

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ И НАНОИНДЕНТИРОВАНИЯ

д. ф.м.-н. ¹Журавков М.А., ¹Романова Н.С., ¹Прохоров Н.А., ²Дрозд Е.С.

¹ Белорусский государственный университет, Минск

² Институт тепло- и массообмена имени А.В.Лыкова, Минск

Физико-механические свойства биоматериалов являются их важными фундаментальными характеристиками и определяют целый ряд цитофизиологических и цитопатологических процессов. Изучение механических эффективных свойств биоматериалов не только позволяет получать новые знания об их функционировании и жизнедеятельности, но и представляет несомненный клинический интерес.

У биологических материалов, в частности, биоклеток в процессе жизнедеятельности может изменяться структура и, соответственно, механические свойства. Вследствие этого биообъекты одного и того же типа имеют различные механические свойства в зависимости от фазы клеточного цикла, уровня клеточной активности и окружающей среды, а также целого ряда физико-химических факторов [1]. Такая особенность клеток затрудняет количественную оценку этих свойств, а также объясняет разброс значений их физико-механических параметров.

Поэтому *проблема разработки корректных математических моделей и аналитико-экспериментальных методов для оценки механических свойств биоматериалов является крайне актуальной*. На сегодня существует целый ряд подходов и технологий для изучения и оценки механических, в частности, упругих свойств биоматериалов, каждый из которых имеет определенные ограничения и недостатки.

Можно говорить о том, что сегодня уже сформировалась новая область исследований – **нанобиомеханика**, которая включает в себя изучение механики живых клеток и биомолекул и их связи с заболеваниями человека [2]. Среди недавно созданных приборов и экспериментальных методов измерения особое место занимает **атомно-силовая микроскопия (АСМ)** и разработанные на ее основе методы **клеточной эластографии**. В настоящее время, благодаря уникальным возможностям АСМ, стала доступна эластография отдельных клеток, представляющая несомненный интерес для понимания клеточной патологии, поскольку патогенные факторы, влияющие на метаболизм и структуру клеток, в целом ряде случаев изменяют и их цитомеханические свойства. Кроме того, определение локальных модулей упругости в биосредах открывает возможности для изучения экспериментальных воздействий на клетку, причем не только патогенных факторов, но и различных фармакологических препаратов.

1. О механических свойствах биологических клеток. Технологии и подходы к оценке механических свойств биологических клеток.

Оценочные значения для механических параметров биологической клетки лежат в очень широком диапазоне [3]. Очевидно, что эти значения помимо зависимости от типа клеток, их состояния и экспериментальных условий зависят от экспериментальных методов и/или от используемых теоретических моделей [4].

Механические свойства отдельной клетки определяются взаимосвязанными механическими свойствами клеточных компонент [5]. Но, все же механические свойства клетки главным образом определяются механическими свойствами клеточных оболочек, интегральных структур цитоскелета и ядра. Для оценки механических свойств клеток важно знать как интегральные (приведенные, эффективные) модули упругости, так и пространственное распределение по поверхности клетки локальных упругих модулей.

Современные *технологии определения механических характеристик* гетерогенных структур основываются на базовых подходах механики, физики, биологии, химии и других естественнонаучных дисциплин. Следует отметить, что, несмотря на существование большого числа методов оценки механических свойств клеток *универсального метода исследования деформируемости биоматериалов пока не существует*. При этом серьезной проблемой является несогласованность различных методов между собой, что объясняется различным вкладом клеточных компонентов в регистрируемый параметр.

В последние годы активно развиваются подходы, базирующиеся на использовании *методов атомно-силовой микроскопии*, интенсивное развитие которой позволило достичь уникальных научных результатов в различных областях физики и биологии, благодаря новым экспериментальным возможностям: нанометровое пространственное разрешение при анализе поверхности, неразрушающий характер исследований для широкого класса образцов и сред, возможность локальной оценки физико-механических свойств микро- и нанообъектов. Данные преимущества АСМ делают перспективным ее применение для изучения структуры и физико-механических свойств биоматериалов, например, клеток.

Цитомеханические свойства клеточных структур могут быть оценены как в статическом, так и динамическом режимах АСМ с использованием различных подходов. Методики, базирующиеся на использовании силовой спектроскопии атомно-силового микроскопа, позволяют определять значения локального модуля упругости исследуемого объекта в результате воздействия индентора (острия АСМ-зонда) на исследуемый материал в пределах площадки с минимальным размером вплоть до нескольких нанометров.

В то же время следует подчеркнуть, что изучение биологических объектов остается более сложной задачей по сравнению с аналогичными исследованиями поверхностных слоев твердых тел. Это связано с необходимостью специальной подготовки образцов клеток, оптимизации параметров измерений, а также достоверного интерпретирования экспериментальных результатов. Имеющиеся литературные данные о механических свойствах биологических клеток значительно различаются между собой, что вызвано отсутствием единообразия измерений, и, следовательно, затрудняет количественный анализ и сравнение результатов исследований. *Важнейшим условием установления однозначной связи между измеряемыми характеристиками деформирования исследуемых объектов и искомыми механическими свойствами является использование адекватных механико-математических моделей.*

Технологии определения механических характеристик различных наноструктур зачастую связаны с решением обратных задач механики. Вследствие характерных особенностей таких технологий, в частности механизма взаимодействия инденторов/штампов/зондов с изучаемыми материалами и структурами, построение механико-математических моделей для исследования соответствующих процессов базируется на использовании фундаментальных решений и/или решении контактных задач.

Очевидно, что если имеем дело с такими структурами, как биоматериалы, то рассмотрение их в приближении однородного изотропного деформируемого упругого тела в общем случае не является корректным. Таким образом, использование «классических» решений уже изначально вносит существенные погрешности в процедуру получения конечного результата. Вследствие этого *актуальным представляется выбор базовой теоретической модели поведения биоматериала, как можно более адекватно описывающей его реальное состояние.*

2. О механико-математических моделях как базисе при интерпретации экспериментальных исследований изучения деформационных свойств биологических клеток

Как отмечалось в предыдущих разделах, для успешного развития биомеханики клетки и эффективного прикладного использования этих знаний необходимо развивать и теоретические механико-математические модели для расширения и углубления знаний о процессах, происходящих на клеточном уровне.

Для описания механического состояния и поведения биоматериалов и биоструктур в первую очередь следует записать систему разрешающих уравнений, описывающих их состояние как объекта биомеханики. Одним из определяющих факторов данной системы являются уравнения механического поведения биоматериалов. В качестве моделей, описывающих состояние клетки, могут быть выбраны различные модели поведения среды.

На сегодняшний день наиболее активно в качестве моделей, описывающих механическое поведение биоматериалов (клеток), используются модели вязкоупругого поведения деформируемой среды. Так, например, в качестве теоретического базиса в технологиях определения физико-механических свойств биоструктур достаточно часто в качестве основополагающих соотношений для вязкоупругой ткани используются различные модификации модели Фойгта (Voigt). Вместе с тем, как отмечается в [6], выполненные рядом ученых исследования показали, что такие вязкоупругие модели имеют пределы применимости с точки зрения адекватности и точности описания динамических явлений при различных временных масштабах и/или в случае широкого спектрального интервала. Достаточно четко это проявляется в случае с биологическими тканями и клетками.

Одним из направлений «обхода» упомянутых здесь ограничений и погрешностей, касающихся «стандартных» механико-математических моделей, является *использование моделей дробного порядка в качестве базовых моделей поведения среды*. В общем случае процессы ползучести и релаксации для реальных неоднородных сред являются нелинейными как в пространстве, так и во времени. Поэтому, использование производных дробного порядка в уравнениях состояния вязкоупругих сред позволяет отобразить и учесть неоднородную структуру вязкого и упругого элементов и неоднородность механических процессов по времени.

Следует отметить, что основное уравнение поведения вязкоупругих материалов представляет собой, по-видимому, наиболее раннюю сферу приложений дробного исчисления в механике и на сегодня в этом направлении получено более всего достижений [7]. Во многих случаях вязкоупругое поведение естественных природных структур и современных гетерогенных материалов хорошо описывается моделями с производными порядка « α », значение которого находится в интервале между «0» и «1».

Уравнения движения для изотропной однородной вязкоупругой деформируемой среды в случае малых перемещений могут быть записаны в следующем виде:

$$(\lambda + \mu) \operatorname{grad} \operatorname{div} \bar{u} + \mu \Delta \bar{u} + \bar{F} = \rho \frac{\partial^2 \bar{u}}{\partial t^2}. \quad (1)$$

Для линейной вязкоупругой модели Фойгта временно-зависимые коэффициенты Ламе выражаются как

$$\lambda(t) = \lambda_0 + \lambda_1 \frac{\partial}{\partial t}, \quad \mu(t) = \mu_0 + \mu_1 \frac{\partial}{\partial t}, \quad (2)$$

где $\lambda_0, \lambda_1, \mu_0, \mu_1$ – соответственно, коэффициенты объемного сжатия, объемной вязкости, сдвиговой упругости и сдвиговой вязкости. В случае использования других вязкоупругих моделей выражение для коэффициентов Ламе имеют вид, отличный от приведенного.

Использование для многих материалов стандартной двухэлементной модели Фойгта сдвиговой вязкоупругости (μ_0, μ_1) не в полной мере позволяет выполнить модельное описание сдвигового динамического поведения материалов, соответствующее экспериментальным измерениям. Среди последних, например, разнообразные элементарные возбужденные волны от периодического или случайного источника, с частотой, значение которой находятся в широком диапазоне.

Вязкоупругость дробного порядка для механических характеристик материалов представляется единым структурным элементом «пружина в поршне» (springpot) и может быть определена следующим образом [8]:

$$\mu(t) = \mu_0 + \mu_1 \frac{\partial^\alpha}{\partial t^\alpha}, \quad 0 < \alpha \leq 1. \quad (3)$$

Уравнение (3) называют *моделью Фойгта дробного порядка* для $\alpha < 1$ [8].

Как отмечалось ранее, сегодня, для измерения локальной упругости на микронных и субмикронных масштабах наибольшее распространение получили две технологии: *атомно-силовая микроскопия* с использованием процедуры «силовой спектроскопии» и *наноиндентирование* с помощью специализированных приборов-наноинденторов.

Замечание. В отличие от наноиндентирования возможности АСМ позволяют не только оценить механические свойства образцов, но и одновременно получить изображения исследуемого объекта. При этом можно обеспечить контроль положения соприкасающегося с материалом зонда с нанометровой точностью.

Хотя технологическая реализация этих двух подходов значительно различается, но механические процессы и теоретический базис построения механико-математических моделей для описания процессов, являющихся основой данных технологий, один и тот же. С точки зрения механической интерпретации этих процессов – это задачи о контактном взаимодействии двух объектов и решение обратных задач механики по определению механических характеристик одного из взаимодействующих объектов. При моделировании процесса индентирования для описания механического поведения биологических тканей используются различные модели контактной механики, но наиболее часто все же применяются модели теории упругости при малых и конечных деформациях. Однако, несмотря на достижения в области приборостроения и развитие методов анализа, применение их для исследования мягких материалов по-прежнему затруднено в связи с весьма ограниченным количеством адаптированных для широкого практического использования нели-

нейных моделей контактной механики. Поэтому значимой проблемой, которую приходится решать при использовании как силовой спектроскопии, так и наноиндентирования, является выбор адекватной теоретической модели.

Следует отметить, что помимо использования фундаментальных решений существуют и другие методы для решения рассматриваемого класса задач.

Несмотря на существования различных подходов, до сих пор не существует теоретической модели, которая бы позволяла наиболее точно проводить расчет локального модуля упругости на основании данных силовой спектроскопии/наноиндентирования. Кроме того, использование различных расчетных моделей приводит к существенной вариабельности абсолютных значений модулей упругости клеток. Так, значения для одинаковых клеток, полученные в схожих экспериментах, но рассчитанные с использованием разных моделей, могут отличаться друг от друга более чем на порядок. Поэтому, вследствие того, что в случае малых деформаций большинство биоматериалов можно считать подчиняющимися закону линейной упругости, модели контактного деформирования и, в частности, модель Герца, по-прежнему чаще всего используются при анализе данных статической силовой спектроскопии и наноиндентирования, поскольку при этом не требуется подбора эмпирических параметров и для определения модуля упругости получаются простые выражения в явном виде.

При построении математической модели важным представляется введение начальных допущений о взаимодействии индентора с исследуемым объектом (основанием). При этом индентор рассматривается как внешнее силовое воздействие на основание. В этом случае математическое решение эффективно строить, используя фундаментальные решения. Существенными обстоятельствами, которые влияют на выбор/построение механико-математической модели, являются введение допущений о деформировании собственно индентора и принятие определенного закона поведения изучаемого материала [9].

Как известно, для неупругого тела принцип суперпозиции является неприемлемым. Следовательно, интегрирование распределенной нагрузки является в таком случае некорректным. Данное обстоятельство существенным образом влияет на правомерность использования фундаментальных решений однородной линейной теории упругости при рассмотрении контактных задач в биомеханике, вследствие явно неупругого и нелинейного поведения биоматериалов. Поэтому, *необходимы специальные технологии решения задач для материалов с неупругим или нелинейным поведением*. В качестве таковых могут быть использованы, например, следующие:

- построение решения, используя в качестве исходных определяющие уравнения для неоднородной теории упругости;
- построение специальных классов фундаментальных решений, отличных от классических;
- модификация определенным образом решений, построенных на основе подходов классической линейной теории упругости однородных тел.

В качестве примера рассмотрим один из возможных подходов к *модификации классического решения контактной задачи Герца*.

Как указывалось ранее, при описании контактного взаимодействия «индентор/зонд–образец» на сегодняшний день чаще всего используют модели, основанные на *классической теории Герца*, которая описывает взаимодействие контактирующих тел в рамках линейной упругости и в случае малых деформации [10]. Модель Герца описывает контакт сферических тел и предполагает, что материалы соприкасающихся тел однородны и изотропны, нагрузка вызывает в зоне контакта только упругие деформации, площадка контакта мала по сравнению с размерами контактирующих тел, а силы давления нормальны к поверхности соприкосновения (силами трения пренебрегают).

Учет реологических эффектов можно выполнить, воспользовавшись принципов Вольтерра [11, 12]. При этом изучаемый процесс рассматривается как подчиняющийся законам линейной вязкоупругости. В соответствии с принципом Вольтерра решение задач вязкоупругости можно построить, введя понятие «фиктивного» упругого решения и воспользовавшись затем решением задачи теории упругости, но уже для фиктивного упругого решения [11, 12].

На основании этого рассматриваем биоматериал как усредненная однородная структура с постоянным коэффициентом Пуассона ν , начальным модулем сдвига μ_0 , функцией сдвиговой релаксации $\mu(t)$, функцией сдвиговой ползучести $I(t)$. Между функцией релаксации $G(t)$ и функцией ползучести $I(t)$ существует функциональная связь, представляемая однородным интегральным уравнением

$$I(t) = G(0) + \int_0^t I(t-\tau) \dot{G}(\tau) d\tau = 1 (t \geq 0). \quad (4)$$

Фиктивные упругие перемещения u_i^y и деформации ε_{ij}^y вводятся следующим образом:

$$u_i^y(x, t) = u_i(x, t) + \frac{1}{G_0} \int_0^t \dot{G}(t-\tau) u_i(x, \tau) d\tau, \quad (5)$$

$$\varepsilon_{ij}^y(x, t) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i^y}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j^y}{\partial x_i} \right). \quad (6)$$

Аналогичным образом определяется величина $g_i^y(x, t)$, представляющая собой фиктивные граничные перемещения от истинных граничных перемещений $g_i(x, t)$ исследуемого тела:

$$g_i^y(x, t) = g_i(x, t) + \frac{1}{G_0} \int_0^t \dot{G}(t-\tau) g_i(x, \tau) d\tau. \quad (7)$$

Тогда функциональную связь между истинными напряжениями и фиктивными перемещениями принимает вид закона Гука для изотропного однородного тела:

$$\sigma_{ij} = 2G_0 \varepsilon_{ij}^y + \frac{2\nu}{1-2\nu} G_0 \sum_{k=1}^m \varepsilon_{kk}^y \delta_{ij}. \quad (8)$$

В итоге для фиктивных перемещений u_i^y , фиктивных деформаций ε_{ij}^y и истинных напряжений σ_{ij} имеет место квазистатическая упругая задача, причем уравнения Ламе относительно u_i^y принимают вид

$$\Delta u_i^y + \frac{1}{1-2\nu} \frac{\partial \theta^y}{\partial x_i} + \frac{X_i}{G_0} = 0, \quad (i = 1, \dots, m). \quad (9)$$

К уравнениям (9) можно применить процедуру построения разрешающих уравнений для задач теории упругости, учитывая, что под $\vec{u}(x)$ здесь подразумеваются фиктивные функции $\vec{u}^y(x)$, определяемые (5).

После решения вспомогательной упругой задачи и определения фиктивных перемещений $u_i^y(x, t)$ истинные перемещения находятся по формуле

$$u_i(x, t) = u_i^y(x, t) + \frac{1}{I_0} \int_0^t \dot{I}(t-\tau) u_i^y(x, \tau) d\tau. \quad (10)$$

Следует подчеркнуть, что получаемые в процессе решения вспомогательной упругой задачи напряжения являются истинными напряжениями исходной вязкоупругой задачи.

В соответствии с этим подходом **рассмотрим процедуру испытаний биоструктур в опытах с АСМ**. Пусть в моменты времени $t_i, i = \overline{1, N}$ выполнены измерения перемещений граничной поверхности биоструктуры $\delta_i(x, t), i = \overline{1, N}$ в зависимости от прикладываемого усилия $P_i, i = \overline{1, N}$.

Согласно (7) можно определить величину δ_i^y :

$$\delta_i^y(x, t) = \delta_i(x, t) + \frac{1}{G_0} \int_0^t \dot{G}(t-\tau) \delta_i(x, \tau) d\tau. \quad (11)$$

Используем решение Герца, учитывая, что в данном случае оно строится для фиктивных перемещений, т.е.

$$w^y(r=0) = \delta^y = \frac{P(1-\nu)}{4G_0 a}. \quad (12)$$

Так как в опытах с АСМ определяются истинные перемещения $\delta_i(x, t), i = \overline{1, N}$, тогда, согласно (11) и (12) имеем

$$\delta(t_i) + \frac{1}{G_0} \int_0^t \dot{G}(t-\tau) \delta(\tau) d\tau = \frac{P_i(1-\nu)}{4G_0 a}$$

В качестве функции релаксации в выполненных экспериментах были взяты следующие функции:

1. дробно-экспоненциальное ядро Работнова вида $\mu_\alpha(-1, t) = t^\alpha \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n t^{n(1+\alpha)}}{\Gamma_*(n+1)(1+\alpha)}$, являющееся

резольвентой ядра ползучести типа Абеля $I_\alpha(t) = \frac{t^\alpha}{\Gamma_*(1+\alpha)}$, ($-1 < \alpha < 0$);

2. экспоненциальное ядро релаксации вида $R(t) = Be^{-qt}$, являющееся резольвентой ядра ползучести $\Gamma(t) = Ae^{-pt}$, ($A > 0, p > 0$).

РЕЗЮМЕ

Рассмотрена комплексная задача восстановления механических свойств биологических структур как решение задачи обработки результатов экспериментальных данных при использовании технологий, основанных на контакте и внедрении индентора в образцы биотканей. Выполнен анализ механико-математических моделей, описывающих механические процессы, сопровождающие данные технологии. Показано, что повышение адекватности моделей реальным физическим процессам может быть обеспечено путем модификации моделей, в том числе на основе использования аппарата дробного исчисления.

Использование моделей поведения среды дробного порядка имеет большие практические применения в области медицинской диагностики состояния биотканей. Повышение точности модели может быть достигнуто путем уточнения моделей дробного порядка, например введением добавочных дробных элементов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аскадский, А.А. Деформация полимеров / А.А. Аскадский – М.: Химия, 1973. – 448с.
2. Свербиль, В.П. Эритроциты в сдвиговом потоке: механизмы деформируемости, методы измерений, медицинские применения / В.П. Свербиль, С.Д. Захаров // Сб. тр. XV Межд. конф., Пуцзино, 28 янв. – 2 февр. 2008 г. – М.: Ижевск, 2008. – Т.3 – С.123–130.
3. Measuring cell viscoelastic properties using a force-spectrometer: influence of protein-cytoplasm interactions / E. Canetta [et. al.] // Biorheology. – 2005. – Vol.42, С 5. – 321–333.
4. Atomic force microscopy probing of cell elasticity / T.G. Kuznetsova [et al.] // Micron. – 2007. – Vol. 38, С 8. – 824–833.
5. Starodubtseva, M.N. Mechanical properties of cells and ageing / M.N. Starodubtseva // Ageing Res. Rev. [Electronic resource]. – 2011. – Vol. 10, С. 1.
6. Bagley, R.L. On the fractional calculus model of viscoelastic behavior / R.L. Bagley, P.J. Torvik // Journal of Rheology. – 1986. – V.30. – PP.133–155.
7. Журавков, М.А. О перспективах использования теории дробного исчисления в механике / М.А. Журавков, Н.С. Романова // Минск: БГУ, 2013. – 53 с. 8. Schiessel, H. Generalized viscoelastic models: Their fractional equations with solutions / H. Schiessel et al. // J. of Ph. A: Math. and Gen. – 1995. – V.28. – PP.6567–6584.
9. Журавков, М.А. Фундаментальные решения теории упругости и некоторые их применения в геомеханике, механике грунтов и оснований. Курс лекций / М.А. Журавков // Минск: БГУ, 2008 – 247 с.
10. Ландау, Л.Д. Теоретическая физика: [учеб. пособие: в 10 т.] / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. – М.: Наука, 1973 – 1989. – Т.7 : Теория упругости. – 4-е изд., испр. и доп. – 1987 – 246 с.
11. Журавков, М.А. Механика сплошных сред. Теория упругости и пластичности: учеб./ М.А. Журавков, Э.И. Старовойтов. – Минск: БГУ, 2011 – 543 с.
12. Журавков, М.А. Математическое моделирование деформационных процессов в твердых деформируемых средах / М.А. Журавков // Мн.: БГУ, 2002 – 456с.

SUMMARY

Number of cytophysiological and cytopathological processes is defined by physical and mechanical properties of biomaterials (cells, tissue, bones and etc.). Fractional models of medium behaviour have a wide application in medical diagnostics of biotissue state. Complex recovery problem of mechanical properties of biological structures, which solution is based on Atomic Force Microscopy results are considered in this paper. One of the ways to improve an adequacy of mathematical models is their modification, including the use of fractional calculus, is presented.

Поступила в редакцию 25.09.2013