



You have downloaded a document from  
**RE-BUŚ**  
repository of the University of Silesia in Katowice

**Title:** Modelowanie komputerowe i analityczne bioinspirowanego, standardowego układu fizyki powierzchni, w zakresie tarcia i smarowania, na wybranym przykładzie

**Author:** Piotr Bełdowski

**Citation style:** Bełdowski Piotr. (2017). Modelowanie komputerowe i analityczne bioinspirowanego, standardowego układu fizyki powierzchni, w zakresie tarcia i smarowania, na wybranym przykładzie. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

**UNIwersytet  
Technologiczno -  
Przyrodniczy w Bydgoszczy**

**Instytut Matematyki i Fizyki**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

mgr inż. Piotr Bełdowski

**Modelowanie komputerowe i analityczne bioinspirowanego,  
standardowego układu fizyki powierzchni, w zakresie tarcia i  
smarowania, na wybranym przykładzie**

Promotor  
Prof. dr hab. inż. Adam Gadomski

Bydgoszcz 2017

*Panu prof. dr hab. inż.  
Adamowi Gadomskiemu  
składam serdeczne  
podziękowanie za wszelką  
okazaną pomoc oraz cenne  
wskazówki udzielone podczas  
powstawania tej pracy.*

## Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie modelu opisującego tarcie i smarowanie układu stawu naturalnego na przykładzie chrząstki stawowej. Model pozwala na zrozumienie wpływu składników cieczy smarującej na działanie układu w zmiennych reżimach tarcia i opis zmian skutkujących jego degeneracją. W oparciu o model ułatwionego smarowania zaprezentowano najważniejsze czynniki wpływające na niską wartość tarcia i niskie zużywanie układu chrząstki stawowej. Układ złożony jest z dwóch (naturalnych) powierzchni trących i cieczy smarującej. Ciecz smarująca nazywana cieczą synowialną złożona jest z wody, lipidów, biopolimerów oraz białek. W pracy skupiono się na wpływie lipidów w formach zagregowanych oraz ich oddziaływania z kwasem hialuronowym jako kluczowych w mechanizmie tarcia. Odpychanie hydratacyjne naładowanych cząsteczek amfifilowych oraz zmiana reżimu tarcia ze ślizgowego na toczne (będącego konsekwencją sferycznych micel) pozwala na osiągnięcie niskich wartości tarcia. Badany model przewiduje istnienie tzw. kanałów inter- i intramicelarnych - struktur pozwalających na anomalny transport protonów, powodujących efekt elektrostatycznego rozpychania powierzchni trących. Zjawiska zachodzące w układzie w kilku skalach przestrzennych: od skali atomowej do mezoskopowej, opisywane są przez fizykę materii miękkiej. Stosując modele analityczne, metodę dynamiki molekularnej oraz metody eksperymentalne badane są poszczególne aspekty układu. Wszystkie zjawiska są od siebie zależne stąd zmiana proporcji między składnikami cieczy skutkuje spadkiem funkcjonalności układu. Prawidłowa praca układu jest w głównej mierze odbiciem stanu powierzchni.

Praca ta składa się z siedmiu rozdziałów uporządkowanych tematycznie.

W rozdziale pierwszym opisuje się podstawy potrzebne do zrozumienia zjawisk zachodzących w układzie. Rozdział składa się z pięciu części. W części pierwszej przedstawiono podstawy zjawiska tarcia, z krótkim opisem reżimów oraz opis smarowania powierzchni trących. W kolejnej części opisano wybrane zagadnienia fizyki materii miękkiej, ze szczególnym uwzględnieniem koloidów i polimerów. Następnie przedstawiam budowę stawu naturalnego, skupiając się głównie na układzie chrząstki stawowej z opisem reżimów tarcia, którym jest poddawana w różnych fazach ruchu. Przedostatnia część opisuje odpychanie hydratacyjne, które według autora w największym stopniu wpływa na niską wartość tarcia w stawie. Opisano dwuwarstwy lipidowe oraz „szczoteczki” biorące udział w tarcu granicznym. Ostatnia część opisuje mechanizm Grotthuss'a transportu protonów w wodzie.

Drugi rozdział opisuje dynamikę molekularną oraz jej modyfikacje. Przedstawiono również wielkości wykorzystywane na potrzeby tej pracy i obliczane dzięki dynamice molekularnej.

Rozdział trzeci zawiera opis modelu ułatwionego smarowania. Przedstawiono model koncentracji lipidów w cieczy synowialnej w dwóch strefach: przypowierzchniowej oraz międzypowierzchniowej oraz zjawisko tribomicelizacji - kinetyki chemicznej powstającej miceli. Model wiąże zjawiska w skali mezoskopowej jak dynamika powierzchni oraz

micelizacja z transportem jonów. Przedstawiono numeryczne obliczenia układu z interpretacją fizyczną. Dopasowano również funkcje wynikające z modelu do danych doświadczalnych. Wykorzystując metodę MNET (mesoscopic non-equilibrium thermodynamic) opisano transport protonów w tzw. kanałach micelarnych jako zależny od koncentracji jonów oraz grubości kanału.

Rozdział czwarty prezentuje interakcje między lipidami (PL) a kwasem hialuronowym (HA). Przedstawiono analizę danych opublikowanych dotyczących HA oraz PL w normalnych oraz anormalnych warunkach. Następnie na podstawie badań elektroforetycznych omówiono właściwości związków tych elementów - zmiany koncentracji lipidów w anormalnych warunkach powodują negatywne skutki dla mechanizmu sieciowania i transportu protonów. Głównym elementem tego rozdziału są symulacje komputerowe cząsteczek HA i PL w roztworze fizjologicznym. Zależność tych interakcji od koncentracji lipidów oraz pH przedstawione są przez ewolucję promienia bezwładności oraz innych obserwabli opisujących cechy geometryczne HA. Dodatkowo opisano ilościowo wpływ oddziaływań hydrofobowych oraz wiązań wodorowych na zjawisko. Model Rouse'a wykorzystany został do opisu dynamiki łańcucha polimeru HA w celu lepszego zrozumienia zjawiska.

W rozdziale piątym przedstawiono efekt wpływu micel na zjawisko tarcia. Przedstawiono wyniki symulacji komputerowych dwóch micel oddziałujących ze sobą w środowisku wodnym dla stałej prędkości dryfu wyrażonej przez liczbę Peclet'a. Symulacje wykonane zostały dla micel prostych i odwrotnych (obie konfiguracje występują w cieczy synowialnej). Pokazano również interakcje micel przy występowaniu przepływów ścinających, gdzie efekt hydratacyjnego odpychania powierzchni hydrofobowych pokazuje przydatność micel jako struktur użytecznych w smarowaniu. W ostatniej części pokazano micelę poddawaną periodycznemu naciskowi przez dwie powierzchnie grafitowe. Badanie odpowiedzi miceli na periodyczny nacisk daje możliwość zrozumienia jej udziału w „przenoszeniu” periodycznych (nano)obciążeń.

Rozdział szósty rekapitułuje prace wykonane w ramach doktoratu oraz ich powiązanie między sobą w celu przedstawienia spójnej teorii opisywanego zjawiska.

Rozdział siódmy stanowi podsumowanie pracy. Przedstawiono perspektywy pracy jak również przedstawiono potencjalne zastosowanie otrzymanych wyników.

## Abstract

This thesis presents a description of friction and lubrication mechanisms when applied to natural system of articular cartilage. The presented model of facilitated lubrication of articular cartilage explains a multiscale phenomenon during application of an external quasi-normal load to the surfaces. The model is applied to explain degeneration of articular cartilage surface as well as synovial fluid in terms of its composition. Molecular dynamics simulations as well as analytical description are employed to describe these phenomena. Presented work is divided into 7 chapters.

First chapter describes the theory behind friction and lubrication. The chapter consists of 5 subsections essential for understanding all occurrences in the system. First one introduces friction and lubrication phenomenon. The basics of Soft Matter Physics as well as physiology of articular cartilage are presented in terms of their connection to friction/lubrication mechanism. Finally, the key factors of hydration repulsion and Grotthuss mechanism are discussed.

Second chapter presents the theory of molecular dynamics simulation and its several varieties: full-atom, coarse grained and steered molecular dynamics.

Third section depicts a facilitated lubrication mechanism. The model is delivered by applying dispersive kinetics as a description of PLs concentration fields. Then by modification of model variables one can discuss a physical explanation. Finally, MNET dynamics is used to describe dynamics of proton channels as interplay between overcrowding of protons and confinement of a channel.

Fourth part presents on hyaluronic acid and phospholipids interactions. The literature study provides a first step towards understanding processes occurring in normal and abnormal synovial fluid. Results of microelectrophoresis on HA/PL complexes are presented in terms of cross-linking mechanism as well as proton transport. Finally, molecular dynamics simulations of HA:PL complexes are presented for different pHs and PLs concentrations. The results are rationalized in terms of Rouse model.

Fifth chapter presents steered molecular dynamics study on micelles' interactions and their impact on overall process.

Sixth part presents recapitulation of all works published for this thesis and a connection between them.

The last chapter summarizes and addresses a future application of presented studies.

# Spis treści

<b>1</b>	<b>Wprowadzenie</b>	<b>7</b>
1.1	Tarcie i smarowanie . . . . .	8
1.2	Wybrane zagadnienia fizyki materii miękkiej . . . . .	10
1.3	Chrzątka stawowa . . . . .	13
1.4	Smarowanie hydratacyjne . . . . .	15
1.5	Mechanizm Grotthussa . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Metody obliczeniowe fizyki</b>	<b>18</b>
2.1	Dynamika molekularna . . . . .	19
2.2	Modelowanie molekularne . . . . .	22
2.2.1	Modele gruboziarniste . . . . .	22
2.2.2	Sterowana dynamika molekularna . . . . .	24
2.2.3	Wielkości wyznaczone za pomocą MD . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Model ułatwionego smarowania</b>	<b>27</b>
3.1	Model matematyczny . . . . .	28
3.2	Kanały protonowe w mechanizmie smarowania . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Oddziaływanie HA/PL w mechanizmie smarowania</b>	<b>38</b>
4.1	Wprowadzenie . . . . .	40
4.2	Badania elektroforetyczne . . . . .	42
4.3	Symulacje komputerowe . . . . .	44
4.4	Model Rouse'a . . . . .	54
4.5	Podsumowanie . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Tarcie w skali mezo i nanoskopowej</b>	<b>62</b>
5.1	Oddziaływanie trączy micel . . . . .	64
5.1.1	Ruch micel w przepływie ścinającym . . . . .	67
5.1.2	Micele odwrotne . . . . .	69
5.2	Symulacje nacisku na micle . . . . .	71

<i>SPIS TREŚCI</i>	6
5.3 Podsumowanie . . . . .	77
<b>6 Podsumowanie badań własnych</b>	<b>78</b>
<b>7 Podsumowanie i perspektywy</b>	<b>81</b>



# Rozdział 1

## Wprowadzenie

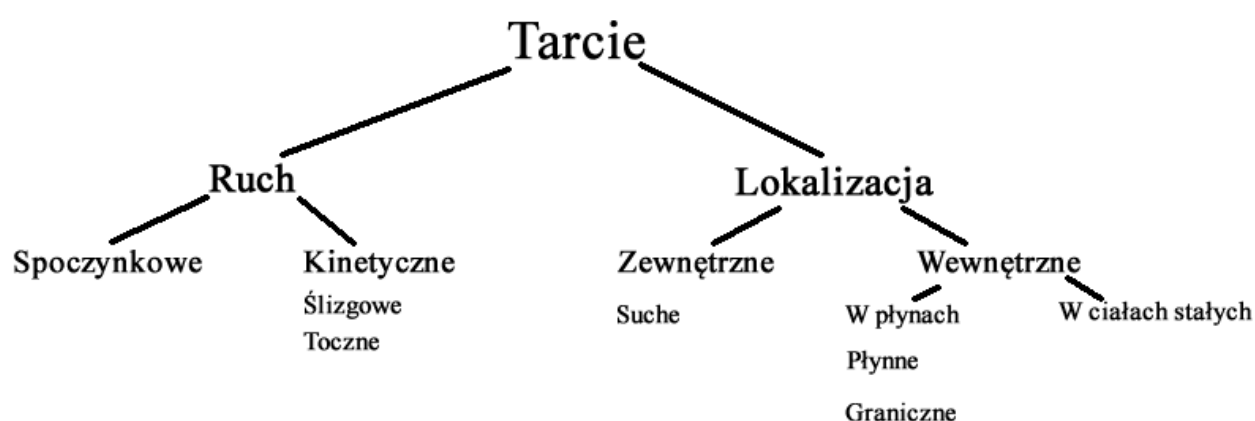
Tribologia jest nauką zajmującą się zjawiskiem tarcia, smarowania, adhezji i zużycia powierzchni trących. Interdyscyplinarny charakter polega na wykorzystaniu narzędzi fizyki, mechaniki oraz chemii. Problem, który opisuję w niniejszej pracy dotyczy zjawiska tarcia w układach biologicznych, a szczególnie w stawach naturalnych i mieści się w opisie działu biotribologii (Nosonovsky 2010). Praca ta ma zatem na celu przybliżenie zjawiska tarcia chrząstki stawowej jako układu dwóch powierzchni trących oraz rozdzielających je cieczy smarującej. Chrząstka stawowa jest rodzajem tkanki pokrywającej zakończenia kości w stawach. Ruch stawów charakteryzuje się niskim współczynnikiem tarcia i dużą odpornością na zużywanie. Poniższy rozdział ma na celu zapoznanie czytelnika z pewnym zakresem wiedzy biotribologicznej.

## 1.1 Tarcie i smarowanie

Zjawisko tarcia ze względu na swoją złożoność nie doczekało się do tej pory jednej, spójnej teorii. Ze względu na miejsce występowania możemy je podzielić na tarcie wewnętrzne i zewnętrzne (Rysunek 1.1). Teoria opisująca tarcie wewnętrzne jest dobrze ugruntowaną teorią. Tarcie zewnętrzne to zjawisko o bardzo złożonej naturze ze względu na ogrom efektów towarzyszących (Nosonovsky 2010, Scherge & Gorb 2001). Zjawiska adhezji i zużywanie powodują, że opis zjawiska się komplikuje (Scherge & Gorb 2001). Jeśli dodamy do tego możliwość dodania trzeciego składnika - smaru, do układu, schemat komplikuje się jeszcze bardziej (również ilość smaru determinuje całkowicie nowe cechy układu). Mimo tych problemów już od początku rozwoju nowoczesnej nauki próbowano opisać zjawisko tarcia. Klasyczną teorią opisującą tarcie jest teoria Coloumb'a-Amontons'a. W swoich badaniach doszli oni do wniosku, że siła tarcia nie zależy od wielkości powierzchni trących ani od prędkości poślizgu (do podobnych wniosków doszedł na przełomie XV i XVI wieku Leonardo da Vinci). Zgodnie z ich teorią, siła tarcia zależy wyłącznie od ciężaru ciała  $N$  i współczynnika tarcia  $\mu$  według zależności:

$$F = \mu \cdot N. \quad (1.1)$$

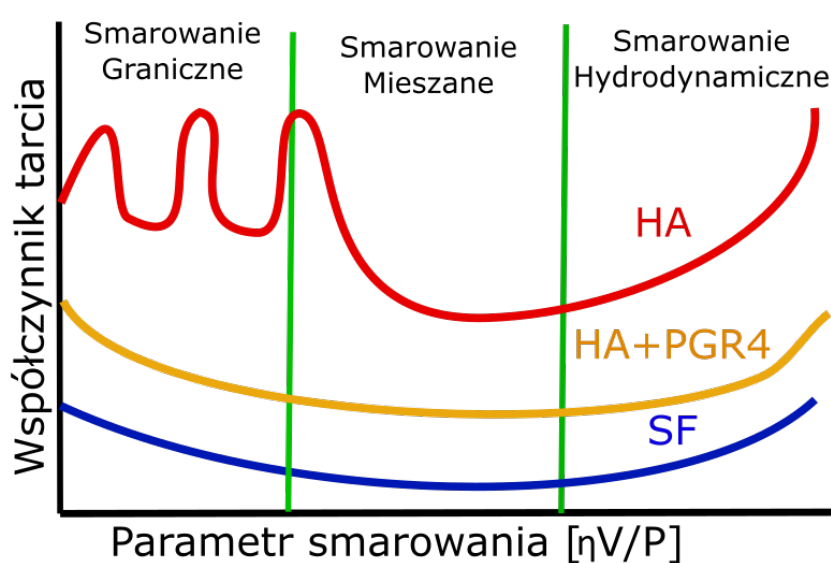
Teoria ta funkcjonuje jako dobre przybliżenie w skali makroskopowej dla większości materiałów dla tarcia suchego (Rysunek 1.1). Występowanie tarcia jest konsekwencją chropowatości powierzchni trących. Jednak swój wkład ma również siła adhezji zwiększająca się ze zmniejszaniem chropowatości.



Rysunek 1.1: Podział rodzajów tarcia ze względu na typ ruchu i lokalizację. W niniejszej pracy opisujemy tarcie kinetyczne, zarówno ślizgowe jak i toczne. W zakresie lokalizacji mamy do czynienia z tarcie wewnętrzne w płynach: płynnym i granicznym.

Ze względu na brak możliwości całkowitego wyeliminowania zjawiska tarcia stosuje się

metody mające na celu obniżenie jego wartości. Podstawowym sposobem jest użycie środka smarującego mającego na celu wypełnienie mikro-nierówności płynem. Ze względu na ilość tego płynu możemy wyróżnić kilka rodzajów smarowania: graniczne, mieszane oraz hydrodynamiczne (Rysunek 1.2). Reżimy smarowania jak widać na rysunku różnią się ilością środka smarującego. Jeżeli ilość smaru będzie zbyt duża zwiększy to siły tarcia. Efektywna praca stawu możliwa jest dzięki płynnemu przechodzeniu między reżimami smarowania w różnych fazach ruchu stawów.



Rysunek 1.2: Krzywa Stribeckiego pokazująca reżimy tarcia w zależności od grubości warstwy smarującej i składu cieczy (Jay & Waller 2014). Smarowanie cieczy stawowej (SF) jest bardziej efektywne w porównaniu do układu kwasu hialuronowego (HA) oraz HA z lubrycyną (PGR4). Bezwymiarowy parametr smarowania (inaczej nazywany liczbą Hersey'a  $He$ ): zmienna  $\eta$  oznacza lepkość,  $P$  - obciążenie,  $V$  - prędkość przemieszczania się powierzchni.

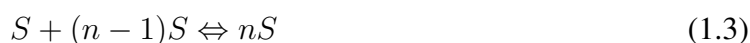
## 1.2 Wybrane zagadnienia fizyki materii miękkiej

Procesy opisywane w tej pracy mają związek z procesami zachodzącymi w organizmach żywych. Fizyka Materii Miękkiej (MM) jest działem Fizyki Fazy Skondensowanej i zajmuje się badaniem substancji typu: żele, polimery, koloidy, czyli składników budujących komórki i tkanki organizmu. Termin materia miękka odnosi się do modułu sztywności materiałów znajdujących się w spektrum zainteresowania tej dziedziny:  $G \sim 10^1 \div 10^9 Pa$ . Układy MM silnie reagują na małe zmiany zewnętrzne zachowując się w sposób nieliniowy, dodatkowo są bardzo podatne na fluktuacje termiczne. W skali przestrzennej rozmiary rozważanych modeli rozciąga się od 10 do 1000 nanometrów, czyli w tzw. skali mezoskopowej. Bardzo ważnym zjawiskiem obserwowanym w badanych układach jest zjawisko samoorganizacji, gdy cząsteczki określonego typu związków samorzutnie tworzą uporządkowane struktury (Marsh 2012) typu micelle, dwuwarstwy itp. (Rysunek 1.4). Układy MM (lub ciecze złożone) charakteryzują się występowaniem dwóch podstawowych typów oddziaływań. Pierwszym rodzajem są oddziaływania typu dipol-dipol (bądź wodorowe) są odpowiedzialne za kształtowanie organizacji atomów w cząsteczce. Drugim rodzajem są oddziaływania hydrofobowe, wynikające z zakazu Pauli'ego nadające cząsteczkom ich kształt i odpowiadają za ich położenie względem sąsiadów w przestrzeni. Oddziaływanie hydrofobowe odpowiedzialne jest za kształtowanie relacji między cząsteczkami polarnymi-hydrofilowymi, a niepolarnymi - hydrofobowymi.

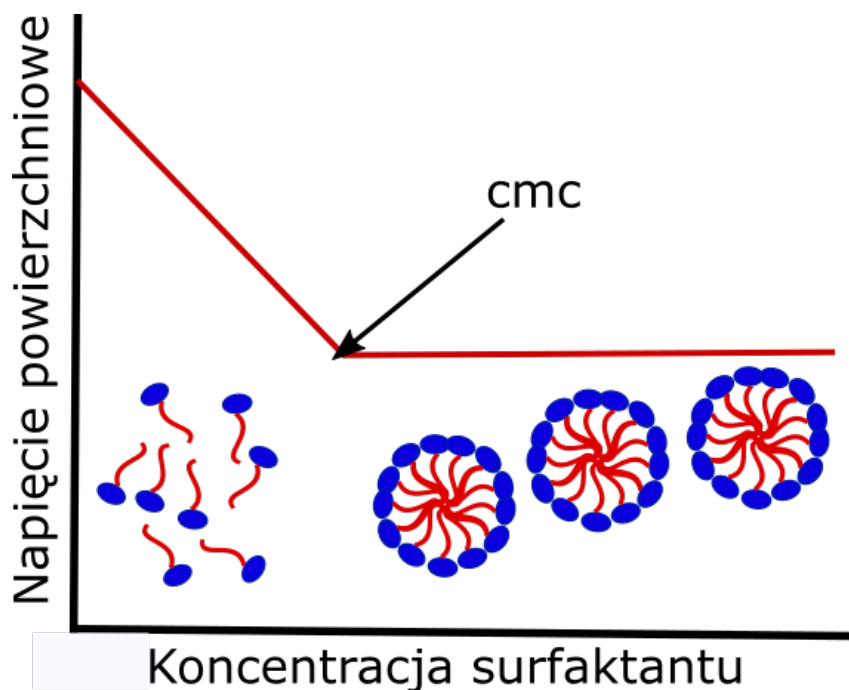
Tworzenie miceli wiąże się ze zmianą energii swobodnej Gibbsa  $\Delta G$  zależną od  $cmc$  (ang. critical micelle concentration - cmc) według wzoru:

$$\Delta G_{mic} = \mu_{mic} - \mu_{solv} = R \cdot T \cdot \ln(cmc). \quad (1.2)$$

Wielkości  $\mu_{mic}$  i  $\mu_{solv}$  opisują potencjały chemiczne miceli i rozpuszczalnika, zaś  $R$  to stała gazowa. Proces tworzenia miceli z pojedynczych surfaktantów  $S$  przebiega wg schematu addycji :



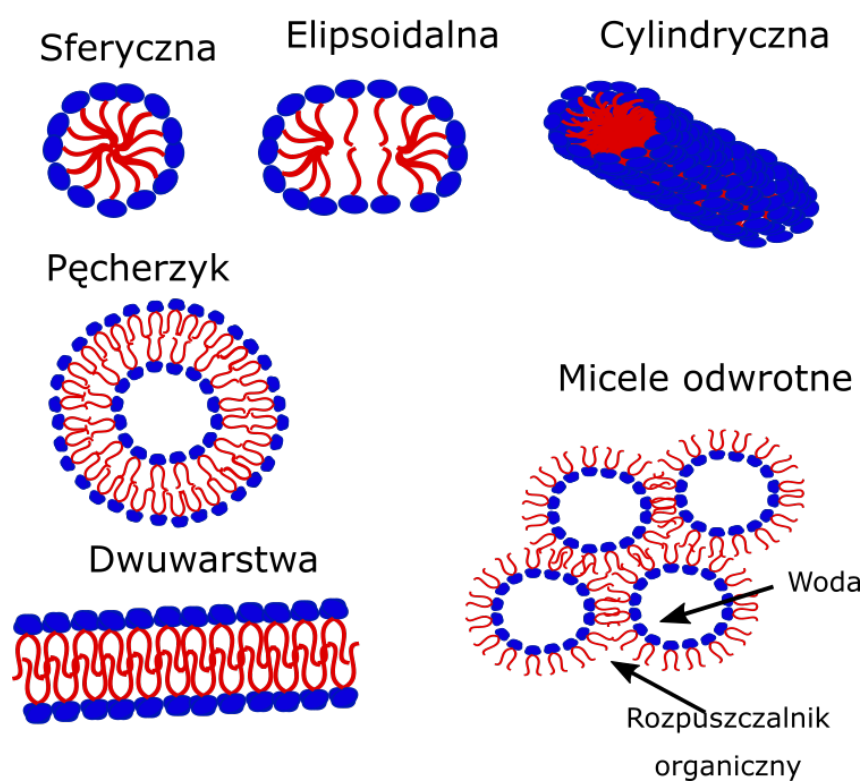
Oddziaływanie hydrofobowe, przejawiające się awersją cząsteczki w stosunku do cząsteczek wody, pełni ważną rolę w kształtowaniu interakcji między cząsteczkami hydrofobowymi a polarnymi - hydrofilowymi. Na wielkość tego oddziaływania istotny wpływ ma nie tylko odległość, ale również typ uporządkowania cząsteczek wody, generowany przez obecnych w układzie polarnych sąsiadów, a zatem zarówno wielkość jak i układ otoczenia hydratacyjnego. Na krótkich odległościach przewyższa ono o rząd wielkości potencjał van der Waalsa, natomiast zanika w sposób eksponencjalny wraz ze wzrostem odległości (zasięg rzędu  $1 \div 2nm$ ). Ważnymi grupami opisywanymi przez MM są surfaktanty oraz polimery. Związki te funkcjonują



Rysunek 1.3: Graficzna reprezentacja wpływu koncentracji na samoorganizację cząsteczek lipidów w formie micel. cmc (critical micelle concentration) opisuje koncentrację powyżej, której lipidy tworzą formy złożone.

w skali uporządkowania zwanej mezofazą, której stopień uporządkowania jest określany pomiędzy brakiem uporządkowania cieczy izotropowej a porządkiem mającym miejsce w pełni uporządkowanym kryształ. Własność ta powoduje różnice w stosunku do klasycznych cieczy, które są izotropowe i nie posiadają uporządkowania orientacyjno-translacyjnego. Ze względu na problem obrazowaniem struktury układów MM trzeba stosować modele przybliżone. W tym celu stosuje się techniki komputerowe pozwalające na odtworzenie zachowania w układach *in silico*.

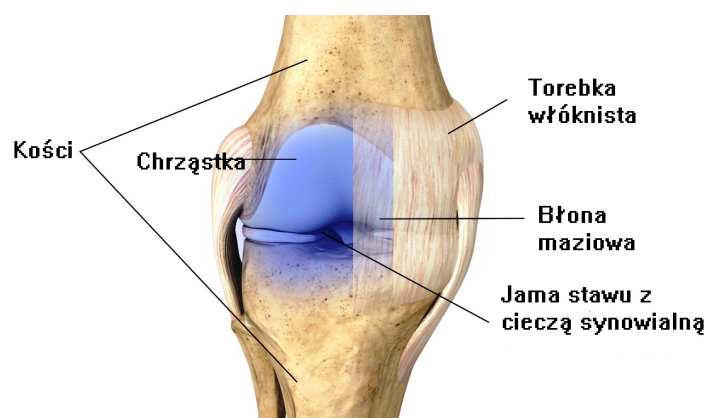
## Kształty micel



Rysunek 1.4: Typy micel występujące w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych.

### 1.3 Chrzątka stawowa

Modelowym obiektem badań przedstawionym w tej pracy jest układ chrząstki stawowej. Układ składa się z dwóch poro-elastycznych powierzchni trących oraz cieczy smarującej zwanej cieczą synowialną (Rysunek 1.5). Chrzątka stawowa jest elementem lepkosprężystym zbudowanym z chondrocytów, kolagenu, kwasu hialuronowego (Garg & Hales 2004), wody oraz innych składników (Wright & Dowson 1976). Ilość mazi stawowej w jednym stawie wynosi 3 ÷ 5 ml i jest cieczą nienewtonowską: współczynnik lepkości dynamicznej wynosi od 1 mPas do 4 Pas (Jebens & et al. 1959). Dodatkowo powierzchnie smarowane są cieczą synowialną złożoną z: wody do 70%, proteoglikanów, kwasu hialuronowego, fosfolipidów oraz innych składników. Rolą cieczy synowialnej jest odżywianie chrząstki, smarowanie oraz amortyzacja nacisku na chrząstkę.



Rysunek 1.5: Anatomiczna budowa stawu kolanowego - największego stawu w ludzkim ciele.

W prawidłowo zbudowanym i zdrowym stawie człowieka warstwa mazi stawowej oddziela współpracujące powierzchnie kości stawu i zapewnia występowanie tarcia płynnego. Faza wodnista cieczy synowialnej jest łatwo wciśnięta w porowata chrząstkę, a większe cząstki kwasu hialuronowego pozostają w szczelinie smarowniczej, zapobiegając wystąpieniu tarcia suchego. Te niezwykle własności cieczy synowialnej, wyrażające się zdolnością przystosowywania się do zmiennych obciążeń stawów, zapewniają prawidłowe warunki funkcjonowania układu kostno-stawowego człowieka. K. Wierzcholski (Wierzcholski 2006) wyróżnia cztery podstawowe rodzaje tarcia, które mogą wystąpić w przypadku stawów. Tarcie płynne występuje w zdrowym stawie, gdy powierzchnie oddzielone są warstwą kilkudziesięciu mikrometrów cieczy synowialnej. Siła tarcia i współczynnik tarcia wyrażone są:

$$F_R = \frac{\eta VA}{h}; \mu = \frac{F_R}{P}, \quad (1.4)$$

gdzie:  $\eta$  to lepkość dynamiczna cieczy,  $V$ -prędkość ścinania,  $A$ - powierzchnia stykających się powierzchni kostnych,  $h$ -średnia grubość warstwy smarującej,  $P$ -siła nacisku.

Tarcie elastohydrodynamiczne jest efektem wystąpienia dużych obciążeń. Grubość warstwy smarnej zmienia się od 0.10 do 1.00  $\mu m$ . Długość strefy kontaktu dochodzi do 0.10 mm. Przy tym rodzaju tarcia wysokość chropowatości tkanki kostnej jest porównywalna z grubością warstwy smarującej wytworzonej przez maź stawową.

Tarcie graniczne zachodzi gdy powierzchnie trące kości są oddzielone warstwą smaru o grubości poniżej 1  $\mu m$ . Znajdująca się na powierzchni styku kości uporządkowana warstwa graniczna o grubości rzędu  $10^{-11} \div 10^{-10}$  m jest pod działaniem sił elektrostatycznych. Oddziaływanie tego pola może powodować zwiększenie przestrzennego upakowania i uporządkowania cząstek, czego efektem jest wzrost lepkości i gęstości cieczy synowialnej w porównaniu z wartością lepkości dynamicznej normalnego filmu smarowego występującego podczas tarcia płynnego.

Tarcie mieszane (gdzie występują obszary z i bez smaru) występuje na ogół przy małych prędkościach i dużych naciskach, np. w przypadku rozpoczęcia ruchu. W przypadku niedostatecznej ilości mazi stawowej w zmienionych chorobowo stawach tylko część powierzchni tkanki kostnej jest oddzielona substancją smarową, a w pewnych obszarach wystąpi bezpośredni styk tkanki kostnej.

Chrzątka stawowa jest organem podatnym na urazy. Najczęstszą chorobą dotykającą stawy jest osteoartroza (OA) -choroba polegająca na zaniku chrząstki w stawie pod wpływem czynników mechanicznych lub fizjologicznych. Tabela 1.3 pokazuje skład cieczy w różnych etapach rozwoju choroby. Warto podkreślić, że OA powoduje także zmianę pH środowiska cieczy synowialnej co ma zasadnicze znaczenie w modelu ułatwionego smarowania zaprezentowanym w tej pracy.

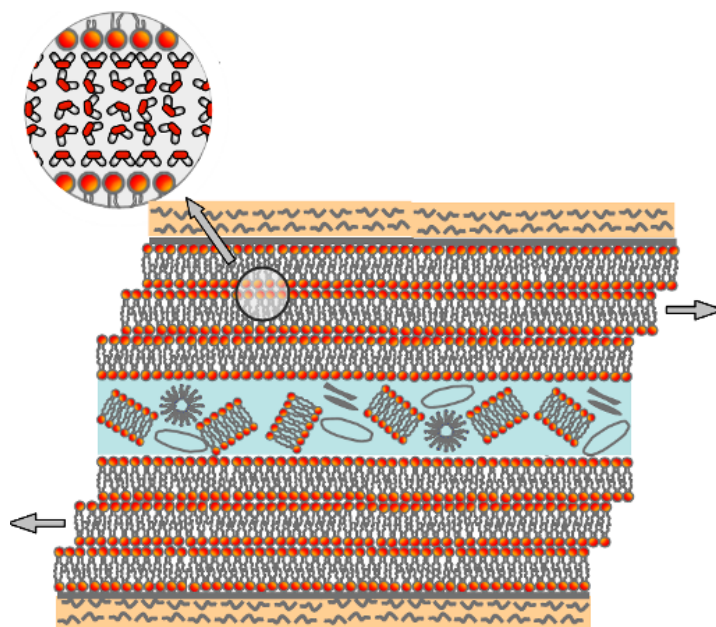
Parametr	Zdrowa	Wczesna OA	Późna OA	RA
Lubrycyna( $\mu g/mL$ )	364	244	152	139
Fosfolipidy(nmol/mL)	314.2	643.8	758.8	877.7
Kwas hialuronowy(mg/mL)	2.2	1.7	1.9	1.0
pH	7.3	7.6	8.1	6.8

Tablica 1.1: Skład cieczy synowialnej w różnych stanach chorobowych (Kosińska & et al. 2015).



## 1.4 Smarowanie hydratacyjne

Agregaty lipidowe występują w przyrodzie m.in. jako błony komórkowe. Budowa lipidu z hydrofobowym neutralnym elektrostycznie ogonem oraz hydrofilową naładowaną główką determinuje jego właściwości. W środowisku wodnym formy zagregowane oddziałują ze sobą zapewniając dodatkowe właściwości. Wielu autorów przekazało doniesienia dotyczące zjawiska odpychania hydratacyjnego (Klein 2013, Pawlak & Oloyede 2008, Pawlak et al. 2010, 2016). Zjawisko polega na elektrostycznym odpychaniu form zagregowanych. W pracy (Pawlak et al. 2010) prof. Pawlak przedstawił zależność między pH a współczynnikiem tarcia dla dwóch warstw lipidowych trących o siebie w środowisku soli fizjologicznej. W zakresie fizjologicznego pH (powyżej 7.4) współczynnik tarcia w funkcji pH osiąga minimum, co związane jest właśnie z opisywanym efektem (Hills 2000, Daniel 2012). W pobliżu naładowanej elektrostycznie warstwy cząsteczki wody tworzą uporządkowane struktury wywołując efekt odpychania jak pokazano na Rysunku 1.7. W reżimie smarowania



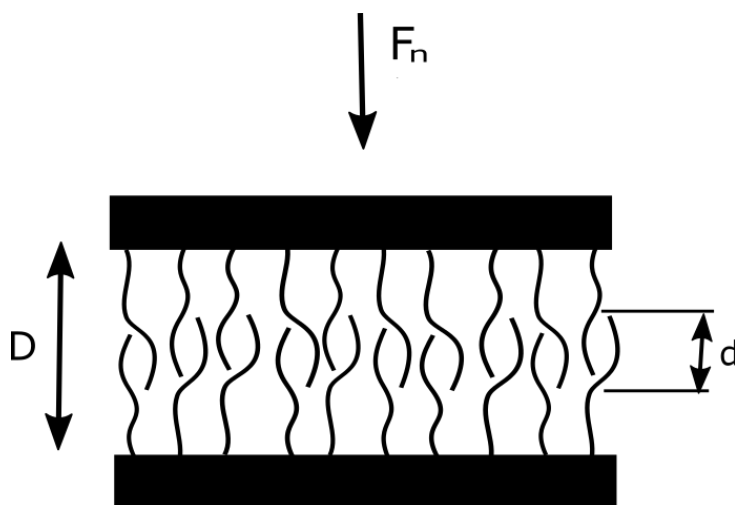
Rysunek 1.6: Tarcie dwóch powierzchni stawowych pokrytych dwuwarstwami lipidowymi. Powiększenie fragmentu na granicy dwuwarstw ukazuje uporządkowanie cząsteczek wody w pobliżu powierzchni dwuwarstwy. Zaczerpnięte z pracy (Pawlak et al. 2016).

granicznego przestrzenie międzypowierzchniowe są na tyle małe ( $100\mu m$ ), że potrzebny jest dodatkowy mechanizm zmniejszający tarcie. W tym zakresie najefektywniejszymi formami są tzw. „szczotki” tworzone przez lubrycyne, HA i lipidy (uproszczony obraz tej struktury pokazano na Rysunku 1.7). To tzw. smarowanie szczotkowe (Seror & et al. 2011). Przyczyną silnego efektu smarowania zapewnianej przez polimerowe szczotki jest to, że są one w stanie przenosić duże obciążenie normalne, utrzymując międzyfazowy płynny obszar pomiędzy nimi

podczas przesuwania. Prowadzi to do bardzo małych oporów tarcia przeciwstawiających się ślizganiu, stąd niskie współczynniki tarcia. Efekt ten przypomina przenikania się dwóch włókien polimeru. Ze względu na silne odpychanie objętości wykluczonej podczas interakcji między oddziałującymi strukturami występuje silny opór. Można wykazać (Seror & et al. 2012), że wartość wzajemnego nakładania się włókien polimerowych  $d$  w bardzo małym stopniu zależy od ściśnięcia:

$$d \propto D^{-1/3} (D < 2L). \quad (1.5)$$

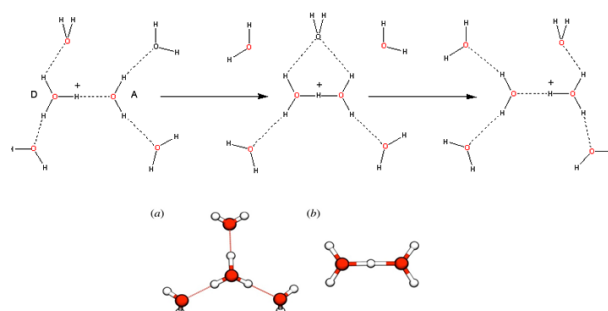
$L$  we wzorze oznacza długość włókna. Zatem pięciokrotne ściśnięcie szczotek zwiększy szerokość strefy przenikania o około 70%.



Rysunek 1.7: Mechanizm smarowania szczotek polimerowych. Wartość  $D$  opisuje odległość między powierzchniami.  $F_n$  to siła normalna przyłożona do powierzchni górnej.

## 1.5 Mechanizm Grotthussa

Transport jonów hydroniowych w wodzie jest zjawiskiem odgrywającym ważną rolę w wielu procesach biologicznych np. syntezie ATP. Model ułatwionego smarowania zakłada hipotezę, według której w wyniku nacisku zadanego w stawie, zerwaniu ulegają wiązania wodorowe w cząsteczkach wody (Gadomski et al. 2008). Tak powstałe kaskady jonów hydroniowych w przestrzeniach inter-micelarnych, tzw. kanałach micelarnych/jonowych, powodują rozpychanie włókien sieci kwasu hialuronowego, przyczyniając się w ten sposób do absorpcji nacisku i normalizacji smarowania (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013). Jony hydroniowe charakteryzują się bardzo wysoką przewodnością w wodzie, która wynosi ok.  $3.62 \cdot 10^{-3} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  i jest prawie 5 razy większa od kolejnego pod tym względem jonu amonowego (E.DeCoursey 2003). Mechanizm przewodnictwa jonowego opisywany jest przez tzw. mechanizm Grotthussa i powiązany z nim mechanizm - hoppingu (przeskakiwania) jonu hydroniowego. Mechanizm ten opisał pierwszy raz Theodor Grotthuss w 1806 roku, starając się w ten sposób wyjaśnić wysokie przewodnictwo jonowe wody. W mechanizmie Grotthussa jon hydroniowy przemieszcza się poprzez wiązanie wodorowe z kolejnymi klastrami wody. Jednak badania z XX wieku prowadzone przez min. Manfreda Eigena i Noama Agmona pokazują zmodyfikowany i zgodny z danymi eksperymentalnymi obraz (Agmon 1995, Cukierman 2006). Mianowicie: woda składająca się m.in. ze struktur typu: kation Zundela ( $H_5O_2^+$ ) i Eigena ( $H_9O_4^+$ ), (Patrz Ryunek .1.8) dolna część a) i b). Transport odbywa się (Rys. 1.8) poprzez zrywanie wiązania w jonie Eigena tworząc kompleks jonu Zundela i wody po czym struktura ta odtwarza się w następnym kroku transportu. Transport Grotthussa pełni także ważną rolę w transporcie jonów w dwuwarstwach lipidowych.



Rysunek 1.8: Mechanizm Grotthussa. W górnej części widzimy najbardziej prawdopodobny mechanizm działania: z jonu Zundela do Eigena i z powrotem do Zundela. Dolna część przedstawia dwa rodzaje jonów: a) Zundela, b) Eigena.

## Rozdział 2

# Metody obliczeniowe fizyki

Złożoność układów fizycznych oraz limity zastosowań metod eksperymentalnych wymuszają tworzenie narzędzi wykorzystujących metody numeryczne. Metody te wykorzystują coraz lepiej rozwiniętą infrastrukturę komputerową oraz wyrafinowane techniki obliczeniowe. Do metod takich możemy zaliczyć metodę Monte Carlo (MC), dynamikę molekularną (MD), automaty komórkowe (CA) oraz inne (Heermann 1997). Metoda dynamiki molekularnej, którą wykorzystano w tej pracy jest powszechnie stosowaną do symulacji zarówno układów biologicznych jak i fizycznych oraz chemicznych. Metoda ta pozwala na badanie układów atomowych jak i takich, w których skala przestrzenna sięga mikrometrów, a skala czasowa - milisekund. W tym celu stosuje się wyrafinowane algorytmy pozwalające na badanie układów z założonym stopniem ogólności. W rozdziale tym zaprezentowano przegląd metod numerycznych wykorzystywanych na potrzeby pracy. Różnorodność zastosowanych technik wynika z różnej skali opisu interesującego mnie zagadnienia od skali nano do mezoskopowej. Jak wspomniano w poprzednim rozdziale mechanizm tarcia jest procesem wieloskalowym. Zjawiska zachodzą zarówno w skali nanoskopowej jak również obserwuje się efekty kwantowe - bardzo istotne dla mechanizmu ułatwionego smarowania.

## 2.1 Dynamika molekularna

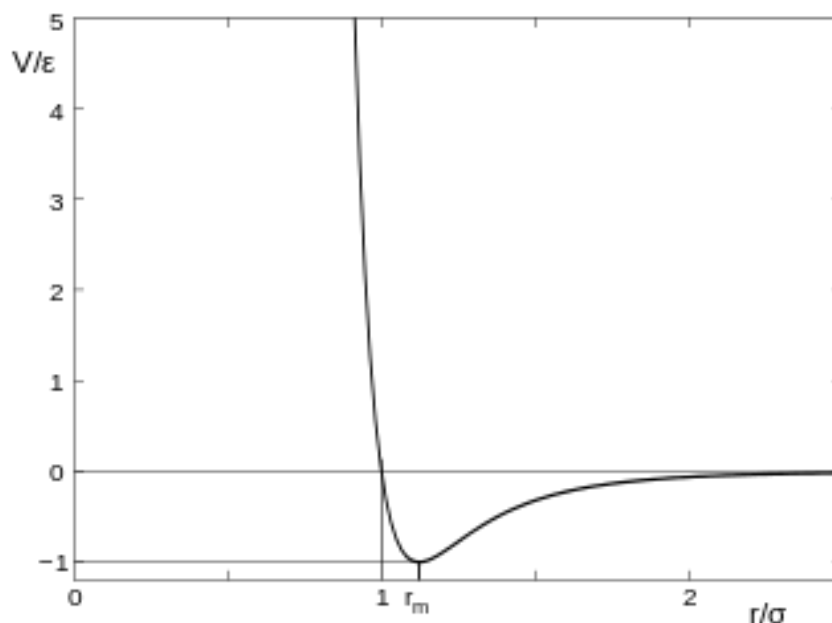
Dynamika molekularna (MD-molecular dynamics) jest metodą polegającą na numerycznym rozwiązywaniu zespołu równań Newtona dla każdej z  $N$  cząsteczek i komputerowej symulacji przestrzeni fazowej dla modelu układu molekuł (Rysunek 2.1):

$$F_i(t) = -\nabla_i \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N V(r_{ij}(t)), \quad (2.1)$$

gdzie  $F_i(t)$  jest siłą działającą na  $i$ -ty atom w chwili  $t$ , zaś  $V(r_{ij}(t))$  opisuje potencjał oddziaływania  $i$ -tego atomu z  $j$ -tym atomem znajdującym się w odległości  $r_{ij}$ . Potencjałem najczęściej występującym w MD jest potencjał 12-6, czyli potencjał Lennarda - Jones:

$$V(r) = 4\epsilon \left( \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right), \quad (2.2)$$

gdzie:  $\sigma$  oznacza odległość, dla której potencjał LJ równa się zero, a  $\epsilon$  oznacza siłę



Rysunek 2.1: Potencjał Lennarda-Jonesa w funkcji odległości między środkami mas atomów.

oddziaływania, zaś  $r$  to odległość między oddziałującymi atomami. Ze względu na to, że w symulacjach mamy do czynienia z dużą ilością atomów (sięgającą od setek do miliardów), przyjęto, że każdy z atomów oddziałuje tylko z atomami w bliskiej odległości  $2.5\sigma$ . Na Rysunku 2.1 przedstawiono jak potencjał L-J maleje powyżej  $r = \sigma$ . Stąd takie przybliżenie ma uzasadnienie, dodatkowo pozwala ono oszczędzić czas obliczeniowy. W pracy tej dodatkowo ze względu na obecność ładunków elektrycznych modelowanych cząsteczek wykorzystuje się

potencjał Coulomba:

$$V(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_1 q_2}{r^2}, \quad (2.3)$$

$q_1$  i  $q_2$  to ładunki atomów. Dodatkowo oddziaływania między atomami tworzącymi złożone struktury opisane są za pomocą tzw. potencjałów związania:

$$V(r) = k(r - r_0)^2, \quad (2.4)$$

$k$  oznacza stałą sprężystości, zaś  $r_0$  to długość wiązania. Dodatkowo pomiędzy trzema kolejnymi atomami występuje potencjał kątowy:

$$V_{\Theta}(r) = k_{\Theta}(\Theta - \Theta_0)^2, \quad (2.5)$$

$\Theta$  i  $\Theta_0$  określają kąt oraz kąt równowagowy. Dodatkowo mogą występować potencjały wiążące kąty dwusienne itp. W zależności od problemu dodaje się dodatkowe potencjały lub modyfikuje określone powyżej w celu osiągnięcia wymaganego stopnia szczegółowości układu. Po określeniu wszystkich interesujących nas oddziaływań rozwiązujemy równanie dla każdego z atomów w postaci:

$$m\ddot{r}(t) = F_i(t), i = 1 \dots N. \quad (2.6)$$

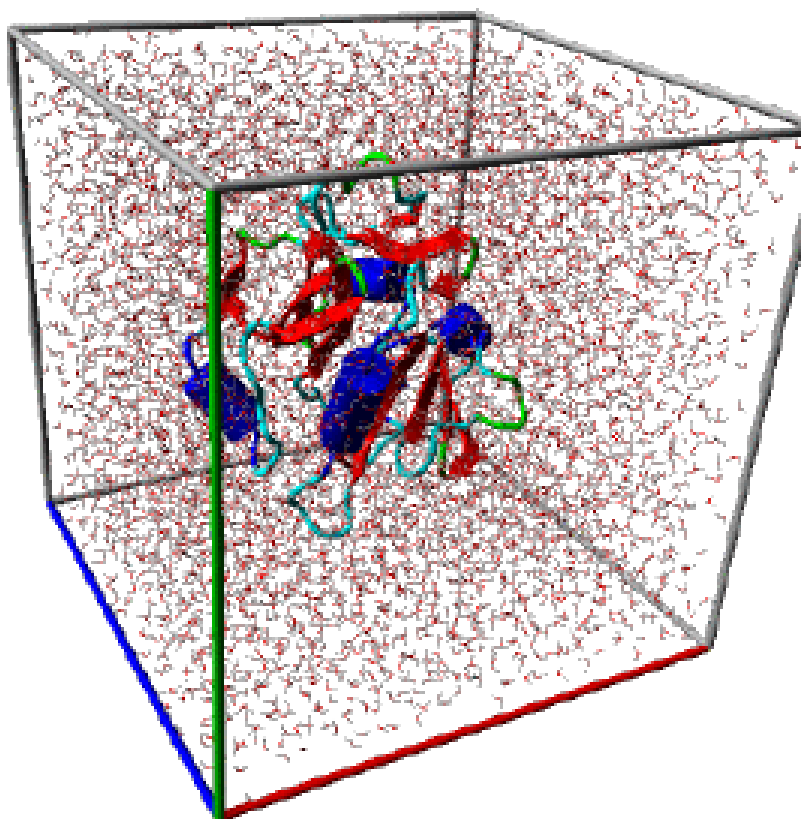
Używając algorytmu Verleta możemy wyliczyć położenie i prędkość za pomocą formuły:

$$r_i(t + \Delta t) \approx 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i}{m} \Delta t^2. \quad (2.7)$$

Istnieje szereg pakietów oprogramowania do prowadzenia symulacji dynamiką molekularną, najpopularniejsze to ABINIT (DFT), AMBER (model klasyczny), CHARMM, GROMACS, LAMMPS czy YASARA.

W symulacjach MD mamy do czynienia w wieloma problemami. Do głównych problemów należą utrzymywanie stałej temperatury układu, zachowanie stałej liczby cząsteczek oraz stałej energii całkowitej układu zamkniętego. W symulacjach możemy symulować kilka rodzajów zespołów statystycznych:

- mikrokanoniczny (NVE): ze stałą liczbą cząsteczek  $N$ , objętością  $V$  i energią  $E$ ,
  - kanoniczny (NVT): ze stałą liczbą cząsteczek  $N$ , objętością  $V$  i temperaturą  $T$ ,
  - izotermiczno - izobaryczny (NPT): ze stałą liczbą cząsteczek  $N$ , ciśnieniem  $P$  i temperaturą  $T$ .
- W celu zachowania stałej liczby cząsteczek używa się tzw. periodycznych warunków brzegowych. Procedura ta polega na traktowaniu ścianek pudła symulacyjnego jako takich, gdzie cząsteczka wychodząc z jednej ze ścian wchodzi z powrotem ścianą równoległą. W obliczeniach numerycznych korzystano z programu LAMMPS (Large-scale Atomic/Molecular



Rysunek 2.2: Białko w reprezentacji wstążkowej z wodą w pudle symulacyjnym.

Massively Parallel Simulator) (<http://lammps.sandia.gov/> n.d.) oraz YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application) (<http://yasara.org/> n.d.).

## 2.2 Modelowanie molekularne

W moich symulacjach komputerowych wykorzystam klasyczną dynamikę molekularną z użyciem pola siłowego AMBER (Cornell & et al. 1995) przy stałej wartości współczynnika pH (Swails & et al. 2014). Uzyskanie stałej wartości pH osiąga się przez modyfikację potencjału protonizacji - modyfikując oddziaływanie wodorów z innymi atomami i możliwość tworzenia wiązań wodorowych.

### 2.2.1 Modele gruboziarniste

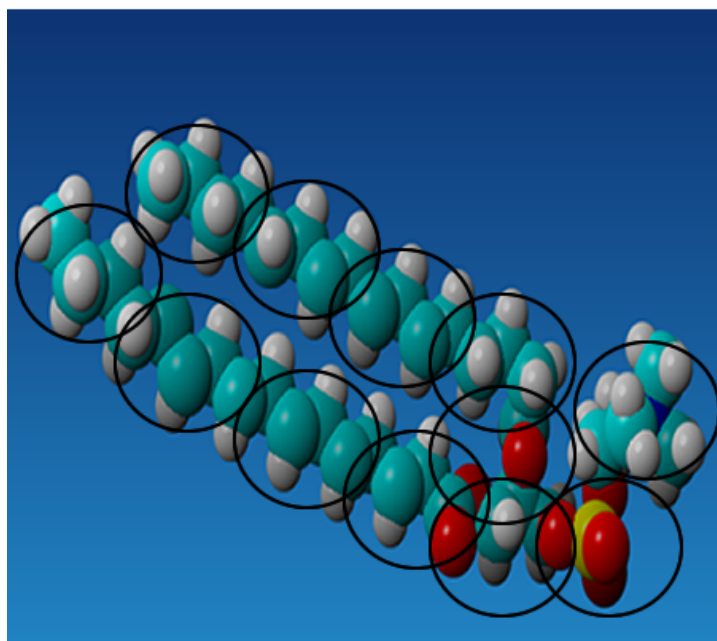
Złożoność układów biologicznych wymaga użycia nowych metod będących w stanie dokonać obliczeń w rozsądnym czasie i w większych skalach przestrzennych (Tozzini 2005) wymusiła opracowanie modeli gruboziarnistych - coarse-grained (CG). Modele pozwalają na osiągnięcie większych skal czasowych i przestrzennych w porównaniu z klasycznym podejściem. Model gruboziarnisty zakłada, że grupę atomów traktujemy jako jeden 'koralik', który posiada uśrednione właściwości całej grupy atomów. Do najbardziej znanych modeli gruboziarnistych należy pole siłowe MARTINI, stworzone przez Marrink'a et al. (Marrink et al. 2007). Pole to zostało we wstępnej wersji zaproponowane do odtwarzania interakcji między lipidami a wodą, jednak z czasem rozrosło się tak, aby móc konstruować modele aminokwasów, DNA, białek, polimerów. MARTINI definiuje 4 podstawowe grupy atomów, z których można zbudować wymienione cząsteczki. W skład podstawowych składowych potencjału MARTINI wchodzi cząsteczki: polarne (P), niepolarne (N), apolarne (C) oraz naładowane (Q). Każdy z tych rodzajów ma dodatkowo swoje podgrupy (4 lub 5) i całkowita liczba „cegielek” to 18. Istnieje jeszcze dodatkowa klasa oddziaływań, z których korzystam w tej pracy - a mianowicie potencjał pozwalający tworzyć hydrofobowe powierzchnie typu grafen lub grafit (Gobbo & et. al. 2013). Model ten oferuje dodatkowo trzy rodzaje gruboziarnistej wody i pozwala na tworzenie nowych gruboziarnistych cząsteczek (Marrink & Tieleman 2013). Interakcje między cząsteczkami opisywane są przez: zmodyfikowany potencjał van der Waalsa (VdW)(Marrink et al. 2007) oraz potencjał Coulombowski. Oddziaływanie VdW jest podzielone na 9 podstawowych rodzajów interakcji: od silnego do słabego z promieniem  $\sigma$  równym 4.7 lub 6.2 (Marrink et al. 2007). Krok czasowy waha się między 20-50 ps. W poniższej Tabeli 2.1 zaprezentowano rodzaje oddziaływań między gruboziarnistymi atomami. Pole siłowe MARTINI stosuje odwzorowanie 4 do 1, co oznacza, że jeden gruboziarnisty koralik reprezentuje cztery grupy atomowe np. 1 cząsteczka wody reprezentuje 4 rzeczywiste i jej masa to 72 au (Rysunek 2.3). Odwzorowanie takie zostało zastosowane tak, aby zachować kompromis między szybkością symulacji, a zachowaniem właściwości układu. W porównaniu z symulacjami w reprezentacji pełno-atomowej opisywany model pozwala wykonywać obliczenia 4-12 razy szybciej. Z tego względu model pozwala na symulowanie układów dochodzących do mikrometrów a w skali



sub	Q				P					N				C					
	da	d	a	0	5	4	3	2	1	da	d	a	0	5	4	3	2	1	
Q	da	O	O	O	II	O	O	O	I	I	I	I	I	IV	V	VI	VII	IX	IX
	d	O	I	O	II	O	O	O	I	I	I	I	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
	a	O	O	I	II	O	O	O	I	I	I	I	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
	0	II	II	II	IV	I	O	I	II	III	III	III	IV	V	VI	VII	IX	IX	
P	5	O	O	O	I	O	O	O	O	O	I	I	I	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	4	O	O	O	O	O	I	I	II	II	III	III	III	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	3	O	O	O	I	O	I	I	II	II	II	II	II	IV	IV	V	V	VI	VII
	2	I	I	I	II	O	II	II	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VII	
	1	I	I	I	III	O	II	II	II	II	II	II	III	IV	IV	IV	V	VI	
N	da	I	I	I	III	I	III	II	II	II	II	II	IV	IV	V	VI	VI	VI	
	d	I	III	I	III	I	III	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VI	VI	
	a	I	I	III	III	I	III	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VI	VI	
	0	IV	IV	IV	IV	IV	IV	III	III	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	V	VI	
C	5	V	V	V	V	V	V	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	V	V	
	4	VI	VI	VI	VI	VI	VI	V	IV	IV	V	V	IV	IV	IV	IV	V	V	
	3	VII	VII	VII	VII	VI	VI	V	V	IV	VI	VI	IV	IV	IV	IV	IV	IV	
	2	IX	IX	IX	IX	VII	VII	VI	VI	VI	VI	VI	V	V	V	IV	IV	IV	
	1	IX	IX	IX	IX	VIII	VIII	VII	VII	VI	VI	VI	VI	V	V	IV	IV	IV	

Tablica 2.1: Tabela oddziaływań między atomami różnych typów. W symulacjach wykonanych na potrzeby tej pracy oddziaływania między hydrofobowymi częściami lipidów zostały zwiększone dwukrotnie. Miało to na celu uniknięcie sytuacji, gdy interakcje między micelami powodowały wymianę lipidów jak i sytuacje, w której micelle ulegają zniszczeniu podczas kontaktu. Dla wszystkich rodzajów oddziaływań  $\sigma = 4.7$  poza oddziaływaniem IX gdzie promień ten wynosi 6.2 (Marrink et al. 2007).

czasowej do milisekund. W Rozdziale 5 zostaną przedstawione wyniki symulacji układu dwóch micel trących o siebie w środowisku wodnym.



Rysunek 2.3: Reprezentacja cząsteczki lipidu w modelu MARTINI. Lipidem najczęściej występującym w cieczy synowialnej jak i chrząstce stawowej jest lipid DPPC (dipalmitoylofosfadynocholina), przedstawiona na rysunku. W Rozdziale 5 zaprezentowano symulacje dwu micel prostych zbudowanych z surfaktantów DPC oraz dwu micel odwróconych zbudowanych z lipidów DPPC z wodą wewnątrz.

### 2.2.2 Sterowana dynamika molekularna

Modyfikacją klasycznej dynamiki molekularnej jest sterowana dynamika molekularna (ang. Steered Molecular Dynamics) (Israilewitz & et al. 2001), w skrócie SMD. Metoda polega na działaniu stałą zewnętrzną siłą na określony atom lub grupę atomów. Siła może być zadana na dwa sposoby: bezpośrednio - wymuszająca ruch ze zmienną prędkością lub poprzez połączenie wiążąc atom z wirtualnym atomem za pomocą wirtualnej sprężyny co skutkuje ruchem ze stałą prędkością - Rysunek 2.4. W wyniku działania siły następuje ruch cząsteczki w układzie lub jej zmiana konformacyjna. Siłę zewnętrzną działającą na atom definiujemy:

$$\vec{F} = -\nabla U, \quad (2.8)$$

oraz:

$$U = \frac{1}{2}k[v t - (\vec{r} - \vec{r}_0) \cdot \vec{n}]^2, \quad (2.9)$$

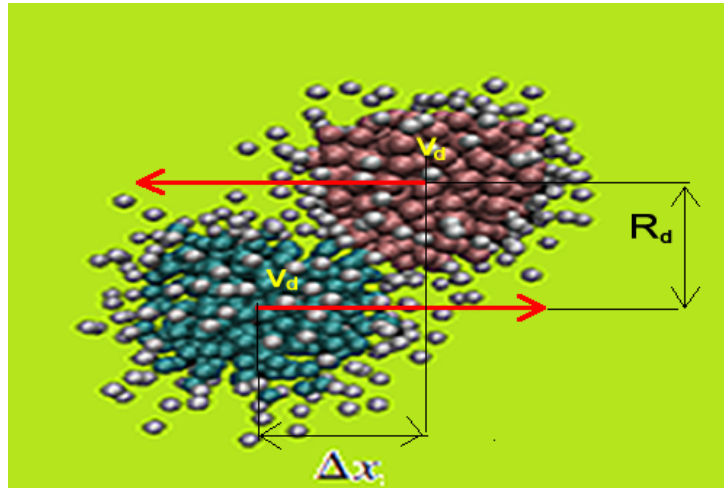
gdzie  $k$  jest stałą sprężystości,  $v$  jest prędkością cząsteczki wymuszającej ruch,  $r$  i  $r_0$  to położenia odpowiednio wirtualnej cząsteczki wymuszającej ruch oraz środkiem masy cząsteczki,  $t$  - czas a  $\vec{n}$  opisuje kierunek ruchu. SMD służy do badania mechanicznych i dynamicznych właściwości struktur zaburzając ich równowagę za pomocą zewnętrznej siły. SMD używana jest jeszcze do przyspieszania lub hamowania modelowanych procesów biologicznych oraz do modelowania doświadczeń przeprowadzanych za pomocą mikroskopu sił atomowych lub atomowej pęsety (ang. optical tweezers). Modelowanie pozwala na zebranie większej ilości danych i statystyk niż w przypadku rzeczywistego doświadczenia, ale jak wszystkie obliczenia komputerowe, obarczone jest błędem. Podczas SMD, tak samo jak w przypadku klasycznej dynamiki molekularnej, można śledzić zachowanie pojedynczych atomów, rozpadanie się wiązań i struktur drugo- oraz trzeciorzędowych, na tej podstawie można również wnioskować o ich tworzeniu się.

W przeprowadzonych eksperymentach dokonano połączenia dwóch wymienionych metod: mianowicie SMD oraz CG. Obie metody służą skróceniu czasu obliczeń. Należy jednak pamiętać, że takie połączenie generuje niepewności interpretacyjne względem interpretacji skali czasowej

### 2.2.3 Wielkości wyznaczone za pomocą MD

MD polega na wyznaczaniu prędkości i położenia w danej chwili czasu. Na podstawie tych wartości oraz znając parametry pola siłowego możemy wyznaczyć wiele cech systemu. Na podstawie wyników symulacji wyznaczono szereg parametrów:

Tensor bezwładności opisuje rozkład atomów cząsteczki względem środka jej masy według



Rysunek 2.4: Obraz z symulacji interakcji dwóch micel w środowisku wodnym. Micele pomalowano na dwa różne kolory, jednak mają one dokładnie taką samą budowę. Sterowana dynamika molekularna w tym przypadku polegała na połączeniu wirtualnego atomu (nieoddziałującego z innymi atomami) ze środkiem masy miceli wirtualną sprężyną. Następnie wirtualny punkt poruszał się ze stałą prędkością. Rysunek zaczerpnięty z (Bełdowski, P., Winkler, Hładyszowski, Jung & Gadomski 2016).

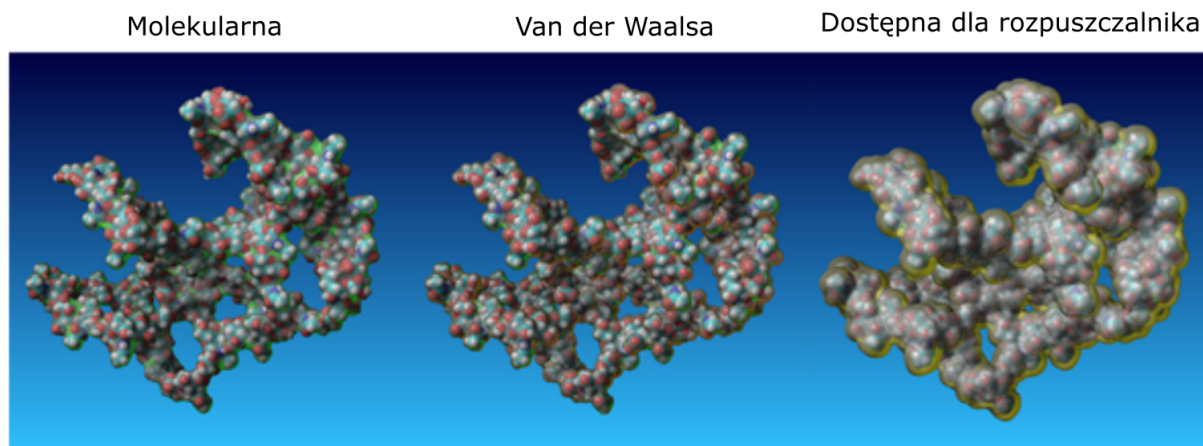
wzoru:

$$R_{\alpha\beta}^2 = G_{\alpha\beta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle \Delta r_{i,\alpha} \Delta r_{i,\beta} \rangle, \quad (2.10)$$

$N$  oznacza liczbę atomów w cząsteczce  $\Delta r_{i,\alpha}$  i  $\Delta r_{i,\beta}$  odchyłki położenia od środka masy w danej osi. Trzy rodzaje powierzchni: Van der Waalsa, molekularna, dostępna dla rozpuszczalnika pokazane zostały Rysunku 2.5. Do wyznaczania powierzchni: VdW, molekularnej i dostępnej dla rozpuszczalnika wykorzystuje się metody przybliżone jak i dokładne. Większość metod przybliżonych oparta jest na algorytmie obliczenia całek metodą Monte Carlo. Do analitycznych metod wyznaczania można przedstawić te zaproponowane przez Connollyego (Connolly 1983) i Richmonda (Richmond 1984). Ilość oddziaływań hydrofobowych, określona jako liczba miejsc, gdzie cząstka wody jest w odległości mniejszej niż 1 nm od cząsteczki hydrofobowej. *RMSD* (root mean square deviation) opisuje średnio-kwadratowe odległości między atomami (głównie ciężkimi: C, O, N) w cząsteczce:

$$RMSD(\vec{v}, \vec{w}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2}, \quad (2.11)$$

$\vec{v}$  i  $\vec{w}$  to wektory  $n$ -elementowe opisujące położenia atomów. Wektor koniec - koniec  $\vec{R}$  często wykorzystywany z fizyce polimerów opisujący odległość między końcami polimeru,



Rysunek 2.5: Graficzne przedstawienie idei powierzchni: molekularnej, VdW oraz dostępnej dla rozpuszczalnika.

zdefiniowany jest:

$$\vec{R} = \vec{R}_N - \vec{R}_0 = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i, \quad (2.12)$$

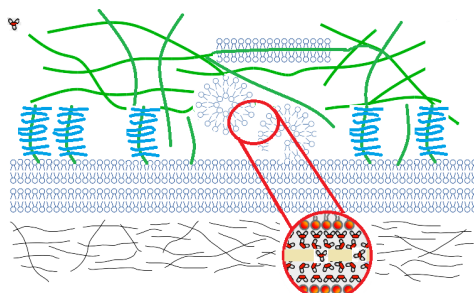
$\vec{R}_N$  oraz  $\vec{R}_0$  to położenia pierwszego monomeru w cząsteczce polimeru. Można dowieść, że długość wektora  $R$  zależy od  $N$  - liczby merów polimeru i średniej odległości między merami:

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \left\langle \left( \sum_i \vec{r}_i \right) \cdot \left( \sum_j \vec{r}_j \right) \right\rangle = \sum_i \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_i \rangle + 2 \sum_{i < j} \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle = \\ &= Nl^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle = Nl^2 + 2 \sum_{i=1}^N (N-n) \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_{i+n} \rangle \end{aligned} \quad (2.13)$$

## Rozdział 3

# Model ułatwionego smarowania

Prezentowany model oparty jest na dobrze opisanym zjawisku reorganizacji cieczy zawierającej cząsteczki amfifilowe (Roberts 1971, Hills & Buttler 1984) pod wpływem przyłożonego pola siłowego. SAPL (powierzchniowo aktywne fosfolipidy - surface active phospholipids) głównie fosfatydocholina (DPPC), fosfoetalynoamina (DPPE) oraz sfingomielin (SPH) (Hills & Buttler 1984) tworzą micelle oraz dwuwarstwy lipidowe elektrostatycznie odpychające się naładowanymi powierzchniami (Klein 2013). Lipidy wraz z kwasem hialuronowym i lubrycyną są głównymi składnikami wpływającymi na właściwości smarowania cieczy synowialnej (Gadomski et al. 2008). Według modelu ułatwionego smarowania micelle ze względu na swój sferyczny kształt zmieniają typ tarcia, ze ślizgowego na toczne znacznie zmniejszając wartość siły tarcia. Odpychanie hydratacyjne jest także istotnym elementem tarcia szczoteczek tworzonych przez lubrycynę, kwas hialuronowy oraz lipidy (Dedinatè 2012). Przedstawiony rozdział oparty jest na pracach (Bełdowski, P. et al. 2014, 2013, Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013, Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013, Gadomski et al. 2008).



Rysunek 3.1: Graficzna reprezentacja układu, uwzględniająca efekty opisane w pracy. Zielone linie prezentują łańcuchy kwasu hialuronowego, niebieskie lubrycynę. Lipidy (przedstawione jako „główki” połączone z ogonkami) przyjmują wiele form: dwuwarstw, micel oraz cylindrycznych form otaczających HA. Wtrącenie przedstawia tzw. kanały jonowe przewodzące jony hydroniowe w przestrzeniach między micelami.

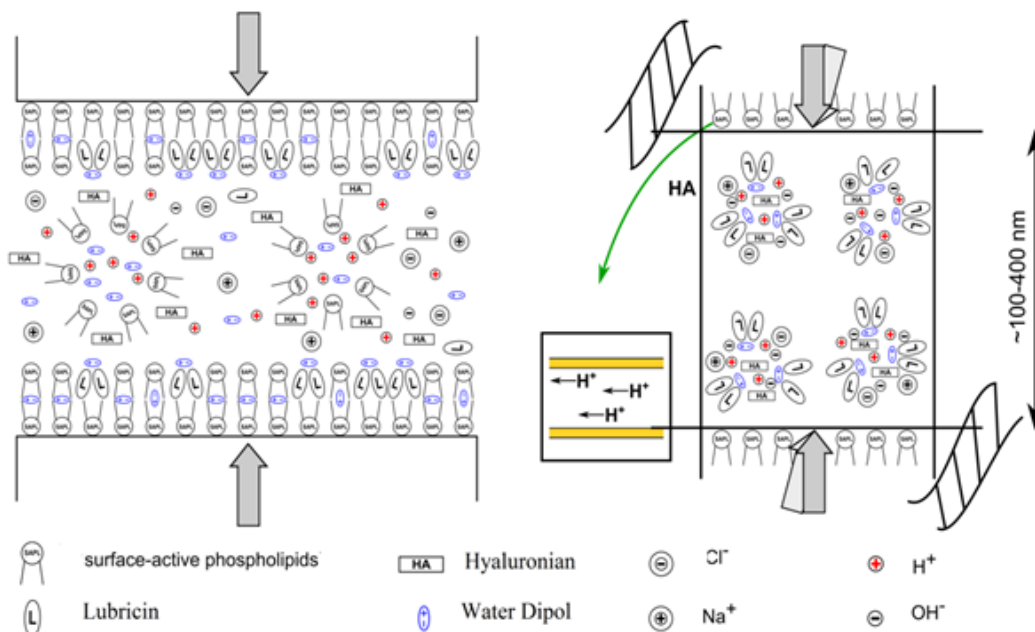
### 3.1 Model matematyczny

Opisywany model ma charakter wieloskalowy i wiąże smarowanie z efektem transportu jonów wodorowych jak i tarcia micel oraz ich interakcji z kwasem hialuronowym - jak pokazano na Rysunku 3.1. Pod wpływem nacisku - według modelu - zrywane zostają wiązania wodorowe cząsteczek wody, co skutkuje uwolnieniem wolnych jonów wodorowych. Obecność ujemnie naładowanego HA powoduje przyciąganie „kaskad” jonów, mogących rozpychać elektrostatycznie sieci kwasu. Jak pokazano w (Nosonovsky 2010) transport wodorów w tzw. transporcie Grotthussa jest ułatwiony w pobliżu dwuwarstw. Przestrzeń między micelami tworzą specjalne warunki pozwalające na ukierunkowany transport jonów hydroniowych ze względu na ograniczenie przestrzeni ruchu. Te tzw. kanały intermicelarne są dodatkowym efektem wzmacniającym zjawisko smarowania. Rysunek 3.2 ukazuje graficzną reprezentację modelu jako układu składającego się z dwóch powierzchni trących i warstwy smarującej między nimi.

Model ułatwionego smarowania zdefiniowany jest przez układ trzech równań różniczkowych pierwszego rzędu opisujących koncentrację SAPL w objętości cieczy synowialnej oraz w warstwie przypowierzchniowej. Między powierzchniowy proces tribomicelizacji odpowiedzialny jest za kreację sferycznych micel powstających przez przenikanie lipidów z warstwy przypowierzchniowej do międzypowierzchniowej.

$$\begin{cases} \frac{d\rho}{dt} = a + b\phi + c\rho - \delta\rho^2 \\ \frac{d\phi}{dt} = e + f\rho + kN_{HA}(1 - \phi) \\ \frac{dK}{dt} = C \cdot K \cdot \left(1 - \left(\frac{K}{c_K}\right)^{\frac{1}{h}}\right). \end{cases} \quad (3.1)$$

Równanie (3.1) opisuje zmianę koncentracji SAPL w czasie blisko powierzchni AC w formie dwuwarstw lipidowych. Zmienna oznaczona jako  $\rho$  opisuje pole koncentracji na lipidów na powierzchni AC, zaś  $\phi$  w objętości cieczy.  $a + b\phi$  opisuje sprzężenie między dwoma polami koncentracji  $\rho$  i  $\phi$  w najprostszej formie liniowej, z założeniem istnienia wolnego źródła amfifili  $a$  wpływających od płynu synowialnego  $b\phi$ . Nieliniowa część równania opisuje dynamikę lipidów w dwuwarstwie, która wiąże mechanizm kreacji i anihilacji wad powierzchniowych. Kreacja defektu jest procesem wymiany jednej cząsteczki wody przez dwie cząsteczki lipidów z powierzchni. Anihilacja, polega na wymianie dwóch cząsteczek wody jedną cząsteczką lipidu. Parametry  $c$  i  $\delta$  są wielkościami kreacji i anihilacji defektów. Gdy człon liniowy równa się zero Równanie (3.1) przybiera formę dobrze znanego w fizyce powierzchni równania Smirnova. Druga część układu Równań (3.1) opisuje koncentrację lipidów w objętości cieczy synowialnej. Parametr  $N_{HA}$  opisuje koncentrację kwasu hialuronowego, zaś zmienna  $K$  opisuje proces tribomicelizacji. Kiedy pierwsza, liniowa część Równania (3.1) równa jest zero otrzymujemy

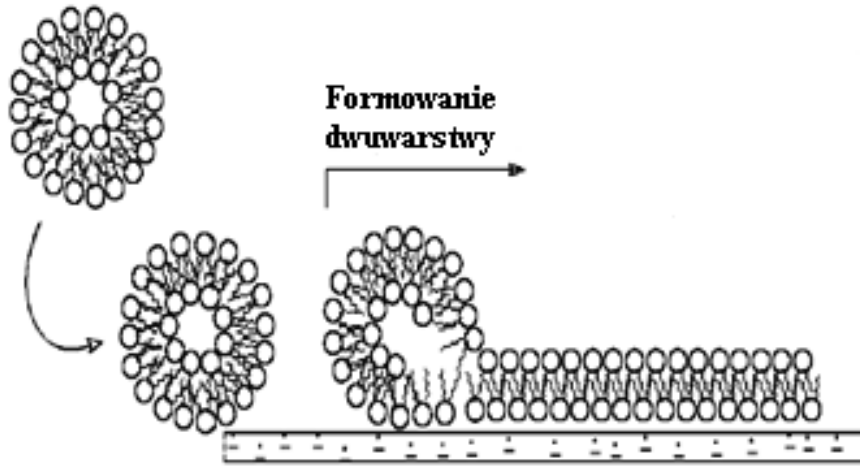


Rysunek 3.2: Graficzna reprezentacja układu chrząstki stawowej. Po lewej stronie zaprezentowano układ chrząstki stawowej jako składający się z dwóch powierzchni trących oraz cieczy smarującej. Model ułatwionego smarowania opisuje koncentracje lipidów przy powierzchni chrząstki, gdzie tworzą dwuwarstwy oraz w objętości cieczy gdzie tworzą sferyczne micelle. Z prawej strony zaprezentowano widok sieci kwasu hialuronowego udekorowanego lipidami. Powiększenie obrazuje efekt tworzenia kaskad jonów wspomagających smarowanie. Legenda opisuje główne komponenty cieczy synowialnej.

równanie typu Avramiego - Kolmogorova, opisujące kinetykę zmiany fazy micelarnej (albo domeny SAPL agregowanej-zdezagregowanej). Płyn synowialny w zdrowym układzie organu utrzymywany jest w równowadze, co zakłada -  $a = e$ ,  $b = f$  oraz  $\delta = c$  - wszystkie procesy w cieczy są zbilansowane.

Zmienna  $K$  z układu równań (3.1) opisuje proces tribomicelizacji (pokazany na Rysunku 3.3) związany ze zmianą lepkości środowiska. Proponowana dynamika tribomicelizacji ma charakter dyspersyjny. Zmienna  $K$  po przeskalowaniu zmiennej czasowej:  $\kappa(t) = \frac{t}{\tau_{ch}}$ , gdzie  $t_{ch}$  staje się bezwymiarowa i opisuje charakterystyczny czas micelizacji spowodowany przez tarcie AC. Zakładając, że w środowisku zachodzą procesy mające charakter typu Arrheniusa, możemy przyjąć  $\tau_{ch} \approx \exp[E_{mic}/RT]$ , z  $E_{mic}$  reprezentującym energię wymaganą do utworzenia średniej miceli,  $R$  to stała gazowa, dzięki czemu czas tworzenia miceli jest opisany jako zależny od temperatury.

Parametr  $C$  reprezentuje tempo tribomicelizacji w czasie, zaś  $c_K$  opisuje stopień tribomicelizacji. W konsekwencji funkcja  $K$  może ujawnić ilościową informację o smarowaniu i jego zależności od współczynnika tarcia jako funkcja naładowania powierzchni  $\mu(t) \sim 1/K(t)$  (Gadomski et al. 2008, Gadomski 1997). Formacja miceli sterowana jest efektem



Rysunek 3.3: Mechanizm powstawania defektów na powierzchni AC. Zmiana fazowa dwuwarstwa - micela indukowana jest polem siłowym.

hydrofobowym, a tempo tworzenia  $t$  zależne od czasu z promieniem opisanym jako  $R(t) \sim t^\gamma$ . Z czego wynika objętość miceli  $V_{mic}(t) \sim t^{3\gamma}$ . Innym czynnikiem wpływającym na formację miceli jest kinetyka dyspersyjna dla całkowitej struktury micelarnej,  $K(t) = K_0 \left(1 + \frac{t}{\tau_{ch}}\right)^{-h}$ , gdzie  $K_0$  oznacza stałą tempa micelizacji (Plonka 2001). Relacja między tymi dwoma wykładnikami opisana jest przez  $3\gamma - 1 = h$ , która tworzy relację struktura-własność: wykładnik  $\gamma$  i spektralny wykładnik  $h$ . Formacja miceli jest możliwa o ile struktura sieci HA pozwalają na takie zjawisko (Gadomski et al. 2008), innym efektem może być powstawanie struktur HA:PL opisanych w Rozdziale 4. Warto zwrócić uwagę, że równanie opisujące zmienną  $K$  z układu równań 3.1 jest niezależne od pozostały równań oraz, że pozostałe dwa równania zależą od niego bezpośrednio dla zmiennej  $\phi$  lub pośrednio dla  $\rho$ . Stąd kanały jonowe mają wpływ nie tylko na właściwości lokalne, ale też na globalne - znacznie zmienia właściwości cieczy smarującej.

Lepkość środowiska  $\eta$  opisana za pomocą relacji fluktuacyjno-dyssypatywnej przybiera postać:

$$\eta(t) \sim k_B T t^{1-2/d_{RW}}, \quad (3.2)$$

gdzie:  $k_B$  stałą Boltzmanna,  $d_{RW}$  to parametr błędzenia przypadkowego. Dodatkowo:

$$D(t) = \frac{k_B T}{\eta(t)} \quad (3.3)$$

Przyjmując definicję współczynnika dyfuzji:

$$D(t) = \frac{d}{dt} \langle r(t)^2 \rangle \quad (3.4)$$



otrzymujemy

$$\langle r^2(t) \rangle \propto t^{\frac{2}{d_w}} \quad (3.5)$$

Według modelu ułatwionego smarowania współczynnik tarcia jest odwrotnie proporcjonalny do lepkości dynamicznej:

$$\mu(t) \cong \frac{1}{\eta(t)} \quad (3.6)$$

Pomiędzy parametrami układu zachodzą następujące związki:

$$2 + d_F = 2 \cdot d_W \quad (3.7)$$

$$\frac{(h+1)}{3} + \left( \frac{d_F}{d_W} \right) \approx 2 \quad (3.8)$$

Ostatecznie współczynnik tarcia w funkcji czasu w zależności od czasu przyjmuje postać:

$$\mu(t) = a \left( \frac{t}{t_{ch}} \right)^{\frac{2}{d_w} - 1} \quad (3.9)$$

Rysunek 3.4 przedstawia funkcje  $\rho$  i  $\phi$  w funkcji czasu dla zmiennej wartości kwasu hialuronowego. Jak widzimy wraz ze spadkiem ilości kwasu spada koncentracja lipidów w warstwie przypowierzchniowej maleje, zaś koncentracji w objętości cieczy wzrasta. Można to powiązać z rozwojem choroby co pokazano w Tabeli 1.1 z Rozdziału 1. OA nie powoduje dużego spadku koncentracji HA jednak zmienia się jego struktura - łańcuchy są krótsze co w połączeniu z ekranowanym lipidami środowiskiem skutkuje zanikaniem warstwy przypowierzchniowej. W przypadku zdrowego środowiska (Rysunki 3.5 i 3.6) koncentracja lipidów w obu polach koncentracji i micelizacja zależne są od parametrów układu. Możemy wyznaczyć stany stacjonarne układu równań (3.1)  $\dot{\rho} = \dot{\phi} = \dot{K} = 0$

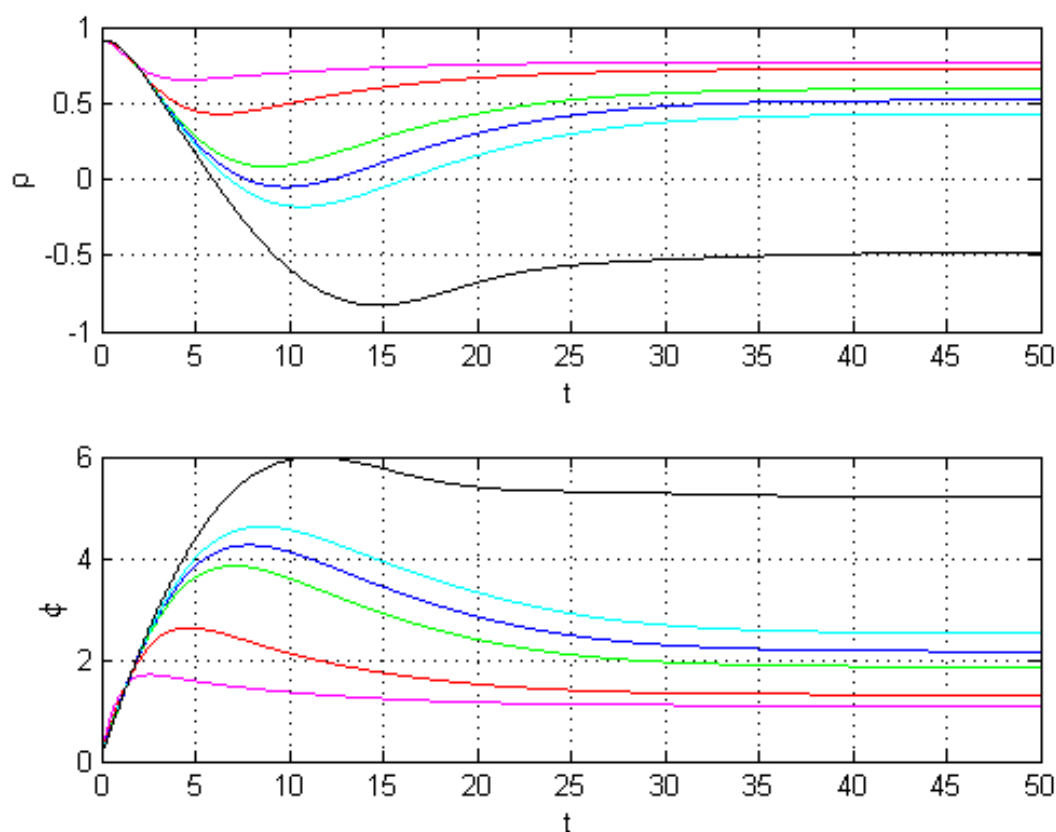
$$K_{st} = c_K \quad (3.10)$$

$$\phi_{st} = \frac{e + f\rho_{st}}{N_{HA} \cdot c_K} + 1 \quad (3.11)$$

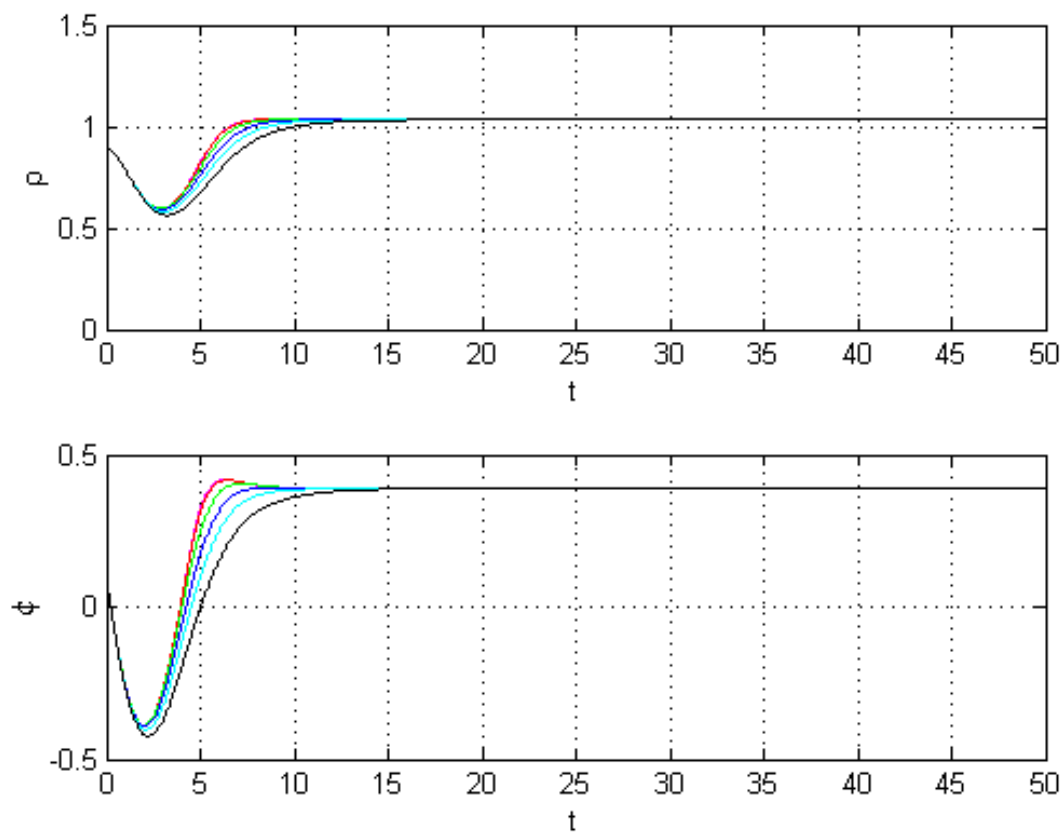
$$\rho_{st} = \frac{\frac{b \cdot f}{N_{HA} \cdot c_K} + c - \sqrt{\left( \frac{b \cdot f}{N_{HA} \cdot c_K} + c \right)^2 + 4\delta \left( a + b + \frac{b \cdot e}{N_{HA} \cdot c_K} \right)}}{2\delta} \quad (3.12)$$

Kreacja micel jest w opisywanym modelu zjawiskiem pożądanym, ponieważ struktury te kompensują nacisk na chrząstkę stawowa. Po ustąpieniu nacisku zanikają zgodnie z prawem Kelvina - Laplace'a - Younga. Do zaniku micel może prowadzić także zbyt duży nacisk, a także sytuacja, gdy ciśnienie wewnątrz miceli jest mniejsze od tego w cieczy synowialnej. Cały proces tarcia i smarowania, czyli kreacji i anihilacji micel ma charakter periodyczny - przebiega od jednego nacisku do następnego. Jednakże pozytywny wpływ micelizacji

ograniczony jest istnieniem trwałych sieci molekularnych tworzonych przez kwas hialuronowy. Wraz ze zmianą składu cieczy synowialnej sieci są słabsze a koncentracja lipidów wzrasta, w tym przypadku bez odpowiedniego zabezpieczenia micelle nie są w stanie spełniać swoich funkcji (co opisane zostanie w Rozdziale 4). Wzrost koncentracji lipidów prowadzi do powstawania wielkich miceli (Pawlak & Oloyede 2008) zbyt słabych w porównaniu z sieciami polimerowymi czego konsekwencją jest słabsze smarowanie, a ostatecznie tarcie suche - najbardziej destruktywny rodzaj tarcia. Jak pokazano w pracy (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013) opisane właściwości układu są silnie związane z ilością kwasu hialuronowego  $N_{HA}$ . Bez jego udziału, gdy  $N_{HA} \rightarrow 0$  (choć w praktyce zmienia się jego długość i minimalnie koncentracja) układ może wpaść w drgania oscylacyjne co przy odpowiednich warunkach może doprowadzić do katastrofy  $\phi \rightarrow \infty$ , skutkującej kontaktem powierzchni trących. Zatem wyniki symulacji potwierdzają przewidywania modelu 3.1, podkreślając fundamentalną rolę jaką w mechanizmie pełnią oddziaływania kwasu hialuronowego z lipidami. Dopasowania przewidywań efektu odpychania

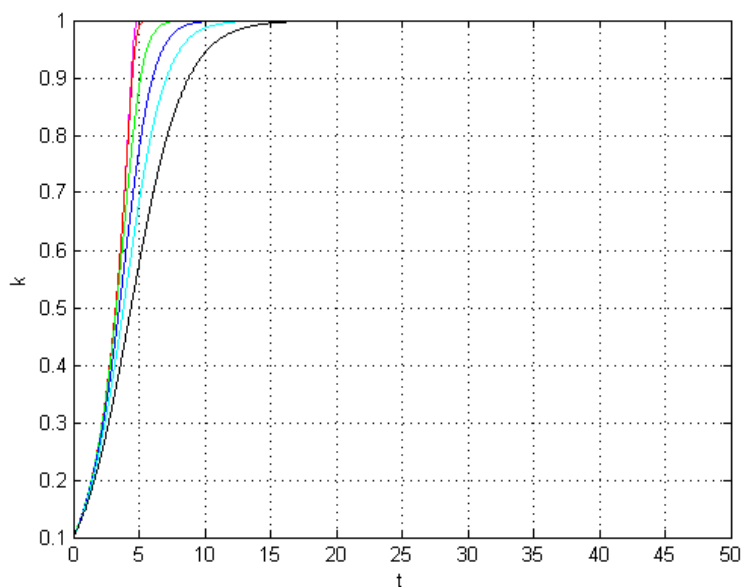
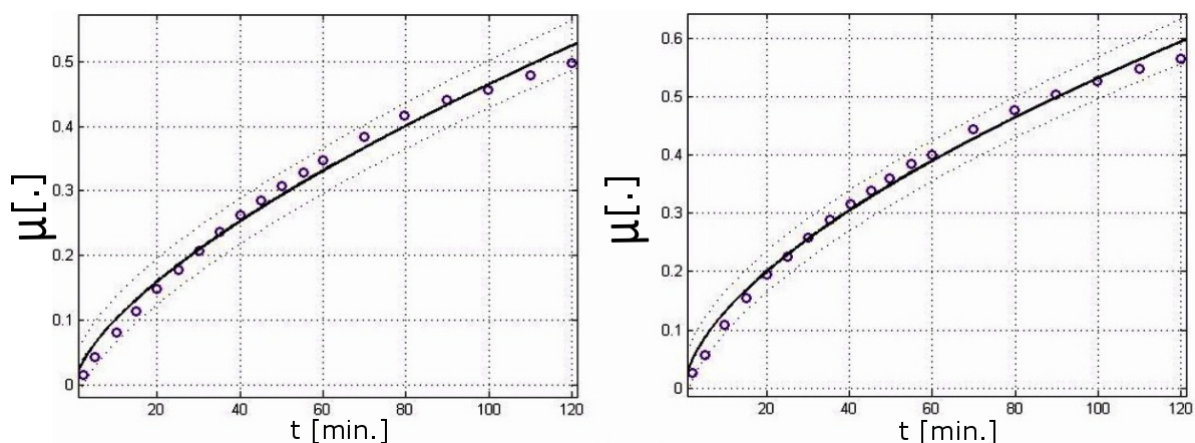


Rysunek 3.4: Zmiany pól gęstości  $\rho$  i  $\phi$  w funkcji czasu dla przypadku patologicznych zmian. Poszczególne krzywe wykazują zmiany ilości HA od różowego - dużo HA, do czarnego - mało HA. Zgodnie z przewidywaniem maleje koncentracja lipidów w warstwie przypowierzchniowej, zaś wzrasta w objętości cieczy.



Rysunek 3.5: Zmiany pól gęstości  $\rho$  i  $\phi$  w funkcji czas dla przypadku normalnym. Poszczególne krzywe wykazują zmiany parametru  $h$  od różowego -  $h \sim 0$  do czarnego -  $h \sim 1$ . Zgodnie z przewidywaniem maleje koncentracja lipidów w warstwie przypowierzchniowej nie zmienia się, zaś w objętości podlega większym perturbacjom.

powierzchni jonami do danych eksperymentalnych (Forster & Fisher 1996) pokazano na Rysunku 3.7. Dopasowanie dla cieczy synowialnej dają dużo lepsze wyniki niż w przypadku roztworu soli fizjologicznej. Może się to wiązać z brakiem struktur HA:PL.

Rysunek 3.6: Przebieg wartości tempa tribomicelizacji dla różnych parametrów  $h$ .

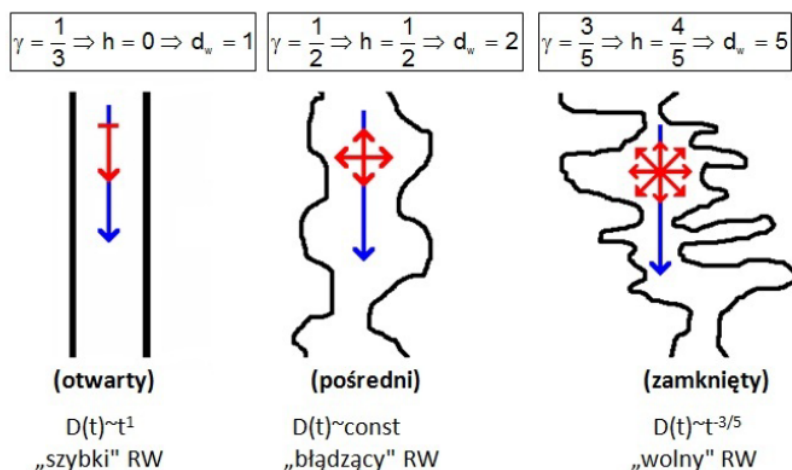
Rysunek 3.7: Dopasowania funkcji współczynnika tarcia dla danych eksperymentalnych dla dwóch roztworów od lewej: Cieczy synowialnej oraz soli fizjologicznej. Parametry dopasowania przedstawiono w Tabeli 3.1. Dopasowania dokonano dla danych zaczerpniętych z (Forster &amp; Fisher 1996).

Country List					
Smar	$R^2$	SSE	a	$\tau [min]$	h
Ciecz synowialna	0.9893	0.004303	0.00477	0.1027	0.1673
Sól fizjologiczna	0.9217	0.02499	0.01007	0.1150	0.2270

Tabela 3.1: Parametry dopasowania funkcji zależności współczynnika tarcia od czasu dla dwóch różnych cieczy smarujących. Wszystkie dopasowania zachowują wartość  $R^2 > 0.9$ .

## 3.2 Kanały protonowe w mechanizmie smarowania

Aktywowanymi napięciowo kanałami protonowymi nazywamy kanały jonowe charakteryzujące się mechanizmem otwierania zależnym od depolaryzacji silnie powiązanych ze zmianami pH (Nagle & Morowitz 1978, Cherny & DeCoursey 1999, Blicher & Heimbürg 2013). Transport jonów pełni ważną rolę w wielu układach biologicznych między innymi w komórkach, DNA itp. (Żabicki et al. 2009, E.DeCoursey 2003). Kanałami protonowymi w mechanizmie ułatwionego smarowania nazywamy ukształtowaną w wyniku zewnętrznego pola siłowego przestrzeń występującą między powierzchniami micel (Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013, Gadomski et al. 2008). Tworzenie kanałów ma charakter dynamiczny i jest efektem towarzyszącym hydrodynamicznym interakcjom micel i zrywaniu wiązań wodorowych tworzących kaskady wolnych jonów hydroniowych. Ze względu na anomalny charakter dyfuzji na powierzchniach dwuwarstw lipidowych (Wolf & et al. 2014) można podejrzewać podobny mechanizm w przypadku micel. Co jednak najważniejsze dla mechanizmu ułatwionego smarowania ruch jonów jest ukierunkowany ze względu na istnienie sieci kwasu hialuronowego. Kwas hialuronowy w fizjologicznym pH ma ujemny ładunek całkowity przez co może przyciągać elektrostatycznie dodatnio naładowane jony. Tak powstałe kaskady jonów mogą elektrostatycznie rozpychać włókna HA zapobiegając kontaktowi między ścierającymi się nano-powierzchniami sieci HA. Ruch jonów w kanałach micelarnych odbywa się dzięki transportowi typu Grotthussa (Godoy & Cukierman 2001, Tuckerman et al. 1995, Cukierman 2006, Agmon 1995). Efekt elektrostatycznego odpychania nanopowierzchni jest silnie zależny od pH roztworu i stanu sieci. Jak przedstawiono w Rozdziale 1 wraz z rozwojem OA wzrasta pH cieczy synowialnej, co wiąże się ze spadkiem koncentracji jonów. Efekt ten w połączeniu z upośledzonym tworzeniem sieci skutkuje pogorszeniem działania stawu. Dodatkowym skutkiem jest zwiększona koncentracja lipidów co wiąże się z ekranowaniem środowiska. Na Rysunku 3.8 pokazano trzy typy kanałów jonowych występujących w mechanizmie smarowania, które reprezentują trzy możliwe reżimy dyfuzyjne: od lewej do prawej są to super-dyfuzja, dyfuzja normalna oraz subdyfuzja. Wystąpienie któregoś z tych reżimów zależy od stanu cieczy synowialnej jak opisano to powyżej. W pracy (Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013) przedstawiono wpływ czynników jak przekrój kanału oraz gęstość jonów hydroniowych na mechanizm transportu w kanale. Dynamika Smoluchowskiego jest użytecznym narzędziem pomocnym min. w opisie dyspersyjnej agregacji polimerów (Grzywna & Stolarczyk 2002, 2005) jak i koloidów. Jak pokazano za pomocą dynamiki MNET (mesoscopic non-equilibrium thermodynamic) (Reguera et al. 2005) prędkość dryfu  $v_d$  w jednowymiarowym modelu jest



Rysunek 3.8: Rodzaje kanałów protonowych. Od lewej do prawej pokazano kolejno: otwarty, przejściowy i zamknięty. Zależność między parametrami opisano w tekście.

wypadkową przyciągania elektrostatycznego oraz sił entropowych:

$$v_d \simeq (F_{el} - F_{entr}) \frac{D^{H^+}}{k_B \cdot T}, \quad (3.13)$$

gdzie:  $F_{entr}$  oznacza siłę entropową,  $F_{el}$  siłę elektrostatyczną,  $D^{H^+}$  współczynnik dyfuzji,  $k_B$  to stała Boltzmanna a  $T$  to temperatura,  $N_{H^+}$  koncentracja jonów,  $l_{ch}$  - długość kanału

$$F_{entr} = \frac{k_B \cdot T \cdot N_{H^+}}{l_{ch}} \ln[N_{H^+}], \quad (3.14)$$

$$v_d^{H^+} = \frac{D^{H^+}}{k_B \cdot T} \left( \frac{F_{el}}{1 - \frac{x}{l_{ch}}} - F_{entr} \right). \quad (3.15)$$

Powyższy rozdział miał na celu przybliżenie czytelnikowi modelu ułatwionego smarowania. Złożony charakter procesów tarcia i smarowania chrząstki wymusza używanie uproszczonych modeli do opisu zjawiska. Jak przedstawiono na Rysunku 3.1 praca skupia się na opisie zjawisk tarcia i smarowania z uwzględnieniem wielu skal przestrzennych. Rozdział 4 opisuje interakcje kwasu hialuronowego z lipidami w zjawisku smarowania we wszystkich jego reżimach. Rozdział 5 skupia się na tarcu micel. W każdy z rozdziałów opisano dodatkowo jego wpływ na zjawisko transportu jonów hydroniowych. Mechanizm tarcia w układzie chrząstki jest bardzo efektywny i odporny na mniejsze zaburzenia, jednak w momencie zaniku warstw przypowierzchniowej dochodzi do reakcji łańcuchowej, której efektem jest upośledzenie działania stawu. Pomimo uproszczonej formy opisany model pozwala wyciągać poprawne wnioski w pojawianiu się dysfunkcji. Ubytek warstwy przypowierzchniowej i zmiana struktury

sieci HA nie pozwalają na zachodzenie dwóch ważnych zjawisk minimalizujących tarcie: normalizacji nacisków (sieci HA) i odpychania hydratacyjnego (tarcie dwuwarstw oraz micel).

## Rozdział 4

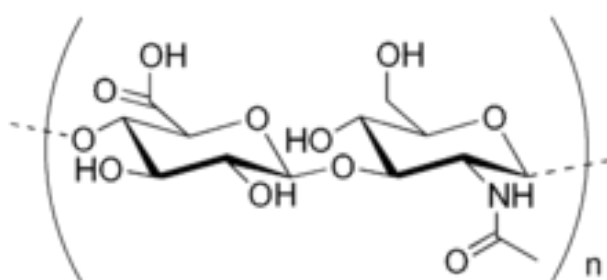
# Oddziaływanie HA/PL w mechanizmie smarowania

Kwas hialuronowy (ang. Hyaluronic Acid - HA) jest liniowym biopolimerem (Rysunek 4.1) wykazującym wiele unikalnych cech dla biomateriałów. Jest biodegradowalny, biokompatybilny oraz bioaktywny, dzięki czemu wykorzystywany jest w okulistyce oraz w ortopedii. Zawiera grupy funkcjonalne wzdłuż łańcucha głównego, pozwalające na chemiczną modyfikację grup pobocznych w celu uzyskania hydrożeli. Cechuje się niespecyficzną adsorpcją białek między optymalnym nośnikiem (ang. scaffold) i komórkami promując angiogenezę (tworzenie naczyń krwionośnych). HA jest polielektrolitem, co oznacza, że można go stosować w transporcie leków (Garg & Hales 2004). Jednakże jego biomedyczne stosowanie HA jest ograniczone ze względu na trudność zachowania mechanicznej integralności w środowisku wodnym. Poprzez modyfikację substancji chemicznej można przedłużyć rozkład i degradację jak również utrzymać mechaniczną stabilność. HA może przybierać wiele form użytecznych z punktu widzenia medycyny (filmy, żele i piany) w celu transportu leków i/albo tworzenia nowych tkanek *in vivo*. Ze względu na liniowość i fakt tego, że HA jest polianionem należy to grupy polimerów tzw. super-elastycznych płynów (ang. super-elastic liquids) co sprawia, że jego zachowanie przypomina zachowanie gumy. Dzięki mechanizmowi sieciowania (ang. crosslinking) HA tworzy złożone sieci, których konsekwencją jest lepkosprężystość. Mechanizm sieciowania HA możemy podzielić na fizyczny i chemiczny. W sieciowaniu fizycznym oddziaływania hydrofobowe oraz jonowe modyfikują HA lub jego pochodne sprzyjają powstawaniu wiązań między łańcuchami. Konsekwencją jest powstawanie sieci w formie hydrożelu. Sieciowanie chemiczne polega na tworzeniu nowych wewnątrz- i między-molekularnych wiązań kowalencyjnych tworzących sieć molekularną. W przedstawionym rozdziale skupiono się na sieciowaniu fizycznym. Długie łańcuchy HA, zwłaszcza w zatłoczonych środowiskach, oddziałują chętnie z wodą wykazując hydrofilowe właściwości, jednakże dodatek lipidów skutkuje większym wpływem efektu hydrofobowego



wpływającego na jego konformację. Zastosowanie HA jest konsekwencją jego właściwości lepko-sprężystych wynikających z gęsto upakowanych sieci molekularnych (Pasquali-Ronchetti et al. 1997). Jak pokazano w pracy (Wik & Wik 1998) właściwości te zależą zarówno od koncentracji, średniej masy molekularnej, rodzaju rozpuszczalnika oraz szybkości ścinania.

Poza tym jego rolą jest pośrednictwo w przekazywaniu sygnałów biologicznych (Dedinatè 2012). Ze względu na właściwości lepko-sprężyste jest on ważnym elementem w smarowaniu zarówno elastohydrodynamicznym jak i granicznym. HA wraz z lipidami oraz lubryciną tworzą kilka funkcjonalnych struktur w cieczy synowialnej. Należą do nich tzw. struktury szczotkowe (Rozdział 1) oraz opisywane w następnym rozdziale formy normalizujące nacisk i ułatwiające tarcie powierzchni micelarnych. Poniższy rozdział oparty jest na pracy (Jung et al. 2017)



Rysunek 4.1: Pojedyncza cząsteczka kwasu hialuronowego. W warunkach naturalnych łańcuch zbudowany jest nawet z 20000 merów.

zaś część dotycząca symulacji dynamiki molekularnej opublikowana zostanie w późniejszym czasie.

## 4.1 Wprowadzenie

Zgodnie z prawem Marka-Houwinka-Sakurady masa molekularna polimeru wpływa na graniczną lepkość liczbową roztworu według zależności (Doi & Edwards 1986):

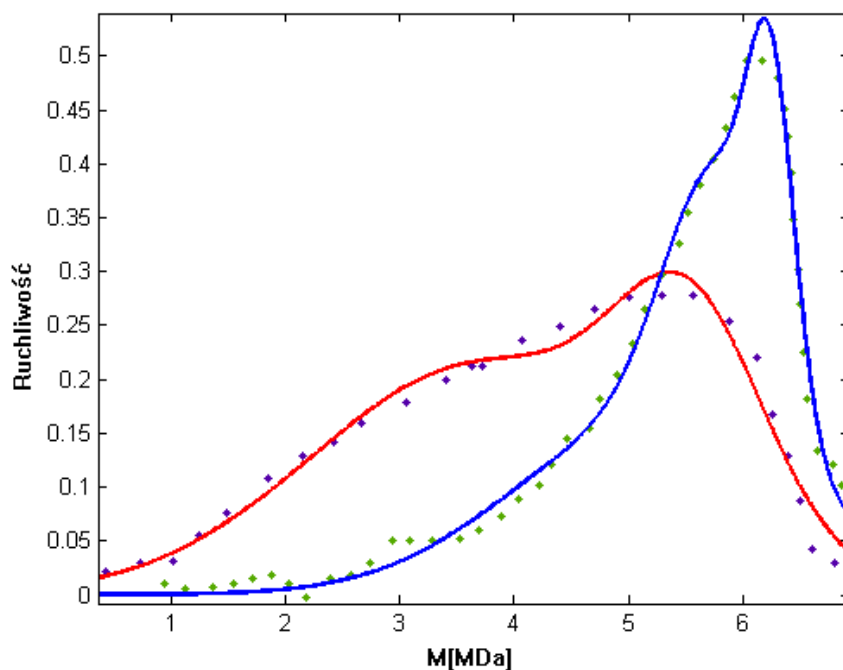
$$\eta = KM^\alpha, \quad (4.1)$$

gdzie  $M$  jest masą molekularną polimeru,  $\alpha$  określa typ rozpuszczalnika,  $K$  jest stałą.

Kwas hialuronowy sam nie jest w stanie zapewnić wystarczających warunków ułatwionego smarowania (Nitzan & et al. 2001). Dopiero synergia wszystkich składników cieczy synowialnej, takich jak: lipidy oraz białka, pozwala osiągnąć właściwe smarowanie. W tym rozdziale przedstawione zostaną wyniki pomiarów elektroforetycznych jak i wyniki symulacji MD. Tabela 1.1 z Rozdziału 1 pokazuje skład głównych składników cieczy w warunkach normalnej i zdegenerowanej cieczy synowialnej (Kosińska & et al. 2015). Rozwój osteoartrozy (OA) wiąże się ze zmianą proporcji składników. Jak pokazano w tabeli podczas OA znacznie maleje ilość lubrycyny odpowiedzialnej za smarowanie chrząstki w tarciu granicznym. Równocześnie dwukrotnie wzrasta liczba lipidów. Związane jest to z obumieraniem komórek chondrocytów i wnikaniami lipidów tworzących błonę komórkową do objętości cieczy. Ilość kwasu hialuronowego nie maleje w dużym stopniu, jednakże zmienia się jego struktura-występuje większa ilość krótkich łańcuchów na rzecz dłuższych w zdrowym stawie. Na Rysunek 4.2 pokazano polidispersyjność kwasu hialuronowego w zdrowym i chorym stawie z krzywą dopasowującą. Do danych dotyczących polidispersyjności kwasu (Lee & Cowman 1994) dopasowana została krzywa będąca sumą rozkładów Gaussa:

$$f(x) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{\sqrt{2\sigma_i^2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \mu_i)^2}{\sigma_i^2}\right), \quad (4.2)$$

gdzie  $\sigma_i^2$  oznacza wariancję  $i$ -tej populacji HA,  $\mu_i$  - średnią  $i$ -tej populacji, zaś  $x$  długość HA. Wybór takiej dystrybucji podyktowany jest tym, że w zdrowym stawie za produkcję HA odpowiadają trzy rodzaje komórek: HAS1, HAS2 i HAS3 (Garg & Hales 2004). Syntezują one kwas o różnej masie molekularnej: długie, średnie i krótkie łańcuchy. Zmiany zachodzące podczas OA powodują zahamowanie produkcji długich łańcuchów (synteza jest silnie związana z pH (Garg & Hales 2004)). Tą tendencję oddaje również krzywa dopasowująca: polidispersyjność HA w zdrowym stawie jest sumą trzech rozkładów Gaussa, zaś chorego sumą dwóch. W dopasowaniu posłużono się narzędziem wbudowanym w program Matlab o nazwie CFTool, wykorzystujący regresję liniową i nieliniową. Dane z wykresów wyekstrahowano przy pomocy Digizelt. Parametry dopasowania przedstawiono w Tabeli 4.1. Przy dobrej wartości dopasowania  $R^2 = 0.97 \div 0.99$ , funkcja  $f(x)$  ukazuje tendencję, która



Rysunek 4.2: Polidispersyjność kwasu hialuronowego w zdrowej (zielone punkty) oraz chorej (niebieskie punkty) cieczy synowialnej. Niebieska i czerwona krzywe przedstawiają dopasowanie krzywej typu Gaussa do danych eksperymentalnych zaczerpniętych z (Lee & Cowman 1994).

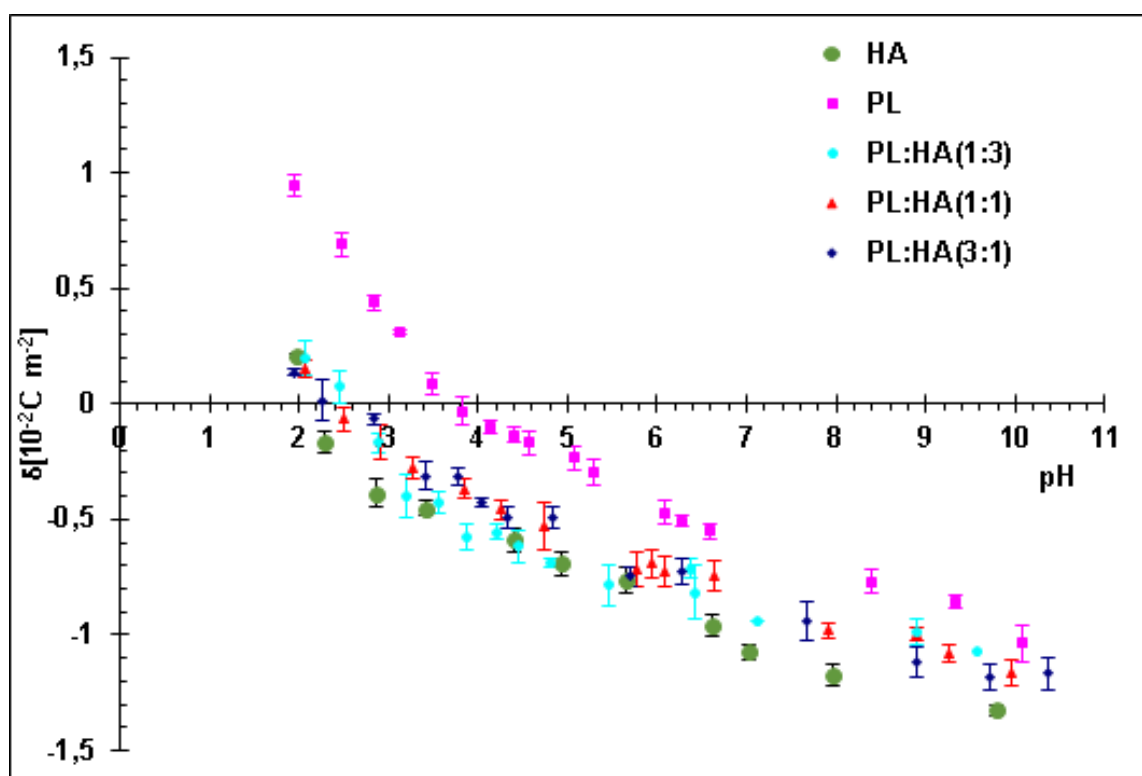
Stan cieczy synowialnej	Średnia [MDa]	Wariancja [MDa]	R <sup>2</sup>
Normalny	5.653	1.169	0.991
OA	4.244	1.742	0.970

Tablica 4.1: Wartości parametrów funkcji dopasowującej dla polidispersyjności HA w płynie ze zdrowego i chorego stawu (Lee & Cowman 1994).

występuje w zdrowym i chorym stawie. W cieczy synowialnej pojawia się duża ilość krótkich łańcuchów HA co znacząco wpływa na lepkość środowiska (Maleki 2008, Lee & Cowman 1994).

## 4.2 Badania elektroforetyczne

Ze względu na zmieniające się pod wpływem czynników chorobotwórczych pH cieczy smarującej przeprowadzono badania elektroforetyczne związków HA:PL w różnych koncentracjach oraz pH. Technika elektroforezy jest szeroko stosowaną min. w analizie polimerów, DNA itd. (Pasciak, Krawczyk, Gudowska-Nowak & Kułakowski 2005, Pasciak, Kułakowski & Gudowska-Nowak 2005) Wykonano serię pomiarów ruchliwości w żelu z zastosowaniem liposomów fosfatydylocholiny zawierających HA. Pomiary przeprowadzono na różnych wartościach pH przy użyciu 0.155 Mol chlorku sodu jako elektrolitu nośnego (Kotyńska & Figaszewski 2014).



Rysunek 4.3: Zależność pH od gęstości ładunku powierzchniowego błon lizosomalnych utworzonych przez HA, PL i HA: mieszanina PL w roztworze chlorku sodu (Kotyńska & Figaszewski 2014).

Liposomy wytworzono przez sonifikację (Kotyńska & Figaszewski 2014). Fosfatydylocholina i kwas hialuronowy zważono, rozpuszczono w chloroformie ( $10ml/cm^3$ ) i zmieszano w różnych stosunkach molowych PL HA (3: 1, 1: 1, 1: 3). HA o średniej masie cząsteczkowej 1.6-2.0 MDa i stężeniu 22 mg / ml (BioVico®), Gdynia, Polska) zmieszano z PL o 99% koncentracji żółtka jaja L- $\alpha$ -fosfatydylocholina (Sigma; St. Louis, MO). Pomiary przeprowadzono w funkcji pH. Liposomy tworzone zawieszono w roztworze chlorku metalu alkalicznego. W celu zmiany wartości pH dodawano odpowiednią ilość kwasu lub zasady.

Przedstawione wartości reprezentują średnią z co najmniej sześciu pomiarów wykonanych dla każdej wartości pH. Wszystkie doświadczenia powtórzone co najmniej trzy razy. Wartości ruchliwości w żelu przeliczono na powierzchnię gęstość ładunku za pomocą Równania 4.3 (Kotyńska & Figaszewski 2014). Na podstawie pomiarów ruchliwości elektroforetycznej określano gęstość ładunku powierzchniowego przez:

$$\sigma = \frac{\eta \cdot u}{d} \quad (4.3)$$

gdzie:  $\sigma$  - powierzchniowa gęstość ładunku,  $\eta$  - lepkość roztworu,  $u$  - ruchliwość elektroforetyczna,  $d$  - grubość warstwy dyfuzyjnej. Grubość warstwy dyfuzyjnej wyznaczana jest ze wzoru (Kotyńska & Figaszewski 2014)

$$d = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 RT}{2F^2 I}}, \quad (4.4)$$

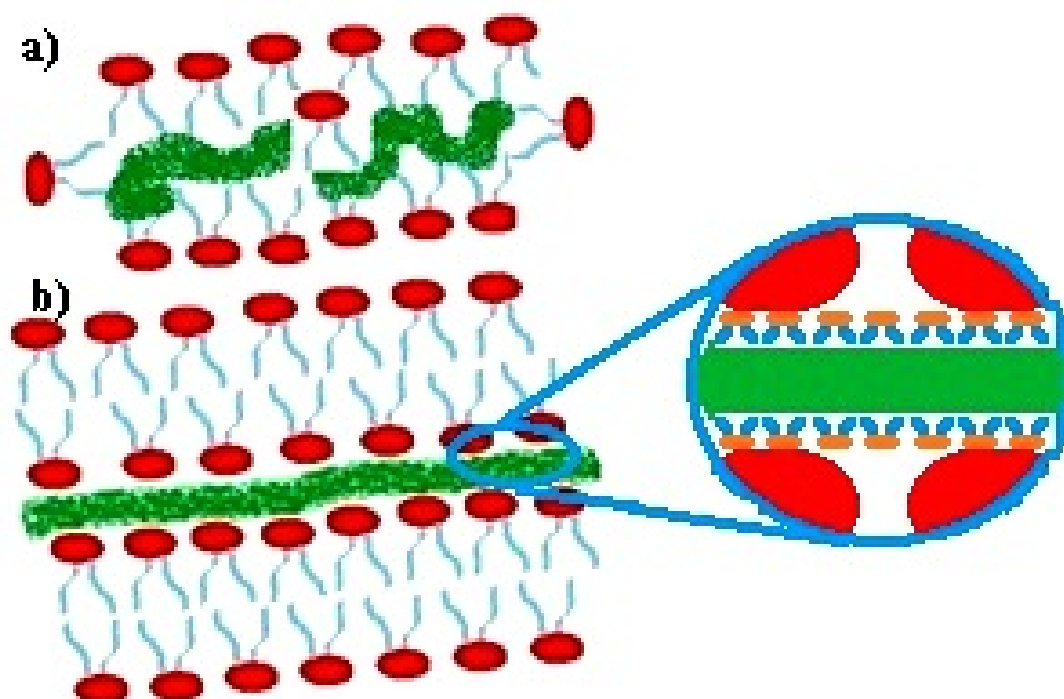
$R$  oznacza stałą gazową,  $T$  - temperatura,  $F$  to stała Faradaya,  $I$  to siła jonowa elektrolitu,  $\epsilon_0$  i  $\epsilon$  przenikalności elektryczne: bezwzględna i względna.

Rysunek 4.3 pokazuje, że HA posiada ładunek dodatni jedynie w najbardziej kwasowym pH, gdy roztwór staje się bardziej zasadowy ładunek powierzchniowy HA pozostaje ujemny. Punkt izoelektryczny dla liposomu fosfatydylocholino wynosi pH=3.8, zaś dla liposomu HA dla pH=2.2. W zakresie warunków fizjologicznych pH płynu (6.8 do 8.1), ładunek powierzchniowy HA liposomów wzrasta o około 10%. W fizjologicznym pH gęstość ładunku pozostaje stała, co stwarza optymalne warunki smarowania wewnątrz płynu stawowego. Kompleksy HA:PL wykazują nieznacznie różne zachowania w zależności od kompozycji, a mianowicie w stosunku do PL:HA.

Wartość ładunku powierzchniowego jest ważnym czynnikiem w zjawisku transportu jonowego (Stein et al. 2004). Wzrost powierzchniowej gęstości ładunku HA w fizjologicznym zakresie sprzyja lepszemu przewodnictwu jonów wodorowych w mechanizmie smarowania. Rysunek 4.3 przedstawia związki HA z PL oraz same PL przejawiają widocznie mniejszą gęstość ładunku o ok. 20-50%. Efekt ten jest szczególnie szkodliwy uwzględniając wzrost koncentracji lipidów i spadek HA w przypadku zdegenerowanej AC. Związki HA z agregatami lipidowymi tworzą kanały jonowe sprzyjające anormalnej dyfuzji. Brak sieci HA (w połączeniu z obniżoną wartością ładunku powierzchniowego) powoduje brak pozytywnego wpływu kanałów jonowych.

### 4.3 Symulacje komputerowe

Oddziaływanie HA z lipidami jest energetycznie korzystnym dla obu molekuł. Struktury tworzone przez te związki zależne są od długości HA tworząc unilamelarne micelle o wielkości od 15-30 nm do złożonych związków molekularnych (Pasquali-Ronchetti et al. 1997). Powstałe struktury pokazane na Rysunku 4.4 są rezultatem oddziaływań hydrofobowych. Związki te zawsze związane są z obecnością HA (Garg & Hales 2004) oraz związane są z wiązaniem między lipidami z wodą i HA jak pokazano na Rysunku 4.4. HA może spełniać dwie funkcje

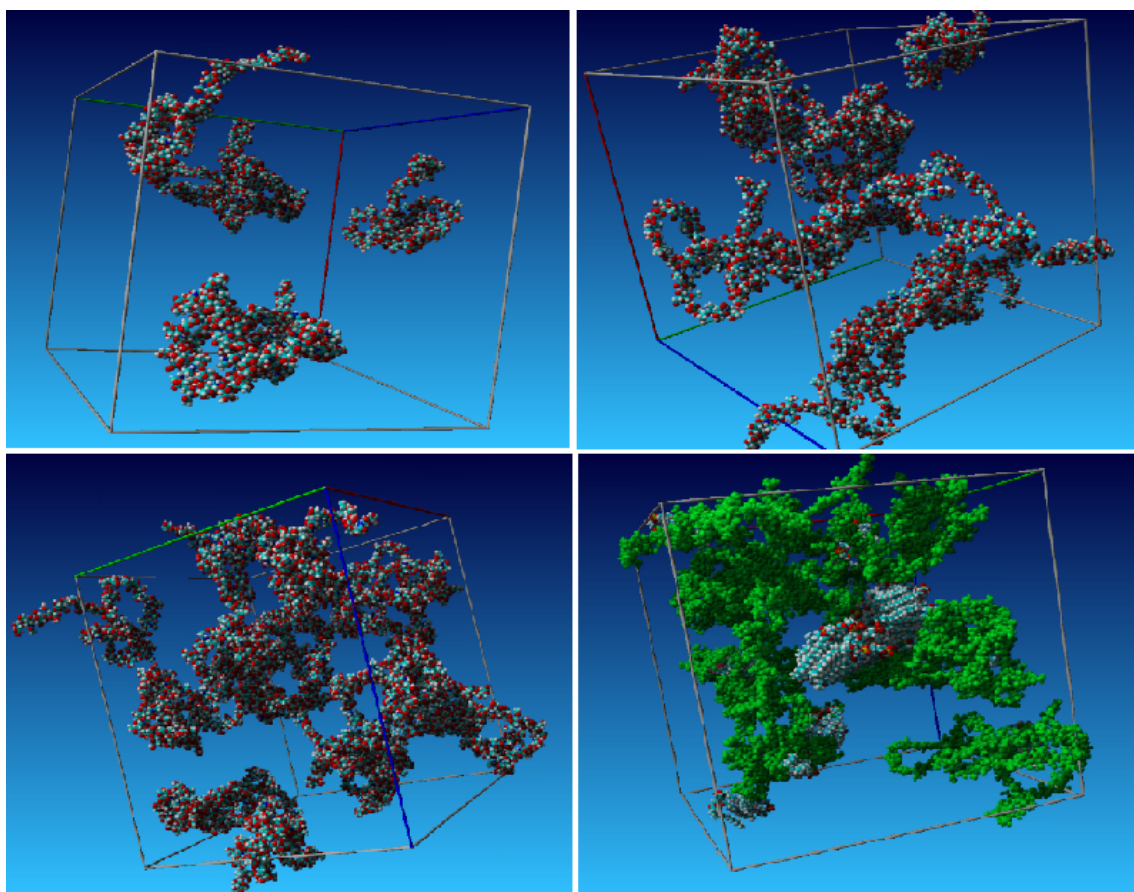


Rysunek 4.4: Rodzaje form HA:PL. Ze względu na długość łańcucha HA mogą one przybierać jedną z dwóch form. Część a) pokazuje micelle PL absorbującą łańcuch HA do swojego wnętrza co charakterystyczne jest dla krótkich łańcuchów o masie  $<0.5$  MDa. Część b) występuje w przypadku długich łańcuchów. Lipidy tworzą formy cylindryczne, gdzie między lipidami a HA występuje warstwa wody. HA zaznaczony jest na zielono, lipidy składają się z hydrofobowej części zaznaczonej na niebiesko i hydrofilowej na czerwono. Wodory z cząsteczki wody zaznaczono na niebiesko a tlen na pomarańczowo.

w porządkowaniu cząsteczek sąsiadujących: utrzymywanie warstwy wody dzięki czemu lipidy lepiej układają się przy powierzchni a także stabilizuje warstwy lipidów poprzez bezpośrednie oddziaływanie.

W ramach pracy przeprowadzono symulacje komputerowe interakcji fosfolipidów DPPC z kwasem hialuronowym. Przy użyciu programu YASARA adoptując pole siłowe AMBER03 symulowano takie interakcje dla różnych wartości współczynnika pH w różnych stosunkach HA/PL w roztworze soli fizjologicznej 0.9% NaCl. Symulacje NPT przeprowadzono dla stałej

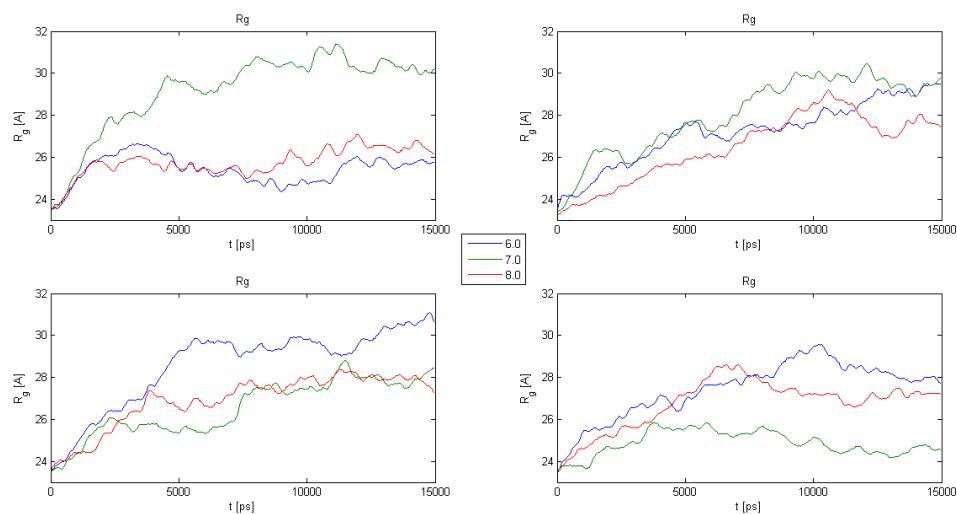
temperatury 310 K. Jak pokazują wyniki promień bezwładności (zdefiniowany w Rozdziale 2) dla symulacji powyżej 5 ns dla pH=7 osiąga maksimum, jednakże po dodaniu lipidów nie odbiega od wartości dla innych współczynników pH - Rysunku 4.6. Wyniki są zgodne z danymi doświadczalnymi (Maleki 2008). Ważnym oraz nowym efektem zaobserwowanym dla układu jest zależność między promień bezwładności a koncentracją lipidów (Rysunek 4.7). Wraz ze wzrostem koncentracji PL  $R_g$  maleje. Także te wyniki można powiązać z danymi eksperymentalnymi. Jak pokazano w (Pasquali-Ronchetti et al. 1997) kwas hialuronowy o masie molekularnej poniżej 0.5 MDa jest absorbowany na powierzchni liposomów DPPC, zaś powyżej 0.5 MDa tworzy formy cylindryczne o rdzeniu tworzonym przez HA oraz lipidami otaczającymi go (4.4). Innym parametrem pokazującym odległości między atomami w łańcuchu HA jest wielkość RMSD pokazana na Rysunku 4.8. Wyznaczono również powierzchnie HA: molekularną, Van der Waalsa oraz dostępną dla rozpuszczalnika - Rysunki 4.9 - 4.12. Dla pH=7.0 wielkości te są w niewielkim stopniu zależne od koncentracji lipidów (w przeciwieństwie do pozostałych wartości pH). Jest to pozytywne zjawisko w ujęciu modelu ułatwionego smarowania ze względu na możliwość dostępu cząsteczek wody w zjawisku transportu jonów hydroniowych. W pH=8.0 (warunki patologiczne) ilość jonów wodorowych maleje co w połączeniu z mniejszą (w stosunku do pH=7.0) powierzchnią dostępną dla rozpuszczalnika skutkuje gorszym transportem jonów (Santamaria-Holek et al. 2005). Liczba interakcji hydrofobowych zależna jest od samoorganizacji lipidów ponieważ HA jest hydrofilowym polimerem (Patrz Rysunek 4.13). Jednakże wraz ze wzrostem koncentracji po początkowym wzroście maleje liczba interakcji HP i wiązań wodorowych jak widać na Wykresach 4.18 i 4.17. Jedną z podstawowych funkcji HA jest również organizacja cząsteczek wody w komórce co związane jest z jego silną hydrofilowością. Tworzenie trwałych sieci jest zjawiskiem wspierającym smarowanie, jednakże długie łańcuchy w odpowiednich konformacjach (patrz Rysunek 5.1 z Rozdziału 5) są w teorii w stanie zapewnić odpowiedni efekt zabezpieczający przed stykaniem się powierzchni trących. Rysunek 4.5 przedstawia wyniki symulacji dla sieci HA po 50 ns. Niskiej koncentracji nie towarzyszy pojawianie się połączeń między łańcuchami HA. Jednak wraz ze wzrostem koncentracji HA można zaobserwować tworzenie sieci co widać w prawym górnym i lewym dolnym rogu. W tym obrazie zaobserwować można również wolne łańcuchy HA, nie tworzące sieci. Ciekawa sytuacja przedstawiona jest w prawym dolnym rogu. Można tu zaobserwować również sieci HA, występują tutaj jednak dodatkowo swego rodzaju „wiązania” między lipidami a HA pozwalające na łączenie łańcuchów w dłuższe sieci. Obok „mostków” micelarnych lipidy tworzą dodatkowo sterowane efektem hydrofobowym małe micle. Lipidy ze względu na efekt hydrofobowy skierowane są przeważnie w część hydrofilową w kierunku HA (choć występują też połączenia hydrofobowe).



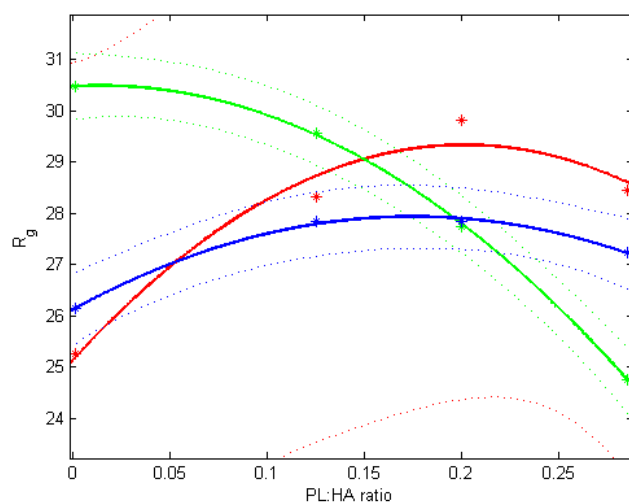
Rysunek 4.5: Wyniki symulacji pokazujące zachowanie wielu łańcuchów HA w pudle symulacyjnym o stałej wielkości. W lewym górnym rogu przedstawiono układ 3 łańcuchów, zaś w prawym 6. Dolna część przedstawia układ 10 łańcuchów. Po lewej stronie łańcuchy HA bez lipidów zaś po prawej z lipidami (dla lepszej wizualizacji HA zaznaczono na zielono). Stosunek ilościowy lipidów do HA wynosi 4.

Dla celów demonstracyjnych przeprowadzono symulacje krótkich i średnich łańcuchów HA (o masie molekularnej  $<0.5$  MDa) ze 150 lipidami DPPC w środowisku soli fizjologicznej. W obu przypadkach HA absorbowany jest na powierzchni powstałej miceli. Efekt ten jest zgodny z wynikami eksperymentalnymi (Pasquali-Ronchetti et al. 1997). Łańcuchy te ze względu na absorpcję na lub wewnątrz miceli nie są w stanie tworzyć efektywnych sieci. Jednakże tak powstały związek HA:PL posiada nowe właściwości, które mogą wzmacniać wnętrze miceli pozwalając na przenoszenie wyższych obciążeń. Fakt, że struktury takie występują głównie w chorym układzie nasuwa wniosek, że struktury takie mają bardzo ograniczoną użyteczność.

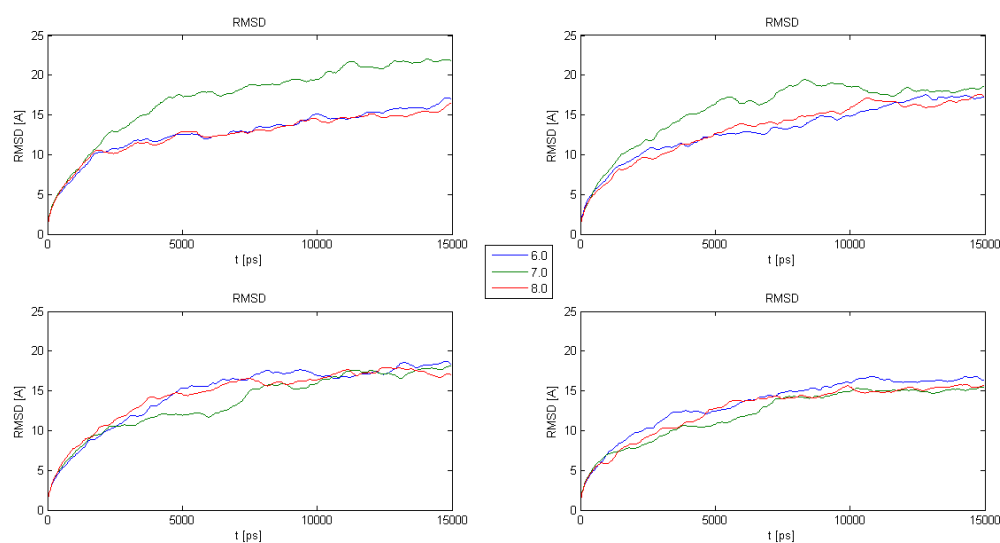




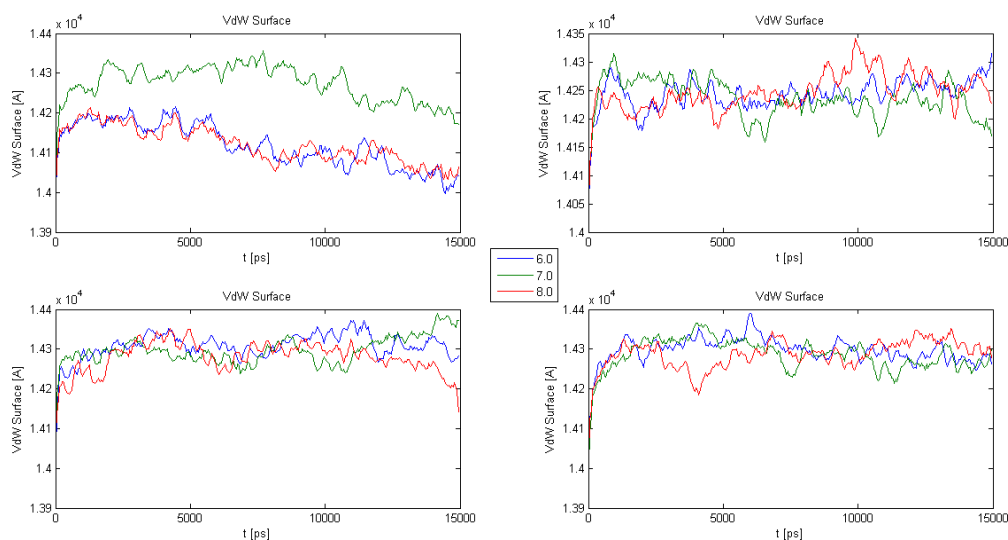
Rysunek 4.6: Zależność promienia bezwładności cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



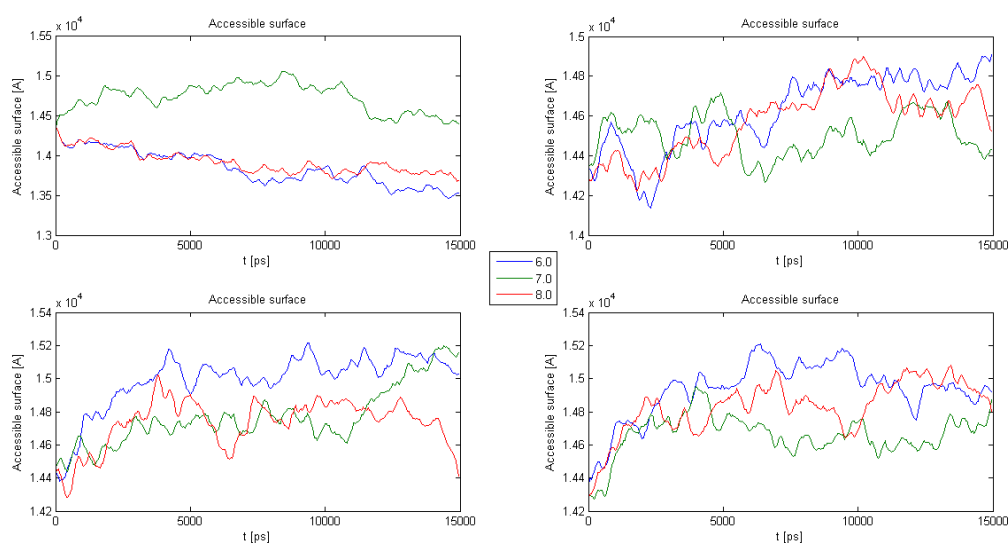
Rysunek 4.7: Zależność promienia bezwładności w funkcji proporcji lipidów do HA. Zielona krzywa przedstawia  $pH=7.0$ , czerwona  $pH=8.0$  a niebieska  $pH=6.0$ .



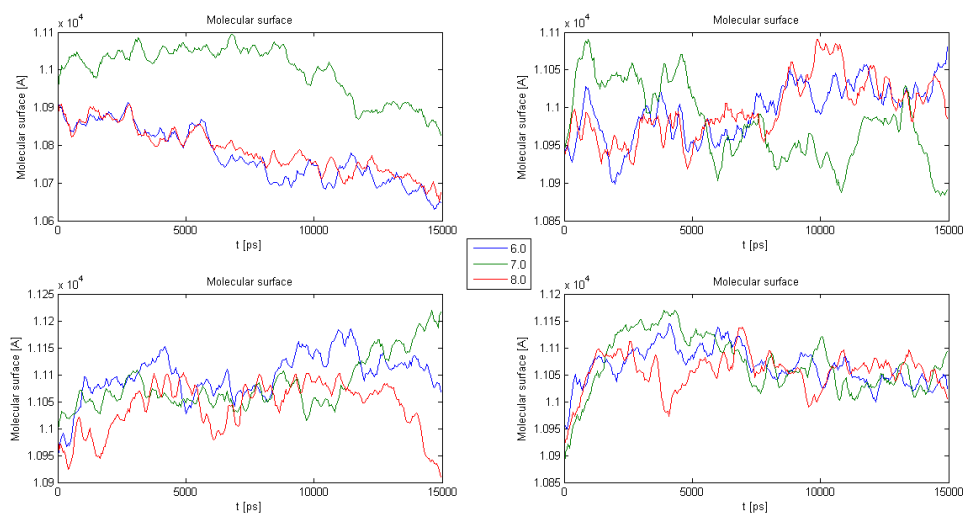
Rysunek 4.8: Zależność RMSD cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



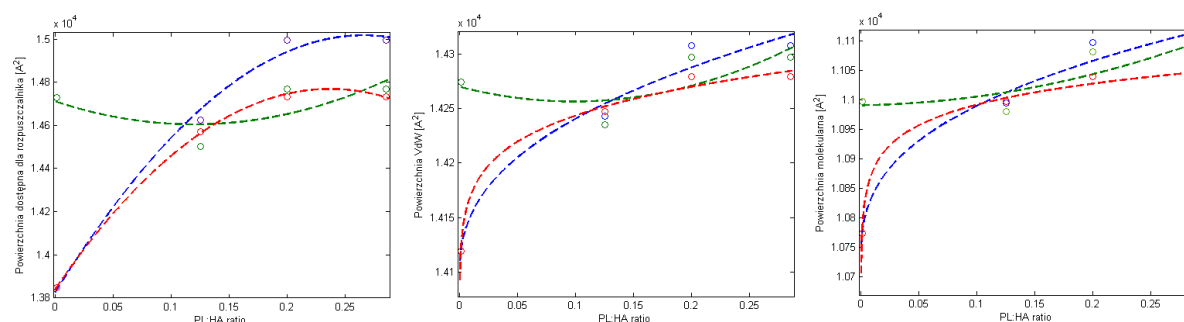
Rysunek 4.9: Zależność powierzchni Van der Waalsa cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



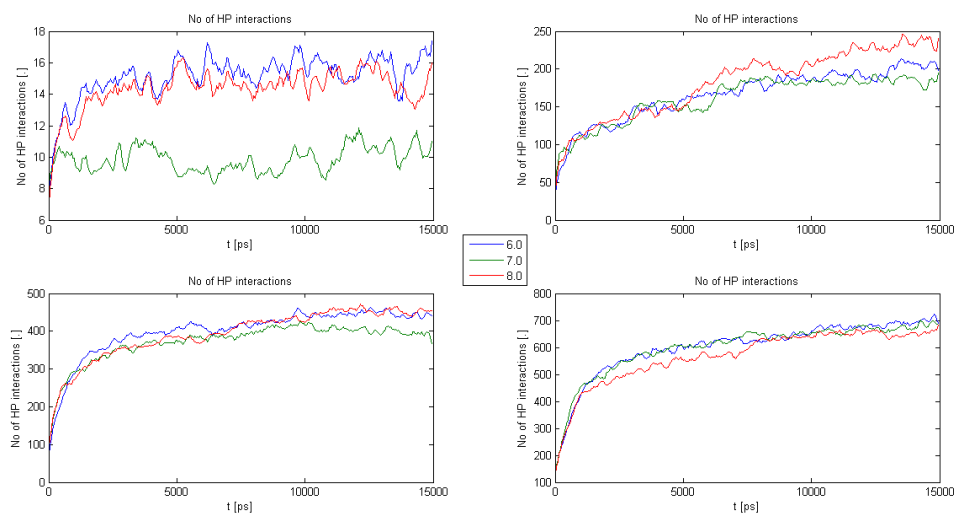
Rysunek 4.10: Zależność powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



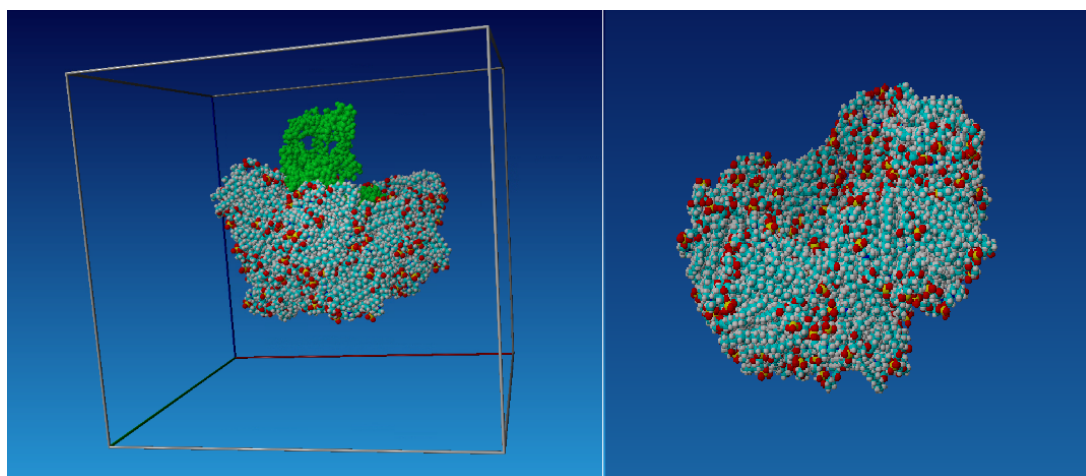
Rysunek 4.11: Zależność powierzchni molekularnej cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



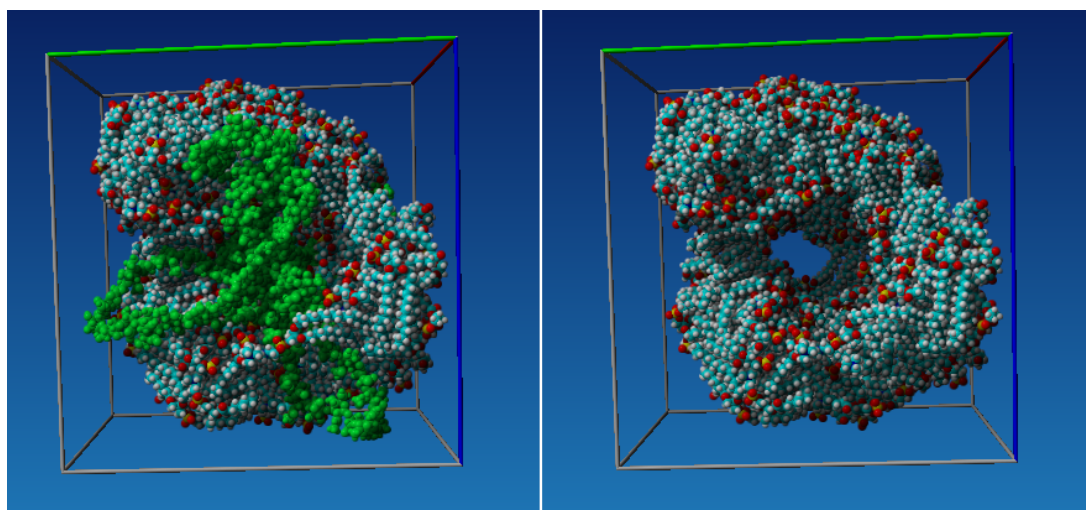
Rysunek 4.12: Zależność powierzchni molekularnej, Van der Waalsa oraz dostępnej dla rozpuszczalnika od ilości lipidów w stosunku do HA.



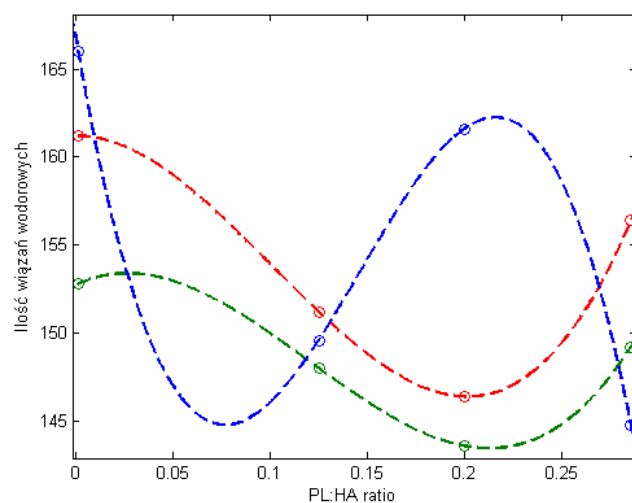
Rysunek 4.13: Zależność ilości oddziaływań hydrofobowych cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .



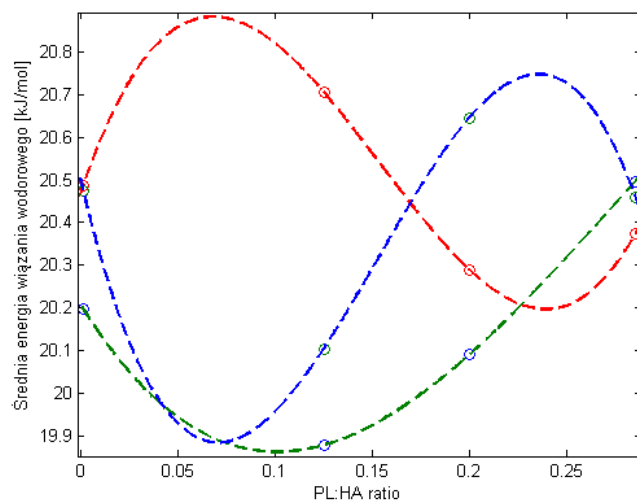
Rysunek 4.14: Wynik symulacji krótkiego łańcucha HA z 150 lipidami DPPC. Po lewej stronie przedstawiono cały układ HA:PL: zielona część reprezentuje HA, zaś niebiesko-biało-czerwone cząsteczki to lipidy (czerwone atomy reprezentują część hydrofilną, niebiesko-białe hydrofobową). Po prawej stronie przedstawiono micelę bez HA.



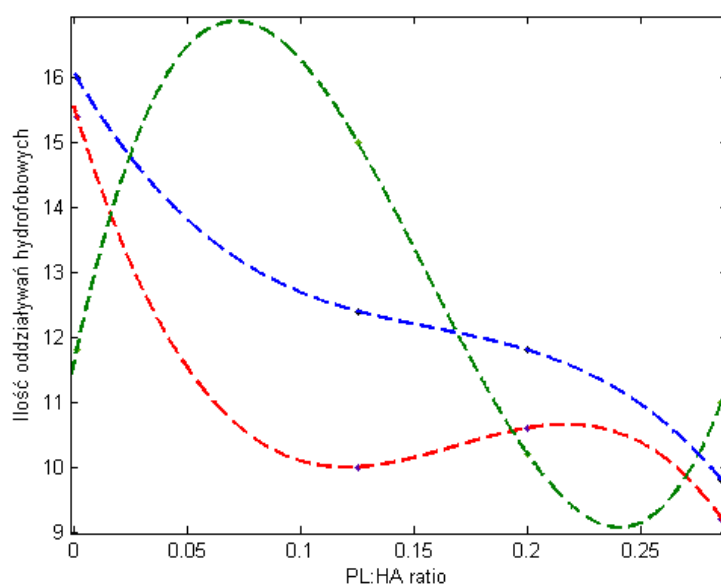
Rysunek 4.15: Wynik symulacji długiego łańcucha HA z 150 lipidami DPPC. Po lewej stronie przedstawiono cały układ HA:PL: zielona część reprezentuje HA, zaś niebiesko-biało-czerwone cząsteczki to lipidy (czerwone atomy reprezentują część hydrofilną, niebiesko-białe hydrofobową). Po prawej stronie przedstawiono micelę bez HA.



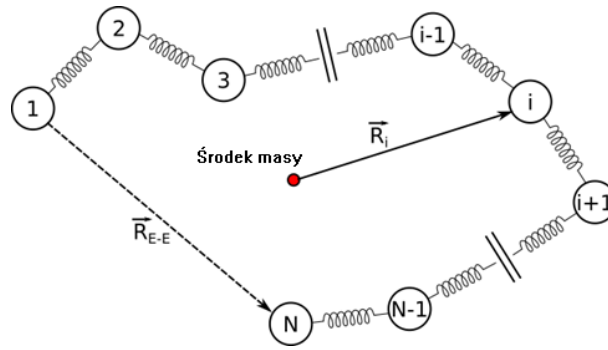
Rysunek 4.16: Zależność ilości wiązań wodorowych pomiędzy monomerami HA od stosunku PL:HA. Do punktów pomiarowych dopasowano krzywą typu wielomianowego stopnia 3. Niebieska linia przedstawia dopasowanie dla pH=7.0. Czerwona dla pH=6.0, a zielona dla pH=8.0.



Rysunek 4.17: Zależność średniej energii wiązań wodorowych pomiędzy monomerami HA od stosunku PL:HA. Do punktów pomiarowych dopasowano krzywą typu wielomianowego stopnia 3. Zielona linia przedstawia dopasowanie dla pH=7.0. Czerwona dla pH=6.0, a niebieska dla pH=8.0



Rysunek 4.18: Zależność ilości oddziaływań hydrofobowych pomiędzy monomerami HA od stosunku PL:HA. Do punktów pomiarowych dopasowano krzywą typu wielomianowego stopnia 3. Zielona linia przedstawia dopasowanie dla pH=7.0. Czerwona dla pH=6.0, a niebieska dla pH=8.0 .



Rysunek 4.19: Model łańcucha „bead-spring”.

## 4.4 Model Rouse’a

Zachowanie łańcucha HA jak przedstawiono powyżej zależne jest od obecności lipidów. Hydrofobowość łańcucha HA wpływa na jego interakcje z lipidami. Wielkości typu promień bezwładności, RMSD, itd. są miarą konformacji łańcucha, jednakże nie opisują wszystkich jego właściwości. Inną miarą jest wartość odległości końców łańcucha. Pozwala ona na lepsze zrozumienie jego zachowania w badany układzie. W tym celu wykorzystano model Rouse’a, aby zracjonalizować wpływ lipidów na sieciowanie HA. Model Rouse’a wykorzystywany jest do opisu ruchu łańcucha typu bead-spring, (Rysunek 4.19) składającego się z  $N$  „koralików” (beads) w rozpuszczalniku o lepkości  $\eta$  (Doi & Edwards 1986). W trakcie ruchu na segmenty działa siła oporu proporcjonalna do prędkości. Ruch  $N$ -tego koralika definiuje wektor  $\mathbf{R}_n(t)$  opisany jest równaniem Langevin’a:

$$\frac{d\mathbf{R}_n}{dt} = -\frac{1}{\xi} \frac{\partial U}{\partial \mathbf{R}_n} + f_n, \quad (4.5)$$

gdzie  $\xi$  oznacza współczynnik tarcia koralika,  $U$  siłę sprężystości, zaś  $f_n$  losową siłę działającą na koralik.

Przyjmuje się założenie, że wektor wiązania  $\mathbf{r}_n = \mathbf{R}_n - \mathbf{R}_{n-1}$  posiadają pewną elastyczność podlegającą statystyce Gaussa:

$$p(r_n) = \text{const.} \exp\left(\frac{-3r_n^2}{2a^2}\right), \quad (4.6)$$

gdzie  $a$  oznacza długość segmentu łańcucha złożonego ze sprężyny i koralika. Energia łańcucha zdefiniowana jest za pomocą sumy wszystkich energii sprężystości łańcucha:

$$U = \frac{1}{2}k \sum_{n=1}^N (\mathbf{R}_n - \mathbf{R}_{n-1})^2, \quad (4.7)$$



gdzie stała  $k = \frac{3k_B T}{a^2}$  jest stałą sprężystości. Podstawiając dany potencjał do równania Langevin'a i przechodząc ze zmiennych dyskretnych na ciągłe otrzymujemy równanie opisujące ruchy Browna sprzężonych oscylatorów z siłą losową  $f(n, t)$  działającą na  $n$ -ty monomer w  $t$  chwili :

$$\frac{\partial \mathbf{R}}{\partial t} = \frac{k}{\xi} \frac{\partial^2 \mathbf{R}}{\partial n^2} + f(n, t). \quad (4.8)$$

Równanie rozwiązuje się poprzez wprowadzenie zmiennych normalnych. Każda ze zmiennych może dokonywać niezależne ruchy przez co ruch łańcucha można sprowadzić do niezależnych modów:

$$X_p = \frac{1}{N} \int_0^N dn \cos\left(\frac{p\pi n}{N}\right) \mathbf{R}_n(\mathbf{t}) \quad (4.9)$$

Równanie 4.8 po wprowadzeniu zmiennych normalnych przybiera postać:

$$\xi_p \frac{\partial}{\partial t} X_p = -k_p X_p + g_p, \quad (4.10)$$

gdzie  $\xi_0 = N\xi$ ,  $\xi_p = 2N\xi$  dla  $p = 1, 2, \dots$  oraz

$$k_p = \frac{6\pi^2 k_B T}{Na^2} p^2 \quad dla \quad p = 0, 1, 2, \dots \quad (4.11)$$

$g_p$  reprezentują siły stochastyczne, spełniające relacje:

$$\langle g_{p\alpha} \rangle = 0 \quad (4.12)$$

oraz:

$$\langle g_{p\alpha}(t) g_{q\beta}(t') \rangle = 2\delta_{pq} \delta_{\alpha\beta} k_B T \delta(t - t') \quad (4.13)$$

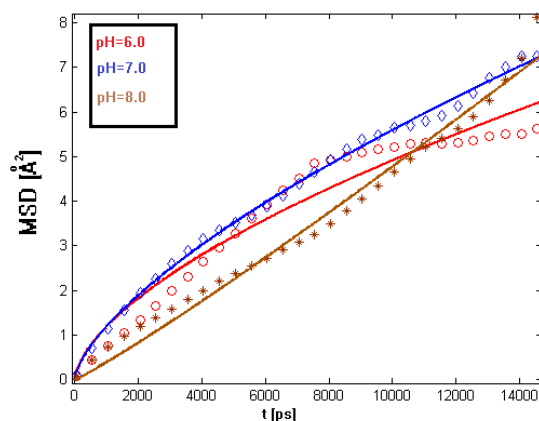
Ponieważ siły  $g_p$  są niezależne od siebie to również reorientacje składowych normalnych  $X_p$  są od siebie niezależne. W związku z czym możemy rozłożyć ruch łańcucha polimerowego na  $p$  niezależnych modów. Funkcja korelacji dla współrzędnych normalnych przybiera następującą postać:

$$\langle X_{p\alpha}(t) X_{q\beta}(0) \rangle = \delta_{pq} \delta_{\alpha\beta} \frac{k_B T}{k_p} \exp\left(\frac{-t}{\tau_p}\right), \quad (4.14)$$

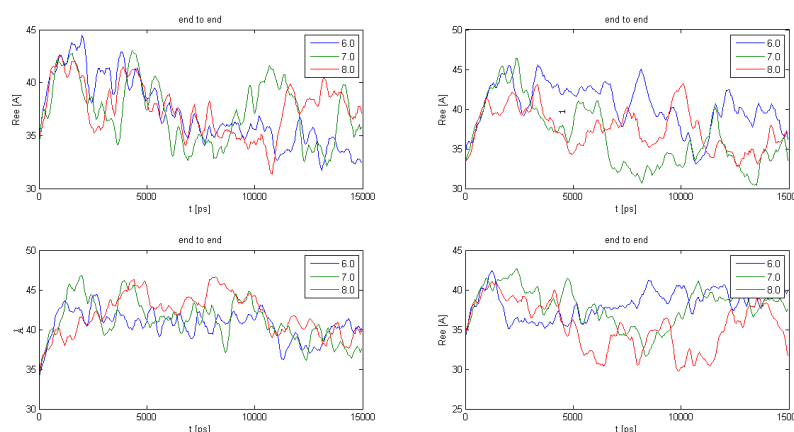
gdzie:  $\tau_p = \frac{\tau_1}{p^2}$  i  $\tau_1 = \frac{\xi_1}{k_1} = \frac{\xi N^2 a^2}{3\pi^2 k_B T}$  Średnio-kwadratowe przemieszczenie związane jest z samodyfuzją środka masy i zdefiniowana jest jako:

$$\langle (R_G(t) - R_G(0))^2 \rangle = \sum_{\alpha=x,y,z} \langle (X_{0\alpha}(t) - X_{0\alpha}(0))^2 \rangle = 6 \frac{k_B T}{N\xi} t. \quad (4.15)$$

Jak pokazano na Rysunku 4.20  $MSD$  jest zależne od współczynnika  $pH$ , gdzie może wykazywać zarówno reżim subdyfuzyjny (dla  $pH=6$  i  $7$ ) oraz superdyfuzyjny dla  $pH=8.0$ .



Rysunek 4.20: Zależność MSD od pH z krzywymi dopasowującymi. Dla pH=6.0  $\beta = 0.6$ , pH=7.0  $\beta = 0.7$  pH=8.0  $\beta = 1.1$



Rysunek 4.21: Zależność wektora koniec-koniec cząsteczki HA w funkcji czasu. Wartości współczynnika pH opisano w legendzie rysunku. Cztery wykresy przedstawiają wyniki dla różnych stosunków masowych  $k=PL:HA$ . Lewy górny róg  $k=0$ , prawy górny  $k=1/8$ , lewy dolny  $k=1/5$ , prawy dolny  $k=2/7$ .

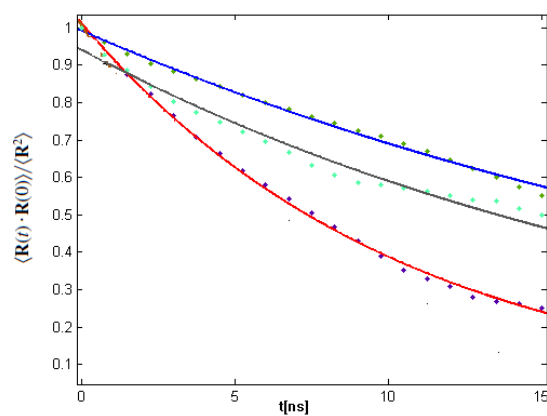
Funkcja autokorelacji promienia  $R_{ee}$  opisana jest

$$\langle R(t) \cdot R(0) \rangle \cong \frac{8Nb^2}{\pi} \sum_{i:odd} \frac{1}{i^2} \exp(-t/\tau_i), \quad (4.16)$$

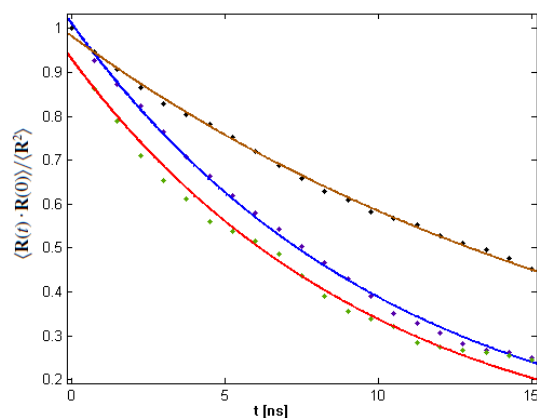
gdzie  $\tau_i$  oznacza stałą relaksacji,  $N$  - długością łańcucha, zaś  $b$  długością wiązania. Autokorelacja liczona jest po wszystkich modach łańcucha. Jednakże w przybliżeniu przyjmuje ona postać

$$\langle R(t) \cdot R(0) \rangle \cong Nb^2 \exp(-t/\tau_1) \quad (4.17)$$

Z przedstawionych dopasowań wynika, że długość wektora jest silnie zależna od koncentracji



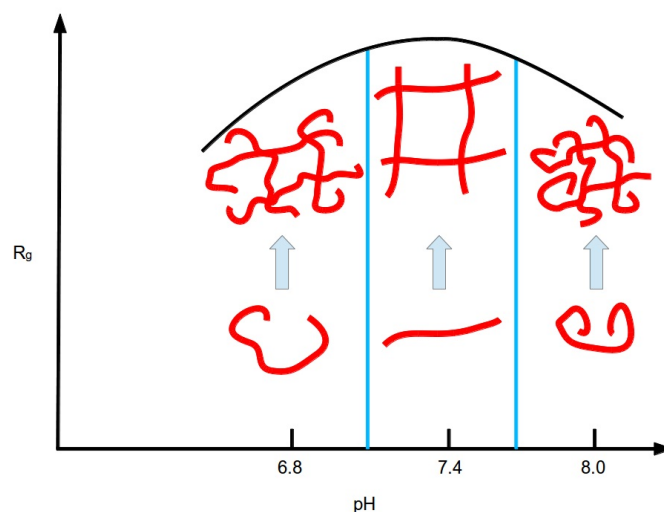
Rysunek 4.22: Zależność funkcji autokorelacji wektora  $R_{ee}$  od czasu dla różnych układów HA:PL. Wolny HA zachowuje się w sposób losowy. Jednakże dodanie lipidów sprawia, że zachowuje się on w sposób wynikający z oddziaływań hydrofobowych. Linia czerwona przedstawia wyniki dla HA, szara PL:HA=1/8, niebieska PL:HA=2/7.



Rysunek 4.23: Zależność funkcji autokorelacji wektora  $R_{ee}$  od czasu dla różnych wartości pH dla HA bez lipidów. Niebieska linia pH=7.0, czerwona pH=6.0, brązowa pH=8.0.

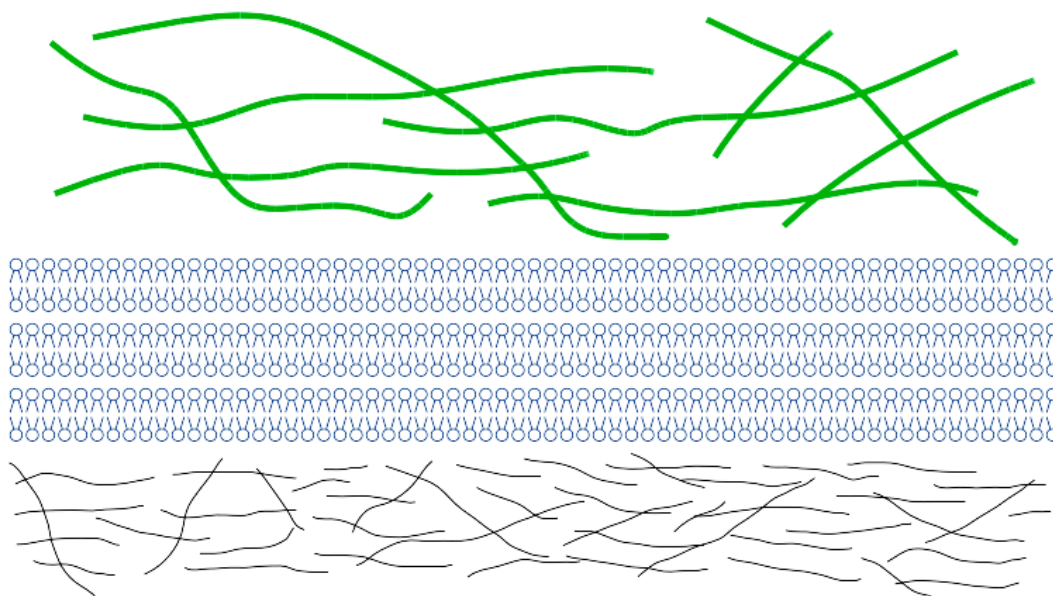
lipidów. Jest to związane ze zmianami promienia bezwładności oraz hydrofobowymi zmianami cząsteczki HA jak pokazano na Rysunkach 4.17 i 4.18.  $MSD$  i  $R_{ee}$  (Rysunki 4.20 i 4.22-4.23) pokazują charakterystyczne zachowanie cząsteczki HA w pH=8.0 (odpowiadającym patologicznym warunkom smarowania). Łańcuch HA wykazuje się modem dyfuzji normalnej (w przeciwieństwie do pH=6 i 7) oraz nielosowym zachowaniem (niezależnym od koncentracji lipidów). Zatem w zakresie przedstawionego układu HA:PL mamy do czynienia z dwoma groźnymi zjawiskami wynikającymi z pH i koncentracji lipidów.

## 4.5 Podsumowanie

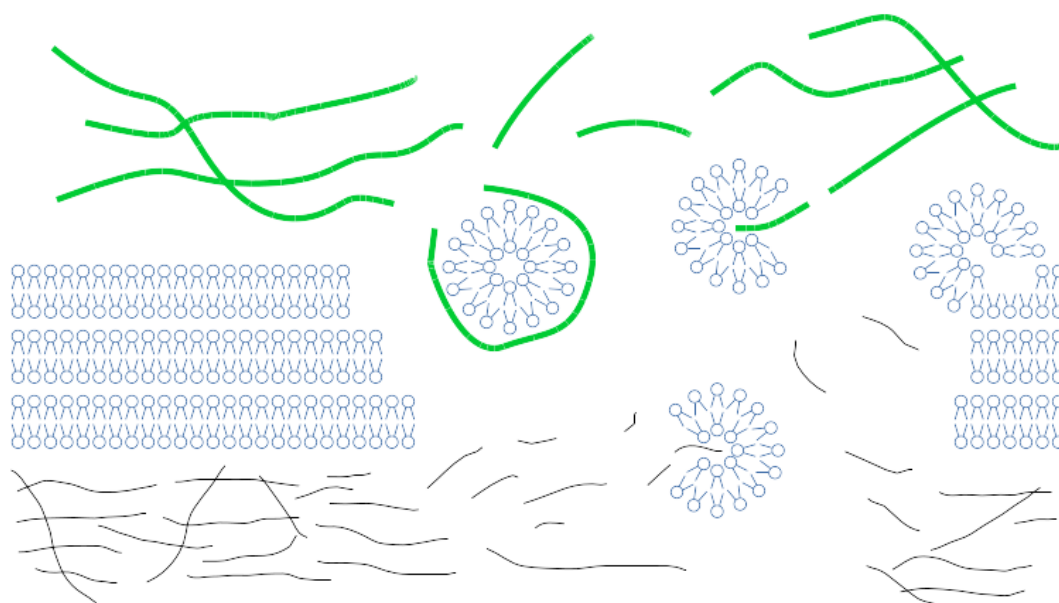


Rysunek 4.24: Obrazowe przedstawienie mechanizmu sieciowania HA jako zależność promienia bezwładności od pH.

Powyższy rozdział miał na celu przybliżenie zjawiska smarowania jako zależnego od oddziaływań lipidów z HA. Przedstawione wyniki ukazują obraz oddziaływań HA/PL jako zależnych od stosunku składników biorących w nim udział oraz czynnika pH. Obraz normalnej/zdrowej cieczy synowialnej diametralnie różni się od tego, który występuje w chorej cieczy. Pomimo tego, że wszystkie składniki cieczy pozostają te same zmieniają się proporcje między nimi. Zwiększona koncentracja lipidów oraz ubytek dwuwarstw z warstwy przypowierzchniowej powoduje zmianę właściwości lepko-sprężystych cieczy synowialnej. Ubytek lubrycyny (opisany w Rozdziale 1), składnika znacząco wpływającego na smarowanie graniczne, w połączeniu ze zmniejszoną średnią masą molekularną HA pogarsza smarowanie w reżimie smarowania granicznego. Z drugiej strony krótkie łańcuchy HA są absorbowane przez liposomy powstające w wyniku obumierania komórek chondrocytów oraz zanikiem warstwy przypowierzchniowej uniemożliwiając tworzenie sieci wspomagającej smarowanie hydrodynamiczne. Wyniki z pomiarów elektroforetycznych pokazują przesunięcie w funkcji gęstości ładunku między lipidami a kwasem hialuronowym co wiąże się z mniejszym transportem jonów wraz ze wzrostem koncentracji lipidów (Rysunek 4.26) w stosunku do warunków normalnych (4.25). Efekt ten wpływa także na pogorszenie mechanizmu sieciowania. Do konsekwencji opisanych zjawisk dochodzi spadek przewodnictwa jonowego SF. Jest on konsekwencją zarówno niskiej powierzchniowej gęstości ładunku jak i wzrostem koncentracji lipidów ekranujących transport jonów wodorowych. Słabsze i krótsze sieci są złym absorberem (nano)nacisku. Przedstawione wyniki mogą w pewnym stopniu wyjaśnić słabą efektywność kuracji polegającej na wstrzykiwaniu kwasu hialuronowego do chorego



Rysunek 4.25: Graficzna prezentacja przypowierzchniowej warstwy cieczy synowialnej w normalnych warunkach. Zielone linie reprezentują kwas hialuronowy. Czarne linie to włókna chondrocytów budujących chrząstkę synowialną. Lipidy DPPC tworząca do 10 dwuwarstw.



Rysunek 4.26: Graficzna reprezentacja przypowierzchniowej warstwy cieczy synowialnej w patologicznych warunkach. W tych warunkach następuje degeneracja warstwy przypowierzchniowej w wyniku czego uwalniane są lipidy do objętości cieczy synowialnej. Dodatkowo HA występuje w postaci krótszych łańcuchów, które absorbowane są przez micelle powstałe w wyniku przekroczenia stężenia micelizacji. Dodatkowo ekranowane lipidami HA traci możliwość tworzenia sieci.

stawu. Zazwyczaj wstrzykuje się 1-2% roztwór o objętości ok. 2 ml. Roztwór normalizuje pH w kierunku wartości fizjologicznych, jednakże przy zwiększonej koncentracji lipidów i ubytku warstwy przypowierzchniowej, cały czas istnieje problem ekranowania środowiska lipidami. Efektem jest brak tworzenia sieci dostatecznie trwałych, aby być dobrym absorberem nacisku oraz słabe tworzenie szczotek w tarciu granicznym. Rysunki 4.14 i 4.15 przedstawiają formy w jakich występują lipidy z HA w dużych koncentracjach PL i krótkich łańcuchach. Hydrofobowość łańcucha HA jako zależna od pH i koncentracji lipidów również wpływa na mechanizm tworzenia sieci i w konsekwencji ułatwionego smarowania. Jak pokazują dopasowania do MSD pH wpływa również na dyfuzyjność łańcucha, w pH=8.0 jest to dyfuzja normalna zaś w zakresie od 6.0 do 7.0 jest to subdyfuzja. W normalnych warunkach synergia wszystkich elementów prowadzi do uzyskania bardzo efektywnej struktury operującej między reżimami. W konsekwencji zanikania warstwy przypowierzchniowej stosunek lipidów do kwasu hialuronowego zostaje zachwiany co skutkuje gorszą odpowiedzią układu na nacisk. Brak sieci skutkuje słabą odpowiedzią na naprężenia występujące w chrząstce, zaś utrata lubrycyny pogarsza działanie układu w smarowaniu granicznym. Rysunki 4.26 i 4.25 pokazują stan środowiska cieczy synowialnej w chorym i zdrowym stawie. Zanikanie warstwy przypowierzchniowej i zanik sieci HA prowadzą do całkowitej zmiany reżimu tarcia w kierunku tarcia suchego.

## Rozdział 5

# Tarcie w skali mezo i nanoskopowej

W modelu ułatwionego smarowania jednym z mechanizmów zmniejszających tarcie w chrząstce jest oddziaływanie między powierzchniami hydrofilowymi (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013, Bełdowski, P. et al. 2014, Gadomski et al. 2008). Głównym mechanizmem jest zjawisko hydratacyjnego odpychania między dwuwarstwami lipidowymi przy powierzchni chrząstki (Pawlak et al. 2016) oraz tarcie micel (Gadomski et al. 2008). Wpływ micel polega na zmianie reżimu z tarcia ślizgowego na tarcie toczne. Prezentowany rozdział przedstawia wyniki symulacji dynamiki molekularnej na układach micelarnych. Zdolność miceli do smarowania w pewnym stopniu w porównaniu z innymi cząsteczkami może objaśnione na podstawie poniższych cech:

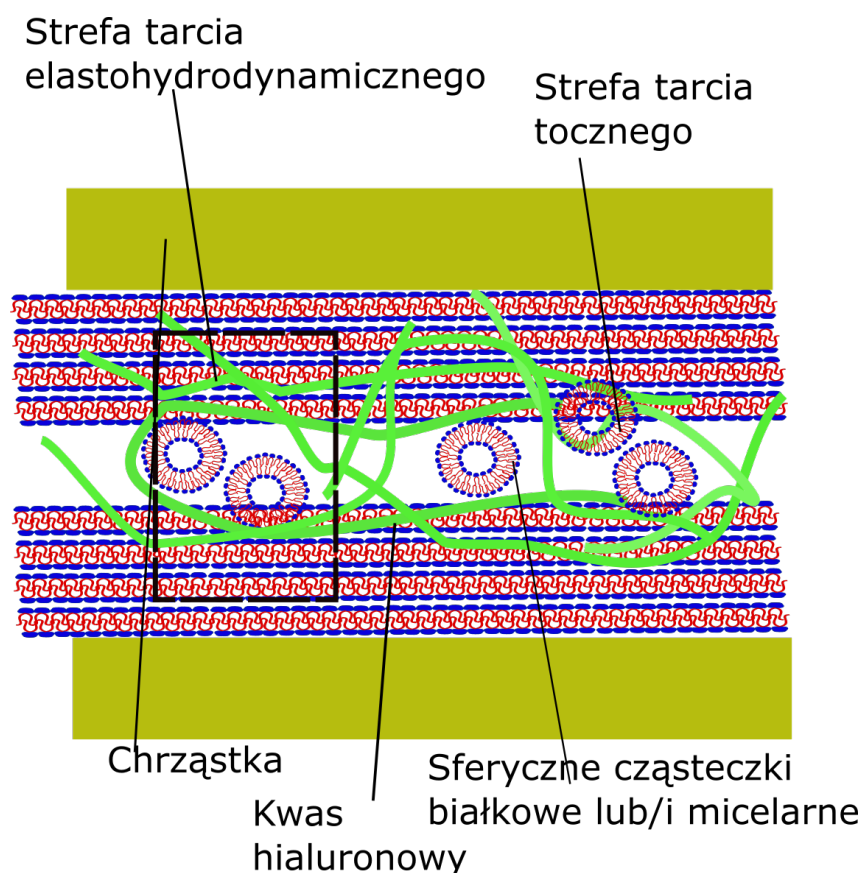
1. Micele mogą być adsorbowane fizycznie na dowolnej powierzchni (metal, ceramika, materiały bogate w węgiel, chrząstka) ze względu na występowanie sił Van der Waalsa.
2. Zaadsorbowane micidele są tak małe, że prawie nie mogą być usunięte z powierzchni ruchomej cieczy.
3. Wielkość miceli jest tak mała, że można ją łatwo wprowadzić makroskopowy styk ślizgowy w warunkach brzegowych, ale nie zakłóca ona znacząco reżimu hydrodynamicznego.

Rozdział oparty jest na dwóch opublikowanych pracach opisujących symulacje dynamiki micel (Bełdowski, P., Winkler, Hładyszowski, Jung & Gadomski 2016, Bełdowski, P., Winkler, Augé, Hładyszowski & Gadomski 2016) oraz materiałach zaprezentowanych na międzynarodowych konferencjach. Poniżej przedstawiono wyniki symulacji interakcji micel przy użyciu techniki sterowanej dynamiki molekularnej oraz z przepływem ścinającym zastosowanym do dwóch form występujących w cieczy synowialnej: miceli prostych i odwrotnych. Ostatnia część przedstawia symulacje pojedynczej miceli pomiędzy grafitowymi ściankami, poddawaną periodycznemu naciskowi (Bełdowski, P., Winkler, Augé, Hładyszowski & Gadomski 2016).

Zmianę reżimu tarcia ze ślizgowego na toczne rozważano już w latach 80-tych (Ermakov et al. 2016). Przy pomocy mikroskopów elektronowych: transmisyjnego i skaningowego zaobserwowano obecność kulistych struktur (Rysunek 5.1). Tarcie toczne odbywa (wg.



(Ermakov et al. 2016)) dzięki tworzeniu związków HA z białkami/micelami. Zgodnie z

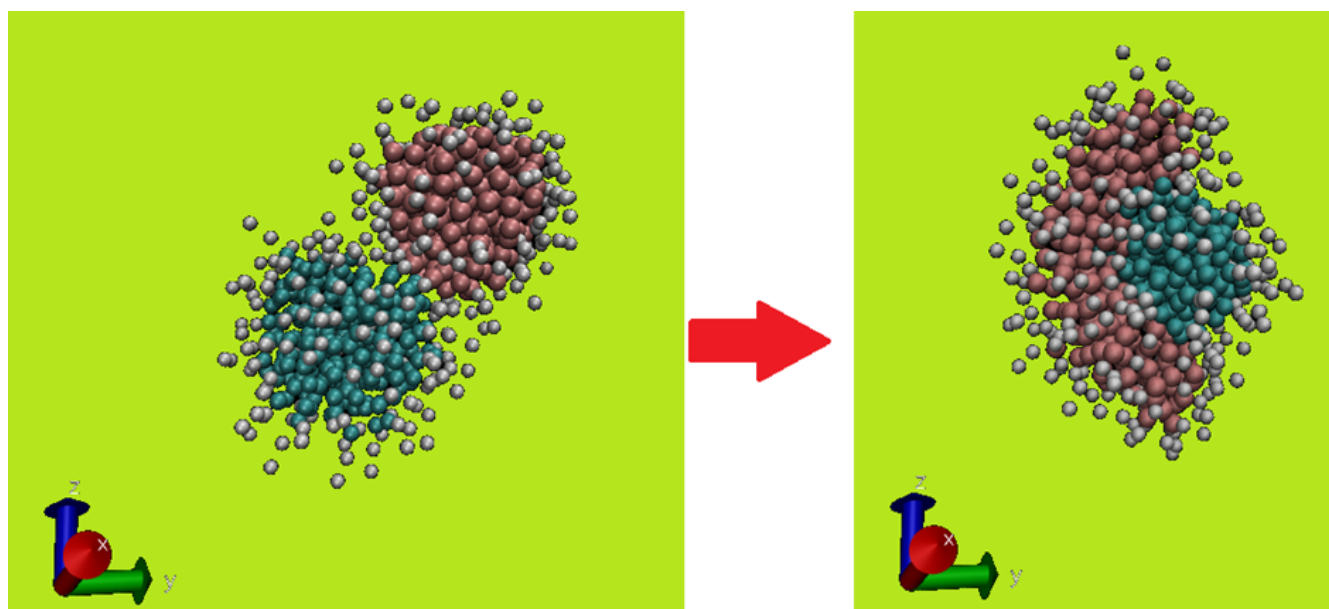


Rysunek 5.1: Układ chrząstki stawowej w reżimie smarowania hydrodynamicznego. Występujące sferyczne obiekty reprezentują białka lub micelle. Tarcie toczne może występować tylko w obecności sieci kwasu hialuronowego (z kolagenem) jako medium przejmującego zewnętrzny bodziec siłowy. Zainspirowane (Ermakov et al. 2016).

tym modelem, sieć cząsteczek HA otacza sferycznej cząsteczki białkowe podobnie jak łożyska kulkowe, dzięki czemu cząsteczki białka mogą się swobodnie obracać. Ze względu na wysoką koncentrację lipidów w przestrzeniach między-powierzchniowych i zjawisko tribomicelizacji, podobne zjawisko może zachodzić również dla układów micel, lub układów lipidowo-białkowych.

## 5.1 Oddziaływanie trących micel

W przeprowadzonych symulacjach korzystano z gruboziarnistej reprezentacji cząsteczek lipidów. W Rozdziale 1 opisano dwa rodzaje micel - odwrotne (zbudowane z lipidów DPPC, w rozpuszczalniku niepolarnym, zawierające wodę w swoim wnętrzu) oraz micelle proste/sferyczne (zbudowane z surfaktantów DPC w wodzie). Zastosowano także metodę sterowanej dynamiki molekularnej do wymuszenia ukierunkowanego ruchu micel. Micele tworzą się spontanicznie w roztworze po przekroczeniu krytycznego stężenia micelizacji i są strukturami stabilnymi termodynamicznie (Marsh 2012). Oddziałując ze sobą wymieniają się masami co powoduje komplikacje w obliczeniach na grupach atomów (obliczenie promienia bezwładności i powiązanych z nim parametrów staje się obciążone błędem). Dlatego w stosunku do oryginalnego pola MARTINI (Marrink et al. 2007) zmodyfikowano potencjały oddziaływania części lipidu. W przypadku micel odwróconych zmodyfikowano siłę oddziaływania między hydrofilowymi częściami lipidu. W micelach normalnych były to oddziaływania części hydrofobowych. Modyfikacja pola siłowego pozwala na utrzymanie micel w grupie i obliczenie ww. parametrów. Parametrami mierzonymi w trakcie symulacji był tensor bezwładności (zdefiniowany w Rozdziale 2), siła sprężystości między wirtualnym atomem a środkiem masy miceli (patrz Rysunek 5.2), rotacja micel wokół centrum masy oraz moment pędu. Obrót miceli w osi  $xy$  zdefiniowany przez:



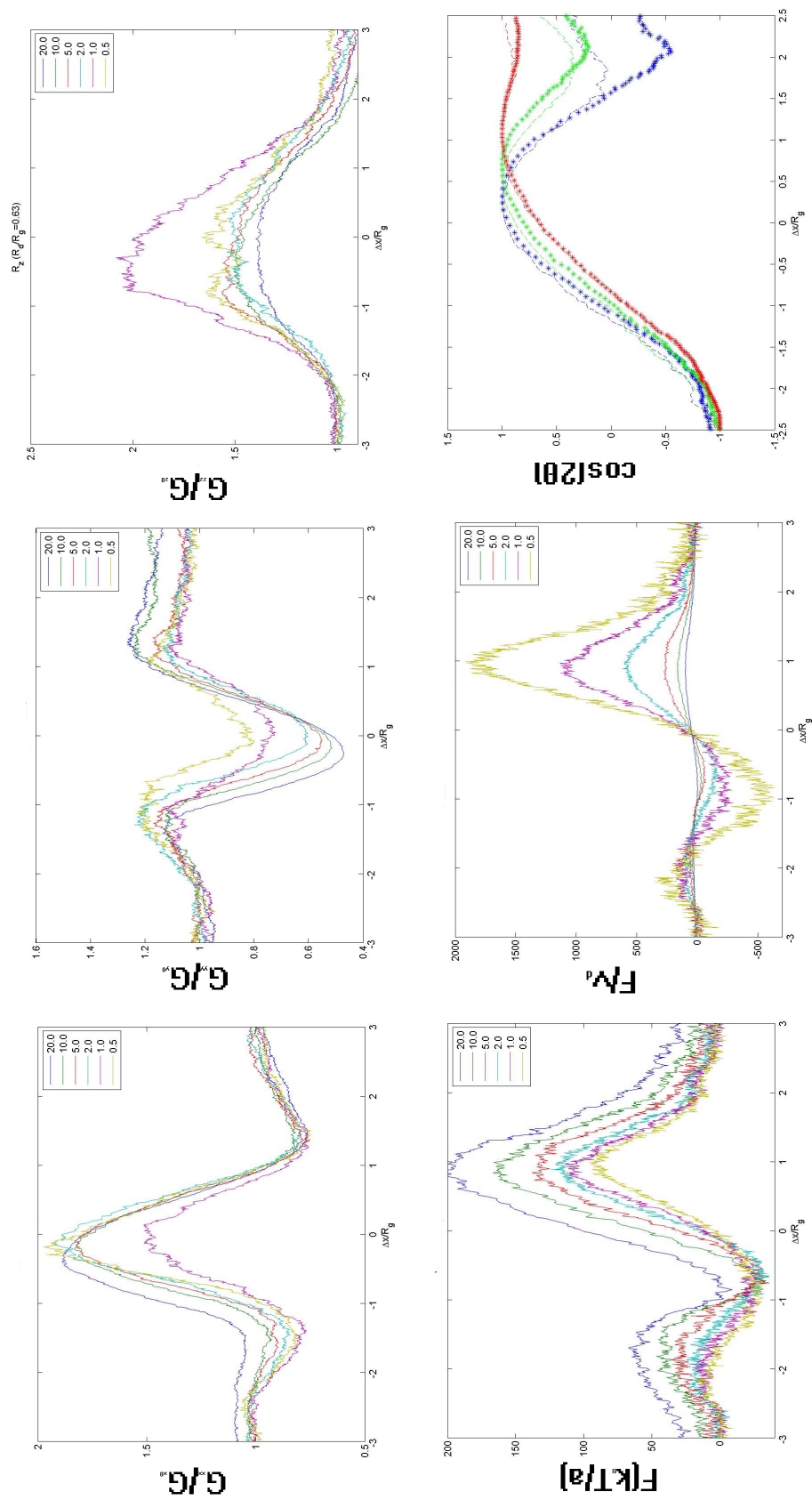
Rysunek 5.2: Wynik symulacji w dwóch fazach interakcji micel: (i) w momencie początkowej interakcji; (ii) moment gdy odległość między środkami mas równa się zero.

$$\cos(2\Theta) = \frac{G_{xx} - G_{yy}}{\sqrt{4G_{xy}^2 + (G_{xx} - G_{yy})^2}} \quad (5.1)$$

oraz całkowity moment pędu

$$\vec{L}_S = \sum_{i=1}^N \vec{L}_{S,i} = \sum_{i=1}^N \vec{r}_{S,i} \times \vec{p}_i \quad (5.2)$$

Symulacje były przeprowadzane dla trzech różnych liczb agregacji miceli, a mianowicie 40, 60 i 75 lipidów (Bełdowski, P., Winkler, Hładyszowski, Jung & Gadomski 2016) i różnych prędkości dryfu. Rysunek 5.3 przedstawia zmiany kształtu i położenia miceli w osi  $x - y$  dla promienia bezwładności  $R_g = \sqrt{R_x^2 + R_y^2 + R_z^2}$ , gdzie  $R_x$ ,  $R_y$  i  $R_z$ . Symulacje przeprowadzono dla różnych prędkości wyrażonej przez bezwymiarową liczbę Peclet  $Pe = \frac{\tau_r}{\tau_d} = \frac{\tau_r v_d}{R_g}$ .  $\tau_r$  oznacza czas relaksacji,  $R_g$  promień bezwładności,  $v_d$  to prędkość dryfu. Środki mas micel były przesunięte względem siebie w osi  $y$   $R_d/R_g \approx 0.6$ , gdzie  $R_d$  oznacza bezwzględną odległość w osi  $y$ . Micele zmieniały swoje kształty, jak pokazano na Rysunkach 5.2 i 5.3 z kulistego do quasi-cylindrycznego. Wyniki symulacji wskazują, że morfologia dwóch oddziałujących miceli zależy od położenia środka masy masy i prędkości dryfu (słabiej od ilości lipidów). Takie dynamiczne zachowanie przypomina jakościowo nierównowagowe morfologie występujące w złożonych procesach dyfuzyjnych (Brenner et al. 2000, Gadomski 1999). Badanie pozwala opisać warunki ułatwionego smarowania jako pochodną oddziaływań między agregatami amfifilowymi w cieczy smarującej (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013, Gadomski et al. 2008). Micele mają tendencję do odpychania w początkowej fazie interakcji, efekt jest tym silniejszy im niższa jest prędkość miceli. Spowodowane jest to zapewne czasem relaksacji, rozumianym jako powrót miceli do początkowego kształtu. Cząsteczki rozpuszczalnika przy powierzchni miceli wymuszają większe zmiany morfologiczne przy większych prędkościach przez niedostateczne „wypychanie” ich ze strefy między-micelarnej. Podobny efekt występuje w polimerach gwieżdzystych (Singh & et al. 2011). W środkowej fazie interakcji tworzy się jedna złożona micela, hydrofobowe części miceli pozostają w kontakcie z wodą. W tej fazie ruchu micidele mogą wymieniać się lipidami i tworzyć trwałe struktury co skutkuje zachowaniem układu w ostatniej fazie interakcji. W fazie trzeciej dochodzi do rozdzielenia struktury co wiąże się z powstawaniem rozciągniętych struktur: w fazie tej może dochodzić do uwalniania wolnych lipidów do cieczy. Zależność siły harmonicznej między micelą, a wirtualnym punktem wynika z czasu relaksacji miceli podczas kontaktu. W niższych prędkościach efekt odpychania hydratacyjnego pozwala na zachowanie struktury co widać także w symulacjach przepływu ścinającego.



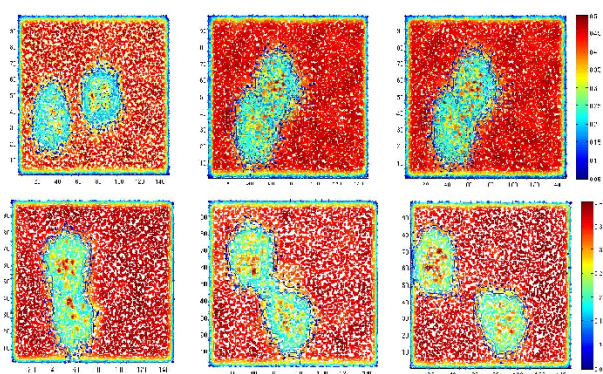
Rysunek 5.3: Wyniki symulacji micel przy użyciu SMD. Linie oznaczają wyniki dla różnych prędkości. W dolnym rzędzie obserwujemy od lewej do prawej: siła harmoniczna między środkami masy miceli a wirtualnym atomem, siła harmoniczna odniesiona do prędkości oraz obrót micel względem położenia początkowego. Górny rząd przedstawia składowe tensora bezwładności w trzech prostopadłych osiach-  $x$ ,  $y$  i  $z$ . Legenda pokazuje wartości  $v_d$  w  $mm/s$ .

### 5.1.1 Ruch micel w przepływie ścinającym

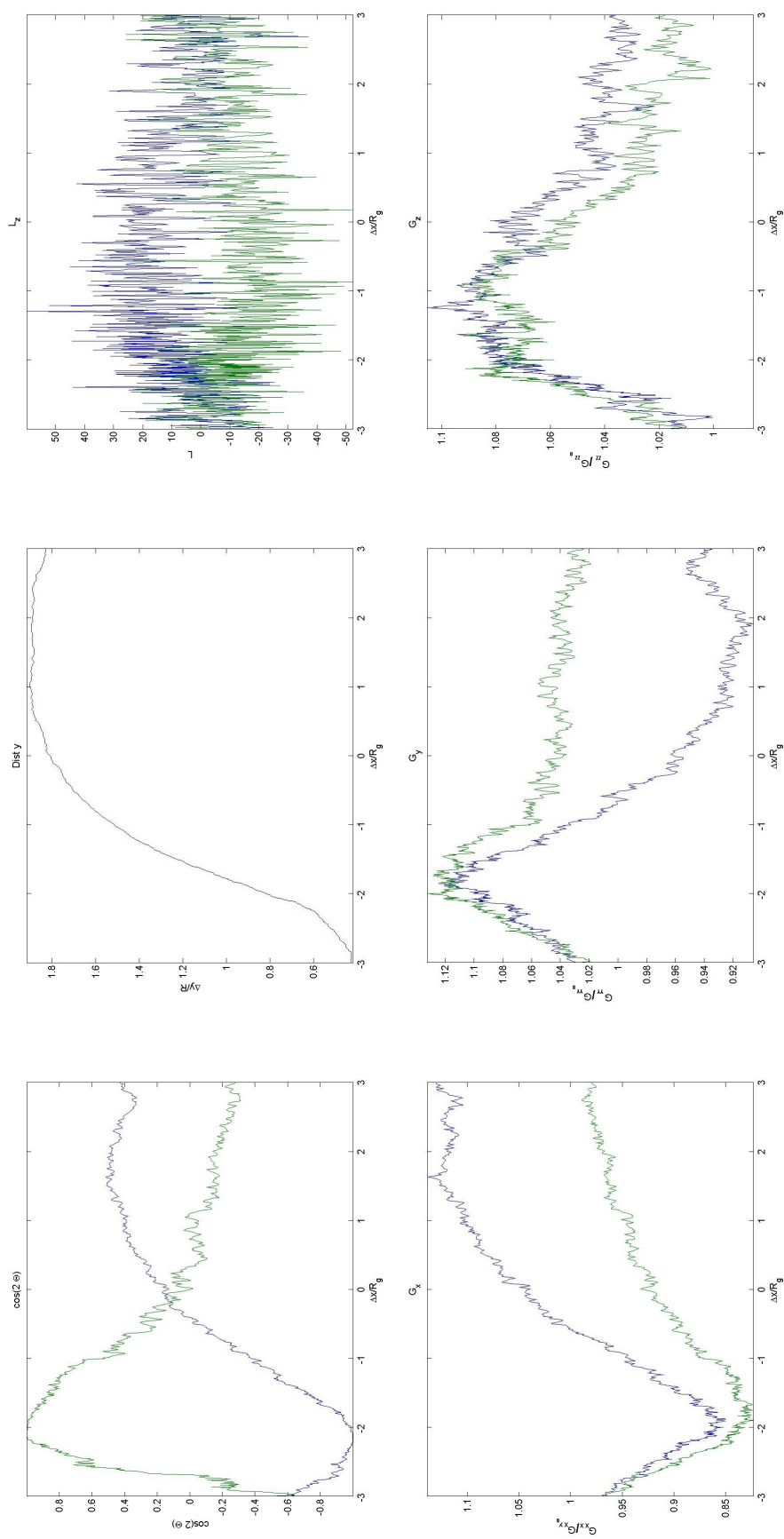
W celu zbadania właściwości trących micel o większej ilości stopni swobody przeprowadzono symulację interakcji w obecności przepływu ścinającego. Zachowanie miceli w tym układzie przypomina zachowanie kropeł (Bayareh & Mortazavi 2011) w układach makroskopowych. Jednak w odróżnieniu od układów micelarnych, wpływ siły ciężkości i ciśnienia są małe. Równaniem opisującym przepływ niestacjonarnego, lepkiego, nieściśliwego i niemieszalnego układu dwóch ciał opisuje równanie Naviera - Stokesa:

$$\frac{\partial \rho \mathbf{u}}{\partial t} + \nabla \cdot \rho \mathbf{u} \mathbf{u} = -\nabla P + \nabla \cdot \mu (\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T) + \sigma \int \kappa \mathbf{n} \delta^\beta (\mathbf{x} - \mathbf{X}) ds + \rho \mathbf{g} \quad (5.3)$$

$u$  jest prędkością płynu,  $P$  - ciśnieniem,  $\rho$  oznacza gęstość płynu,  $\mu$  oznacza lepkość cieczy, a  $\sigma$  współczynnikiem napięcia powierzchniowego. Również  $\delta^\beta$  jest dwu- lub trójwymiarową funkcją delta.  $\kappa$  jest krzywizną przepływów dwuwymiarowych.  $n$  jest wektorem jednostkowym prostopadłym do powierzchni miceli skierowaną na zewnątrz miceli.  $x$  jest pozycją we współrzędnych Eulera, zaś  $X$  oznacza położenie we współrzędnych Lagrange'a.  $g$  to przyspieszenie ziemskie. Rysunki 5.4 i 5.5 pokazują jak micelle unikają kontaktu w początkowej fazie ruchu co skutkuje przesunięciem odległości w osi  $y$ . W przypadku braku przyciągania van der Waalsa, odpychanie hydratacyjne zapobiega rozpadowi miceli zaś zmniejszony przekrój zderzenia miceli pozwala przesuwac je względem siebie. Micelle przyspieszają podczas ślizgania się po sobie w środkowej fazie interakcji. Rotacja miceli w kierunku  $x$  indukuje zmianę momentu pędu w osi  $z$ . Taki efekt sugeruje ułatwione smarowanie w zakresie niskich koncentracji lipidów wspartych sieciami HA co możemy powiązać ze zmodyfikowanym potencjałem oddziaływania wewnętrznych atomów miceli.



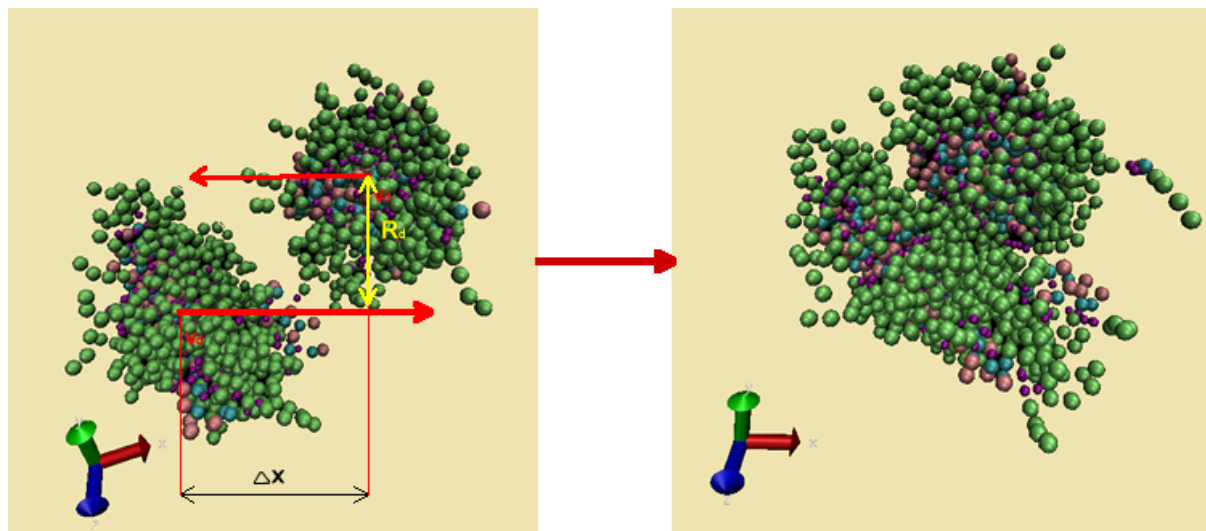
Rysunek 5.4: Etapy interakcji micel poddanych przepływowi ścinającemu jako funkcja gęstości. Kolejne fazy ruchu widoczne są od lewej do prawej z góry i kontynuacja od dołu. Czerwone cząsteczki reprezentują wodę, zaś niebiesko-żółte micelle.



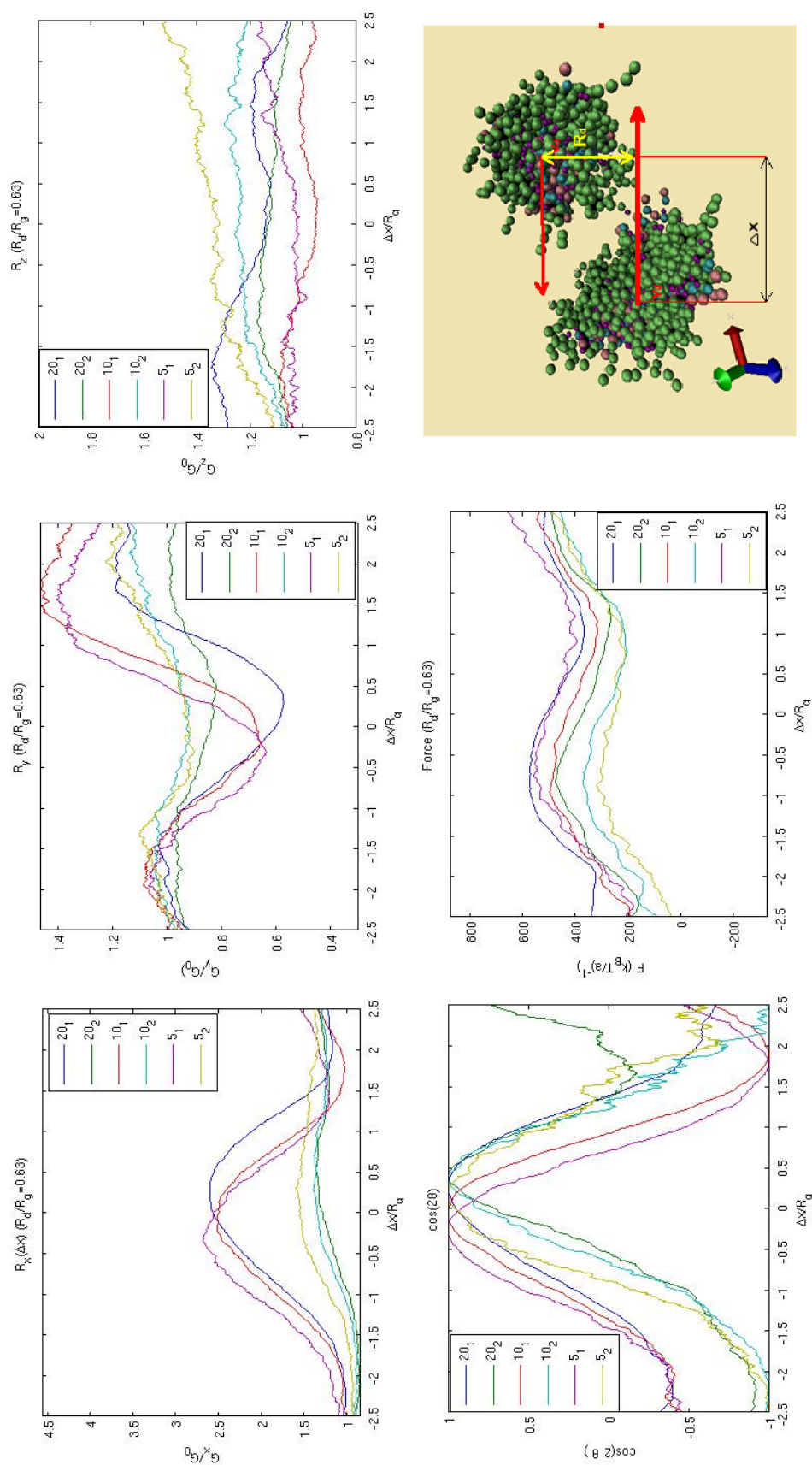
Rysunek 5.5: Wyniki symulacji micel w przepływie ścinającym w wodzie. Niebieska i zielona linia prezentują wyniki dla każdej z symulowanych micel osobno, wszystkie wykresy przedstawiają zależność od odległości od środków mas micel. W górnym rzędzie obserwujemy od lewej do prawej: obrót micel względem położenia początkowego, dystans między micelami w osi y oraz moment pędu micel. Dolny rząd przedstawia składowe tensora bezwładności w trzech prostopadłych osiach x, y i z.

### 5.1.2 Micele odwrotne

Ostatni przykład oddziaływań dotyczy micel odwróconych (Rysunek 5.6), charakteryzuje się zmianą kształtów: przypomina to układ główka - panewka w łożysku trącym (Rysunek 5.7). Również obrót micel przypomina ten układ - bardziej sferyczna micela obraca się po panewkowej. W przypadku micel odwróconych zauważono brak efektu odpychania hydratacyjnego więc struktury te nie są użyteczne w mechanizmie smarowania. Jednak właściwości te mogą być użyteczne w utrzymywaniu sieci HA.



Rysunek 5.6: Wycinek z symulacji dwóch micel odwróconych w rozpuszczalniku niepolarnym.

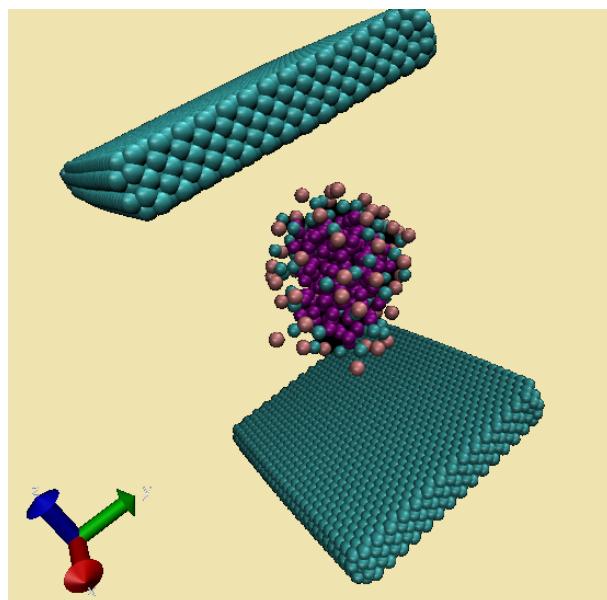


Rysunek 5.7: Wyniki symulacji interakcji dwóch micel odwróconych. Górny rząd przedstawia zmiany kształtu dla każdej osi. Dolny rząd przedstawia obrót micel w funkcji odległości środków mas oraz siłę potrzebną do przesunięcia miceli na każdym etapie interakcji. W przypadku micel odwróconych każda z micel zachowuje się w inny sposób. Przypomina to układ łożyska-panewka. Dodatkowo widoczny jest brak odpychania w początkowej fazie interakcji.



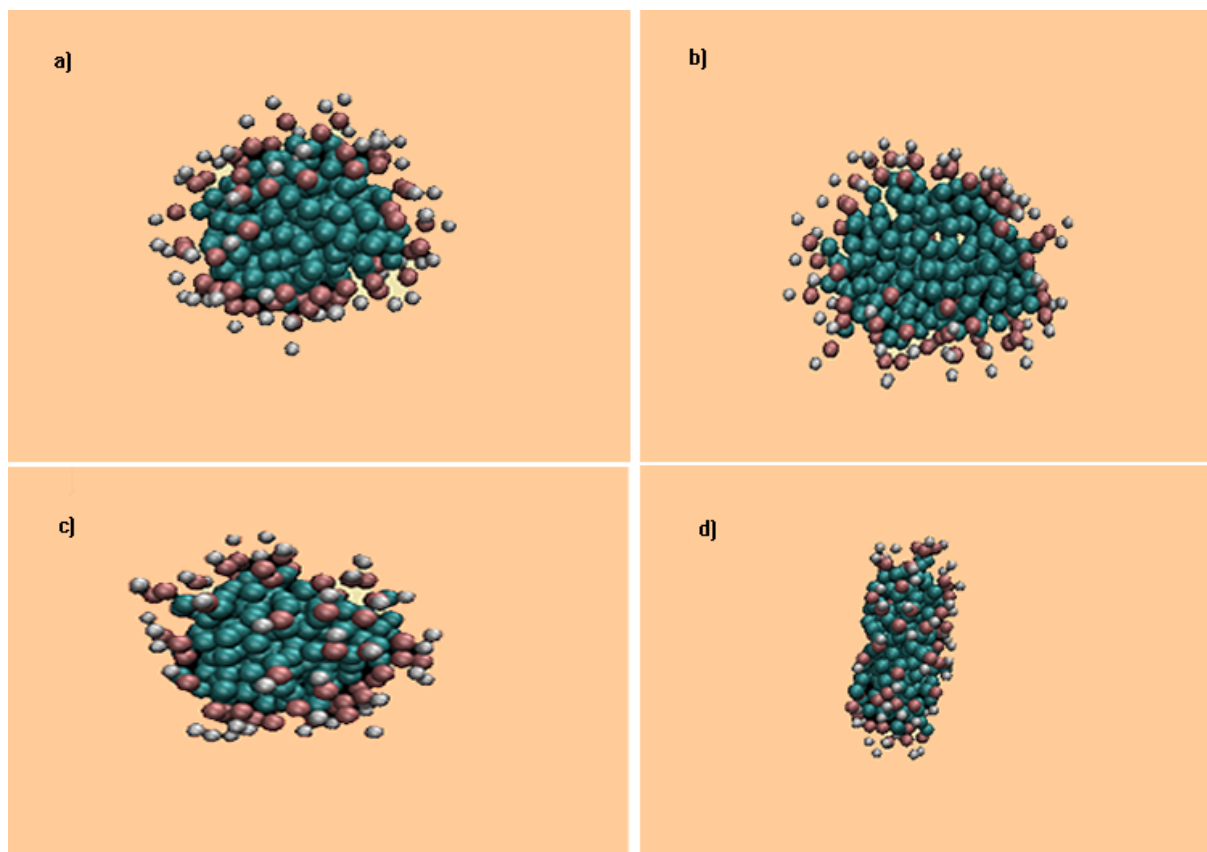
## 5.2 Symulacje nacisku na micela

Ostatnią zbadaną cechą micel jest ich odpowiedź na nacisk. Pojedyncza micela bądź układ dwóch micel trących są jak pokazano wyżej czynnikami pozwalającymi rozważać je jako elementy istotne w mechanizmie tarcia, jednakże układ musi dodatkowo przenosić pewne obciążenie zewnętrzne, aby być rozważany jako element dobrze smarujący AC. W tym celu przeprowadzono symulacje miceli naciskanej w jednej osi w środowisku wodnym. Modelowany układ składał się z 18.000 cząsteczek (wody - polarnych, lipidów i grafitu - apolarnych). Symulacje NPT były wykonywane przez przemieszczanie dwóch powierzchni grafitu względem siebie (patrz Rysunek 5.8), podczas gdy woda i lipidy są dynamicznie uwięzione pomiędzy nimi (Winkler & Hentschke 1993). Każda powierzchnia składała się z pięciu warstw grafitu dla lepszej stabilizacji jego struktury (Gobbo & et. al. 2013). Krok czasowy wynosił 10 fs. Micele składały się z 40, 60 i 75 lipidów DPC. Grafity



Rysunek 5.8: Micela między dwiema powierzchniami grafitowymi. Cząsteczki wody, które znajdują się wokół całego układu jak i między płytkami, nie pokazano na rysunku.

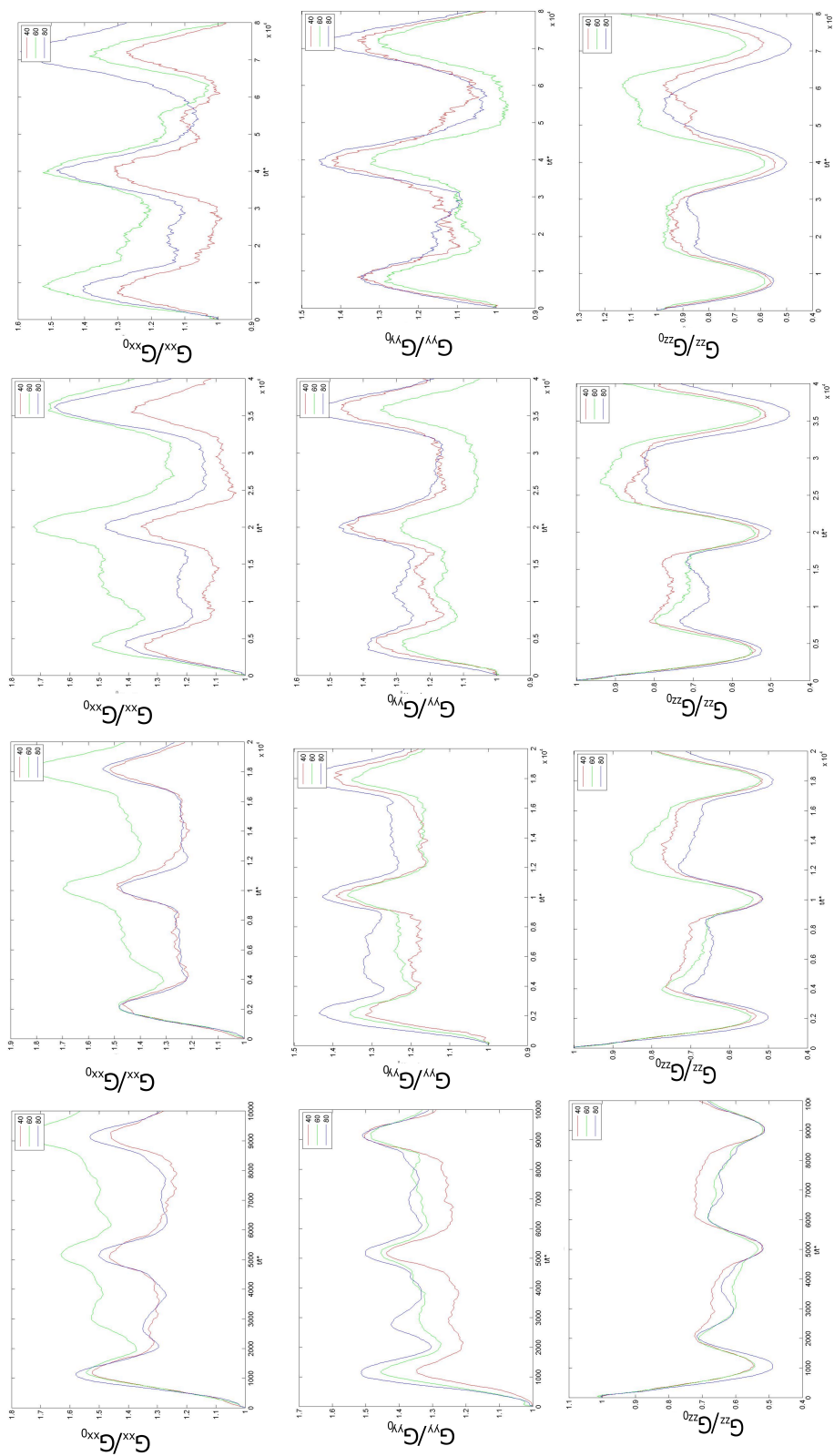
zbudowany był z cząsteczek apolarnych. Podobnie jak w wypadku tarcia micel potencjał oddziaływania lipidów został zmodyfikowany w celu osiągnięcia lepszej stabilności struktury. Jak pokazują wyniki symulacji morfologia miceli zmienia się wraz z zewnętrznymi warunkami obciążenia. Te reprezentowane są przez okresowe zmiany obciążenia, w którym zarówno amplituda i okres mogą ulec zmianie. Na Rysunku 5.12 zaprezentowano diagram zmian morfologicznych dla różnych wartości amplitudy i okresu. W związku z tym, podstawowym parametrem układu okresowego obciążenia jest stosunek amplitudy  $A$  i okresu  $T$ . Środek masy miceli może dodatkowo wykonywać ruch translacyjny w modzie (sub)dyfuzyjnym



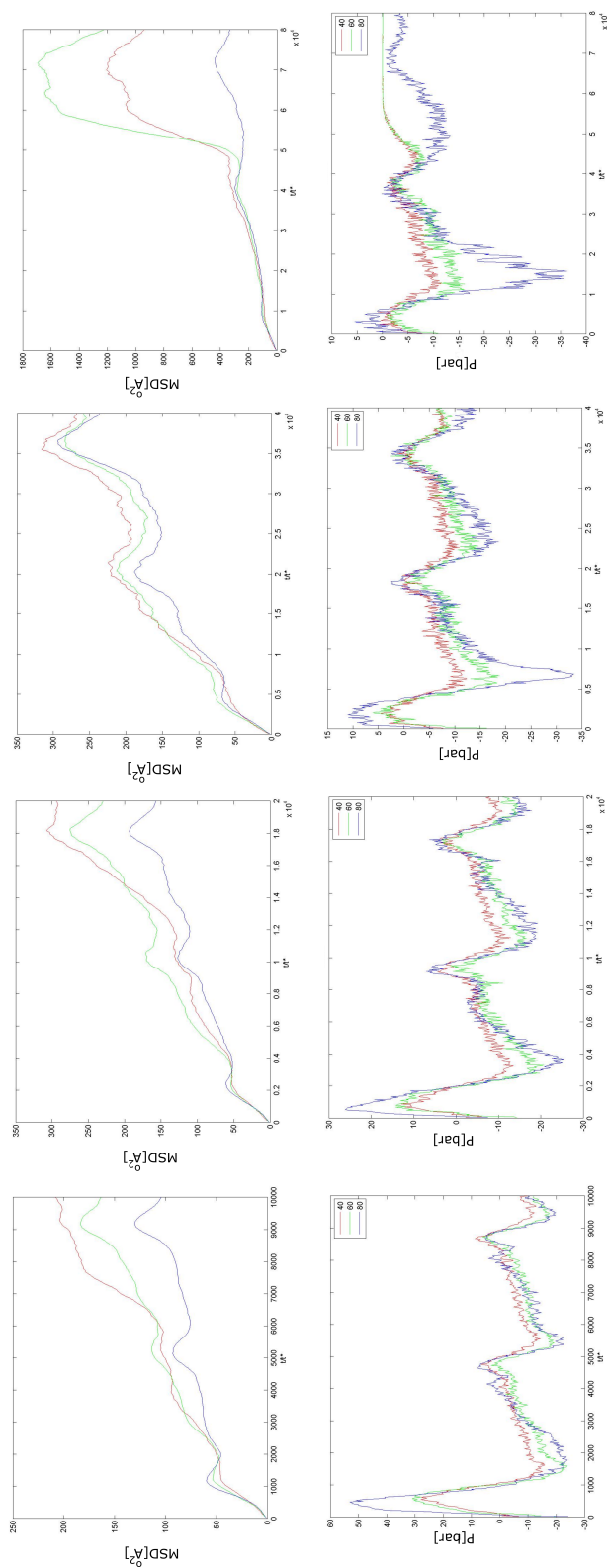
Rysunek 5.9: Micela między dwiema powierzchniami grafitowymi. Cząsteczki wody, które znajdują się wokół całego układu jak i między płytkami, nie pokazano na rysunku.

między powierzchniami grafitowymi. Rysunek 5.9 przedstawia wynik symulacji miceli przed i po zadaniu obciążeniu. Micela pod obciążeniem jest zdeformowana (Rysunek 5.10) zachowując hydrofobowy charakter - hydrofilowe części lipidów dążą do kontaktu z wodą podczas gdy hydrofobowe ze ściankami. Rysunek 5.12 przedstawia zmiany morfologiczne kształtu miceli scharakteryzowane przez promień bezwładności. Wzdłuż kierunku  $x$  i  $y$ , micela ulega podobnym zmianom kształtu. W większości przypadków, micelle są odkształcone ze sferycznego do kształtu przypominającego kształtem dysk. Jednak dla najbardziej ekstremalnych warunkach (najwyższa amplituda i najkrótszy okres) widoczny jest rozpad miceli. W przypadku dłuższych okresów, micelle mają wystarczająco dużo czasu na relaksację, a tym samym wykazują najmniejsze zmiany kształtu dla wszystkich badanych amplitud. Promień bezwładności wzdłuż kierunku  $z$  jest najbardziej stabilny, a jest to spowodowane warunkiem brzegowym dla tej osi. Rysunek 5.12 przedstawia zmiany kształtu, jak i stosunki przekrojów w różnych osiach zależnych od komponentów promienia bezwładności. Zmiana morfologiczna sfera - dysk jest ogólnym przypadkiem. Rysunek 5.11 pokazuje zmiany (MSD) miceli i naprężenie wewnątrz miceli. Amplituda ruchu ścian jest ważniejszym czynnikiem, ponieważ istnieją trzy odrębne reżimy: dla wysokiej, średniej i niskiej amplitudy. Po zastosowaniu

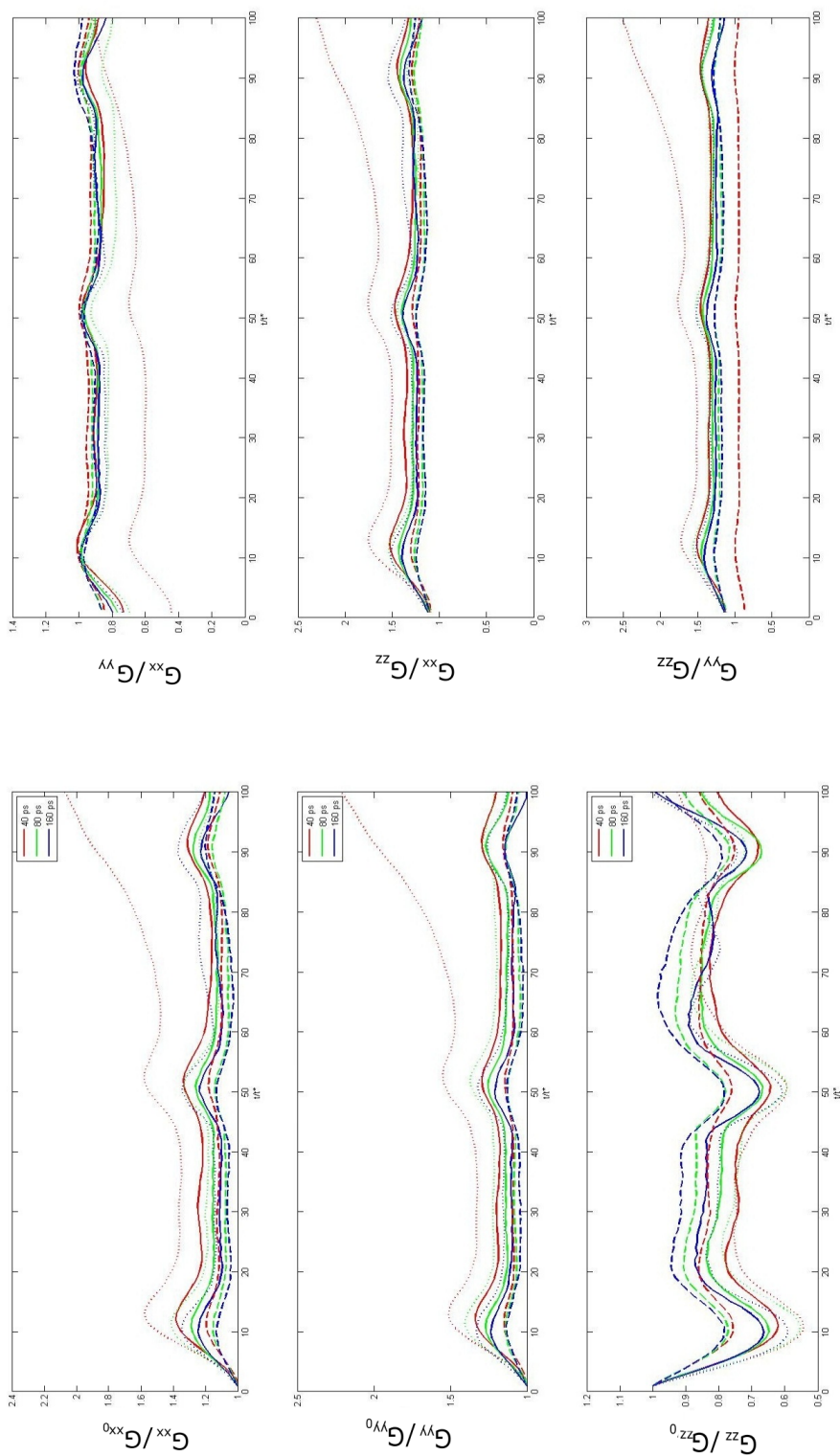
początkowego obciążenia micela porusza się w ten sam sposób we wszystkich badanych przypadkach. Po drugim obciążeniu micela również wraca do swojego kształtu. Dla ostatniego powtórzenia obciążenia micela wraca do podstawowego kształtu szybciej, poza wypadkiem rozpadu miceli. Ta tendencja wynika również dynamicznych przemian morfologicznych w układzie na powierzchni miceli. Efekt kształtu może być zarówno szkodliwy jak i korzystny dla chwilowych warunków smarowania - zmiany kształtu mogą mieć wpływ na przewodnictwo jonów aktywnych (na przykład  $H^+$ ) przyczynić się do ogólnego efektu smarowania (Gadomski et al. 2008) (tworząc gęstsza sieć hydrofilowych części pozwalających na szybszy transport). Podobne zjawisko obserwujemy dla zachowania miceli w zależności od ilości lipidów. Małe micelle są bardziej stabilnymi strukturami w efekcie czego ich czas relaksacji jest krótszy. Widać to zarówno dla promienia bezwładności jak i ciśnienia wewnętrznego i MSD.



Rysunek 5.10: Zmiany morfologiczne miceli w funkcji czasu w zależności od wielkości miceli.  $t^*$  jest wybrana, aby uzyskać kilka okresów dla każdego przypadku. Od góry widzimy zmiany promienia bezwładności dla każdej osi: po kolei x, y i z. Od lewej do prawej strony widzimy zmiany okresu drgań od 40 ps do 320 ps.



Rysunek 5.11: Zmiany MSD i ciśnienia miceli w funkcji czasu w zależności od wielkości miceli.  $t^*$  jest wybrana, aby uzyskać kilka okresów dla każdego przypadku. Od lewej do prawej strony widzimy zmiany zakresu drgań od 40 ps do 320 ps.



Rysunek 5.12: Zmiany morfologiczne miceli w funkcji czasu.  $t^*$  jest wybrana, aby uzyskać kilka okresów dla każdego przypadku. Na lewej stronie, przedstawiono promień bezwładności podzielony przez wartości początkowe wzdłuż wszystkich trzech osi. Z prawej strony, stosunki (zdeformowany) promieni bezwładności są wyświetlane wzdłuż xi osi y. Każdy kolor reprezentuje inny przypadek zmiany amplitudy, jak przedstawiony w legendzie, natomiast różne style linii przedstawiają odpowiednie zmiany amplitudy. Linia kropkowana odpowiada  $A = 1.0$  nm, linie przerywane  $A = 0.6$  nm, a linie ciągłe do  $A = 0.8$  nm

### 5.3 Podsumowanie

Celem przedstawionego rozdziału było przedstawienie nanoskopowego tarcia w układzie micelarnym. Tarcie takie jest efektywne tylko w obecności składnika normalizującego nacisk.  $cmc$  jest silnie zależne od ciśnienia stąd micela są w stanie przenosić tylko mały zakres obciążeń mechanicznych. Przedstawione wyniki pokazują jeden z ważniejszych efektów mechanizmów w modelu ułatwionego smarowania. Udział micel w smarowaniu niesie za sobą pozytywne jak i negatywne skutki. We wcześniejszym rozdziale przedstawiono wyniki symulacji pokazujących oddziaływanie lipidów z kwasem hialuronowym. Wraz z rozwojem choroby osteoartretycznej wzrasta koncentracja lipidów w objętości cieczy synowialnej jednocześnie ubywa lipidów z warstwy przypowierzchniowej. W warunkach normalnych zjawisko tribomicelizacji jest efektem pozytywnym ze względu na wsparcie otrzymywane przez sieci HA, które normalizuje nacisk i wzmacnia efekt odpychania hydratacyjnego. Innym elementem normalizującym oddziaływania micel jest lubrycyna w smarowaniu granicznym. Z tego punktu widzenia zmodyfikowany potencjał oddziaływania między hydrofobowymi częściami lipidów ma usprawiedliwienie. Jednakże wraz z rozwojem choroby zmienia się skład cieczy. W warunkach patologicznych struktury typu sieci i szczotek zanikają i/lub stają się o wiele słabsze co wiąże się większym udziałem fazy micelarnej. Bez HA i lubrycyny micela odpowiadają za tarcie i przetrzymanie nacisku. Micela tracą swoje pozytywne właściwości i zamiast pozytywnego efektu odpychania hydratacyjnego tworzą nietrwałe struktury związane w części z krótkimi łańcuchami HA zaabsorbowanymi na powierzchni micel. Warty podkreślenia jest fakt stabilności miceli o niskiej liczbie lipidów. W chorej cieczy synowialnej mamy do czynienia z dużą ilością lipidów tworzących micela. Układ taki prowadzi do niestabilności struktur micel i w konsekwencji do upośledzenia mechanizmu smarowania. W rozdziale tym przedstawiono wyniki symulacji micel DPC w ujęciu gruboziarnistym. Pomimo ogólności tego typu modelowania pozwala ono na zaobserwowanie wielu parametrów interakcji. W symulacji oddziaływania dwu micel widoczny jest mechanizm odpychania hydratacyjnego. Pozwala ono na uniknięcie kontaktu między micelami, szczególnie widoczne jest to w symulacjach naprężenia ścinającego oraz w pierwszym etapie interakcji micel na Wykresie 5.4. Pewną trudność interpretacyjną stanowi wykorzystanie sterowanej dynamiki molekularnej w zakresie skal czasowych. Technika ta jednak pozwala na wyznaczenie siły potrzebnej do rozdzielenia micel na każdym etapie interakcji. Wartość ta może pomóc w określeniu tribomicelizacji będącej efektem nacisku według modelu ułatwionego smarowania.

## Rozdział 6

### Podsumowanie badań własnych

Przedstawiona praca oparta jest na artykułach własnych, materiałach konferencyjnych oraz wynikach w przygotowaniu do publikacji. Wszystkie opublikowane prace znajdują się w spisie literatury - nazwisko autora tej pracy zostało podkreślone. Założenia modelu ułatwionego smarowania przedstawione zostały w pracy (Gadomski et al. 2008). Badania prowadzone w ramach doktoratu miały na celu zrozumienie zjawisk smarowania i tarcia w układzie chrząstki stawowej oraz ich konfrontacji z ww. modelem. W pracy wykorzystano zarówno narzędzia do analitycznego (układy dynamiczne, metodę MNET), numerycznego (dynamika molekularna) oraz eksperymentalnego (elektroforeza, badania tribologiczne) opisu układu. Początkowe badania skupiły się na badaniu zjawisk zachodzących w układach lipidowych: wymiana lipidów między dwoma polami koncentracji oraz tworzeniem micel. Powstające micelle odgrywają dwie kluczowe dla zjawiska role. Po pierwsze, sferyczny kształt miceli zmienia rodzaj tarcia: ze ślizgowego na toczne. Dzięki odpychaniu hydratacyjnego hydrofilowych powierzchni micel teoretycznie osiągnąć można bardzo niskie wartości współczynnika tarcia. Drugim efektem towarzyszącym powstawaniu micel jest występowanie tzw. kanałów protonowych (przewodzących głównie jony hydroniowe - przestrzeni między-micelarnych. W tak powstałych przestrzeniach (wg modelu) występuje uporządkowanie cząsteczek wody, które ułatwia transport jonów - efekt ten jest wzmocniony ujemnie naładowanymi sieciami kwasu hialuronowego pełniącymi rolę katody. Kaskady jonów (powstałe dzięki zrywaniu wiązań wodorowych wywołanego zewnętrznym bodźcem siłowym) rozpychają sieci HA, dając lepszą odpowiedź na nacisk.

W pracach współautorskich (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013, Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013, Bełdowski, P. et al. 2013, 2014) opisano główne efekty modelu oraz powiązano je ze zjawiskami zachodzącymi w rzeczywistej chrząstce stawowej. Praca (Gadomski, Bełdowski, P., Rubi, Urbaniak, Augé, Santamaria-Holek & Pawlak 2013) opisuje model ułatwionego smarowania oraz analizuje układ równań pól koncentracji lipidów.



Pozwoliło to na wyznaczenie warunków pracy układu jako zależnych od stanu początkowego i wpływ zależności między polami gęstości na efektywność smarowania. Stosując zależność współczynnika tarcia od czasu (wynikającą z hipotezy zrywania wiązań) dopasowano krzywe teoretyczne do danych eksperymentalnych, przedstawiających tę zależność dla różnych hydrożeli stosowanych jako alternatywa dla cieczy synowialnej. Podobny problem podjęto w pracach (Bełdowski, P. et al. 2013, 2014). Skupiono się tu jednak głównie na wpływie kanałów jonowych. Porównano właściwości cieczy synowialnej z roztworem soli fizjologicznej jako medium ułatwiające transport jonowy. Pomimo podobnego składu jonowego tych płynów ciecz synowialna wykazywała lepsze właściwości. Co można powiązać z istnieniem wspomnianych kanałów. Wyniki te skłoniły autora do lepszego zrozumienia mechanizmu działania ww. kanałów jonowych. Praca (Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013) skupia się na opisie transportu jonów w kanałach micelarnych. Wykorzystując metodę MNET zbadano wpływ grubości kanału i koncentracji jonów na to zjawisko. Ruch jonu hydroniowego w kanale zależny był od dwóch efektów: koncentracji jonów oraz przewężenia/prześwitu kanału. Uzyskana w ten sposób zależność prędkości dryfu jonu od położenia w kanale pozwoliła na zrozumienie wpływu zjawisk zarówno wspierających transport (sieci HA oraz szerokość kanału) jak i tłumiących go (wzrost/spadek koncentracji jonów).

Kolejnym etapem badań było zrozumienie mechanizmu tribomicelizacji oraz udziału micel w smarowaniu. W tym celu ze względu na łatwość w implementacji, szybkość uzyskanych wyników i wykorzystując dobrze zbadany model wykorzystano metodę dynamiki molekularnej. Wykorzystując pole siłowe MARTINI oraz sterowaną dynamikę molekularną zbadano układy micelarne. Pierwsza praca dotycząca symulacji interakcji micel w środowisku wodnym wykonana została w Forschungszentrum Jülich w Niemczech (Bełdowski, P., Winkler, Hładyszowski, Jung & Gadomski 2016). Badano zachowanie micel trących o siebie przy stałej prędkości dryfu. W analizie posłużono się danymi opisującymi morfologię struktur dwóch micel jako zależną od położenia względem siebie. Dodatkowo badano siłę potrzebną do przesunięcia tych agregatów. Uzyskane wyniki pokazywały, że micidele jako struktury niestabilne są tylko w pewnym ograniczonym zakresie efektywnie wspomagać smarowanie. Pod wpływem interakcji mogą tworzyć bardziej złożone micidele, które trudno jest rozdzielić. Jednakże poprzez oddziaływanie z innymi składnikami cieczy smarującej np. HA jako rdzeniem wzmacniającym wewnętrzne oddziaływania, są one w stanie efektywnie przenosić nacisk i zmieniać reżim tarcia ze ślizgowego na toczne (jak zakładano w (Gadomski et al. 2008)). Kontynuacją badań nad micelami była praca opublikowana jako rozdział w książce „Dynamical Systems: Modelling” (Bełdowski, P., Winkler, Augé, Hładyszowski & Gadomski 2016). Praca ta opisywała odpowiedź miceli na periodyczny nacisk dwóch powierzchni grafitowych. Potwierdzała użyteczność micel z HA jako układu pozwalającego na efektywne

smarowanie.

Symulacje dynamiki molekularnej potwierdziły użyteczność micel w mechanizmie smarowania choć wymagana jest obecność kwasu hialuronowego. Skłoniło to autora do skierowania uwagi na zachowanie tego składnika w zmiennych warunkach fizykochemicznych, skutkujących chorobą OA. Badania zaprezentowane w (Jung et al. 2017) pokazały jak pod wpływem czynników chorobotwórczych zmienia się skład i właściwości fizykochemiczne cieczy synowialnej. Zmiana koncentracji lipidów oraz średniej długości HA są wyznacznikiem pogorszenia właściwości smarujących AC. Wyniki badań elektroforetycznych potwierdziły wyższą gęstość ładunku powierzchniowego HA w porównaniu do lipidów w funkcji pH. Wysoka koncentracja lipidów oraz spadek średniej długości HA wpływają na gęstość ładunku powierzchniowego - lipidy tworzą micelle, które absorbują HA na swojej powierzchni. Wiąże się to ze spadkiem siły elektrostatycznej w wpływającej na prędkość dryfu (Gadomski, Bełdowski, P., Augé, Hładyszowski, Pawlak & Urbaniak 2013). Dodając do tego efekt wzrostu pH (czyli spadku koncentracji jonów hydroniowych) otrzymujemy znaczne obniżenie wpływu kanałów jonowych. Wyniki symulacji dynamiki molekularnej układów HA:PL pozwalają zrozumieć negatywny skutek wzrostu koncentracji lipidów. Pozytywne zjawisko interakcji HA:PL - objawiające się między innymi w postaci sieci HA i micel zmniejszających tarcie - jest efektywne tylko w obecności zdrowej powierzchni. Wzrost koncentracji lipidów oraz pH skutkują zmniejszeniem promienia bezwładności, co jest negatywnym czynnikiem ze względu na tworzenie sieci HA.

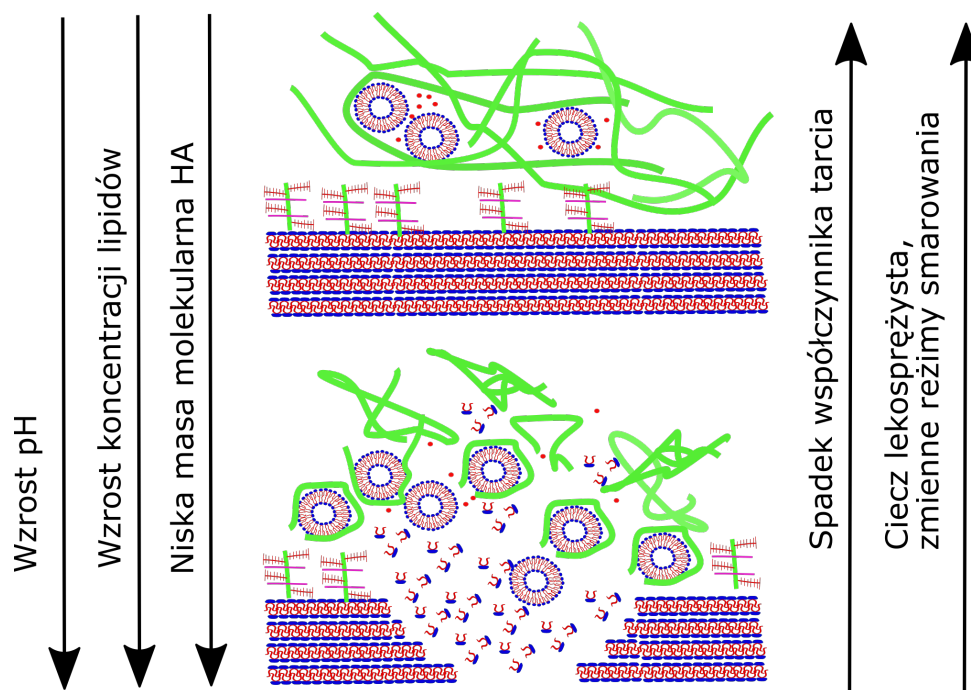
Pozytywny wpływ warstw przypowierzchniowych tworzonych przez lipidy pokazano w pracy (Pawlak et al. 2016). W zakresie fizjologicznym powyżej  $pH=7.4$  wartość współczynnika tarcia jest najmniejsza co związane jest z uporządkowaniem hydrofilowej części lipidów. Poprzez zjawisko odpychania hydratacyjnego będącego konsekwencją uporządkowania lipidów otrzymano minimum zależności współczynnika tarcia od czasu. Podobny efekt widoczny jest w przypadku dwóch micel oddziałujących o siebie. W strefie kontaktu występuje uporządkowanie (cząsteczek wody o zasięgu do 1 nm) powodujące efektywne przesuwanie się micel o siebie. To uporządkowanie również sprzyja transportowi jonów hydroniowych dzięki efektywniejszemu mechanizmowi „hoppingu” jaki występuje min. w pobliżu dwuwarstw lipidowych (Rozdział 3).

Podsumowując badania własne można stwierdzić, że założenia modelu US można powiązać z wynikami symulacji numerycznych jak i wyników eksperymentalnych. Wpływ opisanych czynników może być mniejszy niż sugeruje autor - jest on jednak częścią złożonego układu. Dalsze prace skupiać się będą na uwzględnianiu innych elementów cieczy oraz rozszerzeniu już wykonanych badań w innych warunkach fizykochemicznych.

# Rozdział 7

## Podsumowanie i perspektywy

Celem przedstawionej pracy było zaprezentowanie modelu tarcia i smarowania chrząstki stawowej z uwzględnieniem zjawisk zachodzących w kilku skalach przestrzennych: od skali atomowej/molekularnej do mezoskopowej (supramolekularnej). Opisany mechanizm pozwala na zrozumienie mechanizmu prawidłowego funkcjonowania jak i degeneracji cieczy smarującej. Ułatwione smarowanie jest efektem tworzenia sieci HA pozwalających na tribomicelizację i transport jonów hydroniowych. Z drugiej strony równowaga w układzie utrzymywana jest dzięki nieuszkodzonej powierzchni chrząstki i warstwie lipidów. To właśnie stan powierzchni jest punktem startowym do dalszych zmian zachodzących w układzie. HA jako główny składnik cieczy smarującej odpowiada za jej właściwości lepko-sprężyste. Prawidłowa praca układu wymaga płynnego przechodzenia między różnymi reżimami tarcia związanymi z wielkością przestrzeni między współpracującymi powierzchniami. Sieci kwasu hialuronowego wraz z micelami umożliwiają efektywną pracę układu w smarowaniu hydrodynamicznym. Dwuwarstwy lipidowe, „szczotki” HA i lubrycyny odgrywają kluczową rolę w smarowaniu granicznym i mieszanym. Skład cieczy smarującej zasadniczo wpływa na efektywność smarowania: w zdrowym stawie płyn stawowy jest cieczą tiksotropową, zaś w chorym staje się cieczą Newtonowską (nieefektywnym smarem). Rysunek 7.1 stanowi pewną formę podsumowania badań w celu opisu zmian zachodzących w układzie smarującym oraz ich wpływ na właściwości cieczy. Jak pokazano w Tabeli 1.1 patologiczna ciecz charakteryzuje się wzrostem liczby lipidów co spowodowane jest degeneracją powierzchni. Obumierające komórki chrząstki wydzielają do układu lipidy tworzące wcześniej błony komórkowe. Skutkuje to zarówno zanikaniem dwuwarstw przypowierzchniowej, jak i zjawiskiem micelizacji. Zjawisko tribomicelizacji opisane w Rozdziale 4 niesie z sobą zarówno pozytywne jak i negatywne skutki. Kluczowe w tej relacji są oddziaływania lipidów z kwasem hialuronowym. Oddziałujące micle pełnią dwie kluczowe role w mechanizmie smarowania. Pierwsza wynika z możliwości zmiany reżimu tarcia ze ślizgowego na toczne. Efekt ten jest podyktowany kulistym kształtem miceli, wzmocnionym elektrostatycznym odpychaniem naładowanych



Rysunek 7.1: Skład cieczy synowialnej: zdrowej (górna część) i chorej (dolna część). Lipidy przedstawiono jako niebiesko-czerwone cząsteczki, sieci HA na zielono, lubrycyna - różowe linie, agregany - czerwone włókna, czerwone kropki reprezentują jony hydroniowe. W zdrowym płynie wszystkie składniki pełnią określone role jak opisano w tekście, pod wpływem czynników chorobotwórczych zmieniają się czynniki, jak pokazano po lewej części rysunku. Różnice jakościowe płynu smarującego między zdrowym a chorym płynem pokazano po prawej stronie.

powierzchni. Uporządkowanie cząsteczek wody w przestrzeniach między-micelarnych wzmacnia ten efekt. Dodatkowo powstają warunki tworzenia się kanałów powalających na ułatwiony transport jonów. Efekt ten jest wzmocniony występowaniem kwasu hialuronowego pełniącego funkcję anody przyciągającej naładowane jony hydroniowe, które rozpychają łańcuchy sieci. Ze względu na wyższą gęstość ładunku HA w porównaniu z lipidami (Patrz Rysunek 4.3) ruch ten jest zwrócony w kierunku HA, pozwalając na rozpychanie sieci HA. Trwałe i dobrze ukształtowane sieci HA odpowiedzialne są za przenoszenie obciążeń co daje układom micelarnym możliwość występowania tych dwóch pozytywnych zjawisk.

Stany patologiczne powodują utratę środka normalizującego nacisk, w konsekwencji gorszą odpowiedź układu i tarcie mieszanym/suchym - najgorszym gdyż powodującym największe zużycie powierzchni trących. Mechanizm sieciowania opisany w Rozdziale 4 jest zakłócony ze względu na ekranowanie środowiska lipidami, które absorbują krótsze łańcuchy HA wyłączając je z mechanizmu smarowania. Wzrost pH cieczy synowialnej wpływa na efektywność transportu jonów przez co mechanizm elektrostatycznego odpychania sieci jest mniej efektywny.

Wzrost koncentracji micel w środowisku w stosunku do HA powoduje spadek efektu

odpychania. Gęstość ładunku powierzchniowego dla układu lipidowego w porównaniu z HA potwierdza zmniejszenie efektywności transportu jonów. W ramach przedstawionych wyników można zaobserwować reakcję „łańcuchową” w wyprowadzonym z równowagi układzie. Degeneracja powierzchni skutkuje wzrostem koncentracji lipidów. Śmierć komórek chondrocytów będących efektem tarcia suchego powoduje dodatkowy wzrost koncentracji lipidów, oraz wzrost pH. To zaś zmienia polidispersyjność HA. Krótsze łańcuchy w tak określonym środowisku mają mniejsze szanse na stworzenie trwałych sieci. Podanie zewnętrznego źródła HA o polidispersyjności zdrowego płynu nie jest z tego punktu widzenia zasadne, gdyż tworzą się dwie fazy: lipidowa (chora) i HA (zdrowa), które słabo się penetrują. W konsekwencji nie ma możliwości odtworzenia pierwotnych właściwości układu.

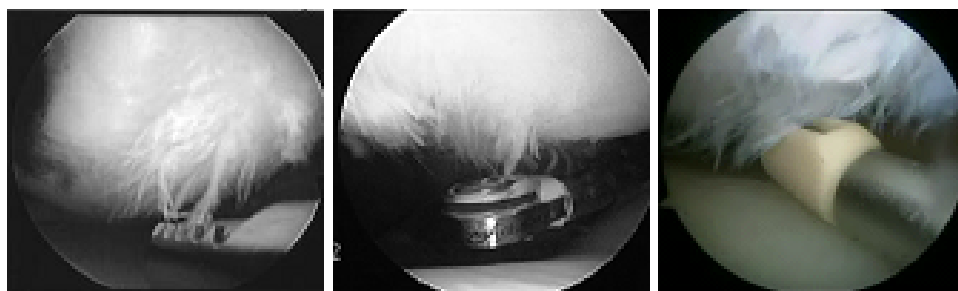
Co ważne w przedstawionej pracy nie uwzględniono udziału białek oraz proteoglikanów, choć efekt ich udziału jest znaczący. Jednak zarówno HA jak i lipidy oddziałują z tymi składnikami, stąd pośrednio można je powiązać z zachodzącymi procesami. Układ 3 trzech równań opisujących koncentrację lipidów, zawiera w sobie (w sposób niejawnym) udział innych składników jak lubrycyna i komórki chondrocytów. Przytoczone wyniki symulacji komputerowych sprawiają pewną trudność interpretacyjną, wynikającą z modeli gruboziarnistych wykorzystywanych w zjawisku interakcji miceli. W modelach tych wpływ sił tarcia i bardziej subtelnych oddziaływań międzyatomowych jest ograniczony. Z tego względu interpretacja skal czasowych jest trudna oraz nie daje szczegółowych informacji nt. opisywanych zjawisk. Wykorzystanie tych modeli pozwala jednak na wyrobienie intuicji dot. zjawiska oraz jakościowe właściwości układu. W pracy nie dokonano szerszego opisu udziału kanałów protonowych. Pomimo uzyskania wstępnych wyników nie zaprezentowano wyników symulacji transportu jonów hydroniowych w kanałach micelarnych. Model komputerowy wykorzystany do opisu transportu został przedstawiony przez (Wolf & et al. 2014). Jednak ze względu na jego złożoność i trudność powiązania z modelem MNET, nie przedstawiono tu tych wyników. Wszystkie przeprowadzone symulacje były oparte na klasycznych modelach, bez uwzględnienia efektów kwantowych. Zjawiska kwantowe (tworzenie/zrywanie wiązań wodorowych, transport Grotthussa) są ważne w modelu, opis klasyczny typu (Agmon 1995) pozwala na uzyskanie wyników zgodnymi z danymi eksperymentalnymi.

Wyniki badań oddziaływań HA:PL pozwalają na lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących w trakcie zmian chorobotwórczych związanych z rozwojem OA. Zmiana polidispersyjności HA oraz wzrost koncentracji lipidów powodują słabsze sieciowanie. Wynik ten może wyjaśnić niską skuteczność wiskosuplementacji (zastrzyków) HA w miejscu chorego stawu. Podawany roztwór zawiera objętości kwasu w swojej objętości równe ilości mazi stawowej w zdrowym stawie. Wstrzyknięcie HA pozwala znormalizować pH z 8.0 do wartości bliższej warunkom fizjologicznym. Powinno to skutkować normalizacją środowiska do pH=7.0. Jednakże wysoka

koncentracja lipidów tłumi mechanizm sieciowania, zaś dalsza degeneracja powierzchni tylko potęguje ten efekt. W rzeczywistości HA podany z zewnątrz tworzy nową fazę i absorbuje odłamki chrząstki dostające się do SF. W początkowych fazach choroby, przy niskich koncentracjach lipidów i małych uszkodzeniach powierzchni ten efekt nie jest silny. Jednak wraz z rozwojem choroby zastrzyki HA mają efektywność porównywalną z *Placebo*.

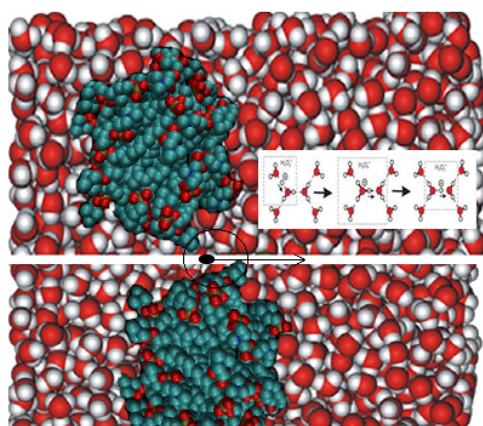
Kontynuacja przedstawionej pracy dotyczyć będzie opisu zjawisk występujących w układzie chrząstki w różnych warunkach fizyko-chemicznych.

W dalszych badaniach opisywany szerzej będzie mechanizm transportu jonów hydroniowych



Rysunek 7.2: Skalpel fizjochemiczny wykorzystujący strumień protonów do operacji leczenia powierzchni stawowych.

w kanałach micelarnych. W tym celu wykorzystam technikę hybrydowych symulacji dynamiki molekularnej i metody Monte Carlo. Wykorzystując metodę HYDYN (HYdrogen DYNamics)(Wolf & et al. 2014) badany będzie wpływ micelarnych kanałów na mechanizm smarowania oraz kreacji i anihilacji defektów w warstwie przypowierzchniowej. Równolegle



Rysunek 7.3: Prezentacja transportu jonów hydroniowych w kanale micelarnym za pomocą techniki HYDYN.

rozszerzone zostaną badania nad oddziaływaniami HA/PL. W tym celu wykorzystam pole siłowe MARTINI, które pozwala na zbudowanie gruboziarnistej reprezentacji HA. Gruboziarnisty HA będzie również wykorzystany do badania mechanicznych właściwości sieci

oraz wpływ polidispersyjności i chemicznych modyfikacji HA na trwałość struktury. Na cele pracy zaplanowane zostały badania reometryczne, jednakże ze względu na problemy techniczne nie udało się ich zrealizować. Nawiązano jednak kontakt z nowymi grupami badawczymi, zainteresowanymi przeprowadzeniem tych badań. Badania skupione będą na właściwościach reologicznych układów HA:PL w różnych warunkach fizykochemicznych. Złożoność układu oraz potencjał w postaci wykorzystania wyników w medycynie daje duże możliwości do wieloletnich badań ze specjalistami z wielu dziedzin.

# Bibliografia

- Agmon, N. (1995), *Chem. Phys. Lett.* **150**, 456–462.
- Bayareh, M. & Mortazavi, S. (2011), *Transactions of Mechanical Engineering* **35**, 121–132.
- Bełdowski, P., Augé, W. & Gadomski, A. (2014), *Current Topics in Quantum Biology*, WN UAM Poznań, pp. 79–93.
- Bełdowski, P., Gadomski, A., Wilczyńska, I. & Augé, W. (2013), *Current Topics in Biophysics* **36**, 5.
- Bełdowski, P., Winkler, R. G., Augé, W., Hładyszowski, J. & Gadomski, A. (2016), *Dynamical Systems: Modelling*, Springer, pp. 73–80.
- Bełdowski, P., Winkler, R., Hładyszowski, J., Jung, S. & Gadomski, A. (2016), *Acta Phys. Pol. A* **129**, 188–189.
- Blicher, A. & Heimbürg, T. (2013), *PLoS ONE* **8**, e65707.
- Brener, E., Müller-Krumbhaar, H., Temkin, D. & Abel, T. (2000), *Solid State Ionics* **131**, 23–33.
- Cherny, V. V. & DeCoursey, T. E. (1999), *J. Gen. Physiol.* **114**, 819–838.
- Connolly, M. (1983), *J. Appl. Cryst.* **16**, 548–558.
- Cornell, W. & et al. (1995), *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.
- Cukierman, S. (2006), *Bioch. et Biophys. Acta* **1757**, 876–885.
- Daniel, M. (2012), *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Elsevier - Academic Press.
- Dedinatè, A. (2012), *Soft Matter* **8**, 273–284.
- Doi, E. & Edwards, S. F. (1986), *The theory of polymer dynamics*, Clarendon Press.
- E.DeCoursey, T. (2003), *Physiol. Rev.* **83**, 475–579.



- Ermakov, S., Beletskii, A., Eismont, O. & Nikolaev, V. (2016), *Liquid Crystals in Biotribology*, Springer.
- Forster, H. & Fisher, J. (1996), *Proc Instr Mech Eng* **210**, 109–119.
- Gadomski, A. (1997), *Journal of Mathematical Chemistry* **22**, 161–183.
- Gadomski, A. (1999), *Phys. Rev. E* **60**, 1252–1261.
- Gadomski, A., Bełdowski, P., Augé, W., Hładyszowski, J., Pawlak, Z. & Urbaniak, W. (2013), *Acta Phys. Pol. B* **44**, 1801–1820.
- Gadomski, A., Bełdowski, P., Rubì, J. M., Urbaniak, W., Augé, W., Santamaria-Holek, I. & Pawlak, Z. (2013), *Math. Biosci.* **244**, 188–200.
- Gadomski, A., Pawlak, Z. & Oloyede, A. (2008), *Tribol. Lett.* **30**, 83–90.
- Garg, H. G. & Hales, C. A. (2004), *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Elsevier - Academic Press.
- Gobbo, C. & et. al. (2013), *J. Phys. Chem. C* **117**, 15623–15631.
- Godoy, C. M. D. & Cukierman, S. (2001), *Biophys. J.* **81**, 1430–1438.
- Grzywna, Z. & Stolarczyk, J. (2002), *Int. J. Mod. Phys C* **13**, 1301–1312.
- Grzywna, Z. & Stolarczyk, J. (2005), *Acta Phys. Pol. B* **36**, 1595–1612.
- Heermann, D. W. (1997), *Podstawy symulacji komputerowych w fizyce*, WNT.
- Hills, B. A. (2000), *Proc Inst Mech Eng Part H - J Engineering in Medicine* **214**, 83–94.
- Hills, B. A. & Buttler, B. D. (1984), *Annals of the Rheumatic Diseases* **43**, 641–648.
- <http://lammms.sandia.gov/> (n.d.).
- <http://yasara.org/> (n.d.).
- Isralewitz, B. & et al. (2001), *Curr. Op. Struct. Bio.* **11**, 224–230.
- Jay, G. D. & Waller, K. A. (2014), *Matrix Biology* **39**, 17–24.
- Jebens, E. H. & et al. (1959), *J. Bone and Joint Surg.* **41**, 388–400.
- Jung, S., Petelska, A., Bełdowski, P., Augé, W., Casey, T., Lemke, K., Walczak, D. & Gadomski, A. (2017), *Coll. Polym. Sci.* **295**, 403–412.
- Klein, J. (2013), *Friction* **1**, 1–23.

- Kosińska, M. K. & et al. (2015), *PLOS ONE* **10**, e0125192.
- Kotyńska, J. & Figaszewski, Z. A. (2014), *European Physical Journal E* **37**, 92–97.
- Lee, H. G. & Cowman, M. K. (1994), *Annal Biochem* **219**, 278–287.
- Maleki, A. (2008), *Macromol. Symp.*, **274**, 131–140.
- Marrink, S. J., Risselada, H., Yefimov, S., Tieleman, D. & de Vries, A. (2007), *J. Phys. Chem. B* **111**, 7812–7824.
- Marrink, S. & Tieleman, D. (2013), *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6801–6822.
- Marsh, D. (2012), *Biophysical J.* **102**, 1079–1087.
- Nagle, J. F. & Morowitz, H. I. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 298–302.
- Nitzan, D. & et al. (2001), *Rheumatology* **40**, 336–340.
- Nosonovsky, M. (2010), *Phil. Trans. R. Soc. A.* **368**, 4677–4694.
- Pasciak, P., Krawczyk, M., Gudowska-Nowak, E. & Kułakowski, K. (2005), *J. Biol. Phys.* **31**, 365–373.
- Pasciak, P., Kułakowski, K. & Gudowska-Nowak, E. (2005), *Acta Phys. Pol. B* **36**, 1737–1743.
- Pasquali-Ronchetti, I., Quaglino, D., Mori, G. & Bacchelli, B. (1997), *Journal of structural biology* **120**, 1–10.
- Pawlak, Z., Figaszewski, Z., Gadomski, A., Urbaniak, W. & Oloyede, A. (2010), *Tribol. Intern.* **43**, 1719–1725.
- Pawlak, Z., Gadomski, A., Sojka, M., Urbaniak, W. & Bełdowski, P. (2016), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **146**, 452–458.
- Pawlak, Z. & Oloyede, A. (2008), *Biosystems* **94**, 193–201.
- Plonka, A. (2001), *Dispersive Kinetics*, Kluwer.
- Reguera, D., Rubí, J. & Vilar, J. (2005), *J. Phys. Chem. B* **109**, 21502–21515.
- Richmond, T. J. (1984), *J. Mol. Biol.* **178**, 63–89.
- Roberts, A. D. (1971), *Nature* **231**, 434–436.
- Santamaria-Holek, I., Grzywna, Z. J. & Rubi, J. (2005), *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **37**, 273–290.

- Scherge, M. & Gorb, S. (2001), *Biological Micro- and Nanotribology. Nature's Solutions*, Springer-Verlag.
- Seror, J. & et al. (2011), *Biomacromolecules* **12**, 3432–3443.
- Seror, J. & et al. (2012), *Biomacromolecules* **13**, 3823–3832.
- Singh, S. P. & et al. (2011), *Phys. Rev. Lett.* **107**, 158301–1–5.
- Stein, D., Kruithof, M. & Dekker, C. (2004), *Phys. Rev. Lett.* **93**, 035901–1–4.
- Swails, J. M. & et al. (2014), *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 1341–1352.
- Tozzini, V. (2005), *Curr. Op. Struct. Bio.* **15**, 144–150.
- Tuckerman, M., Laasonen, K., Sprik, M. & Parrinello, M. (1995), *J. Chem. Phys* **103**, 150–161.
- Wierzcholski, K. (2006), *Intern.l J. Appl. Mech. and Engin.* **11**, 515–527.
- Wik, H. B. & Wik, O. (1998), *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives*, Portland Press Ltd, pp. 25–32.
- Winkler, R. G. & Hentschke, R. (1993), *J. Chem. Phys.* **99**, 5405–5417.
- Wolf, M. G. & et al. (2014), *Biophys. J.* **107**, 76–87.
- Wright, V. & Dowson, D. (1976), *J. Anat.* **121**, 107–118.
- Żabicki, M., Gudowska-Nowak, E. & Fischer, S. (2009), *Phys. Lett. A* **374**, 50–54.