



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

ANALÝZA MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ NATIVNÍCH BUNĚK

An analysis of mechanical properties of native cells

Diplomová práce

Autor: Bc. Veronika Řeháková

Studijní program: BIOMECHANIKA A LÉKAŘSKÉ PŘÍSTROJE

Vedoucí práce: Ing. Josef Šepitka Ph.D.

Praha 2018



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Řeháková** Jméno: **Veronika** Osobní číslo: **405386**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Strojní inženýrství**
Studijní obor: **Biomechanika a lékařské přístroje**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Analyza mechanických vlastností nativních buněk

Název diplomové práce anglicky:

An analysis of mechanical properties of native cells

Pokyny pro vypracování:

1. Provést rešerši na téma experimentální metody měření mechanických vlastností buněk
2. Provést experimentální měření mechanických vlastností živých buněk
3. Aplikovat vhodný model pro analýzu mechanických vlastností buněk
4. Srovnání mechanických vlastností buněk vypěstovaných na různých substrátech

Seznam doporučené literatury:

- H. Hertz, Über die Berührung fester elastischer Körper, Journal für die reine und angewandte Mathematik 92, 156-171 (1881)
A. C. Fischer-Cripps, Nanoindentation, 2nd ed. New York: Springer, 2004.
A. Overbeck, S Guenther, I Kampen, A. Kwade, Compression Testing and Modeling of Spherical Cells-Comparison of Yeast and Algae, Chem, Eng. Technol. vol 40, pp. 1158-1164, 2017

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:


Ing. Josef Šepitka, Ph.D., FS, ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

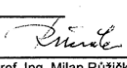
Jméno a pracoviště druhého(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **21.04.2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **17.08.2018**

Platnost zadání diplomové práce:


Ing. Josef Šepitka, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce


prof. Ing. Milan Růžička, CSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

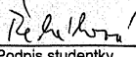

prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomantka bere na vědomí, že je povinna vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

30.4.2018

Datum převzetí zadání


Podpis studentky

Anotační list

Jméno autora: Bc. Veronika Řeháková

Název DP: Analýza mechanických vlastností nativních buněk

Anglický název: An analysis of mechanical properties of native cells

Rok: 2018

Obor studia: Biomechanika a lékařské přístroje

Ústav/odbor: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Vedoucí: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jaroslav Lukeš, Ph.D.

<i>Bibliografické údaje:</i>	počet stran:	64
	počet obrázků:	32
	počet tabulek:	04
	počet příloh:	00

Klíčová slova:

Modul pružnosti, osteoblasty, instrumentovaná nanoindentace, titanové nanotrubičky, výška buňky

Keywords:

Elastic modulus, osteoblasts, instrumented nanoindentation, titanium nanotubes, height of the cell

Anotace:

Tato práce se zabývá měřením mechanických vlastností živých buněk pomocí instrumentované nanoindentace. Je zjišťováno, zda je pomocí instrumentované nanoindentace možné určit, jak ovlivní modifikace povrchu mechanické vlastnosti buněk. V experimentu jsou testovány lidské osteoblasty vypěstované na titanu s různě modifikovaným povrchem. Vlastnosti buněk vypěstovaných na titanových nanotrubičkách jsou porovnávány s vlastnostmi buněk vypěstovaných na leštěném titanu. Z indentační křivky je určen modul pružnosti buňky podle podobné metodiky, jež se užívá při vyhodnocení indentace prováděné pomocí AFM. Z indentační křivky je také určena výška buňky před deformací. Podle získaných výsledků je pak možné hodnotit, jaká modifikace povrchu je vhodnější z hlediska osteointegrace.

Abstract:

Measurement of mechanical properties of live cells by instrumented nanoindentation is performed in this study. We investigate if the effect of surface modification on mechanical properties of the cells can be measured with instrumented nanoindentation. Live osteoblasts tested in the experiment were cultured on titanium with different surface modifications. Properties of the cells cultured on titanium nanotubes are compared with the properties of the cells cultured on polished titanium. Elastic modulus of the cell is determined from the indentation curve by the similar method that is being used for evaluation of data obtained from the indentation performed by AFM. Height of the cell is also determined from the indentation curve. The most convenient surface modification in terms of the osseointegration can be chosen according to the results.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne 8.6.2018

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce Ing. Josefu Šepitkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a věnovaný čas. Poděkování patří také Ing. Jaroslavu Lukešovi, Ph.D. a prof. RNDr. Mateji Danielovi, Ph.D. za obohacující konzultace. Nemohu opomenout svou nejbližší rodinu, která mě podporovala během celého mého studia, a tímto bych jim chtěla také poděkovat.

Obsah

Anotační list	1
Seznam použitých symbolů.....	7
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Stavba buněk	9
2.2 Experimentální metody pro analýzu mechanických vlastností buněk	12
2.3 AFM.....	16
2.3.1 Analýza mechanických vlastností buněk pomocí AFM.....	17
2.4 Instrumentovaná nanoindentace	20
2.4.1 Nanoindentace buněk	23
2.5 Analytické modely	27
2.5.1 Hertzův model.....	27
2.5.2 Model podle Olivera a Pharra.....	28
2.5.3 Modely založené na teorii skořepin	29
3 Cíle práce.....	33
4 Metody	34
4.1 Příprava vzorků	34
4.2 Použité přístroje.....	37
4.3 Postup měření.....	38
4.4 Analýza dat.....	40
5 Výsledky	47
6 Diskuze	50
6.1 Interpretace výsledků.....	50

6.2	Důležité kroky a vlivy.....	54
7	Závěr.....	58
8	Použitá literatura	60

Seznam použitých symbolů

Symbol	Legenda	Jednotka
A	Kontaktní plocha při maximálním zatížení	$[m^2]$
a	Poloměr kontaktní plochy	$[m]$
α	Úhel	$[^\circ]$
D	Průměr	$[m]$
d	Ohyb raménka AFM mikroskopu	$[m]$
δ	Vertikální posuv hrotu	$[m]$
E	Youngův modul pružnosti	$[Pa]$
ε	Poměrná deformace	$[-]$
F	Síla zatěžování	$[N]$
f	Frekvence	$[Hz]$
Φ	Fázový posun	$[^\circ]$
H	Tvrдость	$[N \cdot m^{-2}]$
h	Výška buňky	$[m]$
k	Koeficient tuhosti raménka AFM mikroskopu	$[N \cdot m^{-1}]$
m	Konstanta geometrie hrotu	$[-]$
ν	Poissonova konstanta	$[-]$
p	Tlak	$[Pa]$
R	Poloměr	$[m]$
S	Tuhost	$[N \cdot m^{-1}]$
σ	Napětí	$[Pa]$
t	Tloušťka membrány	$[m]$
V	Objem	$[m^3]$
z	Vertikální posuv raménka AFM mikroskopu	$[m]$

1 Úvod

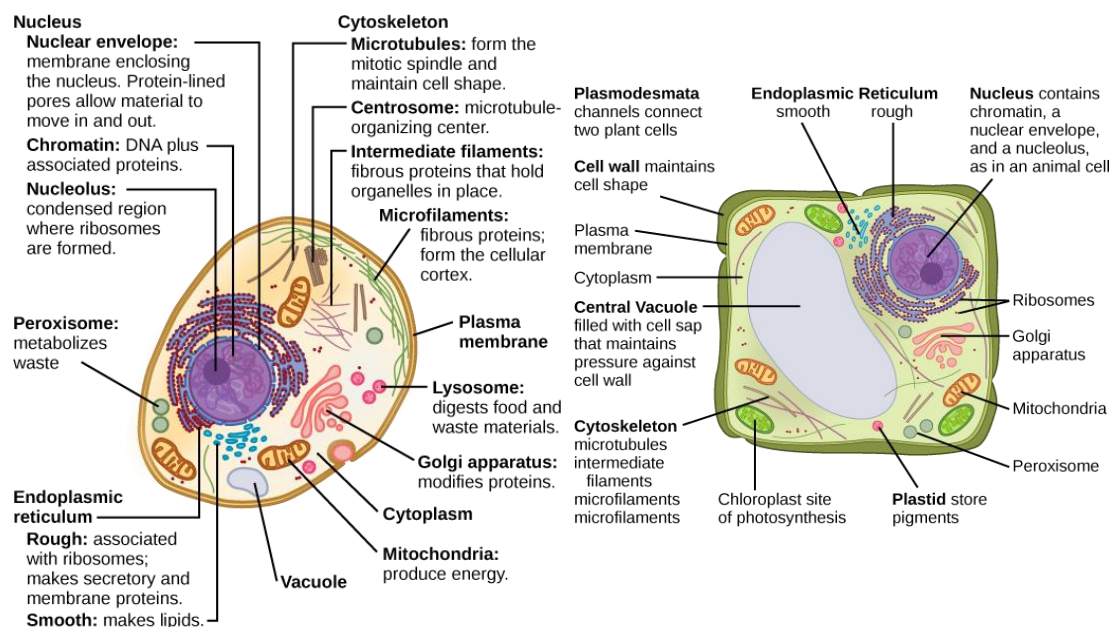
Buňka je základní stavební jednotkou všech živých organismů a tedy i člověka. V lidském těle se vyskytuje velké množství různých druhů buněk, které se liší svou funkcí a svými vlastnostmi. Pro zdraví člověka a pro správné fungování všech jeho orgánů je důležitá správná funkce jednotlivých buněk. Funkce buněk může být ovlivněna řadou vlivů. Kromě chemických látek má na správné fungování buňky také velmi významný vliv její mechanické namáhání, jak dokazuje ve svých experimentech například Ingber. [1] Je mnoho vlivů, které mohou ovlivnit funkci buněk, ještě však není zdaleka známo, jak přesně buňka z mechanického hlediska funguje. Proto se v současné době stále více prací zabývá mechanotransdukci a zkoumáním různých vlivů na mechanické vlastnosti buněk.[2] Mechanické vlastnosti jednotlivých struktur, ze kterých je buňka složena, pak udávají celkové mechanické vlastnosti buňky jako biologického kompozitního materiálu. Během života buněk se navíc jejich mechanické vlastnosti mohou měnit.[3] Nejen stáří buňky má vliv na její mechanické vlastnosti ale i prostředí ve kterém žijí. Dokonce je možné podle mechanických vlastností buněk rozpoznat, zda jsou zdravé či nemocné. V současnosti nejoblíbenější metodou pro měření mechanických vlastností buněk je AFM mikroskopie, která je již natolik rozšířená, že by mohla sloužit jako diagnostická metoda. Poměrně mnoho publikací se zabývá identifikací rakovinných buněk, jejichž modul pružnosti se liší od modulu pružnosti zdravých buněk stejného typu. [4] AFM mikroskopie však není jedinou metodou, která umožňuje měřit mechanické vlastnosti buněk. Již bylo také publikováno několik měření mechanických vlastností buněk pomocí instrumentované nanoindentace, která sice není tak citlivá jako AFM mikroskopie, ale zato je vhodnější pro určování mechanických vlastností celého objemu buňky.[5]

Tato práce se zabývá měřením mechanických vlastností živých buněk pomocí instrumentované nanoindentace. Je zjišťováno, zda je pomocí instrumentované nanoindentace možné určit, jak ovlivní modifikace povrchu, na kterém byly buňky vypěstovány, jejich mechanické vlastnosti. V experimentu jsou testovány lidské osteoblasty vypěstované na různě modifikovaném titanu. Vystává tak domněnka, že výsledek měření by pak mohl být použit jako jedno z kritérií zvažovaných při rozhodování, který typ titanového povrchu je vhodnější pro kostní implantáty.

2 Teoretická část

2.1 Stavba buněk

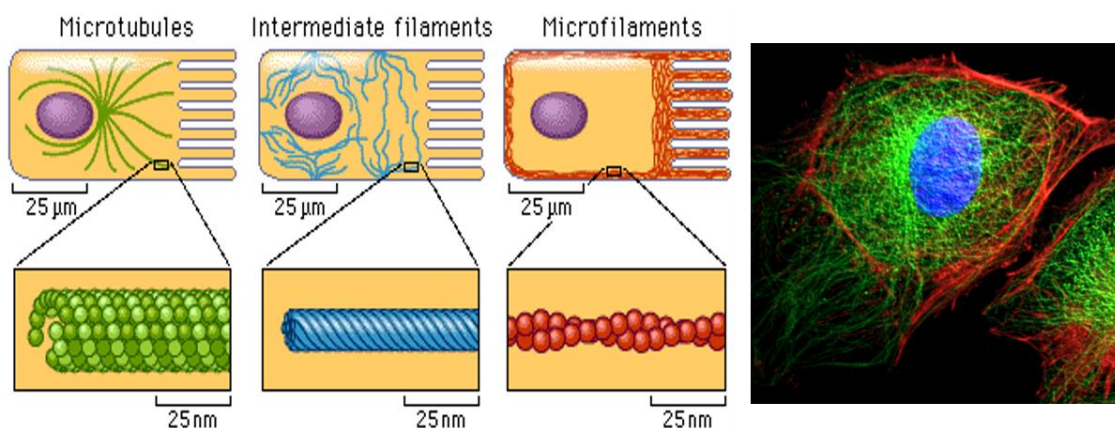
Buňka je základní stavební jednotkou organismu. Buňky se dají rozdělit na prokaryotické buňky (jednobuněčné organismy bez ohraničeného jádra) a evolučně mladší eukaryotické buňky. Do skupiny eukaryot patří buňky živočišné, rostlinné a buňky hub. Průměrná velikost rostlinné buňky bývá v rozmezí $10-100\mu m$, živočišné buňky pak kolem $10-20\mu m$. [6]



Obr. 1: Schéma živočišné buňky (vlevo) a rostlinné buňky (vpravo). [7]

Eukaryotická buňka obsahuje jádro, cytoplazmu, membránou oddělené organely, cytoskelet a buněčné inkluze. (Obr. 1) Na rozdíl od prokaryotické má eukaryotická buňka jádro ohraničené jadernou membránou. Jádro obsahuje molekuly DNA a RNA, uchovává tedy genetickou informaci a řídí činnost všech cytoplazmatických struktur. Je to největší buněčná organela (průměrně $4-30\mu m$), obsahuje také jadérko, chromatin, buněčnou šťávu a má i vlastní nukleoskelet. Kolem jádra se rozprostírá endoplazmatické retikulum ER. Drsné ER je pokryto ribozomy, které jsou místem syntézy proteinů. Hladké ER je místem syntézy lipidů. Důležitou semiautonorní organelou je mitochondrie, která zajišťuje buněčné dýchání, spojené s rozkladem glukózy na CO_2 a H_2O za vzniku ATP, zdroje energie pro všechny buněčné procesy. Rostlinné buňky obsahují navíc plastidy.

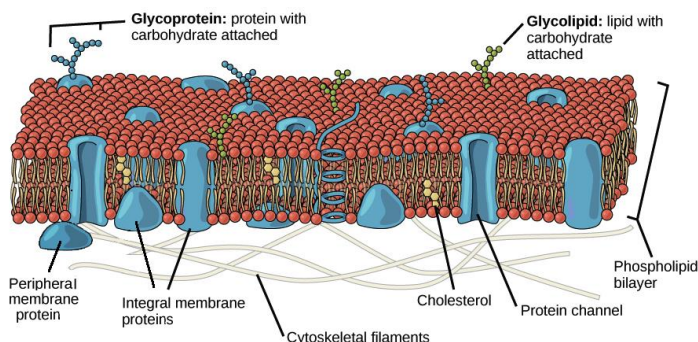
Nejvýznamnější jsou chloroplasty s chlorofylem, v kterých probíhá fotosyntéza. Prostedím pro všechny buněčné organely a pro průběh reakcí je cytoplazma tvořená až z 80% vodou. V cytoplazmě se nacházejí další organely: Golgiho aparát, lysozomy, peroxizomy a vakuola, která může zaujmout až 80% celkového objemu především rostlinné buňky, kde funguje jako zásobárna vody.[6]



Obr. 2: Cytoskelet tvoří mikrotubuly, intermediální filameny a mikrofilameny. Vpravo snímek pořízený fluorescenčním mikroskopem, modře jádro, zeleně tubulin, červeně aktin. [8]

Z hlediska mechanických vlastností buňky je důležitý cytoskelet. Je to síť trubicovitých a vláknitých útvarů. Poskytuje oporu, udává tvar buňky, umožňuje pohyb, poskytuje hustou síť polymerů pro transport a podílí se i na mezibuněčných spojích.[6] Cytoskelet hraje důležitou roli v mechanotransdukci. Díky tensegritické struktuře jsou síly roznášeny po celé buňce a jádro tak může reagovat na mechanické působení vnějšího i vnitřního prostředí. [9] Cytoskelet tvoří mikrotubuly, mikrofilameny a intermediální filameny. (Obr. 2) Mikrotubuly jsou trubičky o průměru kolem 25nm a délce až stovky μm , jsou tvořeny kulovitými proteiny tubulinu. Podle zatížení dochází k jejich přestavbě. Mikrofilameny mohou tvořit aktinová nebo myozinová vlákna. Aktinová vlákna tvoří bohatou síť (krustu) hlavně pod cytoplasmatickou membránou, se kterou je krusta pevně spojena pomocí proteinů. Tloušťka krusty může být 100-1000nm. Cytoplasmatická membrána se však může i lokálně odpojit a vytvořit výdutě při vyrovnávání lokálních tlaků. Aktinová vlákna reagují na vnější zatížení deformací a přeuspořádáním. Mění svou délku a polohu pomocí polymerizace a depolymerizace svých konců, tím také umožňují přesun celé buňky. Myozin je schopen změny prostorové konfigurace části své molekuly, čímž vyvolá pohyb. Myozin se dokáže

vázat na aktin a tudíž po něm šplhat, čehož se využívá k transportu nebo ke kontrakci a expanzi celé buňky, příkladem jsou buňky svalových vláken. K extracelulární matici je buňka přichycena pomocí integrinů, které jsou spojeny s aktinovými vlákny a přenáší mechanické síly mezi maticí a buňkou. [10], [11]



Obr. 3: Cytoplasmatická membrána. [7]

Celou buňku uzavírá cytoplasmatická membrána, jejíž existence umožnila samotný vznik buňky jako takové. Funguje jako bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím. Cytoplasmatická membrána je selektivně semipermeabilní dvojvrstva fosfolipidů. Fosfolipidy jsou amfifilní molekuly, jsou tedy složeny z polární hydrofilní hlavičky a nepolární hydrofobní části, která se skládá ze dvou řetězců mastných kyselin. Hydrofilní hlavičky zajišťují kontakt s vnitřním a vnějším vodným prostředím, hydrofobní řetězce tvoří střední vrstvu membrány. V membráně jsou také další struktury, jako jsou transmembránové kanálky nebo proteinové struktury fungující jako receptory. Fosfolipidová dvojvrstva není statická, ale jednotlivé fosfolipidy i ostatní struktury se mohou pohybovat a vyrovnávat, jak naznačuje model fluidní mozaiky podle Singera a Nicolsna.[12]

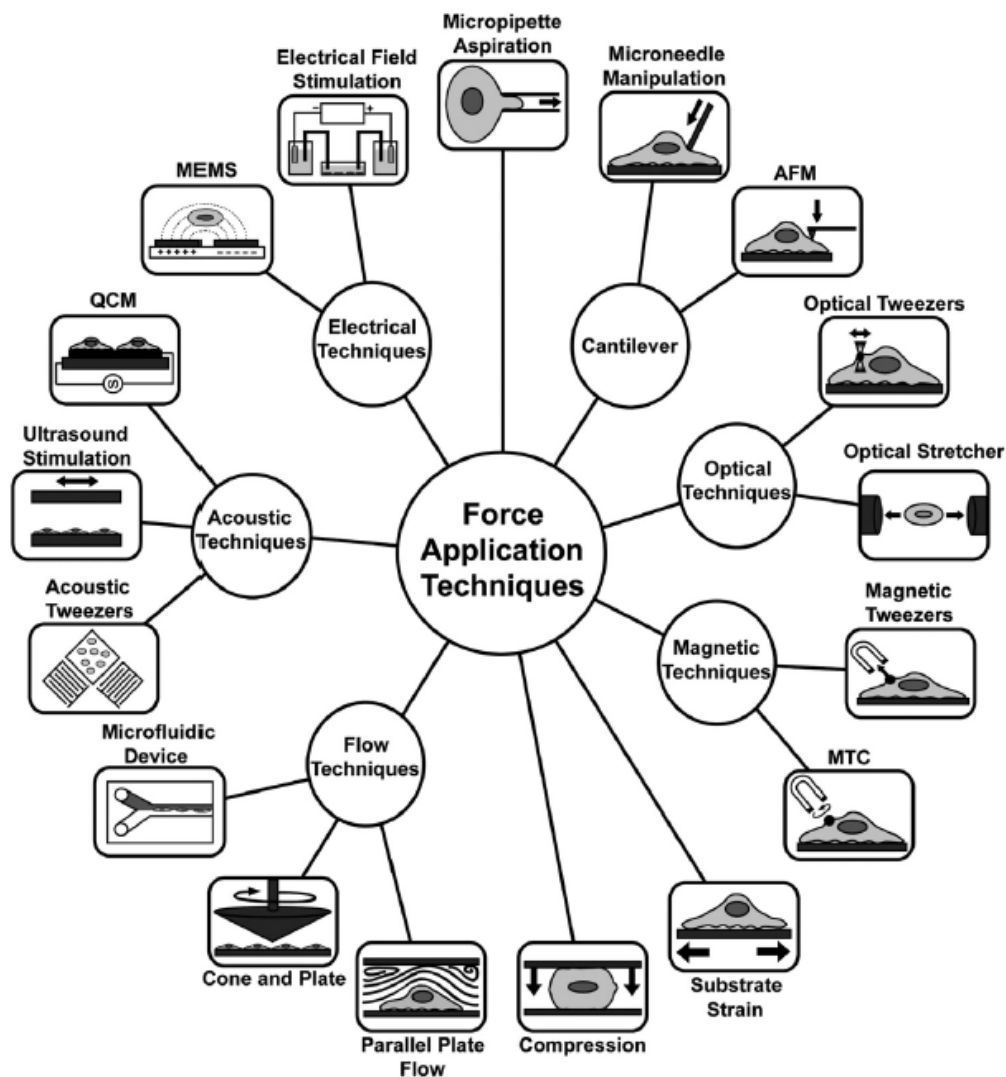
Rostlinná buňka má kolem cytoplasmatické membrány ještě buněčnou stěnu složenou z polysacharidů a celulósových molekul. Ta tvoří mechanickou ochranu buňky a je považována za neživou část. Rostlinná buňka obsahuje některé orgány, které u živočišné buňky nejsou, jako například velké vakuoly sloužící jako zásobárny vody, plastidy, peroxizomy a plazmodesmata (kanálky spojující sousední buňky). Naopak živočišné buňky obsahují centrioly (shluky mikrotubul), centrozomy a lysozomy sloužící k hydrolýze bílkovin, cukrů a lipidů.[6]

2.2 Experimentální metody pro analýzu mechanických vlastností buněk

Mechanické vlastnosti buněk je možné určit pomocí experimentálních metod. Volba experimentální metody závisí především na dostupnosti laboratorního vybavení. Existuje poměrně široká škála mechanických experimentů vhodných k testování buněk a buněčných struktur. Hlavní princip metod spočívá v sledování mechanické odezvy buňky nebo její části na zatížení silou či deformací. Pro výpočet konstant jako je například modul pružnosti se naměřená data často prokládají analytickým modelem, který odpovídá konkrétní experimentální metodě. Většina modelů předpokládá kontinuum, přestože buňka není homogenní a má složitou hierarchickou strukturu. Je tedy zřejmé, že každý jednotlivý model je schopen popsat jen určité chování buňky a pouze za specifických podmínek. Běžně hledanou veličinou je například Youngův modul pružnosti buněčné membrány, vláken cytoskeletu nebo celé buňky.[13] Na obr. 4 jsou znázorněny současné experimentální metody, jejich stručný popis se nachází níže.

Aspirace mikropipetou je jednou z prvních metod používaných pro výzkum mechanických vlastností buněčné membrány, díky své jednoduchosti se stále hojně používá. Princip experimentu je následující, skleněná mikropipeta o průměru několik mikrometrů se přiloží k buňce, poté se vytvoří podtlak, čímž dojde k vyboulení části buňky dovnitř pipety. Podle množství nasátého buněčného materiálu se vyhodnocují mechanické vlastnosti buňky. [14]

Metody využívající ohyb sondy patří mezi nejpoužívanější. Síla na buňku je přenášena pomocí mikrojuhly nebo hrotu mikroskopu atomárních sil (AFM). Mikrojuhla či raménko mikroskopu mají známou tuhost a z jejich průhybu lze určit vyvolanou sílu. Průhyb se běžně měří pomocí optických nebo elektrických snímačů. Zároveň se snímá i deformace buňky. Ze sklonu naměřené křivky síly a deformace je vyhodnocována například tuhost buňky. [11]



Obr. 4: Experimentální metody pro analýzu mechanických vlastností buněk. [15]

Optické metody využívají schopnost fotonů manipulovat s velmi malými objekty, jako jsou atomy, viry i celé buňky. Princip optických metod je založen na faktu, že fotony procházející předmětem změni svůj směr podle indexu lomu objektu, kterým procházejí. Změna směru způsobí změnu hybnosti fotonů, což vede k vyvolání síly na objekt, aby se zachovala celková hybnost soustavy. Optické pinzety jsou realizovány pomocí infračerveného laseru. Laser manipuluje s kuličkami o poloměru menším než je vlnová délka laseru. Kuličky bývají potaženy extracelulárními proteiny, aby se pevně navázaly k buňce a tím byl zajištěn přenos síly na buňku. V optických strečrech je laserový paprsek veden optickými vlákny, to umožňuje

manipulaci s většími objemy. Deformace buňky je zaznamenávána video-mikroskopem. Výhodou optických metod je bezkontaktní měření, ale může docházet k nežádoucímu zahřívání. [15]

Magnetické metody využívají schopnost manipulace feromagnetickými kuličkami pomocí magnetického pole. Skrze kuličky je vyvolána síla na buněčné struktury. Pokud je kulička koncipována jako dipól, je možné vyvolávat i kroučící sílu. Kuličky mohou být potaženy proteiny pro přichycení k buněčným strukturám, jako je tomu u optických metod. [15]

Napínání substrátu je metoda, při které dochází k deformaci buňky přichycené na elastické membráně nebo gelovém substrátu. Napínání substrátu se provádí pomocí nafukování a vyfukování nebo pomocí indentace povrchu substrátu blízko buňky. Tato metoda umožňuje jednoosé i víceosé namáhání a velmi dobře napodobuje fyziologické namáhání buněk v přirozeném prostředí. [15]

Kompresse pomocí rovinné desky je využívána k měření mechanické odezvy celé buňky. Buňky jsou pěstovány na rovinném povrchu, následně jsou stlačovány paralelní deskou. Kompresní síla působící na buňku závisí na zatěžovacím módu a může být proměnná v čase. Zatížení deskou může být i dlouhodobé. Tvar buňky během komprese se zaznamenává video-mikroskopem. [15]

Proudění tekutiny je pro mnohé buňky běžnou mechanickou zátěží. Pro simulaci fyziologického proudění se používají mikrofluidní zařízení, jako je soustava rotujícího kužele a stacionární roviny nebo průtoková komora. Díky různým metodám lze buňku vystavit laminárnímu, přechodovému i turbulentnímu proudění. [15], [10]

Akustické metody se používají hlavně k manipulaci, lze je ale také použít pro vyvinutí mechanických sil na buňku. Akustická pinzeta pracuje na principu povrchové stojaté vlny. Soustava se skládá z piezoelektrických transducerů, které vyvolávají stojaté vlnění elastického substrátu a tím i napínání buněk. Další možností je vyvolání akustických vibrací jedné z paralelních desek, mezi kterými se nachází médium s buňkami. [15]

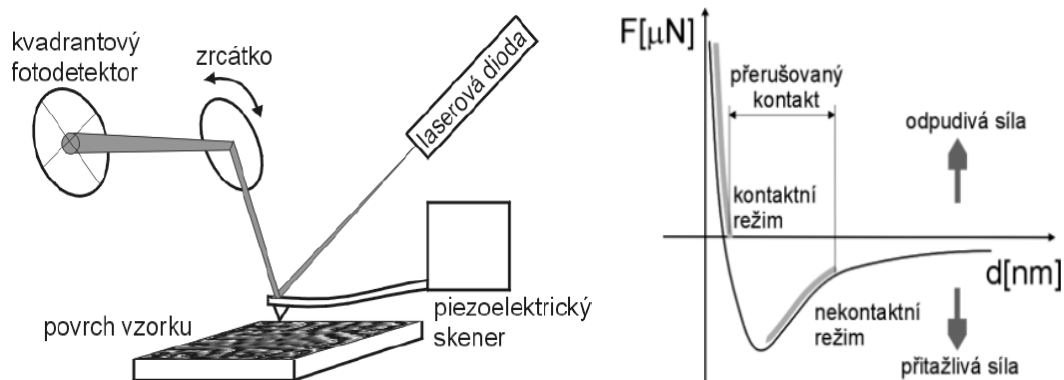
Elektrické metody jsou vhodné pro třídění, manipulaci a elektrickou stimulaci buněk. Hlavním principem mikroelektromechanických systémů (MEMS), které se

využívají pro manipulaci a napínání buněk je dielektorforéza. Jejím základem je nehomogenní elektrické pole, ve kterém dochází k polarizaci buněk. Díky rozdílu mezi Coulombovými silami působícími na opačné póly je buňka přitahována k místu s větší hustotou elektrického pole. Na buňky je také možno působit pomocí elektrochemického gradientu. [15]

Dále bude podrobněji popsána mikroskopie atomárních sil (AFM), která se v současnosti hojně používá pro zkoumání buněk a určování modulu pružnosti buňky. Princip instrumentované nanoindentace, jako poměrně nové metody v oblasti analýzy mechanických vlastností buněk, je velmi podobný principu AFM. Proto i při testování mechanických vlastností buněk pomocí instrumentované nanoindentace je možné těžit ze zkušeností získaných z měření pomocí AFM.

2.3 AFM

Mikroskopie atomárních sil (AFM), metoda známá již od roku 1986, byla navržena pro skenování povrchů s rozlišením v řádu desetin nanometrů. Její rozlišení je srovnatelné s rozlišením rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), k zobrazení však využívá pouze sil krátkého dosahu a nevyžaduje tak elektrickou vodivost vzorku, či speciální úpravy měřícího postupu pro nevodivé povrchy jako SEM. AFM navíc umožňuje měření ve fyziologicky relevantním prostředí, tedy v kapalině, proto se stala velmi oblíbeným nástrojem užívaným v cytologii i molekulární biologii.[4], [16]



Obr. 5: Schéma AFM mikroskopu (vlevo). Charakter sil mezi hrotem a povrchem v závislosti na jejich vzdálenosti (vpravo). [17]

Jádrem přístroje je hrot připevněný na raménku. Geometrie i materiál, ze kterého je hrot vyroben, mohou být různé. Běžně se hrot i raménko vyrábí pomocí mikrofabricačních metod. Často používaný materiál pro výrobu hrotu je pak křemík nebo nitrid křemíku. Poloměr zakřivení hrotu významně ovlivňuje rozlišení přístroje. Pro skenování povrchu je proto vhodný velmi ostrý hrot. Podle výrobce [18] je možné vyrobit velmi ostrý kuželovitý hrot s polovičním úhlem 10° o výšce $10\text{-}15\mu\text{m}$ a poloměrem zakřivení menším než 7nm , volba geometrie však závisí na konkrétní aplikaci. Piezokeramický aktuátor pak zajišťuje posuvy raménka s hrotem ve třech osách. Ohyb raménka je měřen pomocí laserového paprsku, který se odráží od konce raménka a dopadá na fotodetektor. (Obr. 5 vlevo) V průběhu měření se hrot přiblíží velmi blízko k povrchu (řádově 10^{-9} až 10^{-10} m). V tak malé vzdálenosti od povrchu již působí Van der Waalovy síly, které vyvolají ohyb raménka a tudíž rozpoznání struktur topografie. Na hrot mohou také působit rušivé síly, jako například

kapilární, elektrostatické nebo magnetické, ty pak mohou komplikovat měření. [16], [19], [20]

Při skenování se rozlišují tři základní režimy. Charakter působících sil popisuje obr. 5 vpravo. S klesající vzdáleností nejprve roste přitažlivá síla, po dosažení maxima velikost síly klesá, až se změní v sílu odpudivou, která pouze roste. [20]

- a) **Kontaktní režim:** V kontaktním režimu je vzdálenost mezi hrotem a povrchem tak malá, že převládají odpudivé síly. Pokud je tuhost raménka menší než efektivní tuhost držící atomy povrchu pohromadě, ohyb vyvolaný odpudivou silou lze použít k měření topografie. Pokud je tuhost raménka větší, dojde k indentaci povrchu. Vyvolaná síla v kontaktním režimu, je řádově 10^{-7} N. Zpětnovazebním řízením je možné udržovat režim konstantní výšky raménka nebo konstantní síly.
- b) **Bezkontaktní režim:** Využívá přitažlivých sil ve větší vzdálenosti od povrchu (desítky až stovky nanometrů) kde se velikost síly pohybuje v řádech 10^{-12} N. Nedochází k mechanickému kontaktu, a proto se hodí pro mapování měkkých a pružných vzorků. Ohyb je však kvůli malým silám velmi malý a tudíž i signál. Proto se raménko rozkmitává s frekvencí blízkou rezonanční a s rozkmitem jednotek nanometrů a měří se změna rezonanční frekvence při přiblížení se k povrchu.
- c) **Pokleповý režim:** Pokleповý režim je také založen na snímání změny rezonanční frekvence, avšak dochází k většímu rozkmitu a tudíž k přerušovanému kontaktu se vzorkem. [20]

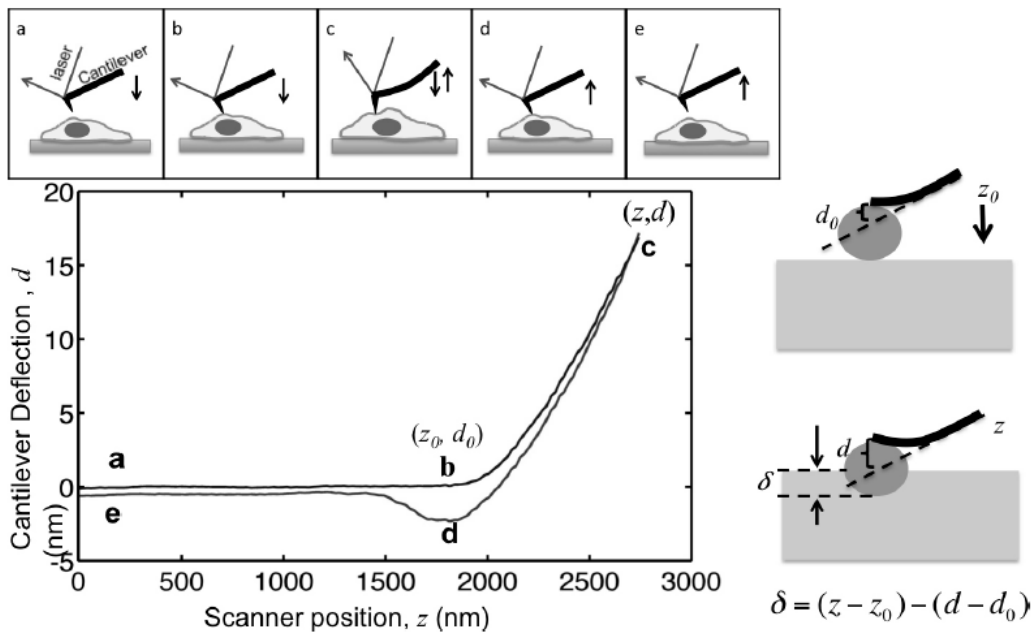
2.3.1 Analýza mechanických vlastností buněk pomocí AFM

Pro měření mechanických vlastností buněk (adheze, elasticita) se volí režim, při kterém dochází k indentaci vzorku. Mechanické vlastnosti se vyhodnocují z křivky působící síly F v závislosti na posuvu δ , která se získá přepočtem zaznamenaných hodnot vertikálního posuvu raménka z a ohybu raménka d podle tab. 1. Pro výpočet posuvu δ je potřeba znát ještě hodnotu vertikálního posuvu z_0 a ohybu raménka d_0 v místě prvního kontaktu se vzorkem. Pro výpočet síly působící na vzorek je potřeba také znát koeficient tuhosti raménka k . Pro jeho přesné určení se provádí kalibrace před každým měřením.[21]

Tab. 1: Přepočet vertikálního posuvu z a ohybu raménka d na posuv δ a sílu F [21]

$z < z_0$	$\delta = 0$	$F = 0$
$z \geq z_0$	$\delta = z - z_0 - d - d_0$	$F = k d - d_0$

Na obr. 6 je naznačen průběh měření. V první fázi a)- b) se raménko s hrotem přibližuje k povrchu, na hrot nepůsobí žádná síla, ohyb raménka je tedy nulový. Ve fázi b)- c) se hrot dostává do kontaktu a dochází k indentaci vzorku, raménko se chová jako elastický nosník a jeho ohyb d je proporcionalní síle působící na vzorek podle tab. 1. Ve fázi c) je indentace zastavena předepsanou maximální hodnotou ohybu. Maximální ohyb se volí například tak, aby vyvolaná síla nezpůsobila poškození živé buňky. Následně dochází k postupnému odlehčování c) až d) a úplnému návratu do původní polohy e). V místě d) je hrot často tažen zpět ke vzorku díky adhezním silám působícím mezi hrotem a vzorkem. Vliv adheze by měl být zohledněn při vyhodnocování naměřených dat. [21]



Obr. 6: Průběh měření a křivka ohybu d v závislosti na vertikálním posuvu z : a)-b) Hrot je volný nepůsobí žádná síla b) hrot se dostává do kontaktu b)-c) indentace c)-d) odlehčování d)-e) návrat do počáteční polohy. [21]

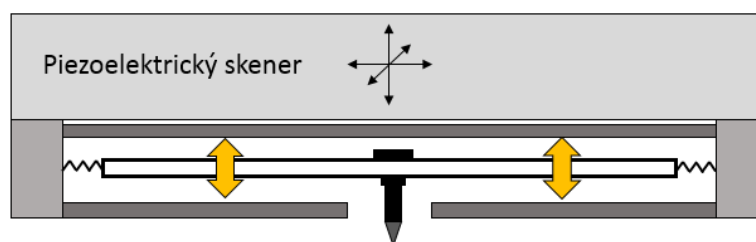
Pokud je indentovaný vzorek absolutně tuhý, nedojde k žádné deformaci δ a průběh křivky b)-c) je lineární a skloněn pod úhlem 45° , při indentaci měkkého vzorku však pozorujeme jiný průběh. Průběh přepočtené křivky síly v závislosti na posuvu nezávisí pouze na elastických vlastnostech vzorku, ale také na geometrii hrotu. Pro výpočet modulu pružnosti E se křivka $F - \delta$ prokládá funkcí předepsanou analytickým modelem. Nejčastěji se používá Hertzův model, který vychází z předpokladu elastické deformace dvou těles v kontaktu. [19] Matematické modely budou podrobněji popsány v kapitole 2.5.

Výše popsaný postup vede k určení jednoho modulu pružnosti z jedné indentační křivky $F - \delta$. AFM se používá zejména k mapování modulu pružnosti po celé buňce nebo dokonce tkáni. Indentace se tedy provádí v mnoha místech buňky a výsledkem je mapa rozložení modulu pružnosti po povrchu buňky. [20] Velké množství odlišných hodnot modulů pružnosti získaných z mnoha indentačních křivek se často vyhodnocuje statisticky a buňky se porovnávají podle nejčtenějšího modulu pružnosti. Takto získaný modul pružnosti tak není absolutní hodnota nýbrž relativní a použitelná hlavně pro srovnání různých typů buněk. [4] Také je třeba vzít v úvahu, že buňka není homogenní útvar a velmi záleží na místě indentace.

2.4 Instrumentovaná nanoindentace

Instrumentovaná nanoindentace spočívá ve vtlačování objektu ze známého materiálu do objektu zkoumaného materiálu. Slouží k určení mechanických vlastností zkoumaného materiálu, jako je například modul pružnosti nebo tvrdost, přičemž tyto vlastnosti jsou známy pro objekt, který je do testovaného materiálu vtlačován. Na principu indentace jsou založeny zkoušky tvrdosti, nejznámější jsou například zkoušky podle Brinella, Vickerse nebo Rockwella, kdy se tvrdost určuje jako podíl síly k ploše vtisku. Nanoindentace je pak indentace, při které se hloubka vtisku pohybuje v řádu nanometrů. Protože v tak malém měřítku je velmi obtížné měřit rozměry vtisku, velikost kontaktní plochy se získává výpočtem. Měřena je pouze hloubka indentace a díky známé geometrii indentačního hrotu je pak možné dopočítat velikost kontaktní plochy v průběhu zkoušky.[22]

Nanoindentor je přístroj, který byl primárně pro nanoindentaci zkonstruován. Podobně jako AFM lze nanoindentor také použít pro skenování topografie povrchu. Konstrukce přístroje se liší podle výrobce. Součástí přístroje je většinou tuhý rám, motorizovaný stolek s přesným posuvem pro manipulaci se vzorkem, světelný mikroskop sloužící k zobrazení a výběru oblasti zájmu a hlavně měřící hlava (transducer) připevněná na piezokeramickém skeneru. Do transduceru se upíná hrot, jímž se provádí samotná nanoindentace. Celá měřící soustava bývá uzavřena pro udržení stálého prostředí během experimentu. Některé přístroje jsou navíc opatřeny antivibrační jednotkou. [22], [23]

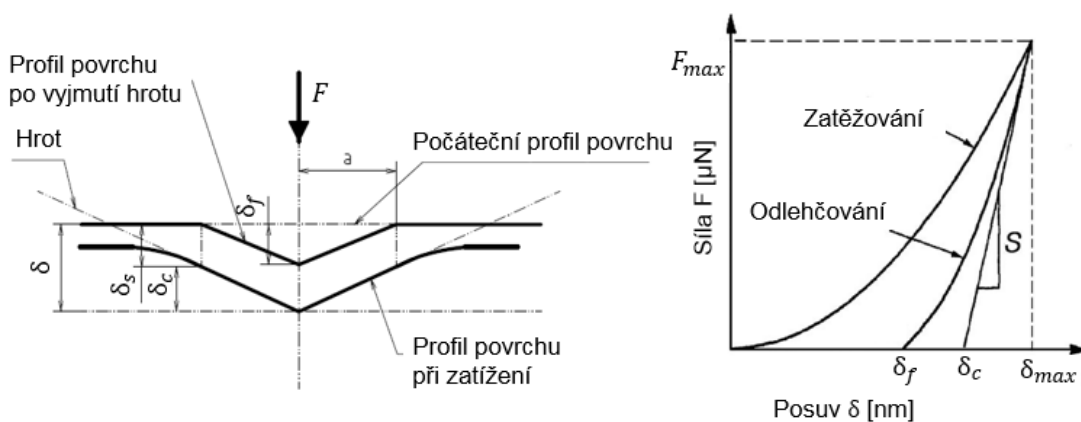


Obr. 7: Schéma 1D transduceru připojeného na piezoelektrický skener.

Jak již bylo zmíněno výše, pro vyhodnocení nanoindentace je potřeba znát hloubku indentace. Ta je měřena pomocí senzoru posuvu založeném na změně indukčnosti nebo kapacitance. Síla, kterou hrot působí na vzorek, je vyvolána elektrostaticky nebo expanzí piezoelektrických elementů či působením magnetického pole na cívku.[22] Transducer slouží jako senzor a zároveň i jako

aktuátor. Na obr. 7 je schéma 1D transduceru, který se používá v přístrojích TI 950 TriboIndenter. Snímání posuvu ve vertikálním směru je v tomto případě založeno na změně kapacitance. Skládá se ze dvou řídicích elektrod napájených střídavým napětím a střední plovoucí elektrody, na níž je připevněn indentační hrot. Modulací přiváděného napětí lze vyvolat posuv střední elektrody v svislém směru. Síla je vyvolávána elektrostaticky, tedy přivedením stejnosměrného napětí na spodní elektrodu, čímž dojde k přitažení střední elektrody. Tímto způsobem je možné řídit nanoindentaci pomocí síly nebo posuvu. Pro vrypové zkoušky je potřeba manipulovat s hrotem ještě v jednom směru, proto se vyrábí ještě 2D transducer, který je složen ze tří takových jednotek. [23]

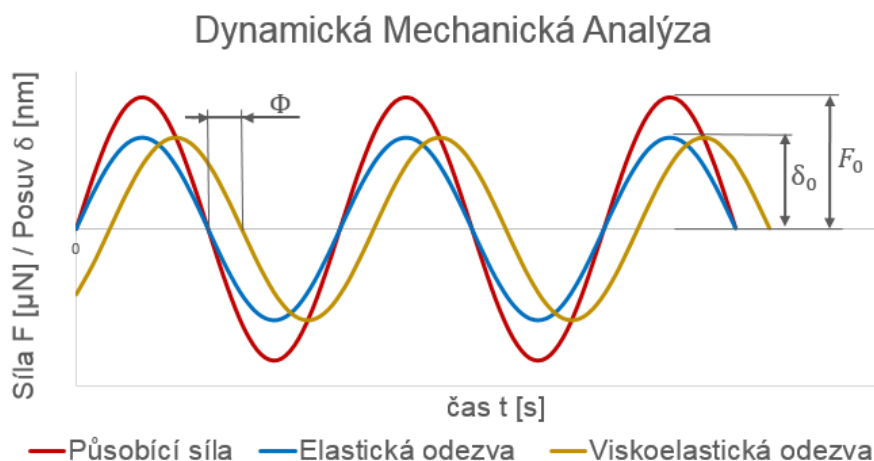
Transducer je připojen na skener z piezoelektrické keramiky, který zajišťuje pohyb hrotu ve všech třech osách. Skener se používá pro přesné umístění indentu nebo pro skenování povrchu vzorku. Během kvazistatické nanoindentace je však piezokeramika nehybná a pohyby hrotu vykonává pouze transducer. Díky velké variabilitě v řízení pohybu indentačního hrotu je možné provádět následující měření. [23]



Obr. 8: Schéma kvazistatické nanoindentace, při které působí hrot silou F na vzorek a způsobuje deformaci povrchu o hloubce vtisku δ , kontaktní plochu mezi hrotem a povrchem charakterizuje poloměr a . Naměřená síla F a posuv δ tvoří indentační křivku vpravo. [24]

- a) **Kvazistatická nanoindentace:** To je režim, při kterém střídavé napětí s opačnou fází na řídicích elektrodách vyvolá statickou výchylku střední elektrody, přičemž tato výchylka může být postupně měněna. Výstupem kvazistatické nanoindentace je indentační křivka, to je závislost síly F na posuvu δ , která je zobrazena na obr. 8 vpravo. Z obrázku je vidět, že sklon

zatěžovací a odlehčovací křivky se liší a po úplném odlehčení zůstává plastická deformace, která je definována finální hloubkou vtisku δ_f . V průběhu indentace je celková indentační hloubka δ rovna součtu $\delta = \delta_c + \delta_s$, kde δ_c je vertikální vzdálenost podél které je hrot v kontaktu s materiálem a δ_s je vertikální posuv povrchu v okolí vtisku, jak je vidět z obr. 8 vlevo. Zatěžovací křivka nese informaci o elasto-plastické deformaci, kdežto odlehčovací křivka nese informaci o elastickém chování materiálu, vyhodnocením odlehčovací křivky podle teorie Olivera a Pharra [24] lze určit tuhost, tvrdost i Youngův modul pružnosti testovaného materiálu, jak bude popsáno v kapitole 2.5.



Obr. 9: nanoDMA: Harmonický průběh budící síly působící na hrot (červeně) vyvolá odezvu materiálu v podobě deformace. Průběh deformace má stejnou úhlovou frekvenci jako budící síla. Pokud je materiál elastický, průběh deformace je ve fázi s budící silou (modře). Je-li materiál viskoelastický, průběh deformace je zpožděna za budící silou o fázový posun Φ (žlutě).

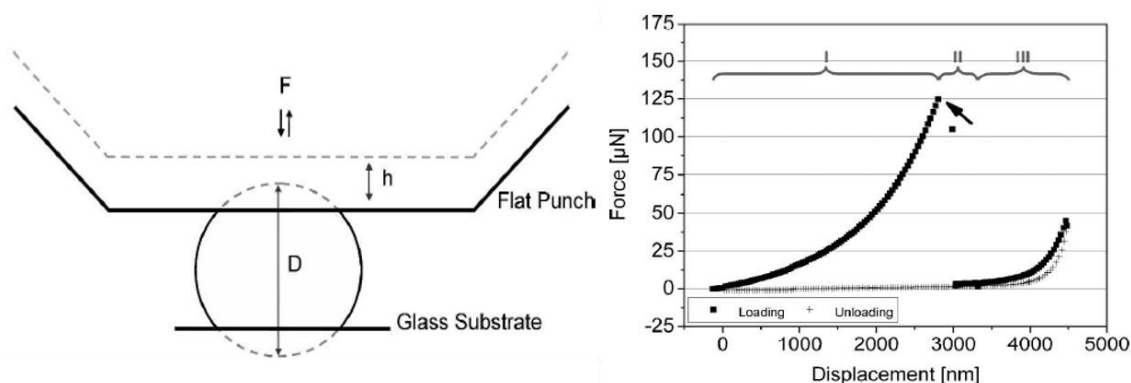
- b) **nanoDMA:** Kromě kvazistatické nanoindentace je možné provádět další zkoušky, významnou metodou pro zkoumání časově závislých vlastností polymerů a měkkých biologických vzorků je nanometrická dynamická mechanická analýza (nanoDMA). Během nanoDMA je vzorek zatěžován harmonicky buzenou silou a zároveň je snímána odezva materiálu v podobě deformace. Na obr. 9 je znázorněn průběh zatěžování, působící síla je značena červeně, modrá křivka je ve fázi s červenou a představuje tak ideální elastickou deformaci. Žlutě je vykreslena deformace viskoelastického materiálu, která je zpožděna o hodnotu fázového posunu Φ . Díky změřenému fázovému posunu Φ , amplitudě síly F_0 a amplitudě

posuvu δ_0 je možné určit mnoho dynamických vlastností materiálu, jako například viskozitu, tlumení, ale i modul pružnosti. [25]

- c) **Ostatní zkoušky:** Nanoindentor umožňuje měření i v dalších režimech, jako je například nano-vrypová zkouška (scratch test), při které hrot škrábe do materiálu a vzniká dlouhý vryp. Nano-vrypová zkouška je užitečná pro měření mechanických vlastností tenkých vrstev. Další možnosti jsou například zkoušky opotřebení nebo mapování modulu pružnosti. Avšak tyto metody nejsou zatím reálně použitelné pro analýzu mechanických vlastností buněk. [22]

2.4.1 Nanoindentace buněk

Instrumentovaná nanoindentace je metoda, která byla vyvinuta primárně pro zjišťování mechanických vlastností inženýrských materiálů se strukturami v nanometrickém měřítku. Rozšíření aplikace této metody pro měření mechanických vlastností biologických vzorků, zejména pak buněk, je zatím v počátcích a ještě nebylo publikováno zdaleka tolik materiálů jako pro metodu AFM. Proto i postup vyhodnocování naměřených dat není jednotný a liší se podle autora i podle charakteru testovaných buněk.

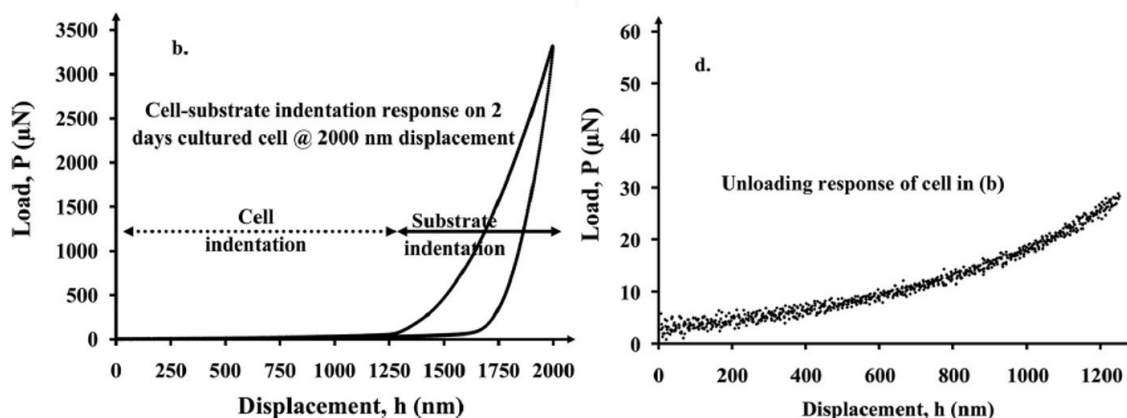


Obr. 10 Idealizované schéma komprese buňky mezi dvěma plochami (vlevo). Indentační křivka se zaznamenanou silou při prasknutí (vpravo). [26]

Jedním přístupem je komprese kulových buněk pomocí plochého hrotu podle Arfstena a spol.[26] Z indentačních křivek, získané kvazistatickou nanoindentací, tak lze identifikovat sílu, energii a relativní deformaci, při které dochází k prasknutí buněčné membrány. Také je možné měnit rychlost zatěžování a sledovat vliv na sílu potřebnou pro prasknutí kulové buňky. Schéma experimentu je na obr. 10 vlevo.

Na obr. 10 vpravo je vidět indentační křivka se třemi fázemi zatěžování: I. Komprese buňky II. Prasknutí buňky II. Komprese prasklé buňky. Výstupem experimentu je informace o kritické síle, potřebné k prasknutí buňky, při určité rychlosti zatěžování.[26]

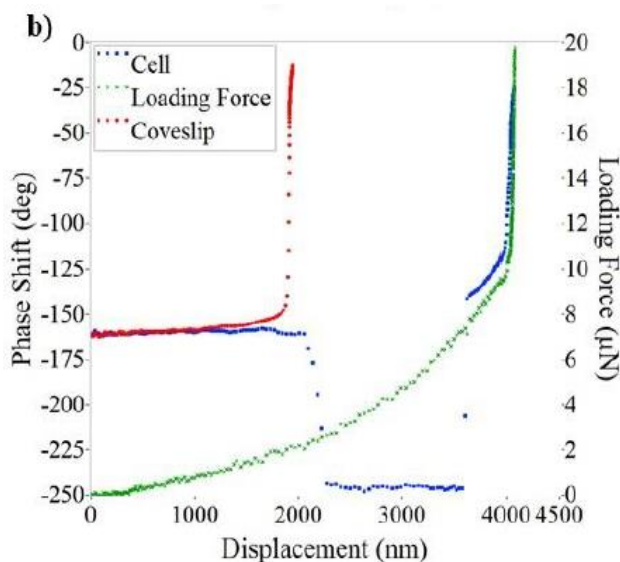
Existuje však odlišný přístup, který využívá teorie běžně používané pro vyhodnocování kvazistatické nanoindentace inženýrských materiálů. Buňka je indentována klasickým hrotem (například Berkovichův hrot tvaru trojboké pyramidy). Určení počátku indentace buňky je kritické pro následné vyhodnocování. Khanna a spol. proto v [5] navrhuje následující postup. Hrot se nejprve přibližuje k povrchu buňky naslepo s maximální předepsanou silou $3\mu N$, jakmile je identifikován kontakt, maximální dovolená síla se okamžitě sníží na $0,75\mu N$, aby došlo k co nejmenší deformaci buňky. To je běžný postup pro určení prvního kontaktu s povrchem vzorku. Následně však hrot nevysune zpět do počáteční polohy, ale v takto identifikovaném místě kontaktu ihned provede posuvem řízenou nanoindentaci. Výsledkem je indentační křivka, pokud nedojde k prasknutí buňky během zatěžování, odlehčovací křivka nese informaci o mechanických vlastnostech buňky. Na obr. 11 je vidět, že během nanoindentace buňky jsou síly poměrně malé, kdežto po dosažení dostatečné hloubky začne být vliv substrátu signifikantní. Modul pružnosti buňky jako homogenního tělesa pak lze vypočítat z odlehčovací křivky podle teorie Olivera a Pharra, která bude popsána v kapitole 2.5.2. [5]



Obr. 11: Indentační křivka buňky a substrátu (vlevo). Detail odlehčovací křivky v oblasti indentace buňky (vpravo). [5]

Dojde-li však k prasknutí buňky během zatěžování, odlehčovací křivka není k dispozici a vyhodnocení je nutné provést přímo z křivky zatěžovací. Modul pružnosti se pak získá proložení dat analytickým modelem, jako při analýze mechanických vlastností buněk pomocí AFM. Overbeck a spol. v [27] porovnává Hertzův model (kapitola 2.5.1), model podle Luleviche (kapitola 2.5.3.a) a vlastní model založený na geometrickém popisu deformace kulové membrány (kapitola 2.5.3.b). Overbeck dále navrhuje normalizaci každé indentační křivky kritickou silou a deformací při prasknutí membrány. Normalizované indentační křivky jsou pak zprůměrovány a teprve poté proloženy analytickým modelem, čímž se sníží rozptyl výsledků. [27]

Pro správné určení modulu pružnosti, ať už membrány či buňky jako celku, je nejdůležitější správně určit počátek indentační křivky. Jedná-li se o indentaci velmi tvrdých materiálů, jako jsou kovy, počátek je jednoduše identifikovatelný. Pokud jde ale o měření měkkých biologických vzorků, nelze jednoduše detekovat povrch vzorku jako při indentaci tvrdých materiálů. Biologické vzorky jsou navíc často ponořeny v kapalině. Indentační křivka tak roste jen velmi pozvolna, a proto je nutné použít sofistikované metody, jako při vyhodnocení indentace pomocí AFM.[28] Metod pro určování počátku indentační křivky odvozených zejména pro



Obr. 12 Zeleně: indentační křivka, červeně: fázový posun v kapalině mimo buňku, modře: fázový posun během indentace buňky. Změna prostředí, jímž hrot prochází je identifikována změnou fázového posunu. [29]

data získaná AFM měřením je již celá řada. Pro určení počátečního kontaktu mezi hrotem a buňkou pomocí instrumentované nanoindentace byl v [29] navržen postup, který využívá možnosti měření fázového posunu v režimu nanoDMA.

Posuvem řízená nanoindentace, kdy transducer slouží pouze jako snímač síly je vhodná pro zaznamenání kritické síly prasknutí membrány. Pro určení kontaktu hrotu s buňkou je však výhodná nanoDMA analýza, při které je řízena amplituda a frekvence síly, kterou hrot působí na vzorek. Informace o kontaktu s buňkou je obsažena v záznamu fázového posunu. Na obr. 12 je vidět průběh fázového posunu, červeně je znázorněn fázový posun zaznamenaný během indentace mimo buňku. Jeho průběh je konstantní a v okamžiku, kdy dojde ke kontaktu hrotu se sklíčkem, se skokově změní. Modře je zaznamenan fázový posun během indentace buňky. Nejprve je fázový posun shodný s posunem naměřeným pouze v kapalině. Při kontaktu s buňkou se hodnota fázového posunu výrazně sníží, což značí přechod do prostředí s odlišnou viskoelasticitou. Po dobu indentace samotné buňky je fázový posun konstantní, při kontaktu se sklíčkem se jeho hodnota prudce zvýší a dosáhne stejných hodnot jako při detekci kontaktu se sklíčkem během indentace mimo buňku. Změna prostředí, kterým hrot prochází je tedy určena skokovou změnou fázového posunu. V prostředí s konstantní viskoelasticitou je i fázový posun konstantní. Tímto postupem je tedy poměrně přesně vymezena oblast indentace samotné buňky. [29]

2.5 Analytické modely

V této sekci budou popsány analytické modely, které se používají při vyhodnocování indentační křivky získané měřením pomocí AFM nebo instrumentované nanoindentace.

2.5.1 Hertzův model

Hertzův model byl odvozen pro elastický kontakt dvou těles. Při analýze dat získaných testováním buněk pomocí AFM se používá tvar odvozený pro kontakt koule s nekonečným poloprostorem. Koule o poloměru R reprezentuje hrot, který indentuje vzorek jakožto poloprostor. Poloměr kontaktní plochy a závisí na indentační hloubce δ podle rovnice (1).

$$a = \sqrt{R \delta} \quad (1)$$

Vztah mezi působící silou F a indentační hloubkou δ je dán rovnicí (2), kde E_r je redukovaný modul pružnosti dvou těles, hrotu a vzorku.

$$F = \frac{4}{3} \sqrt{R} E_r \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2)$$

Redukovaný modul pružnosti vyjadřuje skutečnost, že během zatěžování dochází k deformaci vzorku i hrotu a je dán rovnicí (3). ν je Poissonovo číslo hrotu nebo vzorku a E je Youngův modul pružnosti hrotu nebo vzorku. Je-li materiál hrotu významně tvrdší než vzorek, rovnice (3) může být nahrazena rovnicí (4).

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_{hrotu}^2}{E_{hrotu}} + \frac{1 - \nu_{vzorku}^2}{E_{vzorku}} \quad (3)$$

$$E_r = \frac{E_{vzorku}}{1 - \nu_{vzorku}^2} \quad (4)$$

Pro zjištění Youngova modulu pružnosti buňky E_{vzorku} se naměřená závislost $F - \delta$ prokládá křivkou předepsanou rovnicí (5), hodnota Poissonova čísla buňky se běžně používá $\nu_{vzorku} = 0,5$ a E_{vzorku} je hledaný parametr.

$$F = \frac{4}{3} \sqrt{R} \frac{E_{vzorku}}{1 - \nu_{vzorku}^2} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (5)$$

Tento tvar Hertzova modelu je použitelný pro parabolický diamantový hrot se zaoblením o poloměru R . Důležitým předpokladem je velmi malá deformace δ v porovnání s výškou indentovaného vzorku, protože odvozené vztahy platí pouze pro lineární elastickou oblast zatěžování rozlehlého poloprostoru.

a) Modifikace podle Shneddona

Pro jiný než kulový hrot se používá modifikovaný tvar podle Shneddona. Rovnice (6) je modifikace pro kuželovitý hrot, kde figuruje poloviční vrcholový úhel α .

$$F = \frac{2}{\pi} \tan \alpha \frac{E_{vzorku}}{1 - \nu_{vzorku}^2} \delta^2 \quad (6)$$

Shneddon tak zobecnil Hertzův vztah, aby byl použitelný i pro jiné geometrie hrotu. Zobecněný vztah pak popisuje rovnice (7) kde kromě síly a posuvu figuruje koeficient λ a exponent m , přičemž oba jsou konstanty odvozené pro jednotlivé geometrie.

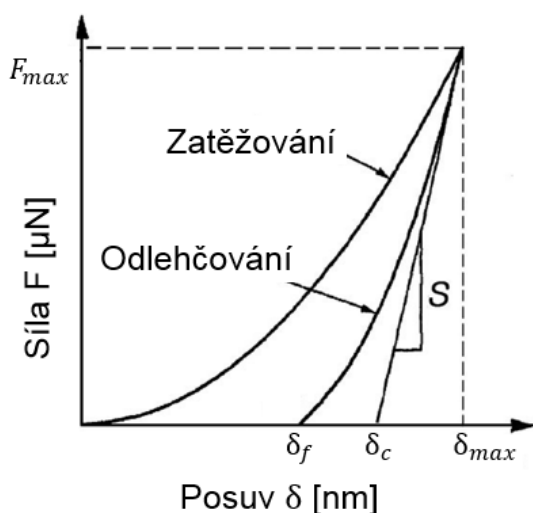
$$F = \lambda \delta^m \quad (7)$$

Pokud dochází k adhezi mezi vzorkem a hrotem během testování, používají se modifikované modely. Pro měkké vzorky vykazující adhezi je nejběžnějším adhezním modelem modifikace podle Johnsona, Kendalla a Robertse. Hertzův model i jeho modifikace popisují buňku jako spojitě homogenní těleso, jehož elastické chování je popsáno Youngovým modulem pružnosti celku, tím se liší od ostatních modelů.[30]

2.5.2 Model podle Olivera a Pharra

Pro vyhodnocení instrumentované nanoindentace se používá model podle Olivera a Pharra. [24] Vyhodnocení modulu pružnosti a tvrdosti se provádí výhradně z odlehčovací křivky (Obr. 13), která je popsána rovnicí (8) a vychází ze zobecněného Hertzova vztahu (7). Kontaktní plocha A a konstanta m jsou závislé pouze na materiálu a geometrii hrotu. Hodnoty exponentu m pro některé nejběžnější geometrie jsou $m = 1$ pro válec, $m = 2$ pro kužel, $m=1,5$ pro sférický i parabolický hrot.

$$F = A(\delta - \delta_f)^m \quad (8)$$



Obr. 13: Indentační křivka. [24]

Tuhost je definována jako derivace odlehčovací křivky v místě největšího zatížení podle rovnice.

$$S = \frac{dF}{d\delta} \quad (9)$$

Redukovaný modul pružnosti E_r je proporcionální sklonu odlehčovací křivky a vypočte se podle rovnice (10). Jeho přepočtení na Youngův modul pružnosti vzorku popisuje rovnice (3). A je kontaktní plocha při maximálním zatížení a je určena geometrií hrotu a hloubkou kontaktu h_c .

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (10)$$

Tvrdoost je definována jako podíl maximálního zatížení P_{max} a kontaktní plochy A při maximálním zatížení.

$$H = \frac{F_{max}}{A} \quad (11)$$

2.5.3 Modely založené na teorii skořepin

Dalším přístupem jsou modely založené na teorii skořepin, pomocí kterých se určují materiálové konstanty membrány nikoli celé buňky. Buňka je v tomto případě modelována jako elastická membrána naplněná tekutinou, jejíž objem se během deformace nemění. Membrána v těchto modelech nemusí představovat pouze cytoplazmatickou membránu tlustou jen několik nanometrů, nýbrž celý

komplex cytoplazmatické membrány s aktinovou kůrou, jehož tloušťka se pohybuje ve stovkách nanometrů. Definice membrány se však liší podle autorů. Některé analytické modely se neomezují jen na lineární elastické chování při malých deformacích. Nelineární chování při velkých deformacích popisuje například neo-Hookeovský konstitutivní model, Skalakův model či Evansův Skalakův model. [31]

a) Model podle Luleviche

Z Laplaceovy rovnice (12) pro napjatost rotačně symetrické membrány vyšel i Lulevich v [32]. Laplaceova rovnice udává vztah mezi hlavním napětím σ_1 a σ_2 v hlavních směrech a vnitřním tlakem p , který působí na stěnu skořepiny o tloušťce t . Zakřivení skořepiny v hlavních směrech popisují poloměry křivosti R_1 a R_2 , jedná-li se o kouli, jsou si poloměry křivosti rovny.

$$\frac{\sigma_1}{R_1} + \frac{\sigma_2}{R_2} = \frac{p}{t} \quad (12)$$

Výsledkem Lulevichova odvození je rovnice (13), kde F je zatěžovací síla, E modul pružnosti membrány, t tloušťka membrány a ε poměrná deformace určená rovnicí (14). Poměrná deformace je určena z počátečního průměru buňky D_0 a hloubky indentace δ . Svůj model původně odvodil pro experiment, při kterém indentoval vícevrstvou kulovou kapsli z elastických polymerů o poloměru $2\mu\text{m}$. Jako indentor použil skleněnou kouli připevněnou na raménku AFM, přičemž skleněná koule byla asi 10x větší než kapsle.

$$F = 4\pi Et^2 \varepsilon^3 + \frac{\pi}{2\sqrt{2}} Et^2 \sqrt{\varepsilon} \quad (13)$$

$$\varepsilon = 1 - \frac{D_0 - \delta}{D_0} \quad (14)$$

b) Model podle Overbecka

Overbeck a spol. publikoval jiný přístup, který odvodil pro kompresi kulové buňky pomocí plochého hrotu nanoindentoru. Vychází z Laplaceovy rovnice, jejíž tvar pro kulovou tenkostěnnou nádobu je popsán rovnicí (15), díky symetrii koule jsou hlavní napětí shodná a značí se σ . Dále se předpokládá lineární elastické chování buňky a tedy platnost Hookova zákona podle rovnice (16), kde E je Youngův

modul pružnosti membrány a ε poměrná deformace určená rovnicí (17). Poměrná deformace je určena jako logaritmus poměru okamžitého průměru největšího obvodu buňky D k počátečnímu průměru D_0 , je nutné si uvědomit, že D se v průběhu komprese neustále zvětšuje a jedná se tedy o vektor hodnot.

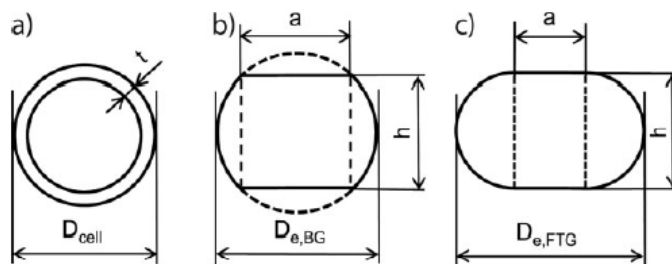
$$\sigma = p \frac{D}{4t} \quad (15)$$

$$\sigma = E\varepsilon \quad (16)$$

$$\varepsilon = \ln \left(\frac{D}{D_0} \right) \quad (17)$$

Také se předpokládá, že objem stlačované buňky zůstává po celou dobu komprese konstantní a žádná tekutina neuniká. Na počátku je objem buňky přibližně roven objemu koule o průměru D_0 a tloušťce stěny t dle rovnice (18). (Obr. 14a) Během komprese se mění tvar, uvažují se dva různé modely stlačené koule, tvar soudku značen zkratkou BG (barrel-like geometry) (Obr. 14b) a tvar plného toroidu značen zkratkou FTG (filled-torus geometry) (Obr. 14c). Stlačený tvar je určen průměrem největšího obvodu $D_{e,BG}$ a $D_{e,FTG}$, výškou h a průměrem kontaktní plochy a .

$$V_0 = \frac{\pi}{6} D_0^3 - 2t^3 \quad (18)$$



Obr. 14: Geometrie zatěžování. [27]

Stlačování buňky je řízeno posuvem plochého hrotu, tudíž je výška buňky známá, pokud je znám počáteční průměr buňky. Průměr kontaktní plochy a se vypočte ze vzorce pro objem soudku nebo plného toroidu dle rovnice (19) nebo (20) za předpokladu, že objem je po celou dobu konstantní a tedy roven počátečnímu $V_{BG} = V_{FTG} = V_0$.

$$V_{BG} = V_{v\acute{a}lce} + V_{vrchl\u00edku} = \frac{\pi}{4} a^2 h + \frac{\pi}{6} h^3 \quad (19)$$

$$V_{FTG} = V_{\text{v\u00e1lce}} + V_{\text{p\u00fal\u010dkruhu}} = \frac{\pi}{4} a^2 h + A_{\text{p\u00fal\u010dkruhu}} 2\pi r_T \quad (20)$$

Objem pl\u00e9ho toroidu se vypo\u010dte jako sou\u010det objemu v\u00e1lce a objemu p\u00fal\u010dkruhu rotovan\u00e9ho na poloměru r_T .

$$r_T = \frac{a}{2} + \frac{2h}{3\pi} \quad (21)$$

Po vypo\u010dten\u00ed pr\u00fcm\u011bru kontaktn\u00ed plochy a se ji\u017e jednodu\u0161e dopo\u010dte pr\u00fcm\u011br nej\u0161ir\u0161\u00edho obvodu deformované koule podle vzorce (22) nebo (23), kter\u00fd se n\u00e1sledn\u011b dosad\u00ed do rovnice (17) pro v\u00fdpo\u010det pom\u011brn\u00e9 deformace.

$$D_{BG} = \sqrt{\left(\frac{h^2}{2}\right)^2 + \left(\frac{a}{2}\right)^2} \quad (22)$$

$$D_{FTG} = a + h \quad (23)$$

Z pr\u00fb\u011bh\u00fa nanoindentace je zn\u00e1ma je\u0161t\u011b s\u00edla, kterou p\u00fasob\u00ed hrot na bu\u0148ku. Ze vztahu (24) se vypo\u010dte tlak v bu\u0148ce, protože se p\u0159edpokl\u00e1d\u00e1, \u017ee s\u00edla p\u00fasob\u00edc\u00ed na plochu a vyvol\u00e1 odpov\u00eddaj\u00edc\u00ed tlak p uvnit\u0159 bu\u0148ky.

$$F = p \frac{\pi}{4} a^2 \quad (24)$$

Po vy\u0159e\u0161en\u00ed soustavy rovnic, je model prolo\u017een nam\u011b\u0159en\u00fdmi daty pomocí metody nejmen\u0161\u00edch \u010dtverc\u00fa, jedin\u00fd hledan\u00fd parametr je Young\u00fav modul pru\u017enosti membr\u00e1ny E . [27]

3 Cíle práce

Provést nanoindentaci živých buněk.

Aplikovat vhodný model pro analýzu mechanických vlastností buněk.

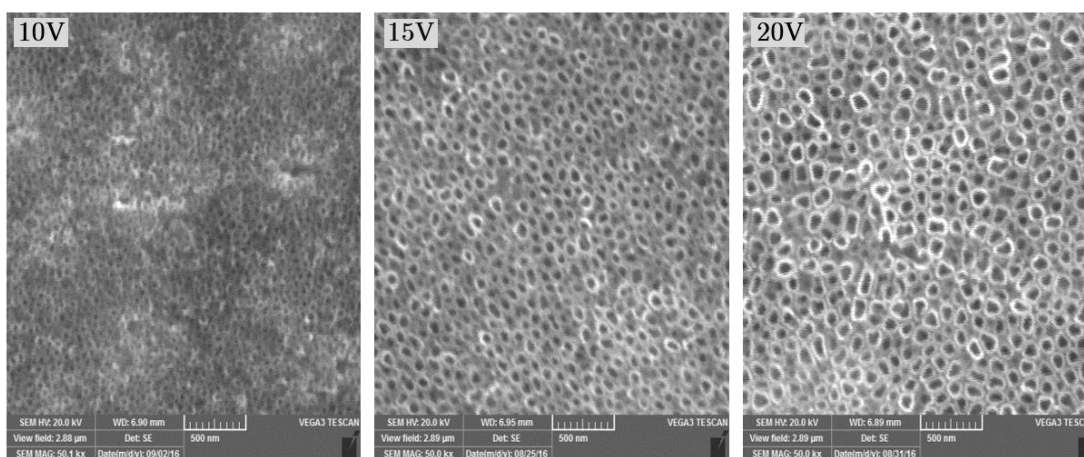
Provést analýzu mechanických vlastností buněk.

Srovnání mechanických vlastností buněk vypěstovaných na různých typech povrchů.

4 Metody

4.1 Příprava vzorků

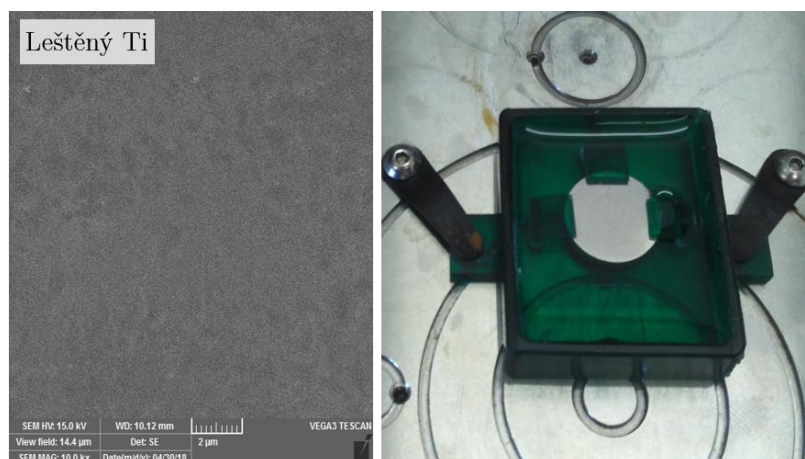
Během experimentu byly měřeny mechanické vlastnosti lidských osteoblastů Saos-2. Buňky byly vypěstovány na čtyřech typech povrchů titanových disků o výšce 3mm a průměru 15mm. Všechny disky byly vyrobeny z čistého titanu s komerčním označením stupeň 2, jejich povrch byl broušen a následně vyleštěn do zrcadlového lesku. Jeden disk byl ponechán bez dalších úprav. Zbylé tři disky byly modifikovány elektrochemickou úpravou vyleštěného povrchu. Pomocí přístroje Potentiostat-Galvanostat IMP 88 PC-200V byly na vyleštěném povrchu vytvořeny nanotrubičky. Odlišných průměrů nanotrubiček bylo docíleno vytvořením různých potenciálu během anodické oxidace. Rozdíly mezi strukturami jsou vidět na snímcích z elektronového mikroskopu. (Obr. 15) Rozměry trubiček popisuje tab. 2. Veškerá příprava materiálu a povrchové úpravy byly provedeny na Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství VŠCHT.



Obr. 15: Snímky povrchů s nanotrubičkami pořízené elektronovým mikroskopem (Vega3 Tescan).

Tab. 2: Rozměry nanotrubiček.

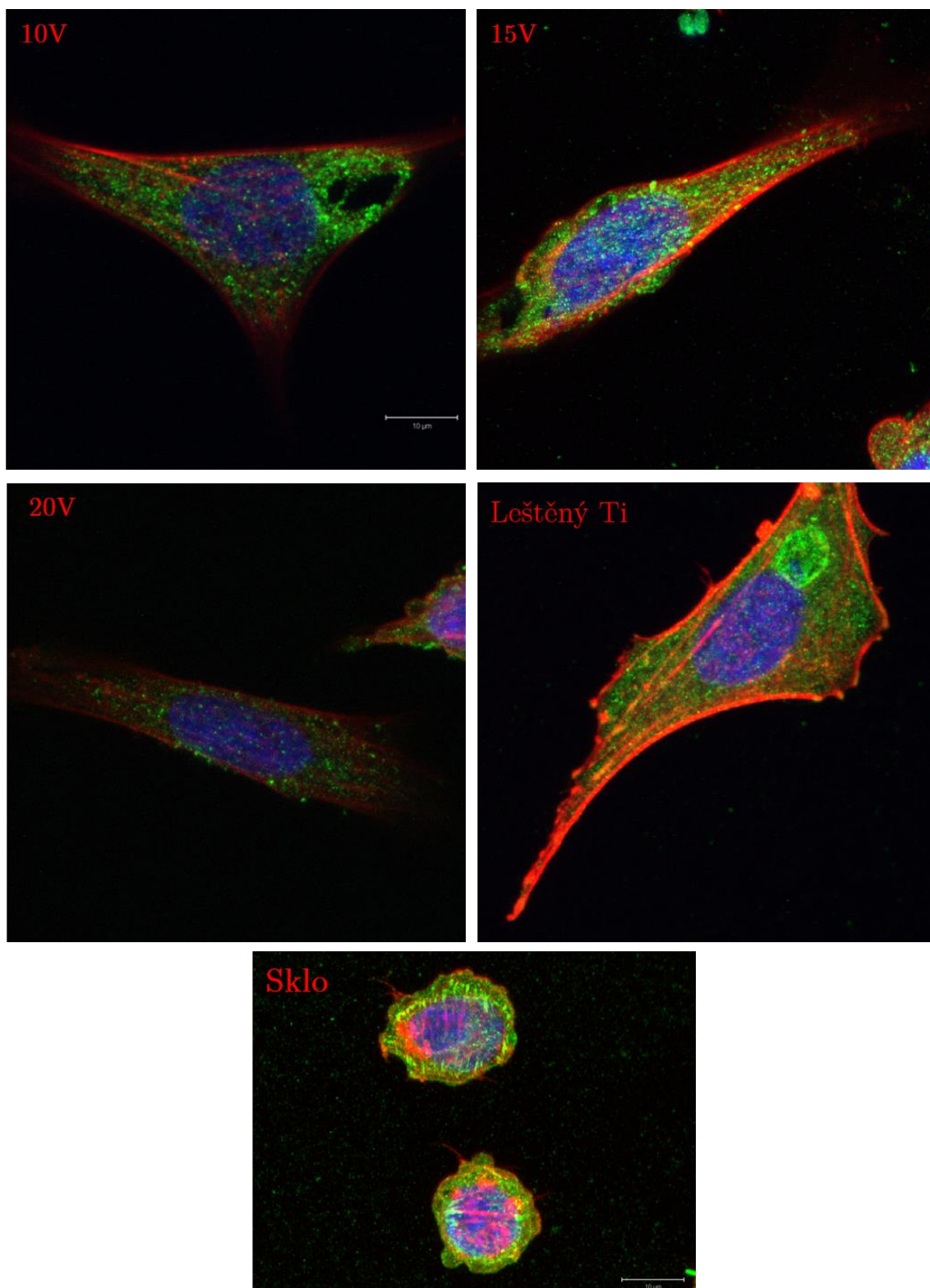
Potenciál během depozice [V]	Průměr trubiček [nm]	Délka trubiček [nm]	Počet měřených trubiček
10	31±8	468±24	20
15	44±12	731±32	20
20	61±16	1097±75	20



Obr. 16: Snímek povrchu leštěného titanu z elektronového mikroskopu a celý disk s živými buňkami na povrchu umístěný v přípravku a zalitý médiem.

Na všech čtyřech typech povrchů byly vypěstovány buňky stejným postupem. Před osídlením povrchů buňkami byly disky sterilizovány 70% etanolem a omyty PBS roztokem (fosfátovým pufrem). Následně byly disky umístěny do kultivačních nádob, kam byly nasazeny buňky o hustotě $15000/cm^2$ v 1ml základního média. Aby se buňky uchytili na povrchu, byly uchovávány v inkubátoru udržujícím teplotu $37^{\circ}C$ a atmosféru s 5% CO_2 po dobu nejméně 48 hodin. Kultivace buněk probíhala v laboratořích ústavu experimentální medicíny AV ČR, následně byly předány k analýze jejich mechanických vlastností. Laboratoř poskytla snímky vypěstovaných buněk z konfokálního fluorescenčního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO, které vypovídají o vlivu úpravy povrchu na tvar buněk. (Obr. 17)

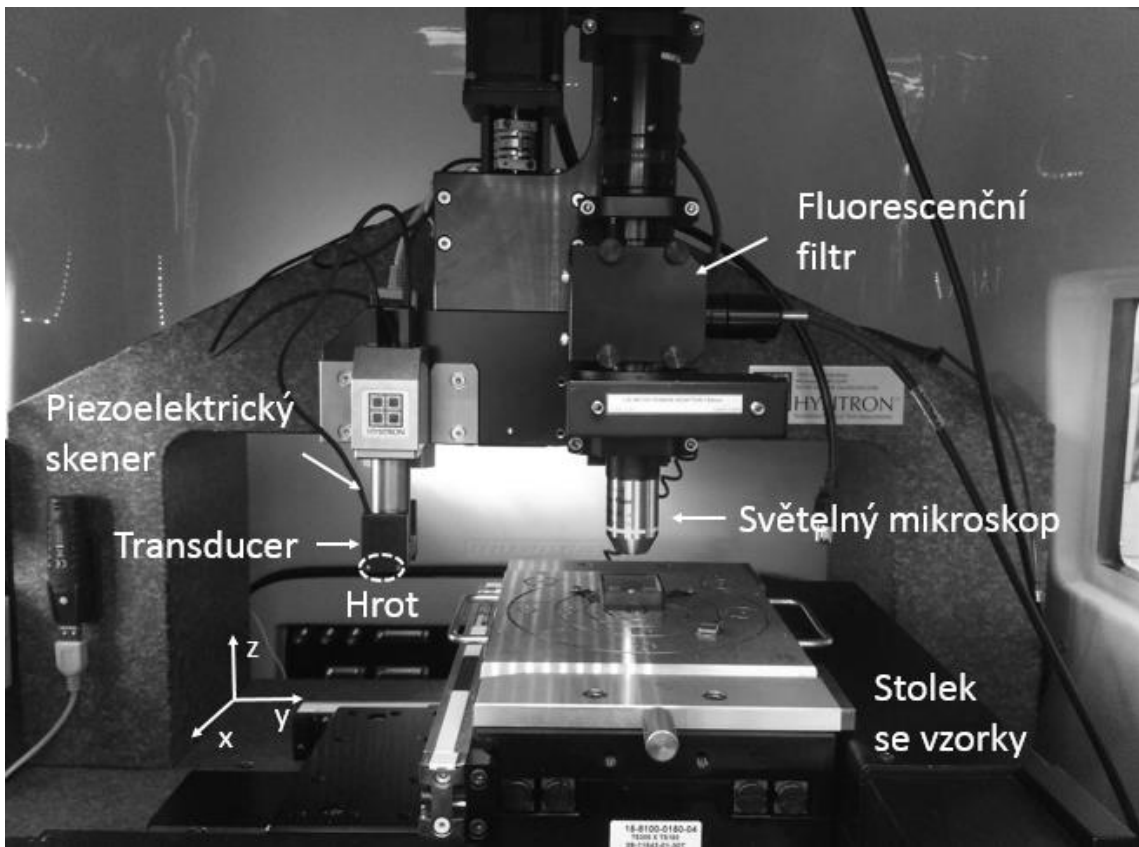
Bezprostředně před měřením mechanických vlastností pomocí instrumentované nanoindentace byly buňky obarveny fluorescenčním barvivem, aby byl jasně vidět celý obrys buňky v mikroskopu s horním osvětlením, který je zabudovaný v nanoindentoru. Pro obarvení byly buňky inkubovány 30 minut v roztoku $2,5 \mu l$ fluorescenčního barviva BCECF a $248,5 \mu l$ základního média. (Při excitačním záření s vlnovou délkou 488nm barvivo BCECF emituje záření s vlnovou délkou 505-535nm.) Poté byl roztok s barvivem odsát, buňky byly omyty PBS roztokem a celý disk umístěn do přípravku zalitého základním médiem s 10% FBS (fetálního bovinního séra), v kterém pak probíhalo samotné měření. Veškerá příprava buněk byla prováděna v sterilním prostředí laminárního boxu. Na obr. 16 vlevo je vidět titanový disk s leštěným povrchem s živými buňkami umístěný v přípravku.



Obr. 17: Buňky Saos-2 vypěstované na různých typech titanového povrchu a kontrolní vzorek buněk vypěstovaných na skle. Fluorescenční barvení: Vinculin (zeleně), F-actin (červeně), jádro (modře). Připraveno v laboratořích ústavu experimentální medicíny AV ČR.

4.2 Použité přístroje

Měření mechanických vlastností buněk Saos-2 bylo provedeno na přístroji pro nanomechanické testování Hysitron TI 950 TriboIndenter™. Přístroj byl osazen světelným mikroskopem s fluorescenčním filtrem Olympus U-MWIB3 (propouští excitační záření s vlnovou délkou 460-495nm a emisní záření s vlnovou délkou 505nm). Dále byl použit transducer nanoDMA® III s rozsahem sil 70nN-10mN, rozsahem frekvencí 0,1-301Hz a rozsahem posuvu ve směru osy z $10\mu\text{m}$. Do transduceru byl upnut konosférický hrot s vrcholovým úhlem $\alpha = 90^\circ$ a poloměrem zakřivení $R = 9\mu\text{m}$.



Obr. 18: Nanoindentor Hysitron TI 950 TriboIndenter™.

4.3 Postup měření

Nejprve byla optickým mikroskopem vybrána buňka, která bude následně testována, její souřadnice xy byly uloženy a také bylo vybráno místo vedle buňky pro referenční indentaci.

Před každým měřením byla provedena automatická kalibrace transduceru. Nejprve bylo potřeba získat vertikální polohu povrchu vzorku. Pomocí funkce Imaging se hrot naslepo přibližoval k povrchu ve vybraném místě vedle buňky. Jakmile byl detekován kontakt, systém zaznamenal souřadnici z . Poté byl hrot vysunut $8\mu m$ nad povrch a byla provedena dynamická kalibrace transduceru. Během dynamické kalibrace byla diskrétně zvětšována statická síla, při každé hodnotě síly byla zvětšována frekvence z 0 na $301Hz$, zároveň byla průběžně zaznamenávány síla a posuv. Dále pak byla provedena statická kalibrace, při níž byl vysunut hrot do maximální vzdálenosti a následně zasunut zpět. Zaznamenané síly vyvolané vlivem prostředí byly následně odfiltrovány z měření.

Po zkalibrování transduceru byla ihned provedena nanoindentace. Počátek nanoindentace byl ve výšce $8\mu m$ nad povrchem vzorku ve vybraném místě ve vzdálenosti $15-20\mu m$ od buňky. Byla tak získána referenční indentační křivka média a povrchu vzorku mimo buňku. Následně byla stejným postupem provedena nanoindentace buňky. Mezi nanoindentací buňky a referenční nanoindentací nebyl hrot úplně vyzdvižen z média, byla změněna pouze pozice indentu. Obě měření byla provedena v nanoDMA módu se stejnou zatěžovací funkcí. Nastavení přístroje popisuje tab. 3. Během zatěžování rostla kvazistatická síla z 0 do $F_{max} = 3000\mu N$ a zároveň hrot osciloval. Oscilace byla předeepsána amplitudou dynamické síly $F_o = 0,06\mu N$ a frekvencí oscilace $f = 125Hz$. Tímto postupem bylo vybráno a indentováno nejméně 12 buněk na každém ze čtyř disků s odlišným povrchem. Po každých pěti indentacích byl hrot očištěn tak, že byla provedena indentace polykarbonátu, tím byl hrot zbaven případných biologických nečistot, které mohly na hrotu ulpět. Všechna měření byla provedena nejdéle do 3 hodin od vyjmutí vzorků z inkubátoru, aby byla zajištěna viabilita buněk během testování.

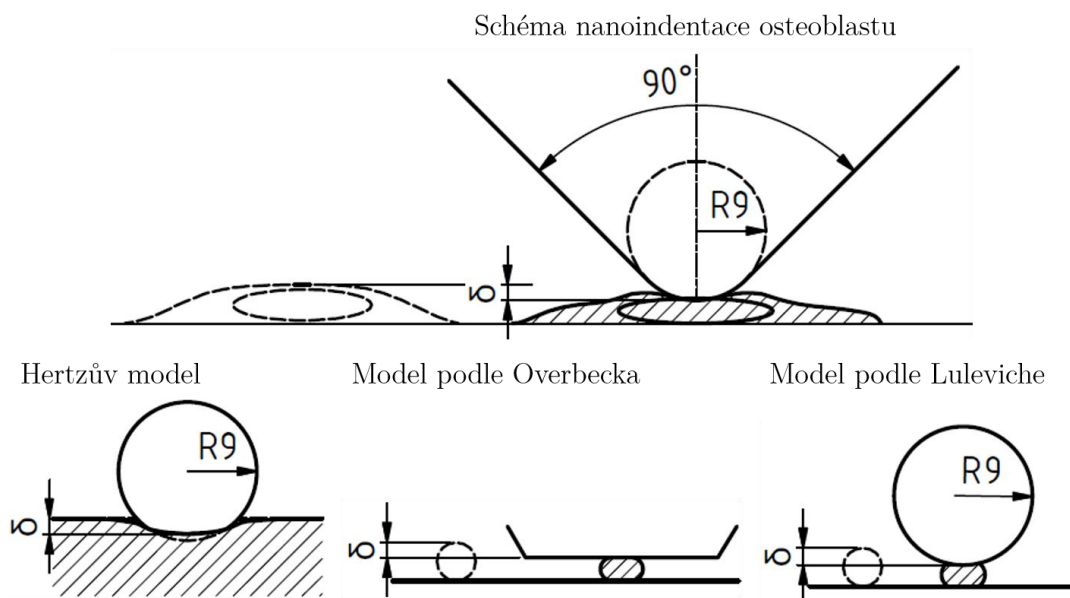
Tab. 3 : Konfigurace systému pro nanoDMA analýzu

Měřicí přístroj:	Hysitron TI 950 TriboIndenter™
Vybavení přístroje:	1D Transducer pro nanoDMA
Hrot:	Konosférický: $R = 9\mu m$, $\alpha = 90^\circ$
Řízení:	Open loop
Maximální kvazistatická síla:	$F_{max} = 3000 \mu N$
Amplituda dynamické síly:	$F_o = 0,06 \mu N$
Frekvence dynamické síly:	$f = 125 Hz$
Rychlost zatěžování:	$200 \mu N/s$

4.4 Analýza dat

a) Výběr analytického modelu

Pro určení modulu pružnosti jako veličiny charakterizující mechanické vlastnosti buňky bylo nejprve nutné zvolit analytický model, který bude použit. Z fluorescenční mikroskopie (Obr. 17) je vidět, že tvar lidských osteoblastů na titanovém povrchu rozhodně není kulový, ale spíše protáhlý a zploštělý. Průměr jádra se pohybuje kolem $20\ \mu\text{m}$ a délka celé buňky pak kolem $40\ \mu\text{m}$. Z literatury je také možné získat přibližnou výšku lidských osteoblastů pěstovaných na čistém titanu. Z měření topografie buněk Saos-2 na titanu pomocí AFM v [33] byla naměřena výška osteoblastu kolem 4000nm . To je ostatně i ve shodě s naměřenými daty, z nichž je patrné, že výška buněk se pohybuje kolem 5000nm . Díky přibližné informaci o rozměrech buňky a přesně definované geometrii použitého hrotu bylo pro jasnější představu vytvořeno schéma nanoindentace živé buňky v měřítku, které je vidět na obr. 19. Výška nedeformované buňky na obrázku je 5000nm a posuv hrotu při deformaci je $\delta = 2000\text{nm}$.



Obr. 19: Schéma nanoindentace lidského osteoblastu, jehož výška je 5000nm . (nahore) Geometrická interpretace analytických modelů. (dole) Čárkovaně: model buňky o výšce 5000nm . Šrafovaně: model buňky po deformaci $\delta = 2000\text{nm}$.

Pro určení modulu pružnosti inženýrských materiálů z dat získaných nanoindentací se běžně používá teorie Olivera a Pharra. Ta však vyžaduje odlehčovací křivku. Při nanoindentaci buněk vždy došlo k jejich poškození a během odlehčování již nebyla zaznamenána žádná odezva buňky, tudíž nebylo možné odlehčovací křivku použít.

Model, který použil Overbeck, předpokládá kompresi kulové membrány mezi dvěma deskami. Tento model nebyl použit, protože během experimentu s plochým hrotem nebylo možné zajistit dokonalé planparalelní uložení hrotu s povrchem vzorku. Pro vyřešení tohoto problému by bylo nutné instalovat zařízení pro kompenzaci naklonění plochého hrotu, jako provedl Overbeck v [27].

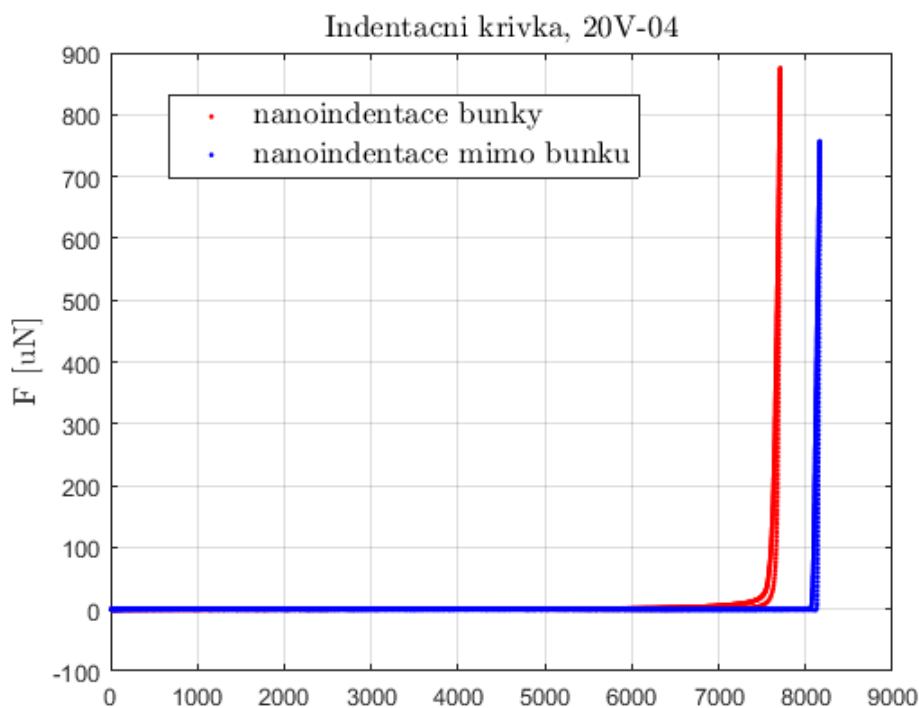
Konosférickému hrotu dobře odpovídá model podle Luleviche, který uvažuje jako indenter kouli. Buňku pak uvažuje jako kulovou membránu o tloušťce t . Osteoblast však není kulový a zjednodušením komplexního tvaru osteoblastu vysokého $5000nm$ na kouli o průměru $5000nm$ by došlo k zanedbání všech struktur uvnitř buňky a také velké části jeho objemu. Hlavní překážkou, proč nebylo možné tento model použít, nebyl pouze tvar buněk, nýbrž fakt, že nanoindentor není tak citlivý jako AFM a neumožňuje získat dostatek dat během indentace samotné membrány o tloušťce jen několik nm .

Pro určení modulu pružnosti buňky byl tedy zvolen Hertzův model, který uvažuje hrot jako kouli o poloměru $R = 9\mu m$ a buňku vzhledem k hrotu jako nekonečně velký homogenní poloprostor, čímž se zanedbává veškerá geometrie buňky a odlišnost vnitřních struktur. Nicméně během deformace buňky do hloubek až tisíce nanometrů byl zaznamenán dostatek dat pro vyhodnocování. Výsledný modul pružnosti pak přísluší celé buňce jako celku, nikoli pouze její membráně.

b) Indentační křivka

Výstupem experimentu je indentační křivka buňky a indentační křivka média v těsné blízkosti buňky. Indentační křivka je závislost síly F na posuvu δ a skládá se z křivky zatěžování a odlehčování. Indentační křivka buňky číslo 4 na titanovém disku s povrchovou úpravou 20V je vidět na obr. 20. Nejstrmější růst síly je v hloubce, kdy již hrot indentuje tvrdý povrch

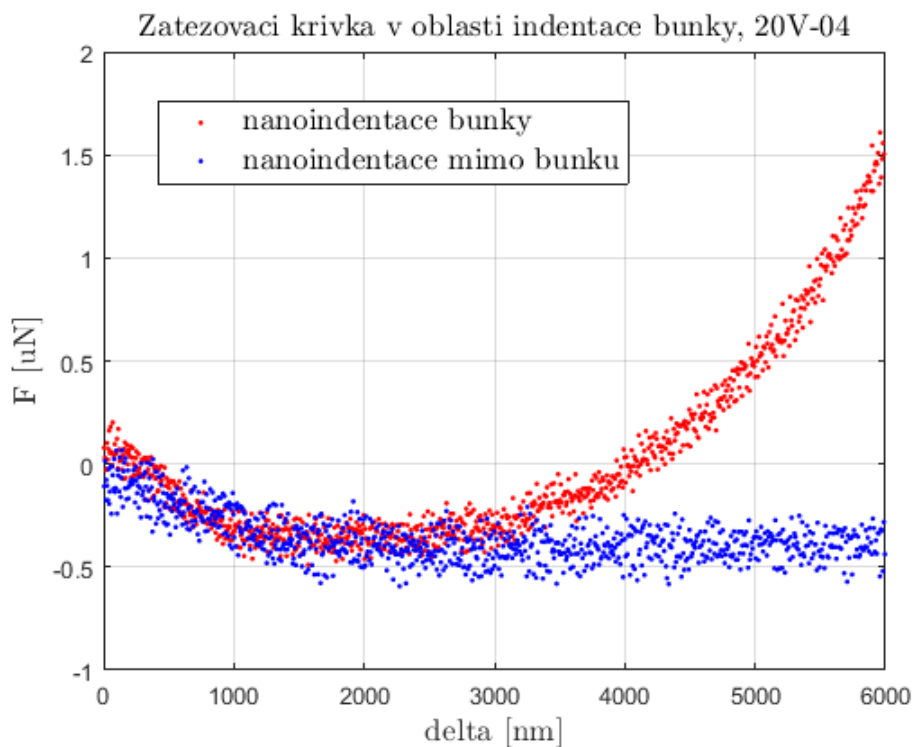
titanového disku. Po dosažení maximální síly dochází k odlehčování a úplnému návratu do počáteční polohy.



Obr. 20: Indentační křivka buňky a média mimo buňku.

c) Výběr části zatěžovací křivky

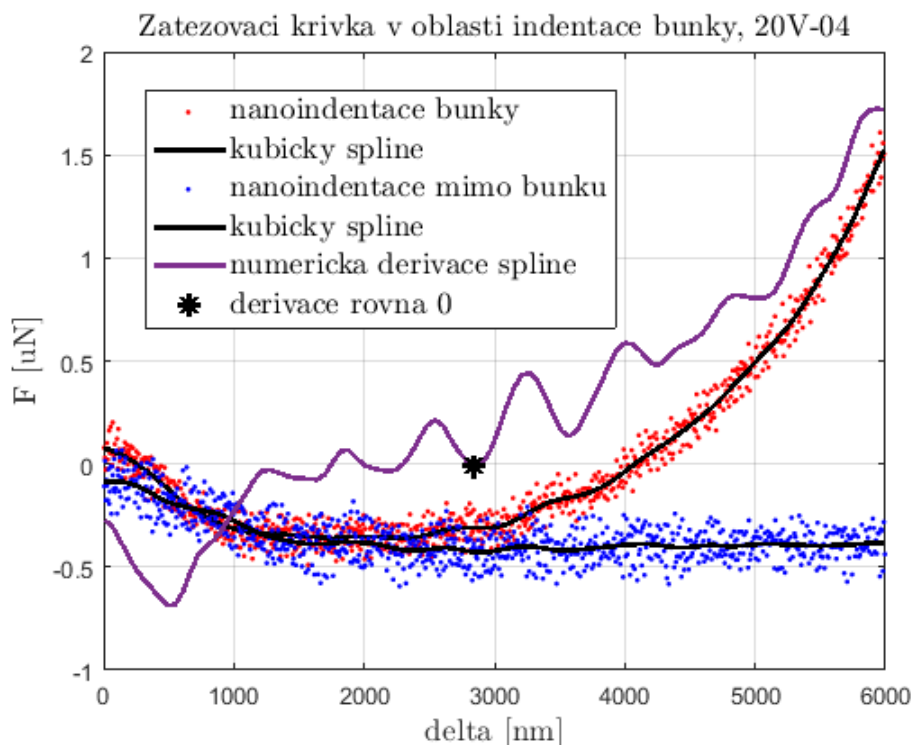
Během indentace buňky je růst síly pozvolnější a dosažené hodnoty jsou výrazně nižší než při indentaci titanového povrchu. Detail části křivky, kdy je indentována buňka, je znázorněn červeně na obr. 21. Modře znázorněná data jsou naměřená pouze v médiu vedle buňky. Dokud hrot nedosáhne hloubky, při níž již indentuje povrch titanového disku, je průběh síly detekované v médiu přibližně konstantní. Obě zatěžovací křivky mají zpočátku velmi podobný průběh, protože nanoindentace začíná ve stejné výšce nad povrchem disku. Jakmile se začne zatěžovací křivka buňky lišit od zatěžovací křivky média, je patrné, že hrot začal indentovat buňku. Určení počátku indentace buňky je klíčové pro vyhodnocení jejích mechanických vlastností. Vzhledem k tomu, že během nanoindentace došlo k poškození buňky, k vyhodnocení je použitelná pouze zatěžovací křivka, nikoli odlehčovací.



Obr. 21: Detail části zatěžovací křivky v hloubce, kdy je indentována pouze buňka nikoli povrch disku (červeně) a část naměřených data při indentaci média mimo buňku ve stejné hloubce (modře).

d) Určení počátku indentace buňky

Jak je vidět z obr. 21 v hloubce mezi 2000nm a 3000nm dojde k oddělení zatěžovacích křivek. 1000nm je poměrně široké rozmezí, proto bylo třeba zvolit metodu, jakou bude počátek určován. Vzhledem k množství a různorodosti naměřených dat by nebylo efektivní vyhodnocovat jednotlivě každou křivku a spoléhat pouze na vlastní odhad počátku indentace buňky. Proto byl zvolen následující postup. Pro automatické určení počátku indentace buňky je zatěžovací křivka nejprve proložena kubickým spline. Pro určení sklonu zatěžovací křivky je numericky vypočtena první derivace kubického spline. Hloubka, ve které je derivace rovna nule a následně je sklon zatěžovací křivky pouze kladný, je prohlášen za počátek indentace buňky. Vyhlazení dat pomocí kubického spline a průběh derivace je vidět na obr. 22.



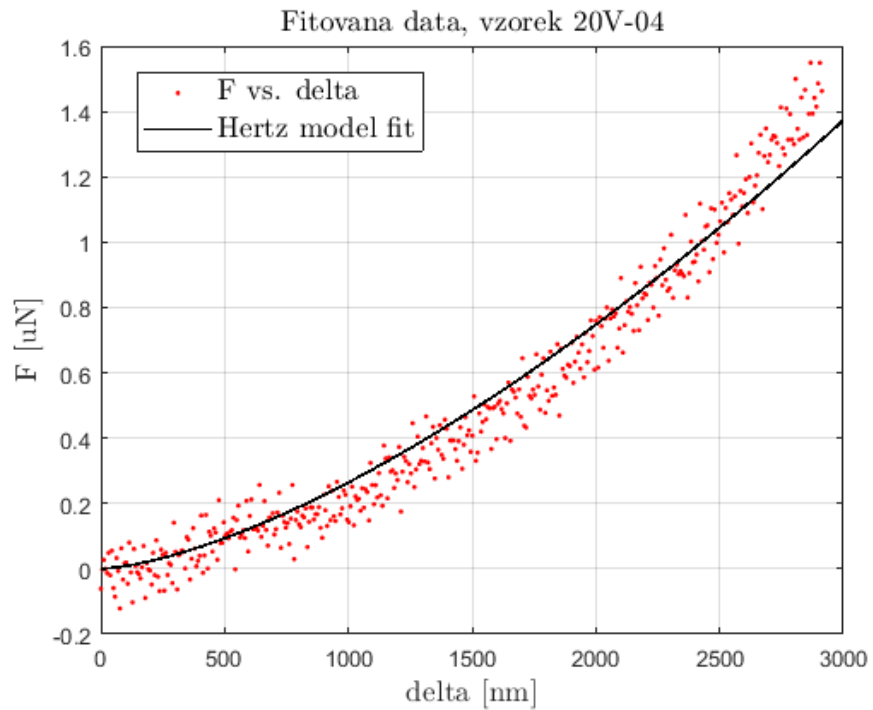
Obr. 22: Určení počátku indentace buňky pomocí numerické derivace kubického spline, jímž je proložena zatěžovací křivka.

e) Posunutí počátku do nuly a omezení intervalu

Pokud je určen počátek indentace buňky, jsou vybrána pouze data z intervalu ohraničeného počátkem indentace a maximální hloubkou. Hloubka a síla na počátku je považována za nulovou a celá křivka je tak posunuta do nuly. Maximální hloubka indentace je určena jako $\delta_{max} = 2930 \text{ nm}$, to je maximální hloubka, při níž se konosférický hrot chová pouze jako kulový a tak je splněn předpoklad Hertzova modelu, že indentace je provedena koulí.

f) Proložení připraveného úseku dat analytickým modelem a určení modulu pružnosti

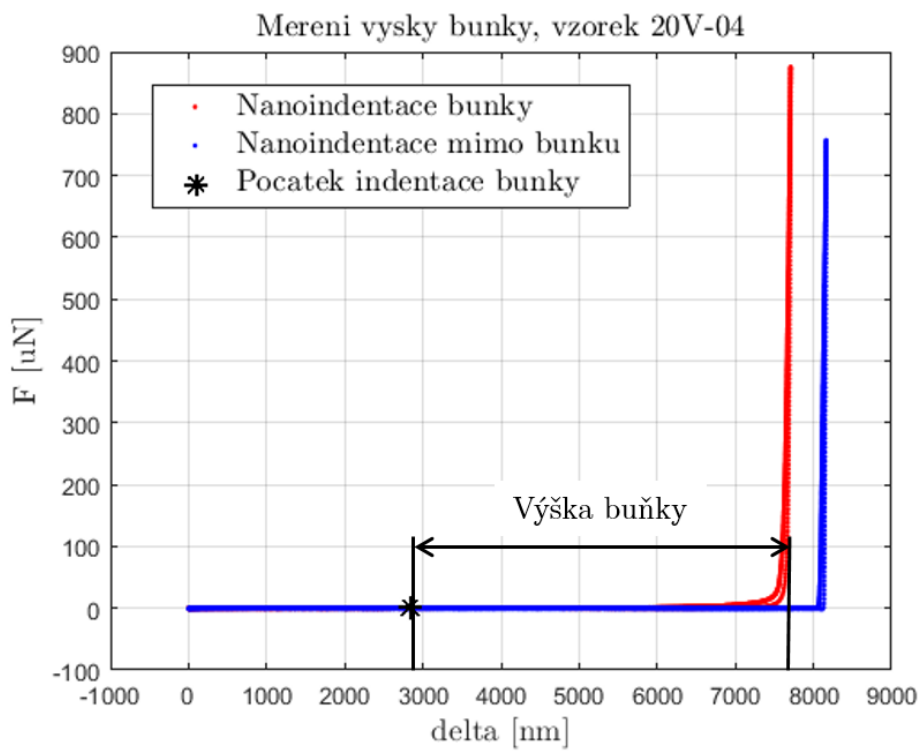
Vybraná část indentační křivky je následně proložena Hertzovým modelem podle rovnice (5). (Obr. 23) K proložení byla zvolena metoda nejmenších čtverců. Pro všechny výše popsané operace byl použit program MATLAB.



Obr. 23: Vybraná část indentační křivky buňky proložená Hertzovým modelem pomocí metody nejmenších čtverců.

g) Výpočet výšky buňky

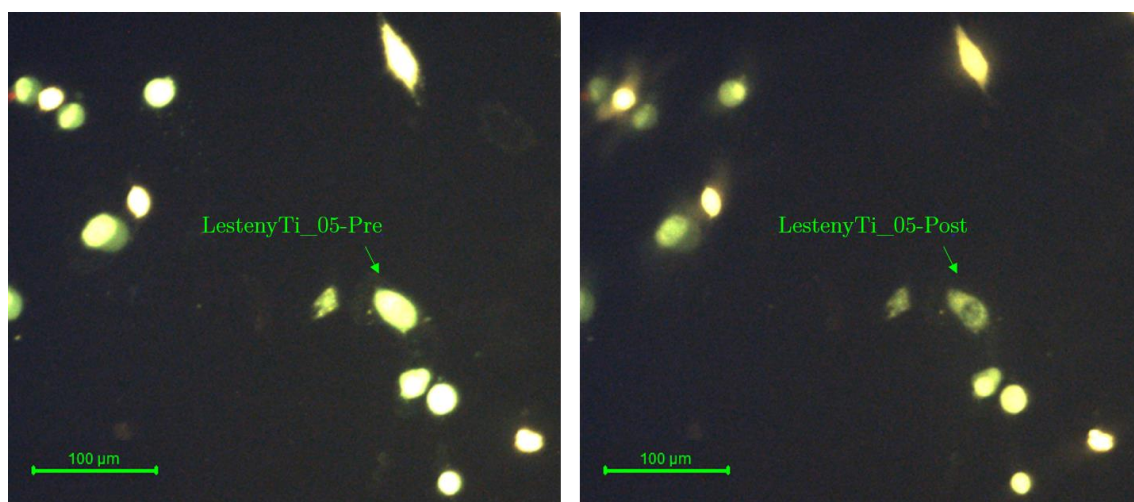
Pokud je již znám počátek indentace buňky, je poměrně snadné určit výšku buňky v místě indentace, jak je vidět na obr. 24. Výška buňky je vypočtena jako rozdíl maximální indentační hloubky, při které hrot narazil na povrch titanového disku, a hloubky, v níž došlo k prvnímu kontaktu s buňkou.



Obr. 24: Výška buňky.

5 Výsledky

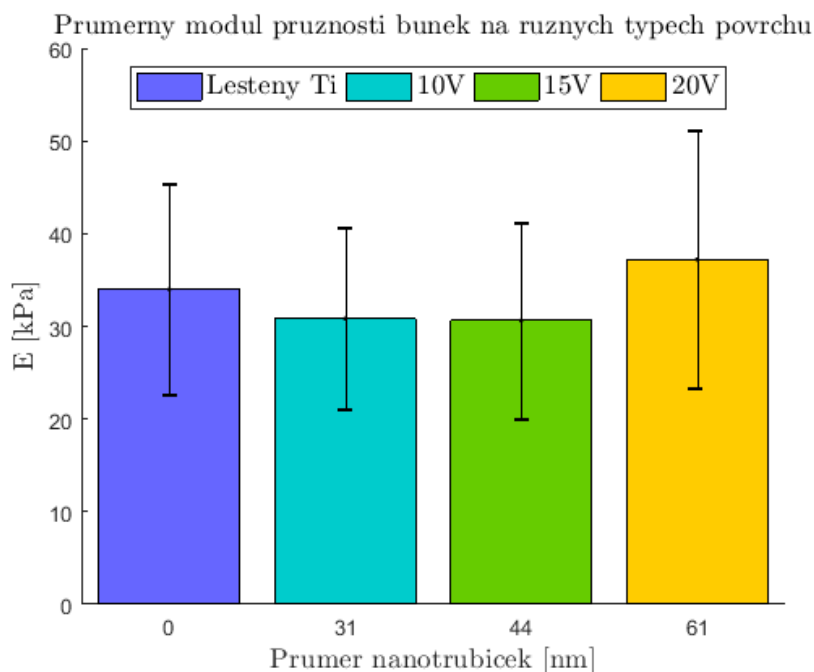
Během experimentu byla pomocí nanoindentoru Hysitron TI950 TriboIndenter™ provedena nanoindentace živých lidských osteoblastů Saos-2 vypěstovaných na titanu s nanotrubičkami o různých průměrech a tedy různou porozitou povrchu. Experiment byl proveden za účelem zjistit, zda má modifikace povrchu vliv na modul pružnosti buňky. Proto byly také výsledky porovnány s hodnotami naměřenými na buňkách vypěstovaných na leštěném titanu, který nebyl nijak modifikován. Před každým měřením byla buňka vybrána a zacílena pomocí světelného mikroskopu, který je součástí nanoindentoru. Snímek buňky číslo 5 na leštěném titanu pořízený před a po nanoindentaci je na obr. 25. Z rozdílu mezi snímky je vidět, že došlo k indentaci buňky, na snímku pořízeném po nanoindentaci je patrný kruhový otisk hrotu v buňce, což potvrzuje, že buňka byla indentována.



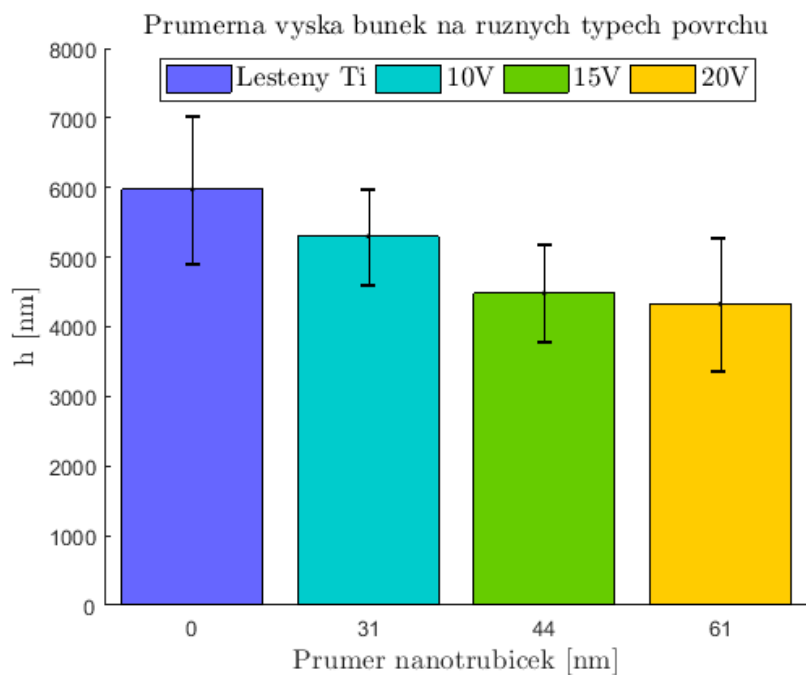
Obr. 25: Snímek lidského osteoblastu na čistém titanu pořízený před a po nanoindentaci pomocí zabudovaného světelného mikroskopu. Buňky obarveny fluorescenčním barvivem.

Na každém typu povrchu bylo indentováno dvanáct buněk. Modul pružnosti živých lidských osteoblastů Saos-2 vypěstovaných na leštěném titanu a na povrchu s titanovými nanotrubičkami o průměru 31nm, 44nm a 61nm byl určen proložením dat analytickým modelem podle Hertze. Průměrné hodnoty modulu pružnosti buněk jsou vykresleny na obr. 26. Průměrná hodnota modulu pružnosti buňky na leštěném titanu je $E = 34,0 \pm 11,4$ kPa. Na povrchu s titanovými nanotrubičkami o průměru 31nm a 44nm je průměrný modul pružnosti téměř shodný a je asi o 10% nižší než modul pružnosti buněk na leštěném titanu. Při průměru nanotrubiček

61nm hodnota modulu pružnosti naopak roste a je asi o 9% vyšší než modul pružnosti buněk na leštěném titanu a o 24% vyšší než modul pružnosti buněk na povrchu s nanotrubičkami o menších průměrech.



Obr. 26: Průměrné hodnoty modulů pružnosti buněk vypěstovaných na různých typech povrchu a směrodatné odchylky průměrných hodnot.



Obr. 27: Průměrné výšky buněk vypěstovaných na různých typech povrchu a směrodatné odchylky průměrných hodnot.

Z obr. 27 je vidět, že průměr nanotrubiček na povrchu pod buňkami má vliv na výšku buňky. S rostoucím průměrem nanotrubiček výška buňky klesá. V tab. 4 je zapsán průměrný modul pružnosti buněk na jednotlivých typech povrchů, průměrná výška buňky a počet vyhodnocených měření, z kterých byl průměrný modul vypočten. V tabulce je také zapsána průměrná hodnota parametru spolehlivosti fitu R^2 , který vysvětluje, kolik procent variability dat proložený model popisuje.

Tab. 4: Průměrné hodnoty modulu pružnosti a výšky buněk

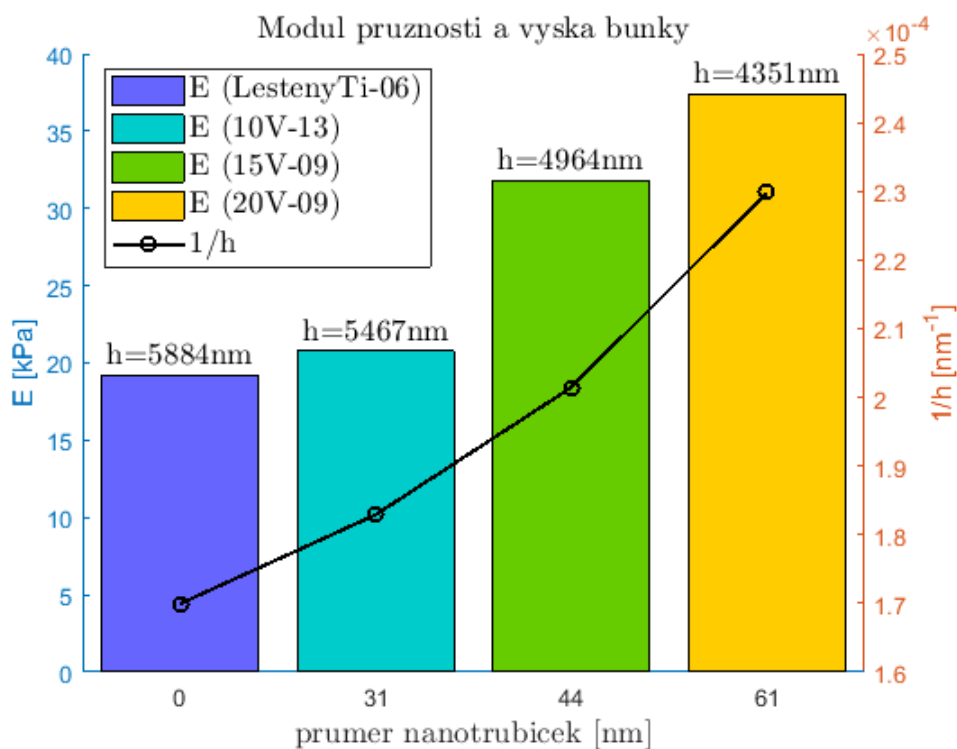
Typ povrchu	Průměr trubiček [nm]	Průměrný modul $E \pm \text{SODCH}$ [kPa]	R^2 [%]	Průměrná výška $h \pm \text{SODCH}$ [nm]	Počet měřených buněk
Leštěný Ti	0	$34,0 \pm 11,4$	91	5973 ± 1052	11
10V	31	$30,8 \pm 9,8$	93	5301 ± 686	10
15V	44	$30,6 \pm 10,6$	87	4484 ± 704	10
20V	61	$37,2 \pm 13,9$	90	4329 ± 955	11

6 Diskuze

6.1 Interpretace výsledků

Výsledné průměrné moduly pružnosti buněk vypěstovaných na různých typech povrchů se pohybují kolem 30 a 40 kPa. Průměrný modul pružnosti buněk vypěstovaných na nanotrubičkách s největším průměrem je nejvyšší, avšak žádná výrazná závislost průměrného modulu pružnosti na průměru nanotrubiček není z obr. 26 na první pohled patrná. Směrodatná odchylka navíc dosahuje až 37% průměrných hodnot, tudíž není možné z průměrných hodnot jednoznačně rozlišit vliv typu povrchu na modul pružnosti buněk Saos-2. Je třeba se ptát, jak může různě modifikovaný povrch stejného chemického složení zapříčinit změnu mechanických vlastností buněk stejného typu, vypěstovaných naprosto stejným způsobem. Nejjednodušší možné vysvětlení je, že odlišná struktura povrchu umožní buňce odlišně uspořádat cytoskelet a vnitřní orgány, čímž se změní i její globální mechanické vlastnosti. Na obr. 28, kde je zobrazena průměrná výška buňky na jednotlivých typech povrchů, je vidět poměrně jasná závislost. Čím větší je průměr nanotrubiček, tím menší je výška buňky. Jak je vidět i na obrázcích z fluorescenčního mikroskopu (obr. 17), tvar buňky na skle je výrazně odlišný od tvaru buňky na leštěném titanu i na titanových nanotrubičkách. Nanotrubičky na titanu se tvoří hlavně proto, aby vznikla na povrchu titanu struktura, která zajistí přívětivější prostředí pro kostní buňky a zlepší se tak osteointegrace titanových implantátů. A to se skutečně děje. Během sledování buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu v biologické laboratoři bylo totiž zjištěno, že buňky vrůstají do 3D struktury povrchu s nanotrubičkami. Jejich výška byla změřena až pomocí nanoindentace, čímž se tedy potvrdilo, že opravdu vrůstají do nanotrubiček a jejich výška se tedy s rostoucím průměrem nanotrubiček snižuje. To je jejich přirozená reakce, protože v těle, kde jsou buňky obklopeny extracelulární matricí a ostatními buňkami, nejsou přichycené svými integriny pouze v jedné rovině, jako je tomu na hladkém povrchu. Jakmile mají možnost, přichytí se k okolnímu prostředí v jakémkoli směru. Na leštěném titanu jsou buňky nejvíce vypouklé, protože mají všechny integriny, kterými jsou přichyceny k povrchu, v jedné rovině. Naopak na povrchu s největšími průměry nanotrubiček se některé integriny mohou přichytit uvnitř trubiček, čímž se část buňky dostane pod povrch a buňka se tak jeví nižší.

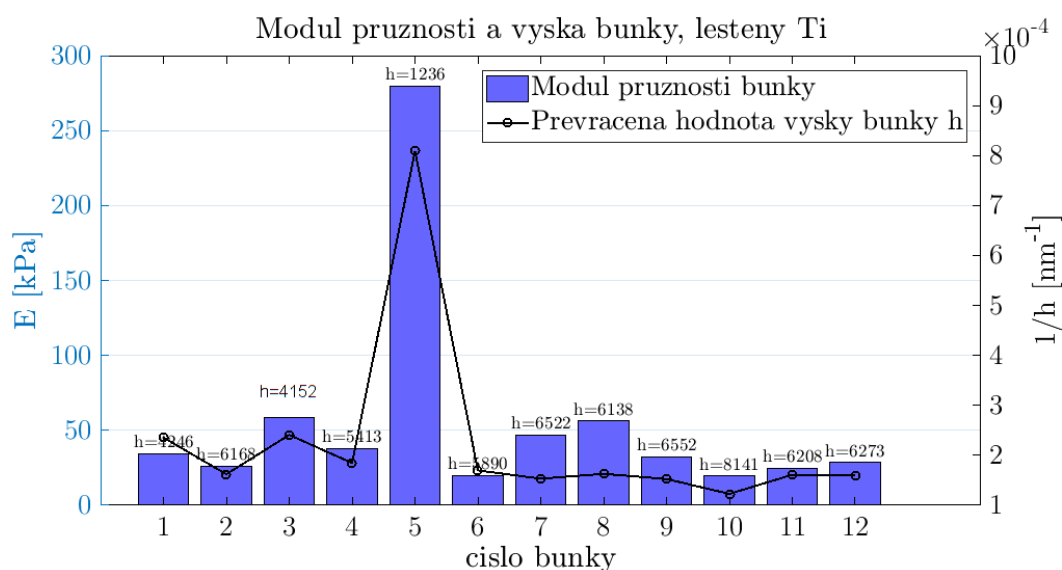
Průměrná výška buněk vypěstovaných na nanotrubičkách s průměrem 61nm je dokonce o 1644nm nižší než buněk na leštěném titanu, to je rozdíl o necelých 30%. Průměrné hodnoty modulů pružnosti a výšek jsou však málo vypovídající, protože jejich rozptyl je velmi výrazný. Mohlo by se zdát, že je to vlivem biodiverzity, avšak vše je jasnější, pokud se podíváme na obr. 28, kde je zobrazen modul pružnosti a výška vybraných jednotlivých buněk. Z obr. 28 je jasně vidět, že modul pružnosti buňky je nepřímo úměrný její výšce. Z toho tedy plyne, že nižší buňka se jeví jako tužší, není to však tím, že by se lišilo její složení, ale její tvar a hlavně vnitřní uspořádání. Čím je buňka nižší, tím větší její část je uvnitř nanotrubiček, v buňce jsou však orgány a jádro je natolik velké, že určitě zůstane na povrchu nanotrubiček, je tedy daleko blíže k povrchu samotné buňky, který je indentován. Během indentace tedy dříve dochází ke stlačování jádra, které má dokonce vlastní nukleoskelet, a buňka se tak jeví tužší a tedy i modul pružnosti je větší, protože je vyhodnocován vždy ze stejné délky vektoru naměřených dat.



Obr. 28: Modul pružnosti a výška buněk, jejichž výška se nejméně liší od průměrné výšky na každém typu povrchu.

Z průměrných hodnot však není tato závislost jasně vidět, protože výšky jednotlivých buněk na stejném typu povrchu se také liší. Rozptyl hodnot modulu

pružnosti a výšky buněk na leštěném titanu je vidět na obr. 29. Z některých měření dokonce vyšly hodnoty natolik odlišné, že nebyly zahrnuty do výpočtu průměrného modulu pružnosti. To je vidět na obr. 29, buňka číslo 5 má výšku jen $h = 1236nm$ a její modul pružnosti je tak výrazně vyšší než průměr. Protože modul pružnosti byl vždy vyhodnocen při maximální hloubce $\delta = 2930nm$ je jasné, že v tomto případě odpovídá spíše povrchu než samotné buňce. To mohlo být způsobeno například indentací pouze okrajové části buňky nikoli středu, kde je buňka nejvyšší, či poškozením buňky ještě před samotnou indentací.



Obr. 29: Závislost modulu pružnosti na výšce buňky, měřeno na čistém titanu.

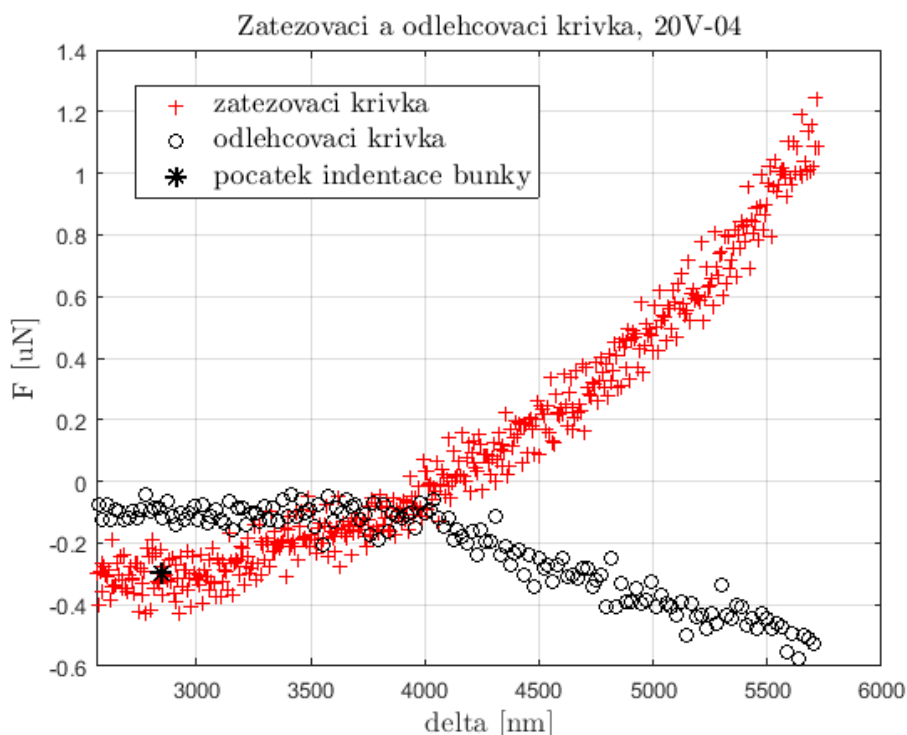
Z měření pomocí AFM mikroskopu a vyhodnocení zatěžovací křivky podle Hertzova modelu se hodnoty modulu pružnosti lidských osteoblastů na titanu pohybují v řádu jednotek kPa, jak bylo publikováno v [33]. Hodnoty modulu pružnosti získané z měření pomocí AFM jsou o řád nižší nejspíše proto, že hrot AFM mikroskopu indentuje buňku do hloubky pouze několik set nanometrů, tedy přibližně do o jeden řád menší maximální hloubky indentace. Modul tak nejlépe charakterizuje mechanické vlastnosti spíše povrchových struktur buňky.

V [5] se modul pružnosti lidských osteoblastů naopak pohybuje v řádu jednotek MPa. To může být vysvětleno tím, že v [5] byl první kontakt s buňkou detekován klasickým způsobem používaným při nanoindentaci tvrdých materiálů, tedy při detekci síly o velikosti $0,75\mu N$. Podrobněji je postup popsán v kapitole 2.4.1, důležité však je, že při takto velké síle je již měkká buňka výrazně stlačena.

Jak je vidět na obr. 30, v našem případě by při síle $0,75\mu N$ byla buňka stlačena o více než 2000nm, což představuje poměrně významnou počáteční deformaci buňky, dokonce 60% maximální hloubky, z které byla v našem případě data vyhodnocována. Modul pružnosti lidských osteoblastů změřený v [5] dosahuje tak vysokých hodnot, protože byl změřen ve výrazně větších indentačních hloubkách než v našem případě a popisuje tak hlavně mechanické vlastnosti jádra a je možné, že i samotného povrchu pod buňkami. V našem případě (indentace do hloubky $\delta_{\max} = 2930\text{nm}$) má na změřený modul pružnosti nejspíše největší vliv cytoskelet, hlavně pak aktinová krusta pod membránou, ale také jádro. Také je důležité uvážit, že v [20] byl modul pružnosti vyhodnocován z odlehčovací křivky podle teorie Olivera a Pharra nikoli ze zatěžovací křivky podle Hertzova modelu. Hodnoty modulu pružnosti změřené různými metodami tak nelze mezi sebou porovnávat a to nejen kvůli rozdílným hloubkám indentace, ale také kvůli odlišným postupům měření i vyhodnocování.

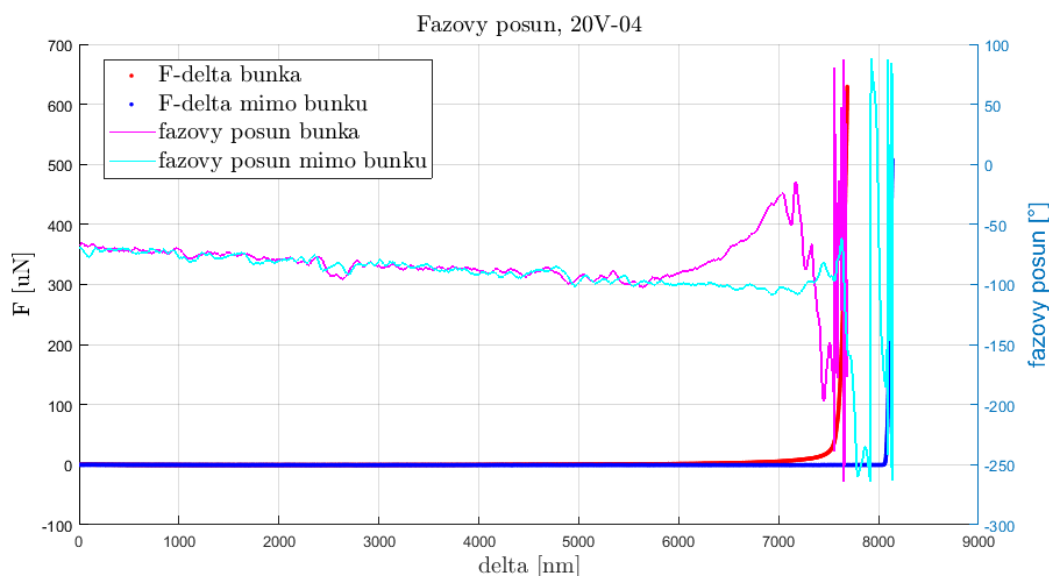
6.2 Důležité kroky a vlivy

Při nanoindentaci tvrdých materiálů se modul pružnosti běžně určuje z odlehčovací křivky. Z naměřených dat na obr. 30 je ale patrné, že během odlehčování nebyla zaznamenána žádná elastická odezva buňky a tudíž nebylo možné určit modul pružnosti buňky z odlehčovací křivky podle teorie Olivera a Pharra jako v [5]. Navíc by při tomto postupu vznikla významná počáteční deformace buňky při její detekci, jak již bylo zmíněno.



Obr. 30: Zatěžovací a odlehčovací křivka vzorku 20V-04. Během odlehčování poškozená buňka ulpívá na hrotu, a proto je síla při odlehčování záporná.

Aby nedošlo k ovlivnění výsledného modulu pružnosti počáteční deformací, byl zvolen podobný postup měření jako při nanoindentaci pomocí AFM mikroskopu, při kterém není buňka deformována ještě před samotným měřením. Největším problémem pak představuje určení počátku indentace buňky. Podle [29] (kapitola 2.4.1) je možné k přesnému určení počátku indentace použít režim DMA, který umožňuje měřit fázový posun. Díky odlišnému fázovému posunu změřenému v médiu a v buňce by pak bylo snadné určit počátek indentace buňky stejně jako v [29].

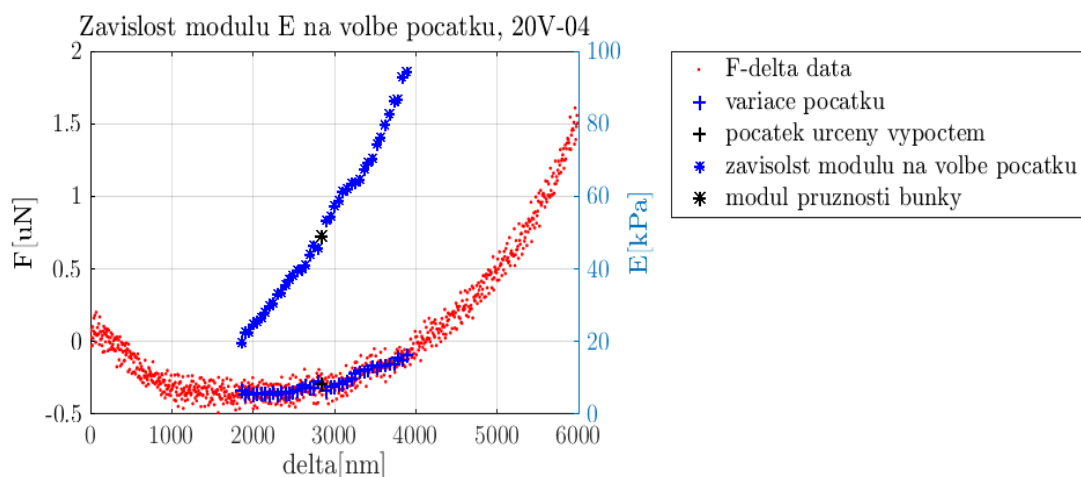


Obr. 31: průběh fázového posunu během indentace buňky a média.

Na obr. 31 je ale vidět, že fázový posun deformace buňky a média má po celou dobu téměř shodný průběh. Nedojde k žádné skokové změně v křivce fázového posunu při přechodu hrotu z média do buňky, jako tomu bylo v [29] na obr. 12. V indentační hloubce mezi 3000nm a 3500nm, kde se od sebe oddělují zatěžovací křivka média a buňky (detailně na obr. 21), sice dochází k většímu rozkmitu fázového posunu deformace buňky, avšak křivky fázového posunu v médiu a v buňce se následně opět spojí a pokračují stejným trendem, jako kdyby médium a buňka měli stejnou viskoelasticitu. Výrazná skoková změna fázového posunu nastává až v místě indentace titanového povrchu. Fakt, že nebyl detekován rozdíl mezi fázovým posunem měřeným v buňce a v samotném médiu, může být také způsoben odlišným nastavením zatěžovací funkce. Během měření byla rychlost zatěžování 400 krát větší než v [29] a amplituda síly byla pouze 20% amplitudy síly předepsané v [29], také nebyl použit plochý hrot, ale konosférický. Nakonec byl tedy zvolen podobný postup určení počátku indentace buňky, který se používá při vyhodnocování indentace prováděné pomocí AFM. Modul pružnosti byl pak také určen pomocí Hertzova modelu.

Určení počátku indentace buňky má velmi významný vliv na hodnotu modulu pružnosti buňky. Jak je vidět z obr. 32, pokud je počátek určen jen o 500nm hlouběji hodnota modulu pružnosti se zvýší o 32%, nárůst hodnot pak pokračuje přibližně stejným trendem. Proto je výhodnější určovat počátek indentace buňky

automaticky, čímž se eliminuje subjektivita volby a počátek je tak určen vždy podle stejného algoritmu. Algoritmus, jímž je počátek určen, přesto nezaručuje jeho přesné určení, ale dobrou opakovatelnost. Mírný vliv na polohu počátku má i parametr vyhlazení dat pomocí spline. Nepřesnost v určení počátku je však daleko menší, než jaká by byla při hledání prvního kontaktu s buňkou klasickým způsobem, používaným při nanoindentaci tvrdých materiálů.



Obr. 32: Závislost modulu pružnosti na volbě počátku indentace buňky při konstantní maximální indentační hloubce $\delta_{max} = 2930\text{nm}$.

Pro určení modulu pružnosti byl zvolen Hertzův model, tím se zanedbala rozdílnost mechanických vlastností jednotlivých buněčných struktur a organel. Také se neuvažovala možnost toku kapaliny skrz membránu během indentace, přestože by vysvětlovala, proč při odlehčování nebyla detekována žádná elastická síla. V [26] bylo zjištěno, že při rychlosti zatěžování nižší než 1500nm/s se projevuje vliv viskoelasticity buněčných struktur a může také docházet k úniku tekutin z buňky, experiment byl však proveden pouze na kulových kvasinkách. Nicméně rychlost zatěžování v našem případě byla kolem 573nm/s , tedy poměrně nízká a mohlo tak opravdu dojít k úniku kapaliny, čímž by se vysvětlila absence elastické reakční síly při odlehčování, přestože nedošlo k prasknutí buňky. Vzhledem k tomu, že posuv hrotu byl omezen maximální dosaženou silou F_{max} ne však hloubkou, došlo k úplnému stlačení buňky a dokonce i k indentaci titanového povrchu pod buňkou. Proto se předpokládalo, že k úniku kapaliny a porušení membrány došlo až při extrémní kompresi a únik kapaliny během indentace do 2930nm byl považován za zanedbatelný. Tudíž byl objem buňky považován po celou dobu

indentace za konstantní. Nejvýznamnějším zjednodušením však bylo zanedbání veškeré geometrie buňky, která pak byla považována vůči hrotu za nekonečně velký homogenní poloprostor.

7 Závěr

Nejprve byla provedena rešeršní studie metod použitelných k určení mechanických vlastností buněk, aby byla vybrána metoda, která se nejvíce podobá instrumentované nanoindentaci. Nejpodobnější instrumentované nanoindentaci je metoda AFM, jejíž výsledky a postupy byly následně více nastudovány, aby posloužila k inspiraci pro postup měření a vyhodnocení mechanických vlastností buněk pomocí instrumentované nanoindentace. Dále byly nastudovány publikace, v kterých již byla provedena instrumentovaná nanoindentace živých buněk různého typu. V neposlední řadě byla také provedena rešeršní studie stavby buněk.

Pomocí přístroje Hysitron TI 950 TriboIndenter™ byla provedena nanoindentace živých lidských osteoblastů z kmene Saos-2, které byly vypěstovány na různých typech titanového povrchu. Typy povrchů byly následující: leštěný titan, vrstva titanových nanotrubiček na leštěném titanu s průměrem trubiček 31nm, 44nm a 61nm o různých výškách. Nanoindentace byla provedena v kultivačním médiu, aby byla zajištěna viabilita buněk. Nanoindentace proběhla v režimu nanoDMA, a začátek zkoušky byl zvolen v dostatečné výšce nad buňkou, aby nedošlo k její počáteční deformaci. Proto bylo nutné následně určit počátek indentace buňky, kdy hrot, pohybující se v kapalném médiu, detekoval buňku. Pro určení prvního kontaktu s buňkou byla zvolena metoda, používaná při vyhodnocování indentace prováděné AFM mikroskopem. Naměřená data (závislost síly F na posuvu δ) byla nejprve vyhlazena pomocí interpolace kubického spline, poté byl vypočten průběh první derivace křivky a v místě kde se derivace rovnala nule a následně již pouze rostla, byl určen počátek indentace buňky. Pro proložení analytickým modelem byla ze zatěžovací křivky vybrána pouze část omezená počátkem nanoindentace a maximální indentační hloubkou odpovídající hloubce, při které se konosférický hrot chová pouze jako kulový a celá křivka pak byla posunuta do nuly, tak aby v místě počátku byla naměřená síla a posuv nulové. Následně byla takto připravená data proložena Hertzovým modelem a byl tak určen modul pružnosti buňky. Díky zvolené metodě bylo možné také vypočítat počáteční výšku nedeformované buňky.

Dále pak proběhla analýza vlivu typu povrchu na mechanické vlastnosti buňky. Bylo zjištěno, že typ povrchu má výrazný vliv na výšku buňky a tedy i její tvar. Povrch s největším průměrem nanotubiček a zároveň jejich největší výškou umožnil buňkám nejvíce vrůst do struktury a průměrná výška buňky tak byla nejnižší. Modul pružnosti se pak jevil vyšší, což bylo zřejmě způsobeno vnitřním uspořádáním buňky. Ukázalo se také, že průměrné hodnoty modulu pružnosti mají velký rozptyl, avšak jednotlivé hodnoty jsou nepřímo závislé na výšce buňky. Z toho tedy vyplývá, že metodu instrumentované nanoindentace je možné použít pro hodnocení osteointegrace. Pro nejlepší osteointegraci je pak pro lidské osteoblasty nejvýhodnější povrch s největším průměrem nanotubiček. Pro výběr nejvhodnějšího typu povrchu pro kostní implantáty z hlediska osteointegrace je však ještě třeba vyhodnotit výsledky z kvalifikace biologických procesů v buňkách a kvantifikace syntézy kostního tkaniva buněk na jednotlivých typech povrchu.

Cíle práce byly tímto splněny. Pro potvrzení výsledků i pro kvalitnější vyhodnocení a lepší představu by bylo vhodné v budoucnu instalovat laterální kameru, která by snímala buňku během indentace, také by umožnila přesnější popis tvaru buňky před i během indentace. Pak by bylo nutné najít vhodnější model pro přesnější výpočet modulu pružnosti živé buňky, který zahrne i její geometrii a také vlastnosti a odlišnost vnitřních struktur. Přesnější model by pak lépe vystihl mechanické vlastnosti buňky a bylo by tak snadnější pochopit, jaké konkrétní mechanické vlastnosti jsou klíčové pro správnou funkci buněk. Instrumentovaná nanoindentace by se mohla měřit s metodou evaluace mechanických vlastností buněk pomocí AFM mikroskopu. Díky své jednoduchosti a rychlosti oproti příliš podrobnému skenování buňky pomocí AFM mikroskopu by dokonce mohla být vhodnější metodou pro určování modulu pružnosti buňky.

8 Použitá literatura

- [1] S. N. Bhatia a D. E. Ingber, „Microfluidic organs-on-chips“, *Nat. Biotechnol.*, roč. 32, č. 8, s. 760–772, srp. 2014.
- [2] C. R. Jacobs, H. Huang, a R. Y. Kwon, *Introduction to cell mechanics and mechanobiology*. New York: Garland Science, 2013.
- [3] M. N. Starodubtseva, „Mechanical properties of cells and ageing“, *Ageing Res. Rev.*, roč. 10, č. 1, s. 16–25, led. 2011.
- [4] J. Zemła, J. Danilkiewicz, B. Orzechowska, J. Pabijan, S. Seweryn, a M. Lekka, „Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues“, *Semin. Cell Dev. Biol.*, roč. 73, s. 115–124, led. 2018.
- [5] R. Khanna, K. S. Katti, a D. R. Katti, „Experiments in Nanomechanical Properties of Live Osteoblast Cells and Cell–Biomaterial Interface“, *J. Nanotechnol. Eng. Med.*, roč. 2, č. 4, s. 041005, 2011.
- [6] V. Vymětalová, České vysoké učení technické v Praze, a Fakulta biomedicínského inženýrství, *Biologie pro biomedicínské inženýrství*. Praha: Česká technika - nakladatelství ČVUT, 2008.
- [7] „Eukaryotic Cells | Boundless Biology“. [Online]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/eukaryotic-cells/>. [Viděno: 14-úno-2018].

- [8] „Pearson - The Biology Place". [Online]. Dostupné z: http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/cytoreview.html. [Viděno: 05-čer-2018].
- [9] D. E. Ingber, „The architecture of life", *Sci. Am.*, roč. 278, č. 1, s. 48–57, led. 1998.
- [10] Ptáček, „CYTOLOGIE – I (stavba buněk)". [Online]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm>. [Viděno: 15-úno-2018].
- [11] K. Haase a A. E. Pelling, „Investigating cell mechanics with atomic force microscopy", *J. R. Soc. Interface*, roč. 12, č. 104, s. 20140970–20140970, led. 2015.
- [12] M. Daniel, T. Mareš, V. Kralj-Iglič, a A. Iglič, *Biomechanics of biomembranes*. V Praze: České vysoké učení technické, 2007.
- [13] A. Vaziri a A. Gopinath, „Cell and biomolecular mechanics in silico", *Nat. Mater.*, roč. 7, č. 1, s. 15–23, led. 2008.
- [14] R. Bullen, W. Bullen, a H. Bullen, „Introduction to Scanning Probe Microscopy(SPM)". Northern Kentucky University, 2006.
- [15] M. L. Rodriguez, P. J. McGarry, a N. J. Sniadecki, „Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches", *Appl. Mech. Rev.*, roč. 65, č. 6, s. 060801, říj. 2013.
- [16] D. Rugar a P. Hansma, „Atomic force microscopy.", *Phys. Today*, roč. 1990, č. 43.10, s. 23–30.

- [17] R. Kubínek, „Sborník seminárních materiálů- Moderní mikroskopie“. [Online]. Dostupné z: <https://databaze.opvk.cz/Product/Detail/66311>. [Viděno: 11-úno-2018].
- [18] „AFM probes, AFM tips, AFM cantilevers - BudgetSensors“. [Online]. Dostupné z: <https://www.nanoandmore.com/Colloidal-Nanomechanics-AFM-Probes>. [Viděno: 05-čer-2018].
- [19] S. Kasas, P. Stupar, a G. Dietler, „AFM contribution to unveil pro- and eukaryotic cell mechanical properties - ScienceDirect“, *Semin. Cell Dev. Biol.*, č. 73, s. 177–187, 2018.
- [20] M. Vůjtek, R. Kubínek, M. Mašláň, Univerzita Palackého, a Katedra experimentální fyziky, *Nanoskopie*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012.
- [21] G. Thomas, N. A. Burnham, T. A. Camesano, a Q. Wen, „Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy“, *J. Vis. Exp.*, č. 76, čer. 2013.
- [22] A. C. Fischer-Cripps, *Nanoindentation*, 2nd ed. New York: Springer, 2004.
- [23] Hysitron, „TI 950 TriboIndenter User Manual“. 2011.
- [24] W. C. Oliver a G. M. Pharr, „An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments“, *J. Mater. Res.*, roč. 7, č. 06, s. 1564–1583, čer. 1992.

- [25] K. P. Menard, *Dynamic mechanical analysis: a practical introduction*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- [26] J. Arfsten, C. Bradtmöller, I. Kampen, a A. Kwade, „Compressive testing of single yeast cells in liquid environment using a nanoindentation system“, *J. Mater. Res.*, roč. 23, č. 12, s. 3153–3160, pro. 2008.
- [27] A. Overbeck, S. Günther, I. Kampen, a A. Kwade, „Compression Testing and Modeling of Spherical Cells - Comparison of Yeast and Algae“, *Chem. Eng. Technol.*, roč. 40, č. 6, s. 1158–1164, čer. 2017.
- [28] D. C. Lin, E. K. Dimitriadis, a F. Horkay, „Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—I. Non-adhesive Indentation of Soft, Inhomogeneous Materials“, *J. Biomech. Eng.*, roč. 129, č. 3, s. 430, 2007.
- [29] J. Sepitka, P. Grznarova, T. Fuzik, a J. Lukes, „Compression tests of a living cell: a contact detection problem“, *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, roč. 17, č. sup1, s. 40–41, srp. 2014.
- [30] T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik, a R. I. Zhdanov, „Atomic force microscopy probing of cell elasticity“, *Micron*, roč. 38, č. 8, s. 824–833, pro. 2007.
- [31] M. Carin, D. Barthès-Biesel, F. Edwards-Lévy, C. Postel, a D. C. Andrei, „Compression of biocompatible liquid-filled HSA-

alginate capsules: Determination of the membrane mechanical properties", *Biotechnol. Bioeng.*, roč. 82, s. 207–212, dub. 2003.

[32] V. V. Lulevich, D. Andrienko, a O. I. Vinogradova, „Elasticity of polyelectrolyte multilayer microcapsules", *J. Chem. Phys.*, roč. 120, č. 8, s. 3822–3826, úno. 2004.

[33] J. Domke, S. Dannöhl, W. J. Parak, O. Müller, W. K. Aicher, a M. Radmacher, „Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, roč. 19, č. 4, s. 367–379, pro. 2000.