

## MOŽNOSTI POUŽITÍ NANOINDENTACE V BIOLOGII A MEDICÍNĚ

Reklamní článek firmy

**JIŘÍ NOHAVA**

*Anton Paar TriTec SA*

### Úvod

Anton Paar byl po mnoho let aktivní na poli mikro-mechanického testování biologických materiálů a biomateriálů. Po získání potřebných zkušeností při testování tvrdých biologických materiálů, jako jsou dentin nebo kosti jak v suchém, tak i kapalném prostředí, bylo dalším logickým krokem posun směrem k měkkým tkáním a materiálům. Stále vzrůstající potřeby znalosti mechanických vlastností v oblasti biologie a medicíny zejména v oblasti měkkých biologických a biokompatibilních materiálů iniciovaly vývoj metod a přístrojů pro lokalizované testování těchto typů materiálů. Jednou z těchto metod je i nanoindentace, která je dnes běžně používána pro měření tvrdosti a modulu pružnosti kovových, keramických polymerních a dalších materiálů. Nanoindentace umožňuje testování materiálů v poměrně malých objemech, což je velmi vhodné pro biologické materiály a biomateriály. Nicméně povaha biologických vzorků s velmi nízkou tuhostí (modul pružnosti ~10 MPa a méně) vyžadovala přístroj se specifickými vlastnostmi tak, aby bylo možné měřit i takto poddajné vzorky. Na základě zkušeností s nanoindentací byly společně s biology a bioinženýry stanoveny požadavky na nový přístroj a odpovídající nanoindentační techniku. No-



Obr. 1. Plně vybavený Bioindenter s řídicí jednotkou a temperační celou

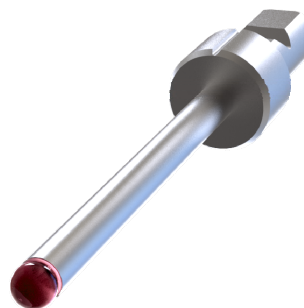
vý nanoindentační systém pro potřeby biologů resp. bioinženýrů by tedy měl splňovat následující podmínky:

- zátěžné síly v řádu desítek milinewtonů a méně s vysokým rozlišením,
- velký rozsah vertikálního posuvu pro měření velmi měkkých materiálů,
- možnost testování vzorků plně ponořených v tekutině,
- automatické procedury pro testování vzorků s nepravidelným tvarem a povrchem.

Navíc by mělo nové nanoindentační zařízení nabízet vizualizační funkce, vynikající tepelnou stabilitu, dostatečnou přesnost laterálního přenastavení pro lokalizované testy a volitelnou možnost temperace simulující biologické prostředí.

### Systém Bioindenteru

Nový bioindentační systém pod názvem Bioindenter byl vyvinutý ve spolupráci se specialisty v oblasti biologie z Life Sciences Division of the CSEM Laboratory (Switzerland). Tato spolupráce vedla k adaptaci a validaci nanoindentačních protokolů pro biologické vzorky. Bioindenter používá zatěžování pomocí piezoelektrického elementu v rozsahu ~0,01 mN až 20 mN s celkovým posunem indenteru 100  $\mu\text{m}$ . Tento přístroj byl vyvinut na základě úspěšného Ultra nanoindentačního systému (UNHT), ze kterého byly převzaty vynikající tepelná stabilita a vysoká citlivost pro měření časově závislých vlastností materiálů (tečení, poroelasticita, atd.). S ohledem na druhy testovaných materiálů byly vyvinuty speciální indentory s dlouhou upevňovací osou, aby bylo možné provádět měření ponořených vzorků a zároveň omezit kapilární efekty.



Obr. 2. Indentor s dlouhou osou pro bioindentační aplikace

Tyto indentory s dlouhým osou jsou k dispozici v různých geometriích. Nejčastěji používané geometrie jsou kulové (sférické) a válcové (tzv. flat punch). Aby bylo možné pracovat s biologickými vzorky, obsahuje Bioindentor speciálně připravený držák pro Petriho misky umožňující jednoduchý přenos a výměnu vzorků. K dispozici je volitelně i ohřev pro zajištění regulace teploty vzorků až do 50 °C. Motorizovaný XY stolek s přesností posuvu  $\pm 1 \mu\text{m}$  přináší možnost laterálního nastavení; motorizovaný Z stolek umožňuje automatické přiblížení a oddálení indentoru v průběhu testu. Mikroskop s objektivy s dlouhou pracovní vzdáleností a LED zdrojem umožňuje vynikající zobrazování vzorku. Na žádost lze dodat i tzv. *in-situ* zobrazovací mikroskop umístěný pod vzorkem k zajištění pozorování vzorku v průběhu experimentu.

### Bioindentační technika

Protokol měření pro nanoindentaci biologických vzorků (někdy též zmiňován pod názvem bioindentace) bere v úvahu nerovnoměrnost povrchu vzorku začleněním automatické procedury detekce povrchu v měřicí matici. Detekce povrchu zahrnutá do softwaru indentace je založena na změně tuhosti kontaktu za účelem eliminace falešných detekcí způsobených externími silami (kapilarita, atd.). Použití velkých sférických indentorů umožňuje bezpečnou detekci kontaktu také na extrémně měkkých vzorcích (hydrogely, chrupavky, scaffoldy) a zároveň přeměřuje povrch a strukturální nehomogenitu. Indentační hloubky, které lze u bioindentace pozorovat, se pohybují obvykle v rozsahu deseti až stovky mikrometrů a testují se tedy především části tkání spíše než jednotlivé buňky. Bioindentace tak nabízí informace o mechanických vlastnostech měkkých biologických materiálů a biomateriálů v řádu desítek až stovek mikrometrů, přičemž tato technika vyžaduje relativně malý počet experimentů. Bioindentor lze použít pro testování chrupavek, šlach, oční rohovky, scaffoldů, regenerace tkání, rostlin, mikro-tkáňové komprese, hydrogelů a elastomerů (Ebenstein and Pruitt, 2006; Oyen, 2010). Kromě modulu pružnosti lze Bioindentor využít i k určení tečení a poroelastických vlastností těchto materiálů (Hu et al., 2010; Kaufman et al., 2008; Menčík et al., 2009).

### Použití Bioindentoru

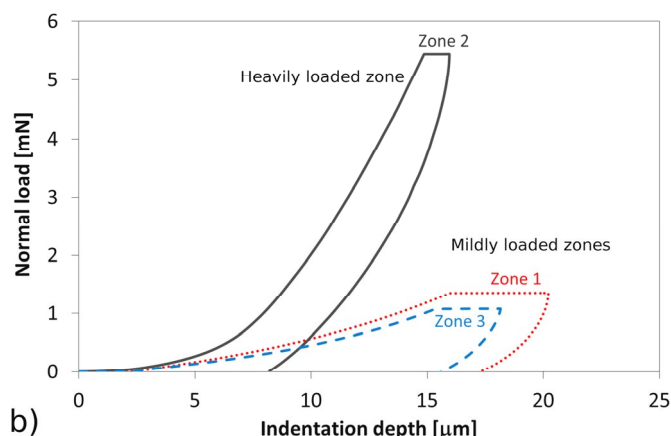
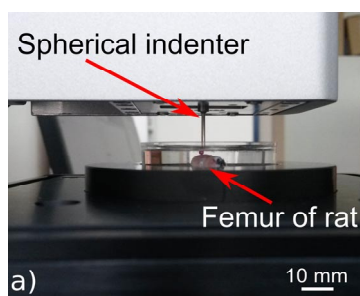
Použití tohoto přístroje je velmi široké. Mnohé lidské tkáně jsou vystaveny mechanické zátěži a jejich mechanická charakterizace může tudíž poskytnout cenné informace pro rozvoj chorob, léčbu a také vývoj umělých náhrad (implantáty, scaffoldy). Bioindentaci lze využít také pro diagnostiku chorob (funkce jater, artérií) a pro základní výzkum jejich léčení (Hu et al., 2012; Levental et al., 2010; Oyen, 2010). Tato technika nachází své uplatnění také ve stále více se rozvíjející oblasti biomimetického výzkumu, kde se vyžaduje přesná charakteristika strukturálních a mechanických vlastností tkání, za účelem vývoje

štěpovacích a transplantačních materiálů s vlastnostmi co možná nejvíc podobnými reálným tkáním. Mechanické vlastnosti získané pomocí Bioindentoru jsou úzce spojené s lokální strukturou materiálu a odhalují důležité informace o biomechanické odezvě tkáně.

Naprostou zásadní výhodou Bioindentoru je jeho schopnost měřit lokální mechanické vlastnosti biologických tkání za účelem porozumění jejich funkce při mechanickém zatěžování. To se provádí za účelem hledání potenciálních náhradních materiálů, jejichž vlastnosti by měly být co možná v největší shodě s nahrazovanými tkáněmi. Bioindentor je tedy unikátní nástroj testování jak skutečných tkání, tak jejich potenciálních náhradních materiálů.

### Chrupavka – osteoartritida

Osteoartritida je jedním z nejběžnějších onemocnění postihující přibližně polovinu světové populace. I přesto, že bylo v léčení tohoto onemocnění dosaženo nezanedbatelného pokroku, stále ještě plně nerozumíme různým mechanismům iniciace choroby, jejího šíření a také efektům léčby. Mnohé laboratoře proto provádí výzkum v oblasti charakterizace mechanických vlastností chrupavek v různých stádiích choroby společně s pochopením účinků různých léčebných postupů. Tyto experimenty jsou téměř výlučně prováděny na malých laboratorních zvířatech, tj. krysách nebo myších, poskytujících velmi malé vzorky s malými testovacími plochami. Použití Bioindentoru v této oblasti výzkumu přináší pro testy malých vzorků chrupavek odpovídající rozsah zatěžování a hloubky v kombinaci s vysokým laterálním rozlišením. Výsledky nanoindentačních testů se využívají ve vývoji a vyhodnocení léčby osteoartrity a při studiu různých efektů na její rozvoj. Jeden z hlavních úkolů vývoje spočívá v mapování mechanických vlastností chrupavek v souvislosti s úrovní zátěže aplikované na určitou oblast. Detailní studii byla podrobena kolenní chrupavka laboratorní krysy za účelem stanovení vlastností ve třech hlavních zónách: anteriorní zóna (1), posteriorní zóna (3) a svrchní zóna (2). Anteriorní a posteriorní zóny (1 a 3) jsou v průběhu života krysy zatěžované středně, zatímco svrchní zóna (2) podléhá během života vysoké mechanické zátěži. Výsledky měření Bioindentoru s kulovým hrotem na chrupavce zcela ponořené v kapalině ukazují, že vysoce zatěžovaná svrchní zóna 2 má nepoměrně vyšší modul elasticity a nižší creep než anteriorní a posteriorní zóny (1 a 3). Jedná se o velmi důležité zjištění, jelikož ukazuje na značnou heterogenitu chrupavky a závislost jejich vlastností na mechanickém zatěžování během života. Všechny indentace byly provedeny s maximální hloubkou 15  $\mu\text{m}$  (začátek periody výdrže). Rozdílná tuhost a tečení (creep) se odrazila v různých maximálních silách potřebných k dosažení hloubky 15  $\mu\text{m}$ . Více zatěžovaná svrchní zóna 2 má vyšší tuhost než méně zatěžované zóny 1 a 3. Zóny 1 a 3 také vykazují vyšší creep (díky toku kapaliny pod vlivem zatížení) než tužší zóna 2. Tento příklad ukazuje, že časově závislé vlastnosti jsou při charakterizaci biologických materiálů stejně tak



Obr. 3. Bioindenter v průběhu indentace kolenní chrupavky krysy (a) a indentační odezva chrupavky v zatěžované a méně zatěžované oblasti (b)

důležité jako charakterizace pružných vlastností (modul pružnosti).

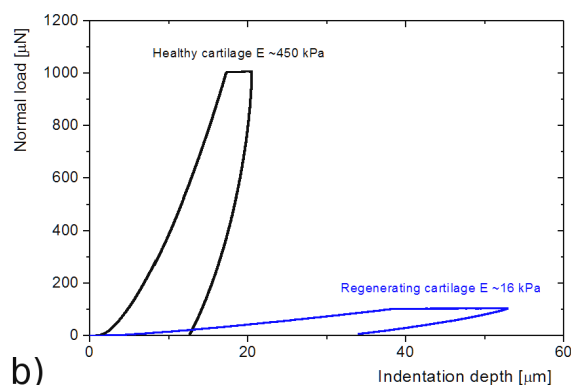
#### Regenerace tkání, scaffoldy

Bioindenter lze taktéž použít ke studiu stupně regenerace po úrazech chrupavky. Za tímto účelem bylo provedeno testování regeneračního procesu chrupavky po transplantaci scaffoldu do poranění kolenní chrupavky u kozy. Zvíře bylo obětováno tři měsíce po transplantátu a následovaly testy jak zdravé, tak i regenerující oblasti chrupavky. Měření provedená pomocí Bioindentoru ukázala, že zdravá a regenerující oblast chrupavky vykazují velké rozdíly v modulu pružnosti a tečení, resp. poroelasticitě. V tomto případě byla k dispozici relativně velká testovací oblast (~několik stovek mikrometrů), takže bylo možné z běžně prezentovaných lokálních změn tuhosti zdravé i regenerující chrupavky získat průměrné hodnoty. Příliš

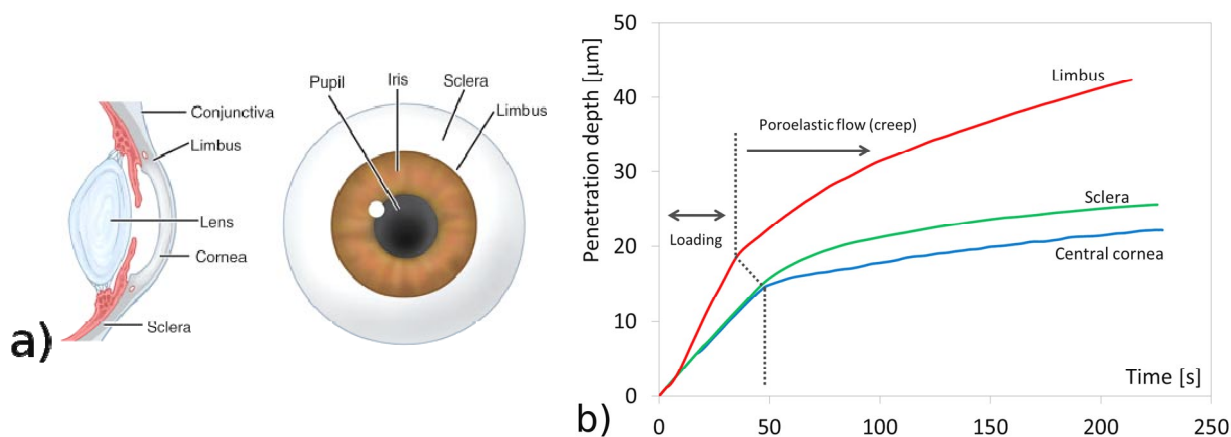
lokalizovaná měření (např. pomocí indentace Atomic Force Microscope) by vedla k velkému rozptýlení experimentálních výsledků a bylo by obtížné učinit závěry ohledně regeneračního procesu. Bioindentační měření ukázala, že regenerovaná chrupavka má významně vyšší tečení a více než desetinásobně nižší modul pružnosti než chrupavka zdravá. Je zřejmé, že regenerace chrupavky je ve velmi raném stádiu dokonce i po třech měsících po transplantaci.

#### Rohovka

Oční rohovka, bělmo a oblast mezi nimi (limbus) mají velmi důležitou roli pro dobrý zrak. Některá onemocnění nebo poškození rohovky mohou vést k částečné nebo celkové slepotě či k chronickým bolestem oka. Přežití a samo-regenerační schopnost limbálních kmenových buněk jsou silně závislé na biomechanických vlastnostech okolí, tj. oční rohovky, bělmo a oblast mezi nimi. Z toho důvodu je



Obr. 4. Bioindenter při indentaci kolenní chrupavky kozy (a), srovnání indentačních křivek obržených na zdravé a obnovující se chrupavce téhož laboratorního zvířete (indentace kulovým hrotem s poloměrem 0,5 mm) (b)



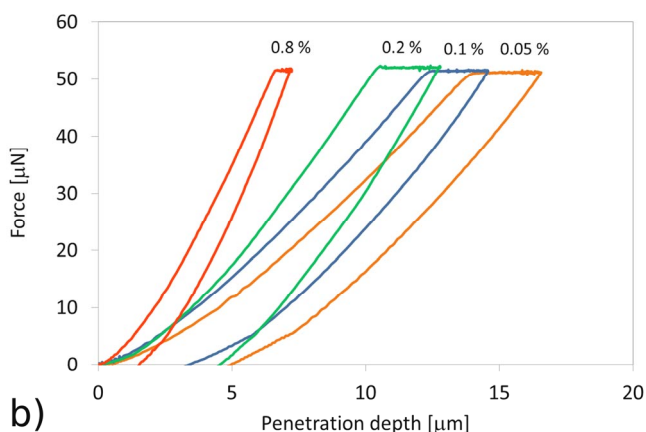
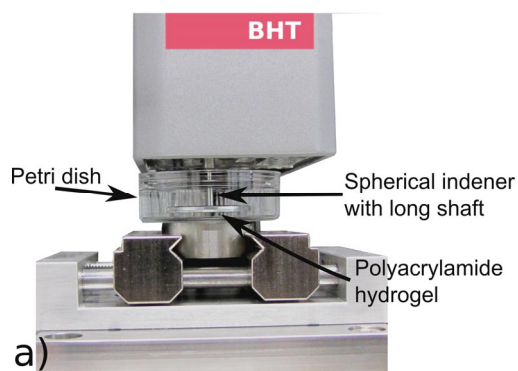
Obr. 5. Různé oblasti oka (a) a indentační hloubka versus doba pro tři různé části oka: bělmo (sclera), limbus a rohovka (cornea). Indentace byla prováděna se zátěží 0,05 mN a 180 vteřin výdrži při maximálním zatížení kulovým indentorem s poloměrem 0,5 mm. (b) srovnání indentační hloubky a úrovně creepu pro jednotlivé oblasti

velmi zajímavé měření modulu pružnosti a permeability limbusu, rohovky a bělma za účelem získání biomechanických vlastností těchto unikátních struktur oka. Některé léčebné postupy (jako např. UVA-crosslinking) mohou také ovlivnit tuhost a permeabilitu rohovky. Měření těchto změn je důležitý faktor pro indikaci účinnosti léčebných metod. Při našem výzkumu byl Bioindentor použitý k indentaci těchto tří rozdílných oblastí oka (oční rohovka, bělmo a limbus) za účelem zjištění modulu pružnosti a porovnání poroelastických vlastností (schopnosti toku kapaliny při mechanickém zatěžování) v těchto třech oblastech.

### Hydrogely

Hydrogely jsou velmi měkké materiály vhodné pro tkáňové inženýrství, které se používá v různých oblastech

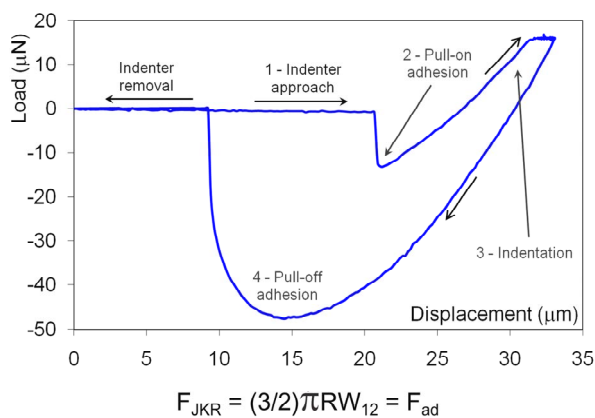
biologického a klinického výzkumu, např. kontroly osteoporózy nebo vnitřního krvácení. Mnohé hydrogely jsou považovány za potenciální náhrady tkání, jsou používány k regeneraci tkání pomocí scaffoldů nebo jako růstové substráty pro měkké tkáně v lidském těle. Nedávno bylo zjištěno, že modul pružnosti substrátů může významně ovlivnit tkáňovou homeostázu, jež hraje velmi důležitou roli v regeneračním procesu (Discher et al., 2005; Moers et al., 2013). Stanovení elastických a v širším měřítku i ostatních mechanických vlastností biologických substrátů má proto skutečně velký význam při vývoji nových tkáňových náhrad. Modul pružnosti a poroelastické vlastnosti lze studovat pomocí Bioindentoru díky jeho výborné stabilitě a kompatibilitě měření v kapalinách. Přístroj lze navíc používat v různých módech zatěžování (Nohava et al., 2014) a tedy testovat i časově závislou odezvu těchto velmi měkkých materiálů.



Obr. 6. Uspořádání Bioindentoru pro indentaci hydrogelů (a) a indentační křivky zátěž – indentační hloubka pro polyakrylamidový hydrogel o různých koncentracích (0,05 mN maximální zátěž, 100 sekund výdrž, kulový indentor s poloměrem = 0,5 mm) (b)

## Adheze – elastomery a gely

Bioindentační měření je možné použít nejen k indentaci biologických materiálů, ale také k vyšetřování různých elastomerů, gelů a hydrogelů, které není nutné měřit ponořené v kapalině. Takové materiály mohou často vykazovat velmi elastické vlastnosti a silnou adhezi (Kohn a Ebenstein, 2013). Tyto jevy lze studovat pomocí Bioindentoru a jeho schopnosti pracovat s velmi malými silami působícími na hrot v průběhu testu při jeho aplikaci na povrch materiálu. Jakmile se indenter dostatečně přiblíží k povrchu, v důsledku adheze se objeví negativní normálová síla. Při odtěžování také dochází k poměrně velkým negativním silám v důsledku adheze mezi indentorem a povrchem materiálu. Přístroj obě tyto události zaznamenává během indentačního procesu a posléze je lze použít k výpočtu adhezivní síly nebo povrchové energie.



Obr. 7. Měření adheze na při kulové indentaci na elastomeru spolu s rovnicí pro výpočet povrchové energie na základě modelu Johnson, Kendall, Roberts (Menčík, 2012), kde  $W_{12}$  je povrchová energie,  $F_{ad}$  ( $=F_{JKR}$ ) je adhezivní síla v inflexním bodě a  $R$  je poloměr kulového indentoru

## Závěr

Nanoindentace měkkých biologických tkání (bioindentace) je rozvíjející se oblast s mnoha specifiky vyžadující nové experimentální a analytické přístupy. Ačkoliv se jedná o poměrně novou metodu, je zřejmé, že si již našla své místo v mnoha laboratořích po celém světě a slouží jak k vývoji klinické léčby, tak základnímu biomechanickému výzkumu. Za účelem velmi citlivé indentace měkkých tkání a biomateriálů vyvinul Anton Paar nový nanoindentační přístroj s názvem Bioindenter. Tento přístroj nabízí unikátní schopnost lokální charakterizace bio-

logických materiálů ke studiu jejich mechanických vlastností a odezvy na mechanické zatěžování. Velkou výhodou Bioindentoru je také možnost měření časově závislých vlastností spojených s tokem kapaliny ve tkáních, což je velmi důležité pro porozumění celkové funkce mnoha druhů měkkých tkání. Bioindenter tak může významně přispět k výzkumu mechanických vlastností biologických materiálů a biomateriálů a tím i k vývoji nových léčebných postupů.

## LITERATURA

1. Discher D. E., Janmey P., Wang Y.: *Science* 310, 1139 (2005).
  2. Ebenstein D. M., Pruitt L. A.: *Nano Today* 1, 26 (2006).
  3. Hu Y., You J.-O., Auguste D. T., Suo Z., Vlassak J. J.: *J. Mater. Res.* 27, 152 (2012).
  4. Hu Y., Zhao X., Vlassak J. J., Suo Z.: *Appl. Phys. Lett.* 96, 121904 (2010).
  5. Kaufman J. D., Miller G. J., Morgan E. F., Klapperich C. M.: *J. Mater. Res.* 23, 1472 (2008).
  6. Kohn J. C., Ebenstein D. M.: *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 20, 316 (2013).
  7. Levental I., Levental K. R., Klein E. A., Assoian R., Miller R. T., Wells R. G., Janmey P. A.: *J. Phys. Condens. Matter* 22, 194120 (2010).
  8. Menčík J.: *Chem. Listy* 106, 481 (2012).
  9. Menčík J., He L. H., Swain M. V.: *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2, 318 (2009).
  10. Moers K., Steinberg T., Schlunck G., Reinhard T., Tomakidi P., Eberwein P.: *Exp. Cell Res.* 319, 1889 (2013).
  11. Nohava J., Swain M., Eberwein P.: *Key Eng. Mater.* 606, 121 (2014).
- Oyen M. L.: *Handbook of Nanoindentation: With Biological Applications*, 1. vyd. Pan Stanford Publishing, 2010.

**J. Nohava (Anton Paar in Peseux, Switzerland):  
Applications of Nanoindentation in Biology and Medicine**

This work summarizes recent measurements with the new Bioindenter device in the field of soft biological tissues and biomaterials. First, the bioindentation technique is briefly described with its specificities and the main requirements on the instrumentation. In the second part, the main applications of this novel technique using the Bioindenter nanoindentation system are presented. These represent an overview of measurements on cartilage, cornea, hydrogels and regenerating tissue.