



Fakulta strojního inženýrství
Ústav konstruování / Odbor tribologie

Faculty of Mechanical Engineering
Institute of Machine and Industrial Design / Department of Tribology

Vliv viskosuplementace na mázání a tření kloubních chrupavek

Projekt disertační práce
Dissertation thesis project

Autor práce: **Ing. David Rebenda**
Author

Vedoucí práce: **doc. Ing. Martin Vrbka, Ph.D.**
Supervisor

1 NÁZEV PRÁCE

1

Vliv viskosuplementace na mazání a tření kloubních chrupavek
Effect of viscosupplementation on lubrication and friction of articular cartilage

2 KLÍČOVÁ SLOVA

viskosuplementace, kloubní chrupavka, synoviální kapalina, fluorescenční mikroskopie, mazání, tření
viscosupplementation, articular cartilage, synovial fluid, fluorescent microscopy, lubrication, friction

3 ANOTACE

3

S nárůstem počtu pacientů trpících degenerativními nemocemi kloubů roste poptávka po léčebných metodách, které by zpomalily rychlost opotřebení kloubní chrupavky a oddálily výměnu lidského kloubu za kloubní náhradu. Jednou z nejčastějších neinvazivních metod léčby je právě viskosuplementace. Díky výrazným rozdílům v efektivitě a délce účinku této metody se však názory lékařů a lékařských organizací na její používání liší. Pro zvýšení efektivity této léčby a vývoj nových viskosuplementů je mimo jiné nutné popsat základní tribologické děje, ke kterým v lidských kloubech dochází a popsat vliv viskosuplementace na tyto děje. Podstata disertační práce tedy spočívá v popisu vlivu složení viskosuplementů na mazání a tření kloubních chrupavek. Aby bylo toto umožněno, je nejdříve nutné popsat vliv složení synoviální kapaliny na procesy spojené s mazáním chrupavek.

4 ÚVOD

Řada klinických stavů jako artróza, trauma, vrozené či získané kloubní choroby vedou ke ztrátě tkáně kloubní chrupavky. Díky avaskulární a aneurální povaze je schopnost regenerace chrupavky velmi nízká. Odhaduje se, že více než 7 milionů dospělých ve Velké Británii (přibližně 15 % populace) trpí dlouhodobými zdravotními problémy spojenými s artrózou. Výsledkem je vysoká poptávka po léčebných metodách pro opravu poškozené kloubní chrupavky především u velkých synoviálních kloubů člověka – kyčle a kolena. Znalosti o fyziologii, biomechanických a biotribologických vlastnostech zdravé kloubní chrupavky nabývají na důležitosti při snaze pochopit průběh nemocí kloubů či při vývoji nových léčebných prostředků a procedur pro léčbu nemocí kloubů [1].

Jednou z neinvazivních metod pro zpomalení degenerace kloubní chrupavky a snížení bolestivosti kloubu je tzv. viskosuplementace. Viskosuplementace spočívá v injekčním vpravení účinné látky do kloubního pouzdra, přičemž touto látkou u současných komerčně vyráběných viskosuplementů bývají nejčastěji kyselina hyaluronová nebo kortikosteroidy. Kyselina hyaluronová (HA) je látkou přirozeně se vyskytující v kloubní chrupavce. Její význam při mazání synoviálních kloubů byl již popsán v řadě studií [2] a bylo dokázáno, že zvýšení koncentrace HA zlepšuje funkčnost kloubů a snižuje bolestivost kloubů. Nicméně řada lékařských studií rovněž poukazuje na rozdíly v účinnosti a délce trvání léčebných účinků u některých pacientů. Z toho pak vyplývají odlišné názory lékařů a lékařských organizací na využívání této metody při léčbě artrózy, chondropatie, atd. Aby bylo možné rozklíčovat tyto rozdíly je mimo jiné nutné objasnit procesy, ke kterým dochází v lidských kloubech při viskosuplementaci a jaký vliv na tyto procesy mají složení synoviální kapaliny a viskosuplementu.

Objasnění dějů, ke kterým dochází při viskosuplementaci, by mělo primárně pomoci v lékařské praxi. Lepší znalost vlivu složení viskosuplementu na tření v kloubech by měla pomoci lékařům při výběru viskosuplementu pro konkrétního pacienta podle složení jeho synoviální kapaliny a tím pádem vést ke zvýšení efektivity léčebné metody. Další oblastí uplatnění se pak nabízí vývoj nových viskosuplementů, kde by znalosti procesů, ke kterým v kloubu dochází, mohli přispět k efektivnějšímu vývoji nových typů těchto přípravků.



Obř. 1 Předozadní rentgenový snímek kyčle při viskosuplementaci [3]

5 SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ ODBORNÉ PROBLEMATIKY V DANÉ VĚDNÍ OBLASTI

5

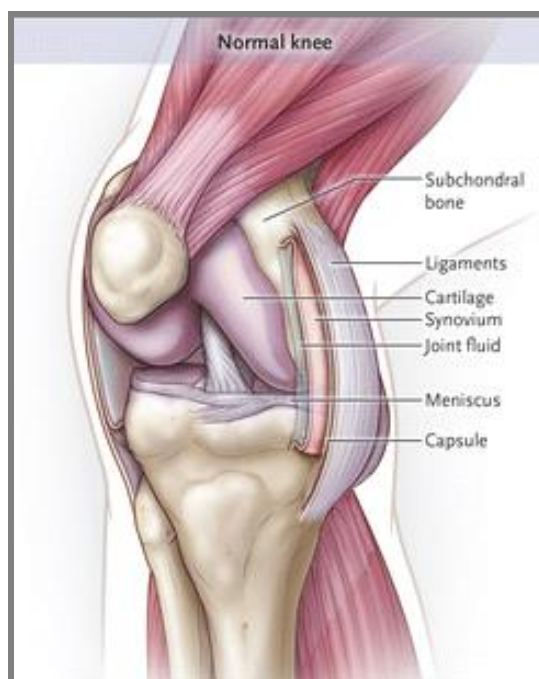
5.1 Synoviální kloub

5.1

5.1.1 Struktura kloubní chrupavky

5.1.1

Třecí povrchy v synoviálních kloubech (Obr. 2) jsou pokryty speciálním typem hyalinní chrupavky tzv. kloubní chrupavkou. Hyalinní chrupavka tvoří povrchy s nízkým třením a zvýšenou pevností v tlaku. Povrch je za normálních podmínek odolný proti opotřebení. Kloubní chrupavka rovněž tlumí rázy. Jedná se o aneurální, avaskulární a alymfatickou měkkou pojivovou tkáň složenou převážně z vody, vláken kolagenu typu II, velkých shluků proteoglykanů a chondrocytů. Kolagen, proteoglykany a chondrocyty tvoří dohromady pevnou strukturu chrupavky. Vzhledem k vysoké poréznosti struktury je zbývající prostor vyplněný intersticiální kapalinou složenou převážně z vody a iontů Na^+ a Cl^- . Největší porozita tkáně je v povrchové vrstvě, směrem k subchondrální tkáni klesá [4].



Obr. 2 Kolenní kloub [5]

Voda tvoří 65 – 80 % hmotnosti chrupavky. Nejvyšší obsah vody je v povrchové vrstvě chrupavky (až 80 %), směrem k subchondrální tkáni její obsah klesá, kdy v hluboké vrstvě je její obsah pouze 65 %. Voda poskytuje chrupavce výživu a slouží jako mazivo. U osteoartrózy je obsah vody vyšší (až 90 %) díky zvýšené permeabilitě a rozrušení matrice. To vede ke snížení pevnosti, Youngova modulu pružnosti a tedy k omezení schopnosti chrupavky přenášet zatížení. Rovněž dochází ke zvětšování chondrocytů a zvyšování obsahu proteinů a snižování počtu buněk. [6,7]

Kolagen tvoří přibližně 10 – 20 % hmotnosti chrupavky. Kolagen typu II tvoří základní komponent (90 – 95 %) vláknové struktury a poskytuje chrupavce pevnost v tahu [7].

Proteoglykany tvoří 10 – 20 % mokré váhy chrupavky a poskytují jí pevnost v tlaku. V chrupavce můžeme nalézt 2 základní typy proteoglykanů - velké agregované monomery proteoglykanů a malé molekuly proteoglykanů. Proteoglykany udržují rovnováhu tekutin a elektrolytů v chrupavce. Vyčerpání proteoglykanů je jedním z prvních rysů artrózy. Makromolekuly mají negativně nabitě síranové a karboxylové skupiny, které přitahují pouze pozitivně nabitě molekuly a odpuzují negativní molekuly. Tím se zvyšuje celková koncentrace anorganických iontů v matrici, což vede ke zvýšení osmolarity chrupavky (osmotického tlaku) a tvorbě Donnanova efektu [7].

Chondrocyty tvoří 1-5 % objemu a jsou řídké rozmístěny v matrici. Jsou zodpovědné za syntézu a udržování všech komponentů matrice pevné struktury (kolagen, proteoglykany, nekolagenní proteiny) a regulují metabolismus chrupavky. Matrice má pH 7,4; změna může snadno narušit strukturu matrice. Jejich funkce je výrazně ovlivněna mechanickým zatěžováním kloubu. V prvotních fázích osteoartrózy jsou chondrocyty zodpovědné za produkci enzymů, které způsobují degradaci pevné matrice chrupavky [7].

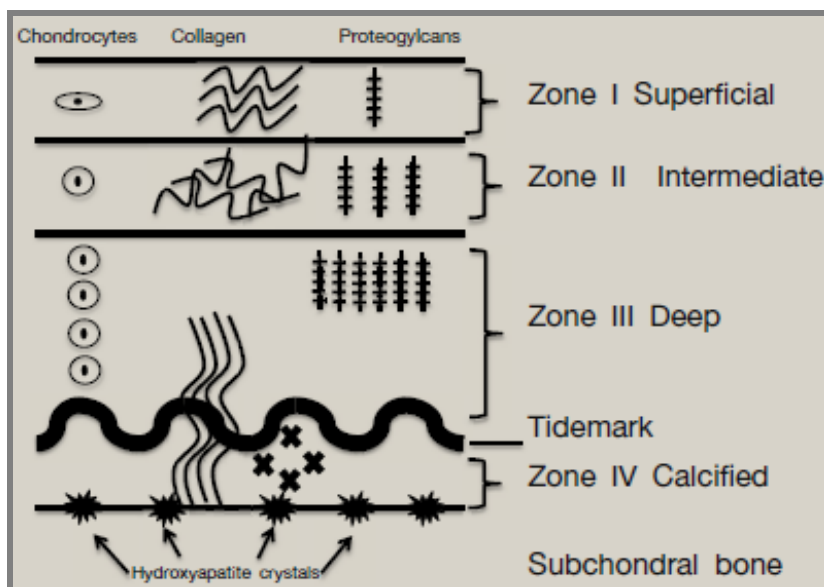
V závislosti na orientaci vláken kolagenu má chrupavka čtyři vrstvy (Obr. 3) – povrchovou, přechodnou, hlubokou a kalcifikovanou vrstvu [4].

Povrchová vrstva je nejtenčí vrstva tvořená zploštělými elipsoidními buňkami. Kolagenová vlákna jsou orientována paralelně k povrchu kloubu a jsou pokryta tenkou vrstvou filmu synoviální kapaliny tzv. lubricinem. Tento protein je zodpovědný za hladký povrch chrupavky. Chondrocyty v této vrstvě syntetizují vysoké koncentrace kolagenu a nízké koncentrace proteoglykanů. Díky tomu je v této vrstvě vysoká koncentrace vody. Paralelní uspořádání vláken poskytuje vrstvě výbornou pevnost v tahu a ve smyku. Poškození vrstvy mění mechanické vlastnosti chrupavky a přispívá k rozvoji osteoartrózy. Vrstva dále slouží jako filtr velkých makromolekul [7].

V přechodné vrstvě je nižší obsah buněk s převážně kulovitým tvarem, které jsou uspořádány v husté matrici. Kolagenové vlákna mají velký průměr a jsou náhodně orientována. Oproti povrchové vrstvě je zde vyšší koncentrace proteoglykanů [7].

V hluboké vrstvě jsou buňky orientovány kolmo k povrchu a mají kulovitý tvar. Vrstva obsahuje vlákna kolagenu s největším průměrem a nejvyšší koncentraci proteoglykanů. Naopak koncentrace chondrocytů je nejnižší. Tato vrstva je zodpovědná za odolnost vůči tlaku a za rozložení zatížení v chrupavce [7].

Kalcifikovaná vrstva je mineralizovaná oblast obsahující malé množství buněk uspořádaných v kalcifikované matrici. Chondrocyty syntetizují kolagen typu X, který je důležitý pro strukturální integritu a spolu se subchondrální tkání tlumí rázy. Jedná se o přechodovou vrstvu mezi chrupavkou a méně odolnou subchondrální tkání [7].



Obr. 3 Schéma kloubní chrupavky [6]

5.1.2 Synoviální kapalina

5.1.2

V synoviálních kloubech plní funkci maziva synoviální kapalina. Jedná se o nažloutlou průhlednou viskózní kapalinu. Synoviální kapalina je dialyzát plazmy modifikovaný látkami, které jsou vylučované kloubní tkání. Oproti ostatním tělním tekutinám odvozeným z plazmy ji pak odlišuje vysoká koncentrace kyseliny hyaluronové [8].

Kapalina se do kloubu dostává činností povrchové vrstvy makrofágů pokrývajících vnitřní list kloubního pouzdra. Zde má pak dvě hlavní funkce – transport látek pro výživu chrupavky a oddělování třecích povrchů, čímž se snižuje tření a opotřebení kloubu [9].

Vlastnosti kapaliny jsou určeny jejím složením. Hlavní složky synoviální kapaliny jsou: voda, proteiny albumin a γ -globulin, kyselina hyaluronová, fosfolipidy a glykoprotein lubricin. Koncentrace jednotlivých složek a jejich vzájemný poměr pak odráží stav kloubu a ovlivňují mazačí schopnosti kapaliny [9].

Synoviální kapalina je newtonskou kapalinou. Její dynamická viskozita je závislá na smykové rychlosti a dalších parametrech jako např. na složení, teplotě a tlaku. U zdravé synoviální kapaliny je dynamická viskozita přibližně 0,02 Pa·s, u pseudosynoviální kapaliny je pak hodnota dynamické viskozity při nízkých smykových rychlostech 0,04 Pa·s [9].

Z humánních důvodů se při laboratorních testech nahrazuje synoviální kapalina hovězím sérem, které je rovněž kapalinou obsahující proteiny a rovněž se chová jako newtonská kapalina. Sérum se při laboratorních testech ředí na 25% koncentraci, při níž je celkový obsah proteinů přibližně shodný s obsahem proteinů v synoviální kapalině. Koncentrace jednotlivých proteinů a i dalších složek je však oproti synoviální kapalině odlišná, což může v určité míře ovlivnit výsledky měření. Objevují se tedy snahy o nahrazení hovězího séra modelovými kapalinami, které by se svým složením a chováním více blížily synoviální kapalině [9, 10].

5.1.3 Vlastnosti kloubní chrupavky

Chrupavka vykazuje znaky řady komplexních charakteristik a chování. Vykazuje znaky viskoelastivity závislé na toku, která je reprezentována mechanismem disipace energie vyplývajícím z tření mezi intersticiální kapalinou a pevnou maticí. Rovněž vykazuje známky viskoelastivity závislé na toku, která je reprezentována mechanismem disipace energie uvnitř matrice. To je způsobeno tvorbou a rozpadáním dočasných vazeb mezi molekulami. Díky vláknové povaze vykazuje chrupavka mnohem větší pevnost v tahu než v tlaku. Navíc díky různé orientaci vláken vykazuje chrupavka anizotropii v tahu a tlaku [4].

Chrupavka trpí na creep a dochází u ní k relaxaci napětí. Creep nastává při zatížení, kdy je kapalina vytlačována z tkáně. Na počátku dochází k velké deformaci a kapalina je rychle vylučována z matrice. Postupně se zmenšujícím se obsahem kapaliny dochází ke zpomalování toku, dokud není dosaženo rovnováhy a tok je zastaven [6].

Deformace chrupavky při zatížení je závislá na interakci kapalné a pevné části resp. na toku intersticiální kapaliny skrz porózní propustnou strukturu kolagenových vláken. Tok intersticiální kapaliny skrz pevnou maticí je doprovázený vznikem relativně velkých třecích sil, které generují tlakové gradienty. Díky tomu je intersticiální kapalina schopna přenášet část zatížení, dokud nedojde k jejímu kompletnímu vytlačení do kloubního prostoru a do nezatížené části chrupavky [1].

Díky tomuto mechanismu mohou být hodnoty součinitele tření v kontaktu kloubních chrupavek velmi nízké. S postupným vytlačováním intersticiální kapaliny dochází k nárůstu zatížení, které se přenáší do pevné struktury chrupavky. Autoři většiny studií předpokládají, že pro udržení nízkých hodnot součinitele tření je nutná rehydratace chrupavky jejím odtížením [11, 12]. Byly však publikovány i studie, ve kterých nebyl pozitivní vliv odtížení na součinitel tření pozorován [13]. Byly dokonce publikovány články [14], ve kterých autoři popřeli nutnost odtížení chrupavky pro její rehydrataci. K rehydrataci chrupavky by mělo docházet díky hydrodynamickému efektu, kdy je stlačené mazivo v klínové mezeře před kontaktem vtlačováno do porózní struktury chrupavky.

5.2 Nemoci kloubní chrupavky

5.2.1 Artróza

Osteoartróza je degenerativní a omezující porucha diartroidálních kloubů postihující přibližně 70 % lidí starších 70 let [15]. Jedná se o jednu z nejběžnějších poruch muskuloskeletálního systému, která je charakterizována nerovnováhou mezi syntézou a degradací kloubní chrupavky a subchondrální kosti [3] a tím pádem poškozením kloubní chrupavky. Poškození chrupavky osteoartrózou způsobuje nárůst tření a částečně rozrušení bifázového mazání [16]. Poškození kloubní chrupavky rovněž vede k zúžení kloubní dutiny a ztrátě schopnosti kloubu absorbovat rázy [3].

Existují důkazy, že osteoartróza je spojena s dědičností, nedostatkem estrogenu a vysokými hodnotami minerálů v kostech. Do vývoje promlouvají další faktory jako oslabené svalstvo v okolí kloubu, obezita, volnost vazů. [15]

Kloub se při artróze stává ztuhlým, oteklým, bolestivým a v pozdějších fázích deformovaným. Rentgen odhalí zmenšení kloubního prostoru, subchondrální cysty se sklerózou a osteofyty. Při inspekci jsou na chrupavce pozorovány oblasti změkčení, rozvláknění, fibrilace, opotřebení kloubní chrupavky a oblasti postižené synovitiidou. Rovněž se mohou vyskytovat oblasti, kde dojde k úplnému opotřebení kloubní chrupavky a tím pádem k odhalení subchondrální tkáně, která bývá často sklerotická. Mikroskopické změny zahrnují povrchové nepravidelnosti, eroze, poškození vrstvy tidemark, trhliny a poškození struktury chrupavky.

Obsah vody je zvýšený a dochází k poklesu obsahu proteoglykanů. Řetězce proteoglykanů jsou zkrácené a poměr keratin/chondroitin je zvýšený. Celkový obsah kolagenu je stejný ale přítomnost kolagenázy (proteáza rozkládající kolagen) rozrušuje jeho orientaci a strukturu. [6]

Spouštěcí faktor aktivuje dělení a aktivitu chondrocytů. Tato aktivace může být způsobena nadměrným zatížením kloubu, nebo defektem v chrupavce či subchondrální kosti. Chondrocyty produkují enzymy, které omezují produkci proteoglykanů. Proteolytická degradace matrice chrupavky zhoršuje vlastnosti chrupavky jako elasticitu, odolnost vůči tlaku a pevnost v tahu [17]. Při poškození chrupavky se uvolňují kusy chrupavky, které následně plavou v kloubním pouzdře. Tyto částice mohou poškodit synoviální výstelku a zasáhnout do správné funkce kloubu. [3]

Během degradace dochází k rozkladu kolagenu typu II, základní složky matrice a aggrecanu (proteoglykan). Kolagenová síť je chráněna dokud nedojde k odstranění povlaku proteoglykanů. Jakmile dojde k porušení kolagenové struktury, dojde ke stavu, který už nelze zvrátit. Chondrocyty mohou být stimulovány mechanicky nebo díky zánětu. [17, 18]

5.2.2 Chondropatie

5.2.2

Chondromalacie pately, v České republice pod názvem chondropatie pately, je časté, ale ne zcela objasněné onemocnění. Chondromalacie pately je patologický stav v oblasti kolenního kloubu, při němž dochází k patologickým změnám v hluboké radiální vrstvě chrupavky. V kolenních kloubech s přítomnou chondromalacií je tlak působící na poškozené místo významně snížen díky ztrátě mechanické integrity chrupavky. Chrupavka, která přímo sousedí s poškozeným místem, je vystavena významně vyššímu kontaktnímu tlaku než normální chrupavka. Tento zvýšený tlak může být příčinou rychlého rozšíření chondromalacie z místa poškození [19]. Dochází k úbytku základní hmoty (proteoglykanů) a destrukci radiálních kolagenních vláken. Povrchové vrstvy chrupavky jsou postiženy až v pozdější fázi vývoje. Tento fakt odlišuje chondropatii od osteoartrózy, při které postihují změny nejdříve povrchovou vrstvu chrupavky [20].

Chondropatie je projevem porušené rovnováhy mezi zatížením, odolností a schopností regenerace. Příčinou vzniku chondropatie mohou být geneticky snížená odolnost chrupavky nebo tzv. malalignment syndrom neboli odchylky v anatomii dolní končetiny a funkci extenzního aparátu kolenního kloubu. Dalším častým startovacím momentem bývá trauma, nejčastěji přímý pád na koleno, po kterém

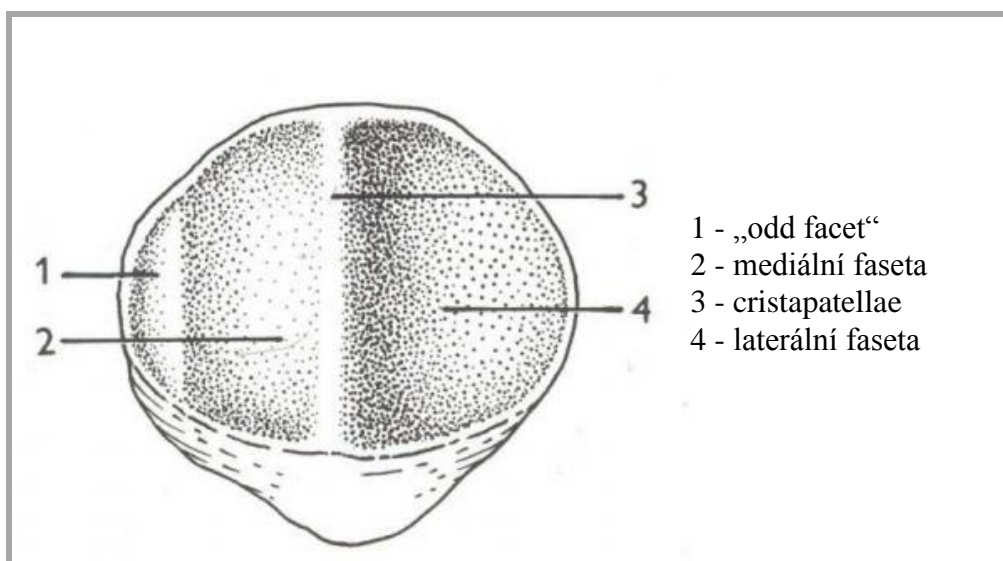
dojde k rozvláknění části kloubní plochy, případně vytvoření puchýře a poté ke kompletní desintegraci chrupavky [20].

Nejčastěji zmiňované dělení v odborné literatuře je podle Outerbridge, který popsal 4 stupně chondromalacie pately dle rozsahu makroskopického postižení [21]:

- I. stupeň – ložisko do 0,5 cm v průměru, dochází k změknutí chrupavky a tvorbě otoku, povrch chrupavky není lesklý, ale matný a nažloutlý.
- II. stupeň – fragmentace a tvorba trhlin na chrupavce v oblasti do průměru ½ palce
- III. stupeň – fragmentace ve větší oblasti než o průměru ½ palce
- IV. stupeň – obnažení subchondrální kosti

Lokalizací změn na chrupavce pately se zabývalo již mnoho studií. Nejčastěji je udávaná mediální faseta pately a „odd facet“. Outerbridge [21] při diagnostice patologií menisků zkoumal i povrch chrupavek a zjistil, že nejčastěji postiženým místem je mediální faseta. Domníval se, že mediální faseta je traumatizována třením o abnormálně zvětšený okraj mediálního kondylu femuru a že existuje vztah mezi velikostí tohoto okraje a závažností poranění chrupavky pately.

Odd facet se dostává do kontaktu s femurem relativně málo, až při 90° flexi, kdy je patela naklopena mediálně a mediální kondyl femuru se dostává s odd facet do kontaktu. Odd facet, a zejména hrana, kterou je oddělena od mediální fasety, je vystavena velkému kontaktnímu tlaku a střihovým silám [22].



Obr. 4 Patela [23]

5.3 Viskosuplementace

Pod viskosuplementací rozumíme intraartikulární podávání kyseliny hyaluronové (HA). HA je polysacharid produkovaný chondrocyty a synoviocyty a je hlavní složkou extracelulární matrice a povrchové vrstvy synoviální membrány. Ve vysoké koncentraci je rovněž obsažena v synoviální kapalině. HA má unikátní viskoelastické vlastnosti. V klidu jsou řetězce spletené do klubek a při náhlém nárazu se

nerozpletou – tato elasticita má tlumící schopnosti. Při pomalém pohybu se řetězce HA rozplétají a působí jako viskózní mazivo. [24]

HA zlepšuje viskoelastické vlastnosti, působí protizánětlivě a stimuluje tvorbu endogenní HA. Viskoelastické vlastnosti HA poskytují synoviální kapalině mazací schopnosti a schopnost adsorbovat rázy. HA pomáhá udržovat strukturu a funkci kloubní chrupavky – vyvolává syntézu a agregaci proteoglykanů a reguluje zánět. [3,24]

Injekce s HA do kloubů se užívají při OA, u pacientů, u kterých neúčinkovaly nefarmakologické terapie a jednoduché analgetika. V osteoartritickém kloubu je synoviální kapalina zředěná zánětlivým výpotkem a její molekulová hmotnost klesá. Ztrácí svoje viskoelastické vlastnosti, v důsledku čeho dochází k většímu přenosu mechanické energie na chrupavku. Cílem viskosuplementace je obnovit SF s normálními reologickými vlastnostmi. Účinky viskosuplementaci se projevují hlavně v počátečních fázích osteoartrózy. [15,25]

Věří se, že mechanismus působení HA v kloubech souvisí s útlumem zánětlivých mediátorů a enzymů rozkládajících chrupavku. Tím je snížena rychlost degradace chrupavky a zvýšena produkce částí tvořících extracelulární matici. [57]

Podle molekulové hmotnosti rozlišujeme přípravky s HA s malou (>700 kDa), střední (800 – 1500 kDa) a vysokou (> 1 500 kDa) molekulovou hmotností. Podle struktury je dělíme na hyaluronany a hylany. Hyaluronany jsou polysacharidy – lineární polymery N-acetyl glykosaminu a kyseliny glukorové. Hylany jsou řetězce hyaluronanů pospojované příčnými vazbami, čímž dosahují několikanásobně vyšší molekulové hmotnosti. Hylany mají podstatně lepší viskoelastické vlastnosti a vydrží v kloubu podstatně delší čas. Receptor CD44, a tím i syntézu endogenní HA, stimuluje nejlépe fragmenty HA s molekulovou hmotností 500 – 1500 kDa, které mají ale horší viskoelastické vlastnosti. U hylanů je aktivace receptorů CD44 pomalejší ale trvá delší dobu. Přehled komerčně dostupných viskosuplementů na Slovensku v roce 2014 je vidět na obr. 5. [24,27]

	Objem účinné látky	Počet injekcí	Obsah kyseliny hyaluronové v 1 injekci	Molekulová hmotnost
Synvisc	2 ml	1–2	16 mg	6 000 kDa
Synvisc One	6 ml	1	48 mg	6 000 kDa
Erectus	2 ml	3	24 mg	1 100 kDa
Go-On	2,5 ml	3	25 mg	800–1 500 kDa
Hyalone	4 ml	3	60 mg	1 500–2 000 kDa
Hyalgan	2 ml	3–5	20 mg	500–730 kDa
Jointex	2 ml	3	16 mg	800–1 200 kDa
RenehaVis	0,7 + 0,7 ml	1–3	15,4 mg/ 7 mg	1 000/2 000 kDa
Sinovial	2 ml	3	16 mg	800–1 200 kDa
Suplasyn One Shot	6 ml	1	60 mg	500–1 000 kDa
Synochrom	2 ml	5	20 mg	1 600 kDa
Synochrom Forte	2 ml	3	40 mg	2 100 kDa

Obr. 5 Přehled dostupných viskosuplementů [24]

Existuje řada studií reportujících výsledky, že IA HA poskytuje úlevu pacientům s osteoartrózou. Nicméně mechanismus, který za tímto stojí, nebyl dosud objasněn. Původní teorie od Balazse a Denlingera [28] počítala pouze s obnovou

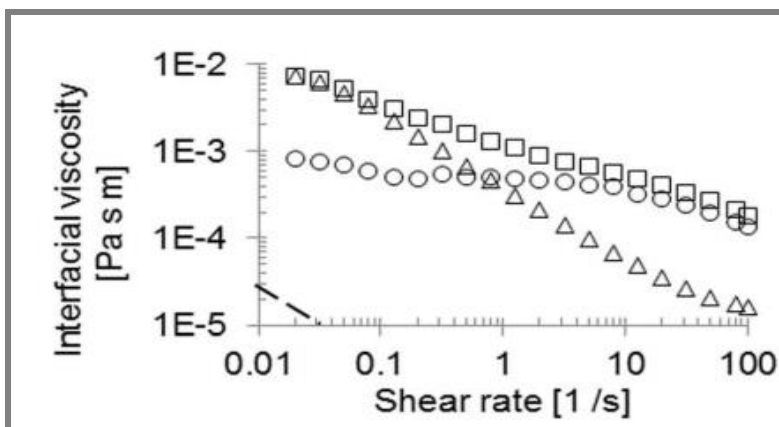
fyziologických/reologických vlastností SF. Nicméně rychlé vymizení IA HA ze synoviální kapaliny a dlouhotrvající pozitivní účinky u pacientů tuto teorii vyvracejí. Následné studie poukázaly na protizánětlivé a imunoregulační schopnosti, které byly zprostředkované díky stimulaci specifických receptorů jako např. CD44. [29]

In vitro studie rovněž poukázaly na chondroprotektivní vlastnosti HA. V těchto studiích vykazovaly lepší výsledky přípravky s molekulovou hmotností $<1\ 000$ kDa. Mechanismus, který je za toto zodpovědný je stále nejasný ale může souviset s lepším průnikem přípravků s nízkou HA do tkáně, čímž je dosažena vyšší koncentrace látky v perikulárním prostředí. Výsledky na zvířatech a lidech ukazují opačné výsledky, kdy je v dlouhodobém horizontu dosaženo lepších výsledků u HA s vysokou molekulovou hmotností. [29]

Důležitým faktorem farmakologické aktivity u makromolekul jako je HA je jejich schopnost pronikat do extracelulární matrice a interagovat s receptory požadovaných buněk nebo se hromadit v perikulárním prostředí těchto buněk, kde můžou regulovat pohyb dalších biologicky aktivních molekul do a z buněk. Oligonometry HA s nízkou molekulovou hmotností, u nichž by byla očekávána volná difuze skrz matrici, mohou vykazovat kontrastní buněčnou odezvu podobnou vysokomolekulární HA. Na základě těchto poznatků se dá předpokládat, že nejvíce farmakologicky aktivní přípravky budou obsahovat HA, která bude dostatečně malá, aby se mohla dostat do pericelulární matrice ale na druhou stranu byla dostatečně velká pro vyvolání požadované buněčné odezvy na daných receptorech a kontrolovat pohyb důležitých mediátorů z a do buněk. [29]

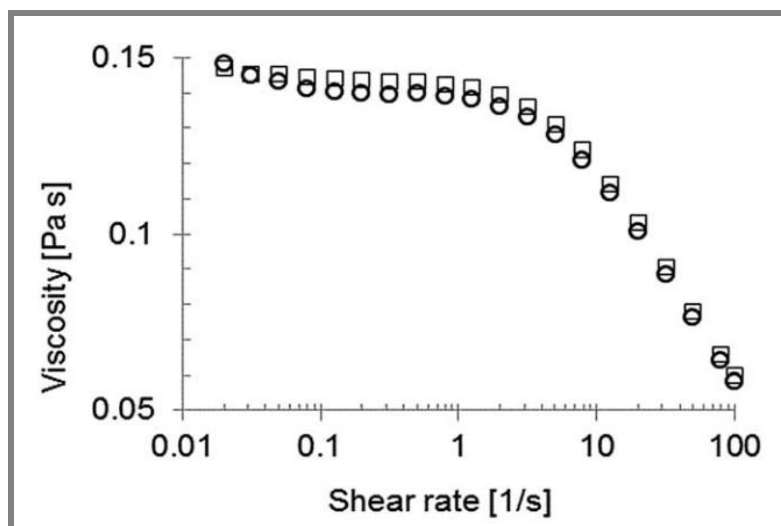
5.3.1 Reologie synoviální kapaliny a viskosuplementů

Zhang a kol. [30] se ve své první studii zabýval vlivem proteinů na reologii modelové synoviální kapaliny. Výsledky ukázaly, že γ -globulinu nemá na reologii synoviální kapaliny zásadní roli, neboť byly pozorovány podobné výsledky měření i pokud byla koncentrace tohoto proteinu řádově jiná. Z grafu závislosti viskozity na smykovém spádu (Obr. 6) je vidět, že chování modelové kapaliny je kombinací vlastností kyseliny hyaluronové při nízkých smykových spádech a albuminu při vysokých smykových spádech. Mezifázový lineární viskoelastický modul modelové synoviální kapaliny poukazuje na elastické vlastnosti podobné hovězímu sérovému albuminu a viskózní vlastnosti kyseliny hyaluronové.



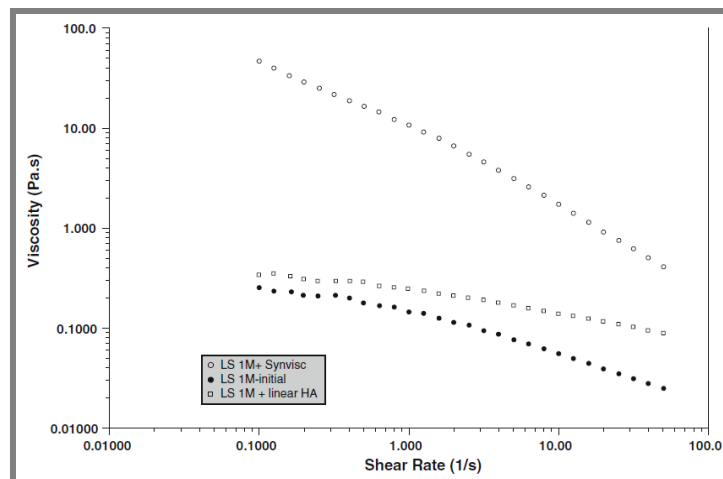
Obr. 6 Závislost viskozity na smykovém spádu synoviální kapaliny (čtverce), kyseliny hyaluronové (kružnice) a albuminu (trojúhelníky) [30]

V navazující práci se Zhang a kol. [31] zaměřili na roli nelineární viskoelasticity kyseliny hyaluronové při mazání kloubů. Otázkou je, zda samotná kyselina ovlivňuje reologii synoviální kapaliny nebo zda interakce mezi proteiny a kyselinou vytváří mikrostruktury, které vylepšují viskoelasticitu. Z dat na obr. 7 je jasně vidět podobnost v chování synoviální kapaliny (kys. hyaluronová, albumin, γ -globulin) a roztoku kyseliny hyaluronové. Rovněž ztrátový a dynamický modul pružnosti v tahu jsou kromě nízkých hodnot symkového spádu velmi podobné. Z toho lze usuzovat, že kyselina hyaluronová je primární složka ovlivňující viskozitu synoviální kapaliny.



Obr. 7 Závislost viskozity na smykovém spádu u modelové synoviální kapaliny (čtverce) a roztoku kyseliny hyaluronové (kružnice) [31]

Mathieu a kol. [32] se ve své studii zabývali reologickými vlastnostmi osteoartritické synoviální kapaliny po přidání různých viskosuplemenů založených na HA. Ve studii jsou použity dva typy komerčně vyráběných viskosuplemenů obsahující lineární a síťovanou kyselinu hyaluronovou. Synoviální kapalina byla získána z pacientů postižených různými stádii osteoartrózy. Na obr. 8 lze vidět závislost viskozity na smykovém spádu pro jednu konkrétní synoviální kapalinu, přičemž je zkoumán rozdíl mezi čistou synoviální kapalinou a synoviální kapalinou s oběma viskosuplementy. Z grafu je celkem jasně vidět, že viskosuplementy mají zásadní vliv na chování synoviální kapaliny. Smíchání synoviální kapaliny s lineární kyselinou hyaluronovou vede k menšímu nelineárnímu chování kapaliny. Na druhou stranu, smíchání synoviální kapaliny se síťovanou kyselinou hyaluronovou vede k výraznějšímu nelineárnímu chování. Přidáním viskosuplementu do synoviální kapaliny rovněž dochází k nárůstu viskozity kapaliny. U lineární kyseliny je nárůst viskozity mírný, u síťované kyseliny je pak, zvláště při nízkých smykových spádech, nárůst viskozity výrazný.



Obr. 8 Závislost viskozity na smykovém spádu u čisté synoviální kapaliny (černé kruhy), synoviální kapaliny modifikované lineární HA (bílé kruhy) a synoviální kapaliny modifikované síťovanou HA (čtverce) [32]

Rovněž Borzacchiello a kol. [33] se zabývali reologií fyziologické a patologické synoviální kapaliny a vlivu nově vyvíjeného viskosuplementu na tyto vlastnosti.

Zdráva synoviální kapalina vykazuje reologické chování typické pro síťovanou strukturu – viskózní při nízkých frekvencích pohybu a převážněji elastické při vysokých frekvencích. Při nízkých frekvencích mohou řetězce uvolňovat napětí rozplétáním a znovu uspořádáváním řetězců během oscilace a roztok tedy vykazuje viskózní chování. Při vysokých frekvencích toto není umožněno a struktura se chová jako trvale zesíťovaná a převládající je elastické chování. Chování patologické synoviální kapaliny je velmi podobné, nicméně dochází k poklesu hodnot visózního a elastického modulu pružnosti v tahu.

Přimíchání viskosuplementu do fyziologické a patologické synoviální kapaliny vede k nárůstu hodnot elastického a viskózního modulu a k vymizení přechodu mezi viskózním a elastickým chováním. Zvyšováním koncentrace viskosuplementu v synoviální kapalině se reologické vlastnosti blíží slabému gelu. U vysokých koncentrací viskosuplementu jsou hodnoty modulů téměř nezávislé na frekvenci pohybu a převládá elastické chování roztoku.

5.3.2 Medicínské studie viskosuplementace

Studie ukazují, že příznivé účinky kyseliny hyaluronové vyplývají z několika odlišných mechanismů, které v lidských kloubech způsobuje s tím, že dominantní mechanismus zatím nebyl odhalen. Patří mezi ně například ochrana chondrocytů, syntéza proteoglykanů a glykosaminoglykanů, protizánětlivé a mechanické účinky, či interakce se subchondrální tkání. Většina exogenní HA zůstává v kloubu pouze pár dnů, zatímco pozitivní dopady léčby kyselinou hyaluronovou mohou být pozorovány až 6 měsíců po aplikaci. To naznačuje, že externě dodaná HA neslouží pouze k samotné viskosuplementaci a tedy k obnově viskoelastických vlastností synoviální kapaliny. Injekce HA může stimulovat synoviocyty v produkci endogenní HA, což vede k částečné obnově obsahu HA v synoviální kapalině a znovuobnovení homeostázy kloubu. Díky okamžitému nárůstu HA v synoviální kapalině dochází ke zlepšení mazacích schopností a schopností pohlcovat rázy u synoviální kapaliny. Rovněž pomáhá udržovat mezní mazací film kolem nociceptorů, což vede ke snížení

vnímání bolestivosti kloubu. Odhaduje, že díky všem těmto procesům dochází k oddálení implantace kloubní náhrady o zhruba 2 roky [34, 35].

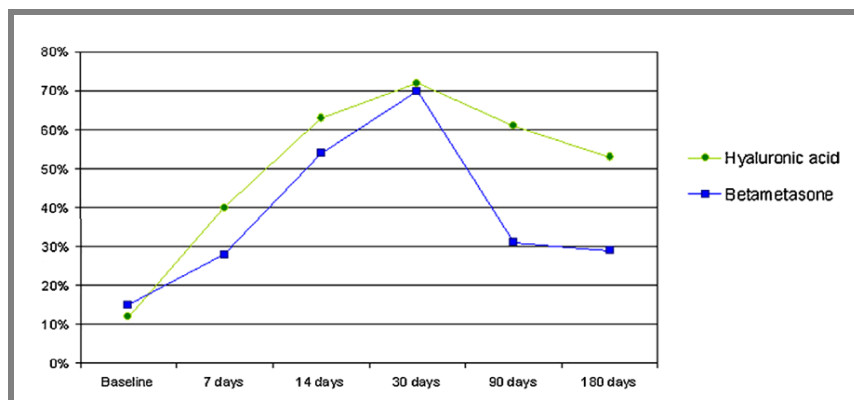
Jednou z vlastností HA, která rozhoduje o účinku viskosuplementu, je molekulová hmotnost. Většina studií se shoduje na tom, že HA s vysokou molekulovou hmotností poskytuje lepší léčebné účinky, než HA s nízkou molekulovou hmotností. Při osteoartróze je totiž mimo jiné snížený obsah endogenní HA v synoviální kapalině a ta má často navíc sníženou molekulovou hmotnost [34,36].

Z lékařských studií zabývajících se viskosuplementací však vyplývají poněkud rozporuplné závěry. Byly publikovány studie, kde autoři nepozorovali rozdíly při použití viskosuplementu oproti placebo [37]. Na druhou stranu byla publikována řada studií poukazující na výrazné snížení bolestivosti kloubů u pacientů, kterým byl aplikován viskosuplement [38, 39]

V článku [38] autoři provedli studii, která se zabývala porovnáním efektivity HA s nízkou molekulovou hmotností a kortikosteroidů při léčbě artrózy palce. Pacienti dostali tři injekce s viskosuplementem s časovým rozestupem jednoho týdne a po dobu šesti měsíců byly prostřednictvím dotazníků zkoumány jejich léčebné účinky.

U obou skupin pacientů došlo na začátku léčby k výrazným poklesům v hodnotách VAS (visual analogue for pain) a FIHOA (functional index for hand osteoarthritis) s tím, že u kortikosteroidů byl znát rychlejší nástup účinků. Hodnoty sledovaných parametrů se v úvodní fázi studie držely na přibližně stejných hodnotách. Nicméně v pozdějších fázích (cca po 90 dnech) výsledky poukázaly na výraznější klinické zlepšení u skupiny léčené HA, kde rovněž došlo k výraznějším zlepšením u pacientů s pokročilejším stádiem nemoci.

Tyto data podporují všeobecně akceptovanou myšlenku, že kortikosteroidy jsou účinnější při snižování zánětu a zmírnění bolesti v počátečních fázích, zatímco obnovení viskoelasticity díky HA vede k obnově homeostázy kloubu a tím k dlouhodobějšímu zlepšení funkčnosti a snížení bolesti kloubu.



Obr. 9 Procento pacientů, jejichž stav byl během léčby označen za dobrý [38]

5.4 Tribologie kloubní chrupavky

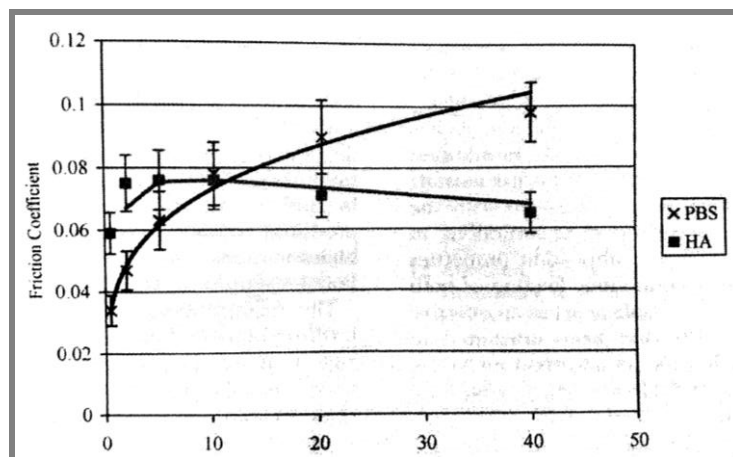
5.4

5.4.1 Tření kloubní chrupavky

5.4.1

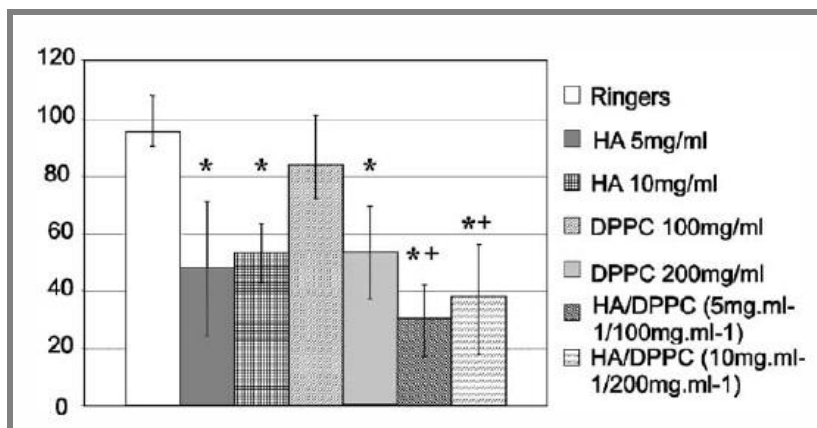
Bell a kol. [40] se jako jedni z prvních zabývali třením v kontaktu chrupavka-
chrupavka. Za podmínek statického a dynamického zatěžování měřili součinitel tření

u zdravých a mechanicky poškozených chrupavek mazaných PBS a kyselinou hyaluronovou. U mechanicky poškozené chrupavky byly za všech testovacích podmínek naměřeny vyšší hodnoty součinitele tření. Kyselina hyaluronová se během testů ukázala jako velmi efektivní mazivo. Při testech statického zatěžování byly hodnoty součinitele tření výrazně nižší oproti PBS. U dynamických testů (Obr. 10) se rozdíl projevil až v pozdějších fázích měření, kdy docházelo k vytlačení intersticiální kapaliny z chrupavky.



Obr. 10 Závislost součinitele tření na čase pro PBS a HA u mechanicky poškozené chrupavky [40]

Pozitivní vliv kyseliny hyaluronové na tření poškozené chrupavky zaznamenal rovněž Forsey a kol. [15]. Při použití kyseliny hyaluronové, jako maziva v kontaktu chrupavka-chrupavka, byly hodnoty součinitele tření výrazně nižší oproti referenčnímu mazivu – Ringerovu roztoku. Podobné hodnoty byly pozorovány nezávisle na koncentraci kyseliny. Naopak při použití roztoku fosfolipidů bylo snížení hodnot součinitele tření závislé na jejich koncentraci v roztoku. Smíchání kyseliny a fosfolipidů do jednoho roztoku vedlo ještě k výraznějšímu snížení hodnot součinitele tření. Interakce těchto dvou složek synoviální kapaliny tedy může hrát při tření a mazání chrupavek významnou roli. Souhrnné výsledky všech měření jsou vidět na obr. 11.

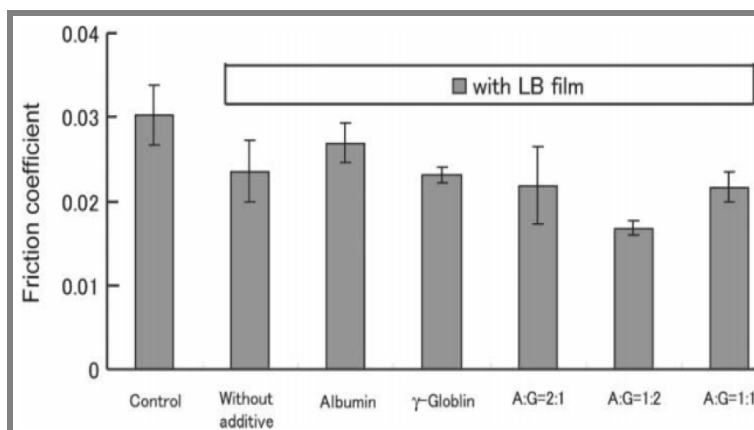


Obr. 11 Procentuální snížení hodnot součinitele tření pro různá maziva [15]

Při výzkumu v oblasti tribologie se přistupuje i k náhradě chrupavek za jiné materiály. Jednou skupinou z nich mohou být tzv. hydrogely. Jedním z článků,

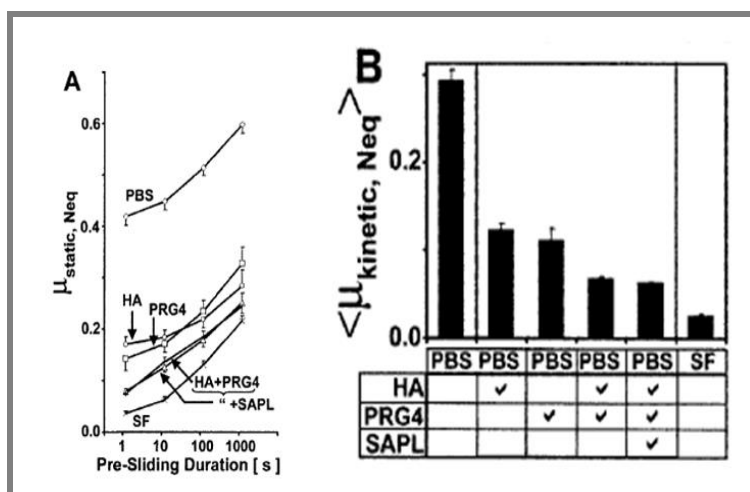
zabývajících se měřením tření v kontaktu hydrogelu mazaném různými proteinovými roztoky je článek od Murakamiho a kol. [41]. Autoři využili tribometr typu pin-on-plate s konfigurací pin z hydrogelu proti skleněné desce a kontakt postupně mazaly roztoky albuminu, γ -globulinu a jejich kombinací s různými koncentracemi. Proteiny byly zároveň fluorescenčně označeny a díky skleněné desce byl umožněn náhled do kontaktu během pohybu.

Výsledky (Obr. 12) ukázaly, že při stejné koncentraci je tření v kontaktu mazaném γ -globulinem nižší, než u albuminu. Smíchání obou proteinů do jednoho roztoku vede ke snížení součinitele tření, nicméně se ukazuje, že změna koncentrace albuminu v roztoku nemá na součinitel tření žádný vliv. Oproti tomu zvýšení koncentrace γ -globulinu způsobuje značný pokles tření.



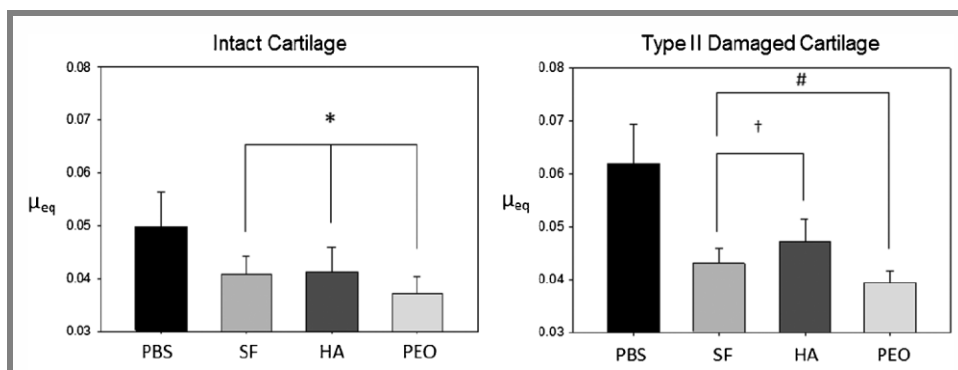
Obr. 12 Hodnoty součinitele tření pro různá maziva [41]

Schmidt a kol. [42]. se ve své práci zabýval vlivem několika složek synoviální kapaliny – kyseliny hyaluronové, proteoglykanů a fosfolipidů na součinitel tření v kontaktu chrupavka-chrupavka. Výsledky (Obr. 13) ukázaly výrazný pokles v hodnotách součinitele tření u kyseliny hyaluronové a proteoglykanů v závislosti na koncentraci oproti PBS. U fosfolipidů snížení tření pozorováno nebylo. Ani přimíchání fosfolipidů do roztoku obsahující kyselinu nebo proteoglykany nevedlo k dalšímu snížení tření. Ukazuje se tedy, že fosfolipidy nehrají při mazání chrupavek žádnou významnou roli.



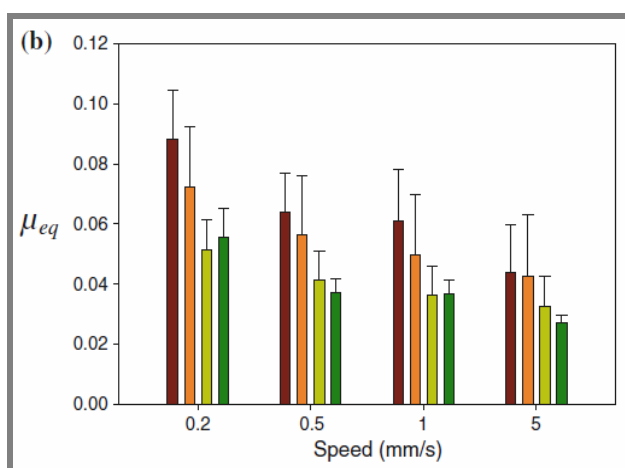
Obr. 13 Statický a dynamický součinitel tření pro různá maziva [42]

Podobné výsledky zveřejnil Shi a kol. V článku [43] se zabýval vlivem složení maziva na součinitel tření u nedotčené a mechanicky poškozené chrupavky. Výsledky měření na tribometru pin-on-disc jsou uvedeny na obr. 14. Při použití PBS, jako maziva, je u poškozené kloubní chrupavky vidět výraznější nárůst součinitele tření. Oproti tomu u ostatních maziv – synoviální kapaliny, PEO (PBS + polyetylenglykol) a HA (PBS + kyselina hyaluronová) bylo pozorováno pouze minimální navýšení hodnot součinitele tření. Toto naznačuje, že různé složky synoviální kapaliny mohou zlepšit mazání chrupavky a snížit tak její opotřebení.



Obr. 14 Rozdíly v hodnotách součinitele tření pro netknutou a mechanicky poškozenou chrupavku a různá maziva [43]

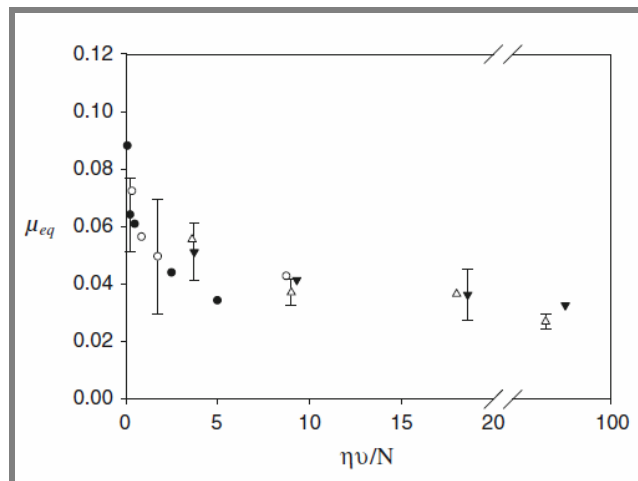
Ve své další práci [44] se Shi a kol. opět zabývali vlivem složení maziva na tření u chrupavek. Bylo porovnáváno čisté PBS se dvěma roztoky polyetylenglykolu (PEG) o různé molekulové hmotnosti v PBS a roztokem chondroitin sulfátu (CS) v PBS. Výsledky (Obr. 15) opět ukazují výrazný pokles součinitele tření u roztoků PBS oproti čistému PBS. Z grafu lze rovněž vyčíst pokles tření při nárůstu rychlosti. Z výsledků s roztoky polyetylenglykolu lze dále vyčíst, že součinitel tření klesá s rostoucí viskozitou maziva. Biokompatibilní polymery s vysokou molekulovou hmotností by tedy mohli být rovněž využívány při léčbě nemocí spojených s opotřebením chrupavky.



Obr. 15 Závislost tření na rychlosti pro PBS (hnědá), PEG v PBS (oranžová, žlutá) a CS v PBS (zelená) [44]

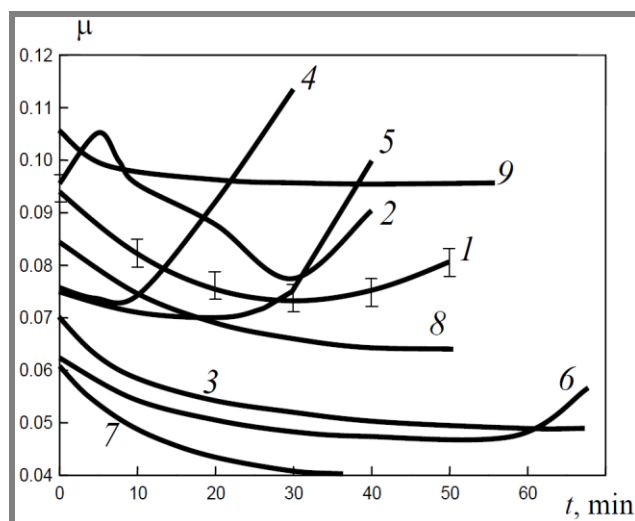
Pokud se výsledky tření vykreslí v závislosti na Herseyho čísle (Obr. 16), je u všech maziv vidět jednotný trend vývoje. Tento fakt poukazuje na význam viskozity,

zatížení a rychlosti při analýze režimů mazání v chrupavce. V první části grafu dochází s nárůstem Herseyho čísla k poklesu součinitele tření, což naznačuje smížený režim mazání v kontaktu. V druhé části jsou hodnoty tření na Herseyho číse nezávislé, což vede spíše na výraznější vliv hydrodynamického režimu mazání.



Obr. 16 Závislost součinitele tření na Herseyho čísle [44]

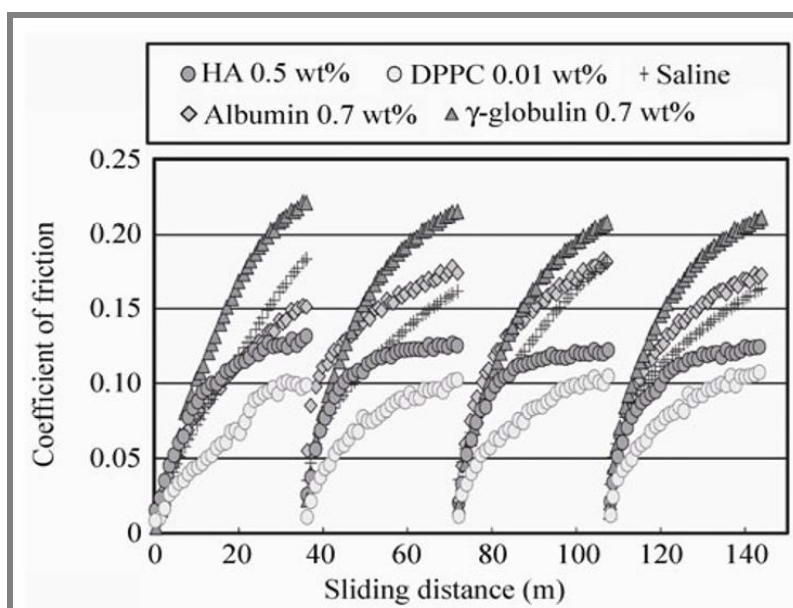
Cherniakova a Pinchuk se ve studii [45] zabývali vlivem odlišného složení viskosuplementů na součinitel tření. Pomocí kyvadlového simulátoru měřili součinitel tření mezi ocelovým hranolem a podložkou z UHMWPE polyethylenu, přičemž jako mazivo bylo postupně použito 8 viskosuplementů s odlišnou účinnou látkou a léčebným efektem a dále byl experiment pro porovnání proveden se synoviální kapalinou. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 17. Výsledky ukazují, že každý typ maziva vykazuje odlišné hodnoty součinitele tření, všechny viskosuplementy vykazují vyšší hodnoty než čistá synoviální kapalina. Nejnižších hodnot bylo dosaženo pro Hyalgan a Diprospan. Výsledky testů byly použity při vývoji nových léků na osteoartrózu. In vitro výsledky nových léků byly verifikovány během klinických testů, což dokazuje, že analýzy mazání a tření mohou výrazně pomoci při vývoji nových léčiv.



Obr. 17 Závislost součinitele tření na čase pro 1 – hydrocortizon, 2 – Kenalog, 3 – Diprospan, 4 – linkomycin, 5 – Synvisk, 6 – Hyalgan, 7 – SF, 8 – hydrokortizon, 9 – chondrosamin [45]

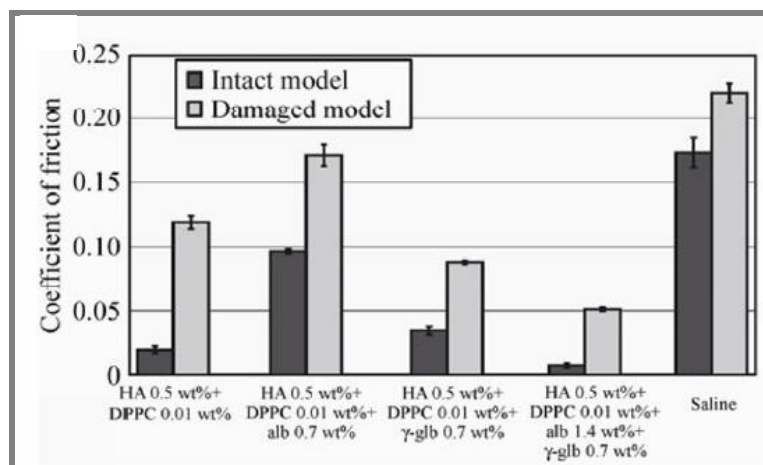
Jednou z mála studií, která se zabývala i vlivem proteinů, obsažených v synoviální kapalině, na tření je článek od Murakamiho a kol. [46]. Autoři měřili součinitel tření v kontaktu chrupavka-sklo mazaném roztoky kyseliny hyaluronové, fosfolipidů, albuminu a γ -globulinu (celkem 13 maziv). Měření proběhla jak pro roztoky obsahující pouze jednotlivé složky tak i roztoky obsahující různé kombinace dvou a tří složek. Poslední měření bylo se solným roztokem obsahujícím všechny čtyři složky, který svým složením reprezentoval synoviální kapalinu. Experimenty navíc proběhly pro netknutou a mechanicky poškozenou chrupavku.

Přidání jednotlivých proteinů do základního solného roztoku způsobilo pokles počáteční hodnoty součinitele tření, nicméně hodnoty dosažené na konci měření byly vyšší (Obr. 18). Rozdíly v hodnotách tření pro jednotlivé proteiny autoři připisují lepší schopnosti γ -globulinu adsorbovat na povrch chrupavky. Největšího snížení tření je dosaženo přidáním fosfolipidů (DPPC) do solného roztoku.



Obr. 18 Vliv složek synoviální kapaliny na tření [46]

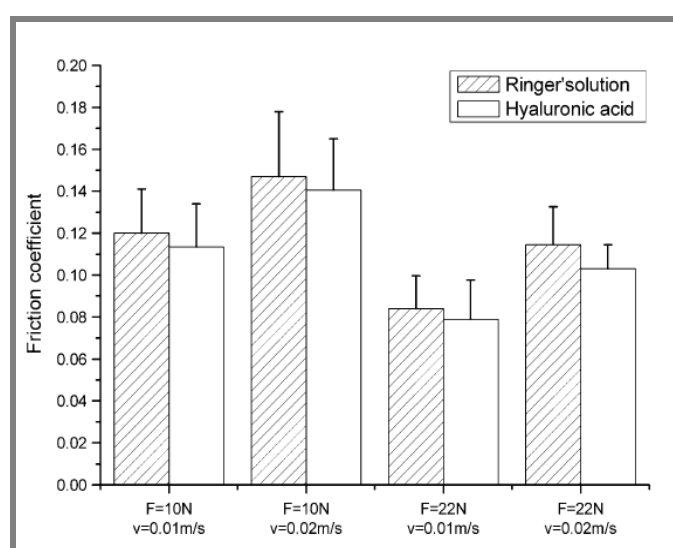
Zajímavé je pak sledovat chování roztoků obsahujících více složek synoviální kapaliny. Roztoky proteinu a kyseliny byly vyšetřovány v dřívějším článku autorů, výsledky zde tedy nejsou uvedeny. Přidání fosfolipidů do roztoku albuminu nebo γ -globulinu vede v obou případech ke snížení součinitele tření u netknuté chrupavky, naopak u mechanicky poškozené chrupavky dochází k nárůstu součinitele tření. Autoři tuto situaci vysvětlují rozdílným charakterem formování adsorbovaného filmu na povrchu chrupavky. Přidání DPPC k HA vede ke většímu snížení tření než u kombinací DPPC-protein. Nejnižších hodnot součinitele tření bylo dosaženo u obou typů chrupavek pro roztok reprezentující synoviální kapalinu (Obr. 19).



Obr. 19 Vliv kombinace složek SF na součinitel tření [46]

V roce 2016 vyšla práce autorů Li a kol. [47] rovněž mapující vliv maziva na tření tentokrát v kontaktu chrupavky a PVA hydrogelu. Měření probíhala na zařízení typu pin-on-plate v kombinaci chrupavky přilepené na pinu a podložky z již zmíněného hydrogelu. Kromě vlivu maziva (Ringerův roztok, HA) byl dále zkoumán vliv zatížení a kinematických podmínek.

Výsledky (Obr. 20) ukazují, že při zvýšení přitlačné síly dochází k poklesu součinitele tření a při nárůstu kluzné rychlosti dochází k nárůstu součinitele tření. Rozdíl hodnot při použití různých maziv je značný, přičemž hodnoty součinitele tření při použití kyseliny hyaluronové jsou nižší. Výsledky krátkodobých testů vlivu složení na tření byly ověřeny při dlouhodobých testech. Výsledky byly velmi podobné. Při použití kyseliny hyaluronové došlo po určité době k ustálení součinitele tření, kdežto u Ringerova roztoku docházelo během celého experimentu k růstu koeficientu tření. Zajímavé bylo rovněž vyhodnocení opotřebení třecích povrchů po experimentech pomocí ESEM (environmental scanning electron microscopy). U chrupavky nebyly zpozorovány známky opotřebení, kdežto u hydrogelu došlo ke značnému poškození povrchových vrstev a částice hydrogelu ulpívaly na povrchu chrupavky.

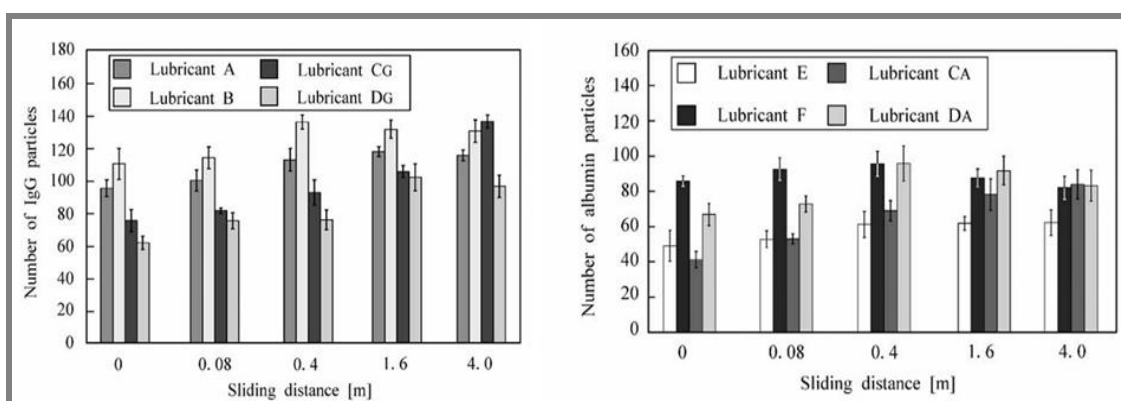


Obr. 20 Závislost součinitele tření na rychlosti a zatížení pro různá maziva [47]

5.4.2 Mazání kloubní chrupavky

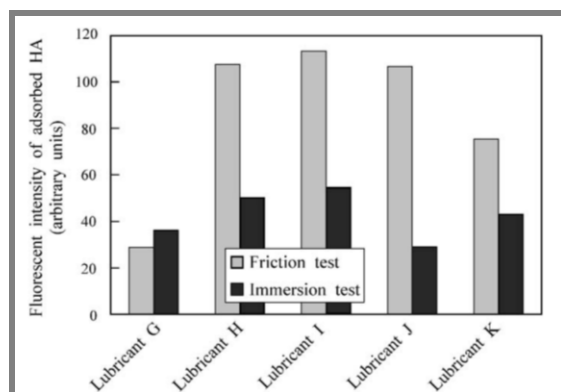
Oblast mazání kloubních chrupavek je oproti tření dosti opomíjena. Přičemž doposud například nebyly publikovány články zabývající se měřením tloušťky mazacího filmu v kontaktu chrupavky. Jedním z mála týmů, které se zabývají touto problematikou je výzkumný tým z Kyushu University. Ten v roce 2008 vydal článek [48], ve kterém autoři analyzovali proteinový film adsorbovaný na třecích površích. Experimenty probíhaly na recipročním tribometru typu pin-on-plate, kdy pin byl z PVA hydrogelu a jezdil po skleněné desce. Kontakt byl mazaný roztoky obsahující albumin, γ -globulin a kyselinu hyaluronovou. Složky byly fluorescenčně označeny a díky snímání kontaktu pomocí fluorescenční aparatury s CCD kamerou byly experimenty zaznamenávány. Se snímků pak byly analyzovány počty částic adsorbovaných na třecím povrchu během experimentu.

Počet částic adsorbovaných z globulinového roztoku (Obr. 21) je vyšší než u roztoku obsahující oba proteiny, přičemž vyšší koncentrace albuminu má za následek nižší počet adsorbovaných částic γ -globulin. U albuminu jsou nejvyšší počty částic u roztoků s vyšší koncentrací albuminu bez výrazného rozdílu, jestli roztok obsahuje i γ -globulin nebo ne. Při nízkém poměru albumin- γ -globulin dochází k adsorpci γ -globulinu na skle kdežto při vysokém poměru albumin- γ -globulin dochází ke snadné desorpci γ -globulinu a jeho náhradě za albumin.



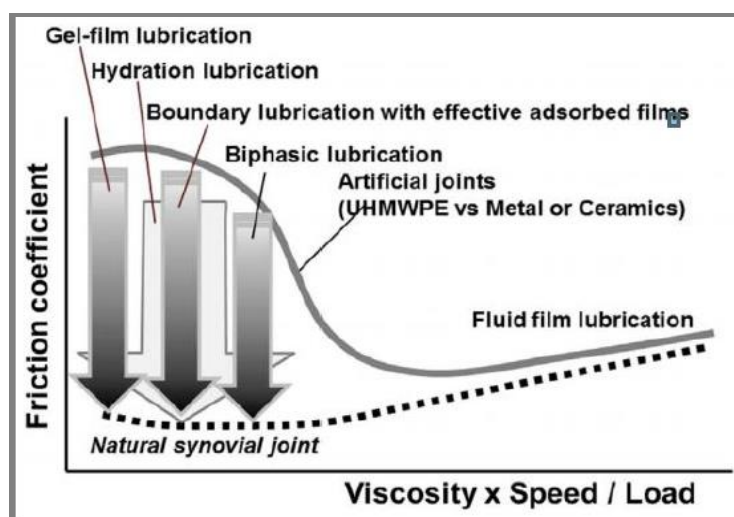
Obr. 21 Závislost počtu částic γ -globulin a albuminu na kluzné dráze pro různé roztoky: A,B – roztoky γ -globulinu (0,7 a 1,4 mg/ml); C,D – roztoky obsahující oba proteiny (A:G = 1:2 a 1:1); E,F – roztoky albuminu (0,7 a 1,4 mg/ml) [48]

Experimenty s kyselinou hyaluronovou (Obr. 22) ukazují, že při smíchání albuminu s HA jsou hodnoty intenzity adsorbované HA poměrně nízké. Molekuly těchto látek se totiž navzájem odpuzují. Na třecím povrchu je adsorbovaný protein albumin a díky odpuzujícím silám mezi těmito dvěma látkami je množství HA na povrchu minimální. Již dříve však bylo dokázáno, že kyselina tvoří s proteiny komplexní struktury, které obsahují výhradně γ -globulin a téměř žádný albumin. I z měření a snímků s fluorescenčně označenou HA, je vidět, že přítomnost γ -globulinu v roztoku zvyšuje intenzitu vyzářeného světla, což odpovídá většímu množství adsorbované HA na třecích površích.



Obr. 22 Fluorescenční intenzita adsorbované HA v různých roztocích: G – roztok albuminu; H – roztok γ -globulinu; I, J – roztoky obsahující oba proteiny (A:G = 1:2 a 1:1); K – roztok pouze s HA [48]

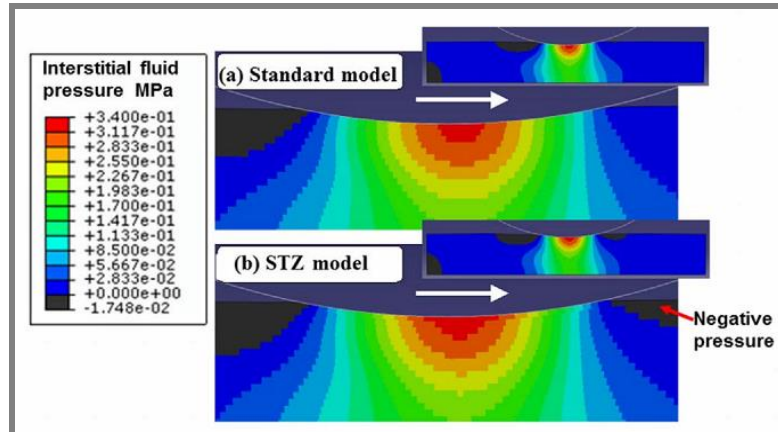
V roce 2017 vydal stejný tým článek [49], ve kterém se autoři zabývali režimy mazání při malých smykových rychlostech. Autoři uvádí, že při nízkých smykových rychlostech pracují klouby v tzv. multimode režimu mazání a při vysokých smykových rychlostech se režim mění na soft-EHD nebo micro-EHD. Kapalinové režimy nastávají pouze při chůzi nebo běhu. Multimode režim nastává při trvalém zatížení kloubu nebo při malých smykových rychlostech mezi třecími povrchy. Multimode režim se přizpůsobuje podle daných podmínek vždy tak, aby zajistil pohyb kloubu s velmi nízkou hodnotou součinitele tření a nízkým opotřebením třecích povrchů. Podle podmínek v kloubu můžeme adaptivní multimode dále rozdělit na několik podrežimů: gel-film mazání, hydratační mazání, dvoufázové mazání a mezní mazání s adsorbovaným filmem (Obr. 23). Zatím však není známo, jakými pravidly se režim řídí a za jakých podmínek nastávají jednotlivé podrežimy.



Obr. 23 Stribekova křivka multimode režimu [49]

Autoři pak v práci provedly numerickou analýzu statického kontaktu a statického kontaktu zatěžovaného konstantní silou. Tyto podmínky by měly odpovídat dvoufázovému mazání. Pro výpočet byly vytvořeny dva modely – standardní a modifikovaný, který zahrnoval úpravu povrchové vrstvy chrupavky na tangenciální. Modifikovaný výpočtový model pak vykazoval nižší hodnoty tření.

Autoři dále numericky určily Von Mises napětí a intersticiální tlak kapaliny v chrupavce. Výsledky (Obr. 24) ukazují vznik podtlaku ve vstupní oblasti kontaktu, což napomáhá rehydrataci chrupavky. Tento jev byl však pouze pozorován u modifikovaného výpočtového modelu.



Obr. 24 Rozložení tlaku v kontaktu podle standardního a modifikovaného výpočtového modelu [49]

5.5 Příprava vzorků a uchování chrupavek

Získání vzorků zdravých lidských chrupavek pro testování je hlavně díky etickým komisiím poměrně velký problém. Vzorky lidské chrupavky lze většinou získat pouze z kloubů pacientů podstupujících implantaci kloubních náhrad [15, 50]. Takto získané klouby jsou však v naprosté většině případů poškozeny osteoartrózou a vzorky pro měření lze získat pouze z nezatěžovaných oblastí chrupavky. Chrupavka má ale v těchto oblastech odlišné mechanické vlastnosti [13] a její využití pro testy tedy není příliš vhodné.

Z výše uvedených důvodů se při testování tribologických vlastností chrupavek přistupuje k náhradě lidských chrupavek zvířecími. Nejčastější typy náhrad jsou chrupavky z hovězího kolene [12, 14, 43, 44], hovězího femuru [13, 40], hovězí pažní kosti [51] či z prasečího kolene [46].

Pro laboratorní testování kloubních chrupavek se nejčastěji využívají tribometry typu pin-on-disc a pin-on-plate. Z kloubu je tedy nutné extrahovat vzorky chrupavky odpovídajícího tvaru. Z literatury vyplývají dva odlišné přístupy k tvorbě pinů z chrupavek. Buďto se pomocí speciálních nástrojů extrahuje pouze samotná chrupavka, která se následně přilepí na kovový/akrylový pin o předem definované geometrii [11, 13, 44] nebo se pomocí dutého vrtáku či frézy extrahuje chrupavka i se subchondrální tkání [14, 15, 42]. Hlavní výhodou prvního řešení je přesně definovaná geometrie pinu potažmo chrupavky. Otázkou však zůstává, nakolik ovlivní vlastnosti chrupavky lepidlo, pomocí kterého se chrupavka k pinu přilepí a jak se do výsledků promítne záměna subchondrální tkáně za kov/akryl (podkladový materiál chrupavky).

Chrupavka jakožto biologický materiál podléhá poměrně rychle degradaci a ztrácí svoje mechanické vlastnosti. Z hlediska dlouhodobého testování tribologických

vlastností chrupavek je proto důležité nalézt vhodné skladovací podmínky a média pro uchovávání. Z odborných článků lze vyčíst hned několik možných přístupů k dané problematice.

Pro krátkodobé uchování chrupavek v řádech dnů (max. 7) se ukazuje být vhodné skladování v lednici při 4 °C [12, 14, 44, 51, 52] ve fosfátem pufrovaném solném roztoku (PBS). Díky nízké teplotě by mělo dojít k zpomalení degradace buněk. Pro udržení životaschopnosti buněk po krátký čas (max. 24 h) je možné zapojit i opačný postup a chrupavku uchovávat při teplotě lidského těla v roztoku DMEM/F12 (BSA, streptomycin, penicilin) [13].

Pro dlouhodobé uchovávání chrupavky je nutné ještě více snížit rychlost degradace tkáně, a proto se chrupavka hluboce mrazí na – 20 °C. Jako vhodné médium pro uchovávání se opět ukazuje PBS [11, 43, 50] nebo Ringerův roztok [53].

Všechny výše uvedené podmínky by měly zajistit zachování mechanických vlastností chrupavky po určitou dobu. Žádný z výše uvedených článků se ovšem nezabývá porovnáním vlivu odlišných podmínek na mechanické vlastnosti chrupavky. Jedna z mála studií, která se touto problematikou zabývala je od autorů Szarko a kol. [54]. Autoři ve studii porovnávali vliv odlišné teploty a metody zmrazení chrupavky na její tuhost. Vzorky chrupavky byly po určitou dobu skladovány při 4 °C, -20 °C, -80 °C a při -80 °C s tím, že byl vzorek rychle zmrazen pomocí tekutého dusíku. Poté se všechny vzorky nechaly při 37,5 °C roztát na pokojovou teplotu a proběhl test mechanických vlastností. Výsledky ukázaly zhoršení mechanických vlastností (tuhosti) pouze u vzorku zmrazeného pomocí tekutého dusíku. Vysoká rychlost zmrazení zvyšuje šanci tvorby tzv. ledových čoček. Formování těchto čoček uvnitř chrupavky vede k porušování kolagenových vláken a k již zmíněnému zhoršení mechanických vlastností.

6 ANALÝZA, INTERPRETACE A ZHODNOCENÍ POZNATKŮ ZÍSKANÝCH NA ZÁKLADĚ KRITICKÉ REŠERŠE

6.1 Kloubní chrupavka

Kloubní chrupavka se jakožto biologický materiál svými materiálovými charakteristikami výrazně liší od materiálů, se kterými se pracuje v klasické tribologii nebo v oblasti biotribologie kloubních náhrad. Její tribologické vlastnosti jsou výrazně ovlivněny bifázovou strukturou a tedy interakcí mezi pevnou a kapalnou fází. Pevná matrice je tvořena vlákny kolagenu typu II, proteoglykany a chondrocyty. Jelikož se jedná o porézní strukturu, jsou volné prostory vyplněny vodou, proteiny, volnými ionty, atd. Tyto látky slouží jednak k výživě chrupavky ale zároveň slouží i jako mazivo. Kolagen, tvořící vláknovou strukturu, dodává chrupavce pevnost v tahu. Díky přítomnosti proteoglykanů má pak chrupavka pevnost v tlaku. Chondrocyty jsou v chrupavce zodpovědné za syntézu kolagenu a regulují metabolismus chrupavky. [4, 7]

V závislosti na uspořádání kolagenových vláken, proteoglykanů a chondrocytů lze chrupavku rozdělit na 4 vrstvy – povrchovou, přechodnou, hlubokou a kalcifikovanou. V povrchové vrstvě je nejvíce kolagenu a nejméně proteoglykanů, což vede k vysokému obsahu vody ve vrstvě. Díky vláknům kolagenu, které jsou orientovány tangenciálně k povrchu chrupavky, má tato vrstva výbornou pevnost v tahu a ve smyku. Zároveň tato vrstva tvoří filtr velkých molekul (proteiny, HA), které ulpívají na povrchu a tvoří mezní mazací film. V hlubších vrstvách dochází k přeorientování vláken kolmo k povrchu chrupavky a navíc se zvyšuje jejich průměr, což způsobuje vyšší odolnost proti tlakovému zatížení a jeho lepší rozložení. Díky své unikátní struktuře vykazuje chrupavka znaky řady komplexních materiálových charakteristik jako např. viskoelasticity, creepu či relaxace napětí. [4, 6, 7]

Při degenerativních kloubních onemocněních (artróza, chondropatie) dochází k poruše rovnováhy mezi syntézou a degradací kloubní chrupavky a k rozrušení struktury chrupavky v různých vrstvách, což vede ke zhoršení mechanických vlastností chrupavky, rozrušení bifázového mazání, nárůstu součinitele tření a snížení schopnosti absorbovat rázy. V chrupavce může docházet ke změkčením, fibrilacím, rozvláknění kolagenové struktury a mohou se objevit oblasti postižené synovitiidou. [3]

6.2 Viskosuplementace

Viskosuplementace spočívá v injekčním vpravení HA do postiženého kloubu. Prvotní studie zabývající se touto problematikou [28] věřili, že HA se dodává do kloubu pouze za účelem zlepšení reologických vlastností synoviální kapaliny. Medicínské studie však poukázaly na pozitivní účinky této léčebné metody i po několika měsících od aplikace viskosuplementu. Endogenní HA přitom zůstává v kloubech pouze několik dnů.

Studie ukazují, že dostatečně malé molekuly HA mohou pronikat do extracelulární matrice, kde interagují s receptory CD44 nebo se hromadí v okolí požadovaných buněk a následně regulují pohyb jiných látek. Z hlediska reologických [32] a tribologických [45] vlastností, se však zdají více optimální viskosuplementy s HA o

vysoké molekulové hmotnosti. Při in vitro testech bylo dokázáno, že tyto viskosuplementy způsobují výraznější nárůst viskozity po jejich přidání do synoviální kapaliny oproti viskosuplementům obsahujícím HA o malé nebo střední molekulové hmotnosti. In vivo studie na pacientech ukazují pomalejší nástup účinku u viskosuplementů s HA o vysoké molekulové hmotnosti. Tento jev může být způsobený tím, že molekuly HA jsou příliš velké na to, aby pronikaly do extracelulární matrice a teprve až po určité době dojde, díky jejich namáhání vlivem zatěžování kloubu, ke zkracování řetězců a po zkrácení na určitou délku jsou teprve schopny pronikat do extracelulární matrice. Jako ideální viskosuplement by se tedy mohla zdát látka obsahující molekuly HA s nízkou i vysokou molekulovou hmotností jako je např. Hylan GF-20. HA s nízkou molekulovou hmotností by mohla poměrně rychle proniknout do extracelulární matrice a podpořit syntézu exogenní HA, zatímco HA s velmi vysokou molekulovou hmotností by sloužila ke zlepšení reologických vlastností synoviální kapaliny a ke zlepšení tribologických vlastností kloubu.

6.2.1 Reologie synoviální kapaliny

6.2.1

Výsledky článku [30] poukazují na to, že γ -globulin nemá téměř žádný vliv na reologii synoviální kapaliny. Její tokové vlastnosti jsou tedy kombinací vlastností kyseliny hyaluronové a albuminu, přičemž primární složkou, která ovlivňuje viskozitu a moduly pružnosti je HA. Z toho poměrně jasně vyplývá idea používání HA při viskosuplementaci. Synoviální kapalina jako celek pak vykazuje chování typické pro zesíťovanou strukturu – při nízkých frekvencích pohybu převažuje viskózní chování, neboť dochází k uvolňování napětí díky rozplétání a splétání řetězců molekul a při vysokých rychlostech se vyznačuje elastickým chováním, jelikož se její struktura chová jako trvale zesíťovaná.

Viskosuplementy se pak vzájemně liší hlavně molekulovou hmotností kyseliny hyaluronové a způsobem uspořádání molekul, tzn. stupněm síťování a poměrem mezi síťovanou a nezesíťovanou HA. Přidání HA do synoviální kapaliny způsobuje primárně již dříve zmíněný nárůst viskozity, přičemž síťovaná HA způsobuje značně výraznější nárůst než lineární HA [32] a navíc způsobuje výraznější nenewtonské chování synoviální kapaliny. Rovněž dochází k nárůstu modulů pružnosti, kdy při vysoké koncentraci viskosuplementu jsou jejich hodnoty nezávislé na frekvenci pohybu a roztok se chová elasticky.

6.2.2 Výsledky viskosuplementace u pacientů

6.2.2

Články v této kapitole poukazují na to, že HA dodaná do kloubu z vnějšku během viskosuplementace spouští v kloubu několik procesů a změn, přičemž není známo, zda je některá z nich dominantní. Spíše se zdá, že celkový pozitivní dopad viskosuplementace je výsledkem součtu příspěvků od jednotlivých změn. Změny by se v zásadě daly rozdělit do dvou hlavních skupin: mechanická část a fyziologická část. Mechanické změny jsou způsobeny zvýšením koncentrace HA v synoviální kapalině, což má za následek zvýšení její viskozity. Zároveň se zlepšuje schopnost synoviální kapaliny pohlcovat rázy a její mazací schopnosti. Posledním důsledkem z této skupiny je pak zlepšení schopnosti synoviální kapaliny udržovat mezní mazací film kolem nociceptorů, což vede ke sníženému vnímání bolestivosti kloubu.

Co se týče fyziologických změn, podporuje HA dodaná po viskosuplementaci syntézu endogenní HA a chondrocytů. Dále snižuje aktivitu zánětlivých buněk, což vede ke snížení rychlosti degradace HA.

Ze samotných studií pak vyplývají rozporuplné závěry. Jsou publikovány studie, ve kterých pozitivní přínos HA nebyl pozorován [37] ale byla rovněž i publikována řada článků, ve kterých byl pozorován pozitivní dopad viskosuplementace při léčbě různých forem artrózy [38, 39]. Studie porovnávající HA s kortikosteroidy poukazují na rychlejší nástup účinků právě u kortikosteroidů. Z dlouhodobějšího hlediska je však optimálnější využití HA, neboť u kortikosteroidů je poměrně krátká doba účinku. Naproti tomu pozitivní účinky HA lze pozorovat i 6 měsíců po aplikaci viskosuplementu.

6.3 Tribologický výzkum kloubní chrupavky

Během vývoje výzkumu v oblasti biotribologie kloubní chrupavky bylo prezentována řada studií, která vysvětlovala děje probíhající v kloubní chrupavce pomocí různých režimů mazání - elastohydrodynamického [55], mezného [42, 56], smíšeného, atd. V poslední době se autoři článků shodují na různých variantách tzv. „biphasic lubrication“, kdy při zatížení chrupavky dochází k vytlačování intersticiální kapaliny z kolagenové struktury do kloubního prostoru. Toto stlačené mazivo přenáší část zatížení a udržuje nízké hodnoty součinitele tření v kontaktu, dokud nedojde k úplnému vytlačení intersticiální kapaliny [11, 12].

Mezi teorie pokoušející se vysvětlit biphasic lubrication patří zejména teorie od Ateshiana [4] a Accardiho [57]. Weeping režim mazání pracuje podobně jako režim hydrostatického mazání u kluzných ložisek. U tohoto režimu mazání je mazivo vtlačováno pod tlakem do kontaktu, kdy v případě chrupavky je tlak vyvolán samotným stlačováním pevné matrice. Mazivo je vytlačováno do kontaktu mezi třecí povrchy chrupavek a dochází k tvorbě mazacího filmu. Druhým režimem popsáním ve výše zmíněných článcích je tzv. režim boosted. Ten je založený na tom, že struktura tvořená kolagenem a proteoglykany propouští do chrupavky pouze molekuly do určité velikosti. Příliš velké molekuly jako mohou být např. γ -globulin nebo HA zůstávají na povrchu chrupavky a tvoří gelový mezní film, který zároveň chrání chrupavku před opotřebením.

6.3.1 Tření v chrupavce

Oblasti tření kloubních chrupavek se věnuje pozornost poměrně dlouhou dobu. Přesto vliv složení synoviální kapaliny a vliv viskosuplementace na tření kloubních chrupavek nebyl detailněji pospán. V řadě článků [15, 40] se autoři zabývají pouze vlivem kyseliny hyaluronové a fosfolipidů na tření. Jedná se však pouze o roztoky obsahující jednu složku popř. obě o dané koncentraci. Vliv rozdílné koncentrace těchto složek na tření není dostatečně prozkoumán popř. jejich interakce s proteiny a dalšími složkami SF. Jedinou prací, která se zabývá vlivem proteinových roztoků popř. roztoků obsahujících různé kombinace složek SF na tření je článek od Murakamiho a kol. [46]. Zde autoři provedli komplexní studii měření s celkem 13 roztoky obsahující různé kombinace složek SF a detailně rozebrali interakci mezi jednotlivými složkami. Měření byla provedena i s kapalinou obsahující všechny

základní složky SF – albumin, γ -globulin, fosfolipidy a kyselinu hyaluronovou dohromady. Pro lepší pochopení vlivu složení SF na tření chrupavky by však bylo dobré na tuto práci navázat a provést měření s různými vzorky modelových synoviálních kapalin a tím lépe popsat chování jednotlivých složek v komplexní mazací kapalině a vliv jejich koncentrace na součinitel tření. Z článku totiž vyplývá, že interakce mezi jednotlivými složkami SF hrají při mazání chrupavky významnou roli.

Jedním z mála článků, které se zabývají vlivem viskosuplementace na tření je článek od Cherniakové a Pinchuka [45]. Autoři v tomto článku vyhodnocují součinitel tření pro různé viskosuplementy a porovnávají je s měřením se synoviální kapalinou. Tento článek dává poměrně dobrý přehled o tribologických vlastnostech viskosuplementů s různými účinnými látkami. Měření jsou však provedena pouze se samotnými viskosuplementy. Pro detailnější analýzu a pochopení základních mechanismů, ke kterým při viskosuplementaci dochází, je nutné provést měření s roztoky synoviálních kapalin o odlišném složení obsahující různé vzorky viskosuplementů. Jedině tak bude možné detailně popsat procesy, ke kterým dochází a odhalit příčiny rozdílné účinnosti a délky trvání účinku viskosuplementace u různých pacientů.

6.3.2 Mazání chrupavek

6.3.2

Oproti tření je oblast mazání kloubních chrupavek oblastí značně neprobádanou. Články zabývající se měřením tloušťky mazacího filmu v kloubní chrupavce pomocí optických či jiných metod doposud nebyly publikovány a vliv složení synoviální kapaliny a viskosuplementace na tloušťku mazacího filmu tedy zatím popsán nebyl. Poměrně kvalitním článkem zabývajícím se mazáním náhrady chrupavky – PVA hydrogelem je článek od Yarimitsu a kol. [48]. Autoři zde pomocí fluorescence měřili počty částic proteinů a HA adsorbovaných na třecí povrchy, z čehož si lze udělat částečný obraz o vývoji mezního mazacího filmu na povrchu PVA hydrogelu. Z měření intenzity vyzářeného světla pak lze odtušit trend vývoje tloušťky filmu. Tento článek je poměrně důležitý z toho hlediska, že dává naději na analýzu tloušťky mazacího filmu v kloubní chrupavce právě pomocí fluorescenční mikroskopie. Otázkou však zůstává, jaké rozdíly budou mezi hydrogelem a chrupavkou a zda některý z těchto rozdílů (např. zhasení fluorescence, nežádoucí interference materiálu) neznemožní měření tloušťky filmu. Dále je otázkou, zda se podaří najít klíč pro převod intenzity vyzářeného světla na tloušťku filmu nebo zda bude pro měření tloušťky nutno využít nějaké jiné metody, jak to například udělal Nečas a kol. v článku [58], kde při měření zkombinoval fluorescenční mikroskopii s optickou interferometrií.

Z výsledků článku [48] plyne, že při vyšší koncentraci albuminu v roztoku klesá množství adsorbovaného γ -globulinu. Díky nižší molekulové hmotnosti je totiž rychlost adsorpce albuminu vyšší a adsorbovaný albumin pak brání adsorpci γ -globulinu. To podporují i výsledky testů s fluorescenčně označeným albuminem, kdy při vyšší koncentraci albuminu bylo i vyšší množství tohoto proteinu adsorbovaného na třecí povrchy. Zároveň nebyl pozorovaný žádný zásadní rozdíl v tom, jestli roztok obsahoval i γ -globulin nebo ne.

Částice albumin a kyseliny hyaluronové se navzájem odpuzují. Jelikož pak albumin adsorbuje na třecí povrchy, kyselina na tyto povrchy neadsorbuje a na površích

netvoří gelovou vrstvu, což je vidět i z nízké intenzity vyzářeného světla na snímcích z fluorescence. Již dříve však bylo dokázáno, že HA tvoří s proteiny komplexní struktury. Ty jsou pak pravděpodobně tvořeny pouze s proteinem γ -globulinem, což částečně zlepšuje schopnost HA adsorbovat na třecí povrchy.

7 PODSTATA A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

7

Disertační práce se zabývá studiem tribologických dějů probíhajících v lidských synoviálních kloubech postižených osteoartrózou/chondropatií po viskosuplementaci. Cílem práce je analýza vlivu molekulové hmotnosti a síťování HA, dodané do kloubu během viskosuplementace, na utváření mazacího filmu a na tření v kontaktu kloubních chrupavek v závislosti na složení synoviální kapaliny. Hlavními sledovanými parametry budou součinitel tření v kontaktu a intenzita světla vyzářená jednotlivými složkami SF (tloušťka mazacího filmu), přičemž do analýzy budou vstupovat rovněž data o reologických vlastnostech synoviálních kapalin a viskosuplementů. Díky novému typu tribometru by měla být umožněna analýza mazání i tření během jednoho experimentu.

Dílčí cíle práce

- Metodika extrakce a uchovávání vzorků kloubních chrupavek
- Implementace optických metod pro analýzu utváření mazacího filmu v kontaktu chrupavka - sklo
- Experimentální analýza vlivu složení proteinových roztoků a modelových synoviálních kapalin na mazání a tření kloubních chrupavek
- Experimentální analýza vlivu změny tribologických/reologických vlastností synoviální kapaliny po viskosuplementaci na mazání a tření kloubních chrupavek

8 VĚDECKÉ OTÁZKY A PRACOVNÍ HYPOTÉZY

Vědecká otázka

„Jaký je vliv molekulové hmotnosti a síťování kyseliny hyaluronové dodané do kloubního pouzdra po viskosuplementaci na tření a mazání kloubní chrupavky?“

Pracovní hypotéza

„Viskosuplementy s vyšší molekulovou hmotností a s vyšší stupněm síťování způsobí výraznější pokles součinitele tření a výraznější nárůst tloušťky mazacího filmu než viskosuplementy s nesíťovanou HA o nízké molekulové hmotnosti.“

Články v kapitole 5.4.1 ukazují, že přidání HA do základního roztoku [15, 40, 43] nebo např. do roztoku fosfolipidů [15, 46] způsobuje pokles tření. Otázkou je jak dále vývoj součinitele tření ovlivní přítomnost a koncentrace proteinů v mazacím roztoku. Základní představu může dát článek od Murakamiho [46], kde se ukazuje, že přidání albuminu do roztoku HA a DPPC způsobí u zdravé i poškozené chrupavky nárůst tření, kdežto přidání γ -globulinu do stejného základového roztoku způsobí nárůst součinitele tření u zdravé chrupavky, kdežto u poškozené chrupavky dojde k poklesu tření. Lze tedy předpokládat, že synoviální kapaliny s vyšším obsahem albuminu budou vykazovat vyšší tření, kdežto u γ -globulinu budou výsledky záviset na stavu chrupavky.

V žádném článku nebyla provedena studie zabývající se vlivem molekulové hmotnosti a stupně síťování HA na tření a mazání. Přitom z článků zabývající se reologií HA [32] vyplývá, že HA s vysokou molekulovou hmotností má oproti HA s nízkou molekulovou hmotností vyšší viskozitu. Pokud je HA navíc síťovaná (nárůst molekulové hmotnosti je výraznější), je hodnota viskozity ještě o poznání vyšší.

Vyšší viskozita maziva by podle teorií platných v klasické tribologii rovněž měla znamenat vyšší tloušťku mazacího filmu. Velké molekuly HA by navíc neměly být schopné pronikat do vláknové struktury chrupavky a tím pádem by měly více ulpívat na jejím povrchu. Do vývoje tloušťky mazacího filmu dále promluví přítomnost proteinů v roztoku. Autoři v článku [48] publikovaly výsledky, které ukazují, že molekuly albuminu a HA se vzájemně odpuzují. Díky schopnosti albuminu rychle adsorbovat na třecí povrchy je pak množství HA na povrchu chrupavky velmi nízké. Naopak s γ -globulinem tvoří HA komplexní struktury, díky kterým může být množství HA adsorbované na površích vyšší. Do tloušťky filmu tedy bude pravděpodobně jako u tření promlouvat koncentrace jednotlivých proteinů v synoviální kapalině.

9 ZPŮSOB ŘEŠENÍ A POUŽITÉ VĚDECKÉ METODY ZKOUMÁNÍ

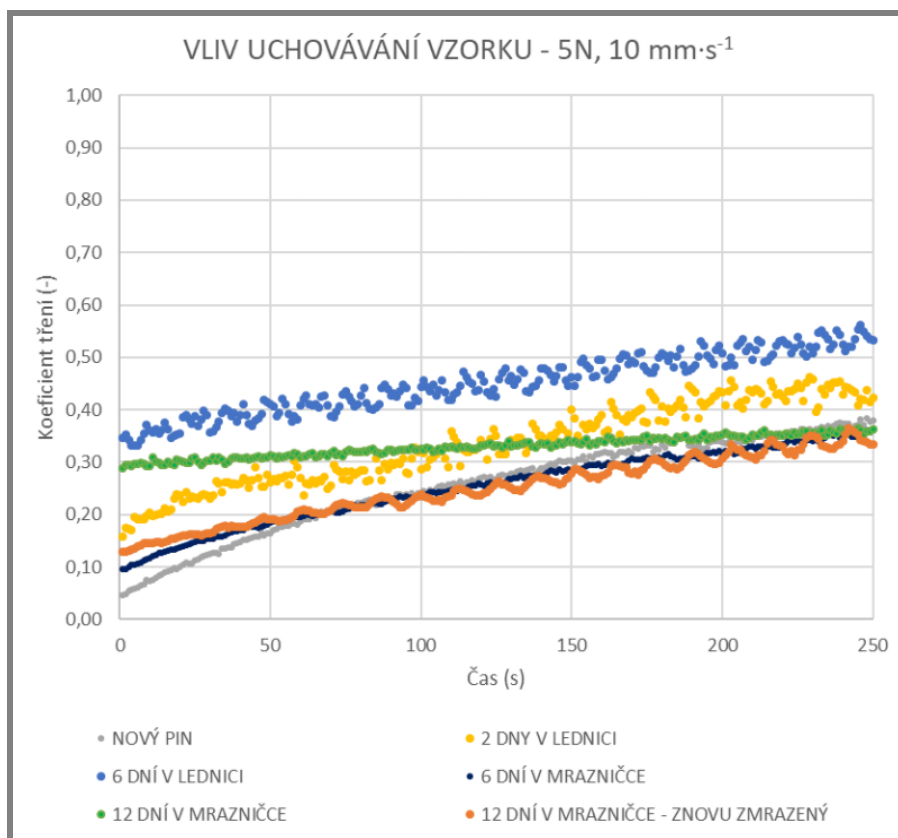
Pro splnění cílů disertační práce bylo v první řadě potřeba navrhnout a experimentálně ověřit metodiku pro extrahování a uchovávání vzorků chrupavek. Vzhledem k vybavení laboratoří UK bylo nutné navrhnout nástroje pro výrobu pinů z chrupavky i se subchondrální tkání tak, aby nedošlo k mechanickému poškození nebo degradaci chrupavky vlivem tepla. Jako náhrada lidské chrupavky byla zvolena prasečí chrupavka. Kvůli svému přibližně kulovitému tvaru pak byla vybrána chrupavka z prasečího femuru. Prasečí femury byly vždy v den porážky přivezeny z místních jatek a pomocí dutého vrtáku byly odebrány vzorky o průměru 5,6 mm a výšce přibližně 1 cm.

Z rešerše se ukázalo jako vhodné skladovací medium roztok PBS. Extrahované vzorky tedy byly vloženy do zkumavek s PBS a po různé dlouhou dobu skladovány buďto v lednici nebo v mrazáku. Postupně pak na vzorcích byly prováděny měření tření a výsledky porovnávány s výsledkem čerstvě extrahovaného pinu.



Obr. 25 Metodika extrakce a uchovávání kloubní chrupavky

Měření probíhaly na zařízení MTM v konfiguraci pin-on-disc vždy za stejných podmínek. Pin z chrupavky byl přitlačován na kovový disk, přičemž aplikované zatížení bylo 5 N a rychlost $10 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Tyto hodnoty by měly odpovídat podmínkám, které mohou nastat v reálném kloubu. Výsledky (Obr. ukázaly, že při skladování vzorků v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ vede už po poměrně krátké době (2 dny) k degradaci kloubní chrupavky, což je projevilo na nárůstu hodnot součinitele tření oproti měření s čerstvým pinem. Naopak skladování pinů v mrazáku při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ nemělo na výsledky experimentů zásadní vliv a proto skladování pinů v roztoku PBS při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bude využívat i během dalších etap řešení disertační práce.

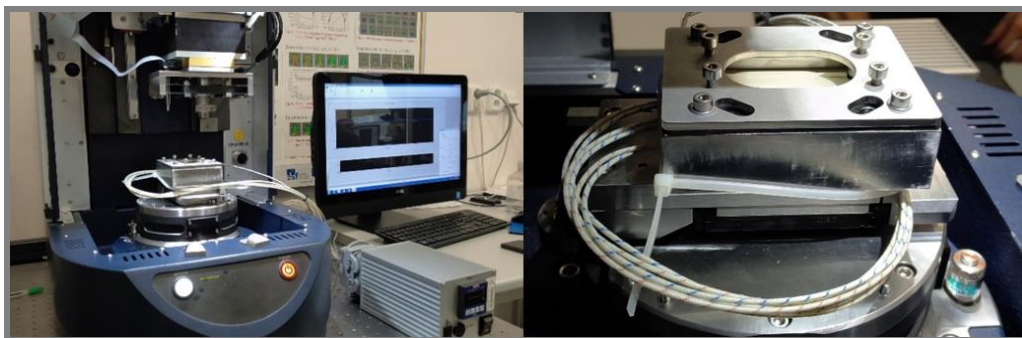


Obr. 26 Vliv uchovávání chrupavky na součinitel tření

Kromě metodiky extrakce a uchovávání chrupavky bude před zahájením experimentální fáze disertační práce nutné namíchat modelové synoviální kapaliny. Tato část řešení proběhne ve spolupráci s FN Olomouc. Na této instituci probíhá dlouhodobý výzkum zabývající se změnami složení synoviální kapaliny v závislosti na stavu kloubu (stupeň osteoartrózy, stav náhrady kyčelního/kolenního kloubu). Na základě analýzy synoviálních kapalin pacientů podstupujících viskosuplementaci bude vytipováno a namícháno několik vzorků modelových synoviálních kapalin, které budou svým složením charakterizovat skupiny pacientů podstupujících tuto proceduru (na základě pohlaví, stupně OA, věku, hmotnosti, ...).

Dále bude nutné vytipovat viskosuplementy, které budou během experimentů přidávány do synoviálních kapalin. Zde bude opět využito spolupráce s FN Olomouc a z komerčně dostupných viskosuplementů (Obr. 5), které se na této instituci používají, bude vybráno několik zástupců tak, aby zahrnovaly celé spektrum viskosuplementů z hlediska molekulové hmotnosti HA, síťování HA nebo objemu HA ve vzorku. V budoucnu se pak bude nabízet i možnost testování nově vyvíjených viskosuplementů díky spolupráci se společností CONTIPRO.

V další fázi bude na tribometrech typu pin-on-disc proveden soubor experimentů mapujících vliv kinematických podmínek, složení synoviální kapaliny a viskosuplementu na tření mezi chrupavkou a kovem či sklem. Pro tyto experimenty bylo potřeba navrhnout a vyrobit přípravky pro upnutí pinů z chrupavky do zatěžovacího mechanismu stroje a dále vyhřívanou vanu na mazivo, do které by bylo možno upnout skleněnou/kovovou destičku. Celá konstrukce (Obr. ..) již byla realizována v letním semestru 2017 studenty 4. ročníku navazujícího magisterského studia v rámci předmětu ZIP.

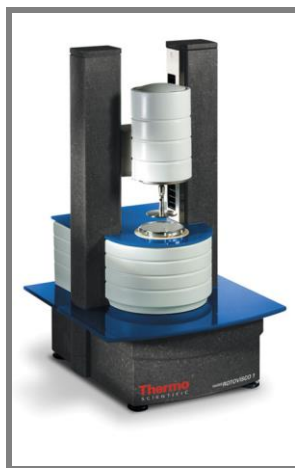


Obr. 27 Tribometr Brüker s moduly pro měření s chrupavkou

Ze záznamů průběhů normálové a třecí síly, získaných pomocí tenzometrických snímačů v experimentálních zařízeních, pak bude možno vyhodnocovat průběhy součinitele tření.

Experimenty mapující vývoj součinitele tření budou rozděleny na krátkodobé a dlouhodobé testy. Krátkodobé testy budou zaměřené na mapování změn součinitele tření po přidání viskosuplementu a na hodnoty počátečního a ustáleného součinitele tření. Dlouhodobé testy budou mapovat schopnost viskosuplementu dlouhodobě snižovat součinitel tření. Jejich hlavním cílem bude zanalyzovat dobu, po kterou endogenní HA v synoviální kapalině funguje, resp. dobu, za kterou dojde ke ztrátě mazacích schopností HA a obnovení hodnot součinitele tření, které byly naměřeny před přidáním viskosuplementu do synoviální kapaliny.

Do analýzy vlivu složení synoviální kapaliny a viskosuplementace na tření a později i na mazání budou rovněž vstupovat data mapující reologii použitých maziv. Synoviální kapalina i kyselina hyaluronová se chovají jako neneutonské kapaliny a jejich tokové vlastnosti tedy mohou mít na výsledky zásadní vliv. Bude potřeba analyzovat závislost viskozity na smykové rychlosti (potažmo smykovém spádu) a rovněž závislost elastického a viskózního modulu pružnosti opět na smykovém spádu. K těmto bude využito rotačního viskozimetru HAAKE RotoVisco, který se nachází v laboratořích UK. Pro měření může být rovněž využito spolupráce s FN Olomouc nebo společností CONTIPRO, které se mají s problematikou reologie synoviální kapaliny a kyseliny hyaluronové větší zkušenosti a jejich laboratoře jsou vybaveny stejně kvalitními, ne-li lepšími přístroji, pro daná měření.



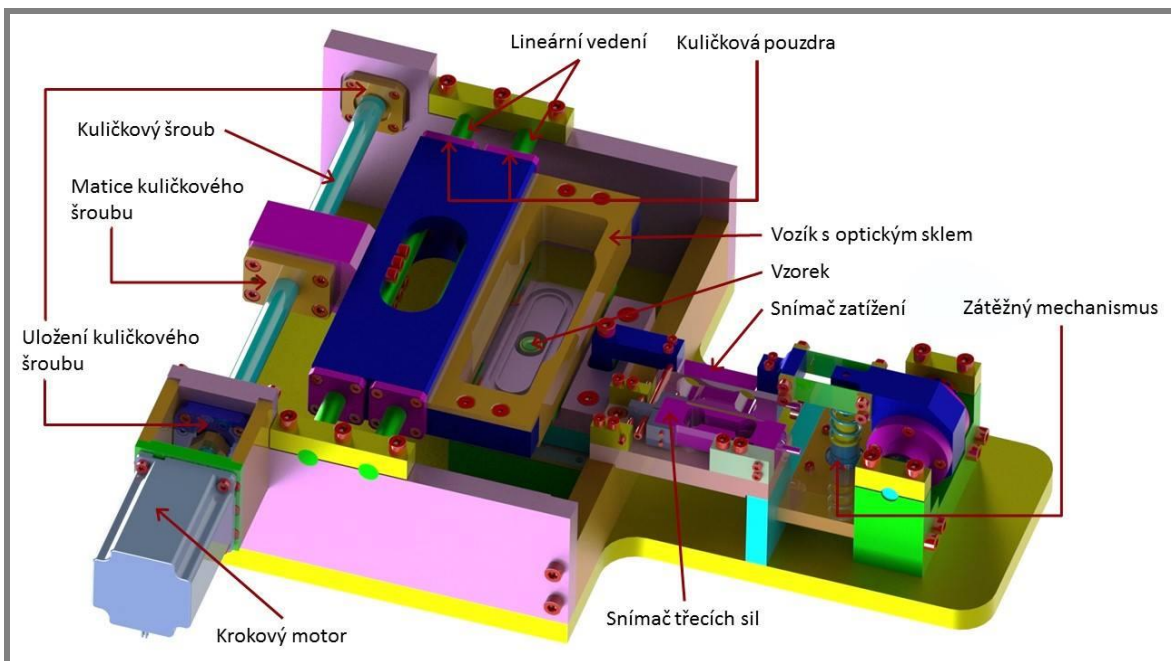
Obr. 28 Viskozimetr HAAKE RotoVisco 1

Další velkou etapou řešení disertační práce, která se bude částečně časově překrývat s měřeními tření, je analýza vlivu složení synoviální kapaliny a viskosuplementu na tloušťku mazacího filmu v kontaktu chrupavky a skla. Sklo je voleno s ohledem na předpoklad vyhodnocování tloušťky filmu pomocí optických metod.

Pro tento typ experimentů není v současné době v tribologických laboratořích ÚK vhodné experimentální zařízení. Souběžně s řešením této disertační bude probíhat disertační práce kolegy Ing. Pavla Čípka. V rámci této disertační práce by měl vzniknout nový tribometr typu pin-on-plate pro vizualizaci tloušťky mazacího filmu v poddajných kontaktech. Na tomto zařízení by mělo být umožněna analýza dříve popsaných parametrů na mazání chrupavky.

Koncepční návrh tribometru byl již vytvořen studenty 5. ročníku v rámci předmětu ZKR a rovněž byla na toto téma vypsána bakalářská práce. Na základě koncepčních návrhů pak byl navrhnout finální tribometr, který lze vidět na obr. 29.

Skleněná destička je uložena ve vozíku, který se recipročně pohybuje po lineárním vedení. Pohyb vozíku je vyvozován pomocí krokového motoru, který pohání kuličkový šroub, na kterém je matice kuličkového šroubu spojena s vozíkem. Pin z chrupavky je upevněn v kleštině a uložen v rameni zatěžovací páky. Páka s pinem je zesponu přitlačován na skleněnou destičku pomocí zátěžného mechanismu, který tvoří lineárního aktuátoru. Součástí zatěžovací páky je i tenzometrické snímače pro měření zatěžovací síly. K zatěžovací páce pak lze paralelně připojit i druhý snímač pro měření třecí síly. Tento snímač není součástí páky, jelikož je velmi citlivý a při neopatrné manipulaci s pákou by mohlo dojít k jeho přetížení a zničení. Tímto by mělo být umožněno měření tloušťky mazacího filmu a součinitele tření v kontaktu během jednoho experimentu.



Obr. 29 Reciproční tribometr

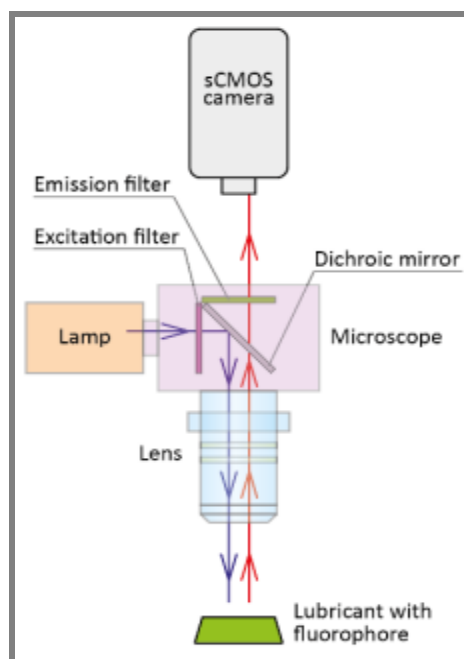
Pro analýzu tloušťky mazacího filmu se předpokládá využití metody fluorescenční mikroskopie. Tato metoda byla poprvé představena Haugland a kol. [59]. Princip metody je schematicky znázorněn na obr. 30. Foton excitovaný lampou je pohlčen

fluorescenčním barvivem v mazivu a dochází k tzv. fázi rozrušeného pohybu molekul. V této fázi setrvává molekula barviva maximálně 10 ns, během kterých emituje záření. Vzhledem k disipaci energie má foton vyzařovaný barvivem nižší energii a větší vlnovou délku. Rozdíl ve vlnových délkách se nazývá Stokesův posun, který je zásadní pro separaci excitace a emise.

Vyhodnocení dat bude probíhat pomocí počítačového zpracování obrazu z CMOS kamery. V základu lze ze snímků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie získat data o intenzitě světla vyzařovaného fluorescenčně označenými složkami synoviální kapaliny. Aby bylo možné převést hodnoty intenzity vyzařovaného světla na tloušťku mazacího filmu, je nejdříve nutné provést kalibraci. Zde se nabízí dvě možnosti kalibrace – pomocí klínové mezery nebo pomocí optické interferometrie.

Pro kalibraci pomocí klínové mezery by byla potřeba vyrobit velmi přesný přípravek, který by měl známou geometrii ve tvaru klínové mezery. Tato mezera by se pak zaplavila synoviální kapalinou. Pomocí jednoduchého výpočtu by se v každém místě klínové mezery vypočítala výška prostoru a tomu by se přiřadila odpovídající hodnota intenzity vyzařovaného světla. Využití této metody kalibrace může znemožnit hned několik situací. Většina biologických tkání při využití fluorescenční mikroskopie přirozeně svítí. Navíc intenzita vyzařovaného světla nemusí být konstantní a může rychle klesat (i nelineárně). V závislosti na charakteru změny intenzity vyzařovaného světla v čase během experimentu by pak mohl být převod intenzity světla na tloušťku filmu znemožněn.

Další možností by pak byla kalibrace pomocí optické interferometrie. Sada experimentů by se provedla za stejných podmínek několikrát, přičemž by kontakt byl snímán jak fluorescenční, tak i interferometrickou optickou sestavou. Na základě vyhodnocení tloušťky filmu a intenzit vyzařovaného světla by pak proběhlo přiřazení odpovídajících si hodnot těchto dvou parametrů. U této metody je však otázka, jestli je povrch chrupavky natolik odrazivý, aby docházelo k interferenci světla. Kalibrace metody a vyhodnocování tloušťky mazacího filmu by mělo probíhat v programu Achilles.

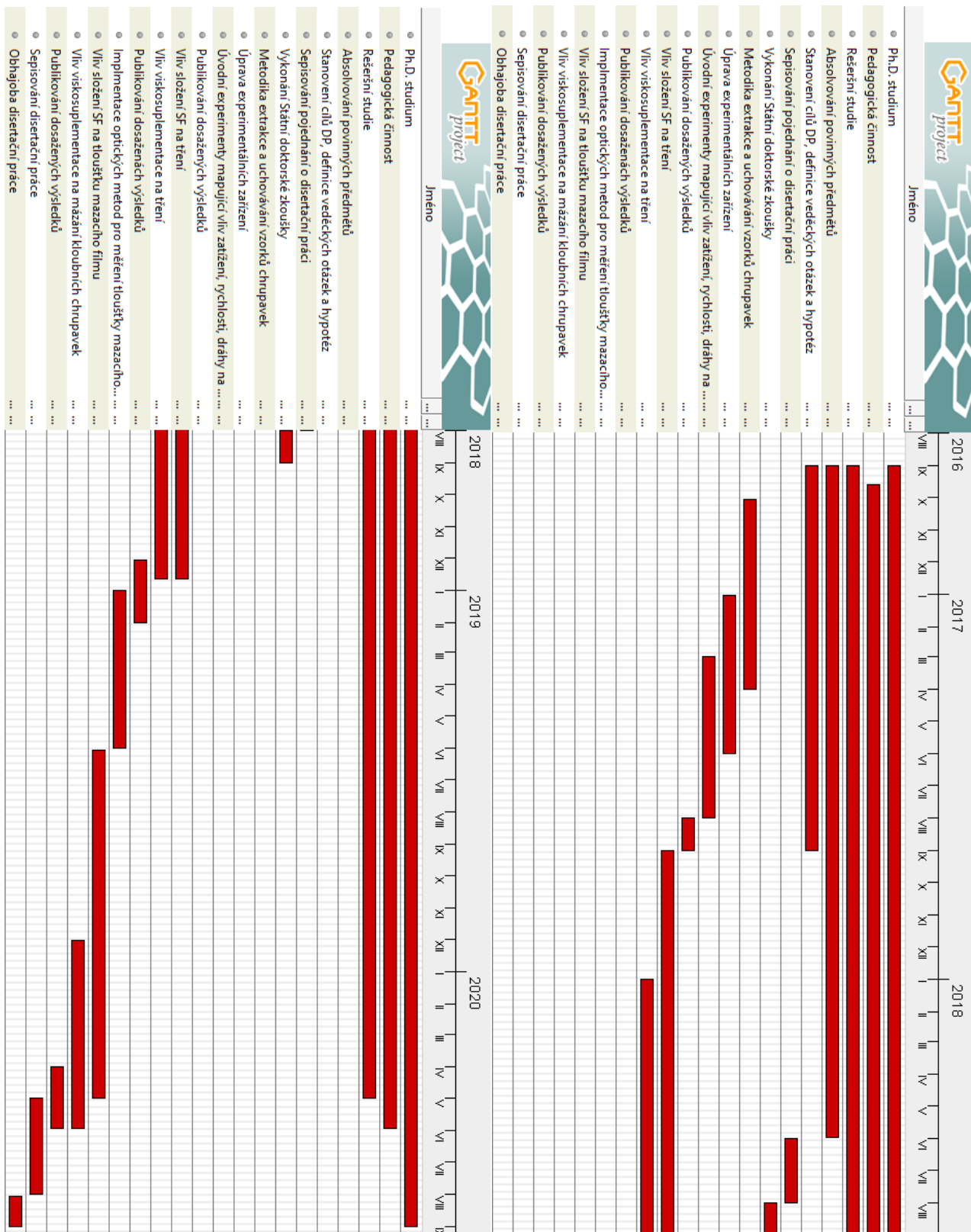


Obr. 30 Princip fluorescence [60]

Problémy, které se mohou při řešení vyskytnout

- Nenalezení vhodných podmínek pro dlouhodobé uchování chrupavky
- Mála rozlišovací schopnost tenzometrických snímačů v tribometrech Rtec a Bruker
- Nemožnost využití fluorescenční mikroskopie pro měření tloušťky filmu

10 ČASOVÝ ROZVRH A ETAPY ŘEŠENÍ



11 ODŮVODNĚNÍ NUTNOSTI A POTŘEBNOSTI ŘEŠENÍ DANÉ PROBLEMATIKY V DANÉM ČASE

Ze současného stavu poznání a jeho následné analýzy v kapitolách 5 a 6 je celkem jasně viditelné, že oblast tribologie kloubních chrupavek doposud nebyla dostatečně prozkoumána. Stále například nebyl popsán režim mazání, který nastává v kontaktu kloubních chrupavek a stojí za tak nízkými hodnotami součinitele tření. Také je patrný nedostatek studií zabývajících se měřením tloušťky mazacího filmu ať již pomocí optických metod (optická interferometrie, fluorescenční mikroskopie) nebo jakýchkoliv jiných metod např. odporové.

Popsání vlivu viskosuplementace na tribologii kloubních chrupavek nabývá důležitosti hlavně v medicínské praxi. Výzkumy ukazují, že dochází k neustálým meziročním nárůstům počtů operací, při kterých je poškozený lidský kloub nahrazený protézou. Navíc se snižuje průměrný věk pacientů, kteří tuto operaci podstupují. Vzhledem k tomu a k omezené životnosti současně vyráběných kloubních náhrad na přibližně 10 – 15 let je snaha o oddálení implantace kloubních náhrad. Jednou z možností, jak tyto operace oddálit, je právě viskosuplementace.

Řada lékařských studií však ukazuje, že účinnost a délka trvání účinků současných komerčně vyráběných viskosuplementů závisí na stavu konkrétního pacienta (složení synoviální kapaliny, stav kloubu, atd.). V některých případech jsou účinky minimální, ne-li žádné, a proto se i samotní lékaři liší v názoru, zda tuto proceduru vůbec využívat.

Objasnění tribologických dějů, ke kterým dochází v kloubních chrupavkách a popsání vlivu viskosuplementace na tyto děje by mělo pomoci lékařům při výběru viskosuplementu pro konkrétního pacienta a tím zvýšit účinnost této léčebné procedury. Vyšší účinnost léčby by pak měla prodloužit životnost kloubních chrupavek postižených artrózou či chondropatií a oddálit implantaci kloubních náhrad.

Aplikace výsledků do praxe pak bude umožněna hlavně díky dlouhodobé spolupráci biotribologické výzkumné skupiny s Ortopedickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc.

12 SPOLUPRÁCE S JINÝMI INSTITUCEMI

Vzhledem k problematice řešené v rámci disertační práce a jejím cílům se předpokládá spolupráce s následujícími vědci a výzkumnými institucemi:

- prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
 - přednosta Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc
 - dodávání vzorků lidských chrupavek, synoviálních kapalin, komerčně vyráběných viskosuplementů
 - měření reologických vlastností synoviálních kapalin a viskosuplementů
 - konzultace výsledků z medicínského a biochemického hlediska

- prof. Yoshinori Sawae
 - Department of Mechanical Engineering, Kyushu University
 - konzultace výsledků experimentů zaměřených na mazání a tření kloubních chrupavek

- Contipro a.s.
 - dodávání vzorků kyseliny hyaluronové
 - testování nově vyvíjených viskosuplementů

13 PŘEDPOKLÁDANÉ NÁKLADY SPOJENÉ S ŘEŠENÍM A JEJICH ZDROJE

13.1 Předpokládané náklady

• Konstrukce modulů do univerzálních tribometrů	15 000 Kč
• Laboratorní materiál (maziva, vzorky chrupavek, disky do MTM, skleněné a CoCrMo destičky do tribometrů, zkumavky, ...)	100 000 Kč
• Spotřební materiál	5 000 Kč
• Náklady související s účastmi na konferencích	100 000 Kč
• Náklady na zahraniční stáž	250 000 Kč
• Mzda řešitele	975 000 Kč

13.2 Financování výzkumu

Řešení disertační práce bude financováno z projektů školitele. Vedoucí v současné době řešitelem žádného projektu není, nicméně do budoucna se počítá s podáním přihlášek u GAČR, IGA MZ, MŠMT.

14 CHARAKTERISTIKA PŘEDPOKLÁDANÉHO VÝSLEDKU ŘEŠENÍ DISERTAČNÍ PRÁCE V KATEGORIÍCH DEFINOVANÝCH PRO ZÁKLADNÍ VÝZKUM V SOULADU S PLATNOU METODIKOU HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ VÝZKUMU A VÝVOJE

Vzhledem k interním požadavkům Ústavu konstruování, kdy je vyžadována přílohová forma disertační práce, se předpokládá publikování minimálně tří článků v impaktovaných časopisech. Články musejí svým obsahem souviset s tématem disertační práce a v okamžiku podání Žádosti o povolení obhajoby disertační práce musí být minimálně přijaty k publikaci v daném časopise. Dále se předpokládá prezentace výsledků v rámci konferencí a tedy i v konferenčních sbornících. Bodové hodnocení předpokládaných výstupů podle platné Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje je uvedeno v tab. 2

Tab. 1 Očekávané výstupy práce a jejich bodové hodnocení dle [61]

Druh výsledku		Bodové hodnocení
J _{imp}	Článek v impaktovaném časopise	10 - 305
D	Článek v konferenčním sborníku	8 - 60

Seznam potenciálních periodik pro publikaci výsledků disertační práce (Tab. 3) byl sestaven s ohledem na téma disertační práce a na časopisy, ve kterých byly publikovány studie uvedené v kapitole Shrnutí současného stavu poznání odborné problematiky v dané vědní oblasti.

Tab. 2 Seznam periodik pro publikaci článků

Název časopisu	Impact Factor	5-Year Impact Factor
Osteoarthritis and Cartilage	4.535	5.093
Journal of of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	2.876	3.152
Journal of Biomechanics	2.431	2.951
Tribology Transactions	1.418	1.519
Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca	0.552	0.527
Biotribology	-	-

15 BIBLIOGRAFIE

- [1] KATTA, Jayanth, Zhongmin JIN, Eileen INGHAM, John FISHER a Martin HARTL. Biotribology of articular cartilage—A review of the recent advances: The Effect of Protein Interactions on Adsorbed and Lubricating Films. *Medical Engineering*. 2008, 30(10), 1349-1363. DOI: 10.1016/j.medengphy.2008.09.004. ISSN 13504533. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350453308001677>
- [2] BANNURU, Raveendhara R., Nikola S. NATOV, Isi E. OBADAN, Lori L. PRICE, Christopher H. SCHMID a Timothy E. MCALINDON. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis*. 2009, **61**(12), 1704-1711. DOI: 10.1002/art.24925. ISSN 00043591. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.24925>
- [3] TEHRANZADEH, J., F. BOOYA a J. ROOT. Cartilage Metabolism in Osteoarthritis and the Influence of Viscosupplementation and Steroid: a Review. *Acta Radiologica*. 2005, **46**(3), 288-296. DOI: 10.1080/02841850510016027. ISSN 0284-1851. Dostupné také z: <http://acr.sagepub.com/lookup/doi/10.1080/02841850510016027>
- [4] ATESHIAN, Gerard A. The role of interstitial fluid pressurization in articular cartilage lubrication. *Journal of Biomechanics*. 2009, **42**(9), 1163-1176. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.04.040. ISSN 00219290. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929009002565>
- [5] JARCHO, John A., David J. HUNTER a J. ROOT. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: structure, injuries and review of management. *New England Journal of Medicine*. 2015, **372**(11), 1040-1047. DOI: 10.1056/NEJMct1215534. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMct1215534>
- [6] LEES, Deborah a Paul PARTINGTON. Articular cartilage. *Orthopaedics and Trauma*. 2016, **30**(3), 265-272. DOI: 10.1016/j.mporth.2016.04.007. ISSN 18771327. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187713271630040>
- [7] BHOSALE, A. M., J. B. RICHARDSON a J. ROOT. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*. 2008, **87**(1), 77-95. DOI: 10.1093/bmb/ldn025. ISSN 0007-1420. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/bmb/ldn025>
- [8] Synovial Fluid [online]. [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: http://cal.vet.upenn.edu/projects/saortho/chapter_86/86mast.htm

- [9] GALLO, J., M. HARTL, M. VRBKA, T. NÁVRAT a I. KŘUPKA. Co by měl vědět ortoped o biotribologii totální endoprotézy kyčelního kloubu. *Acta chirurgiae orthopaediae et traumatologiae Čechoslovaca*. 2013, 80, 377-385
- [10] GALANDÁKOVÁ, Adéla, Jitka ULRICHOVÁ, Kateřina LANGOVÁ, Adéla HANÁKOVÁ, Martin VRBKA, Martin HARTL a Jiri GALLO. Characteristics of synovial fluid required for optimization of lubrication fluid for biotribological experiments: review of the literature. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2016, **20**(11), -. DOI: 10.1002/jbm.b.33663. ISSN 15524973. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33663>
- [11] KRISHNAN, Ramaswamy, Monika KOPACZ a Gerard A. ATESHIAN. Experimental verification of the role of interstitial fluid pressurization in cartilage lubrication. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004, **22**(3), 565-570. DOI: 10.1016/j.orthres.2003.07.002. ISSN 0736-0266. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.orthres.2003.07.002>
- [12] CALIGARIS, M. a G.A. ATESHIAN. Effects of sustained interstitial fluid pressurization under migrating contact area, and boundary lubrication by synovial fluid, on cartilage friction. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008, **16**(10), 1220-1227. DOI: 10.1016/j.joca.2008.02.020. ISSN 10634584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458408000642>
- [13] CHAN, S.M.T., C.P. NEU, K. KOMVOPOULOS a A.H. REDDI. The role of lubricant entrapment at biological interfaces: Reduction of friction and adhesion in articular cartilage. *Journal of Biomechanics*. 2011, 44(11), 2015-2020. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2011.04.015. ISSN 00219290. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929011003332>
- [14] MOORE, Axel a David BURRIS. New Insights Into Joint Lubrication. *Tribology & Lubrication Technology* [online]. 2016, **72**(5), 26-26 [cit. 2017-02-24]. ISSN 1545-858X.
- [15] FORSEY, R, J FISHER, J THOMPSON, M STONE, C BELL a E INGHAM. The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*. 2006, **27**(26), 4581-4590. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.018. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206003802>
- [16] PARK, Jae-Yong, Cong-Truyen DUONG, Ashish Ranjan SHARMA, et al. Effects of Hyaluronic Acid and γ -Globulin Concentrations on the Frictional Response of Human Osteoarthritic Articular Cartilage. *PLoS ONE*. 2014, **9**(11), e112684-. DOI: 10.1371/journal.pone.0112684. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0112684>
- [17] GOLDRING, M. B., Cong-Truyen DUONG, Ashish Ranjan SHARMA, et al. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*.

- 2012, **4**(4), 269-285. DOI: 10.1177/1759720X12448454. ISSN 1759-720x. Dostupné také z: <http://tab.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1759720X12448454>
- [18] LOESER, Richard F., Steven R. GOLDRING, Carla R. SCANZELLO, et al. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis*. 2012, **64**(6), 1697-1707. DOI: 10.1002/art.34453. ISSN 00043591. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.34453>
- [19] FU, F. H. Patellofemoral Biomechanics. In *The Patellofemoral Joint*. New York : McGraw Hill, 1993. Kapitola 3, s. 49-61.
- [20] Dungl, P. a kolektiv. *Ortopedie*. Praha: Grada Publishing, 2001, 1280 s. ISBN 80-247-0550-8.
- [21] OUTERBRIDGE, R.E. The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* [online]. 1961, **43-B**, 752-757 [cit. 2017-06-22]. ISSN 0301620X.
- [22] WILES, P, P S ANDREWS a M B DEVAS. Chondromalacia of the patella. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* [online]. 5602, **38-B**(1), 95 [cit. 2017-06-22]. ISSN 0301-620X.
- [23] BARTONÍČEK, J., HEŘT, J. Základy klinické anatomie pohybového aparátu. Praha : Maxdorf, 2004. 256 s. ISBN 80-7245-017-8.
- [24] ŽABKA, M. Viskosuplementácia v liečbe osteoartrózy kolena. *Farmakoterapia*. 2014, **4**(1), 46-50.
- [25] LI, P., D. RAITCHEVA, M. HAWES, N. MORAN, X. YU, F. WANG a G.L. MATTHEWS. Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms: review of the literature. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012, **20**(11), 1336-1346. DOI: 10.1016/j.joca.2012.07.004. ISSN 10634584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458412008801>
- [26] AMMAR, Tiago Youssef, Tomas Araujo Prado PEREIRA, Saulo Luís Lopes MISTURA, André KUHN, José Idilio SAGGIN a Osmar Valadão LOPES JÚNIOR. Viscosupplementation for treating knee osteoarthrosis: review of the literature. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*. 2015, **50**(5), 489-494. DOI: 10.1016/j.rboe.2015.07.007. ISSN 22554971. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255497115001068>
- [27] LEGRÉ-BOYER, V., Ronald RUBIO, Said ALASFAR a Hugo E. JASIN. Viscosupplementation: Techniques, indications, results. *Orthopaedics*. 2015, **101**(1), S101-S108. DOI: 10.1016/j.otsr.2014.07.027. ISSN 18770568. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877056814003235>

- [28] BALAZS, E. A., J. E. DENLINGER. Viscosupplementation : A new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 1993, **20**, 3-9
- [29] GHOSH, Peter a Diego GUIDOLIN. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: Are the effects molecular weight dependent?. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2002, **32**(1), 10-37. DOI: 10.1053/sarh.2002.32549
- [30] ZHANG, Z., S. BARMAN a G. F. CHRISTOPHER. The role of protein content on the steady and oscillatory shear rheology of model synovial fluids. *Soft Matter*. 2014, **10**(32), 5965-. DOI: 10.1039/C4SM00716F. ISSN 1744-683x. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4SM00716F>
- [31] ZHANG, Zhenhuan, Gordon F. CHRISTOPHER a G. F. CHRISTOPHER. The nonlinear viscoelasticity of hyaluronic acid and its role in joint lubrication. *Soft Matter*. 2015, **11**(13), 2596-2603. DOI: 10.1039/C5SM00131E. ISSN 1744-683x. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SM00131E>
- [32] MATHIEU, Pierre, Thierry CONROZIER, Eric VIGNON, Yves ROZAND a Marguerite RINAUDO. Rheologic Behavior of Osteoarthritic Synovial Fluid after Addition of Hyaluronic Acid: A Pilot Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2009, **467**(11), 3002-3009. DOI: 10.1007/s11999-009-0867-x. ISSN 0009-921x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11999-009-0867-x>
- [33] BORZACCHIELLO, A., L. MAYOL, A. SCHIAVINATO a L. AMBROSIO. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, **999A**(13), NA-NA. DOI: 10.1002/jbm.a.32455. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32455>
- [34] ALTMAN, RD, A. MANJOO, A. FIERLINGER, F. NIAZI a M. NICHOLLS. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2015, **16**(1), -. DOI: 10.1186/s12891-015-0775-z. ISSN 1471-2474. Dostupné také z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/16/321>
- [35] MAHEU, Emmanuel, François RANNOU a Jean-Yves REGINSTER. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2016, **45**(4), S28-S33. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2015.11.008. ISSN 00490172. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049017215002863>
- [36] BANNURU, Raveendhara R., Nikola S. NATOV, Isi E. OBADAN, Lori L. PRICE, Christopher H. SCHMID a Timothy E. MCALINDON. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis*. 2009, **61**(12),

- 1704-1711. DOI: 10.1002/art.24925. ISSN 00043591. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.24925>
- [37] MEENAGH, G K, Delfin ROTÉS-SALA, Nuria SEGALÉS, et al. A randomised controlled trial of intra-articular corticosteroid injection of the carpometacarpal joint of the thumb in osteoarthritis: Results of a 6-month single-masked randomized study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004, **63**(10), 1260-1263. DOI: 10.1136/ard.2003.015438. ISSN 0003-4967. Dostupné také z: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2003.015438>
- [38] MONFORT, Jordi, Delfin ROTÉS-SALA, Nuria SEGALÉS, et al. Comparative efficacy of intra-articular hyaluronic acid and corticoid injections in osteoarthritis of the first carpometacarpal joint: Results of a 6-month single-masked randomized study. *Joint Bone Spine*. 2015, **82**(2), 116-121. DOI: 10.1016/j.jbspin.2014.08.008. ISSN 1297319x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X14002000>
- [39] SALINI, V., D. DE AMICIS, M. ABATE, MA. NATALE a A. DI IORIO. Ultrasound-Guided Hyaluronic Acid Injection in Carpometacarpal Osteoarthritis: Short-Term Results. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2009, **22**(2), 455-460. DOI: 10.1177/039463200902200222. ISSN 0394-6320. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/039463200902200222>
- [40] BELL, C J, E INGHAM a J FISHER. Influence of hyaluronic acid on the time-dependent friction response of articular cartilage under different conditions. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2006-1-1, **220**(1), 23-31. DOI: 10.1243/095441105X69060. ISSN 0954-4119. Dostupné také z: <http://sdj.sagepub.com/lookup/10.1243/095441105X69060>
- [41] MURAKAMI, T, Y SAWAE, K NAKASHIMA, S YARIMITSU a T SATO. Micro- and nanoscopic biotribological behaviours in natural synovial joints and artificial joints. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers J, Journal of Engineering Tribology* [online]. 2007, **221**(3), 237-245 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1243/13506501JET245. ISSN 13506501.
- [42] SCHMIDT, Tannin A., Nicholas S. GASTELUM, Quynhhoa T. NGUYEN, Barbara L. SCHUMACHER a Robert L. SAH. Boundary lubrication of articular cartilage: Role of synovial fluid constituents. *Arthritis*. 2007, **56**(3), 882-891. DOI: 10.1002/art.22446. ISSN 00043591. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.22446>
- [43] SHI, Liu, Vassilios I. SIKAVITSAS a Alberto STRIOLO. Experimental Friction Coefficients for Bovine Cartilage Measured with a Pin-on-Disk Tribometer: Testing Configuration and Lubricant Effects. *Annals of Biomedical Engineering*. 2011, **39**(1), 132-146. DOI: 10.1007/s10439-010-

0167-3. ISSN 0090-6964. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10439-010-0167-3>

- [44] SHI, Liu, Daniel B. BRUNSKI, Vassilios I. SIKAVITSAS, Matthew B. JOHNSON a Alberto STRIOLO. Friction coefficients for mechanically damaged bovine articular cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, **109**(7), 1769-1778. DOI: 10.1002/bit.24435. ISSN 00063592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24435>
- [45] CHERNIAKOVA, Yu M a L S PINCHUK. Tribological aspects of joint intraarticular therapy. *Acta of bioengineering and biomechanics* [online]. 2011, **13**(1), 57 [cit. 2017-02-28]. ISSN 1509-409X
- [46] MURAKAMI, Teruo, Seido YARIMITSU, Kazuhiro NAKASHIMA, Yoshinori SAWAE a Nobuo SAKAI. Influence of synovia constituents on tribological behaviors of articular cartilage. *Friction*. 2013, **1**(2), 150-162. DOI: 10.1007/s40544-013-0010-6. ISSN 2223-7690. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s40544-013-0010-6>
- [47] LI, Feng, Anmin WANG a Chengtao WANG. Analysis of friction between articular cartilage and polyvinyl alcohol hydrogel artificial cartilage. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. New York: Springer US, 2016, **27**(5), 1-8 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1007/s10856-016-5700-y. ISSN 09574530.
- [48] YARIMITSU, Seido, Kazuhiro NAKASHIMA, Yoshinori SAWAE a Teruo MURAKAMI. Influences of lubricant composition on forming boundary film composed of synovia constituents. *Tribology International*. 2009, **42**(11-12), 1615-1623. DOI: 10.1016/j.triboint.2008.11.005. ISSN 0301679x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X08002478>
- [49] MURAKAMI, Teruo, Seido YARIMITSU, Nobuo SAKAI, Kazuhiro NAKASHIMA, Tetsuo YAMAGUCHI a Yoshinori SAWAE. Importance of adaptive multimode lubrication mechanism in natural synovial joints. *Tribology International* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1016/j.triboint.2016.12.052. ISSN 0301679X.
- [50] CALIGARIS, M., C.E. CANAL, C.S. AHMAD, T.R. GARDNER a G.A. ATESHIAN. Investigation of the frictional response of osteoarthritic human tibiofemoral joints and the potential beneficial tribological effect of healthy synovial fluid. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009, **17**(10), 1327-1332. DOI: 10.1016/j.joca.2009.03.020. ISSN 10634584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458409001009>

- [51] KRISHNAN, R., M. CALIGARIS, R.L. MAUCK, C.T. HUNG, K.D. COSTA a G.A. ATESHIAN. Removal of the superficial zone of bovine articular cartilage does not increase its frictional coefficient. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004, **12**(12), 947-955. DOI: 10.1016/j.joca.2004.08.009. ISSN 10634584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458404001621>
- [52] KRISHNAN, Ramaswamy, Elise N. MARINER a Gerard A. ATESHIAN. Effect of dynamic loading on the frictional response of bovine articular cartilage. *Journal of Biomechanics*. 2005, **38**(8), 1665-1673. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.07.025. ISSN 00219290. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929004003781>
- [53] LI, Feng, Yonglin SU, Jianping WANG, Gang WU a Chengtao WANG. Influence of dynamic load on friction behavior of human articular cartilage, stainless steel and polyvinyl alcohol hydrogel as artificial cartilage. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010, **21**(1), 147-154. DOI: 10.1007/s10856-009-3863-5. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-009-3863-5>
- [54] SZARKO, Matthew, Ken MULDREW a John EA BERTRAM. Freeze-thaw treatment effects on the dynamic mechanical properties of articular cartilage. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2010, **11**(1), -. DOI: 10.1186/1471-2474-11-231. ISSN 1471-2474. Dostupné také z: <http://bmcmsculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2474-11-231>
- [55] JIN, Z M a D DOWSON. Elastohydrodynamic Lubrication in Biological Systems. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*. 2005-6-1, **219**(5), 367-380. DOI: 10.1243/135065005X33982. ISSN 1350-6501. Dostupné také z: <http://sdj.sagepub.com/lookup/10.1243/135065005X33982>
- [56] CROCKETT, Rowena. Boundary Lubrication in Natural Articular Joints. *Tribology Letters*. 2009, **35**(2), 77-84. DOI: 10.1007/s11249-009-9430-x. ISSN 1023-8883. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11249-009-9430-x>
- [57] ACCARDI, Mario Alberto, Daniele DINI a Philippa M. CANN. Experimental and numerical investigation of the behaviour of articular cartilage under shear loading—Interstitial fluid pressurisation and lubrication mechanisms. *Tribology International*. 2011, **44**(5), 565-578. DOI: 10.1016/j.triboint.2010.09.009. ISSN 0301679x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X10002239>
- [58] NEČAS, David, Martin VRBKA, Filip URBAN, Ivan KŘUPKA a Martin HARTL. The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements: The Effect of Protein Interactions on Adsorbed and

Lubricating Films. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016, **55**(3), 295-307. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.11.006. ISSN 17516161. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616115004245>

- [59] HAUGLAND, Richard P, Michelle T SPENCE a Iain D JOHNSON. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6th ed. Eugene, OR, USA (4849 Pitchford Ave., Eugene 97402): Molecular Probes, c1996, xii, 680 p. ISBN 09-652-2400-7.
- [60] NEČAS, D. The Effect of Synovial Fluid Constituents on Lubrication of Hip Joint Replacements. PhD thesis. Brno University of Technology, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Machine and Industrial Design. Supervisor: prof. Ing. Martin Hartl, Ph.D.
- [61] Metodika hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení výsledků ukončených programů (platná pro léta 2013 až 2016). *Odbor Rady pro výzkum, vývoj a inovace* [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné také z: <http://www.vyzkum.cz/storage/att/471EC8E44A7C3AA09C01B666F1ED6B30/M2013-0815-kor2.pdf>

16 VĚDECKÝ ŽIVOTOPIS

Ing. David Rebenda

- Ph.D. student na Ústavu konstruování (ÚK), Fakulta strojního inženýrství (FSI), Vysoké učení technické v Brně (VUT)
- Vědecký pracovník odboru tribologie ÚK, FME, VUT

Vzdělání a akademická kvalifikace

- 2014 – 2016 navazující magisterské studium
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství
obor: Konstrukční inženýrství
téma diplomové práce: Mazání náhrad kyčelního kloubu
- 2011 – 2014 bakalářské studium
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství
obor: Strojní inženýrství

Pracovní zkušenosti

- 09/2016 – současnost vědecký pracovník, ÚK, FSI, VUT
- 07/2014 – současnost konstruktér, MITRAS machinery s.r.o.

Hlavní oblasti výzkumu

- Mazání náhrad kyčelního kloubu
- Mazání a tření kloubních chrupavek
- Optické metody pro měření tloušťek velmi tenkých mazacích filmů

Identifikátory vědeckého pracovníka

- ResearchID, Thomson Reuters: <http://www.researcherid.com/rid/B-1770-2017>
- ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5407-1336>

Člen výzkumných týmů při řešení následujících projektů

- NT14267-3/2013 – Vliv složení kloubní kapaliny na utváření mazacího filmu v TEP kyčle, Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České republiky, 2013 – 2015