

Microreometro e proprietà viscoelastiche delle cellule

Mastrofini Alessandro

alessandro.mastrofini@alumni.uniroma2.eu

Abstract

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche della cellula è di grande importanza per stimarne lo stato biologico e la sua fisiologia.

Tra le diverse tecniche di misura, tramite il microreometro è possibile di caratterizzarne le proprietà viscoelastiche. In questo report si considera un esperimento di misura di un microreometro a biglia paramagnetica e i dati sperimentali per analizzare il comportamento di un modello meccanico di cellula a parametri concentrati.

Tale modello viene descritto dal parallelo di un corpo di Maxwell con una rigidità elastica al quale viene aggiunto uno smorzatore in serie per ridurre la discrepanza con i dati sperimentali.

Le costanti viscoelastiche stimate dal modello a parametri concentrati sono indicative delle proprietà dell'intera cellula e non dei singoli costituenti quali membrana, citoscheletro o citoplasma, per i quali sarebbe richiesto un modello differente.

1 Introduzione

Per caratterizzare meccanicamente la cellula e le sue proprietà viscoelastiche è necessario avere un modello descrittivo del suo comportamento.

Viene quindi considerato un modello a parametri concentrati costituito da uno smorzatore in serie ad un ramo dato dal parallelo di un corpo di Maxwell e una rigidità elastica.

Si considerano quindi dei parametri materiali noti dalla letteratura tramite i quali viene analizzata la soluzione, analitica e numerica, a differenti tipologie di ingresso.

sono utili indicatori di cambiamenti citoscheletrici e dello stato cellulare.

Ne sono esempi l'aumento di rigidità nei globuli rossi affetti da sferocitosi [2, 3] e l'aumento di deformabilità nella cellule cancerogene [4].

Tali proprietà meccaniche possono essere misurate con differenti tecniche quali microscopio a forza atomica, trappole ottiche, microreometro a biglia magnetica e l'aspirazione con micropipette [5].

In questo report viene posta l'attenzione su un microreometro a biglie magnetiche e il modello di cellula per stimarne le proprietà viscoelastiche.

2 Background

Le proprietà e la fisiologia cellulare sono il principale motivo di indagine e ricerca. Tra queste le proprietà meccaniche sono utili biomarker [1].

La deformabilità e le proprietà viscoelastiche

2.1 Microreometro a biglia magnetica

Il microreometro è un dispositivo utilizzato nella micro reologia per caratterizzare le proprietà reologiche di un mezzo quali la viscosità o le tracce di flusso. Tali dispositivi si misurano si dividono in attivi e passivi a seconda che sfruttano l'energia ter-

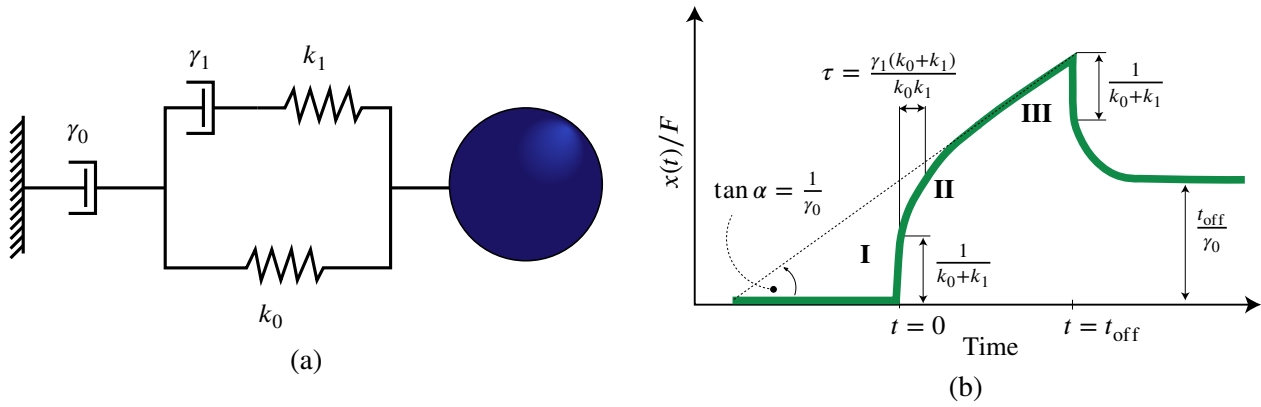


FIG. 1: Modello utilizzato per la descrizione del comportamento cellulare (a) e comportamento meccanico del modello (b) dove è possibile identificare diversi fasi quali fast elastic response (I), relaxation regime (II) e flow regime (III).

mica o forze esterne applicate per movimentare la particella.

In questo report viene analizzato un microreometro a biglie magnetiche. Tali biglie paramagnetiche di $4.5 \mu m$ di diametro sono legate al citoscheletro cellulare tramite la connessione tra le integrine di membrana e la fibronectina di cui sono ricoperte le biglie. L'integrina di membrana è connessa direttamente al citoscheletro quindi la misura dello spostamento della biglia fornisce informazioni sulla meccanica cellulare.

La presenza di un campo magnetico controllato applica una forza sulla miglia e misurandone lo spostamento è possibile caratterizzarne alcune proprietà viscoelastiche [6] fissando un modello viscoelastico di cellula.

Il comportamento osservato è rappresentato in fig. 1b ed è possibile distinguere tre fasi princi-

pali. Come viene applicata la forza c'è un primo spostamento della biglia (fase I) identificato come risposta elastica veloce. La prima fase è seguita dal regime di rilassamenti (fase II) e infine la regime di flusso, dove si verifica un progressivo scivolamento.

Considerando la seguente descrizione del modello è possibile stimarne sperimentalmente tre parametri quali l'ampiezza della prima fase $\frac{1}{k_1+k_0}$, la costante di tempo dell'andamento esponenziale della fase II pari a $\tau = \frac{\gamma_1(k_0+k_1)}{k_0k_1}$ e il parametro γ_0 identificativo dell'ampiezza della fase III.

Tali valori, stimati da Bausch et al. [6], verranno utilizzati per implementare una soluzione numerica del modello all'interno dell'ambiente Matlab.

2.2 Modello meccanico

Tali curve sperimentali sono analizzate sulla base di un modello meccanico descritto da una serie di uno smorzatore (a seguire indicato come Dashpot) e di un corpo Zener, noto anche come corpo Kelvin, descritto da un parallelo di una ramo con una rigidezza elastica e un secondo ramo formato dalla serie di uno smorzato e una rigidezza. Tale modello è rappresentato in fig. 1a.

La descrizione meccanica segue dal fatto che lo spostamento risultante sarà proprio la somma del dashpot γ_0 (D) e del corpo Zener (Z).

$$x(t) = x_D(t) + x_z(t) \quad (1)$$

E quindi derivando vale ancora:

$$\dot{x}(t) = \dot{x}_D(t) + \dot{x}_z(t) \quad (2)$$

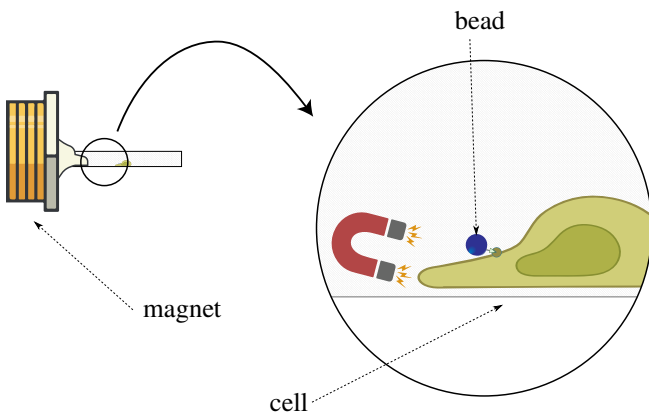


FIG. 2: Rappresentazione del funzionamento del microreometro a biglia paramagnetica. Un elettromagnete permette di esercitare una forza controllata sulla biglia paramagnetica a sua volta ancorata sulla cellula e al suo citoscheletro.

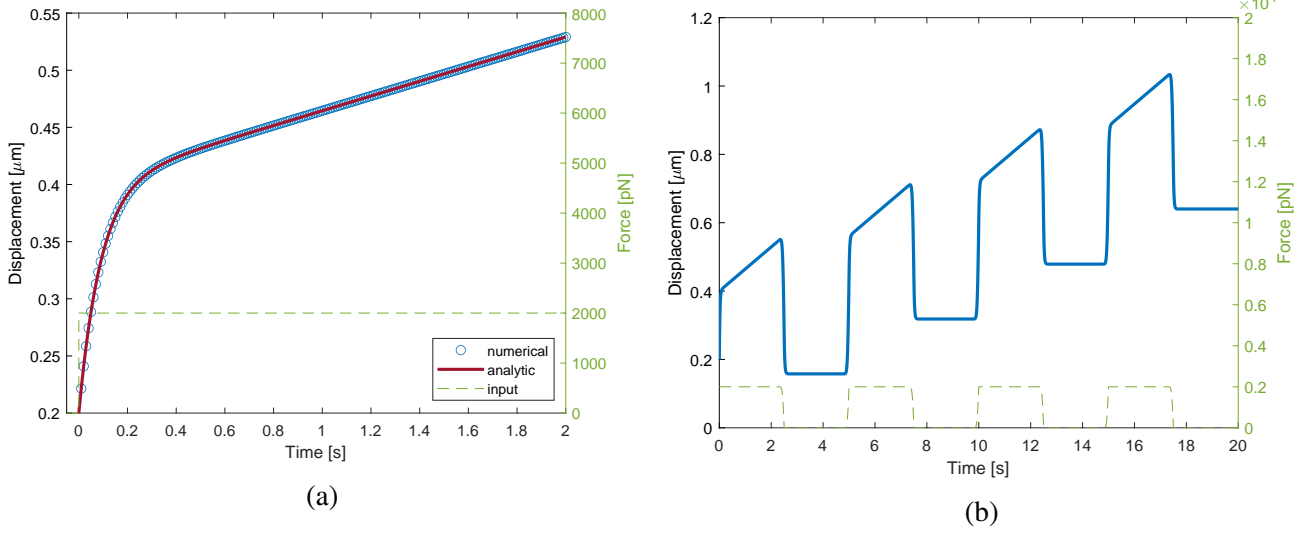


FIG. 3: Risposta del sistema ad ingresso a gradino (a) e ad onda quadra con periodo di 5s (b). La risposta è data dalla somma di un contributo lineare crescente dato dallo smorzatore (D) a cui si aggiunge la risposta più complessa del corpo Zener.

Chiaramente la forza applicata sarà la stessa su entrambi.

Per (D) è nota la relazione dello smorzatore da cui possiamo ricavare la velocità come:

$$\dot{x}_D = \frac{F}{\gamma_0} \quad (3)$$

Per il corpo Zener la forza si distribuisce sul ramo elastico e sul ramo dove è presente un corpo Maxwell (molla e smorzatore).

$$F(t) = F_{\text{Maxwell}}(t) + F_{\text{Ko}}(t) \quad (4)$$

Dove la forza applicata sul corpo di Maxwell è proprio la differenza tra quella totale applicata e quella del ramo elastico $k_0 x_Z(t)$.

Ovvero per il corpo Maxwell, derivando lo spostamento, si ottiene:

$$\dot{x}_Z(t) = \frac{\dot{F}}{k_1} + \frac{F}{\eta_0} \quad (5)$$

E quindi complessivamente per il corpo Zener vale:

$$\dot{x}_Z(t) = \frac{\dot{F}(t) - k_0 \dot{x}(t)}{k_1} + \frac{F(t) - k_0 x(t)}{\eta_0} \quad (6)$$

In conclusione, lo spostamento sarà dato dalla somma dei due spostamenti che possono essere ricavati risolvendo le due equazioni differenziali per un dato ingresso e condizione iniziale.

3 Risultati

Tale modello viene quindi analizzato all'interno dell'ambiente numerico Matlab confrontando la soluzione numerica e analitica per differenti tipologie di ingressi.

3.1 Ingresso a gradino

Per un ingresso a gradino, di ampiezza \bar{F} otterremo per il dashpot l'equazione differenziale:

$$\begin{cases} \dot{x}_D = \frac{\bar{F}}{\gamma_0} & t > 0 \\ x_D(0) = 0 \end{cases} \quad (7)$$

Di soluzione analitica lineare nel tempo:

$$x_D(t) = \frac{\bar{F}}{\gamma_0} t \quad (8)$$

Tale risposta lineare è rappresentante della fase lineare osservata nelle misure sperimentali.

Per il corpo Zener vale:

$$\begin{cases} \dot{x}_Z(t) \left(1 + \frac{k_0}{k_1}\right) = -\frac{k_0}{\gamma_1} x_Z + \frac{\bar{F}}{\gamma_1} & t > 0 \\ x_Z(0) = \frac{\bar{F}}{k_1 + k_0} \end{cases} \quad (9)$$

Dove la condizione iniziale deriva dal fatto da considerare lo spostamento sullo smorzatore nullo all'istante iniziale e allora lo spostamento complessivo è legato alle sole rigidità elastiche.

```

1 function dydt=zener_displacement(t,y,parameters,tspan,flag)
2     k_0=parameters(1);
3     k_1=parameters(2);
4     gamma_0=parameters(3);
5     gamma_1=parameters(4);
6     F_bar=parameters(5);
7     switch flag
8         case 'square'
9             [F, dF]=force(t,tspan);
10            dydt=((F-k_0*y)/gamma_1 + (dF/k_1))*(1+k_0/k_1);
11        case 'step'
12            dydt=(-(k_0/gamma_1)*y+(F_bar/gamma_1))/(1+(k_0/k_1));
13        case 'harmonic'
14            omega=parameters(7);
15            F=F_bar*(1+sin(omega*t));
16            dF=F_bar*omega*cos(omega*t);
17            dydt=((F-k_0*y)/gamma_1 + (dF/k_1))*(1+k_0/k_1);
18    end
19 end

```

FIG. 4: Routine richiamata da ode15s per la soluzione dell'equazione differenziale per lo spostamento del corpo Zener

```

1 function dydt=dashpot_displacement(t,y,parameters,tspan,flag)
2     gamma_0=parameters(3);
3     gamma_1=parameters(4);
4     F_bar=parameters(5);
5     switch flag
6         case 'square'
7             [F, dF]=force(t,tspan);
8             dydt=F/gamma_0;
9         case 'step'
10            dydt=F_bar/gamma_0;
11        case 'harmonic'
12            omega=parameters(7);
13            F=F_bar*(1+sin(omega.*t));
14            dF=F_bar*omega*cos(omega*t);
15            dydt=F/gamma_0;
16    end
17 end

```

FIG. 5: Routine richiamata da ode15s per la soluzione dell'equazione differenziale per lo spostamento dello smorzatore

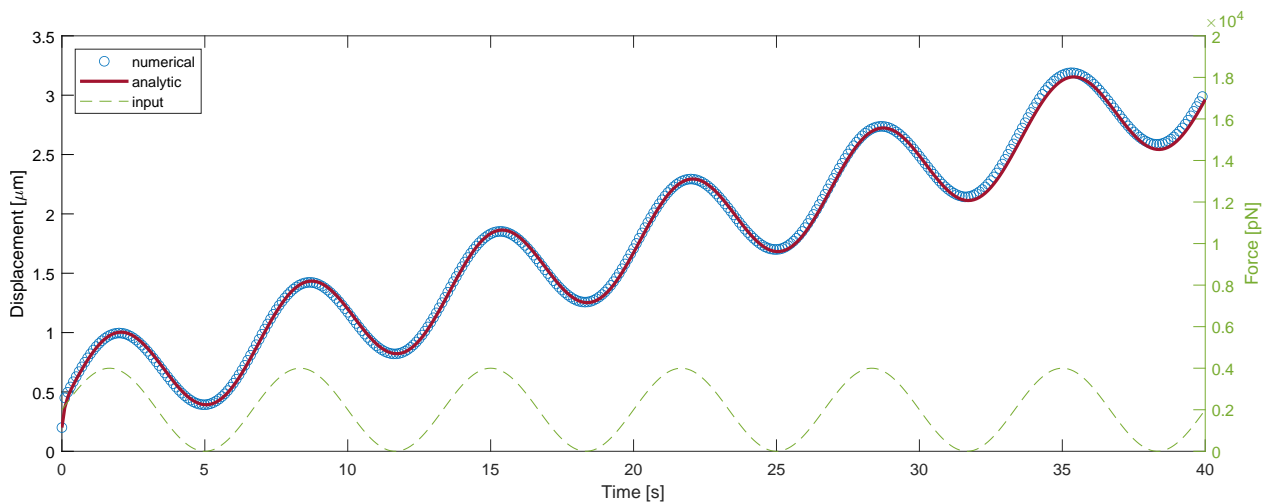


FIG. 6: Confronto tra il risultato analitico e il risultato numerico con ingresso sinusoidale a frequenza 0.15 Hz applicato per 40s.

Considerando il tempo di rilassamento

$$\tau = \gamma_1 \frac{k_1 + k_1}{k_0 k_1} \quad (10)$$

Si può riscrivere il problema come

$$\begin{cases} \dot{x}_z(t) + \frac{1}{\tau} x_z(t) = \frac{\bar{F}}{k_0 \tau} & t > 0 \\ x_z(0) = \frac{\bar{F}}{k_1 + k_0} \end{cases} \quad (11)$$

Ovvero, tale problema di Cauchy presenta una soluzione del tipo:

$$x_z(t) = e^{-A(t)} \left[x_0 + \int_{t_0}^t g(x) e^{A(t)} \right] \quad (12)$$

Dove $A(t)$ è il termine legato alla soluzione dell'equazione omogenea, ovvero l'integrale dell'esponenziale con esponente il coefficiente che moltiplica $x_z(t)$, mentre il termine $g(x)$ è legato all'equazione non omogenea.

Allora si ottiene:

$$x_z(t) = e^{-\frac{t}{\tau}} \left[\frac{F}{k_0 + k_1} + \frac{F}{k_0} e^{\frac{t}{\tau}} - \frac{F}{k_0} \right] \quad (13)$$

Che può essere riscritta come:

$$x_z(t) = \frac{\bar{F}}{k_0} \left(1 - \frac{k_1}{k_0 + k_1} e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (14)$$

Ovvero un'esponenziale che progressivamente tenderà a $\frac{\bar{F}}{k_0}$.

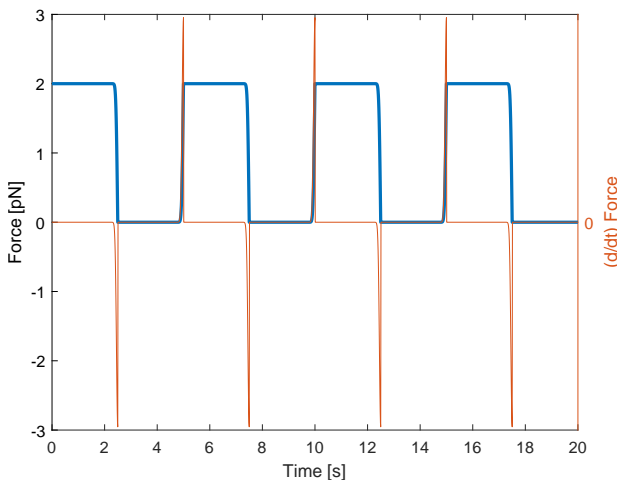


FIG. 7: Ingresso ad onda quadra regolarizzata dove le discontinuità sono state ammorbidite con un filtro gaussiano al fine di poter calcolare la derivata numerica. Tale segnale diventa l'ingresso per il modello meccanico.

Inoltre, lo spostamento è raffigurato in fig. 3a e fig. 9.

Tale soluzione viene graficata in fig. 3a e confrontata con la soluzione numerica ottenuta in Matlab.

3.2 Soluzione numerica

La soluzione numerica viene ottenuta in Matlab tramite ode15s, un solutore proprietario per equazioni differenziali stiff.

La routine principale (main.m) permette di selezionare tramite la variabile flag il tipo di ingresso per la forza, scegliendo tra l'ingresso a gradino, un'onda quadra e una sinusoide, descritte più avanti.

Successivamente la routine setta un intervallo temporale appropriato e richiama ode15s() passando le funzioni dove sono definiti gli spostamenti (fig. 5) e poi viene graficata la loro somma.

3.3 Ingresso a onda quadra

Viene poi testato un ingresso ad onda quadra come utilizzato in [6], con un periodo di 5s, un duty cycle del 50% e un'ampiezza di 2000 pN, testata su un intervallo di 20s.

Tale ingresso viene implementato tramite la routine force.m, descritta in fig. 8 avendo l'accortezza di ammorbidire il gradino per poterne fare la derivata numerica anche delle discontinuità e facendo in modo che ode15s possa richiederne il valore a qualsiasi istante, e non solo sui campioni dove viene definita, tramite un'interpolazione. Tale segnale è presente in fig. 7.

I risultati sono presenti in fig. 3b e dalla scomposizione dei due segnali (fig. 9) è possibile osservare come il dashpot presenta una componente lineare a tratti alla quale viene aggiunto il comportamento oscillatore del corpo Zener.

3.4 Ingresso sinusoidale

L'effetto oscillatorio è chiaramente molto presente se sollecitiamo il modello con un ingresso sinusoidale del tipo:

$$F(t) = \bar{F} (1 + \sin(\omega t)) \quad (15)$$

La soluzione analitica presenta sia una componente armonica che una esponenziale:

```

1 function [F, dF]=force(t_curr,t)
2 T_cyc=5;
3 N_cyc=4;
4 F=2000;
5 freq=1/T_cyc;
6 squareWave=F/2*(square(2*pi*freq*t,50)+1);
7 squareWave(end)=0;
8 squareWave_smooth=smoothdata(squareWave,'gaussian',(size(t)/N_cyc)*0.05);
9 derivate=[0 diff(squareWave_smooth)];
10 F=interp1(t,squareWave_smooth,t_curr);
11 dF=interp1(t,derivate,t_curr);
12 end

```

FIG. 8: Routine per la generazione dell'onda quadra regolarizzata di ingresso. Viene inserita anche la funzione `interp1` per permette a `ode15s` di leggere il valore di forza a qualsiasi istante temporale (`t_curr`) e non solo sui campione dove è stato definito il segnale.

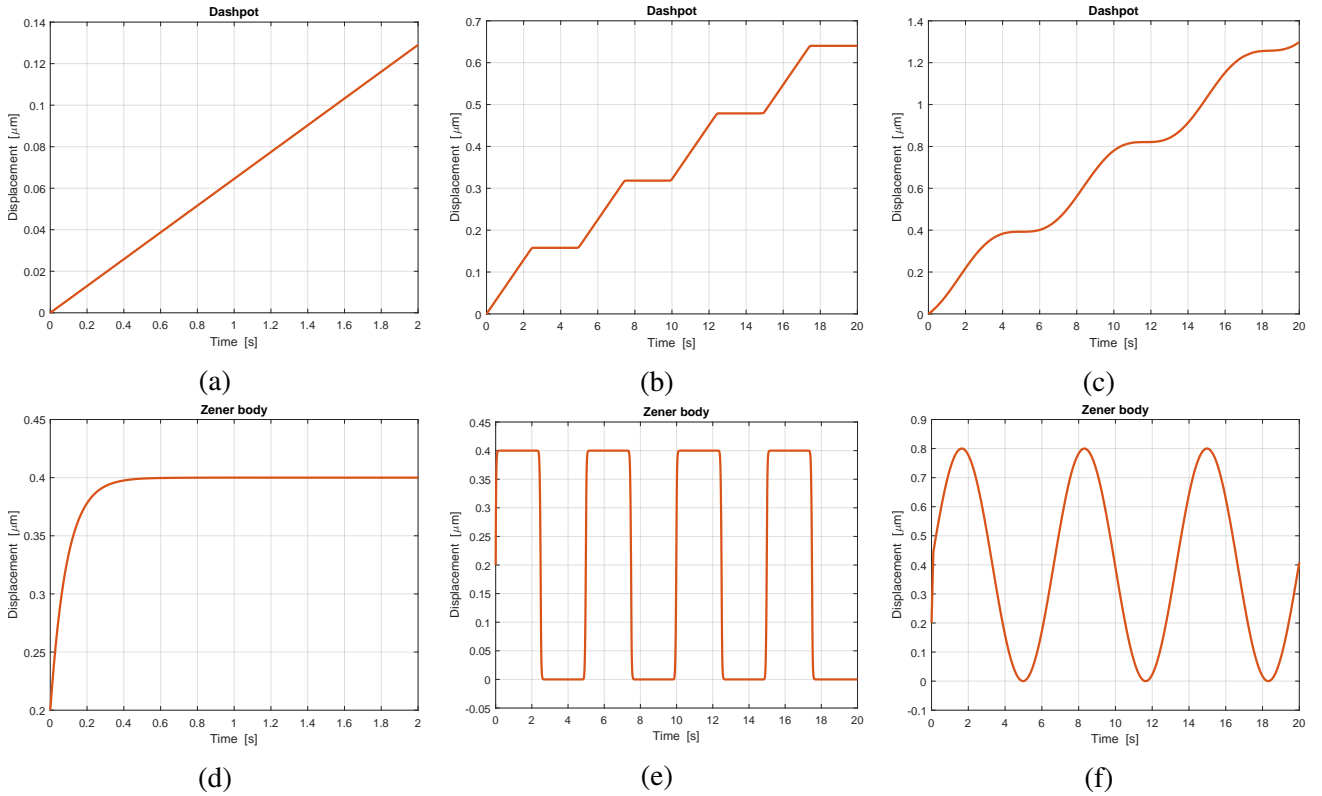


FIG. 9: Andamento dello spostamento dello smorzatore (sopra) e del corpo Zener (sotto) nel caso di ingresso a gradino (a,d); a onda quadra con periodo di 5s (b,e); sinusoide a frequenza 0.15 Hz (c,f).

$$\begin{aligned}
 x(t) = \frac{F_0}{k_0} & \left[1 - \frac{k_1}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau} + \right. \\
 & + \frac{\tau\omega \left(1 - \frac{\gamma_1}{k_1\tau} \right) (e^{-t/\tau} - \cos\omega t)}{1 + (\tau\omega)^2} + \\
 & \left. + \frac{\left(1 + \frac{\gamma_1\tau\omega^2}{k_1} \right) \sin\omega t}{1 + (\tau\omega)^2} \right] \quad (16)
 \end{aligned}$$

Tale soluzione viene confrontata con la soluzione numerica in fig. 6.

Dai due spostamenti separati (fig. 9) è possibile vedere come entrambi hanno una componente armonica e mentre lo spostamento del corpo Zener è limitato il dashpot presenta una crescita lineare involupata da una sinusoide.

4 Conclusioni

Lo studio e la classificazione del comportamento meccanico di tali modelli permette di analizzarne i coefficienti e poter fittare dei dati sperimentali per ricavare le proprietà meccaniche cellulari.

Avvalersi di un solutore numerico permette di analizzare il modello meccanico anche per ingressi complessi e fortemente variabili nel tempo.

Le costanti viscoelastiche stimate dal modello a parametri concentrati sono indicative delle proprietà dell'intera cellula, ma tali proprietà sono determinate in parte dalle proprietà della membrana cellulare e in parte dalle proprietà del citoplasma e dalla struttura del citoscheletro. Per avere maggiori informazioni sulle singole componenti cellulari è richiesto un modello più dettagliato.

Disponibilità dei dati

Il materiale è disponibile alla repository online del progetto: <https://github.com/mastroalex/microrheometer>.

Riferimenti

- [1] Dino Di Carlo. "A Mechanical Biomarker of Cell State in Medicine". en. In: *SLAS Technology* 17.1 (Feb. 2012), pp. 32–42. ISSN: 24726303. DOI: 10 . 1177 / 2211068211431630. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2472630322016612> (visited on 06/15/2022).
- [2] Gabriel Y.H. Lee and Chwee T. Lim. "Biomechanics approaches to studying human diseases". en. In: *Trends in Biotechnology* 25.3 (Mar. 2007), pp. 111–118. ISSN: 01677799. DOI: 10 . 1016 / j . tibtech . 2007 . 01 . 005. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779907000212> (visited on 06/15/2022).
- [3] S. Suresh et al. "Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria". en. In: *Acta Biomaterialia* 1.1 (Jan. 2005), pp. 15–30. ISSN: 17427061. DOI: 10 . 1016 / j . actbio . 2004 . 09 . 001. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270610400008X> (visited on 06/15/2022).
- [4] Claudia Tanja Mierke. "Viscoelasticity Acts as a Marker for Tumor Extracellular Matrix Characteristics". In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (Dec. 2021), p. 785138. ISSN: 2296-634X. DOI: 10 . 3389 / fcell . 2021 . 785138. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.785138/full> (visited on 06/15/2022).
- [5] C Ross Ethier and Craig A Simmons. *Introductory Biomechanics: From Cells to Organisms*. en.
- [6] Andreas R. Bausch et al. "Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometry". en. In: *Biophysical Journal* 75.4 (Oct. 1998), pp. 2038–2049. ISSN: 00063495. DOI: 10 . 1016 / S0006 - 3495 (98) 77646 - 5. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349598776465> (visited on 05/18/2022).