

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



ANALÝZA MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ ŽIVÝCH BUNĚK

Diplomová práce

Martin Herda

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Herda** Jméno: **Martin** Osobní číslo: **424765**  
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:

**Analýza mechanických vlastností živých buněk**

Název diplomové práce anglicky:

**An analysis of mechanical properties of living cells**

Pokyny pro vypracování:

1. Kritická rešerše (klíčová slova: mechanical properties, living cells, nanoindentation)
2. Zpracování experimentálních dat
3. Aplikace vhodného matematického modelu na naměřená data
4. Porovnání a interpretace mechanických vlastností buněk kultivovaných na různých substrátech

Seznam doporučené literatury:

1. OVERBECK A, GUNTHER S, KAMPEN I, KWAEDE A. Compression testing and modeling of spherical cells-comparison of yeast and algae. Chem Eng Technol. 2017, 40:1158-1164.
2. ALBERTS B, ALEXANDER JOHNSON A AND LEWIS J. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

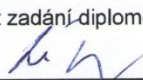
**Ing. Josef Šepitka, Ph.D., FS, ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**

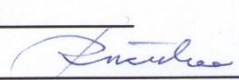
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

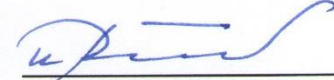
Datum zadání diplomové práce: **25.04.2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **16.08.2019**

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

Diplomant bere na vědomí, že je povinen 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.

**30.4.2019**  
Datum převzetí zadání

  
Podpis studenta

# ANOTAČNÍ LIST

**Jméno autora:** Bc. Martin Herda

**Název DP:** Analýza mechanických vlastností živých buněk

**Anglický název:** An analysis of mechanical properties of living cell

**Rok:** 2019

**Obor studia:** Biomechanika a lékařské přístroje

**Ústav/odbor:** Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

**Vedoucí práce:** Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

**Bibliografické údaje:** Počet stran: 60

Počet obrázků: 33

Počet tabulek: 8

## **Klíčová slova:**

Mechanické vlastnosti, modul pružnosti, živé buňky, rakovinové buňky, melanom, nanoindentace, komprese buněk, kultivace buněk

## **Keywords:**

Mechanical properties, elastic modulus, living cells, cancerous cells, melanoma, nanoindentation, cells compression, cell cultivation

**Anotace:**

Tato diplomová práce se zabývá mechanickými vlastnostmi živých buněk, konkrétně rakovinových buněk melanomu, které byly měřeny pomocí kompresního experimentu. Pro získání modulu pružnosti z experimentálních dat byl použit analytický model, respektující geometrii buněk a uvažující buňku jako tenkostěnnou skořepinu. Práce poskytuje srovnání mechanických vlastností živých buněk kultivovaných na čtyřech odlišných podkladech.

**Abstract:**

This master thesis deals with mechanical properties of living cells, specifically with the cancerous melanoma cells, which have been measured by compression experiment. An analytical model, respecting cell geometry and considering the cell as a thin-walled shell was used to obtain the elastic modulus from the experimental data. This thesis provides a comparison of mechanical properties of living cells cultivated on four distinct surfaces.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně a použil pouze podklady uvedené v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu této práce Ing. Josefu Šepitkovi, Ph.D. za veškerý čas, který mi poskytl při našich konzultačních setkání, za jeho odbornou pomoc, cenné rady a podporu.

Děkuji také své ženě za velkorysou podporu, trpělivost a ohleduplnost, kterou mi věnovala po celé vysokoškolské studium.

Děkuji i svým rodičům za umožnění studovat a za poskytnutí všestranné péče nejen během studia.

Děkuji svým sourozencům a přátelům za cenný čas odpočinku, který jsem s nimi mohl během psaní této práce strávit.

# OBSAH

Anotační list .....	1
Seznam použitých symbolů .....	7
1 Úvod.....	8
2 Cíle.....	10
3 Teoretická část.....	11
3.1 Stavba buněk.....	11
3.2 Mechanické vlastnosti buněk.....	12
3.3 Rakovinové buňky .....	14
3.4 Mechanické vlastnosti rakovinových buněk .....	15
3.5 Experimentální metody k vyhodnocení mechanických vlastností buněk.....	17
3.5.1 Aspirace mikropipetou.....	18
3.5.2 AFM.....	18
3.5.3 Optické nůžky.....	19
3.5.4 Magnetické nůžky .....	20
3.5.5 Napínání substrátu.....	20
3.5.6 Proudění tekutiny .....	21
3.5.7 Akustické metody .....	21
3.5.8 Elektrické metody .....	21
3.5.9 Komprese .....	22
3.6 Analytické modely pro kompresní experiment.....	25
3.6.1 Hertzův model.....	26
3.6.2 Lulevichův model .....	26
3.6.3 Overbeckův model.....	27
3.6.4 Yokokurův model .....	28

4	Metody.....	29
4.1	Vzorky.....	29
4.2	Kompresní experiment.....	30
4.3	Úprava experimentálních dat.....	31
4.4	Úprava modelu dle Overbecka et al.....	35
4.5	Analýza dat.....	40
5	Výsledky .....	42
6	Diskuze .....	49
7	Závěr .....	54
8	Použitá literatura .....	57



## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

Symbol	Význam	Jednotka
$a$	Okamžitý průměr vnitřního válce plného toroidu	[m]
$A$	Rozměr hlavní poloosy elipsy	[m]
$a_0$	Průměr vnitřního válce plného toroidu před kompresí	[m]
$A_{sc0}$	Plocha polokruhu v průřezu plného toroidu před kompresí	[m <sup>2</sup> ]
$B$	Rozměr hlavní poloosy elipsy	[m]
$d$	Posuv hrotu	[m]
$D$	Okamžitý průměr	[m]
$D_0$	Počáteční průměr	[m]
$E$	Youngův modul pružnosti	[Pa]
$F$	Síla	[N]
$h$	Okamžitá výška buňky	[m]
$h_0$	Výška buňky před kompresní zkouškou	[m]
$p$	Vnitřní tlak	[Pa]
$P$	Aplikovaný tlak	[Pa]
$R$	Poloměr	[m]
$r_{c0}$	Centrální poloměr průřezu plného toroidu před kompresí	[m]
$t$	Tloušťka stěny	[m]
$V_{E0}$	Objem poloviny elipsoidu před kompresní zkouškou	[m <sup>3</sup> ]
$V_T$	Objem plného toroidu v průběhu komprese	[m <sup>3</sup> ]
$V_{T0}$	Objem plného toroidu před kompresní zkouškou	[m <sup>3</sup> ]
$\varepsilon$	Relativní deformace	[--]
$\vartheta$	Poissonova konstanta	[--]
$\sigma$	Napětí ve stěně skořepiny	[Pa]

# 1 ÚVOD

Zdraví člověka je ovlivněno správným fungováním orgánů v jeho těle. Tyto orgány jsou tvořeny tkáněmi, jejichž schopnosti určují zejména jednotlivé buňky. Výzkum buněk tak hraje nezastupitelnou roli při zkoumání příčin patologických stavů, při léčbě různých onemocnění či jejich prevenci, ale vede i k lepšímu porozumění lidskému organismu jako takovému.

Buňka je ovlivňována nejen chemicky, ale i mechanicky. Mechanické vlastnosti jednotlivé buňky jsou úzce spojeny s biologickými procesy jako je proliferace, diferenciace, migrace a adheze. Změny v mechanických vlastnostech buněk tak souvisí i s různými patologickými jevy a nemocemi. [1]

Na každou buňku tedy působí vnější síly, které ji ovlivňují. V důsledku působení těchto sil se tvar a vnitřní struktura buňky mění. Buňky se tímto buď posilují, nebo naopak degradují. To má široký dopad na zdraví a nemoci jak jednotlivých buněk, tak celého člověka. Například nepřetržité napínání axonů vyvolává jejich růst, popř. vede k jejich odpojení. [2]

Poznatky z oblasti mechaniky buněk nám mohou sloužit při diagnostice rakoviny, při výzkumu diferenciace kmenových buněk nebo stárnutí. Znalost vlastností jednotlivých buněk a jejich reakcí na určitý typ vnějšího podnětu (například i působení léků) tak může dopomoci k včasnému detekování fází rakoviny, ke schopnosti ovlivňovat kultivaci buněk, popřípadě k prodloužení buněčného života.

Mechanické vlastnosti jednotlivých rakovinových buněk jsou zkoumány již delší dobu. K popisu tuhosti jednotlivé buňky se používá Youngův modul pružnosti. Nejčastěji používaným experimentem v této oblasti je indentace pomocí AFM (mikroskopie atomárních sil). Modul pružnosti buňky je z tohoto experimentu získáván pomocí Hertzova modelu. Tato kombinace přístupů má svá omezení. Z Hertzova modelu jsme omezení předpokladem elastické, isotropní a homogenní buňky, AFM pak zohledňuje lokální vlastnosti, které se i v rámci jedné buňky mohou lišit. [3]

Dalším experimentem z oblasti mechaniky buněk je kompresní experiment. Komprese buňky umožňuje oproti lokální indentaci získat informace o chování celé buňky.

Tento experiment provedli na buňkách také Overbeck et al. [4]. Pomocí nanoindentoru srovnávali mechanické vlastnosti jednotlivých buněk kvasinek a řas. K získání modulu pružnosti buňky použili analytický model buňky jako kontinua i skořepinový model buněčné stěny.

V této práci aplikuji geometrický model buněčné stěny, inspirovaný právě Overbeckem et al., na data získaná z komprese buněk melanomu. Model upravuji pro specifickou geometrii těchto rakovinových buněk.

## 2 CÍLE

Provedení kritické rešerše v oblasti analýzy mechanických vlastností živých buněk.

Zpracování experimentálních dat, získaných z nanoindentačního experimentu.

Aplikace vhodného matematického modelu na naměřená data a získání parametru popisujícího mechanické chování jednotlivých buněk.

Interpretace výsledků a porovnání mechanických vlastností živých buněk kultivovaných na různých substrátech.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Stavba buněk

Buňka je základní stavební jednotkou lidského těla. Její velikost se pohybuje v řádu desítek mikrometrů. Skládá se z buněčné membrány, která obklopuje vnitřek buňky, tzv. cytoplasmu. V cytoplasmě se nachází cytoskelet spolu s jádrem buňky a na povrchu membrány buněčný plášť – glykokalyx. Protože se tato práce zabývá mechanickými vlastnostmi, jsou v následujících kapitolách popsány jednotlivé části buňky zejména z tohoto pohledu. Uvedeny jsou tak v první řadě informace, které sledují cíl této práce.

#### A. Membrána

Membrána odděluje a ochraňuje vnitřní prostředí buňky od vnějšího a zajišťuje transport látek mezi těmito prostředími. Jedná se o fluidní membránu, která se skládá z dvojvrstvy lipidů a proteinů. Tloušťka této membrány je asi 5 nm. [5]

#### B. Glykokalyx

Glykokalyx je ochranný buněčný plášť na povrchu buňky. Jeho hlavní funkcí je ochrana buňky před mechanickým a chemickým poškozením. [5]

Jde o vrstvu oligosacharidů obalující vnější stranu buňky. Ty se mohou objevovat například ve formě glykoproteinů, nebo proteoglykanů, které jsou nejčastěji navázány na membránové proteiny kovalentní vazbou. [5] Tloušťka této vrstvy se pohybuje v rozmezí 40–400 nm. [6]

#### C. Cytoskelet

Cytoskelet je vnitřní část buňky tvořená systémem vláken, která zajišťují chemickou, biologickou a, pro nás nejvíce zajímavou, mechanickou funkčnost celé buňky. Cytoskelet je viskoelastický materiál, jehož uspořádání a složení určuje tvar buňky. Obsahuje buněčné organely, přenáší síly uvnitř buňky a reaguje mechanicky na vnější podněty, které přenáší do cytoplasmy. Skládá se ze tří typů vláken, kde každé vlákno má své specifické mechanické vlastnosti: [2]

*Mikrotubuly* jsou dutá vlákna o průměru cca 25 nm s velikostí lumen 15 nm. Z mechanického hlediska zajišťují pevnost a udržují tvar celé buňky. Přenášejí napětí zejména v tlaku. [2]

*Intermediální vlákna* mají průměr mezi 8–12 nm. Zajišťují pevnost buňky v tahu a nacházejí se napříč celým cytoskeletem, kde křížují mikrotubuly a aktinová vlákna, čímž poskytují celé buňce stabilitu. Mohou se protáhnout až o 250 %. [2]

*Aktinová vlákna* jsou dvojité šroubovice, které mají průměr cca 7 nm. Poskytují buňce tvar a zprostředkovávají její pohyb. Ve velké koncentraci se nacházejí pod povrchem buněčné membrány, čímž membráně vytváří pevnostní oporu. Přenášejí pouze tah. [2]

Důležitou roli zde hrají také proteiny, které spojují jak vlákna mezi sebou, tak vlákna s dalšími prvky v buňce. [5]

#### *D. Kortex*

Pod pojmem kortex rozumíme korovou oblast cytoplasmu navázanou na vnitřní stranu buněčné membrány. Je to síť tvořená aktinovými vlákny, obsahující též množství proteinů. Kortex pomáhá membráně nést napětí a udržovat její tvar. [5]

Tloušťka kortexu je u každé buňky jiná a pohybuje se od 100 nm (Diktyostelidy) do 4000 nm (oocyt myši). [7] Jiní autoři uvádějí tloušťku této vrstvy u eukaryotických buněk 100-1000 nm. [6]

#### *E. Jádro*

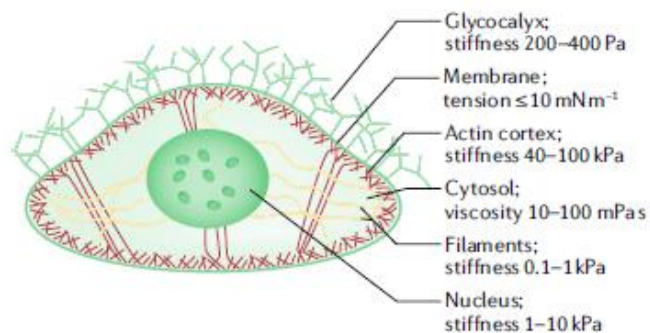
Jádro se nachází ve střední části buňky. Je obklopené cytoskeletem. Objem jádra se pohybuje v rozmezí 1/10 až 3/10 objemu celé buňky. U buněk melanomu je to pak cca 2/10. [8]

### 3.2 Mechanické vlastnosti buněk

Typickými představiteli mechanických vlastností jednotlivých buněk jsou elasticita, tuhost, viskoelasticita a dále pak adhezní vlastnosti. Tuhost je definována Youngovým modulem pružnosti  $E$ , který je u buněk mnohonásobně menší než u běžných materiálů. Například běžná ocel má hodnotu modulu pružnosti cca  $200 \times 10^9$  Pa, guma typicky

$10 \times 10^6$  Pa. Buňka jako celek má modul pružnosti srovnatelný například s pěnou na holení, tj.  $10^3$  Pa. [2]

Buňka je nicméně tvořena mnoha částmi, z nichž každá má také odlišné vlastnosti. Na Obr. 3.1 jsou vidět jednotlivé části savčí (živočišné) buňky a reprezentativní hodnoty jejich mechanických vlastností. Je zde například vidět, že kortex, tvořený aktinovými vlákny, má tuhost o řád vyšší než v předchozím odstavci uvedená tuhost celé buňky, tj.  $10^4$  Pa.



Obr. 3.1 Schéma savčí buňky a mechanické vlastnosti jejích jednotlivých částí. [6]

Mechanické vlastnosti buněk se mění podle okolního prostředí, podle sil, které na buňku působí. Je například dokázáno, že na mechanické vlastnosti buňky má vliv podklad, na kterém je buňka umístěna. Změnou tuhosti podkladu tak můžeme měnit tuhost buňky. [2]

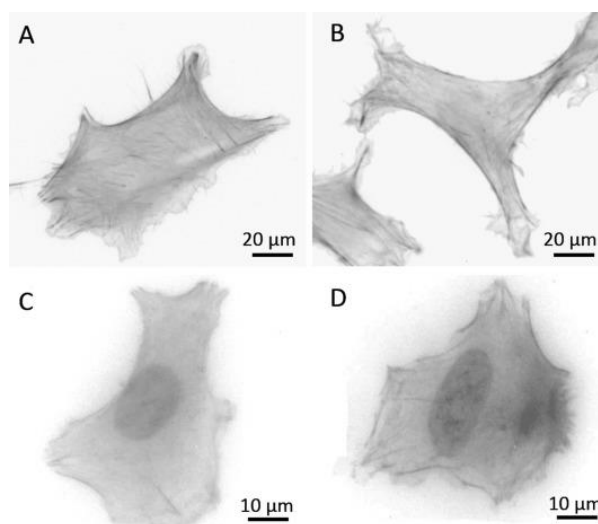
Buňka reaguje na prostředí velmi dynamicky, což dokazuje jiná studie, která ukazuje, že po aplikaci okamžitého napětí buňka fluidizuje, tj. její smykový modul klesá. Po nějakém čase relaxace ale smykový modul opět stoupá a buňka se v řádu stovek sekund dostává opět na svou původní tuhost. [9]

### 3.3 Rakovinové buňky

Tato práce zkoumá mechanické vlastnosti buněk melanomu. Melanom je nádorové onemocnění melanocytu, který se vyskytuje převážně v kůži. Tvoří ho rakovinové buňky, které mají obecně jiné vlastnosti než buňky zdravé. Například tuhost rakovinové buňky je oproti tuhosti zdravé buňky menší. To je způsobeno jiným uspořádáním struktury cytoskeletu a úbytkem aktinových vláken. [10]

Rakovinová buňka také většinou roste mnohem rychleji než zdravá buňka, jádro se častěji dělí, poměr jádro-cytoplasma je větší, větší je i jadérko. [11] Jádro rakovinové buňky prochází oproti zdravé buňce mnohými změnami. Jeho povrch, objem, tvar, hustota i struktura jsou tak od zdravé buňky odlišné. [12]

Rakovinová buňka, oproti normální, ztrácí vlastnost nazývanou „kontaktní inhibice“. Tento mechanismus zabraňuje zdravé buňce v dělení a růstu, jestliže přijde do kontaktu s jinou buňkou. Má za následek, že buňky tvoří pouze jednu vrstvu. Rakovinová buňka má také menší přilnavost k okolním buňkám a mezibuněčnému prostoru. Toto vše je důsledkem změn glykoproteinů na povrchu buňky a následkem je, že rakovinové buňky tvoří nádory, popřípadě metastazují. Jádro rakovinové buňky je velké a nepravidelné. Stejně tak celá buňka je oproti zdravé elipsoidní buňce nepravidelného a náhodného tvaru. [13]



Obr. 3.2 Organizace aktinových vláken v buňce melanomu. Zaznamenané fluorescenčním mikroskopem. [8]



Tloušťka kortexu melanomu, ve kterém jsou aktinová vlákna mající vliv na tvar a pevnost buňky, může být různě velká a je těžce dohledatelná přesnější hodnota. Je ale jisté, že přesahuje 100 nm a této hodnotě se blíží. [7]

Na Obr. 3.2 je vidět buňka melanomu s obarvenými aktinovými vlákny a jádrem (tmavší částí) zaznamenaná fluorescenčním mikroskopem. Z obrázku je také vidět, že rozměry buňky jsou v řádu desítek mikrometrů. Výška těchto buněk pak závisí na roztoku, ve kterém jsou naloženy, a pohybuje se v rozmezí 3.5-4  $\mu\text{m}$ . [14]

V těle se rakovinová buňka vyvíjí ze zdravé buňky, přičemž prochází různými fázemi. Během tohoto procesu mění svou strukturu, např. uspořádání cytoskeletu. [14]

### 3.4 Mechanické vlastnosti rakovinových buněk

Dosavadní měření mechanických vlastností rakovinových buněk probíhalo převážně pomocí AFM. Při tomto experimentu autoři většiny studií indentovali buňku do hloubek maximálně 400 nm. Ve většině případů bylo zjištěno, že rakovinová buňka má oproti zdravé menší tuhost, tj. menší modul pružnosti. [10]

Hodnoty modulu pružnosti rakovinových buněk získané z AFM se pohybují v řádu jednotek kPa. Například Bobrowska ve své práci udává hodnoty pro rakovinové buňky získané z buněčné linie ve fázi vertikálního růstu (WM115), z metastáze do kůže (WM2664) a z metastáze do plic (A375). Hodnoty jsou získané z indentace do hloubky až 700 nm [14], viz Tabulka 1. Pogoda et al. pak získali hodnoty z buněčné linie ve fázi radiálního růstu (WM35) a buněk získaných z metastáze do plic (A375) pro indentace do hloubky 1400 nm [15] a 200 nm [10], viz Tabulka 2.

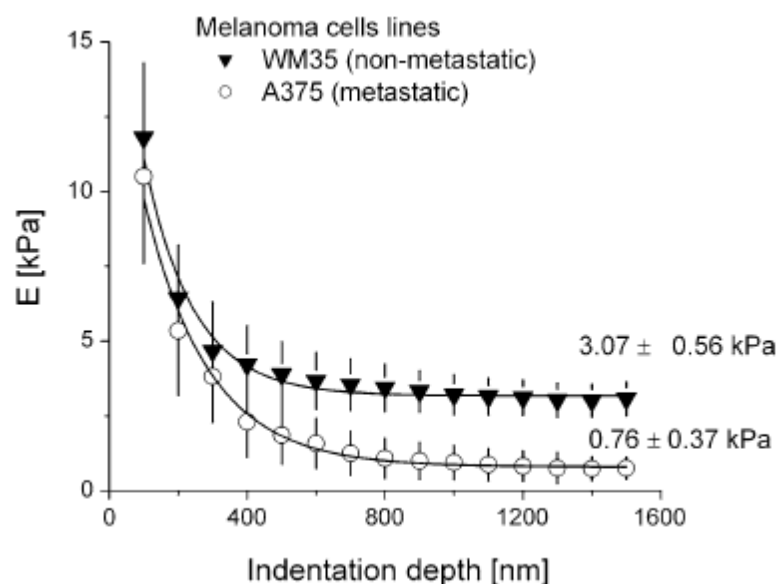
Tabulka 1 Hodnoty modulu pružnosti rakovinových buněk získaných z buněčných linií WM115, WM2664 a A375 dle [14]

Označení buňky	Modul pružnosti E [kPa]	Směrodatná odchylka [kPa]
WM115	9,33	1,96
WM2664	8,38	2,26
A375	6,26	1,76

Tabulka 2 Hodnoty modulu pružnosti rakovinových buněk získaných z buněčných linií WM35 a A375 dle [15] a [10]

Označení buňky	Hloubka indentace	Modul pružnosti E [kPa]	Směrodatná odchylka [kPa]
WM35	200	5,23	--
	1400	3,07	0,56
A375	200	5,10	--
	1400	0,75	0,37

Pogoda et al. ve své studii zkoumali pomocí AFM také závislost hloubky indentace na modulu pružnosti buňky a došli k závěru, že modul pružnosti s hloubkou indentace klesá. Zjistili také, že rozptyl hodnot pro modul pružnosti s rostoucí hloubkou indentace klesá a že až od hloubky větší než 500 nm lze s jistotou odlišit, zda buňka může metastazovat či ne, viz Obr. 3.3. [15]

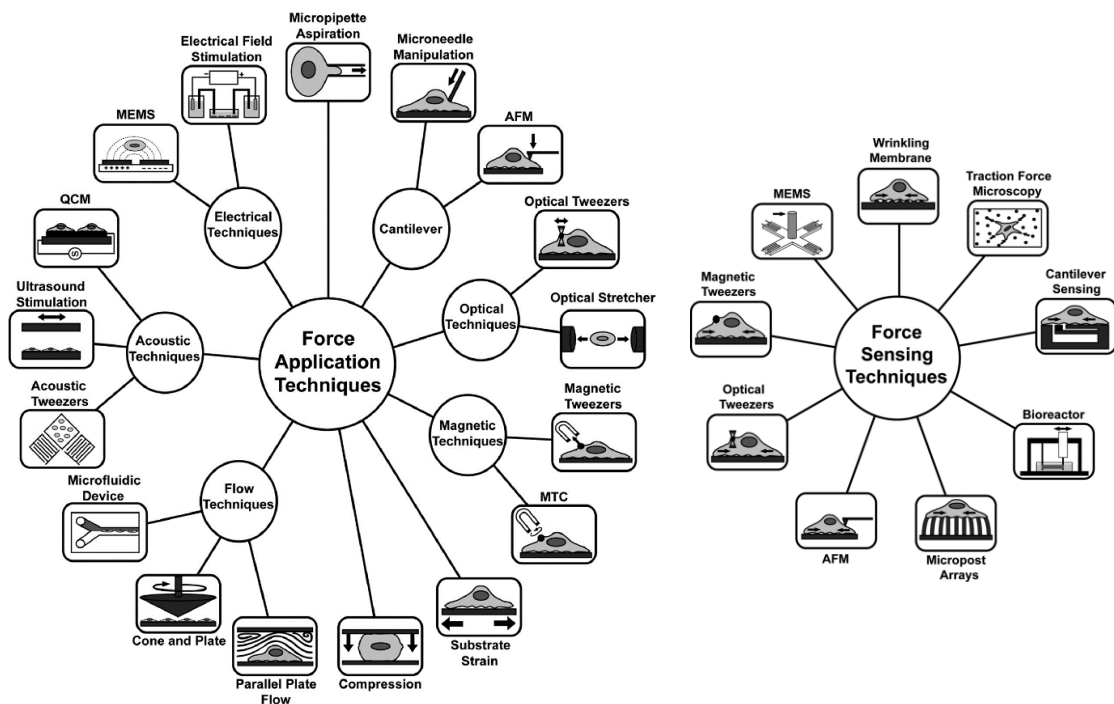


Obr. 3.3 Závislost Youngova modulu pružnosti E na hloubce indentace pro dva typy buněk melanomu: WM35 (nemetastazující) a A375 (metastazující). [15]

### 3.5 Experimentální metody k vyhodnocení mechanických vlastností buněk

Buňka je nejmenší stavební jednotkou lidského těla, které je složeno z milionů takových jednotek. Každá buňka má své specifické vlastnosti, které určují její chování v lidském těle. Zjistit mechanické vlastnosti jednotlivých buněk lze pomocí vhodného experimentu s vhodnými měřicími přístroji. Protože je buňka velice měkká, citlivá na velmi jemné podněty, požaduje se po měřicích přístrojích, aby měřily s vysokou citlivostí a byly vysoce výkonné.

Od druhé poloviny minulého století až do dnešní doby bylo použito různých nástrojů a přístupů pro zjištění mechanických vlastností buněk. V publikaci [16] autoři shrnují experimentální metody, které rozdělují do dvou skupin, viz Obr. 3.4. První skupinou jsou metody, ve kterých se měří mechanická odezva buňky na aplikovanou sílu. Naopak ve druhé skupině se snímají síly, které buňka při jejím deformování produkuje.

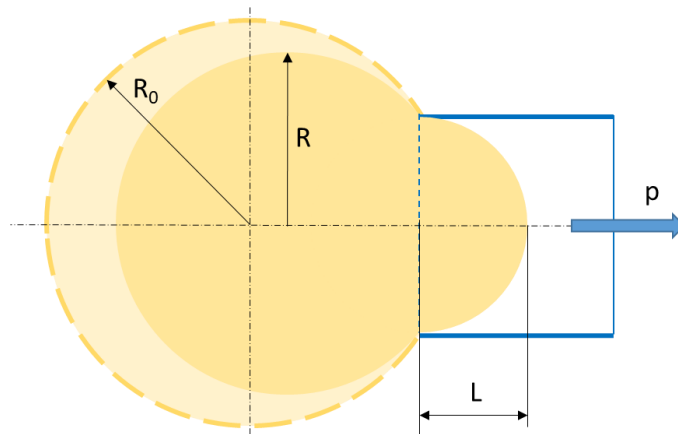


Obr. 3.4 Metody vyšetřování mechanických vlastností buněk. Vlevo metody aplikující sílu, vpravo metody snímající sílu. [16]

K měření mechanických vlastností buněk byla v této práci využita kompresní zkouška pomocí nanoindentoru, proto bude metoda komprese popsána podrobněji než zbývající metody, které jsou zde ve stručnosti shrnuty.

### 3.5.1 Aspirace mikropipetou

Jde o velmi jednoduchý a cenově levný experiment. Pomocí vysokofrekvenční kamery zjišťujeme, jak velká část buňky je pod určitým tlakem nasátá do pipety o známém průměru. Délku nasáté části vyčteme z optických snímků, stejně jako poloměr nenasáté části, viz Obr. 3.5. Z těchto rozměrů a z průměru pipety vypočítáme Youngův modul pružnosti buňky, popřípadě jiné mechanické vlastnosti, např. viskozitu. Touto metodou měříme mechanické vlastnosti celé buňky. Výhodou jsou velmi nízké síly, které je možné aplikovat na buňky (v řádu stovek pN) a variabilita buněk, které je možné měřit. Nevýhodou pak možnost porušení buňky nebo omezené pozorování, dané rozlišením kamery. [16], [17]



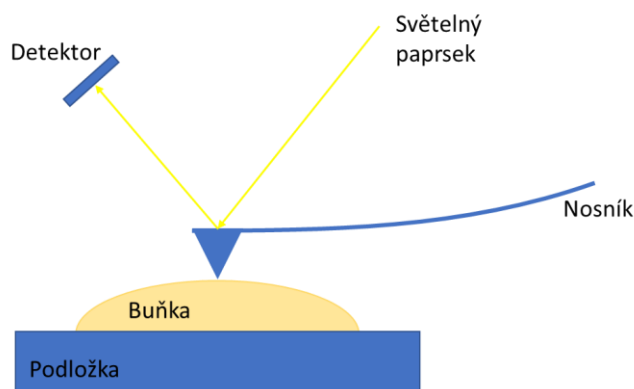
Obr. 3.5 Schéma experimentu aspirace mikropipetou, kde  $R_0$  je poloměr nenasáté buňky,  $R$  okamžitý poloměr vnější části buňky,  $L$  délka nasáté části a  $p$  je tlak pod kterým je buňka nasátá.

### 3.5.2 AFM

Mikroskopie atomární sil (AFM) je jeden z nejpoužívanějších experimentů na zjišťování mechanických vlastností buněk. K aplikaci síly je zde použit nosník mikro rozměrů, viz Obr. 3.6, na jehož konci je přichycen kuželovitý hrot. Poloměr zakřivení hrotu záleží na použití, ale může dosahovat hodnoty i menší než 7 nm [18]. Tento hrot na požadovaném místě indentuje buňku, čímž ji lokálně deformuje. Síla působící na hrot pak způsobí, že se ohýbá nosník, na němž je hrot přichycen. Poloha hrotu se vypočítá

z vertikálního posuvu nosníku a jeho ohybu, který je měřen pomocí laseru. Síla, která působí na hrot, je poté dopočítána z hodnot ohybu a známých ohybových vlastností nosníku. Tímto způsobem lze měřit vlastnosti struktur menších, než je buňka. Výhodou je veliká citlivost měření a relativní jednoduchost. [19]

Pomocí AFM se získají mechanické vlastnosti buňky v oblasti, která je hrotem indentovaná. Interpretace výsledků je tedy závislá na poloze hrotu a mechanické vlastnosti získané z jediné indentace jsou vlastnostmi lokálními. Získat globální vlastnosti celé buňky je složitější a vyžaduje provedení více indentací na různých místech buňky. V takovém případě je třeba brát v potaz změny v cytoskeletu, způsobené dynamickou indentací, které ovlivní každou následující indentaci. [3]

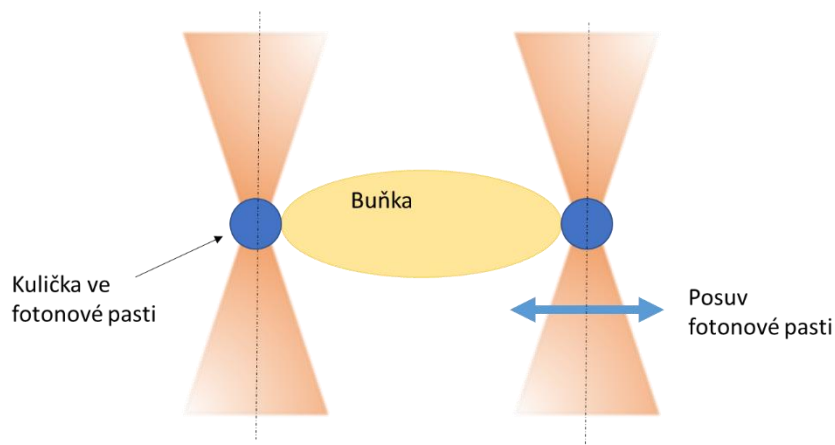


Obr. 3.6 Schéma AFM experimentu

### 3.5.3 Optické nůžky

Optické nůžky jsou nástroj, který dokáže manipulovat pomocí laseru a mikroskopu s různými objekty, bezkontaktně. Proud fotonů, vyzářený laserem, prochází skrz objekt. V důsledku lomu světla je jeho směr při průchodu objektem odkloněn od směru původního. Tato změna směru způsobí změnu celkového momentu, jež vyvolá působení sil na objekt. Jestliže pomocí mikroskopu soustředíme laser do jednoho bodu, objekt se bude nacházet v důsledku největšího gradientu právě v tomto bodě, bude v tzv. fotonové pastí. [16]

Objekt, kterým pohybujeme pomocí fotonové pastí (ve formě kuličky), můžeme pomocí fotonů přichytit na buňku a poté opticky snímat, jak se v důsledku jeho pohybu buňka deformuje, viz Obr. 3.7. Tuhost buňky lze poté vypočítat z této deformace a síly fotonové



Obr. 3.7 Schéma experimentu optické nůžky

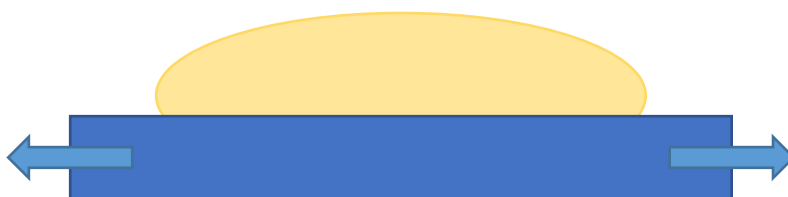
pasti. Síla fotonové pasti se vypočítá z intenzity gradientu laseru, indexu lomu kuličky a okolí. Výhodou této metody je bezkontaktní měření, variabilita přichycení kuliček na buňku, a tedy komplexnější měření. Nevýhodou pak velká citlivost na optické poruchy a odchyly, časová náročnost a možnost ovlivnění měřeného objektu teplem, pocházejícím z laseru. [16]

#### 3.5.4 Magnetické nůžky

Magnetické nůžky fungují na podobném principu jako optické nůžky, ale objektem pohybujeme pomocí gradientu magnetického pole. Síla aplikovaná na objekt je tak přímo úměrná intenzitě magnetického pole. Na rozdíl od optických metod zde nehrozí tepelné ovlivnění, vzniká zde ale přidání moment, který nelze zcela eliminovat. [16]

#### 3.5.5 Napínání substrátu

Metoda fungující na jednoduchém principu: na elastickou podložku přichytíme buňku a tuto podložku následně deformujeme, např. jednoosým tahem, viz Obr. 3.8. Zkoumáme, jak se chová buňka za použití různě velkých sil, kterými působíme na

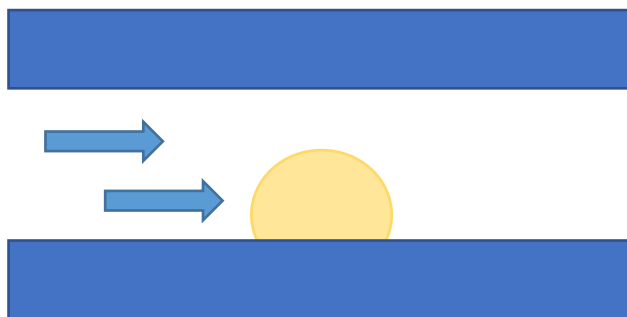


Obr. 3.8 Napínání substrátu, na kterém je přichycena buňka

podložku. Výhodou je jednoduchost a možnost měřit více buněk najednou za stejných podmínek se stejným napěťovým profilem. Obtíž při vyhodnocení vzniká jako důsledek anizotropie uchycení buňky na substrátu a anizotropie samotného elastického substrátu. [16]

### 3.5.6 Proudění tekutiny

Buňka je v tomto experimentu vystavena proudění, jehož profil si zvolíme a ve kterém pozorujeme, jak na něj buňka reaguje. Na Obr. 3.9 je schematicky znázorněno proudění mezi dvěma paralelními deskami. Experiment má velkou výhodu, neboť simuluje fyziologické prostředí buněk. Můžeme s ním měřit nejen vlastnosti buňky, ale pozorovat i růst, popř. množení buněk v tomto prostředí. Proudění namáhá buňku na stříh a jeho výhodou je, že způsobí homogenní smykové napětí. Další výhodou této metody je možnost přímého pozorování buněk, nevýhodou mohutnost měřícího přístroje, vyrobeného na míru specifickému proudění. [16]



Obr. 3.9 Proudění tekutiny mezi paralelními deskami

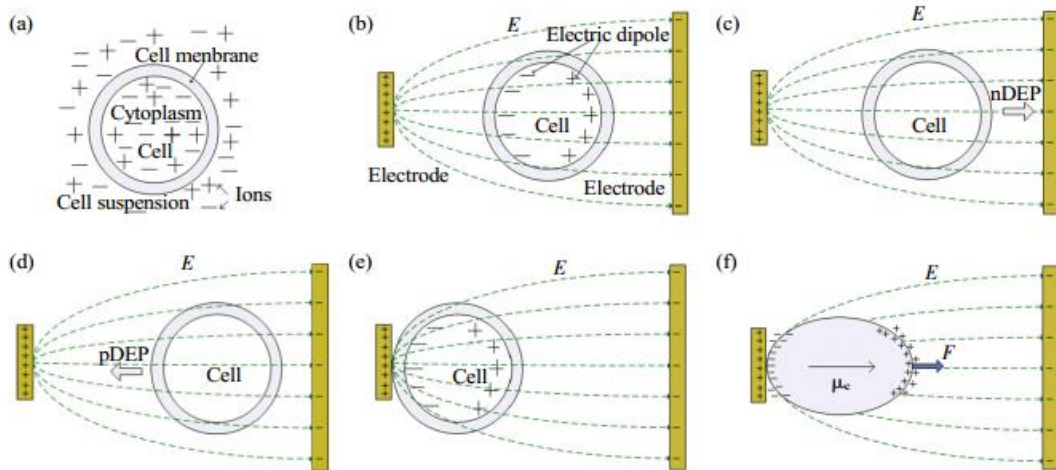
### 3.5.7 Akustické metody

Metody využívající stojatého vlnění, které rozvibruje elastický substrát. Buňka ležící na substrátu je tímto deformována a my tuto deformaci pozorujeme. Výhodou této metody je, že je neinvazivní, buňky mohou být téměř jakéhokoliv typu, není energeticky náročná jako např. předešlé magnetické a optické nůžky a relativně jednoduchá. [16]

### 3.5.8 Elektrické metody

Na Obr. 3.10 je vidět buňka v elektrickém poli v jednotlivých fázích experimentu. Buňka je nejprve polarizována (b) a následně vystavena nehomogennímu elektrickému poli. V důsledku dielektroforézy se buňka uchytí v oblasti s vyšší hustotou elektrického pole

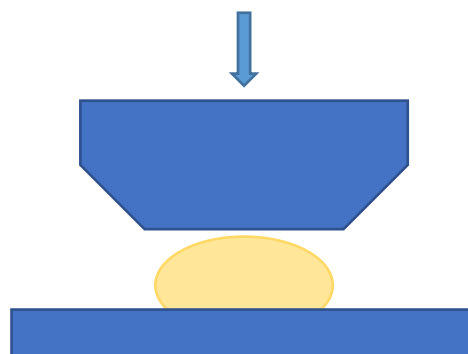
(e). Další působení elektrického pole pak buňku deformuje a lze tak měřit její deformaci  
 (f). Výhodou je, podobně jako v metodě napínání substrátu, možnost měřit více buněk najednou. Metoda je sice jednoduchá, ale poměrně drahá. [16]



Obr. 3.10 Buňka v elektrickém poli v jednotlivých časových fázích experimentu. [20]

### 3.5.9 Komprese

Buňka je v tomto experimentu deformována mezi dvěma paralelními deskami. Nejčastěji se jedna deska pohybuje směrem ke druhé, statické, viz Obr. 3.11. Z experimentu se získá závislost posuvu desky a na ni působící síly. [16]



Obr. 3.11 Kompresní experiment, horní deska se pohybuje směrem dolů za působení síly  $F$

Overbeck et al. [4] využívají ke kompresi buňky Hysitron Triboindenter<sup>TM</sup> vybavený kuželovým hrotem s plochým zakončením o průměru 50  $\mu\text{m}$ . Tento průměr je 10x větší než průměr měřené buňky, proto lze uvažovat experiment autorů jako kompresi mezi dvěma paralelními deskami. Z experimentu je získána zatěžovací křivka, kterou

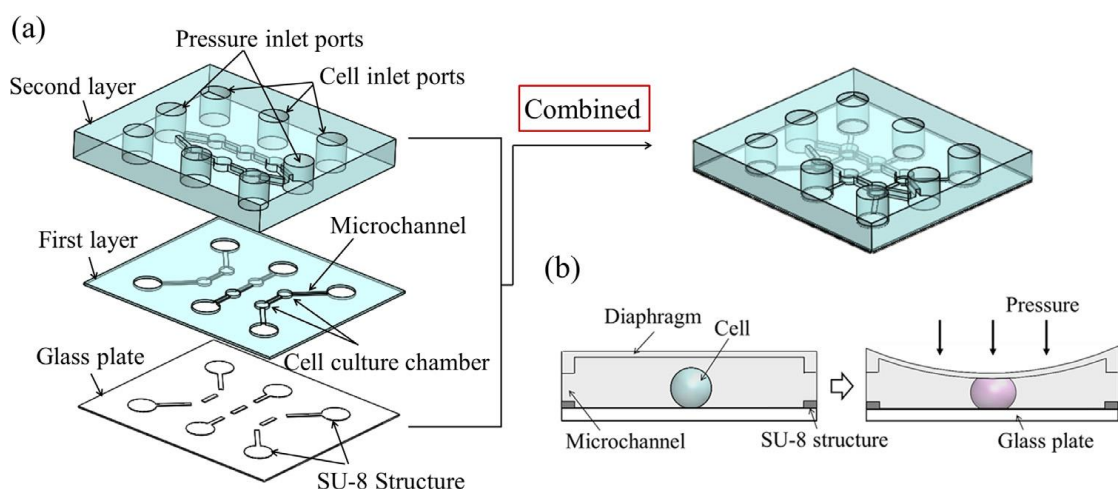


je nutné proložit vhodným analytickým modelem (viz kapitola 3.6), čímž dostaneme Youngův modul pružnosti měřené buňky.

Šepitka et al. [21] provedli kompresi buněk na stejném přístroji jako Overbeck et al., ale vybaveným plochým hrotem o průměru 100  $\mu\text{m}$ , viz Obr. 3.11. Ve své práci se zaměřují na přesné určení počátku indentace buňky. Ten není lehké rozpoznat, protože buňka je velice měkká, navíc ponořená v tekutém médiu.

Buňku autoři zatěžovali dynamicky, v režimu tzv. nanometrické dynamické mechanické analýzy (nanoDMA), ve kterém je buňka zatěžována oscilující silou. Díky znalosti změny fázového posunu na rozhraní média, v němž je buňka ponořena, a samotné buňky je v tomto režimu možné přesněji detekovat počátek indentace buňky, který je ze samotné zatěžovací křivky nejasný. [21]

Yokokura et al. [22] představují své zařízení na vyhodnocení deformace jednotlivých buněk právě pomocí komprese. Jejich zařízení se skládá ze dvou vrstev samo-přilnavého materiálu. Na Obr. 3.12 je vidět první vrstva obsahující komory pro buňky, které jsou přikryté deformovatelnou membránou. Buňka je v komoře deformována pomocí této membrány, na kterou je aplikován tlak regulovaný pomocí vzduchu, popřípadě hydrostatického tlaku. Youngův modul pružnosti buňky je vypočítán z geometrie vzorku, která se mění s deformací membrány.



Obr. 3.12 Mikrozařízení pro měření Youngova modulu pružnosti pomocí komprese. [22]

Ishii et al. [23] využívají zařízení, ve kterém stlačují buňky položené na rovinném podkladu pomocí konvexní čočky. Čočka má poloměr křivosti oproti rozměru buňky mnohonásobně větší, proto autoři považují experiment jako kompresi mezi dvěma paralelními rovinnými deskami. Čočku zde využívají pro optické snímání buňky v průběhu experimentu.

Výhodou kompresních testů je získání mechanických vlastností celé buňky. Lze takto získat i mechanické vlastnosti skupiny buněk při jediné kompresi. Dále je to široká škála profilů napětí, které lze aplikovat. Nevýhodou je anisotropie způsobená Poissonovým efektem, možná destrukce buňky a obtíž při vyhodnocování buněk, které nemají symetrický, kulový tvar. [16]

### 3.6 Analytické modely pro kompresní experiment

Buňka je sice malý, ale velmi složitý objekt. Při jejím modelování tak musíme vždy přijmout nějaká zjednodušení.

Podle již publikovaných výzkumů autoři odvozují mechanické modely na základě dvou přístupů: buňka je brána buď jako kontinuum, nebo jako mikrostrukturní (nanostrukturní) komplex. V druhém případě je brán největší ohled na cytoskelet a zkoumá se jeho mechanické chování. Buňka jako kontinuum je pak velmi zjednodušený pohled, který nám neřekne mnohé o detailních mechanických dějích, které se v buňce odehrávají. Výhoda tohoto přístupu je ale v jeho jednoduchosti a využití v případech, kdy nám jde o získání mechanických vlastností buňky jako celku. [24]

U buňky, kterou považujeme za kontinuum, lze při modelování postupovat několika rozdílnými způsoby. Nejjednodušší způsob definuje buňku jako celistvé homogenní těleso, které se chová například jako lineárně elastické, nebo jako lineárně viskoelastické. [24]

Další způsob rozděluje buňku na dvě části. Vnitřní – kapalnou část a vnější – skořepinu. Obě části pak popisujeme pomocí reologických modelů. Lze tak uvažovat vnitřní část buď jako Newtonovu nebo Maxwellovu kapalinu a vnější skořepinu jako anizotropní viskózní vrstvu se statickým napětím a s nulovou odolností proti ohybu. [24]

Lze použít i složitější modely, které vycházejí z již pozorovaných vlastností jednotlivých buněk. Může jím být například takový, který počítá s přítomností jádra uvnitř buňky, jež zaujímá asi 20 % jejího objemu. Jádro je tužší a viskóznější než okolní cytoplasma, a proto je modelováno jako samostatná viskóznější Newtonská kapalina obalená anizotropní viskózní vrstvou. [24]

Ukazuje se, že výsledné mechanické vlastnosti buňky zjišťované při stejných podmínkách ze stejného experimentu se liší podle použitého mechanického modelu. Tento fakt komplikuje například porovnávání výsledků napříč jednotlivými modelovacími přístupy. Pro nejhodnější výběr je tak důležité zvážit možné chování měřeného typu buňky, stejně jako to, zda uvažujeme malé nebo velké deformace apod. [24]

V případě kompresního experimentu jsou získaná data ve formě diskrétních bodů. V jednotlivých časových okamžicích je zaznamenána hodnota posuvu indentoru a naměřena síla, kterou působí indentor na buňku. Výsledkem je tak množina bodů popisující závislost posuvu na působící síle.

Abychom z těchto dat mohli zjistit příslušné materiálové vlastnosti, v našem případě modul pružnosti, je třeba najít vhodný analytický model, kterým naměřená data proložíme.

### 3.6.1 Hertzův model

Hertzův model je znám pro své použití v indentaci již delší dobu. Jeho úprava pro kompresi kulové elastické buňky mezi dvěma tuhými paralelními deskami vede k rovnici [4]:

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{R_0} \left(\frac{d}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \quad (1)$$

kde  $F$  je síla působící na pohybující se desku,  $E$  je Youngův modul pružnosti buňky,  $R_0$  její počáteční poloměr,  $\nu$  poissonovo číslo a  $d$  je posuv pohybující se desky.

### 3.6.2 Lulevichův model

Model založený na bázi skořepiny naplněné vodou, kde zjišťujeme vlastnosti pouze této skořepiny. Předpokladem v tomto modelu je skořepina jako elastická membrána namáhaná pouze tahem. Dále předpokládáme zachování objemu během komprese. Lulevich et. al [25] tento model aplikovali na měření vlastností jednotlivých buněk. Overbeck et. al [4] pak tento model převzali v podobě, která vyjadřuje závislost působící síly  $F$  na posuvu desky  $d$ :

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

kde  $E$  je Youngův modul pružnosti buňky,  $t$  tloušťka stěny skořepiny a relativní deformace  $\varepsilon$  je vyjádřena vztahem:

$$\varepsilon = 1 - \frac{D_0 - d}{D_0} = 1 - \frac{h}{D_0} \quad (3)$$

kde  $D_0$  představuje počáteční průměr buňky,  $d$  je posuv kompresní desky a  $h$  je okamžitá výška buňky.

### 3.6.3 Overbeckův model

Tento model opět vyšetřuje vlastnosti v kulové skořepině. Pracuje pouze s rovníkovým napětím, neboť předpokládá největší napětí právě v rovníkové rovině. Overbeck et al. [4] dále předpokládají kontakt indentoru a buňky bez tření.

Vychází z Laplaceovy rovnice pro tenkostěnnou kulovou nádobu, která pro velmi malou tloušťku stěny  $t$  dává do závislosti obvodové napětí  $\sigma$ , vnitřní tlak v kulové nádobě  $p$  a její průměr  $D$  podle vztahu:

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

Dále se předpokládá lineárně elastické chování:

$$\sigma = E\varepsilon \quad (5)$$

kde  $E$  představuje Youngův modul pružnosti stěny buňky a  $\varepsilon$  její prodloužení v rovníkové rovině, vyjádřené logaritmicky:

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{D}{D_0}\right) \quad (6)$$

kde  $D_0$  je průměr buňky ve tvaru koule před deformací a  $D$  je okamžitý průměr buňky v rovníkové rovině v průběhu deformace, viz Obr. 3.13.

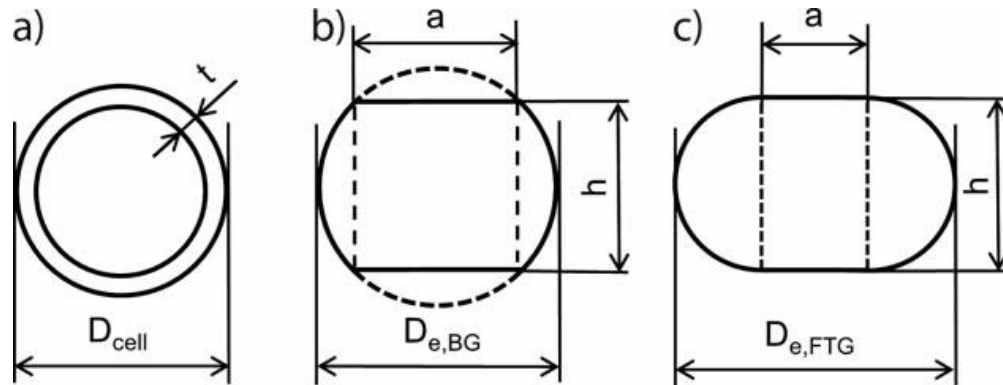
Dalším předpokladem je zachování objemu buňky v průběhu deformace. Spolu se známou geometrií deformované buňky lze získat již zmíněný okamžitý průměr buňky  $D$ .

Overbeck et al. uvažují dvě geometrická tělesa, reprezentující geometrii buňky v průběhu komprese. Prvním je těleso ve tvaru sudu (zkratka BG, Obr. 3.13b), druhým tělesem je plný toroid (zkratka FTG, Obr. 3.13c).

Síla  $F$ , kterou reaguje buňka na deformaci, lze vypočítat ze vztahu:

$$F = \frac{\pi}{4} a^2 p \quad (7)$$

kde  $a$  je průměr vnitřního válce plného toroidu v průběhu komprese, viz Obr. 3.13.



Obr. 3.13 Řezy geometrických těles, reprezentující buňku před deformací (a) a po deformaci ve tvaru BG (b), resp. FTG (c) [4]

#### 3.6.4 Yokokurův model

Yokokura et. al ve své práci [22] předpokládají buňku jako kontinuum, která se ze své počátečního tvaru koule deformuje do již zmíněného tvaru plného toroidu. Autoři však používají experiment, ve kterém měří tlak aplikovaný na buňku. Na rozdíl od Overbecka et. al tak získávají modul pružnosti buňky  $E$  z rovnice:

$$P = E \varepsilon_h \quad (8)$$

kterou prokládají experimentální data závislosti  $P^{exp} - \varepsilon_d^{exp}$ , kde  $P$  je aplikovaný tlak na buňku a  $\varepsilon_h = (h_0 - h)/h_0$ , kde  $h_0$  je výška buňky před kompresní zkouškou.

## 4 METODY

### 4.1 Vzorky

V této práci byly měřeny mechanické vlastnosti rakovinových buněk melanomu. Jednotlivé vzorky buněk byly získány ze čtyř komerčně dostupných buněčných linií. Označení těchto linií viz Tabulka 3.

Tabulka 3 Význam zkratk buněčných linií

<b>WM115</b>	Primární melanom ve fázi vertikálního růstu
<b>WM35</b>	Primární melanom ve fázi radiálního růstu
<b>WM2664</b>	Metastáze melanomu do kůže
<b>A375</b>	Metastáze melanomu do plic

Vzorky jsou dále rozlišeny dle toho, na jakém podkladu byly kultivovány. Vždy se jedná o skleněný podklad, který je různě modifikovaný. Přehled tohoto rozdělení viz Tabulka 4.

Tabulka 4 Význam zkratk pro označení podkladu, na kterém byly buňky kultivovány

<b>Glass</b>	Skleněný podklad, bez modifikace
<b>Coll</b>	Skleněný podklad, modifikovaný kolagenem I
<b>FN</b>	Skleněný podklad, modifikovaný fibronectinem
<b>PLL</b>	Skleněný podklad, modifikovaný polylysinem

Skleněná krycí sklíčka byla s danou modifikací, tj. kolagenem I, fibronectinem nebo polylysinem, inkubována přes noc v lednici při teplotě 4°C. Buňky byly tripsinizovány a vsazeny na příslušné sklíčko do kultivačního média, kde zůstaly po dobu asi 24 hodin. Před samotnou indentací byla sklíčka přilepena k tenké skleněné podložce a na buňky bylo shora přidáno čerstvé kultivační médium.

Buňky získané z jedné buněčné linie byly kultivovány na všech typech podkladů. Zkoumáno bylo následně vždy 8-10 buněk na každém typu podkladu osazeném buňkami dané linie. Skupina takto vypěstovaných buněk je v této práci nazývána sadou. Celkově bylo pomocí kompresního experimentu stlačováno 144 jednotlivých buněk.

Každá buňka byla před vlastním experimentem pomocí světelného mikroskopu vyfotografována z pohledu shora. Fotografie byla doplněna měřítkem, pomocí kterého byly odečteny rozměry jednotlivých buněk z tohoto pohledu.

## 4.2 Kompresní experiment

Experiment byl proveden v Laboratoři nanoindentačních zkoušek na Fakultě strojní ČVUT. Použit byl přístroj pro nanomechanické a nanotribologické testování Hysitron TI 950 TriboIndenter™. Vybavení přístroje obsahuje světelný mikroskop s fluorescenčním filtrem Olympus U-MWIB3 a transducer nanoDMA® III. Transducer byl osazen 90° konickým hrotem s plochým diamantovým zakončením o průměr 100 μm pro kompresi fluidních buněk.

Na počátku experimentu bylo sklíčko s buňkami a kultivačním médiem vloženo do přístroje. Optickým mikroskopem byla poté na sklíčku lokalizována jedna buňka, jejíž poloha byla zaznamenána. Snímek buňky z optického mikroskopu byl uložen.

Následujícím krokem bylo určení polohy sklíčka ve svislém směru v bezprostřední blízkosti testované buňky. Hrot se přibližoval 150 μm vedle měřené buňky směrem k podkladu a v okamžiku, kdy zaznamenal kontakt, byl vysunut zpět do vzdálenosti 5-6 μm nad podklad. Protože výška měřených buněk byla vždy menší než 5 μm, tato vzdálenost je dostačující. V této poloze byla provedena dynamická kalibrace v rozsahu frekvencí 5-301 Hz s maximální předepsanou kvazistatickou silou  $F_{max} = 2500$  μN. Indentační hrot se vysunoval z transduceru směrem k podkladu, zaznamenávaly se dynamické parametry jako je amplituda posuvu hrotu a fázové zpoždění a zároveň kvazistatické parametry, jako je posuv hrotu a síla aplikovaná na hrot. Poté byla ve stejné výchozí pozici provedena kalibrace statická s předepsanou stejnou maximální silou  $F_{max} = 2500$  μN. Obě kalibrace byly nastaveny tak, aby pokryly stejný rozsah vysunutí hrotu, který odpovídal následujícímu pracovnímu rozsahu experimentu. Síly působící na hrot byly zaznamenány a odečteny od hodnot zaznamenaných v následujícím měření, při kterém byla stlačována i samotná buňka.

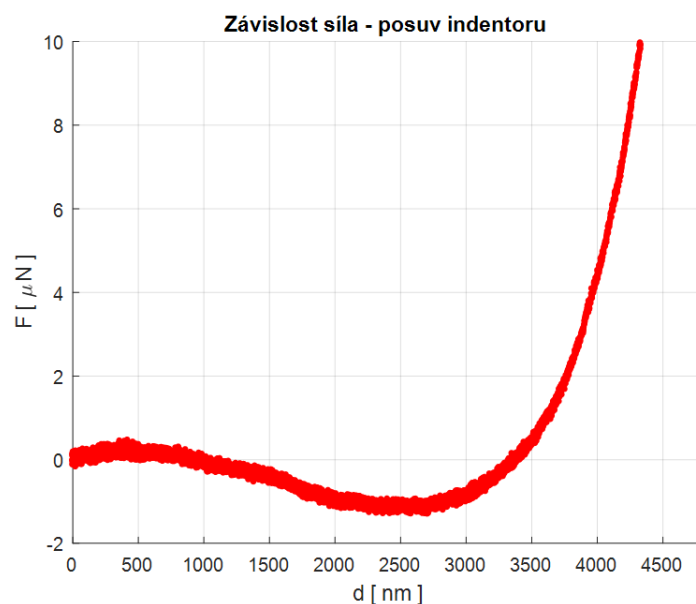
Komprese buňky byla provedena v režimu nanoDMA. Při zatěžování postupně rostla síla z počáteční hodnoty 0 μN, přičemž byla omezena maximální dovolenou silou 2500 μN. Síla v průběhu měření oscilovala s frekvencí 140 Hz a amplitudou 0,12 μN.



Tímto postupem byla provedena komprese 8-10 buněk v každé sadě, přičemž po každých pěti zatěžování byl hrot očištěn od případných nečistot. Očištění bylo provedeno indentací polykarbonátu.

### 4.3 Úprava experimentálních dat

Z kompresního experimentu byla získána závislost posuvu hrotu (indentoru) na působící síle, viz Obr. 4.1. V počátečním čase nula (nulová hodnota posuvu) se hrot nachází nad buňkou, ve výšce 5000-6000 nm nad podkladem, s počáteční nulovou působící silou. Hodnota posuvu se postupně zvětšuje. Při hodnotě posuvu cca 2500 nm je na Obr. 4.1 vidět, že hodnota síly začíná po pozvolném klesání stoupat. Přibližně v této hodnotě posuvu je započata komprese samotné buňky. Do hodnoty posuvu 2500 nm je z obrázku patrná přítomnost síly působící na hrot, která do hodnoty posuvu 500 nm stoupá a poté klesá. Jelikož není známa výška měřené buňky, tento nelineární přírůstek sil působících na hrot v kapalině znemožňuje přesné určení hodnoty posuvu, ve které se hrot dostává do kontaktu s buňkou.



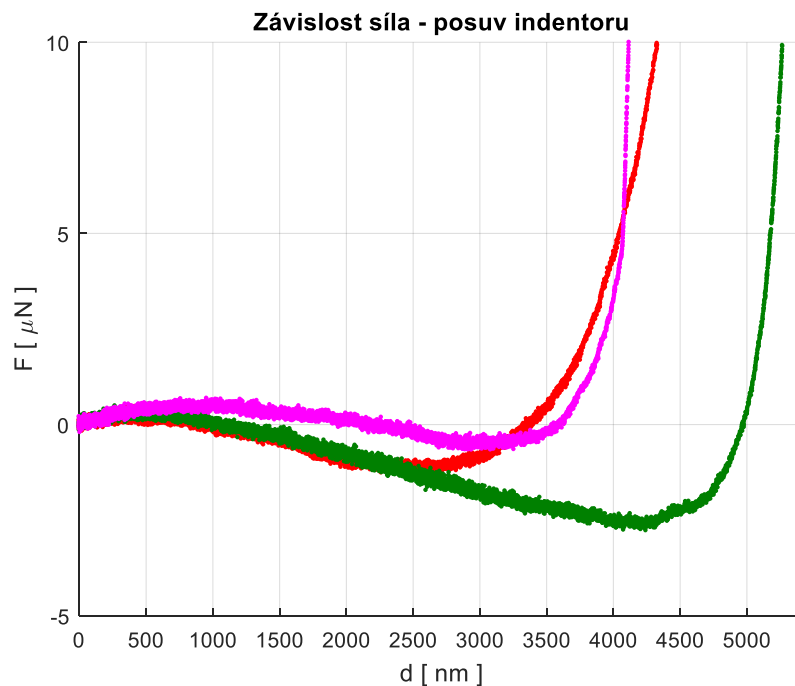
Obr. 4.1 Data získaná z experimentu ukazující závislost posuvu hrotu na působící síle

Vyskytují se zde dva úkoly, které je nutné před samotným aplikováním analytického modelu vyřešit. Jednak je to odečtení „nežádoucího přírůstku sil“ působících na hrot

v kapalině – popsaných výše, za druhé pak určení přesné hodnoty posuvu, při které je započata komprese buňky.

Popsaný nežádoucí přírůstek sil lze eliminovat tím, že se vedle každé buňky provede tzv. referenční indentace. To znamená, že se indentor pohybuje kapalinou, aniž se po celou dobu dotkne jakékoliv buňky, přičemž se v jednotlivých hodnotách posuvu zaznamenávají síly působící na hrot. Hodnoty sil, změřených v této fázi, jsou následně odečteny od hodnot sil získaných z kompresní křivky. Data vyhodnocována v této práci však referenční indentaci neobsahovala.

Křivka z referenční indentace se zaznamenanými hodnotami sil tak mohla být nahrazena např. částí nejdelší křivky z dané sady měření, viz Obr. 4.2 – zelená křivka. Indentor se v tomto případě volně pohybuje tekutinou až do hodnoty posuvu cca 4000 nm, ve které začíná buňku stlačovat. Do této hodnoty by křivka mohla být použita na odfiltrování nežádoucího přírůstku sil u ostatních křivek, jak je popsáno výše. Na Obr. 4.2 je vidět, že je část této křivky shodná s částí červené křivky. V obou případech tak pravděpodobně působí na hrot indentoru, který se pohybuje volně v kapalině, stejné



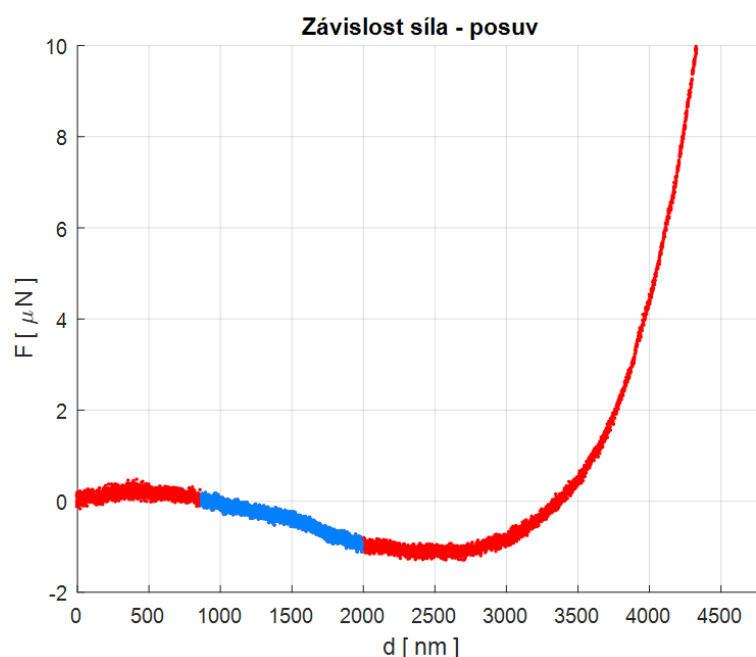
Obr. 4.2 Data získaná z experimentu ukazující závislost posuvu hrotu na působící síle pro 3 buňky z jedné sady

síly o stejných hodnotách. V případě růžové křivky na Obr. 4.2 tomu tak ale není. Komprimovaná buňka v tomto případě mohla ležet na odlehlejšími místě od buňky, kterou reprezentuje zelená křivka, a kde tak patrně působily síly odlišné.

Popsaný přístup tedy nebyl vhodný ze dvou důvodů. V sadě křivek z Obr. 4.2 lze odečítat nežádoucí přírůstek sil pomocí zelené křivky pouze do hodnoty posuvu hrotu cca 4000 nm, čímž se omezí získaná data do této hodnoty u ostatních křivek, nehledě na to, že jedna křivka (odečítací), by nemohla být vyhodnocena vůbec. Dalším důvodem je pak odlišný počáteční trend křivek, který říká, že v každém případě působí na hrot indentoru jiné síly.

Byl tedy navržen nový způsob tohoto vyhodnocení. Jak je vidět na Obr. 4.2, síly mají v oblasti, v níž je křivka klesající, průběh téměř shodný s křivkou popsanou polynomem druhého stupně. Proložení této části daným polynomem tak můžeme odhadnout, jak vypadá křivka v důsledku působení nežádoucích sil až do hodnoty posuvu větší než 4000 nm.

U každého měření je tedy vybrána část křivky, která má klesající trend, viz modrá část na Obr. 4.3. Začátek této části je umístěn do počátku souřadnicového systému. Vybraná

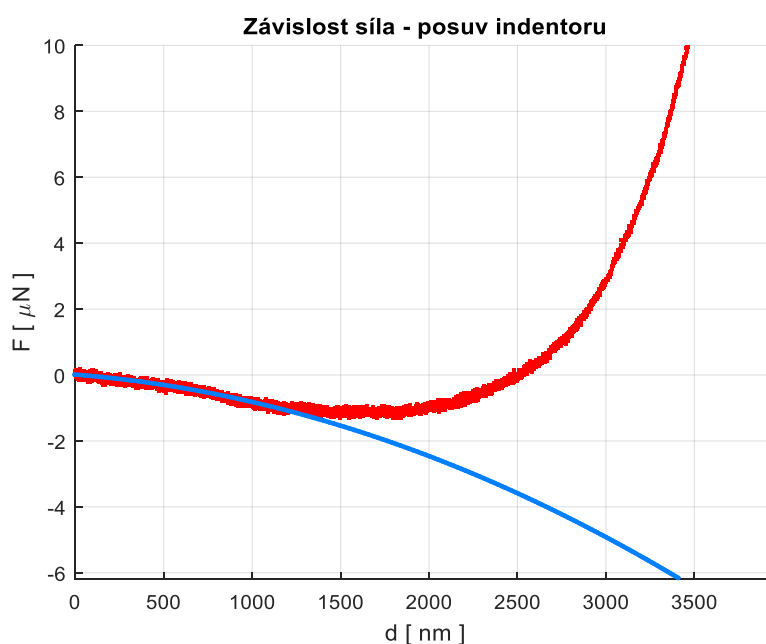


Obr. 4.3 Vyznačená část pro odečtení nežádoucího přírůstku sil na křivce popisující závislost posuvu hrotu na působící síle

část (modrá) je poté proložena polynomem 2. stupně, který reprezentuje zaznamenaný nežádoucí přírůstek sil, viz Obr. 4.4.

Tyto síly (modrá křivka na Obr. 4.4) jsou odečteny od naměřených dat (červená křivka na Obr. 4.4). Pro část zatěžovací křivky, kdy ještě není hrot v kontaktu s buňkou, jsou takto získány nulové hodnoty pro sílu, která působí na pohybující se indentor, viz Obr. 4.5.

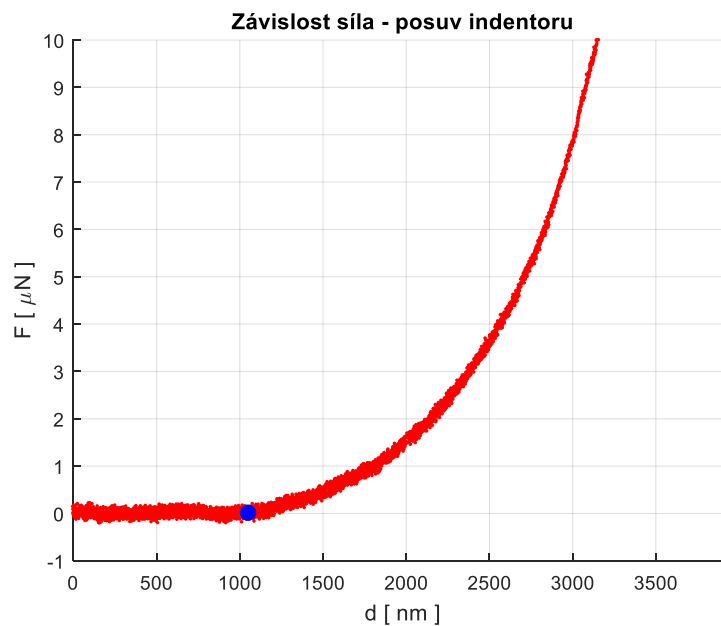
Určení počátku komprese je nyní již snadné. Je jím bod, ve kterém začíná hodnota síly růst, na Obr. 4.5 vyznačen modře.



Obr. 4.4 Proložení části zatěžovací křivky polynomem (modře), který reprezentuje nežádoucí přírůstek sil působících na hrot v kapalině

Z výsledných zatěžovacích křivek byly určeny výšky jednotlivých buněk před kompresním experimentem  $h_0$ . Délka zatěžovací křivky odpovídá posuvu hrotu, který se zastaví ve chvíli, kdy dojde ke kontaktu hrotu se skleněným podkladem. Ve skutečnosti se při maximální kompresi mezi hrotem a podkladem nachází určitá hmota deformované buňky. K maximálnímu posuvu byla proto přičtena odhadnutá tloušťka této hmoty o velikosti 300  $\text{nm}$ , čímž byla určena výška buňky. Hodnota tohoto odhadu je

dvojnásobkem tloušťky buněčné stěny, která dle předpokladu analytického modelu zůstává po dobu komprese konstantní.



Obr. 4.5 Indentační křivka s odečteným nežádoucím přírůstkem sil. Modrý bod je pak vyznačený nalezený počátek, tj. bod, kdy začne křivka stoupat.

Výsledná křivka byla dále vyhlazena pomocí metody Savitzky-Golay, protože naměřená data vykazovala velký rozptyl.

Celý postup byl proveden pro každou křivku zvlášť v programu Matlab R2017a tak, aby byly vyhodnoceny všechny křivky stejným způsobem a výsledky mohly být považovány za nezávislé, porovnatelné mezi sebou.

#### 4.4 Úprava modelu dle Overbecka et al.

Díky úpravě dat, popsané v předešlé kapitole 4.3, byly získány křivky popisující závislost působící síly na posuvu hrotu z oblasti komprese buňky. Tato data bylo následně třeba proložit vhodným analytickým modelem. Model užitý v této práci vychází z geometrického modelu, jak jej použili Overbeck et al. [4], je však upraven pro odlišnou geometrii měřených buněk.

Tento model je použit proto, že respektuje geometrii buněk. Předpokládá se, že právě přesnější geometrický popis může vést k výsledkům, odrážejícím skutečnou tuhost buněk. Předpoklad tenkostěnné skořepiny je pak zvolen proto, že největší část napětí

přenáší aktinový kortex, ležící hned pod buněčnou membránou. Jeho tuhost je o řád větší než dosud změřená tuhost celé buňky, nebo tuhost jádra.

Jak je vidět z Obr. 4.6, námi měřená buňka není před kompresní zkouškou tvaru koule, jak předpokládali Overbeck et al. ve svém modelu. Tento horní pohled ukazuje, že má buňka v průřezu spíše tvar elipsy. Ve 3D prostoru by se její tvar dal popsat pomocí geometrie jedné poloviny elipsoidu, viz Obr. 4.7.



Obr. 4.6 Reprezentativní buňka melanomu vyfotografovaná před kompresní zkouškou

Tento tvar ale nespĺňuje podmínku pro výpočet napětí ve stěně tenkostěnné nádoby, který říká, že by se její poloměr neměl měnit skokově, jak je to na Obr. 4.7 patrné. Tento tvar se také nedeformuje jako plný toroid, jako předpokládá Overbeck et al. [4]. Tvar buňky byl proto převeden z tvaru poloviny elipsoidu na tvar plného toroidu (s kruhovým průřezem). Aby mohl být tvar plného toroidu použit k popisu měřených buněk, je třeba získat jeho rozměry. Ty získáme z rovnice, která říká, že při přechodu od jednoho tvaru k druhému zachováváme hodnotu objemu:

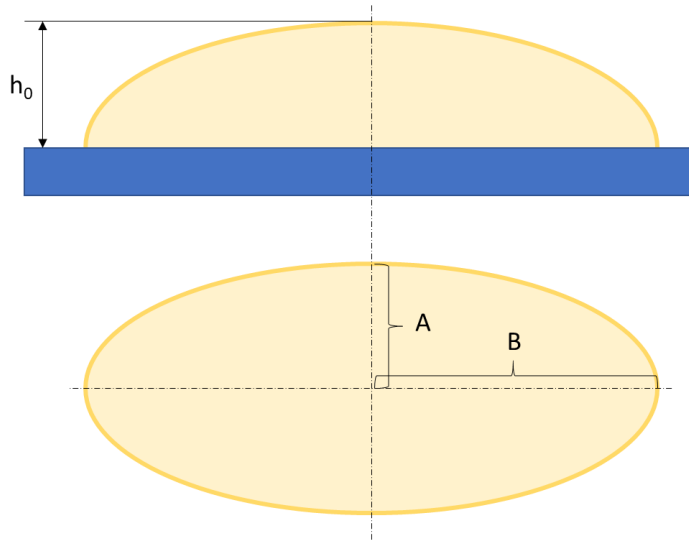
$$V_{E0} = V_{T0} \quad (9)$$

kde  $V_{E0}$  je objem poloviny elipsoidu (buňky tohoto tvaru před kompresí) a  $V_{T0}$  objem plného toroidu (buňky tohoto tvaru před kompresí).

Výchozí hodnoty pro výpočet získáme ze snímků buněk před kompresní zkouškou, ze kterých je možné změřit velikost průřezu buňky na počátku měření. Průřez buňky je tvaru elipsy, potřebnými hodnotami jsou tedy její hlavní poloměry  $A$  a  $B$ , viz Obr. 4.7.

Dále pak ze zatěžovací křivky určíme výšku buňky  $h_0$ . Z těchto rozměrů je možné dopočítat počáteční objem  $V_{E0}$  poloviny elipsoidu dle vztahu:

$$V_{E0} = \frac{1}{2} \frac{4}{3} (ABh_0\pi) \quad (10)$$



Obr. 4.7 Tvar buňky ve tvaru poloviny elipsoidu s vyznačenými počátečními rozměry.

Počáteční objem plného toroidu  $V_{T0}$  před kompresní zkouškou se vypočítá jako:

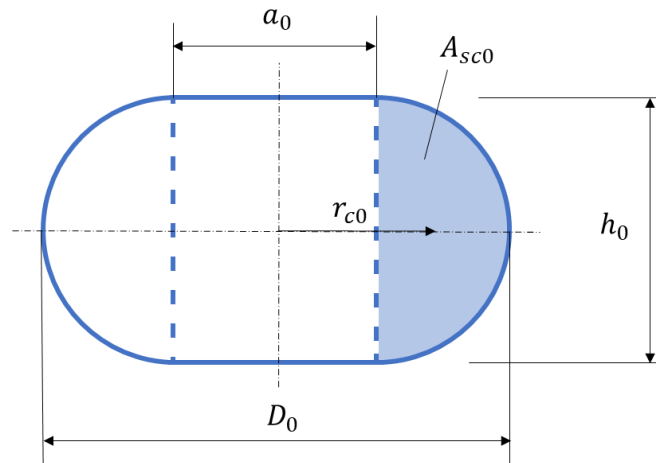
$$V_{T0} = \frac{\pi}{4} a_0^2 h_0 + A_{sc0} 2\pi r_{c0} \quad (11)$$

kde  $a_0$  je průměr válce uvnitř plného toroidu, který reprezentuje buňku před kompresí,  $h_0$  je výška plného toroidu,  $A_{sc0}$  je plocha polokruhu průřezu plného toroidu před kompresí, viz Obr. 4.8, definovaná jako:

$$A_{sc0} = \frac{\pi \frac{h_0^2}{4}}{2} \quad (12)$$

a  $r_{c0}$  je centrální poloměr:

$$r_{c0} = \frac{a_0}{2} + \frac{2h_0}{3\pi} \quad (13)$$



Obr. 4.8 Průřez plným toroidem s vyznačenými počátečními rozměry definující počáteční tvar buňky před kompresní zkouškou.

Z rovnice ( 9 ) nakonec vyjádříme jedinou neznámou  $a_0$ .

Okamžitý rozměr  $a$ , tj. průměr vnitřního válce plného toroidu v průběhu komprese, viz Obr. 4.9, vyjádříme z rovnice:

$$V_{T0} = V_T \quad (14)$$

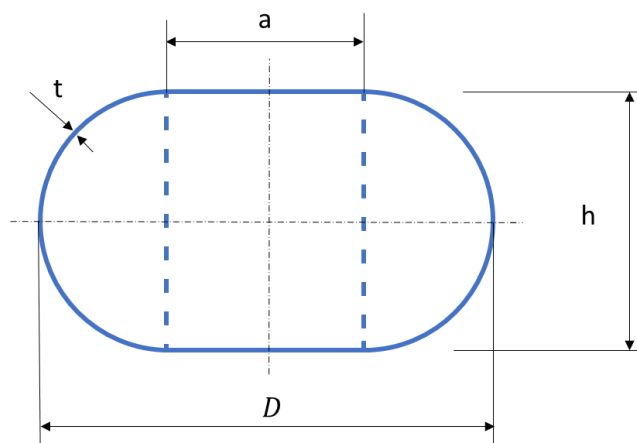
kde  $V_T$  představuje objem buňky tvaru plného toroidu v průběhu komprese.

Dále bylo předpokládáno stejné chování jako předpokládají Overbeck et. al. [4], tj. vychází se z Laplaceovy rovnice. Vnitřní tlak v tenkostěnné nádobě tvaru plného toroidu lze vyjádřit jako:

$$p = \sigma \frac{(\pi t h + 2 a t)}{a h + \pi \frac{h^2}{4}} \quad (15)$$

kde  $t$  je tloušťka stěny,  $\sigma$  je napětí ve stěně,  $h$  je okamžitá výška buňky a  $a$  je okamžitý průměr kruhové plochy, která je v kontaktu s indentorem, viz Obr. 4.9.





Obr. 4.9 Buňka ve tvaru plného toroidu v průběhu komprese. Plný toroid je zde považován za tenkostěnnou skořepina s vyznačenými charakteristickými rozměry.

Vyjádření vnitřního tlaku je získáno z rovnice rovnováhy v rovníkovém řezu plným toroidem, viz Obr. 4.10:

$$p \left( ah + \pi \frac{h^2}{4} \right) = \sigma(\pi th + 2at) \quad (16)$$

Levá strana rovnice reprezentuje sílu, působící ve stěně nádoby, pravá pak sílu, způsobenou tlakem uvnitř nádoby působící na její dno.

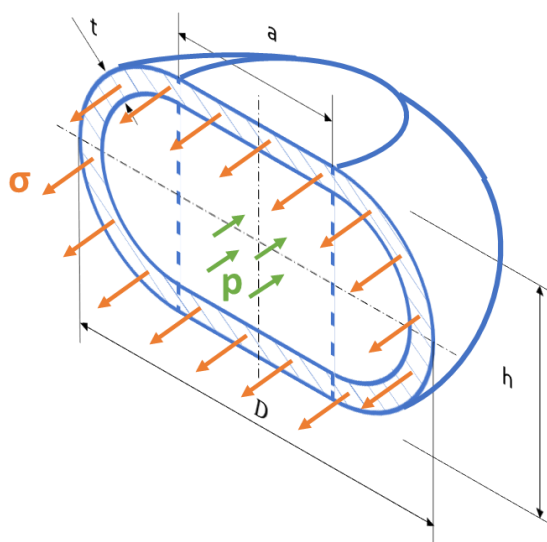
Dále se předpokládá lineárně elastické chování popsané rovnicí ( 5 ). Průměr buňky před deformací  $D_0$  v rovníkové rovině, viz Obr. 4.8, je vyjádřen rovnicí ( 17 ) a okamžitý průměr buňky  $D$  v rovníkové rovině v průběhu deformace, viz Obr. 4.9 rovnicí ( 18 ).

$$D_0 = h_0 + a_0 \quad (17)$$

$$D = h + a \quad (18)$$

$$h = h_0 - d \quad (19)$$

Sílu, kterou buňka reaguje na deformaci, lze vypočítat ze vztahu vyjádřeném rovnicí ( 7 ).



Obr. 4.10 Rovníkový řez tenkostěnnou nádobou, tvaru plného toroidu, reprezentující buňku. Vyznačeno napětí  $\sigma$  ve stěně nádoby a tlak  $p$  působící uvnitř buňky.

Opět se předpokládá zachování objemu během deformace, což vede k vyjádření

$$V_{T0} = V_T \quad (20)$$

kde  $V_T$  představuje objem buňky tvaru plného toroidu v průběhu komprese.

Ze všech předešlých rovnic byla v programu Matlab R2017a získána jediná rovnice vyjadřující závislost síly  $F$  na posuvu hrotu  $d$ , známých geometrických parametrech buňky  $a_0, h_0, t$  a neznámého materiálového parametru  $E$ . Matematicky vyjádřeno  $F = F(d, a_0, h_0, t, E)$ .

#### 4.5 Analýza dat

Z původního počtu experimentálních křivek musela být odstraněna ta data, která byla nějakým způsobem poškozena. Křivka například skokově měnila své hodnoty, popřípadě byla příliš krátká apod.

Analytickým modelem z předchozí kapitoly 4.4 byly následně metodou nejmenších čtverců proloženy křivky popisující závislost působící síly na posuvu hrotu v oblasti komprese buňky. Tyto křivky byly získány úpravou dat z kompresního experimentu, viz kapitola 4.3. Jejich proložení bylo provedeno od námi přesně definovaného počátku

komprese buňky (viz kapitola 4.3) postupně do různých hodnot posuvu hrotu, konkrétně do hodnot 250, 500, 750 a 1000 nm.

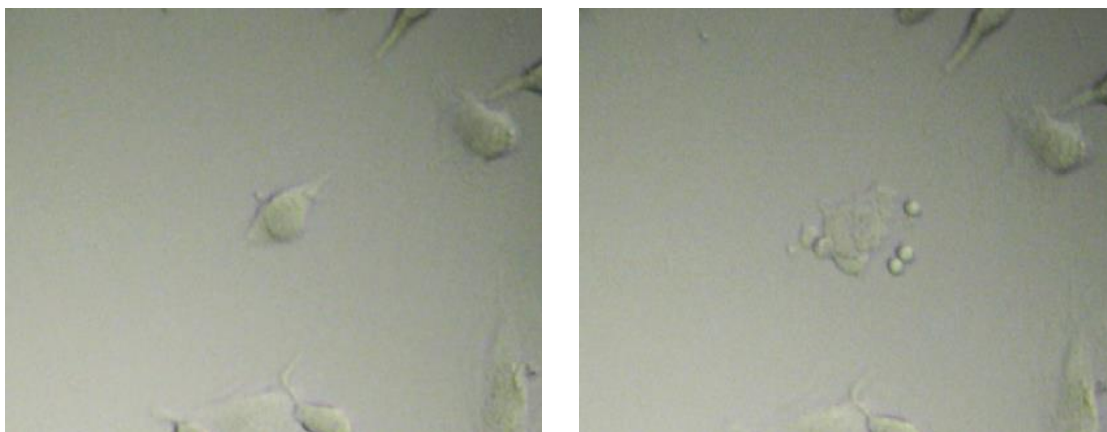
Proložením dat byl zjištěn koeficient determinace. V případech, kdy byl tento koeficient menší než 80 %, nebyla data zařazena do výsledného vyhodnocení. Proložení do hodnoty posuvu hrotu menší než 250 nm vykazovalo příliš velkou nepřesnost, tj. koeficient determinace menší než 80 %. Na ten má vliv také nepřesné určení počátku komprese buňky, proto měl úsek dat proložený analytickým modelem z kapitoly 4.4 minimální hodnotu posuvu hrotu 250 nm.

Z každé křivky byl tedy získán Youngův modul pružnosti buňky. Na každé sadě křivek, tj. dat získaných z komprese jednotlivých buněk totožné buněčné linie, které byly kultivovány na jednom typu podkladu a stlačovány o určenou hodnotu posuvu, byl proveden Dean–Dixonův test, který vyřazuje hrubé chyby – odlehlé hodnoty. [26] Tento test, vhodný pro soubory s malým počtem měření, skutečně prokázal několik hrubých chyb, které byly vyřazeny.

Na závěr byla získána průměrná hodnota modulu pružnosti v každé sadě a byla vypočítána odchylka hodnot od této průměrné hodnoty.

## 5 VÝSLEDKY

Jednotlivé buňky byly před kompresní zkouškou lokalizovány pomocí světelného mikroskopu zabudovaném v nanoindentoru, kterým byly zároveň pořízeny snímky každé komprimované buňky. Snímek byl pořízen vždy před a po kompresní zkoušce, viz Obr. 5.1. Ze snímku vpravo je pak patrné, že byla buňka po kompresi poškozena.

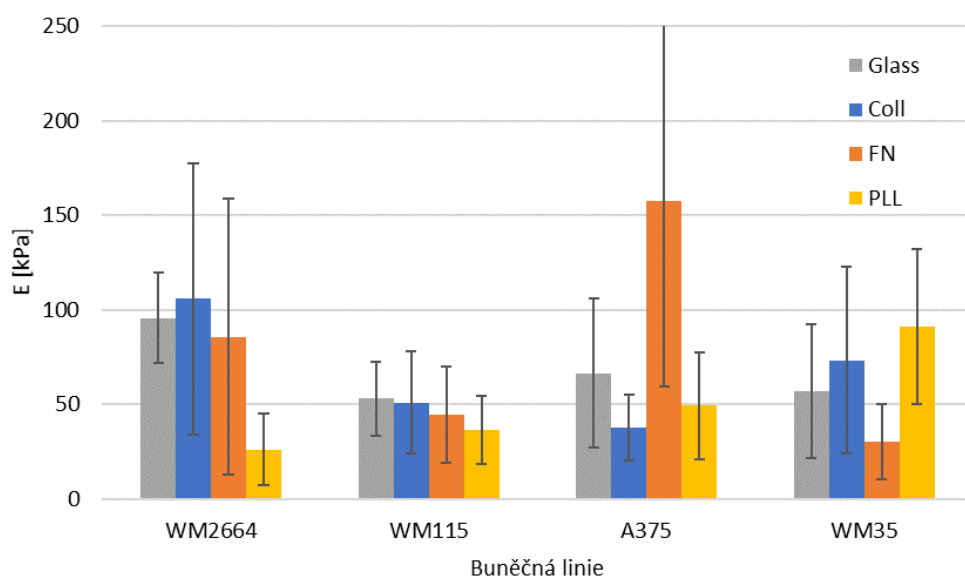


Obr. 5.1 Snímek buňky z buněčné linie A375 kultivované na nemodifikovaném skleněném podkladu před kompresní zkouškou (vlevo) a snímek té samé buňky po kompresní zkoušce (vpravo)

Výsledný průměrný Youngův modul pružnosti buněk získaný z každé sady křivek se pohybuje v řádu desítek kPa. Největší průměrný modul pružnosti  $E = 157.4 \pm 98.1 \text{ kPa}$  dosahuje sada z buněčné linie A375 kultivovaná na skleněném podkladu modifikovaném fibronectinem (A375\_FN) při stlačení o 250 nm. Naopak nejmenší průměrný modul pružnosti  $E = 18.0 \pm 8.9 \text{ kPa}$  má sada WM2664\_PLL při hodnotě stlačení 1000 nm. Význam zkratk jednotlivých sad viz kapitola 4.1. Jelikož se jedná o biologický organismus, odchylka od průměrné hodnoty je v mnoha případech značně velká, dosahující v extrémním případě až  $\pm 85 \%$ .

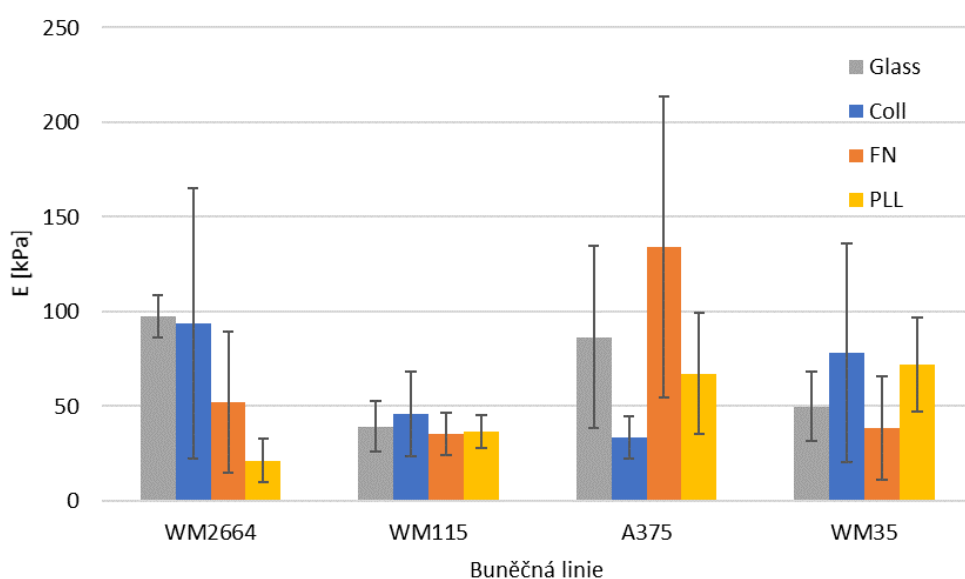
Na následujících grafech (viz Obr. 5.2 - Obr. 5.5) je zobrazen průměrný Youngův modul pružnosti jednotlivých sad pro hodnoty stlačení 250, 500, 750 a 1000 nm. V každém grafu jsou pro danou velikost stlačení zastoupeny vedle sebe všechny sady vzorků. Vyznačeny jsou také směrodatné odchylky od průměrných hodnot.

Průměrný Youngův modul pružnosti pro velikost stlačení 250 nm



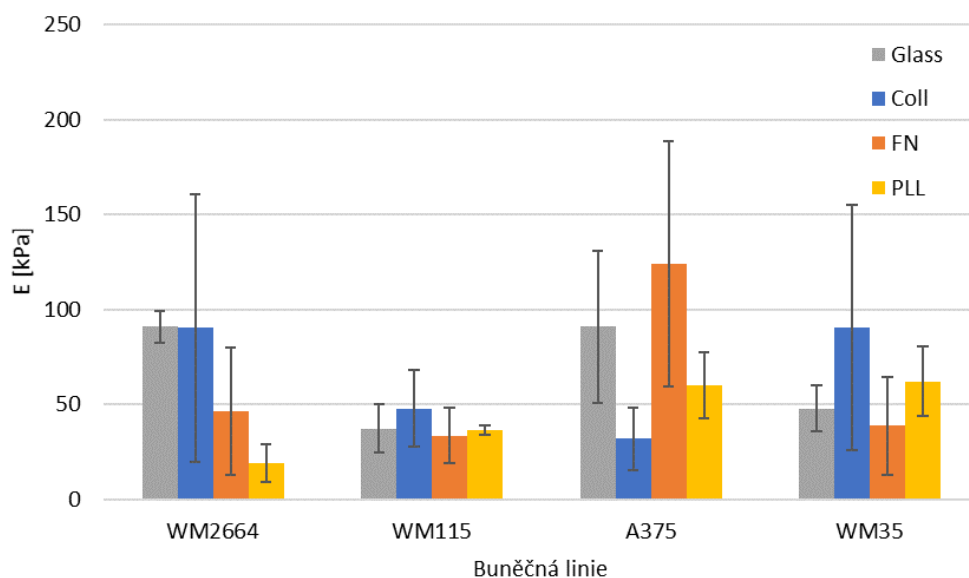
Obr. 5.2 Průměrné hodnoty modulů pružnosti buněk pro velikost stlačení 250 nm. Jednotlivé hodnoty jsou rozděleny na vodorovné ose do skupin podle typu buněčné linie, jednotlivé barvy určují typ podkladu, na kterém byla sada buněk z dané buněčné linie kultivována, význam zkratk viz kapitola 4.1.

Průměrný Youngův modul pružnosti pro velikost stlačení 500 nm



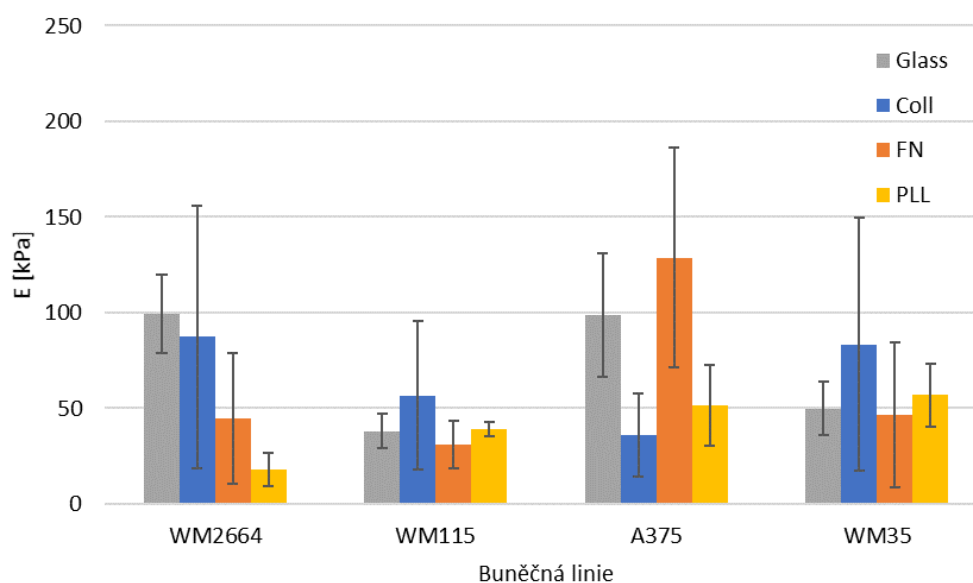
Obr. 5.3 Průměrné hodnoty modulů pružnosti buněk pro velikost stlačení 500 nm. Jednotlivé hodnoty jsou rozděleny na vodorovné ose do skupin podle typu buněčné linie, jednotlivé barvy určují typ podkladu, na kterém byla sada buněk z dané buněčné linie kultivována, význam zkratk viz kapitola 4.1.

Průměrný Youngův modul pružnosti pro velikost stlačení 750 nm



Obr. 5.5 Průměrné hodnoty modulů pružnosti buněk pro velikost stlačení 750 nm. Jednotlivé hodnoty jsou rozděleny na vodorovné ose do skupin podle typu buněčné linie, jednotlivé barvy určují typ podkladu, na kterém byla sada buněk z dané buněčné linie kultivována, význam zkratk viz kapitola 4.1.

Průměrný Youngův modul pružnosti pro velikost stlačení 1000 nm



Obr. 5.4 Průměrné hodnoty modulů pružnosti buněk pro velikost stlačení 1000 nm. Jednotlivé hodnoty jsou rozděleny na vodorovné ose do skupin podle typu buněčné linie, jednotlivé barvy určují typ podkladu, na kterém byla sada buněk z dané buněčné linie kultivována, význam zkratk viz kapitola 4.1.

Na výše uvedených grafech (viz Obr. 5.2 - Obr. 5.5) lze v rámci každé buněčné linie pozorovat určité rozdíly v průměrných hodnotách modulů pružnosti buněk, kultivovaných na jednotlivých podkladech. Přesné hodnoty jsou vypsány v tabulkách níže, viz Tabulka 5 - Tabulka 8. Rozdíly jsou dále popsány právě v rámci jednotlivých buněčných linií, porovnány jsou pak zejména vůči nemoifikovanému podkladu, tj. podkladu s označením Glass.

Průměrný modul pružnosti buněk z buněčné linie WM2664 kultivovaných na podkladu Coll má velkou směrodatnou odchylku (v závislosti na velikosti stlačení  $\pm 67-78 \%$ ), změna této hodnoty oproti hodnotě průměrného modulu pružnosti buněk na podkladu Glass tak není signifikantní. Průměrný modul pružnosti buněk na podkladu Glass má při velikosti stlačení 250 nm hodnotu  $E = 95.7 \pm 24.1 \text{ kPa}$ . Na podkladu FN vykazují od velikosti stlačení 500 nm buňky této buněčné linie dvakrát nižší hodnoty modulu pružnosti než na podkladu Glass. Nejnižší modul pružnosti mají buňky kultivované na podkladu PLL. Průměrná hodnota modulu pružnosti těchto buněk je asi pětikrát menší než buněk na podkladu Glass.

Podíváme-li se na hodnoty průměrných modulů pružnosti buněk z linie WM115 na všech podkladech a vezmeme-li v úvahu směrodatné odchylky, není rozdíl v těchto hodnotách signifikantní. Je ale vidět, že vliv podkladu na modul pružnosti buněk je u této linie oproti ostatním liniím nepatrný.

Buňky z buněčné linie A375 mají nejnižší modul pružnosti na podkladu Coll. Oproti podkladu Glass, kde při velikosti stlačení 250 nm je  $E = 66.5 \pm 39.4 \text{ kPa}$ , je zde hodnota průměrného modulu pružnosti buněk téměř dvakrát nižší, při vyšších velikostech stlačení až třikrát. Hodnota průměrného modulu pružnosti buněk na podkladu PLL je oproti hodnotě na podkladu Glass také nižší, a to o 30-50 % v závislosti na velikosti stlačení. Nejvyšší modul pružnosti pak vykazují v této buněčné linii buňky, kultivované na podkladu FN. Při velikosti stlačení 250 nm je na tomto podkladu dosaženo nejvyššího modulu pružnosti ze všech měření  $E = 157.4 \pm 98.1 \text{ kPa}$ .

Průměrný modul pružnosti buněk z buněčné linie WM35 na podkladu Glass při velikosti stlačení 250 nm má hodnotu  $E = 56.9 \pm 35.6 \text{ kPa}$ . Na podkladu Coll je hodnota

průměrného modulu pružnosti o 20-90% vyšší v porovnání s hodnotou na nemodifikovaném podkladu Glass (v závislosti na velikosti stlačení), a tato hodnota je v rámci celé linie od velikosti stlačení 500 nm nejvyšší. Při velikosti stlačení 250 nm ji převyšuje hodnota na podkladu PLL. Hodnota průměrného modulu pružnosti buněk na podkladu PLL je o 10-50 % vyšší než na podkladu Glass. Na podkladu FN mají buňky modul pružnosti nižší oproti podkladu Glass, při velikosti stlačení 250 nm téměř dvakrát, při velikosti stlačení 1000 není tento rozdíl signifikantní.

Tabulka 5 Průměrné hodnoty Youngova modulu pružnosti buněk E [kPa] a jejich směrodatná odchylka [kPa] získané z jednotlivých buněčných linií při velikosti stlačení 250 nm.

	Glass	Coll	FN	PLL
<b>WM2664</b>	95.7 ± 24.1	105.8 ± 71.7	85.5 ± 73.0	26.1 ± 18.9
<b>WM115</b>	53.0 ± 19.7	51.0 ± 27.2	44.3 ± 25.6	36.3 ± 18.1
<b>A375</b>	66.5 ± 39.4	37.5 ± 17.2	157.4 ± 98.1	49.3 ± 28.2
<b>WM35</b>	56.9 ± 35.6	73.3 ± 49.7	30.3 ± 19.9	91.0 ± 41.0

Tabulka 6 Průměrné hodnoty Youngova modulu pružnosti buněk E [kPa] a jejich směrodatná odchylka [kPa] získané z jednotlivých buněčných linií při velikosti stlačení 500 nm.

	Glass	Coll	FN	PLL
<b>WM2664</b>	97.6 ± 11.0	93.8 ± 71.3	52.2 ± 37.2	21.3 ± 11.6
<b>WM115</b>	39.3 ± 13.1	45.9 ± 22.4	35.3 ± 11.2	36.7 ± 8.6
<b>A375</b>	86.4 ± 48.0	33.4 ± 11.1	133.9 ± 79.6	67.2 ± 31.8
<b>WM35</b>	49.8 ± 18.3	78.3 ± 57.7	38.5 ± 27.1	72.2 ± 24.9

Tabulka 7 Průměrné hodnoty Youngova modulu pružnosti buněk E [kPa] a jejich směrodatná odchylka [kPa] získané z jednotlivých buněčných linií při velikosti stlačení 750 nm.

	Glass	Coll	FN	PLL
<b>WM2664</b>	91.0 ± 8.2	90.4 ± 70.4	46.2 ± 33.4	19.2 ± 10.0
<b>WM115</b>	37.4 ± 12.5	47.9 ± 20.0	33.5 ± 14.7	36.2 ± 2.5
<b>A375</b>	90.9 ± 39.9	31.9 ± 16.3	124.2 ± 64.7	60.3 ± 17.4
<b>WM35</b>	47.8 ± 12.2	90.6 ± 64.8	38.7 ± 25.8	62.2 ± 18.4

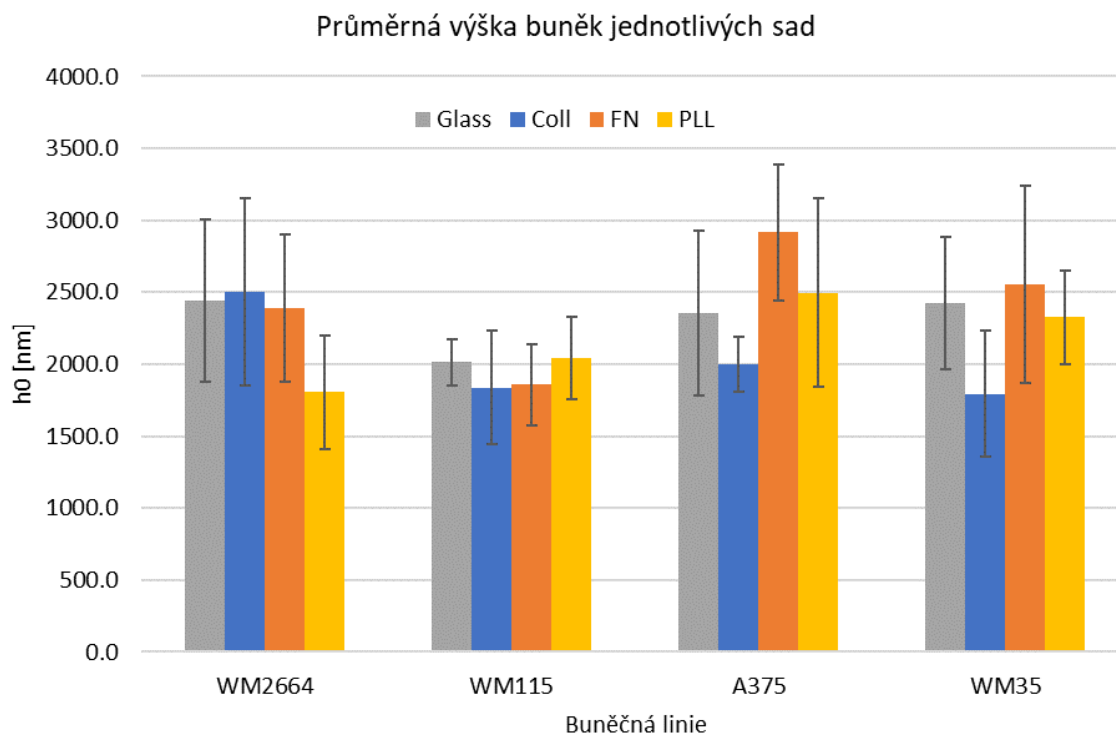


Tabulka 8 Průměrné hodnoty Youngova modulu pružnosti buněk  $E$  [kPa] a jejich směrodatná odchylka [kPa] získané z jednotlivých buněčných linií při velikosti stlačení 1000 nm.

	Glass	Coll	FN	PLL
<b>WM2664</b>	99.3 ± 20.3	87.4 ± 68.5	44.5 ± 34.3	18.0 ± 8.9
<b>WM115</b>	37.9 ± 9.1	56.7 ± 38.9	31.1 ± 12.4	39.2 ± 3.6
<b>A375</b>	98.6 ± 32.1	35.8 ± 21.8	128.7 ± 57.6	51.5 ± 21.3
<b>WM35</b>	50.0 ± 14.3	83.3 ± 66.1	46.4 ± 37.8	56.9 ± 16.3

Ze zatěžovacích křivek byla také určena výška jednotlivých buněk před kompresním experimentem  $h_0$ . Průměrné výšky buněk z jednotlivých sad ukazuje Obr. 5.6.

Maximální průměrnou výšku  $h_0$  z měřených sad má sada A375\_FN s hodnotou  $h_0 = 2915.3 \pm 474.2$  kPa. Nejmenší průměrnou výšku  $h_0$  má sada WM35\_Coll s hodnotou  $h_0 = 1795.2 \pm 439.5$  kPa. Z grafu na Obr. 5.6 je vidět, že v rámci jednotlivých buněčných linií má na výšku buňky vliv podklad, na němž byla buňka kultivována.



Obr. 5.6 Průměrná výška buněk jednotlivých sad  $h_0$ . Jednotlivé hodnoty jsou rozděleny na vodorovné ose do skupin podle typu buněčné linie, jednotlivé barvy určují typ podkladu, na kterém byla sada buněk z dané buněčné linie kultivována.

Buňky z buněčné linie WM2664 kultivované na podkladu PLL jsou například nižší než na zbývajících podkladech, na kterých jsou téměř totožně vysoké. V rámci buněčné linie WM115 rozdíly ve výšce buněk na různých podkladech nejsou signifikantní.

Buňky z buněčné linie A375 jsou nejvyšší na podkladu FN, nejnižší na podkladu Coll. Na podkladech Glass a PLL mají tyto buňky výšku téměř shodnou. Stejný trend pak můžeme nalézt i u buněčné linie WM35.

## 6 DISKUZE

Z kompresního experimentu byly získány snímky buňky před jeho provedením a po jeho skončení, viz Obr. 5.1. Tyto snímky mimo jiné ukazují, že je buňka po kompresi porušena. Důvodem je nastavení kompresní zkoušky, které bylo v našem případě takové, že se transducer zastavil až ve chvíli, kdy bylo dosaženo kontaktu hrotu se sklíčkem. Při takovém nastavení je v koncových hodnotách posuvu působící síla silně ovlivněna podkladem, na němž se buňka nachází, a může zde docházet k úniku tekutiny z vnitřku buňky. Proto pro získání modulu pružnosti buňky nelze vyhodnocovat zatěžovací křivku v celé její délce a výsledky v předchozí kapitole jsou tak omezeny do hodnot stlačení 1000 nm.

Průměrný Youngův modul pružnosti každé sady je vypočítán pro různé velikosti stlačení a vnesen do grafů na Obr. 5.2 - Obr. 5.5. Porovnání všech 4 grafů ukazuje, že trend rozdílů průměrných modulů pružnosti na jednotlivých typech podkladů se v rámci jedné buněčné linie v závislosti na velikosti stlačení nemění až na dvě výjimky – sada WM2664\_Glass a WM115\_Glass, která však není signifikantní. Pro cíl této práce, kterým je porovnání vlivu jednotlivých podkladů na mechanické vlastnosti živých buněk, by tak mohlo být dostačující použít pouze jeden graf ze 4 výše zmíněných. Otázkou je, který?

K získání Youngova modulu pružnosti jednotlivých buněk byl použit analytický model tenkostěnné skořepiny, který zohledňuje napětí v její stěně, jejíž tloušťka byla stanovena na 150 nm. Proto se jeví jako nejvhodnější použít k vyhodnocení výsledky, získané do velikosti stlačení 250 nm, viz Tabulka 5. Tato velikost odpovídá mimo jiné 1/6 velikosti nejnižších buněk. Vliv tuhosti jádra, který zaujímá u buněk melanomu 1/5 celkového objemu, je tak v tomto případě minimální a výsledky nejvíce odpovídají reálnému napětí v buněčné stěně. Je navíc jisté, že při této velikosti stlačení neuniká z buňky žádná tekutina a lze použít předpoklad zachování objemu během deformace. Měření je také nejméně ovlivněno podkladem, na němž se buňka během komprese nachází.

Zjištěné hodnoty Youngova modulu pružnosti měřených rakovinových buněk se pohybují v desítkách kPa. Ve srovnání s jinými studiemi [10], které zkoumaly mechanické vlastnosti nádorových buněk, jsou tyto hodnoty o řád větší. Všechny dosavadní studie však k zjištění mechanických vlastností používaly metodu AFM, která svým hrotem měří

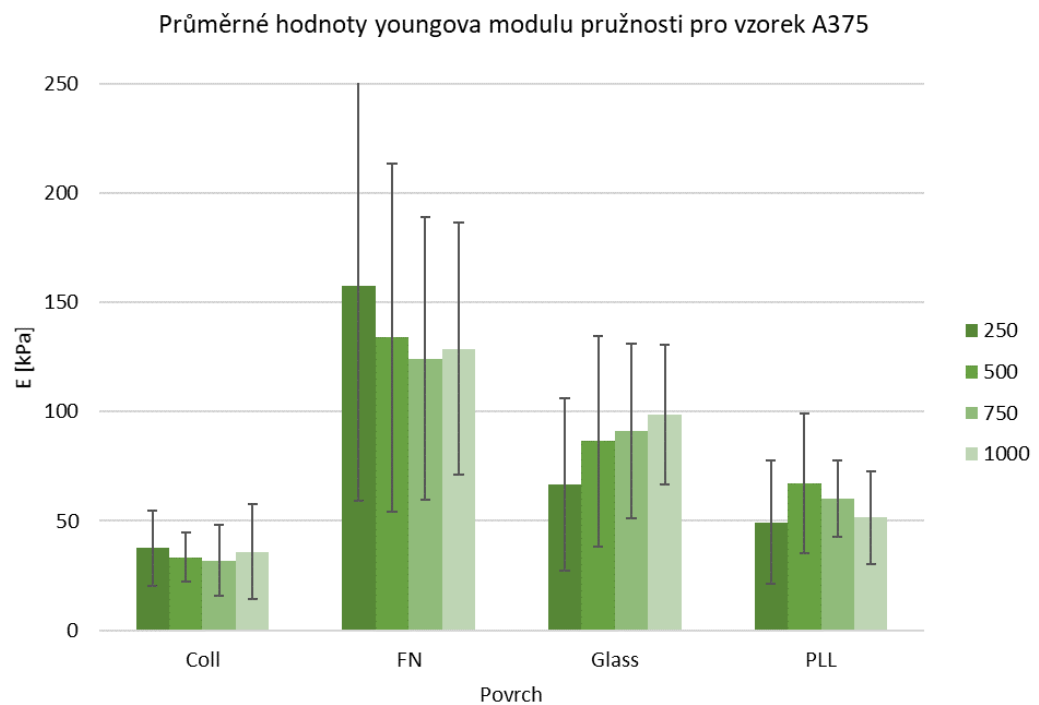
lokální mechanické vlastnosti buňky. Námi použitý kompresní experiment měří globální vlastnosti buňky, proto byly odlišné výsledky očekávané. Dalším důvodem neporovnatelnosti číselných hodnot s jinými studiemi může být použití odlišného analytického modelu. Rozdíly v číselných hodnotách modulu pružnosti buněk získaných různými analytickými modely lze vidět u Overbecka et al., kteří ve své studii [4] použili k získání modulu pružnosti 4 různé analytické modely a získali výsledky, jejichž hodnoty se liší až o jeden řád.

Model použitý v této práci zkoumá napětí ve stěně buňky, tudíž zanedbává přítomnost vnitřního cytoskeletu i jádra. Zde se naše výsledky shodují s publikovanými hodnotami tuhosti aktinového kortexu, které se pohybují v rozmezí 40-100 kPa [6]. A protože jsou hodnoty vzaty z velikosti stlačení 250 nm, vliv jádra je na výslednou tuhost při této velikosti zanedbatelný. Tímto přístupem by tak mohla být měřena pouze tuhost buněčné stěny, skládající se z aktinového kortexu a buněčné membrány.

Z grafu pro velikost stlačení 250 nm na Obr. 5.2 je dále vidět, že buňky jednotlivých buněčných linií mění při změně podkladu, na kterém byly modifikovány, své mechanické vlastnosti odlišně, jak je popsáno v kapitole 5. Například zatímco na skleněném podkladu modifikovaném fibronectinem vzorky linie A375 tuhne, vzorky linie WM35 na tom samém podkladu měknou. Je také vidět, že linie WM115 je na změnu podkladu nejméně citlivá. Naopak linie WM2664 je velmi citlivá na podklad modifikovaný polylysinem, na kterém výrazně měkne, a linie A375 je citlivá na podklad modifikovaný fibronectinem, na kterém značně tuhne. Zjištění, že měřené buňky mění své mechanické vlastnosti podle toho, na jakém podkladu se nachází, je ve shodě s literaturou [2].

Při zkoumání mechanických vlastností buněk melanomu pomocí AFM byla v předchozích studiích pozorována závislost modulu pružnosti buněk na hloubce indentace. Bylo zjištěno, že s hloubkou indentace klesá modul pružnosti buňky. V našem případě je hloubkou indentace myšlena velikost stlačení, v obou případech se pak jedná o hodnotu posuvu hrotu. Popsanou závislost lze v případě této práce nalézt pouze u několika sad. Jak je vidět na Obr. 6.1, v případě buněčné linie A375 je klesající závislost pozorovatelná u podkladu FN, zatímco na podkladu Glass s rostoucí velikostí stlačení buňka tuhne. Předpoklad, že s rostoucí velikostí stlačení v případě živých buněk melanomu modul

pružnosti klesá, tak není dle výsledků naší práce správný a nabízí se otázka, proč u AFM tento jev pozorujeme?

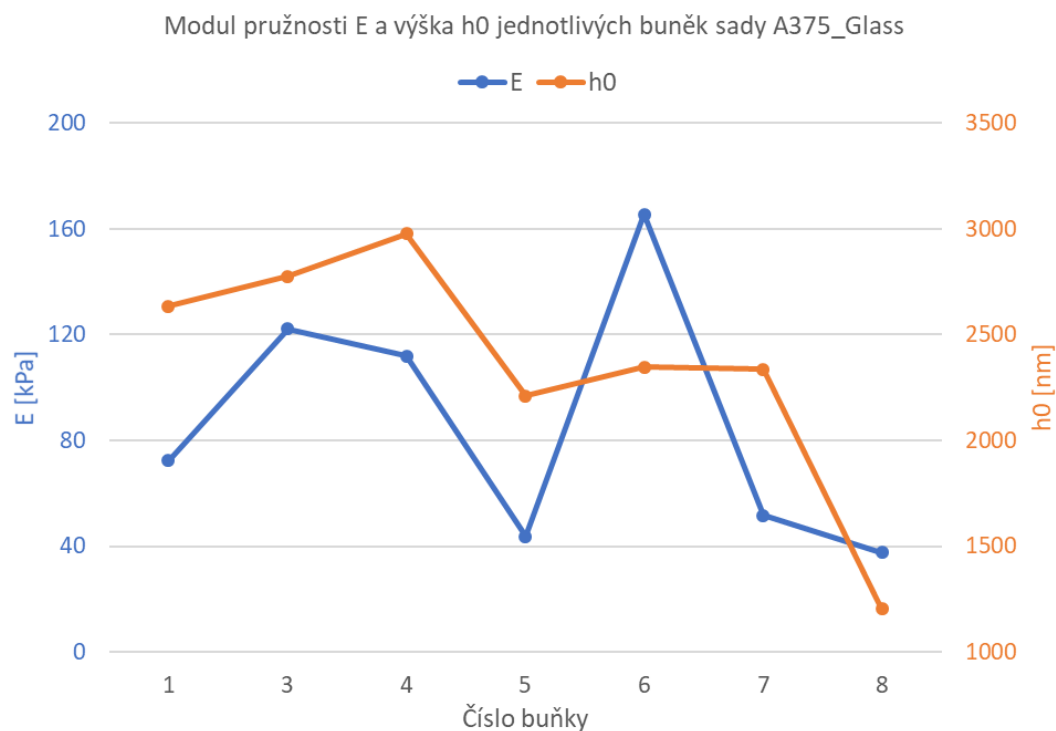


Obr. 6.1 Závislost velikosti stlačení na průměrné hodnotě modulu pružnosti buněk, získaných z buněčné linie A375 a kultivovaných na jednotlivých typech podkladů

Při AFM je prováděna lokální indentace pomocí velmi ostrého hrotu, který vniká do buňky. Tento hrot může způsobit rozrušení struktury aktinových vláken, které jsou v buněčné stěně zodpovědné za pevnost buňky. S rostoucí hloubkou indentace pak roste i rozrušení struktury, které může mít za následek pokles modulu pružnosti. Při kompresním experimentu provádíme deformaci plochým hrotem, a tak zde lokální narušení struktury nehrozí. A protože zde nebyla nalezena žádná obecná závislost na velikosti komprese, může být změna tuhosti s rostoucí velikostí komprese důsledkem dynamičnosti živé buňky, která pod působícím napětím mění svou vnitřní strukturu [9]. Co ovlivňuje, zda svou vnitřní strukturu buňka změní ve prospěch tuhosti, nelze z výsledků této práce určit a bylo by předmětem hlubšího zkoumání.

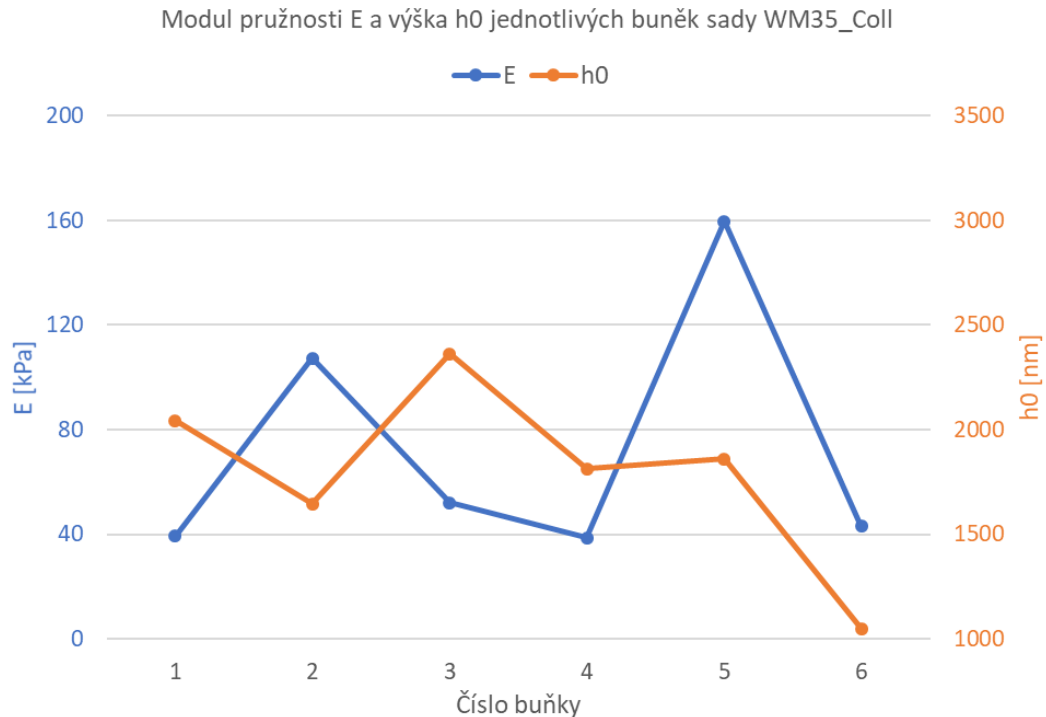
V již zmíněné práci [18] autorka zkoumala vliv výšky živých buněk (lidských osteoblastů) na jejich tuhost. Dospěla k závěru, že čím je buňka nižší, tím je tužší. Při zkoumání vlivu výšky buněk na jejich tuhost v této práci nebyla tato nepřímá úměrnost zjištěna,

což dokazuje graf na Obr. 6.2 pro sadu A375\_Glass. Ve většině případů je dokonce vidět úměrnost přímá. Protože se ale tato úměrnost neobjevuje u všech buněk (dobře je to vidět na Obr. 6.3), lze konstatovat, že tuhost buňky je nezávislá na její výšce.



Obr. 6.2 Vliv výšky jednotlivých buněk na jejich modulu pružnosti. Buňky jsou označeny na vodorovné ose číslem a přísluší sadě A375\_Glass

Průměrná výška měřených buněk se pohybuje v rozmezí od 1800 do 2900 nm. Tyto hodnoty se liší od již zjištěné výšky buněk z buněčných linií WM2664 a WM115 dle [8]. Autoři měřili výšku pomocí AFM a pro živé buňky naměřili hodnotu 3500 nm. Nicméně také zjistili, že na výšku buňky má vliv jejich úprava. Například po vyschnutí klesne výška buněk pod 1000 nm. Nižší výška buněk v této práci tak může být přisuzována odlišné kultivaci buněk před samotným experimentem.



Obr. 6.3 Vliv výšky jednotlivých buněk na jejich modulu pružnosti. Buňky jsou označeny na vodorovné ose číslem a přísluší sadě WM35\_Coll

Na výšku buňky má též vliv přesná detekce prvního kontaktu hrotu s buňkou, jež je zároveň stěžejní pro správnou interpretaci získaných dat z kompresního experimentu [21]. Pro identifikaci počátečního kontaktu je v případě této práce použita metoda, která pracuje pouze se zatěžovací křivkou, viz kapitola 4.3. Tato metoda bere v úvahu nežádoucí přírůstek sil působících na hrot v kapalině v počátku měření individuálně pro každou buňku přesně v momentě zatěžování. Odečtení těchto sil je tak přesnější, než když je k jejich odečtení použita křivka se zaznamenanými silami z jiného měření, tj. z referenční indentace. Úskalí použité metody je v případě, kdy je prokládán příliš krátký úsek zatěžovací křivky mimo buňku, který je vyznačen modře na Obr. 4.3. Proložený polynom pak může mít neodpovídající charakter. Pro přesnější popis nežádoucích sil působících na hrot v kapalině by tak bylo vhodné posunout počáteční pozici transduceru do větší vzdálenosti od povrchu buňky a získat tak více dat pro proložení.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce je strukturována do několika oddílů, jež odpovídají postupu, který byl zvolen tak, aby byly splněny vytyčené cíle.

Nejprve byla provedena rešerše v oblasti stavby eukaryotické buňky, na kterou navázala rešerše o rakovinové buňce melanomu. V těchto oblastech byly vyhledány informace, které napomohly ke vhodné analýze mechanických vlastností měřených živých buněk. Byly zjištěny rozměry jednotlivých částí rakovinové buňky, stejně jako její mechanické vlastnosti.

Mechanické vlastnosti buněk lze měřit různými metodami, proto byla provedena rešerše těchto metod s důkladnější rešerší metody komprese, pomocí které byla získána data vyhodnocená v této práci. Mechanické vlastnosti rakovinových buněk se do této doby měřily pouze pomocí AFM, jehož znalost byla použita k interpretaci výsledků, získaných právě pomocí tohoto experimentu.

Byla provedena rešerše analytických metod, použitelných pro kompresní experiment živých buněk. Jako hlavní zdroj zde posloužil článek od Overbecka et al. [4], který přichází s modelem buňky založeným na geometrii a využívajícím teorii skořepin.

Samotný experiment byl proveden na Fakultě strojní ČVUT v Laboratoři nanoindentačních zkoušek na přístroji pro nanomechanické a nanotribologické testování Hysitron TI 950 TriboIndenter™. Jednalo se o kompresní experiment mezi dvěma paralelními deskami. Měřeny byly mechanické vlastnosti buněk melanomu, získané ze 4 odlišných buněčných linií. Tyto buňky byly kultivovány na 4 různých podkladech předepsaným postupem a následně jednotlivě stlačovány v režimu nanoDMA. Experimentu bylo podrobena celkem 144 buněk. Z této kompresní zkoušky byla získána data ve formě závislosti posuvu hrotu na působící síle. Dále byly získány snímky před kompresní zkouškou a po ní, ze kterých je patrné, že se jedná o zkoušku destruktivní.

Při vyhodnocování dat získaných z experimentu byla prvním úkolem eliminace přírůstku sil působících na hrot v tekutině na počátku každého měření. Osvědčené postupy v tomto případě nemohly být použity, proto byl vyvinut nový postup. Využita byla



interpolace polynomem druhého stupně té části zatěžovací křivky, která neobsahuje kompresi buňky. Polynomem vytvořená křivka byla prodloužena i do oblasti komprese a odečtena od celé zatěžovací křivky. Tím byla získána nová data, ze kterých byl již snadno určen počátek komprese.

Data byla dále proložena analytickým modelem, zohledňujícím geometrii měřených buněk a respektujícím teorii skořepin. Použitý analytický model je inspirován modelem z publikace [4], ve které autoři zkoumají mechanické vlastnosti kulových buněk. Rakovinové buňky takový tvar před kompresní zkouškou nemají, proto byly popsány pomocí geometrie plného toroidu. Tím bylo docíleno velké shody modelu s experimentálními daty.

Proložení bylo provedeno pro různé velikosti stlačení, definované posuvem hrotu. Byl tak získán Youngův modul pružnosti buňky i v závislosti na velikosti stlačení. Z následné analýzy muselo být vyřazeno několik křivek, u kterých byl po proložení analytickým modelem vypočítán koeficient determinace menší než 80 %. Tento nízký koeficient se objevil převážně u velikostí komprese menší než 200 nm, což může být způsobeno nepřesností při určování prvotního kontaktu hrotu s povrchem buňky a omezenou citlivostí přístroje.

Bylo zjištěno, že tuhost buňky je ovlivněna podkladem, na kterém je kultivována. Porovnány byly průměrné moduly pružnosti všech buněčných linií na jednotlivých typech podkladů. Jejich rozdíly ukázaly, že každá buněčná linie reaguje na jeden a ten samý podklad odlišně. Při výběru modifikace podkladu je tak třeba zohlednit specifické chování každé buněčné linie na daný podklad.

Z provedené rešerše pro indentaci živých buněk pomocí AFM byla předpokládána závislost modulu pružnosti na velikosti stlačení. Tento předpoklad nebyl potvrzen a je tak možné, že pozorovaná závislost je pouze dílem AFM, které měří lokální mechanické vlastnosti buněk. Nebyla prokázána ani závislost výšky buněk na jejich tuhost.

Provedený kompresní experiment se ukázal jako relativně jednoduchý. Pro získání globálních mechanických vlastností jednotlivých buněk vyžaduje oproti AFM pouze jednu zatěžovací křivku, tj. jediné měření v rámci jedné buňky. Získání globálních

mechanických vlastností pak více odpovídá reálnému namáhání rakovinových buněk v lidském těle, zvláště těch metastazujících, které jsou při průchodu řečištěm stlačovány.

Výsledky prezentované v této práci mají veliký rozptyl hodnot, jejich ověření je proto namístě. Pro větší statistickou významnost by bylo vhodné v budoucnu provést měření výrazně většího počtu buněk. Jednoduchost a menší časová náročnost experimentu, která vyplývá z jeho nastavení, popsaném v této práci, toto umožňuje.

Náročnost kompresního experimentu vzroste, pakliže je požadováno přesnější vyhodnocení dat, které by odpovídalo reálnému zatížení buněk a nešlo by pouze o komparativní analýzu. V takovém případě by bylo dobré v budoucnu upravit nastavení experimentu. K ověření správné eliminace nežádoucího přírůstku sil na počátku měření by např. dobře posloužila referenční indentace v blízkosti měřené buňky. Ve spojení se skenováním povrchu pomocí AFM by bylo možné získat přesnou výšku a tvar buňky, viz [8]. Určení počátku komprese by pak bylo snadnější a přesnější – odečtením velikosti buňky od maximálního posuvu hrotu. Znalost tvaru buňky by pak posloužila k přesnějšímu definování její geometrie s přesnými rozměry.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] QUAN, Fu-Shi a Kyung Sook KIM. Medical applications of the intrinsic mechanical properties of single cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* [online]. 2016, 48(10), 865-871 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1093/abbs/gmw081. ISSN 1672-9145. Dostupné z: <https://academic.oup.com/abbs/article-lookup/doi/10.1093/abbs/gmw081>
- [2] ESPINOSA, H. D. a Gang BAO. *Nano and cell mechanics: fundamentals and frontiers*. Chichester, West Sussex: John Wiley, 2013. ISBN 9781118460399.
- [3] LEKKA, M. a P. LAIDLER. Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotechnology* [online]. 2009, 4(2), 72-72 [cit. 2019-06-18]. DOI: 10.1038/nnano.2009.004. ISSN 1748-3387. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nnano.2009.004>
- [4] OVERBECK, Achim, Steffi GÜNTHER, Ingo KAMPEN a Arno KWADE. Compression Testing and Modeling of Spherical Cells – Comparison of Yeast and Algae. *Chemical Engineering & Technology* [online]. 2017, 40(6), 1158-1164 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1002/ceat.201600145. ISSN 09307516. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ceat.201600145>
- [5] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- [6] KRIEG, Michael, Gotthold FLÄSCHNER, David ALSTEENS, et al. Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nature Reviews Physics* [online]. 2019, 1(1), 41-57 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1038/s42254-018-0001-7. ISSN 2522-5820. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s42254-018-0001-7>
- [7] CHUGH, Priyamvada a Ewa K. PALUCH. The actin cortex at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. 2018, 131(14) [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1242/jcs.186254. ISSN 0021-9533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.186254>
- [8] BOBROWSKA, Justyna, Joanna PABIJAN, Joanna WILTOWSKA-ZUBER, et al. *Protocol of single cells preparation for time of flight secondary ion mass spectrometry*. *Analytical Biochemistry* [online]. 2016, 511, 52-60 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1016/j.ab.2016.06.011. ISSN 00032697.

- [9] TREPAT, Xavier, Linhong DENG, Steven S. AN, Daniel NAVAJAS, Daniel J. TSCHUMPERLIN, William T. GERTHOFFER, James P. BUTLER a Jeffrey J. FREDBERG. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*. 2007, 447(7144), 592-595. DOI: 10.1038/nature05824. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature05824>
- [10] HAYASHI, Kozaburo a Mayumi IWATA. *Stiffness of cancer cells measured with an AFM indentation method*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2015, 49, 105-111 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.04.030. ISSN 17516161. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616115001587>
- [11] LODISH, Harvey, Arnold BERK, S Lawrence ZIPURSKY, Paul MATSUDAIRA, David BALTIMORE a James DARNELL. *Molecular Cell Biology: Tumor Cells and the Onset of Cancer* [online]. 4th edition. New York: W. H. Freeman, 2000 [cit. 2019-06-13]. ISBN ISBN-10: 0-7167-3136-3. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21590/>
- [12] ALECSANDRU, Ioan Baba a Cătoi CORNEL. *Comparative Oncology: Chapter 3, Tumor cell morphology* [online]. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007 [cit. 2019-06-13]. ISBN ISBN-10: 973-27-1457-3. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>
- [13] Morphology of cancer cells. In: *Bioted* [online]. Barcelona [cit. 2019-06-13]. Dostupné z: <http://bioted.es/protocolos/MORPHOLOGY-CANCER-CELLS-ENG.pdf>
- [14] BOBROWSKA, Justyna. *Characterization of cell surface structure and its relation to cytoskeleton elasticity in cancer cells*. Kraków, 2016. Doctor Thesis. The Henryk Niewodniczański Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences.
- [15] POGODA, Katarzyna, Justyna JACZEWSKA, Joanna WILTOWSKA-ZUBER, Olesya KLYMENKO, Kazimierz ZUBER, Maria FORMAL a Małgorzata LEKKA. Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data. *European Biophysics Journal* [online]. 2012, 41(1), 79-87 [cit. 2019-06-18]. DOI: 10.1007/s00249-011-0761-9. ISSN 0175-7571. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00249-011-0761-9>
- [16] RODRIGUEZ, Marita L., Patrick J. MCGARRY a Nathan J. SNIADOCKI. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanics Reviews*

- [online]. 2013, 65(6) [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1115/1.4025355. ISSN 0003-6900.  
Dostupné z:  
<http://appliedmechanicsreviews.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?doi=10.1115/1.4025355>
- [17] WANG, K., X. H. SUN, Y. ZHANG, et al. Characterization of cytoplasmic viscosity of hundreds of single tumour cells based on micropipette aspiration. *Royal Society Open Science* [online]. 2019, 6(3) [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1098/rsos.181707. ISSN 2054-5703. Dostupné z:  
<http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.181707>
- [18] ŘEHÁKOVÁ, Veronika. *Analýza mechanických vlastností nativních buněk*. Praha, 2018. Diplomová práce. ČVUT.
- [19] CAMPÀS, Otger. *A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2016, 55, 119-130 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.03.011. ISSN 10849521. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116300726>
- [20] BAI, Guo-Hua, Wen-Xi WANG a Qiu-Lin TAN. Optimization of a Cell Electro-stretching Method and Analysis of The Effect of Doxorubicin on Stiffness of Leukemia NB4 Cells. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 2018, 45(3), 363-374.
- [21] SEPITKA, J., P. GRZNAROVA, T. FUZIK a J. LUKES. Compression tests of a living cell: a contact detection problem. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* [online]. 2014, 17(sup1), 40-41 [cit. 2019-07-09]. DOI: 10.1080/10255842.2014.931093. ISSN 1025-5842. Dostupné z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10255842.2014.931093>
- [22] YOKOKURA, Tairo, Yuta NAKASHIMA, Yukihiro YONEMOTO, Yuki HIKICHI a Yoshitaka NAKANISHI. Method for measuring Young's modulus of cells using a cell compression microdevice. *International Journal of Engineering Science* [online]. 2017, 114, 41-48 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1016/j.ijengsci.2017.02.002. ISSN 00207225. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020722516305146>
- [23] ISHII, Haruhiko, Tatsuji ISHII, Takatsune NARUMI, Kenji IZUMI, Akiomi USHIDA a Taisuke SATO. Deformation Characteristics of Cultured Single Viable Cells by

- Squeezing Tests. *Nihon Reorogi Gakkaishi* [online]. 2018, 46(4), 179-184 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1678/rheology.46.179. ISSN 0387-1533. Dostupné z: [https://www.istage.jst.go.jp/article/rheology/46/4/46\\_179/article](https://www.istage.jst.go.jp/article/rheology/46/4/46_179/article)
- [24] LIM, C.T., E.H. ZHOU a S.T. QUEK. Mechanical models for living cells—a review. *Journal of Biomechanics* [online]. 2006, 39(2), 195-216 [cit. 2019-06-14]. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.12.008. ISSN 00219290. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929004005949>
- [25] LULEVICH, Valentin V., Denis ANDRIENKO a Olga I. VINOGRADOVA. Elasticity of polyelectrolyte multilayer microcapsules. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2004, 120(8), 3822-3826 [cit. 2019-06-13]. DOI: 10.1063/1.1644104. ISSN 0021-9606. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1644104>
- [26] SUCHÝ, Tomáš. *Medicínská statistika III* [přednáška]. Praha: ČVUT v Praze, 13. března 2019.