

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Rozprawa doktorska

Dyscyplina naukowa inżynieria
biomedyczna/
Dziedzina nauk inżynieryjno-
technicznych

mgr inż.

Natalia Branecka-Strzelczyk

Modelowanie i badanie wpływu obciążeń mechanicznych na osteocyty
w kontekście mechanotransdukcji i przebudowy tkanki kostnej

Promotor

prof. dr hab. inż. **Marek Pawlikowski**

Promotor pomocniczy

dr inż. **Yanfei Lu**

Warszawa 2025

Dziękuję moim Rodzicom i Babci za niewiarygodnie wielkie i niewyczerpane pokłady
wsparcia, bez których nie powstałaby ta praca.

Dziękuję, nieobecnemu już wśród nas, mojemu mentorowi prof. Tomaszowi Lekszyckiemu za
godziny inspirujących rozmów i nakierowanie mnie na ścieżkę naukową.

Dziękuję prof. Markowi Pawlikowskiemu za cierpliwość, wskazówki i przyjęcie mnie pod
swoje skrzydła.

Dziękuję Łukaszowi za cierpliwość i wiarę we mnie.

Streszczenie

Celem pracy było opracowanie matematycznego modelu przebudowy cytoszkieletu komórek kostnych stanowiącego podstawę adaptacji osteoidu oraz symulacji numerycznych adaptacji komórek i tkanki kostnej pod wpływem obciążeń mechanicznych. Rozprawa stanowi podsumowanie badań nad matematycznym ujęciem wpływu oddziaływań mechanicznych na aktywność i odporność komórek kostnych, a tym samym na procesy adaptacyjne tkanki, co otwiera możliwość komputerowej symulacji i analizy przebudowy kości.

W ramach pracy przedstawiono charakterystykę budowy tkanki kostnej, ze szczególnym uwzględnieniem roli poszczególnych typów komórek i ich udziału w procesach przebudowy. Omówiono rolę cytoszkieletu w mechanotransdukcji oraz czynniki środowiskowe, takie jak hormony i gospodarka mikroelementów, wpływające na tempo i charakter procesów przebudowy. Przeprowadzono analizę istniejących modeli tkanki kostnej, pojedynczych komórek i cytoszkieletu, wskazując ich ograniczenia. Zaproponowano dwa uzupełniające się podejścia: modelowanie tkanki kostnej w oparciu o sygnały mechaniczne regulujące aktywność komórek oraz model przebudowy cytoszkieletu oparty na równaniach optymalizacyjnych, pozwalający na analizę zmian topologicznych w architekturze filamentów.

Symulacje numeryczne z wykorzystaniem metody elementów skończonych potwierdziły zasadność przyjętej koncepcji. Wyniki wskazują, że integracja modelu sygnałowego z opisem przebudowy cytoszkieletu otwiera nowe możliwości badania procesów adaptacji oraz może znaleźć zastosowanie w prognozowaniu odpowiedzi tkanki kostnej na obciążenia mechaniczne.

Słowa kluczowe:

modelowanie matematyczne, symulacje numeryczne, metoda elementów skończonych, osteocyt, cytoszkielet, przebudowa

Abstract

The aim of this study was to develop a mathematical model of cytoskeletal remodelling in bone cells, which forms the basis of osteoid adaptation, as well as to perform numerical simulations of cell and bone tissue adaptation under mechanical loading. The dissertation summarizes research on the mathematical representation of how mechanical interactions influence the activity and resilience of bone cells, and thus the adaptive processes of the tissue, thereby enabling computer-based simulation and analysis of bone remodelling.

The work presents the structural characteristics of bone tissue, with particular emphasis on the role of specific cell types and their involvement in remodelling processes. It discusses the role of the cytoskeleton in mechanotransduction and highlights environmental factors, such as hormones and mineral metabolism, that affect the rate and nature of remodelling. A review of existing models of bone tissue, single cells, and the cytoskeleton was carried out, with their limitations identified. Two complementary approaches were proposed: modelling bone tissue on the basis of mechanical signals regulating cellular activity, and a cytoskeletal remodelling model based on optimization equations, allowing for the analysis of topological changes within the filamentous architecture.

Numerical simulations using the finite element method confirmed the validity of the proposed concept. The results indicate that integrating the signal-based model with the description of cytoskeletal remodelling opens new opportunities for studying adaptive processes and may be applied to predict the response of bone tissue to mechanical loading.

keywords:

mathematical modelling, numerical simulations, finite element method, osteocyte, cytoskeleton, remodelling

Spis treści

1	Wprowadzenie.....	9
1.1	Uzasadnienie podjęcia tematu	10
2	Biomechanika i mechanobiologia	13
2.1	Makroskopowa i mikroskopowa budowa tkanki kostnej	14
2.1.1	Osteoklasty	15
2.1.2	Osteoblasty	16
2.1.3	Osteocyty	18
2.2	Procesy zachodzące w tkance kostnej	19
2.2.1	Przebudowa kości	19
2.2.2	Mechanotransdukcja	22
2.3	Cytoszkielek osteocyta	25
2.3.1	Filamenty aktynowe	25
2.3.2	Mikrotubule	27
2.3.3	Filamenty pośrednie	28
2.4	Sygnały jako czynniki zewnętrzne wpływające na komórki kostne	29
3	Przegląd modeli matematycznych	31
3.1	Modele przebudowy kości	31
3.1.1	Modele optymalizacyjne	32
3.1.2	Modele fenomenologiczne	33
3.1.3	Modele mechanistyczne	33
3.2	Modele komórki	34
3.2.1	Ciągłe modele komórki jako ciała stałego	36
3.2.2	Ciągłe modele komórki jako cieczy w powłoce	39
3.2.3	Model potęgowy	41
3.2.4	Model dwufazowy	43
3.2.5	Podsumowanie modeli na poziomie komórkowym	44

3.3	Modele cytoszkieletu.....	44
3.3.1	Model tensegrity.....	46
3.3.2	Model naprężonej sieci.....	48
3.3.3	Model piany otwartokomórkowej (open-cell foam)	51
3.3.4	Model ziarnisty.....	53
3.3.5	Model półsztywnej sieci polimerów	54
3.3.6	Modelowanie cytoszkieletu – podsumowanie.....	55
4	Cel i teza rozprawy.....	57
5	Modelowanie i badanie przebudowy.....	59
5.1	Model ciągły przebudowy kości z uwzględnieniem aktywności osteocytów i procesu mechanotransdukcji - ewolucja parametrów sztywności 2D	59
5.1.1	Przypadek czysto hydrostatyczny 2D	65
5.1.2	Przypadek czystego ścinania 2D	66
5.1.3	Przypadek rozciągania jednoosiowego 2D	68
5.2	Model ciągły przebudowy kości z uwzględnieniem aktywności osteocytów i procesu mechanotransdukcji - ewolucja parametrów sztywności 3D	70
5.3	Wstęp do optymalizacji topologicznej cytoszkieletu komórki kości (osteocytu)	78
5.4	Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocytu – model 2D.....	83
5.5	Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocytu – model 3D.....	91
5.6	Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu komórki kości (osteocytu) obciążonej przepływem	96
5.7	Sygnał biochemiczny – obecność jonów wapnia (Ca^{2+}).....	98
5.8	Sygnał od innych osteocytów.....	103
5.9	Sygnał biochemiczny – estrogen.....	105
6	Podsumowanie i wnioski.....	110
7	Bibliografia.....	113
	Spis rysunków	125
	Spis tablic	128

1 Wprowadzenie

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi podsumowanie badań autorki poświęconych przede wszystkim poszukiwaniu matematycznego opisu wpływu obciążeń mechanicznych na aktywność i odporność komórek kości, w kontekście adaptacji tkanki kostnej, umożliwiającego komputerowe symulacje procesu przebudowy. Rozprawa wpisuje się w nurt badań z zakresu biomechaniki i mechanobiologii, w których łączy się metody analityczne i obliczeniowe w celu zrozumienia złożonych procesów zachodzących w żywych tkankach. Rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów.

W rozdziale 2 omówiono budowę tkanki kostnej, uwzględniając cechy każdego typu komórek kostnych oraz opisując ich role w procesach związanych z przebudową kości. Opisano strukturę i właściwości mechaniczne cytoszkieletu, który odgrywa niezwykle istotną rolę w tym procesie. Oprócz obciążeń mechanicznych wyszczególniono także inne warunki środowiskowe istotnie wpływające na szybkość oraz jakość sygnalizacji międzykomórkowej i w efekcie przebudowy tkanki kostnej.

W rozdziale 3 zawarto przegląd zaproponowanych w literaturze modeli matematycznych przebudowy tkanki kostnej, a także opisujących mechanikę pojedynczych żywych komórek oraz cytoszkieletu. Opisane modele matematyczne biorą pod uwagę przede wszystkim aspekty mechaniczne, nie uwzględniając innych zjawisk zachodzących w tkance kostnej.

Cel naukowy rozprawy doktorskiej został przedstawiony w rozdziale 4. Przedstawiono w nim również tezę, której poświęcono poniższą pracę doktorską.

W rozdziale 5 zaprezentowano modele oraz wyniki symulacji numerycznych. Można rozdzielić ten rozdział na dwie zasadnicze części – w pierwszej przedstawiono model przebudowy tkanki kostnej w odpowiedzi na bodźce mechaniczne, w którym uwzględniono czułość komórek kostnych na różne rodzaje obciążeń. W drugiej części przedstawiono model matematyczny przebudowy struktury cytoszkieletu oparty na równaniach optymalizacyjnych, zatem skoncentrowano się na analizie zmian topologicznych w architekturze złożonej sieci filamentów cytoszkieletu. Następnie podjęto próbę zintegrowania tego modelu przebudowy z wpływem środowiska, czyli modelami opisującymi biologiczne procesy regulacji hormonalnej (estrogen), gospodarki makroelementów (jony wapnia) i innymi.

Rozdział 6 został poświęcony podsumowaniu pracy doktorskiej oraz wskazaniu możliwych zastosowań zaproponowanych modeli, oraz kierunków dalszego ich rozwoju.

1.1 Uzasadnienie podjęcia tematu

Zjawisko przebudowy kości, rozumiane jako funkcjonalna adaptacja ich kształtu oraz mikrostruktury do działających obciążeń mechanicznych, już od połowy dziewiętnastego wieku stanowi przedmiot intensywnych badań w obszarze nauk bioinżynierskich [1], [2]. Od tego czasu powstało wiele modeli opisujących ten proces, od mechanistycznych, przez fenomenologiczne, po modele oparte na założeniu optymalności struktury kości. Mają one zastosowanie między innymi w implantologii czy endoprotezoplastyce. Takie podejście makroskopowe, pomimo że użyteczne, pomija aspekt na poziomie komórkowym, na którym odbywa się sterowanie procesem przebudowy tkanki kostnej. Osteocyty, czyli komórki kostne odpowiedzialne za regulację przebudowy tkanki, są więc ogniwem łączącym działanie obciążeń mechanicznych z funkcjonalną adaptacją kości.

Tematyką rozprawy doktorskiej jest modelowanie i badanie wpływu obciążeń mechanicznych na aktywność i odporność jednego z rodzajów komórek kości – osteocytów właśnie. Wybór tego zagadnienia wynika z przekonania, że osteocyty i ich cytoszkielet są kluczowym elementem w procesie adaptacji tkanki kostnej, a jednocześnie pozostają obszarem stosunkowo słabo rozpoznany w modelowaniu matematycznym. Dotychczasowe badania nad przebudową kości koncentrowały się przede wszystkim na makroskopowych aspektach przebudowy, podczas gdy mechanizmy działania pojedynczych komórek, a zwłaszcza ich odpowiedzi na obciążenia zewnętrzne, mają charakter nie tylko czysto mechaniczny, ale są to również procesy biologiczne i chemiczne. Na rysunku 1.1 przedstawiono schemat, na którym podkreślono procesy, które zachodzą podczas reakcji tkanki kostnej na obciążenie mechaniczne.

Za sygnalizację międzykomórkową, umożliwiającą sterowanie procesem przebudowy kości, odpowiedzialny jest przede wszystkim cytoszkielet osteocytów. Istniejące podejścia, takie jak modele ciągłe, modele cząsteczkowe oraz te oparte na ścieżkach sygnalizacyjnych, pozwalają uchwycić wybrane aspekty funkcjonowania komórek, ale żaden z nich nie daje pełnego obrazu dynamicznej przebudowy cytoszkieletu. Szczególnie istotne wydaje się zatem sformułowanie modelu matematycznego, który pozwoli zamodelować strukturę i właściwości cytoszkieletu

zmieniające się w czasie pod wpływem bodźców mechanicznych. Wiadomo bowiem, że zmienność środowiska, zarówno pod względem biochemicznym, jak i mechanicznym, może wywoływać szybkie i znaczące przeobrażenia cytoszkieletu, które wpływają na przebudowę całej tkanki. Badania na pojedynczych żywych komórkach mają ogromne znaczenie dla przewidywania ich zachowania w żywej tkance w reakcji na naturalnie występujące bodźce mechaniczne. Odtwarzając rodzaje obciążeń, jakich doznaje dany typ komórek w żywej tkance i badając ich reakcje, możliwe jest zamodelowanie zachowania zarówno komórek, jak i całych tkanek w organizmie, ponieważ umożliwia zidentyfikowanie istotności wpływu różnych bodźców na rzeczywistą przebudowę tkanki kostnej. Badając reakcje komórek na obciążenia mechaniczne, można przewidzieć jakie warunki spowodują ich umieranie, a jakie wzmogą ich aktywność metaboliczną. Jest to wiedza niezmiernie istotna w protetyce oraz przy leczeniu chorób kostnych.



Rysunek 1.1: Schemat przebudowy tkanki kostnej

Dostępne w literaturze fenomenologiczne opisy komórek są często uproszczone, bowiem traktują je jako ciało sprężyste, kroplę cieczy otoczoną błoną lub materiał lepkosprężysty. Nie uwzględniają one jednak niejednorodności materiałowej ani zdolności komórek do aktywnej zmiany swoich właściwości w odpowiedzi na bodźce o różnej intensywności. Co więcej, matematyczne modele komórek bywają dostosowywane do konkretnych technik obciążania, co ogranicza ich uniwersalność. Tymczasem to właśnie dynamika przebudowy cytoszkieletu, częściej analizowana w badaniach biologicznych i chemicznych, okazuje się kluczowa, ponieważ obciążenia mechaniczne wpływają nie tylko na właściwości mechaniczne samej komórki, ale również na przekazywanie sygnałów regulujących ekspresję genów czy procesy endocytozy i fagocytozy wpływające na proces przebudowy tkanki kostnej.

Akcenty w pracy położone są przede wszystkim na proces. Centrum zainteresowań stanowi tutaj określenie w jaki sposób zmienia się cytoszkielet osteocyty pod wpływem różnorodnych sygnałów i jak te zmiany wpływają na adaptację tkanki kostnej. Przebudowa cytoszkieletu może pełnić rolę swoistego biomarkera, sygnalizującego stan tkanki, a nawet umożliwiającego diagnozę chorób, w których procesy adaptacyjne zostały zaburzone. W tym kontekście modelowanie dynamiki cytoszkieletu staje się nie tylko narzędziem do opisu biologii komórki, ale także propozycją spojrzenia na procesy patologiczne, takie jak osteoporoza.

Podjęcie tego tematu ma więc uzasadnienie zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Zrozumienie mechanizmów adaptacji osteocytów pozwala lepiej opisać procesy przebudowy kości i wypełnia lukę pomiędzy skalą mikroskopową a makroskopową. Jednocześnie posiada istotne implikacje praktyczne, wyniki badań w tym obszarze mogą znaleźć zastosowanie w:

- modelowaniu regeneracji tkanki kostnej,
- diagnostyce,
- planowaniu operacji,
- projektowaniu materiałów i kształtów implantów i endoprotez,
- rehabilitacji.

Ponadto badania *in silico*, mogą być alternatywą dla badań eksperymentalnych na zwierzętach.

2 Biomechanika i mechanobiologia

Biomechanika to interdyscyplinarna dziedzina nauki, która łączy zasady mechaniki (klasycznej, materiałów i płynów) z wiedzą biologiczną w celu analizy zachowania się układów biologicznych pod wpływem obciążeń mechanicznych. Obejmuje zarówno badanie właściwości mechanicznych tkanek biologicznych (np. modułu Younga, granicy plastyczności, sprężystości), jak i modelowanie narządów oraz układów ciała ludzkiego w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Biomechanika może być stosowana na różnych poziomach organizacji biologicznej – od molekularnego (np. deformacja białek strukturalnych) przez komórkowy (np. odpowiedź komórek na naprężenia ścinające), aż po poziom całych narządów czy układów (np. analiza chodu, obciążenia kręgosłupa, mechanika stawu kolanowego) [3].

Mechanobiologia natomiast jest młodszą, bardziej molekularną i komórkową gałęzią nauki, zajmującą się badaniami dotyczącymi wpływu jak mechaniczne bodźce mechaniczne wpływają na procesy biologiczne, takie jak różnicowanie komórek, apoptoza, proliferacja, czy ekspresja genów. Mechanobiologia integruje mechanikę z biologią komórkową i molekularną, skupiając się na mechanotransdukcji – czyli procesie przekształcania bodźców mechanicznych w sygnały biochemiczne wewnątrz komórki [4], [5].

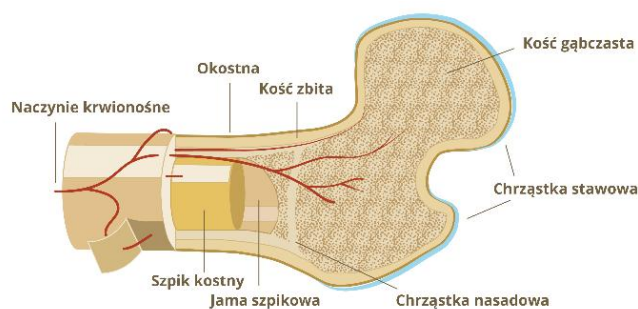
Zakres prowadzonych badań obejmuje zarówno biomechanikę, jak i mechanobiologię, co znajduje szczególne uzasadnienie w kontekście tkanki kostnej. Biomechanika dostarcza narzędzi do ilościowego opisu odpowiedzi kości na obciążenia mechaniczne, pozwalając analizować m.in. rozkład naprężeń, deformacji oraz ich wpływ na właściwości materiałowe i wytrzymałość tkanki. Z kolei mechanobiologia koncentruje się na biologicznych mechanizmach regulujących te procesy, badając, w jaki sposób komórki kostne reagują na bodźce mechaniczne i jak przekłada się to na proces przebudowy kości. Przykładem jest rola osteocytów, które pełnią funkcję czujników obciążenia mechanicznego i poprzez sygnalizację komórkową wpływają na aktywność osteoblastów i osteoklastów, regulując tym samym dynamiczną równowagę pomiędzy procesami syntezy i resorpcji. Takie podejście łączące oba obszary pozwala uzyskać pełniejszy obraz adaptacji funkcjonalnej kości – od poziomu mechaniki tkanek po molekularne mechanizmy komórkowe, które warunkują przebudowę kości.

2.1 Makroskopowa i mikroskopowa budowa tkanki kostnej

Szkielet organizmu żywego składa się z dwóch kluczowych elementów – kości i chrząstki. Pełnią one istotną rolę w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania procesów fizjologicznych organizmu. Ich podstawową funkcją jest funkcja strukturalna – chronią i wspierają narządy wewnętrzne oraz nadają kształt ciału. Układ szkieletowy stanowi również miejsce przyczepu mięśni umożliwiających ruch. Ponadto odgrywa istotną rolę metaboliczną jako magazyn wapnia i fosforanów niezbędnych do utrzymania homeostazy. Histologicznie kość jest narządem zbudowanym z wielu różnych tkanek. Główną z nich jest porowata struktura złożona z włókien kolagenowych, białek, wody oraz związków wapnia, fosforu i magnezu, a przede wszystkim hydroksyapatytu. W jej porach działają komórki kostne – osteoblasty, osteoklasty i osteocyty – odpowiedzialne za wymianę masy i przebudowę tkanki. Proporcje tych składników różnią się w zależności od typu kości i ich lokalizacji. Z makroskopowego punktu widzenia szkielet wydaje się być statycznym organem, jednak na poziomie mikroskopowym jest to tkanka wysoce aktywna, która nieustannie reaguje na obciążenia zewnętrzne i dostosowuje swoje właściwości mechaniczne i morfologiczne w procesie przebudowy [6], [7].

Tkanka kostna jest bogatą w sole mineralne odmianą tkanki łącznej, która charakteryzuje się dużą wytrzymałością i sztywnością. Składa się w 5% z komórek, czyli osteoblastów, osteoklastów i osteocytów, a w 95% z istoty międzykomórkowej, w której około 25% masy to osteoid, czyli część organiczna, a 60-70% masy to sole mineralne, czyli część nieorganiczna [8]. W dojrzałym szkielecie człowieka wyróżnia się dwa główne typy kości: kość korową (zbitą) oraz kość beleczkową (gąbczastą). Pomimo znacznych różnic w organizacji przestrzennej i właściwościach mechanicznych, mają one taki sam skład chemiczny.

Kość korowa, stanowiąca około 80% całkowitej masy kostnej, cechuje się zwartą, gęstą strukturą, niskim wskaźnikiem przebudowy oraz wysoką odpornością na siły ściskające. Lokalizowana jest głównie w zewnętrznych warstwach wszystkich struktur szkieletowych, gdzie pełni funkcję mechanicznego wsparcia i ochrony narządów wewnętrznych. Choć główną jej rolą jest utrzymanie integralności biomechanicznej szkieletu, kość korowa może również uczestniczyć w regulacji gospodarki mineralnej, szczególnie w warunkach przewlekłego niedoboru wapnia lub fosforu. Schemat kości przedstawiono na rysunku 2.1.



Rysunek 2.1: Schemat budowy kości

Kość beleczkowa, stanowiąca około 20% masy szkieletu, cechuje się mniejszą gęstością o wysokim stopniu porowatości, co przekłada się na dużą powierzchnię kontaktu z mikrośrodowiskiem. Pomimo mniejszej masy, odpowiada za około 80% całkowitej powierzchni kości, co czyni ją kluczowym miejscem aktywnej przebudowy i wymiany metabolicznej. Ma większą elastyczność oraz wyższy wskaźnik przebudowy tkankowej niż kość korowa, odgrywa więc istotną rolę w regulacji homeostazy mineralnej oraz adaptacji do zmiennych obciążeń mechanicznych. Kość gąbczasta przyczynia się również do wsparcia biomechanicznego, szczególnie w obrębie kręgów i innych struktur poddawanych znacznym obciążeniom osiowym, a w sytuacjach ostrego deficytu mineralnego stanowi pierwotne źródło uwalniania wapnia i fosforanów do krążenia ogólnego [6].

2.1.1 Osteoklasty

Etymologia słowa osteoklast pochodzi ze starożytnej greki, jest połączeniem słów *ostéon* czyli kość i *klastos* tłumaczonego jako zniszczony, rozbity. Osteoklasty są komórkami niszczącymi kość – kościogubnymi.



Rysunek 2.2: Osteoklast

Osteoklasty to wysoce wyspecjalizowane komórki wielojądrowe wywodzące się z linii monocytowo-makrofagowej szpiku kostnego, należące do układu fagocytarnego (rysunek 2.2). Powstają one w wyniku fuzji 5–10 jednojądrowych komórek prekursorowych, a proces ten jest wspomagany m.in. przez aktywną formę witaminy D₃ (kalcytriol). Dojrzały osteoklast osiąga średnicę do 100 µm i zawiera zazwyczaj od 5 do 10 jąder. Cytoplazma osteoklastu ma charakter kwasochłonny, co wynika z dużej zawartości organelli związanych z aktywnością degradacyjną [9].

Osteoklasty lokalizują się głównie na powierzchni kości, gdzie tworzą charakterystyczne zagłębienia zwane zatokami Howshipa (lacunae Howshipi), będące miejscem aktywnej resorpcji tkanki kostnej. Na powierzchni osteoklastu skierowanej ku istocie międzykomórkowej znajduje się rąbek szczoteczkowy, utworzony przez liczne, silnie pofałdowane wypustki cytoplazmatyczne, które znacznie zwiększają powierzchnię kontaktu z macierzą kostną [10].

Aktywne osteoklasty wydzielają enzymy lizosomalne, przede wszystkim hydrolazy kwaśne (w tym katepsynę K), które degradują organiczne komponenty macierzy kostnej. Dodatkowo, za pośrednictwem pomp protonowych i kanałów chlorkowych, osteoklasty transportują jony H⁺ i Cl⁻ do przestrzeni resorpcyjnej, prowadząc do jej zakwaszenia. Niskie pH umożliwia dezaktywizację hydroksyapatytu i rozpuszczanie mineralnej frakcji kości, co jest kluczowym etapem w procesie resorpcji [8], [11].

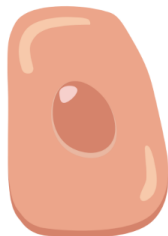
Aktywność osteoklastów jest kluczowa zarówno dla procesu modelowania i przebudowy kości. Prawidłowa regulacja ich funkcji jest zatem niezbędna dla homeostazy tkanki kostnej. Zaburzenia aktywności osteoklastów mogą prowadzić do stanów patologicznych – upośledzenie ich rozwoju lub funkcji skutkuje zwiększoną masą kostną (np. w osteopetrozie), natomiast nadmierna aktywność osteoklastów prowadzi do ubytku masy kostnej (jak w przypadku osteoporozy).

Po zakończeniu fazy resorpcji, osteoklasty ulegają apoptozie, co stanowi istotny mechanizm regulacji czasu ich aktywności i przestrzennego ograniczenia procesu degradacji macierzy [12].

2.1.2 Osteoblasty

Osteoblasty to komórki kościotwórcze, z greki: *osteo-* (kość) i *-blast* (kiełek), czyli komórka tworząca kość. Są wyspecjalizowanymi komórkami pochodzenia mezenchymalnego,

odpowiedzialnymi za syntezę składników organicznych macierzy pozakomórkowej tkanki kostnej. Ich prekursorami są komórki macierzyste zrębu szpiku kostnego, które ulegają różnicowaniu w odpowiedzi na sygnały lokalne i systemowe [13].



Rysunek 2.3: Osteoblast

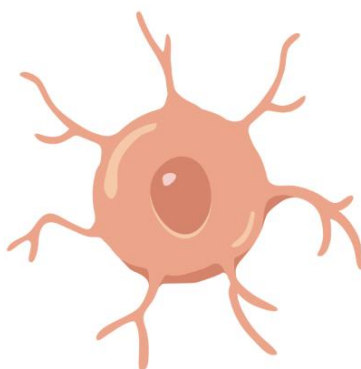
Dojrzałe osteoblasty lokalizują się na powierzchni nowo formowanej kości, gdzie tworzą ciągłą warstwę komórkową izolującą powierzchnię macierzy od działania osteoklastów, przeciwdziałając w ten sposób niekontrolowanej resorpcji. Mają owalny kształt, średnicę około 20–30 μm , kuliste jądro i zasadochłonną cytoplazmę (rysunek 2.3). W okresie spoczynku morfologia osteoblastów ulega zmianie — komórki spłaszczają się, a jądra stają się wydłużone. Osteoblasty charakteryzują się obecnością licznych wypustek cytoplazmatycznych, za pośrednictwem których tworzą połączenia typu nexus (ang. *gap junctions*) z sąsiednimi komórkami. Struktury te umożliwiają wymianę jonów, małych cząsteczek i koordynację aktywności metabolicznej [8].

Funkcjonalnie osteoblasty syntetyzują główne składniki organicznej macierzy kostnej (osteoidu), w tym kolagen typu I i proteoglikany. Ponadto wydzielają białka regulujące mineralizację, takie jak osteonektyna i osteokalcyna, a także enzymy hydrolityczne (np. kolagenaza). Szczególną rolę pełni również osteoprotegeryna (OPG) – glikoproteina wiążąca ligand RANKL, która zapobiega jego interakcji z receptorem RANK na powierzchni prekursorów osteoklastów. Dzięki temu OPG hamuje różnicowanie osteoklastów, ogranicza resorpcję kości, wspiera stabilność mineralną oraz przeciwdziała wapnieniu naczyń krwionośnych [14].

Po zakończeniu syntezy macierzy kostnej część dojrzałych osteoblastów ulega różnicowaniu do osteocytów, zostając trwale wbudowana w nowo powstałą tkankę kostną. Inne osteoblasty ulegają spłaszczeniu i pozostają na powierzchni kości jako tzw. komórki wyściółkowe, pokrywające nieaktywne obszary kostne. Pozostała populacja osteoblastów ulega apoptozie.

2.1.3 Osteocyty

Najbardziej niezwykłymi, istotnymi z punktu widzenia sterowania procesem przebudowy kości, a także kluczowymi dla tego procesu są osteocyty, a więc z greki *osteo-* (kość) połączona z *-cyt* (komórka), co znaczy dosłownie *komórki kostne*. Osteoblasty, które zostają całkowicie otoczone przez zmineralizowaną macierz pozakomórkową kości, ulegają przekształceniu w osteocyty. Bezpośrednie otoczenie komórki oraz jej wypustek cytoplazmatycznych nie ulega mineralizacji, co prowadzi do powstania jam kostnych (łac. *lacunae*), w których znajdują się ciała osteocytów, oraz kanalików kostnych (łac. *canaliculi*), zawierających ich wypustki. Ponieważ zmineralizowana macierz kostna jest nieprzepuszczalna dla substancji odżywczych i metabolitów, transport tych cząsteczek odbywa się przez system wypustek cytoplazmatycznych łączących osteocyty, zwłaszcza pomiędzy komórkami zlokalizowanymi w sąsiedztwie naczyń krwionośnych a tymi położonymi bardziej obwodowo [8].



Rysunek 2.4: Osteocyt

Osteocyty (rysunek 2.4) to najliczniejsze komórki w kościach, stanowią ponad 90% wszystkich komórek obecnych w zmineralizowanej macierzy oraz na powierzchni kości. Coraz liczniejsze dowody wskazują, że osteocyty pełnią kluczową rolę w integracji sygnałów mechanicznych i hormonalnych, koordynując aktywność osteoblastów i osteoklastów w procesach przebudowy i utrzymania homeostazy tkanki kostnej [15], [16].

Osteocyty wykazują wyjątkowo wysoką wrażliwość na bodźce mechaniczne, przewyższając pod tym względem m.in. fibroblasty okostnowe oraz osteoblasty. W odpowiedzi na stymulację mechaniczną modulują ekspresję licznych cząsteczek sygnałowych odgrywając tym samym centralną rolę w mechanotransdukcji kostnej. Osteocyty aktywowane mechanicznie syntetyzują i uwalniają szereg cząsteczek sygnałowych, takich jak białka morfogenetyczne kości (BMP), ligandy szlaku Wnt, prostaglandyna E2 (PGE₂) oraz tlenek azotu (NO), które

regulują rekrutację, różnicowanie i aktywność osteoblastów oraz osteoklastów, wpływając tym samym na procesy modelowania i przebudowy kości [17]. Ta właściwość osteocytów, będzie dalej określana, z braku lepszego tłumaczenia, jako mechanoczułość (ang. *mechanosensing*), czyli zdolność osteocytów do bycia receptorami, czyli odbioru i przetwarzaniu sygnałów mechanicznych. W procesie mechanotransdukcji będą one przekazywać komórkom – aktorom, czyli osteoblastom i osteoklastom, sygnał biochemiczny, informujący o czynnościach jakie należy podjąć. Proces mechanotransdukcji opisano szerzej w rozdziale 2.2.2.

2.2 Procesy zachodzące w tkance kostnej

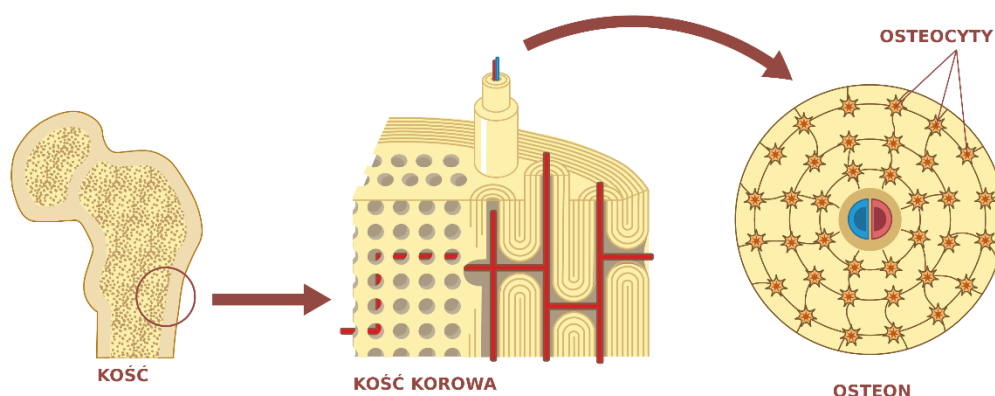
Podjmując się próby modelowania matematycznego tkanki kostnej, która jest tkanką żywą, konieczne jest przyjrzenie się zjawiskom, które w niej zachodzą. Z punktu widzenia niniejszej pracy najistotniejsze są procesy związane z reakcją kości na mechaniczne obciążenia.

2.2.1 Przebudowa kości

Kość nieustannie dostosowuje się do warunków środowiskowych reagując na zmiany zewnętrznych obciążeń mechanicznych, zmieniając swoje właściwości w procesie przebudowy (ang. *bone remodeling*). Adaptacja kości opiera się na mechanizmie wykrywania obciążeń i ciągłej przebudowie jej architektury poprzez tworzenie i resorpcję tkanki kostnej – proces ten zależy od obciążeń zewnętrznych [18].

Proces przebudowy może zachodzić w obrębie wszystkich czterech głównych powierzchni kostnych: okostnej, powierzchni endokortykałnej, beleczkowej oraz wewnątrzkorowej. W przypadku przebudowy wewnątrzkorowej zorganizowane zespoły osteoklastów i osteoblastów penetrują macierz kostną, tworząc tzw. kanały resorpcyjne. Zespół ten, wraz z towarzyszącymi naczyniami krwionośnymi, określany jest mianem kostnej jednostki wielokomórkowej (ang. *Bone Multicellular Unit*, BMU) – podstawowej jednostki funkcjonalnej odpowiedzialnej za przebudowę kości. Końcowym efektem przebudowy w obrębie tkanki korowej jest osteon (system Haversa) – struktura złożona z koncentrycznych lamelli kostnych ułożonych wokół centralnego kanału Haversa, przez który przebiegają naczynia krwionośne i nerwy, jak przedstawiono na rysunku 2.5. Osteon jest ograniczony obwodowo przez linię cementową, która stanowi granicę pomiędzy nowo utworzoną a uprzednio istniejącą tkanką kostną [19]. Nowe jednostki BMU mogą inicjować się w różnych

lokalizacjach: w obrębie szpiku kostnego, na powierzchni okostnej lub w układzie naczyniowym istniejącego osteonu. W przypadku przebudowy zachodzącej na powierzchniach endokortykalnych, beleczkowych (gąbczastych) oraz okostnej, proces ten nie wiąże się z tworzeniem nowego kanału naczyniowego.

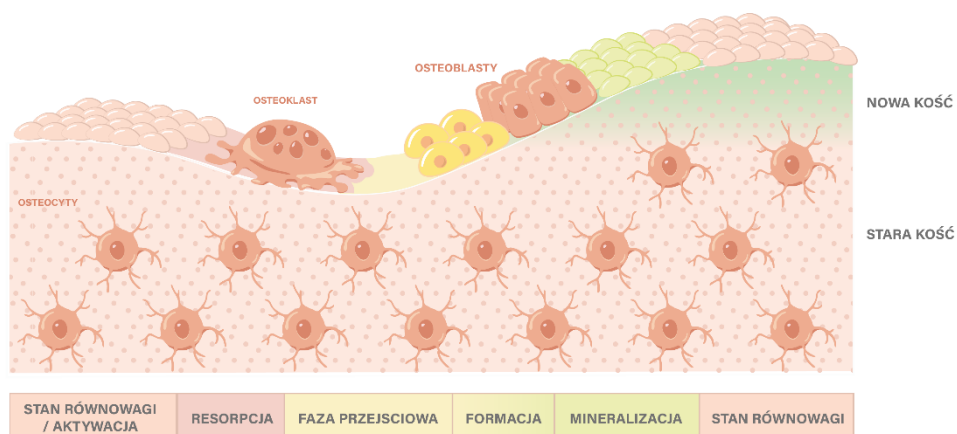


Rysunek 2.5: Budowa korowej tkanki kostnej

Przebudowa endokortykalna i wewnątrzokortykalna to powszechne zjawiska zarówno w okresie wzrostu i dojrzewania, jak i w życiu dorosłym, gdzie odpowiadają za bieżącą przebudowę i adaptację tkanki kostnej. Natomiast przebudowa na powierzchni okostnej występuje znacznie rzadziej na każdym etapie życia.

Przebudowę kości można sklasyfikować jako proces celowy lub stochastyczny. Przebudowa celowa jest inicjowana w odpowiedzi na określone lokalne sygnały mechaniczne i biochemiczne. Najczęściej akceptowanymi mechanizmami sygnalizacyjnymi są mikrouszkodzenia mechaniczne oraz apoptoza osteocytów, przy czym oba te czynniki mogą być ze sobą funkcjonalnie powiązane. Z kolei przebudowa stochastyczna charakteryzuje się brakiem wyraźnego lokalnego sygnału inicjującego i zachodzi w sposób pozornie losowy, najprawdopodobniej w celu utrzymania równowagi wapniowo-fosforanowej w organizmie. Przebudowa celowa jest kluczowa dla utrzymania integralności mechanicznej szkieletu poprzez usuwanie i zastępowanie uszkodzonych fragmentów macierzy kostnej, natomiast przebudowa stochastyczna wydaje się pełnić funkcję regulacyjną w homeostazie mineralnej [20].

Zdolność kości do modyfikacji swojego kształtu oraz mikroarchitektury w odpowiedzi na zmieniające się warunki obciążeń mechanicznych określana jest mianem funkcjonalnej adaptacji. Proces ten stanowi podstawowy mechanizm regulujący strukturę tkanki kostnej w zależności od lokalnych wymagań biomechanicznych.



Rysunek 2.6: Przebudowa kości

Proces przebudowy tkanki kostnej można podzielić na sześć podstawowych etapów, przedstawionych na rysunku 2.6:

- 1) stan równowagi – w tym stadium powierzchnia kości jest pokryta warstwą nieaktywnych komórek wyściółkowych (ang. *lining cells*), które stanowią barierę ochronną przed dostępem dla osteoklastów;
- 2) stan aktywacji – w wyniku zmian środowiska pobudzany jest proces przebudowy tkanki, sygnały biochemiczne i fizyczne motywują komórki prekursorowe osteoklastów do migracji w miejsce, gdzie będzie następować przebudowa;
- 3) resorpcja – osteoklasty rozpuszczają organiczne i mineralne składniki kości;
- 4) faza przejściowa – zanik osteoklastów, wygładzenie powierzchni warstwą cementową, ułatwiającą związanie kolejnej warstwy tkanki z poprzednią, pojawienie się komórek prekursorowych, z których różnicują się osteoblasty;
- 5) formowanie – osteoblasty osadzają się na powierzchni zdegenerowanej przez osteoklasty i zaczynają syntezę tworzącą macierz;
- 6) mineralizacja – krystalizacja minerałów, głównie hydroksyapatytu, na włóknach kolagenowych, powstanie twardej, dojrzałej tkanki kostnej.

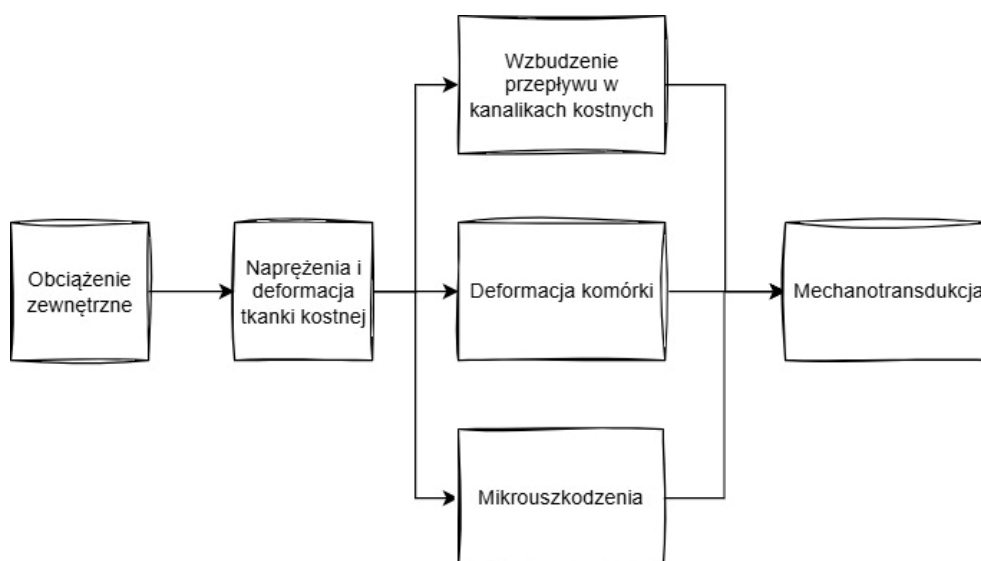
U dorosłego człowieka około 10% całkowitej masy kostnej ulega rocznej wymianie, co implikuje pełną przebudowę materiału kostnego w skali około dekady. W obszarach, które doświadczają relatywnie niskich obciążeń mechanicznych, dochodzi do resorpcji tkanki przez osteoklasty, co prowadzi do wzrostu porowatości oraz ewentualnych zmian morfologii kości. Z kolei w regionach poddanych zwiększonemu naprężeniu mechanicznemu, proces przebudowy przebiega w sposób bardziej zrównoważony: osteoklastyczna degradacja matrycy

jest kompensowana syntezą nowej tkanki przez osteoblasty. Efektem jest struktura o zmodyfikowanej mikroarchitekturze i zoptymalizowanych, anizotropowych właściwościach mechanicznych, lepiej dostosowanych do kierunków działania sił.

2.2.2 Mechanotransdukcja

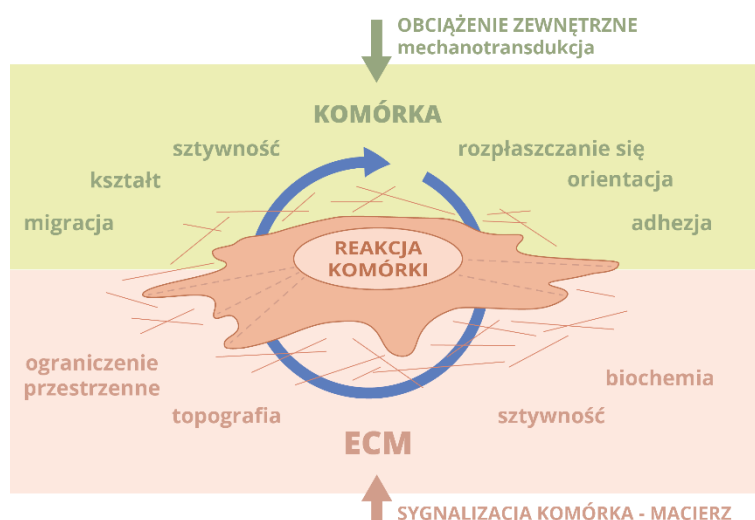
Mechanotransdukcja to przekształcanie bodźców mechanicznych wynikających z oddziaływań zewnętrznych w sygnały biochemiczne, które mogą indukować odpowiedź komórek kostnych odpowiedzialnych za syntezę lub resorpcję tkanki kostnej. Komórki biorące udział w tym przekształcaniu, identyfikowane jako mechanosensory osteocyty, wykrywają sygnały mechaniczne i inicjują oraz kontrolują proces przebudowy [21], [22], [23]. Osteocyty są regularnie osadzone w jamkach kostnych (łac. *lacunae*), zakotwiczone za pomocą wyspecjalizowanych struktur adhezyjnych, opartych na integrzynach i białkach kotwiczących (np. winkulinie), które łączą cytoszkielet komórki z macierzą zewnątrzkomórkową i połączone wąskimi kanałami, tworząc sieć zwaną systemem kanalików i jam osteocytarnych (OLCN), która umożliwia im komunikację [15], [24], [25], [26], [27].

Obciążenia mechaniczne – takie jak ściskanie czy zginanie – generują gradienty ciśnienia i przepływ płynu przez kanalikı kostne, co wywołuje lokalne siły ścinające oraz naprężenia rozciągające działające na błonę komórkową osteocytów. Schemat przebiegu procesu został przedstawiony na rysunku 2.7.



Rysunek 2.7: Uproszczony schemat wpływu obciążeń mechanicznych wywołujących proces mechanotransdukcji

Deformacja struktury otaczającej osteocyty przekłada się na reakcję mechanotransdukcyjną: naprężenia ścinające aktywują integryny i kinazy ogniskowe (np. FAK, Src), co prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych, takich jak MAPK/ERK, regulujących przeżycie komórek i przebudowę kości. Osteocyty pełnią zatem funkcję lokalnych czujników naprężenia, które modulują aktywność osteoblastów i osteoklastów poprzez produkcję sygnałów biochemicznych. Mechanicznie indukowane sygnały mogą być dodatkowo modulowane przez obecność receptorów estrogenowych, które warunkują efektywność odpowiedzi osteogenicznej [12].

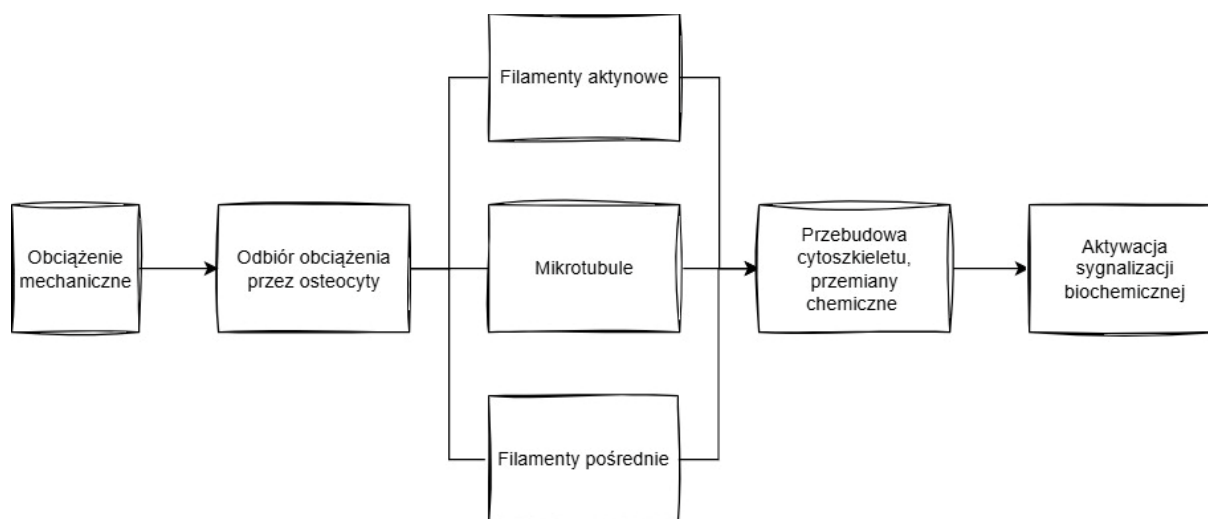


Rysunek 2.8: Mechanotransdukcja i czynniki wpływające na komórkę

Osteocyty wykazują mechanoczułość na różne rodzaje bodźców mechanicznych, w tym deformacji całej tkanki, ciśnienia hydrostatycznego oraz naprężeń ścinających generowanych przez ruch płynu śródkanałowego [23]. Badania *in vitro* wykazały, że osteocyty wykazują najwyższą czułość na naprężenia ścinające powstałe w wyniku przepływu płynu śródkanałowego przez macierz kostną. Ten rodzaj obciążenia mechanicznego stanowi znacznie silniejszy bodziec niż ciśnienie hydrostatyczne o porównywalnej wielkości [15], [28], [29].

Cytoszkielek komórkowy zapewnia komórce i jej organelom wewnętrzną strukturę i wsparcie. Pod wpływem naprężeń mechanicznych cytoszkielek ulega ściśnięciu i działa na zewnątrz, wytwarzając siłę przeciwną. Dodatkowo, cytoszkielek pośrednio łączy się z macierzą zewnątrzkomórkową i innymi komórkami poprzez połączenia adhezyjne i tworzy wyspecjalizowane wypustki komórkowe, co sprawia, że jest on dobrze umiejscowiony, aby wyczuwać siły mechaniczne, takie jak naprężenia ścinające płynu, naprężenia w połączeniach macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zmiany sztywności podłoża, które ściskają i rozciągają

komórki i ich połączenia zewnątrzkomórkowe. Dlatego cytoszkielet pełni kluczową rolę jako mechanosensor, umożliwiający komórce detekcję i reakcję na bodźce mechaniczne (rysunek 2.8) [30].



Rysunek 2.9: Schemat mechanotransdukcji

Cytoszkielet jest dobrze poznany elementem odpowiadającym za przekazywanie sygnałów mechanicznych w różnych typach komórek. Działa jak centrum sygnalizacyjne, współpracując z mechanicznie aktywowanymi kanałami wapniowymi i jonowymi, kinazami oraz receptorami GPCR. Dzięki tym interakcjom uruchamiane są szlaki sygnałowe, które przekształcają bodźce mechaniczne w odpowiedzi bio-chemiczne, umożliwiając komórce reagowanie na zmiany w swoim otoczeniu – czyli prowadząc proces mechanotransdukcji [31], [32], [33]. Schemat przebiegu procesu mechanotransdukcji przedstawiono na rysunku 2.9. Cytoszkielet jest dobrze poznany elementem odpowiadającym za przekazywanie sygnałów mechanicznych w różnych typach komórek. Działa jak centrum sygnalizacyjne, współpracując z mechanicznie aktywowanymi kanałami wapniowymi i jonowymi, kinazami oraz receptorami GPCR. Dzięki tym interakcjom uruchamiane są szlaki sygnałowe, które przekształcają bodźce mechaniczne w odpowiedzi bio-chemiczne, umożliwiając komórce reagowanie na zmiany w swoim otoczeniu – czyli prowadząc proces mechanotransdukcji [31], [32], [33]. Schemat przebiegu procesu mechanotransdukcji przedstawiono na rysunku 2.9.

2.3 Cytoszkieleł osteocyta

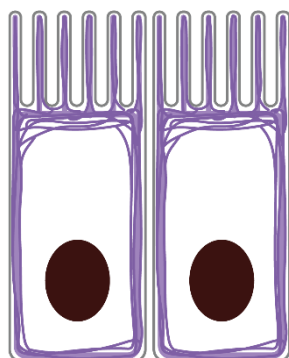
Cytoszkieleł jest to system filamentowych struktur występujących w cytoplazmie komórek eukariotycznych. Jest zbudowany z trzech głównych komponentów: mikrofilamentów aktynowych, mikrotubuli, filamentów pośrednich oraz wielu białek łączących, regulatorowych i motorycznych. Układy filamentowych nitek tworzą gęstą sieć przypominającą szkieleł, chociaż nie pełnią jedynie funkcji podporowych. Są to struktury bardzo dynamiczne i zdolne do szybkich reorganizacji. Niektóre z nich są wytwarzane tylko na krótką chwilę, by spełnić swoją funkcję. Polimeryzacja i depolimeryzacja włókien odpowiada za możliwość szybkiej przebudowy architektury. Cytoszkieleł jest strukturą organizującą wewnątrz komórki i stanowiącą jej podparcie decydując o jej kształcie, a jednocześnie jest to dynamiczna i adaptacyjna struktura, której polimery składowe i białka regulatorowe są w ciągłym ruchu. Zatem to cytoszkieleł właśnie odpowiada za wszystkie ruchy wykonywane przez komórkę oraz wydarzające się wewnątrz niej jak na przykład skurcz mięśni i mitotyczny ruch chromosomów [34]. Poszczególne typy układów filamentowych są ze sobą połączone strukturalnie i funkcjonalnie, a dzięki kompleksom białkowym oddziałują na siebie nawzajem, ale także na błony, organella komórkowe oraz macierz zewnątrzkomórkową. Cytoszkieleł jest jedyną strukturą łączącą organella komórkowe ze sobą nawzajem oraz błoną komórkową. Spośród funkcji cytoszkieletu należy wymienić także wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów czy stanowienie szlaków dla białek motorycznych.

Każdy rodzaj filamentów cytoszkieletu charakteryzuje się odmiennym zakresem funkcji, co znajduje odzwierciedlenie w ich strukturze molekularnej oraz specyficznym rozmieszczeniu wewnątrzkomórkowym. Mimo to, filamety cytoszkieletu organizują się w zintegrowaną, dynamiczną sieć, zdolną do ciągłej przebudowy w odpowiedzi na zmieniające się sygnały pochodzące zarówno z wnętrza komórki, jak i jej otoczenia. W rezultacie takiej ścisłej współpracy i dynamicznej natury cytoszkieletu, jednoznaczna ocena udziału poszczególnych jego komponentów w procesach mechanotransdukcji jest bardzo trudna.

2.3.1 Filamety aktynowe

Filamety aktynowe, nazywane również mikrofilamentami, są włóknami białkowymi o średnicy 5-7 nm, a tym samym są najcieńszymi spośród nici siatki cytoszkieletu. Są zbudowane z monomerów aktyny, które łączą się w długie polimery dwóch skręconych ze sobą

łańcuchów. Filamenty aktynowe są polarne, wszystkie podjednostki są ukierunkowane, zatem można rozróżnić końce każdej nici [35].



Rysunek 2.10: Filamenty aktynowe w komórkach

Cytoszkielek aktynowy, przedstawiony schematycznie na rysunku 2.10, stanowi główną platformę mechaniczną komórki, zdolną zarówno do generowania, jak i przekazywania sił. Filamenty aktynowe (F-aktyna) wykazują umiarkowaną sztywność w porównaniu z innymi komponentami cytoszkieletu — są znacznie bardziej elastyczne niż mikrotubule, ale mniej podatne na rozciąganie niż filamente pośrednie. Ich długość persystencji, czyli miara sztywności, wynosi około 10–17 μm , co oznacza, że mogą tworzyć półsztywne struktury na skalę pojedynczej komórki, ale przy dłuższych odcinkach ulegają ugięciu [36]. Ta elastyczność pozwala im dostosowywać się do zmieniających się naprężeń wewnętrznych i zewnętrznych [37].

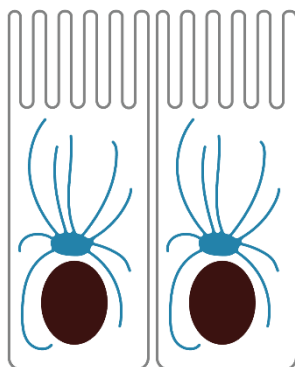
Filamenty aktynowe są cienkie i elastyczne, zatem aby osiągnąć sztywność i lepsze własności mechaniczne łączą się w duże kompleksy połączonych ze sobą włókien. Filamenty aktynowe mogą organizować się w wysoce dynamiczne sieci i struktury zależnie od obecności białek pomocniczych, a tym umożliwiać komórce modulować swoimi właściwościami mechanicznymi przestrzennie i czasowo [36], [38]. W przeciwieństwie do mikrotubul, których struktura opiera się na centralnych ośrodkach organizacyjnych, aktyna działa w sposób bardziej lokalny. Cytoszkielek aktynowy dynamicznie reaguje na sygnały z otoczenia komórki – jego układ zmienia się w odpowiedzi na aktywację receptorów powierzchniowych [33]. Cytoszkielek aktynowy pełni kluczową rolę w generowaniu sił w komórce. Może on wytwarzać zarówno siły wypychające (protruzyjne), napędzane polimeryzacją aktyny, jak i siły kurczliwe, powstające w wyniku interakcji filamentów aktynowych z bipolarnymi włóknkami miozyny II. Dzięki temu cytoszkielek ten uczestniczy w migracji komórek, interakcji z otoczeniem,

regulacji mechanicznych właściwości powierzchni komórki oraz wielu innych procesach fizjologicznych [33], [39].

Filamenty aktynowe uczestniczą także w przenoszeniu sił zewnętrznych do wnętrza komórki, stanowiąc element mechanicznego sprzężenia z otoczeniem komórkowym. Połączenia z błoną komórkową i macierzą zewnątrzkomórkową umożliwiają aktynie odgrywanie roli mechanicznego czujnika i przekaźnika, co jest kluczowe dla mechanotransdukcji [37].

2.3.2 Mikrotubule

Mikrotubule, schematycznie przedstawione na rysunku 2.11, są najbardziej sztywnymi spośród trzech głównych składników cytoszkieletu. Ich rurkowata struktura o średnicy około 25 nm nadaje im znaczną odporność na zginanie. Na podstawie testów zginania wyznaczono, że są one około 300 razy sztywniejsze niż filamenty aktynowe. Ta wyjątkowa sztywność czyni z nich główne struktury nośne cytoszkieletu, zdolne do przenoszenia znacznych sił ściskających w obrębie komórki [35].



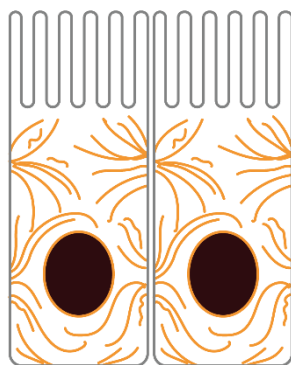
Rysunek 2.11: Mikrotubule w komórkach

Podobnie jak filamenty aktynowe, mikrotubule są strukturami spolaryzowanymi i wyróżniają się wyjątkowo dynamicznym przebiegiem polimeryzacji i depolimeryzacji. Procesy te, polegające na szybkim przyłączaniu i odłączaniu podjednostek tubuliny na końcach mikrotubuli, umożliwiają im nieustanną przebudowę w odpowiedzi na potrzeby komórki. Charakterystyczna jest dla mikrotubuli dynamiczna niestabilność, czyli cykliczne przechodzenie między fazą wzrostu a gwałtownego rozpadu, co umożliwia błyskawiczną reorganizację sieci mikrotubuli oraz sprawne przeszukiwanie przestrzeni komórkowej [33], [35], [40], [41], [42].

W warunkach fizjologicznych mikrotubule nie pozostają sztywno prostoliniowe. Przeciwnie, w komórkach obserwuje się często ich znaczne zagięcia, co sugeruje, że są one poddawane działaniu dużych sił mechanicznych, zwłaszcza sił ściskających [40]. Taka architektura wspiera pogląd, że mikrotubule pełnią funkcję sprężystych podpór wewnątrzkomórkowych, stabilizując strukturę komórki i przeciwdziałając mechanicznym deformacjom. Co więcej, mogą przenosić siły wynikające z interakcji z innymi składnikami cytoszkieletu, takimi jak filamenty pośrednie czy aktynowe, co dodatkowo wpływa na ich zachowanie mechaniczne [35], [37], [43].

2.3.3 Filamenty pośrednie

Filamenty pośrednie, przedstawione schematycznie na rysunku 2.12, określane tak ze względu na swoją średnicę, która plasuje się pomiędzy cieńszymi mikrofilamentami aktynowymi a grubszyimi mikrotubulami, stanowią trzecią główną klasę białek cytoszkieletowych. Szacuje się, że około 70 genów koduje białka należące do sześciu różnych klas filamentów pośrednich [44]. Pomimo podziału na sześć odrębnych klas, wszystkie filamenty pośrednie wykazują zbliżoną strukturę drugorzędową. W przeciwieństwie do aktyny i mikrotubul, które cechuje polaryzacja z wyróżnionymi końcami dodatnim i ujemnym, filamenty pośrednie są strukturami apolarnymi. Choć ich podstawowa struktura drugorzędowa pozostaje wysoce konserwatywna, to końce N- i C-terminalne wykazują dużą zmienność, co prawdopodobnie przekłada się na zróżnicowanie funkcji poszczególnych podtypów [45]. Oprócz zdolności do samoorganizacji, wiązki filamentów pośrednich są formowane i stabilizowane przez białka pomocnicze. Białka te nie tylko wspierają łączenie się filamentów pośrednich, lecz także umożliwiają ich współdziałanie z innymi elementami cytoszkieletu, niektóre z nich wiążą filamenty pośrednie z mikrofilamentami aktynowymi oraz mikrotubulami, tworząc zintegrowaną, połączoną sieć cytoszkieletową [46].



Rysunek 2.12: Filamenty pośrednie w komórkach

Filamenty pośrednie są najmniej sztywnymi spośród trzech głównych typów polimerów cytoszkieletowych, a jednocześnie wykazują dużą odporność na siły rozciągające, znacznie lepiej niż na siły ściskające. Mogą tworzyć sieci zarówno pomiędzy sobą, jak i z innymi elementami cytoszkieletu – mikrotubulami oraz filamentami aktynowymi – przy udziale białek pośredniczących, takich jak pektyny. W niektórych przypadkach organizacja sieci filamentów pośrednich opiera się głównie na interakcjach z mikrotubulami lub aktyną. Co więcej, wiele typów komórek syntetyzuje filamenty pośrednie jako odpowiedź na działające naprężenia mechaniczne, co podkreśla ich rolę w adaptacji strukturalnej komórki [33].

Filamenty pośrednie uczestniczą również w organizacji mikrotubul, wpływając tym samym na wiele procesów komórkowych, takich jak migracja, transport wewnątrzkomórkowy, ruchliwość komórki czy mechanotransdukcja. Ich funkcja rusztowania strukturalnego może w istotny sposób oddziaływać na zachowanie komórki [47]. Właściwości te podkreślają złożoność i wzajemne powiązania elementów cytoszkieletu, które utrudniają jednoznaczne przypisanie roli w przekazywaniu sygnałów mechanicznych wyłącznie pojedynczym jego składnikom.

2.4 Sygnały jako czynniki zewnętrzne wpływające na komórki kostne

Aktywność komórek kostnych podlega regulacji przez szereg czynników biochemicznych, fizycznych oraz mechanicznych obecnych zarówno w mikrośrodkowisku kości, jak i w całym organizmie. W warunkach homeostazy procesy resorpcji i formowania kości, realizowane odpowiednio przez osteoklasty i osteoblasty, pozostają w stanie dynamicznej równowagi. W efekcie cykl przebudowy kostnej przebiega bez istotnych zmian w objętości i masie tkanki kostnej, zachowując integralność strukturalną kości przy jednoczesnej odnowie jej mikroarchitektury [12]. Zaburzenia wykraczające poza zakres homeostazy prowadzą do rozchwiania tej równowagi, mogą skutkować przewagą resorpcji nad kościotworzeniem. Taki stan sprzyja progresywnej utracie masy kostnej i może stanowić podłoże rozwoju chorób układu kostnego o charakterze degeneracyjnym [19]. Na kości, tkankę kostną, a idąc dalej – osteocyty i cytoszkielet komórkowy wpływają:

- czynniki mechaniczne
 - siły mechaniczne (obciążenia), deformacje

- przepływ płynu w kanalikach kostnych
- sztywność podłoża
- chropowatość podłoża
- hormony
 - estrogen i androgen (hamują resorpcję)
 - PTH (stymuluje resorpcję - osteoklasty)
 - kortyzol (osłabia kości)
 - insulina (stymuluje osteoblasty)
 - czynniki molekularne (cytokiny)
 - interakcje międzykomórkowe, sygnalizacja lokalna, mechanotransdukcja
 - RANKL/OPG
 - integryny
 - czynniki wzrostu
 - czynniki metaboliczne
 - Wapń, fosfor, witamina D (mineralizacja kości)
 - Witamina K
 - leki, toksyny
 - starzenie

Brak aktywności fizycznej prowadzi do utraty masy kostnej oraz zwiększonego ryzyka złamań nie tylko w populacji osób starszych, lecz również wśród pacjentów unieruchomionych oraz młodzieży wykazującej ograniczoną aktywność ruchową. Zjawisko to staje się jednym z kluczowych wyzwań współczesnej opieki zdrowotnej na skalę globalną. Osteocyty, komórki zlokalizowane wewnątrz macierzy kostnej, odgrywają zasadniczą rolę w regulacji przebudowy kości – promują jej tworzenie w odpowiedzi na bodźce mechaniczne, a w ich braku inicjują procesy degradacyjne.

Pomimo postępu w badaniach, mechanizmy, za pośrednictwem których osteocyty wykrywają sygnały mechaniczne, pozostają nie w pełni poznane. Również spektrum cząsteczek sygnałowych syntetyzowanych przez osteocyty w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne jest jedynie częściowo zidentyfikowany. Ograniczone zrozumienie tych procesów znacząco utrudnia opracowanie skutecznych strategii zapobiegania utracie masy kostnej [16].

3 Przegląd modeli matematycznych

Istnieje wiele modeli matematycznych opracowanych w celu pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów przebudowy kości. Są one klasyfikowane przede wszystkim według rodzaju uwzględnianych czynników: biomechanicznych lub biochemicznych. Modele biomechaniczne koncentrują się na analizie wpływu morfologii tkanki kostnej, jej integralności strukturalnej oraz obciążeń mechanicznych, na procesy adaptacyjne i ewolucję struktury kostnej. Niektóre z nich uwzględniają również – w sposób uproszczony – dynamikę działania poszczególnych typów komórek kostnych, takich jak osteoblasty, osteoklasty czy osteocyty.

Z kolei modele biochemiczne skupiają się na szczegółowym odwzorowaniu procesów molekularnych i sygnałowych regulujących aktywność populacji komórek kostnych. Uwzględniają one interakcje pomiędzy kluczowymi mediatorami biochemicznymi (np. ligandami, cytokinami, czynnikami wzrostu) a komórkami układu kostnego, lecz często pomijają mechaniczne bodźce środowiskowe, które odgrywają istotną rolę w regulacji przebudowy.

W odpowiedzi na potrzebę integracji obu aspektów, rozwijana jest nowa kategoria tzw. modeli mechano-chemo-biologicznych, które łączą w sobie wystarczająco szczegółowe odwzorowanie zarówno procesów biomechanicznych, jak i biochemicznych. Modele te umożliwiają bardziej realistyczne odwzorowanie sprzężonych mechanizmów regulujących homeostazę i przebudowę tkanki kostnej na poziomie komórkowym i tkankowym [48].

3.1 Modele przebudowy kości

Modele przebudowy kości, czyli funkcjonalnej adaptacji, można podzielić na trzy podstawowe typy [49], [50], które zostaną przedstawione w niniejszym podrozdziale. Modele te formułowane są z makroskopowego punktu widzenia. Ponieważ jednak korzystnym w modelowaniu kości jest uwzględnienie zjawisk zachodzących na poziomie komórkowym, modele te zostaną przedstawione w sposób poglądowy.

3.1.1 Modele optymalizacyjne

Modele optymalizacyjne, czyli modele, w których punktem wyjścia jest założenie o optymalności struktury kości, co można porównać do zasady optymalności stosowanej w konstrukcjach inżynierskich. Kość można w tym podejściu traktować jako układ mechaniczny, który poddaje się optymalizacji minimalizując przyjęty funkcjonal jakości, za który najczęściej zakłada się globalną miarę podatności, przy nałożonym ograniczeniu na całkowitą masę kości lub odwrotnie przyjmując za funkcjonal jakości masę kości, a ograniczając podatność. W tym celu modyfikacji podlegają zmienne decyzyjne, czyli określone cechy geometryczne, strukturalne lub właściwości materiałowe. Wynik przeprowadzonej optymalizacji może przyjmować różne postacie: optymalnej geometrii, kształtu, a także przestrzennego rozkładu anizotropowych właściwości materiałowych. Analiza jest zazwyczaj prowadzona dla zadanego układu obciążeń zewnętrznych, chociaż w niektórych przypadkach uwzględnia się także kilka wariantów obciążeniowych, a otrzymane rozwiązanie stanowi wówczas uśredniony wynik, zbudowany z rozwiązań cząstkowych ważonych odpowiednimi współczynnikami [51], [52]. Jedna z hipotez o optymalnej reakcji kości zaproponowana przez Lekszyckiego [50] zakłada, że to szybkość reakcji tkanki jest optymalizowana. Istota tego podejścia polega na założeniu, że jeśli zostanie zdefiniowany odpowiedni funkcjonal jakości, który pozwala ocenić, która konfiguracja kości jest korzystniejsza, a która mniej optymalna, to reakcja tkanki powinna prowadzić do maksymalizacji szybkości zmian tego funkcjonu, wyrażonej jako jego pochodna względem czasu. W sytuacji, gdy zamiast funkcjonu jakości rozważamy funkcjonal kosztu (czyli im mniejsza jego wartość, tym lepszy układ), optymalna reakcja będzie dążyła do minimalizacji szybkości zmian tej wielkości [53].

Zaletą podejścia optymalizacyjnego jest możliwość wykorzystania rozwiniętych metod optymalizacji stosowanych w inżynierii konstrukcji, co ma duże znaczenie w kontekście złożoności zagadnienia. Analizowana struktura charakteryzuje się bowiem skomplikowaną geometrią, ogromną liczbą zmiennych decyzyjnych oraz dużymi rozmiarami modeli numerycznych, które rozwiązują się najczęściej przy użyciu metody elementów skończonych (MES). Otrzymywane wyniki w wielu przypadkach wykazują duże podobieństwo do struktur obserwowanych w naturze, co dodatkowo potwierdza trafność przyjętego podejścia.

Metoda optymalizacyjna stosowana do modelowania przebudowy tkanki kostnej stała się inspiracją do modelowania przebudowy cytoszkieletu osteocytów, który został zaproponowany w niniejszej pracy.

3.1.2 Modele fenomenologiczne

Najwcześniejszą i jedną z szerzej reprezentowanych grup stanowią modele fenomenologiczne. Umożliwiają one ilościowe powiązanie bodźca mechanicznego z adaptacyjną odpowiedzią tkanki kostnej. Kluczowym elementem tego podejścia jest właściwy wybór bodźca, gdyż w dużej mierze determinuje on charakter całego modelu. Modele fenomenologiczne opierają się na regułach obserwowanych w badaniach eksperymentalnych, które opisują zachowanie kości w zależności od wielkości bodźca mechanicznego. Z tego względu w literaturze na przestrzeni lat zaproponowano wiele koncepcji, które mają na celu uwzględnienie w modelu matematycznym faktu, że kość w określony sposób odbiera obciążenia mechaniczne i dostosowuje do nich swoją odpowiedź biologiczną. Jako bodziec wyzwalający przebudowę tkanki kostnej można traktować różnorodne wielkości mechaniczne, które odzwierciedlają stan obciążenia działającego na kość. Jedną z teorii, która zyskała duże uznanie była teoria mechanostatu Frosta, zgodnie z którą istnieją zakresy progowe odkształceń: poniżej dolnego progu dominuje resorpcja, w strefie równowagi remodelowanie przebiega w sposób utrzymujący stabilizację, natomiast powyżej górnego progu inicjowane jest tworzenie nowej tkanki [54]. W literaturze najczęściej wymienia się miary naprężeń i odkształceń, a także ich pochodne w czasie, czyli prędkość odkształceń [55]. Innym podejściem jest powiązanie bodźca z energią mechaniczną – zarówno całkowitą energią naprężeń, gęstością energii odkształceń, jak i jej szybkością zmian. W niektórych koncepcjach bodziec utożsamiano również z mikrouszkodzeniami akumulującymi się w tkance, z efektami piezoelektrycznymi wynikającymi z deformacji macierzy kostnej czy też ze zmianami rozpuszczalności hydroksyapatytu. Wreszcie, zaproponowano także hydrostatyczne ciśnienie płynu śródkostnego jako potencjalny czynnik sygnałowy [56]. Różnorodność proponowanych wielkości świadczy o tym, że mechanizm odbierania i odczytywania obciążeń przez komórki nie został dotychczas jednoznacznie wyjaśniony, a każdy z bodźców odzwierciedla jedynie pewien aspekt złożonej odpowiedzi adaptacyjnej kości.

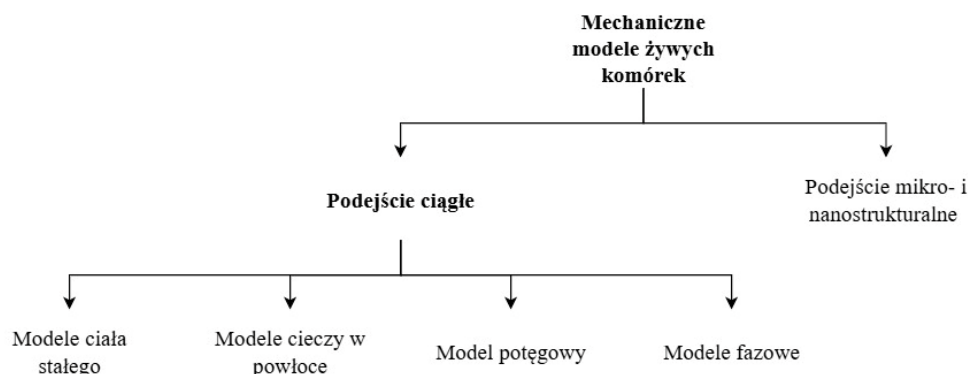
3.1.3 Modele mechanistyczne

Modele fenomenologiczne w wielu sytuacjach spełniają swoją funkcję, umożliwiając praktyczne odwzorowanie procesów przebudowy kości. Ich zasadniczym ograniczeniem jest jednak to, że nie pozwalają na głębsze wnioskowanie o biomechanicznej naturze adaptacji funkcjonalnej. Do analiz tego typu bardziej przydatne okazują się modele mechanistyczne, które wykraczają poza podejście fenomenologiczne i zamiast prostego powiązania „wejścia” z „wyjściem” badanego układu dążą do szczegółowego wyjaśnienia kolejnych etapów oraz mechanizmów biologicznych i chemicznych odpowiedzialnych za zmiany właściwości mechanicznych i architektury tkanki kostnej [49]. Mechanistyczne podejście do modelowania przebudowy koncentruje się na szczegółowym odwzorowaniu procesów biologicznych zachodzących w tkance kostnej. W takich modelach uwzględnia się rolę głównych typów komórek oraz ich wzajemne interakcje i regulację molekularną [29], [57]. Opisuje się tu m.in. funkcję szlaku RANK–RANKL–OPG, działanie sklerostyny czy udział mediatorów systemowych, takich jak hormony i cytokiny. Tego rodzaju modele są jednak wciąż nielicznie reprezentowane w literaturze, głównie ze względu na ograniczoną wiedzę o procesach biochemicznych uczestniczących w przebudowie kości i sterujących tymi procesami. Dlatego dostępne modele mechanistyczne, mimo że stanowią istotny krok naprzód w porównaniu z ujęciem fenomenologicznym, nadal pozostają znacznym uproszczeniem w zestawieniu ze złożonością obserwowaną w organizmach biologicznych.

3.2 Modele komórki

Ze względu na niewielkie rozmiary oraz niską sztywność komórek, działające na nie siły mechaniczne i związane z nimi odkształcenia zazwyczaj mieszczą się w zakresie pikoniutonów i nanometrów. Precyzyjne pomiary mechanicznych właściwości pojedynczych, żywych komórek stały się możliwe dopiero dzięki rozwojowi zaawansowanych technik mikroskopowych. Wśród najczęściej stosowanych metod znajdują się: pęsety optyczne i magnetyczne, mikroskopia sił atomowych (AFM) oraz zasysanie komórek przy użyciu mikropipety [58]. Pomimo znacznych postępów technologicznych, pomiary te często prowadzą do uśrednienia lokalnych różnic w strukturze komórki w tym ziarnistości, anizotropii, nieliniowych właściwości mechanicznych oraz przestrzennej niejednorodności. Stopień tego

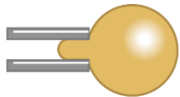
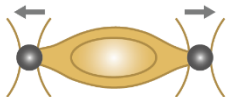
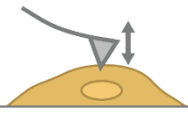
uśrednienia w dużej mierze zależy od zastosowanej metody badawczej i skali przestrzennej pomiaru.



Rysunek 3.1: Podział mechanicznych modeli żywych komórek na poziomie komórkowym

Istnieje wiele matematycznych ujęć opisujących zachowanie komórek, które można uporządkować według skali analizowanego zjawiska: poziomu wewnątrzkomórkowego, całej pojedynczej komórki oraz zespołów komórkowych. Modele traktujące komórkę jako podstawowy element analizy często przyjmują podejście fenomenologiczne, oparte na opisie ciągłym (rysunek 3.1).

Tabela 3.1: Techniki mechanicznego obciążania komórek i stosowane do nich modele matematyczne

Technika mechanicznego obciążania komórek	Model
 Zasysanie pojedynczych komórek przy użyciu mikropipety	- ciało stałe - kropla cieczy otoczona elastyczną błoną
 Pęseta optyczna	- Kropla cieczy otoczona elastyczną błoną
 Mikroskopia sił atomowych	- ciało stałe - zależność wykładnicza (power law) tłumienia strukturalnego (structural damping)
 Przepływy	- ciało stałe

Modele ciągłe (typu „continuum”) koncentrują się na odwzorowaniu uśrednionych właściwości mechanicznych komórek, pomijając szczegółowy opis molekularny. Wśród nich wyróżnia się dwa główne podejścia: jedno zakładające, że komórka zachowuje się jak ciało stałe, a drugie — że przypomina kroplę cieczy otoczoną sprężystą błoną. Dobór modelu matematycznego jest ściśle związany z zastosowaną techniką badawczą [59], jak zaprezentowano w tabeli 3.1.

3.2.1 Ciągłe modele komórki jako ciała stałego

Modele ciągłe komórki stanowią klasę modeli opracowaną w celu odwzorowania właściwości ciał stałych, jakie komórki wykazują podczas obciążania mechanicznego. Modele te szczególnie dobrze sprawdzają się w interpretacji wyników eksperymentów takich jak zasysanie komórek mikropipetą, badania mikroskopią sił atomowych i manipulacje magnetycznymi lub optycznymi pęsetami. W tym podejściu komórka jest traktowana jako izotropowa, nieściśliwa i ciągła półprzestrzeń [60] lub ciało stałe o skończonych wymiarach [61]. Komórka może być modelowana jako ośrodek jednorodny lub niejednorodny, w którym jądro komórkowe stanowi osobno zdefiniowany element, osadzony w cytoplazmie. Do tej grupy modeli zalicza się klasyczne podejścia liniowo sprężyste, bardziej złożone nieliniowe modele hipersprężyste (np. neo-Hooke'a), a także modele lepko-sprężyste, które uwzględniają parametr czasu [62], [63].

W przypadku modeli sprężystych, podstawową zależność stanowi prawo Hooke’a, które mówi, że naprężenia są proporcjonalne do odkształceń, a współczynnikiem proporcjonalności jest moduł Younga:

$$\tau_{ij} = G \gamma_{ij} \quad (1)$$

$$E = 2(1 + \nu)G \quad (2)$$

gdzie

τ_{ij} – naprężenia ścinające, G – moduł Kirchoffa, γ_{ij} – odkształcenia postaciowe,

E – moduł Younga, ν – współczynnik Poissona.

Korzystając z opisu materiału komórki, oraz wybierając konkretną technikę, na przykład zasysania komórki przy użyciu mikropipety, sformułowano model:

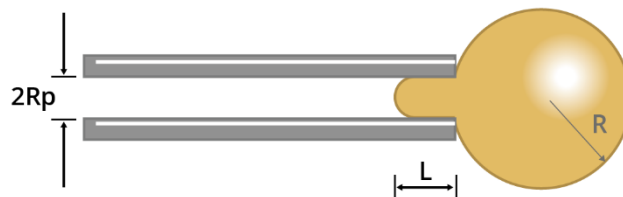
$$\frac{L}{R_p} = \frac{\Phi_p \Delta P}{2 \pi G} \quad (3)$$

gdzie (rysunek 3.2):

L – długość zassanej komórki do wnętrza mikropipety,

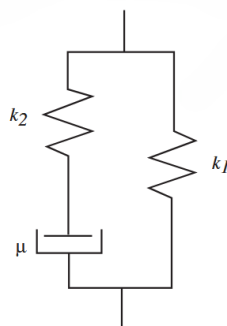
ΔP – ciśnienie zasysania komórki, R_p – promień mikropipety,

Φ_p – współczynnik stosunku grubości ścianki pipety do jej promienia.



Rysunek 3.2: Schemat techniki zasysania pojedynczych komórek przy użyciu mikropipety (MPA)

W modelach lepko-sprężystych, takich jak Maxwella czy Kelvina–Voigta, uwzględnia się także komponenty lepkie, co pozwala lepiej odwzorować zachowanie komórki uwzględniając zależne od czasu zjawiska pełzania i relaksacji. Dla układu przedstawionego na rysunku 3.3



Rysunek 3.3: Przyjęty model lepko-sprężysty komórki

sformułowano równanie konstytutywne:

$$\tau_{ij} + \frac{\mu}{k_2} \dot{\tau}_{ij} = k_1 \gamma_{ij} + \mu \left(1 + \frac{k_1}{k_2} \right) \dot{\gamma}_{ij} \quad (4)$$

gdzie funkcja pełzania $J(t)$ jest zdefiniowana następująco:

$$J(t) = \frac{1}{k_1} \left[1 - \frac{k_1}{k_1 + k_2} (1 - e^{-t/\tau}) \right] H(t), \quad (5)$$

Charakterystyczny czas pełzania τ :

$$\tau = \frac{\mu(k_1 + k_2)}{k_1 k_2} \quad (6)$$

gdzie

k_1, k_2 – stałe sprężyny, μ – lepkość, $\dot{\gamma}_{ij}$ – szybkość odkształcenia postaciowego,

$H(t)$ – funkcja Heaviside’a.

Dla tak opisanego materiału, model komórki w technice MPA formuluje się:

$$\frac{L(t)}{R_p} = \frac{\Phi_P \Delta P}{2 \pi k_1} \left[1 + \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} - 1 \right) e^{\frac{-t}{\tau}} \right] H(t) \quad (7)$$

Analizując obraz odkształconej komórki i zmiany jej kształtu w odpowiedzi na kontrolowane obciążenie, zarówno punktowe, jak i rozproszone oraz stosując odpowiedni model matematyczny, możliwe jest wyznaczenie takich parametrów materiałowych jak moduł Younga, moduł Kirchoffa, lepkość, sztywność lokalna czy podatność na deformację. Tego typu podejścia są szeroko stosowane w biomechanice komórkowej, szczególnie w kontekście różnicowania komórek, odpowiedzi na bodźce środowiskowe, patologii (np. nowotwory) oraz inżynierii tkankowej.

Zachowanie komórki w reakcji na obciążenia mechaniczne opisują między innymi modele ciągłe, które traktują cytoszkielet jako jednorodny ośrodek sprężysty lub lepkosprężysty, opisany przy użyciu równań konstytutywnych i równania pędu Cauchy’ego. W tym podejściu objętość (w przypadku 3D) lub powierzchnia (w przypadku 2D) komórki jest dzielona na jednostki obliczeniowe, a równania są rozwiązywane numeryczną metodą elementów skończonych przy określonych warunkach brzegowych. Na podstawie równań opisujących charakterystykę naprężeń i odkształceń można określić właściwości mechaniczne komórek w reakcji na przyłożone siły oraz porównać wyniki z obserwacjami odkształceń w badaniach eksperymentalnych.

Modele ciągłe są wykorzystywane także przy podejściu wielofazowym, w którym rozróżniane są fazy komórki opisywane przez różne równania konstytutywne naprężenie-odkształcenie, które składają się na obraz zachowania komórki. W takim podejściu można na przykład traktować cytoszkielet jako fazę stałą, cytoplazmę jako fazę płynną, ostatecznie otrzymując lepkosprężyste zachowanie komórki.

3.2.2 Ciągłe modele komórki jako cieczy w powłoce

Komórki zawieszone, takie jak neutrofile, leukocyty czy erytrocyty, ze względu na brak silnych adhezji do podłoża oraz dominację zjawisk powierzchniowych, często przyjmują morfologię zbliżoną do kuli i zachowują się reologicznie jak krople cieczy [64], [65]. Szczególnie dobrze widoczne jest to podczas eksperymentów z użyciem mikropipet – po przekroczeniu określonego progu różnicy ciśnień, komórki mogą zostać zassane do wnętrza pipety o średnicy mniejszej niż średnica spoczynkowa komórki. Po ustaniu przyłożonego ciśnienia, komórki te odzyskują swój pierwotny kulisty kształt, co wskazuje na dominujący wpływ napięcia powierzchniowego i braku trwałych deformacji plastycznych [58], [66].

W celu opisu tego typu zachowania opracowano modele kropli cieczy w powłoce (ang. *liquid-drop models*). Modele te traktują komórkę jako układ zbudowany z cienkiej, elastycznej powłoki otaczającej płynne wnętrze [62]. Model kropli newtonowskiej został opracowany do opisu leukocytów przeciskających się przez cienkie naczynia włosowate i zakładał wnętrze komórki jako ciecz newtonowską otoczoną warstwą korową – powłoką – modelowaną jako lepką ciecz o stałym napięciu powierzchniowym, gdzie stan naprężenia był uważany za niezależny od przemieszczenia [67]. Kropla newtonowska jest opisana równaniami:

$$\tau_{ij} = \mu \dot{\gamma}_{ij} \quad (8)$$

$$\tau_{ij} = \sigma_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \sigma_{kk} \quad (9)$$

$$\dot{\gamma}_{ij} = \frac{\partial v_i}{\partial x_j} + \frac{\partial v_j}{\partial x_i}, \quad (10)$$

gdzie:

μ – lepkość cytoplazmy, σ_{ij} – naprężenie, δ_{ij} – delta Kroneckera,

zaś powłoka o stałym napięciu powierzchniowym:

$$\frac{T_1 + T_2}{2} = T_0 + k V_a/2, \quad (11)$$

$$\frac{T_1 - T_2}{2} = \zeta V_s, \quad k = 3\zeta, \quad (12)$$

gdzie:

T_0 – napięcie powierzchniowe powłoki,

V_a, V_s – tempo dylatacji i ścinania w warstwie korowej,

k, ζ – współczynniki lepkości powierzchniowej.

W eksperymencie zasysania komórki mikropipetą krytyczne nadciśnienie ssące P_{kr} definiuje się jako wartość, w której wewnątrz pipety formuje się statyczna półkulista wypukłość, zgodnie z prawem Laplace'a można zapisać:

$$P_{kr} = 2T_0 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R} \right) \quad (13)$$

gdzie:

R – promień komórki (rysunek 3.2).

Zaproponowano także równanie opisujące przepływ komórki po chwili utworzenia się statycznej półkulistej wypukłości komórki w mikropipecie:

$$\frac{\mu \left(\frac{\dot{L}}{R_p} \right)}{\Delta P - P_{kr}} = f \left(\frac{R_p}{R}, \tilde{\zeta} \right) \quad (14)$$

gdzie:

$\tilde{\zeta}$ – stosunek strat energetycznych w błonie komórkowej do strat w cytoplazmie, na przykład $\tilde{\zeta} = \zeta / \mu R$.

Zależnie od złożoności zjawiska, stosuje się też bardziej rozbudowane modele, od złożonego modelu kropli cieczy newtonowskiej, które uwzględniają jądro komórkowe poprzez dodanie wewnętrznego komponentu o większej lepkości [68], po modele cieczy rozrzedzanej ścinaniem (ang. *shear-thinning*) jak w równaniach:

$$\eta = \eta_c \left(\frac{\dot{\gamma}_m}{\dot{\gamma}_c} \right)^{-\beta} \quad (15)$$

$$\dot{\gamma}_p = \sqrt{\frac{1}{2} \dot{\gamma}_{ij} \dot{\gamma}_{ij}} \quad (16)$$

$$\tau = \eta_c (\dot{\gamma}_m)^{-\beta} \dot{\gamma} \quad (17)$$

dla prostego ścinania:

$$\tau = \eta_c (\dot{\gamma})^{1-\beta} \quad (18)$$

gdzie:

η – chwilowa lepkość, η_c – lepkość charakterystyczna,

$\dot{\gamma}_m$ – średnia szybkość ścinania, $\dot{\gamma}_c$ – charakterystyczna szybkość ścinania,

β – stała potęgowania,

czy model cieczy lepkosprężystej Maxwella [59]:

$$\tau_{ij} + \frac{\mu}{k} \dot{\tau}_{ij} = \mu \dot{\gamma}_{ij} \quad (19)$$

Modele te pozwalają lepiej oddać rzeczywiste właściwości reologiczne zawieszonych komórek, w których obserwuje się efekty zależne od czasu, prędkości odkształcenia i geometrii.

Te modele dotyczą komórek nieadherentnych, czyli przede wszystkim komórek zawieszonych w płynach, takich jak komórki krwi.

3.2.3 Model potęgowy

W klasycznych ujęciach reologicznych, takich jak model newtonowski, Maxwella czy liniowo sprężysty, odpowiedź komórki na obciążenia opisywana jest za pomocą skończonej liczby parametrów i charakterystycznych czasów relaksacji. Jednak, jak wykazano w badaniach dynamicznych (m.in. przy użyciu mikroskopii sił atomowych – AFM) rzeczywista odpowiedź komórek nie mieści się w ramach tych uproszczonych modeli.

Wyniki licznych badań mikroreologicznych prowadzonych dla różnych typów komórek wskazują na występowanie zbliżonego rodzaju odpowiedzi mechanicznej. Zaobserwowano prostą zależność, określaną mianem prawa potęgowego, opisującą sposób odkształcania się komórek w funkcji czasu pod wpływem stałego lub oscylacyjnego naprężenia mechanicznego [69]. To zachowanie przypomina materiały typu *soft glass*, takich jak zawiesiny i pianki.

Od początku XXI wieku popularnością w biologii komórki cieszy się model reologiczny typu *Soft Glassy Rheology* (SGR), znany również jako model tłumienia strukturalnego o rozkładzie potęgowym (ang. *power-law damping*). Jego popularność wynika z wyjątkowej zdolności do odwzorowywania nieliniowych, zależnych od czasu reakcji mechanicznych, które obserwuje się w żywych komórkach. W oparciu o teorię SGR opracowano podejście fenomenologiczne, które pozwala opisać dynamiczne właściwości komórek poddanych zmiennym w czasie siłom zewnętrznym. Propozycję modelu potęgowego w formie zespolonej opisującego zachowanie komórki przedstawiają równania [70]:

$$G^*(\omega) = G' + iG'' \quad (20)$$

$$G(\omega) = \frac{(1 - \nu) \tan \psi}{3d_0} \frac{A_F}{A_d} e^{i\phi} - i\omega b(0) \quad (21)$$

gdzie:

G' - dynamiczny moduł pamięci, G'' - dynamiczny moduł strat,

ω – częstotliwość, A_F, A_d – amplitudy siły i przemieszczenia, ϕ – przesunięcie fazowe,

b – współczynnik związany z tarcie w metodzie eksperymentalnej mikroskopii sił atomowych.

Zarówno moduł pamięci G' , jak i moduł strat G'' rośnie wraz z częstotliwością zgodnie z prawem potęgowym w szerokim zakresie ($10^{-2} - 10^3$ Hz), co opisuje równanie $G^*(\omega) \sim (i\omega)^\alpha$, gdzie α przyjmuje wartości od 0,1 do 0,4 [59]. Taka „słaba zależność potęgowa” świadczy o tym, że cytoszkieleł komórki nie zachowuje się jak prosta kombinacja sprężyn i tłumików, lecz jak złożona sieć polimerowa o rozproszonych czasach relaksacji. Im mniejsza wartość α , tym bardziej sprężyste zachowanie komórki, natomiast większe wartości wskazują na dominację komponenty lepkiej. Z tego względu modele potęgowe uznaje się za szczególnie przydatne do opisu odpowiedzi dynamicznych komórek w warunkach fizjologicznych, w których poddane są one cyklicznym obciążeniom o różnych częstotliwościach

W ujęciu potęgowym przyjmuje się, że mikrostruktura komórki, głównie elementy cytoszkieletu, tworzy układ energetycznych „studni potencjału”, wynikających z oddziaływań między sąsiednimi składnikami. Ze względu na ograniczony dostęp do energii cieplnej, struktury te nie reorganizują się swobodnie, przez co cząstki pozostają uwięzione w lokalnych minimach energetycznych. Zmiana struktury następuje pod wpływem naprężeń mechanicznych, dostarczających energii niezbędnej do „ucieczki” z tych potencjałów, proces ten zachodzi z rozciągniętym w czasie procesem relaksacji [71]. Zjawiska typu potęgowego zostały później wyjaśnione w kontekście tzw. lepkości ułamkowej (ang. *fractional viscoelasticity*), co umożliwia bardziej adekwatne modelowanie odpowiedzi mechanicznej komórek niż klasyczne podejścia lepkosprężyste. W modelach potęgowych sugeruje się także, że cytoszkieleł może być zorganizowany jako sieć bezskalowa (ang. *scale-free network*). Tego typu struktury charakteryzują się brakiem charakterystycznej liczby połączeń przypadających na jeden element, co skutkuje ciągłym widmem czasów relaksacji, w przeciwieństwie do

widma dyskretnego, typowego dla klasycznych modeli lepko-sprężystych zbudowanych z elementów typu sprężyna i tłumik [72]. Taka struktura umożliwia bardzo szeroki zakres reakcji mechanicznych i dynamicznych, co może tłumaczyć elastyczność adaptacyjną komórek w środowiskach biologicznych. Co więcej, wykazano, że właściwości dynamiczne komórek adherentnych, takie jak moduły sprężystości i lepkości, wykazują ścisły związek z poziomem wewnątrzkomórkowego napięcia generowanego przez cytoszkielet. Innymi słowy, im większe siły kurczliwe wewnątrz komórki, tym wyższe wartości tych parametrów mechanicznych [73].

3.2.4 Model dwufazowy

W przeciwieństwie do wcześniej omawianych modeli ciągłych, które traktowały cytoplazmę jako jednorodny ośrodek jednofazowy – o właściwościach stałych lub płynnych – model dwufazowy zakłada, że cytoplazma stanowi układ złożony z dwóch współistniejących faz: stałej (zwykle utożsamianej z rusztowaniem cytoszkieletowym) oraz ciekłej (odpowiadającej cytozolowi). Model ciągły mieszanin, któremu początki przypisuje się Truesdellowi, został po raz pierwszy zaadaptowany do badań biomechanicznych tkanek biologicznych – w tym chrząstki stawowej – poprzez implementację liniowej teorii dwufazowej [74]. W ujęciu teorii ciągłej mieszanin faza stała cytoplazmy opisywana jest jako materiał liniowo sprężysty, natomiast faza płynna traktowana jest jako idealny, nielepki płyn, gdzie faza ciekła może dyfundować przez fazę stałą [75]:

$$\boldsymbol{\sigma} = \boldsymbol{\sigma}^s - p\mathbf{I} \quad (22)$$

$$\nabla \cdot (k\nabla p) = \frac{\partial \varepsilon_v}{\partial t} \quad (23)$$

gdzie:

$\boldsymbol{\sigma}^s$ – tensor naprężenia w fazie stałej (cytoszkiecie), p – ciśnienie płynu, $\mathbf{I}$ – tensor jednostkowy, k – współczynnik przepuszczalności, ε_v – odkształcenia objętościowe.

Dwufazowe właściwości pojedynczych komórek kostnych i chrząstki wykorzystuje się do charakteryzowania dynamicznego środowiska macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), w którym funkcjonują chondrocyty. Stanowi to istotny etap w badaniach mechanotransdukcji chondrocytów oraz mechanobiologii chrząstki [76]. Modele są również rozwijane w postaci wielofazowe.

3.2.5 Podsumowanie modeli na poziomie komórkowym

Modele ciągłe w skali komórkowej były szeroko wykorzystywane zarówno do symulacji zachowania całych komórek, jak i w badaniach eksperymentalnych nad właściwościami mechanicznymi materiału komórkowego. Wybór konkretnego modelu zależy od analizowanych warunków i interesujących zjawisk. Mimo szerokiego zastosowania, podejścia te mają istotne ograniczenia. Koncentrują się one przede wszystkim na makroskopowych właściwościach i dynamice komórki, pomijając mikrostrukturę oraz zachowania poszczególnych elementów cytoszkieletu. Aproksymacja na poziomie continuum nie uwzględnia m.in. efektów sieciowania włókien aktynowych, fluktuacji termicznych czy procesów polimeryzacji i depolimeryzacji. W konsekwencji interpretacja oddziaływań molekularnych w tym ujęciu jest niemożliwa. Co więcej, modele makroskopowe nie pozwalają na wyjaśnienie zjawiska wstępnego naprężenia obserwowanego w sieci cytoszkieletu [77]. Dokładniejszą analizę właściwości oraz zachowania komórki z perspektywy mikrostrukturalnej umożliwiają natomiast modele cytoszkieletu. Podejścia te pozwalają uwzględnić mechanizmy zachodzące na poziomie dynamiki cytoszkieletu, a także poszczególnych filamentów i ich połączeń, co sprzyja lepszemu zrozumieniu zjawisk pomijanych w ujęciu makroskopowym.

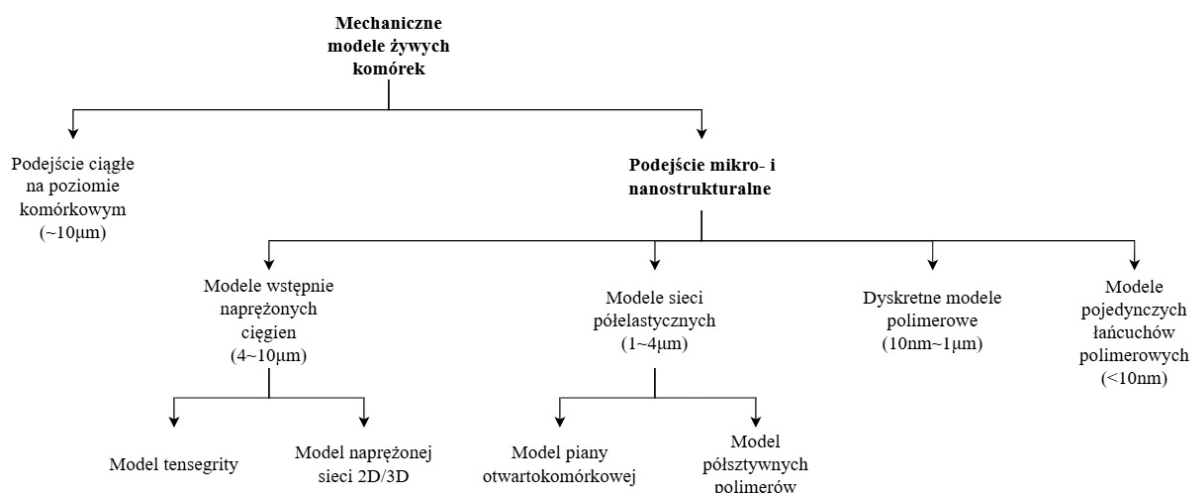
3.3 Modele cytoszkieletu

Cytoszkielet stanowi podstawową strukturę wewnętrzną komórki, zapewniając jej integralność strukturalną. W związku z tym, jego właściwości reologiczne i mechaniczne odgrywają kluczową rolę w zdolności komórki do realizacji różnorodnych funkcji zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Pomimo powszechnie uznanej roli cytoszkieletu, zależność pomiędzy jego mikrostrukturą a makroskopowym zachowaniem reologicznym pozostaje nie do końca wyjaśniona. W ciągu ostatnich dwóch dekad zaproponowano szereg modeli obliczeniowych i fenomenologicznych, jak również technik eksperymentalnych, mających na celu opis cytoszkieletu, co doprowadziło do powstania wielu, często sprzecznych teorii [78]. Pomimo licznych podejść mających na celu modelowanie relacji pomiędzy architekturą cytoszkieletu a jego właściwościami reologicznymi i odpowiedzią mechaniczną, złożoność jego struktury oraz heterogeniczność składowych uniemożliwiły opracowanie

uniwersalnego modelu zdolnego do wiernego odwzorowania pełnego spektrum jego zachowań [79].

Główną wadą modeli ciągłych, jest brak możliwości opisu mikrostruktury wewnątrzkomórkowej, przez co opisują one właściwości komórki w sposób przybliżony. Na ten problem odpowiadają modele dyskretne rozróżniające elementy strukturalne komórki. W tego rodzaju modelach wyodrębnia się opisy naprężeń i odkształceń poszczególnych składowych komórki, co pozwala na rekonstrukcję zachowania całej komórki w oparciu o właściwości i dynamikę jej cytoszkieletu. Dzięki temu możliwe jest uchwycenie zależności pomiędzy lokalnymi procesami mechanicznymi zachodzącymi w obrębie filamentów a globalną odpowiedzią komórki na działanie bodźców zewnętrznych.

Jedną z takich metod jest przybliżenie cytoszkieletu do siatki wstępnie naprężonych cięgien, czyli siatki liniowo-sprężystych sprężyn umocowanych na granicy komórki, czyli macierzy zewnątrzkomórkowej. Innym podejściem jest model tensegrity, gdzie wyróżnione są cięgna odpowiadające wstępnie naprężonym elementom przenoszącym, czyli filamentom aktynowym, równoważonym przez lokalnie ściśnięte jednostki odpowiadające mikrotubulom. Ta samostabilizująca się sieć podlega równowadze mechanicznej i odkształceniom geometrycznym, które zależą od rozmieszczenia ich elementów.



Rysunek 3.4: Podział mechanicznych modeli żywych komórek na poziomie strukturalnym

W innych podejściach zakłada się, że badania na poziomie cząsteczkowym pozwalają uznać, iż składowe biopolimery cytoszkieletu zachowują się jak polimery półelastyczne i przyczyniają się do elastyczności cytoszkieletu. Proponuje się więc modele bazujące na strukturze półelastycznej siatki polimerowej. Kolejne koncepcje traktują sieć cytoszkieletu jako

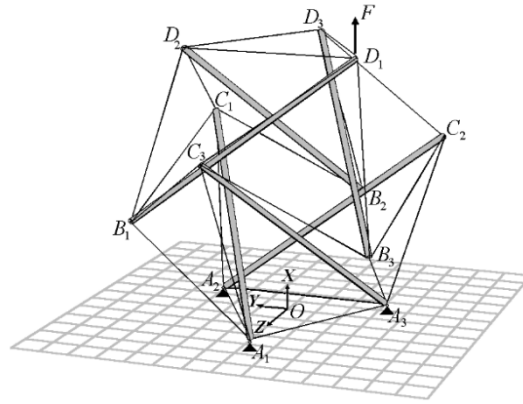
składającą się z nitek o charakterystyce gumy w mechanice ciągłej i bazującą na zależności siła-wydłużenie. Pojawia się też cała klasa modeli opierających się na różnych strukturach polimerów tworzących siatki cytoszkieletu. Typologię modeli strukturalnych przedstawia rysunek 3.4.

3.3.1 Model tensegrity

Model tensegrity (nazwa powstała z połączenia słów ang. *tension* – naprężenie wynikające z rozciągania oraz *integrity* – integralność) opiera się na koncepcji konstrukcji znanej jako architektura tensegrity opracowanej przez Richarda Fullera, Kennetha Snelsona oraz Davida Georgesa Emmericha, w której stabilność struktury wynika z wzajemnego równoważenia elementów poddawanych rozciąganiu i ściskaniu. W ujęciu komórkowego modelu tensegrity zakłada się, że sieć cytoszkieletu utrzymuje wstępne naprężenie rozciągające (ang. *prestress*), które odgrywa kluczową rolę w zachowaniu stabilności kształtu komórki [80]. Naprężenie to jest częściowo kompensowane przez siły generowane w punktach adhezji komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej, a częściowo przez wewnętrzne elementy cytoszkieletu zdolne do przenoszenia obciążeń ściskających, takie jak mikrotubule. Źródłem wstępnych naprężeń w cytoszkiecie jest aktywna kurczliwość komórki, natomiast dodatkowe naprężenie powstaje pasywnie w wyniku mechanicznego rozciągania komórki poprzez jej zakotwiczenie w podłożu, wskutek ciśnienia osmotycznego cytoplazmy (turgoru) oraz sił generowanych w procesie polimeryzacji filamentów. Głównym nośnikiem tego naprężenia jest sieć filamentów aktynowych, wspierana w mniejszym stopniu przez filamety pośrednie [80]. W warunkach izolowanych mikrotubule mają postać prostych struktur, podczas gdy mikrofilamenty oraz filamety pośrednie są wygięte lub splątane. W obrębie komórki mikrofilamenty zazwyczaj przyjmują formę prostą, filamety pośrednie wykazują falisty przebieg, natomiast mikrotubule są wówczas wygięte [4]. W konfiguracji nieodkształconej struktura tensegrity tworzy samorównowążący się układ, który może stanowić model naprężonego cytoszkieletu komórek swobodnie zawieszonych lub przylegających do podłoża. Po dodaniu obciążeń zewnętrznych umożliwia ona odwzorowanie istotnych zmian morfologii komórki, wynikających zarówno z dużych deformacji strukturalnych, jak i z przebudowy sieci cytoszkieletu [81], [82].

Podstawowy model tensegrity był strukturą oktahedryczną (ośmiościenną) zbudowaną z sześciu quasi-sztywnych elementów rozpięających i dwudziestu czterech

liniowosprężystych cięgien (ang. *cables*), która mogła być zawieszona lub zamocowana jak na rysunku 3.5.



Rysunek 3.5: Oktahedryczny model tensegrity, źródło [83]

Dla modelu o tej samej geometrii i przyjęciu, że ciała zachowują się jak materiał lepkosprężysty Voigta i poddaniu go próbom pełzania przy niewielkich siłach jednoosiowego rozciągania, opis modelu opisującego jego zachowanie przyjmuje postać układu równań różniczkowych:

$$\mathbf{F} = \mathbf{K}\mathbf{u} + \mathbf{C}\dot{\mathbf{u}} \quad (24)$$

gdzie:

$\mathbf{F}$ jest siłą zewnętrzną powiązaną z przemieszczeniami węzłowymi $\mathbf{u}$ i ich prędkością,

$\mathbf{K}$ oznacza macierz sztywności, $\mathbf{C}$ – macierz tłumienia.

Przy założeniu małych odkształceń, równanie (24) rozwiązano z wykorzystaniem liniowej metody przyrostowej, która polega na obliczaniu przemieszczeń węzłowych w funkcji przyrostu czasu dt . W tym ujęciu wektor przyrostowych przemieszczeń $d\mathbf{u}_i$ opisano równaniem:

$$d\mathbf{u}_i = [\mathbf{I}_d - e^{-[\mathbf{C}_{i+1}]^{-1}[\mathbf{K}_{i+1}]dt}][\mathbf{K}_{i+1}]^{-1}d\mathbf{F}_i \quad (25)$$

gdzie:

$\mathbf{I}_d$ – macierz jednostkowa.

Przyjęto, że w chwili początkowej ($t = 0$) przemieszczenia węzłowe są równe zeru, wyznaczono stałą czasową ζ_t oraz pozorny moduł sprężystości E_t całego modelu tensegrity. Moduł lepkości obliczono na podstawie zależności:

$$\eta_t = \zeta_t \cdot E_t \quad (26)$$

Tak sformułowany model umożliwia określenie parametrów lepkosprężystych na drodze analizy czasowej odpowiedzi struktury tensegrity [81].

Wiele badań przeprowadzonych przy użyciu tego oktahedrycznego modelu tensegrity uzyskało dobrą zgodność z obserwacjami żywych komórek, w tym zjawiska usztywnienia komórek w wyniku zwiększenia początkowej siły komórkowej lub odkształcenia oraz generowania dużych sił trakcyjnych działających na macierz zewnątrzkomórkową wskutek przerwania mikrotubuli [84]. Model tensegrity posłużył również do analizy innych właściwości mechanicznych cytoszkieletu, takich jak elastyczność, transmisja siły, lepkosprężystość czy zdolność absorpcji energii. Rozwijając ten model, w celu zbadania lepkosprężystych właściwości cytoszkieletu, przyjęto założenie, że elementy ciągnowe zachowują się jak ciała lepkosprężyste typu Voigta (sprężyna połączona równolegle z elementem tłumiącym) zamiast jak klasyczne elementy liniowo sprężyste [81], [82]. Rozwinęło się wiele wariantów tej metody, od zmian materiałowych włókien napinających i rozciągających, przez zmianę geometrii, po uzupełnienie o inne elementy strukturalne komórki, takie jak błona komórkowa [83], [85], [86], [87], [88].

3.3.2 Model naprężonej sieci

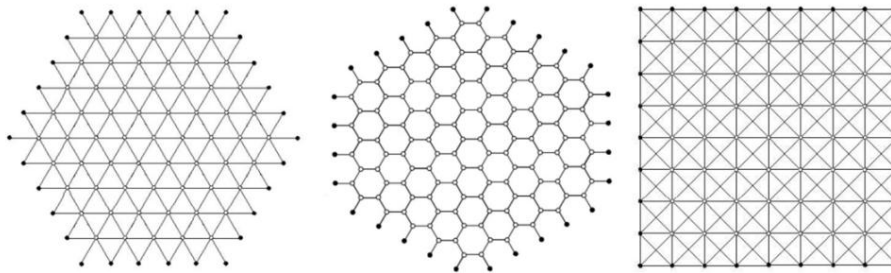
Modele wstępnie naprężonej sieci cięgien opisują układ zbudowany wyłącznie z elementów ciągnowych pracujących na rozciąganie modelowanych jako sprężyny liniowo sprężyste, bez uwzględnienia równoważących je sił ściskających wytwarzanych przez mikrotubule. W tym ujęciu wstępne naprężenie jest utrzymywane i stabilizowane przez macierz zewnątrzkomórkową. Model przewiduje liniową zależność pomiędzy sztywnością a naprężeniem przy stałym napięciu cięgien, natomiast w przypadku jego zmienności zależność ta staje się nieliniowa [73], [89]. W tej klasie modeli przyjmuje się, zgodnie z wieloma badaniami, że kształt komórek adherentnych oraz ich reakcja na siły generowane wewnętrznie i zewnętrznie pozostają przede wszystkim w ścisłym związku z organizacją cytoszkieletu aktywnego (CSK) oraz jego połączeniami transbłonowymi z macierzą zewnątrzkomórkową [90], [91]. Tego rodzaju modele znajdują zastosowanie w analizie procesów

mechanotransdukcji oraz w badaniach reakcji komórki na bodźce mechaniczne w obrębie warstwy korowej komórki, między innymi w kontekście zjawisk związanych z ogniskami adhezji.

Charakterystycznym parametrem geometrycznym modeli jest długość cięgna, określająca mikrostrukturę sieci. Wstępna siła rozciągająca jest zwykle przyjmowana jako równa sile generowanej przez pojedynczą jednostkę aktynomiozynową, związanej z hydrolizą ATP, której wartość mieści się w przedziale 0,2–6 pN [80], [92], [93], [94]. Modele obejmują różne rodzaje płaskiej sieci o zróżnicowanych układach geometrycznych. Stosuje się układy o regularnej topologii będącej planarną siecią sześciokątów, trójkątów równobocznych lub wzmocnionych kwadratów (rysunek 3.6). Dla sieci heksagonalnej można uzależnić pole powierzchni S od liczby N wpisanych w sześciokąty okręgów (liczba pierścieni heksagonów) i początkowej długości cięgna l_0 :

$$S = \frac{\sqrt{3}}{2}(1 + 3N)^2 l_0^2 \quad (27)$$

Wzrost stopnia usztywnienia uzyskuje się poprzez zwiększenie liczby cięgien przyłączonych do pojedynczego węzła przegubowego, jak w strukturze wzmocnionych kwadratów w porównaniu do układów o regularnym rozmieszczeniu sześciokątów czy trójkątów równobocznych. Oprócz jednorodnych sieci istnieją także modele z topologią losową [84], [89], [95].



Rysunek 3.6: Przykładowe geometrie w modelu naprężonej sieci, źródło [84]

Parametry geometryczne i właściwości sprężyste elementów są zazwyczaj określone na podstawie danych literaturowych. Siłę F w pojedynczym cięgnię można zapisać korzystając z prawa Hooke’a:

$$F = \begin{cases} E_c A_c \left(\frac{l}{l_r} - 1 \right) & \text{dla } l > l_r \\ 0 & \text{dla } l \leq l_r \end{cases} \quad (28)$$

gdzie

E_C – moduł Younga filamentu aktynowego, A_C – pole przekroju poprzecznego filamentu,

l – aktualna (odkształcona) długość cięgna, l_r – spoczynkowa długość cięgna.

Można zapisać równowagę dla węzła, w tym przypadku w kierunku osi x, dla osi y i z będą to równania analogiczne:

$$\sum_{i=1}^{n_c} \frac{F_i(x_i - x_0)}{L_i} = 0 \quad (29)$$

gdzie:

x_0, y_0, z_0 – współrzędne danego węzła, x_i, y_i, z_i – współrzędne sąsiednich węzłów,

F_i – siła w cięgnię łączącym więzy, L_i – długość cięgien między węzłami,

n_c – liczba cięgien przyłączonych do węzła ($n_c=3$ dla sieci heksagonalnej).

Sieci te poddaje się deformacjom odpowiadającym warunkom stosowanym w eksperymentach mechanicznych na komórkach adherentnych, takich jak punktowe obciążanie komórek (ang. *cell poking* CP), cytometria skręcania magnetycznego (ang. *magnetic twisting cytometry*, MTC) czy mikroreometria magnetyczna z użyciem mikrokulek (ang. *magnetic bead microrheometry*, MBM). Dla pierwszej z wymienionych metod równanie równowagi przyjmie postać:

$$W + \sum_{i=1}^C \frac{F_i(z_i - u)}{l_i} = 0 \quad (30)$$

gdzie:

W – siła wgniatania stempla, F_i – siła w cięgnię przecinającym linię stempla,

x_i, y_i, u – punkt kontaktu cięgna ze stemplem, u – głębokość wgniatania stempla,

C – ilość cięgien przecinających linię stempla,

l_i – długość odcinka od węzła do punktu kontaktu ze stemplem.

Dla każdej z technik obciążania komórek równanie równowagi będzie wyglądało inaczej.

Mimo swoich zalet, podejście to ma pewne ograniczenia. Jednym z nich jest dwuwymiarowy charakter modelu. Nie pozwala to na uwzględnienie pełnej złożoności trójwymiarowej struktury cytoszkieletu, przez co model nie nadaje się do analizy procesów wymagających

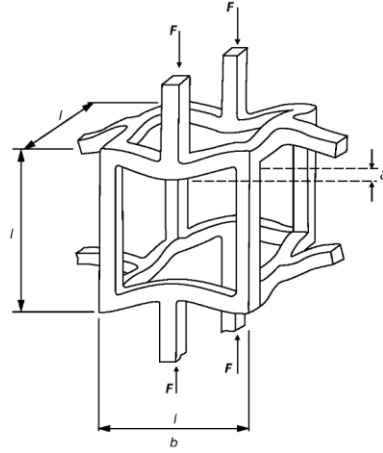
odzworowania zachowania innych komponentów cytoszkieletu poza korową siecią aktynową. Niemniej jednak, dzięki prostocie i możliwości odzwierciedlenia podstawowych mechanizmów przenoszenia naprężeń, modele te pozostają użytecznym narzędziem do badania wybranych aspektów mechaniki komórek adherentnych.

Zaproponowano również podejście trójwymiarowe, czyli trójwymiarową, wstępnie naprężoną sieć cięgien, mającą na celu wyjaśnienie mechanizmów kształtowania naprężeń związanych z procesami rozprzestrzeniania się i migracji komórek. Właściwości materiałowe elementów ciągnowych oraz węzłów są w tym modelu analogiczne do tych stosowanych w dwuwymiarowych sieciach cięgien. Oprócz standardowych połączeń przegubowych, w modelu tym dopuszcza się również istnienie połączeń o charakterze nieusieciowanym. Podstawowym ograniczeniem tego podejścia jest jednak fakt, że uwzględnia ono wyłącznie elementy cytoszkieletu przenoszące obciążenia rozciągające. Tymczasem mikrotubule, będące elementami ściskanyymi struktury wewnątrzkomórkowej, odgrywają istotną rolę w kształtowaniu odpowiedzi mechanicznej komórek. Liczne badania wykazały, że mikrotubule zwiększają efektywność transmisji sił wewnątrz komórki oraz przyczyniają się do zachowania jej stabilności strukturalnej. Postuluje się, że własności mechaniczne komórki są regulowane przez równowagę między napięciem we włóknach aktynowych zrównoważonym przez ściskanie na mikrotubulach [96]. Z tego powodu to model tensegrity zyskał większą popularność.

3.3.3 Model piany otwartokomórkowej (open-cell foam)

Model piany otwartokomórkowej (ang. *open-cell foam model*), zaproponowany pierwotnie przez Gibsona i Ashby'ego, został opracowany w celu analizy właściwości mechanicznych trójwymiarowych pian stosowanych w lekkich konstrukcjach nośnych [97]. Istota tej koncepcji polega na przedstawieniu materiału o nieregularnej, porowatej strukturze jako sieci trójwymiarowych jednostek połączonych w układzie wieloskalowym. Pojedyncza jednostka jest zbudowana z elementów belkowych i służy do szacowania właściwości mechanicznych rzeczywistych pian na podstawie odpowiednich współczynników eksperymentalnych. Najprostszym i najczęściej stosowanym wariantem jest sześcienna struktura piany o otwartych komórkach [98], jak przedstawiono na rysunku 3.7, jednak w celu odzwierciedlenia większej złożoności strukturalnej stosowano również modele o geometrii różnych wielościanów [99].

W modelu piany otwartokomórkowej przyjmuje się, że węzły łączące elementy belkowe są sztywne, a dominującym mechanizmem deformacji całej struktury jest zginanie elementów nośnych.



Rysunek 3.7: Model piany otwartokomórkowej, źródło [100]

W tej koncepcji rozważany jest wyłącznie układ filamentów aktynowych i na tej podstawie wysnuwany jest opis mechanicznego zachowania komórki. Geometria jest opisywana długością l komórki oraz jej promieniem a , moduł Younga E opisuje materiał odpowiadający filamentom aktynowym. Globalna deformacja otwartej komórki jednostkowej poddanej jednoosiowemu ścisnaniu siłą F wynika z ugięcia δ jej elementów składowych. Na tej podstawie jest definiowany równoważny moduł sprężystości E^* ze stosunku naprężenia $\sigma = F/l^2$ do odkształcenia $\varepsilon = \delta/l$:

$$E^* = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\pi}{4} E (L^*)^{-4} \quad (31)$$

gdzie:

$L^* = l/a$ i jest znormalizowaną długością charakterystyczną komórki.

Aby określić lepkość tego modelu, przyjęto, że pręty modelu wykazują właściwości lepkosprężyste zgodnie z modelem Voigta. W próbach pełzania do komórki jednostkowej przykładano stałe naprężenie σ , a odkształcenie ε opisano w funkcji czasu t .

$$\varepsilon(t) = \frac{\sigma}{C_1 \left(\frac{\rho^*}{\rho}\right)^2 E} \left(1 - e^{\frac{-Et}{\eta}} \right) \quad (32)$$

gdzie:

η_u – lepkość prętów, C_1 – stała strukturalna, przyjmowana jako 1,

$\frac{\rho^*}{\rho}$ – stosunek gęstości całej komórki do gęstości pręta.

Na tej podstawie wyznaczono stałą czasową τ oraz lepkość η modelu otwartokomórkowego [100].

$$\tau_u \equiv \frac{\eta_u}{E^*} = \frac{\eta}{E} \quad (33)$$

Obserwacje przy użyciu mikroskopu stereoskopowego ujawniły znaczące podobieństwo przestrzennej organizacji cytoszkieletu aktynowego do struktur piany [101], co skłoniło część badaczy do traktowania filamentów aktynowych jako elementów belkowych i odwzorowywania trójwymiarowej sieci cytoszkieletu w postaci uproszczonej piany sześcienniej [100]. W tym ujęciu właściwości mechaniczne, w tym moduł Younga, wyznacza się na podstawie geometrii komórki piany i właściwości materiałowych jej elementów.

3.3.4 Model ziarnisty

Model ziarnisty (ang. *granular model*), obejmujący dużą liczbę elementów ziarnistych, został opracowany w celu symulacji procesu przebudowywania się cytoszkieletu. W przeciwieństwie do wcześniej opisanych podejść, powstał on w oparciu o założenie dynamicznej polimeryzacji mikrotubul. Komórkę odwzorowano jako ośrodek ziarnisty, zbudowany ze sztywnych sfer (ziaren). Struktura modelu obejmuje trzy typy ziaren, reprezentujących odpowiednio jądro komórkowe, cytoplazmę oraz błonę zewnętrzną. Centralne, największe ziarno odpowiada jądro, natomiast dwa ziarna położone obok niego pełnią rolę centrosomów, z których rozwijają się mikrotubule. Wewnętrzne, wielowarstwowe ziarna odwzorowują połączenia pomiędzy filamentami aktynowymi a mikrotubulami, natomiast ziarna obwodowe reprezentują błonę komórkową; część z nich losowo przypisuje się do pełnienia funkcji receptorów adhezyjnych (integryn). Proces adhezji jest symulowany poprzez wzrost mikrotubul z centrosomu w kierunku receptorów adhezyjnych. W trakcie symulacji, w każdym kroku czasowym, wyznacza się najkrótszą ścieżkę między centrosomem a integryną położoną najbliżej macierzy zewnątrzkomórkowej. Polimeryzacja mikrotubul jest odwzorowywana poprzez stopniowe wydłużanie segmentów (prętów) odpowiadających mikrotubulom wzdłuż tej ścieżki, co powoduje wypychanie ziaren na zewnątrz i prowadzi do deformacji modelu w kierunku stanu

równowagi. W wyniku tego procesu kształt modelu ulega stopniowej zmianie, aż do uzyskania mechanicznie zrównoważonej struktury, w której siły rozciągające i ściskające pozostają w interakcji z reakcjami podłoża [92], [102].

3.3.5 Model półsztywnej sieci polimerów

Aktualnie modele opisujące zachowanie mechaniczne pojedynczych filamentów cytoszkieletu najczęściej bazują na teorii półsztywnych łańcuchów polimerowych (ang. *semi-flexible polymer chains*). Teoria ta obejmuje zarówno sprężyste rozciąganie i zginanie włókien, jak i proces prostowania początkowo pofalowanych włókien pod wpływem przyłożonego obciążenia [103]. W rezultacie, odległość między końcami filamentu różni się od jego długości konturowej w stanie swobodnym, a relacje modelowe wiążą siłę osiową działającą na jeden z końców z odległością końcową znormalizowaną względem długości konturowej [104]. Półsztywne łańcuchy polimerowe charakteryzują się skończoną sztywnością na zginanie, przez co ich właściwości mechaniczne wynikają z kompromisu pomiędzy energią sprężystą zginania a energią swobodną o charakterze entropowym, związaną z termicznymi fluktuacjami kształtu. Choć do modelu można włączyć także energię rozciągania, w pierwszym przybliżeniu filamente traktuje się jako nierozciągliwe [105].

Analiza odpowiedzi mechanicznej żeli utworzonych z oczyszczonych filamentów cytoszkieletu, odtworzonych *in vitro*, dostarcza cennych informacji o właściwościach tych polimerów w warunkach komórkowych. Sieci filamentów aktynowych wzbudzają szczególne zainteresowanie ze względu na różnorodność formowanych struktur oraz fakt, iż stanowią modelowe przykłady polimerów półsztywnych [29]. Ich elastyczność może wynikać z dwóch źródeł: sprężystości entropowej, będącej skutkiem ograniczenia liczby możliwych konfiguracji termicznie fluktuujących filamentów, np. podczas ich rozciągania, oraz sprężystości entalpicznej, wynikającej ze zmian odległości między cząsteczkami budującymi filament, np. podczas jego zginania, nawet przy braku fluktuacji termicznych. Znaczenie poszczególnych składowych sprężystości zależy w dużej mierze od architektury samej sieci [33]. Odpowiedź mechaniczna sieci filamentów półsztywnych, takich jak aktyna czy kolagen, poddanych różnym konfiguracjom obciążeń, była przedmiotem licznych badań z wykorzystaniem dyskretnych modeli sieci. Pozwoliły one zidentyfikować kluczowe skale długości i energii determinujące zachowanie takich struktur [93], [106], [107]. W warunkach odkształceń globalnych (np. rozciągania jednoosiowego lub ścinania) wyróżniono trzy dominujące

mechanizmy deformacji: rozciąganie materiałowe, rozciąganie o charakterze entropowym oraz zginanie.

3.3.6 Modelowanie cytoszkieletu – podsumowanie

Zdolność komórki eukariotycznej do opierania się deformacji, generowania sił, transportu ładunku wewnątrzkomórkowego oraz zmiany kształtu podczas ruchu jest warunkowana działaniem cytoszkieletu. Zewnętrzne i wewnętrzne siły fizyczne mogą wywoływać zmiany w strukturze cytoszkieletu, zatem wpływać na lokalne właściwości mechaniczne i zachowania komórkowe [33]. Cytoszkielet zapewnia wewnętrzną strukturę i wsparcie dla organeli komórkowych. Pod wpływem obciążeń mechanicznych cytoszkielet ściska się i zapewnia siłę przeciwną, która przeciwdziała zmięczeniu komórki. Ponadto cytoszkielet pośrednio łączy się z macierzą zewnątrzkomórkową i innymi komórkami poprzez połączenia adhezyjne, dzięki czemu może pośredniczyć w komunikacji pomiędzy wnętrzem i zewnątrz komórki, a przede wszystkim czyni go bardzo wrażliwym na wykrywanie sił mechanicznych, takich jak naprężenia ścinające wywołane przez przepływ, naprężenia w miejscach szczywania z macierzą zewnątrz komórkową i zmiany sztywności na tych połączeniach [30].

Przy dużym zagęszczeniu filamentów, typowym dla środowiska biologicznego, modele dyskretne wymagają znacznych nakładów obliczeniowych [93]. Dodatkowym utrudnieniem jest brak prostego sposobu przekształcenia takiej sieci w model ciągły, który zachowałby realizm biologiczny, a jednocześnie pozwalał na szybsze obliczenia.

Ponadto, proste metody skalowania nie uwzględniają wstępnego naprężenia sieci *in vivo*, co ogranicza możliwość ich bezpośredniego zastosowania. Większość makroskopowych modeli continuum opiera się na uśrednianiu właściwości zespołów filamentów, zgodnie z zasadami fizyki polimerów [105], [108]. Najstarszą i najliczniejszą grupę stanowią klasyczne podejścia wywodzące się z teorii sprężystości gumy – modele łańcuchowe, pełnosieciowe i mikrosferyczne [109], które były stosowane do sieci aktynowych, prowadząc do hipersprężystych i lepkosprężystych równań konstytutywnych [110], [111]. Nadal brakuje szerokiego zastosowania metod matematycznych o większym stopniu ścisłości, takich jak przejście dyskretno-continuum czy homogenizacja, które umożliwiłyby systematyczne połączenie obu podejść [103]. Częstym problemem jest także niska zgodność topologii z rzeczywistością biologiczną.

Zaawansowane podejścia matematyczne z powodzeniem wykorzystywano natomiast do badania procesów reorganizacji cytoszkieletu w trakcie migracji komórek, w tym dynamiki aktyny, miozyny oraz białek wiążących w strefie wiodącej. Tego typu modele często umożliwiają uzyskanie rozwiązań analitycznych, np. określających zależność prędkości przemieszczania się komórki od parametrów podłoża [112], [113].

Należy także pamiętać, że cytoszkielet jest strukturą niezwykle dynamiczną, która może ulegać ciągłej reorganizacji w reakcji na czynniki zewnętrzne lub wewnętrzne. Wyróżnia się trzy najbardziej kluczowe procesy biochemiczne, które wpływają na organizację struktury cytoszkieletu [114]:

- sygnał biochemiczny, który wywołuje polimeryzację aktyny oraz fosforylację miozyny,
- zależne od napięcia połączenie aktyny i miozyny we włókno cytoszkieletu,
- połączenia między włóknami aktyny i miozyny, który generują napięcie.

W wyniku działania tych procesów cytoszkielet może generować siły powodujące skurcz komórki, zmianę jej kształtu i własności mechanicznych, które są wywołane przebudowaniem struktury cytoszkieletu.

4 Cel i teza rozprawy

W części teoretycznej pracy zaprezentowano modele, które stosuje się na trzech poziomach opisu: tkanki kostnej, komórki oraz cytoszkieletu. Na każdym z tych poziomów podejmowana jest próba ujęcia procesów zachodzących w żywym organizmie, który nieustannie podlega zmianom. Analiza dotychczasowych podejść do modelowania przebudowy kości w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne wskazuje na konieczność uwzględnienia procesu mechanotransdukcji, regulującego mechanizmy przebudowy. Determinuje ona nie tylko rodzaj, ale także tempo zmian zachodzących w kości. Zmiany w architekturze włókien cytoszkieletowych inicjują kaskadę sygnałów biochemicznych i umożliwiają komunikację międzykomórkową, a w konsekwencji przebudowę tkanki. Dotychczasowe modele koncentrowały się głównie na mechanicznych właściwościach komórek lub pojedynczych filamentów, pomijając dynamiczny proces reorganizacji cytoszkieletu. W niniejszym podejściu akcent przesunięto na opis przebudowy, postanowiono użyć narzędzi, które były stosowane dotychczas w modelowaniu przebudowy kości do opisu przebudowy cytoszkieletu. Celem takiego podejścia jest możliwość zamodelowania przebudowy architektury cytoszkieletu.

Nie chodzi przy tym o prostą analizę ewolucji właściwości mechanicznych pojedynczej komórki, gdyż osteocyt sam w sobie nie przenosi znaczących obciążeń. W rozprawie została podjęta próba utworzenia modelu, który umożliwi opis i symulację przebudowy cytoszkieletu, jego kształtu, topologii i architektury w reakcji na otaczające środowisko. Środowisko to nie jest jednorodne ani proste – przeciwnie, należy je rozumieć jako układ złożony, kompleksowy, a wręcz konstelacyjny. Składają się na nie równocześnie czynniki fizyczne, biologiczne i chemiczne, które współoddziałując, determinują odpowiedź komórki. Z uwagi na daleko idącą specjalizację w poszczególnych dziedzinach nauki powstało wiele modeli opisujących wpływ pojedynczych elementów tego układu, tj. właściwości materiałowych tkanki, dynamiki reakcji komórkowych, czy zachowania pojedynczych włókien cytoszkieletu. Tymczasem rzeczywistość biologiczna wymaga spojrzenia holistycznego – nie tylko wyodrębnienia poszczególnych czynników, ale także ich zespolenia w jeden spójny model.

Celem rozprawy jest sformułowanie modelu uwzględniającego dodatkowo proces przebudowy cytoszkieletu komórki kostnej, który stanowi fundament procesu adaptacyjnego osteoidu kostnego i w konsekwencji całej tkanki kostnej. Teza pracy została sformułowana następująco:

Uwzględnienie przebudowy cytoszkieletu osteocytów w modelu matematycznym funkcjonalnej adaptacji tkanki kostnej pozwala na bardziej rzeczywistą symulację tego zjawiska na poziomie mikroskopowym.

W niniejszej pracy podjęto zatem próbę opisu reakcji osteocyty na złożone komunikaty płynące ze świata zewnętrznego i wewnętrznego. Są to z jednej strony obciążenia mechaniczne oraz warunki fizyczne, pochodzące z zewnątrz, wynikające z deformacji tkanki czy przepływu płynu w kanalikach kostnych, a z drugiej sygnały chemiczne i biochemiczne, w tym oddziaływania pochodzące od innych osteocytów, wpływ hormonów czy obecność makroelementów. Wszystkie te czynniki współkształtują przebudowę cytoszkieletu, który można traktować jako centralny, integrujący różne rodzaje sygnałów i umożliwiający ich translację element. Jednocześnie należy podkreślić, że ścisłe powiązania pomiędzy poszczególnymi filamentami i mikrotubulami sprawiają, że nie sposób wyodrębnić i przypisać funkcji mechanotransdukcji wyłącznie pojedynczych składników cytoszkieletu. Konieczne jest zatem modelowanie całej jego struktury i dynamiki, co pozwala uchwycić złożony charakter tego procesu.

Wybór podejścia interdyscyplinarnego wynika z potrzeby połączenia różnych języków opisu. Dysponując językiem przede wszystkim fizycznym, a nawet specyficznie mechanicznym, konieczne staje się włączenie do niego elementów biologicznych i chemicznych. Oznacza to czerpanie z dorobku takich dziedzin nauki, jak biologia komórki, biochemia i chemia fizyczna, które dostarczyły modeli opisujących dynamikę białek cytoszkieletu, oddziaływania sygnałowego czy regulacji procesów apoptozy i proliferacji. Dopiero na tej podstawie można sformułować spójny model, który nie ogranicza się do opisu wybranego porządku, lecz stanowi próbę zespolenia różnych informacji w jeden obraz. W tym sensie celem pracy nie jest opisywanie sztywnych parametrów materiałowych cytoszkieletu, czy komórki, lecz raczej opis jego przemiany – procesu dynamicznego, którego tempo i architektura stanowią odbicie stanu fizjologicznego lub patologicznego tkanki.

5 Modelowanie i badanie przebudowy

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu dotychczas stosowanych modeli na różnych poziomach skali zjawisk oraz technik obciążania pojedynczych żywych komórek [58] w niniejszym rozdziale przedstawiono własne podejście badawcze i modele, uwzględniające specyfikę badanej tkanki. Do przeprowadzenia symulacji wykorzystano metodę elementów skończonych, która umożliwiła odwzorowanie i analizę zaproponowanych modeli matematycznych.

5.1 Model ciągły przebudowy kości z uwzględnieniem aktywności osteocytów i procesu mechanotransdukcji - ewolucja parametrów sztywności 2D

Proces adaptacji kości jest oparty na zjawisku mechanotransdukcji (ang. *mechanotransduction*), czyli zdolności komórek do detekcji odkształceń mechanicznych i przekształcania ich w sygnały biochemiczne, opisanym szerzej w rozdziale 2.2.2. Osteocyty, komórki umieszczone w sieci kanalików (ang. *lacuno-canalicular network (OLCN)*), odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu i kontrolowaniu tego procesu. W niniejszym rozdziale przedstawiono model ciągły przebudowy tkanki kostnej, w którym śludzona jest niezależna ewolucja dwóch parametrów sztywności: modułu objętościowego K oraz modułu ścinania G [115]. Celem takiego podejścia jest uchwycenie wpływu dwóch odmiennych typów bodźców mechanicznych — odkształceń hydrostatycznych i odkształceń postaciowych (dewiatorowych) — na proces adaptacji mechanicznej kości. Ze względu na zróżnicowaną wrażliwość komórek sensorowych, czyli osteocytów, na działanie ciśnienia oraz naprężeń ścinających, zasadne jest wyodrębnianie w modelach matematycznych tych procesów. W rzeczywistości mechanizmy odpowiedzialne za percepcję stanu mechanicznego tkanki kostnej są złożone i zlokalizowane w różnych obszarach osteocytów, opisanych szerzej w rozdziale 2.1.3. Traktowanie obu rodzajów bodźców w sposób jednolity stanowi nadmierne uproszczenie, które może prowadzić do utraty istotnych informacji o przebiegu procesów biomechanicznych.

Przyjęto, że kość można opisać w przybliżeniu jako izotropowy ośrodek sprężysty w zakresie małych odkształceń, co oznacza, że jej właściwości mechaniczne są jednakowe we wszystkich

kierunkach. Zapisano prawo Hooke'a w taki sposób, aby zdefiniować tensor naprężeń σ_{ij} jako liniową kombinację tensorów odkształceń objętościowych i dewiatorowych:

$$\sigma_{ij} = 3K \left(\frac{1}{3} \epsilon_{kk} \delta_{ij} \right) + 2G \left(\epsilon_{ij} - \frac{1}{3} \epsilon_{kk} \delta_{ij} \right) \quad (34)$$

gdzie:

σ_{ij} – tensor naprężeń,

K – moduł objętościowy, odpowiadający za reakcję na ściskanie/rozciganie,

G – moduł ścinania, opisujący reakcję materiału na odkształcenia postaciowe,

ϵ_{ij} – tensor odkształceń,

δ_{ij} – delta Kroneckera.

Pierwsza część wyrażenia opisuje część hydrostatyczną:

$$\sigma^h_{ij} = 3K \left(\frac{1}{3} \epsilon_{kk} \delta_{ij} \right) \quad (35)$$

a druga część dewiatorową (postaciową):

$$\sigma^s_{ij} = 2G \left(\epsilon_{ij} - \frac{1}{3} \epsilon_{kk} \delta_{ij} \right) \quad (36)$$

gdzie składowe tensora odkształcenia w przybliżeniu liniowym można zapisać:

$$\epsilon_{ij} = \frac{1}{2} (u_{i,j} + u_{j,i}) \quad (37)$$

Indeks po przecinku oznacza różniczkowanie względem odpowiedniej zmiennej przestrzennej. Sztywność jest początkowo obliczana na podstawie parametrów materiałowych opierających się na module Younga E oraz współczynniku Poissona ν :

$$K = \frac{E}{3(1 - 2\nu)} \quad (38)$$

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)} \quad (39)$$

Następnie rozdzielono energię sprężystości (ang. *strain energy density*) W na dwie części:

$$W = W_h + W_d \quad (40)$$

Rozkład energii w tych dwóch częściach jest dość wygodny do użycia w ewolucji sztywności, ponieważ są one energetycznie ortogonalne. W rzeczywistości są one pozbawione jakiegokolwiek wzajemnego sprzężenia.

Brany jest pod uwagę przypadek 2D, w którym część hydrostatyczna to:

$$W_h = \frac{1}{2}K(\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22})^2 \quad (41)$$

A część dewiatorowa to:

$$W_d = G \left(\varepsilon_{11}^2 + \varepsilon_{22}^2 + 2\varepsilon_{12}^2 - \frac{1}{2}(\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22})^2 \right) \quad (42)$$

W ten sposób implementowana jest gęstość energii sprężystej dla zagadnienia kości obciążonej mechanicznie. W modelu wprowadzono trzy grupy zmiennych:

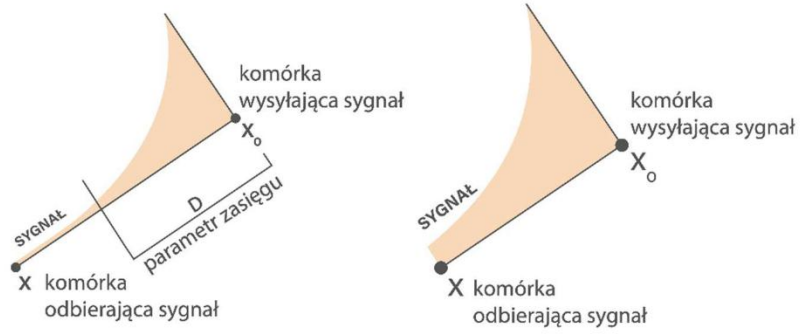
- klasyczne pole przemieszczeń $u(\mathbf{X}, t)$ opisujące deformację tkanki, gdzie $\mathbf{X}$ to wektor współrzędnych przestrzennych,
- dwa pola sygnałów $S_K(\mathbf{X}, t)$ oraz $S_G(\mathbf{X}, t)$, dostarczające informacji związanej odpowiednio z odkształceniami hydrostatycznymi i postaciowymi, które w wyniku aktywności komórkowej prowadzą do przebudowy kości.
- dwa istotne parametry materiałowe: K i G charakteryzujące przyjętą izotropową kwadratową energię sprężystą.

Osteocyty czyli komórki odpowiedzialne za odbieranie obciążeń mechanicznych, czyli mechanosensory, są regularnie rozmieszczone w objętości tkanki. Ich rozkład ma znaczący wpływ na proces przebudowy kości. Osteocyty przekształcają sygnał mechaniczny w biochemiczny, który w tym uproszczonym modelu jest natychmiast przesyłany, a jego intensywność spada wykładniczo wraz ze wzrostem odległości od osteocytów (źródła sygnału) [116].

Rozważany jest promień zasięgu otaczający osteocyty D , który w przeprowadzonych symulacjach ma wartość 0,1mm [115]. W badanym przypadku 2D znormalizowaną odległość od mechanosensora zlokalizowanego w odległości X_0 do komórki nazywanej aktorem, czyli osteoblastu lub osteoklastu, możemy zapisać:

$$E_s = \frac{\|\mathbf{X} - \mathbf{X}_0\|}{D} \quad (43)$$

Zgodnie z rysunkiem 5.1 parametr zasięgu D to wielkość powyżej, której sygnał jest pomijalnie mały, $\mathbf{X}$ opisuje położenie komórki odbierającej sygnał, a $\mathbf{X}_0$ położenie komórki wysyłającej sygnał.



Rysunek 5.1: Schemat wpływu sygnału

Sygnał biochemiczny przekazywany przez osteocyty wywołuje aktywność komórek aktorów, czyli osteoblastów i osteoklastów, w procesie adaptacji kości do stymulacji mechanicznej. Zgodnie z poprzednim podziałem założono postać sygnałów biochemicznych związanych kolejno z częścią hydrostatyczną gęstości energii sprężystości oraz dewiatorową:

$$S_K(\mathbf{X}, t) = \int_{\Omega} W_h(\mathbf{X}_0, t) e^{-E_s(\mathbf{X}, \mathbf{X}_0)} d\mathbf{X}_0 - S_{K0}(\mathbf{X}, t) \quad (44)$$

$$S_G(\mathbf{X}, t) = \int_{\Omega} W_d(\mathbf{X}_0, t) e^{-E_s(\mathbf{X}, \mathbf{X}_0)} d\mathbf{X}_0 - S_{G0}(\mathbf{X}, t) \quad (45)$$

Równania (44) i (45) zakładają, że osteocyty przekazują sygnał biochemiczny, który jest zależny od energii sprężystej. Wielkości S_{K0} i S_{G0} to wartości sygnału w równowadze homeostatycznej. Formułując równania ewolucyjne parametrów materiałowych K i G ich zmiana jest wiązana z sygnałem przesyłanym do elementarnej objętości materiału:

$$\frac{\partial K(S_K, t)}{\partial t} = A_K(S_K) H\left(\frac{K}{K_{\text{Max}}}\right) \quad (46)$$

$$\frac{\partial G(S_G, t)}{\partial t} = A_G(S_G) H\left(\frac{G}{G_{\text{Max}}}\right) \quad (47)$$

gdzie funkcje A_K i A_G są funkcjami liniowymi sygnału określonymi:

$$A_K(S_K) = \begin{cases} r_{sK} S_K & \text{dla } S_K \geq 0 \\ r_{rK} S_K & \text{dla } S_K < 0 \end{cases} \quad (48)$$

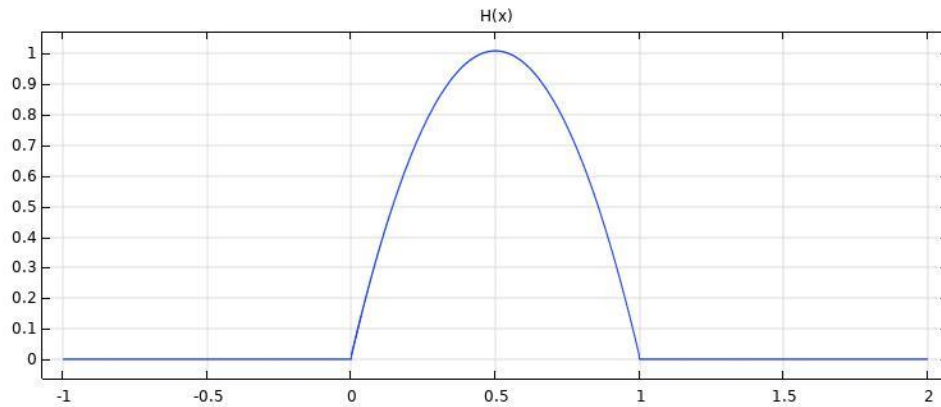
$$A_G(S_G) = \begin{cases} r_{sG} S_G & \text{dla } S_G \geq 0 \\ r_{rG} S_G & \text{dla } S_G < 0 \end{cases} \quad (49)$$

Współczynniki r_{sK} , r_{rK} , r_{sG} , r_{rG} wyznaczone doświadczalnie, pełnią rolę parametrów regulacyjnych w modelu. Wartość r_{sK} skaluje funkcję S_K dla wartości większych lub równych zero, natomiast r_{rK} dla wartości ujemnych. Analogicznie, r_{sG} modyfikuje funkcję S_G przy wartościach nieujemnych, a r_{rG} przy wartościach ujemnych.

Funkcja $H(x)$ skaluje obliczenia numeryczne, tak aby parametry K i G nie uległy całkowitemu zanikowi lub nieograniczonemu wzrostowi, przyjęto:

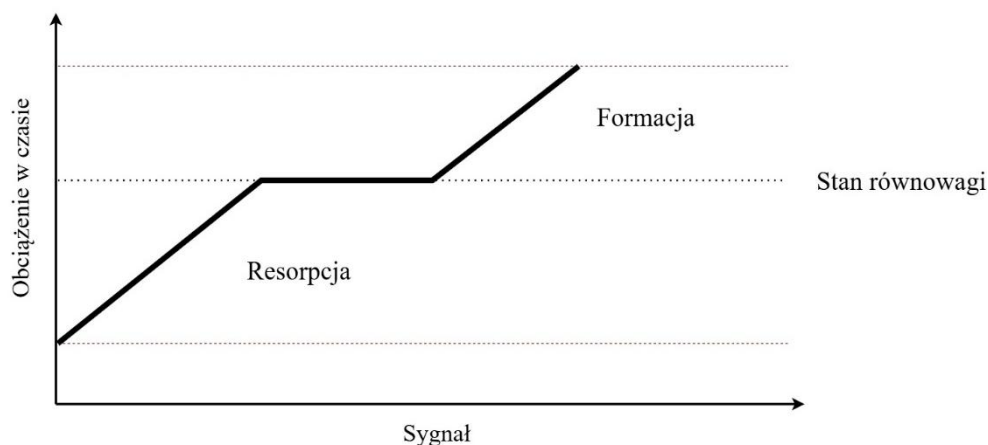
$$H(x) = 4x(1 - x) \quad (50)$$

w przedziale $[0;1]$, poza którym jest równa 0, jak na rysunku 5.2. Maksymalne wartości parametrów K i G oznaczono odpowiednio jako K_{Max} i G_{Max} .



Rysunek 5.2: Wykres funkcji $H(x)$

Proces przebudowy tkanki kostnej jest ściśle zależny od poziomu bodźca mechanicznego. Zbyt niska intensywność prowadzi do resorpcji kości, a zbyt wysoka do jej uszkodzenia. Pomiędzy tymi skrajnymi wartościami występuje jednak zakres optymalny, w którym struktura kostna dostosowuje swoje właściwości do panujących warunków obciążenia mechanicznego. Graficzna interpretacja równania (17) przedstawiona jest na rysunku 5.3.



Rysunek 5.3: Schemat przebudowy tkanki kostnej

Zgodnie z założeniem, że energia odkształcenia dzieli się na składową hydrostatyczną i dewiatorową w dalszej części przedstawiono wyniki szeregu symulacji numerycznych, ilustrujących wpływ różnych typów obciążeń mechanicznych na proces przebudowy kości.

Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.1.

Tabela 5.1: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

E_0	ν_0	D	K_{Max}	G_{Max}	S_{K0}	S_{G0}	r_{sK}	r_{rK}	r_{sG}	r_{rG}
GPa	-	mm	GPa	GPa	N	N	$m^{-3}s^{-1}$	$m^{-3}s^{-1}$	$m^{-3}s^{-1}$	$m^{-3}s^{-1}$
18	0,3	0,1	30	13,84	0,001	0,001	10^7	10^9	10^3	10^9

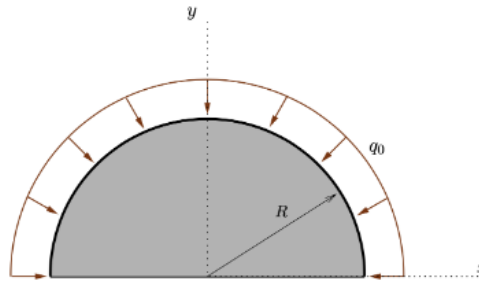
Model zaimplementowano w środowisku MES w programie COMSOL Multiphysics dla przypadku 2D. Parametry początkowe dobrano na podstawie literatury [116], [117], a współczynniki r_{sK} , r_{rK} , r_{sG} , r_{rG} ustalono eksperymentalnie, uwzględniając typowe wartości znane z badań in vitro i in vivo.

Przeprowadzono symulacje w trzech scenariuszach:

- przypadek czysto hydrostatyczny, brak zmiany kształtu,
- czyste ścinanie,
- obciążenie mieszane, rozciąganie jednoosiowe.

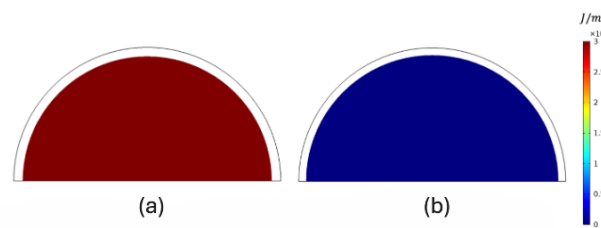
5.1.1 Przypadek czysto hydrostatyczny 2D

Półkolisty fragment kości o promieniu R , unieruchomiony względem podłoża w celu wyeliminowania przemieszczeń sztywnych, lecz swobodny w zakresie odkształceń, poddano działaniu rozłożonej siły prostopadłej do jego zakrzywionej krawędzi q_0 , geometrię przedstawia rysunek 5.4.



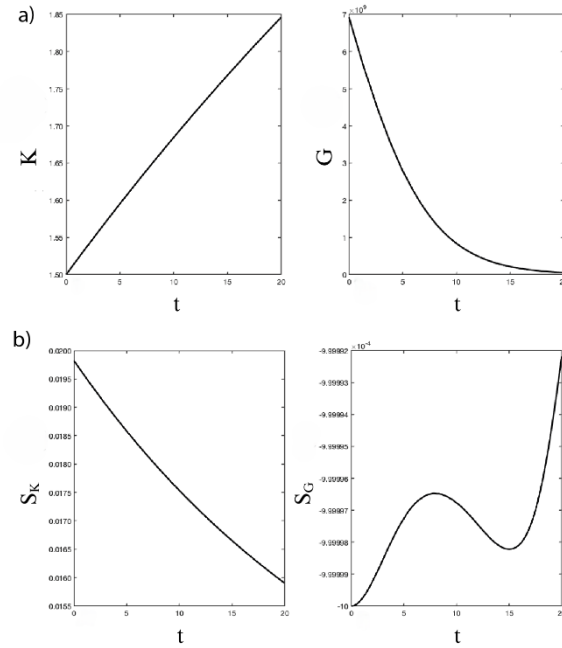
Rysunek 5.4: Geometria i obciążenie dla przypadku czysto hydrostatycznego 2D

Pozioma średnica, czyli miejsce przylegania elementu do podłoża, została unieruchomiona poprzez sztywne zamocowanie w kierunku pionowym oraz zastosowanie niewielkiego potencjału sprężystego w kierunku poziomym. Takie warunki brzegowe eliminują możliwość przemieszczeń sztywnych w kierunku poziomym, a jednocześnie pozwalają na odkształcenia w tej płaszczyźnie. Dzięki osiowej symetrii obciążenia i geometrii powstało jednolite ściskanie materiału nie wywołujące zmiany kształtu, a jedynie zmianę objętości.



Rysunek 5.5: Kształt odkształconego elementu dla przypadku czysto hydrostatycznego, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną W_h i (b) dewiatorową W_d część energii

W wyniku obciążenia ciało ulegało czystemu odkształceniu hydrostatycznemu, gdzie $W_h > 0$, $W_d \approx 0$, co pozwoliło zbadać wpływ samej części hydrostatycznej energii na przebudowę kości. Wyniki przedstawiono na rysunku 5.5.

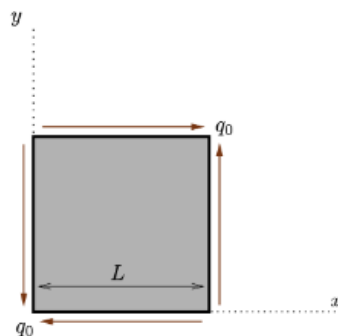


Rysunek 5.6: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów S_K i S_G [N] w czasie t [doba] dla przypadku czysto hydrostatycznego

Zgodnie z przewidywaniami, moduł Helmholtza K w trakcie ewolucji pod wpływem obciążenia mechanicznego ulegał zwiększeniu, co wynikało z wystarczająco wysokiego poziomu obciążenia, generującego dodatni sygnał dla tego parametru. Natomiast udział energii odkształcenia w części postaciowej był równy zeru, co skutkowało pojawieniem się sygnału ujemnego. W rezultacie moduł Kirchhoffa G zaczął stopniowo maleć, wskazując na redukcję odporności materiału na odkształcenia postaciowe (rysunek 5.6).

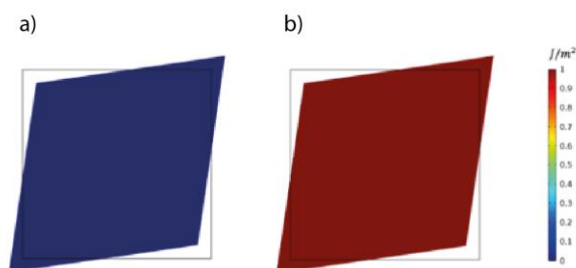
5.1.2 Przypadek czystego ścinania 2D

Przeprowadzono symulację przypadku czystego odkształcenia postaciowego. W tym scenariuszu warunki brzegowe zostały dobrane tak, aby wywołać deformację zmieniającą kształt badanego fragmentu, lecz bez zmiany jego powierzchni. Odebrano wszystkie stopnie swobody dolnej krawędzi elementu, a obciążenie q_0 przyłożono do górnej krawędzi zgodnie z osią x (rysunek 5.7).



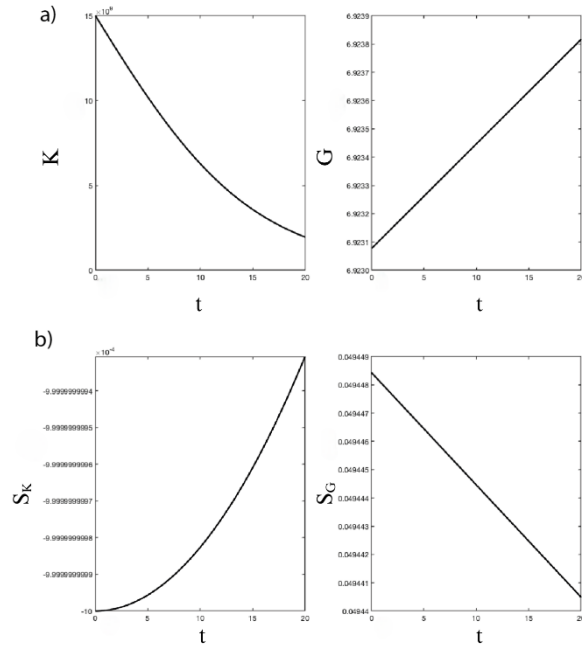
Rysunek 5.7: Geometria i obciążenie dla przypadku czystego ścinania 2D

W wyniku obciążenia ciało ulegało czystemu odkształceniu postaciowemu, gdzie $W_d > 0$, $W_h \approx 0$, co pozwoliło zbadać wpływ samej części dewiatorycznej energii na przebudowę kości.



Rysunek 5.8: Kształt odkształconego elementu dla przypadku czystego ścinania, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną W_h i (b) dewiatorową W_d część energii

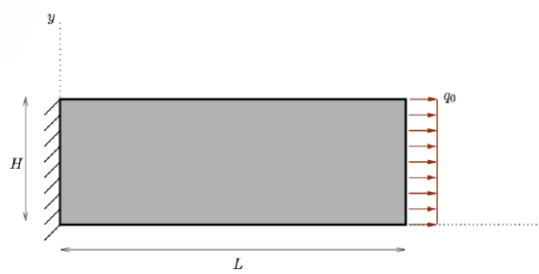
W przeciwieństwie do poprzedniego przypadku, role parametrów G i K uległy odwróceniu. Wartość parametru K spadała, ponieważ odpowiadający mu sygnał miał wartość ujemną (brak aktywacji składowej hydrostatycznej energii), natomiast parametr G wzrastał pod wpływem działania siły zewnętrznej, która generowała sygnał dodatni (rysunek 5.9).



Rysunek 5.9: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów S_K i S_G [N] w czasie t [doba] dla przypadku czystego ścinania

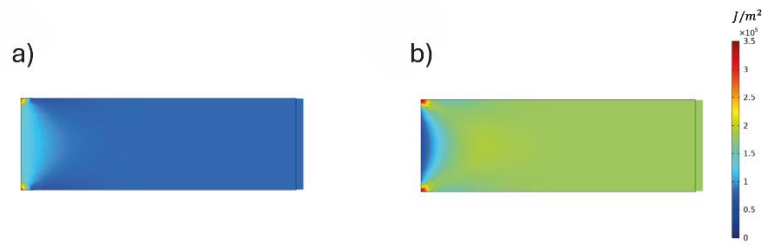
5.1.3 Przypadek rozciągania jednoosiowego 2D

Przeprowadzono symulację dla przypadku mieszanego, czyli próbę rozciągania. Odebrano wszystkie stopnie swobody lewej krawędzi elementu, zaś do prawej przyłożono siłę rozciągającą (rysunek 5.10).



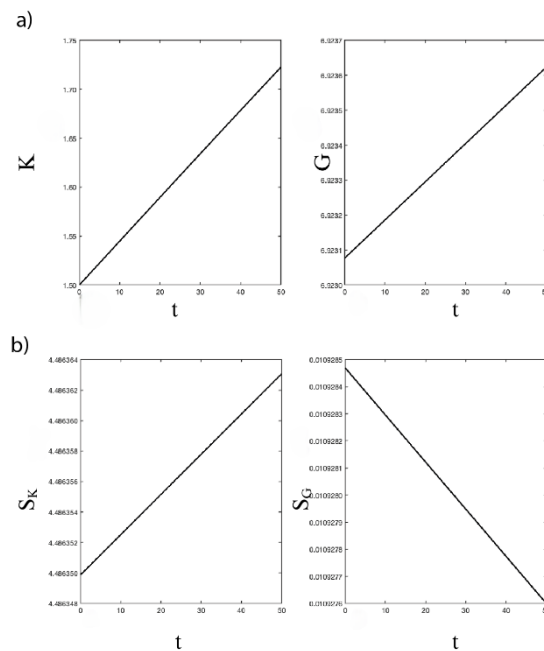
Rysunek 5.10: Geometria i obciążenie dla przypadku rozciągania jednoosiowego 2D

W tym scenariuszu aktywne były obie składowe energii sprężystej. Oba generowane sygnały miały wartość dodatnią, co prowadziło do równoczesnego wzrostu obu parametrów opisujących sztywność materiału (rysunek 5.11).



Rysunek 5.11: Kształt odkształconego elementu dla przypadku jednoosiowego rozciągania, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną W_h i (b) dewiatorową W_d część energii

Oba generowane sygnały miały wartość dodatnią, co prowadziło do równoczesnego wzrostu obu parametrów opisujących sztywność materiału (rysunek 5.12).



Rysunek 5.12: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów S_K i S_G [N] w czasie t [doba] dla przypadku rozciągania jednoosiowego

W rzeczywistych zastosowaniach oba typy odkształceń niemal zawsze występują jednocześnie, jednak ich wpływ na materiał może prowadzić do odmiennych rezultatów. Wynika to z różnej natury parametrów materiałowych biorących udział w procesie ewolucji. Przykładowo, zmiany pozornej gęstości masy są bezpośrednio powiązane z objętościową sztywnością K , ponieważ modyfikacja porowatości istotnie wpływa na hydrostatyczną odpowiedź tkanki kostnej. Z kolei moduł postaciowy G w większym stopniu odpowiada za zdolność mechaniczną tkanki kostnej

do przeciwstawiania się deformacjom kształtu, a jego zmiana przekłada się na modyfikację wytrzymałości materiału w odniesieniu do tego rodzaju odkształceń.

Przedstawiony model matematyczny pozwala na opisanie przebudowy kości w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne z uwzględnieniem różnorodności bodźców hydrostatycznych i dewiatorowych. Wyniki symulacji potwierdziły, że odkształcenia dewiatorowe mają większy wpływ na przebudowę kości niż hydrostatyczne, a proces przebudowy jest wrażliwy na różne rodzaje obciążeń mechanicznych. Wyniki te są zgodne z obserwacjami eksperymentalnymi, w szczególności z faktem, że osteocyty wykazują większą wrażliwość na bodźce dewiatorowe (ściskanie) niż na czyste obciążenia hydrostatyczne.

Opracowany model umożliwia równoczesne śledzenie niezależnych zmian w odpowiedzi hydrostatycznej i dewiatorowej kości. Rozdzielenie wpływu tych bodźców pozwala lepiej zrozumieć mechanoczułość i mechanotransdukcję w tkance kostnej, a także otwiera drogę do rozszerzenia koncepcji na przypadek ortotropowy, istotny dla wiernego odwzorowania właściwości mechanicznych kości w badaniach symulacyjnych i w inżynierii biomedycznej.

5.2 Model ciągły przebudowy kości z uwzględnieniem aktywności osteocytów i procesu mechanotransdukcji - ewolucja parametrów sztywności 3D

Poprzedni model rozszerzono o proces dyfuzji lepiej opisujący proces rozchodzenia się sygnałów biochemicznych, a badany model jest trójwymiarowy [118]. Model koncentruje się na ewolucji dwóch kluczowych parametrów sztywności: modułu Helmholtza K oraz modułu Kirchhoffa G . Parametry te ulegają niezależnym zmianom w odpowiedzi na wymagania mechaniczne, jakim poddawana jest kość, umożliwiając dostosowanie się struktury tkanki do odkształceń hydrostatycznych oraz dewiatorowych. Bodźce mechaniczne oddziałujące na kość wpływają na aktywność komórek kostnych, co prowadzi do zmian w strukturze i wytrzymałości tkanki, a tym samym do modyfikacji wspomnianych modułów, schemat postępowania przedstawiono na rysunku 5.13.

Podobnie jak w poprzednim modelu zakłada się, że kość jest materiałem izotropowym i sprężystym opisywanym przez prawo Hooke'a zapisane w formie rozdzielającej części

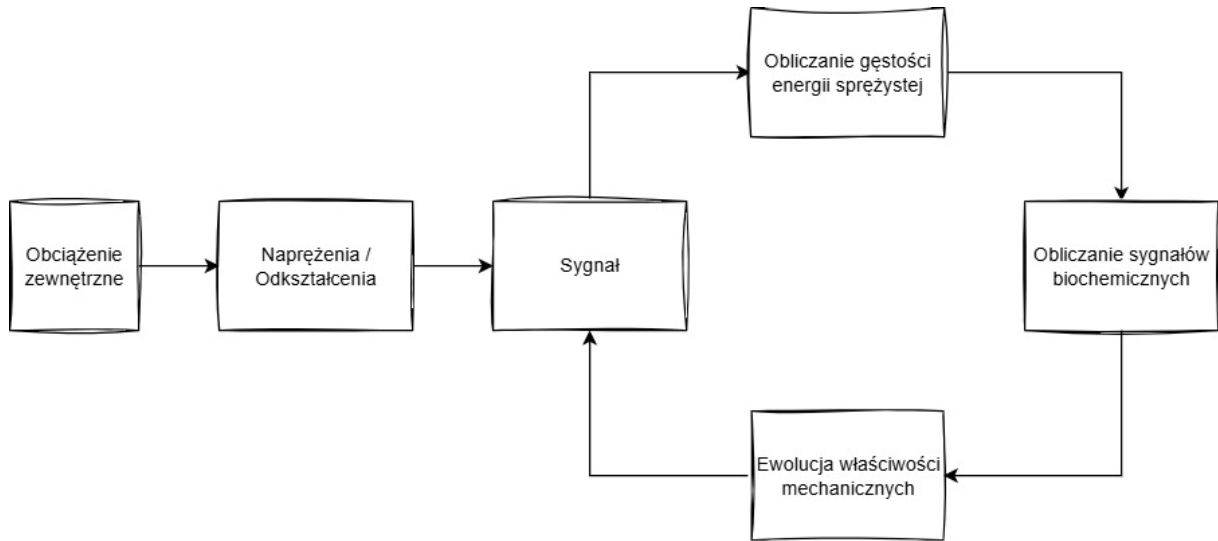
hydrostatyczną i dewiatorową jak w równaniach (34) – (40). W tym przypadku ze względu na trójwymiarową geometrię energia sprężysta dzieli się na część hydrostatyczną, która ma postać:

$$W_h = \frac{1}{2} K (\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22} + \varepsilon_{33})^2 \quad (51)$$

i dewiatorową:

$$W_d = G \left[\varepsilon_{11}^2 + \varepsilon_{22}^2 + \varepsilon_{33}^2 + 2(\varepsilon_{12}^2 + \varepsilon_{13}^2 + \varepsilon_{23}^2) - \frac{1}{3} (\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22} + \varepsilon_{33})^2 \right] \quad (52)$$

Sposób przekazywania bodźców sygnałowych na poziomie komórkowym jest złożony. W omawianym modelu transmisja sygnału biochemicznego jest opisywana przy zastosowaniu równań dyfuzji. W biologicznym kontekście proces ten odzwierciedla rozprzestrzenianie się sygnałów biochemicznych generowanych przez osteocyty (np. czynniki wzrostu, cytokiny), które pobudzają osteoblasty i osteoklasty do działania.



Rysunek 5.13: Schemat modelowanego procesu mechanotransdukcyjnego

W proponowanym modelu oba źródła sygnału zostały powiązane z podstawowymi rodzajami odkształcenia, tj. odkształceniem hydrostatycznym oraz dewiatorowym. W konsekwencji, równania rządzące opisują dwa kluczowe sygnały sterujące – odpowiedzialne odpowiednio za ewolucję hydrostatyczną S_K oraz ewolucję dewiatorową S_G i zapisano je w postaci:

$$\frac{\partial S_K}{\partial t} + \nabla \cdot (-c_h \nabla S_K) = -R_K S_K + g_h W_h \quad (53)$$

$$\frac{\partial S_G}{\partial t} + \nabla \cdot (-c_d \nabla S_G) = -R_G S_G + g_d W_d \quad (54)$$

Gdzie c_h i c_d są izotropowymi współczynnikami dyfuzji opisującymi jak szybko sygnały rozprzestrzeniają się w tkance. Człon $\nabla \cdot (-c_h \nabla S_K)$ i analogiczny $\nabla \cdot (-c_d \nabla S_G)$ opisują dyfuzję sygnału w tkance kości. Dyfuzja sprawia, że bodźce mechaniczne są bardziej równomiernie rozprowadzane w całej objętości kości. To zapobiega nadmiernym reakcjom w miejscach z wysokimi naprężeniami i umożliwia aktywację komórek w obszarach o niższych naprężeniach. Stałe R_K i R_G to współczynniki absorpcji reprezentujące działanie metaboliczne, które usuwa wcześniej wygenerowany sygnał, gdy nie jest już potrzebny, g_h i g_d to współczynniki wzmocnienia, które sprzyjają wytwarzaniu sygnału na podstawie poziomu energii sprężystej z którym są związane. Człony $-R_K S_K$ i $-R_G S_G$ ograniczają czas działania bodźców, co pozwala na zachowanie dynamicznej równowagi układu, czyli homeostazy.

Homeostaza to w makroskopowym ujęciu proces utrzymania optymalnego poziomu deformacji w tkance kostnej przez sprzężony zwrotnie proces kontrolny, który zapewnia, że kości nie są zbyt miękkie, co mogłoby osłabić szkielet, ani zbyt sztywne, co wymagałoby nadmiernej ilości składników odżywczych i energii do jego utrzymania. Schemat działania przedstawia rysunek 5.13. Do opisu użyto równań ewolucyjnych (46) i (47), gdzie funkcje A_K i A_G funkcjami liniowymi sygnału określonymi z uwzględnieniem tzw. strefy zerowej określającej wartości sygnałów, dla których funkcje te przyjmują wartość 0:

$$A_K(S_K) = \begin{cases} r_{sK}(S_K - S_{K0s}) & \text{dla } S_K - S_{K0s} \geq 0 \\ 0 & \text{dla } S_{K0r} < S_K < S_{K0s} \\ r_{rK}(S_K - S_{K0r}) & \text{dla } S_K - S_{K0r} \leq 0 \end{cases} \quad (55)$$

$$A_G(S_G) = \begin{cases} r_{sG}(S_G - S_{G0s}) & \text{dla } S_G - S_{G0s} \geq 0 \\ 0 & \text{dla } S_{G0r} < S_G < S_{G0s} \\ r_{rG}(S_G - S_{G0r}) & \text{dla } S_G - S_{G0r} \leq 0 \end{cases} \quad (56)$$

Funkcja $H(x)$, podobnie jak w równaniu (50), skaluje obliczenia numeryczne, tak aby parametry K i G nie uległy całkowitemu zanikowi lub nieograniczonemu wzrostowi.

Parametry S_{K0s} , S_{K0r} , S_{G0s} , S_{G0r} to wartości progowe sygnałów, określają one zakres homeostazy. Jeżeli sygnał przekroczy te wartości to następuje przebudowa kości. Próg aktywacji dla naprężeń hydrostatycznych, wywołujący formację tkanki kostnej jest określony:

$$S_{K0s} = \frac{1}{2} K_0 \varepsilon_s^2 V \quad (57)$$

Próg aktywacji dla naprężeń hydrostatycznych, wywołujących resorpcję:

$$S_{K0r} = \frac{1}{2} K_0 \varepsilon_r^2 V \quad (58)$$

Próg aktywacji dla naprężeń ścinających wywołujących formację:

$$S_{G0s} = G_0 \varepsilon_s^2 V \quad (59)$$

Próg aktywacji dla naprężeń ścinających wywołujących resorpcję:

$$S_{G0r} = G_0 \varepsilon_r^2 V \quad (60)$$

Gdzie parametry K_0 i G_0 to początkowe wartości parametrów sztywności K i G , a parametry aktywacji, których wartości przyjęto $\varepsilon_s = 10^{-3}$ i $\varepsilon_r = 4 \cdot 10^{-4}$, określają wartości odkształceń granicznych wyznaczających zakres stanu homeostazy. Zakres $\varepsilon_r < \varepsilon < \varepsilon_s$ oznacza stan równowagi, w objętości V . Wybór tych parametrów uzasadniony jest założeniem, że referencyjne wartości bodźców należy interpretować jako ilość energii niezbędnej do inicjacji procesów syntezy, w przypadku przekroczenia odkształcenia ε_s lub resorpcji w sytuacji, gdy odkształcenie spada poniżej wartości ε_r (rysunek 5.3).

Przedstawione wartości są przyjętymi parametrami odniesienia w tym modelu, mające na celu zgodność ze zjawiskami, gdzie próg ε_s odpowiada wartościom odkształcenia w normalnych warunkach obciążeniowych dla ludzkiej kości, a próg ε_r wskazuje na obciążenia zbyt małe, prowadzące do resorpcji kości, pojawiające się na przykład przy długotrwałym unieruchomieniu kończyny.

Jeśli bodziec mechaniczny wywoła sygnał S_K lub S_G przekraczający próg S_{0s} , to zostanie aktywowane działanie osteoblastów, kość będzie tworzona, a jej sztywność się zwiększy. Podobne w przypadku spadku poniżej wartości S_{0r} – aktywowane będą osteoklasty, kość będzie zanikać, więc jej sztywność spadnie.

Tabela 5.2: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

E_0	ν_0	K_{Max}	G_{Max}	S_{K0s}	S_{K0r}	S_{G0s}	S_{G0r}	r_{sK}	r_{rK}	r_{sG}	r_{rG}
GPa	-	GPa	GPa	J	J	J	J	-	-	-	-
6,48	0,3	15	6,92	0,084	0,013	0,078	0,013	10	20	1	2

Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.2., współczynniki związane z dyfuzją przedstawiono w tabeli 5.3. Są to arbitralnie przyjęte

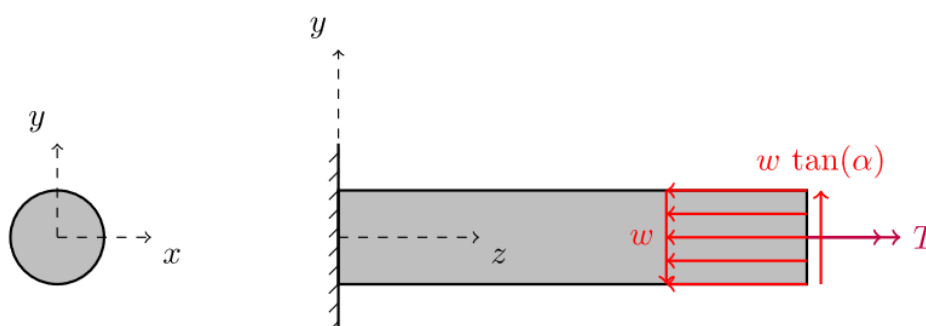
wartości odniesienia, których metodologia wyznaczania może być podobna do tych stosowanych w pracach [119], [120].

Tabela 5.3: Wartości parametrów dyfuzji użytych w symulacjach numerycznych

R_G	R_K	g_d	g_h	c_d	c_h
2,4	4,2	1	1	10^{-6}	10^{-6}

W przeprowadzonych testach numerycznych próbką badawczą był walcowy model fragmentu kości udowej o promieniu $r = 1\text{cm}$ i długości $l = 10\text{cm}$, poddany złożonemu obciążeniu obejmującemu jednocześnie działanie momentu zginającego, siły ściskającej oraz momentu skręcającego. Celem takiej konfiguracji było odtworzenie rzeczywistego stanu naprężeń w środkowej części kości udowej.

Na jednym z końców próbki przyłożono równomiernie rozłożone obciążenie powierzchniowe o wartości $w = 1,01\text{ MPa}$, co odpowiada w przybliżeniu średniej masie ciała osoby o standardowej budowie. Wektor siły nie był zorientowany wzdłuż osi walca, lecz ustawiony pod kątem $\alpha = 9^\circ$ względem osi kości, co pozwalało zasymulować typowe niewielkie odchylenie osi kości udowej od kierunku pionowego i jednocześnie generowało składową osiową oraz ścinającą. Dodatkowo na tę samą powierzchnię końcową nałożono moment skręcający o wartości $T = 5\text{ N} \cdot \text{m}$, uzupełniając warunki obciążenia testowego. Drugi koniec próbki przyjęto jako całkowicie zamocowany, odbierając wszystkie stopnie swobody (rysunek 5.14).



Rysunek 5.14: Geometria i obciążenie dla przypadku 3D

Ponadto, dla równań (53) i (54) przyjęto warunki brzegowe Neumanna o wartości zerowej, co odpowiada założeniu, że strumień bodźca na granicy domeny zanika, a więc układ jest idealnie izolowany. Oznacza to brak wymiany sygnału (czynnika stymulującego) pomiędzy

rozpatrywaną objętością a jej otoczeniem. Warunki początkowe dla obu równań dyfuzji określono jako:

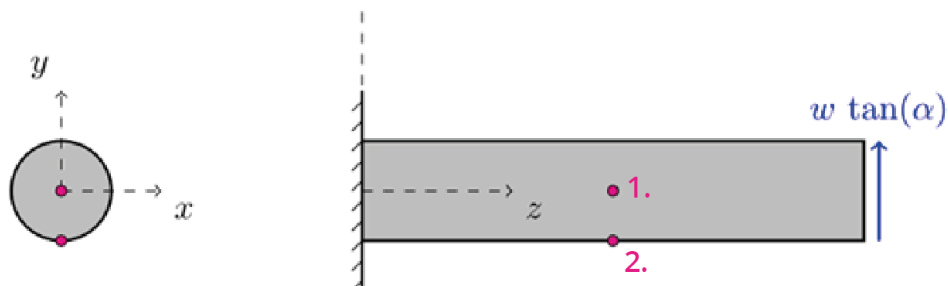
$$S_K(X, 0) = 0 \quad (61)$$

$$S_G(X, 0) = 0 \quad (62)$$

co odpowiada sytuacji, w której w chwili początkowej w całej objętości materiału brak jest zarówno bodźca hydrostatycznego, jak i postaciowego. Warunki początkowe dla równań (53) i (54) określono, przyjmując wartości modułów $K_0 = 5,4\text{GPa}$ oraz $G_0 = 2,4923\text{GPa}$. Parametry te wyznaczono na podstawie referencyjnych wartości efektywnego modułu Younga oraz współczynnika Poissona, podanych w tabeli 5.2, wykorzystując zależności (38) i (39). Należy zauważyć, że równania opisujące ewolucję tych wielkości nie wymagają zdefiniowania warunków brzegowych w przestrzeni, ponieważ nie występują pochodne przestrzenne.

Symulacje numeryczne przeprowadzono w dwóch etapach w celu oceny wpływu parametrów zestawionych w tabeli 5.3, które są charakterystyczne dla proponowanego modelu. W pierwszym etapie zastosowano wartości referencyjne podane w tabeli 5.3, co pozwoliło uzyskać wynik bazowy zgodny z nowymi równaniami i przyjętymi założeniami. Następnie, w drugim etapie, przeprowadzono analizę wpływu zmian tych parametrów w zakresie $\pm 25\%$ względem wartości referencyjnych.

Przeprowadzona analiza parametryczna dostarczyła istotnych informacji na temat reakcji układu w zróżnicowanych warunkach obciążenia, co umożliwiło pełniejszą ocenę działania modelu i lepsze zrozumienie jego zachowania. Wyniki badań przedstawiono dla dwóch wybranych punktów pomiarowych: (1) w centralnej części próbki oraz (2) na obwodowej powierzchni próbki, zgodnie z rysunkiem 5.15.



Rysunek 5.15: Umieszczenie punktów pomiarowych: (1) centralny (2) obwodowy

Pierwsza symulacja referencyjna, wykazała, że obciążenie skręcające wywołuje jedynie niewielki wpływ na hydrostatyczną część gęstości energii sprężystej W_h (rysunek 5.16). Ponadto stwierdzono, że część dewiatorowa gęstości energii sprężystej W_d przyjmuje niższe wartości w obszarach wewnętrznych modelu w porównaniu z obszarami zewnętrznymi, w których występują wyższe wartości naprężeń postaciowych (rysunek 5.17).

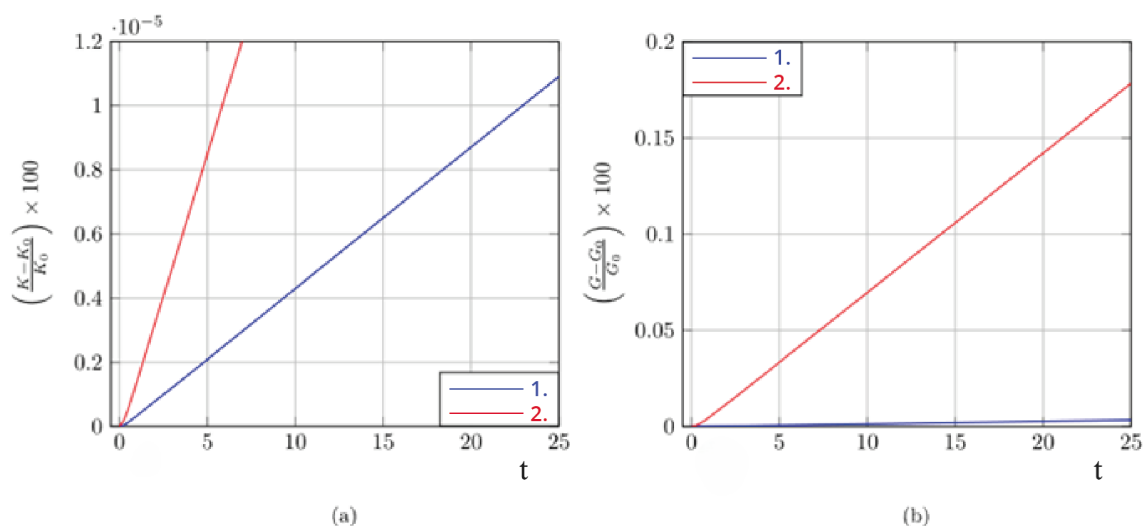
Analiza zmian sztywności, przedstawiona na rysunek 5.18, ujawnia ogólny wzrost wartości modułów K i G , co wynika z przyjęcia poziomu wymuszenia zewnętrznego większego od siły homeostatycznej odpowiadającej stanowi równowagi. Zarówno dla modułu objętościowego K , jak i modułu Kirchhoffa G , obserwuje się wyraźniejszy przyrost sztywności w punkcie zlokalizowanym na powierzchni próbki (rysunek 5.18). Różnica ta jest szczególnie widoczna w przypadku modułu postaciowego, podczas gdy w odniesieniu do modułu objętościowego pozostaje ona niemal pomijalna.



Rysunek 5.16: Hydrostatyczna część energii W_h w przypadku 3D

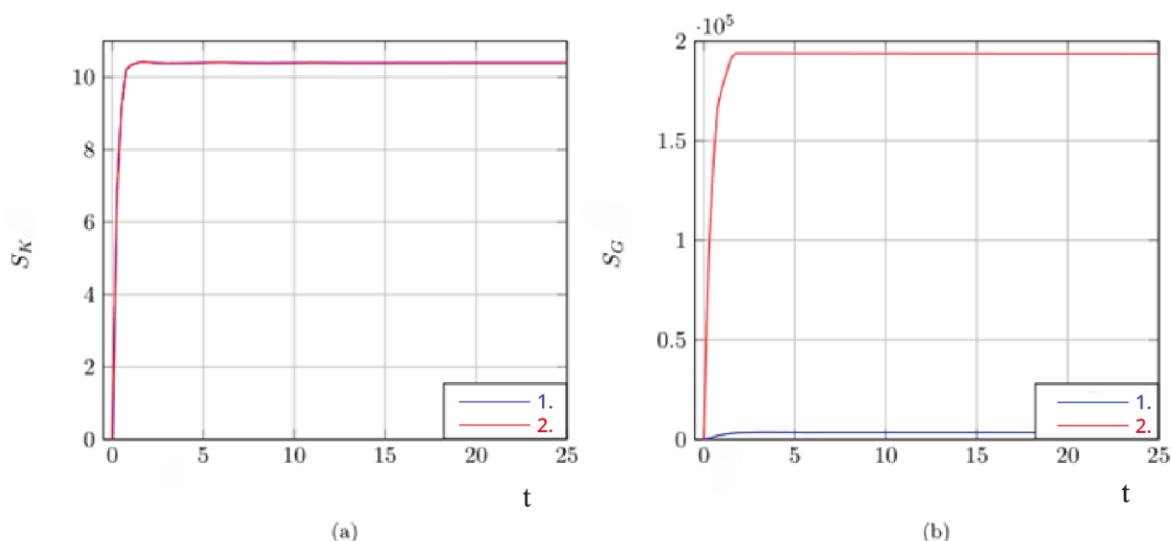


Rysunek 5.17: Dewiatorowa część energii W_d w przypadku 3D



Rysunek 5.18: Procentowa zmiana (a) modułu K , (b) modułu G w czasie t [doba] punktach kontrolnych (1) i (2)

Analiza przebiegów bodźców mechanicznych (rysunek 5.19) pokazuje, że na początku symulacji, w bardzo krótkim przedziale czasu, dochodzi do gwałtownego wzrostu ich wartości. Po tej fazie początkowej dynamika zmian wyraźnie spada, a wartości stabilizują się na niemal stałym poziomie aż do końca obliczeń.



Rysunek 5.19: Sygnał (a) S_K i (b) S_G [J] w czasie t [doba] punktach kontrolnych (1) i (2)

Ponieważ początkowo zarówno bodziec hydrostatyczny (S_K), jak i postaciowy (S_G) miały wartość zerową, różnice w tempie przyrostu są szczególnie dobrze widoczne. Największy wzrost dotyczy bodźca postaciowego w punkcie zlokalizowanym na powierzchni próbki — znacznie przewyższa on wartości obserwowane w pozostałych przypadkach, a zwłaszcza

przebiegi bodźca hydrostatycznego. Wartości S_K w analizowanych punktach są wyraźnie niższe niż odpowiadające im wartości S_G , zwłaszcza w punkcie kontrolnym (2) czyli na powierzchni próbki.

Wyniki wskazały, że moduł Kirchoffa G zmieniał się szybciej niż moduł objętościowy K , co potwierdza wrażliwość kości na ścinanie, co jest spójne z badaniami dotyczącymi wrażliwości osteocytów na tego rodzaju bodziec. Wyniki symulacji numerycznych potwierdziły poprawność przyjętej reprezentacji matematycznej, wykazując możliwość niezależnej modyfikacji parametrów sztywności kości w odpowiedzi na różne bodźce mechaniczne. Dyfuzja bodźców mechanicznych jest kluczowa dla homeostazy, a parametry dyfuzji mają kluczowe znaczenie, ponieważ większa dyfuzja powoduje bardziej równomierne rozłożenie sygnału, co wpływa na tempo i lokalizację przebudowy kości.

5.3 Wstęp do optymalizacji topologicznej cytoszkieletu komórki kości (osteocytu)

Badania nad architekturą cytoszkieletu oraz mechanizmami jego przebudowy mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia procesów warunkujących zachowanie i funkcjonowanie komórek. Cytoszkielet jest złożonym, dynamicznym układem, w którym filamenty aktynowe, mikrotubule oraz filamenty pośrednie współdziałają, tworząc wzajemnie powiązaną sieć zapewniającą zarówno mechaniczną stabilność komórki, jak i możliwość jej aktywnej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych.

Złożoność i silne sprzężenie pomiędzy poszczególnymi elementami cytoszkieletu sprawiają, że wyodrębnienie wpływu pojedynczych komponentów na ogólne zachowanie sieci jest wyjątkowo trudne. Filamenty nie działają w izolacji – ich funkcje i mechaniczne właściwości wynikają z synergii z innymi strukturami oraz z obecności białek towarzyszących, takich jak białka wiążące aktynę, kinezyiny czy dyneiny. Ponadto zmiany w jednym z podsystemów cytoszkieletu często inicjują kaskadę przebudów w pozostałych, prowadząc do globalnej modyfikacji architektury komórki. Właśnie ta nierozzerwalna współzależność elementów cytoszkieletu stanowi zarówno wyzwanie badawcze, jak i argument na rzecz prowadzenia szczegółowych analiz jego organizacji przestrzennej oraz mechanizmów przebudowy. Zrozumienie, w jaki sposób kształtuje się struktura cytoszkieletu w różnych stanach funkcjonalnych, jest niezbędne do opracowania wiarygodnych modeli mechaniki komórki,

a także do identyfikacji punktów kontrolnych, które mogą być potencjalnymi celami terapeutycznymi w chorobach związanych z dysfunkcjami szkieletu komórkowego, takich jak nowotwory, schorzenia neurodegeneracyjne czy defekty migracji komórek. W tym kontekście szczególnie uzasadnione jest zastosowanie optymalizacji topologicznej, która pozwala na ilościowe określenie w jaki sposób rozmieszczenie i połączenia elementów sieci wpływają na jej właściwości mechaniczne i zdolność adaptacji. Dzięki tej metodzie można w sposób systematyczny identyfikować konfiguracje strukturalne zapewniające optymalną równowagę pomiędzy sztywnością, elastycznością i odpornością na uszkodzenia, a także analizować wpływ lokalnych reorganizacji cytoszkieletu na zachowanie całego układu. Optymalizacja topologiczna umożliwia również odwzorowanie potencjalnych ścieżek przebudowy cytoszkieletu w odpowiedzi na różne bodźce, co stanowi istotny krok w kierunku tworzenia realistycznych modeli predykcyjnych. Tym samym metoda ta jest nie tylko narzędziem teoretycznym, ale może stać się kluczowym elementem integrującym dane eksperymentalne i symulacyjne w badaniach nad mechanobiologią komórki.

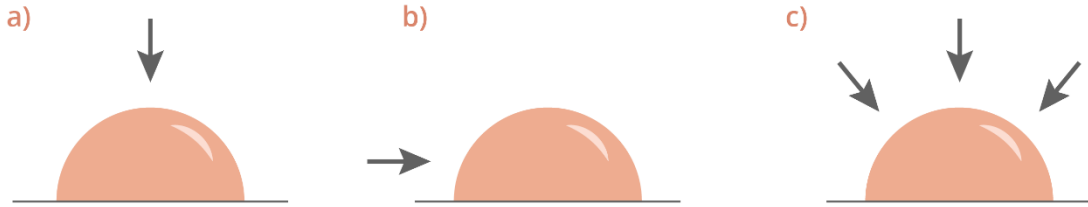
Pierwszym podejściem do optymalizacji topologicznej komórki osteocyty było utworzenie modelu w programie FreeFEM++ symulującego lokalną adaptację sztywności komórki wywołaną stanem naprężeń. Zmienną był moduł Younga $E(X)$, aktualizowany w odpowiedzi na gęstość energii sprężystej $W(X)$ względem poziomu odniesienia W_0 . Nałożono ograniczenia, że moduł Younga musi spełniać $E \in [E_{min}, E_{max}]$, zapobiec degeneracji lub nierealistycznemu wzrostowi sztywności. Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.4.

Tabela 5.4: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

E_0	ν	E_{min}	E_{max}	W_0	f	a	r
MPa	-	MPa	MPa	J	N	-	μm
2,1	0,28	0,5	5	10^{-4}	12	10^{10}	5

Zamodelowano półkolistą geometrię o promieniu r mającą odzwierciedlać przekrój poprzeczny komórki przyklejonej do podłoża, w której rozkład sztywności E_0 był jednolity w całej komórce. Nałożono warunki brzegowe Dirichleta odbierając wszystkie stopnie swobody dolnej krawędzi komórki – utwierdzając komórkę do podłoża. Obciążono komórkę siłą f na trzy sposoby:

- a) równoległe do podłoża (zgodnie z osią x), jak na rysunku 5.20a,
- b) prostopadle do podłoża (zgodnie z osią y), jak na rysunku 5.20b,
- c) równomiernie rozkładając siłę nacisku prostopadle do jego zakrzywionej krawędzi, jak na rysunku 5.20c.



Rysunek 5.20: Sposoby obciążenia komórki

Na podstawie nadanych wartości wyprowadzono parametry Lamégo:

$$\lambda = \frac{Ev}{(1 - 2\nu)(1 + \nu)} \quad (63)$$

Które w pierwszej iteracji wykorzystywały początkową sztywność E_0 i współczynnik Poissona ν .

Rozpatrywany materiał został przyjęty jako sprężysty liniowo i izotropowy. Zapisano równanie równowagi w formie słabej (wariacyjnej):

$$\int_{\Omega} (\lambda(\nabla \mathbf{u})(\nabla \mathbf{w}) + 2G\boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u}) : \boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{w})) d\Omega = \int_{\Gamma_2} \mathbf{T} \mathbf{w} d\Gamma \quad (64)$$

Przy wcześniej wspomnianych warunku Dirichleta na Γ_1 : $u = 0, v = 0$, czyli zamocowaniu komórki i warunku Neumanna Γ_2 : $\mathbf{T} = f\mathbf{N}$, gdzie

$\mathbf{N}$ - wektor normalny o składowych N_x i N_y ,

$\mathbf{u} = (u, v)$ - przemieszczenie o składowych w kierunkach x i y ,

$\mathbf{w} = (u_{test}, v_{test})$ – funkcja testowa w formie słabej,

$\boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u}) = \frac{1}{2}(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T)$ – tensor odkształcenia.

Bodziec do przebudowy został wyrażony proporcjonalnie do gęstości energii sprężystej:

$$W(\mathbf{X}) = \lambda(\nabla \mathbf{u})^2 + 2G\boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u}) : \boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u}) \quad (65)$$

Gdzie operacja oznaczona jako $\boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u}) : \boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{u})$ jest iloczynem wewnętrznym dwóch tensorów wynikającym z podstawienia wzoru na energię sprężystą do prawa Hooke'a.

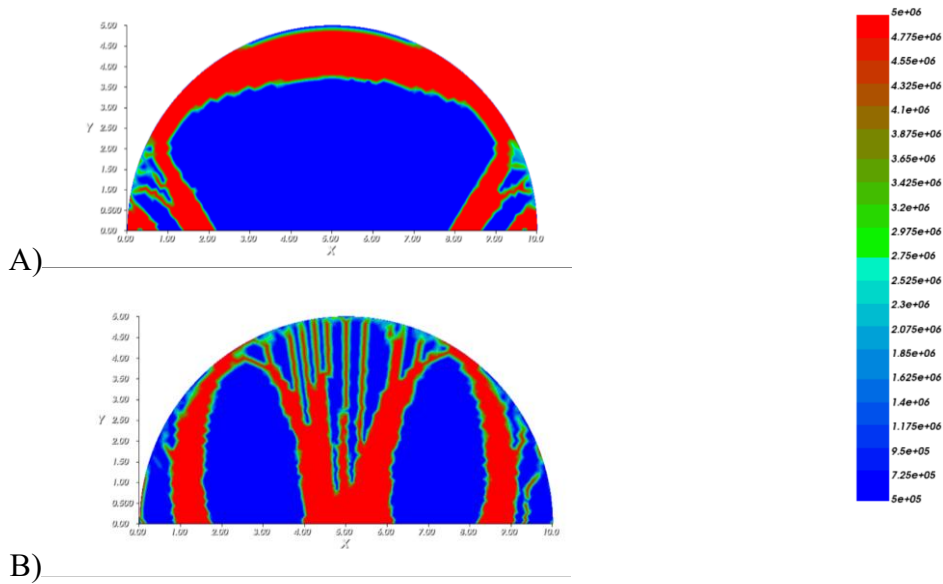
Po każdej iteracji aktualizowano wartość modułu Younga według równania:

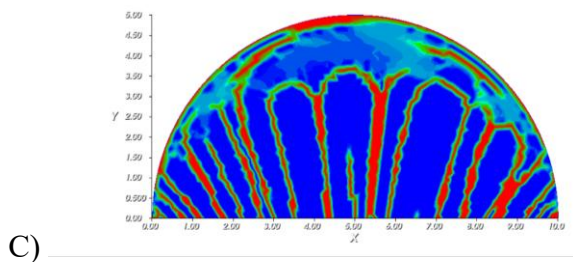
$$E^{k+1}(\mathbf{X}) = E^k(\mathbf{X}) + \frac{a}{j+1} (W(\mathbf{X}) - W_0) \quad (66)$$

Przy czym wartość modułu Younga $E_{min} < E^{k+1} < E_{max}$ przyjmuje wartości według zależności (34):

$$E^{k+1} = \begin{cases} E_{min} & \text{dla } E^{k+1} < E_{min} \\ E^{k+1} & \text{dla } E_{min} < E^{k+1} < E_{max} \\ E_{max} & \text{dla } E^{k+1} > E_{max} \end{cases} \quad (67)$$

A a jest współczynnikiem numerycznym sterującym szybkością zmian sztywności.





Rysunek 5.21: Komórka obciążona A) równoległe do podłoża, B) prostopadle do podłoża, C) normalną do powierzchni komórki

Na podstawie opisanego modelu przeprowadzono symulacje w trzech wariantach obciążenia. Ich celem było zaprezentowanie przebudowy struktury (rozmieszczenia sztywności) jako analogii do reorganizacji cytoszkieletu komórkowego w odpowiedzi na oddziaływania mechaniczne z otoczenia. Wyniki przedstawione na rysunku 5.21 pokazały, że w każdym wariantcie w obszarach o podwyższonej energii sprężystej moduł Younga wzrastał, a w strefach o niskim obciążeniu jego wartość zmniejszała się, co odzwierciedla obserwowaną *in vitro* i *in vivo* tendencję cytoszkieletu do wzmacniania elementów przenoszących siły oraz redukcji połączeń w rejonach nieaktywnych mechanicznie.

Cytoszkielecik osteocytów odgrywa kluczową rolę w ich wytrzymałości mechanicznej, ponieważ zapewnia strukturalną integralność komórki, umożliwia mechanotransdukcję oraz współpracuje z innymi częściami komórki w adaptacji do sił mechanicznych. Boddce mechaniczne, takie jak przepływ płynu międzykomórkowego czy siły rozciągające, indukują reorganizację cytoszkieletu. Na przykład, w osteocytach naprężenia mechaniczne prowadzą do zmian w filamentach aktynowych i mikrotubulach, co umożliwia odpowiedź na bodźce mechaniczne. Filamenty aktynowe, które tworzą strukturę cytoszkieletu, muszą być odpowiednio rozmieszczone, aby spełniały funkcje mechaniczne i transportowe w komórce. Zastosowanie optymalizacji topologicznej w tym przypadku pozwala na badanie, jak zmiana gęstości i rozmieszczenia filamentów wpływa na strukturę cytoszkieletu w odpowiedzi na zmieniające się warunki mechaniczne (np. naprężenia).

5.4 Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocyty – model 2D

Komórkę zamodelowano jako ciągły materiał liniowo-sprężysty, co pozwala zastosować narzędzia inżynierskie do analizy zjawisk zachodzących w skali biologicznej. Rozważany problem optymalizacyjny sformułowano jako maksymalizację globalnej sztywności przy jednoczesnej minimalizacji całkowitej energii sprężystości. Przyjęto, że proces adaptacji struktury komórki, tzn. jej kształtu, a przede wszystkim struktury cytoszkieletu wynika ze sprzężenia zwrotnego w którym gęstość i układ cytoszkieletu są powiązane z siłami zewnętrznymi oddziałującymi na komórkę. Takie podejście jest uzasadnione, ponieważ proces adaptacji struktury komórki, w szczególności jej kształtu oraz układu i gęstości cytoszkieletu, można postrzegać jako sprzężenie zwrotne: rozmieszczenie elementów cytoszkieletu wpływa na sposób przenoszenia obciążeń, a z kolei rozkład naprężeń i odkształceń modyfikuje organizację cytoszkieletu.

Do kolejnych symulacji wykorzystano program COMSOL Multiphysics. Przeprowadzane symulacje numeryczne metodą elementów skończonych mają na celu umożliwienie:

- ilościowej oceny wpływu różnych scenariuszy obciążeń na kształt i rozkład sztywności,
- lepsze zrozumienie mechanizmów adaptacyjnych cytoszkieletu,
- tworzenie hipotez, które można później weryfikować eksperymentalnie.

Cytoszkielet jest interpretowany jako przestrzenny rozkład materiału, który może się lokalnie zagęszczać lub zanikać. W omawianym podejściu przyjęto, że na początku symulacji materiał tworzący beleczki jest jednorodny i izotropowy. W rzeczywistości jednak mamy do czynienia ze strukturą zbudowaną z tysięcy mikroskopijnych beleczek o zróżnicowanej orientacji i sztywności. W efekcie, po uśrednieniu (homogenizacji) ich właściwości, w skali komórkowej uzyskany rozkład materiału tworzącego cytoszkielet będzie wykazywał cechy anizotropowe i niejednorodne. Cytoszkielet jest więc interpretowany jako przestrzenny rozkład materiału, który może się lokalnie zagęszczać lub zanikać.

Do przeprowadzonych symulacji metodą elementów skończonych wykorzystano metodę gęstości w optymalizacji topologicznej, w której zdefiniowano zmienną kontrolną $\theta_c(\mathbf{X})$, która określa obecność materiału w danym punkcie, gdzie:

$$\theta_{min} \leq \theta_c(\mathbf{X}) \leq 1 \quad (68)$$

Każdy element siatki lub węzeł ma przypisaną wartość zmiennej kontrolnej, której wartość 1 oznacza pełny materiał, a $= 10^{-9/p}$ brak materiału, nie przyjęto wartości 0, żeby zapobiec osobliwościom, gdzie parametr p jest wykładnikiem penalizacji w metodzie SIMP.

Optymalizacja topologii wymaga regularyzacji [121], która eliminuje występowanie artefaktów numerycznych związanych z rozdzielczością siatki, w tym przypadku zastosowano równanie Helmholtz'a :

$$\theta_f = R_{min}^2 \nabla^2 \theta_f + \theta_c \quad (69)$$

Gdzie θ_f to przefiltrowana zmienna kontrolna, a R_{min} to minimalna skala długości, w tym przypadku oznaczająca minimalny rozmiar krawędzi siatki. W celu uniknięcia wartości pośrednich zastosowano funkcję projekcji:

$$\theta = \frac{\tanh(\beta(\theta_f - \theta_\beta)) + \tanh(\beta\theta_\beta)}{\tanh(\beta(1 - \theta_\beta)) + \tanh(\beta\theta_\beta)} \quad (70)$$

Gdzie β to parametr stromości (ostrości) projekcji, a θ_β to punkt środkowy projekcji. Im większa jest wartość β tym ostrzejsza jest granica pomiędzy pełnym materiałem a pustką. Wybrano model interpolacji SIMP (ang. *Solid Isotropic Material with Penalization*). W metodzie SIMP stosuje się penalizację modułu Younga:

$$E(\theta) = \theta^p E_0 \quad (71)$$

gdzie:

p to współczynnik penalizacji, który musi przyjmować wartości większe od zera $p \geq 0$, wpływa on na wartości pośrednie zmiennej kontrolnej, jego zwiększanie prowadzi do rozwiązań o wartościach skokowych, eliminując wartości pośrednie, E_0 to początkowy moduł Younga.

Optymalizacja kontroluje nie tylko gdzie znajduje się materiał, ale także jakie są jego właściwości w danym miejscu, co pozwala na płynne przejścia między pełnym materiałem a pustką. Dla równowagi statycznej można wyprowadzić funkcjonal prac wirtualnych:

$$\Pi(\mathbf{u}) = \int_{\Omega} W d\Omega - \int_{\Gamma} F u d\Gamma \quad (72)$$

Gdzie funkcja podcałkowa

$$W = \frac{\sigma_{ij} \varepsilon_{ij}}{2} \quad (73)$$

jest gęstością energii sprężystej. Zatem pierwsza całka reprezentuje energię sprężystą, a drugi człon odpowiada za pracę sił zewnętrznych działających na powierzchni Γ . Minimalizacji podlega podatność $J(\theta)$, czyli dwukrotność energii sprężystości, ponieważ celem zabiegu jest optymalizacja rozkładu naprężeń w komórce, czyli utrzymanie homeostazy.

$$\min J(\theta) = \min 2W(\theta) = \min 2 \int_{\Omega} \frac{\sigma_{ij} \varepsilon_{ij}}{2} d\Omega \quad (74)$$

Nałożono ograniczenie objętości, które dla przypadku dwuwymiarowego zostało sformułowane:

$$\frac{1}{A} \int_{\Omega} \theta(\mathbf{X}) d\Omega \leq V \quad (75)$$

Gdzie

A – pole powierzchni,

V – parametr określający procent objętości, wypełnionej materiałem.

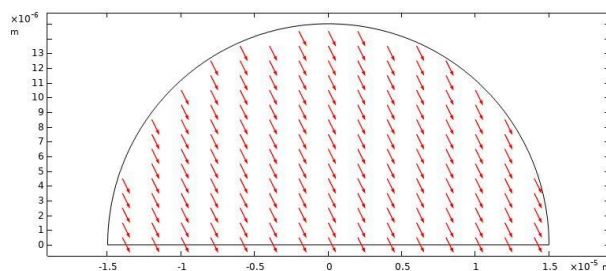
Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.5

Tabela 5.5: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

E_0	ν_0	ρ_0	f	r
MPa	-	kg/m ³	N	μm
2,1	0,28	1250	0,001	15

Zamodelowano półkolistą geometrię o promieniu r mającą odzwierciedlać przekrój poprzeczny komórki przyklejonej do podłoża. Nałożono warunki brzegowe Dirichleta odbierając wszystkie stopnie swobody dolnej krawędzi komórki– utwierdzając komórkę do

podłoża. Obciążono komórkę całkowitą siłą $-f/2$ w kierunku osi x i f w kierunku osi y , jak na rysunku 5.22.



Rysunek 5.22: Obciążenie komórki

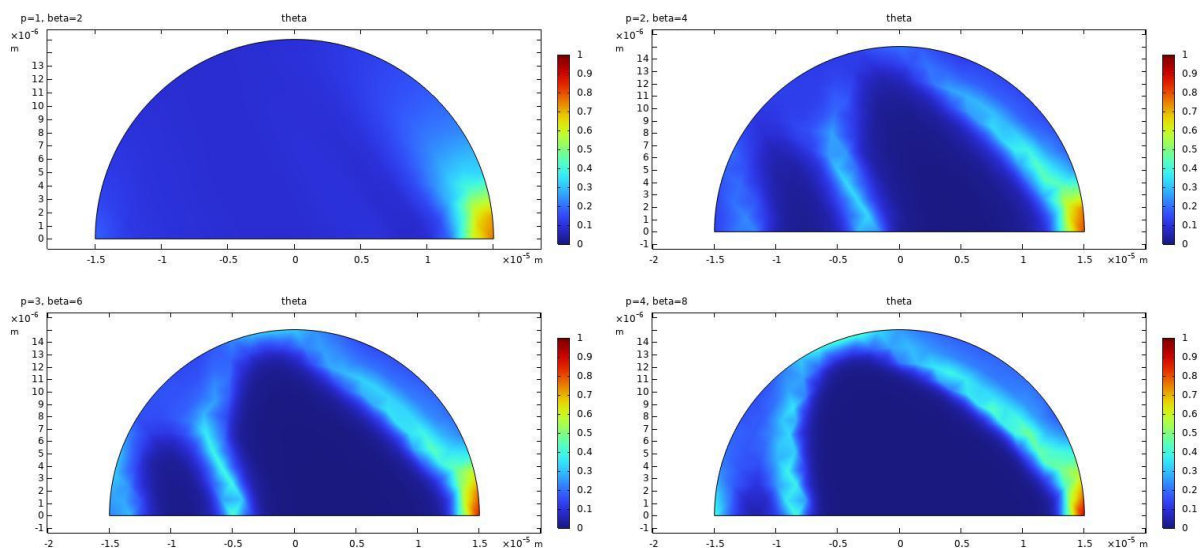
Efektom przeprowadzonych symulacji są zoptymalizowane struktury cytoszkieletu zależne od obciążeń zewnętrznych f . Symulacje wykonano dla różnych parametrów wejściowych optymalizacji w celu analizy ich wpływu na uzyskaną topologię jak w tabeli 5.6.

Tabela 5.6: Wartości parametrów optymalizacji użytych w symulacjach numerycznych.

R_{min}	p	β
MPa	-	-
2,1	1	2
	2	4
	3	6
	4	8

Wyniki symulacji, przedstawione na rysunku 5.23 ukazują zależność $\theta(\mathbf{X})$ od parametrów optymalizacji topologicznej.

Po przeprowadzeniu wstępnej analizy zmian przebiegu parametru θ oraz jego rozkładu w ramach optymalizacji topologicznej, wykonano kolejne symulacje z uwzględnieniem obecności jądra komórkowego. Wybór ten był uzasadniony faktem, iż jądro pełni nie tylko funkcję centralnego ośrodka regulacyjnego, lecz także istotnie wpływa na procesy przebudowy cytoszkieletu oraz na redystrybucję sił wewnątrz komórki. Uzyskane wyniki pokazały charakterystyczny rozkład modułu Younga, odpowiadający przestrzennemu zróżnicowaniu sztywności elementów cytoszkieletu. Struktura ta została zilustrowana na rysunkach 5.25, 5.26, 5.27, 5.28.



Rysunek 5.23: Zależność $\theta(X)$ od parametrów p i β

Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.7

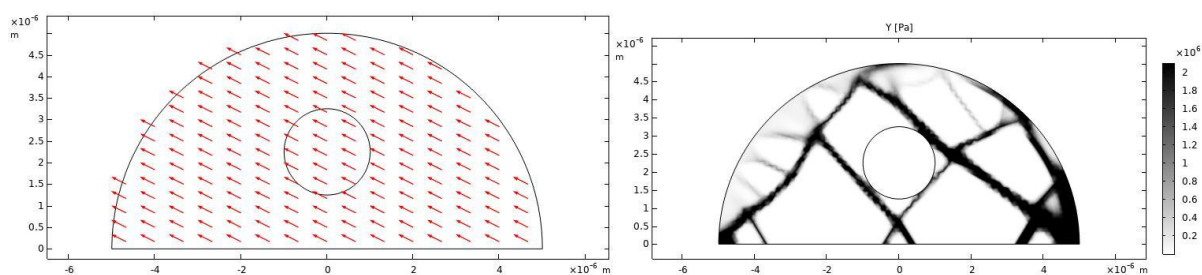
Tabela 5.7: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

E_0	ν_0	ρ_0	Y_n	ν_n	ρ_n	f	r	r_n	p
MPa	-	kg/m ³	MPa	1	kg/m ³	N	μm	μm	-
2,1	0,28	1250	3,34	0,3	1000	0,0001	5	1	5

Parametry z indeksem n dotyczą własności materiałowych i geometrycznych jądra komórkowego.

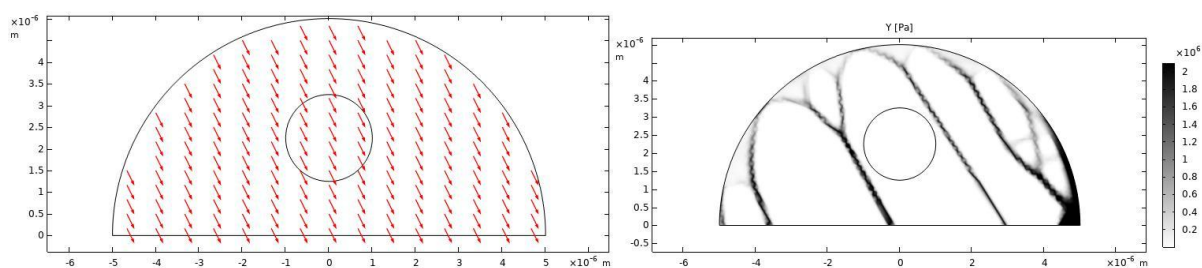
Symulacje zostały przeprowadzone dla różnych obciążeń w układzie odniesienia x-y.

1. obciążenia f w kierunku x, obciążenia $-f/2$ w kierunku y, jak na rysunku 5.24



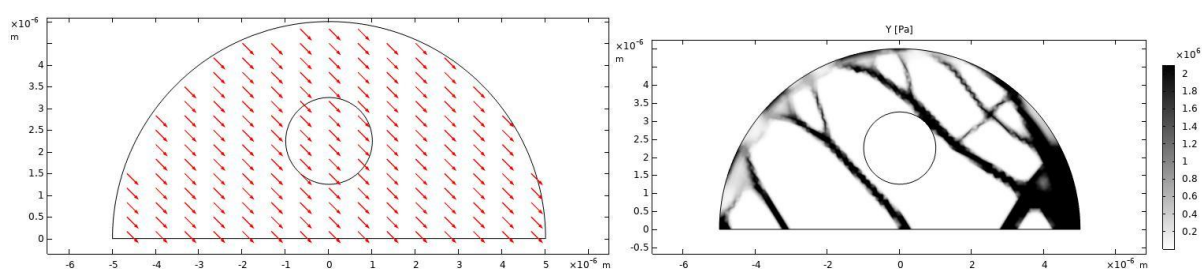
Rysunek 5.24: Obciążenie i komórki i wyniki symulacji

2. obciążenia $-f/2$ w kierunku x, obciążenia f w kierunku y, jak na rysunku 5.25



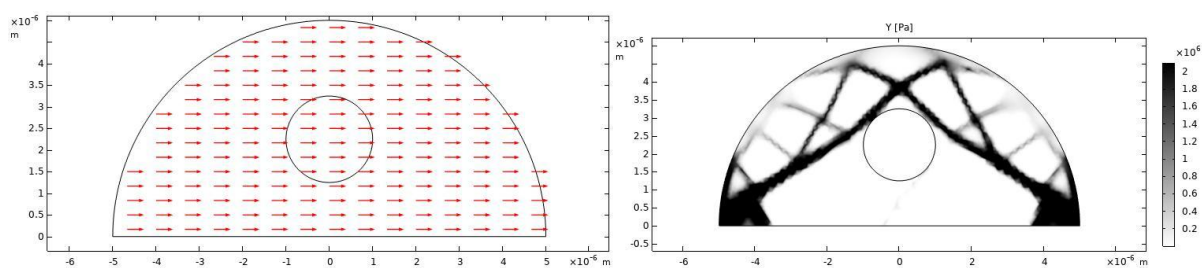
Rysunek 5.25: Obciążenie komórki i wyniki symulacji

3. obciążenia $-f$ w kierunku x, obciążenia f w kierunku y, jak na rysunku 5.26,



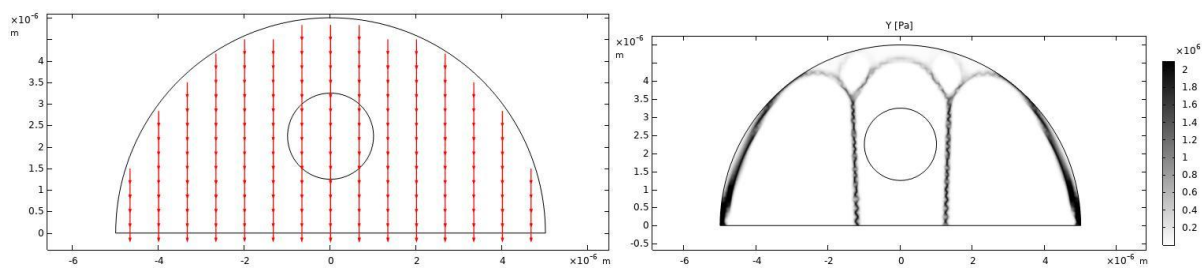
Rysunek 5.26: Obciążenie komórki i wyniki symulacji

4. obciążenia $-f$ w kierunku x, obciążenia 0 w kierunku y, jak na rysunku 5.27,



Rysunek 5.27: Obciążenie komórki i wyniki symulacji

5. obciążenia 0 w kierunku x, obciążenia f w kierunku y, jak na rysunku 5.28,



Rysunek 5.28: Obciążenie komórki i wyniki symulacji

Uzyskane wyniki symulacji optymalizacji topologicznej w modelu dwuwymiarowym należy ocenić jako wyjątkowo interesujące i obiecujące. Już na tym etapie analizy widoczna była wyraźna tendencja do samoorganizacji układu w struktury przypominające charakterystyczne układy włókien cytoszkieletu. Szczególnie istotne jest to, że rozkład parametru θ oraz jego ewolucja w czasie prowadziły do powstania wyraźnych stref o podwyższonej sztywności, odpowiadających regionom wzmożonego przenoszenia obciążeń. Rozkład modułu Younga w zoptymalizowanej geometrii odzwierciedlał funkcjonalne zróżnicowanie cytoszkieletu, z obszarami koncentracji materiału. Nawet w uproszczonym podejściu dwuwymiarowym możliwe jest uzyskanie wyników, które nie tylko są zgodne z intuicją biomechaniczną, ale wręcz odsłaniają mechanizmy odpowiadające za adaptacyjną przebudowę cytoszkieletu. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że optymalizacja topologiczna może stanowić dobre narzędzie do badania wewnątrzkomórkowej organizacji struktur nośnych i jej zależności od warunków mechanicznych.

Komórka jest strukturą niezwykle dynamiczną, dlatego jej przebudowę należy rozważać w czasie przy zmiennym obciążeniu.

$$\frac{dE}{dt} = \alpha F(\mathbf{X}, t) \quad (76)$$

Gdzie α jest stałym współczynnikiem adaptacyjnym i skaluje stopień wpływu środowiska zewnętrznego na przebudowę wewnętrzną, E jest sztywnością zależną od badanego punktu przestrzennego i czasowego, o ograniczeniach:

$$E_{min} \leq E(\mathbf{X}, t) \leq E_{max} \quad (77)$$

a F to siły zewnętrzne oddziałujące na komórkę - impuls mechaniczny; jeżeli jest minimalizowany to całość dąży do zera.

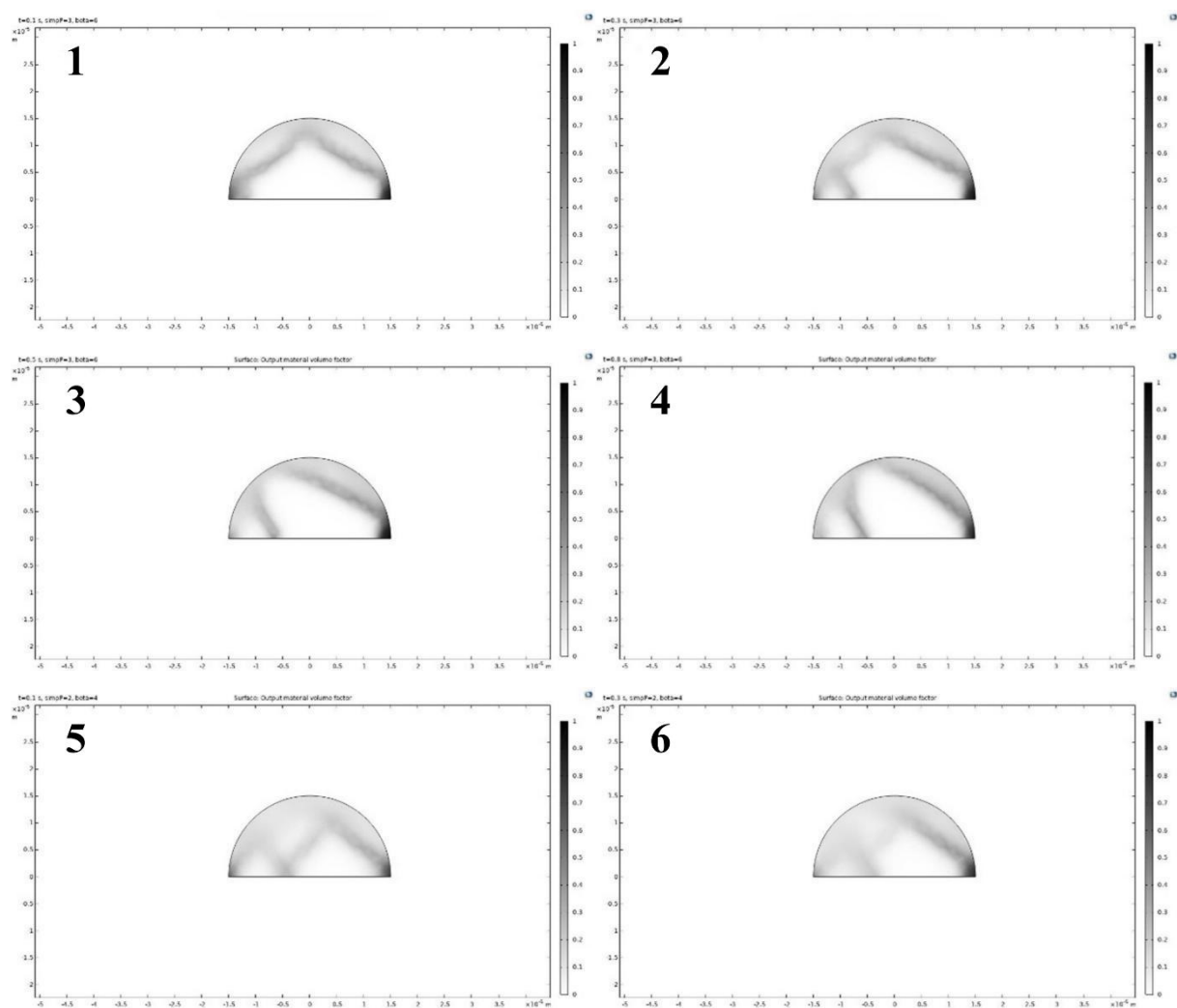
Tabela 5.8: Wartości parametru $t[s]$ użyte w symulacjach numerycznych

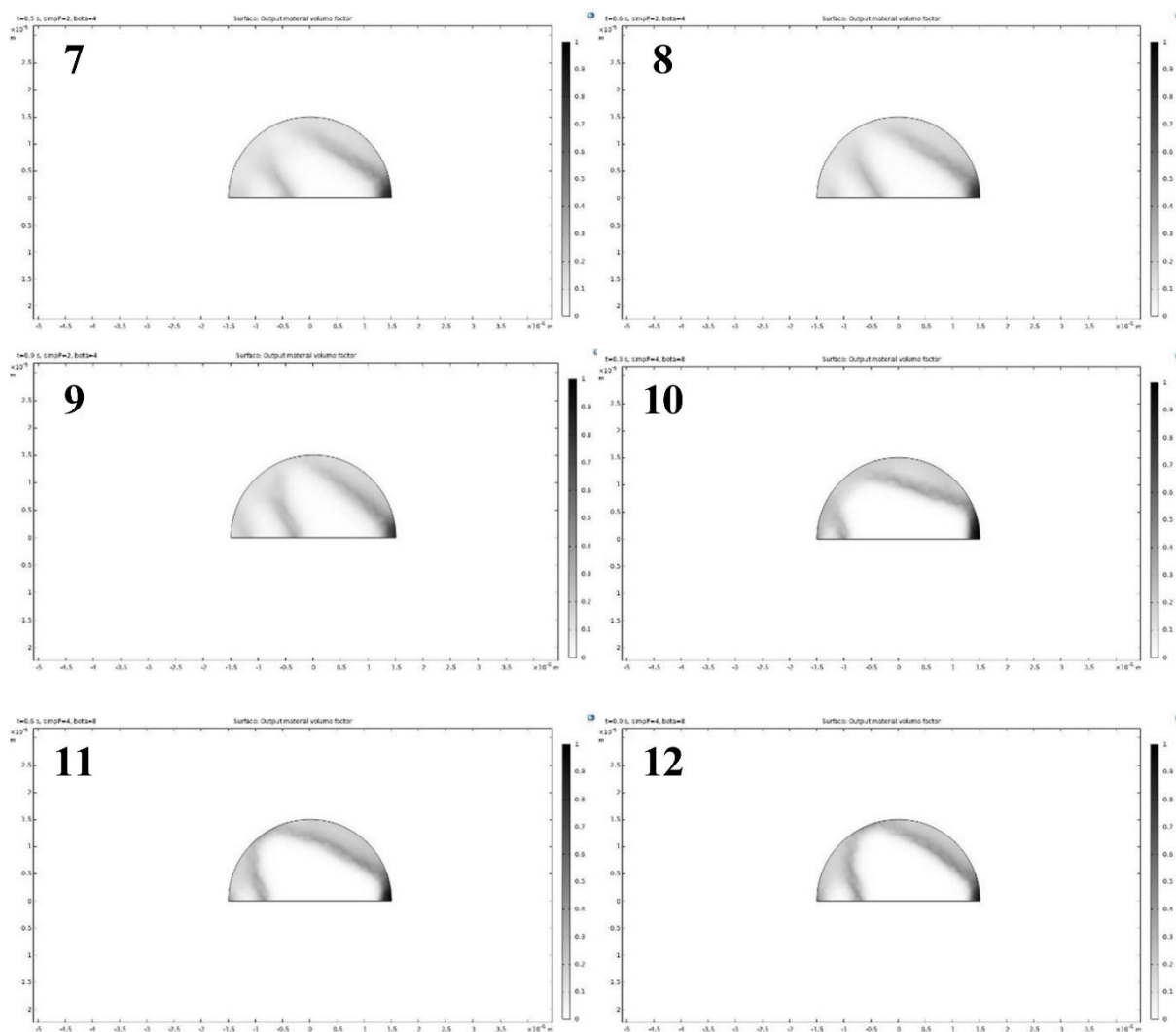
Lp.	t	p	β
1	0,1	3	6
2	0,3	3	6
3	0,5	3	6
4	0,8	3	6
5	0,1	2	4

6	0,3	2	4
7	0,5	2	4
8	0,6	2	4
9	0,9	2	4
10	0,3	4	8
11	0,6	4	8
12	0,9	4	8

Symulacje przeprowadzono także dla różnych współczynników p i β oraz dla obciążenia zmiennego w czasie $F = f \sin(t)$ dla wartości czasu podanych w tabeli 5.8.

Wyniki symulacji dla różnych wartości t przedstawia rysunek 5.29.





Rysunek 5.29: Wyniki symulacji dla różnych wartości t podanych w tabeli 5.8.

5.5 Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocyty – model 3D

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników oraz ich zgodności z obserwacjami eksperymentalnymi zaproponowano rozszerzenie analizowanego przypadku do modelu trójwymiarowego. Umożliwia on pełniejsze odwzorowanie złożonej architektury cytoszkieletu, a także pozwala na bardziej realistyczne odtworzenie rozkładu naprężeń i właściwości mechanicznych w objętości komórki. W tym przypadku rozważano komórkę o kształcie połowy elipsoidy o długości L_x , szerokości L_y i wysokości L_z .

Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.9.

Tabela 5.9: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

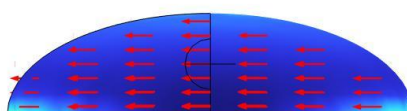
E_0	ν_0	ρ_0	E_n	ν_n	ρ_n	f	L_x	L_y	L_z	r_n	p
MPa	-	kg/m ³	MPa	-	kg/m ³	N	μm	μm	μm	μm	-
2,1	0,28	1250	3,34	0,3	1000	0,001	30	24	15	3,75	4

Podobnie jak poprzednio symulację przeprowadzono dla różnych parametrów SIMP optymalizacji topologicznej, przedstawionych w tabeli 5.10.

Tabela 5.10: Wartości parametrów SIMP użytych w symulacjach numerycznych

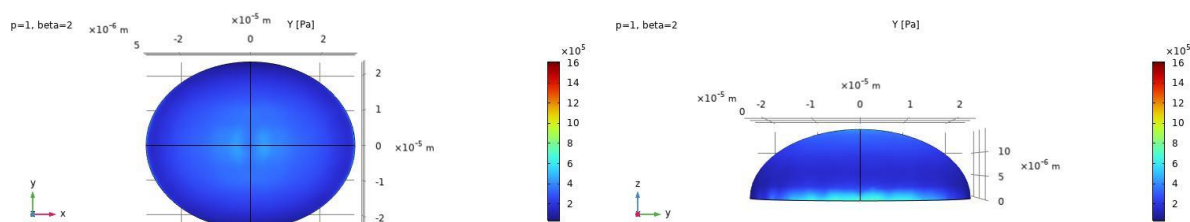
R_{min}	p	β
MPa	-	-
2,1	1	2
	2	4
	3	6
	4	8

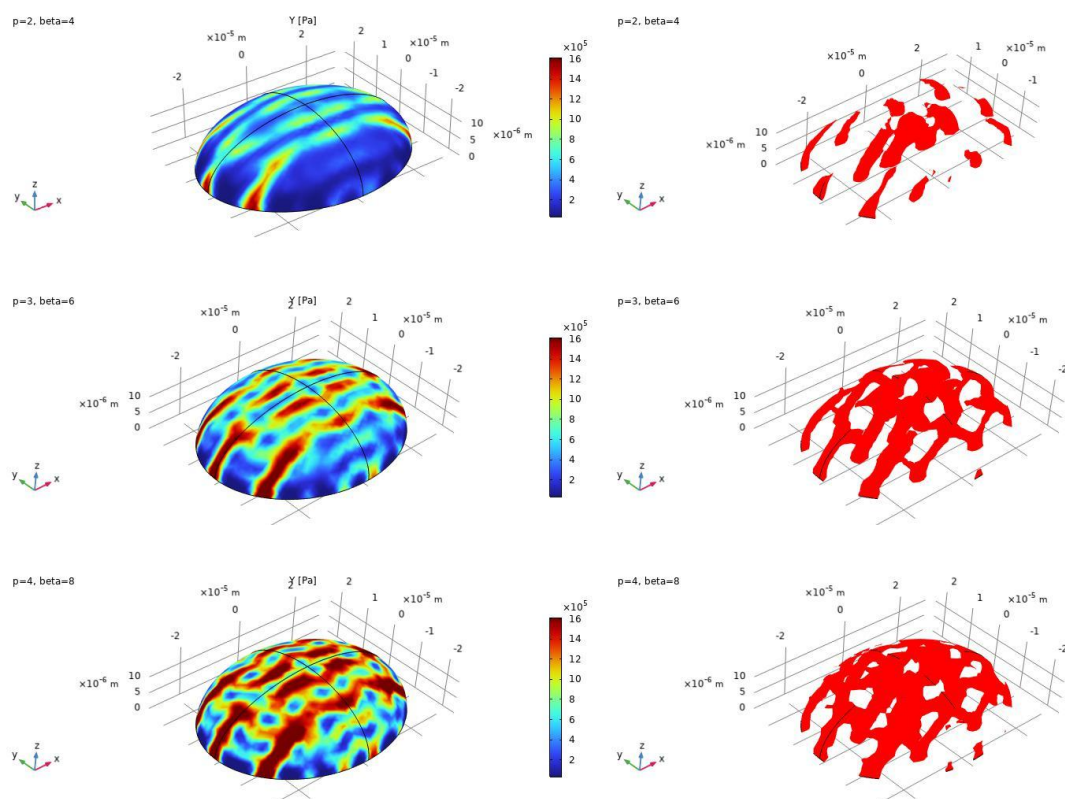
Komórkę obciążono siłą F o rozkładzie imitującym przepływ $F = f \left(\frac{L_z}{z} \right)^2$ zgodnie z kierunkiem zaprezentowanym na rysunek 5.30.



Rysunek 5.30: Obciążenie trójwymiarowej komórki

Przeprowadzono optymalizację topologiczną, a otrzymana struktura została przedstawiona na rysunku 5.31.

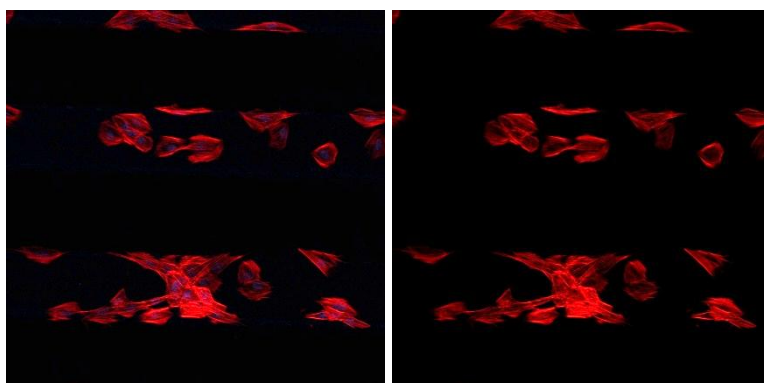




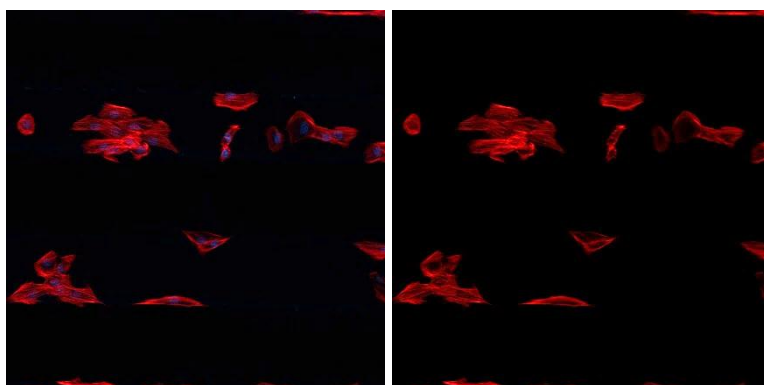
Rysunek 5.31: Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocyty 3D dla różnych parametrów p i β

Wyniki przeprowadzonych symulacji trójwymiarowych zostały zestawione z obserwacjami eksperymentalnymi komórek poddanych działaniu przepływu, które uzyskano dzięki uprzejmości mgr. inż. Dominika Kołodziejka, doktoranta prof. dr hab. inż. Agnieszki Jastrzębskiej z Wydziału Chemii, PW. W badaniach eksperymentalnych analizowano komórki sercowe, gdyż właśnie ten typ komórek, podobnie jak komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, jest w naturalnych warunkach najbardziej narażony na oddziaływania związane z przepływem płynów. Porównanie wyników symulacji z obrazami rzeczywistych komórek pozwoliło na dodatkową weryfikację poprawności przyjętego modelu oraz ocenę jego zdolności do odwzorowania charakterystycznych zjawisk mechanicznych zachodzących w warunkach fizjologicznych. Komórki umieszczono w kanałach o różnych wymiarach i obciążano je przepływem. Dla celów porównawczych zaprezentowano obrazy mikroskopowe komórek poddanych działaniu przepływu oraz grupy kontrolnej, czyli komórek hodowanych w takich samych warunkach, ale nie poddanych obciążeniu. Poniżej zaprezentowano dwa przypadki.

1. Komórki obciążane przepływem o prędkości $2 \frac{\mu l}{min}$ przez 2h w kanale o szerokości $100\mu m$ i wysokości $50\mu m$ przedstawiono na rysunkach 5.32 i 5.33.

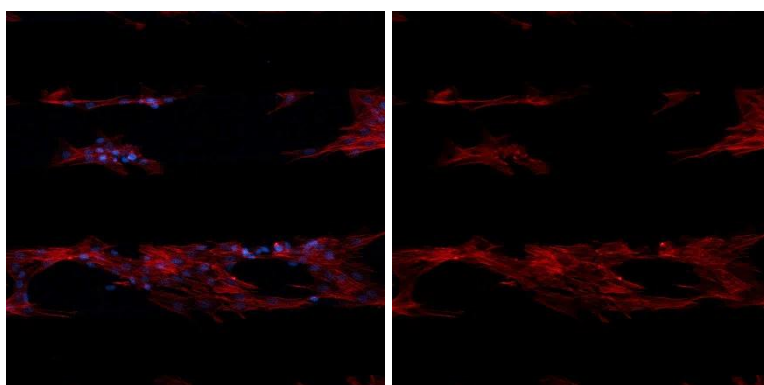


Rysunek 5.32: Komórki obciążone przepływem w kanale $100\mu m$

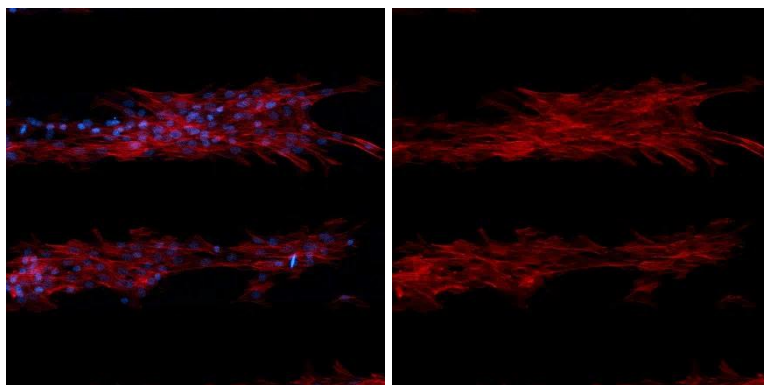


Rysunek 5.33: Komórki obciążone przepływem w kanale $100\mu m$

Komórki z próby kontrolnej wyhodowane w kanale o takich samych wymiarach przedstawiają rysunki 5.34 i 5.35.

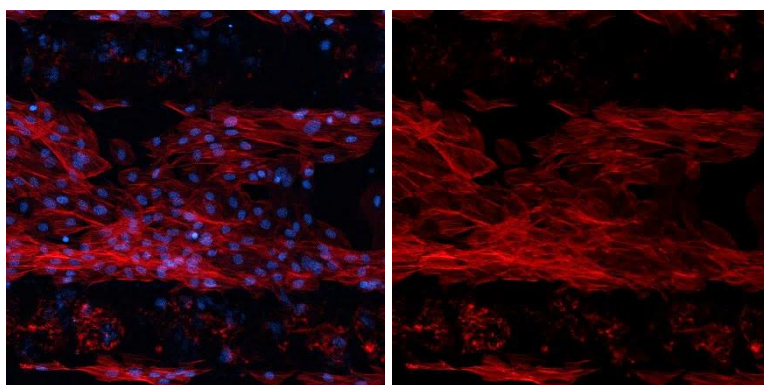


Rysunek 5.34: Komórki nieobciążone przepływem w kanale $100\mu m$

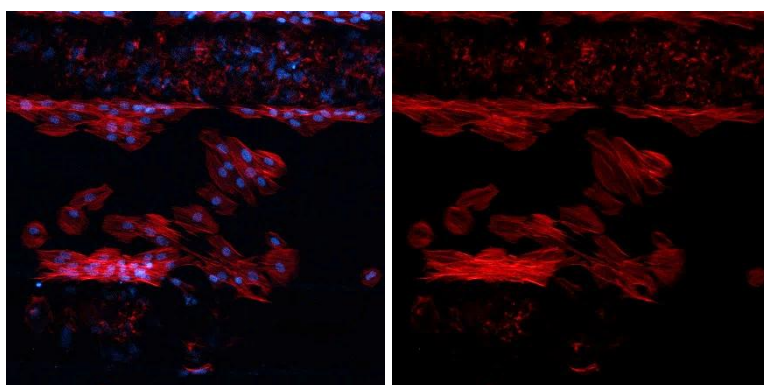


Rysunek 5.35: Komórki nieobciążone przepływem w kanale 100µm

2. Komórki obciążane przepływem o prędkości $2 \frac{\mu l}{min}$ przez 2h w kanale o szerokości 300µm i wysokości 50µm, przedstawiono na rysunkach 5.36 i 5.37.

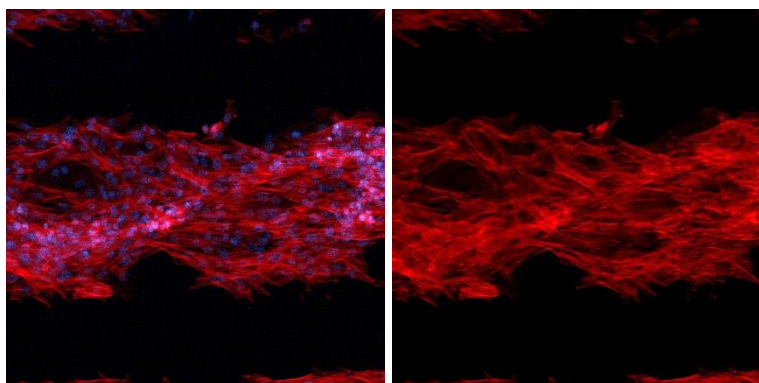


Rysunek 5.36: Komórki obciążone przepływem w kanale 300µm



Rysunek 5.37: Komórki obciążone przepływem w kanale 300µm

Komórki z próby kontrolnej wyhodowane w kanale o takich samych wymiarach przedstawia rysunek 5.38.



Rysunek 5.38: Komórki nieobciążone przepływem w kanale 300μm

Na przedstawionych zdjęciach komórki obserwowane dzięki mikroskopowi odwróconemu, na czerwono zabarwiony jest cytoszkielet aktynowy, natomiast niebieskie barwienie wskazuje położenie jąder komórkowych. Analiza obrazów pozwala zaobserwować wyraźne uporządkowanie i wzmocnienie włókien aktynowych w kierunku działania przepływu, czyli zgodnie z długością kanału, co wskazuje na adaptacyjną przebudowę cytoszkieletu w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne.

Ze względu na ograniczenia mocy obliczeniowej dalsze analizy prowadzono w oparciu o model dwuwymiarowy. Takie podejście pozwoliło na znaczące zmniejszenie kosztów obliczeniowych przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do symulacji kluczowych zjawisk mechanicznych związanych z organizacją i przebudową cytoszkieletu. Choć model 2D stanowi uproszczenie względem rzeczywistej architektury komórki, jego wyniki dostarczyły cennych informacji na temat kierunków rozkładu naprężeń, koncentracji sztywności oraz powstawania charakterystycznych struktur odpowiadających za przenoszenie obciążeń wewnątrz komórki.

5.6 Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu komórki kości (osteocyty) obciążonej przepływem

Kolejnym etapem badań było rozszerzenie symulacji o kanał z przepływem, w którym umieszczono modelowaną komórkę. Dzięki temu możliwe stało się odtworzenie warunków zbliżonych do środowiska *in vivo*, w którym komórki doświadczają oddziaływań mechanicznych generowanych przez przepływ cieczy. Pozwoliło to nie tylko na lepsze

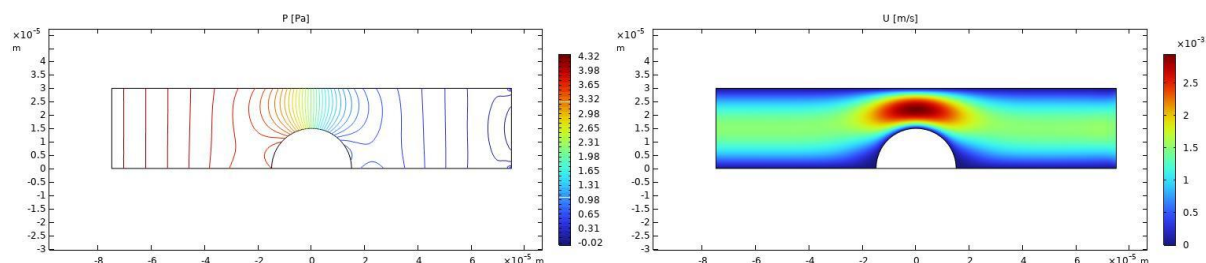
odzworowanie rzeczywistych warunków eksperymentalnych, ale również na analizę przebudowy cytoszkieletu w odniesieniu do kierunku przepływu oraz jego intensywności.

Wartości materiałowe komórki są zgodne z tabelą 5.7. Wartości pozostałych parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.11

Tabela 5.11: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

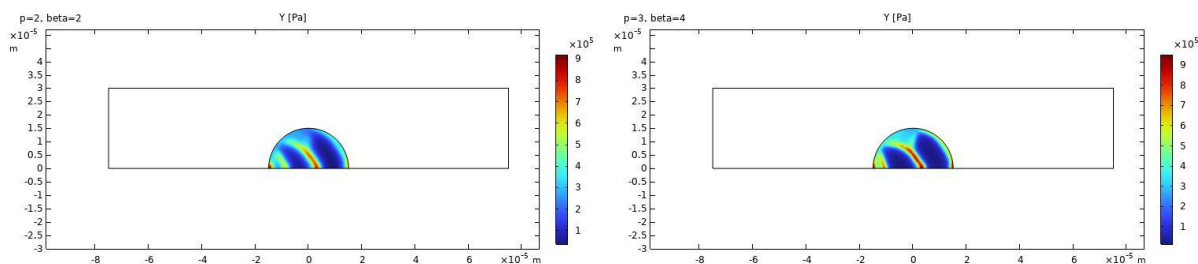
U_{av}	l	h	T	$\rho_f(T)$	μ	P_0	p	β
m/s	μm	μm	K	kg/m^3	$\text{Pa}\cdot\text{s}$	Pa	1	1
0,001	150	30	293,15	996,59	0,3	0	2	2
							3	4

Zamodelowano półkolistą geometrię o promieniu r odzwierciedlającą przekrój poprzeczny komórki przyklejonej do podłoża. Nałożono warunki brzegowe Dirichleta odbierając wszystkie stopnie swobody krawędzi dolnej komórki – utwierdzając komórkę do podłoża. Komórkę umieszczono w kanale o długości l i wysokości h , w którym zamodelowano przepływ o średniej prędkości U_{av} na wlocie i ciśnieniu P_0 na wylocie, przepływ zamodelowano jako laminarny, jak przedstawiono na rysunku 5.39.



Rysunek 5.39: Symulacja numeryczna przepływu

Przeprowadzono optymalizację topologiczną modelu komórki umieszczonej w warunkach przepływu. Celem tej analizy było zbadanie, w jaki sposób rozkład sił ścinających i naprężeń hydrodynamicznych wpływa na reorganizację cytoszkieletu, wyniki zostały przedstawione na rysunku 5.40.



Rysunek 5.40: Symulacja numeryczna komórki obciążonej przepływem

Wyniki pokazały wyraźne wzmocnienie i uporządkowanie wzdłuż kierunku przepływu. W przeprowadzonych symulacjach nie uwzględniono jądra komórkowego, co wynikało z ograniczeń mocy obliczeniowej oraz z faktu, że w analizowanym przypadku nie zakładano zmian jego kształtu. Takie uproszczenie pozwoliło skoncentrować się na procesach reorganizacji cytoszkieletu aktynowego pod wpływem przepływu, przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiej efektywności obliczeń.

5.7 Sygnał biochemiczny – obecność jonów wapnia (Ca^{2+})

Osteocyty, jako główne komórki sensoryczne kości, odgrywają kluczową rolę w translacji bodźców mechanicznych na odpowiedź biologiczną, czyli mechanotransdukcji. Centralnym elementem tego procesu jest cytoszkielet aktynowy, którego przebudowa warunkuje zdolność komórki do adaptacji strukturalnej i funkcjonalnej. W literaturze [27], [122] podkreśla się, że jednym z najważniejszych mediatorów tej przebudowy są jony wapnia (Ca^{2+}), których gwałtowny napływ do cytoplazmy stanowi pierwszą odpowiedź osteocytów na obciążenie mechaniczne, takie jak odkształcenia macierzy kostnej czy przepływ płynu w kanalikach.

Mechaniczna deformacja błony komórkowej oraz aktywacja integrzyn w obrębie połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową prowadzą do otwarcia kanałów jonowych i gwałtownego wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Zmiana ta uruchamia kaskadę sygnałową, w której aktywowane są białka wiążące aktynę, takie jak gelsolina, prowadząc do cięcia filamentów aktynowych i powstawania dużej liczby wolnych końców zdolnych do polimeryzacji. W efekcie cytoszkielet podlega dynamicznej reorganizacji, a wzmocnione filamenty aktynowe mogą być stabilizowane poprzez α -aktyninę i sprzęgane z filamentami miozyny II. Równolegle Ca^{2+} indukuje fosforylację miozyny, co promuje tworzenie filamentów bipolarnych i umożliwia powstawanie włókien cytoszkieletu zdolnych do generowania siły skurczowej. Tym samym

wapń pełni funkcję przełącznika między stanem spoczynkowym a stanem aktywnym cytoszkieletu.

Włączenie jonów Ca^{2+} do modelu biomechanicznego jest kluczowe, ponieważ to właśnie ten sygnał reguluje tempo i zakres reorganizacji włókien aktynowych, a tym samym zdolność osteocytów do odpowiedzi na obciążenia mechaniczne. Na wzór modeli przedstawionych w [114], [123] potraktowano Ca^{2+} jako parametr aktywacyjny, który kontroluje zarówno proces formowania włókien cytoszkieletu, jak i ich dysocjację w zależności od poziomu napięcia w cytoplazmie. Bez uwzględnienia tej zależności niemożliwe byłoby wierne odtworzenie dynamicznej równowagi pomiędzy stabilnością a plastycznością cytoszkieletu.

W kontekście osteocytów nabiera to szczególnego znaczenia, ponieważ zmiany w sygnalizacji wapniowej są związane z patogenezą osteoporozy i obniżoną zdolnością tkanki kostnej do adaptacji mechanicznej. Zaburzenia w transporcie i regulacji Ca^{2+} ograniczają przebudowę cytoszkieletu i zmniejszają kontraktywność włókien, co prowadzi do osłabienia czułości komórek. Z tego względu modelowanie wpływu obciążenia mechanicznego na cytoszkielet osteocytów wymaga traktowania jonów wapnia jako podstawowego elementu łączącego bodziec mechaniczny z reorganizacją struktury wewnątrzkomórkowej i dalszymi odpowiedziami biologicznymi.

Komórki wykazują zdolność do kurczenia się i wywierania sił, co jest kluczowe w procesach migracji komórkowej, rozwoju tkanek i reakcji na środowisko mechaniczne. Jony wapnia Ca^{2+} pełnią kluczową rolę w regulacji procesów biochemicznych prowadzących do zachowań mechanicznych komórki. W modelu Deshpande'a [114] założono, że odpowiedź mechaniczna włókien przenoszących naprężenie – włókien cytoszkieletu, zależy od trzech powiązanych zjawisk:

1. sygnału aktywacyjnego – bodźca który uruchamia proces tworzenia się włókien (ang. *stress fibers*),
2. szybkości tworzenia i dysocjacji włókien – zależy od intensywności sygnału aktywacyjnego i od napięcia wewnętrznego we włóknach,
3. szybkości kontrakcji – zależy od napięcia w włóknach przez mechanizmy zwane dynamiką mostków poprzecznych (ang. *cross-bridge dynamics*), które są odpowiedzialne za kurczenie się włókien.

Zaproponowano uwzględnienie aktywacji przez impuls wapniowy do modelowania wzmacniania się cytoszkieletu komórkowego [114], [123], w odpowiedzi na trwające w czasie

obciążenie, czyli naprężenia ścinające wywołane przepływem. Włączono mechanizm regulacji naprężeń w cytoszkielecie komórkowym poprzez aktywację włókien oraz modelowanie biomechaniczne komórkowej odpowiedzi na obciążenia mechaniczne.

Sygnał aktywacyjny C wywołujący powstawanie dodatkowych włókien, interpretowany jako poziom stężenia jonów wapnia, regulujących formowanie się włókien filamentowych można sformułować następująco:

$$C = e^{\frac{-t}{t_c}} \quad (78)$$

gdzie:

t to czas od momentu aktywacji,

t_c to szybkość zanikania sygnału, dla chondrocytów zakłada się wartość 70 s.

Sygnał aktywacyjny zanika wykładniczo w czasie, a im większa wartość sygnału tym intensywniejsza jest polimeryzacja aktyny (tworzenie się dodatkowych włókien), jest to „impuls wapniowy”. Proces aktywacji włókien cytoszkieletu opisuje równanie kinetyczne:

$$\frac{dh}{dt} = (1 - h)Ck_f - (1 - \sigma/T_0)hk_b \quad (79)$$

k_f to szybkość formowania włókien,

k_b to stała rozpadu włókien,

σ to aktualne naprężenie we włóknach,

σ_0 to izometryczne naprężenie referencyjne włókien.

Równanie opisuje:

- formowanie włókien: $(1 - h)Ck_f$ wskazuje, że sygnał aktywacyjny C przyspiesza formowanie włókien, gdy poziom aktywacji jest niski,
- rozpad włókien: $(1 - \sigma/\sigma_0)hk_b$ pokazuje, że przy naprężeniu niższym niż izometryczne włókna będą się dysocjować.

Przyjęto, że wraz z „impulsem wapniowym” podczas obciążenia tworzą się dodatkowe (lub wzmacniają już istniejące) filamenty aktynowe wpływając na zwiększenie się modułu Younga komórki, który można zapisać jako:

$$E_c(x, t) = Y_0 + \frac{h(X, t)T_{max}}{1 + k_v h(X, t)} \quad (80)$$

gdzie:

k_v to empirycznie wyznaczany współczynnik osłabienia napięcia przy szybkiej deformacji włókien. Współczynnik k_v ma wpływ na szybkość reakcji na zmiany naprężeń i można go opisać (na podstawie szacowań empirycznych) jako

$$k_v \cong \frac{k_b}{k_f} \quad (81)$$

W przypadku, gdy $k_f \gg k_b$ to włókna tworzą się szybciej, a gdy tak $k_f \ll k_b$ to szybciej ulegają rozpadowi. Zatem jeżeli wartość współczynnika k_v jest niska to cytoszkielet jest bardziej stabilny i utrzymuje napięcie nawet pod wpływem nagłych obciążeń, a gdy jest wysoka to cytoszkielet jest bardziej wrażliwy na zmiany.

T_{max} określa maksymalne izometryczne naprężenie generowane przez włókno cytoszkieletu, zatem jeżeli aktywacja sygnału jest pełna, to włókno osiąga jego pełną wartość, gdy aktywacja jest częściowa to jest skalowany [123].

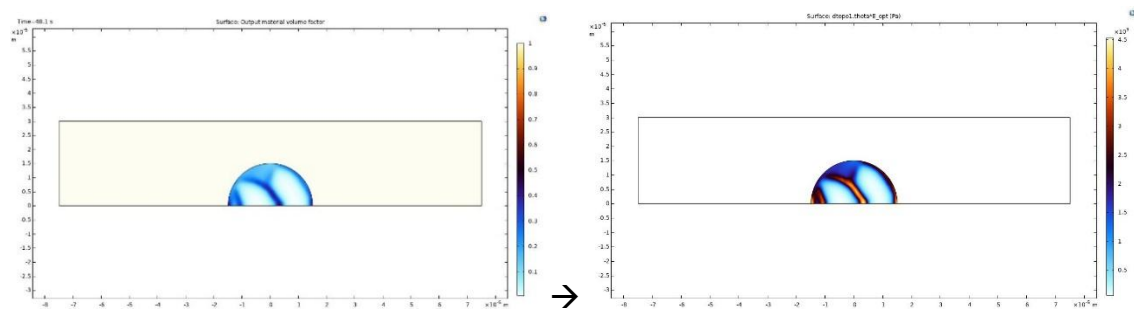
Wyniki przeprowadzonej symulacji, przedstawione na rysunku 5.41, wskazują na wzmocnienie się cytoszkieletu przy dodaniu dodatkowego „impulsu wapniowego” podczas optymalizacji topologicznej komórki obciążanej przepływem, w której ewolucję modułu Younga sformułowano jako:

$$E(\mathbf{X}, t) = \theta^p E_c \quad (82)$$

Wartości parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.12.

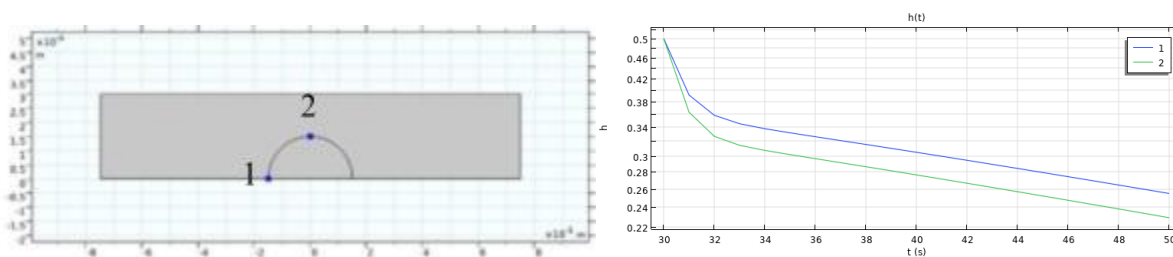
Tabela 5.12: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

t_c	k_f	k_b	T_{max}
s	-	-	N/m ²
40	1	1	100



Rysunek 5.41: Przebudowa cytoszkieletu z uwzględnieniem impulsu wapniowego

W przeprowadzonych obliczeniach uwzględnienie sygnału wapniowego pozwoliło odtworzyć charakterystyczne zjawiska obserwowane eksperymentalnie, tj. szybki wzrost stężenia Ca^{2+} prowadzący do aktywacji białek wiążących aktynę, przebudowy filamentów oraz inicjacji włókien naprężeniowych, czyli reakcji cytoszkieletu na bodziec mechaniczny w postaci wzmocnienia się siatki cytoszkieletu w wymaganych rejonach. Dodanie tego komponentu do modeli numerycznych komórki umożliwia uwzględnienie gwałtownego wzrostu sztywności, w związku z przebudową cytoszkieletu wywołaną impulsem wapniowym towarzyszącym obciążeniu mechanicznemu. W modelu Ca^{2+} działa jako „włącznik” procesu mechanotransdukcji, sprzęgając bodźce mechaniczne z odpowiedzią strukturalną cytoszkieletu osteocytów, a wraz ze spadkiem impulsu wapniowego zmniejsza się aktywność reorganizacji, jak na rysunku 5.42. W obecności sygnału wapniowego sieć aktynowa dynamicznie przebudowuje się w kierunku tworzenia włókien naprężeniowych, co zwiększa sztywność komórki. Z kolei brak aktywacji Ca^{2+} skutkuje zachowaniem pasywnym, przypominającym odpowiedź komórki o zdegradowanym cytoszkiecie, z ograniczoną możliwością adaptacji do obciążeń. Przeanalizowano przebieg sygnału wapniowego h dla dwóch punktów kontrolnych (rysunek 5.42).



Rysunek 5.42: Punkty kontrolnej (po lewej) i wykres impulsu wapniowego dla każdego z nich (po prawej)

Ze względu na charakter zmian wywołanych przez impuls wapniowy, czyli gwałtowne zwiększenie sztywności cytoszkieletu sprzężone z obciążeniem mechanicznym, można

postawić hipotezę, że zmniejszona amplituda i czas trwania sygnału Ca^{2+} , na przykład mogące występować przy osteoporozie, prowadzą do wolniejszej przebudowy cytoszkieletu, a w konsekwencji osłabienia czułości osteocytów osłabionej regulacji przebudowy tkanki kostnej. Zaburzenia w sygnalizacji wapniowej mogą stanowić jeden z ważnych czynników patofizjologicznych odpowiedzialnych za obniżoną zdolność kości do adaptacji mechanicznej przy osteoporozie [124].

5.8 Sygnał od innych osteocytów

Osteocyty stanowią centralne ogniwo mechanotransdukcji w tkance kostnej, odpowiadając za odbiór i interpretację bodźców mechanicznych oraz ich przekształcenie w sygnały biologiczne. Na tej podstawie regulowana jest aktywność innych komórek kostnych, co determinuje kierunek i intensywność przebudowy kości [15]. Aby taki system mógł skutecznie funkcjonować, konieczna jest sprawna komunikacja między osteocytami, umożliwiającą integrację informacji pochodzących z różnych obszarów tkanki.

Sieć osteocytów, rozciągająca się poprzez system kanalików kostnych, działa jak funkcjonalna sieć czujników, która przekazuje informacje dotyczące lokalnych obciążeń mechanicznych oraz stanu metabolicznego tkanki. Dzięki temu osteocyty nie tylko pełnią rolę detektorów bodźców mechanicznych, ale również integratorów i koordynatorów procesów przebudowy. W ten sposób komunikacja sieci osteocytów staje się warunkiem zachowania równowagi strukturalnej kości [125].

Zakłócenia w tym systemie takie jak ograniczenie liczby połączeń czy osłabienie zdolności do przekazywania sygnałów, prowadzą do zaburzeń mechanoadaptacji, czego konsekwencją są choroby metaboliczne kości, w tym osteoporoza [126]. Wskazuje to, że sieć komunikacji osteocytów jest niezbędnym elementem prawidłowego funkcjonowania tkanki kostnej i stanowi podstawę jej zdolności do adaptacyjnej przebudowy.

Zaproponowano integrację modelu omówionego w rozdziale 5.1, w którym uwzględniono odległość pomiędzy komórkami, ale w tym przypadku odległość γ odmierzamy pomiędzy osteocytem zlokalizowanym w w i innym osteocytem w X :

$$\gamma = \frac{\|X - X_0\|}{D} \quad (83)$$

Gdzie D jest maksymalnym zasięgiem sygnału nadawanego przez osteocyt, a jego wartość przyjęto jako 0,1mm. Sygnał biochemiczny powiązano z energią sprężystą:

$$S_c(X, t) = \int_{\Omega} W(X_0, t) e^{-\gamma(X, X_0)} X_0 - S_{c0}(X, t) \quad (84)$$

W równaniu (84) założono, że osteocyty przekazują sygnał biochemiczny, który jest zależny do energii sprężystej W . Wielkość S_{c0} to wartość sygnału w równowadze homeostatycznej. Zakładamy, że wielkość tego sygnału może przekładać się na przebudowę cytoszkieletu w osteocycie, co prowadzi do mechanotransdukcji i w konsekwencji uruchomienia aktywności osteoblastów i osteoklastów. Parametr związany z aktywnością osteocytów w otoczeniu $O(S_c, t)$ sformułowano jako:

$$\frac{\partial O(S_c, t)}{\partial t} = A_o S_c(X, t) H\left(\frac{O}{O_{\text{Max}}}\right) \quad (85)$$

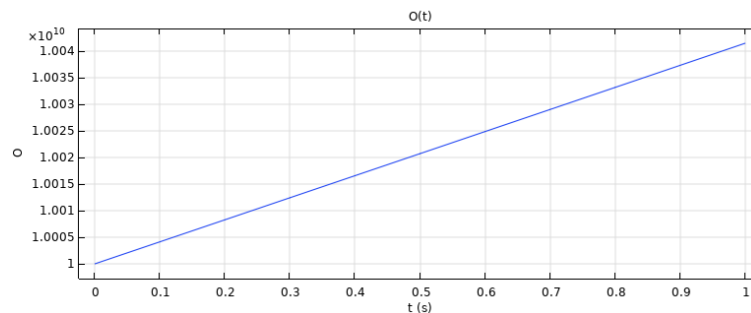
Gdzie A_o to parametr skalujący, a funkcja $H(x)$ skaluje obliczenia numeryczne, podobnie jak w równaniu (50).

Wartości wszystkich parametrów użytych w symulacjach przedstawiono w tabeli 5.13.

Tabela 5.13: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych

S_{c0}	O_o	O_{max}	A_o
-	Pa	Pa	-
1000	10^{10}	10^{11}	1

Prześledzono jego przebieg w punktach kontrolnych zaznaczonych na rysunku 5.43:



Rysunek 5.43: Wyniki symulacji numerycznych sygnału osteocytów

Zaproponowane równanie stanowi bardzo uproszczoną formę zapisu złożonych zjawisk związanych z sygnalizacją między osteocytami w tkance kostnej. Ujęto w nim jedynie podstawowy mechanizm, w którym lokalne obciążenia mechaniczne są przekształcane w sygnały biologiczne i przekazywane w obrębie sieci osteocytarnej. Taki opis pozwala wstępnie odwzorować wpływ komunikacji między komórkami na procesy przebudowy kości, jednak nie obejmuje pełnej dynamiki molekularnej i wielopoziomowych sprzężeń zwrotnych obecnych w rzeczywistym układzie biologicznym.

5.9 Sygnał biochemiczny – estrogen

Hormony jajnikowe, takie jak estrogen, są kluczowe dla zdrowia kości u kobiet. Spadek poziomu estrogenu po menopauzie lub w wyniku usunięcia jajników prowadzi do zmniejszenia gęstości mineralnej kości, co zwiększa ryzyko złamań. 17β -estradiol jest jednym z trzech estrogenów występujących w organizmie. Pozostałe dwa, czyli estron i estriol, mają słabsze działanie biologiczne, dlatego estradiol odgrywa kluczową rolę w diagnostyce. Powstaje on w jajnikach, łożysku oraz w wyniku przekształcania estronu i androgenów (takich jak androstendion i testosteron) w tkankach obwodowych.

Estrogen stanowi jeden z kluczowych regulatorów homeostazy tkanki kostnej, a jego wpływ obejmuje wszystkie rodzaje komórek kostnych: osteoklasty, osteoblasty i osteocyty. Co szczególnie istotne, przy rozważanych badaniach, estrogen oddziałuje bezpośrednio na mechanosensoryczną funkcję osteocytów, determinując ich zdolność do odbioru bodźców mechanicznych i mechanotransdukcji. Stabilność i dynamika cytoszkieletu osteocytów są modulowane przez sygnalizację estrogenową, głównie za pośrednictwem receptorów $ER\alpha$ i $ER\beta$ [127]. Dane eksperymentalne wskazują, że estrogeny chronią osteocyty przed apoptozą, co ma zasadnicze znaczenie, ponieważ utrata żywotności osteocytów prowadzi do osłabienia sieci mechanosensorycznej i zaburzenia procesów przebudowy. Estrogen zmniejsza także ekspresję sklerostyny, białka wydzielanego przez osteocyty, które ogranicza formację kostną. Zmniejszenie poziomu estrogenu, jak ma to miejsce w okresie pomenopauzalnym, wiąże się z deregulacją tych procesów i przyspieszonym ubytkiem masy kostnej [128]. Co więcej, estrogen moduluje równowagę pomiędzy cytokinami (ligandem RANKL i osteoprotegeryną), kontrolując aktywność osteoklastów. To sprzężenie zwrotne oznacza, że cytoszkielet osteocytów, który uczestniczy w regulacji ekspresji RANKL pod wpływem obciążenia mechanicznego, jest zależny od stanu hormonalnego.

Niedobór estrogenów lub androgenów skutkuje wzrostem częstości apoptozy osteocytów, co osłabia mechanosensoryczną sieć komórkową w kości i pogarsza zdolność tkanki do reagowania na bodźce mechaniczne. Przeciwnie, obecność hormonów płciowych działa ochronnie na komórki kostne – zarówno osteocyty, jak i osteoblasty – poprzez aktywację szybkich, pozajądrowych (niegenotropowych) szlaków sygnalizacyjnych.

Ten mechanizm ochronny zależy od aktywności błonowej domeny wiążącej ligand receptora hormonalnego. W praktyce oznacza to, że sygnał hormonalny może być szybko przetwarzany na odpowiedź komórkową, zwiększając odporność osteocytów na obciążenia mechaniczne i wspierając stabilność strukturalną kości [12].

Z punktu widzenia dynamiki cytoszkieletu, estrogen aktywuje szlaki szybkiej sygnalizacji (ang. *membrane-initiated steroid signaling, MISS*), które regulują polimeryzację filamentów aktynowych i stabilność adhezji. Dzięki temu osteocyty zachowują zdolność do przekształcania bodźców mechanicznych w sygnały biochemiczne [127]. W modelach zwierzęcych wykazano, że odpowiedź osteocytów na obciążenie mechaniczne jest osłabiona przy niskim poziomie estrogenu. Postuluje się nawet, że estrogen nie tylko wzmacnia sygnał mechaniczny, ale wręcz warunkuje jego skuteczne przekazanie do dalszych szlaków molekularnych odpowiedzialnych za przebudowę kości [128], [127], [129].

W celu opisanie wpływu poziomu estrogenu (w przypadku uwzględnionych badań 17β -estradiolu) na sztywność komórek [130] wykorzystano wyniki badań dotyczących zastosowania terapii hormonalnej do regulacji zaburzeń osi podwzgórze - przysadka - jajnik (HPO) u kobiet z utratą funkcji jajników. Zaprezentowany model opisuje wpływ terapii farmakologicznej (podanie estrogenu i progesteronu) na poziomy hormonów w osi HPO, opisując za pomocą równań różniczkowych poziom hormonów w terapii farmakologicznej. Założono, że hormony są dostarczane z zewnątrz w określonej, stałej dawce, a poziom estrogenu N można opisać:

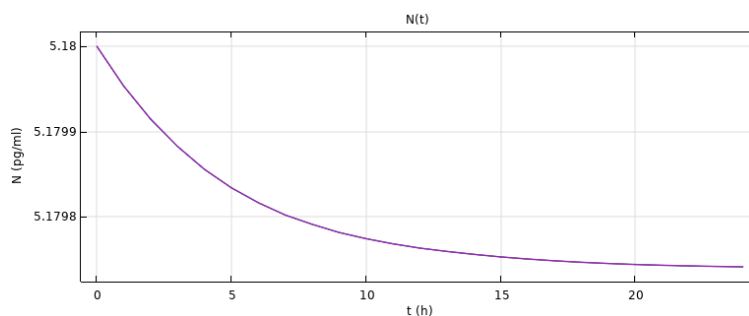
$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} b_e - K_c N & \text{dla } t = 0 \text{ i braku terapii} \\ GK_G + b_e - K_c N & \text{dla } t > 0 \text{ po terapii} \end{cases} \quad (86)$$

Gdzie wszystkie parametry są wyznaczone empirycznie: b_e to bazowa produkcja estrogenu przez inne tkanki, G to dawka podanego estrogenu w terapii, K_G to efektywność przekształcania dawki estrogenu w krwioobiegu, K_c to współczynnik klirensu (oczyszczania krwioobiegu) estrogenu. W symulacjach numerycznych użyto danych przedstawionych w tabeli 5.14 [130].

Tabela 5.14: Wartości parametrów użytych w symulacjach

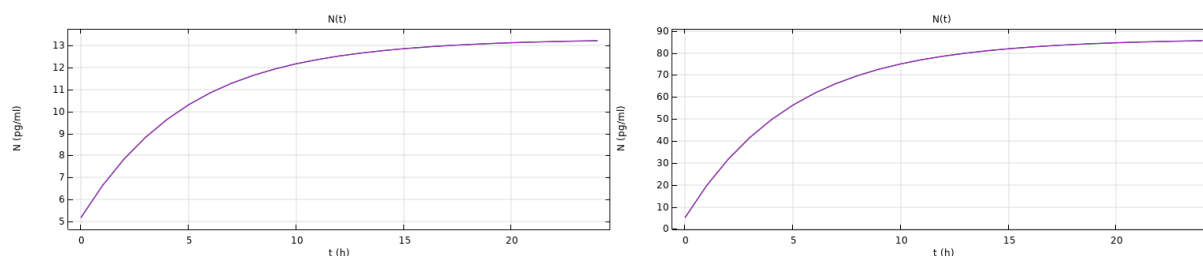
b_e	K_c	K_G	G_1	G_2
kg/(m ³ ·s)	1/s	1/s	kg/(m ³ /s)	kg/(m ³ /s)
$2.8356 \cdot 10^{-13}$	$5.4745 \cdot 10^{-5}$	$2.22 \cdot 10^{-13}$	$2,31 \cdot 10^{-14}$	$2,31 \cdot 10^{-13}$

Przy braku terapii wykres poziomu estrogenu został przedstawiony na rysunku 5.44.



Rysunek 5.44: Wykres poziomu estrogenu przy braku terapii hormonalnej

Przy zastosowaniu terapii w dawce G_1 i przebieg estrogenu w czasie doby po pierwszej dawce zaprezentowano na rysunku 5.45.



Rysunek 5.45: Wykres poziomu estrogenu przy kolejno: dawce G_1 i

Ze względu na specyfikę działania estrogenu, czyli wpływ na proces mechanotransdukcji, a dokładniej wzmocnienie sygnału mechanicznego, który odbierają i przekazują osteocyty, zdecydowano się na normalizację poziomu estrogenu:

$$N^* = \frac{N}{N_{min}} \quad (87)$$

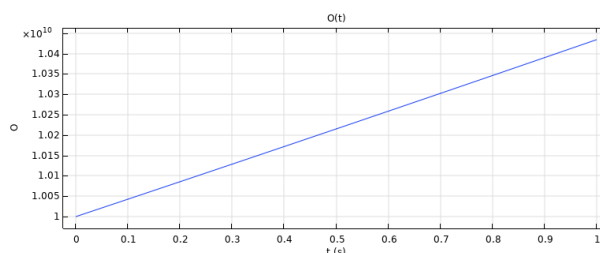
gdzie:

N_{min} - poziom estrogenu w $t = 0$ i przy braku terapii.

Użyto parametru poziomu estrogenu N^* do przeskalowania wartości sygnału przekazywanego przez osteocyty, zatem zastąpiono nim parametr skalujący A_o w równaniu (85) otrzymując:

$$\frac{\partial O_N(S_C, t)}{\partial t} = N^* S_C(X, t) H\left(\frac{O}{O_{Max}}\right) \quad (88)$$

Oznacza to, że jeżeli sygnał od osteocytów zostanie przekazany w chwili czasu $t = 0$, czyli gdy nie zastosowano jeszcze terapii hormonalnej lub przy stanie patologicznym bez terapii, to przebieg sygnału będzie wyglądał jak na rysunku 5.43, natomiast przy wyższym poziomie estrogenu, na przykład po 5 godzinach od podania dawki G_1 , gdy wartość parametru $N^* \approx 10,3$ będzie on przebiegał jak na rysunku 5.46.



Rysunek 5.46: Wykres przebiegu sygnału osteocytów wzmocnionego o parametr związany z estrogenem

Znaczenie estrogenów dla cytoszkieletu osteocytów potwierdzają również badania kliniczne. Deficyt estrogenu tłumaczy znaczną część zmienności gęstości mineralnej kości i ryzyka złamań w populacji kobiet po menopauzie. Zjawisko to można powiązać ze spadkiem zdolności osteocytów do prawidłowej mechanotransdukcji, czyli odpowiedzi na obciążenia fizjologiczne w warunkach niedoboru estrogenu. W ujęciu klinicznym przekłada się to na osłabienie adaptacji kości do wysiłku oraz większą podatność na mikro-uszkodzenia [129]. W celu podkreślenia jak bardzo istotny jest to aspekt i jak zależny od płci, poniżej podane są przybliżone wartości referencyjne poziomu estrogenu u ludzi.

Kobiety przed menopauzą:

- faza folikularna (przed owulacją): 30–120 pg/ml.

- faza owulacyjna: 130–370 pg/ml.
- faza lutealna (po owulacji): 70–250 pg/ml.

Kobiety po menopauzie:

- Estrogen znacząco spada: <20 pg/ml.

Mężczyźni:

- Typowy poziom: 10–40 pg/ml.

Włączenie estrogenu do modelu przebudowy cytoszkieletu osteocytów nie jest jedynie dodatkiem fizjologicznym, lecz warunkiem koniecznym dla realistycznego odwzorowania rzeczywistych procesów w kości [131], [132], [133]. Uwzględnienie wpływu estrogenu na przebudowę cytoszkieletu pozwala wyjaśnić różnice w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne między okresem przed- i pomenopauzalnym oraz odtworzyć efekty leczenia farmakologicznego ukierunkowanego na receptory estrogenowe.

6 Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzona w pracy analiza była próbą zamodelowania procesu mechanotransdukcji z uwzględnieniem roli przebudowy cytoszkieletu komórkowego, a także komunikacji między osteocytami w regulacji przebudowy tkanki kostnej.

W pierwszej części badań skoncentrowano się na modelach matematycznych i symulacjach na poziomie tkanki kostnej, opisujący przebudowę kości z uwzględnieniem aktywności osteocytów, związanej z procesem mechanotransdukcji. Ewolucja parametrów sztywności analizowana w układzie 2D i 3D dla różnych przypadków obciążeń (hydrostatycznych, ścinających, rozciągających) pokazała, że osteocyty, mimo iż nie przenoszą znaczących obciążeń, warunkują sposób, w jaki tkanka reaguje na działanie sił zewnętrznych. Ich aktywność stanowi element nadrzędnej regulacji, której skutki są widoczne w ewolucji właściwości mechanicznych kości w skali makroskopowej.

Zrozumienie, w jaki sposób różne typy obciążeń, takie jak naprężenia ścinające, kompresja hydrostatyczna czy odkształcenia postaciowe, wpływają na osteocyty, ma istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Pozwala lepiej opisać mechanizmy przebudowy kości w zależności od zmiennych warunków mechanicznych, a także wspiera rozwój metod leczenia i profilaktyki chorób układu kostnego, takich jak osteoporoza i martwica kości. Ponadto wiedza ta znajduje zastosowanie w inżynierii biomateriałów i implantologii, gdzie prawidłowe odwzorowanie warunków mechanicznych stymulujących osteocyty jest niezbędne do projektowania struktur sprzyjających regeneracji tkanki kostnej. Badania prowadzone w tym obszarze stanowią istotny pomost pomiędzy skalą makroskopową, opisującą wytrzymałość całej kości, a skalą mikroskopową, w której analizuje się odpowiedź pojedynczych komórek i ich cytoszkieletu. Takie podejście umożliwia opracowanie bardziej realistycznych modeli numerycznych przebudowy kości, łączących aspekty mechaniczne i biologiczne, co w przyszłości może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych strategii terapeutycznych oraz narzędzi diagnostycznych.

Druga część pracy dotyczyła modelowania i symulacji procesów reorganizacji cytoszkieletu osteocytów za pomocą narzędzi optymalizacji topologicznej. Modele 2D i 3D, a także przypadki uwzględniające obciążenia wynikające z przepływu, pozwoliły opisać proces przekształcania się architektury cytoszkieletu w odpowiedzi na różne warunki środowiskowe.

Zastosowanie optymalizacji topologicznej otworzyło możliwość śledzenia nie tyle wartości statycznych parametrów, co dynamiki przemiany struktury i organizacji wewnętrznej komórki.

Dalsze rozszerzenie modelu o sygnały zewnętrzne, zarówno mechaniczne, jak i biochemiczne, pozwoliło na jeszcze pełniejsze uchwycenie złożoności procesu. Uwzględnienie, komunikacji pomiędzy osteocytami, estrogenu oraz obecności jonów wapnia (Ca^{2+}) pokazało, że cytoszkielet komórki reaguje na wieloczynnikowe warunki, w których nakładają się bodźce o różnej naturze. W ten sposób udało się połączyć perspektywę mechaniki i biologii, ukazując, że dopiero ich zespolenie pozwala odwzorować pełen obraz adaptacji kości.

Podjęta próba stworzenia spójnego modelu, była podyktowana przekonaniem autorki, że kluczem nie jest analiza wybranych parametrów materiałowych, ale opis procesu przemiany – tego, jak cytoszkielet osteocytu reaguje i jak jego transformacja wpływa na przebudowę tkanki kostnej. Osteocyt jawi się w tym ujęciu jako mediator między światem mikro a makro, a jego zdolność do translacji bodźców mechanicznych i biochemicznych na sygnały regulujące przebudowę kości czyni go centralnym ogniwem adaptacji.

Wyniki badań wskazują, że tylko podejście holistyczne, takie które łączy modele mechaniczne, biologiczne i chemiczne, umożliwia realistyczne opisanie procesów zachodzących w kości. Praca ta stanowi krok w kierunku takiej integracji: od prostych modeli makroskopowych, przez topologiczną analizę cytoszkieletu, po uwzględnienie sygnałów biochemicznych. Wskazuje to przyszły kierunek badań, w którym interdyscyplinarne podejście jest niezbędne do zrozumienia zarówno fizjologicznej adaptacji, jak i patologicznych zaburzeń, takich jak osteoporoza.

7 Bibliografia

- [1] S. C. Cowin, „The mechanical and stress adaptive properties of bone”, *Ann Biomed Eng*, t. 11, nr 3–4, s. 263–295, maj 1983, doi: 10.1007/BF02363288.
- [2] J. Wolff, „Concept of the Law of Bone Remodelling”, w *The Law of Bone Remodelling*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986, s. 1–1. doi: 10.1007/978-3-642-71031-5_1.
- [3] Y.-C. Fung, *Biomechanics*. New York, NY: Springer New York, 1993. doi: 10.1007/978-1-4757-2257-4.
- [4] D. Ingber, „Mechanobiology and diseases of mechanotransduction”, *Annals of Medicine*, t. 35, nr 8, s. 564–577, sty. 2003, doi: 10.1080/07853890310016333.
- [5] V. Vogel i M. Sheetz, „Local force and geometry sensing regulate cell functions”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 7, nr 4, s. 265–275, kwi. 2006, doi: 10.1038/nrm1890.
- [6] D. J. Hadjidakis i I. I. Androulakis, „Bone Remodeling”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, t. 1092, nr 1, s. 385–396, grudz. 2006, doi: 10.1196/annals.1365.035.
- [7] E. F. Eriksen, „Cellular mechanisms of bone remodeling”, *Rev Endocr Metab Disord*, t. 11, nr 4, s. 219–227, grudz. 2010, doi: 10.1007/s11154-010-9153-1.
- [8] W. Sawicki i J. Malejczyk, „Histologia”. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
- [9] E. O. Of Journal „Morphologia”, „Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. Eighth Edition, 2018 Authors: Wojciech Pawlina; Michael H. Ross”, *Morphologia*, t. 13, nr 4, s. 76–89, grudz. 2019, doi: 10.26641/1997-9665.2019.4.76-89.
- [10] S. L. Teitelbaum, „Bone Resorption by Osteoclasts”, *Science*, t. 289, nr 5484, s. 1504–1508, wrz. 2000, doi: 10.1126/science.289.5484.1504.
- [11] H. C. Blair, M. Zaidi, i P. H. Schlesinger, „Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation”, *Biochemical Journal*, t. 364, nr 2, s. 329–341, cze. 2002, doi: 10.1042/bj20020165.
- [12] „Bone Cells”, w *Basic and Applied Bone Biology*, Elsevier, 2014, s. 27–45. doi: 10.1016/b978-0-12-416015-6.00002-2.
- [13] J. E. Aubin, „Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation”.
- [14] N. Mody, „Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells”, *Free Radical Biology and Medicine*, t. 31, nr 4, s. 509–519, sie. 2001, doi: 10.1016/s0891-5849(01)00610-4.

- [15] L. F. Bonewald, „The amazing osteocyte”, *Journal of Bone and Mineral Research*, t. 26, nr 2, s. 229–238, luty 2011, doi: 10.1002/jbmr.320.
- [16] Department of Oral Cell Biology, Research Institute MOVE, ACTA-VU University Amsterdam, Gustav Mahlerlaan 3004, 1081 LA Amsterdam, The Netherlands, J. Klein-Nulend, R. Bacabac, i A. Bakker, „Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton”, *eCM*, t. 24, s. 278–291, wrz. 2012, doi: 10.22203/eCM.v024a20.
- [17] A. G. Robling *et al.*, „Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 283, nr 9, s. 5866–5875, luty 2008, doi: 10.1074/jbc.m705092200.
- [18] C. H. Turner, „Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli”, *Bone*, t. 23, nr 5, s. 399–407, lis. 1998, doi: 10.1016/S8756-3282(98)00118-5.
- [19] „Bone Modeling and Remodeling”, w *Basic and Applied Bone Biology*, Elsevier, 2014, s. 75–90. doi: 10.1016/b978-0-12-416015-6.00004-6.
- [20] A. M. Parfitt, „Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression”, *Bone*, t. 30, nr 1, s. 5–7, sty. 2002, doi: 10.1016/s8756-3282(01)00642-1.
- [21] M. C. M. Li, S. K. H. Chow, R. M. Y. Wong, L. Qin, i W. H. Cheung, „The role of osteocytes-specific molecular mechanism in regulation of mechanotransduction – A systematic review”, *Journal of Orthopaedic Translation*, t. 29, s. 1–9, lip. 2021, doi: 10.1016/j.jot.2021.04.005.
- [22] O. D. Kennedy, D. M. Laudier, R. J. Majeska, H. B. Sun, i M. B. Schaffler, „Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo”, *Bone*, t. 64, s. 132–137, lip. 2014, doi: 10.1016/j.bone.2014.03.049.
- [23] J. Klein-Nulend, A. D. Bakker, R. G. Bacabac, A. Vatsa, i S. Weinbaum, „Mechanosensation and transduction in osteocytes”, *Bone*, t. 54, nr 2, s. 182–190, cze. 2013, doi: 10.1016/j.bone.2012.10.013.
- [24] P. Kollmannsberger, M. Kerschnitzki, F. Repp, W. Wagermaier, R. Weinkamer, i P. Fratzl, „The small world of osteocytes: connectomics of the lacuno-canalicular network in bone”, *New J. Phys.*, t. 19, nr 7, s. 073019, lip. 2017, doi: 10.1088/1367-2630/aa764b.
- [25] T. J. Heino, T. A. Hentunen, i H. K. Väänänen, „Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts”, *Experimental Cell Research*, t. 294, nr 2, s. 458–468, kwi. 2004, doi: 10.1016/j.yexcr.2003.11.016.

- [26] H. J. Donahue, „Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation”, *Bone*, t. 26, nr 5, s. 417–422, maj 2000, doi: 10.1016/S8756-3282(00)00245-3.
- [27] L. Qin, W. Liu, H. Cao, i G. Xiao, „Molecular mechanosensors in osteocytes”, *Bone Res*, t. 8, nr 1, s. 23, cze. 2020, doi: 10.1038/s41413-020-0099-y.
- [28] S. Weinbaum, S. C. Cowin, i Y. Zeng, „A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses”, *Journal of Biomechanics*, t. 27, nr 3, s. 339–360, mar. 1994, doi: 10.1016/0021-9290(94)90010-8.
- [29] A. Bakker, J. Klein-Nulend, i E. Burger, „Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, t. 320, nr 4, s. 1163–1168, sie. 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.056.
- [30] N. R. Gould, O. M. Torre, J. M. Leser, i J. P. Stains, „The cytoskeleton and connected elements in bone cell mechano-transduction”, *Bone*, t. 149, s. 115971, sie. 2021, doi: 10.1016/j.bone.2021.115971.
- [31] K. Ohashi, S. Fujiwara, i K. Mizuno, „Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction”, *J Biochem*, s. mvw082, sty. 2017, doi: 10.1093/jb/mvw082.
- [32] F. Martino, A. R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari, i G. Forte, „Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function”, *Front. Physiol.*, t. 9, lip. 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00824.
- [33] D. A. Fletcher i R. D. Mullins, „Cell mechanics and the cytoskeleton”, *Nature*, t. 463, nr 7280, s. 485–492, sty. 2010, doi: 10.1038/nature08908.
- [34] A. D. Bershadsky i J. M. Vasiliev, *Cytoskeleton*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [35] T. J. Mitchison, „Compare and contrast actin filaments and microtubules.”, *MBoC*, t. 3, nr 12, s. 1309–1315, grudz. 1992, doi: 10.1091/mbc.3.12.1309.
- [36] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, i J. Plastino, „Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility”, *Physiological Reviews*, t. 94, nr 1, s. 235–263, sty. 2014, doi: 10.1152/physrev.00018.2013.
- [37] „Chapter 19 Mechanical Response of Cytoskeletal Networks”, w *Methods in Cell Biology*, Elsevier, 2008, s. 487–519. doi: 10.1016/s0091-679x(08)00619-5.
- [38] T. M. Svitkina, „Ultrastructure of the actin cytoskeleton”, *Current Opinion in Cell Biology*, t. 54, s. 1–8, paź. 2018, doi: 10.1016/j.ceb.2018.02.007.
- [39] C. L. Carpenter, „Actin cytoskeleton and cell signaling”, *Critical Care Medicine*, t. 28, nr Supplement, s. N94–N99, kwi. 2000, doi: 10.1097/00003246-200004001-00011.

- [40] C. P. Brangwynne, G. H. Koenderink, F. C. MacKintosh, i D. A. Weitz, „Nonequilibrium Microtubule Fluctuations in a Model Cytoskeleton”, *Phys. Rev. Lett.*, t. 100, nr 11, s. 118104, mar. 2008, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.118104.
- [41] C. P. Brangwynne *et al.*, „Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement”, *The Journal of Cell Biology*, t. 173, nr 5, s. 733–741, cze. 2006, doi: 10.1083/jcb.200601060.
- [42] R. Alfaro-Aco i S. Petry, „Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 290, nr 28, s. 17154–17162, lip. 2015, doi: 10.1074/jbc.R115.638452.
- [43] A. D. Bicek *et al.*, „Anterograde Microtubule Transport Drives Microtubule Bending in LLC-PK1 Epithelial Cells”, *MBoC*, t. 20, nr 12, s. 2943–2953, cze. 2009, doi: 10.1091/mbc.e08-09-0909.
- [44] H. Herrmann i U. Aebi, „Intermediate Filaments: Structure and Assembly”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, t. 8, nr 11, s. a018242, lis. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a018242.
- [45] L. M. Godsel, R. P. Hobbs, i K. J. Green, „Intermediate filament assembly: dynamics to disease”, *Trends in Cell Biology*, t. 18, nr 1, s. 28–37, sty. 2008, doi: 10.1016/j.tcb.2007.11.004.
- [46] T. M. Svitkina, A. B. Verkhovskiy, i G. G. Borisy, „Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton.”, *The Journal of cell biology*, t. 135, nr 4, s. 991–1007, lis. 1996, doi: 10.1083/jcb.135.4.991.
- [47] P. A. Coulombe, O. Bousquet, L. Ma, S. Yamada, i D. Wirtz, „The ‘ins’ and ‘outs’ of intermediate filament organization”, *Trends in Cell Biology*, t. 10, nr 10, s. 420–428, paź. 2000, doi: 10.1016/s0962-8924(00)01828-6.
- [48] C. V. Cook, A. M. Lighty, B. J. Smith, i A. N. Ford Versypt, „A review of mathematical modeling of bone remodeling from a systems biology perspective”, *Front. Syst. Biol.*, t. 4, s. 1368555, kwi. 2024, doi: 10.3389/fsysb.2024.1368555.
- [49] R. T. Hart, D. T. Davy, i K. G. Heiple, „Mathematical modeling and numerical solutions for functionally dependent bone remodeling”, *Calcif Tissue Int*, t. 36, nr S1, s. S104–S109, mar. 1984, doi: 10.1007/BF02406142.
- [50] T. Lekszycki, *Wybrane zagadnienia modelowania w biomechanice kości*. w Prace IPPT, no. 2007,6. Warszawa: IPPT PAN, 2007.
- [51] M. Bagge, „A model of bone adaptation as an optimization process”, *Journal of Biomechanics*, t. 33, nr 11, s. 1349–1357, lis. 2000, doi: 10.1016/S0021-9290(00)00124-X.

- [52] P. R. Fernandes, J. Folgado, C. Jacobs, i V. Pellegrini, „A contact model with ingrowth control for bone remodelling around cementless stems”, *Journal of Biomechanics*, t. 35, nr 2, s. 167–176, luty 2002, doi: 10.1016/S0021-9290(01)00204-4.
- [53] T. Lekszycki, „FUNCTIONAL ADAPTATION OF BONE AS AN OPTIMAL CONTROL PROBLEM”.
- [54] H. M. Frost, „Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal”, *Anat. Rec.*, t. 219, nr 1, s. 1–9, wrz. 1987, doi: 10.1002/ar.1092190104.
- [55] R. Huiskes, „If bone is the answer, then what is the question?”, *Journal of Anatomy*, t. 197, nr 2, s. 145–156, sie. 2000, doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19720145.x.
- [56] R. L. Smith *et al.*, „Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro”, *J. Orthop. Res.*, t. 13, nr 6, s. 824–831, lis. 1995, doi: 10.1002/jor.1100130604.
- [57] R. G. Bacabac *et al.*, „Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing”, *Journal of Biomechanics*, t. 41, nr 7, s. 1590–1598, sty. 2008, doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.01.031.
- [58] N. Branecka i T. Lekszycki, „Experimental methods of living cells mechanical loading: review”, *Continuum Mech. Thermodyn.*, t. 35, nr 3, s. 1165–1183, maj 2023, doi: 10.1007/s00161-022-01099-3.
- [59] C. T. Lim, E. H. Zhou, i S. T. Quek, „Mechanical models for living cells—a review”, *Journal of Biomechanics*, t. 39, nr 2, s. 195–216, sty. 2006, doi: 10.1016/j.jbiomech.2004.12.008.
- [60] D. P. Theret, M. J. Levesque, M. Sato, R. M. Nerem, i L. T. Wheeler, „The Application of a Homogeneous Half-Space Model in the Analysis of Endothelial Cell Micropipette Measurements”, *Journal of Biomechanical Engineering*, t. 110, nr 3, s. 190–199, sie. 1988, doi: 10.1115/1.3108430.
- [61] E. H. Zhou, C. T. Lim, i S. T. Quek, „Finite Element Simulation of the Micropipette Aspiration of a Living Cell Undergoing Large Viscoelastic Deformation”, *Mechanics of Advanced Materials and Structures*, t. 12, nr 6, s. 501–512, lis. 2005, doi: 10.1080/15376490500259335.
- [62] Y. D. Bansod i J. Bursa, „Continuum-Based Modelling Approaches for Cell Mechanics”, t. 9, nr 9, 2015.
- [63] G. Esteban-Manzanares *et al.*, „Improved Measurement of Elastic Properties of Cells by Micropipette Aspiration and Its Application to Lymphocytes”, *Ann Biomed Eng*, t. 45, nr 5, s. 1375–1385, maj 2017, doi: 10.1007/s10439-017-1795-7.

- [64] R. M. Hochmuth, „Micropipette aspiration of living cells”, *Journal of Biomechanics*, t. 33, nr 1, s. 15–22, sty. 2000, doi: 10.1016/s0021-9290(99)00175-x.
- [65] E. Evans i A. Yeung, „Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration”, *Biophysical Journal*, t. 56, nr 1, s. 151–160, lip. 1989, doi: 10.1016/s0006-3495(89)82660-8.
- [66] D. Needham i R. M. Hochmuth, „A sensitive measure of surface stress in the resting neutrophil”, *Biophysical Journal*, t. 61, nr 6, s. 1664–1670, cze. 1992, doi: 10.1016/s0006-3495(92)81970-7.
- [67] A. Yeung i E. Evans, „Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets”, *Biophysical Journal*, t. 56, nr 1, s. 139–149, lip. 1989, doi: 10.1016/s0006-3495(89)82659-1.
- [68] C. Dong, R. Skalak, i K.-L. P. Sung, „Cytoplasmic rheology of passive neutrophils”, *BIR*, t. 28, nr 6, s. 557–567, grudz. 1991, doi: 10.3233/bir-1991-28607.
- [69] D. Stamenović, „Two regimes, maybe three?”, *Nature Mater*, t. 5, nr 8, s. 597–598, sie. 2006, doi: 10.1038/nmat1700.
- [70] J. Alcaraz *et al.*, „Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy”, *Biophysical Journal*, t. 84, nr 3, s. 2071–2079, mar. 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)75014-0.
- [71] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, i J. J. Fredberg, „Scaling the Microrheology of Living Cells”, *Phys. Rev. Lett.*, t. 87, nr 14, s. 148102, wrz. 2001, doi: 10.1103/PhysRevLett.87.148102.
- [72] H. Jeong, S. P. Mason, A.-L. Barabási, i Z. N. Oltvai, „Lethality and centrality in protein networks”, *Nature*, t. 411, nr 6833, s. 41–42, maj 2001, doi: 10.1038/35075138.
- [73] D. Stamenović, Z. Liang, J. Chen, i N. Wang, „Effect of the cytoskeletal prestress on the mechanical impedance of cultured airway smooth muscle cells”, *Journal of Applied Physiology*, t. 92, nr 4, s. 1443–1450, kwi. 2002, doi: 10.1152/japplphysiol.00782.2001.
- [74] V. C. Mow, S. C. Kuei, W. M. Lai, i C. G. Armstrong, „Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments”, *Journal of Biomechanical Engineering*, t. 102, nr 1, s. 73–84, luty 1980, doi: 10.1115/1.3138202.
- [75] D. Shin i K. Athanasiou, „Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties”, *Journal Orthopaedic Research*, t. 17, nr 6, s. 880–890, lis. 1999, doi: 10.1002/jor.1100170613.

- [76] F. Guilak i V. C. Mow, „The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage”, *Journal of Biomechanics*, 2000.
- [77] N. Rosenblatt, A. M. Alencar, A. Majumdar, B. Suki, i D. Stamenović, „Dynamics of Prestressed Semiflexible Polymer Chains as a Model of Cell Rheology”, *Phys. Rev. Lett.*, t. 97, nr 16, s. 168101, paź. 2006, doi: 10.1103/PhysRevLett.97.168101.
- [78] M. R. K. Mofrad, „Rheology of the Cytoskeleton”, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, t. 41, nr 1, s. 433–453, sty. 2009, doi: 10.1146/annurev.fluid.010908.165236.
- [79] N. Banerjee i J. Park, „Modeling and simulation of biopolymer networks: Classification of the cytoskeleton models according to multiple scales”, *Korean J. Chem. Eng.*, t. 32, nr 7, s. 1207–1217, lip. 2015, doi: 10.1007/s11814-015-0071-5.
- [80] D. E. Ingber, „Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton”, *Journal of Cell Science*, t. 104, nr 3, s. 613–627, mar. 1993, doi: 10.1242/jcs.104.3.613.
- [81] P. Cañadas, V. M. Laurent, C. Oddou, D. Isabey, i S. Wendling, „A Cellular Tensegrity Model to Analyse the Structural Viscoelasticity of the Cytoskeleton”, *Journal of Theoretical Biology*, t. 218, nr 2, s. 155–173, wrz. 2002, doi: 10.1006/jtbi.2002.3064.
- [82] P. Cañadas, S. Wendling-Mansuy, i D. Isabey, „Frequency Response of a Viscoelastic Tensegrity Model: Structural Rearrangement Contribution to Cell Dynamics”, *Journal of Biomechanical Engineering*, t. 128, nr 4, s. 487–495, sie. 2006, doi: 10.1115/1.2205867.
- [83] D. Stamenović, „Models of cytoskeletal mechanics based on tensegrity”, w *Cytoskeletal Mechanics*, 1. wyd., M. R. K. Mofrad i R. D. Kamm, Red., Cambridge University Press, 2001, s. 103–128. doi: 10.1017/CBO9780511607318.007.
- [84] T.-J. Chen, C.-C. Wu, i F.-C. Su, „Mechanical models of the cellular cytoskeletal network for the analysis of intracellular mechanical properties and force distributions: A review”, *Medical Engineering & Physics*, t. 34, nr 10, s. 1375–1386, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.medengphy.2012.08.007.
- [85] D. Kardas, U. Nackenhorst, i D. Balzani, „Computational model for the cell-mechanical response of the osteocyte cytoskeleton based on self-stabilizing tensegrity structures”, *Biomech Model Mechanobiol*, t. 12, nr 1, s. 167–183, sty. 2013, doi: 10.1007/s10237-012-0390-y.
- [86] G. M. Khunsaraki, H. N. Oscuii, i A. Voloshin, „Study of the Mechanical Behavior of Subcellular Organelles Using a 3D Finite Element Model of the Tensegrity Structure”, *Applied Sciences*, t. 11, nr 1, s. 249, grudz. 2020, doi: 10.3390/app11010249.

- [87] L. Wang i W. Chen, „Modelling Cell Origami via a Tensegrity Model of the Cytoskeleton in Adherent Cells”, *Applied Bionics and Biomechanics*, t. 2019, s. 1–9, sie. 2019, doi: 10.1155/2019/8541303.
- [88] S. Wendling, P. Cañadas, i P. Chabrand, „Toward a Generalised Tensegrity Model Describing the Mechanical Behaviour of the Cytoskeleton Structure”, *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, t. 6, nr 1, s. 45–52, luty 2003, doi: 10.1080/1025584021000059413.
- [89] R. Paul, P. Heil, J. P. Spatz, i U. S. Schwarz, „Propagation of Mechanical Stress through the Actin Cytoskeleton toward Focal Adhesions: Model and Experiment”, *Biophysical Journal*, t. 94, nr 4, s. 1470–1482, luty 2008, doi: 10.1529/biophysj.107.108688.
- [90] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, i R. A. Brown, „Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 3, nr 5, s. 349–363, maj 2002, doi: 10.1038/nrm809.
- [91] C. M. Nelson *et al.*, „Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, t. 102, nr 33, s. 11594–11599, sie. 2005, doi: 10.1073/pnas.0502575102.
- [92] C. S. Chen, J. L. Alonso, E. Ostuni, G. M. Whitesides, i D. E. Ingber, „Cell shape provides global control of focal adhesion assembly”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, t. 307, nr 2, s. 355–361, lip. 2003, doi: 10.1016/S0006-291X(03)01165-3.
- [93] D. A. Head, A. J. Levine, i F. C. MacKintosh, „Deformation of Cross-Linked Semiflexible Polymer Networks”, *Phys. Rev. Lett.*, t. 91, nr 10, s. 108102, wrz. 2003, doi: 10.1103/PhysRevLett.91.108102.
- [94] W. Roos, J. Ulmer, S. Gräter, T. Surrey, i J. P. Spatz, „Microtubule Gliding and Cross-Linked Microtubule Networks on Micropillar Interfaces”, *Nano Lett.*, t. 5, nr 12, s. 2630–2634, grudz. 2005, doi: 10.1021/nl051865j.
- [95] M. F. Coughlin i D. Stamenović, „A Prestressed Cable Network Model of the Adherent Cell Cytoskeleton”, *Biophysical Journal*, t. 84, nr 2, s. 1328–1336, luty 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74948-0.
- [96] S. R. Heidemann i R. E. Buxbaum, „Tension as a regulator and integrator of axonal growth”, *Cell Motil. Cytoskeleton*, t. 17, nr 1, s. 6–10, 1990, doi: 10.1002/cm.970170103.
- [97] E. W. Andrews, L. J. Gibson, i M. F. Ashby, „The creep of cellular solids”, *Acta Materialia*, t. 47, nr 10, s. 2853–2863, sie. 1999, doi: 10.1016/S1359-6454(99)00150-0.

- [98] C. C. Tee, N. Yu, i H. Li, „Modeling the overall heat conductive and convective properties of open-cell graphite foam”, *Modelling Simul. Mater. Sci. Eng.*, t. 16, nr 7, s. 075006, paź. 2008, doi: 10.1088/0965-0393/16/7/075006.
- [99] T.-J. Chen i J.-S. Huang, „Creep-rupturing of open-cell foams”, *Acta Materialia*, t. 56, nr 10, s. 2283–2289, cze. 2008, doi: 10.1016/j.actamat.2008.01.012.
- [100] P. Cañadas, V. M. Laurent, P. Chabrand, D. Isabey, i S. Wendling-Mansuy, „Mechanisms governing the visco-elastic responses of living cells assessed by foam and tensegrity models”, *Med. Biol. Eng. Comput.*, t. 41, nr 6, s. 733–739, lis. 2003, doi: 10.1007/BF02349982.
- [101] R. Satcher, C. F. Dewey, i J. H. Hartwig, „Mechanical Remodeling of the Endothelial Surface and Actin Cytoskeleton Induced by Fluid Flow”, *Microcirculation*, t. 4, nr 4, s. 439–453, grudz. 1997, doi: 10.3109/10739689709146808.
- [102] B. Maurin, P. Cañadas, H. Baudriller, P. Montcourrier, i N. Bettache, „Mechanical model of cytoskeleton structuration during cell adhesion and spreading”, *Journal of Biomechanics*, t. 41, nr 9, s. 2036–2041, 2008, doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.03.011.
- [103] J. Köry, N. A. Hill, X. Y. Luo, i P. S. Stewart, „Discrete-to-continuum models of pre-stressed cytoskeletal filament networks”, 2 września 2023, *arXiv*: arXiv:2309.01034. doi: 10.48550/arXiv.2309.01034.
- [104] R. H. Pritchard, Y. Y. Shery Huang, i E. M. Terentjev, „Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue”, *Soft Matter*, t. 10, nr 12, s. 1864, 2014, doi: 10.1039/c3sm52769g.
- [105] F. Meng i E. Terentjev, „Theory of Semiflexible Filaments and Networks”, *Polymers*, t. 9, nr 2, s. 52, luty 2017, doi: 10.3390/polym9020052.
- [106] Y. L. Han *et al.*, „Cell contraction induces long-ranged stress stiffening in the extracellular matrix”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, t. 115, nr 16, s. 4075–4080, kwi. 2018, doi: 10.1073/pnas.1722619115.
- [107] E. Berthier, H. Yang, M. Guo, P. Ronceray, i C. P. Broedersz, „Nonlinear mechanosensation in fiber networks”, *Phys. Rev. Research*, t. 6, nr 1, s. 013327, mar. 2024, doi: 10.1103/PhysRevResearch.6.013327.
- [108] M. J. Unterberger i G. A. Holzapfel, „Advances in the mechanical modeling of filamentous actin and its cross-linked networks on multiple scales”, *Biomech Model Mechanobiol*, t. 13, nr 6, s. 1155–1174, lis. 2014, doi: 10.1007/s10237-014-0578-4.

- [109] C. Miehe, „A micro-macro approach to rubber-like materials?Part I: the non-affine micro-sphere model of rubber elasticity”, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, t. 52, nr 11, s. 2617–2660, lis. 2004, doi: 10.1016/j.jmps.2004.03.011.
- [110] G. A. Holzapfel, M. J. Unterberger, i R. W. Ogden, „An affine continuum mechanical model for cross-linked F-actin networks with compliant linker proteins”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, t. 38, s. 78–90, paź. 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.05.014.
- [111] M. J. Unterberger, K. M. Schmoller, A. R. Bausch, i G. A. Holzapfel, „A new approach to model cross-linked actin networks: Multi-scale continuum formulation and computational analysis”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, t. 22, s. 95–114, cze. 2013, doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.11.019.
- [112] H. G. Othmer, „Eukaryotic cell dynamics from crawlers to swimmers”, *WIREs Comput Mol Sci*, t. 9, nr 1, s. e1376, sty. 2019, doi: 10.1002/wcms.1376.
- [113] A. Mogilner i L. Edelstein-Keshet, „Regulation of Actin Dynamics in Rapidly Moving Cells:A Quantitative Analysis”, *Biophysical Journal*, t. 83, nr 3, s. 1237–1258, wrz. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)73897-6.
- [114] V. S. Deshpande, R. M. McMeeking, i A. G. Evans, „A bio-chemo-mechanical model for cell contractility”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, t. 103, nr 38, s. 14015–14020, wrz. 2006, doi: 10.1073/pnas.0605837103.
- [115] N. Branecka, M. E. Yildizdag, A. Ciallella, i I. Giorgio, „Bone Remodeling Process Based on Hydrostatic and Deviatoric Strain Mechano-Sensing”, *Biomimetics*, t. 7, nr 2, s. 59, maj 2022, doi: 10.3390/biomimetics7020059.
- [116] T. Lekszycki i F. dell’Isola, „A mixture model with evolving mass densities for describing synthesis and resorption phenomena in bones reconstructed with bio-resorbable materials”, *Z. angew. Math. Mech.*, t. 92, nr 6, s. 426–444, cze. 2012, doi: 10.1002/zamm.201100082.
- [117] T. S. Keller, Z. Mao, i D. M. Spengler, „Young’s modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone”, *Journal Orthopaedic Research*, t. 8, nr 4, s. 592–603, lip. 1990, doi: 10.1002/jor.1100080416.
- [118] N. Branecka, M. Shanehsazzadeh, M. E. Yildizdag, i I. Giorgio, „A bone remodeling model involving two mechanical stimuli originated from shear and normal load conditions within the 3D continuum mechanics framework”, *Continuum Mech. Thermodyn.*, t. 37, nr 1, s. 7, sty. 2025, doi: 10.1007/s00161-024-01347-8.

- [119] R. Fedele, S. Sessa, i N. Valoroso, „Image Correlation-Based Identification of Fracture Parameters for Structural Adhesives”.
- [120] H. Altenbach, W. H. Müller, i B. E. Abali, Red., *Higher Gradient Materials and Related Generalized Continua*, t. 120. w Advanced Structured Materials, vol. 120. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-30406-5.
- [121] B. S. Lazarov i O. Sigmund, „Filters in topology optimization based on Helmholtz-type differential equations”, *Numerical Meth Engineering*, t. 86, nr 6, s. 765–781, maj 2011, doi: 10.1002/nme.3072.
- [122] M. Edlich, C. E. Yellowley, C. R. Jacobs, i H. J. Donahue, „Oscillating fluid flow regulates cytosolic calcium concentration in bovine articular chondrocytes”, *Journal of Biomechanics*, 2001.
- [123] E. P. Dowling *et al.*, „The effect of remodelling and contractility of the actin cytoskeleton on the shear resistance of single cells: a computational and experimental investigation”, *J. R. Soc. Interface.*, t. 9, nr 77, s. 3469–3479, grudz. 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0428.
- [124] G. T. Charras i M. A. Horton, „Single Cell Mechanotransduction and Its Modulation Analyzed by Atomic Force Microscope Indentation”, *Biophysical Journal*, t. 82, nr 6, s. 2970–2981, cze. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75638-5.
- [125] P. R. Buenzli i N. A. Sims, „Quantifying the osteocyte network in the human skeleton”, *Bone*, t. 75, s. 144–150, cze. 2015, doi: 10.1016/j.bone.2015.02.016.
- [126] S. L. Dallas, M. Prideaux, i L. F. Bonewald, „The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More”, *Endocrine Reviews*, t. 34, nr 5, s. 658–690, paź. 2013, doi: 10.1210/er.2012-1026.
- [127] K. Ikeda, K. Horie-Inoue, i S. Inoue, „Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, t. 191, s. 105375, lip. 2019, doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105375.
- [128] E. Noirrit-Esclassan *et al.*, „Critical Role of Estrogens on Bone Homeostasis in Both Male and Female: From Physiology to Medical Implications”, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021.
- [129] L. T. Ho-Pham, N. D. Nguyen, i T. V. Nguyen, „Quantification of the relative contribution of estrogen to bone mineral density in men and women”, *BMC Musculoskeletal Disord*, t. 14, nr 1, s. 366, grudz. 2013, doi: 10.1186/1471-2474-14-366.
- [130] R. E. Duke, N. J. Stanich, S. Sittadjody, E. C. Opara, J. A. Berberich, i J. M. Saul, „A Simple Mathematical Model Demonstrates the Potential for Cell-Based Hormone Therapy to Address Dysregulation of the Hypothalamus-Pituitary-Ovary Axis in Females

- with Loss of Ovarian Function”, *Ann Biomed Eng*, t. 52, nr 7, s. 1894–1907, lip. 2024, doi: 10.1007/s10439-023-03307-w.
- [131] S. Khosla, M. J. Oursler, i D. G. Monroe, „Estrogen and the skeleton”, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, t. 23, nr 11, s. 576–581, lis. 2012, doi: 10.1016/j.tem.2012.03.008.
- [132] F. Acconcia, C. J. Barnes, i R. Kumar, „Estrogen and Tamoxifen Induce Cytoskeletal Remodeling and Migration in Endometrial Cancer Cells”, *Endocrinology*, t. 147, nr 3, s. 1203–1212, mar. 2006, doi: 10.1210/en.2005-1293.
- [133] M. S. Giretti *et al.*, „Extra-Nuclear Signalling of Estrogen Receptor to Breast Cancer Cytoskeletal Remodelling, Migration and Invasion”, *PLoS ONE*, t. 3, nr 5, s. e2238, maj 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002238.

Spis rysunków

Rysunek 1.1: Schemat przebudowy tkanki kostnej	11
Rysunek 2.1: Schemat budowy kości	15
Rysunek 2.2: Osteoklast	15
Rysunek 2.3: Osteoblast	17
Rysunek 2.4: Osteocyt	18
Rysunek 2.5: Budowa korowej tkanki kostnej	20
Rysunek 2.6: Przebudowa kości	21
Rysunek 2.7: Uproszczony schemat wpływu obciążeń mechanicznych wywołujących proces mechanotransdukcji	22
Rysunek 2.8: Mechanotransdukcja i czynniki wpływające na komórkę	23
Rysunek 2.9: Schemat mechanotransdukcji	24
Rysunek 2.10: Filamenty aktynowe w komórkach	26
Rysunek 2.11: Mikrotubule w komórkach	27
Rysunek 2.12: Filamenty pośrednie w komórkach	28
Rysunek 3.1: Podział mechanicznych modeli żywych komórek na poziomie komórkowym .	35
Rysunek 3.2: Schemat techniki zasysania pojedynczych komórek przy użyciu mikropipety (MPA)	37
Rysunek 3.3: Przyjęty model lepkosprężysty komórki	37
Rysunek 3.4: Podział mechanicznych modeli żywych komórek na poziomie strukturalnym .	45
Rysunek 3.5: Oktahedryczny model tensegrity, źródło [83]	47
Rysunek 3.6: Przykładowe geometrie w modelu naprężonej sieci, źródło [84]	49
Rysunek 3.7: Model piany otwartokomórkowej, źródło [100]	52
Rysunek 5.1: Schemat wpływu sygnału	62
Rysunek 5.2: Wykres funkcji $H(x)$	63
Rysunek 5.3: Schemat przebudowy tkanki kostnej	64
Rysunek 5.4: Geometria i obciążenie dla przypadku czysto hydrostatycznego 2D	65
Rysunek 5.5: Kształt odkształconego elementu dla przypadku czysto hydrostatycznego, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną Wh i (b) dewiatorową Wd część energii	65
Rysunek 5.6: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów SK i SG [N] w czasie t [doba] dla przypadku czysto hydrostatycznego	66

Rysunek 5.7: Geometria i obciążenie dla przypadku czystego ścinania 2D	67
Rysunek 5.8: Kształt odkształconego elementu dla przypadku czystego ścinania, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną Wh i (b) dewiatorową Wd część energii	67
Rysunek 5.9: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów SK i SG [N] w czasie t [doba] dla przypadku czystego ścinania	68
Rysunek 5.10: Geometria i obciążenie dla przypadku rozciągania jednoosiowego 2D.....	68
Rysunek 5.11: Kształt odkształconego elementu dla przypadku jednoosiowego rozciągania, odkształcenia zostały przeskalowane 20-krotnie, przedstawiono (a) hydrostatyczną Wh i (b) dewiatorową Wd część energii	69
Rysunek 5.12: Ewolucja (a) modułów K i G [Pa], (b) sygnałów SK i SG [N] w czasie t [doba] dla przypadku rozciągania jednoosiowego	69
Rysunek 5.13: Schemat modelowanego procesu mechanotransdukcyjnego	71
Rysunek 5.14: Geometria i obciążenie dla przypadku 3D	74
Rysunek 5.15: Umieszczenie punktów pomiarowych: (1) centralny (2) obwodowy	75
Rysunek 5.16: Hydrostatyczna część energii Wh w przypadku 3D	76
Rysunek 5.17: Dewiatorowa część energii Wd w przypadku 3D.....	76
Rysunek 5.18: Procentowa zmiana (a) modułu K , (b) modułu G w czasie t [doba] punktach kontrolnych (1) i (2)	77
Rysunek 5.19: Sygnał (a) SK i (b) SG [J] w czasie t [doba] punktach kontrolnych (1) i (2) ..	77
Rysunek 5.20: Sposoby obciążenia komórki.....	80
Rysunek 5.21: Komórka obciążona A) równolegle do podłoża, B) prostopadle do podłoża, C) normalną do powierzchni komórki	82
Rysunek 5.22: Obciążenie komórki	86
Rysunek 5.23: Zależność $\theta(\mathbf{X})$ od parametrów p i β	86
Rysunek 5.24: Obciążenie i komórki i wyniki symulacji.....	87
Rysunek 5.25: Obciążenie komórki i wyniki symulacji.....	88
Rysunek 5.26: Obciążenie komórki i wyniki symulacji.....	88
Rysunek 5.27: Obciążenie komórki i wyniki symulacji.....	88
Rysunek 5.28: Obciążenie komórki i wyniki symulacji.....	88
Rysunek 5.29: Wyniki symulacji dla różnych wartości t podanych w tabeli 5.8.	91
Rysunek 5.30: Obciążenie trójwymiarowej komórki.....	92

Rysunek 5.31: Optymalizacja topologiczna cytoszkieletu osteocyty 3D dla różnych parametrów p i β	93
Rysunek 5.32: Komórki obciążone przepływem w kanale 100 μ m	94
Rysunek 5.33: Komórki obciążone przepływem w kanale 100 μ m	94
Rysunek 5.34: Komórki nieobciążone przepływem w kanale 100 μ m	94
Rysunek 5.35: Komórki nieobciążone przepływem w kanale 100 μ m	95
Rysunek 5.36: Komórki obciążone przepływem w kanale 300 μ m	95
Rysunek 5.37: Komórki obciążone przepływem w kanale 300 μ m	95
Rysunek 5.38: Komórki nieobciążone przepływem w kanale 300 μ m	96
Rysunek 5.39: Symulacja numeryczna przepływu	97
Rysunek 5.40: Symulacja numeryczna komórki obciążonej przepływem	98
Rysunek 5.41: Przebudowa cytoszkieletu z uwzględnieniem impulsu wapniowego	102
Rysunek 5.42: Punkty kontrolnej (po lewej) i wykres impulsu wapniowego dla każdego z nich (po prawej)	102
Rysunek 5.43: Wyniki symulacji numerycznych sygnału osteocytów	104
Rysunek 5.44: Wykres poziomu estrogenu przy braku terapii hormonalnej	107
Rysunek 5.45: Wykres poziomu estrogenu przy kolejno: dawce $G1$ i $G2$	107
Rysunek 5.46: Wykres przebiegu sygnały osteocytów wzmocnionego o parametr związany z estrogenem	108

Za wykonanie ilustracji do rozprawy dziękuję Annie Matysiak.

Spis tablic

Tabela 3.1: Techniki mechanicznego obciążania komórek i stosowane do nich modele matematyczne.....	35
Tabela 5.1: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	64
Tabela 5.2: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	73
Tabela 5.3: Wartości parametrów dyfuzji użytych w symulacjach numerycznych.....	74
Tabela 5.4: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	79
Tabela 5.5: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	85
Tabela 5.6: Wartości parametrów optymalizacji użytych w symulacjach numerycznych.	86
Tabela 5.7: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	87
Tabela 5.8: Wartości parametru $t[s]$ użyte w symulacjach numerycznych.....	89
Tabela 5.9: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	92
Tabela 5.10: Wartości parametrów SIMP użytych w symulacjach numerycznych.....	92
Tabela 5.11: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	97
Tabela 5.12: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	101
Tabela 5.13: Wartości parametrów użytych w symulacjach numerycznych.....	104
Tabela 5.14: Wartości parametrów użytych w symulacjach.....	107