

**Krzysztof WIERZCHOLSKI\***, **Oliwia ŁUPICKA\***,  
**Andrzej MISZCZAK\*\***

## **PROJEKT MIKRO- I NANOTRIBOLOGICZNYCH BADAŃ CHRZĄSTKI STAWOWEJ**

### **PROJECT FOR MICRO- AND NANO-TRIBOLOGICAL CARTILAGE INVESTIGATIONS**

#### **Słowa kluczowe:**

ścinki chrząstki stawowej, geometria powierzchni, redukcja oporów tarcia

#### **Key words:**

cutting of cartilages, geometry of surface, reduced friction resistances

#### **Streszczenie**

W niniejszej pracy autorzy przedstawiają plan badań mikro- i nanotribologicznych chrząstki stawowej oraz chondrocytów podczas ich opływu oraz odżywiania cieczami biologicznymi w inkubatorze CO<sub>2</sub>.

---

\* Technical University of Koszalin, Institute of Mechatronics, Nanotechnology and Vacuum Technique, PL 75-620 Koszalin, ul. Raclawicka 15-17, Poland; krzysztof.wierzcholski@wp.pl.

\*\* Gdynia Maritime University, Morska Street 81-87, 81-225 Gdynia, Poland; miszczak@am.gdynia.pl.

Proponowane badania prowadzone będą między innymi we współpracy z Zakładem Hematologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W zakładzie tym prowadzone będą badania dotyczące hodowli chondrocytów i badań histologicznych, natomiast pozostałe badania mikro- i nanotribologiczne wykonane będą w laboratoriach tribologicznych.

Badania zawarte w pracy dotyczą: wyznaczania mikrosił tarcia spoczynkowego pomiędzy powierzchnią chondrocytów a międzykomórkową macierzą białkową oraz wyznaczania prędkości przepływów cieczy o własnościach nienewtonowskich w supercienkich warstwach granicznych wokół chrząstki w inkubatorze CO<sub>2</sub>, a także wyznaczanie prędkości ścinania wpływającej na lepkość pożywki.

## WPROWADZENIE

Według aktualnej informacji autorów w obecnych badaniach naukowych prowadzonych w Polsce i na świecie brakuje zarówno eksperymentalnych, jak też analityczno-numerycznych badań mikro- i nanotribologicznych związanych z tarciem, zużyciem i smarowaniem chrząstki stawowej oraz chondrocytów podczas ich opływu oraz odżywiania cieczami biologicznymi w inkubatorze CO<sub>2</sub>. Nadmierne zużycie chrząstki stawowej prowadzi nieuchronnie do wszczepiania endoprotez. Jednakże od kilkunastu lat dokonywane są udane próby rekonstrukcji chrząstki stawowej poprzez wszczepianie chondrocytów do ubytków pod warstwą okostnową. Chondrocyty można uzyskać poprzez hodowlę w bioreaktorach (3D) lub w naczyniach hodowlanych *in vitro* (2D).

Rolą chondrocytów w przeszczepach jest nie tylko produkcja elementów macierzy pozakomórkowej, lecz także przejęcie funkcji mechanicznej od siły ucisku dwóch kości w stawie człowieka łagodzonej powierzchnią warstwy komórek oraz cieczą synowialną, która jest wydzielana przez wewnętrzną warstwę torebki stawowej – błonę maziową [L. 6, 7].

Opisywane badania obejmują obliczanie naprężeń, współczynników tarcia, sił tarcia w mikroskali, a nawet nanoskali w otoczeniu chrząstki lub igłowych biopunktatów pobranych z powierzchni stawowej.

W badaniach przeprowadza się pomiary wartości współczynników materiałowych opisujących związki konstytutywne nienewtonowskiej cieczy biologicznej i chrząstki stawowej. Chodzi tu w głównej mierze o współczynnik lepkości dynamicznej i współczynniki pseudolepkości tej

cieczy, występujące w opisie lepkosprężystych właściwości cieczy (w przypadku stosowania *in vitro* – pożywki) ujętych w modelu Rivlina-Ericksena. Ponadto badania obejmują wyznaczanie wartości mikrotwardości i moduły Younga chrząstki stawowej poddanej działaniom różnych cieczy biologicznych w warunkach statycznych i dynamicznych. Wartości tych współczynników są mało znane, a informacja o ich wartościach jest niezbędna w obliczeniach numerycznych wyznaczających parametry występujące przy prawidłowym funkcjonowaniu stawu człowieka. Autorzy w badaniach tribologicznych wykorzystują mikroskop sił atomowych (AFM) oraz nowoczesne programy matematyczne i symulacyjne, takie jak Matlab, Mathcad, Fluent, Ansys. [L. 10, 11].

Igłowe biopunktaty tkanki chrzęstnej o objętości ok. 20 mm<sup>3</sup> przepłukane PBS-em (buforowana sól fizjologiczna) poddane zostaną badaniom tribologicznym w laboratorium tribologicznym. Pomiar struktury powierzchni biopunktatów i hodowlanych chondrocytów w środowisku medium hodowlanego (DMEM – Sigma/Aldrich) oraz pomiar mikro- i nanosił tarcia w trakcie opływu preparatu w warunkach dynamicznych, dokonywany jest z użyciem mikroskopu sił atomowych. Ocena histologiczna preparatów chrząstki stawowej oceniana jest w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Ropne zapalenie stawów, ropna wydzielina, pozapalna wydzielina wysiękowa, związane są na ogół ze spadkiem wartości lepkości dynamicznej cieczy synowialnej. Takie przypadki wymagają terapii farmakologicznej oraz transplantacji chondrocytów, które są podawane iniekcyjnie pacjentom w postaci zawiesiny w macierzy międzykomórkowej.

Celem badań jest pokazanie wpływu czynników natury hydromechanicznej na właściwości mechaniczno-biologiczno-histologiczne chrząstki stawowej lub chondrocytów oraz ich funkcjonowanie przy tworzenia macierzy pozakomórkowej, zapobiegania martwicy, jak również w sensie czysto tribologicznych oddziaływań.

## ZAKRES BADAŃ

Realizowane będą następujące badania:

- Ocena bezpośredniego wpływu różnych bioakceptowalnych cieczy, pożywek hodowlanych i płynów fizjologicznych w warunkach statycznych i dynamicznych na strukturę geometryczną powierzchni i właściwości fizyczne warstwy wierzchniej z uwzględnieniem mikro-

twardości i modułu Younga igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej w inkubatorze CO<sub>2</sub>.

- Wpływ wartości współczynników materiałowych cieczy biologicznych o własnościach nienewtonowskich zalegających wokoło igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej w inkubatorze CO<sub>2</sub> na współczynniki materiałowe opływanych powierzchni minichrząstki oraz ich struktury geometryczne. Własności te nie mają miejsca w przypadku klasycznego opływu powierzchni pożywkami o newtonowskich własnościach.
- Wyznaczanie wartości sił tarcia oraz ich zmian w trakcie opływu igłowego biopunktatu tkanki chrzęstnej w badaniach dynamicznych (w bioreaktorach – 3D).
- Opracowanie nowych modeli związków konstytutywnych cieczy biologicznych o własnościach nienewtonowskich, przy dostosowaniu modelu Rivlina Ericksena dla cieczy bioakceptowalnych.
- Określenie wpływu chropowatości i geometrii powierzchni minichrząstki w mikro- i nanoskali na przepływ cieczy biologicznej w supercienkiej warstwie granicznej wokół żywej minichrząstki w inkubatorze CO<sub>2</sub> [L. 3–5].
- Badania histologiczne wykonane w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego określające wpływ poszczególnych płynów i cieczy na strukturę warstwy wierzchniej igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej.
- Opracowanie statystyczne gęstości prawdopodobieństwa oraz odchyłeń standardowych dla wartości funkcji opisujących pomierzone mikroskopem sił atomowych struktury geometryczne powierzchni minichrząstki, a także wartości wysokości warstw granicznych cieczy [L. 1, 2, 8, 9]. Uzyskane dane losowe dotyczące powierzchni umożliwią wyznaczenie rozkładów prędkości cieczy odżywczych (pożywki), cieczy bioakceptowalnych w cienkich warstwach granicznych w otoczeniu minichrząstki pobranej z pooperacyjnych wycinków tkanki chrzęstnej w ujęciu probabilistycznym. Takie prędkości pozwolą używać stochastyczne modele rozkładów sił tarcia na utrwalonych pooperacyjnych wycinkach tkanki chrzęstnej oraz na powierzchniach biopunktatów.

## SCHEMAT CYTOLOGICZNYCH BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH

Zawiesina chondrocytów hodowlanych (*in vitro*), jak i igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej pobranych z powierzchni stawowych będzie poddawana procesom statycznym i dynamicznym. Badania statyczne dotyczą przetrzymywanie igłowych biopunktatów, jak i chondrocytów uzyskanych w hodowli *in vitro* w naczyniach hodowlanych w warunkach wysokiej sterylności w płynie hodowlanym DMEM (z dodatkiem suplementów niezbędnych dla hodowli chondrocytów) w celu określenia przeżywalności badanych komórek. Badania dynamiczne obejmują przetrzymywanie zarówno igłowych biopunktatów, jak i chondrocytów uzyskanych w hodowli *in vitro* w naczyniach hodowlanych przepływowych – z wymuszonym krążeniem (za pomocą pompy rotacyjnej – różne prędkości i ciśnienia) medium hodowlanego – DMEM (Invitrogen). Dokonywane jest okresowe pobieranie materiału, utrwalanie i kontrola cytohistologiczna.

## ZASADNOŚĆ BADAŃ

Wyznaczanie wartości sił tarcia oraz ich zmian w trakcie opływu igłowego biopunktatu tkanki chrzęstnej ma istotny wpływ na śledzenie procesów wczesnej destrukcji zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych, co może zapobiegać różnym stanom chorobowym w stawie. Wiedza na temat wartości sił tarcia na powierzchniach igłowego biopunktatu tkanki chrzęstnej oraz możliwość sterowania tymi wartościami poprzez czynniki zewnętrzne umożliwi dostarczenie niezbędnych danych z zakresu istniejącego oraz przewidywanego zużycia powierzchni chrząstki stawowej. Ten fakt ułatwi prowadzenie profilaktyki oraz umożliwi trafniejszą terapię.

- Opływ chrząstki stawowej cieczą biologiczną o własnościach klasycznych i stałej lepkości był już rozpatrywany w pracy [L. 14]. Jednakże, nie był do tej pory badany opływ hydrodynamiczny igłowego biopunktatora tkanki chrzęstnej cieczą (pożywką) o rzeczywistych własnościach nienewtonowskich, gdzie lepkość zależy od prędkości deformacji i sił adhezji zmieniając się po grubości warstwy.
- Nie były do tej pory prowadzone badania obejmujące wpływ różnych cieczy na „stan” igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej pobieranych

z wycinków pooperacyjnych w inkubatorze CO<sub>2</sub>, jak również wpływ tychże cieczy na tkanki chondrocytalne uzyskane metodą *in vitro*.

## **ZNACZENIE WYNIKÓW PROJEKTU DLA ROZWOJU TRIBOLOGII**

- Badania przyczynią się do rozwoju nowej dziedziny naukowej, którą jest cytotribologia oraz histotribologia, czyli tribologia komórek lub tkanek. Są to zdaniem autorów zupełnie nowe dziedziny naukowe, które do tej pory nie były inicjowane w ośrodkach naukowych w kraju i za granicą zarówno w kręgach zajmujących się tribologią, jak też i inżynierią tkanek. Rozwój takich dziedzin naukowych wymaga wiedzy nie tylko z zakresu inżynierii tkanek, lecz również z zakresu nanotribologii i hydromechaniki cienkich warstw cieczy. Niezbędny w tego rodzaju badaniach jest mikroskop sił atomowych (AFM), mierzący struktury geometryczne powierzchni 20 μm × 20 μm oraz siły tarcia rzędu μN powstające na tak małych powierzchniach.
- Nabyte umiejętności w zakresie analitycznego, numerycznego oraz częściowo doświadczalnego wyznaczania stacjonarnych oraz niestacjonarnych rozkładów prędkości cieczy smarującej w super cienkich warstwach otaczających opływane powierzchnie biopunktatów igłowych tkanki chrzęstnej, a także wyznaczanie wartości naprężeń, sił tarcia, współczynników tarcia i zużycia pozwalają zastosować tę wiedzę do wyznaczania analogicznymi metodami podobnych parametrów, lecz znajdujących się w urządzeniach mechanicznych na przykład w maszynowych mikrołożyskach ślizgowych oraz mikrorobotach.
- Metody badawcze w zakresie wyznaczania parametrów tribologicznych w trakcie opływu igłowych biopunktatów tkanki chrzęstnej stają się impulsem do projektowania inteligentnych łożysk ślizgowych.

## **PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE**

Autorzy widzą następujące zastosowania prowadzonych badań:

1. Opracowanie metody, zwłaszcza z zastosowaniem techniki opływu, pozwalającej określić przeżywalności komórek, jak i uzyskanie optymalnych (dla hodowli chondrocytów) parametrów tribologicznych stosowanych płynów umożliwi hodowlę chondrocytów, a nawet biopunktatów chrząstki stawowej o odpowiednich parametrach niezbędnych przy przeszczepach [L. 12, 13]. Pozytywne wyniki badań mogą przy-

czynić się również do zastosowania w warunkach klinicznych zarówno chondrocytów autologicznych, jak i odpowiednich płynów, pozwalających na opóźnienie albo uniknięcie konieczności wszczepiania endoprotez u pacjentów ze schorzeniami stawu biodrowego, a także na naprawę stawu kolanowego poprzez pomyślny remodelling komórek chrząstki stawowej oraz poprzez cofnięcie procesu spadku wartości lepkości dynamicznej cieczy biologicznej, która jest podstawowym czynnikiem sprawczym w procesie poprawnego funkcjonowania chrząstki stawowej.

2. Wyniki badań otrzymane w proponowanym projekcie mogą przyczynić się do produkcji cieczy biologicznej o optymalnej wartości lepkości wobec badanych komórek i tkanek, a także dostosowanie właściwych parametrów tribologicznych powiązanych ze strukturami geometryczno-mechanicznymi [L. 8, 9].

## LITERATURA

1. Bharat Bhushan: Nanotribology and Nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS materials and devices. Elsevier, Microelectronic Engineering, 84, 2007, pp. 387–412.
2. Bharat Bhushan: A Handbook of Nanotribology. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2004.
3. Chizhik S.A., Ahn H.-S., Chikunov V.V., Suslov A.A.: Tuning fork energy dissipation nanotribometry as option of AFM. Scanning Probe Microscopy, 2004, pp. 119–121.
4. Chizhik S., Wierzcholski K.: Micro-and nano level of bio-joint lubrication. Tribologia, 2006, 4(208), pp. 167–179.
5. Chun-Yuh Huang, Soltz M.A., Kopacz M., Mow Van C., Ateshian G.A.: Experimental Verification of the Roles of Intrinsic Matrix Viscoelasticity and Tension-Compression Nonlinearity in the Biphasic Response of Cartilage, ASME, Journal of Biomechanical Engineering, 2003, Vol. 125, No. 1, pp. 84–93.
6. Maurel W., Wu Y., Thalmann D.: Biomechanical Modells for Soft Tissue Simulation, Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1998.
7. Ryniewicz A.: Analiza mechanizmu smarowania stawu biodrowego człowieka, Rozprawy Monograficzne 111.
8. Wierzcholski K.: Experimental measurements of friction forces on the tissue in probabilistic view. Journal of Kones Powertrain and Transport, 2006, Vol. 13, No. 3, pp. 427–435.

9. Wierzcholski K., Chizhik S., Miszczak A.: The theoretical description of friction force in bio-joints as function of cartilage. *Zagadnienia Eksploatacji Maszyn*, 2006, Vol. 41, z. 2 (146), pp. 29–39.
10. Wierzcholski K.: Bio and slide bearings: their lubrication by non-Newtonian fluids and application in non conventional systems. Vol. III: Tribology process for chondrocytes, human joint and micro-bearing, Monograph (pp. 1–129), Published by Krzysztof Wierzcholski, Gdansk University of Technology, Gdańsk 2006–2007.
11. Wierzcholski K., Miszczak A.: Elementy mikro- i nano-tribologii w aspekcie przepływów cieczy biologicznych w warstwie przyściennej, Monografia, Tom III, Foundation for the Development of Gdynia Maritime University, Gdynia 2007 the Development of Gdynia Maritime University, Gdynia 2007.
12. Wierzcholski K., Miszczak A.: Numerical determination of friction forces in unsteady loaded biobearings. *Tribologia*, 2007, 1(211), pp. 247–258.
13. Wierzcholski K., Miszczak A.: Numerical determination of friction coefficient occurring in unsteady human joints. *Tribologia*, 2007, 1(211), pp. 235–245.
14. [www.oce.pg.gda.pl/biobearing](http://www.oce.pg.gda.pl/biobearing), 2006.

**Recenzent:**  
**Anna RYNIEWICZ**

## Summary

**Vitreous cartilage is an important element of the human skeleton, because it makes bone growth possible and forms joint surfaces. The vitreous cartilage consists of cartilage cells and chondrocytes which produce an extra-cell matrix.**

**The commonly applied and effective method of therapy of developed degenerative changes in joints of human lower limbs (mainly of knee and hip joints) is mechanical reconstruction of a used joint by replacing it with a complete endoprosthesis.**

**Despite its unquestionable advantages, the alloplastics are not free of many shortcomings. An artificial joint does not precisely model the joint's surfaces and detrimentally changes biomechanical processes in the part of pelvis in which the joint's sleeve is located, as well as in the root closer to thigh bone. From clinical observations, it results in the "lifetimes" of endoprostheses range from 10 to 13-15**



years after a correctly performed operation and the correct use of the implant. For this reason, more effective methods for the treatment of joint cartilage decrements are still being researched.

One method is to investigate cartilage and chondrocytes in an incubator of CO<sub>2</sub>. This paper presents a current view concerning the study process of cartilage and chondrocytes in an incubator, and it is presented from the side of mechanics, especially hydromechanics methods.

The research determined flow velocity fields of viscous, non-Newtonian biological nutrition liquid as well as friction forces generated within the boundary layer around surfaces of investigated cartilage or tissues. Additionally, were considered potential flows from the joint cavity of joint fluid which nourish joint cartilage after its implantation.