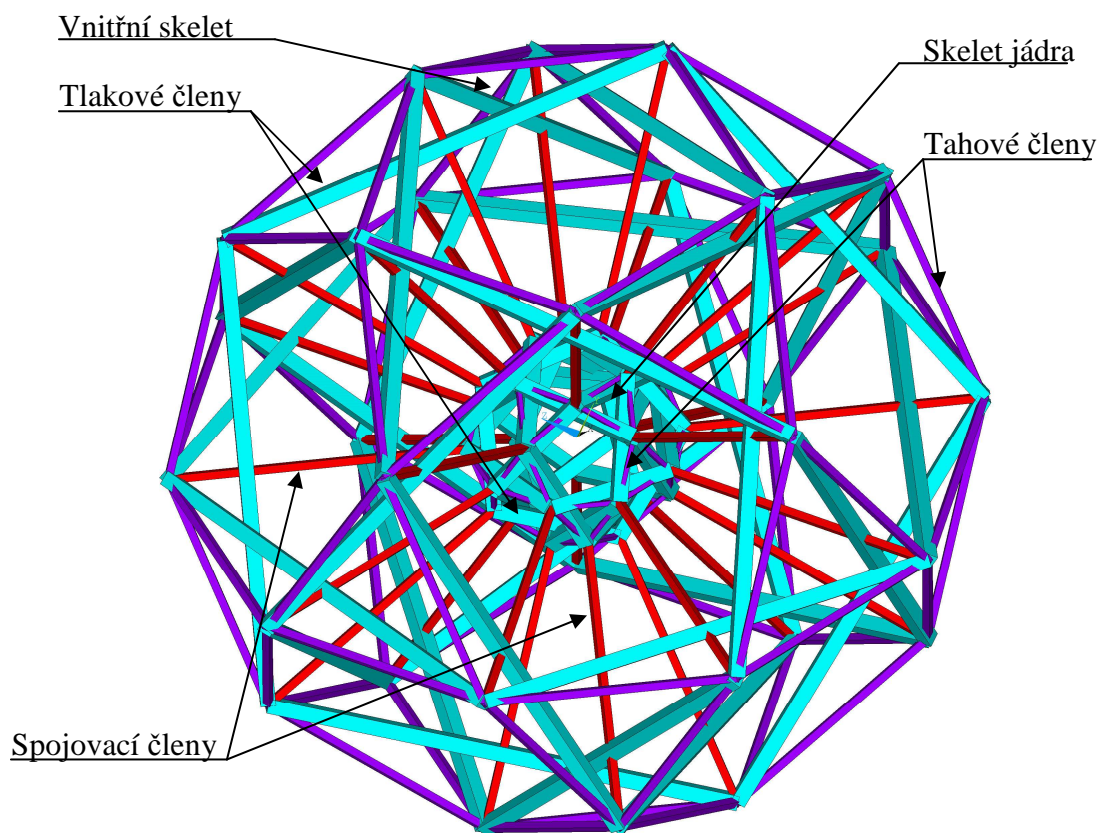


obr. 101 Pětiúhelníky tvořené tlakovými členy tensegritní struktury

Vlastní model cytoskeletu se skládá ze dvou takových tensegritních struktur; jedna představuje vnitřní skelet a druhá topologicky identická, ale zmenšená tensegritní struktura představuje skelet jádra. Tyto dvě tensegritní struktury jsou vzájemně propojeny prostřednictvím spojovacích prvků (ve vzájemně si odpovídajících uzlech), modelujících funkci mikrotubulů a intermediálních vláken a zajišťujících mechanické propojení mezi povrchem buňky a oblastí buněčného jádra (viz. obr. 103). Tahové členy tensegritní struktury modelují mechanickou funkci mikrofilament (včetně aktinmyozinových kontraktilních motorů), tlakové členy modelují mechanickou funkci mikrotubulů. Uzlové body (vrcholy) představují integrinové receptory buňky (celkem 30 receptorů, oproti dvanácti v modelu publikovaném v [106]). Tlakové členy dokáží přenášet pouze tlak, tahové členy pouze tah a spojovací členy jsou univerzální, tj. dokáží přenášet tahová i tlaková zatížení. Celkově je tensegritní model cytoskeletu tvořen 210ti diskrétními členy (120 tahových, 60 tlakových a 30 univerzálních spojovacích členů).



obr. 102 Třicetivzpěrový tensegritní model, modrá - tlakové členy, fialová - tahové členy



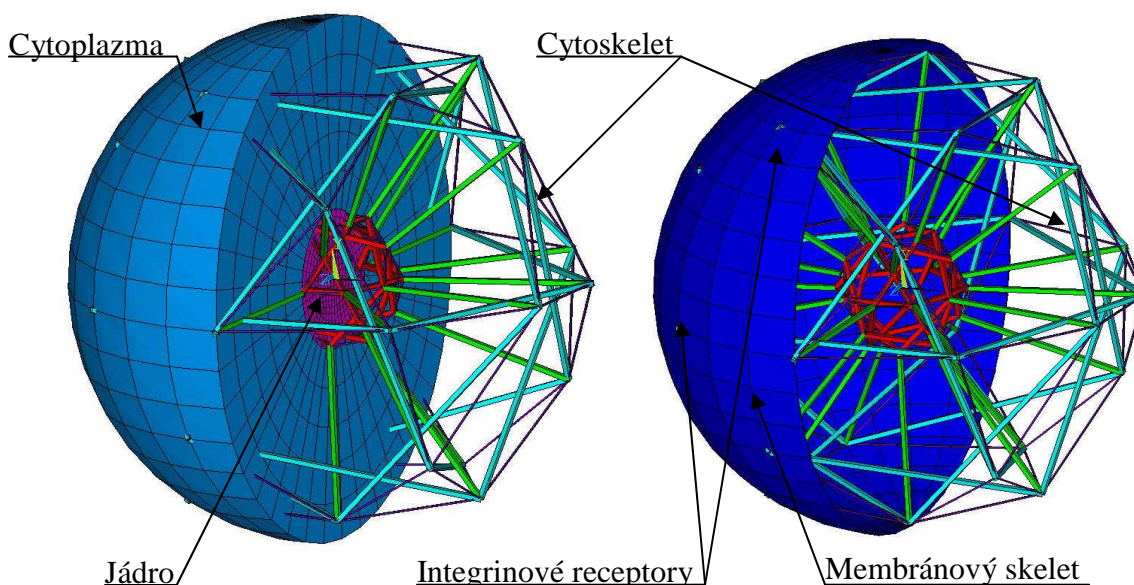
obr. 103 Návrh složitější topologie tensegritního modelu cytoskeletu

## 6.4.2 Tvorba strukturního MKP modelu buňky

Vzhledem k tomu, že u některých experimentálních metod vyšetřování mechanického chování buněk se používají buňky sférického tvaru kultivované v roztoku, zatímco u jiných metod se používají buňky zploštělého tvaru kultivované na podložce (přilnuté), byly vytvořeny dvě geometrické konfigurace, respektující tyto dva základní tvary.

### 6.4.2.1 Model geometrie – sférický tvar

Model geometrie zahrnuje tyto prvky buněčné struktury: cytoskelet (modelovaný tensegritní strukturou), membránový skelet (modelovaný jako skořepina), cytoplasmu a buněčné jádro (modelované jako izotropní homogenní kontinuum). Spojení jednotlivých buněčných komponent je realizováno sdílením hraničních uzlů.



obr. 104 Model geometrie strukturního modelu buňky-sférický tvar

#### ➤ Použité prvky

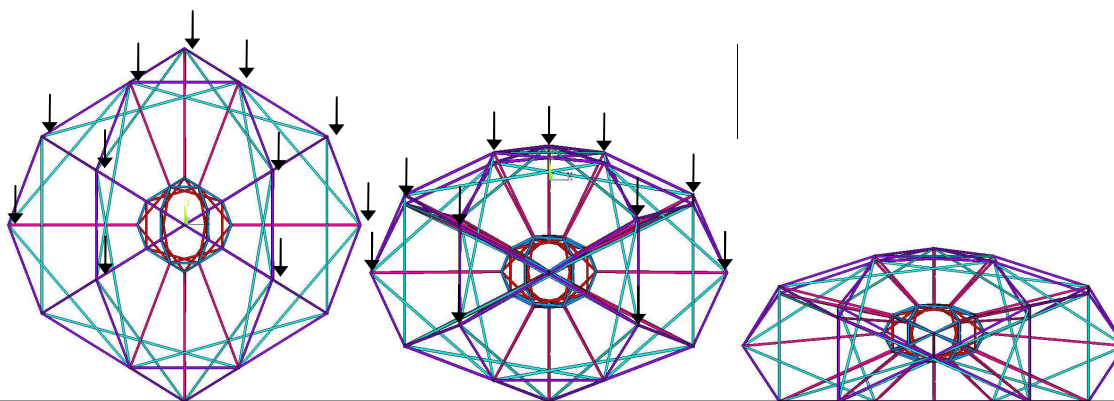
Tahové členy cytoskeletu	LINK 10	Keyopt,3,0 (tah)
Tlakové členy cytoskeletu	LINK 10	Keyopt,3,1 (tlak)
Spojovací členy cytoskeletu	LINK 8	
Membránový skelet	SHELL 181	
Cytoplazma	SOLID 185	
Jádro	SOLID 185	

Tab.5 Prvky použité při modelování buněčných komponent

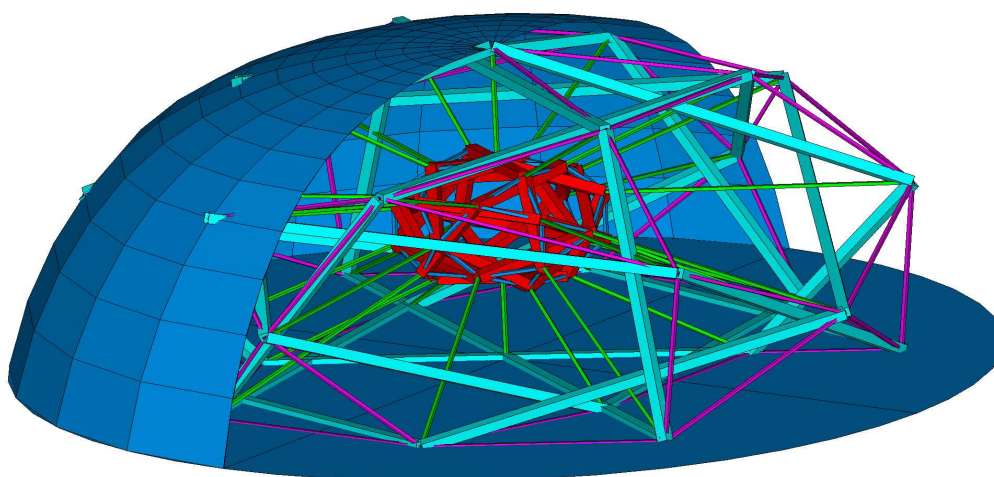
#### 6.4.2.2 Model geometrie – přilnutý tvar

Přilnutý tvar buňky bude využit při výpočtové simulaci vlačovací zkoušky. Protože z výsledků citlivostní analýzy vlivu tuhosti jednotlivých buněčných komponent na výsledky vlačovací zkoušky, provedené na jednodušším modelu (viz. kap. 6.2) vyplývá, že vliv jádra, modelovaného kontinuem, je na výsledky vlačovací zkoušky zanedbatelný, není v tomto modelu přilnuté buňky jádro zahrnuto. Model geometrie tedy zahrnuje tyto prvky buněčné struktury: cytoskelet (modelovaný tensegritní strukturou), membránový skelet (modelovaný jako skořepina), a cytoplasmu (modelovaná jako izotropní homogenní kontinuum).

Přilnutý tvar buňky byl vytvořen remodelací ze základního sférického tvaru. Do uzlů tensegritního modelu cytoskeletu byly předepsány takové posuvy, aby po ukončení výpočtu došlo k vytvoření požadovaného tvaru buňky přilnuté k podložce (viz. obr. 105). Takto remodelovaný cytoskelet byl následně “obalen“ membránou a “vyplněn“ cytoplasmou. Použité prvky jsou stejné jako v případě sférického tvaru.



obr. 105 Tvorba přilnutého tvaru tensegritní struktury cytoskeletu



obr. 106 Model geometrie buňky přilnuté k podložce

### 6.4.2.3 Model konstitutivního chování

Materiálové vlastnosti buněčných komponent nejsou dosud přesně známy, protože je v současnosti nelze přesně měřit (jednak vzhledem k jejím rozměrům a jednak vzhledem k tomu, že buněčné komponenty vykazují jiné vlastnosti jako součást buňky, než když jsou izolovány), proto tyto vlastnosti většinou vstupují do výpočtových modelů jako neznámá. Proto je nutné zvolit takový model konstitutivního chování, který by vzhledem k počtu svých parametrů neznemožňoval jejich identifikaci. V literatuře je nejčastěji používaným modelem konstitutivního chování nejjednodušší lineárně-elastický izotropní homogenní model, zejména z toho důvodu, že vyžaduje pouze dva parametry, což usnadňuje jejich identifikaci. Při modelování časově závislých dějů se také používají modely viskoelastické. Protože se v této práci budeme zabývat pouze statickými úlohami, nebudeme viskoelasticitu v našem modelu uvažovat.

Pro modelování všech komponent buňky proto používáme lineárně elastický konstitutivní model, který vzhledem k malému počtu konstitutivních parametrů usnadňuje jejich identifikaci. Hodnoty elastických konstant jednotlivých buněčných komponent jsme převzali z práce [106], kde byly převzaty z různých zdrojů. Hodnoty těchto konstant byly následně vhodně upraveny na základě výpočtových simulací, aby výsledky těchto simulací řádově odpovídaly experimentu.

	Membránový skelet	Jádro	Cytoplazma	Microtubuly	Microfilamenty	Spojovací prvky
Modul pružnosti [kPa]	10	0.005	0.001	1.2e6	2.6e6	2e6
Poisson's ratio	0.3	0.45	0.45	0.3	0.3	0.3

**Tab.6** Elastické konstanty komponent modelu buňky

### 6.4.2.4 Modelování kontrakce aktinmyozinových motorů

Protože v tensegritních strukturách hraje významnou roli předpětí, které ovlivňuje jejich integritu a tuhost, je nutné toto předpětí zanést i do tensegritního modelu cytoskeletu buňky. V buňkách předpětí vzniká pomocí asociace mikrofilament s proteinem myozinem, čímž vznikají tzv. aktomyozinové kontraktilní motory, které generují tahové (kontraktilní) síly. Toto tahové předpětí je v našem modelu cytoskeletu generováno v tahových členech tensegritní struktury cytoskeletu (tahové členy podle teorie tensegritního modelu buňky představují mikrofilamenty) pomocí předepsání počátečního přetvoření (reálná konstanta INITIAL STRAIN) do prvků LINK10.



## 6.5 POROVNÁNÍ VLASTNOSTÍ MODELU S EXPERIMENTÁLNĚ ZÍSKANÝMI POZNATKY

Protože nejdůležitější částí navrženého strukturního modelu mechanického chování buňky je tensegritní model cytoskeletu, je nejprve nutné ověřit, zda vykazuje mechanické chování v souladu s experimentálně zjištěnými poznatky (např. efekt vzdáleného důsledku, předpět'ové zpevnění atd.), na jejichž základě byl tensegritní model navržen.

Z tohoto důvodu byly provedeny následující testovací výpočty, sloužící k ověření správného chování tensegritního modelu cytoskeletu:

- Předpět'ové zpevnění
- Deformačního zpevnění
- Ověření efektu vzdáleného důsledku pomocí simulace zkoušky magnetickou pinzetou
- Vliv tvaru buňky (úrovně zploštění) a tuhosti mikrotubulů na poměr rozdělení tlakového zatížení mezi podložku a mikrotubuly u přilnuté buňky.

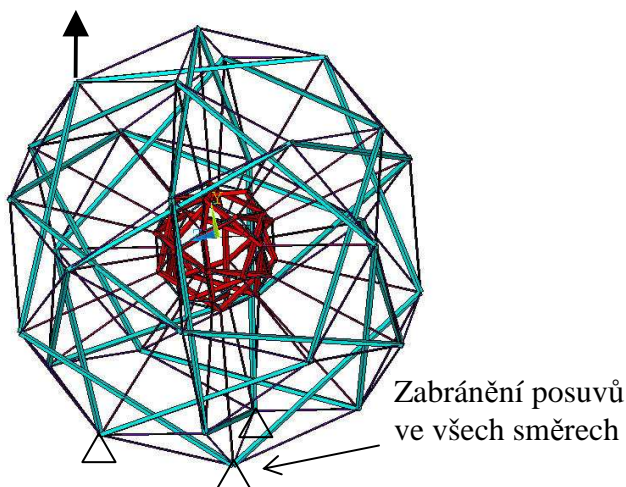
### 6.5.1 Předpět'ové zpevnění

Základní vlastností všech předepnutých struktur je to, že jejich tuhost je téměř přímo úměrná velikosti předpětí [90]. Tento efekt byl pozorován při mnoha experimentálních studiích, prováděných na různých typech buněk. Cílem tohoto testovacího výpočtu bylo ověřit, zda tento jev vykazuje i navržený tensegritní model cytoskeletu. Předpětí cytoskeletu je realizováno pomocí předepsání počátečního přetvoření (zkrácení) do tahových prvků (mikrofilament).

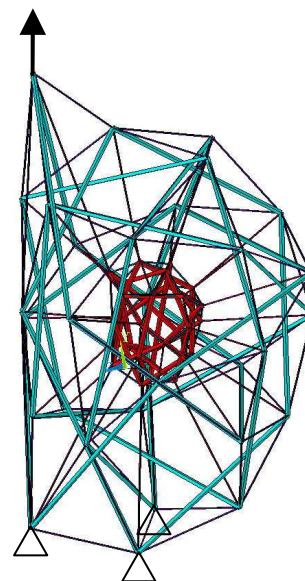
#### ➤ Geometrická konfigurace, okrajové podmínky

Pro ověření efektu předpět'ového zpevnění byl tensegritní model cytoskeletu ve spodní části nepohyblivě uložen a ve vybraném uzlu na povrchu struktury bylo předepsáno silové zatížení (viz obr. 107). V tomto uzlu bylo odečítána hodnota posuvu, který toto silové zatížení vyvolalo. Tuhost struktury byla následně stanovena jako podíl zátěžné síly a posuvu zatíženého uzlu. Výpočty byly provedeny v rozsahu počátečních přetvoření předepsaných do tahových prvků 10%-40%.

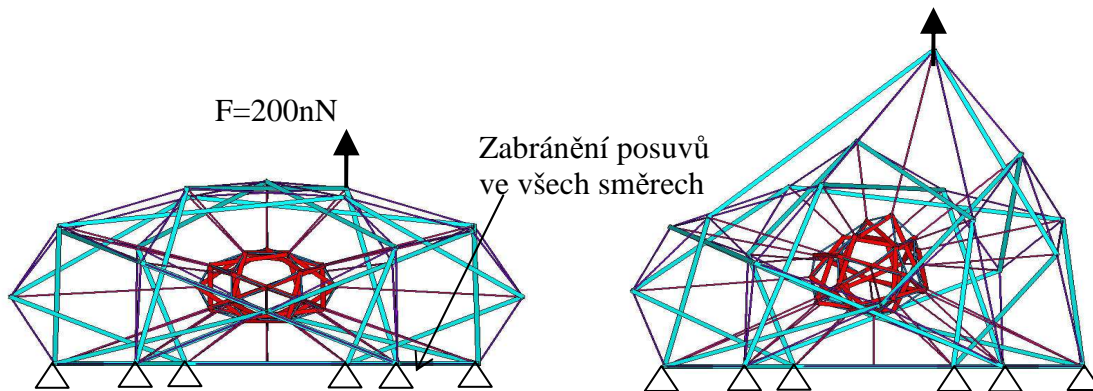
$F=200\text{nN}$



obr. 107 Okrajové podmínky při vyšetřování efektu předpět'ového zpevnění-sférický tvar



obr. 108 Deformovaný tvar modelu cytoskeletu po zatížení silou ve vybraném uzlu-sférický tvar

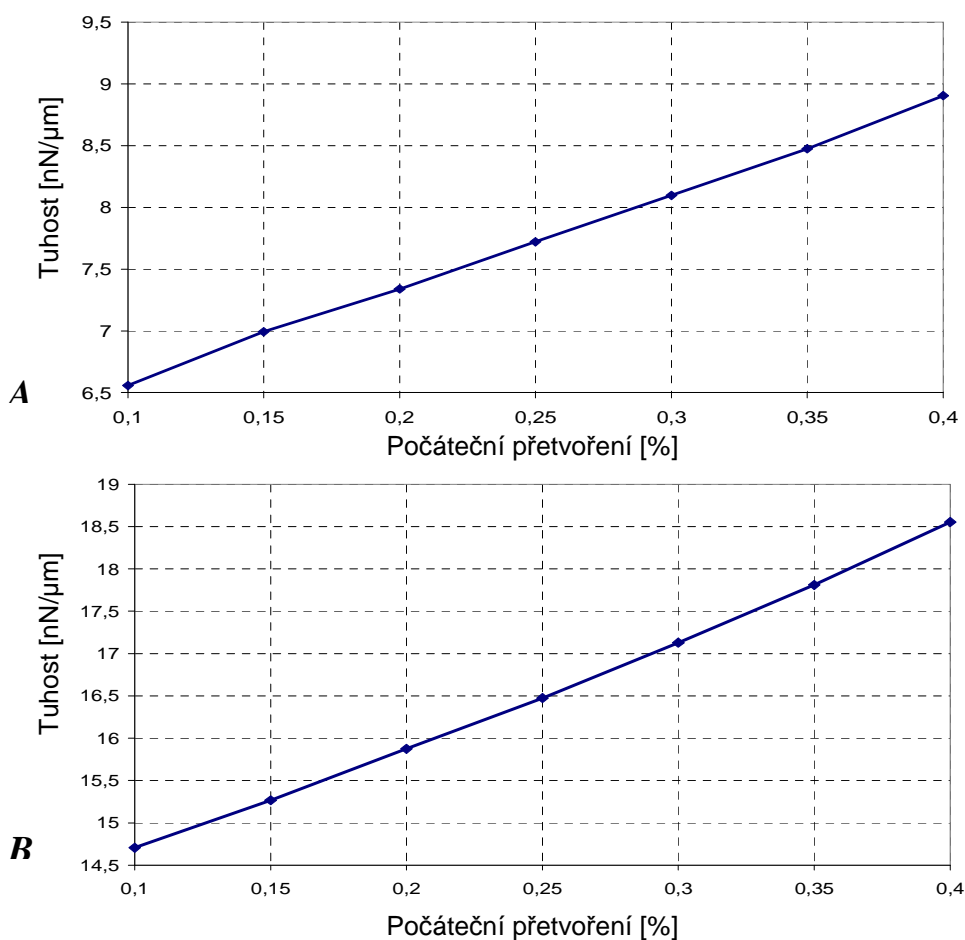


obr. 109 Okrajové podmínky při vyšetřování efektu předpětového zpevnění - přilnutý tvar

obr. 110 Deformovaný tvar modelu cytoskeletu po zatížení silou ve vybraném uzlu

### ➤ Výsledky

Výsledky testovacích výpočtů prokazují lineární závislost mezi předpětím a tuhostí cytoskeletu v souladu s předpokladem tensegritního modelu (obr. 111) Pro kontrolu byly provedeny výpočty i pro jiné uzly na povrchu tensegritní struktury, všechny však vykazovaly lineární závislost.



obr. 111 Křivky tuhost – počáteční přetvoření pro sférický tvar (A) a přilnutý tvar (B) tensegritního modelu cytoskeletu

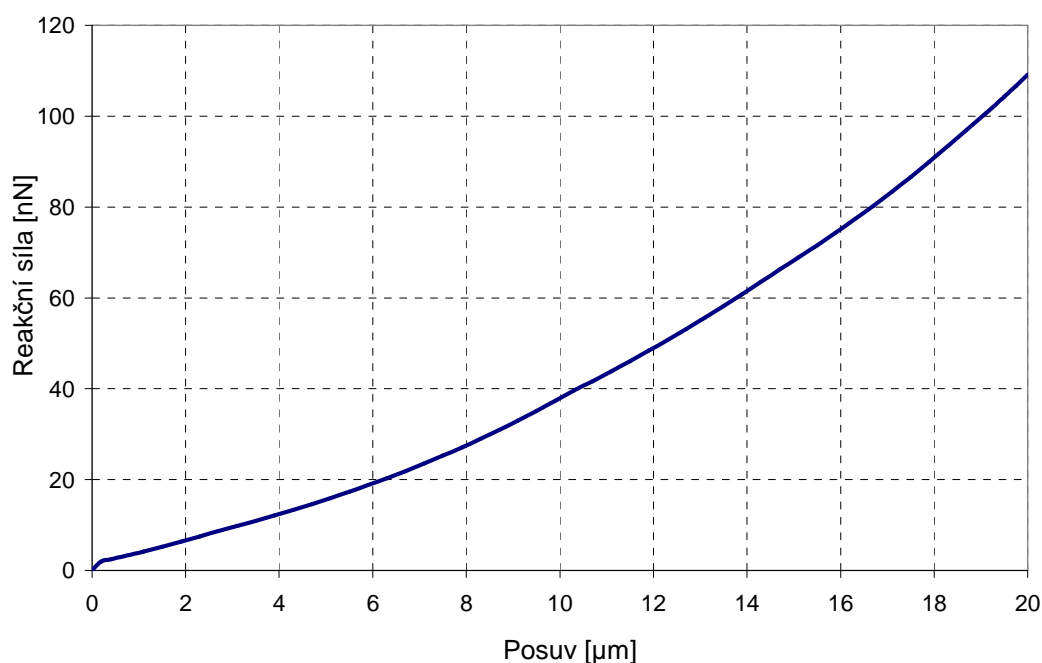
## 6.5.2 Deformační zpevnění

Při vyšetřování mechanických vlastností buněk různými experimentálními metodami bylo zjištěno, že se vzrůstajícím mechanickým zatížením vzrůstá i tuhost buňky, z čehož vyplývá, že buňky vykazují nelineární závislost mezi napětím a přetvořením (deformační zpevnění) [54][84][85]. V diskrétních strukturách (např. tensegritních) je tato nelinearita primárně způsobena geometrickou rekonfigurací a natáčením strukturních prvků ve směru působícího zatížení (spíše než nelineárním chováním individuálních strukturních prvků) [86]. Tento testovací výpočet byl proveden za účelem ověření této vlastnosti u navrženého tensegritního modelu cytoskeletu.

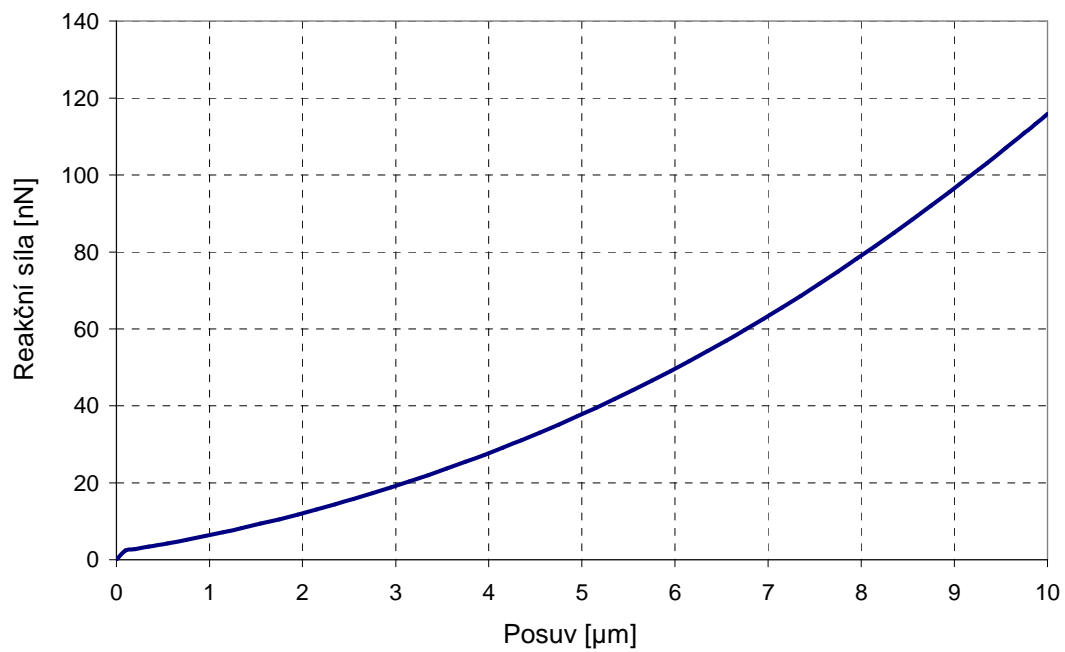
Geometrická konfigurace a okrajové podmínky byly stejné jako při předchozí testovací úloze, s tím rozdílem, že vybraný uzel na povrchu tensegritní struktury byl zatížen deformačně (v předchozím případě bylo použito silové zatížení). V tomto uzlu byla v průběhu zatěžování odečítána reakční síla v závislosti na posuvu. Výpočet byl proveden pro sférickou i přilnutou geometrickou konfiguraci tensegritního modelu cytoskeletu.

### ➤ Výsledky

Bylo zjištěno, že závislost mezi posuvem uzlu a reakční silou má nelineární charakter (zpevňující – se vzrůstající deformací vzrůstá tuhost struktury). Tato nelinearita je způsobena geometrickou rekonfigurací diskrétních členů tensegritní struktury. Výpočty byly provedeny i pro jiné uzly na povrchu tensegritních struktur, výsledky se však výrazně neodlišovaly. Přetvoření v tahových elementech bylo konstantní 10%.



obr. 112 Závislost mezi posuvem vybraného uzlu na povrchu tensegritní struktury a reakční silou – sférický tvar buňky



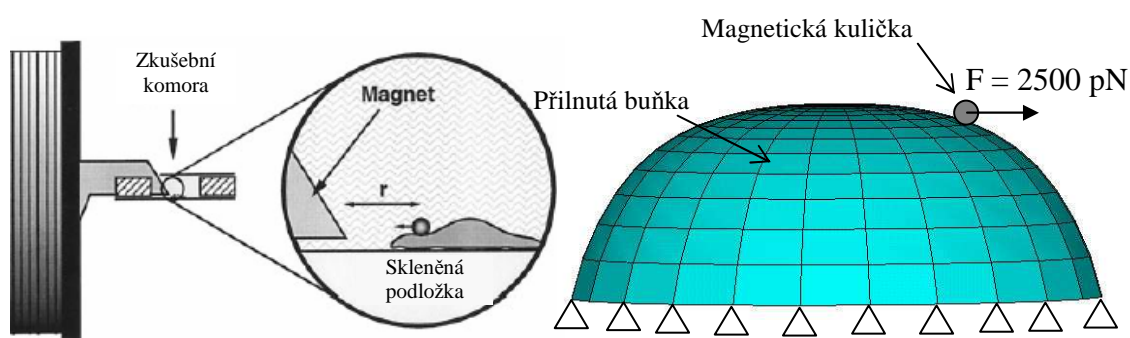
*obr. 113 Závislost mezi posuvem vybraného uzlu na povrchu tensegritní struktury a reakční silou – přilnutý tvar buňky*

### 6.5.3 Efekt vzdáleného důsledku

Jednou z podstatných vlastností tensegritních struktur je globální odezva na aplikované lokální zatížení; protože externí zatížení vyvolá geometrickou reorganizaci strukturních prvků v celé struktuře, dochází k přenosu tohoto zatížení i do míst vzdálených od působíště (tzv. vzdálený důsledek [69]). Tento efekt byl u buněk experimentálně prokázán (viz. kap.5.2.5). Pro ověření toho, zda navržený model respektuje toto chování, byla provedena výpočtová simulace zkoušky *magnetickou pinzetou*. Tato metoda je založena na silovém zatížení magnetické částice, přilnuté k povrchu buňky. Tato kulička je zatížena tangenciální magnetickou silou, prostřednictvím hrotu magnetu, který tvoří jádro cívký (obr. 46). V závislosti na tomto silovém zatížení dochází k posuvu kuličky a tím k deformaci povrchu buňky.

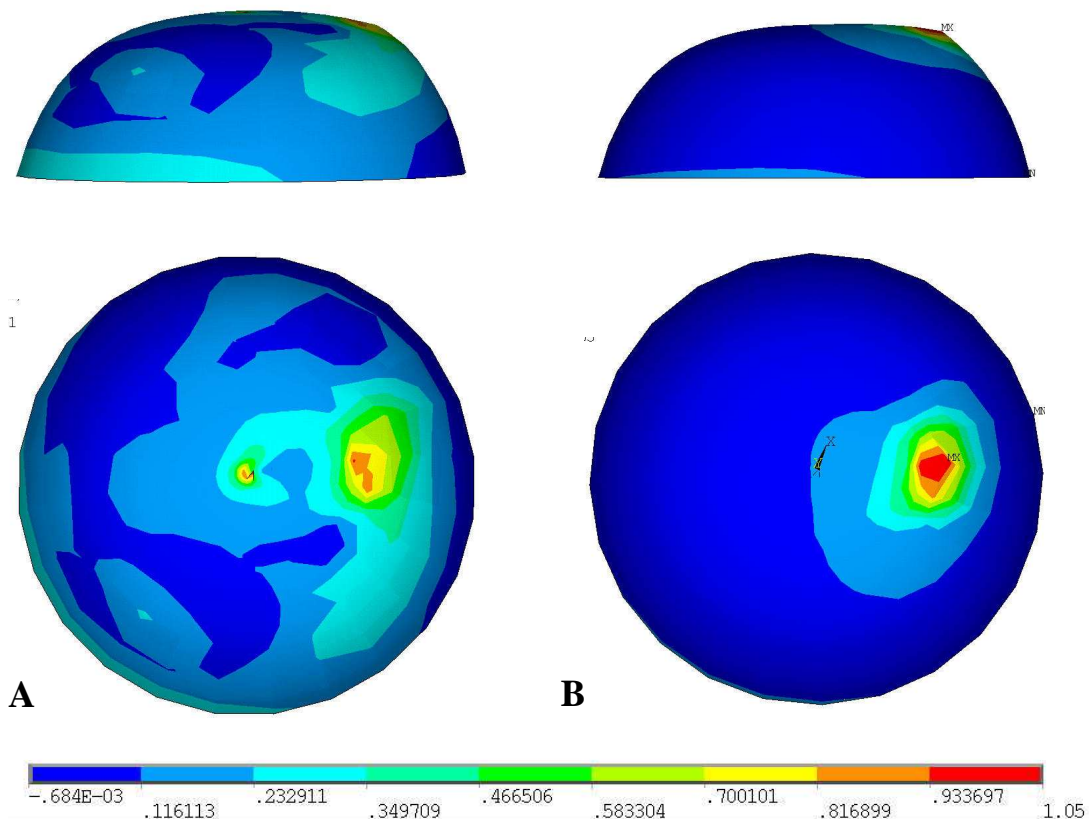
#### ➤ *Model geometrie, okrajové podmínky*

Při simulaci zkoušky magnetickou pinzetou byl použit model buňky přilnuté k podložce (takové buňky se při vyšetřování touto metodou používají) se všemi strukturními prvky, tj. cytoskeletem, membránou a cytoplasmou. Všechny uzly modelu na rozhraní buňka-podložka mají předepsány nulové posuvy ve všech směrech. Simulace zkoušky magnetickou pinzetou je realizována zjednodušeně prostřednictvím síly, působící rovnoběžně s podložkou ve vybraném uzlu na povrchu buňky. Tento uzel představuje povrchový integrinový receptor, tj. je společný pro membránový skelet a tensegritní strukturu cytoskeletu (obr. 115). Magnetická kulička tedy není ve výpočtovém modelu zahrnuta, jen je simulována její funkce.

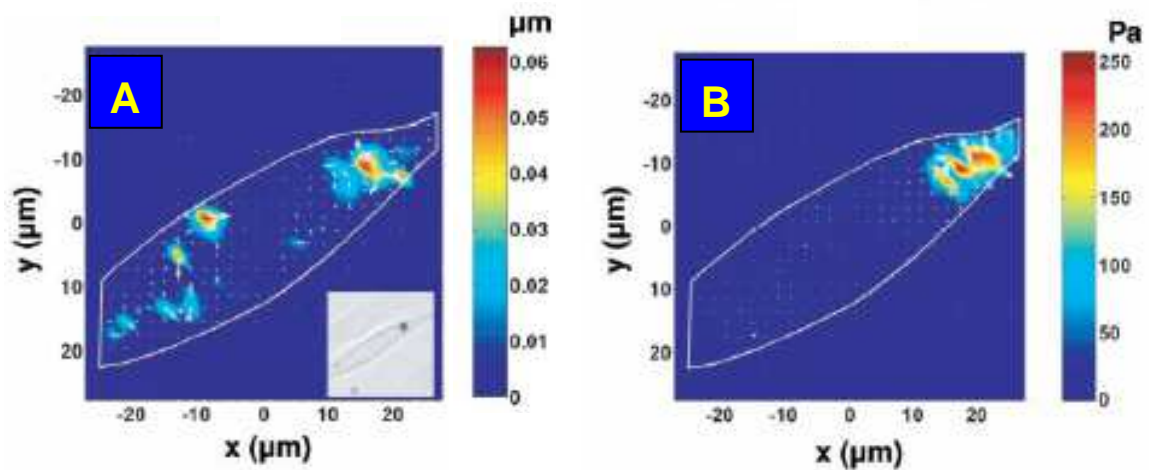


obr. 114 Schéma zkoušky magnetickou pinzetou

obr. 115 Geometrie a okrajové podmínky při simulaci zkoušky magnetickou pinzetou



obr. 116 Rozložení 1. hlavního napětí v membránovém skeletu modelu buňky.  
 A-model s cytoskeletem, B – model bez cytoskeletu



obr. 117 **A**-rozložení posuvů v buňce, vyvolané smykovým zatížením pomocí magnetic twisting cytometry (poloha feromagnetické kuličky je znázorněna černou tečkou na přiložené fotografii). Vysoké hodnoty posuvů se nachází i v místech vzdálených od působení přes 20  $\mu\text{m}$ . **B**-rozložení napětí (přepočítáno z hodnot posuvů) ve stejné buňce po rozrušení aktinového skeletu pomocí cytochalasinu D [94].

### ➤ *Výsledky výpočtové simulace*

Z výsledků výpočtové simulace nás zajímalo, jestli náš model bude vykazovat stejné chování, jaké bylo ověřeno experimentálně a publikováno v [94] (viz. obr. 117). Tedy jestli při zatížení povrchového receptoru buňky dojde k přenosu zatížení i do míst buňky vzdálených od působiště a jestli při vyjmutí cytoskeletu z modelu buňky tento efekt vymizí. Z tohoto důvodu byly provedeny dvě výpočtové simulace zkoušky magnetickou pinzetou, jedna pro model bez cytoskeletu a druhá pro model s cytoskeletem a vyšetřovali jsme vliv silového zatížení vybraného uzlu na rozložení napětí v membránovém skeletu buňky.

Z výsledků (viz. obr. 116) vyplývá, že v modelu bez cytoskeletu dochází pouze k lokálnímu ovlivnění membránového skeletu v oblasti působiště síly, zatímco u modelu s cytoskeletem je zatížení díky tensegritní struktuře cytoskeletu přeneseno i do vzdálenějších oblastí membránového skeletu, podobně, jak bylo zjištěno experimentálně (viz. obr. 117).

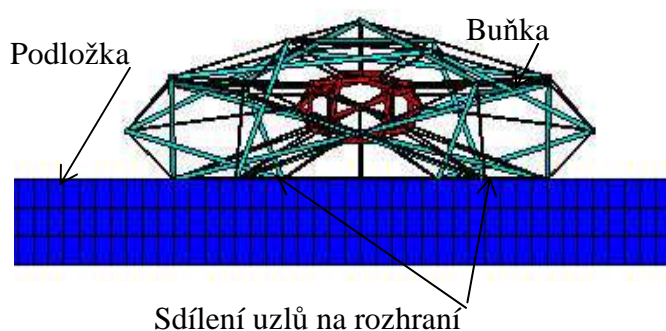
#### **6.5.4 Vliv zploštěného tvaru na přenos zatížení u přilnuté buňky**

U přilnutých buněk je (podle zastánců tensegritních modelů buněk) kontraktilní předpětí, na úrovni zploštění buňky. Čím více je buňka zploštělá, tím více tlakového zatížení je přenášeno na podložku (viz. kap.5.2.5). Přilnutá buňka působí v důsledku předpětí na podložku prostřednictvím tzv. trakčních sil (síly rovnoběžné s rozhraním buňka-podložka). Tyto trakční síly lze ověřit metodou trakční cytometrie (viz. kap. 4.2.4).

Cílem tohoto testovacího výpočtu bylo ověřit, zda navržený výpočtový model vykazuje tuto závislost mezi úrovní zploštění a podílem podložky a mikrotubulů na přenášeném tlakovém zatížení. Toto ověření bylo provedeno pomocí výpočtové simulace zkoušky trakční cytometrie.

### ➤ *Model geometrie, okrajové podmínky*

Při výpočtové simulaci byl použit pouze tensegritní model cytoskeletu, protože ostatní strukturní složky modelu buňky se na tomto jevu nepodílí. Model geometrie je tvořen tuhou podložkou, tvořenou prvky SOLID185 a tensegritním modelem cytoskeletu, který je s podložkou spojen v uzlech na rozhraní buňka-podložka prostřednictvím sdílení uzlů. Předpětí cytoskeletu je realizováno předepsáním počátečního pretvoření do tahových prvků tensegritní struktury pomocí reálné konstanty.



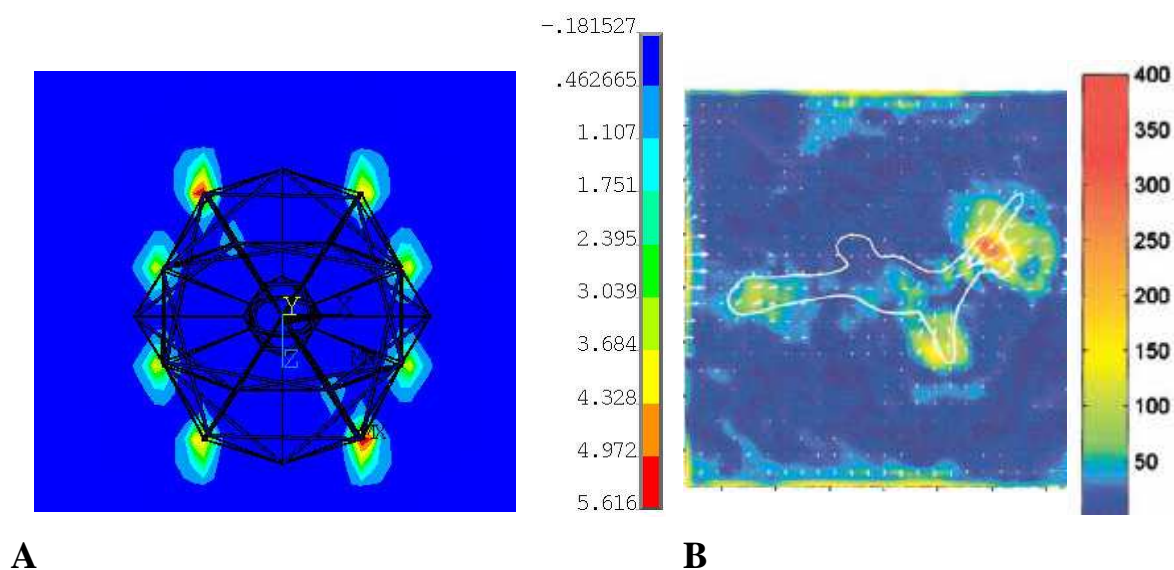
obr. 118 Geometrie a okrajové podmínky při výpočtové simulaci trakční cytometrie

### ➤ *Výsledky výpočtové simulace*

Při výpočtové simulaci jsme zjišťovali, zda při větší úrovni zploštění buňky dojde (při stejné úrovni předpětí v cytoskeletu) ke zvýšení zatížení podložky. Nešlo nám o určení přesných hodnot a validaci s nějakým konkrétním experimentem, ale pouze o ověření trendu. Byly provedeny dvě simulace – s původními hodnotami materiálových konstant prvků cytoskeletu (viz tab.5) při počátečním přetvoření tahových prvků cytoskeletu (mikrofilament) 20% a s tlakovými prvky (mikrotubuly) o dva řády poddajnějšími oproti původním hodnotám. Snížení tuhosti mikrotubulů způsobí jejich větší deformaci v důsledku předpětí mikrofilament a tím pádem dojde k většímu zploštění modelu cytoskeletu.

Tato změna tvaru způsobí také pokles napětí v mikrofilamentových prvcích cytoskeletu, což je nutno kompenzovat zvýšením jejich počátečního předpětí tak, aby bylo dosaženo stejných hodnot napětí v těchto prvcích jako při první simulaci (s původními hodnotami materiálových konstant). Velikost zatížení podložky byla vyhodnocována pomocí součtu absolutních hodnot reakčních (trakčních) sil, působících v uzlech cytoskeletu ve styku s podložkou.

Z výsledků výpočtových simulací bylo zjištěno, že při zploštění buňky v důsledku poklesu tuhosti mikrotubulů o dva řády došlo ke zvýšení trakčních sil o 34%. Tento trend odpovídá experimentálně zjištěným poznatkům. Na obr. 119 je porovnání výsledků výpočtové simulace a experimentu.



*obr. 119 A-rozložení 1. hlavního napětí v podložce, vyvolané trakčními silami tensegritního modelu cytoskeletu, B – rozložení trakčních sil buňky hladkého svalstva dýchacích cest, určených metodou trakční cytometrie[42]*



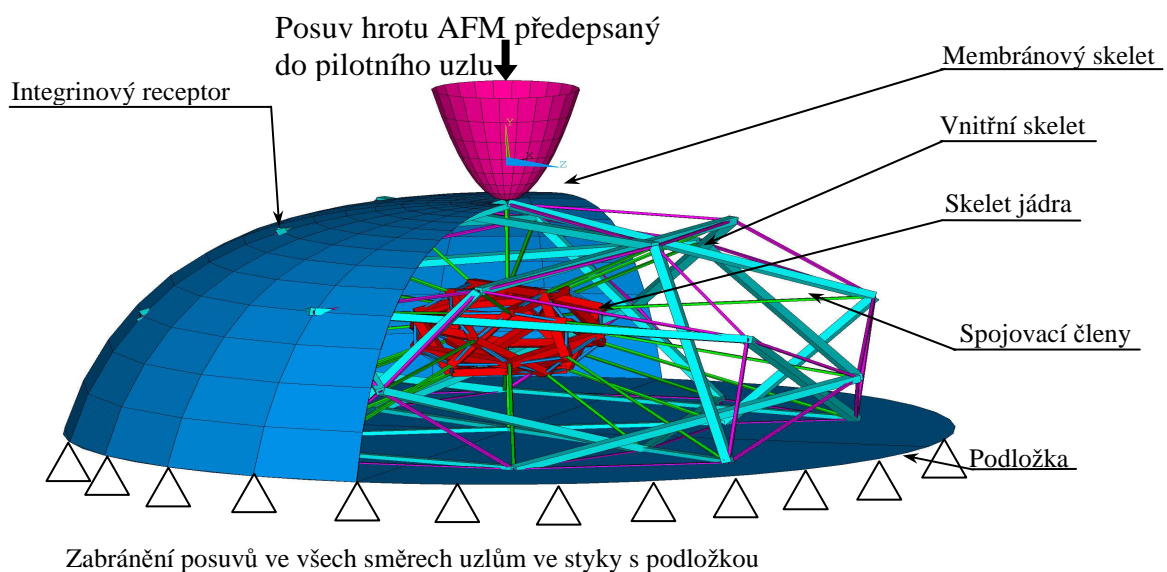
## 6.6 VÝPOČTOVÁ SIMULACE VTLAČOVACÍ ZKOUŠKY

Jedním z hlavních cílů této práce je kromě návrhu a otestování výpočtového modelu mechanického chování buňky také přizpůsobení tohoto modelu k výpočtovému simulování mechanických zkoušek. Tyto výpočtové simulace mohou sloužit zejména k identifikaci parametrů výpočtového modelu buňky na základě výsledků experimentů. Na úrovni výpočtového modelu potom závisí kvalita a kvantita informací, které je možno z experimentálních dat získat.

Jednou z často používaných experimentálních metod pro vyšetřování mechanických vlastností buněk je vtláčovací zkouška pomocí AFM. Její princip je popsán v kap. 4.2.1.

### ➤ *Model geometrie, okrajové podmínky*

Model geometrie při simulaci vtláčovací zkoušky se skládá z modelu buňky a hrotu AFM (viz. obr. 120). Vtláčovací zkouška se provádí na buňkách přilnutých k podložce, proto při výpočtové simulaci používáme přilnutý tvar modelu buňky. Hrot AFM je modelován jako ideálně tuhé těleso (ve skutečnosti je mnohonásobně tužší v porovnání z buňkou) ve tvaru rotačního paraboloidu (poloměr hrotu přibližně odpovídá poloměru hrotu, použitého při vtláčovací zkoušce, publikované v [108]). Přilnutí buňky k podložce je realizováno předepsáním nulových posuvů do všech uzlů na rozhraní buňka-podložka. Interakce mezi hrotem AFM a buňkou je realizována pomocí kontaktních prvků.



obr. 120 *Model geometrie a okrajové podmínky při výpočtové simulaci vtláčovací zkoušky*

### ➤ *Model materiálu*

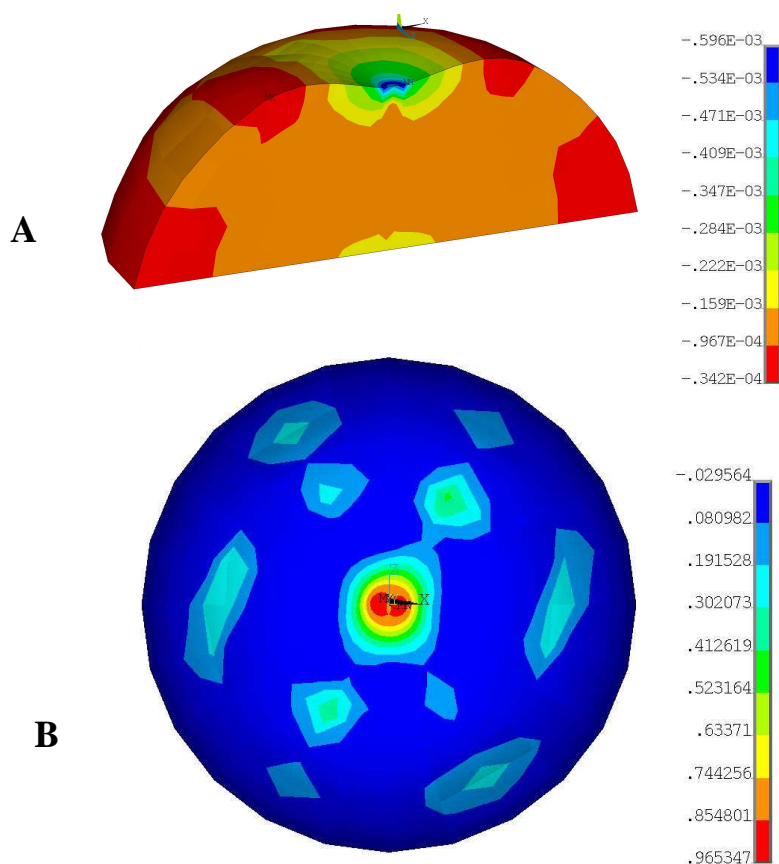
Pro modelování všech strukturních složek modelu buňky byl použit lineárně-elastický homogenní izotropní konstitutivní model s konstantami, uvedenými v tab.5, kap. 6.4.2.3. Hrot AFM je modelován jako ideálně tuhé těleso (RIGID).

### ➤ *Výpočtová simulace*

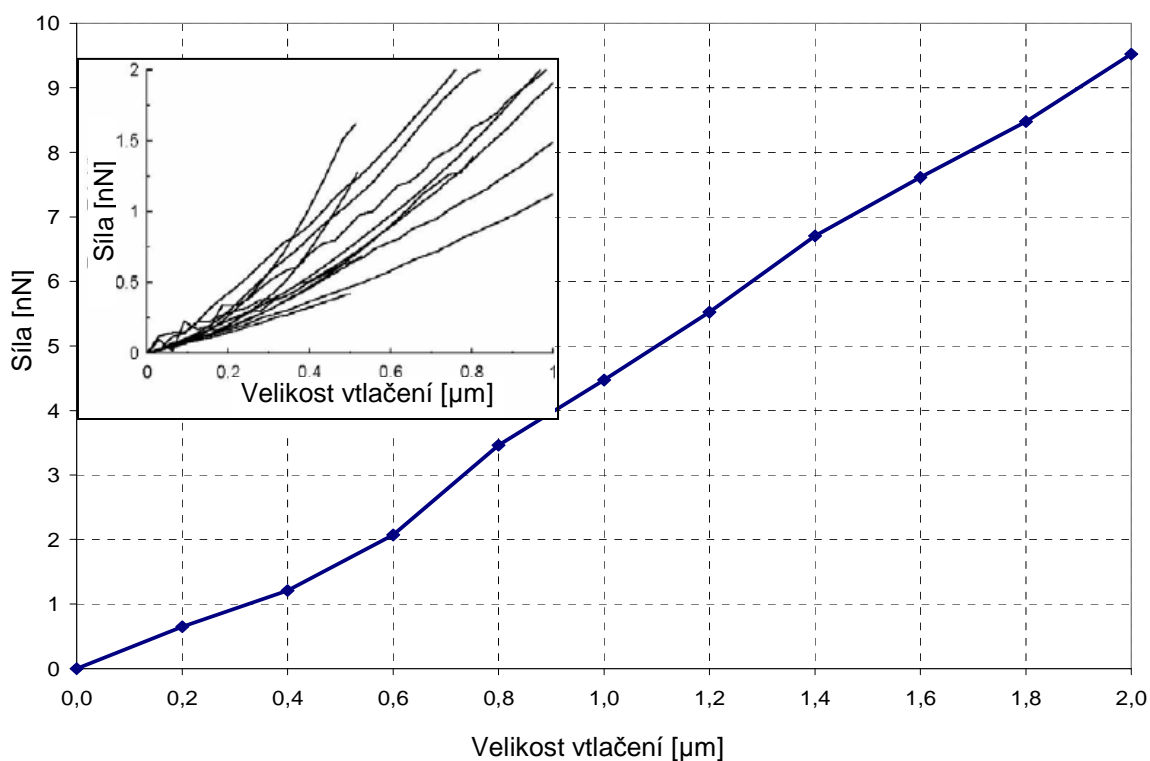
Výpočtová simulace vlačovací zkoušky probíhá ve třech zátěžných krocích. V prvním kroku je zadáno počáteční přetvoření do tahových prvků tensegritní struktury cytoskeletu, což simuluje kontrakci mikrofilament a vytvoření předpětí v cytoskeletu. Ve druhém zátěžném kroku je realizováno přiblížení hrotu AFM na povrch buňky. Ve třetím zátěžném kroku dochází k vlastnímu vlačování hrotu AFM do povrchu buňky. Velikost vlačení byla zvolena  $2\mu\text{m}$ , což odpovídá běžně používaným reálným hodnotám. Výstupem výpočtové simulace je stejně jako při experimentu závislost mezi hloubkou vlačení a reakční silou ve hrotu AFM.

### ➤ *Výsledky*

Při první výpočtové simulaci byla buňka vystavena působení hrotu AFM v místě vrcholového uzlu, tj. přímo v místě, kde dochází k spojení vnitřního skeletu s membránovým skeletem. Toto místo představuje transmembránový integrinový receptor. Na obr. 121 je znázorněno rozložení 1. hlavního napětí v cytoplasmě a membránovém skeletu, na obr. 122 je závislost mezi reakcí v hrotu AFM a hloubkou vlačení.

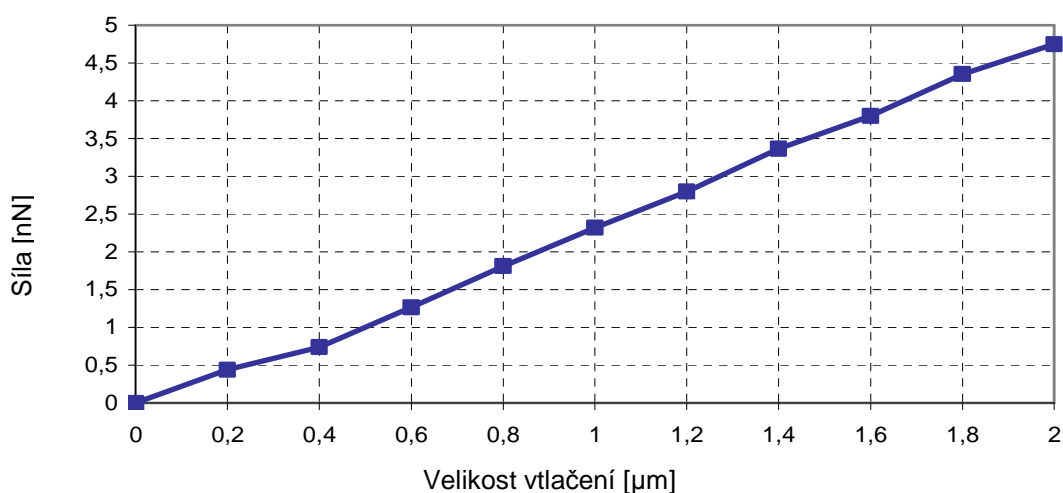


obr. 121 Rozložení 1. hlavního napětí v cytoplasmě (A) a v membránovém skeletu (B)



obr. 122 Závislost reakční síly v hrotu AFM na hloubce vtlačení. Menší obrázek v levém horním rohu znázorňuje experimentální výsledky vtlačovací zkoušky na buňkách hladkého svalstva cévní stěny [108]

Z výsledků výpočtové simulace je vidět, že v porovnání s experimentálními hodnotami je model buňky se zvolenými materiálovými parametry (viz tab.5) tužší. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k modifikaci vstupních materiálových parametrů modelu. Použité hodnoty materiálových konstant byli z velké části převzaty z publikace [106]. Model použitý v této publikaci ovšem neobsahoval spojovací členy mezi cytoskeletem a jádrem (v našem případě skeletem jádra), proto jsme modul pružnosti této komponenty modelu buňky pouze odhadli. Po snížení tuhosti těchto spojovacích prvků na 100 MPa již závislost reakční síly



obr. 123 Závislost reakční síly v hrotu AFM na hloubce vtlačení po úpravě tuhosti spojovacích členů.

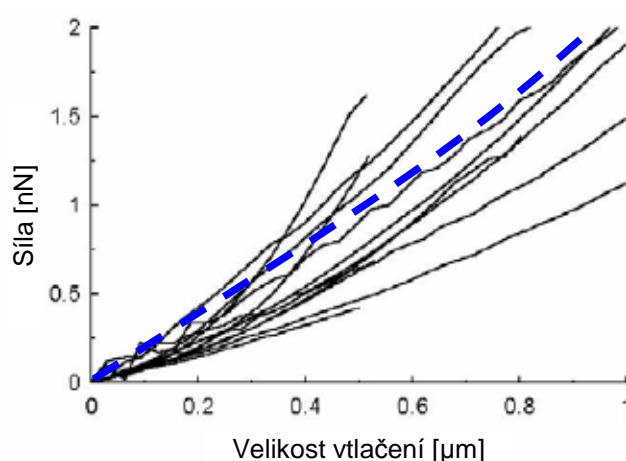
na hloubce průniku přibližně odpovídá experimentálním hodnotám (obr. 123).

### 6.6.1 Citlivostní analýzy

Úkolem citlivostní analýzy je vyšetřit vliv změn určitých vstupních parametrů na hodnoty parametrů výstupních. Protože vstupní materiálové charakteristiky buněčných komponent nelze přesně určit a jsou tedy pouze odhadnuté z různých zdrojů nebo zvolené (výpočtové simulace by měly sloužit k identifikaci těchto parametrů, do výpočtu vstupují jako neznámá), je užitečné vědět, jaký vliv tyto parametry mají na výsledky výpočtové simulace. Z tohoto důvodu byly provedeny následující citlivostní analýzy vlivu následujících vstupních parametrů na výsledky výpočtové simulace vtačovací zkoušky:

- Vliv tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky
- Vliv Poissonova čísla jednotlivých komponent buňky
- Vliv předpětí v tahových členech tensegrituní struktury cytoskeletu
- Vliv vzdálenosti působíště hrotu AFM od povrchového receptoru

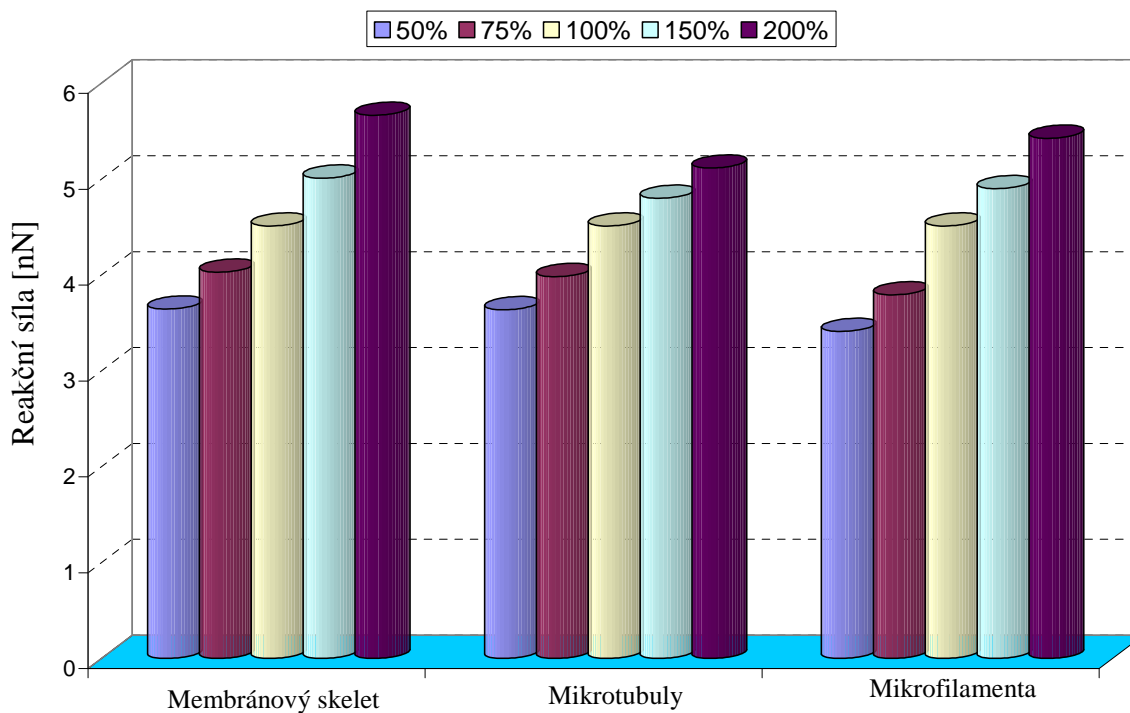
#### *Vliv tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky na výsledky výpočtové simulace*



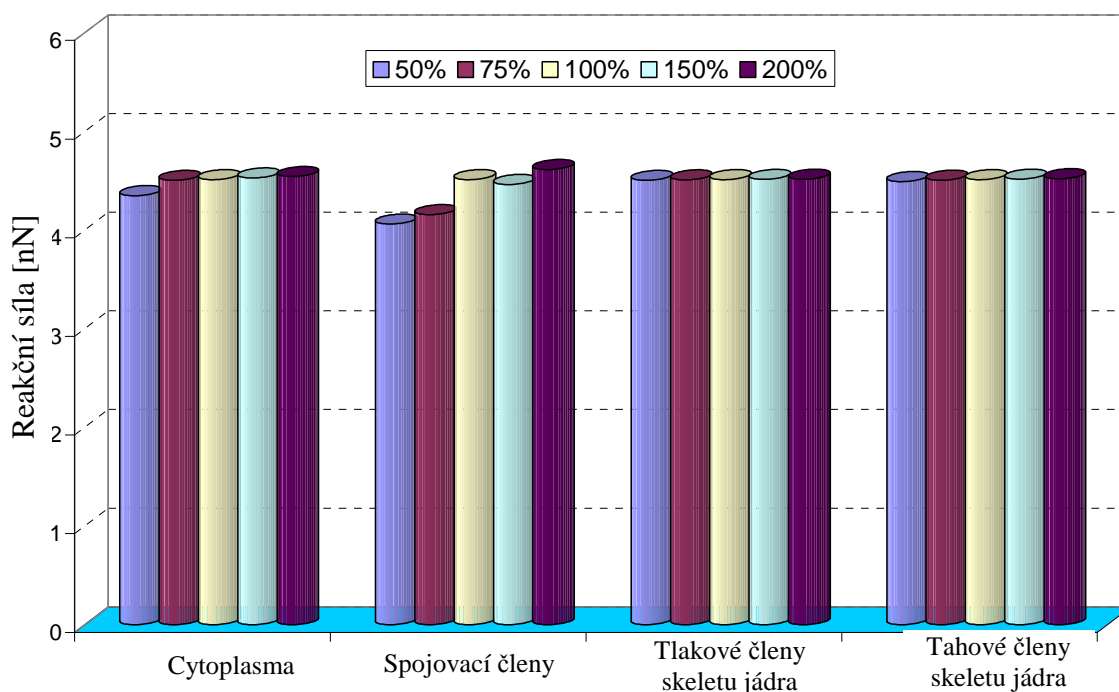
*obr. 124 Porovnání experimentálně určených křivek síla-deformace [108] a křivky určené výpočtovou simulací (čárkovaně)*

V prvním kroku byly zvoleny hodnoty materiálových konstant takové, aby se výsledek výpočtové simulace (křivka reakční síla-hloubka vtačení) přibližně shodoval s experimentem (viz. obr. 124). Tyto hodnoty materiálových konstant byly považovány za výchozí pro citlivostní analýzu. Modul pružnosti byl měněn v intervalu 50% - 200% výchozích hodnot a byla vyhodnocována velikost reakční síly v hrotu AFM při konstantním vtačení 2 μm a při konstantním počátečním přetvoření v tahových prvcích tensegrituní struktury 10%.

Z výsledků citlivostní analýzy je patrné, že největší vliv na výsledek výpočtové simulace vtačovací zkoušky měly změny tuhosti membránového skeletu (viz. obr. 125) a tahových a tlakových prvků tensegrituní struktury vnitřního skeletu (mikrofilament a mikrotubulů). Oproti tomu vliv tahových a tlakových členů skeletu jádra je zanedbatelný (viz. obr. 126).



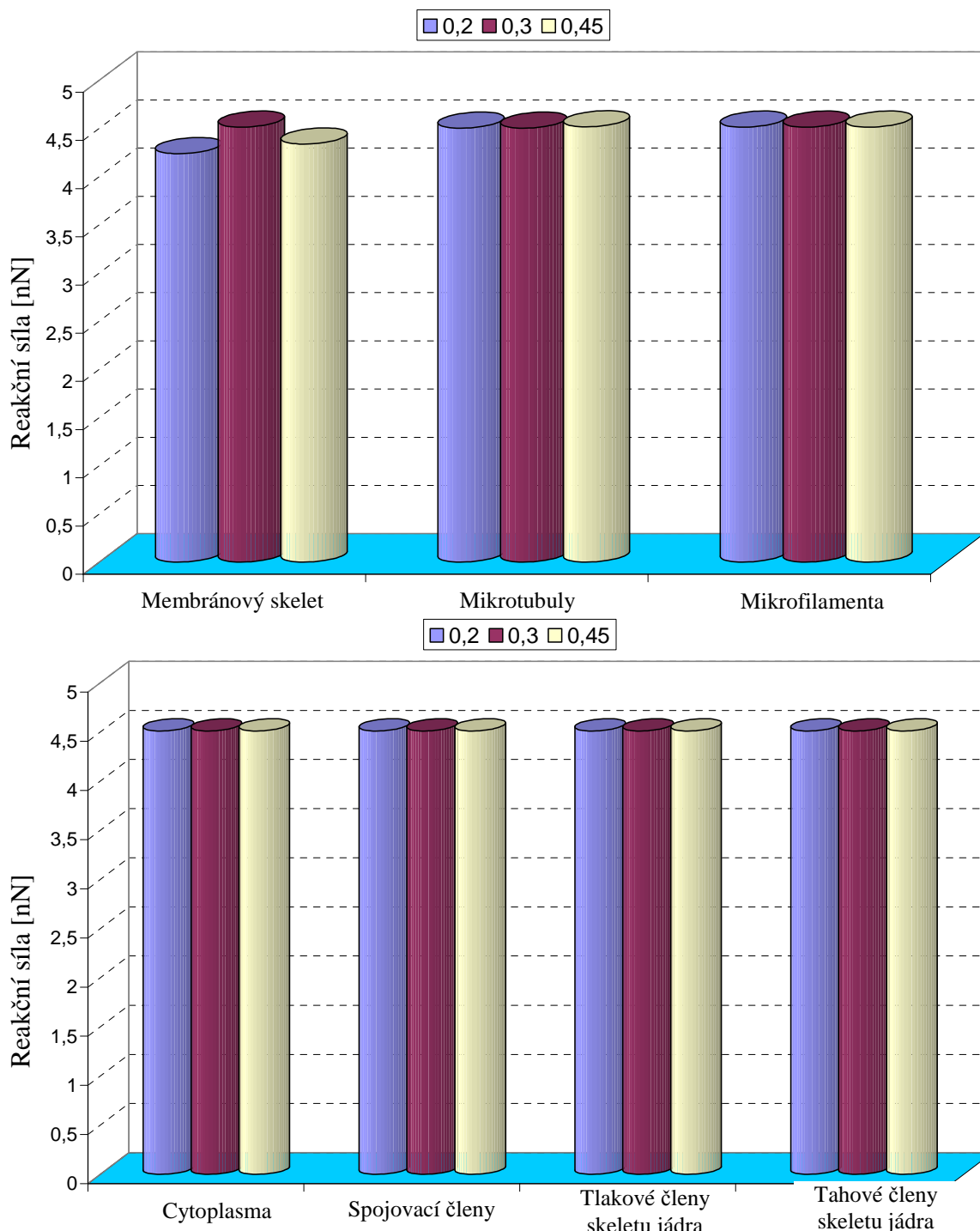
obr. 125 Vliv modulu pružností membránového skeletu, mikrotubulů a mikrofilament vnitřního skeletu na reakční sílu v hrotu AFM při vtláčení 2 $\mu$ m. modul pružnosti jednotlivých komponent byl měněn v rozsahu 50 – 200%



obr. 126 Vliv modulu pružností cytoplasmy, spojovacích členů, tahových a tlakových členů skeletu jádra na reakční sílu v hrotu AFM při vtláčení 2 $\mu$ m. modul pružnosti jednotlivých komponent byl měněn v rozsahu 50 – 200%

### Vliv Poissonova čísla

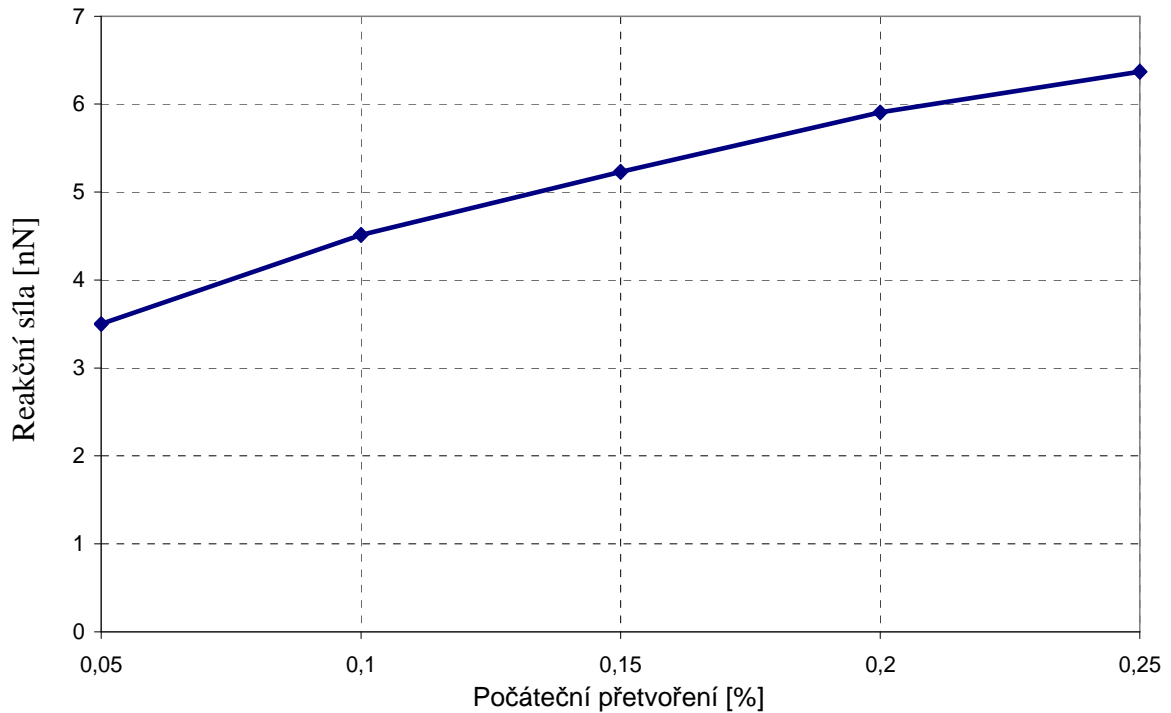
Kromě vlivu modulu pružnosti byl vyšetřován i vliv Poissonova čísla na výslednou reakční sílu v hrotu AFM. Pro zjištění vlivu hodnot Poissonova čísla jednotlivých komponent modelu buňky byly provedeny výpočtové simulace vlačovací zkoušky pro hodnoty Poissonova čísla 0,2 – 0,45. (v případě cytoplasmy 0,2 - 0,49). Závislosti jsou zobrazeny na obr. 127, a lze z nich vyčíst, že vliv Poissonova čísla na výsledky výpočtové simulace je v porovnání s vlivem modulu pružnosti zanedbatelný.



obr. 127 Vliv Poissonova čísla komponent modelu buňky na výsledek výpočtové simulace vlačovací zkoušky (velikost vlačení  $2\mu\text{m}$ )

### *Vliv předpětí v tahových členech tensegritní struktury cytoskeletu*

Při vyšetřování vlivu předpětí v tahových členech tensegritní struktury byly použity výchozí hodnoty materiálových konstant stejné jako při předchozích analýzách, hloubka vtlačení byla  $2\mu\text{m}$ . Počáteční přetvoření tahových prvků tensegritního modelu cytoskeletu bylo měněno v rozsahu 5 – 25%. Z výsledků vyplývá (viz obr. 128), že se vzrůstajícím počátečním přetvořením dochází k nelineárnímu zvyšování tuhosti buňky (nárůst reakční síly v hrotu AFM). Se vzrůstající hodnotou předpětí se jeho vliv na tuhost buňky zmenšuje.



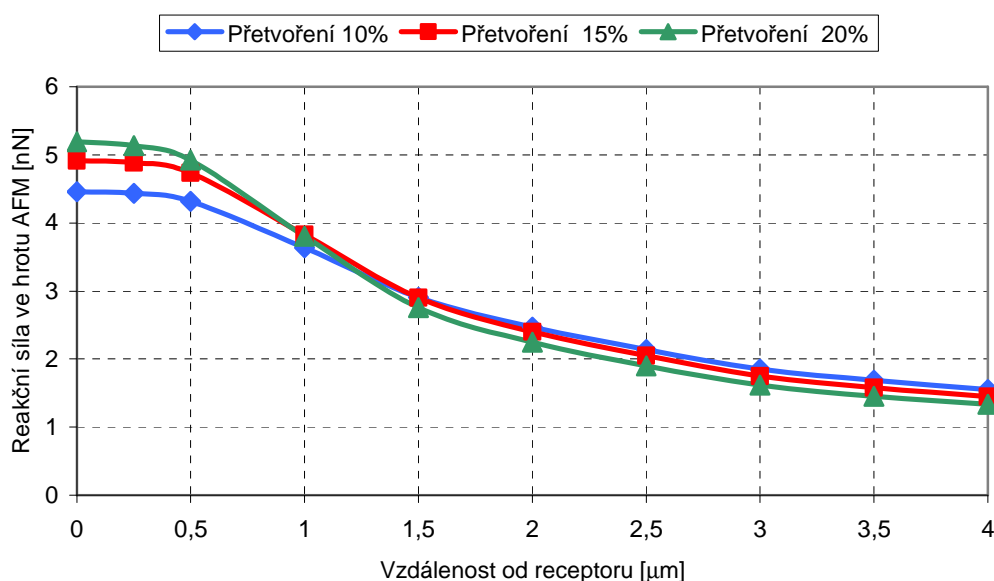
*obr. 128 Vliv počátečního přetvoření v tahových prvcích tensegritní struktury cytoskeletu na výsledek výpočtové simulace vtlačovací zkoušky (velikost vtlačení  $2\mu\text{m}$ ).*

### ***Vliv vzdálenosti působíště hrotu AFM od povrchového receptoru***

Pomocí této citlivostní analýzy byl vyšetřován vliv vzdálenosti působíště hrotu AFM na povrchu buňky od uzlového bodu tensegritní struktury cytoskeletu. Materiálové konstanty byly použity stejné jako při předchozích analýzách, byly provedeny výpočty pro tři různé hodnoty počátečního přetvoření – 10%, 15% a 20% při konstantní hloubce vtlačení 2  $\mu\text{m}$ . Vzdálenost od centrálního receptoru byla měněna v rozsahu 0 - 4  $\mu\text{m}$  (přibližně polovina vzdálenosti k dalšímu receptoru. Z výsledků je patrné (viz. obr. 129) že se vzrůstající vzdáleností od receptoru dochází k významnému poklesu reakční síly v hrotu AFM, buňka je v oblasti mimo receptor poddajnější.

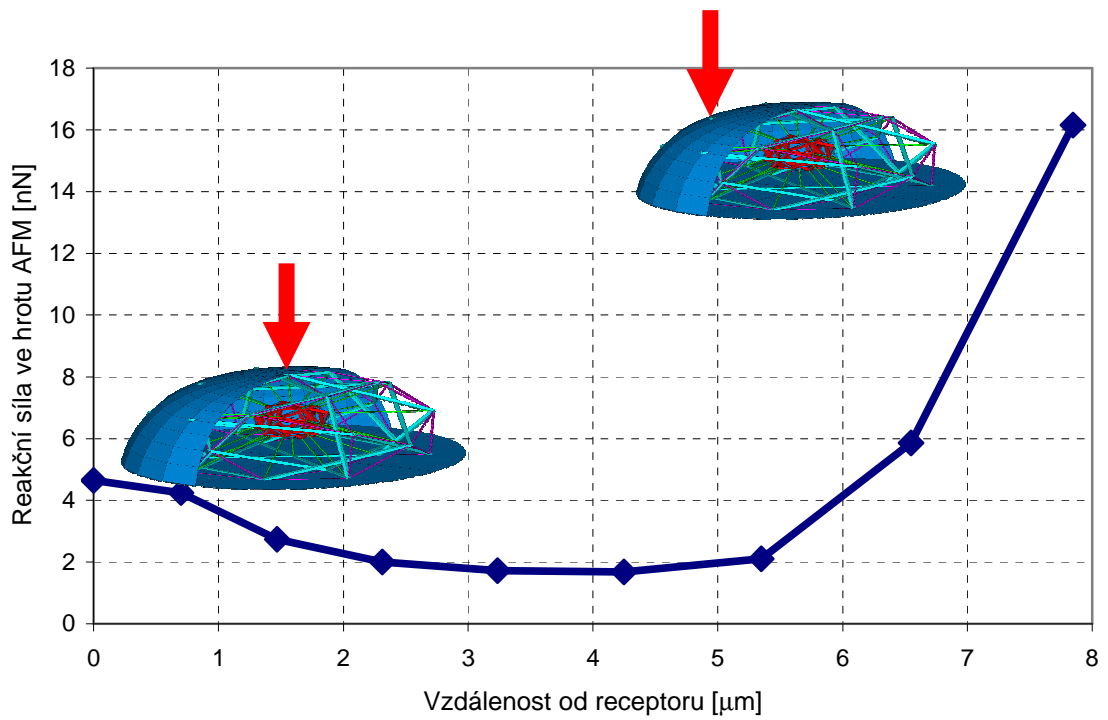
V případě, že se hrot AFM dále přibližuje k postrannímu receptoru, dochází k opětovnému nárůstu reakční síly až na přibližně čtyřnásobek hodnoty v centrálním receptoru (viz. obr. 130). Toto významné vyztužení v oblasti laterálního receptoru je nejspíše způsobeno nedokonalostí modelu, protože v tomto místě vzhledem ke geometrii modelu už hrot nepůsobí kolmo na membránu.

Výsledky této analýzy naznačují, že na vzdálenosti hrotu od receptoru může významně záviset výsledek vtlačovací zkoušky. To může být jednou z příčin poměrně velkého rozptylu experimentálních dat. Na obr. 131 jsou znázorněny experimentální křivky síla – hloubka vtlačení a křivky získané výpočtovou simulací vtlačování hrotu v oblasti centrálního receptoru a v oblasti mezi receptory.

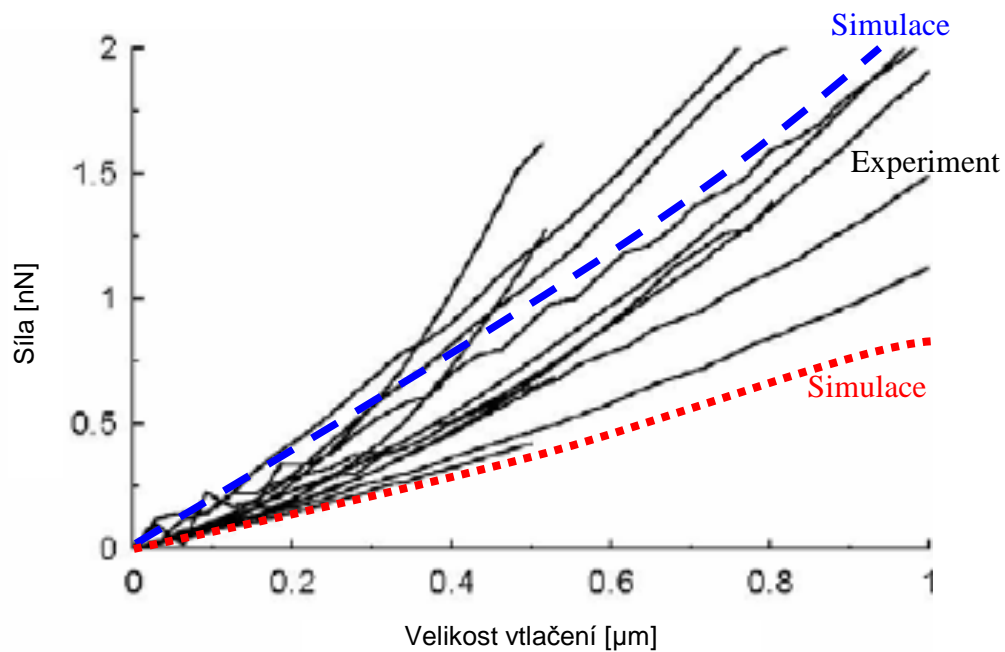


*obr. 129 Závislost mezi vzdáleností působíště hrotu AFM od povrchového receptoru na reakční sílu v hrotu AFM (popisy přeložit do češtiny)*





obr. 130 Závislost polohy působitě hrotu AFM mezi centrálním a laterálním receptorem



obr. 131 Porovnání experimentálních křivek síla – hloubka vtlačení a křivek získaných výpočtovou simulací v centrálním receptoru (modrá) a v oblasti mezi receptory (červená)

## 7 Diskuse výsledků disertační práce

### 7.1 SHRUTÍ HLAVNÍCH CÍLŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce bylo:

- Na základě dostupných informačních zdrojů z oblasti experimentálního vyšetřování a výpočtového modelování mechanického chování buněk **navrhnout a vytvořit výpočtový model buňky**, zahrnující z mechanického hlediska podstatné buněčné komponenty.
- Porovnat vlastnosti navrženého modelu s experimentálně získanými poznatky o mechanickém chování buněk.
- Využít a odladit vytvořený výpočtový model pro simulaci mechanických zkoušek buňky.
- Provést citlivostní analýzy vlivu jednotlivých parametrů modelu na výsledky výpočtových simulací za účelem posouzení jeho použitelnosti, případně k upřesnění jeho parametrů.

### 7.2 ZHODNOCENÍ ÚROVNĚ NAVRŽENÉHO VÝPOČTOVÉHO MODELU BUŇKY

Na základě podrobného rozboru literatury je navržený výpočtový model mechanického chování buňky založen na tensegritních strukturách, pomocí kterých je modelována z mechanického hlediska nejpodstatnější komponenta buňky – cytoskelet. Tensegritní model byl zvolen zejména z toho důvodu, že vzhledem k ostatním používaným modelům mechanického chování buňky dokáže poměrně dobře popsat většinu podstatných mechanických vlastností buněk. Z používaných modelů se jeví jako nejuniverzálnější, přitom je relativně jednoduchý, což je výhodou při řešení identifikačních úloh.

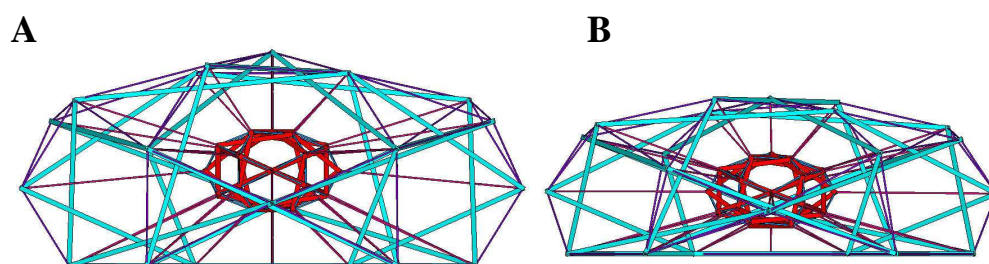
Ostatní prvky buněčné struktury jsou modelovány jako lineárně elastické kontinuum, zejména z důvodu udržení relativně malého počtu materiálových konstant. Pro použití složitějších konstitutivních modelů není k dispozici dostatek vstupních údajů a příliš velký počet neznámých materiálových parametrů by znemožňoval jejich identifikaci.

#### *Přednosti a výhody navrženého modelu*

- Strukturovanost – navržený výpočtový model obsahuje všechny z mechanického hlediska podstatné prvky buněčné struktury, lze tedy pomocí tohoto modelu vyšetřovat vliv různých buněčných komponent na celkové mechanické chování buňky, například výpočtově simulovat experimenty, při kterých dochází k určitému (např. chemickému) rozrušení některých složek vnitrobuněčné struktury (mikrotubulů, mikrofilament, apod.). Modelování prvků vnitrobuněčné struktury je také velice důležité při vyšetřování principu mechanotransdukce, protože na tomto procesu se podílí celá řada intracelulárních prvků.
- Propojení povrchu buňky s oblastí jádra pomocí prvků cytoskeletu – Bylo experimentálně prokázáno, že povrch buňky a jádra je mechanicky propojen [44]. Toto mechanické propojení může být jednou z možností, jak je mechanický signál přenášen z povrchu buňky do řídicího centra buňky – jádra, proto je důležité, aby mo-

del umožňoval tento přenos simulovat. To nesplňuje žádný z dosud publikovaných modelů.

- Možnost simulace mechanicky aktivních prvků cytoskeletu – je známo, téměř všechny druhy buněk dokáží pomocí mechanicky aktivního cytoskeletu generovat tahové napětí. Tyto tahové (kontraktilní) síly vznikají prostřednictvím spojování aktinových mikrofilament s proteinem myozinem, čímž vznikají tzv. aktinmyozinové kontraktilní motory. Funkci těchto kontraktilních motorů je možno v navrženém modelu jednoduše simulovat pomocí předepsání počátečního přetvoření do tahových prvků tensegritní struktury cytoskeletu, čímž lze dosáhnout kontrakce cytoskeletu (viz. obr. 132).



obr. 132 Tensegritní model cytoskeletu v relaxovaném stavu (A) a kontrahovaném stavu (B) při počátečním přetvoření 20%

- Použití jednoduchých konstitutivních modelů materiálového chování, které vzhledem k malému počtu parametrů usnadňují jejich identifikaci na základě výpočtového simulování experimentů.
- Složitější topologie tensegritního modelu cytoskeletu – navržený tensegritní model cytoskeletu, (vycházející z geometrie *icosidodecahedronu*) se skládá z poměrně velkého počtu diskrétních členů a povrchových mechanických receptorů v porovnání s ostatními publikovanými tensegritními modely buňky. Běžně používané šestivzpěrové tensegritní modely se skládají z 30ti diskrétních členů, zatímco navržený model jich obsahuje 210, což více odpovídá realitě, protože cytoskelet obsahuje mnohonásobně více jednotlivých filament.
- Možnost snadného vytvoření přilnutého i sférického tvaru modelu buňky, což je využitelné při výpočtovém simulování experimentů prováděných na těchto dvou základních geometrických tvarech buněk (např. tahová zkouška a vlačovací zkouška).
- Možnost odladění navrženého výpočtového modelu pro výpočtové simulování různých mechanických zkoušek, prováděných na buňkách – přestože v této práci byly provedeny výpočtové simulace pouze *vlačovací zkoušky* a zjednodušeně i *trakční cytometrie* a *magnetické pinzety*, je možné tento model odladit k výpočtovému simulování většiny zkoušek uvedených v kapitole 5. Pomocí tohoto modelu byly také prováděny výpočtové simulace tahové zkoušky, ale vzhledem k časové náročnosti a problémům s numerickou stabilitou výpočtů se nepodařilo ve stanoveném termínu dosáhnout publikovatelných výsledků.

### *Nedostatky a omezení navrženého modelu*

- Nedostatek vstupních údajů – Navržený výpočtový model se skládá z několika vnitrobuněčných komponent, pro které však nejsou k dispozici všechny potřebné informace o jejich materiálových vlastnostech. Je to způsobeno zejména jejich obtížnou měřitelností, variabilitou (jedná se o živou hmotu) a složitostí vnitrobuněčné struktury. Vstupní parametry buněčných komponent je nutné identifikovat na základě mechanických zkoušek celých buněk.
- Jednoduché konstitutivní modely – použité lineárně elastické homogenní izotropní konstitutivní modely představují významné zjednodušení oproti realitě. Protože vytvořený model by měl sloužit především k identifikaci materiálových vlastností buněk a jejich komponent, bylo nutné pro začátek zvolit co nejjednodušší konstitutivní model s co nejmenším počtem neznámých parametrů. Přesto model umožňuje simulovat některé nelineární odezvy buňky (např. deformační zpevnění).
- Nezahrnutí viskoelastickosti – je známo, že buňky a měkké tkáně obecně vykazují viskoelastické chování, v navrženém modelu však tyto vlastnosti nejsou zahrnuty ze dvou hlavních důvodů: ① při tvorbě a odlaďování modelu jsme měli k dispozici data z mechanických zkoušek, při kterých nebyly zaznamenávány časové závislosti veličin, chyběly tedy experimentální údaje, ② než bude možné pracovat se složitějšími konstitutivními modely, je nejprve nutné zvládnout identifikaci parametrů modelů jednodušších.
- Nemožnost modelovat časovou proměnnost cytoskeletu – cytoskelet není stabilní struktura, ale prochází neustálou dynamickou reorganizací v čase, např. některé mikrotubuly zanikají a současně vznikají nové, v závislosti na vnějším zatížení dochází k posilování výztužných vláken v místě zatížení atd. Modelování těchto jevů je zatím velice obtížné a přesahuje naše možnosti (software, čas).
- Numerická nestabilita výpočtu (např. při velkých přetvořeních) – provedené testovací výpočty byly charakteristické poměrně velkou numerickou nestabilitou výpočtů, což představuje významné omezení možností při výpočtových simulacích různých experimentů. Tato numerická nestabilita je způsobená především vlivem velkých deformací modelu (nepřípustné lokální deformace určitých elementů) a vlivem velkých rozdílů mezi moduly pružnosti jednotlivých komponent výpočtového modelu. Vzhledem k době trvání nelineárních výpočtů je hledání cest k jejímu překonání časově velmi náročné.
- Velký počet neznámých parametrů pro identifikační úlohy, nutnost simulovat více experimentů – i přes použití nejjednodušších konstitutivních modelů má navržený výpočtový model buňky příliš velký počet neznámých parametrů, které nelze identifikovat na základě výpočtové simulace pouze jednoho typu experimentu. Identifikaci by mohlo být možné uskutečnit na základě výpočtových simulací více různých mechanických zkoušek, provedených na jednom typu buňky.
- Neuvažování ztráty tvarové stability u tlakových prvků tensegritní struktury – u tlakových členů tensegritní struktury není uvažována ztrata tvarové stability (vybočení vzpěr). Tyto tlakové členy tensegritní struktury cytoskeletu modelují funkci mikrotubulů, u kterých podle některých experimentálních studií k tomuto jevu dochází. Při budoucích pracích na tomto modelu by tedy bylo vhodné toto vybočení uvažovat.

### 7.3 POROVNÁNÍ VLASTNOSTÍ MODELU S EXPERIMENTÁLNĚ ZÍSKANÝMI POZNATKY

Pro porovnání vlastností navrženého modelu buňky s experimentálně získanými poznatky z oblasti experimentálního vyšetřování mechanického chování buněk byly provedeny testovací výpočty. Tyto výpočty sloužily především k ověření, zda navržený model vykazuje takové mechanické chování, na základě kterého byl navržen.

Byly provedeny výpočty, sloužící k ověření správné funkčnosti tensegritního modelu cytoskeletu:

#### ***Předpět'ové zpevnění***

Cytoskelet buňky je v navrženém modelu považován za předepnutou strukturu. Jednou ze základních vlastností předepnutých struktur je proporcionální nárůst jejich tuhosti se vzrůstajícím předpětím. Tento efekt byl pozorován při mnoha experimentálních studiích, prováděných na různých typech buněk. Na základě výpočtu na tensegritním modelu cytoskeletu bylo ověřeno, že model toto chování vykazuje.

#### ***Deformační zpevnění***

Další vlastností tensegritních struktur, která byla pozorována i u většiny druhů buněk, je efekt deformačního zpevnění. U tensegritních struktur je tento efekt způsoben reorganizací diskretních členů ve směru působícího zatížení. Co tento efekt způsobuje u buněk, nebylo zatím prokazatelně zjištěno (u některých buněk tento jev pozorován nebyl). Na základě výpočtů bylo zjištěno, že navržený tensegritní model cytoskeletu vykazuje deformační zpevnění, které je způsobeno geometrickou nelinearitou (reorganizací diskretních prvků tensegritní struktury v důsledku velkých deformací při zatížení).

#### ***Efekt prostorově vzdáleného důsledku***

Jednou z podstatných vlastností tensegritních struktur je globální odezva na aplikované lokální zatížení – při mechanickém zatížení v určitém místě tensegritní struktury dochází prostřednictvím spojitě sítě tahových členů k přenosu tohoto zatížení na ostatní prvky struktury, dochází tedy k přenosu tohoto zatížení i do míst vzdálených od působiště (tzv. vzdálený důsledek - *action at the distance* [69]). Tento efekt byl u buněk experimentálně prokázán (viz. kap.5.2.5). Pro ověření existence této vlastnosti u navrženého modelu buňky byla provedena výpočtová simulace zkoušky *magnetickou pinzetou*. Na základě této simulace bylo zjištěno (viz. kap.6.5.3), že pokud v modelu buňky není zahrnut cytoskelet, zatížení v určitém bodě na povrchu buňky vyvolá pouze lokální odezvu, zatímco pokud je cytoskelet v modelu zahrnut, dochází k přenosu tohoto zatížení i do vzdálenějších oblastí buňky, což odpovídá experimentálně získaným poznatkům.

#### ***Vliv zploštěného tvaru na přenos zatížení u přilnuté buňky***

U přilnutých buněk je (podle teorie tensegritních modelů buněk) kontraktilní předpětí, které je generováno v mikrofilamentech, vyrovnáváno částečně mikrotubuly a částečně podložkou, ke které je buňka přilnuta. Poměr rozdělení přenášeného tlakového zatížení mezi mikrotubuly a podložkou přitom závisí na úrovni zploštění buňky. Čím více je buňka zploštělá, tím více tlakového zatížení je přenášeno na substrát (viz. kap.5.2.5).

Cílem tohoto testovacího výpočtu bylo ověřit, zda navržený výpočtový model vykazuje stejný typ závislosti mezi úrovní zploštění a podílem podložky a mikrotubulů na přenášeném tlakovém zatížení. Toto ověření bylo provedeno pomocí výpočtové simulace zkoušky trakční cytometrie. Bylo zjištěno, že při zploštění buňky v důsledku poklesu tuhosti mikrotubulů o dva řády došlo ke zvýšení trakčních sil v uzlech cytoskeletu ve styku s podložkou o 34%. Tento trend odpovídá experimentálně zjištěným poznatkům.

## 7.4 VYUŽITÍ MODELU PRO VÝPOČTOVÉ SIMULACE MECHANICKÝCH ZKOUŠEK

Jedním z hlavních cílů této práce je kromě návrhu a otestování výpočtového modelu mechanického chování buňky také aplikace tohoto modelu při výpočtovém simulování mechanických zkoušek. Byly vytvořeny dvě geometrické konfigurace výpočtového modelu – sférická a zploštělá, protože při mechanických zkouškách se nejčastěji využívá dvou základních tvarů buněk - sférický tvar (buňky kultivované v roztoku) a zploštělý (přilnutý) tvar (buňky kultivované na podložce).

S využitím zploštělého tvaru byla výpočtově simulována vtláčovací zkouška pomocí AFM. Cílem této simulace bylo ověřit použitelnost navrženého modelu a pokusit se přibližně stanovit parametry modelu na základě výsledků experimentu. Z výsledků výpočtových simulací vyplývá, že závislost reakční síly ve hrotu AFM na hloubce vtláčení řádově odpovídá průběhu naměřenému při experimentu [108] pro použité parametry modelu (materiálové konstanty). Ty byly částečně převzaty z literatury [106], kde však rovněž nebyly identifikovány, a částečně zvoleny (nejsou k dispozici potřebné údaje). Právě modifikací těchto parametrů vůči hodnotám z [106] bylo dosaženo shody výpočtové simulace s experimentem. Vzhledem k velkému počtu neznámých parametrů modelu však toto řešení nelze považovat za správné, protože není zaručena jeho jednoznačnost. Jednou z možností, jak tuto nejednoznačnost eliminovat může být provedení identifikace parametrů výpočtového modelu na základě výpočtových simulací více druhů mechanických zkoušek na stejném typu buněk.

V rámci ověřovacích výpočtů byly dále provedeny zjednodušené výpočtové simulace zkoušek *magnetickou pinzetou* a *trakční cytometrie*. Při výpočtové simulaci tahové zkoušky nebylo zatím dosaženo publikovatelných výsledků, hlavně z důvodu špatné numerické stability výpočtu a jeho časové náročnosti. Tahová zkouška byla tedy výpočtově simulována pouze v rámci testovací úlohy na zjednodušeném 2D nestrukturním modelu buňky, pomocí kterého byli identifikovány globální materiálové charakteristiky buňky (pro homogenní izotropní materiál) hladkého svalstva cévní stěny.

## 7.5 CITLIVOSTNÍ ANALÝZY

Na navrženém výpočtovém modelu byly provedeny celkem čtyři citlivostní analýzy, které vyšetřovaly vliv vstupních parametrů na výsledek výpočtové simulace vtláčovací zkoušky. Těmito vstupními parametry byly: moduly pružnosti jednotlivých komponent modelu buňky, Poissonovo číslo jednotlivých komponent modelu buňky, předpětí v tahových prvcích cytoskeletu a vzdálenost působíště hrotu AFM od povrchového receptoru buňky. Z provedených citlivostních analýz vyplývají tyto nejdůležitější závěry:

- Z materiálových konstant mají největší vliv na výsledek výpočtové simulace vtláčovací zkoušky změny modulu pružnosti membránového skeletu a tahových a tlakových prvků tensegritní struktury vnitřního skeletu (mikrofilament a mikrotubulů). Oproti tomu vliv tahových a tlakových členů skeletu jádra je zanedbatelný.
- Vliv Poissonova čísla jednotlivých komponent modelu buňky na výsledky výpočtové simulace je v porovnání s vlivem modulů pružnosti zanedbatelný.
- Se vzrůstajícím počátečním pretvořením (*prestrain*) v tahových prvcích cytoskeletu dochází ke zvyšování tuhosti buňky (nárůst reakční síly v hrotu AFM). Se vzrůstající hodnotou předpětí se jeho vliv na tuhost buňky zmenšuje.

- Se vzrůstající vzdáleností od receptoru dochází k významnému poklesu reakční síly v hrotu AFM, buňka je v oblasti mimo receptor poddajnější. Tato analýza naznačuje, že výsledek vtlačovací zkoušky může významně záviset na vzdálenosti hrotu od receptoru, což v publikovaných experimentech nebylo autory sledováno.

## 8 Závěr

Předložená disertační práce se zabývá řešením problémů z oblasti biomechaniky buňky, konkrétně návrhem a tvorbou výpočtového modelu mechanického chování buňky. Lze konstatovat, že prezentované výsledky jsou v souladu s cíli formulovanými v kapitole 3. Protože se jedná o první práci z oblasti biomechaniky buňky, řešené na Ústavu mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky na FSI VUT v Brně, byl při řešení vytyčených cílů kladen velký důraz především na podrobný rozbor dostupných informačních zdrojů z dané problematiky, zejména z oblasti experimentálního vyšetřování mechanických vlastností buněk a výpočtového modelování mechanického chování buněk. Z tohoto důvodu je teoretická část disertační práce poměrně rozsáhlá. Výsledný ucelený přehled problematiky experimentálního vyšetřování a výpočtového modelování mechanického chování buněk bude sloužit jako výchozí podklad pro další vědecké pracovníky, kteří se budou podílet na řešení problematiky biomechaniky buňky, proto tuto část považuji za jeden z hlavních přínosů disertační práce.

Výsledky, dosažené při tvorbě výpočtového modelu, jeho testování a odlaďování pro výpočtové simulace naznačují, že navržený strukturní model buňky s tensegritním modelem cytoskeletu vykazuje požadované charakteristiky mechanického chování v souladu s experimentálními poznatky, je vhodný pro simulování různých mechanických zkoušek a pravděpodobně i pro identifikaci materiálových vlastností jednotlivých buněčných komponent. Výpočtový model buňky srovnatelné úrovně dosud nebyl podle dostupných informací publikován, proto lze jeho vytvoření považovat za významný přínos i v mezinárodním měřítku.

Hlavním cílem budoucích prací by tedy mělo být odlaďování modelu pro výpočtové simulování většiny mechanických zkoušek a identifikace parametrů výpočtového modelu na základě výpočtových simulací více druhů mechanických zkoušek na stejném typu buněk. Dále by v budoucnu bylo vhodné pokusit se zakomponovat do modelu nelineární konstitutivní vztahy nebo viskoelasticitu (případně vytvořit vícefázový model), pro možnost přesnějšího simulování dynamických dějů s velkými rychlostmi deformace. Také by bylo vhodné pokusit se zahrnout do modelu efekt dynamické reorganizace cytoskeletu.



## 9 Literatura

- [1] Wolff Y.: *Das Gesetz der transformation der knochen*, Berlin 1892.
- [2] Glowacki J., Trepan E., Folkman J.: *Cell shape and phenotypic expression in chondracytes*, Proc Soc Exp Biol Med, 172: pp. 93-98, 1983.
- [3] Ben-Ze'ev A., Robinson G.S., Bucher N.L, Farmer S.R., *Cell – cell and cell – matrix interactions differentially regulate the expresion of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes*, Proc Natl Acad Sci USA,; 85: pp.2161-2165, 1988.
- [4] Ingber D.E., Folkman J.: *Mechanochemical switching between growth and diferentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix*, J Cell Biol; 109: pp. 317-330, 1989.
- [5] Opas M.: *Expression of the differentiated phenotype by epithelial cells in vitro is regulated by both biochemistry and mechanics of the substratum*, Dev Biol 131: pp.281-293, 1989.
- [6] Dike L., Chen C.S., Mrkish M., Tien J., Whitesides G.M., Ingber D.E.: *Geometric control of the switching between growth, apoptosi, and diferentiation during angiogenesis using micropatterned substrates*, In vitro Cell Dev Biol; 35: pp.441-448, 1999.
- [7] Lo C.M., Wang H.B., Demb M., Wang Y.L.: *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*, Biophys J; 79: pp. 144-152, 2000.
- [8] Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G., Ingber DE.: *Geometric control of cell life and death*, Science; 276: pp.1425-1428, 1997.
- [9] Korff T., Augustin HG.: *Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation*, J. Cell Biol; 143: pp.1341-1352, 1998.
- [10] Duncan R.L.: *Transduction of mechanical strain in bone*, ASGSB Bull;8: pp.49-62, 1995.
- [11] Grodzinsky A.J., Levenston M.E., Jin M., Frank E.H.: *Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces*, Annu Rev Biomed Eng.;2:pp. 691-713, 2000.
- [12] Traub O., Berk B.C.: *Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an. atheroprotective force*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18: pp. 667-685, 1998.
- [13] Zhu Ch., Bao G., Wang N.: *Cell Mechanics: Mechanical Response, Cell Adhesion, and Molecular Deformation*, Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 2, Pages 189-226, 2000.
- [14] Lehoux S., and Tedgui A.: *Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall*, Hypertension. 32: pp. 338–345, 1998.
- [15] 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.
- [16] Sedding D.G., Seay U., Fink L., Heil M., Kummer W., Tillmanns H., Braun-Dullaes RC.: *Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells*, Circulation, 108(5):616-22, 2003.

- [17] Sata M., Sugiura S., Yoshizumi M., Ouchi Y., Hirata Y., Nagai R.: *Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 21: pp.1733–1737, 2001.
- [18] Mayr M., Li C., Zou Y., Huemer U., Hu Y., Xu Q.: *Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases*, *FASEB J*, 14:pp. 261-270, 2000.
- [19] Ingber D.E.: *Mechanobiology and diseases of mechanotransduction*, *Ann. Med.* 35: pp. 564– 577, 2003.
- [20] Janiček P.: *Biomechanika člověka a biomateriálové inženýrství*, učební texty z připravované publikace
- [21] Masopust J.: *Patobiochemie buňky*, 2. lékařská fakulta UK, Praha 2003.
- [22] Grodzinsky A.J., Levenston M.E., Jin M, Frank E.H.: *Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces*, *Annu Rev Biomed Eng.*;2:691-713, 2000.
- [23] Dewey C.F. Jr, Bussolari S.R., Gimbrone M.A. Jr, Davies P.F.: *The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress*, *J Biomech Eng.*;103(3):177–185, 1981.
- [24] Seow C.Y., Pratusевич V.R., Ford L.E.: *Series-to-parallel transition in the filament lattice of airway smooth muscle*, *J.Appl. Physiol.* Vol.89, pp. 869-876, 2000.
- [25] Alenghat F.J., Ingber D.E.: *Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins*, *Science STKE.*;119, 2002.
- [26] Hayden H., Kamm D.R., Lee R.T.: *Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology*, *Am J Physiol Cell Physiol* 287: pp. C1–C11, 2004.
- [27] Daily B., Elson E.L., Zahalak G.L.: *Cell poking, determination of the elastic area compressibility modulus of the erythrocyte membrane*, *Biophys J* 45,671-682. 1984
- [28] Kamm D.R., Mofrad R. K.: *Cytoskeletal mechanics*, Book, Cambridge University Press, 2006.
- [29] Mahaffy R. E., Park S., Gerde E., Kas J., Shih C.K.: *Quantitative analysis of the viscoelastic properties in thin regions of fibroblasts using AFM*, *Biophys.J.* 86, 1777-1793, 2004.
- [30] Holzapfel G.A., Ogden R.W.: *Mechanics of biological tissue*, Book, Springer, Berlin 2006.
- [31] Lehenkari P.P., Charras G.T., Nesbitt S.A., Horton M.A.: *New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells*, *Expert Rev Mol Med.*, Mar 08; pp. 1-19, 2000.
- [32] Zhang X., Chen A., De Leon D., Li H., Noiri E., Moy V.T., Goligorsky M.S.: *Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, January 1; vol. 286(1): pp. 359 – 367, 2004.
- [33] Samuel C., *Atomic force microscopy used to determine the Young's modulus of vascular smooth muscle cells*, Thesis, 2002.

- [34] Berdyyeva T. K., Woodworth C.D., Sokolov I.: *Human epithelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: direct measurements*, Phys. Med. Biol., vol. 50: pp. 81-92, 2005.
- [35] Rotsch C., Jacobson K., and Radmacher M.: *Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy*, Proc Natl Acad Sci USA 96, pp. 921-926, 1999.
- [36] Radmacher M., Fritz M., Kacher C.M., Cleveland J.P., Hansma P.K.: *Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope*, Biophys J. Jan;vol. 70(1): pp. 556-67, 1996.
- [37] Glerum J.J., Van Mastrigt R., Van Koeveringe A. J.: *Mechanical properties of mammalian single smooth muscle cells. III. Passive properties of pig detrusor and human a terme uterus cells*, J. Muscle Res. Cell Motil. 11:453– 462, 1990.
- [38] Miyazaki H., Hasegawa Y., Hayashi K.: *A newly designed tensile tester for cells and its application to fibroblasts*, Journal of Biomechanics, Volume 33, Issue 1, Pages 97-104, 2000.
- [39] Miyazaki H., Hayashi K., Hasegawa Y.: *Tensile properties of fibroblasts and vascular smooth muscle cells*, Biorheology, Vol. 40, No. 1-3, pp. 207-212, 2003.
- [40] Mitchison J. M., Swann M.: *The mechanical properties of the cell surface I. The cell elastimeter*, J. Exp. Biol 31, 443-460, 1954.
- [41] Bao G., Suresh S.: *Cell and molecular mechanics of biological material*, Nat Mater. Nov;2(11): pp. 715-25, 2003.
- [42] Butler J.P., Tolic-Nørrelykke I.M., Fabry B., Fredberg J.J.: *Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings*, Am J Physiol Cell Physiol 282: C595–C605, 2002.
- [43] Dalby M.J., Riehle M.O., Gadegaard N., Sutherland D., Curtis A.S.G., Wilkinson C.D.W.: *Evidence for "self-induced" mechanotransduction in human fibroblasts cultured on nanotopography*, Centre for Cell Engineering, IBLS, University of Glasgow, UK, 2004.
- [44] Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D. E.: *Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,pp. 849-854, 1997.
- [45] Alenghat F.J., S.M. Nauli, R. Kolb, J. Zhou, and D.E. Ingber,: *Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells*, Exp. Cell Res. Nov 15;301(1): pp. 23-30, 2004.
- [46] Ingber, D. E.: *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*, FASEB J. 20, 811–827, 2006.
- [47] Janmey P.A.: *The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling*, Physiol. Rev. 78: 763–781, 1998.
- [48] Trojan S.: *Lékařská fyziologie*, Grada Avicenum, Praha, 1996.
- [49] Wang N., Butler J.P., Ingber D.E.: *Mechanotransduction across the cell surface and through*, The cytoskeleton, Vol. 260, pp. 1124-1127, 1993.

- [50] Bausch A.R., Ziemann F.A., Boulbitch A., K. Jacobson, E. Sackmann.: *Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell membranes by magnetic bead microrheometry*, Biophys. J. 75: pp. 2038–2049, 1998.
- [51] Hénon S., Lenormand G., Richert A., Gallet F.: *A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers*, Biophys. J. ;76(2):1145–1151, 1999.
- [52] Dao M., Lim C.T., Suresh S.: *Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers*, J. Mech. Phys. Solids. Vol.51 :pp. 2259–2280, 2003.
- [53] Guck J., Ananthakrishnan R., Mahmood H., Moon T.J., Cunningham C.C., Kas J.: *The optical stretcher: A novel laser tool to micromanipulate cells*, Biophysical Journal;vol. 81: pp. 767–84, 2001.
- [54] Petersen N.O., McConnaughey W.B., Elson E.L.: *Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin B*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79(17):pp. 5327-31, 1982.
- [55] Braet F. et al.: *Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages*, J Microsc 190, pp. 328-338, 1998.
- [56] Wu H.W., Kuhn T., Moy V.T.: *Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking*, Scanning 20,pp. 389-397, 1998.
- [57] Thoumine O., Ott A.: *Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation*, J. Cell Sci. Vol. 110, pp. 2109–2116, 1997.
- [58] Charras G.T., Horton M.A.: *Determination of Cellular Strains by Combined Atomic Force Microscopy and Finite Element Modeling*, Biophys. J., August 1,;vol. 83(2): pp.858 – 879, 2002.
- [59] Mijailovich S.M., Kojic M.: Zivkovic M., Fabry B., Fredberg J.J.: *A finite element model of cell deformation during magnetic beadtwisting*, J Appl Physiol vol. 93: pp. 1429–1436, 2002.
- [60] Karcher H., J. Lammerding, H. Huang, R. T. Lee, R. D. Kamm, M. R. Kaazempur-Mofrad: *A Three-Dimensional Viscoelastic Model for Cell Deformation with Experimental Verification*, Biophys. J., November 1; vol. 85(5): pp. 3336 - 3349, 2003.
- [61] Baaijens F., Trickey W., Laursen T., Guilak F.: *Large Deformation Finite Element Analysis of Micropipette Aspiration to Determine the Mechanical Properties of the Chondrocyte*, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 33, No. 4, pp. 492–499, 2005.
- [62] Trickey W., F. Baaijens, T. Laursen, L. Alexopoulos, F. Guilak: *Determination of the Poisson's ratio of the cell: Recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration*, J. Biomech. (Submitted), 2004.
- [63] Ananthakrishnan R., J. Guck, F. Wottawah, S. Schinkinger, B. Lincoln, M. Romeyke, J. Käs: *Modelling the structural response of an eukaryotic cell in the optical stretcher*, Current Science, 88(9), 1434, 2005.

- [64] Ingber D.E., Jamieson J.: *Cells as tensegrity structures. Architectural regulation of histodiferentiation by physical forces transduced over basement membrane. p 13 in Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation.* Anderson LL, Gahmberg CG, Kblom PE, eds., Academic Press, New York, 1985.
- [65] Gómez J.V.: *Tensegrity Structures and their Application to Architecture*, Master's thesis, Belfast, Northern Ireland: Queen's University, School of Architecture, 2004.
- [66] Pugh A.: *An Introduction to Tensegrity*, Berkeley, California: University of California Press, 1976, p. 3
- [67] Motro R.: *Tensegrity: Structural Systems for the Future*, London: Kogan Page Science, 2003.
- [68] Fuller R.B.: *Tensegrity*, Portfolio Artnews Annu. 4: 112-127, 1961.
- [69] Ingber D.E.: *Cellular Tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton*, J. Cell Sci., 104:pp. 613-627, 1993.
- [70] Ingber D.E.: *The Architecture of Life*, Scientific American , 278:pp. 48-57, 1998.
- [71] Yanagida T.: Nakase M., Nishiyama K., Oosawa F.: *Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin*, Nature, 307,pp. 58–60, 1984.
- [72] Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J.: *Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape*, J. Cell Biol 120, pp. 923-934, 1993.
- [73] MacKintosh F., Käs J., Janmey P.: *Elasticity of semiflexible biopolymer networks*, Phys. Rev. Lett. 75, pp. 4425–4428, 1995.
- [74] Kurachi M., Hoshi M., Tashiro H.: *Buckling of single microtubule by optical trapping forces: direct measurement of microtubule rigidity*, Cell Motil Cytoskeleton 30: pp. 221–228, 1995.
- [75] Kaech S., Ludin B., Matus A.: *Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins*, Neuron 17, pp. 1189–1199, 1997.
- [76] Satcher R.L. jr, Dewey C.F. jr, Hartwig J.H.: *Mechanical Remodeling of the Endothelial Surface and Actin Cytoskeleton Induced by Fluid Flow*, Microcirculation; 4: pp.439-453, 1997.
- [77] Harris A.K., Wild P., Stopak D.: *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*, Science;208(4440): pp. 177–179, 1980
- [78] Pelham R. J. jr, Wang Y.: *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility*, Proc Natl Acad Sci U S A. ;94(25):pp.13661–13665. 1997.
- [79] Sims J. R., Karp S., Ingber D.E.: *Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape*, J. Cell Sci. 103: 1215-1222, 1992.
- [80] Waterman-Storer C.M., Salmon E.D.: *Actomyosin-based Retrograde Flow of Microtubules in the Lamella of Migrating Epithelial Cells Influences Microtubule Dynamic Instability and Turnover and Is Associated with Microtubule Breakage and Treadmilling*, J. Cell Biol. 139: pp. 417-434, 1997.
- [81] Wang N., Naruse K., et al.: *Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model*, Proc Natl Acad Sci U S A 98(14): 7765-70, 2001.

- [82] Heidemann S.R., Kaech S., Buxbaum R.E., Matus A.: *Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts*, J. Cell Biol. 145: pp. 109-122, 1999.
- [83] Ingber D.E., Heidemann S.R., Lamoureux P., Buxbaum R.E.: *Opposing views on tensegrity as a structural framework for understanding cell mechanics*, J Appl Physiol vol. 89: pp. 1663-1678, 2000.
- [84] Sato M., Theret D.P., Wheeler L.T., Ohshima N., Nerem R.M.: *Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties*, J. biomech. Eng.: 263-8,1990.
- [85] Alcaraz J., Buscemi L., Grabulosa M., Trepas X., Fabry B., Farre R., Navajas D.: *Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy*, Biophys. J., 84(3): 2071 – 2079, 2003.
- [86] Stamenovic D., Fredberg J., Wang N., Butler J., Ingber D.E.: *A microstructural approach to cytoskeletal mechanics based on tensegrity*, J. Theor. Biol; 181: pp.125-136, 1996.
- [87] Coughlin M.F., Stamenovic D., *A tensegrity model of the cytoskeleton in spread and round cells*, ASME J Biomech Eng 120: pp.770-777, 1998.
- [88] Fabry B., Maksym G.N., Hubmayr R.D., Butler J.P., Fredberg J.J.: *Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 194: pp.120-125, 1999.
- [89] Fabry B., Maksym G.N., Butler J.P., Glogauer M., Navajas D., Fredberg J.J.: *Scaling the microrheology of living cells*, Phys Rev Lett 87:148102, 2001.
- [90] Volokh K.Y., Vilnay O., Belsky M.: *Tensegrity architecture explains linear stiffening and predicts softening of living cells*, Journal of Biomechanics, Vol.33, No.12, pp.1543-1549, 2000.
- [91] Wang N., Ingber D.E.: *Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension*, Biophys J.; 66: pp.2181–2189, 1994.
- [92] Cai S. et al.: *Regulation of cytoskeletal mechanics and cell growth by myosin light chain phosphorylation*, Am. J. Phys. 275, pp. 1349–1356, 1998.
- [93] Wang N., Tolic-Nørrelykke I.M., Chen J., Mijailovic S.M., Butler J.P., Fredberg J.J., Stamenovic D.: *Cell prestress I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells*. Am J Physiol Cell Physiol 282: pp. 606–616, 2002.
- [94] Shaohua H., Chen J., Fabry B., Numaguchi Y., Gouldstone A., Ingber D.E., Fredberg J.J., Butler J.P., Wang N.: *Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells*, Am J Physiol Cell Physiol 285: pp.1082–1090, 2003.
- [95] Stamenovic D., Ingber D.E.: *Models of Cytoskeletal Mechanics of Adherent Cells*, Biomechan Model Mechanobiol.: pp.95-108, 2002.
- [96] Helmke B.P., Rosen A.B., Davies P.F.: *Mapping mechanical strain of an endogenous cytoskeletal network in living endothelial cells*, Biophys. J. 84: pp.2691-2699, 2003.

- [97] Stamenovic D., Wang N., Tolic-Nørrelykke I.M., Chen J., Mijailovic S.M.: *Cell prestress. II. Contribution of microtubules*, Am J Physiol Cell Physiol 282: pp.617–624, 2002.
- [98] Hu S., Chen J., Wang N.: *Cell spreading controls balance of prestress by microtubules and extracellular matrix*, Front. Biosci., 9: pp.2177-2182, 2004.
- [99] Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., A. Maniotis, D. Ingber, A. Merckling, F. Langa, M. Aumailley, A. Delouvee, V. Koteliansky, C. Babinet. T. Krieg: *Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts*, J. Cell Sci.; 111(13): pp.1897 – 1907, 1998.
- [100] Brodland G.W., Gordon R.: *Intermediate filaments may prevent buckling of compressively loaded microtubules*, ASME J Biomech Eng 112: 319-321, 1990.
- [101] Tracqui P., Promayon E., Sauvaget T., Norris V., Martiel J.L.: *Tensegrity and oscillations : exploring some constitutive and emergent features of virtual cell models*, “Cours du séminaire " Modelling and simulation of biological processes in the context of genomics“ Autrans 2002, pp. 203-221, 2002.
- [102] Ingber D.E.: *Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology*, J. of Cell Science, Vol. 116, No.7, pp. 1157-1173, 2000.
- [103] Stamenović D., Coughlin M. F.: *A quantitative model of cellular elasticity based on tensegrity*, ASME J. Biomech.Eng. vol. 122: pp. 39–43, 2000.
- [104] Wang N. Stamenović D.: *Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth*, Am J Physiol, Cell Physiol vol. 279: pp. C188–C194, 2000.
- [105] Sultan C., Stamenovic D., Ingber D.E.: *A Computational Tensegrity Model Predicts Dynamic Rheological Behaviors in Living Cells*, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 32, No. 4, pp. 520–530, 2004.
- [106] McGarry J.G., Prendergast P.J.: *A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell*, European cells and Materials: pp.27-34, 2004.
- [107] Burša J.: *Výpočtové modelování problémů mechaniky živých a neživých těles z kompozitních materiálů umožňujících velké deformace*. Habilitační práce, VUT v Brně, 2005.
- [108] Van Lith R., Coaches: Snoecky L.H.E.H., Hayashi K., Miyazaki H., Bouten C.V.C.: *Force mapping of vascular smooth muscle cells with Atomic Force Microscopy: influence of norepinephrine on local stiffness distribution*, BMTE04.30., Internal Report. ISBN, 2004.

#### *Vlastní publikace*

- [109] Burša J., Ryšavý P., Lebiš R.: *Stress-Strain Analysis in Anastomoses of Arteries with Vascular Grafts*, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Sydney, Australia, August 2003.
- [110] Lebiš R., Burša J., Hayashi K.: *Constitutive model of vascular smooth muscle cells determined using computational simulation*, Engineering Mechanics 2004, Svatka, pp.167-168, 2004.

- [111] Ryšavý P., Burša J., Lebiš R.: *Stress-strain analysis of surgical connection between two aortic parts with different geometry*, Engineering Mechanics 2004, Svatka, pp.259-260, 2004.
- [112] Lebiš R., Burša J., Janíček P.: *Possibilities of FE Computational Simulation of Indentation Test of Isolated Cells*, 7th International Scientific Conference Applied Mechanics 2005, Hrotovice, p. 65,2005.
- [113] *Lebiš R., Burša J.: Influence of cell components' stiffness on the results of the indentation test*, Engineering Mechanics 2005, Svatka, pp.195-196, 2005
- [114] Burša J., Janíček P., Lebiš R.: *Computational modelling of smooth muscle cells*, Engineering Mechanics 2005, Svatka, květen 2005.
- [115] Burša J., Lebiš R. and Ryšavý P.: *Computational modelling of behaviour of soft biological tissues*, IFMBE Proceedings (3rd European Medical and Biological Engineering Conference EMBEC'05), Prague, pp. 1538-1543, 2005.
- [116] Lebiš R., Burša J.: *Computational modeling of mechanical behaviour of cell*, Engineering Mechanics 2006, Svatka, pp.195-196, 2006.
- [117] Lebiš R., Burša J.: *Tensegrity FE models of mechanical tests of individual cells*, 5th World Congress of Biomechanics, Munich, Germany, 2006.
- [118] Lebiš R., Burša J.: *Double tensegrity FE model of cell used in simulation its indentation test*, Human biomechanics 2006, Hrotovice, pp. 138-139, 2006.
- [119] Burša J. Lebiš R., Janíček P.: *FE models of stress-strain states in vascular smooth muscle cell*. Technology and Health Care, Vol. 14, No. 4,5, , pp. 311-320, 2006.

#### *Webové stránky*

- [120] <http://www.uni-leipzig.de/~pwm/kas/afm/AFM.html>
- [121] [http://en.wikipedia.org/wiki/Optical\\_tweezers](http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_tweezers)
- [122] <http://www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm>
- [123] Vondrejs V., Tensegrity ve vědě, technice a umění  
<http://giboda.aodesign.de/Cdpresent/Vondrejsz.html>
- [124] <http://www.intergate.com/~bobwb/ts/prospect/prospect.htm#sec:intro>
- [125] <http://www.childrenshospital.org/>