

Індентування біологічних тканин та м'яких матеріалів, використовуючи біоіндетери

Що таке техніка інструментального навантаження?

Техніка інструментального навантаження (ТІН) була доступною протягом останніх двадцяти-тридцяти років для вимірювань локальних механічних властивостей твердих і пружних матеріалів, а зокрема тонких плівок. ТІН інтенсивно використовувалась для тестування твердих матеріалів, включаючи такі біологічні матеріали як дентин чи тканини кісток, за різних умов вологості. За цей час біологія і біоінженерія продовжувала розвиватися і сьогодні знання локальних механічних властивостей нових типів біологічних матеріалів, в тому числі і м'яких біоматеріалів, є необхідними у багатьох галузях. Ось чому природно, що наступним кроком стало використання ТІН для дослідження м'яких та надм'яких матеріалів і тканин.

Однак, навантаження м'яких матеріалів призводить до деяких важливих проблем, пов'язаних з природою цих зразків і умовами випробовувань:

- Дуже м'які (дуже піддатливі) матеріали;
- Постійне занурення у рідину;
- Процедури автоматичного сканування поверхні на зразках з нерівною поверхнею.

Просторова характеристика вимагає додаткової, придатної для використання латеральної системи реопозиціонування та оптичного мікроскопа. Загальнозастосовна процедура для навантаження таких матеріалів передбачає використання сферичного індентора (рис.1), невеликих сил (діапазоном від мкН до мН) та великі глибини проникнення (десятки мікрон). Прилад повинен мати гарну термостійкість, оскільки поведінка багатьох матеріалів під дією температури може змінюватися у часі (поперечно-пружна, див. мал. 2). Для типового вимірювання на хрящі використовується сферичний індентор з радіусом 500 мкм, максимальним навантаженням 5 мН, часом навантаження 10 секунд, періодом навантаженням 30 секунд і тривалістю розвантаження 10 секунд.

Які основні типи м'яких матеріалів?

Основними типами м'яких біоматеріалів (як людського, так і тваринного походження) є хрящ (здоровий чи хворий), рогівка (здорова, чи та, що потребує лікування), сухожилля та печінка. Прикладами штучно створених м'яких матеріалів є гідрогелі, які використовуються як середовище для росту клітин або підмостки, різні типи каркасів (біорозчинні) та мікросфери. Застосування навантаження не обмежується лише біоматеріалами, а включає багато типів інших матеріалів, таких як липкі плівки (ОЧК- оптично чистий клей), еластомери з або без функціонального покриття (Au) та фольгу з гіалуронової кислоти.

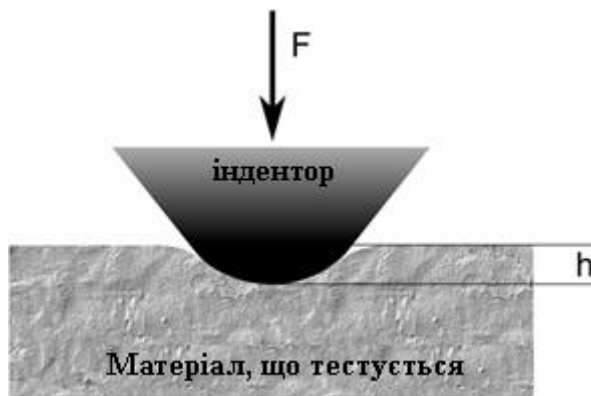


Рис.1. Приклад навантаження сферичного типу.

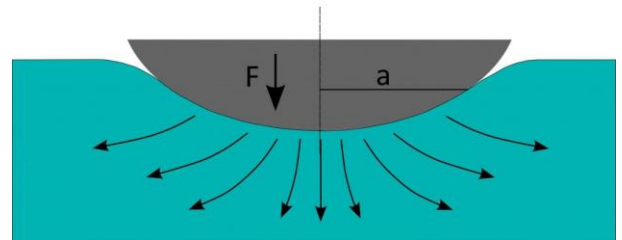


Рис. 2. Сферичне навантаження з ілюстрацією потоку рідини під час локального стиснення.

Чому нас цікавить дослідження навантажень м'яких матеріалів?

Найбільшою перевагою ТІН є здатність характеризувати локальні механічні властивості біологічних тканин на масштабах клітинних шарів (декількох) для розуміння їх механічної поведінки. Часто це робиться для пошуку потенційних заміників матеріалів, чиї властивості і поведінка були б схожими на заміщені тканини. Існує багато причин, чому може знадобитися локальне дослідження механічних властивостей м'яких біологічних тканин і біоматеріалів. Ось перелік основних:

- багато біологічних тканин піддаються механічному навантаженню і їх механічна характеристика може допомогти у розробці еквівалентних штучних тканин;

- зміни механічних властивостей часто пов'язані з хворобами інших тканин і тому можуть надавати інформацію про розвиток захворювання та наслідки лікування;

- режими харчування, як відомо, можуть впливати на деякі види хрящів і призводити до змін їх механічних властивостей;

- як відомо, клітини можуть «відчувати» жорсткість оточуючих матеріалів, таким чином розрізняти їх і рости у якомусь переважному напрямі. Особливий інтерес представляє характеристика механічних властивостей гідрогелів, які використовуються для клітинних культур. Завдяки своєму локальному характеру ТІН легко може дослідити малі ділянки в хрящі, які було уражено, і оцінити рівень регенерації на різних рівнях.

- ТІН також використовується у біометричних дослідженнях, для яких структура і механічні властивості тканин повинні бути детально характеризовані для розробки трансплантатних матеріалів, властивості яких будуть якомога ближчими до реальних тканин.

Що ми отримуємо з дослідження навантаження біологічних матеріалів та біоматеріалів?

Для будь-якого механічного вимірювання важливим є метод аналізу результатів. Bioindenter – програмне забезпечення, яке дотримується стандарту ISO14577 і автоматично розраховує параметри навантаження, включно з модулем пружності, твердістю, текучістю, часом релаксації та роботою навантаження. Однак, на додаток до загальноновживаного методу для розрахунків твердості та пружності (заснованому на підході Олівера та Фарра), програмне забезпечення

Bioindenter може розраховувати модуль пружності, базуючись на моделі Герца, що більше підходить для біологічних матеріалів, ніж стандарт ISO14577.

Розрахунки за моделлю Герца виконуються на частині кривої навантаження (підхід Олівера і Фарра виконується на кривій розвантаження, див. рис.3: Схематична ілюстрація розрахунків за стандартом ISO14577 для модуля пружності і твердості на кривій навантаження при зменшенні навантаження (розвантаженні зразка). h_p – постійна глибина занурення індентору після закінчення дії сили, h_r – це точка дотику (перетин дотичної до кривої навантаження з віссю X), S – нахил кривої розвантаження). Інші типи аналізу (розрахунки проникності, тощо) легко виконуються на даних, експортованих у форматі ASCII з програмного забезпечення для навантаження.

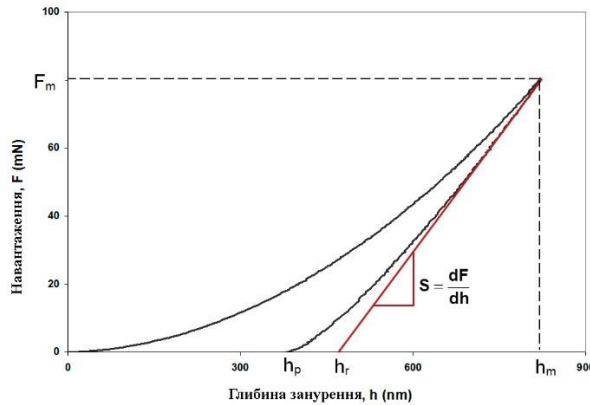


Рис. 3

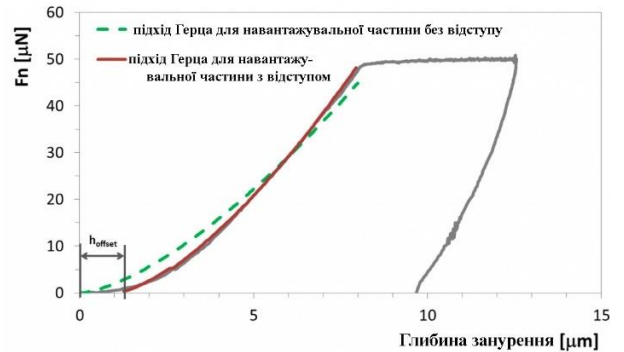


Рис.4 Схематичне зображення підходу Герца до навантажувальної частини кривої індентування.

Зменшений модуль пружності розраховується за рівнянням 1.

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi} \cdot S}{2\beta \sqrt{A_p(h_c)}} - \text{рівняння 1.}$$

Де S – нахил кривої розвантаження,

β - коригуючий коефіцієнт,

A_p – площа контакту на глибині занурення.

Модуль пружності зразка E_{IT} отримується з рівняння 2.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_s^2}{E_{IT}} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} - \text{рівняння 2,}$$

де індекси s та i відповідають зразку та індентору, відповідно. Твердість H_{IT} розраховується за як сила поділена на площу контакту за рівнянням 3.

$$H_{IT} = \frac{E_{IT}}{A_p(h_c)} - \text{рівняння 3.}$$

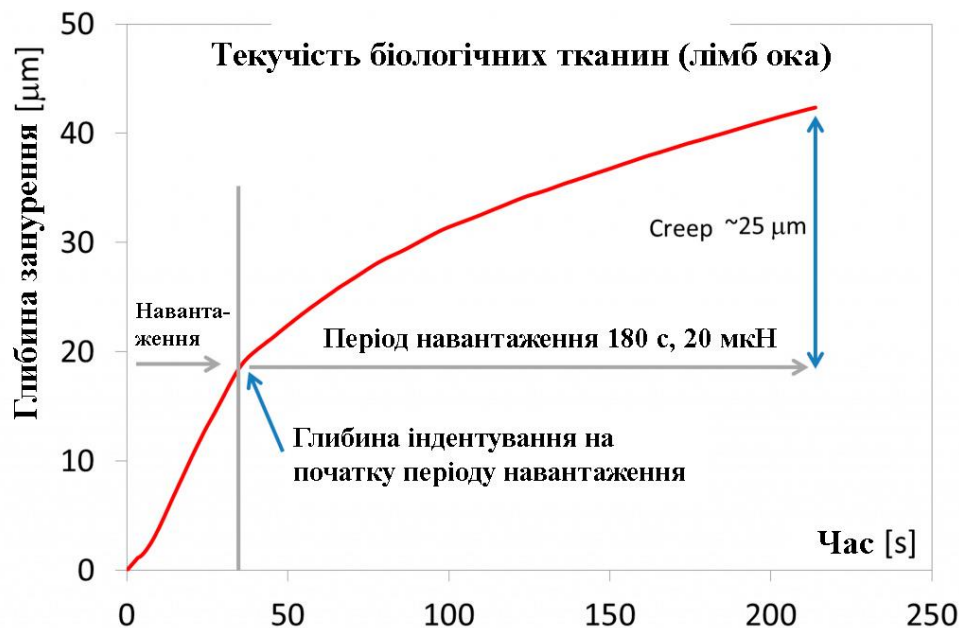
Підхід Герца для навантажувальної частини кривої навантаження виконується згідно з мал. 4, а розрахунок модуля пружності здійснюється, використовуючи рівняння 4. Це рівняння включає h_{offset} , яке враховує початковий етап контакту, коли можуть бути присутніми деякі м'які шари (епітелій) чи сміття. Підхід Герца, відповідно до рис.4, виконується на навантажувальній частині кривої інденування, яка і відображає матеріал.

$$F = \frac{4}{3} E_r \sqrt{R} (h - h_{offset})^{\frac{3}{2}} - \text{Рівняння 4}$$

Додаткові властивості, такі як текучість або час релаксації, також можна отримати з кривої навантаження (інденування), а саме з ділянки, де діє стала сила (рис.5). Найпростіша формула для текучості представлена рівнянням 5:

$$C_I T = \frac{h_m - h_i}{h_i} - \text{рівняння 5, де } h_m - \text{глибина в кінці періоду дії сили, } h_i - \text{на початку.}$$

Вимірювання текучості.



Більш детальну інформацію про в'язкопружні властивості див. у Свейна^[8-10]

Приклади вимірювань на біологічних матеріалах та біоматеріалах.

Після декількох років використання Bioindenter для навантажень м'яких матеріалів було виділено найбільш цікаві області для застосування. Вони включають :

Хрящі

Остеоартрит – одне з найпоширеніших захворювань суглобів, на яке страждають близько 50 відсотків населення Землі. Незважаючи на певний прогрес у його лікуванні, необхідні значні знання для розуміння різних механізмів, які спричиняють захворювання, наслідків харчування, прогресування захворювання та його лікування.

Такі дослідження на даний час проводяться в багатьох лабораторіях і одна з найпопулярніших тем також стосується механічних властивостей хряща. Більшість цих експериментів проводяться на лабораторних тваринах, на щурах або мишах. Перший етап досліджень був зосереджений на картографії жорсткості хряща у місцях, що піддаються різному навантаженню під час щоденного руху (див. на рис. 6 експериментальне устаткування, та на рис.7 типові криві навантаження). Ці результати досліджень навантажень допомагають у розробці та аналізі лікування остеоартриту.

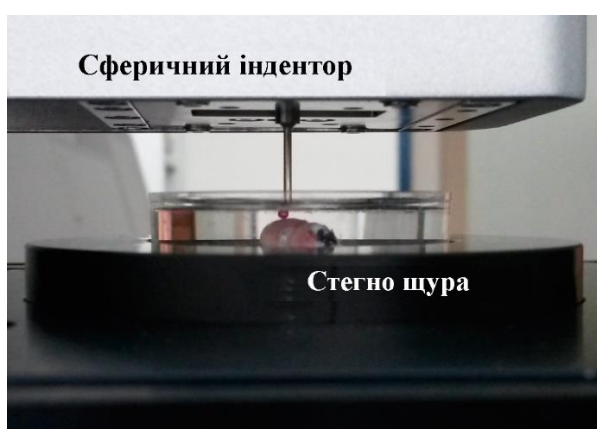


Рис. 6. Експериментальна установка для навантаження хрящів щурів.

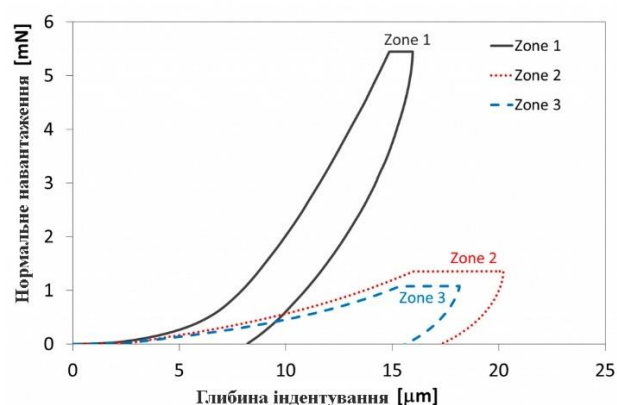


Рис.7. Типові криві навантаження з трьох різних областей стегового хряща щура.

Регенерація тканин

З розвитком каркасів для регенерації тканин, а також зі збільшенням 3D друку каркасів проводилися дослідження для розуміння процесів реконструкції нового хряща. Дослідження, проведені AntonPaarTriTес, зосереджувались на еволюції відновлення хряща після завданих ушкоджень (діаметр ушкодження становив близько 2 мм) на стегні козла.

Вимірювання навантаження показали, що у здорового хряща і того, що відновлюється, виявляються великі відмінності як у модулі пружності, так і у текучості. Завдяки достатній роздільній здатності за допомогою навантаження можна легко виміряти жорсткість (тобто модуль пружності) здорового хряща та того, що відновлюється (рис.8, рис. 9).

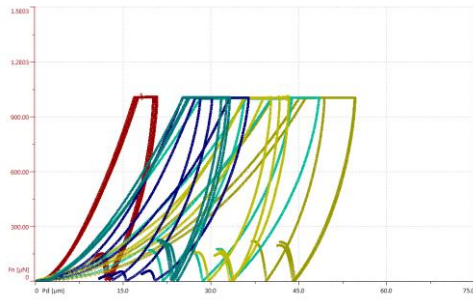


Рис. 8. Криві навантаження, отримані для здорового хряща

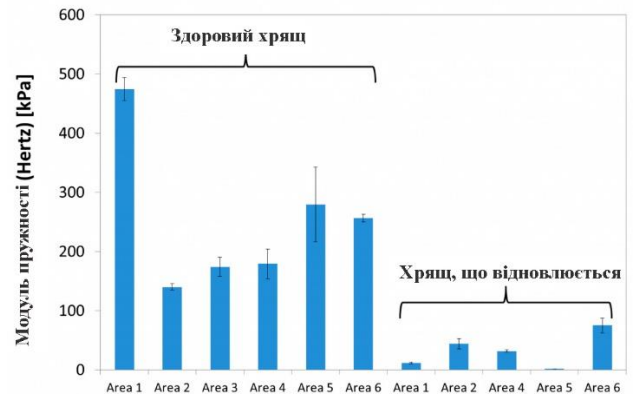


Рис.9. Порівняння модуля пружності здорового хряща та хряща, що відновлюється

Рогівка

Рогівка, склера та корнеосклеральна оболонка між ними – області ока, які відповідають за чіткий зір. Деякі захворювання або травми рогівки можуть призвести до часткової або повної втрати зору або до постійного болю у очах. Лікування таких випадків може відбуватись за рахунок відтворення стовбуровими клітинами, що знаходяться у лімбі рогівки. Використання та самопоновлення стовбурових клітин з лімба рогівки залежить від біомеханічних властивостей оточуючого середовища, тобто рогівки, склери та корнеосклеральної оболонки. Ось чому важливо знати модуль пружності та проникність на межі зміни рогівки та склери.

Крім того, деякі процедури на рогівці (наприклад, зшивання) можуть впливати на жорсткість рогівки і тому слугують індикатором ефективності методу лікування. Недавнє дослідження, проведене разом з Університетом Фрайбурга (УФ), показало відмінність у жорсткості центральної частини рогівки, лімба ока та склери.

Разом з різницею жорсткості вимірювалася текучість при сталому навантаженні (див. рис. 10). Зрозуміло, що текучість була вищою у лімба ніж у склери чи рогівки, що свідчить про здатність лімба краще проводити рідини, ніж інші досліджені утворення.

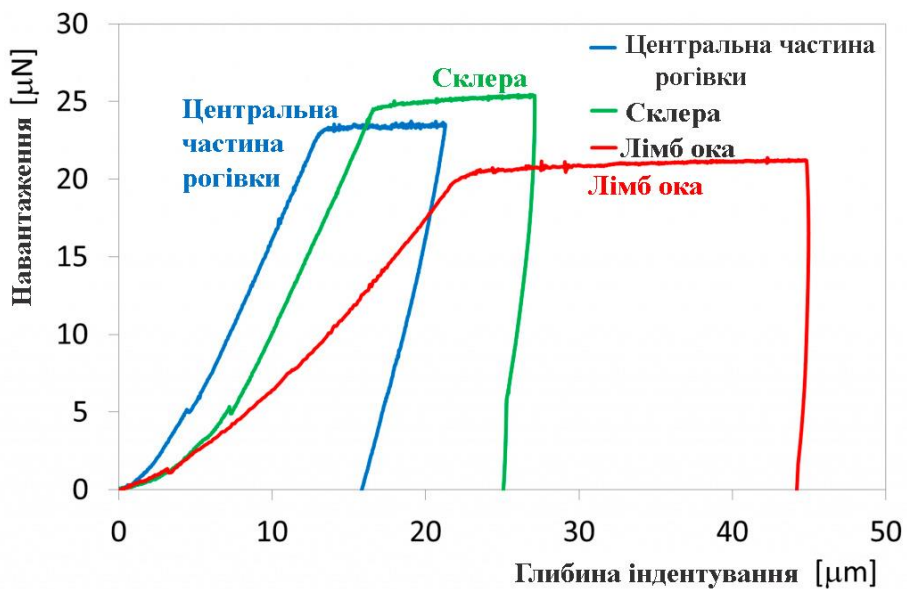


Рис. 10. Типові криві навантаження(індентування), отримані для центральної частини рогівки, лімба і склери.

Гідрогелі

Серія випробовувань була також представлена для дуже м'яких гідрогелів Petrisoft (MatrigenLife Technologies, Бреа, США). Ці гідрогелі являють собою живильне середовище з різними модулями пружності. Усі випробовувані зразки було поміщено в чашку Петрі і повністю занурено в рідину. Їх модуль пружності змінювався у межах від 2 кПа до 24 кПа (рис.11). Використовувався сферичний індентор з радіусом 500 мкм та максимальним навантаженням 50 мкН. Максимальне заглиблення за цих умов, становило 72 мкм.

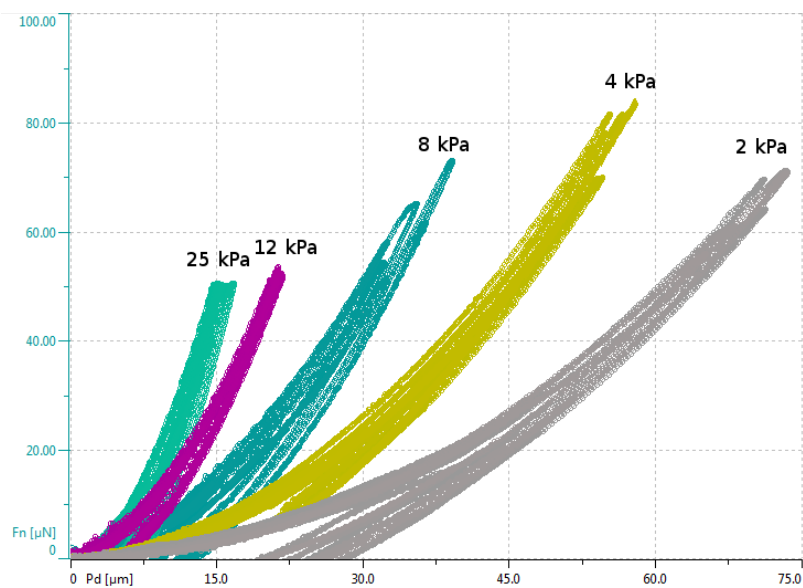


Рис.11. Порівняння кривих відступу, отриманих на гідрогелях Petrisoft з різними модулями пружності.

Що слід враховувати при навантаженні у рідині та на біологічному матеріалі.

Під час навантаження на м'які біологічні тканини або м'які матеріали може виникнути декілька проблем. Ці явища слід враховувати, щоб уникнути їх негативної дії на вимірювання і в результаті отримання помилкових результатів.

Ефект капілярних сил

Для більшості заглиблень, коли зразок знаходиться в рідині, можна спостерігати капілярні сили (див. рис. 12). Коли заглиблення проводиться в рідину, капілярні сили грають переважно негативну роль, але вони залежать від стану поверхні, який може змінюватись через відкладання солей з солевого розчину після повторного занурення туди індентора.

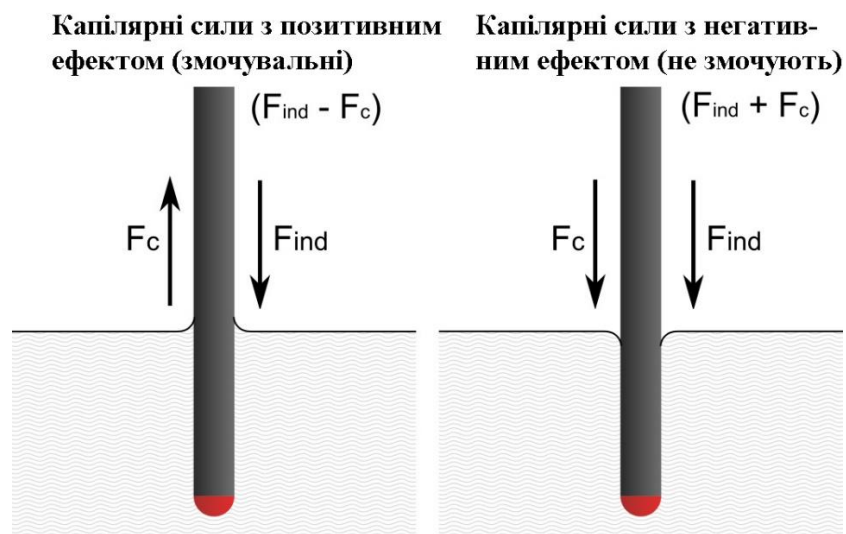


Рис. 12. Схематичне зображення капілярних сил між стінкою індентора та рідиною.

Меніск також може змінювати свій радіус, коли індентор проникає глибше в рідину. Спираючись на численні спостереження, можна зробити висновок, що капілярні сили під час занурення зазвичай є стабільними (індентор рухається відносно повільно) і не впливають на виміри. Однак, капілярні сили стають домінуючими і можуть спостерігатися під час швидкої фази, яка передуює заглибленню.

Ефект «невизначеної» поверхні

В деяких випадках крива навантаження показує повільне збільшення сили на початку, що вказує на контакт з м'яким матеріалом. Зазвичай таке спостерігається для біологічних зразків, де підготовлена поверхня не завжди може бути абсолютно чистою. Фрагменти тканин чи залишки епітелію можуть бути причиною такої «м'якої» фази на початку навантаження. На рис. 13, рис.14 схематично зображено таке навантаження.

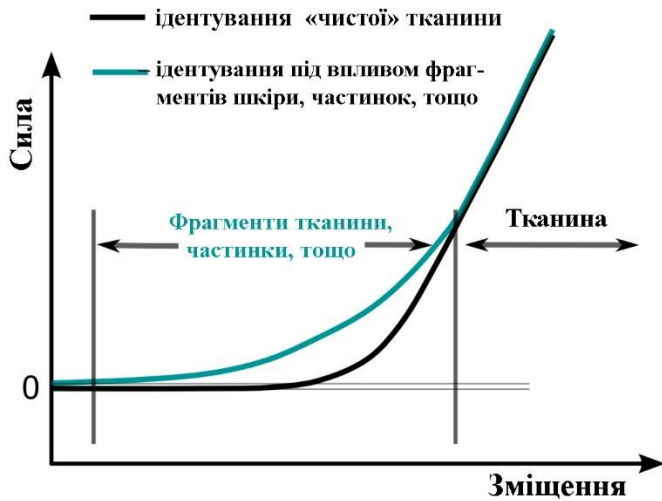


Рис. 13. Схематична ілюстрація навантаження на поверхню з «м'яким» шаром.

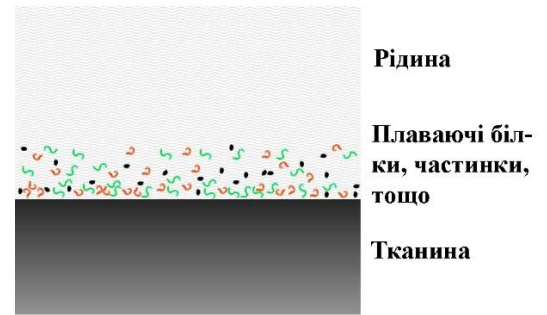


Рис. 14. Приклад «нечистої» та «невизначеної» поверхні.

Адгезія

Деякі м'які матеріали можуть навантажуватись у сухих умовах (на повітрі). Для таких матеріалів спостерігається явище адгезії. Сили адгезії можна виміряти під час процедури навантаження і результат апроксимації може виглядати схожим приклад, наведений на рис. 15.

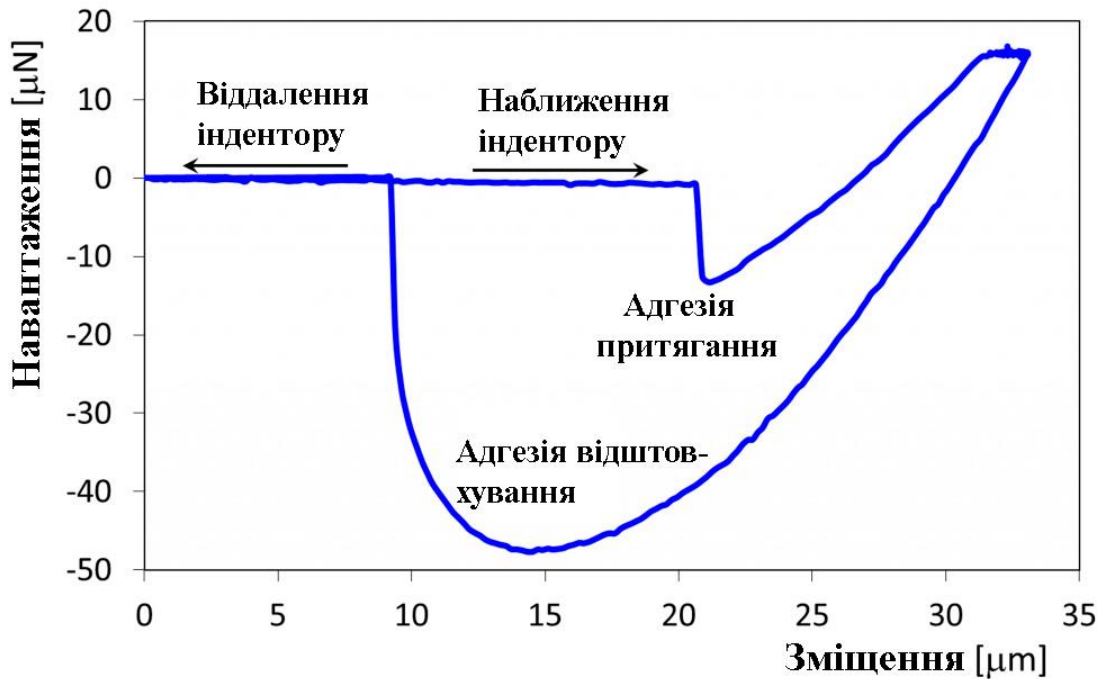


Рис. 15. Типове вимірювання навантаження на зразку з адгезійними силами.

Адгезія притягання реєструється, коли індентор наближається до поверхні, в той час як адгезія відштовхування (зазвичай з меншими відштовхувальними силами завдяки більшій площі контакту) реєструється, коли індентор припиняє взаємодію з поверхнею. Вимірювання мінімальних

відштовхувальних сил дозволяє розрахувати енергію поверхні, використовуючи модель Джонсона, Кендала, Робертса (рівняння 6).

$$F_{JKR} = \frac{3}{2} \pi R W_{12} = F_{Ad} - \text{рівняння 6,}$$

де $F_{JKR} = F_{Ad}$ -мінімальні значення сил відштовхування, R – радіус індентору і W_{12} - поверхнева енергія для даної комбінації матеріалів.

Під час навантаження зразків з адгезійними силами, точка контакту зазвичай встановлюється у місці мінімальної сили натягу, хоча деякі дослідники віддають перевагу встановленню цієї точкитам, де сили натягу є більшими за нуль.

Висновок

Навантаження біологічних тканин і біоматеріалів це дуже цікава галузь, яка на сьогодні набуває великого значення. Хоча методи вимірювання виглядають як вже встановлені, все ж існує багато нових викликів.

Дана стаття є перекладом на українську мову оригінальної [статті](#) Anton Paar GmbH **“Indentation testing on biological and soft materials using the bioindenter”**

Переклад виконаний Донау ЛАБ УКРАЇНА <http://dlu.com.ua> - ексклюзивного дистриб'ютора продукції Anton Paar GmbH в Україні та Молдові



03028 Україна, м. Київ,
вул. Стратегічне шосе, 16
<http://dlu.com.ua>

Тел: +38 (044) 229-15-31
Факс: +38 (044) 229-15-30
e-mail: sale@dlu.com.ua