

ciągła struktura biologicznie zbudowana z tkanki łącznej, których podstawową funkcją jest przenoszenie siły generowanej w mięśniach do kości. To właśnie dzięki ciągłom powodowany jest ruch stawów, a organizmy posiadające układ mięśniowo-szkieletowy są w stanie się przemieszczać. Ciągło zbudowane jest głównie z kolagenu, proteoglikanu, glikoprotein, wody i komórek. Największą część kolagenu stanowi kolagen typu I (ok. 95%), który tworzy 60-85% masy suchej cięgna, a na pozostałe 5% składa się z kolagenów typu III i V. Każde ciągło ma budowę hierarchiczną – jego struktura rozpoczyna się od pojedynczych cząsteček kolagenu o wymiarach rzędu nanometrów (miliardowych części metra), które następnie łączą się w mikrowłókienka zwane fibrylami. Połączone fibryle tworzą kolejno pojedyncze włókna kolagenowe – ich wymiary są już na tyle „duże” (1-20 μm), że wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowy jesteśmy w stanie oglądać ułożenie pojedynczych włókien kolagenowych w pobranej próbce cięgna. Złożone z fibryli włókna są dodatkowo otoczone w osłonce z tkanki łącznej, a następnie znów połączone w pierwotne (pierwszorzędowe) paczki kolagenowe. Te znowu połączone ze sobą dają struktury wtórne (drugorzędowe i trzeciorzędowe) tworząc tym razem „pełnowartościowe” ciągło o wymiarach kilku, a czasami nawet kilkunastu, centymetrów. Zdrowe ciągła mają kolor błyszczącej bieli, a za sprawą zawartych w nich proteoglikanów, czy mukopolisacharydów są w stanie przyciągnąć wodę, utrzymać odpowiednią strukturę i kształt oraz zapewnić tkance odpowiednią elastyczność.

Ciągło w stanie spoczynku ma postać lekko falistej nici, jednak gdy mięśnie, do których ciągło jest przyczepione zaczynają pracować, prostuje się ono i rozciąga. Ciągło podczas wykonywania ruchu przez człowieka musi być odporne na duże obciążenia wynikające z działania sił rozciągających, ścisających czy rotacyjnych. Nie ulega więc w sposób łatwy grupom najbardziej narażonym na obciążenia fizyczne, a zatem najbardziej cierpią na różnego rodzaju problemy ze ścięgnami, sportowcy i osoby aktywnie fizycznie. Niestety, nieodpowiednie przygotowanie do treningu (brak rozgrzewki), długotrwałe powtarzalne lub zbyt gwałtowne ruchy mogą spowodować całkowite zerwanie cięgna. W takich przypadkach konieczna może okazać się interwencja chirurgiczna mająca na celu rekonstrukcję bądź przyczepienie uszkodzonej tkanki. Z roku na rok liczba transplantacji ścięgien wzrasta, a stosowane przez chirurgów-ortopedów techniki operacyjne stają się coraz bardziej wyrafinowane. Niezmiennym pozostaje jednak fakt, że tkanka przeznaczona do przeszczepu podlega wczesniejszemu procesowi głębszego mrozenia. W tym miejscu pojawiają się więc pierwsze wątpliwości związane z tym procesem: Czy proces mrozenia zmienia właściwości tkanki? Jak szybko i jak długo powinna być ona mrozona? Czy wszczepione pacjentowi rozmrózne ciągło będzie miało tak samą wytrzymałość jak w przypadku wiekowej tkanki?

W poszukiwaniu odpowiedzi na te pytania, naukowcy na całym świecie prowadzą badania nad ocenami biochemicznych i biomechanicznych zmian powstałych w ścięgnie na skutek wielokrotnych cykli jego mrozenia i rozmrażania. Metodologia opublikowanych w ciągu ostatnich 15 lat badań, nie jest jednak spójna, skutkiem czego badacze z zespołów badawczych nie podają jednoznacznej granicy liczby cykli mrozenia/rozmrażania po której właściwości tkanek kolagenowych zostaną pogorszone do stopnia, w którym nie można ich wykorzystać do zabiegu przeszczepienia. Aby zgłębić problem zmiany właściwości mrozonych ścięgien koniecznym jest znalezienie i dokładne przeanalizowanie przyczyny, dla której proces ten powoduje nieodwracalne zmiany w strukturze tkanki budującej ciągło.

Według autorów projektu, główną przyczyną pogorszenia właściwości ścięgien w procesie mrozenia związane jest ze znaczną zawartością zawartą w nich wody oraz fizyczno-chemicznymi procesami, którym ona podlega. Jeżeli bowiem wypreparowane do przeszczepu ciągło poddamy procesowi mrozenia, to zawarta w nim woda (stanowiąca 60-80% masy mokrej całego cięgna!) również zacznie zamarzać. Niestety, poniżej pewnej temperatury tj. 3.98°C, znajdująca się jeszcze w stanie ciekłym woda zaczyna wykazywać zjawisko anomalii rozszerzalności temperaturowej. Oznacza to, że objętość wody nie zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury w sposób monotoniczny w całym obszarze występowania w stanie ciekłym lecz w pewnym charakterystycznym punkcie (dla 3.98°C) przyjmuje wartość minimalną. W temperaturach niższych od tej wartości objętość wody zaczyna gwałtownie wzrastać wraz ze spadkiem temperatury, co w różnym stopniu substancji chemicznych jest anomaliami. Zjawisko to spowodowane jest specyficznym kształtem cząsteček wody, a także istnieniem silnych wiązań wodorowych, pomiędzy którymi nie w obszarze anomalnym. Efektom przerwanym wiązania jest znaczący wzrost nieuporządkowania w różniących się cząsteček cieczy, który w konsekwencji prowadzi do zwiększenia jej objętości. Co więcej, gdy temperatura otoczenia spadnie do poziomu 0°C, zwiększając dalej swoją objętość woda, zaczyna zmieniać swój stan skupienia. Proces ten, zwany przemianą fazową wody, powoduje przeobrażenie ciekłej wody do postaci ciała stałego (lodu) w efekcie czego swobodnie cząstečky zostają związane w uporządkowaną strukturę zwaną siecią krystaliczną.

Jeżeli teraz wiemy o zawartej w ścięgnie wodzie jak o milionach cząsteček „uwięzionych” pomiędzy innymi strukturami (fibrylami, włókienkami etc.) i poddanych procesowi chłodzenia i mrozenia, to tajemnica „szkodliwej wody” zaczyna być coraz bardziej czytelna. Po przekroczeniu granicy anomalii rozszerzalności temperaturowej objętość cząsteček wody zaczyna bowiem gwałtownie rosnąć, rozsadzając i rozpychając inne struktury wewnątrz cięgna. Proces ten jest intensyfikowany następującymi chwilami przemian fazowych wody. W efekcie tych działań, budujące ciągło włókna kolagenowe zaczynają modyfikować swój kształt, rednicę i wzajemne ułożenie zmieniając tym samym właściwości biochemiczne i biomechaniczne całego cięgna.

Celem niniejszego projektu jest kompleksowa analiza i opis zjawisk chemiczno-fizycznych zachodzących w zamrażanym ścięgnie, powodujących powstanie i rozwój mikrouszkodzeń jego struktury wewnętrznej. Zgodnie z przyjętymi hipotezami badawczymi, zachowanie cięgna będzie rozpatrywane w dwóch opisanych powyżej, potencjalnie problematycznych punktach tj. poniżej temperatury 3.98°C (w zakresie anomalii rozszerzalności temperaturowej) oraz na granicy przejścia fazowego woda-lód. Autorzy projektu zdecydowali się na podjęcie tej tematyki badawczej ze względu na silne przekonanie, że to właśnie procesy związane z krystalizacją wody w ścięgnach połączone ze zjawiskiem anomalii rozszerzalności temperaturowo-objętościowej wody są bezpośrednimi przyczynami zmian obserwowanych w strukturze rozmrózzonego cięgna. Dogłębne zbadanie mechanizmów mrozenia

ci gna, a tak e nieodl cznie zawartej w nim wody, wydad si wi c kwesti kluczow przy podejmowaniu próby oceny skutków procesu mro enia, a tak e w wyznaczeniu granicy przydatno ci ci gna do przeszczepu.

Aby dogł bnie przeanalizowa i opisa zjawiska zachodz ce na ka dym etapie hierarchicznie zbudowanej tkanki, autorzy projektu stworz wielkoskalowy model ci gna. W tym celu, korzystaj c z molekularnych i chemomechanicznych technik modelowania, zostan opracowane modele opisuj ce struktury ci gna w reprezentatywnych dla nich skalach. Stworzone modele w skali atomowej opisuj ce pojedyncze włókienka kolagenowe, a tak e model w mikroskali obrazuj cy grupy p czków kolagenowych zostan wykorzystane do budowy mezoskalowego modelu obrazuj cego zachowanie mro onego ci gna w skali makroskopowej. Stworzony model b dzie uwzgl dniał tak e skomplikowan , ze wzgl du na proces modelowania zachodz cych w niej procesów, macierz zewn trzkomórkow ci gna, ł cz c wszystkie jego pozostałe struktury. Aby uwzgl dni wszystkie procesy zachodz ce w mro onej tkance, niezb dne b dzie opracowanie tak e modeli wody i lodu, a tak e opisanie granicy przejcia fazowego pomi dzy nimi.

Ka dy z opracowanych modeli zostanie poddany komputerowym symulacjom procesu mro enia przy czym metoda symulacji tak e zostanie dobrana odpowiednio do skali reprezentowanej przez model – dla skali atomowej b dzie to metoda Dynamiki Molekularnej (z ang. Molecular Dynamics), dla mikroskali metoda Gruboziarnistej Dynamiki Molekularnej (z ang. Coarse-Grained Molecular Dynamics), natomiast dla modelu wielkoskalowego Metoda Elementów Sko czonych (z ang. Finite Element Method).

Otrzymany wielkoskalowy model ci gna zostanie poddany procesowi walidacji, czyli ocenie czy opracowany model komputerowy na tyle poprawnie odwzorował prawdziwe ci gno, e prowadzone na tym modelu symulacje b d w stanie przewidzie jego rzeczywiste zachowanie. Proces walidacji b dzie wi c oparty na porównaniu wyników symulacji komputerowych z wynikami bada eksperymentalnych przeprowadzonych w laboratorium na mro onych próbkach prawdziwych wi skich ci gien. Procedura walidacyjna b dzie obejmowała zarówno badania niszc ce jak i nieniszcz ce, m.in.: badania wizualne próbek pod mikroskopem SEM/TEM, obserwacj barwionych przekrojów podłu nych i poprzecznych próbek w wietle ultrafioletowym, badania wygl du włókien kolagenowych, na tle pozostałej tkanki ł cznej z wykorzystaniem barwienia Van Giesona czy badania wytrzymało ci mechanicznej wykonane za pomoc testów statycznego rozci gania. Finalnym efektem projektu b dzie wi c zwalidowany wielkoskalowy model ci gna, zdolny do symulacji wszystkich fizyko-chemicznych procesów zachodz cych w hierarchicznej strukturze ci gna poddanemu procesowi mro enia.

Otrzymane wyniki bada pozwol zdobycie nowej wiedzy o podstawach zjawisk obserwowanych w strukturze ci gna poddanego procesowi mro enia, a opracowany model b dzie niezb dny przy analizie procesu mro enia ró nych tkanek kolagenowych pod k tem optymalizacji szybko ci tego procesu. Dobór odpowiednich warunków mro enia korzystnie wpłynie na mo liw do uzyskania trwało mro onego ci gna przeznaczonego do zabiegu transplantacji, zapewniaj c pacjentowi wy szy komfort i bezpiecze stwo pó niejszego „u ytkowania” przeszczepionej tkanki. Bior c pod uwag , e obecno wody w tkankach mi kkich jest zjawiskiem uniwersalnym, autorzy projektu maj tak e nadziej , e opracowany model wielkoskalowy, a w szczególno ci metodologia jego tworzenia i symulacji oparta na molekularnych i chemomechanicznych technikach modelowania, b dzie w przyszło ci wykorzystana do analizy wpływu mro enia na wła ciwo ci ró nych tkanek– w tym tak e tkanek chorobowo zmienionych. Opracowane i zwalidowane modele wykonane w skali atomowej, mikro i makro, z pewno ci b d stanowi unikalny warsztat badawczy do dalszych bada z zakresu biochemii i biomechaniki tkanek mi kkich.