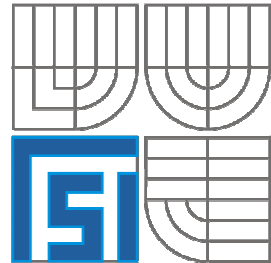


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY
A BIOMECHANIKY



FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND
BIOMECHANICS

VÝPOČTOVÉ MODELOVÁNÍ MECHANICKÝCH
ZKOUŠEK HLADKÝCH SVALOVÝCH BUNĚK
COMPUTATIONAL MODELLING OF MECHANICAL TESTS OF SMOOTH MUSCLE CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

HOLATA JAKUB

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘÍ BURŠA, Ph.D.

BRNO 2007

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky

Akademický rok: 2006/07

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Holata Jakub

který/která studuje v **magisterském studijním programu**

obor: **Aplikovaná mechanika (3901T003)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk

v anglickém jazyce:

Computational modelling of mechanical tests of smooth muscle cells

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Mechanické zatížení živé buňky významně ovlivňuje její biochemickou odezvu, ke které dochází především na úrovni jejího jádra. Proto je důležité modelovat přenos mechanického zatížení z extracelulárního prostoru do jádra buňky.

Cíle diplomové práce:

- Popis struktury buňky a analýza jejích prvků z hlediska významu pro mechanické chování buňky
- Vytvoření modelu buňky respektujícího podstatné prvky a faktory
- Simulace vybraných mechanických zkoušek buňky pomocí vytvořeného modelu

Seznam odborné literatury:

Lebiš: Výpočtové modelování mechanického chování buňky. Pojednání k SDZ, FSI VUT Brno, 2006.

M.R.K.Mofrad,R.D.Kamm: Cytoskeletal Mechanics. Cambridge University Press, 2006

D.Boal: Mechanics of the Cell. Cambridge University Press, 2001

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jiří Burša, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2006/07.

V Brně, dne 27.11.2006



prof. Ing. Jindřich Petruška, CSc.
Ředitel ústavu

doc. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Tato práce vznikla s cílem hlubšího porozumění přenosu mechanického zatížení z venkovního prostoru do jádra buňky. Ke splnění tohoto cíle bylo využito výpočtové modelování. Hlavním úkolem je tedy vytvoření věrohodného výpočtového modelu mechanického chování buňky, zahrnujícího všechny její z mechanického hlediska podstatné strukturní složky.

Jelikož není přesně známo, které komponenty buňky se na přenosu zatížení podílejí, bude v této práci uveden podrobnější popis prvků buňky, které jsou z mechanického hlediska potenciálně významné.

Každé výpočtové modelování potřebuje vstupní hodnoty z experimentu. Z tohoto důvodu je v další části uveden souhrnný přehled základních mechanických zkoušek, které jsou prováděny na buňce.

Další část práce se věnuje vytvoření výpočtového modelu buňky, který umožňuje simulovat jednoosou tahovou zkoušku. Je zde uveden postup vytvoření nestrukturního modelu a následně dokonalejšího strukturního modelu. Strukturní model v sobě zahrnuje z mechanického hlediska důležité komponenty – cytoplasmatickou membránu, cytoplasmu, která obsahuje cytoskelet, jádro a jeho vnitřní skelet. Cytoskelet je modelován jako tensegritní struktura, složená z tahových a tlakových členů. Volba modelu materiálu a jeho parametrů pro jednotlivé komponenty byla prováděna iteračně tak, aby simulace přibližně odpovídala realitě.

V závěrečné části je provedena citlivostní analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent buňky (modelu) a vlivu velikosti předpětí v tahových členech v cytoskeletu na celkovou tuhost buňky (modelu).

Klíčová slova:

Výpočtové modelování, struktura buňky, model buňky, biomechanika buňky, tensegritní struktura.

Abstract

This thesis was drawn up with an aim of better understanding for transfer of mechanical loading from outside space to cell nucleus. Computational modelling was used for realization of this thesis. Creating of reliable computational model of mechanical behaviour of cell is the main target. This model contains all its structural components essential from a mechanical point of view.

In a view of the fact that it is not exactly known which components participate in transfer of loading, detailed description of cell components is given in this thesis that are potentially significant from the mechanical point of view.

Every computational modelling requires input data of the experiment. Out of this reason, there is comprehensive overview of elementary mechanical tests that are practiced with the cell in the following part.

Another part of the thesis is devoted to creating computational model of the cell, that enables us to simulate uniaxial tension test. The process of creating a non-structural model and, consequently, a more sophisticated structural model is also described. Structural model contains important components from the mechanical viewpoint – cytoplasmic membrane, cytoplasm, that consists of cytoskeleton, nucleus and its inner skeleton. Cytoskeleton is modelled as a tensegrity structure that is composed of traction and compression elements. Option of material model and its parameters for single components was realized iteratively, so as the simulation results correspond approximately to a reality.

Sensibility analysis of influence of rigidity of individual cell components and influence of magnitude of prestress in cytoskeleton components on total stiffness is accomplished in final part of thesis.

Key words:

Computational modelling, cell structure, cell model, cell biomechanics, tensegrity structure.

Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Historie objevení buňky a následného vzniku vědeckých oborů	11
1.2	Základní členění organizmů	13
1.3	Základní rozdíly mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou.....	16
1.4	Mechanotransdukce.....	18
2	Cíl práce	18
3	Vymezení problémové situace	18
3.1	Přenos silového zatížení	18
3.2	Ateroskleróza	20
3.3	Remodelace cévní stěny	21
4	Formulace problému a metoda řešení.....	21
4.1	Formulace problému	21
4.2	Metoda řešení	22
5	Struktura buňky	22
5.1	Velikost a tvar buněk.....	23
5.2	Buněčné organely a strukturní prvky	24
5.3	Struktura eukaryotní buňky	25
5.3.1	Plasmatická membrána.....	25
5.3.2	Jádro buňky	31
5.3.3	Protoplazma.....	33
5.3.4	Struktura a funkce cytosketu	37
5.4	Okolí buněk – extracelulární matrix.....	44
5.4.1	Funkce extracelulární matrix.....	44
5.4.2	Prvky fibrilární složky ECM.....	45
6	Buněčné vazby	45
6.1	Realizace vazeb mezi buňkami	45
6.1.1	Spojení utěsňující (Zonulae occludens)	46
6.1.2	Spojení adhesivní (Zonulae adherens, Anchoring junction)	46
6.1.3	Spojení adhesivní (Macula adherens, též desmozom)	47
6.1.4	Spojení komunikační (Nexy)	47
7	Experimentální vyšetřování mechanických vlastností buněk	48
7.1	Určování odezev buněčných populací na mechanické namáhání	49
7.1.1	Zatížení deformací podložky (membrane stretch)	49
7.1.2	Zatížení fluidními smykovými silami (fluid flow).....	49
7.2	Určování mechanických vlastností izolovaných buněk	49

Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk

Diplomová práce, Holata Jakub

7.2.1	Mechanické metody lokální – vlačovací zkoušky (indentation tests).....	50
7.2.2	Mechanické metody globální – tahové, tlakové a smykové zkoušky	52
7.2.3	Aspirační test mikropipetou (micropipette aspiration).....	53
7.2.4	Magnetické metody (magnetocytometrie)	54
7.2.5	Optické metody	55
8	Výpočtové modelování mechanického chování buněk.....	56
8.1	Základní přehled výpočtových modelů mechanického chování buněk	57
8.1.1	Kontinuální modely	57
8.1.2	Tensegritní modely	58
9	Realizace řešení	61
9.1	Kontinuální nestruturní model buňky	61
9.1.1	Tvorba MKP modelu.....	63
9.1.2	Výpočtová simulace tahové zkoušky	63
9.1.3	Identifikace konstitutivních parametrů materiálu buňky.....	64
9.1.4	Výsledné porovnání experimentu a výpočtové simulace	65
9.1.5	Materiálové křivky $\sigma - \epsilon$	66
9.1.6	Parametry modelu Mooney-Rivlin.....	67
9.2	Struturní model buňky při simulaci tahové zkoušky.....	67
9.2.1	Tvorba MKP modelu.....	68
9.2.2	Výpočtová simulace tahové zkoušky	76
9.2.3	Analýza vlivu velikosti MKP sítě na přesnost řešení.....	78
9.2.4	Výsledky citlivostních analýz	79
10	Závěr.....	87
	Literatura.....	89
	Příloha	90

Bibliografická citace

HOLATA, J. Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2006. 90 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiří Burša, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem vypracoval diplomovou práci zcela samostatně s použitím literatury uvedené v závěru diplomové práce.

V Brně

.....

Poděkování

Děkuji doc. Ing. Jiřímu Buršovi, Ph.D. za odborné konzultace a Ing. Radkovi Lebišovi za neocenitelné rady, jimiž přispěli k úspěšnému dokončení mé diplomové práce.

1 Úvod

Slepý člověk nevidí nic. Hodně špatně vidící člověk rozpozná velikost slona, staletého dubu či velkého člověka. Normálně vidící člověk rozpozná zrnka cukru na dezertu u kávy. Člověk, který vidí opravdu dobře, rozpozná 0,3mm mezeru. Vědec, který by chtěl zkoumat strukturu buňky, je opět slepý, protože rozměr největší buňky lidského těla (lidské vajíčko) je cca 0,2mm. Je slepý do doby, než přijde opravdu dobrá technika... Do té doby si může vzít tak dezert, kávu a přemýšlet co dál...

Tímto jsem chtěl pouze přiblížit problematiku poznání a porozumění problémům spojených se zkoumáním tak malého a složitého tělesa jako je buňka. A také jsem chtěl zdůraznit, že nikdy nevíme, do jaké rozlišovací úrovně se lidstvo může kdy dostat (ovšem z mechanického hlediska se zatím jeví tato současná rozlišovací úroveň jako plně vyhovující). Nyní si myslíme, že je naše rozlišovací úroveň vysoká a těžko přemožitelná, ale z pohledu budoucích lidí a techniky, jsme možná v podstatě i teď slepí...

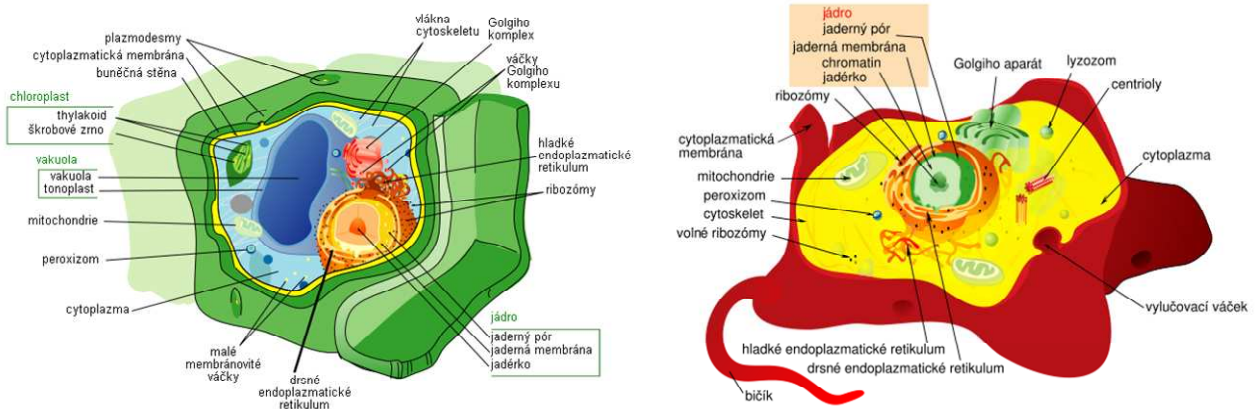
1.1 Historie objevení buňky a následného vzniku vědeckých oborů

Kapitoly 1.1 až 1.3 jsou zpracované na základě [3] a [12].

V 17. – 18. století došlo k tzv. „vědecké revoluci“, což vedlo k výraznému rozvoji matematiky, fyziky a mechaniky a také bylo objeveno mnoho fyzikálních přístrojů, mezi nimiž byl i mikroskop. Prvním člověkem, který zobrazil rostlinné i živočišné buňky byl anglický přírodovědec Robert Hook (1635–1703, je považován za objevitele rostlinných buněk). V roce 1838 jako první podali úplný popis rostlinné buňky Matthias Jakob Schleiden (botanik) a Theodor Schwann (fyziolog). Jejich hlavním objevem bylo, že rostlinné i živočišné buňky mají jádro. To vedlo k názoru, že všechny živé soustavy jsou složeny z buněk. Oba dva vyjádřili myšlenku, že základní strukturální jednotkou všech organismů je buňka.

Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk

Diplomová práce, Holata Jakub



a) schéma rostlinné buňky

Obr. 1

b) schéma živočišné buňky

M. J. Schleiden a T. Schwann zavedli v roce 1838 **buněčnou teorii** – vědecká teorie, která je jedním ze základů cytologie (buněčná biologie). Mezi všeobecně známá tvrzení této teorie patří mimo jiné:

- buňka je základní strukturní a funkční jednotou živých soustav,
- všechny organismy se skládají z jedné nebo více buněk, případně jsou na buňkách závislé (viry),
- buňky vznikají z jiných buněk dělením,
- buňky nesou genetický materiál a při buněčném dělení jej předávají dceřiným buňkám.

Získání komplexních poznatků o struktuře, vlastnostech a chování buňky vyžaduje různé přístupy a různé metody. Metodologie a metody jsou nejvíce ovlivněny úrovní techniky.

První zjištěný popis byl velice hrubý a nepřesný. Až zavedení experimentálních metod do zkoumání buňky Nägelim, Sachsem a Loebem asi před 140 lety umožnilo zkoumat hlouběji i některé procesy probíhající v buňce. Od této doby začaly vznikat nové vědní obory, např. **Biochemie**, **Buněčná biofyzika** a **Molekulární biologie** (od r. 1960). S postupující úrovní poznání a technickým rozvojem se vyvinul obor, který zkoumá vliv mechanického zatížení na buněčné procesy – **Biomechanika buňky**.

1.2 Základní členění organismů

Na naší Zemi žije dnes přibližně jeden a tři čtvrtě milionu živočišných a rostlinných druhů.

Porovnáme-li jednotlivé druhy, nalezneme značné rozdíly v mnoha faktorech, např.:

1. velikost,
od bakterie – několik tisíců milimetrů přes největší savce, které měříme na metry až po největší rostliny, které mohou dosahovat několika desítek metrů, což je případ některých stromů,
2. stavba,
3. složitost,
4. jednotlivé projevy.

Aby bylo názorně vidět, v jaké oblasti organismů se tato diplomová práce bude pohybovat (je to oblast jednobuněčných organismů → eukaryotické buňky), je zde uvedeno jejich základní členění:

1. *Podbuněčné organismy*

- viry (*vir = virus; virus – latinský název, vir – počestělý název*); Drobná částice živé hmoty tvořená dědičnou informací v podobě nukleové kyseliny (DNA či RNA) a bílkovinným obalem. Mají nejjednodušší strukturu ze všech organismů. Nejmenší z nich jsou tvořeny dokonce několika makromolekulami (bílkoviny a nukleové kyseliny). Viry však nemají vlastní metabolismus a nejsou proto schopny trvale samostatné existence. Jejich život (resp. rozmnožování) závisí na buňce, na které viry parazitují.

2. *Jednobuněčné organismy*

- mikroorganismy; Jsou tvořeny jednou jedinou buňkou. Další dělení jednobuněčných organismů bylo dle existence jádra na:
 - o **organismy prokaryotické** (bezjaderné; bakterie a sinice)
 - o **organismy eukaryotické** (buňky živočišné a rostlinné)Eukaryotické buňky jsou základní jednotkou všech živých organismů, obsahují buněčné jádro). Nelze však považovat všechny jednobuněčné organismy za buňky nejjednodušší nebo nejprimitivnější. Skutečnost, že jedno jediné jádro řídí všechny potřebné funkce živé buňky, je nesmírně

zajímavá a velice složitá a vede k nutnosti rozpoznávání nejrůznějších vnitrojaderných struktur.

3. *Buněčné kolonie*

- tvoří přechod mezi organismy jednobuněčnými a vícebuněčnými. Kolonie vzniká dělením buňky. Nejprimitivnější kolonie jsou tvořeny 4 až 32 zcela stejnocennými buňkami.

4. *Vícebuněčné organismy*

- mnohobuněčné organismy jsou složeny z více buněk (např. člověk – cca 10^{18} buněk). V této kategorii dochází k diferenciaci buněk dle struktury a funkce. Buňky určitého funkčního a strukturálního typu jsou spojeny ve tkáň. Tkáň je soubor buněk se stejnými vlastnostmi. Tkáň s různými specifickými funkcemi se seskupí navzájem a vzniknou tak orgány (obr. 2).

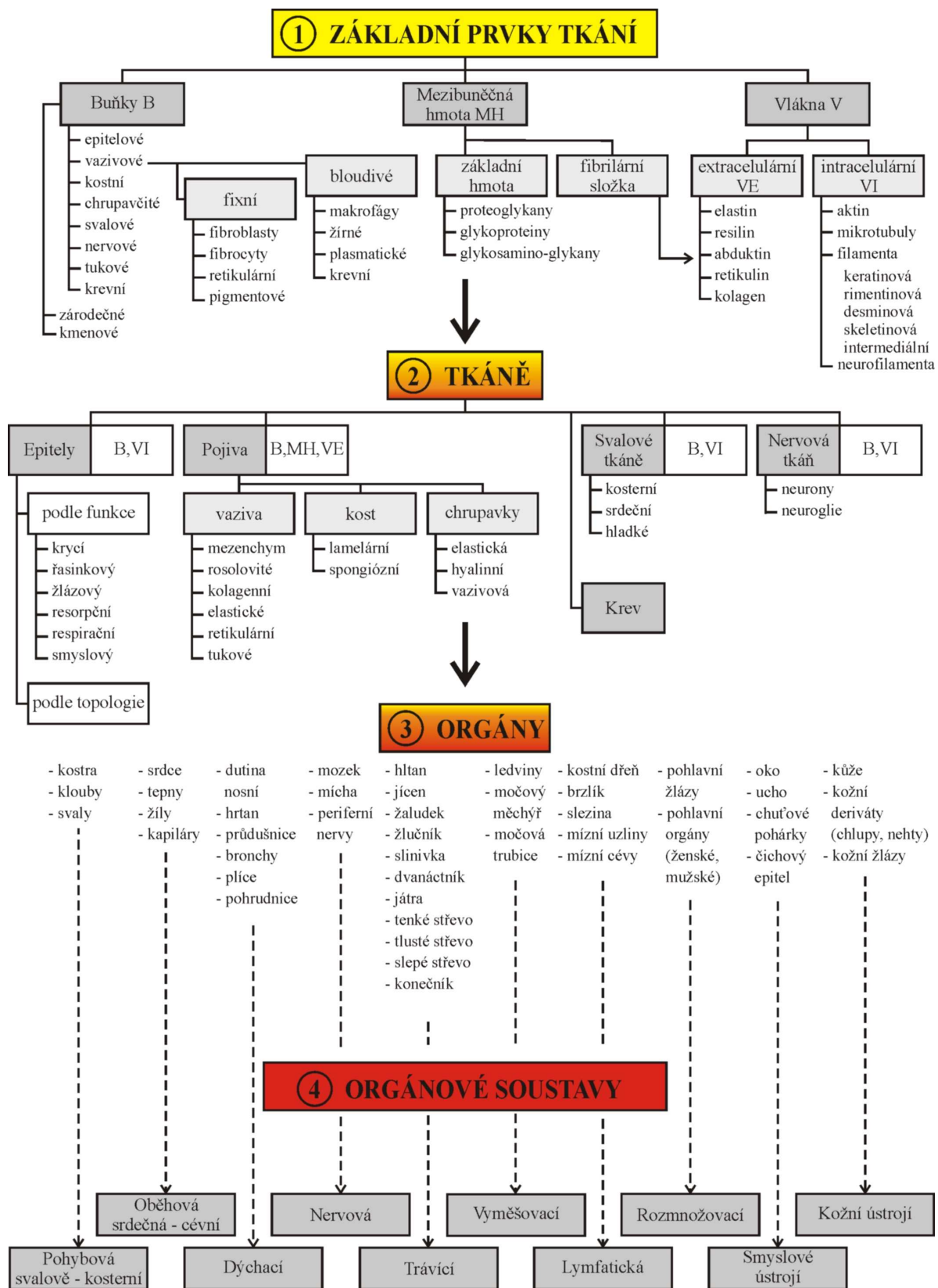
5. *Společenstva vyššího řádu*

- je to organizačně nejsložitější soustava v hierarchii živých systémů. Např. včelstvo, kde jsou jednotlivé funkce striktně rozděleny – královna, trubci a dělnice, sami o sobě však nejsou schopny zajistit přežití sebe nebo druhu. Totéž platí např. o mravencích.

Takto vymezené jednotlivé skupiny (podle [3]) považují pro jednoduchou a základní představu za dostatečné.

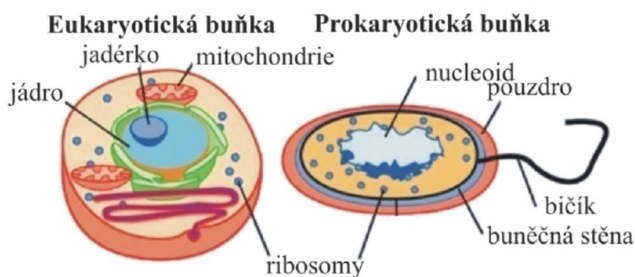
Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk

Diplomová práce, Holata Jakub



Obr. 2 Hierarchická struktura prvků lidského organismu (podle [1])

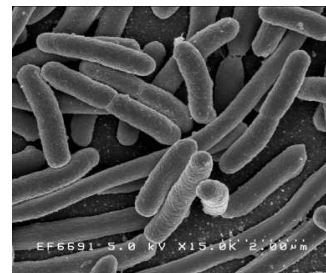
1.3 Základní rozdíly mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou



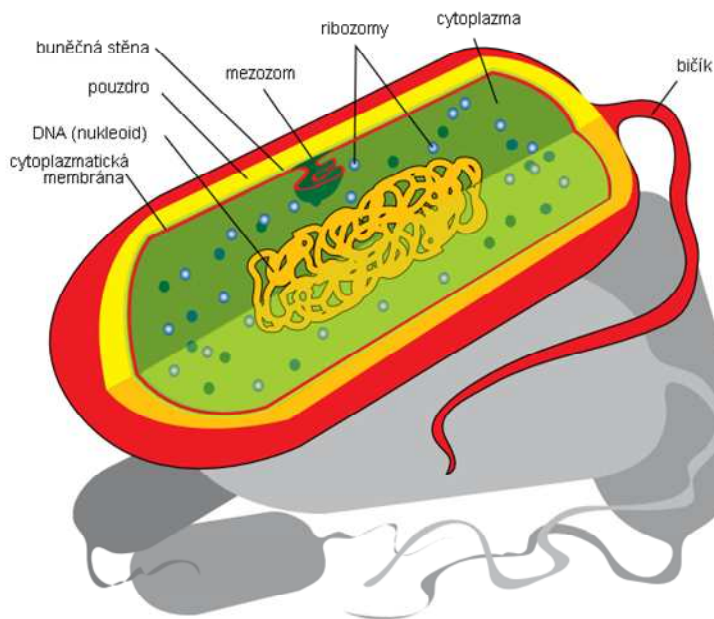
Obr. 3 Schéma eukaryotické a prokaryotické buňky

Prokaryotická buňka

Prokaryota (z řec. *pro* = před a *karyon* = jádro) – jedná se o evolučně velmi staré organismy. Do této skupiny se řadí např. bakterie (obr. 4). Tato buňka je jednodušší a menší než buňka eukaryotická a také nemůže vytvářet mnohobuněčné organismy. Neobsahuje buněčné jádro a jiné orgány. Její DNA je obsažena a umístěna v cytoplazmě v útvaru označovaném jako **nukleoid** v jediném chromosomu.



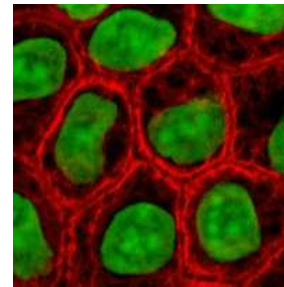
Obr. 4 Bakterie – Escherichia coli



Obr. 5 Řez prokaryotickou buňkou

Eukaryotická buňka

Eukaryota (*zastarale též jaderní = eucaryot; z řec. eus = pravý a karyon = jádro*) – do této kategorie se řadí veškerí prvoci, živočichové, rostliny i houby, ale jejich buňky se mezi sebou dále liší. Jsou výrazně složitější a také větší. Jejich složitá vnitřní struktura je předpokladem pro mezibuněčnou spolupráci potřebnou u mnohobuněčných organizmů.



Obr. 6 Eukaryotické buňky

Podrobný popis všech komponent v eukaryotické buňce bude uveden v kap. 5.

Tabulka uvádějící základní rozdíly mezi oběma typy buněk:

Tab. 1 Základní rozdíly mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou

	prokaryotická buňka	eukaryotická buňka
<i>organismy</i>	bakterie	prvoci, rostliny, živočichové
<i>velikost</i>	1–10 μm	10–100 μm
<i>typ jádra</i>	bez pravého jádra	jádro obklopené dvojitou membránou
<i>DNA</i>	obvykle cirkulární	dlouhé lineární molekuly složené v chromozomech
<i>RNA</i>	syntéza probíhá v cytoplasmě	syntéza probíhá uvnitř jádra
<i>organely a membránové struktury</i>	velmi málo vnitřních struktur	strukturizovány a velmi organizovány
<i>mitochondrie</i>	na jednu buňku vždy jedna	obvykle mnoho
<i>chloroplasty</i>	žádné	jen u řas a rostlin
<i>organizace</i>	obvykle samostatné buňky	jednobuněčné, kolonie, mnohobuněčné

Výběr eukaryotické buňky pro tuto práci má tedy své opodstatnění. Jelikož chceme zjistit jakým způsobem je mechanický signál přenášen z okolí buňky do jejího jádra, budeme potřebovat buňku, která samozřejmě jádro obsahuje a tou je právě eukaryotická buňka. Ta je charakteristická tím, že obsahuje samostatné, dvojitě membránou ohraničené jádro, které je nositelem genetické informace.

1.4 Mechanotransdukce

Pod mechanotransdukci budeme rozumět proces přenosu silového působení z extracelulárního prostoru do prostoru intracelulárního. Tento přenos může být pouze mechanický. Pro biochemickou odezvu na mechanický podnět budeme používat pojem mechanicko-biochemická transdukce. Princip mechanotransdukce a mechanicko-biochemické transdukce není dosud uspokojivě objasněn. Aktuální problémy jsou formulované zhruba do těchto otázek:

- Jakým způsobem je mechanický signál přenášen z okolí do buňky?
- Které komponenty se na tomto procesu podílejí a proč zrovna tyto?
- Jak se přemění signál mechanický na biochemický?

2 Cíl práce

V této práci se budeme zabývat výpočtovým modelováním mechanického chování buňky. Cílem bude vytvoření a odladění takového výpočtového modelu, který bude:

1. Zahrnovat nejdůležitější komponenty buňky, které jsou v této fázi a na naší rozlišovací úrovni považovány za nejpodstatnější z hlediska mechaniky těles.
2. Schopen alespoň přibližného popisu chování při mechanickém namáhání během zkoušek, které jsou v dnešní době prováděny.

3 Vymezení problémové situace

3.1 Přenos silového zatížení

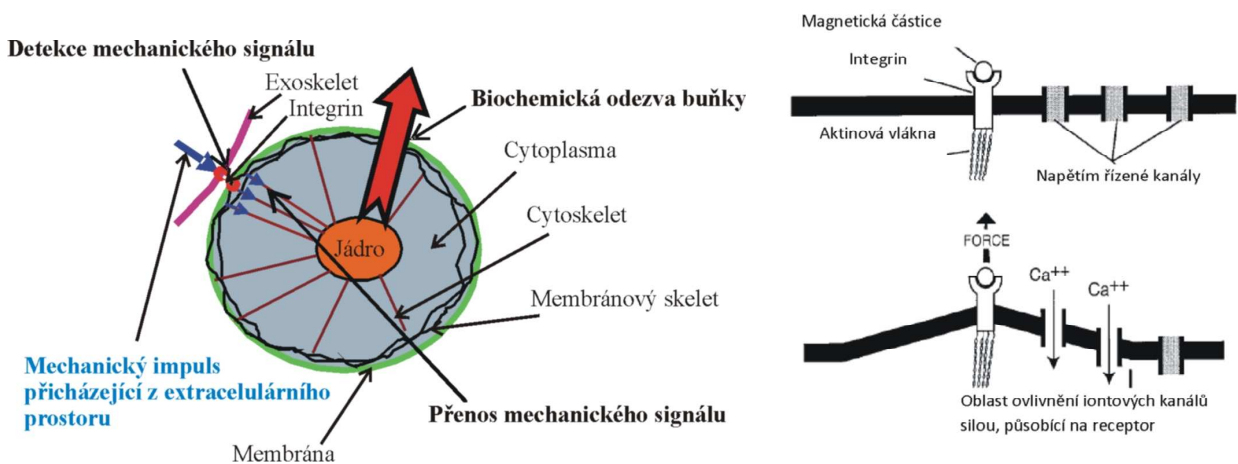
Jedná se o přenos silového zatížení z extracelulárního prostoru do intracelulárního prostoru. V této oblasti existuje mnoho problémových situací. Jednou z nich je popis mechanotransdukce. Je to velice složitý proces, pomocí kterého buňky reagují na mechanický signál přicházející z extracelulárního prostoru. Tento signál se přenesou do buňky a vyvolá patřičnou biochemickou odezvu (obr. 7). Výzkum v této oblasti mechanotransdukce je

v současné době zaměřen především na identifikaci hlavních komponent, které tuto přeměnu zprostředkovávají.

Identifikovány byly:

1. Mechanickým napětím řízené **iontové kanály** (obr. 8), které se vyskytují na buněčné membráně. Tyto kanály mají regulační funkci. Regulují tok iontů přes buněčnou membránu v závislosti na jejím mechanickém zatížení. Bylo zjištěno, že funkčnost těchto iontových kanálů je závislá na propojení s cytoskeletem. Cytoskelet zajišťuje spojení mezi jádrem buňky a jejím povrchem a také zajišťuje vazby mezi buňkou a jejím okolím (prostřednictvím spojovacích proteinů).
2. **Intracelulární komponenty a molekuly**, které hrají roli při procesu mechanotransdukce (integrin, aktin-myozinové motory, jádro, extracelulární matrix a mnoho dalších komponent)

Neznámý ovšem zůstává mechanismus, kterým všechny tyto rozdílné komponenty dokáží



Obr. 7 Schéma přeměny mechanického signálu na biochemický Obr. 8 Aktivace iontových kanálů mechanickým zatížením

společně řídit proces mechanotransdukce ve strukturní hierarchii od makroúrovně po nanoúroveň (tělo – orgány – tkáně – buňky – podbuněčné prvky).

Mechanotransdukce je zkoumána hlavně z toho důvodu, že nejnovější poznatky naznačují, že příčina nebo rozvoj mnoha onemocnění mohou často úzce souviset s abnormální mechanotransdukci. K těmto nemocím se řadí onemocnění kardiovaskulárního systému a to zejména **ateroskleróza** [2]. Stručný popis aterosklerózy bude uveden v následující kapitole.

3.2 Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění tepen („tzv. kornatění“), při němž se v jejich stěnách ukládají **tukové látky** a druhotně **vápník**.

Tukové látky se ukládají ve formě tzv. **ateromu** (z řec. *athere*=kaše). Jedná se o tukové usazeniny kašovitě konzistence ve stěně tepen, které zužují průsvit cévy (jejich zvředovatění může být provázeno vznikem **trombózy** – srážení krve v cévách. Příkladem nebezpečné trombózy v tepnách je trombóza některé koronární tepny, vznikající na stěně již stíženě aterosklerózou a způsobující **akutní infarkt myokardu**). Tepna je takto poškozována, ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování (až uzávěru) s následnou ischemií (nedokrvení) příslušné části orgánu. Nejnápadnější jsou tyto změny na věnčitých tepnách srdce (**ischemická choroba srdeční**), tepnách dolních končetin (**ischemická choroba dolních končetin**) a mozkových tepnách (termín **skleróza** pro poruchu paměti ve vyšším věku, často způsobená právě aterosklerózou). Dále mohou být postiženy další orgány. Ateroskleróza je právě základní příčinou infarktu myokardu a častou příčinou cévních mozkových příhod. Často se nepřesně jako synonymum pro aterosklerózu používá **arterioskleróza**, což je laicky tvrzení tepen. Z mechanického hlediska se jedná o zvětšení modulu pružnosti a tím ztráty elasticity tepny. Toto srovnání není ale úplně přesné, jelikož arterioskleróza je vlastně předstupeň aterosklerózy.[13]

Vznik ateromu je patologický proces a zde je zřejmá úzká souvislost mezi vznikem tohoto patologického procesu v tepnách a mechanickým zatížením. Cévní stěna je namáhána cyklickým napětím, které je způsobeno pulzujícím tlakem krve, zbytkovým napětím způsobeným „technologii výroby“ tepny a napětím od axiálního předepnutí tepny. Výsledkem výpočtového modelování je tenzor přetvoření. Tenzor přetvoření lze konstitutivními vztahy pro daný materiál převést na tenzor napětí. Obvodová složka tenzoru napětí je v důsledku existence zbytkové napjatosti po průřezu tepny téměř rovnoměrná.

K rizikovým faktorům vzniku aterosklerózy patří především zvýšená hladina krevních tuků (zejména cholesterolu), hypertenze, kouření, obezita, diabetes melitus, stres, nedostatek pohybu a zvýšená hladina homocysteinu v krvi. Homocystein je aminokyselina obsahující síru, vzniká v organismu při metabolismu. Zvýšená hladina této kyseliny v krvi se považuje za významný faktor urychlující aterosklerózu a trombotické stavy, a to zejména při některých současných poruchách krevních tuků. Dojde k poškození **endotelu** (buněčná vrstva vystylající

vnitřek cév). Mechanickým vlivem (a samozřejmě i dalšími – kouřením, infekcí atd.) lze tuto výstelku poškodit. Narušení funkce endotelu – *endoteliální dysfunkce* – vede ke vzniku řady chorob, mezi nimiž je i vznik aterosklerózy.[13]

3.3 Remodelace cévní stěny

Jednou z problémových situací je **remodelace cévní stěny**. Touto remodelací je doprovázen rozvoj aterosklerózy. Remodelace spočívá v tom, že organismus reaguje mj. na zvýšené napětí ve stěně tepny tak, že v oblasti některé její vrstvy vyprodukuje více kolagenu a tím stěnu tepny vyztuží – remodeluje. Důležitou roli při remodelaci cévní stěny plní buňky hladkého svalstva. Ve stěně tepny se vyskytují dva základní typy buněk (tzv. **fenotypy** buněk). Je to fenotyp **kontraktilní** a **syntetický**. Struktura a funkce těchto buněk jsou zcela odlišné:

- **Kontraktilní** buňky mají za úkol regulovat krevní průtok a tlak (prostřednictvím kontrakce a relaxace tepny)
- **Syntetické** buňky jsou velice důležité při rozvoji a regeneraci tepen.

Ve stěnách tepny převažují buňky typu kontraktilního. Změna fenotypu (přeměna buňky z kontraktilní na syntetickou) se nazývá **fenotypická modulace** a je jedním z hlavních důvodů právě remodelace cévní stěny. Důvod, proč dochází k fenotypické modulaci není prozatím objasněn [2].

4 Formulace problému a metoda řešení

4.1 Formulace problému

Problém, jenž vyplývá z problémových situací, které byly popsány v předchozím textu je následující:

Vytvoření a otestování výpočtového modelu s takovými vlastnostmi (materiál, geometrie, vazby, zatížení), který by simuloval určité mechanické zkoušky na jisté rozlišovací úrovni a který by dával takové výsledky řešení, které budou na přijatelné úrovni v souladu s experimentálně zjištěnými daty.

Tento model následně vhodně doplňovat a zdokonalovat pro přesnější popsání mechanického chování buňky. Jelikož jsou v praxi uskutečnitelné mechanické zkoušky pouze na kompletní buňce, nikoliv na jejich jednotlivých komponentách, je výpočtový model důležitý pro identifikaci materiálových charakteristik. Z tohoto důvodu je nutné vytvořit výpočtový model, jenž bude schopen popsat materiálové vlastnosti jednotlivých komponent buňky při určitém mechanickém zatížení. Jedná se tedy o úlohu o identifikaci konstitutivních parametrů jednotlivých komponent.

4.2 Metoda řešení

Jelikož nelze určit konstitutivní parametry přímo (nelze je přímo měřit) budou tyto parametry z výchozích hodnot známých z literatury nebo jednodušších modelů upřesňovány postupnou iterací tak, aby výsledný výpočtový model s určitou přesností simuloval experiment. Výpočtový model bude vytvořen a otestován na základě experimentálně zjištěných mechanických vlastnostech buňky. Tento model buňky bude modelován metodou konečných prvků (MKP) v programovém systému ANSYS.

5 Struktura buňky

Všechny buňky jednobuněčných organismů, vícebuněčných živočichů a rostlin mají stejný základní princip stavby i funkce. Struktury, které jsou nositeli hlavních životních funkcí buňky, se vyskytují ve všech buňkách. Mluvíme proto o obecné struktuře buňky. Buňka je z hlediska struktury neobyčejně složitou soustavou, jejímiž prvky jsou jednodušší substruktury. Buňka je tedy vícestupňovou soustavou (formálně vyjádřeno má základní rysy vícestupňového systému) [1][3].

Z tohoto důvodu je možno analyzovat buňku systémově, protože buňka je systémovým objektem. Buňka má:

- **strukturu**

Struktura je tvořena membránou, cytoplazmou a buněčnými organelami.

- **vazby**

Vazby na své okolí, na extracelulární prostor, na jiné buňky.

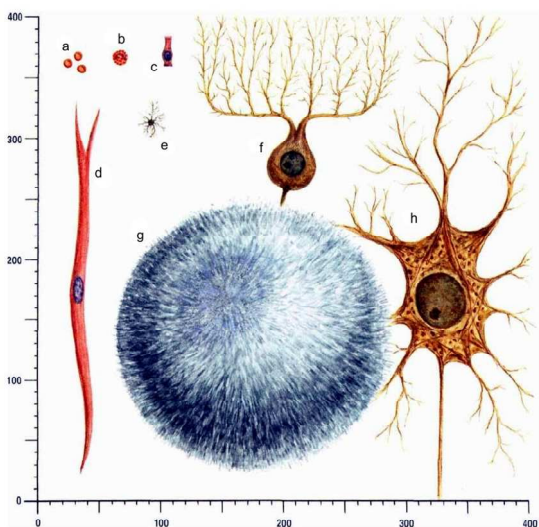
- **cílová chování**

V podobě své funkční specializace.

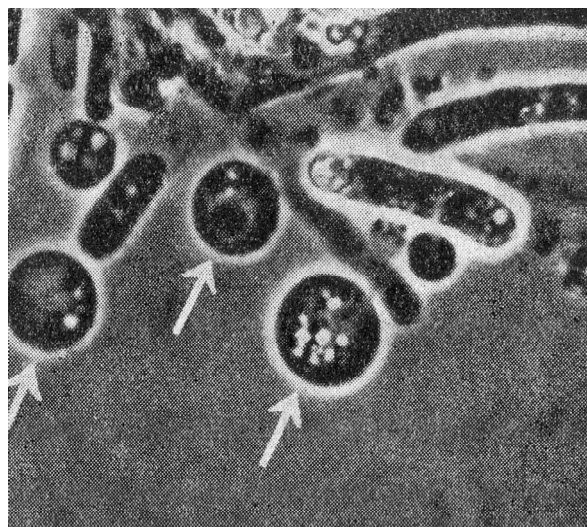
Jelikož tato diplomová práce má svá rozsahová omezení, budeme se v této kapitole věnovat pouze analýze struktury buňky a analýze vazeb buňky na okolí.

5.1 Velikost a tvar buněk

Buňky mají mikroskopické rozměry a jejich organely jsou v řádech nanometrů. K největším buňkám patří některé vaječné buňky (např. vajíčka ptáků) a také buňky obsahující více jader (např. některé řasy – „žabí vlas“ obsahuje 64 jader a má rozměr cca 0,3x3 mm). Lidské vajíčko má rozměr 200 až 250 μm . Tato „nadměrná“ velikost je způsobena tím, že obsahuje velké množství výživných látek pro příští plod. Naopak k nejmenším buňkám patří drobné nervové buňky (cca 3 μm). Velikosti vybraných buněk jsou na obr. 9 [1][3].



Obr. 9 Tvar a velikost vybraných buněk



Obr. 10 Kulovitý tvar rostlinné buňky bez buněčné stěny; zvětšení 1000x

- a) erytrocyt (červená krvinka)
- b) leukocyt (bílá krvinka)
- c) buňka epitelu (b. výstelky)
- d) hladká svalovina
- e) mikroglie
- f) Purkyňova buňka
- g) lidské vajíčko
- h) velký neuron (nervová b.)

Primární tvar buněk je kulovitý. Jestliže má buňka jiný tvar než kulovitý, může to být způsobeno:

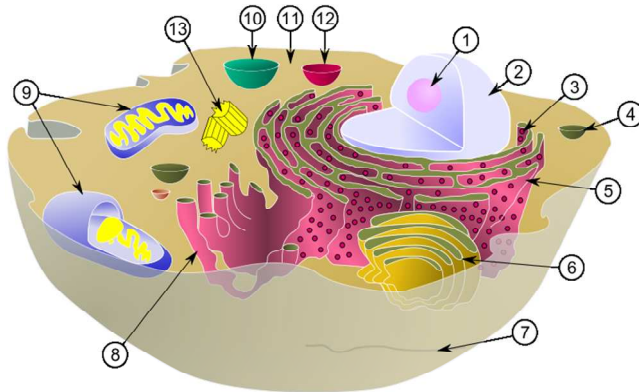
1. Deformací vnějšími silami (např. vzájemná „mechanická“ deformace buněk ve tkáni, vlivem povrchového napětí u buněk rostoucích na pevných podložkách atd.).
2. Pevnou buněčnou stěnou určitého tvaru (zbavíme-li např. protáhlé rostlinné buňky buněčné stěny, zaujme protoplast (protoplast je buňka zbavená stěny) kulovitý tvar (obr. 10).
3. Existencí pevných struktur uvnitř buňky.
4. Kontaktem sousedících buněk.

5.2 Buněčné organely a strukturní prvky

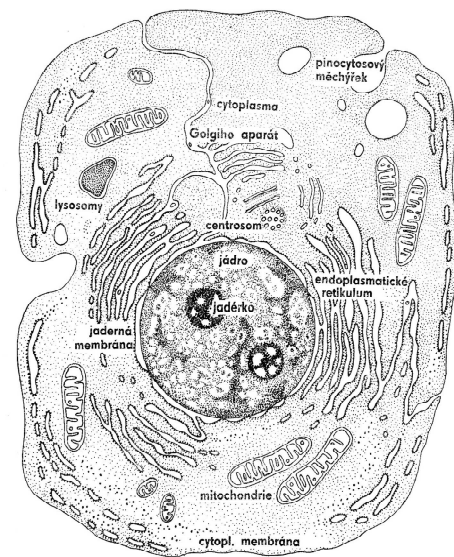
Buňka je základním prvkem živých organismů v tom smyslu, že žádná část její struktury umístěna mimo buňku není schopna samostatného života. Buňka je samostatnou funkční a účelovou soustavou, jejíž detailní strukturu tvoří množina prvků uvedených dále. Při „hrubším“ členění struktury buňky, se jako základní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

- **plasmatická membrána** (buněčná membrána; odděluje vnitřek buňky od jejího okolí)
- **jádro buňky** (jeho prvky jsou: jaderná membrána, chromatin, jadérko a jaderná matrix)
- **cytoplazma** (ta se skládá z těchto komponent: základní hmota, buněčné organely, cytoplazmatické inkluze a cytoskelet)

„Jemnější“ členění buňky má tyto prvky:



Obr. 11 Schéma živočišné buňky (podle [15])



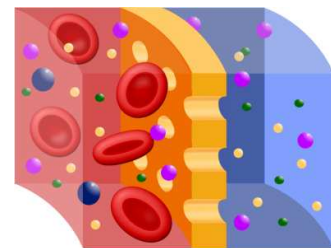
Obr. 12 Schéma živočišné buňky (podle [3])

1. jadérko
2. jádro
3. ribosom
4. membránový váček (transportní váčky, vezikuly – součást membránového komplexu endoplasmatického retikula a Golgiho komplexu)
5. drsné endoplasmatické retikulum
6. Golgiho komplex
7. cytoskelet
8. hladké endoplasmatické retikulum
9. mitochondrie
10. vakuola
11. cytoplasma
12. lysosom
13. centrioly

5.3 Struktura eukaryotní buňky

5.3.1 Plasmatická membrána

Nazývá se též pojmy cytoplazmatická membrána nebo plazmalema. Je to strukturně složitý útvar, který ohraničuje tělo buňky, zajišťuje její celistvost a umožňuje vazby s okolím buňky. Průměrná tloušťka této membrány je cca 6 – 10 nm. Plasmatická membrána je tenký polopropustný obal ohraničující buňku a je soustavou, jejímiž prvky jsou tři typy **tuků** (lipidů), dva druhy **bílkovin** (proteinů) a povrchová vrstva **cukrů**



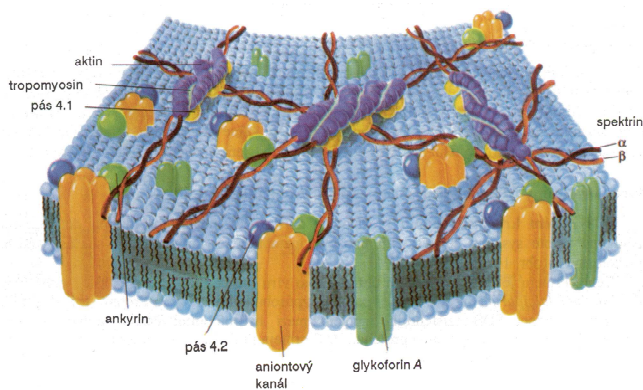
Obr. 13 Polopropustná membrána (žlutá barva)

(sacharidů). Polopropustnost znamená, že membrána propouští pouze některé molekuly nebo ionty, jak je znázorněno na obr. 13.

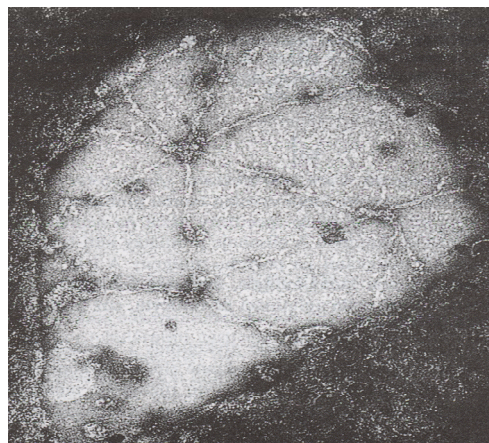
Buněčná membrána má minimální mechanickou odolnost vůči silovému a deformačnímu působení na buňku, které by v ní mohlo vyvolat nepřípustné deformace nebo porušení soudržnosti membrány. Proto je membrána vyztužena mechanicky zevnitř tzv. buněčným **endoskeletem** (cortex of cell) a z vnějšku zase **exoskeletem**.

5.3.1.1 Buněčný endoskelet

Je to, po mechanické stránce, samonosná soustava, jejíž funkcí je zajišťovat relativní tvarovou stabilitu buňky a veškeré její mechanické vlastnosti. Strukturu endoskeletu tvoří množina „lan“ a „kotevnic“ prvků v buněčné membráně a vazebních prvků mezi nimi. „Lana“ jsou tvořena tetramery proteinu spektrin (alfa a beta). V místech křížení spektrinových tetramerů se nachází protein **aktin** (obr. 14 a 15).



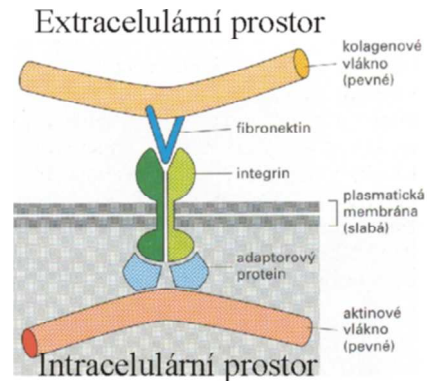
Obr. 14 Schéma endoskeletu erythrocytu (červená krvinka)



Obr. 15 Snímek elektronového mikroskopu endoskeletu erythrocytu

5.3.1.2 Buněčný exoskelet

Do exoskeletu patří ty entity, které leží vně od plazmatické membrány, tj. v extracelulárním prostoru. U živočišných buněk jsou těmito entitami prvky extracelulární matrix. Exoskelet vzniká z molekul vytvářených buňkou a je její nedílnou součástí. Hlavními prvky extracelulární matrix jsou: kolagen, elastin, glykoproteiny, fibronectin, lamini a proteoglykany. Vazbu prvků extracelulární matrix na plazmatickou membránu zajišťují specifické membránové integrální proteiny tzv. **integriny** (obr. 16).



Obr. 16 Soustava propojující extracelulární a intracelulární prostor

Fibronectin je glykoprotein, který má vazební místa pro:

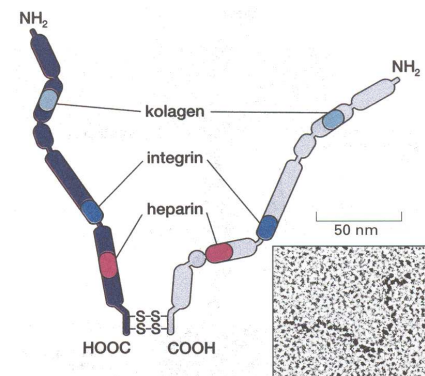
1. Integrin;

Integrinem je fibronectin vázán k membráně buňky.

2. Kolagen;

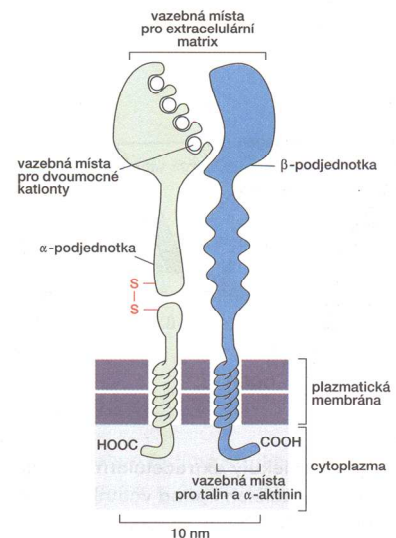
Toto vazební místo má fibronectin z toho důvodu, že samotný kolagen se špatně navazuje k buňce.

Fibronectin může tedy spojovat více molekul extracelulární matrix do souvislých sítí (obr. 17).



Obr. 17 Struktura fibronektinu

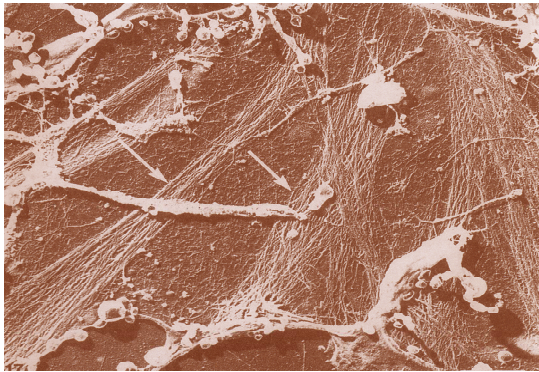
Integriny jsou intergrální proteiny, tedy procházejí plazmatickou membránou. V extracelulárním prostoru se vážou na fibronectin a v intracelulárním prostoru na proteiny asociované s aktinovými filamenty. Integriny mají tedy funkci vazby spojující prvky v extracelulárním a intracelulárním prostoru, jinými slovy, prostřednictvím integrinů je propojen exoskelet s endoskeletem. Proto byly označeny jako transmembránový skelet. Struktura integrinu je na obr. 18. V horní části integrinu jsou



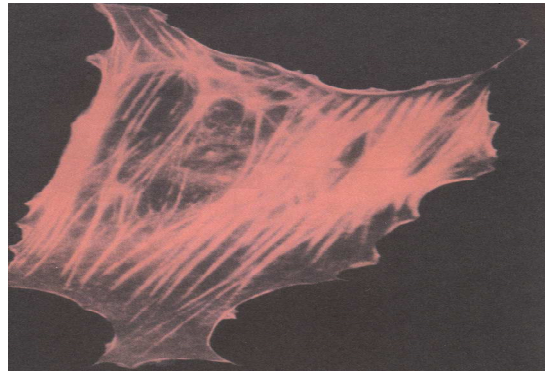
Obr. 18 Struktura integrinu

vazební místa pro fibronektin.

Čistě mechanickou úlohu mají v membránovém endoskeletu i tzv. **stresová vlákna**, která jsou vystavena velkému mechanickému napětí, např. v hladkých svalových buňkách artérií. Znárodnění stresových vláken z elektronového mikroskopu je na obr. 20. Jejich název zřejmě souvisí s anglickým termínem stress (napětí).[7]



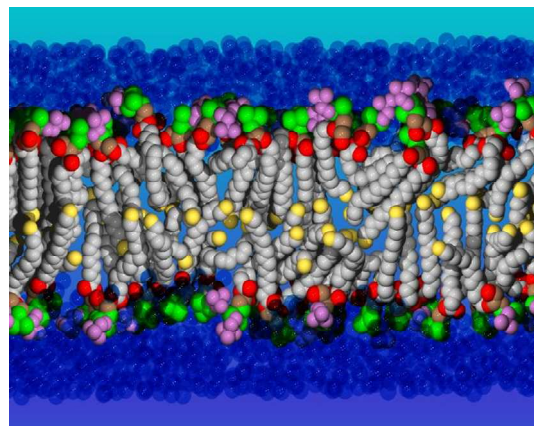
Obr. 19 Svazky aktinových mikrofilament v endoskeletu (podle [7])



Obr. 20 Stresová vlákna (podle [7])

5.3.1.3 Membránové tuky

Skládají se z jedné lipidové dvouvrstvy. Jsou základním stavebním prvkem všech buněčných membrán. Lipidová dvouvrstva je složena ze dvou vrstev fosfolipidů obrácených k sobě hydrofobními částmi („tělo“). Tyto části odpuzují vodu (obr. 21). Mezi jednotlivými „těly“ je ukotven cholesterol (obr. 22). Druhá strana fosfolipidů („hlavička“) je část hydrofilní – vodu přitahující. Vodní prostředí, které lipidová vrstva navzájem odděluje je z vnitřní strany buňky cytosol a z vnější strany buňky tkáňový mok (tzv. intersticiální tekutina), jejíž funkce spočívá v přenosu živin a kyslíku k buňkám. V plasmatické membráně se vyskytují tři druhy tuků: **fosfolipidy**, **cholesterol** a **glykolipidy**.



Obr. 21 Lipidové molekuly; barevné schéma: PO_4 = zelená, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ = fialová, voda = modrá, CH_3 = žlutá, O = červená, glykol C = hnědá, řetězec C = šedá; (podle [14])

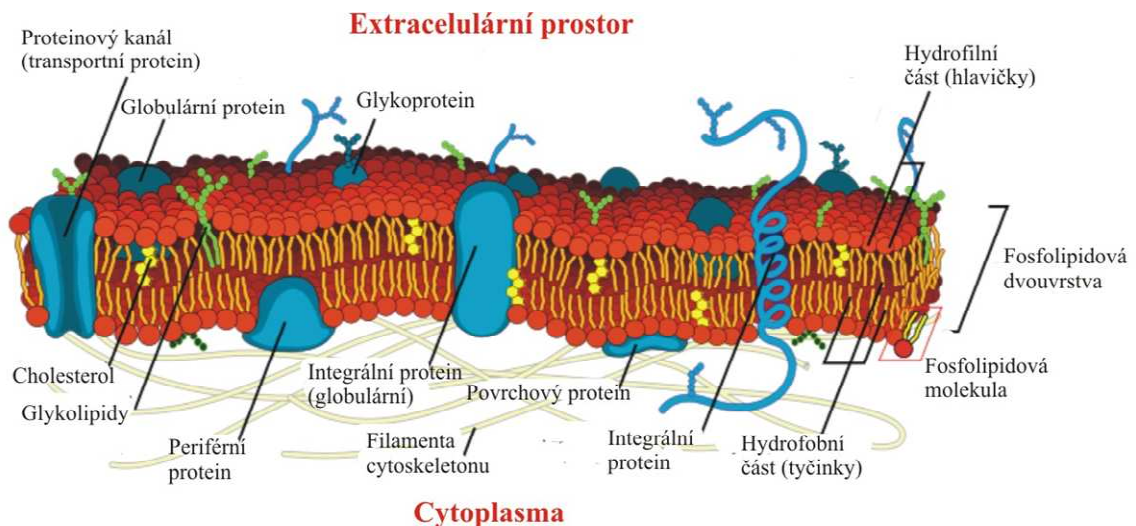
5.3.1.4 Membránové proteiny

Jsou „zanořeny“ mezi molekuly fosfolipidů. Některé z nich pronikají skrz celou tloušťku membrány (**intergrální proteiny**), jiné jsou začleněny do membrány z vnitřní nebo z vnější strany (**periferní proteiny**)

5.3.1.5 Sacharidová povrchová vrstva

Jsou to cukry (sacharidy) kovalentně (silná chemická vazba) napojené na tuky vnější části plasmatické membrány. Membrána je propojena s vnitřními strukturami buňky hustou sítí prvků, které mají v cytoskeletu různé funkce:

1. Umožňují uchycení aktinových vláken k endoskeletu. Aktinová vlákna membránu vyztuží.
2. Umožňují uchycení mikrotubulů k endoskeletu za tzv. čapkový protein.



Obr. 22 Schématický 3D řez buněčnou membránou

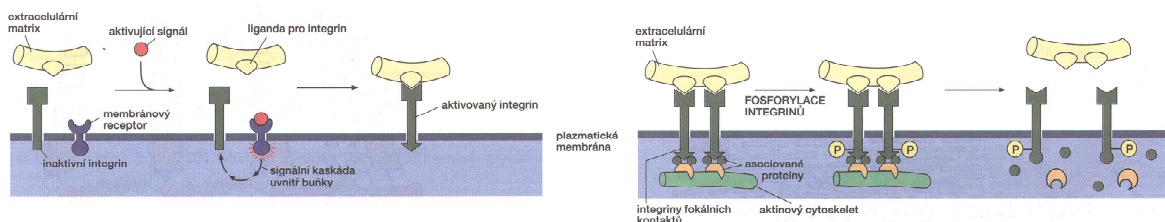
5.3.1.6 Význam transmembránového skeletu

Objevení transmembránového skeletu významně poopravilo představy, že plasmatická membrána je pouze „tekutá“ tuková (lipidová) dvovrstva lokálně prostoupená membránovými proteiny. Transmembránový skelet je významný i z biomechanického a informačního hlediska.

Z pohledu mechaniky transmembránový skelet přenáší silové působení mezi extracelulární matrix a cytoskeletem, zprostředkovává tedy *mechanické interakce* mezi vnějškem buňky a jejím vnitřkem. Tuto skutečnost využívají např. svalové buňky k propojení svého kontraktálního aparátu (sarkomer) s extracelulární matrix na rozhraní svalu a šlachy. To buňkám umožňuje vyvíjet velké síly, i když jsou obaleny pouze tenkou lipidovou dvojvrstevnou membránou.

Tím, že transmembránový skelet přenáší silové působení z vnějšku do vnitřku buňky, zajišťuje i *informační interakci* mezi vnějškem a vnitřkem buňky, čímž usměrňuje odezvu buňky na změnu silových poměrů v jejím okolí. Tuto skutečnost, v níž vystupovala pouze jednosměrná informace o silových poměrech mimo buňku, lze zobecnit na obousměrné informační interakce různé věcné podstaty. Integrinu je totiž připisována i schopnost přenášet z extracelulárního prostoru do vnitřku buňky i informace týkající se diferenciací, migrace a růstu buněk.

Prvkům extracelulární matrix a transmembránovému skeletu je v současnosti věnována velká pozornost, protože změny ve vlastnostech a chování prvků extracelulární matrix v důsledku nejrůznějších příčin (změna mechanického zatížení, změny pH apod.), které jsou přes transmembránový skelet přenášeny na prvky cytoplazmy, podstatně ovlivňují jejich metabolické funkce, dělení, migraci, tvar apod. Schematicky jsou uvedené skutečnosti znázorněny na následujících obrázcích. Na obr. 23a je znázorněna aktivace vazby mezi **extracelulárním prostorem a membránou**, na obr. 23b je aktivace vazby mezi **extracelulárním prostorem a intracelulárním prostorem**.



Obr. 23a,b Transmembránové interakce

Konkrétní příklad: Zvýší-li se hodnota krevního tlaku v cévách dochází ke zvýšení hodnot obvodových napětí v jejich stěnách, což způsobí i zvětšení silového působení na prvky extracelulární matrix a na plazmatické membrány buněk hladkého svalstva. Informace

o tomto stavu jsou přenášeny prostřednictvím fibronektinu a integrinu na filamenta uvnitř buňky. Zřejmě existuje mechanismus (mechano-chemická transdukce), který předá tuto informaci z filament na buněčné organely, které reagují tak, že se začne vytvářet větší množství prekurzorů pro tvorbu kolagenních vláken. Tyto prekurzory se exocytózou dostávají do extracelulárního prostoru, kde dochází k syntetizaci kolagenu. Ve stěně cévy je pak větší množství kolagenních vláken, což zvyšuje její odolnost proti důsledkům mechanického namáhání. (kap. 5.3.1.6 zpracovaná podle [7])

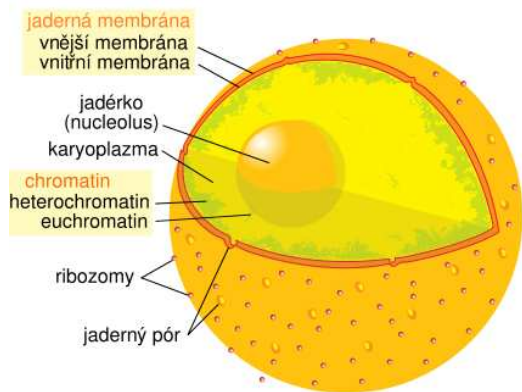
5.3.2 Jádru buňky

Je součástí všech eukaryotních buněk, tedy buněk schopných reprodukce. Tvar jádra je závislý na druhu buňky. Může být kulovitý, vřetenovitý, ledvinovitý atd. a jeho rozměry jsou od 3 do 20 μm , což z jádra dělá největší organelu buňky. Jádro obsahuje genetické informace pro všechny buněčné funkce, včetně autoreprodukce, zakódované v chromosomech. Buňka bez jádra zahyne. Podstatnými prvky jádra jsou:

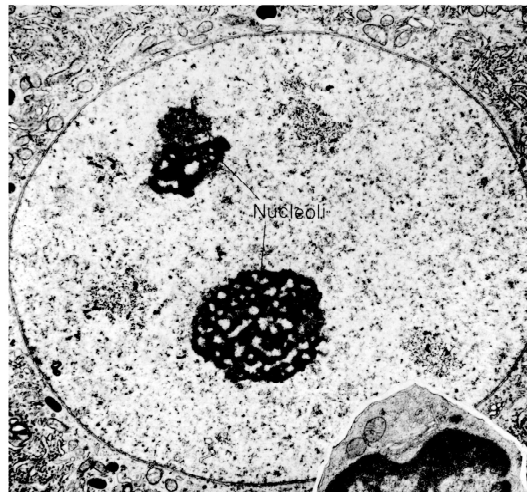
- jaderná membrána,
- nukleoplasma (karyoplasma; tekutý obsah jádra)
- jadérko. [1]

5.3.2.1 Jaderná membrána

Je tvořena dvěma membránami (vnitřním a zevním listem; nukleární obal) a prostorem mezi nimi (perinukleární prostor). Tento prostor je obvykle 20 až 100 nm široký. Každá vrstva membrány je tvořena opět lipidovou dvouvrstvou.



Obr. 24 Schéma buněčného jádra v interfázi (mimo buněčné dělení)

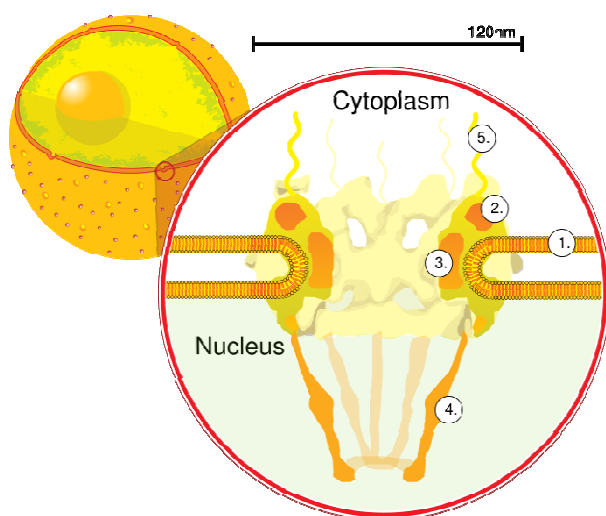


Obr. 25 Buněčné jádro a jadérko, zvětšeno 10 000x

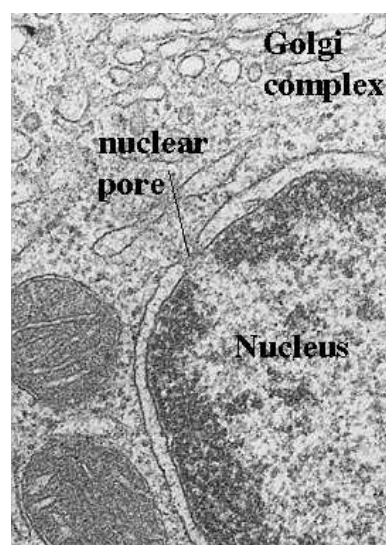
Membrány jsou navzájem propojeny **jadernými póry** (obr. 26, 27 a 28). V jaderné membráně je okolo 2000 jaderných pórů. Tyto jaderné póry zprostředkovávají spojení mezi vnitřkem jádra (nukleoplasmou) a cytoplasmou buňky. Průměr póru je cca 70nm. Jaderné póry mohou transportovat RNA (kyselina ribonukleová) a ribosomy z jádra do cytoplasmy a některé proteiny do jádra buňky. Tento komplex jaderných pórů dokáže provádět až 1000 transportů za 1s. [1][18]



Obr. 26 Komplex jaderných pórů (podle [17])



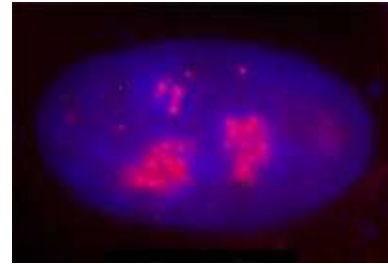
Obr. 27 Řez jaderným pórem: 1) Jaderná membrána, 2) vnější otvor, 3) paprsky, 4) koš, 5) filamenta. Popis získán pomocí elektronového mikroskopu. (podle [18])



Obr. 28 Zobrazení jádra a jaderného póru pomocí elektronového mikroskopu [17])

5.3.2.2 Nukleoplazma

Nukleoplazma tvoří obsah jádra a je tvořena kyselinou deoxyribonukleovou (DNA) a chromosomálními bílkovinami. Jádro také produkuje kyselinu ribonukleovou (RNA).



Obr. 29 Jadérka (červená barva) (podle [19])

5.3.2.3 Jadérko

Je malá vnitřní část buněčného jádra kulovitého tvaru (velikost cca 1 μm). Má charakter suborganely, protože nemá vlastní strukturu. Jadérko obsahuje hodně ribozomální RNA (rRNA – tvoří hlavní složku jadérka, 2 – 5%), která vzniká přímo v jadérku a následně v něm vznikají i ribozomy. Vzniklé ribozomy se spojí přímo s rRNA a poté jsou jadernými póry transportovány do cytoplazmy. Jadérko není trvalou strukturou, při mitotickém dělení jádra mizí a objevuje se znovu ke konci jaderného dělení.

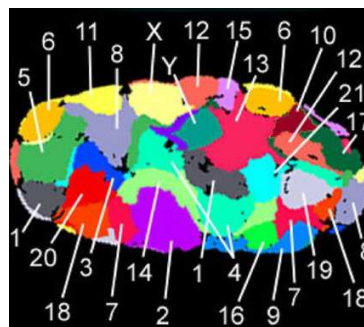
5.3.2.4 Jaderná matrix

Je to základní hmota jádra. Je amorfní (beztvará) a vyplňuje prostor mezi chromatinem a nukleoly. Po strukturní stránce je to chemický komplex kyseliny deoxyribonukleové DNA a bílkovin.

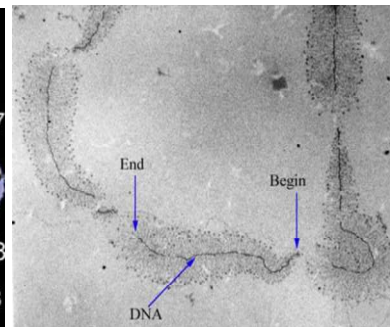
5.3.3 Protoplazma

Protoplazma je metabolicky aktivní živá hmota vyplňující vnitřní část buňky. Na nejjednodušší úrovni se dělí na **cytoplasmu** (obsaženou mimo jádro buňky) a **nukleoplazmu** (hmota uvnitř jádra buňky).

Cytoplazma zahrnuje cytosol, cytoplazmatické inkluze a buněčné organely. Pro komplexnost popisu bude zopakován stručný přehled buněčných organel v cytoplasmě.



Obr. 30 Chromosomy (24) lidské buňky



Obr. 31 Snímek DNA

Cytoplasma

V různých místech buňky lze nalézt cytoplazmu lišící se hustotou, viskozitou, přítomnými rozpuštěnými látkami i typy organel nebo buněčných struktur. V cytoplazmě se nacházejí buněčné organely a cytoskelet (ten bývá někdy označován jako samostatný prvek struktury buňky). Buněčné organely tvoří asi polovinu objemu buňky, přičemž jejich povrch je až desetkrát větší než povrch buněčné membrány. Mezi buněčné organely patří endoplazmatické retikulum, ribozomy, Golgiho aparát, mitochondrie, lysozomy a peroxozomy.

Cytosol

Je tekutý roztok makromolekul a nízkomolekulárních látek tvořící vnitřní obsah buňky. Jeho součástí nejsou buněčné organely. U prokaryotních buněk jsou pojmy cytosol a cytoplazma totožné. Proteiny uvnitř cytosolu hrají důležitou roli v signální transdukcii a glykolýze.

Cytosol je z většiny tvořen vodou (70 – 80%), rozpuštěnými ionty, malými molekulami a velkými molekulami (např. proteiny), které jsou rozpustné ve vodě. V cytosolu je okolo 20% - 30% proteinů.

5.3.3.1 Endoplazmatické retikulum

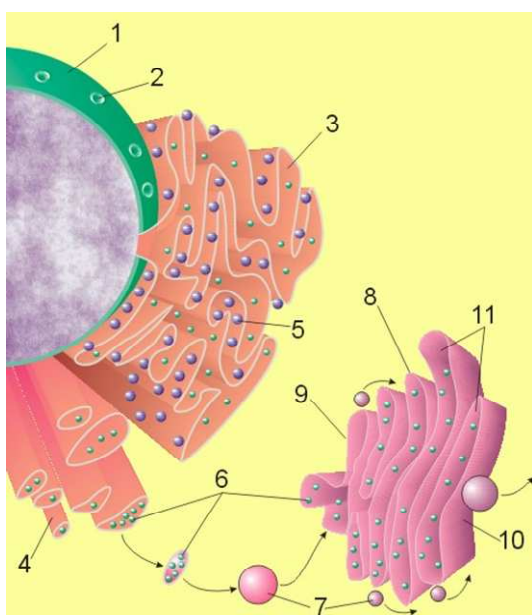
Endoplazmatické retikulum je soustavou biomembrán. Je to síť utvořená z tubulů (kanálky), váčků (cisterny) a měchýčků, které jsou navzájem propojeny. To vytváří členitý labyrint o velkém povrchu. Celková plocha povrchu retikula je až 40x větší než plocha povrchu buňky. Cisterny i tubuly jsou opatřeny membránami. V jednotlivých prostorech mohou probíhat různé látkové procesy, a to odděleně od ostatní cytoplazmy. Rozeznáváme dva druhy endoplazmatického retikula:

1. Granulární (drsné) endoplazmatické retikulum

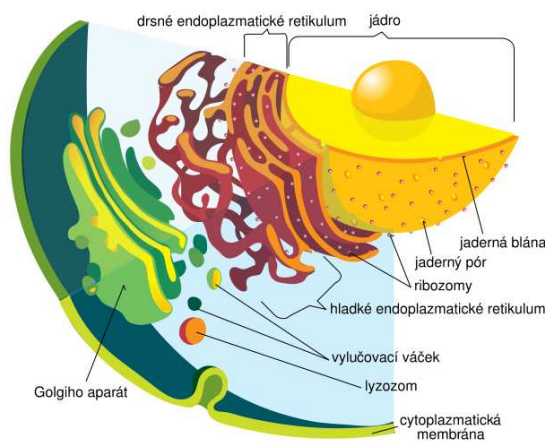
Na membránách cisteren jsou navázány ribosomy. Granulární retikulum se spolu s ribosomy podílí na tvorbě bílkovin. Proteiny vytvořené v drsném endoplazmatickém retikulu jsou následně ve vezikulách transportovány do Golgiho komplexu (obr. 32 a 33).

2. Agranulární (hladké) endoplazmatické retikulum

Na membránách nejsou, na rozdíl od drsného endoplazmatického retikula, žádné ribosomy. Hladké endoplazmatické retikulum propojuje drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex a zajišťuje transport různých makromolekul mezi těmito dvěma systémy. Dále hraje významnou roli při syntéze lipidů, hormonů a v zabezpečování pohybu iontů vápníku ve svalových vláknech. Hladké endoplazmatické retikulum v příčně pruhovaných svalových vláknech se nazývá sarkoplazmatické retikulum. Zde slouží jako transport iontů vápníku do oblastí sarkomer. [1][23]



Obr. 32 Jádro, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát; 1-jádro, 2-jaderný pór, 3-drsné endoplazmatické retikulum, 4-hladké endoplazmatické retikulum, 5-ribosomy na 4, 6-transportované proteiny, 7-transportní měchýřky, 8-Golgiho komplex, 9-cis část na Golgiho komplexu, 10-trans část na Golgiho komplexu, 11-cisterny

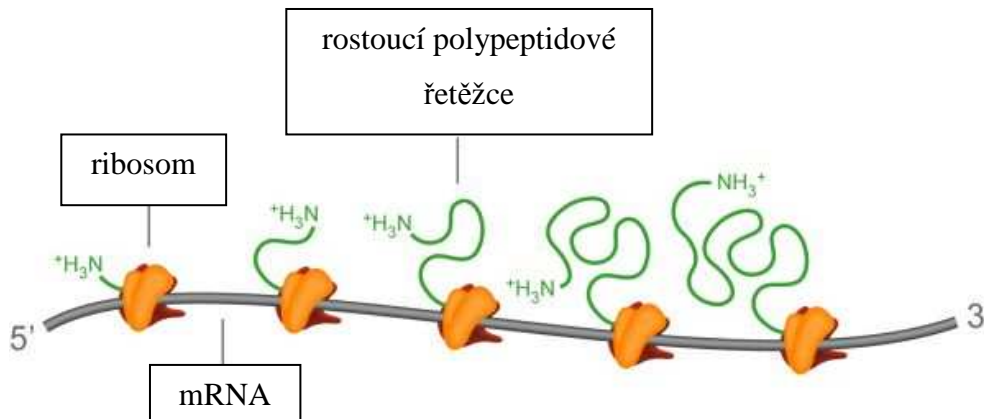


Obr. 33 Endoplazmatické retikulum a další buněčné struktury

5.3.3.2 Ribosomy

Ribosomy jsou buněčné granulární organely nacházející se v cytoplazmě, nebo na povrchu drsného endoplazmatického retikula. Jejich průměr je 15 až 25 nm. Jsou složeny z bílkovin (50 druhů, 35%) a RNA (65%). Z těchto bílkovin vytváří (syntezují) nové molekuly bílkovin podle genetického příkazu neseného kyselinou RNA z jádra buňky. Hlavní funkcí ribosomu je tedy rychlý a přesný přenos genetické informace z informační RNA do vytvářené bílkoviny.

[1][20]

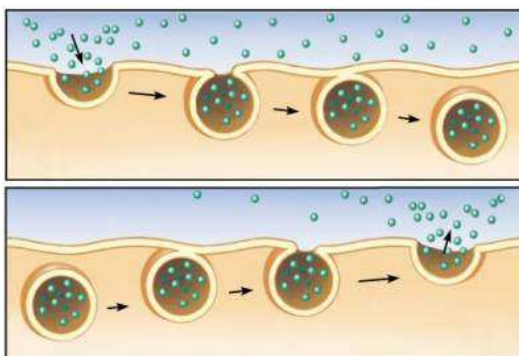


Obr. 34 Schéma vzniku polyribosomu

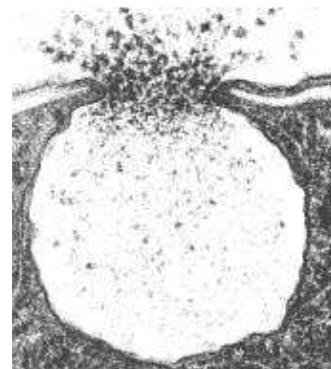
5.3.3.3 Golgiho komplex

Je tvořen několika váčky (cisternami) uzavřenými membránami. Cisterny o rozměru 0,5 až 5 μm jsou k sobě přiloženy jako tácky. Golgiho komplex má dvě polarizované strany cis a trans. Golgiho komplex slouží jako „třídicí centrum“ pro rozhodování o tom, zda bílkovina bude sekretována do extracelulárního prostoru, stane se součástí lysosomů či bude zabudována do buněčné membrány.

K transportu bílkovin slouží tzv. vezikuly. Vezikuly, které se uvolní z endoplazmatického retikula a v nichž jsou membránami uzavřeny nové proteiny, vstoupí do Golgiho komplexu v jeho cis části. Proteiny dále procházejí střední částí komplexu, kde se upravují na různé druhy dle genetického kódu. V Golgiho komplexu se proteiny obalují membránami. Hotové vezikuly s upravenými druhy se následně uvolňují z cisteren v trans části komplexu a putují k buněčné membráně s níž splynou (endocytóza), čímž se proteiny z vezikul uvolní do mimobuněčného prostoru (obr. 35 a 36). [1]



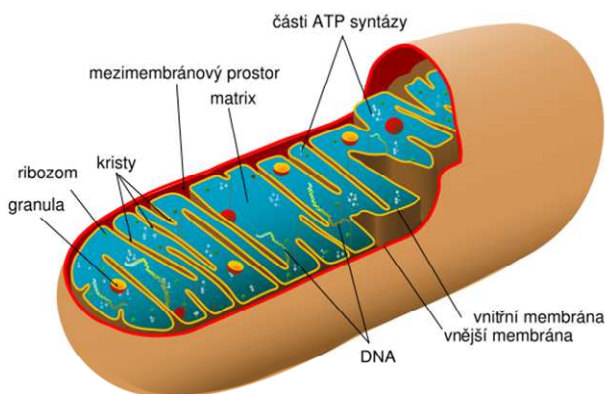
Obr. 35 Endocytóza (horní schéma)
a exocytóza (dolní schéma)



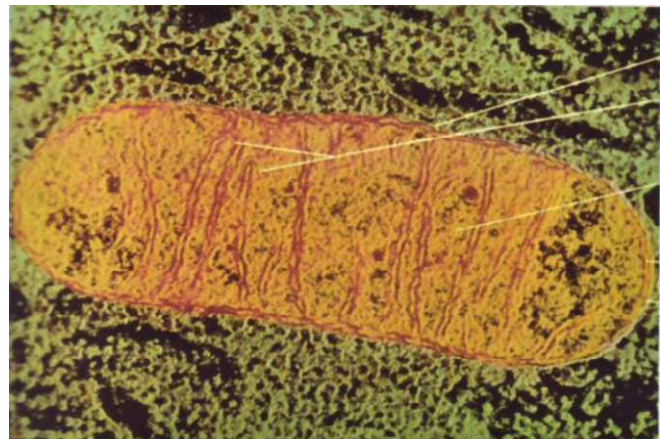
Obr. 36 Exocytóza

5.3.3.4 Mitochondrie

Mitochondrie je semiautonorní organela, protože má vlastní DNA. Mitochondrie mají velmi variabilní tvar (vejčítý, tyčinkovitý nebo vláknitý; obr. 37 a 38). Rozměry jsou řádově šířka 0,2 až 2 μm , délka 2 až 7 μm . Mitochondrie je obklopena dvěma membránami; vnější membrána je hladká a určuje celkový tvar organely a je v ní mnoho pórů; pro ionty nepropustná vnitřní membrána obsahuje řadu transportních bílkovin a její tvar je zvlněný. Vnitřní prostor mitochondrie je vyplněn gelovitou hmotou. Obvykle se v jedné buňce nachází stovky až tisíce mitochondrií, jejich počet však závisí na typu buňky a momentální potřebě energie. V mitochondriích probíhá důležitá fáze chemické přeměny látek a uvolňuje se zde energie potřebná pro buňku. Výběžky, které tím vznikají, se nazývají kristy. Mezi nimi se nachází mezimembránový prostor. Uvnitř výběžkovité membrány se nachází matrix. Proces dýchání probíhá na kristách vnitřní membrány. [1][21]



Obr. 37 Schéma mitochondrie



Obr. 38 Elektronoptický snímek mitochondrie

Dále se mezi buněčné organely řadí: Proteasomy, peroxisomy, kaveosomy a lyzozomy, které už nejsou mechanicky významné, proto nebudou podrobněji popsány.

5.3.4 Struktura a funkce cytosketu

Cytoskelet je „kostra“ buňky. Na nejobecnější úrovni lze konstatovat, že cytoskelet je tvořen množinou bílkovinných vláken různých druhů (strukturně, materiálově, vazebně), která jsou rozmístěna v cytoplazmě a plní zde různé funkce.

Prvky cytoskeletu:

- zajišťují časovou stálost a současně i proměnnost tvaru buňky (tedy její odpor proti deformaci),
- slouží k transportu informací tělem buňky,
- slouží k dynamické organizaci cytoplazmy (přesuny organel a chromosomů v buňce),
- slouží k pohybu buněk apod.

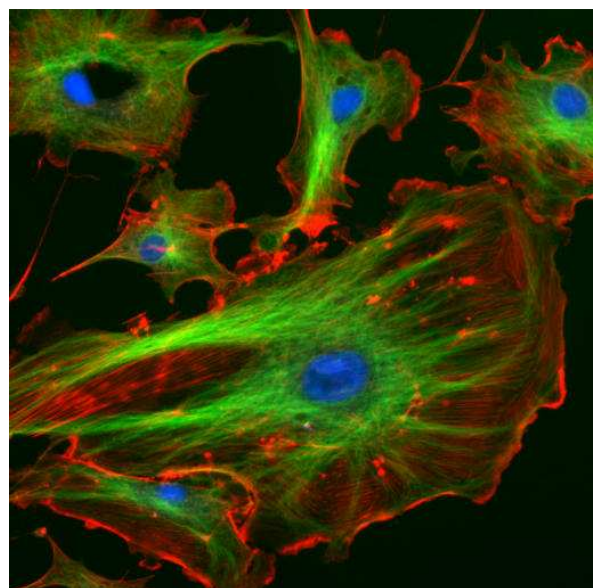
Cytoskeletální množina má tyto základní prvky: mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediální filamenta (střední) [1].

Podle polohy bílkovinných vláken, ve vztahu k buněčné membráně, bylo zavedeno toto členění:

- **Membránový skelet** (actin cortex) – nachází se těsně pod buněčnou membránou a je tvořen svazky aktinových vláken (mikrofilamenta). Ta jsou z jedné strany napojena na membránové proteiny a z druhé strany jsou spojena s prvky endoskeletu.
- **Vnitřní skelet** (endoskelet, deep skeleton) – nachází se uvnitř buňky, tj. v intracelulárním prostoru a převážně je tvořen intermediálními filamenty a mikrotubuly.

Z hlediska funkce cytoskeletu, lze na obecné úrovni konstatovat:

1. **Aktinová vlákna** membránového skeletu „vyztužují“ buňku po mechanické stránce, u některých buněk se též podílejí na pohybu buňky jako celku (améboidní pohyb) atd. Souhrnně řečeno zajišťují tvar buňky včetně jeho změn.
2. **Intermediální filamenta** plní v buňce taktéž „vyztužující“ funkci.
3. Zcela odlišná je funkce **mikrotubulů**, které jsou součástí „dopravní soustavy“

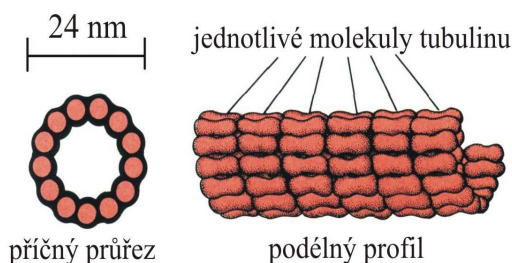


Obr. 39 Cytoskelet eukaryotické buňky: Mikrotubuly – zelená, aktinová vlákna – červená, jádro – modrá

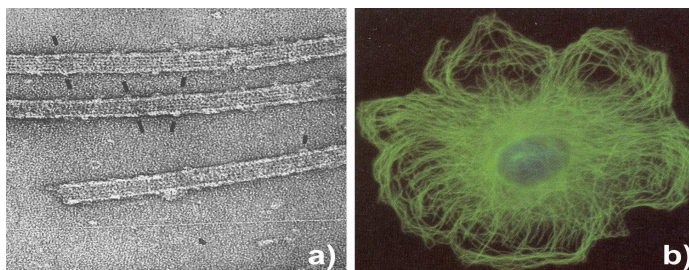
v buňce, konkrétněji jsou „kolejnicemi“, po nichž se pohybují některé molekulové motory (kinesinové a dyneinové; obr. 43 a 44). Tyto motory zajišťují v buňce „dopravu“ jednotlivých buněčných organel, vezikul apod. [2]

5.3.4.1 Mikrotubuly

Jedná se o nejsilnější vláknité struktury cytoskeletu. Mají průměr 15 – 25nm a tloušťka jejich stěn je okolo 5nm. Mikrotubuly mají tvar dlouhých a poddajných trubek a jejich strukturní základ tvoří polymer globulární bílkoviny tubulinu (obr. 40). Tubulin se vyskytuje ve dvou typech – A a B.

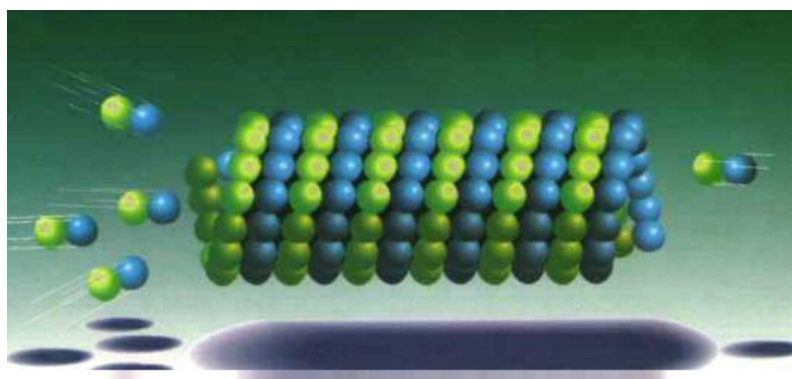


Obr. 40 Struktura mikrotubulu



Obr. 41 a) izolované mikrotubuly b) mikrotubuly zviditelněné elektronovým mikroskopem

Mikrotubuly jsou formovány v blízkosti jádra. Toto místo se nazývá „Organizační centrum mikrotubulů“ (Microtubules Organizing Center – MTOC). Mikrotubuly jsou polární s plus koncem (rychle rostoucí konec) a s mínus koncem (pomalu rostoucí konec). Obvykle je minusový konec jakýmsi kotvícím bodem v MTOC. Na obr. 42, je plusový konec zobrazen vlevo.



Obr. 42 Schématické zobrazení vzniku mikrotubulu (podle [22])

Dynamická nestabilita mikrotubulů

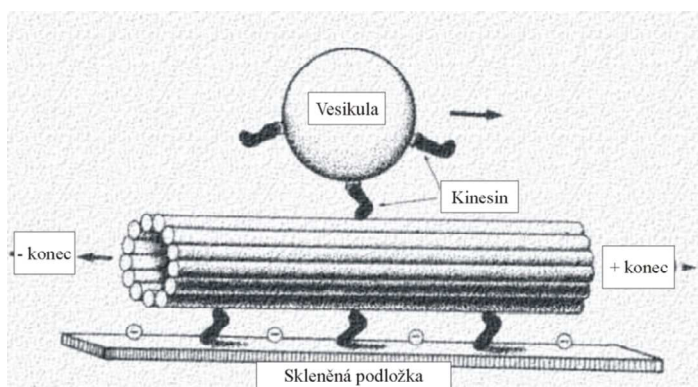
Mikrotubulus vykazuje zvláštní chování, tzv. dynamickou nestabilitu. Ta spočívá v tom, že mikrotubulus roste a uchytí se pomocí čapkujícího proteinu na endoskelet. Pokud se tak nestane, mikrotubul se okamžitě rozpadne na jednotlivé molekuly tubulinu. Tyto bílkoviny volně „plavou“ v cytoplasmě až do doby, kdy začne mikrotubulus z centrosomu opět růst. Dynamická nestabilita je projevem **samoorganizace**. Mikrotubuly se mohou odlišovat v různé rychlosti seskupení a následném rozpadu.

Funkce mikrotubulů

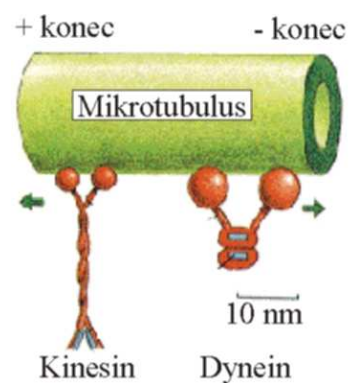
Mikrotubuly vytvářejí dráhy, po kterých se pohybují intracelulární váčky a orgány. Tento pohyb vyžaduje energii poskytovanou hydrolýzou ATP a je realizován proteiny zvanými molekulové motory. Molekulové motory se vyskytují ve dvou typech:

- **kinesin**, který posunuje váčky z minus konce na plus konec (obr. 43)
- proteiny MAP1C (Mikrotubulové přidružené proteiny – Microtubule associated proteins – MAPs), který se podobá **dyneinu** a který posunuje váčky na opačnou stranu než kinesin

Další úlohou mikrotubulů je vytváření **mitotického vřetenka** při mitotickém dělení.



Obr. 43 Schématické zobrazení molekuly kinesinu



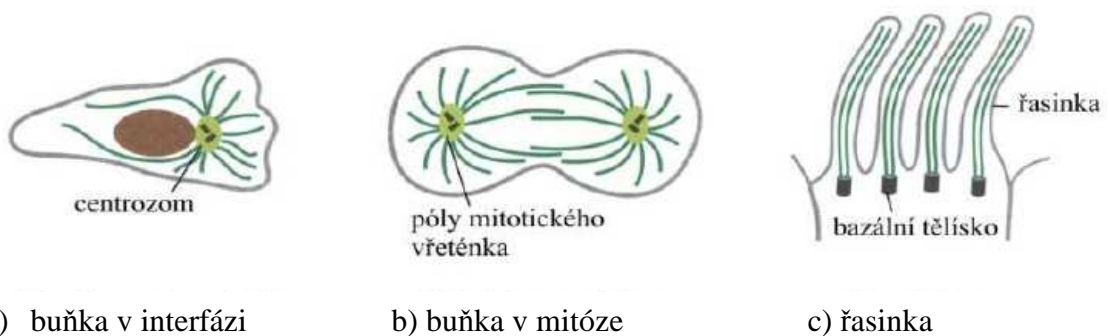
Obr. 44 Schématické zobrazení molekulových motorů kinesinu a dyneinu

Na obr. 45 jsou schémata těchto tří typických míst výskytu mikrotubulů:

- a) Je-li buňka v interfázi (období plnění své funkce), pak mikrotubuly vycházejí z organizačního místa, tzv. centrosomu (obr. 45). Centrosom je tvořen dvěma

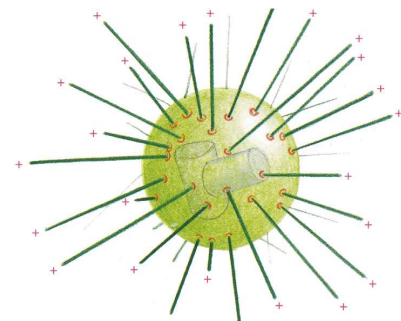
centriolami a vytváří množinu drah, podél nichž molekulové motory transportují váčky, organely a další buněčné prvky.

- b) Když buňka vstupuje do fáze dělení (mitózy), cytoplazmatické mikrotubuly se rozpadají a vytvářejí složitou soustavu, tzv. dělicí vřeténko (mitotické), které má dva póly. Dělicí vřeténko obsahuje nástroje, které umožní, aby chromosomy byly rozděleny mezi obě dceřiné buňky.
- c) Mikrotubuly jsou i „konstrukčními“ prvky centriol, řasinek a bičíků. U řasinek vyrůstají mikrotubuly z tzv. bazálních tělísek.



Obr. 45 Schématické zobrazení tří typických míst výskytu mikrotubulů

Mikrotubuly vyrůstají z tzv. organizačního centra – centrosomu (obr. 46), který se obvykle nachází blízko buněčného jádra. Centrosom organizuje svazky mikrotubulů, které prorůstají cytoplazmu a směřují od něho k buněčné membráně. Centrosom je „továrna“ na výrobu mikrotubulů z bílkoviny tubulinu. Součástí centrosomu jsou dvě vzájemně kolmé centrioly. Jsou to válcovité struktury (průměr cca 0,15 μm , délka až 0,5 μm) složené z mikrotubulů.

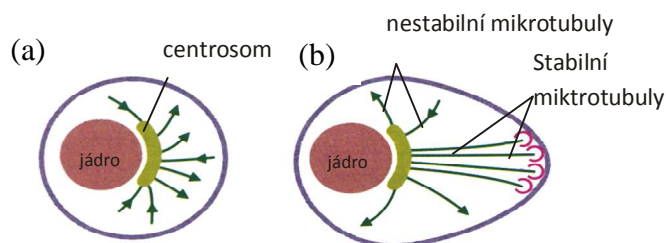


Obr. 46 Mikrotubuly vyrůstající z nukleačních míst na centrosomu

Na obr. 47 je znázorněna nepolarizovaná buňka (a) s novými mikrotubuly, které vyrůstají z centrosomu zcela náhodně všemi směry. Navázáním mikrotubulu na čapkový protein (b) nastane stabilizace volného plus-konce mikrotubulu. Tato selektivní stabilizace způsobí silnou polarizaci buňky. Je-li to u buňky, která je již diferencována do specializovaného buněčného typu a fixována v určité pozici, tak struktura mikrotubulů je bílkoviny stabilizována proti rozpadnutí. Když buňka vstupuje do etapy dělení (mitózy), mikrotubuly se stávají

nestabilními, střídavě rostou a smršťují se, tím se přeskupují a vytvářejí mitotické vřeténko (obr. 45b).

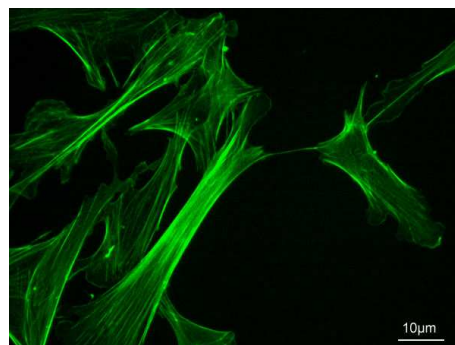
Kapitola 5.3.4.1 byla zpracována podle [1][22].



Obr. 47 Stabilní a nestabilní mikrotubuly

5.3.4.2 Mikrofilamenta

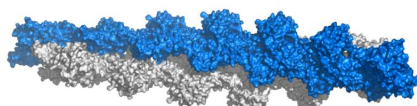
Jsou to velmi tenká vlákna složená z bílkoviny aktinu, jejíž molekula je tvořena 375 aminokyselinami. Nepolymerizovaný aktin se označuje jako G-aktin (obr. 49). Molekuly G-aktinu mají schopnost spojovat se ve vlákna, v tzv. F-aktin (obr. 50). Mikrofilamenta mají tvar šroubovice, tvořené dvěma okolo sebe obtočenými vlákny F-aktinu se stoupáním 37 nm, tloušťkou cca 7 nm a délkou až několik μm . Mezi vlákny F-aktinu existují silné interakce, takže šroubovice se nemůže rozvolnit. Mikrofilamenta jsou polarizována, mají tedy plus-konec (na tomto místě rostou) a mínus-konec (zde se odbourávají) (obr. 51).



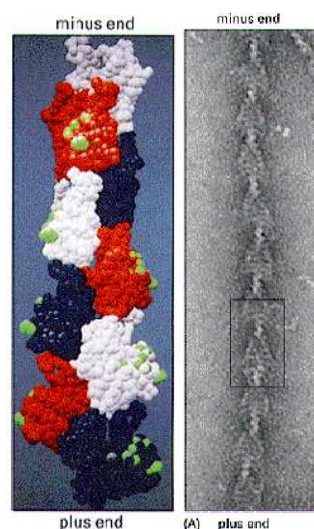
Obr. 48 Aktinový cytoskelet buňky myšského embrya



Obr. 49 G-aktin

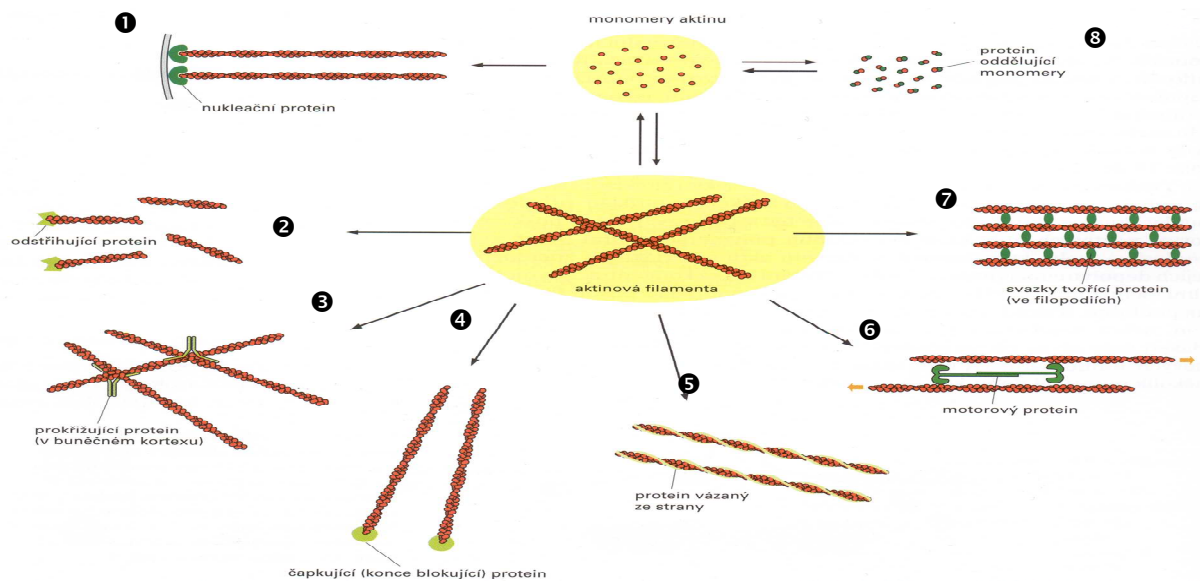


Obr. 50 F-aktin



Obr. 51 Polarizovaná mikrofilamenta

V živočišné buňce se aktin nachází ve dvou formách: asi polovina jako volný monomer v cytosolu, druhá polovina ve formě mikrofilament. Existuje mnoho bílkovin (zatím 48), tzv. asociovaných proteinů s mikrofilamenty, která se vážou na aktin a vytvářejí entity s různými funkcemi. Některé z těchto vazeb jsou na obr. 52.



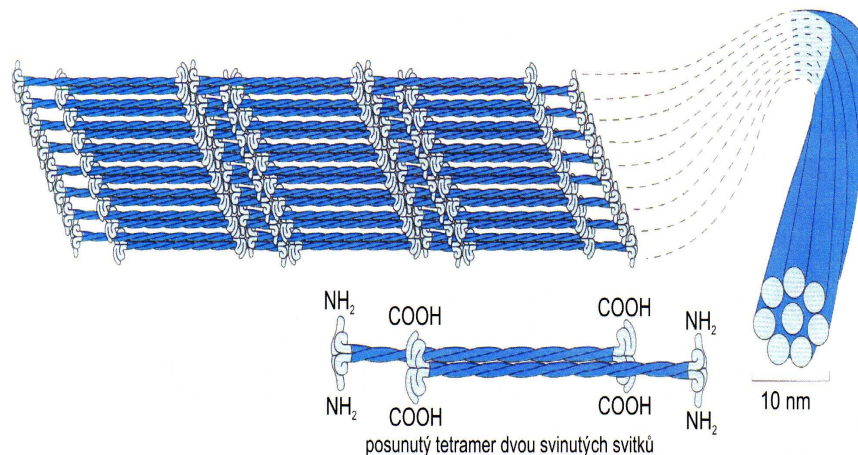
Obr. 52 Hlavní skupiny asociovaných bílkovin (proteinů) na aktin

1. Nukleační protein, který iniciuje vytváření aktinového vlákna z aktinových monomerů.
2. Protein gelsolin člení aktinová vlákna na kratší úseky (je to tzv. odstřihující protein).
3. Protein filamin spojuje zkřížená vlákna (tvoří příčné spojky).
4. Čapkový protein
5. Protein tropomyozin se na aktinové vlákno váže z boku.
6. Motorový protein myozin-II, navazuje se na aktinová vlákna doplněná tropomyozinem a zajišťuje např. kontrakci sarkomery,
7. Proteiny fibrin, α -aktinin a fascin spojují paralelně uspořádaná aktinová vlákna do svazků.
8. Protein odděluje monomery

5.3.4.3 Intermediální filamenta

Někdy se nazývají jako střední filamenta. Jsou to filamenta střední tloušťky (průměr 10 – 12 nm). Jsou přítomna v místech, kde je buňka vystavena mechanickému namáhání. Jsou zodpovědná za mechanickou stabilitu buněk a tkání. Základní stavební jednotkou intermediálních filament je tetrametr. Ten je základem pro hierarchicky vyšší struktury – protofilamenta. Osm protofilament vytváří intermediální filamentum (obr. 53). Tato filamenta mají v buňkách stejnou funkci jakou „armovací železo“ v železobetonu. Nejsou tvořena jedním „univerzálním“ proteinem, ale různě diferencované buňky mají intermediální

filamenta tvořena různými základními proteiny. Tyto se spojují s tzv. asociovanými proteiny – obecně jejich funkce není zcela objasněna, některé spojují intermediální filamenta do hrubších svazků, jiné je připojují k cytoskeletu nebo na jiné buněčné struktury. [1]



Obr. 53 Intermediální filamentum (podle [1])

5.4 Okolí buněk – extracelulární matrix

Důležitou součástí systémového pojetí určité entity, zde buňky, je její okolí. V souladu se strukturou na obr. 2 je **okolí buňky** tvořeno **mimobuněčnou hmotou**, tzv. **extracelulární matrix** (ECM), která je produkována buňkami. Lze ji členit na základní hmotu a fibrilární složku. Tyto dvě složky, spolu s fixními a bloudivými buňkami, vytváří pojivovou tkáň.

5.4.1 Funkce extracelulární matrix

ECM plní v tkáních několik nezastupitelných funkcí, především však tyto:

- funkce topologicko-geometrická (ECM udržuje rozložení a tvar tkání v orgánech),
- funkce vazbová (propojuje různé tkáně do určitých celků),
- funkce mechanická (dává tkáním určité mechanické vlastnosti, zejména pevnost a tuhost; zajišťuje spojitost tkání; orgány se mohou pohybovat jako celek),
- funkce informační (podílí se na komunikaci mezi buňkami; detekuje, vytváří nebo koordinuje chemické signály),
- funkce nutriční (přísun živin do buněk),

- funkce obranná (ECM vytváří bariéru proti pronikajícím mikroorganismům),
- funkce léčebná (účastní se procesu hojení defektů tkání, léčení zánětů).

5.4.2 Prvky fibrilární složky ECM

- kolagen
- elastin
- abduktin
- retikulin
- aktin a další vláknotvorné bílkoviny

6 Buněčné vazby

Tato kapitola, stejně jako kap. 5.4, je převzata z [1].

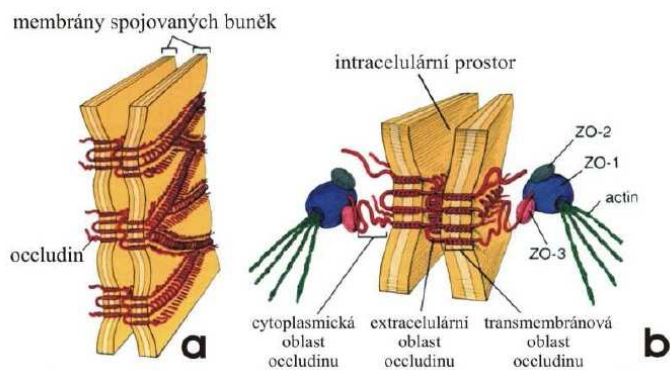
6.1 Realizace vazeb mezi buňkami

Buňky se v lidském organizmu vyskytují buď jako volné nebo jako vzájemně vázané, čímž vytvářejí vyšší strukturní celky (tkáně). Spojení buněk je realizováno **mezibuněčnými vazbami** (spojeními). Vedle **klasického propojení buněk**, které se uskutečňuje zasunutím buněčných výběžků, existují i **spojení specializovaná**. Ta jsou rozčleněna na tyto typy:

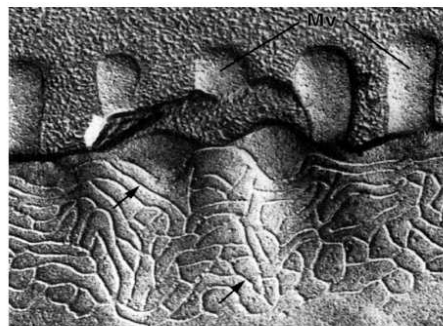
- spojení utěšňující (Zonulae occludens)
- spojení adhesivní (Zonulae adherens)
- spojení adhesivní (Macula adherens, též desmozomy)
- spojení komunikační (Nexy)

6.1.1 Spojení utěšňující (Zonulae ocludens)

Někdy se nazývá jako spojení těsné (tight junction). Tento typ spojení se vyskytuje v místech, v nichž je potřebné pevně a těsně navzájem spojit buňky nebo je připojit k okolní tkáni. Tkáně jsou k sobě „přišity“ vlákny bílkoviny ocludin (obr. 54 a 55). V tomto typu spojení dochází k splynutí membrán – je to tedy spojení bez mezery mezi membránami.



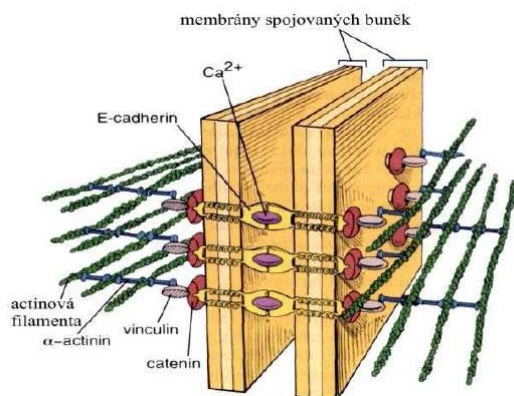
Obr. 54 Schéma spojení „zonula ocludens“



Obr. 55 Zonula ocludens (x100 000)

6.1.2 Spojení adhesivní (Zonulae adherens, Anchoring junction)

Je to pevné (kotvící) spojení s mezerou mezi membránami (až 20 nm), založené na iontové soudržnosti dvou molekul bílkovin typu E-cadherin, které jsou v prostoru mezi spojovanými membránami vázány ionty Ca^{2+} (obr. 56 a 57). Toto spojení je méně soudržné než mechanické spojení utěšňující.



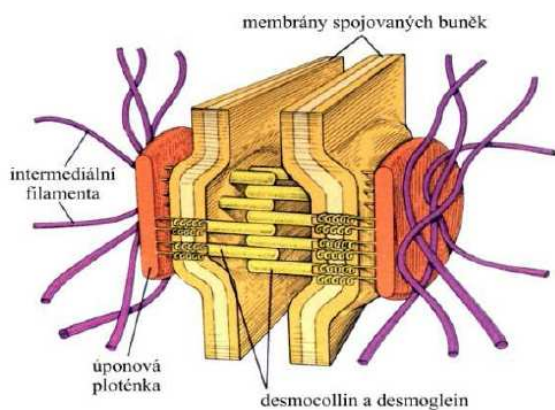
Obr. 56 Schéma spojení „zonula adherens“



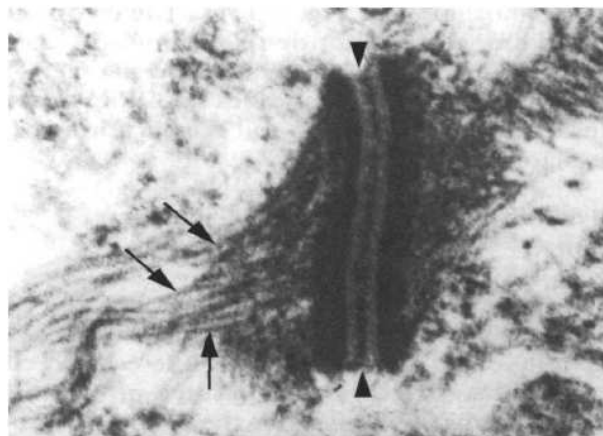
Obr. 57 Zonula adherens (x100 000)

6.1.3 Spojení adhesivní (Macula adherens, též desmozom)

Je to pevnější spojení než předcházející adhesivní spojení, protože místo iontových vazeb mezi spojovacími filamenty jsou u tohoto spojení vazby mechanické (bílkoviny jsou oboustranně zakotveny ve spojovaných membránách, obr. 58 a 59). Oblast spojení je na obou membránách vyztužena cytoplasmatickou úponovou ploténkou, umístěnou na vnitřním povrchu každé z membrán. V těchto ploténkách jsou zakotvena již zmíněná spojovací filamenta. Ploténka je složena z nejméně 12 různých proteinů a má rozměry 400x220x10 nm. Mezera mezi membránami je větší než u předcházejícího spojení, a to až 30 nm. Toto spojení se použije všude tam, kde je potřebné vytvořit mezi buňkami pevné mechanické spojení (např. srdeční sval, močový měchýř).



Obr. 58 Schéma spojení „macula adherens“

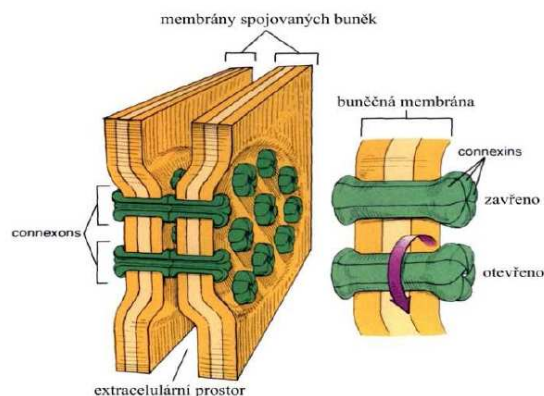


Obr. 59 Macula adherens (x40 000)

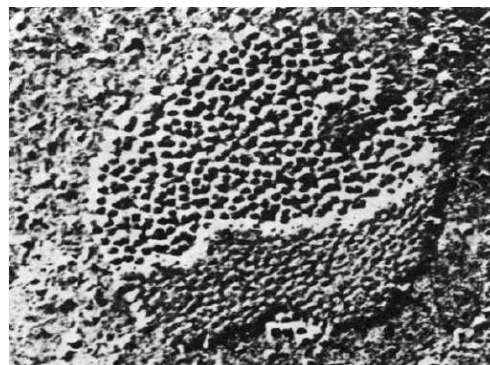
6.1.4 Spojení komunikační (Nexy)

Štěrbínové spoje – gap junction, též můstky. Je to specializované mezibuněčné spojení, které zajišťuje transport z jedné buňky do druhé. V místě spojení je mezibuněčná štěrbina zúžená cca na 2nm a jsou zde válcovité bílkovinné útvary, tzv. konexony (obr. 60). Konexon je tvořen 6 podjednotkami (lamelami). Každý kanál se skládá ze dvou těsně na sebe napojených konexonů. Jsou-li konexony aktivovány určitou koncentrací intracelulárního Ca^{2+} , pak vznikne centrální otvor o průměru (1,5 až 2) nm, který umožňuje volně procházet iontům, aminokyselinám sacharidům a roztokům. Koncentrace intracelulárního Ca^{2+} , hodnoty pH a elektrické napětí ovlivňují velikost průměru kanálu.

Mechanismus otevírání konexonů není zcela objasněn. Předpokládá se, že lamely konexonů se natočí, obdobně jako šterbinová uzávěrka u objektivů fotoaparátů a vznikne otvor. Na obr. 61 jsou znázorněny nexy v čelním pohledu. Spojení buněk nexy připomíná nýtování plechů. Nexy se vyskytují u těch buněčných seskupení, u nichž je nutná komunikace mezi jednotlivými buňkami.



Obr. 60 Schéma nexu



Obr. 61 Nexus v čelním pohledu (x45 000)

7 Experimentální vyšetřování mechanických vlastností buněk

Abychom byli schopni pochopit biologické funkce buněk, musíme se zaměřit na zjištění jejich mechanických vlastností a to z toho důvodu, protože buňky jsou vystaveny působení vnějších sil a podílí se na řadě mechanických procesů. U rostlinných buněk hraje nejvýznamnější roli v určení mechanických vlastností jejich buněčná stěna. U živočišných buněk jsou mechanické vlastnosti určeny především vnitřní výztužnou strukturou, tzv. cytoskeletem. Bylo zjištěno, že mechanické chování buněk vykazuje elastické i viskózní vlastnosti. Další zjištění bylo, že buňky vykazují lineární materiálové chování pouze v oblasti malých přetvoření (do 10%). Pro větší přetvoření se začne buňka chovat výrazně nelineárně. Tato nelinearita se může projevit např. jako deformační zpevnění. K vyšetřování mechanických vlastností buněk slouží různé experimentální metody, stručný přehled nejnovějších metod zde bude uveden. Podrobnější pojednání o experimentálních metodách je v [2].

Podle [2] jsou nejčastěji uváděny dvě základní skupiny experimentálních metod:

1. Určování mechanických vlastností buněčných populací (cell population).
2. Určování mechanických vlastností izolované buňky (single cell).

7.1 Určování odezvy buněčných populací na mechanické namáhání

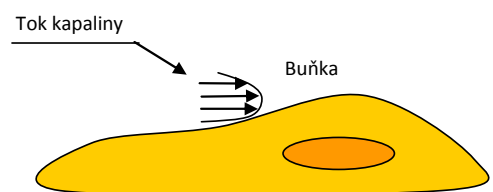
Tyto metody nemají za výsledek přímo mechanické vlastnosti buněk, ale převážně biochemické odezvy na mechanický podnět. Tyto metody byly vyvinuty tak, aby co nejvíce simulovaly realitu. Jsou více než 10 let používané a existuje mnoho variant těchto metod.

7.1.1 Zatížení deformací podložky (membrane stretch)

Cílem této metody je zjištění biochemické odezvy buněčných populací na deformační zatížení. Podstatou je vypěstování buněčné populace na elastické podložce, která je potažena fibronectinem nebo kolagenem. Podložka se následně deformačně zatíží v rozmezí 1% až 30% přetvoření. Toto zatížení může být různého charakteru: jednoosé, dvouosé, tahové i tlakové.

7.1.2 Zatížení fluidními smykovými silami (fluid flow)

Fluidním smykovým silám jsou v lidském těle vystaveny některé typy buněk (např. endotelové). Principem této metody je vyvolání smykové síly pomocí toku kapaliny. Měří se biochemická odezva nebo deformace. Pomocí této metody lze určit deformaci buňky, nikoliv napětí.



Obr. 62 Zatížení buňky proudící kapalinou

7.2 Určování mechanických vlastností izolovaných buněk

Tyto metody na rozdíl od metod, které testovaly celé buněčné populace, mají výhodu v tom, že zatížení může být aplikováno na:

1. celou samostatnou buňku,
2. na určité místo buněčného povrchu,
3. přímo na určité buněčné receptory na buněčném povrchu.

Velikost silového zatížení se většinou nachází v rozsahu 1 pN až 10 nN.

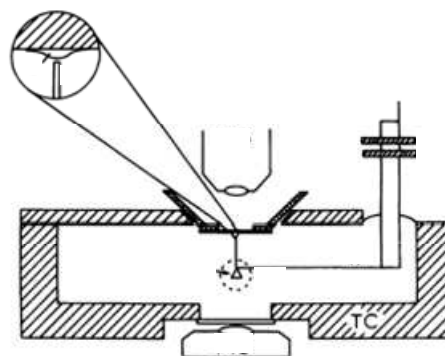
7.2.1 Mechanické metody lokální – vtláčovací zkoušky (indentation tests)

Cílem těchto metod jsou elastické nebo viskoelastické odezvy buněk. Základním principem je vtláčování ostrého předmětu do jejího povrchu. Tyto metody se aplikují v případě potřeby zjistit zejména lokální mechanické vlastnosti buněk.

7.2.1.1 Cell poking (vpichování)

Tato metoda je založena na vpichování skleněné jehly do povrchu buňky. Na obr. 63 je schématické znázornění zařízení, pomocí kterého lze tuto metodu uskutečnit. Hlavní části zařízení jsou:

- piezoelektrický lineární motor,
- ocelový držák se známou tuhostí,
- skleněná mikrožehla,
- objektiv mikroskopu,
- sklíčko s přilnutou buňkou.

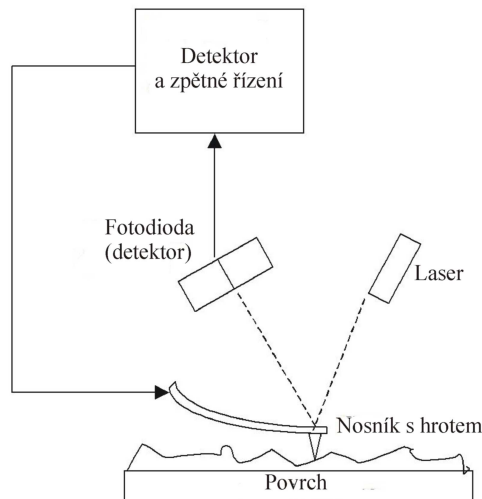


Obr. 63 Zařízení cell poker

Zařízení funguje tak, že pomocí piezoelektrického motoru je řízen pohyb jehly. Když se jehla dotkne buňky a bude dále vpichována do buňky, začne se ocelový držák prohýbat. Tento průhyb je opticky zaznamenán a ze známé tuhosti držáku lze stanovit velikost zatěžující síly působící na buňku. Výsledkem této metody bude závislost silové odezvy buňky na hloubce vpichu do jejího povrchu. [2]

7.2.1.2 Atomic force microscopy (AFM)

Tato metoda se vyznačuje velmi dobrou rozlišovací úrovní. AFM je moderní zařízení, primárně určené pro měření topografie povrchu pevných látek. Principem je skenování povrchu, které se provádí pomocí sondy (nejčastěji ostrý hrot s kónickým tvarem). Sonda je připevněna na pružném držáku, která se pohybuje ve dvou režimech: [2]



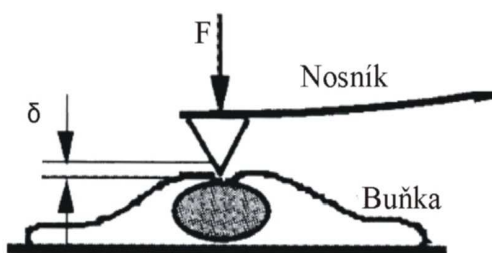
Obr. 64 Princip AFM

a) bezkontaktní režim

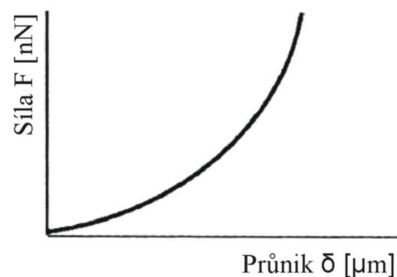
Sonda se pohybuje těsně nad povrchem buňky, dojde k průhybu pružného držáku vlivem působení meziatomárních sil. Tento průhyb je opticky měřen laserovým paprskem (obr. 64) a je pomocí pizeoelektrického motoru udržován na konstantní hodnotě. Průběh vertikální polohy držáku sondy odpovídá geometrii povrchu zkoumaného vzorku. Výhodou tohoto módu je nepoškození povrchu tělesa.

b) kontaktní režim

Sonda se pohybuje po povrchu a v důsledku nerovností se mění průhyb nosníku a výsledná geometrie se vyhodnocuje na základě výchylky laserového paprsku. Tohoto módu se využívá při měření lokálních vlastností buněk. Je to v podstatě stejná metoda jako vpichovací, ale s výrazně vyšší rozlišovací schopností. Výstupem je opět křivka síla – průnik (obr. 65 a 66).



Obr. 65 Schéma AFM



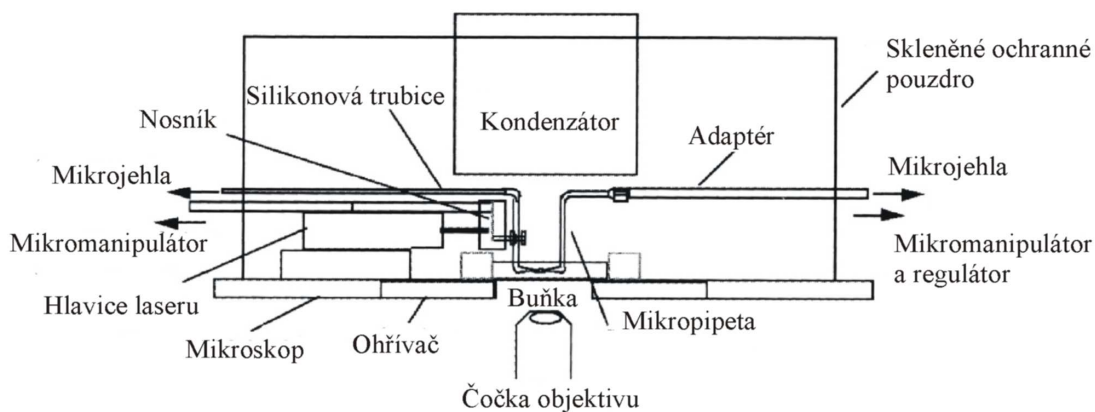
Obr. 66 Typická křivka změřená AFM

7.2.2 Mechanické metody globální – tahové, tlakové a smykové zkoušky

Zatěžování buňky se provádí jednoosým tahem, tlakem nebo smykem. Tyto metody dávají přehled o převážně globální mechanické odezvě buněk na zatížení. [5]

7.2.2.1 Tahová zkouška

Tato metoda se používá pro určení základních mechanických vlastností buněk jako celku. Buňka je zatěžovaná jednoosým tahem. Základní filozofie je prostá: upnout buňku mezi dvě mikropipety a pomocí jedné z nich buňku natahovat. Ovšem uchycení buňky do mikropipet není jednoduché. Proto bylo vyvinuto [11] nové zařízení pro tahovou zkoušku (obr. 67). Toto zařízení je použitelné pro různé druhy buněk.



Obr. 67 Schéma zařízení na provádění tahové zkoušky buněk (podle [2])

Zařízení se skládá z těchto základních prvků:

- termostatická zkušební komora,
- inverzní mikroskop s kamerou,
- dva mikromanipulátory,
- lineární akční člen,
- snímač síly a optický analyzátor rozměrů (VDA).

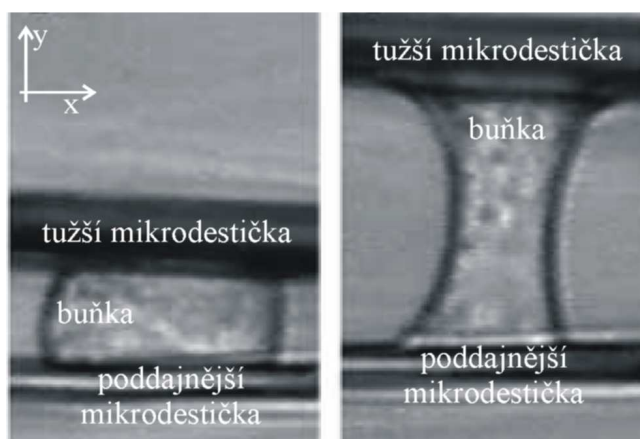
Princip zkoušky:

Buňka je uchycena ke hrotům dvou mikropipet pomocí speciálního lepidla. Jedna z těchto mikropipet je napojena na mikromanipulátor, pomocí kterého je řízeno natahování buňky. Druhá mikropipeta je napojena na snímač síly, který zaznamenává a vyhodnocuje sílu

působící na buňku. Celkové protažení buňky je určováno ze změny vzdálenosti hrotů mikropipet pomocí kamery a VDA. Přesnost měření je u síly $\pm 0.05 \mu\text{N}$ a u posuvu $0,24 \mu\text{m}$. Výstupem této zkoušky je závislost reakční síly v mikropipetě na protažení buňky. [5]

7.2.2.2 Microplate manipulation

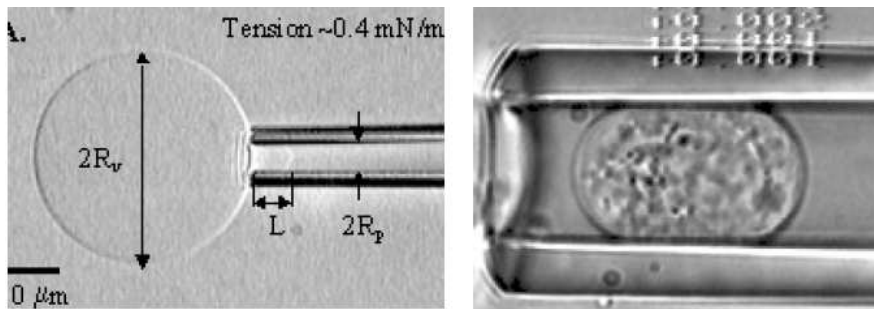
Tato metoda je velmi technicky náročná. Je uskutečnitelná pouze u buněk, které mají velice dobrou adhezi k podložce. Princip této metody: buňka je uchycena mezi dvě mikrodestičky, přičemž jedna je tužší a je napojena na řídicí počítač (přes akční člen, který pohybuje s destičkou v jednom směru, např. osa y), druhá je poddajnější a slouží jako snímač síly. Tato metoda dovoluje aplikovat tahové i tlakové zatížení, statické i cyklické. Výsledkem této metody je elastická odezva ve formě závislosti síla – deformace nebo viskoelastické parametry buňky jako celku. Pokud se jedna z destiček začne pohybovat v druhém směru (osa x), pak lze touto metodou vyvolat i smykové zatěžování. [2]



Obr. 68 Deformovaná buňka při stlačování a natahování mikrodestičkami

7.2.3 Aspirační test mikropipetou (micropipette aspiration)

Tato metoda se používá pro zjištění viskozity a elastické odezvy buněk. Je to starší metoda, poprvé byla zveřejněna v roce 1954. Principem je nasátí buňky nebo její části pomocí podtlaku do mikropipety (obr. 69). Na rozdíl od předchozích je tato metoda určena i pro neadhezivní buňky, z toho důvodu se tato metoda používá pro vyšetřování viskoelasticity krevních buněk (erythrocyty, leukocyty a monocyty), které jsou právě neadhezivní.



Obr. 69 Nasávání buňky a její části do mikropipety při aspiračním testu

7.2.4 Magnetické metody (magnetocytometrie)

Základem těchto metod je manipulace magnetických částic (kuliček) miniaturních rozměrů přilnutých k buňce pomocí magnetického pole. Zatěžování lze provádět:

- momentem (twisting cytometry),
- silou (magnetická pinzeta).

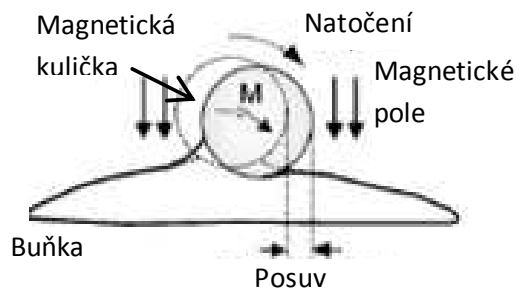
Výhodou těchto metod je možnost aplikace větších lokálních zatěžujících sil. [2]

7.2.4.1 Magnetic twisting cytometry (MTC)

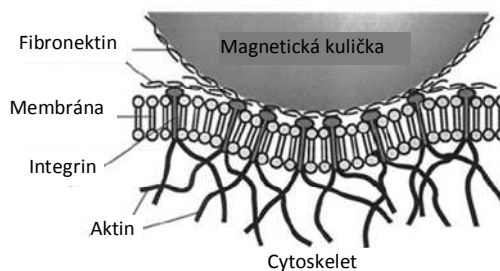
U této metody je zatěžování prováděno pomocí momentového působení magnetických částic. Magnetické kuličky o rozměrech několika mikrometrů jsou pevně spojeny s membránou buňky pomocí povrchových receptorů (obr. 70 a 71). Zmagnetizováním a působením magnetického pole se začnou kuličky pohybovat – rotačním a zároveň translačním pohybem. To způsobí deformaci buňky. Pomocí výkonné zobrazovací techniky jsou vyhodnocovány posuvy a rotace částic. Výsledkem této metody jsou některé mechanické vlastnosti buňky, např. lokální tuhost. Tuto metodu lze využít jak pro samostatnou izolovanou buňku, tak pro celou buněčnou populaci. [2]

Výhody MTC:

- jednoduše ovlivnitelné zatížení aplikované na buňku,
- vyhodnocení adhezní síly v receptorech,
- analýza propojení mezi povrchovými receptory a cytoskeletem,
- určení mechanických vlastností cytoskeletu,
- zkoumání vnitrobuněčné strukturní změny, např. remodelace cytoskeletu



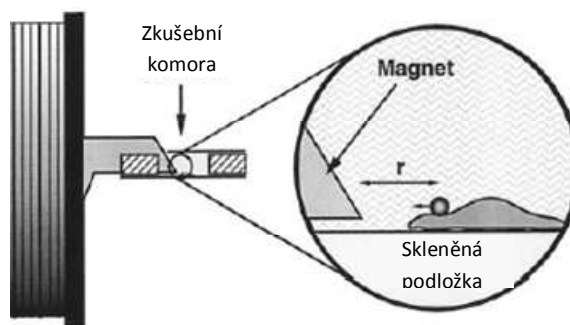
Obr. 70 Princip zkoušky magnetické cytometrie



Obr. 71 Uchycení kuličky k integrinovým receptorům na povrchu buňky

7.2.4.2 Magnetická pinzeta (magnetic tweezer)

Principem této metody je silové zatížení magnetických částic, přilnutých k povrchu buňky. Magnetická kulička je navázána na integrinové receptory v buněčné membráně. Tato kulička je následně zatížena magnetickou silou, která může být statická nebo pulzující. Magnetická síla je vyvolána prostřednictvím hrotu magnetu, který tvoří jádro cívky (obr. 72). V závislosti na tomto silovém zatížení dochází k posuvu kuličky a tím k deformaci povrchu buňky. [2]

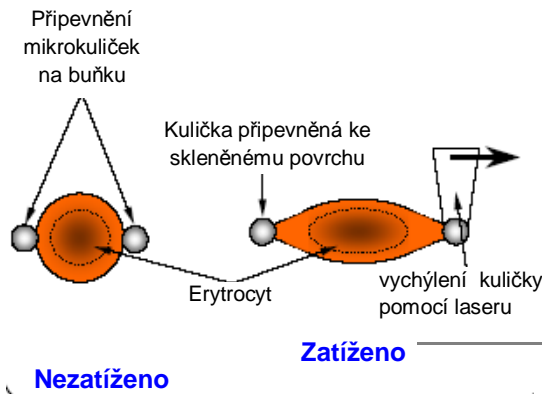


Obr. 72 Princip metody magnetická pinzeta

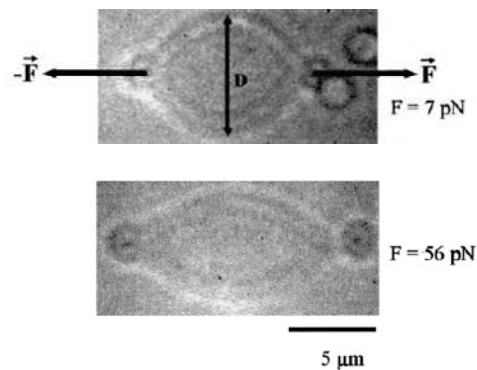
7.2.5 Optické metody

7.2.5.1 Optická pinzeta (optical tweezer)

Princip: Kulička (obvykle o průměru 0,5 – 10 μm) je pevně přilnutá na buněčnou membránu. Na ni působí laserový paprsek. Vychýlení laserového paprsku vyvolá silové zatížení jedné kuličky a tím deformaci povrchu buňky podobné jako u metody magnetická pinzeta. Druhá kulička je ustálena v klidu, je připevněná ke skleněnému povrchu (obr. 73). Nevýhodou této metody je obtížné vyvinutí silových zatížení větších než přibližně 100 pN. To je výrazně méně v porovnání s AFM nebo mikropipetami. Při použití laseru s velkým výkonem dojde k nežádoucímu zahřívání povrchu buňky. Výhodou je velmi dobrá přesnost metody.



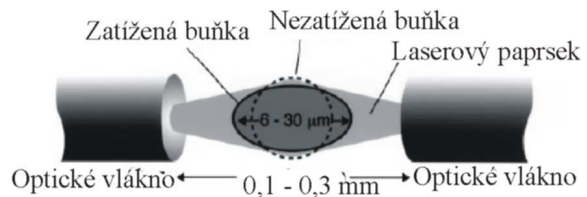
Obr. 73 Zatížení laserovým paprskem



Obr. 74 Natahování buňky pomocí optické pinzety

7.2.5.2 Optical stretcher

Princip: Buňka je uchycena mezi dva protisměrné divergentní laserové paprsky. Toto uchycení bude stabilní do té doby, dokud bude výsledná síla působící na objekt nulová. To bude splněno jedině tehdy, jestliže index lomu světla objektu bude větší než index lomu okolí a jestliže šířka paprsků bude větší než velikost zkoumaného objektu. Při porušení této podmínky dojde k deformaci buňky (obr. 75). Výhodou této metody je, že laserové paprsky nejsou zaměřeny přímo na buňku, a tudíž nedochází k poškození tepelným zářením. Tato výhoda umožní použití laserových paprsků o větším výkonu.[2]



Obr. 75 Natahování buňky pomocí optického stretcheru

8 Výpočtové modelování mechanického chování buněk

Všechny předchozí experimentální metody jsou založeny na měření určité odezvy, která je vyvolána mechanickým zatěžováním (deformační nebo silové zatížení). Z takto zjištěných závislostí nelze vyčíslit mechanické parametry buňky, dostáváme „pouze“ náhled na chování buňky jako celku. Abychom mohli modelovat mechanické chování buňky, případně mechanicky významných komponent buňky, musíme vytvořit vhodný výpočtový model buňky. Pomocí takového výpočtového modelu provedeme identifikaci materiálových parametrů buňky iteračně porovnáváním výsledků simulace s výsledkem experimentu. Identifikace nemůže být u složitějšího modelu z důvodu mnoha neznámých materiálových parametrů jednoznačná, tzn. že existuje více kombinací materiálových parametrů komponent

buňky, které zajistí výpočtové chování buňky shodné s experimentem. Abychom omezili počet těchto možných kombinací materiálových parametrů komponent buňky, museli bychom simulovat více mechanických zkoušek. Po provedení příslušných výpočtových simulací, které pravděpodobně vyloučí některé kombinace parametrů, protože nedosáhnou shody s dalšími simulovanými experimenty, bychom se mohli přiblížit jednoznačnému řešení.

8.1 Základní přehled výpočtových modelů mechanického chování buněk

8.1.1 Kontinuální modely

Všechny komponenty modelu jsou modelovány jako homogenní izotropní kontinuum (lineárně nebo nelineárně elastické, viskoelastické apod.) a tak zde dochází k výraznému zjednodušení reality. Tento typ modelu se používá pouze pro nejjednodušší určení mechanických vlastností buňky jako celku.

Kontinuální modely lze rozdělit podle rozlišovací úrovně na:

a) Strukturní

Tyto modely zohledňují některé hlavní komponenty buňky (např. membrána, cytoplasma, jádro). Těmto komponentám jsou přiděleny různé modely materiálu.

b) Nestrukturní

Tyto modely nezohledňují žádné komponenty buňky a celou buňku modelují jako homogenní izotropní kontinuum.

V této diplomové práci byl kontinuální nestrukturní model použit pro zjištění Mooney-Rivlinových konstant v hyperelastickém materiálu (nelineárně elastický). Tento model materiálu sloužil jako počáteční model, od kterého se odvíjely první odhady materiálových parametrů složitějšího (tensegritního) modelu, upřesňované posléze iteračním způsobem.

8.1.2 Tensegritní modely

Modely založené na tzv. tensegritních strukturách, použitých pro modelování cytoskeletu.

8.1.2.1 Definice tensegritních struktur

Pojem tensegrity vznikl spojením zkratk **tensional** a **integrity** a zavedl ho R. B. Fuller.

Základní rozdíl mezi tensegritní strukturou a klasickou (netensegritní) konstrukcí:

- klasické struktury

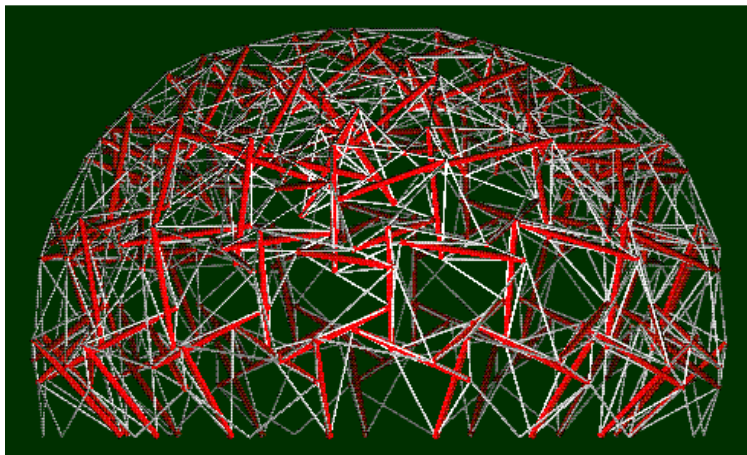
Stabilita je zajištěna pomocí spojitých tlakových sil, vyvolaných gravitačním účinkem Země (drtivá většina lidských staveb, např. kamenná kopule).

- tensegritní struktury

Stabilita je zajištěna silovou rovnováhou mezi spojitými předepnutými čistě tahovými prvky a nespojitými (izolovanými) tlakovými prvky. Čistě tahové prvky jsou takové prvky, které přenášejí pouze tahové zatížení, nikoliv tlakové (např. lano, řetěz). Z tahových prvků je v tensegritní struktuře utvořena spojitá síť, která přenáší zatížení do celé struktury. Tlakové prvky jsou takové prvky, které přenášejí pouze tlakové zatížení. Nejsou vzájemně propojeny a z tohoto důvodu nemohou přímo přenášet mezi sebou žádné zatížení. Na tlakové členy se zatížení přenesou pomocí členů tahových.

Z předešlého textu je tedy zřejmá definice tensegritních struktur. Jednu z nejobecnějších definic publikoval v roce 1975 Anthony Pugh a zněla:

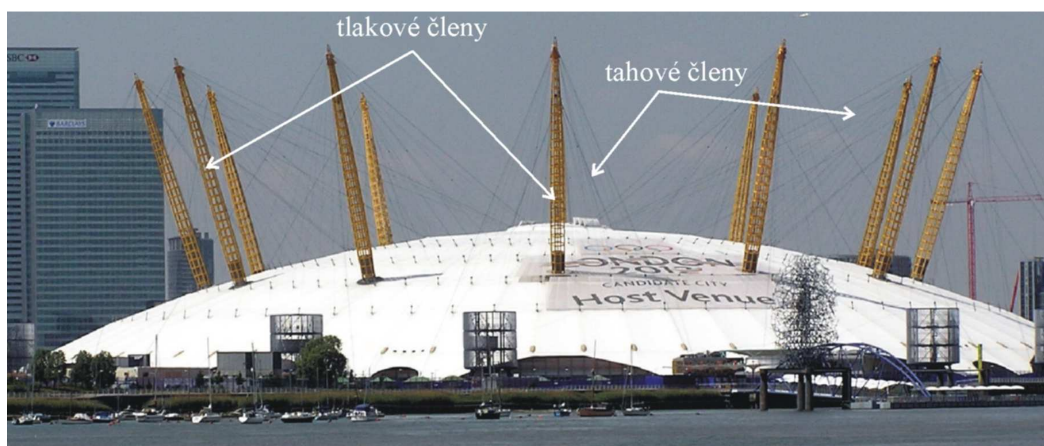
Tensegritní systém vzniká tehdy, jestliže soustava nespojitých tlakových prvků v interakci se soustavou spojitých tahových prvků vytváří stabilní a prostorově definovaný systém.



Obr. 76 Tensegritní struktura vytvořená pruty a lany (podle [24])

8.1.2.2 Využití tensegritních struktur

Tensegritních struktur se využívá především ve stavebnictví (rozsáhlé kopulovité stavby, závěsné mosty). K tomuto využití vede ekonomická výhodnost, jelikož může být použito méně stavebního materiálu než při klasických konstrukcích při stejné spolehlivosti. To je dáno tím, že velká část zatížení se přenáší tahovými členy, u kterých nehrozí tvarová nestabilita (buckling) jako u členů tlakových.



Obr. 77 Ukázka tensegritní struktury – The Millennium Dome, Londýn

8.1.2.3 Vlastnosti tensegritních struktur

- ve struktuře musí existovat předpětí, tím je zajištěna mechanická stabilita struktury,
- tuhost struktury je proporcionálně závislá na velikosti předpětí,
- při zatížení je tensegritní struktura schopna geometrické reorganizace svých jednotlivých prvků tak, aby byla zajištěna stabilita – jedná se o nelineární odezvu na externí zatížení a v důsledku geometrické nelinearity dochází k efektu deformačního zpevnění,

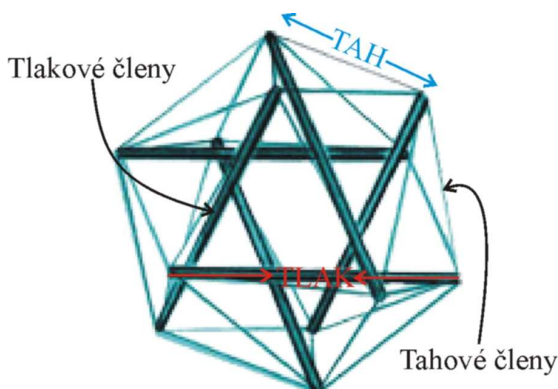
- i při lokálním zatížení dojde ke globální odezvě tensegritní struktury,
- tensegritní struktura vykazuje synergetické chování (mechanické vlastnosti struktury jako celku jsou odlišné od vlastností jednotlivých komponent),
- stabilita struktury není závislá na vazbách s okolím.

8.1.2.4 Tensegritní model buňky

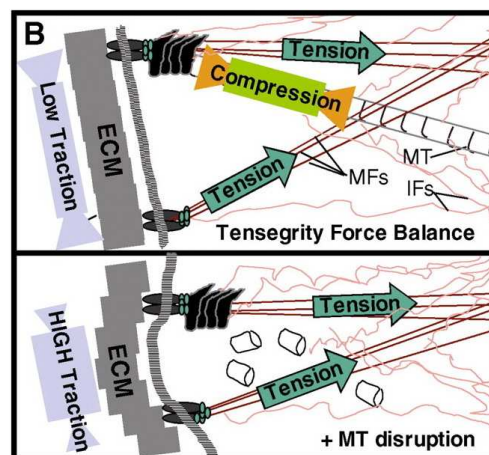
Aby buňka byla odolná mechanickým vlivům, je vyztužena cytoskeletem (cytoskelet má i další funkce, viz. kap. 5.3.4). Tento cytoskelet má významnou roli ve tvarové stabilitě buňky. Je to v podstatě mechanicky aktivní systém, který je tvořen několika komponenty. Jsou to:

- Tahové prvky; tato vlákna tvoří předepnutou síť tahových členů.
- Tlakové prvky; tyto komponenty předpětí vyrovnávají.
- Střední prvky; tyto prvky slouží jako propojení mezi tahovými a tlakovými členy.

Jako tahové prvky v buňce vystupují mikrofilamentová vlákna. V těchto vláknech je generováno předpětí pomocí kontraktilních aktomyozinových motorů. Jako tlakové prvky jsou označeny mikrotubuly a některé silné svazky aktinových vláken. Tyto komponenty vyrovnávají část předpětí, které je vytvořeno v mikrofilamentech. Zbývající předpětí vyrovnává extracelulární matrix, která je fyzicky propojena s cytoskeletem. Ta vlákna, která slouží jako zprostředkovatel propojení mezi mikrotubuly a mikrofilamenty se nazývají intermediální filamenta. Tyto intermediální filamenta hrají významnou roli při podpoře a přenosu kontraktilního předpětí v buňce a při přenosu mechanického zatížení z povrchu buňky do oblasti jádra.



Obr. 78 Tahové a tlakové členy v šestivzpěrové tensegritní struktuře



Obr. 79 Funkce složek cytoskeletu a extracelulární hmoty v buněčné tensegritní struktuře (podle [25])

9 Realizace řešení

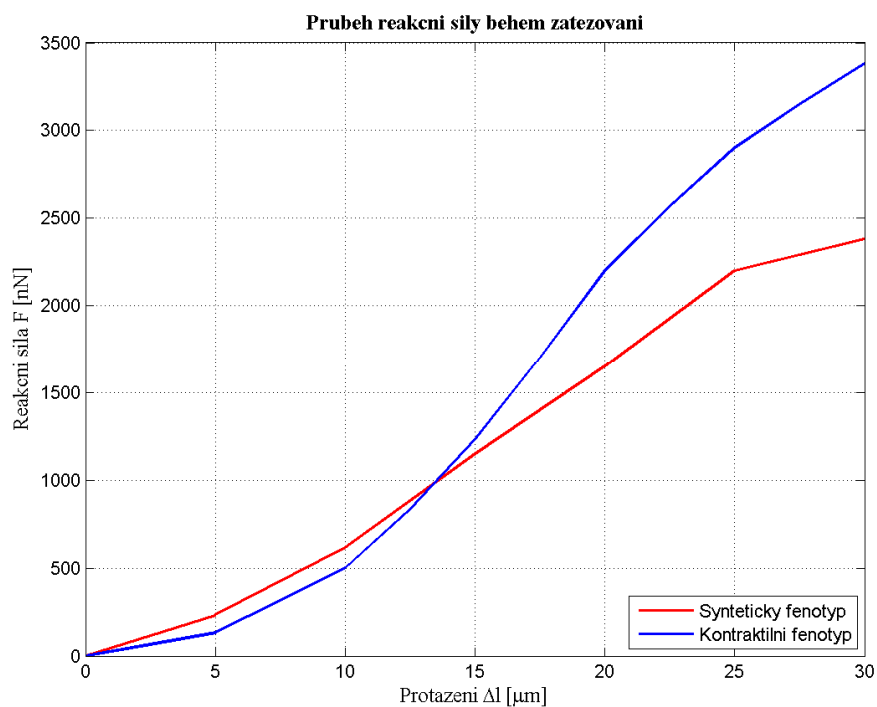
Hlavní cílem této práce je vytvoření a otestování výpočtového modelu s takovými vlastnostmi (materiál, geometrie, vazby, zatížení), který by simuloval jednoosou tahovou zkoušku na jisté rozlišovací úrovni a který by dával takové výsledky řešení, které budou na přijatelné úrovni v souladu s experimentálně zjištěnými daty. Aby mohl být takový cíl splněn, musela se nejprve provést základní testovací úloha na nestruturním výpočtovém modelu. Z této testovací úlohy byla získána určitá vstupní data do modelu, který již respektuje na určité rozlišovací úrovni vnitřní strukturu buňky. Základní testovací úloha byla provedena v rámci [2][10] a její podstatou byla:

- Tvorba kontinuálního nestruturního modelu buňky pro identifikaci materiálových vlastností buněk. Tento model byl rotačně symetrický a simuloval tahovou zkoušku. Jako model materiálu byl použit hyperelastický 5-parametrický model Mooney-Rivlin. Výstupem tohoto kontinuálního nestruturního modelu byly takové hyperelastické parametry, které dávají odezvu v souladu s experimentálně zjištěnými daty. Identifikované hyperelastické parametry pak sloužily jako vstupní data do složitějšího struturního 3D výpočtového modelu. Z tohoto důvodu bude základní testovací úloha i s výsledky prezentována v následující kapitole.

9.1 Kontinuální nestruturní model buňky

Tento výpočtový model byl rotačně symetrický, nestruturní a popisoval buňku jako homogenní nelineárně elastické izotropní kontinuum. Výchozím tvarem byl tvar kulový. Cílem řešení byla identifikace vhodného konstitutivního modelu, který by byl schopen popsat nelineární křivky napětí–přetvoření materiálu buňky a to na základě experimentálních zkoušek jednoosým tahem publikovaných v [10]. Výsledkem experimentu byla závislost zátěžné síly (resp. reakční síly v mikropipetách) na protažení buňky (obr. 80). Experiment byl autory prováděn na obou fenotypech buňky.

Určení napětově deformační křivky z křivky protažení–síla pomocí obvyklých analytických vztahů nebylo možné a to z toho důvodu, že u buňky se výrazně mění příčný průřez po délce vzorku. Velká přetvoření, která přidala k materiálové nelinearitě (hyperelasticita) i nelinearitě geometrickou, situaci dále komplikují. Porovnání křivek $\sigma - \varepsilon$ (ve smluvních hodnotách) určené pomocí jednoduchých analytických vztahů a výpočtovou simulací experimentu pomocí MKP je na obr. 84 a 85.



Obr. 80 Experimentálně určené křivky síla-protážení při tahové zkoušce buněk hladkého svalstva cévní stěny kontraktilního a syntetického fenotypu

Vstupní údaje do výpočtového modelování:

- geometrie buňky,
- zatížení buňky (deformační natažení),
- odezva na tuto aktivaci v podobě závislosti výsledné reakční síly působící na mikropipety na jejich posuvu.

Neznámé charakteristiky:

- materiálové charakteristiky buňky.

Tato úloha byla tedy úlohou inverzní.

9.1.1 Tvorba MKP modelu

9.1.1.1 Model materiálu

V tomto případě byl materiál buňky modelován jako homogenní nelineárně elastické izotropní kontinuum. Tento model byl vybrán z důvodu neznalosti jakýchkoliv materiálových charakteristik. Jako konstitutivní model byl vybrán pětiparametrický Mooney-Rivlinův vztah pro měrnou energii napjatosti ve tvaru:

$$W = c_{10}(\bar{I}_1 - 3) + c_{01}(\bar{I}_2 - 3) + c_{20}(\bar{I}_1 - 3)^2 + c_{11}(\bar{I}_1 - 3)(\bar{I}_2 - 3) + c_{02}(\bar{I}_2 - 3)^2 + \frac{1}{d}(J - 1)^2,$$

kde \bar{I}_i jsou modifikované invarianty Cauchy-Greenova tenzoru deformace (modifikované proto, aby zahrnovaly jen deviátorovou část deformace), d je parametr stlačitelnosti materiálu ($d=2/K$, kde K je objemový modul pružnosti), c_i jsou ostatní materiálové parametry (Mooney-Rivlinovy konstanty) a J je třetí invariant tenzoru deformačního gradientu, tedy udává objemovou změnu.

9.1.1.2 Model geometrie

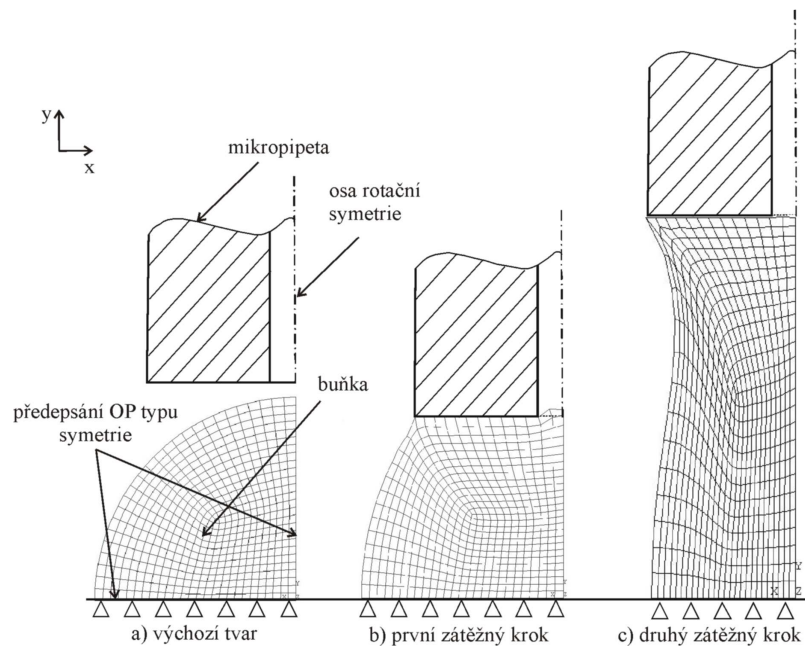
Buňka byla modelována podle reality v nezatíženém stavu jako koule o průměru 30 μm . Mikropipety byly modelovány jako duté nepoddajné válce o vnějším průměru 20 μm a vnitřním průměru 4 μm (obr. 81). Spoj mezi buňkou a mikropipetami byl realizován jako slepený bez vzájemných posuvů.

9.1.1.3 Okrajové podmínky

Jelikož byla úloha rotačně symetrická, stačilo modelovat $\frac{1}{4}$ buňky s využitím rotační symetrie. Symetrie byla předepsána na horizontální a vertikální hranici modelu (obr. 81a). Zatížení od mikropipet bylo realizováno předepsáním příslušných posuvů do těch uzlů, které byly s mikropipetou v kontaktu.

9.1.2 Výpočtová simulace tahové zkoušky

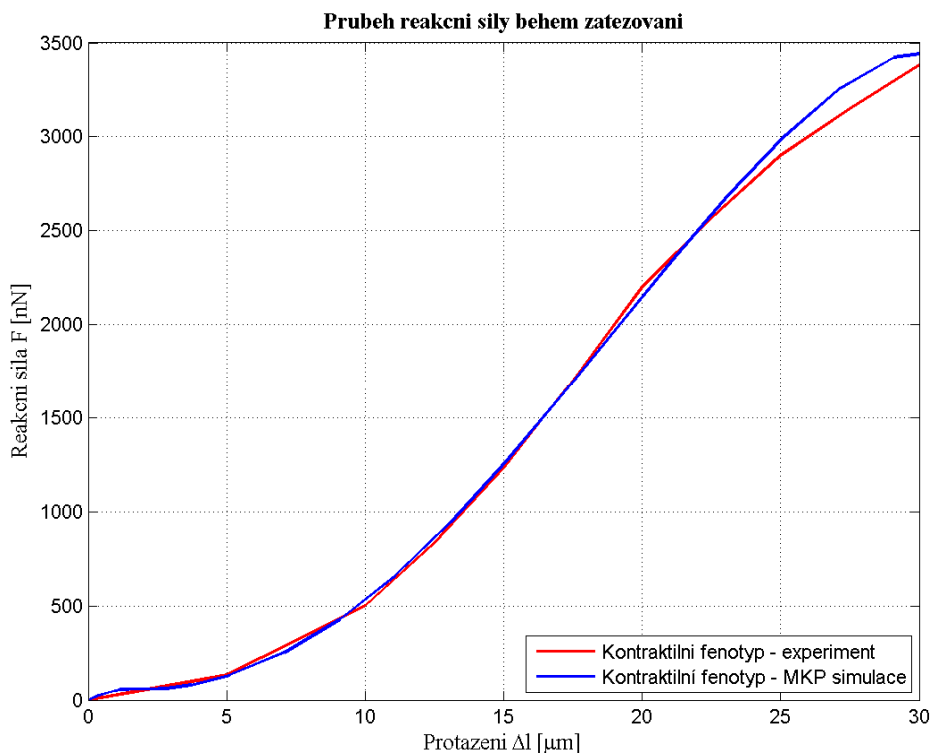
Celý výpočet byl rozdělen na dvě části (kroky, loadsteps). Prvním krokem bylo simulování spojení mikropipety s buňkou (obr. 81b) a nalezení rovnovážné polohy (celková výsledná reakční síla v zatěžujících uzlech musela být nulová). Druhým krokem bylo samotné natahování (obr. 81c) buňky z rovnovážné polohy. Zatěžování bylo prováděno deformačně, tzn. že příslušným uzlům byl předepsán určitý posuv tak, aby celkové natažení buňky bylo v souladu s experimentem.



Obr. 81 Model geometrie a okrajové podmínky, výpočtová simulace

9.1.3 Identifikace konstitutivních parametrů materiálu buňky

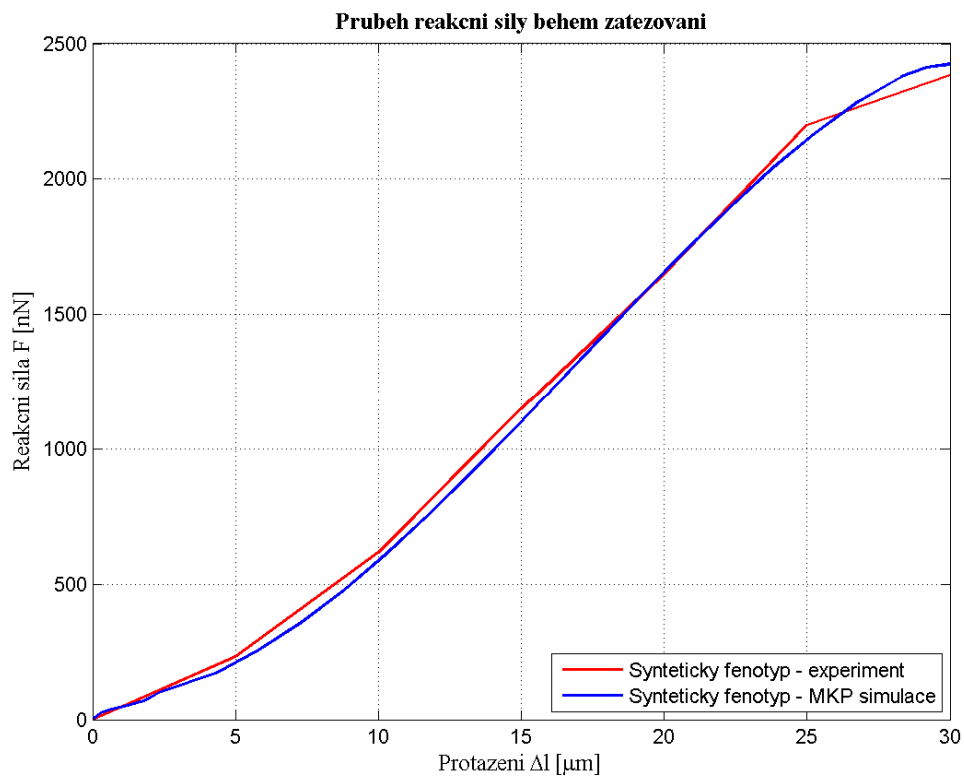
Parametry konstitutivního modelu byly určovány iteračně. Podrobný popis iteračního způsobu v [10]. Metodika výpočtu byla převzata z [10].



Obr. 82 Porovnání závislosti síla – protažení z experimentu a výpočtové simulace u buňky kontraktilního fonotypu

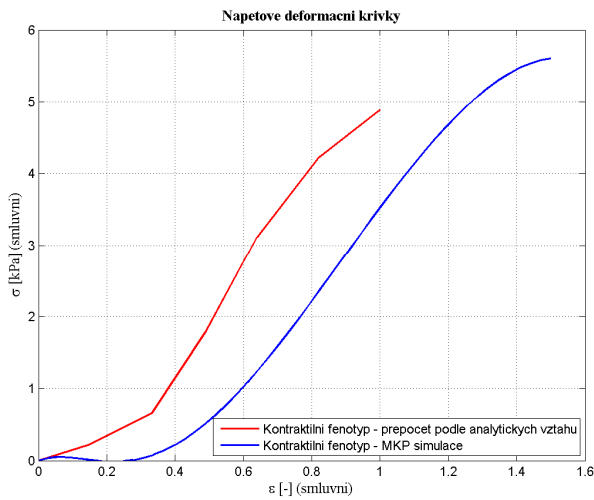
9.1.4 Výsledné porovnání experimentu a výpočtové simulace

Po ukončení iteračního procesu byla závislost síla – protažení, získaná simulací, graficky porovnána se stejnou závislostí získanou experimentem. Výsledky pro kontraktilní fenotyp buňky jsou na obr. 82 a pro syntetický fenotyp na obr. 83.

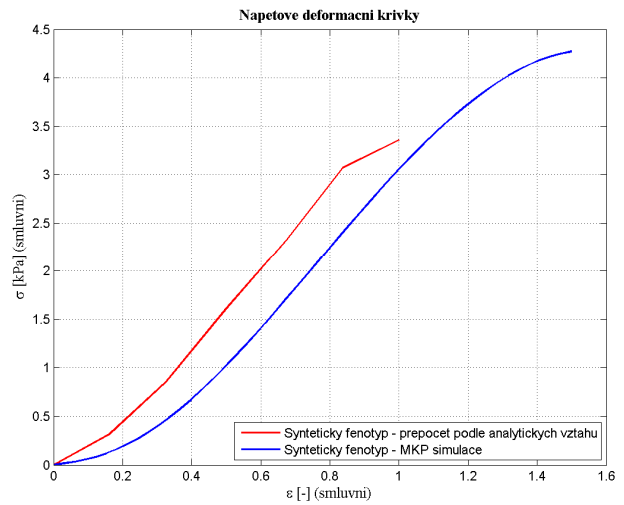


Obr. 83 Porovnání závislosti síla – protažení z experimentu a výpočtové simulace u buňky syntetického fenotypu

Porovnání křivek $\sigma - \varepsilon$ (ve smluvních hodnotách) určené pomocí jednoduchých analytických vztahů a výpočtovou simulací experimentu pomocí MKP uvádí obr. 84 a obr. 85.

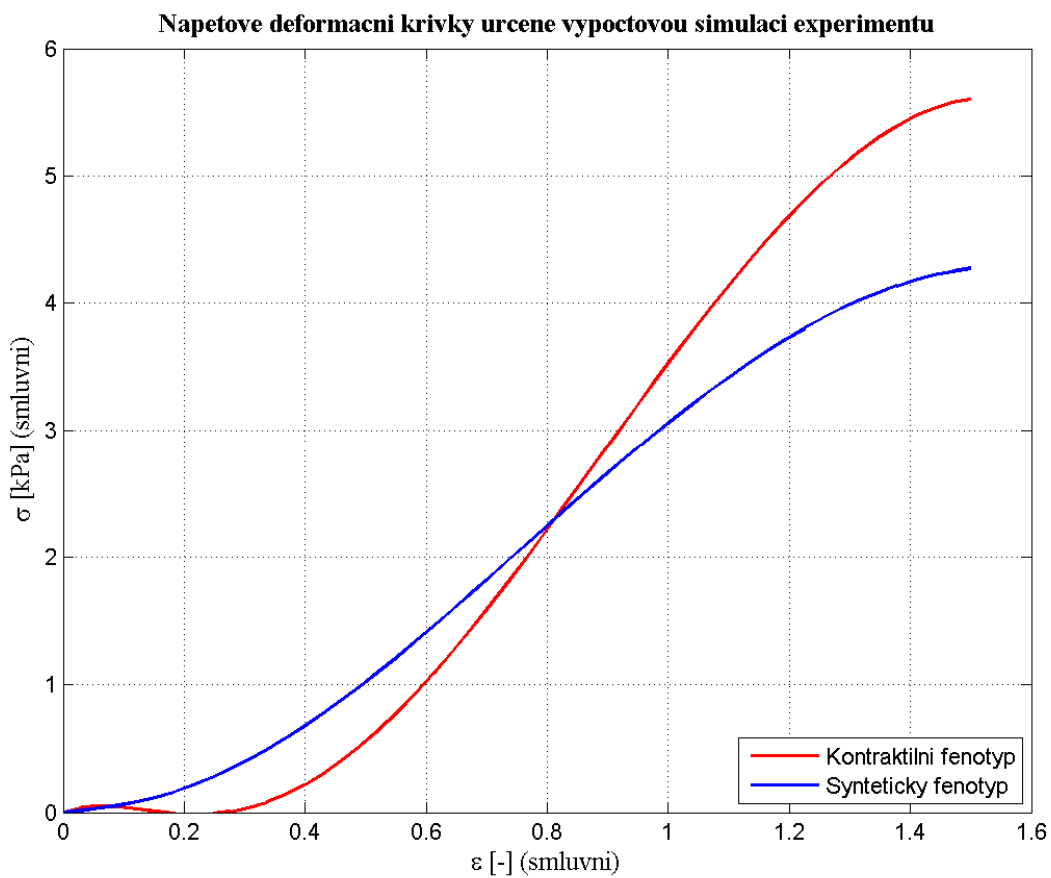


Obr. 84 Porovnání křivek $\sigma - \varepsilon$, kontraktilní fenotyp



Obr. 85 Porovnání křivek $\sigma - \varepsilon$, syntetický fenotyp

9.1.5 Materiálové křivky $\sigma - \varepsilon$



Obr. 86 Výsledné materiálové křivky $\sigma - \varepsilon$ pro oba fenotypy buněk

9.1.6 Parametry modelu Mooney-Rivlin

Hodnoty parametrů Mooney-Rivlinova konstitutivního modelu určené výpočtovou simulací pro oba fenotypy hladkých svalových buněk jsou v tab. 2.

Tab. 2 Hodnoty parametrů Mooney-Rivlinova výpočtového modelu

Mooney-Rivlin konstanty	Kontraktilní fenotyp	Syntetický fenotyp
c_{10}	-3,529955	0,10331155
c_{01}	3,862332	-0,01979183
c_{11}	3,146998	1,13473449
c_{20}	-0,98317	-0,39683974
c_{02}	-0,433546	-0,14901946

Podrobná analýza simulace této zkoušky je v [10].

V této diplomové práci byla zkouška na nestrukturním výpočtovém modelu uvedena z toho důvodu, protože složitější výpočtový model (strukturovaný s vnitřní tensegritní strukturou) má počáteční hodnoty pro hyperelastické materiály (membrána, cytoplazma a jádro) převzaty z výše uvedeného výpočtového modelu. Tyto Mooney-Rivlinovy parametry byly následně modifikovány na požadované hodnoty (kap. 9.2.1.3).

9.2 Strukturní model buňky při simulaci tahové zkoušky

Pomocí strukturního modelu bude simulována jednoosá tahová zkouška. Výchozím tvarem bude tvar kulový a cílem je určení parametrů vhodného konstitutivního modelu. V závěru bude provedena citlivostní analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu na výsledek řešení.

Strukturní model obsahuje:

- membránu,
- membránový skelet,
- jaderný skelet,
- cytoplasmu,
- jádro.

Vstupní údaje do výpočtového modelování:

- geometrie buňky,

- zatížení buňky (deformační natažení),
- odezva na toto zatížení v podobě závislosti výsledné reakční síly působící na mikropipety na jejich posuvu.

Neznámé charakteristiky:

- materiálové charakteristiky buňky.

Jedná se o inverzní úlohu.

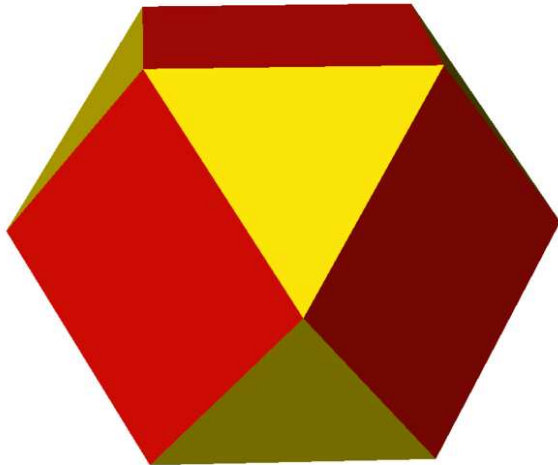
V této úloze je, vzhledem k časovému omezení, provedena výpočtová simulace pro experimentálně zjištěná data pouze syntetického fenotypu buňky (obr. 83, červená křivka). Kontraktilní fenotyp nebude simulován.

V závěru této úlohy byly provedeny citlivostní analýzy vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu na výsledky výpočtové simulace.

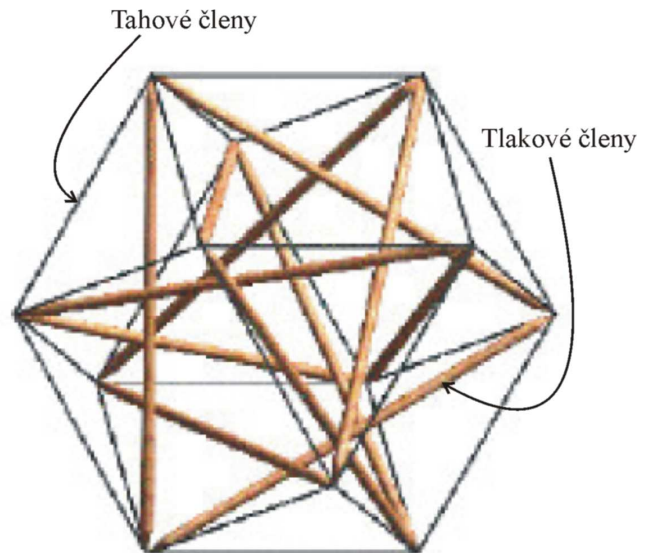
9.2.1 Tvorba MKP modelu

9.2.1.1 Model tensegritní struktury

Tensegritní strukturou je v mechanice buňky modelován cytoskelet. Výchozím tvarem pro tvorbu jednoduššího tensegritního modelu cytoskeletu je tzv. **cuboctahedron**. Jedná se o mnohostěn (8 trojúhelníkových stěn a 6 čtvercových stěn, s 12 vrcholy a 24 stejnými hranami; obr. 87). Do tohoto mnohostěnu se vloží 4 rovnostranné trojúhelníky, které jsou bez vzájemného dotyku (obr. 88). Tyto trojúhelníky představují v tensegritní struktuře tlakové členy (vzpěry). Tahové členy (lana), které jsou druhou nedílnou součástí tensegritní struktury, jsou totožné s hranami cuboctahedronu a spojují tak tlakové členy. Tahové členy tvoří tedy spojitou síť. Z toho vyplývá, že tato tensegritní struktura bude mít 12 tlakových členů (4x3 úhelník) a 24 tahových členů (6x4 úhelník).



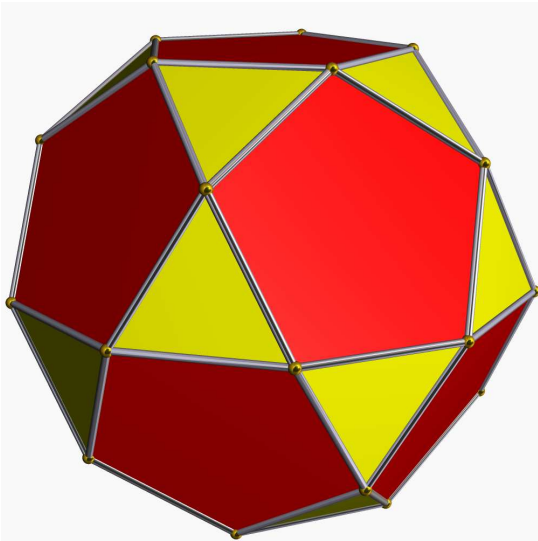
Obr. 87 Cuboctahedron



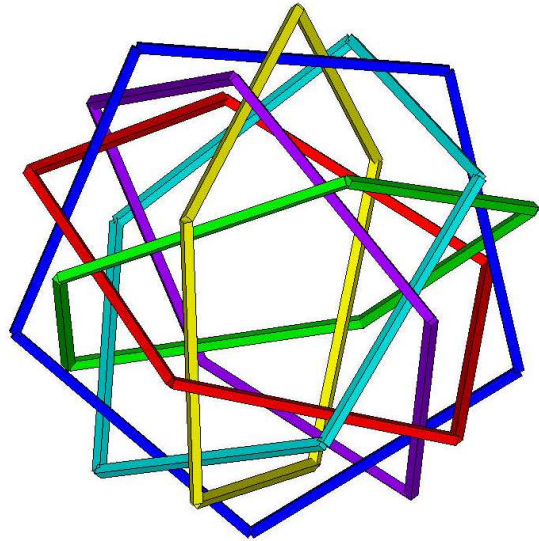
Obr. 88 Tahové a tlakové členy v tensegritní struktuře, vepsané do cuboctahedronu

Tato tensegritní struktura obsahuje celkem 36 členů. Abychom dostali přesnější model buňky, použijeme složitější tensegritní model, který bude mít více než 36 členů. Princip vytvoření složitější tensegritní struktury je shodný s předchozí strukturou.

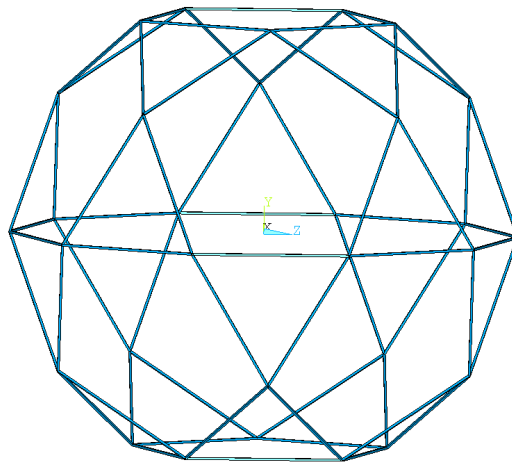
Výchozím tvarem je tzv. **icosidodecahedron**. Jedná se o mnohostěn (20 trojúhelníkových stěn a 12 pětiúhelníkových stěn, s 30 vrcholy a 60 stejnými hranami; obr. 89). Do tohoto mnohostěnu se vloží 6 pravidelných pětiúhelníků, které jsou bez vzájemného dotyku (obr. 90). Tyto pětiúhelníky představují v tensegritní struktuře tlakové členy (vzpěry). Tahové členy (lana) jsou totožné s hranami icosidodecahedronu a spojují tak tlakové členy. Tato tensegritní struktura bude mít 30 tlakových členů (6x5-ti úhelník) a 60 tahových členů (5x12-ti úhelník). Tato tensegritní struktura obsahuje celkem 90 členů. Vrcholy icosidodecahedronu představují integrinové receptory v buněčné membráně.



Obr. 90 Icosidodecahedron



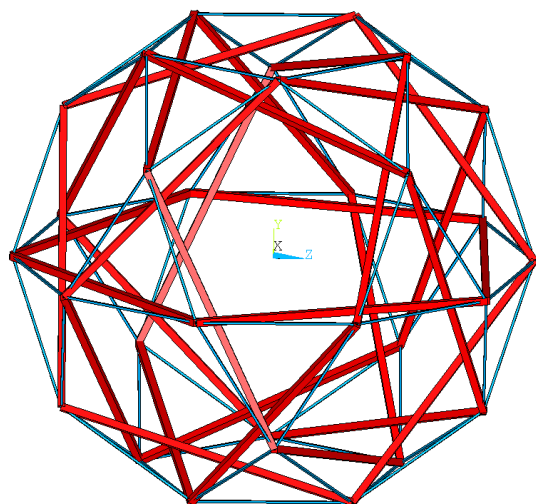
Obr. 91 Pětúhelníky
(tlakové členy tensegritní struktury)



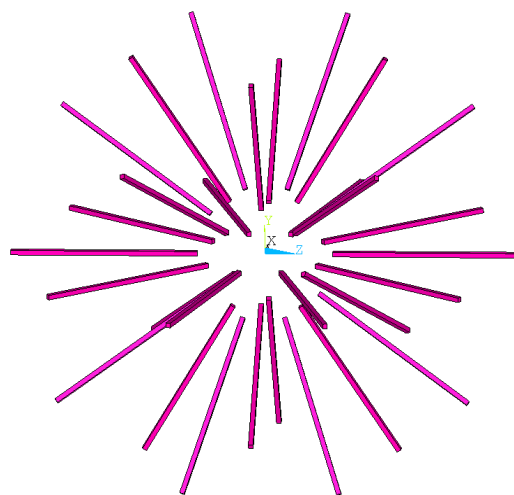
Obr. 89 Tahové členy tensegritní struktury

Celkový tensegritní model buňky:

Skládá se ze dvou tensegritních struktur (ukázka jedné tensegritní struktury na obr. 92). Jedna se nazývá membránová (membránový skelet) a druhá jaderná (jaderný skelet). Obě jsou tvořeny stejnou metodou (pomocí icosidodecahedronu). Model jaderného skeletu je vlastně zmenšenou kopií modelu membránového skeletu. Spojení těchto dvou tensegritních struktur je realizováno pomocí spojovacích členů (obr. 93), které jsou ukotveny na každé straně do příslušných uzlů (vrcholy icosidodecahedronu, integrinové receptory).



Obr. 92 Tensegritní model (30 vzpěr – červená,
60 lan – modrá)



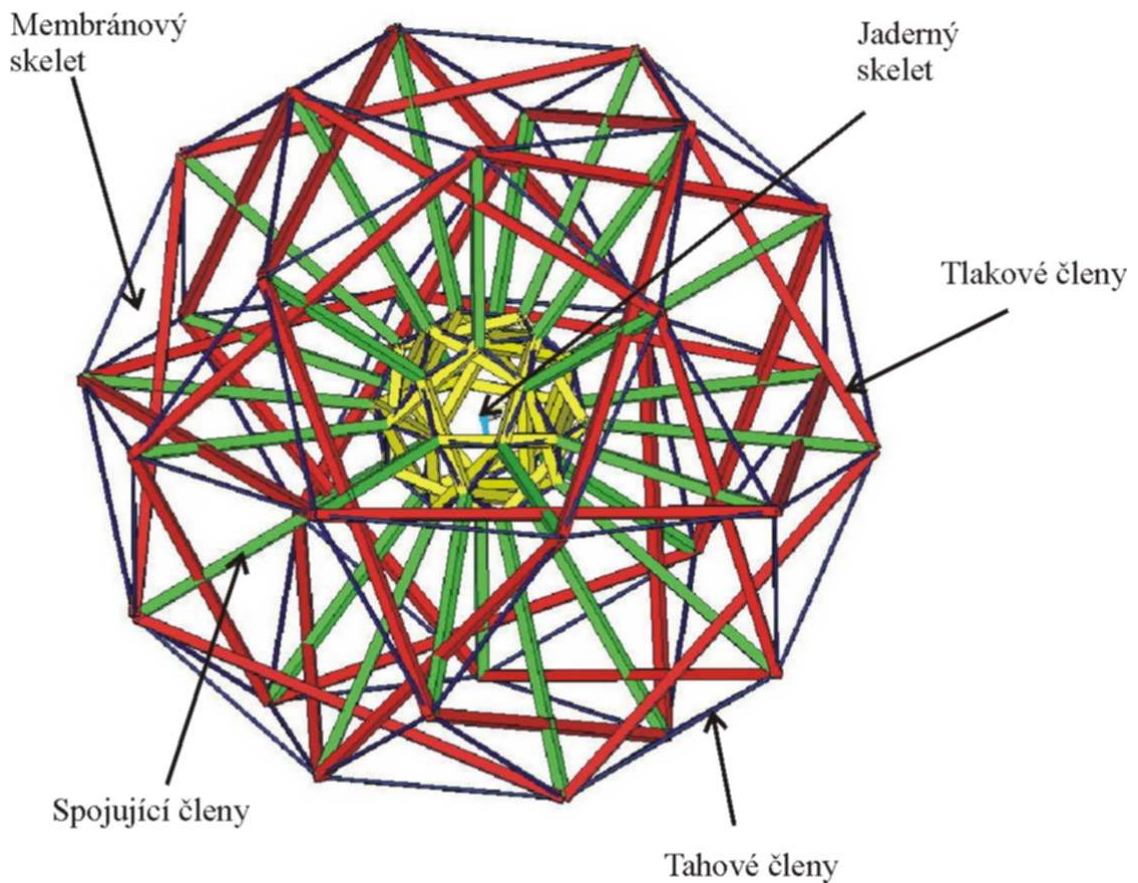
Obr. 93 Spojovací prvky (30x)

V tab. 3 je přehledně uvedeno, jaké funkce jednotlivé členy v tensegritním modelu simulují a v jakém počtu jsou zastoupeny.

Tab. 3 Porovnání funkcí jednotlivých komponent v tensegritním modelu a v živé buňce

komponenta		pozn.	schpnost přenášet	počet
tensegritní model	buňka			
spojovací prvky	mikrotubuly a intermediální vlákna	mechanické propojení mezi povrchem buňky a oblastí buněčného jádra	tah i tlak	30
tahové členy	mikrofilamenta	včetně aktinmyozinových kontraktilních motorů	tah	60
tlakové členy	-	mechanické funkce mikrotubulů	tlak	30
uzlové body (vrcholy)	integrinové receptory	-	-	30

Z tab. 3 je zřejmé, že výsledný tensegritní model cytoskeletu, který bude zahrnovat membránový skelet, jaderný skelet a spojovací členy bude obsahovat: 210 diskrétních členů, z toho 120 tahových, 60 tlakových a 30 spojovacích členů (obr. 94).

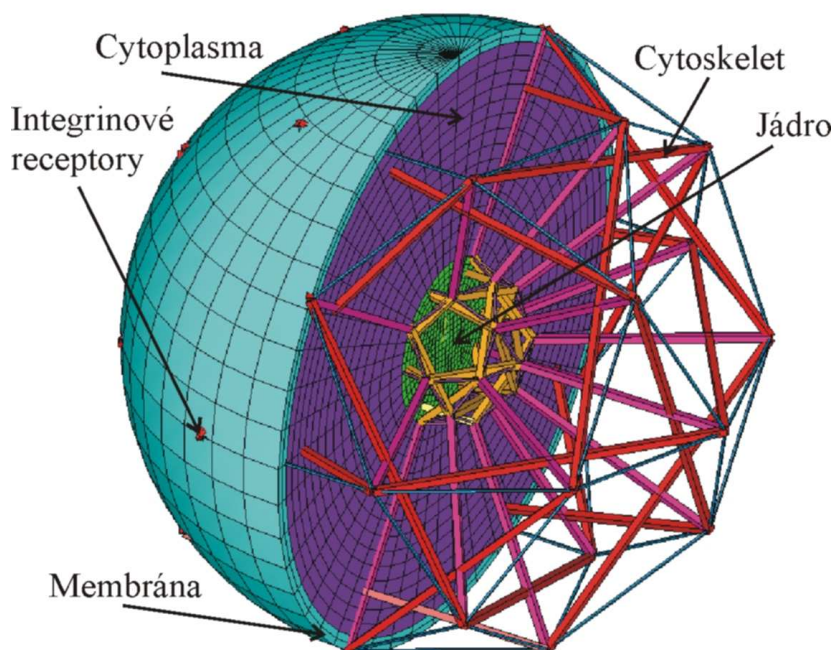


Obr. 94 Kompletní tensegritní model cytoskeletu

9.2.1.2 Charakteristiky modelu

Základním nezatíženým tvarem je tvar sférický (obr. 95). I když je výpočtový model na první pohled rotačně symetrický, nebude modelován jako úloha v rotační symetrii. Je to z důvodu potřeby zachytit kompletní cytoskelet, který není rotačně symetrický. Zatížení bude realizováno stejně jako u nestrukturního modelu, tj. předepsáním příslušných posuvů do těch uzlů, které jsou v kontaktu s mikropipetami.

V tab. 4 jsou uvedeny mechanicky významné komponenty buňky a typ modelu materiálu, kterým jsou tyto komponenty modelovány. Spojení těchto komponent je realizováno sdílením hraničních uzlů. V tab. 5 jsou uvedeny základní rozměry komponent a mikropipet.



Obr. 95 Model geometrie strukturního modelu buňky – nezatížený stav

Tab. 4 Komponenty, které zahrnuje model geometrie a způsob jejich modelování

komponenta	model komponenty a materiálu
cytoskelet	tensegritní struktura – lineární izotropní model
membrána	kontinuum – hyperelastický model
cytoplasma	kontinuum – hyperelastický model
jádro	kontinuum – hyperelastický model

Tab. 5 Základní rozměry komponent buňky a mikropipet

komponenta	rozměr	jednotka
membrána	tl. 0,7	μm
cytoplasma	ø 28,6	μm
jádro	ø 4,0	μm
mikropipety	ø 20,0 / 4,0	μm

Výpočtové modelování mechanických zkoušek hladkých svalových buněk

Diplomová práce, Holata Jakub

V tab. 6 jsou uvedeny použité konstitutivní modely materiálu pro jednotlivé komponenty a použité prvky pro tyto komponenty.

Tab. 6 Přehled použitých materiálů a prvků pro jednotlivé komponenty buňky

komponenta buňky	model materiálu	počet parametrů	použitý prvek
cytoplasmatická membrána	hyperelastický – Mooney Rivlinův model	5	solid 185
cytoplasma	hyperelastický – Mooney Rivlinův model	5	solid 185
tlakové členy v membránovém skeletu	lineárně elastický izotropní model	-	link 10 (přenášející pouze tlak)
tahové členy v membránovém skeletu	lineárně elastický izotropní model	-	link 10 (přenášející pouze tah)
členy spojující membránový a jaderný skelet	lineárně elastický izotropní model	-	link 8 (univerzální, tah – tlak)
jádro	hyperelastický – Mooney Rivlinův model	5	solid 185
tlakové členy jaderného skeletu	lineárně elastický izotropní model	-	link 10 (přenášející pouze tlak)
tahové členy jaderného skeletu	lineárně elastický izotropní model	-	link 10 (přenášející pouze tah)

9.2.1.3 Model materiálu buňky

Jelikož materiálové vlastnosti jednotlivých komponent nejsou přesně známy, byly tyto hodnoty pouze odhadnuty. Odhad byl později iteračně upravován tak, aby výpočtově zjištěná výsledná reakční síla odpovídala experimentálně zjištěné výsledné reakční síle (obr. 83 – červená křivka).

V tab. 7 jsou uvedeny elastické parametry těch komponent, u kterých byl použit lineárně elastický izotropní model materiálu (tab. 6).

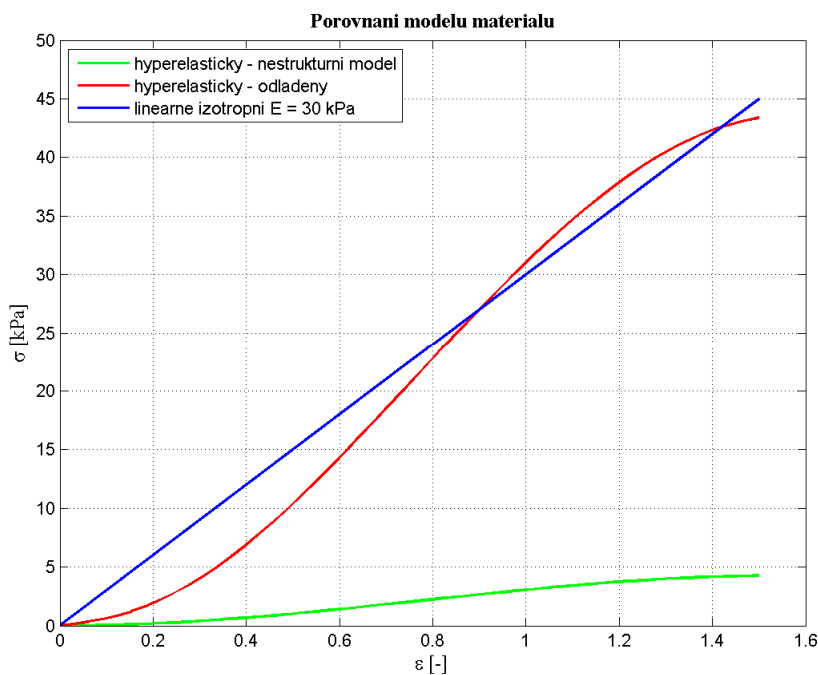
Tab. 7 Elastické hodnoty buněčných komponent

	Tlakové členy	Tahové členy	Spojovací členy
Modul pružnosti [kPa]	1,2e6	2,6e6	1,0e6
Poissonovo číslo [-]	0,3	0,3	0,3

Mooney-Rivlinovy konstanty v hyperelastickém modelu materiálu byly určovány tím způsobem, že byla použita výchozí materiálová křivka z nestruturního modelu (obr. 85 – syntetický fenotyp, obr. 96 a 97 – zelená křivka) a tato materiálová křivka se iteračně upravovala. Úprava spočívala v ladění sklonu křivky tak, aby odpovídala požadovanému modulu pružnosti (obr. 96 a 97 – modrá přímka). Po dosažení uspokojivé shody (červená křivka v obr. 96 a 97) se vypočítaly Mooney-Rivlinovy konstanty pro model hyperelastického materiálu (tab. 8 a 9).

Membrána

Pro membránu byl zvolen 5-ti parametrický hyperelastický materiál. Materiálová křivka tohoto modelu materiálu se iteračně ladila (sklon křivky) tak, aby přibližně odpovídala lineárně izotropnímu materiálu s modulem pružnosti $E = 30$ kPa.



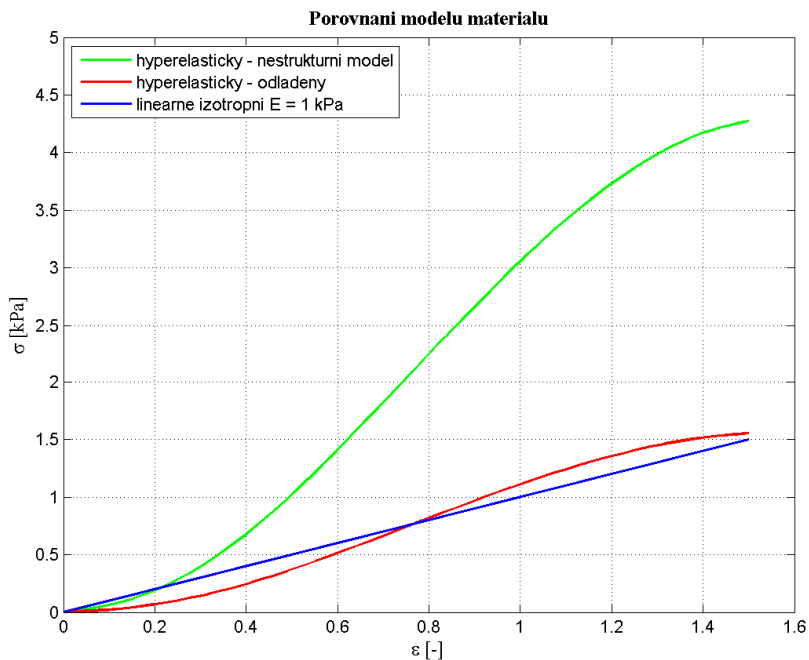
Tab. 8 Mooney-Rivlinovy konstanty pro model materiálu membrány

Parametr	Hodnota
c_{10}	1,04896554
c_{01}	-0,20106175
c_{20}	-4,028476
c_{11}	11,5202261
c_{02}	-1,51301871

Obr. 96 Odladěný model materiálu pro membránu

Cytoplasma, jádro

Zcela analogická úprava jako u membrány následovala u cytoplasmy a jádra. Materiálová křivka se iteračně ladila (sklon křivky) tak, aby přibližně odpovídala lineárně izotropnímu materiálu s modulem pružnosti $E = 1 \text{ kPa}$.



Tab. 9 Mooney-Rivlinovy konstanty pro model materiálu cytoplasmy a jádra

Parametr	Hodnota
c_{10}	3.7559674E-02
c_{01}	-7.1880323E-03
c_{20}	-1.4430413E-01
c_{11}	4.1262523E-01
c_{02}	-5.4180119E-02

Obr. 97 Odladěný model materiálu pro cytoplasma a jádro

9.2.2 Výpočtová simulace tahové zkoušky

Výpočtová simulace bude realizována celkově ve 3 zatěžovacích krocích (loadsteps):

1. krok

V tomto kroku bude zavedeno předpětí (počáteční přetvoření) ve všech tahových členech a ve spojovacích členech. Toto předpětí je potřebné pro plnou funkci tensegritní struktury a simuluje předpětí v buňce, které je realizováno pomocí aktinomyozinových motorů. Zvolené předpětí je u všech členů stejné (10%).

2. krok

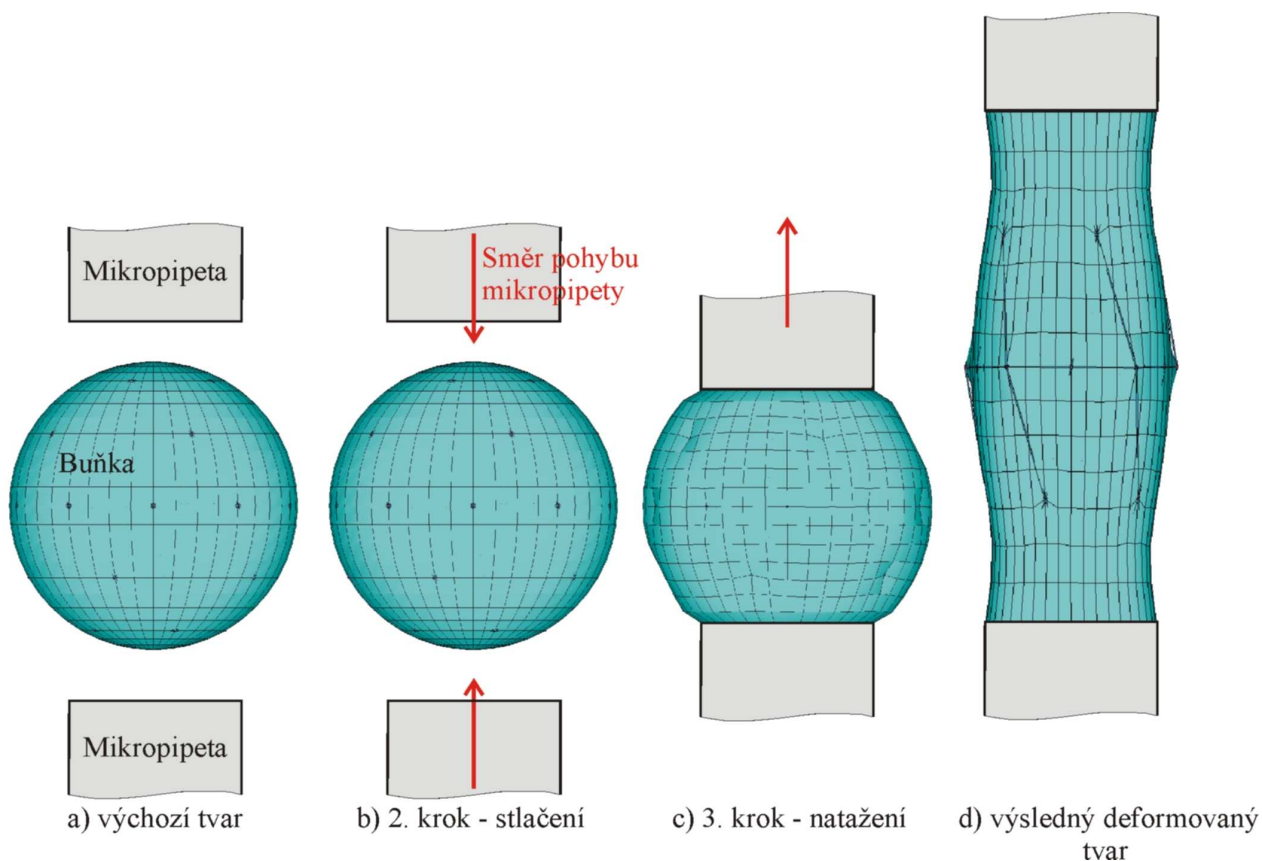
Zde bude zahrnuto stlačení výpočtového modelu. To simuluje přitlačení a přilepení mikropipet na buňku. Axiální deformace od přitlačení mikropipet bude nastavena tak, aby výsledná celková reakční síla byla nulová. Jelikož mikropipety jsou z mechanického hlediska nepoddajné, nebudou ve výpočtovém modelu modelovány.

Stlačení bude předepsáno posuvem jednotlivých uzlových bodů, které jsou ve styku s mikropipetami. (obr. 98b)

3. krok

V posledním kroku bude realizováno samotné natažení výpočtového modelu. Toto simuluje jednoosou tahovou zkoušku. Zatížení bude opět předepsáno do jednotlivých uzlových bodů, stejně jako v kroku 2, pouze místo stlačení bude předepsáno natažení (obr. 98c).

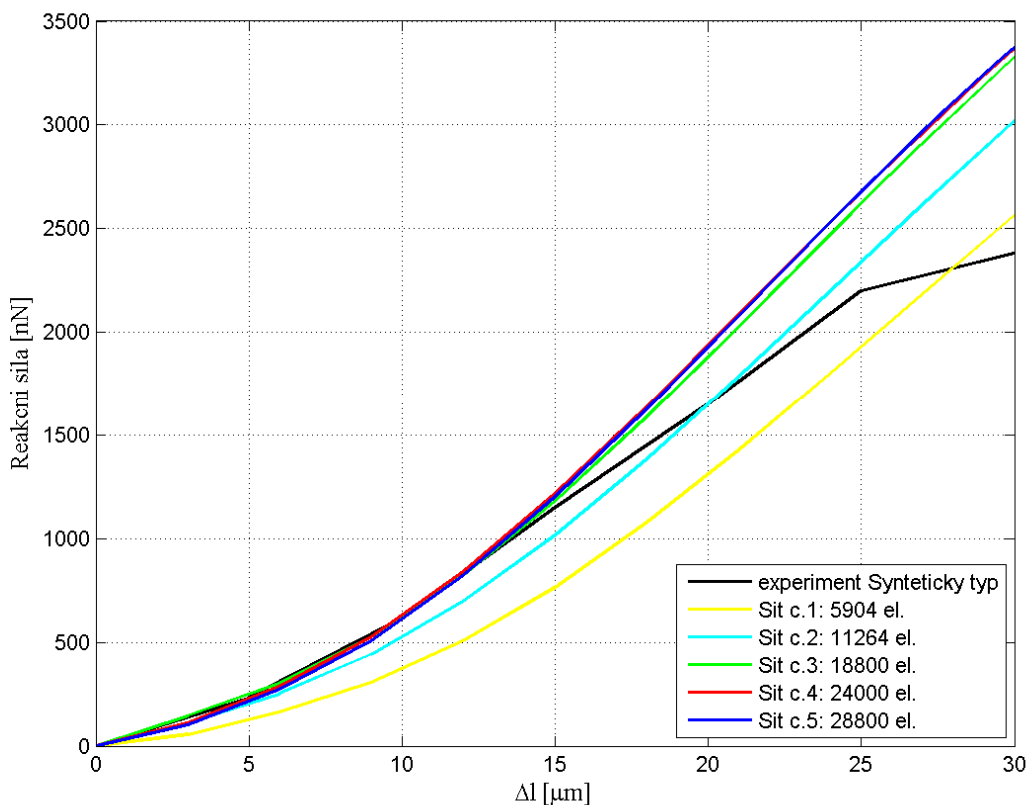
Celkové přepětí, stlačení a natažení bude předepsáno takovými hodnotami, které zajistí přibližnou shodu s výsledky experimentu. V těch uzlech, do kterých bude zatížení předepsáno, bude sledován průběh výsledné reakční síly v závislosti na protažení buňky.



Obr. 98 Model geometrie a okrajové podmínky; výpočtová simulace

9.2.3 Analýza vlivu velikosti MKP sítě na přesnost řešení

Jako první testovací výpočet byla analýza vlivu velikosti MKP sítě (počet elementů solid 185) na přesnost výpočtu.



Obr. 99 Vliv velikosti MKP sítě na přesnost výpočtu

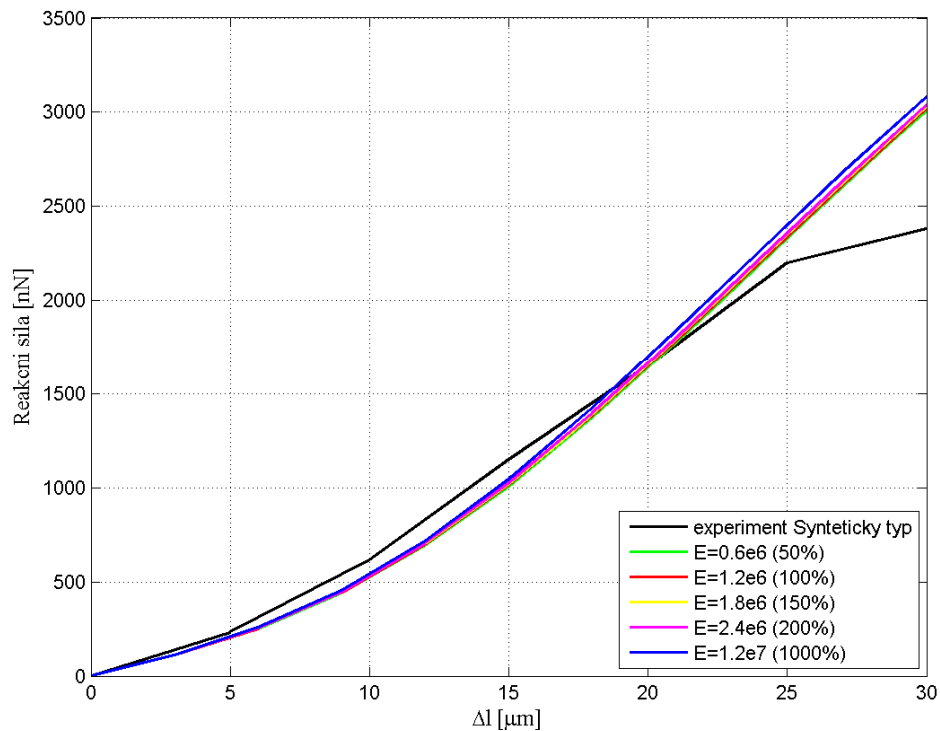
Z obr. 99 je zřejmé, že poslední dvě změny velikosti sítě (sít' č. 4 a 5) nemají významný vliv na přesnost řešení. Sít' č. 2, 3 a 4 vedly k výraznějšímu zpřesnění výpočtu, ovšem velká časová náročnost výpočtů nedovolila využití sítí 3 a 4. Z tohoto důvodu budou citlivostní analýzy probíhat na síti č. 2 s 11264 elementy. Takto způsobená „chyba“ je v toleranci obvyklé v biomechanice a činí zhruba 10% hodnoty výsledné reakční síly na konci celé simulace.

Jedním z budoucích cílů by měly být analýzy, které budou prováděny na jemnějších sítích. Zde by bylo vhodné změnit i typ elementu pro membránu, cytoplasmu a jádro. Současný element solid 185 je pouze 8 uzlový. Vhodnější by byl solid 186, který je 20 uzlový. I tato změna povede na přesnější řešení, ovšem opět velmi naroste časová náročnost.

9.2.4 Výsledky citlivostních analýz

9.2.4.1 Analýza vlivu tlakových členů

V této citlivostní analýze byl postupně měněn modul pružnosti tlakových členů v mezích od 50% do 1000% původní hodnoty. Hodnota 100% odpovídá hodnotě v tab. 7, tj. $E = 1,2e6$ kPa.

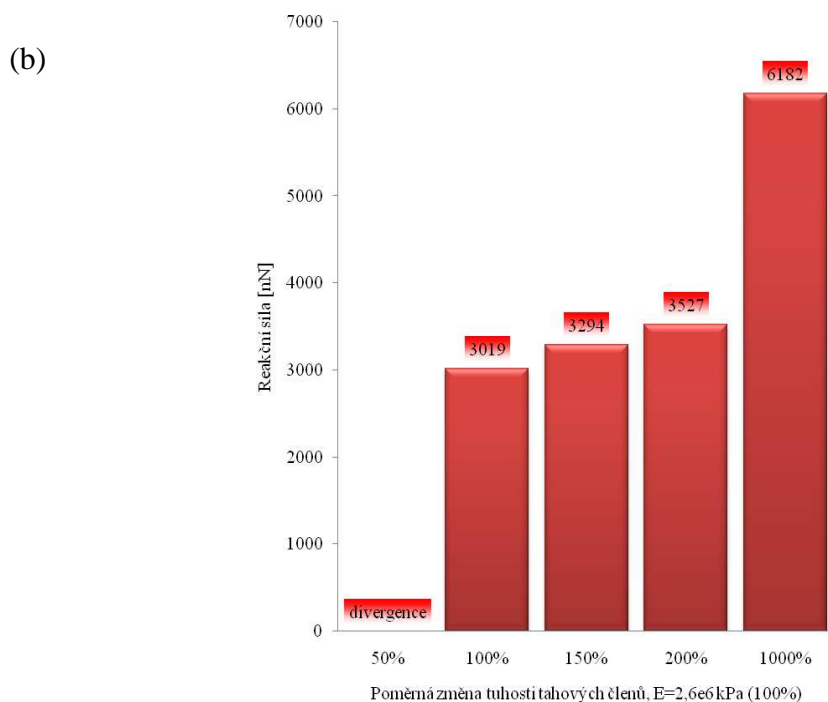
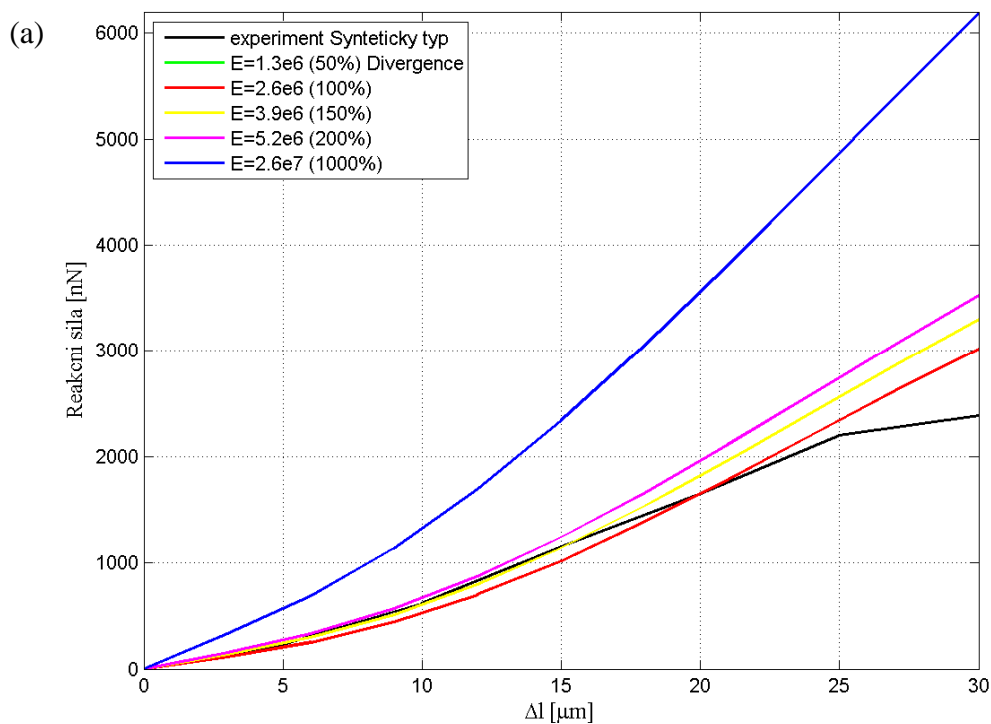


Obr. 100 Vliv změny tuhosti tlakových členů na celkovou tuhost výpočtového modelu

Z obr. 100 je patrné, že změna v uvedeném rozsahu vyvolala odchylky maximální reakční síly menší než 2%.

9.2.4.2 Analýza vlivu tahových členů

V této citlivostní analýze byl postupně měněn modul pružnosti tahových členů v mezích od 50% do 1000% původní hodnoty. Hodnota 100% odpovídá hodnotě v tab. 7, tj. $E = 2,6e6$ kPa.

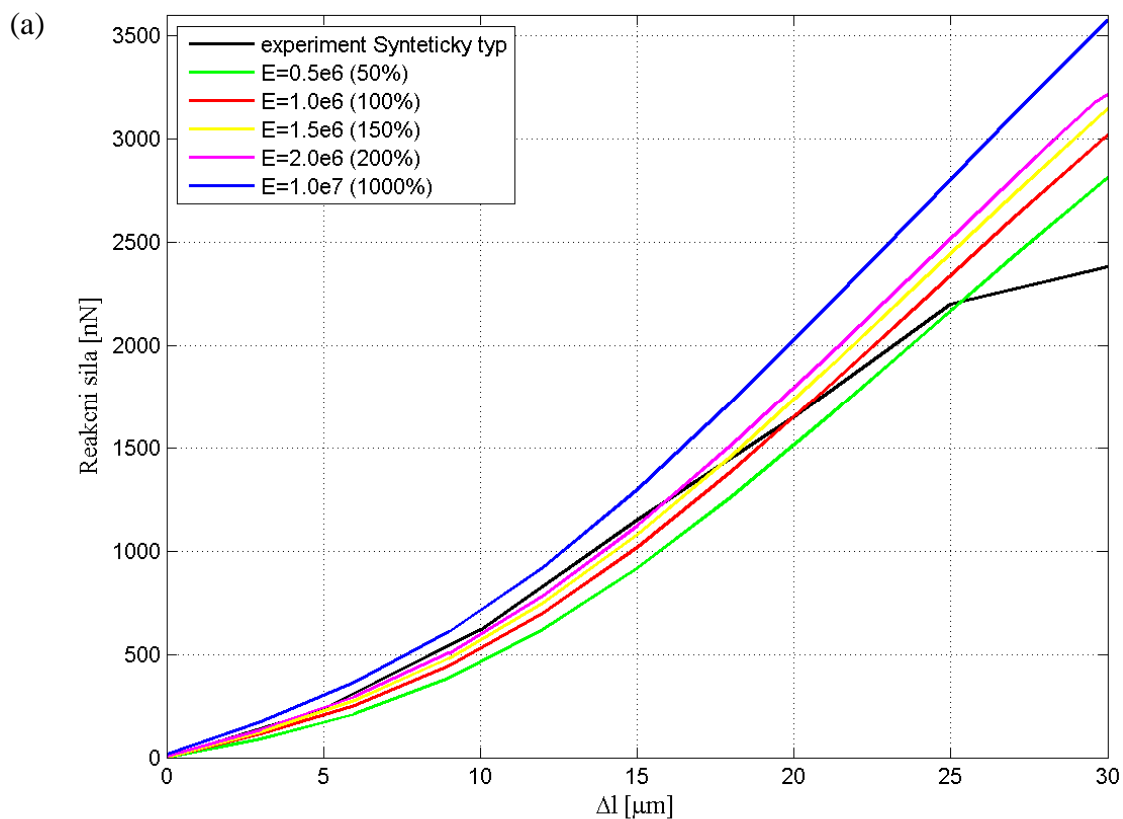


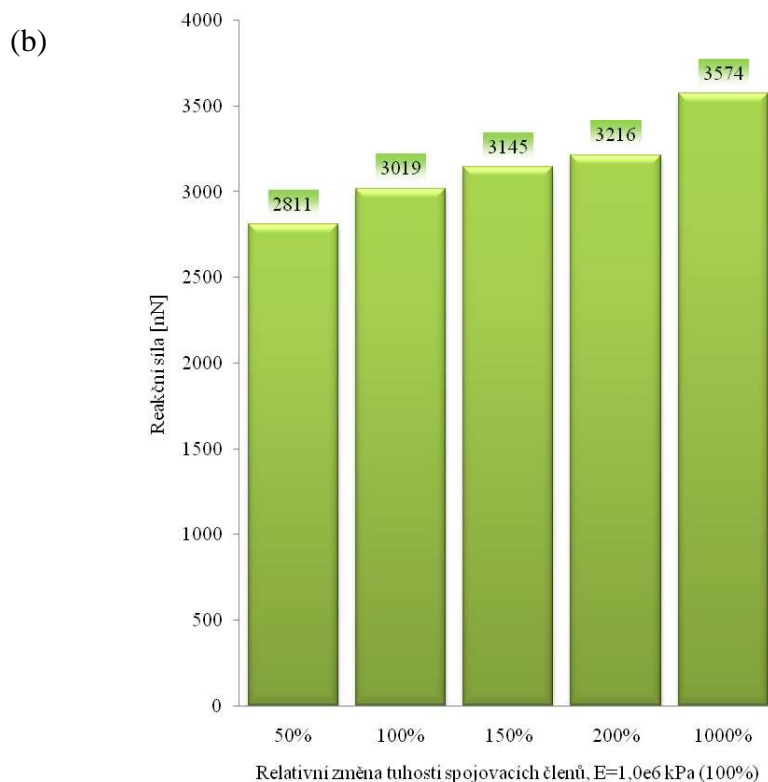
Obr. 101 Vliv změny tuhosti tahových členů na celkovou tuhost výpočtového modelu

Z obr. 101 je zřejmé, že při nižších hodnotách nebylo dosaženo konvergence řešení. Zvyšování modulu pružnosti způsobilo zvýšení reakční síly, nárůst však byl relativně mírný (zvýšení modulu pružnosti na desetinásobek způsobilo zvýšení reakční síly přibližně na dvojnásobek).

9.2.4.3 Analýza vlivu spojovacích členů

V této citlivostní analýze byl postupně měněn modul pružnosti spojovacích členů v mezích od 50% do 1000% původní hodnoty. Hodnota 100% odpovídá hodnotě v tab. 7, tj. $E = 1,0e6$ kPa.



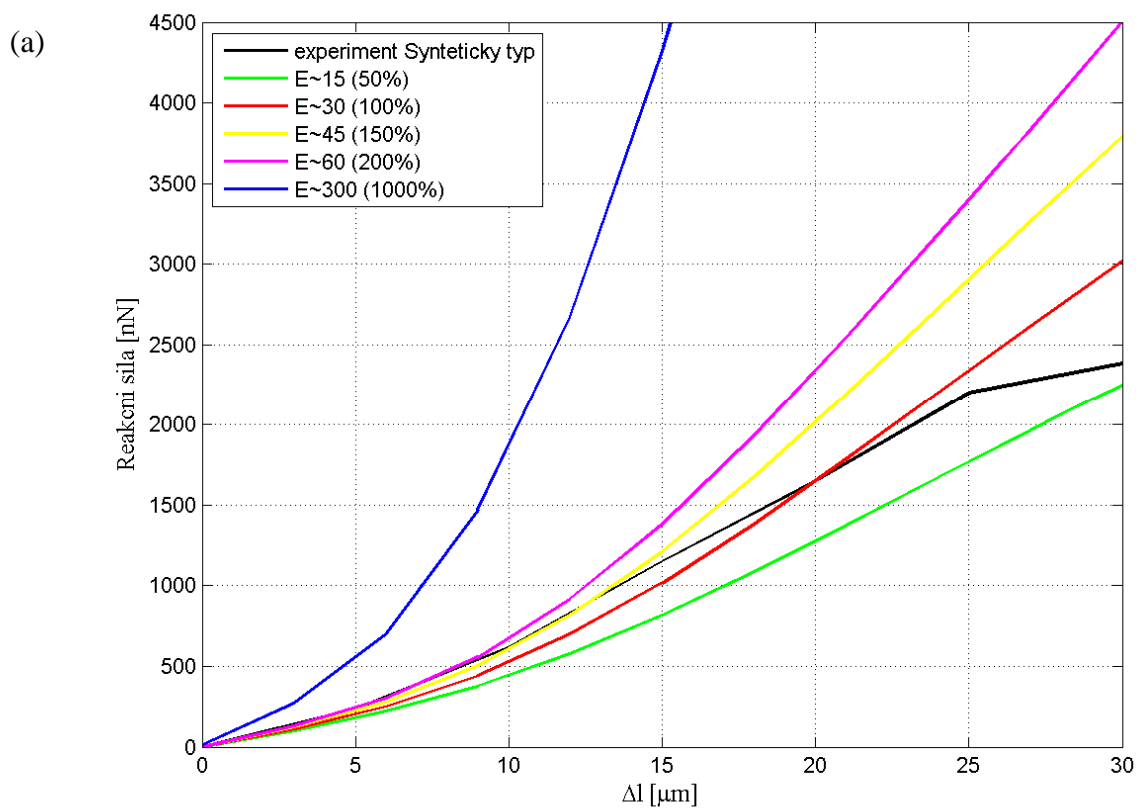


Obr. 102 Vliv změny tuhosti spojovacích členů na celkovou tuhost výpočtového modelu

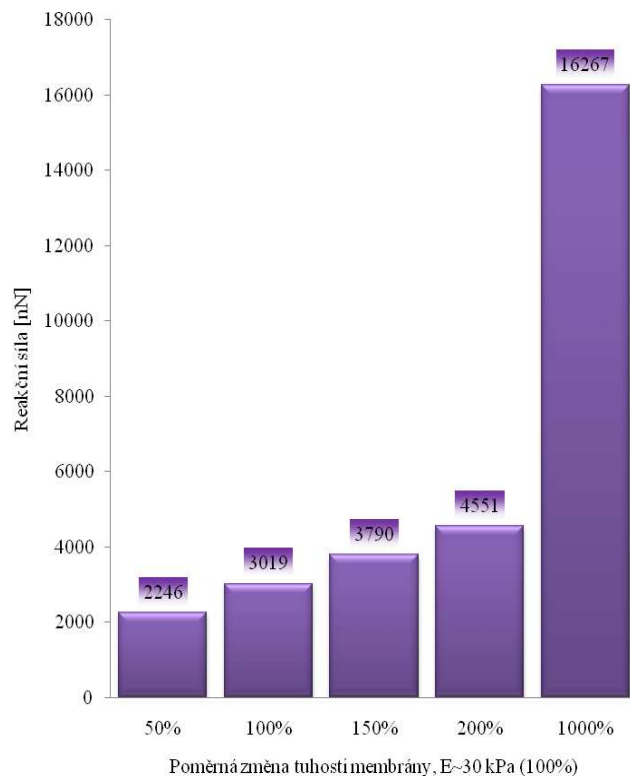
Zvyšování modulu pružnosti způsobilo zvýšení reakční síly, nárůst však byl relativně mírný (zvýšení modulu pružnosti na desetinásobek způsobilo zvýšení reakční síly přibližně o 20%).

9.2.4.4 Analýza vlivu membrány

V této citlivostní analýze byla postupně měněna tuhost membrány v mezích od 50% do 1000% původní hodnoty. Hodnota 100% odpovídá Mooney-Rivlinovým konstantám uvedených v tab. 8, tj. $E \sim 30$ kPa.



(b)

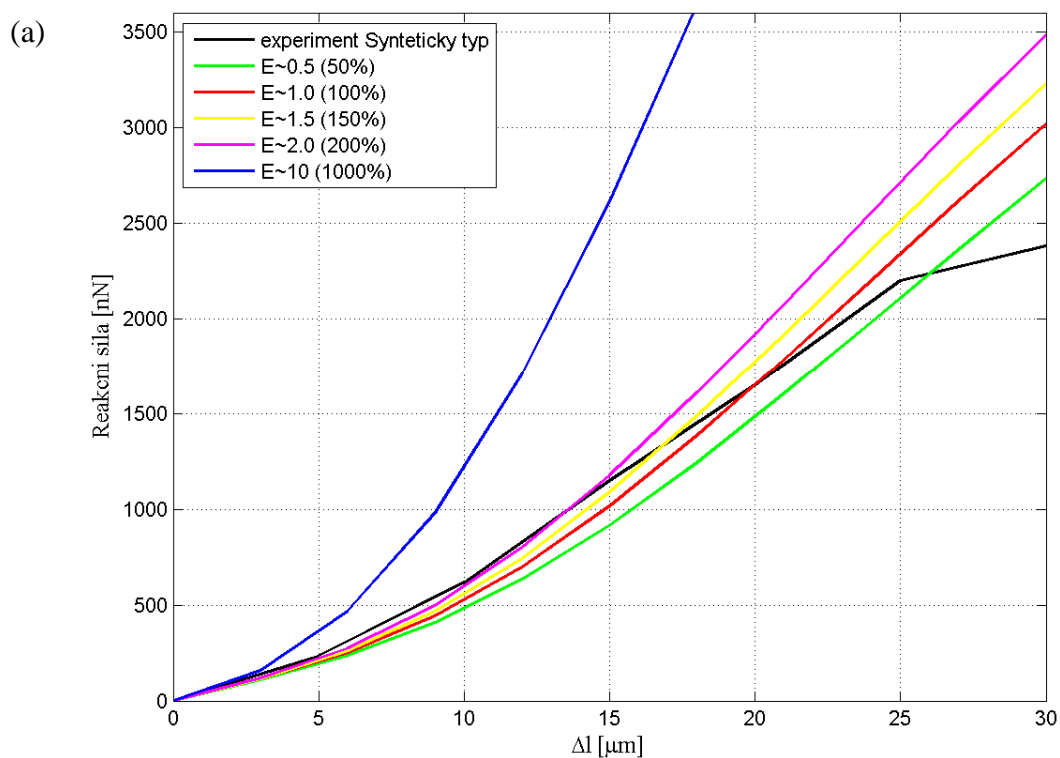


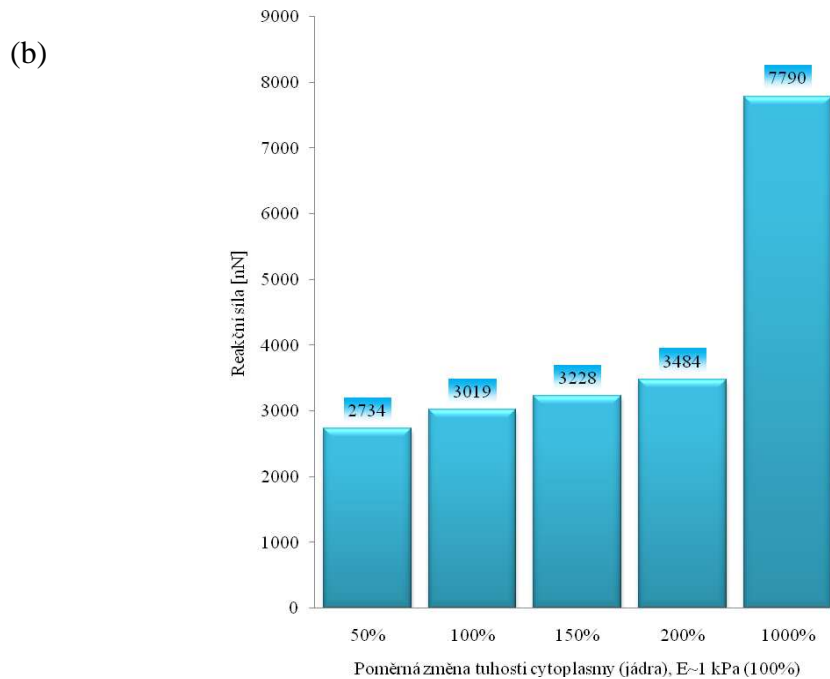
Obr. 103 Vliv změny tuhosti membrány na celkovou tuhost výpočtového modelu

Zvyšování modulu pružnosti způsobilo zvýšení reakční síly, nárůst byl nejvýraznější ze všech testovaných komponent. Zvýšení modulu pružnosti na desetinásobek způsobilo zvýšení reakční síly přibližně na 550%).

9.2.4.5 Analýza vlivu cytoplasmy a jádra

V této citlivostní analýze byla postupně měněna tuhost cytoplasmy a jádra v mezích od 50% do 1000% původní hodnoty. Hodnota 100% odpovídá Mooney-Rivlinovým konstantám uvedených v tab. 9, tj. $E \sim 1$ kPa.



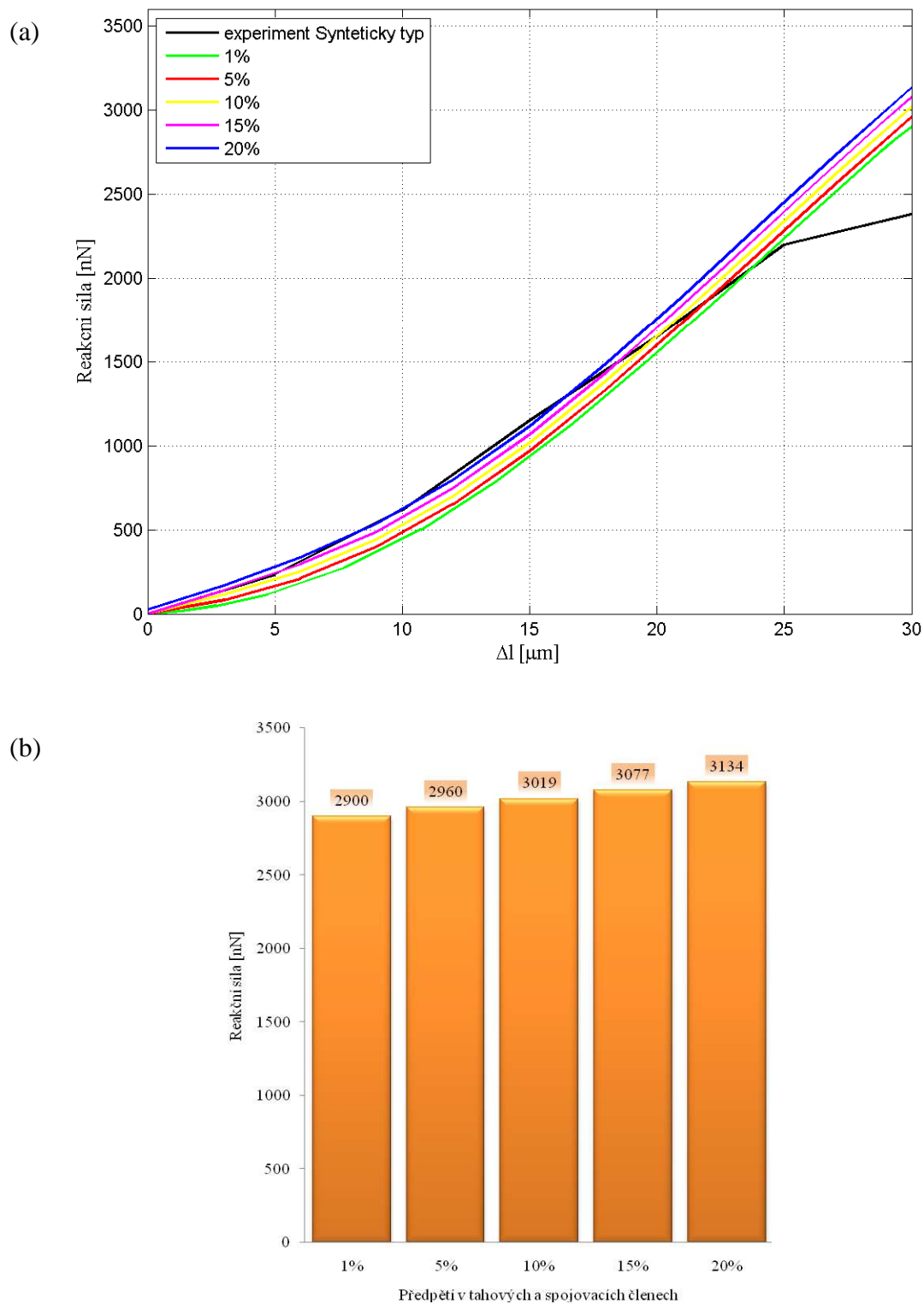


Obr. 104 Vliv změny tuhosti cytoplasmy a jádra na celkovou tuhost výpočtového modelu

Zvyšování modulu pružnosti způsobilo zvýšení reakční síly, nárůst byl druhý nejvýraznější ze všech testovaných komponent po membráně. Zvýšení modulu pružnosti na desetinásobek způsobilo zvýšení reakční síly přibližně na 260% výchozí hodnoty). Tento výrazný vliv na celkovou tuhost buňky je způsoben velkou tuhostí cytoplasmy oproti realitě. Při zadané nižší tuhosti do výpočtového modelu nebyla dosažena konvergence výpočtu.

9.2.4.6 Analýza vlivu předpětí

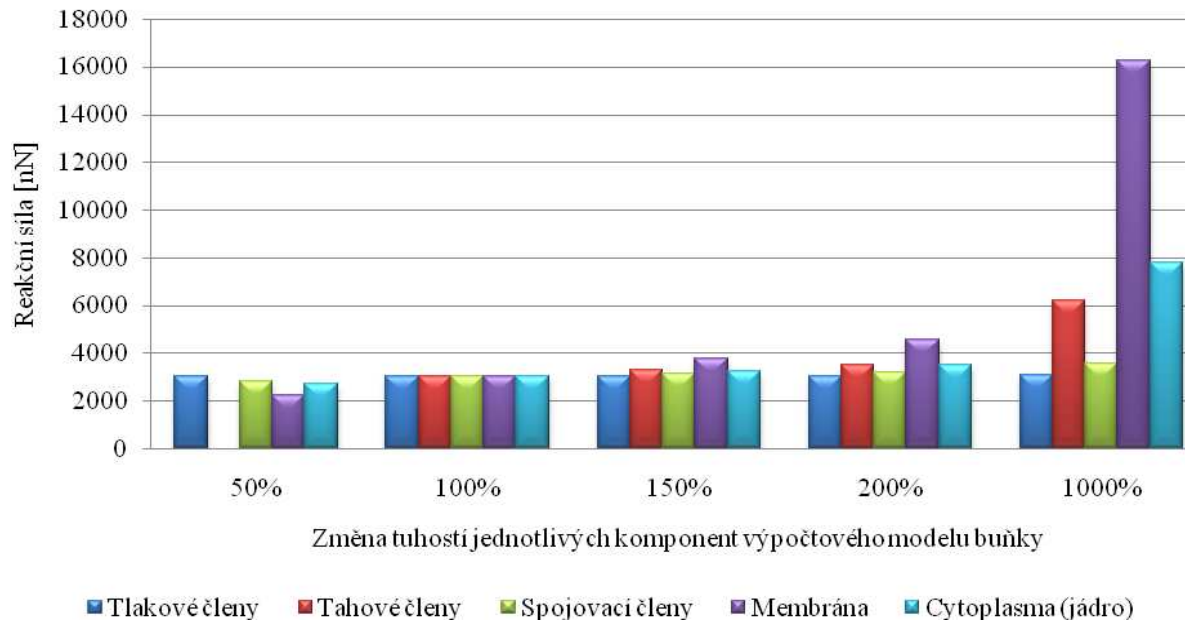
V této citlivostní analýze byla postupně měněna hodnota předpětí v tahových a spojovacích členech v rozmezí 1 – 20%. U simulace, která byla přibližně v souladu s experimentem (obr. 99 – síť č. 2), bylo v 1. kroku výpočtu nastaveno předpětí 10%.



Obr. 105 Vliv změny hodnoty předpětí na celkovou tuhost výpočtového modelu

Z obr. 105 je patrné, že změna předpětí v uvedeném rozsahu vyvolala odchylky maximální reakční síly menší než 5%.

Souhrn vlivu změn tuhostí jednotlivých komponent buňky na výslednou reakční sílu



Obr. 106 Vliv změn tuhosti jednotlivých komponent na celkovou tuhost modelu buňky

10 Závěr

Výpočtový model použitý v této práci byl strukturní, tzn. že zahrnoval z mechanického hlediska podstatné komponenty – membránu, cytoplasmu a jádro. Cytoplasma dále obsahovala cytoskelet, který byl modelován jako tensegritní struktura.

Výsledky výpočtové simulace tahové zkoušky hladké svalové buňky syntetického fenotypu jsou vyhodnocovány prostřednictvím závislosti celkové reakční síly v uzlech, které jsou v kontaktu s pohybující se mikropipetou, na délce natažení. Pro zvolené materiálové parametry bylo dosaženo dobré shody s experimentem. Byla provedena citlivostní analýza vlivu tuhosti jednotlivých komponent modelu buňky na silovou odezvu při výpočtové simulaci tahové zkoušky. V prvním kroku byly zvoleny elastické konstanty (pro tlakové členy, tahové členy a spojovací členy) a hyperelastické konstanty (pro membránu, cytoplasmu a jádro) tak, aby se výsledek výpočtové simulace přibližně shodoval s výsledky experimentu. Tyto hodnoty byly uvažovány jako hodnoty výchozí. Poté byly měněny moduly pružnosti jednotlivých komponent v rozsahu 50% - 200% a 1000% výchozí hodnoty a byl zkoumán vliv na výsledky simulace.

Celková tuhost výpočtového modelu je, pro stejné protažení, dána velikostí výsledné reakční síly. Čím větší výsledná reakční síla bude, tím bude model vykazovat vyšší tuhost.

Z citlivostní analýzy je zřejmé, že největší vliv (rozptyl křivek síla-protažení) na celkovou tuhost výpočtového modelu má změna modulu pružnosti u membrány. Zvýšení modulu pružnosti na desetinásobek způsobilo zvýšení reakční síly přibližně o 450%. Membrána sama o sobě tak vysokou tuhost v realitě nemá, ovšem ve výpočtovém modelu membrána v sobě zahrnuje i kortikální skelet, který je tvořen převážně aktinovými vlákny (tzv. stressová vlákna). Naopak nejmenší vliv na celkovou tuhost měly změny modulu pružnosti u tlakových členů. Ta vyvolala odchylky maximální reakční síly menší než 2%. Celkový přehled je ve sloupcovém grafu v předchozí kapitole (obr. 106). Při změně modulu pružnosti u tahových členů na 50% původní hodnoty nedošlo ke konvergenci výpočtu. Podstatný vliv cytoplasmy může být způsoben její vysokou tuhostí oproti realitě. Při testování nižší tuhosti cytoplasmy však rovněž nedošlo ke konvergenci výpočtu.

Pomocí další citlivostní analýzy byl zjišťován vliv velikosti předpětí (počátečního přetvoření) ve složkách cytoskeletu (tahové a spojovací členy) na velikost reakční síly v mikropipetách. Velikost předpětí cytoskeletu byla zadávána předepsáním počátečních přetvoření do tahových a spojovacích členů v rozsahu 1 – 20%. Z výsledků (obr. 105) vyplývá, že při zvětšujícím se počátečním přetvoření v cytoskeletu mírně vzrůstá celková tuhost buňky (odchylky maximální reakční síly byly menší než 5%).

Cílem budoucích prací by mělo být vytvoření takového výpočtového modelu, který:

- bude se stejnými materiálovými vlastnostmi simulovat více zkoušek (tedy s verifikací modelu jiným experimentem),
- bude mít jemnější síť, pomocí které bude snížena numerická chyba výpočtu,
- bude využívat 20 uzlový element solid 186,
- bude mít vnitřní tensegritní strukturu složenou z více členů,
- by zajistil při nižším modulu pružnosti cytoplasmy konvergenci výpočtu,
- bude modelovat přesnější topologii jednotlivých komponent v buňce,
- by do budoucna umožňoval výpočtově modelovat spojení dvou a více buněk.

Literatura

- [1] Janíček P., *Systémová encyklopedie vybraných oborů pro techniky*. CERM, 2007 (v tisku)
- [2] Lebiš R., *Výpočtové modelování mechanického chování buňky, pojednání k státní doktorské zkoušce*. FSI VUT Brno, 2006
- [3] Nečas O., Soška J., Šmarda J., *Obecná biologie*. Praha, 1975
- [4] Burša J., *Tensegrity structures and their application in models of cytoskeleton*. Proceedings of the International Conference Human Biomechanics 2006, Hrotovice, November 2006, pp.68-69.
- [5] Hayashi K., *Mechanics of Biological Tissue, Micromechanics, Cell and Matrix*, 2005
- [6] Venable R., *Structural and dynamic properties of lipid bilayer systems*, National Institutes of Health USA, November 2000
- [7] Janíček P., a kol., *Modelování v klinické biomechanice člověka – připravovaná publikace*
- [8] Ingber D.E.: Tensegrity I. *Cell structure and hierarchical systems biology*. J. of Cell Science, Vol. 116, No.7, pp. 1157-1173,2000
- [9] J. McGarry G., Prendergast P.J., *A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell*, European cells and Materials, 27-34, 2004
- [10] Lebiš R., Burša J., Hayashi K.: *Constitutive model of vascular smooth muscle cells determined using computational simulation*. Engineering Mechanics 2004, Svratka, CZ, May 2004
- [11] Miyazaki H, Hasegawa Y, Hayashi K. A newly designed tensile tester for cells and its application to fibroblasts. *Journal of Biomechanics*, Volume 33, Issue 1, Pages 97-104

Webové stránky

- [12] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Buňka>
- [13] <http://www.maxdorf.cz/maxdorf/ls.html>
- [14] <http://helix.nih.gov/research/rvenable.html>
- [15] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Organela>
- [16] http://www.cellnucleus.com/education_main.htm
- [17] http://cellbio.utmb.edu/curriculum/nuclear_envelope.htm#Pore
- [18] http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_pores
- [19] <http://npd.hgu.mrc.ac.uk/compartments/nucleolus.html>
- [20] <http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosome>
- [21] <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>

[22] http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/microtubule_structure.htm

[23] <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/rer1.htm>

[24] <http://www.intergate.com/~bobwb/ts/prospect/prospect.htm#sec:intro>

[25] http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/116/7/1157?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=ingber&andorexactfulltext=and&searchid=1131984873234_1515&stored_search=&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=1&journalcode=joces

Příloha

Na přiloženém médiu je nahrán výpočtový program, pomocí kterého je řešeno výpočtové modelování jednoosé tahové zkoušky buňky v programu ANSYS.