



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta strojního inženýrství
Ústav konstruování

Brno University of Technology
Faculty of Mechanical Engineering
Institute of Machine and Industrial Design

VLIV VISKOSUPLEMENTACE NA TŘENÍ KLOUBNÍ CHRUPAVKY

REBENDA DAVID

Pojednání ke státní doktorské zkoušce
Discourse on the Dissertation Thesis

Brno 2018



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta strojního inženýrství
Ústav konstruování

Brno University of Technology
Faculty of Mechanical Engineering
Institute of Machine and Industrial Design

VLIV VISKOSUPLEMENTACE NA TŘENÍ KLOUBNÍ CHRUPAVKY

**EFFECT OF VISCOSUPPLEMENTATION ON FRICTION OF
ARTICULAR CARTILAGE**

Rebenda David

Autor práce
Author

doc. Ing. Martin Vrbka, Ph.D.

Vedoucí práce
Supervisor

Pojednání ke státní doktorské zkoušce
Discourse on the Dissertation Thesis

Brno 2018

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 VYMEZENÍ ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY A PŘEDBĚŽNÉHO CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	7
3 SHRUTÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ	10
3.1 Tribologie	10
3.2 Reologie synoviální kapaliny a viskosuplementů	29
4 ANALÝZA, INTERPRETACE A ZHODNOCENÍ POZNATKŮ ZÍSKANÝCH NA ZÁKLADĚ REŠERŠE	39
4.1 Reakce složek synoviální kapaliny	39
4.2 Osteoartritická chrupavky	40
4.3 Reologie	40
5 VYMEZENÍ CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A NÁVRH ZPŮSOBU JEJÍHO ŘEŠENÍ	43
5.1 Vymezení cíle práce	43
5.2 Vědecká otázka a pracovní hypotéza	43
5.3 Návrh způsobu řešení	44
5.3.1 Přípravná část	44
5.3.2 Experimentální část	45
5.3.3 Zpracování a analýza dat	47
6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÍ DISERTAČNÍ PRÁCE	49
6.1 Metodika odběru a skladování vzorků chrupavek	49
6.2 Úvodní měření mapující vliv proteinových roztoků a HA na tření	50
6.3 Analýza reologie maziv	51
7 ZÁVĚR	55
8 LITERATURA	56
SEZNAM OBRÁZKŮ	59
SEZNAM TABULEK	61

1 ÚVOD

Řada klinických stavů jako artróza, trauma či různé kloubní nemoci mohou vést k nadměrnému opotřebení kloubní chrupavky. Díky její avaskulární a aneurální povaze je schopnost regenerace kloubní chrupavky velmi nízká. Odhaduje se, že více než 1,5 milionů dospělých v České republice trpí dlouhodobými zdravotními problémy spojenými s artrózou. Výsledkem je vysoká poptávka po léčebných metodách pro zmírnění příznaků této choroby a oddálení implantace kloubních náhrad 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 zmírnění příznaků těchto nemocí.

Jednou z neinvazivních metod pro zpomalení degenerace osteoartritické 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 bývá nejčastěji kyselina hyaluronová. Kyselina hyaluronová je látkou přirozeně se vyskytující v kloubní chrupavce. Její význam při mazání synoviálních kloubů byl již popsán v řadě studií a bylo dokázáno, že zvýšení koncentrace kyseliny hyaluronové zlepšuje funkčnost kloubů a snižuje bolestivost kloubů. Nicméně řada lékařských studií rovněž poukazuje na rozdíly v účinnosti a délce trvání léčebných účinků u jednotlivých 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 má složení synoviální kapaliny a viskosuplementu.

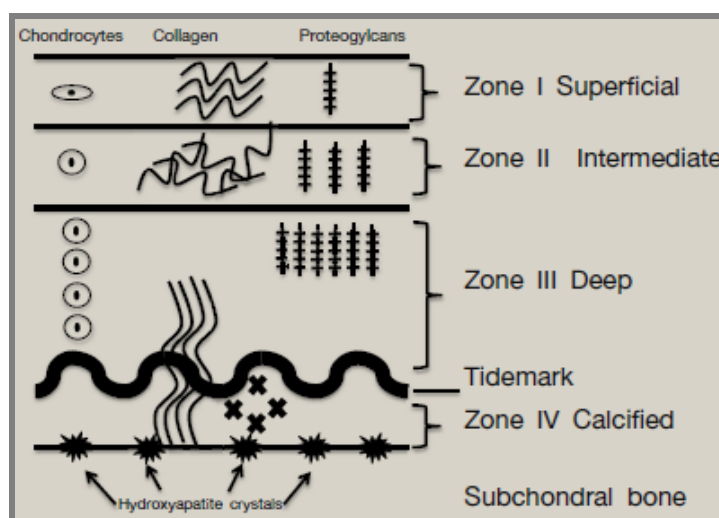
Objasnění dějů, ke kterým dochází při viskosuplementaci, by mělo primárně pomoci v lékařské praxi. Lepší znalost vlivu složení synoviální kapaliny a viskosuplementu na tření v kloubech by mohla pomoci lékařům při výběru viskosuplementu pro konkrétního pacienta a tím pádem vést ke zvýšení efektivity léčebné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

2 VYMEZENÍ ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY A PŘEDBĚŽNÉHO CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

2

Kloubní chrupavka je speciální typ hyalinní chrupavky, která pokrývá třecí povrchy ve velkých synoviálních kloubech jako je kyčel, koleno nebo rameno. Chrupavka tvoří povrchy s nízkým třením a za normálních podmínek se vyznačuje velmi nízkým opotřebením a dobrou schopností pohlcovat rázová zatížení. Jedná se o aneurální a avaskulární 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. V závislosti na orientaci vláken kolagenu můžeme strukturu chrupavky rozdělit na několik vrstev (Obr. 1) – povrchovou, přechodnou, hlubokou a kalcifikovanou vrstvu. Vzhledem k vysoké poréznosti struktury je zbývající prostor vyplněný intersticiální kapalinou složenou převážně z vody a iontů Na^+ a Cl^- [1].

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 matici 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 nezátížené části chrupavky [2]. Tento mechanismus vede k velmi nízkým hodnotám součinitele tření v kontaktu. S postupným vytláčováním 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 [3,4].



Obr. 1 Struktura kloubní chrupavky [5]

Osteoartróza je jednou z nejběžnějších poruch muskuloskeletálního systému, která je charakterizovaná nerovnováhou mezi syntézou a degradací kloubní chrupavky. Vlivem nadměrného opotřebením chrupavky dochází ke změkčení a rozvláknění kolagenové struktury, což způsobí nárůst tření a částečné rozrušení bifázového mazání [5]. Díky zvýšené permeabilitě a rozrušení matrice narůstá obsah vody. To vede ke snížení pevnosti, Youngova modulu pružnosti a k omezení

schopnosti chrupavky přenášet zatížení. Rovněž dochází ke zvětšování chondrocytů a zvyšování obsahu proteinů a snižování počtu buněk [5,7]. V pozdních fázích dochází k úplnému opotřebení chrupavky a odhalení subchondrální tkáně.

Kyselina hyaluronová je jednou z hlavních složek extracelulární matrice. Ve vysoké koncentraci je rovněž obsažena v synoviální kapalině. Tato kyselina zlepšuje viskoelastické vlastnosti synoviální kapaliny, působí protizánětlivě a stimuluje tvorbu endogenní kyseliny hyaluronové. Viskoelastické vlastnosti kyseliny hyaluronové poskytují synoviální kapalině mazací schopnosti a schopnost adsorbovat rázy. Kyselina hyaluronová pomáhá udržovat strukturu a funkci kloubní chrupavky – vyvolává syntézu a agregaci proteoglykanů a reguluje zánět [6,8].

V osteoartritickém kloubu je synoviální kapalina zředěná zánětlivým výpotkem a její molekulová hmotnost klesá. Ztrácí svoje viskoelastické vlastnosti, v důsledku čehož dochází k většímu přenosu mechanické energie do vláknové struktury chrupavky. Jedním z cílů viskosuplementace je obnovení reologických vlastností synoviální kapaliny. Účinky viskosuplementací se projevují hlavně v počátečních fázích osteoartrózy [9,10].

Podle molekulové hmotnosti rozlišujeme viskosuplementy obsahující kyselinu hyaluronovou s nízkou (>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 [8,11].

Existuje řada studií publikující výsledky, že intraartikulárně podaná kyselina hyaluronová poskytuje úlevu pacientům s osteoartrózou. Nicméně mechanismus, který za tímto stojí, nebyl dosud objasněn. Původní teorie od Balazse a Denlingera [12] počítala pouze s obnovou fyziologických/reologických vlastností synoviální kapaliny. Nicméně rychlé vymizení exogenní kyseliny hyaluronové 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 [13].

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 [13].

Z výše uvedených odstavců vyplývá, že exogenní kyselina hyaluronová má v osteoartritickém kloubu hned několik účinků jako je snížení tření, obnova reologických vlastností synoviální kapaliny a podpora syntézy endogenní kyseliny hyaluronové. Doposud však nebylo objasněno, zda je některý z mechanismů dominantní a stojí za pozitivními léčebnými účinky viskosuplementace, či je celkový efekt spíše výsledkem jednotlivých pozitivních dopadů. Předběžným cílem práce

je tedy analýza vlivu viskosuplementace na tření v kloubu. Vzhledem k tomu, že při viskosuplementaci dochází ke smíchání kyseliny hyaluronové a synoviální kapaliny, bude rovněž potřeba provést analýzu chování jednotlivých složek synoviální kapaliny při tvorbě mazacího filmu a jejich reakcí s kyselinou hyaluronovou. Exogenní kyselina hyaluronová rovněž výrazně ovlivňuje viskozitu a viskoelastické vlastnosti synoviální kapaliny, které budou mít na tření zásadní vliv. Pro posouzení vlivu viskosuplementace na tření tedy bude nutná i analýza reologických vlastností kyseliny hyaluronové.

3 SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

Vzhledem k vymezeným cílům disertační práce a postupům využitým při jejím řešení je kapitola zabývající se shrnutím současného stavu poznání v oblasti viskosuplementace rozčleněna do dvou podkapitol:

- Tribologie kloubní chrupavky se zaměřením na vliv složení synoviální kapaliny na součinitel tření, rozdíly v tření u zdravé a poškozené (osteoartritické) chrupavky a testování viskosuplementů.
- Reologické vlastnosti synoviální kapaliny a kyseliny hyaluronové.

3.1 Tribologie

[9] **FORSEY, R., et al.** The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*.

Autoři zkoumali mazací schopnosti roztoků obsahujících kyselinu hyaluronovou s vysokou molekulovou hmotností, DPCC (dipalmitoylfosfatidylcholin) nebo kombinace obou látek. Měření tření probíhala na speciálně navrženém zařízení s využitím lidské osteoartritické chrupavky. Při testech byla dále využita fluorescenčně označená kyselina hyaluronová a s využitím fluorescenční mikroskopie bylo studováno pronikání kyseliny do struktury chrupavky a její interakce s chondrocyty.

Materiál a metody

Tibiální plató a femorální hlavice byly získány od pacientů podstupujících implantaci kloubní náhrady. Z femorálních hlavic byly extrahovány piny s kompletním pokrytím kloubní chrupavkou o průměru 5 mm. Tibiální plató bylo vždy rozděleno na části o velikosti (10 x 5) mm. Testy zabývající se analýzou tření probíhaly na speciálně navrženém tribometru v konfiguraci pin-on-plate. Pin byl zatížen silou 25 N, což odpovídá kontaktnímu tlaku 1,3 MPa. Rychlost pinu byla nastavena na 4 mm/s. Kontaktní dvojice byly postupně mazány roztoky kyseliny hyaluronové s molekulovou hmotností 3 MDa a koncentrací 5 mg/ml nebo 10 mg/ml, roztoky DPCC s koncentrací 100 mg/ml nebo 200 mg/ml a jejich kombinacemi. Jako kontrolní mazivo byl použit Ringerův roztok. Při testech s fluorescenčně označenou kyselinou hyaluronovou byly ze zdravé chrupavky připraveny válcové vzorky o průměru 5 mm a tloušťce 2 mm. Na vzorky byla nanášena fluorescenčně označená kyselina hyaluronová. Následně byly po dobu 48 hodin inkubovány při 4 °C v kryostatu. Pro pozorování pomocí konfokálního mikroskopu pak byly vzorky nařezány na tenké plátky.

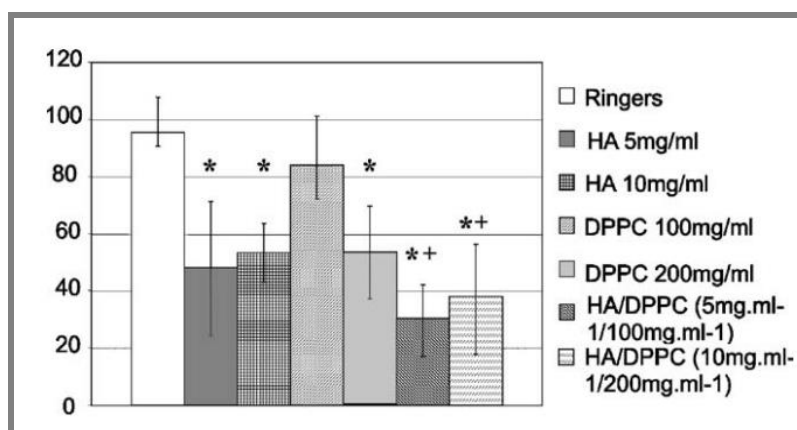
Výsledky

Kyselina hyaluronová s koncentrací 5 mg·ml⁻¹ způsobila u 4 z 6 vzorků významný pokles součinitele tření oproti Ringerovu roztoku. Největší snížení součinitele tření bylo o 0,158. U roztoku HA s koncentrací 10 mg/ml bylo pozorováno významné snížení tření u všech vzorků. Největší zaznamenaný pokles součinitele tření byl o 0,146. Z výsledků lze tedy usuzovat, že koncentrace HA nemá

za podmínek mezního mazání zásadní vliv na tření. Za těchto podmínek je mazání závislé především na dvoufázové struktuře chrupavky a mezním filmu, který je tvořen především proteiny a fosfolipidy.

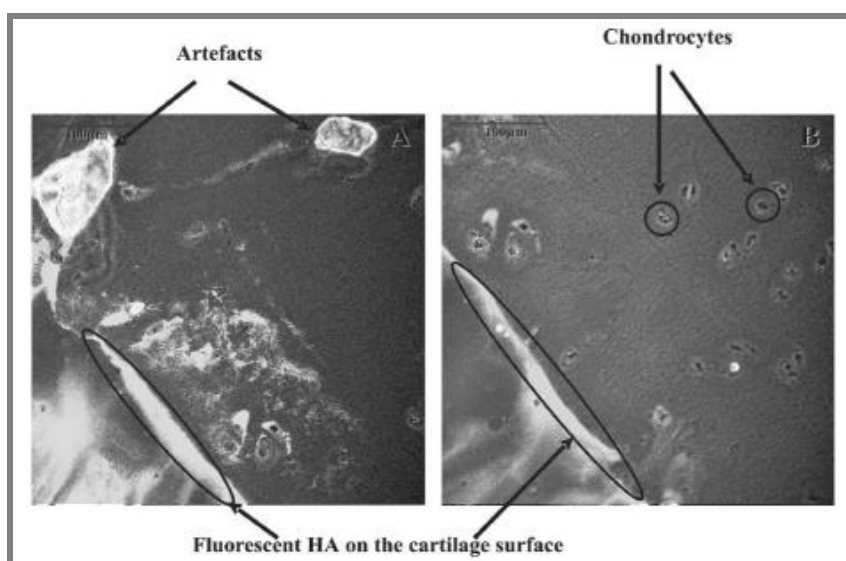
U DPPC s nižší koncentrací nebyl pozorován výraznější pokles tření. Hodnoty součinitele tření nepoklesly ani u jednoho vzorku o více než 0,05. Naopak u DPPC s koncentrací 200 mg/ml byl zaznamenán pokles součinitele tření až o 0,278. Koncentrace DPPC může tedy velmi výrazně ovlivnit vývoj součinitele tření.

Největší pokles tření byl zaznamenán u roztoku obsahující HA s koncentrací 10 mg/ml a DPPC s koncentrací 200 mg/ml. Zde byl pozorován pokles součinitele tření až o 0,336. Graf znázorňující procentuální pokles tření u jednotlivých roztoků lze vidět na obr. 2.



Obr. 2 Hodnoty součinitele tření roztoků HA a fosfolipidů [9]

Na snímcích z fluorescenční mikroskopie (Obr. 3) lze pozorovat pronikání HA skrz povrchovou vrstvu chrupavky do střední vrstvy. HA není rovnoměrně rozmístěna ve tkáni chrupavky, ale koncentruje se v okolí chondrocytů. S nimi pravděpodobně interaguje pomocí receptorů CD44 a stimuluje chondrocyty k syntéze nové HA. Tímto mechanismem by mohly být vysvětleny dlouhodobé léčebné účinky HA.



Obr. 3 Řez chrupavkou s fluorescenčně označenou HA [9]

Závěr

Použití HA a DPPC v mazacím roztoku způsobilo u poškozené chrupavky pokles součinitele tření. Výsledky HA nebyly závislé na její koncentraci. U DPPC tomu bylo právě naopak. Kombinace obou látek způsobila ještě výraznější pokles tření. Mechanismus tohoto efektu však nebyl objasněn. HA aplikovaná na povrch chrupavky pronikala skrz povrchovou a střední vrstvu, kde se soustředila v okolí chondrocytů.

[14] MURAKAMI, T., et al. Micro- and nanoscopic biotribological behaviours in natural synovial joints and artificial joints. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*.

Autoři měřili tření a in situ pozorovali kontakt PVA (polyvinylalkohol) hydrogelu proti sklu. Cílem in situ pozorování byla analýza změn v adsorpci proteinů při mazání kontaktu různými proteinovými roztoky. Kontakt by mazané roztoky albuminu a γ -globulinu v různých poměrech. Experimenty mapující vývoj součinitele tření probíhaly při vyšších rychlostech, kdy nastával smíšený režim mazání, kdežto pozorování adsorpce proteinů probíhalo za podmínek mezního mazání.

Materiál a metody

Pozorování adsorpce probíhalo na tribometru v konfiguraci pin-on-plate. Vzorek kulovitého tvaru z PVA hydrogelu konal reciproční pohyb vůči skleněné desce. Hydrogel byl zatížen silou 0,736 N, což odpovídá kontaktnímu tlaku 0,1 MPa. Rychlost pohybu hydrogelového vzorku byla nastavena na 0,2 mm/s a délka dráhy na 4 mm. Při těchto podmínkách by měl v kontaktu nastat mezní režim mazání. Kontakt byl zaplaven solnými roztoky obsahujícími fluorescenčně označené proteiny albumin a γ -globulin. Přesné složení všech maziv je uvedeno na obr. 4.

Lubricant	Albumin (wt%)	γ -Globulin (wt%)
A	0.7	0
B	0	0.7
C	0.7	1.4
D	1.4	0.7
E	1.4	1.4

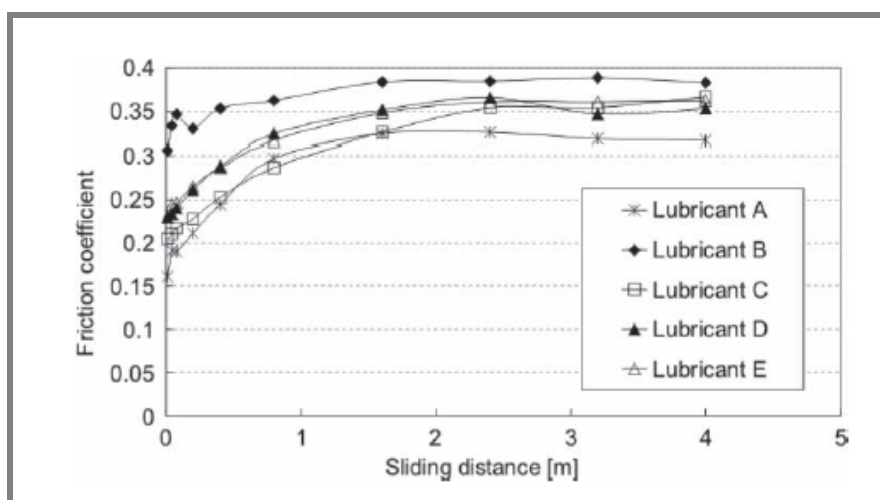
Obr. 4 Složení testovaných roztoků [14]

Testy mapující vývoj součinitele tření rovněž probíhaly na zařízení typu pin-on-plate. Eliptický vzorek z PVA hydrogelu konal reciproční pohyb vůči sklu, které bylo potaženo vrstvou fosfolipidů. Tato vrstva měla vysoce hydrofóbní charakter a oproti čistému sklu se předpokládalo významné snížení tření. Tato vrstva měly svým chováním simulovat povrch kloubní chrupavky. Vzorek hydrogelu byl zatížen silou 4,9 N, čímž byl vyvolán kontaktní tlak 0,12 MPa. Rychlost pohybu byla nastavena na 40 mm/s a délka dráhy na 30 mm. Jako mazivo posloužil 0,5 % roztok

kyseliny hyaluronové, do kterého byly přimíchávány proteiny albumin a γ -globulin v koncentracích uvedených na obr.4.

Výsledky

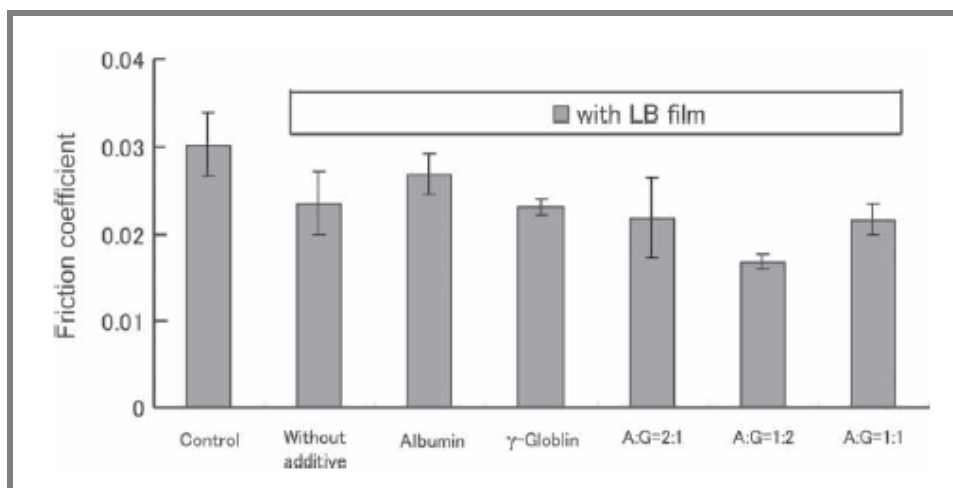
Na snímcích z testů s fluorescenčně označenými proteiny lze vidět, že molekuly albuminu jsou na povrchu skla dobře rozlišitelné a adsorbovaný film je velmi tenký. Adsorpce albuminu na povrch je tedy poměrně slabá. U γ -globulinu je tomu právě naopak. Tento protein tvoří na povrchu hladký a rovnoměrný mezní film. Při smíchání obou proteinů se množství albuminu v adsorbovaném filmu zvýšilo a stabilita filmu se odvíjela od poměru albuminu a γ -globulinu v roztoku (A/G). Na obr. 5 jsou vidět průběhy součinitele tření během testů. U roztoků obsahující oba proteiny se hodnoty součinitele tření pohybují mezi hodnotami pro roztoky jednotlivých proteinů. Autoři tyto výsledky připisují kombinaci adsorbčních vlastností obou proteinů. Albumin potlačuje adsorbční schopnosti γ -globulinu, což vede ke snížení tření oproti čistému roztoku γ -globulinu. Rozdíly mezi jednotlivými poměry A/G autoři připisují rozdílům ve struktuře a vlastnostech adsorbovaného filmu. Při poměru A/G = 1 : 2 je struktura adsorbovaného filmu stejnoměrná, kdežto při A/G = 1 : 1 je adsorbovaný film více separovaný. Na snímcích lze rozlišit malé a velké adsorbáty, které jsou pravděpodobně tvořeny odlišnými proteiny.



Obr. 5 Vývoj součinitele tření proteinových roztoků [14]

V grafu na obr. 6 jsou uvedeny střední hodnoty a odchylky součinitele tření se stejnými roztoky za podmínek smíšeného mazání. Vrstva fosfolipidů na povrchu skla způsobila pokles součinitele tření oproti kontrolnímu vzorku. Nejnižší střední hodnota a směrodatná odchylka součinitele tření je obdržena pro A/G = 1 : 2.

Autoři na základě výsledků předkládají model adsorbovaného filmu. γ -globulin, díky svým hydrofobním vlastnostem, adsorbuje na povrch a chrání jeho strukturu vůči opotřebení. Na něj adsorbuje albumin, který vzhledem ke své hydrofilní povaze, formuje adsorbovanou vrstvu s nízkou smykovou odolností. Při pohybu chrupavek vůči sobě pak může docházet k jeho desorpci a tvoří mezivrstvu, která se odvaluje mezi třecími povrchy.



Obr. 6 Vliv proteinových roztoků na tření za podmínek smíšeného mazání [14]

Závěr

Formování a stabilita adsorbovaného filmu není závislá pouze na koncentraci proteinů ale i na jejich poměru. Při správném poměru dochází k formování uniformního a stabilního mezního mazacího filmu, který vede k významnému snížení tření a opotřebení pravé/umělé kloubní chrupavky. Autoři v článku dále popisují vlastní model adsorbovaného proteinového filmu.

[15] **SCHMIDT, T. A., et al.** Boundary lubrication of articular cartilage: Role of synovial fluid constituents. *Arthritis*.

Autoři článku zkoumali, zda složky synoviální kapaliny – kyselina hyaluronová, proteoglykan 4 (PRG4) a povrchově-aktivní fosfolipidy (SAPL) fungují v kontaktu chrupavka-chrupavka za podmínek mezního mazání nezávisle, nebo zda spolu při tvorbě mezního mazacího filmu vzájemně interagují.

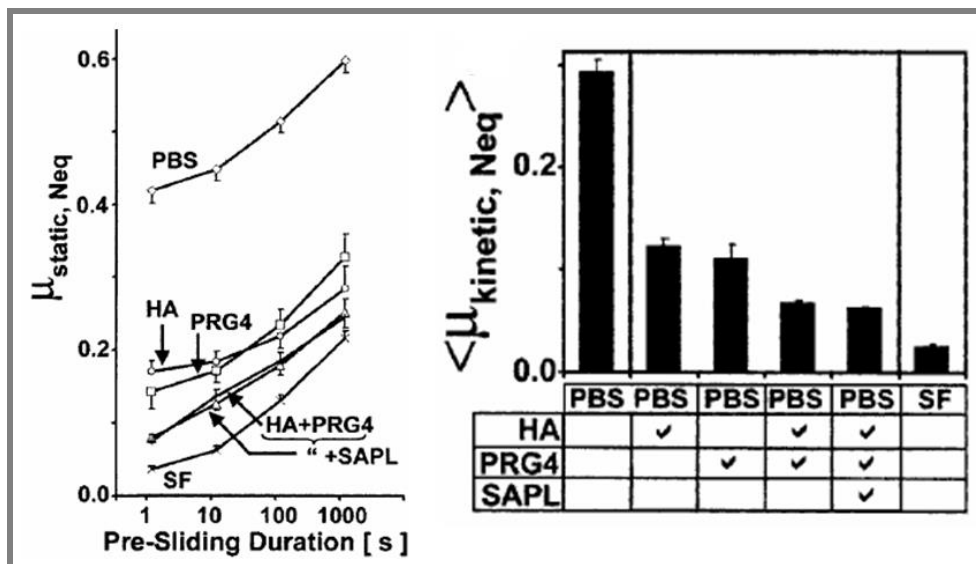
Materiál a metody

Vzorky chrupavek byly získány z hovězích kolen. Vždy byl odebrán vzorek z femuru a odpovídající část pately. Testy tření probíhaly na zařízení ELF 3200 se synoviální kapalinou (3,3 %; 10 %; 33 % a 100 % roztok), roztoky HA (110 µg/ml, 1 100 µg/ml a 3 300 µg/ml), PRG4 (4,5 µg/ml; 45 µg/ml a 450 µg/ml) a SAPL (200 µg/ml). Pro analýzu interakce mezi nimi byly poté jednotlivé složky, ve své nejvyšší koncentraci, míchány dohromady a výsledky byly porovnávány se synoviální kapalinou.

Výsledky

Nejvyšší hodnoty statického i dynamického součinitele tření byly naměřeny pro čisté PBS a nejnižší pro synoviální kapalinu. Se zvyšující se koncentrací synoviální kapaliny docházelo k poklesu tření. Hodnoty statického a dynamického součinitele tření byly u 100 % synoviální kapaliny přibližně 10x nižší oproti čistému

PBS. Roztoky obsahující jednotlivé složky synoviální kapaliny (Obr. 7) vždy snížili tření oproti PBS s tím, že vyšší koncentrace způsobily výraznější pokles. Hodnoty ale byly vždy vyšší než u čisté synoviální kapaliny. Smíchání HA a PRG4 způsobilo výraznější pokles oproti samostatným roztokům. Přimíchání SAPL výrazné změny tření nezpůsobilo.



Obr. 7 Hodnoty statického a dynamického součinitele tření HA, PRG4 a SAPL [15]

Závěr

Na základě měření statického a dynamického koeficientu v kontaktu chrupavka-chrupavka mazaného synoviální kapalinou a roztoky obsahující různé kombinace HA, PRG4 a SAPL bylo dokázáno, že HA a PRG4 přispívají k mazání chrupavky v mezním režimu jak samostatně, tak v kombinaci s jinou složkou. SAPL samostatně snižují tření oproti čistému PBS. Jejich přimíchání do komplexního roztoku ale snížení tření nepřineslo. Nejnížší tření bylo vždy naměřeno pro synoviální kapalinu. Na snižování tření se tedy podílí ještě některé další složky synoviální kapaliny jako například proteiny.

[16] YARIMITSU, S., et al. Influences of lubricant composition on forming boundary film composed of synovia constituents. *Tribology International*.

Autoři s využitím fluorescenční mikroskopie pozorovali adsorpci proteinů a stabilitu mezního mazacího filmu v závislosti na složení mazacího roztoku. Rovněž se zabývali i adsorpcí HA na třecí povrchy. Výsledky ukázaly, že formování spodní vrstvy mezního filmu, která je tvořena hlavně γ -globulinem, je klíčové pro vznik stabilního filmu. Adsorpce HA na třecí povrchy probíhala při interakci s γ -globulinem ve větší míře. Gelový mazací film na povrchu je zformován díky přispění HA k meznímu mazacímu filmu a vede ke snížení tření.

Materiál a metody

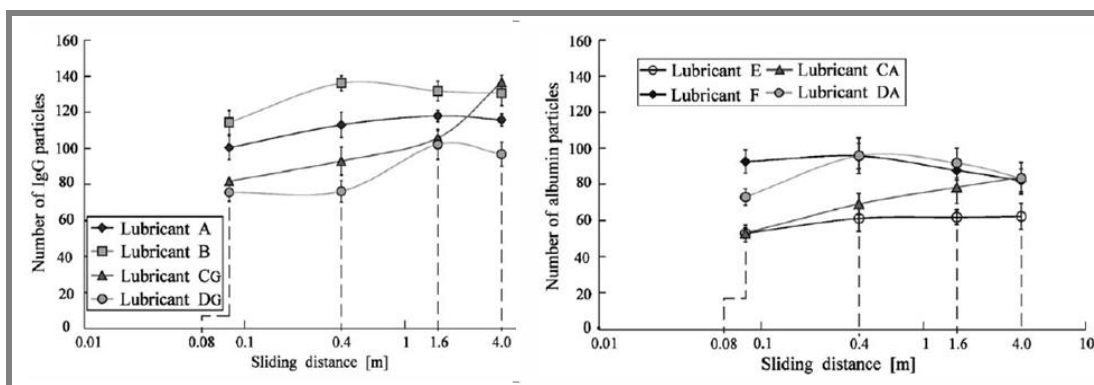
Reciproční testy probíhaly na zařízení typu pin-on-plate. Vzorek z PVA hydrogelu s poloměrem zakřivení 7 mm konal reciproční pohyb vůči skleněné desce. Naměřená drsnost povrchu hydrogelu byla 10 μm a modul pružnosti 1,2 MPa. Kontaktní tlak byl 0,104 MPa, rychlost pohybu 0,2 mm/s a dráha 4 mm. Za daných podmínek by měl nastat mezní režim mazání. Kontakt byl mazán solnými roztoky albuminu a γ -globulinu, do kterých bylo vždy přidáno malé množství fluorescenčně označeného proteinu. Přesné složení maziv je vidět na obr. 8. Při testech adsorpce HA byly do 0,5 % HA postupně přidávány proteiny ve stejných koncentracích. Část molekul HA byla opět fluorescenčně označena. Ze snímků kontaktu byl vyhodnocován počet adsorbovaných částic.

Lubricant	Albumin (wt%)	γ -globulin (wt%)	Alexa 488 labeled	
			IgG (mol/L)	Albumin (mol/L)
A	0	0.7	1.0×10^{-9}	0
B	0	1.4		
C _G	0.7	1.4		
D _G	1.4	1.4		
E	0.7	0	0	1.0×10^{-9}
F	1.4	0		
C _A	0.7	1.4		
D _A	1.4	1.4		

Obr. 8 Složení testovaných roztoků [16]

Výsledky

Počet částic γ -globulinu adsorbovaný z čistého roztoku je vyšší, než když je smíchaný s albuminem. Počet částic adsorbovaného albuminu závisí na jeho koncentraci v jednoduchém roztoku. U roztoku obou proteinů dochází při nízkém poměru A/G k adsorpci γ -globulinu na sklo, kdežto při vyšším poměru A/G dochází k desorpci γ -globulinu a je nahrazován albuminem. U roztoků obou proteinů, u kterých došlo ke zformování stabilního mezního filmu, jsou počty adsorbovaných částic γ -globulinu vždy vyšší než počty částic albuminu. Zformování spodní vrstvy mezního filmu, tvořené převážně γ -globulinem, je tedy pro stabilitu filmu zásadní. Přidání albuminu snižuje soudržnost filmu, mezní film bohatý na γ -globulin je tedy stabilnější. Vývoj počtu adsorbovaných částic proteinů lze vidět na obr. 9.



Obr. 9 Počty částic adsorbovaných z jednotlivých roztoků [16]

Adsorpce HA z roztoku s albuminem je výrazně nižší než z roztoku HA a γ -globulinu. HA a albumin se vzájemně odpuzují, adsorpci HA na povrch tedy pravděpodobně zabraňuje již adsorbovaný albumin. Proteiny a HA tvoří ve společném roztoku komplexní struktury, které jsou převážně tvořeny s γ -globulinem. Interakce mezi γ -globulinem a HA je tedy silnější než mezi HA a albuminem a přispívá k podílu HA při tvorbě mezného filmu a snižování tření. HA by rovněž měla přispět k formování mazacího filmu díky zvýšení viskozity roztoku.

Závěr

Zformování spodní vrstvy mezného filmu, která je tvořena převážně γ -globulinem, je klíčové pro vytvoření stabilního mazacího filmu. Adsorpce HA na povrch je zvýšená díky interakci s γ -globulinem. Gelový film, který je tvořen převážně HA, přispívá ke snížení součinitele tření v kontaktu.

[17] **CALIGARIS, M., et al.** Investigation of the frictional response of osteoarthritic human tibiofemoral joints and the potential beneficial tribological effect of healthy synovial fluid. *Osteoarthritis and Cartilage*.

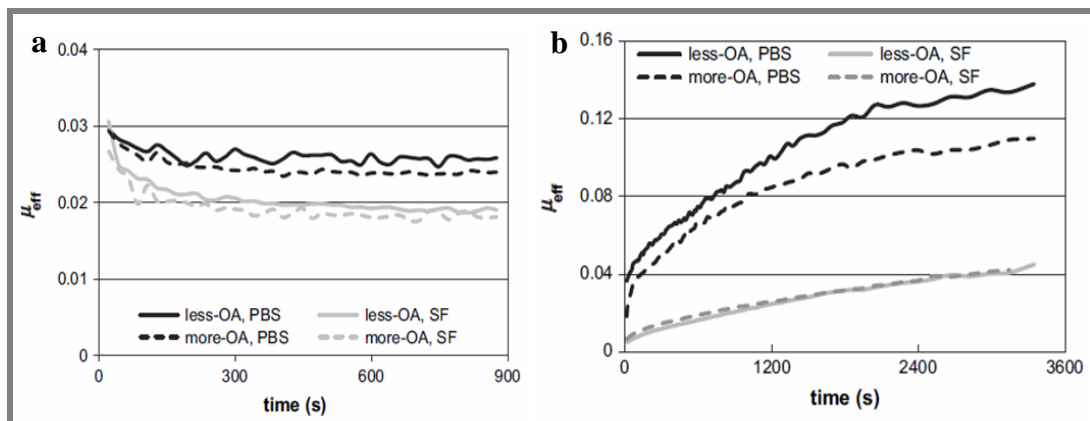
Autoři testují teorii, podle které dochází při přirozeném rozvoji osteoartrózy v kloubu ke zvyšování součinitele tření v kontaktu chrupavek. Další otázkou je, zda zdravá synoviální kapalina může zmírnit nárůst tření v postiženém kloubu.

Materiál a metody

Celkem osm lidských kolen v různých stádiích osteoartrózy bylo získáno od tkáňové banky. Z laterálních a mediálních částí tibie a femuru byly vždy odebrány odpovídající si vzorky, které byly následně testovány proti sobě. Synoviální kapalina byla extrahována z hovězích zápěstí. Reciproční experimenty probíhaly v kombinaci chrupavka-chrupavka (MCA) a chrupavka-sklo (SCA). Vzorky chrupavky byly během testů vždy zatíženy stejnou silou – 6,27 N. V prvním případě síla vyvolal kontaktní tlak 0,2 MPa, v druhém 0,5 MPa.

Výsledky

Na obr. 10a jsou uvedeny výsledky pro konfiguraci MCA. Po úvodním poklesu došlo u všech vzorků k ustálení hodnot součinitele tření. Na obr. 10b jsou uvedeny výsledky pro SCA konfiguraci. Zde došlo u všech vzorků k postupnému nárůstu součinitele tření. U vzorků mazaných synoviální kapalinou byly naměřeny nižší hodnoty tření, což je způsobeno přítomností různých složek kapaliny, které se mohou podílet na tvorbě mezného mazacího filmu. Mezi hodnotami součinitele tření u méně a více postižené chrupavky nebyly zjištěny významné rozdíly. Pouze u SCA mazaného synoviální kapalinou jsou vidět vyšší hodnoty tření u méně osteoartritické chrupavky. Chrupavka si tedy zachovává svou funkci i v prvotních stádiích postižení osteoartrózou.



Obr. 10 Hodnoty tření osteoartritických chrupavek v konfiguraci a) chrupavka-chrupavka (MCA), b) chrupavka - sklo (SCA) [17]

Závěr

Součinitel tření u lidské tibiofemorální chrupavky nemusí při přirozeném rozvoji osteoartrózy v raném stádiu narůstat. Rozvoj artrózy je spojen s opotřebením a degradací struktury kloubní chrupavky. To však nemusí znamenat, že by došlo k rozrušení mechanismu mazání, který je založený na tlakování intersticiální kapaliny. Zdravá synoviální kapalina snižuje u osteoartritických kloubů tření oproti roztoku PBS, který měl svým způsobem reprezentovat osteoartritickou synoviální kapalinu. Při vstříknutí zdravé synoviální kapaliny do kloubu by tedy mělo dojít ke snížení tření.

[18] MURAKAMI, T., et al. Roles of adsorbed film and gel layer in hydration lubrication for articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*.

Formování adsorbovaného filmu na povrchu kloubní chrupavky hraje významnou roli v mazání chrupavky při smíšeném a mezném režimu mazání. Vrstva proteoglykanů na povrchu hraje důležitou roli při udržování nízkého tření a opotřebením chrupavky při hydratačním mazání. Autoři článku se zabývali interakcí a synergickým působením těchto vrstev. Pomocí série recipročních testů v konfiguraci chrupavka-sklo zkoumali vývoj součinitele tření a analyzovali vliv adsorbovaného filmu na hydratační mazání u chrupavky s i bez povrchové gelové vrstvy.

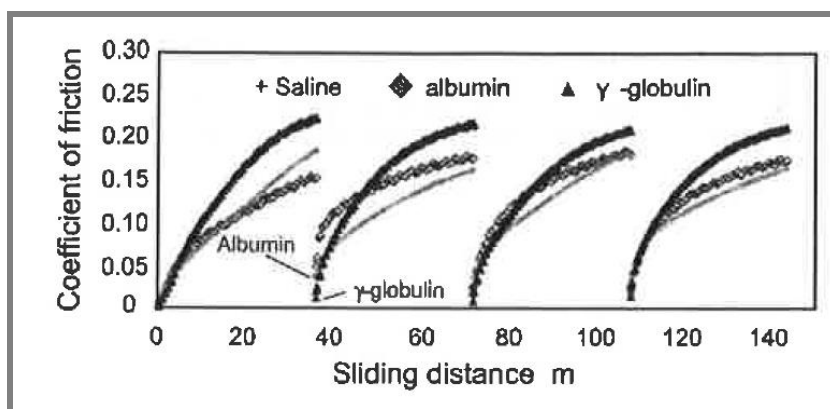
Materiál a metody

Autoři využili tribometr typu pin-on-plate, kdy elipsoidní vzorek chrupavky konal reciproční pohyb vůči skleněné desce. Chrupavka byla i se subchondrální tkání extrahována z vepřového femorálního kondylu. Kontaktní tlak při testu byl nastaven na 0,47 MPa, rychlost pohybu na 20 mm/s a délka dráhy na 35 mm. Jako mazivo sloužily solné roztoky obsahující 0,7 % albuminu nebo γ -globulinu. Pro testy s chrupavkou bez gelové vrstvy se vzorek nechal třít vůči sklu v solném roztoku, dokud nedošlo k odhalení kolagenových vláken.

Výsledky

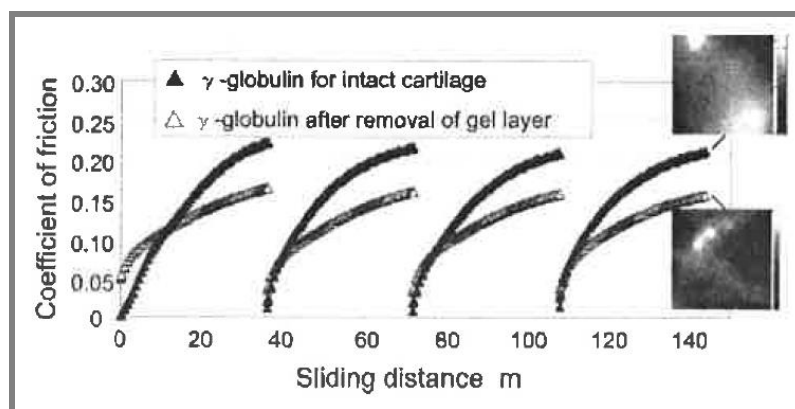
Při zatížení chrupavky docházelo během testu k postupnému nárůstu hodnot součinitele tření. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny pro roztok γ -globulinu. Během testu dochází k vytlačování kapaliny ze struktury chrupavky, která slouží jako mazivo. V momentech před rehydratací dochází k jejímu úplnému vytlačení a v kontaktu může nastávat smíšené mazání. γ -globulin tvoří vrstvu, která poměrně dobře chrání povrch chrupavky proti opotřebení, při kontaktu povrchových nerovností ale vykazuje adhezivní vlastnosti, které stojí za vyšším třením.

Vždy po uražení kluzné dráhy 36 m byl kontakt na 5 minut odtížen. Během odtížení dochází k obnově obsahu kapaliny ve struktuře chrupavky a tím pádem k obnově hydratačního mazání. Rehydratace chrupavky vedla k výraznému poklesu tření u všech roztoků. Po opětovném zatížení byly hodnoty součinitele tření vyšší oproti počátku testu. Roztoky proteinů však oproti solnému roztoku vykazovaly nižší tření s tím, že nejnižší tření bylo v kontaktu mazaném γ -globulinem (Obr. 11). K tomuto snížení tření dochází díky adsorpci proteinů na povrch chrupavky.



Obr. 11 Vývoj součinitele tření jednoduchých proteinových roztoků [18]

Při odstranění gelové vrstvy chrupavky došlo k nárůstu počátečních hodnot tření po rehydrataci i u roztoku γ -globulinu, nicméně hodnoty na konci kluzné dráhy byly oproti chrupavce s gelovou vrstvou nižší (Obr. 12). To poukazuje na nedostatečnou adsorpci γ -globulinu na povrch chrupavky. Díky tomu je tření po rehydrataci vyšší a na konci zatížení, kdy nastává režim smíšeného mazání, se jeho adhezivní vlastnosti projevují v menší míře než u zdravé chrupavky.



Obr. 12 Rozdíly ve vývoji tření u chrupavky s a bez gelové vrstvy [18]

Závěr

Hydratační mazání je efektivní při snižování tření v chrupavce, pokud dochází k její rehydrataci. Přidání proteinů do základního solného roztoku způsobilo pokles počátečních hodnot tření. Tento pokles je zapříčiněn adsorpcí proteinů na povrch chrupavky. Na konci testů však bylo tření vyšší díky adhezivním vlastnostem proteinů obsažených v adsorbovaném filmu. Proteiny snížily tření i u chrupavky bez proteoglykanové vrstvy. Tím by dokázán význam adsorbované filmu při redukci tření v kloubu u zdravé i osteoartrické chrupavky.

[19] **CHERNIAKOVA, Y. M. a L. S. PINCHUK.** Tribological aspects of joint intraarticular therapy. *Acta of bioengineering and biomechanics*.

Autoři zkoumali rozdíly v součiniteli tření u různých komerčně dostupných přípravků, které se injekčně vpravují do kloubů při léčbě synovitydy a dystrofie. Zkoumali, jak rozdíly mezi jednotlivými skupinami léků s odlišným mechanismem účinku (antibakteriální, protizánětlivé, imunomodulační, obnovující mazání, ...), tak i rozdíly u přípravků patřících do téže skupiny. Výsledky jsou porovnávány s hodnotami obdrženy pro zdravou synoviální kapalinu s příměsí preparátu založeného na krevním dialyzátu. Tento roztok byl vyvíjen a testován jako nový možný typ léku pro léčbu dříve zmíněných chorob.

Materiál a metody

Přehled testovaných přípravků i s jejich léčebnými efekty jsou uvedeny na obr. 13. Testy probíhaly na kyvadlovém simulátoru simulujícím pohyb v kolenním kloubu. Kontaktní dvojice byla tvořena stacionární UHMWPE základnou, ve které byla rýha ve tvaru protikusů, do které se dávkovalo mazivo. K polyetylenové základně byl připojen solenoid, který simuloval elektromagnetické pole lidského těla. Vůči základně se pohyboval trojboký ocelový hranol. Kývající se rameno s hranolem bylo zatíženo 2 kg závaží a konalo kývavý pohyb s kluznou rychlostí 1 m/s. Tyto podmínky by měly odpovídat kinematice zdravého kolene.

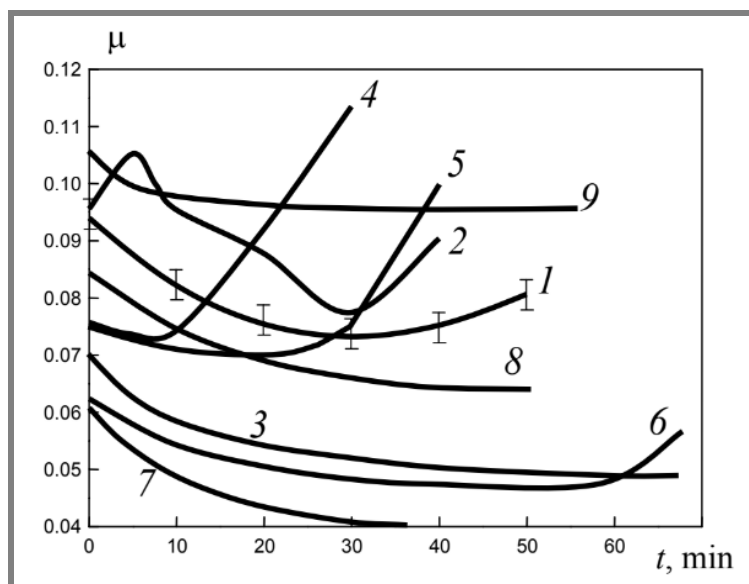
Drugs	Composition	Producer	Therapeutic effect
Hydrocortisone	Hydrocortisone acetate, 125 mg	Gedeon Richter (Hungary)	Anti-inflammatory
Kenalog-40	Triamcinolone acetonide, 40 mg; benzil alcohol, 9.9 mg	Bristol-Myers Squibb SpA (Italy)	
Diprosan	Betametasone dipropionate, 6.43 mg; betametasone sodium phosphate, 2.63 mg	Schering-Plau (Germany)	
Lincomycine hydrochloride	30% solution of lincomycine hydrochloride	Drug factory, Borisov (Belarus)	Antimicrobial
Chondrozamine	Chondroitine sulphate, 200 mg; glucosamine hydrochloride, 250 mg	Minskintercaps (Belarus)	A simulator for cartilage regeneration to take perorally
Synvisc	Hylan A and B, 8.0 mg in 1 cm ³	Biomatrix, Inc. (USA)	SF endoprosthesis
Hyalgan	Viscous solution of natural hyaluronic acid, 2 cm ³	Fidia Pharmaceuticals (Italy)	
Hya-Ject	Hyaluronic acid in physiological solution, 2 cm ³	ORMED GmbH & Co (Germany)	

Obr. 13 Přehled testovaných léčiv [19]

Výsledky

Výsledky měření součinitele tření v závislosti na čase pro všechny roztoky jsou uvedeny na obr. 14. Synoviální kapalina zdravého pacienta s krevním dialyzátem vykazuje nejnižší hodnoty součinitele tření. Vlivem elektromagnetického pole navíc dochází během experimentu ke značnému poklesu součinitele tření. Snížení hodnot součinitele tření v průběhu testu lze pozorovat i u hydrokortizonu, Diprospanu a Hyalganu. Z dostupných léků vykazují nejnižší hodnoty součinitele tření Diprospan a Hyalgan. U linkomycinu, Synviscu a Hyalganu došlo na počátku měření k poklesu součinitele tření, po určité době se ale hodnoty zvyšují.

Rozdíly v chování Synviscu a Hyalganu jsou způsobeny jejich odlišnou viskozitou. Synvisc, se svojí relativně vysokou viskozitou a gelovou strukturou, vytváří při pohybu kyvadla velmi obtížně souvislou mazací vrstvu na povrchu polyetylenu. Hyalgan má mnohem nižší viskozitu a souvislou vrstvu vytváří snáze. Nárůst tření u obou viskosuplementů v pozdějších fázích testu je způsoben degradací kyseliny hyaluronové a zkracováním jejich řetězců, čímž dochází k poklesu viskozity a zhoršení mazacích schopností roztoku.



Obr. 14 Vývoj součinitele tření jednotlivých léků: 1 - hydrokortizon, 2 - Kenalog-40, 3 - Diprospan, 4 - linkomycin, 5 - Synvisc, 6 - Hyalgan, 7 - SK+sérum, 8 - hydrokortizon+sérum, 9 - chondrozamin [19]

Závěr

Autoři otestovali nově vyvinutý tip injekčního přípravku pro léčbu synovitidy kolene. Lék je založený na séru, které je získáno z pacientovy krve a obsahuje mimo jiné i antibakteriální a protizánětlivé látky, které byly pacientovy podávány ústně. Sérum je před vstříknutím do kloubu smícháno s dalšími léky, které jsou dostupné ve formě injekcí. Synoviální kapalina smíchaná s tímto sérem vykazovala v tribologických testech nižší tření, než všechny testované komerční látky. Výsledky in vitro testů tření byly následně verifikovány během klinické studie.

[20] KWIECINSKI, J. J., et al. The effect of molecular weight on hyaluronan's cartilage boundary lubricating ability – alone and in combination with proteoglycan 4. *Osteoarthritis and Cartilage*.

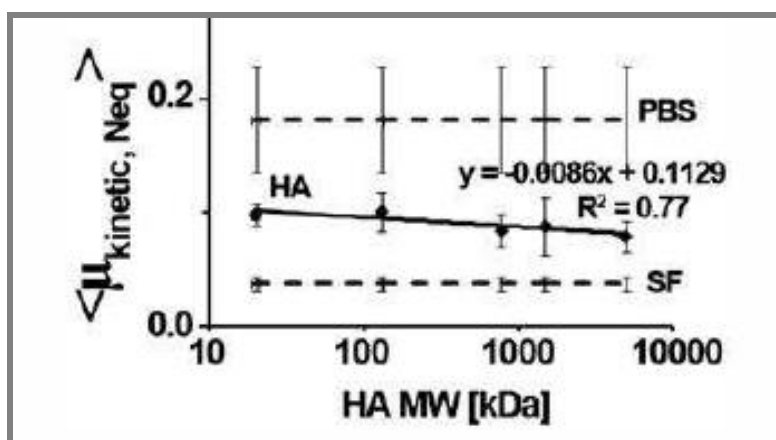
Autoři článku se zabývali vlivem molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové na mazání chrupavky v mezném režimu mazání při její fyziologické koncentraci. Dále se autoři pomocí EMSA (electrophoretic mobility shift assay) snažili objasnit interakci mezi HA a PRG4 a jak tato reakce ovlivňuje vývoj tření v kontaktu.

Materiál a metody

Testy tření proběhly na zařízení Bose ELF 3200 v konfiguraci chrupavka-chrupavka s roztoky HA o koncentraci 3,33 mg/ml s různou molekulovou hmotností (20 kDa, 132 kDa, 780 kDa, 1 500 kDa a 5 000 kDa). Tyto roztoky pak byly míchány s PRG4 s koncentrací 450 µg/ml. Vzorčky chrupavky byly získány z hovězího kolene.

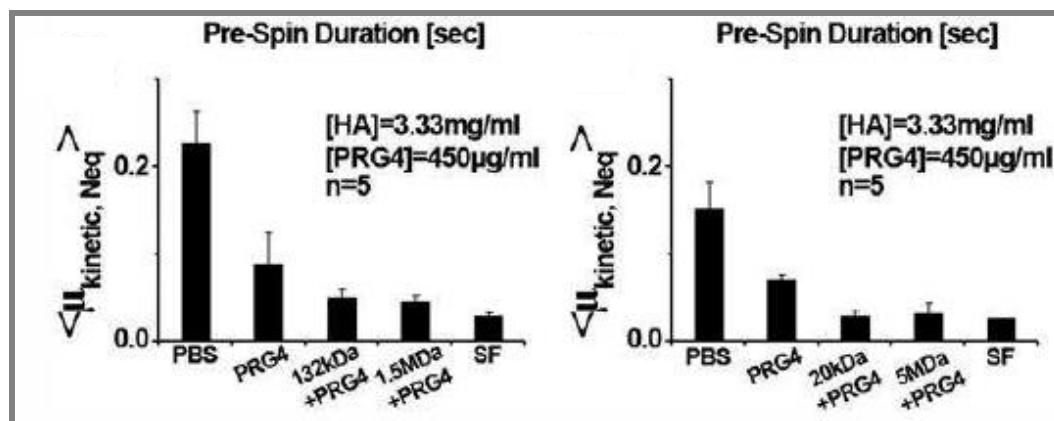
Výsledky

Kyselina hyaluronová snižuje tření v kontaktu v závislosti na své molekulové hmotnosti. Hodnoty statického a dynamického součinitele tření u 5 000 kDa HA byly výrazně nižší oproti 10 kDa HA. Z výsledků lze vyčíst lineární závislost součinitele tření na molekulové hmotnosti HA (Obr. 15).



Obr. 15 Závislost součinitele tření na molekulové hmotnosti HA [20]

Přimíchání fosfolipidů způsobuje pokles tření. Pokles hodnot součinitele tření ale není na molekulové hmotnosti HA závislý a pro všechny roztoky PRG4 a HA, s různou molekulovou hmotností, byly naměřeny velmi podobné hodnoty součinitele tření (Obr 16). EMSA analýza odhalila, že při vysokém poměru PRG4:HA dochází k omezení pohybu molekul HA. PRG4 tedy tvoří s molekulami HA (s různou molekulovou hmotností) komplexní struktury. Vazby mezi molekulami jsou však poměrně slabé a může docházet k rozpadu struktur. Díky těmto částečným vazbám dochází ke zpomalení pohybu molekul HA. Tento jev je závislý na poměru PRG4:HA. Při vysokém poměru se může na molekuly HA vázat i více molekul PRG4 a zpomalení pohybu je výraznější.



Obr. 16 Hodnoty součinitele tření roztoku proteoglykanů a HA s různou molekulovou hmotností [20]

Závěr

Rozdíly v molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové mohou výrazně ovlivnit mezný režim mazání u chrupavky. Tento efekt se však dá zmírnit reakcí s PRG4, kdy dochází při fyziologické koncentraci k tvorbě komplexních struktur a hodnoty součinitele tření přestávají být na molekulové hmotnosti HA závislé. I HA s nízkou molekulovou hmotností se tedy může podílet na tvorbě ochranného filmu na povrchu chrupavky. Pro jeho tvorbu je však důležitá přítomnost PRG4 v roztoku.

[21] MURAKAMI, T., et al. Effectiveness of adsorbed film and gel layer in hydration lubrication as adaptive multimode lubrication mechanism for articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*.

Autoři zkoumali mazací schopnosti adsorbovaného filmu u zdravé a poškozené kloubní chrupavky mazané roztoky HA. Dále se zabývali rozdíly v adsorpci proteinů na povrchu chrupavky v závislosti na stavu gelové vrstvy. Výsledky ukázaly, adsorbovaný film se významně podílí na snižování tření za podmínek smíšeného a mezného mazání, kdy může docházet ke styku povrchových nerovností.

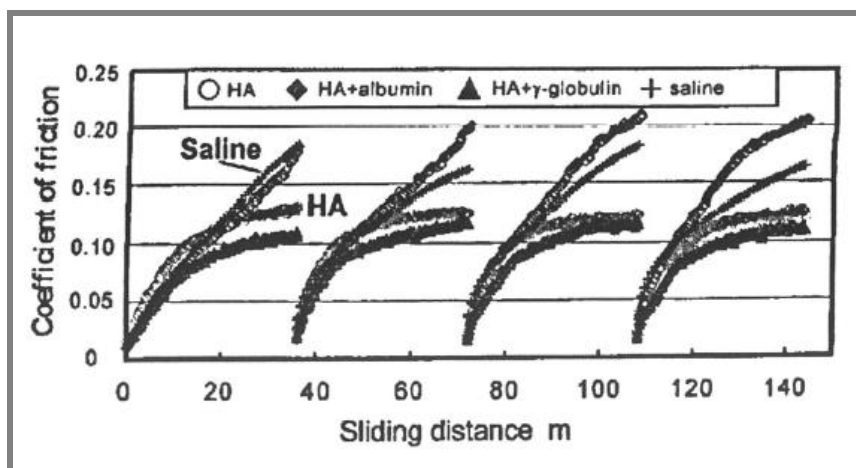
Materiál a metody

Reciproční testy proběhly na tribometru pin-on-plate v konfiguraci chrupavka sklo. Elipsoidní vzorky chrupavky se subchondrální tkání byly extrahovány z vepřových femorálních kondylů. Testy probíhaly při kontaktnímu tlaku 0,47 MPa, rychlosti 20 mm/s a délce dráhy 35 mm. Kontakt byl mazán solným roztokem nebo 0,5 % solným roztokem HA (molekulová hmotnost 950 kDa), do kterého ještě byly přimíchávány proteiny albumin a γ -globulin v koncentraci 7 mg/ml. Pro testy s poškozenou chrupavkou byly vzorky několikrát ořeny papírovým kapesníkem. Částečné rozrušení gelové vrstvy bylo potvrzeno analýzou povrchu pomocí AFM.

Výsledky

Roztoky HA vykazují po rehydrataci nižší tření než solný roztok (Obr. 17). Po uražení dané kluzné dráhy, před další rehydratací, vykazují nejvyšší tření roztok HA a γ -globulinu. U roztoku HA a albuminu je tření velmi podobné solnému roztoku. To poukazuje na synergické působení mezi HA a γ -globulinem a nepříznivou interakci mezi HA a albuminem. Albumin, díky odpuzivým silám mezi negativně nabitými molekulami HA a albuminu, narušuje adsorpci HA a tím omezuje její schopnosti snižovat tření. Obdobné výsledky byly obdrženy i pro poškozenou chrupavku. Pouze hodnoty součinitele smykového tření byly vyšší.

Koexistence mezi γ -globulinem a HA byla dokázána i při pozorování kontaktu pomocí fluorescenční aparatury, kdy u zdravé chrupavky γ -globulin formoval výrazný adsorbovaný film napříč pozorovanou oblastí, kdežto u albuminu byly adsorbáty na povrchu chrupavky pouze lokálně rozmístěny. U poškozené chrupavky jsou vidět rozdíly v místech adsorpce proteinů. γ -globulin s HA adsorbují na zbytcích gelové vrstvy, kdežto adsorbáty albuminu jsou rozptýleny v oblastech, kde již gelová vrstva není.



Obr. 17 Průběhy součinitele tření roztoku HA smíchaného s proteiny [21]

Závěr

Čistá kyselina hyaluronová snižuje tření u zdravé i poškozené kloubní chrupavky. Její koexistence s proteinem γ -globulinem se zdá být efektivní při snižování tření u obou testovaných druhů chrupavky. Naproti tomu přimíchání albuminu do roztoku HA způsobilo nárůst tření. Tyto rozdíly byly analyzovány pomocí in situ pozorování kontaktu, které ukázalo významný rozdíl v množství adsorbovaných proteinů na povrchu chrupavky. U poškozené chrupavky se také lišily místa výskytu adsorbátů jednotlivých proteinů.

[22] **SHI, Liu, et al.** Friction coefficients for mechanically damaged bovine articular cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*.

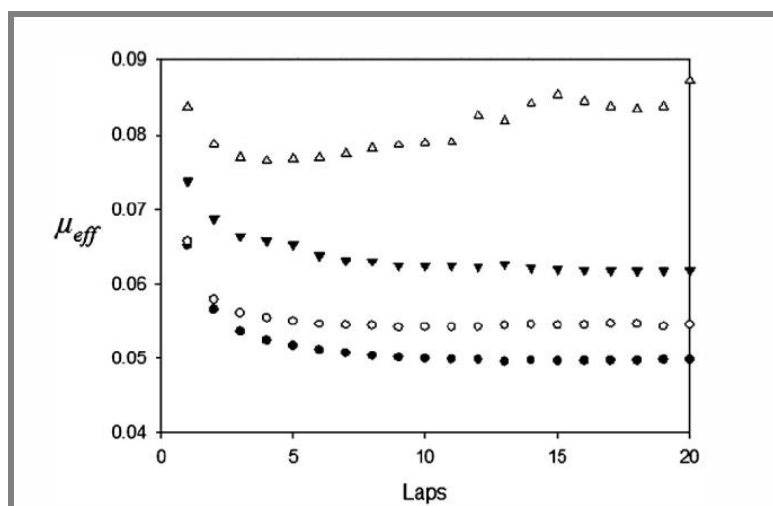
Autoři zkoumali vliv stupně poškození chrupavky na vývoj hodnot součinitele tření v kontaktu hliník-chrupavka. Jako mazivo posloužily roztoky obsahující kyselinu hyaluronovou a polyetylen glykol či hovězí sérum.

Materiál a metody

Experimenty proběhly na zařízení typu pin-od-disc, kdy byl pin zhotoven z hliníku, a kruhové vzorky chrupavky byly přilepeny na hliníkový disk. Pin byl zatížen silou 2 N, která vyvolal kontaktní tlak 0,63 MPa. Smyková rychlost během experimentu byla 1 mm/s. Vzorky chrupavky byly získány z laterálního a mediálního kondylu hovězího femuru. U části vzorků, u kterých byl zkoumán vliv mechanického poškození, bylo pomocí hrotu zhotoveno do povrchové vrstvy chrupavky několik rýh ve tvaru soustředných kružnic. Jako mazivo sloužilo hovězí sérum a roztoky PBS obsahující kyselinu hyaluronovou (10 mg/ml, MW 300 kDa) nebo polyetylen glykol (100 mg/ml). Čisté PBS sloužilo jako referenční mazivo.

Výsledky

Na obr. 18 jsou výsledky měření s různě poškozenými chrupavkami. U všech vzorků dochází na počátku měření k poklesu hodnot součinitele tření a následně se hodnoty ustálí. Nejnížší hodnoty jsou obdrženy pro netknutou chrupavku, se zvyšujícím se počtem rýh dochází k nárůstu hodnot součinitele tření. U nejvíce poškozené chrupavky dochází přibližně od poloviny experimentu k nárůstu tření. Takto výrazné poškození chrupavky může podle autorů způsobit výraznější opotřebení chrupavky během testu.



Obr. 18 Hodnoty součinitele tření pro chrupavky s různým stupněm poškození [22]

Z roztoků vykazuje nejnižší tření PEO a nejvyšší tření čisté PBS jak u netknuté, tak i poškozené chrupavky. U poškozené chrupavky jsou hodnoty počátečního i ustáleného součinitele tření výrazněji vyšší pouze u čistého PBS. Ačkoli dochází k rozrušení struktury chrupavky, která se významně podílí

na hydratačním mazání, složky synoviální kapaliny mohou díky tvorbě gelové vrstvy a mezního filmu udržet nízké hodnoty součinitele tření. Lehce nižší hodnoty součinitele tření jsou obdrženy pro synoviální kapalinu oproti HA, což je zapříčiněno obsahem dalších složek, jako jsou například fosfolipidy. Pozitivní dopad interakce fosfolipidů a HA na tření již byl diskutován v předchozích studiích.

Závěr

Naměřené hodnoty součinitele tření u poškozené chrupavky jsou jen nepatrně vyšší oproti netknuté chrupavce. U PEO ani HA nebyla pozorována adsorpce na povrch. U synoviální kapaliny tomu bylo právě naopak. Synoviální kapalina tedy zlepšuje mazání i díky tvorbě adsorbovaného filmu. Snížení tření může být rovněž způsobeno vyšší viskozitou roztoků oproti čistému PBS, což má pozitivní vliv na hydratační mazání.

[23] **MURAKAMI, T., et al.** Influence of synovia constituents on tribological behaviors of articular cartilage. *Friction*.

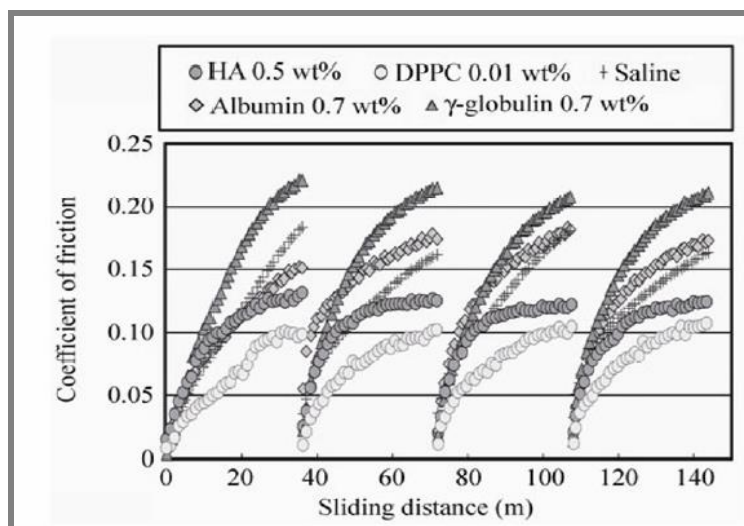
Autoři článku se zabývali rolemi hlavních složek synoviální kapaliny – proteinů, kyseliny hyaluronové a fosfolipidů při mazání chrupavky a interakci těchto složek s jejím povrchem. Rovněž jsou analyzovány rozdíly v chování těchto látek u netknuté a poškozené kloubní chrupavky v kontaktu chrupavka-sklo.

Materiál a metody

Reciproční testy byly provedeny na zařízení typu pin-on-plate. Testy proběhly při zatížení 9,8 N, rychlosti pohybu 20 mm/s a délce dráhy pohybu 35 mm. Elipsoidní vzorky chrupavky byly i se subchondrální tkání extrahovány z femorálního kondylu vepřového kolene. U poškozené chrupavky došlo k částečnému odstranění povrchové gelové vrstvy díky otření vzorku papírovým kapesníkem. Tím došlo k částečnému odhalení kolagenových vláken na povrchu chrupavky. Jako maziva sloužily solné roztoky obsahující různé kombinace albuminu (0,7 nebo 1,4 wt%), γ -globulinu (0,7 wt%), kyseliny hyaluronové (0,5 wt%, MW 920 kDa) a fosfolipidů (0,01 wt%).

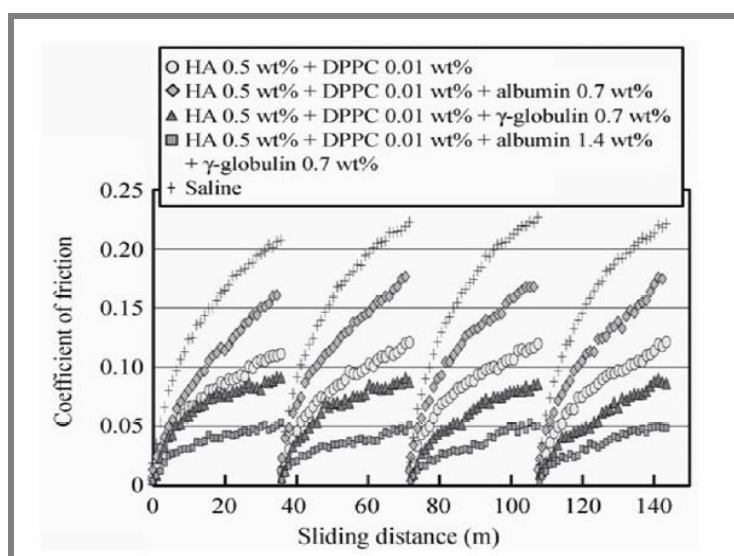
Výsledky

Z roztoků obsahující pouze jednu složku synoviální kapaliny (Obr. 19) vykazuje nejvyšší tření na konci testu γ -globulin a nejnižší fosfolipidy. γ -globulin vykazuje dokonce vyšší tření než čistý solný roztok. Rozdíly v chování proteinů jsou připisovány silnějším adsorpčním vlastnostem γ -globulinu. Díky adsorbovanému filmu jsou počáteční hodnoty součinitel tření nižší. Vázání molekul proteinu na druhé kontaktní těleso ale způsobuje vyšší tření na konci experimentu. Adsorpce proteinů vede i k nárůstu počátečních hodnot tření po rehydrataci. Při odtížení ale může dojít k částečné desorpci tohoto filmu.



Obr. 19 Vývoj součinitele tření jednoduchých roztoků [23]

Inerakce mezi HA a albuminem či γ -globulinem již byla testována v dřívější práci autorů [21]. V tomto článku se tedy soustředili na reakci proteinů a fosfolipidů. Ve výsledcích jsou vidět rozdíly mezi netknutou a mechanicky poškozenou chrupavkou. U netknuté chrupavky vede přimíchání obou proteinů do roztoku fosfolipidů ke snížení tření, kdežto u poškozené chrupavky ke zvýšení tření. Smíchání fosfolipidů a HA do jednoho roztoku vede k významnému poklesu tření (Obr. 20), což poukazuje na tvorbu komplexních struktur tvořených těmito dvěma složkami. Přimíchání obou proteinů do roztoku způsobí ještě výraznější pokles tření. Pokud jsou ale do tohoto roztoku přidány proteiny samostatně, dochází k nárůstu tření. U poškozené chrupavky způsobilo přimíchání γ -globulinu do roztoku HA a fosfolipidů pokles tření. Adsorpce γ -globulinu na povrch poškozené chrupavky tedy bude důležitá pro ochranu jejího povrchu. Nejnižší tření je rovněž pro roztok s oběma proteiny, který simuluje komplexní synoviální kapalinu. Hodnoty součinitele tření jsou však oproti netknuté chrupavce vyšší.



Obr. 20 Hodnoty součinitele tření roztoku HA a fosfolipidů s různými proteiny [23]

Závěr

Každá složka synoviální kapaliny má při mazání chrupavky svou roli. Jejich vzájemná interakce je však rovněž velmi důležitá. Přimíchání jednotlivých složek do maziva může vést k nárůstu tření. Jejich komplexní roztok však u obou typů testované chrupavky vykazoval vždy nejnižší hodnoty součinitele tření. Při mazání chrupavky komplexní kapalinou tvoří fosfolipidy a albumin vrstvy s nízkou smykovou odolností. γ -globulin tvoří, díky své silné adsorpci na povrchu chrupavky, ochranný film. Kyselina hyaluronová zvyšuje viskozitu kapaliny a na povrchu chrupavky tvoří ochrannou gelovou vrstvu.

[24] **PARK, J.-Y., et al.** Effects of Hyaluronic Acid and γ -globulin Concentrations on the Frictional Response of Human Osteoarthritic Articular Cartilage. *PLoS ONE*.

Autoři článku se zabývali vlivem koncentrace kyseliny hyaluronové a γ -globulinu na mezní mazání u zdravé a poškozené chrupavky v různých stádiích osteoartrózy.

Materiál a metody

Testy mikrotření proběhly s PBS roztoky obsahující γ -globulinu s koncentrací 0,5 a 2 mg/ml a HA s MW 1,63 MDa a koncentrací 1, 3 a 5 mg/ml. Čistý PBS sloužilo jako referenční mazivo. Byla použita lidská chrupavka z kyčelního kloubu v různých stádiích osteoartrózy.

Výsledky

Výsledky měření topografie povrchu ukázaly výrazný nárůst drsnosti povrchu u poškozených chrupavek. R_q u zdravé chrupavky bylo 137 ± 25 nm, kdežto u chrupavky v pozdním stádiu osteoartrózy bylo naměřeno $R_q 533 \pm 196$ nm.

U zdravé chrupavky nebylo zlepšení tření u HA a γ -globulinu oproti PBS pozorováno. Roztoky γ -globulinu a HA s koncentrací 5 mg/ml naopak způsobily nárůst hodnot součinitele tření. U chrupavky v raném stádiu osteoartrózy bylo pozorováno podobné chování, pouze nedocházelo k nárůstu tření u nejkonzentrovanejšího roztoku HA. U chrupavky v pozdním stádiu osteoartrózy způsobily roztoky obou látek výrazný pokles tření. U γ -globulinu byl pokles závislý na koncentraci proteinu v roztoku, u HA tato závislost pozorována nebyla. Z výsledků nebyla patrná žádná korelace mezi výsledky měření topografie povrchu a tření.

Závěr

Poškozená chrupavka bez povrchové vrstvy vykazovala vyšší tření oproti zdravé chrupavce. Autoři připisují tento jev vyššímu obsahu lubricinu ve zdravé chrupavce. Adsorpce kyseliny hyaluronové a γ -globulinu významně snížila tření u chrupavky s pokročilým stádiem osteoartrózy. U zdravé a lehce osteoartrické

chrupavky výrazné změny v hodnotách součinitele tření pozorovány nebyly. Snížení tření při adsorpci γ -globulinu bylo závislé na jeho koncentraci. Toto chování u HA pozorováno nebylo.

3.2 Reologie synoviální kapaliny a viskosuplementů

3.2

[25] MAZZUCCO, D., et al. Rheology of joint fluid in total knee arthroplasty patients. *Journal of Orthopaedic Research*.

Autoři analyzovali rozdíly ve viskozitách a viskoelatických vlastnostech synoviálních kapalin pacientů podstupujících primární a revizní artroplastiku kolene. Reologické vlastnosti byly porovnávány s hovězím sérem, které se nejčastěji využívá jako mazivo v kloubních simulátorech, a komerčními viskosuplementy.

Materiál a metody

Testování bylo celkem 58 vzorků synoviálních kapalin od pacientů podstupujících primární artroplastiku a 19 vzorků od pacientů podstupujících revizní artroplastiku. Hovězí sérum bylo zředěno na 40 % roztok s celkovou koncentrací proteinů 73 mg/ml. Testovanými viskosuplementy byl Supartz (1 % roztok HA s MW 620 – 1 170 kDa) a Orthovisc (1,4 % roztok HA s MW 1 390 kDa). Měření proběhly na reometru TA Instruments CSL 500. Synoviální kapaliny a hovězí sérum byly testovány v konfiguraci soustředných válců, roztoky HA v konfiguraci cone-plate (kužel o průměru 30 mm s úhlem 1°).

Výsledky

U všech vzorků synoviálních kapalin bylo pozorováno pseudoplastické chování. U většiny vzorků bylo při nízkých hodnotách smykového spádu pozorováno viskozitní plató. Hodnoty viskozity se pohybovaly v rozsahu tří řádů Pa·s. Oproti tomu se hovězí sérum během analýzy viskozity chovalo v celém rozsahu smykového spádu jako newtonská kapalina.

Synoviální kapaliny od pacientů při primární artroplastice vykazovaly vyšší viskozity oproti revizní artroplastice. Naměřené viskozity synoviálních kapalin při smykovém spádu 1 s^{-1} byly přibližně o dva řády vyšší oproti hovězímu séru a o 1 – 2 řády nižší oproti viskosuplementům. Vyšší viskozitu Orthoviscu oproti Supartzu autoři připisují vyšší koncentraci a molekulové hmotnosti HA. Naměřené viskozity jednotlivých roztoků jsou uvedeny na obr. 21.

Group	$\eta_{1\text{ Pa}}$ (Pa s)	η_0 (Pa s) ^a
TKA ($n = 35$)	0.26 (0.0094–11)	1.3 (0.087–25)
Revision ($n = 14$)	0.13 (0.0043–0.77)	1.0 (0.0087–4.0)
Effusion after TKA ($n = 2$)	0.0096 ^c 0.18 ^d	0.12 2.7
Supartz ^e	3.0	3.1
Orthovisc ^e	37	39
Bovine serum ^e	0.0015	N/A

Obr. 21 Hodnoty viskozit naměřené pro jednotlivé roztoky [25]

Z analýzy viskoelastických vlastností (Obr. 22) lze vyčíst, že u většiny testovaných vzorků se podařilo naměřit crossover point, kdy se charakter kapaliny mění z viskózní na gelovou strukturu. Při frekvenci pohybu 2,5 Hz, která odpovídá běhu, byly vyšší hodnoty modulů naměřeny pro synoviální kapaliny z primární artoplastiky. Crossover point nastává u synoviální kapaliny z primární artoplastiky při nižší frekvenci. U synoviální kapaliny z revizní artoplastiky nastává crossover point až při relativně vysoké frekvenci 3,1 Hz. U hovězího séra nebyl naměřen elastický modul. Viskosuplementy opět vykazují lepší vlastnosti, vyšší moduly byly naměřeny pro Orthovisc.

Crossover frequency and modulus at crossover for joint fluid samples					
Group	Number exhibiting crossover	f_c (Hz)	G_c (Pa)	$G'_{2.5\text{Hz}}$ (Pa)	$G''_{2.5\text{Hz}}$ (Pa)
TKA	13/19	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.2	1.9 ± 0.5	1.4 ± 0.3
Revision	7/11	3.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Supartz	All	11	39	12	20
Orthovisc	All	0.83	38	60	46
Normal 52–78 year old ^a		0.41 ± 0.12	6.1 ± 0.7	19 ± 3	10 ± 1

Obr. 22 Viskoelastické vlastnosti analyzovaných roztoků [25]

Závěr

Synoviální kapalina u pacientů podstupujících primární artoplastiku má vyšší viskozitu a lepší viskoelastické vlastnosti než synoviální kapalina pacientů podstupujících revizní operaci. Obě skupiny vykazovaly lepší reologické vlastnosti než hovězí sérum, ale horší vlastnosti oproti viskosuplementům Orthoviscu a Supartzu. Rozdíly mezi viskosuplementy jsou způsobeny rozdílnou koncentrací a molekulovou hmotností HA.

[26] **MATHIEU, P., et al.** Rheologic Behavior of Osteoarthritic Synovial Fluid after Addition of Hyaluronic Acid: A Pilot Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.

Autoři analyzovali viskozity a viskoelastické vlastnosti u 13 vzorků osteoartrické synoviální kapaliny. Dále se zabývali reologickými vlastnostmi čisté synoviální kapaliny a synoviální kapaliny smíchané s nativní kyselinou hyaluronovou nebo komerčním přípravkem obsahujícím síťovanou kyselinu

hyaluronovou. Studie trvala celkem 6 týdnů, čímž se zároveň vyhodnocovala stabilita synoviální kapaliny modifikované kyselinou hyaluronovou v čase.

Materiál a metody

Vzorky synoviálních kapalin byly získány od 12 pacientů trpících osteoartrózou kolene a od jednoho pacienta trpícího osteoartrózou ramene. Pacienti trpěli mírnou až těžkou formou osteoartrózy (stupně 1-2 resp. 3-4 podle Kellgren-Lawrencovy radiografické klasifikace) a nevykazovali žádné další příznaky.

Pro měření reologie roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu byly tyto dvě látky smíchány v poměru 1:1. Tento poměr odpovídá in vivo viskosuplementaci v klinické praxi. Synoviální kapalina a viskosuplement byly míchány v magnetické míchačce při okolní teplotě 15 minut před experimentem.

Viskosuplementy reprezentoval roztok lineární kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1,14 MDa. Prášková kyselina hyaluronová byla rozpuštěna v 0,15 mol/L NaCl. Druhý použitý viskosuplement byl Synvisc založený na síťované Hylanu G-F 20 s koncentrací 8 ± 2 g/L a zdánlivou molekulovou hmotností 6 MDa. Oproti lineární kyselině hyaluronové má Hylan G-F 20 při stejné koncentraci až 15x vyšší viskozitu a 9x vyšší elasticitu. Síťovaná kyselina hyaluronová se rovněž vyznačuje delší výdrží v kloubu než lineární kyselina hyaluronová.

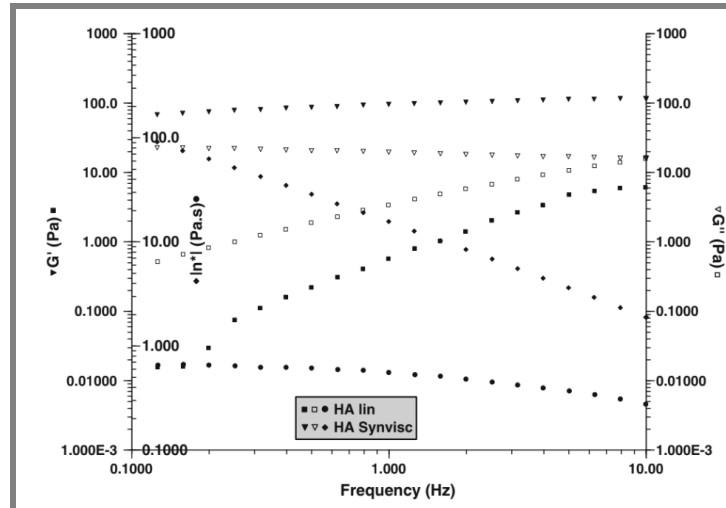
Měření reologických vlastností proběhlo na reometru AR 1000 od firmy TA Instruments. Měření proběhla v konfiguraci cone-plate (kužel průměru 40 mm, úhel $3,59^\circ$) při 25°C . Viskozita byla měřena v závislosti na smykovém spádu v rozsahu $0,1 - 50 \text{ s}^{-1}$. Viskózní a elastický modul pružnosti byly měřeny v závislosti na úhlové frekvenci v rozsahu $0,1 - 10 \text{ Hz}$.

Výsledky

Za podmínek konstantního toku vykazovaly všechny vzorky synoviálních kapalin neneutonské chování. Při zvyšování smykového spádu docházelo k poklesu viskozity, což je klasickým projevem chování pseudoplastických kapalin. Viskozita při smykovém spádu $0,1 \text{ s}^{-1}$ se pohybovala v rozsahu $0,1 - 10 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

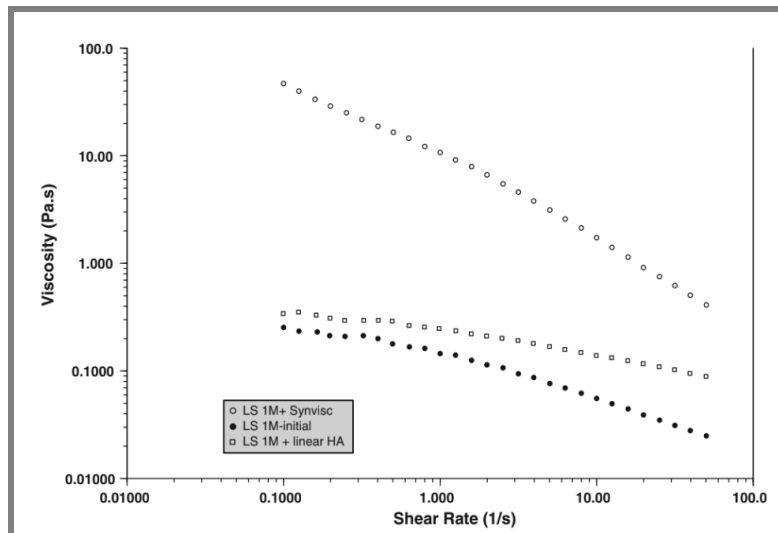
Měření viskoelastických vlastností viskosuplementů (Obr. 23) ukázalo výrazný rozdíl mezi lineární a síťovanou kyselinou hyaluronovou. U Hylanu G-F 20 je v celém rozsahu úhlové frekvence elastický modul pružnosti vyšší než viskózní modul pružnosti. Toto chování je typické pro gely. U lineární kyseliny hyaluronové je viskózní modul vyšší než elastický, což je typické pro viskózní látky. U lineární kyseliny hyaluronové lze rovněž pozorovat výraznější závislost hodnot dynamických modulů pružnosti na úhlové frekvenci.

Z výsledků je rovněž patrné výraznější neneutonské chování Hylanu G-F 20 oproti lineární kyselině hyaluronové. Hylan G-F 20 vykazoval neneutonské chování v celém rozsahu smykového spádu, zatímco lineární HA vykazovala newtonské chování do smykového spádu 1 s^{-1} .



Obr. 23 Viskoelastické vlastnosti lineární a síťované HA [26]

Přidání lineární HA do synoviální kapaliny způsobilo pouze lehké změny v chování. Došlo ke zvýšení viskozity při vyšších hodnotách smykového spádu a snížil se vliv smykového spádu na viskozitu. Přidání Hyalnu G-F 20 do synoviální kapaliny vedlo k výraznému nárůstu viskozity napříč celým rozsahem smykového spádu a došlo ke zvýraznění neneutonského charakteru kapaliny. Výsledky měření viskozit roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu lze vidět na obr. 24.



Obr. 24 Viskozity roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [26]

Závěr

Síťovaná kyselina hyaluronová má výrazně lepší viskoelastické vlastnosti. Hodnoty viskózního a elastického modulu pružnosti jsou oproti lineární kyselině hyaluronové řádově vyšší. Z toho pak vyplívá odlišný vliv obou látek na synoviální kapalinu. Výsledky ukazují, že viskozita synoviální kapaliny smíchané s Hylanem G-F 20 je při nízkých smykových spádech přibližně o 2 řády vyšší než viskozita synoviální kapaliny smíchané s lineární kyselinou hyaluronovou. U roztoku obsahující Hylan G-F 20 je ale výraznější vliv neneutonského charakteru kapaliny.

[27] **BHUANANTANONDH, P., D. GRECOV a E. KWOK.** Rheological Study of viscosupplements and Synovial Fluid in Patients with Osteoarthritis. *Journal of Medical and Biological Engineering*.

Studie se zabývala vlivem tří komerčních viskosuplementů na viskozitu a viskoelastické vlastnosti osteoartritické synoviální kapaliny. Autoři se dále zaměřili na změny reologických vlastností roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu v čase. Výsledky jsou porovnávány s fyziologickou synoviální kapalinou, aby bylo možné posoudit, zda viskosuplementace obnovuje reologické vlastnosti synoviální kapaliny.

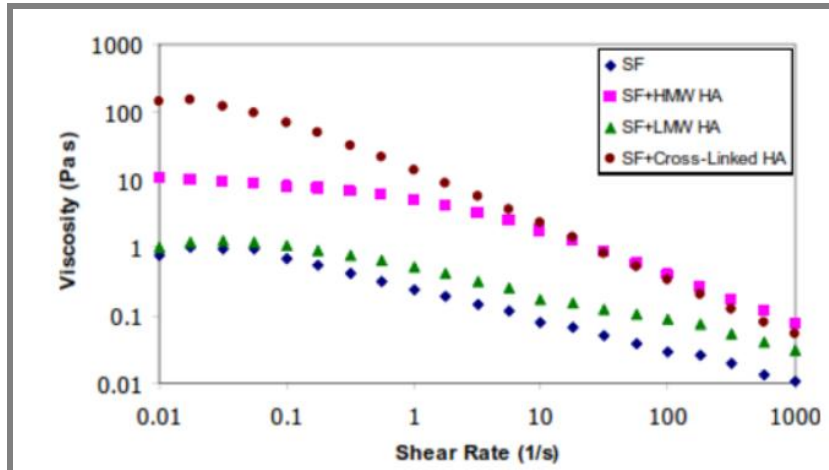
Materiál a metody

Vzorky reálné osteoartritické synoviální kapaliny byly odebrány od pacientů podstupujících artroplastiku kolene. Každý vzorek byl rozdělen do čtyř zkumavek. Tři z nich pak byly v poměru 1:1 smíchány s viskosuplementem. Pro testy byly použity viskosuplementy Orthovisc (lineární HA s nízkou molekulovou hmotností 500 – 730 kDa), Suplasyn (lineární HA s vysokou molekulovou hmotností 1 000 – 2 900 kDa) a Synvisc (síťovaná HA s molekulovou hmotností 6 000 kDa). Viskosuplementy byly se synoviální kapalinou míchány při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Testy proběhly na reometrech Bohlin Gemini HR a Malvern Instruments Kinexus v konfiguraci cone-plate (kužel o průměru 40 mm s úhlem 1°) při 37 °C. Viskozity byly proměřeny pro rozsah smykových spádů 0,01 – 1 000 s⁻¹. Viskoelastické vlastnosti byly měřeny při úhlové frekvenci 1 – 10 Hz při 5 % strainu.

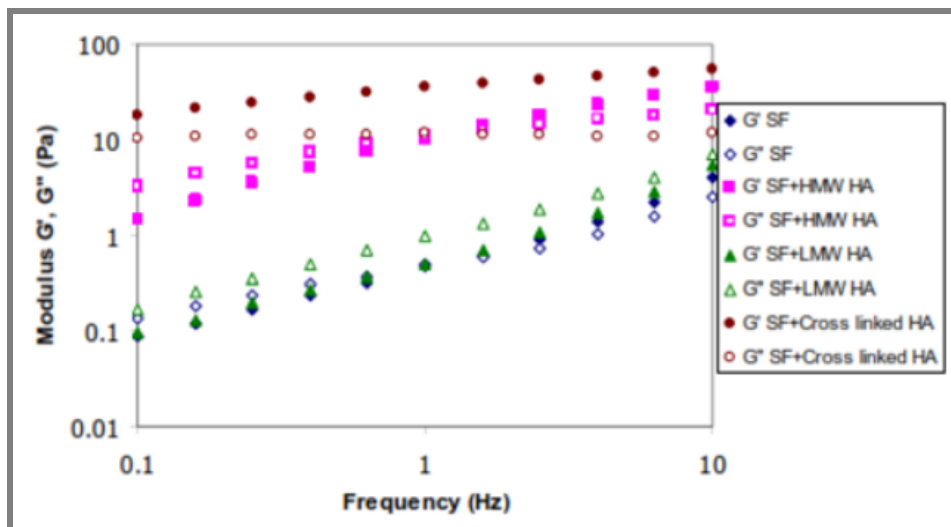
Výsledky

U všech vzorků synoviálních kapalin bylo pozorováno neneutonské chování. Řetězce HA jsou při nízkých smykových spádech zapletené a kladou největší odpor vůči pohybu. Při vysokých smykových spádech dochází k rozplétání a molekuly se orientují ve směru tečení kapaliny. Tím se viskozita roztoku snižuje. Přimíchání viskosuplementu do SF vedlo k nárůstu viskozity v celém rozsahu smykového spádu. Při vysokých smykových spádech jsou hodnoty viskozity velmi podobné u všech viskosuplementů. Při těchto hodnotách se tedy vliv viskosuplementu na reologické vlastnosti synoviální kapaliny snižuje. Lineární HA s vysokou molekulovou hmotností způsobila nárůst viskozity o jeden řád, síťovaná HA o dva řády. U síťované HA je vidět největší míra poklesu viskozity se smykovým spádem. Neneutonské chování je u ní nejvýraznější. Skladování v lednici nemá na viskozitu vliv. Výsledky měření viskozit roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu lze vidět na obr. 25.



Obr. 25 Závislost viskozity na smykovém spádu roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [27]

Na obr. 26 lze vidět výsledky měření viskoelastických vlastností HA smíchané s viskosuplementy. Přimíchání nízkomolekulární HA způsobilo nárůst viskózního modulu a roztok se chová jako viskózní látka v celém rozsahu úhlové frekvence. Přimíchání vysokomolekulární HA zvýšilo hodnoty obou modulů o jeden řád a při frekvenci kolem 1 Hz dochází ke crossover pointu. Přimíchání síťované HA způsobilo nárůst obou modulů o více než dva řády a roztok se v celém rozsahu smykového spádu choval jako gel.



Obr. 26 Viskoelastické vlastnosti roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [27]

Závěr

Reologické vlastnosti roztoku synoviální kapaliny a viskosuplementu závisí na molekulové hmotnosti a síťování HA. Přimíchání HA způsobí nárůst viskozity a zlepšení viskoelastických vlastností oproti osteoartrické synoviální kapalině.

[28] **BHUANANTANONDH, P., et al.** Rheology of osteoarthritic synovial fluid mixed with viscosupplements: A pilot study. *Biomedical Engineering Letters*.

Autoři článku analyzovali viskozity a viskoelastické vlastnosti u 3 komerčně dostupných viskosuplementů založených na lineární kyselině hyaluronové s nízkou a vysokou molekulovou hmotností a na síťované kyselině hyaluronové. V druhé části jsou analyzovány reologické vlastnosti celkem 22 synoviálních kapalin odebraných z kolen pacientů podstupujících artroplastiku.

Materiál a metody

U naprosté většiny pacientů byla klasifikována pokročilá osteoartróza 4. stupně dle Kellgren-Lawrencovy stupnice. U dvou pacientů byla prováděna bilaterální artroplastika. Ve výsledcích jsou porovnávány rozdíly ve složení synoviální kapaliny mezi levým a pravým kolenem. Testované komerční viskosupplementary byly zastoupeny Orthoviscem a Suplasynem, které jsou založeny na lineární kyselině hyaluronové, a Synviscem. Synvisc je viskosuplement založený na síťovaném Hylanu G-F 20.

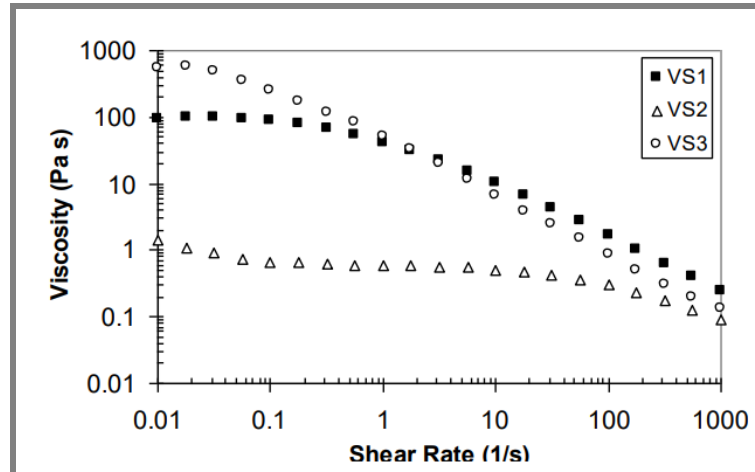
Měření reologie proběhly na reometrech Bohlin Gemini HR a Malvern Instruments v konfiguraci cone-plate (kužel o průměru 40 mm s úhlem 1°) při 37 °C pro rozsah smykových spádů 0,01 – 1 000 s⁻¹. V druhém kroku byly naměřeny hodnoty dynamických modulů pružnosti v závislosti na frekvenci v rozsahu 0,1 – 10 Hz při aplikovaném strainu 5%.

Výsledky

Synoviální kapalina se chová jako pseudoplastická neneutonská kapalina a má viskoelastické vlastnosti. Naměřená viskozita při nulovém smykovém spádu napříč vzorky byla 3,4 ± 2,9 Pa·s. Při frekvenci 0,5 Hz byl naměřen elastický modul pružnosti 2,14 ± 1,7 Pa a viskózní modul 1,63 ± 1 Pa. Při frekvenci 2,5 Hz byl elastický modul 3,55 ± 2,72 Pa a viskózní modul 2,51 ± 1,25. Frekvence 0,5 Hz a 2,5 Hz odpovídají frekvenci pohybu a běhu.

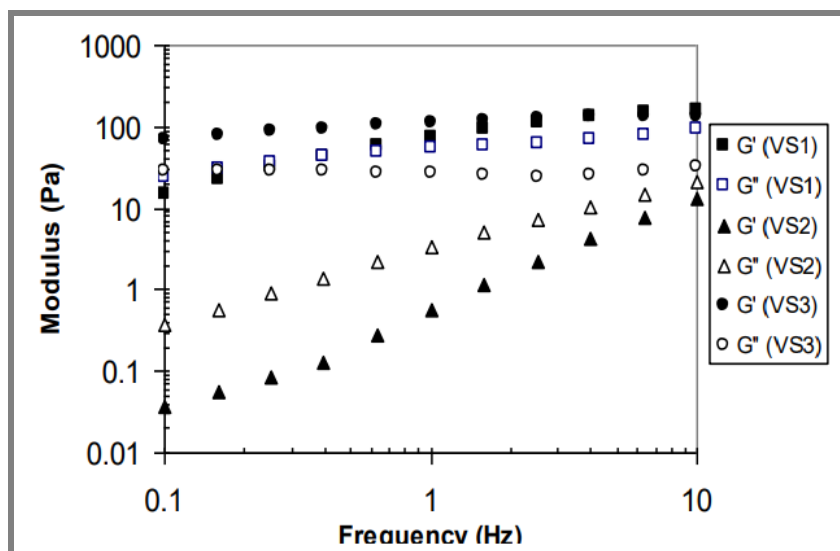
U pacientů s bilaterální artroplastikou byly pozorovány velké rozdíly ve viskozitě a viskoelastických vlastnostech synoviální kapaliny odebrané z levého a pravého kolene. Osteoartróza je tedy více než systémová porucha. Na reologii synoviální kapaliny mohou mít vliv další parametry jako geometrie kloubu nebo historie vzniku poškození chrupavky.

Viskosupplementary se rovněž chovají jako pseudoplastické kapaliny. Nejnižší viskozity napříč celým rozsahem smykových spádů byla naměřena pro viskosuplement s nízkomolekulární HA. Síťovaná HA má oproti nesíťované HA vyšší viskozitu při smykových spádech do 2 s⁻¹. Při vyšších smykových spádech má viskozitu nižší. Oproti HA s nízkou molekulovou hmotností je viskozita při nízkých smykových spádech o více než dva řády vyšší. Viskozita HA je tedy výrazně závislá na její molekulové hmotnosti. U síťované HA je pokles viskozity s narůstajícím smykovým spádem nejvýraznější. Výsledky měření viskozit viskosuplementů lze vidět na obr. 27.



Obr. 27 Viskozita viskosuplementů [28]

Testované viskosuplementy vykazují odlišné viskoelastické vlastnosti (Obr. 28). U síťované HA jsou hodnoty elastického modulu vyšší než viskózního modulu. Látka se tedy chová jako gel. U lineární HA s vysokou molekulovou hmotností dochází při 0,39 Hz ke crossover pointu. Při nízkých frekvencích se látka chová jako viskózní kapalina, při vyšších frekvencích jako gel. HA s nízkou molekulovou hmotností se chová vždy jako viskózní kapalina. Hodnoty obou modulů jsou oproti ostatním roztokům nižší. Při frekvencích 0,5 Hz a 2,5 Hz má nejvyšší elastický modul síťovaná HA a nejvyšší viskózní modul nesíťovaná HA s vysokou molekulovou hmotností.



Obr. 28 Měření viskoelastických vlastností viskosuplementů [28]

Závěr

Reologické vlastnosti synoviální kapliny u různých pacientů s osteoartrózou se mohou velmi lišit i v rámci jednotlivých kloubů. Viskozita viskosuplementů je závislá na molekulové hmotnosti a síťování HA. S nárůstem těchto parametrů se rovněž zlepšují viskoelastické vlastnosti a dochází ke změně charakteru látky z viskózní na gelovou strukturu.

- [29] 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*.

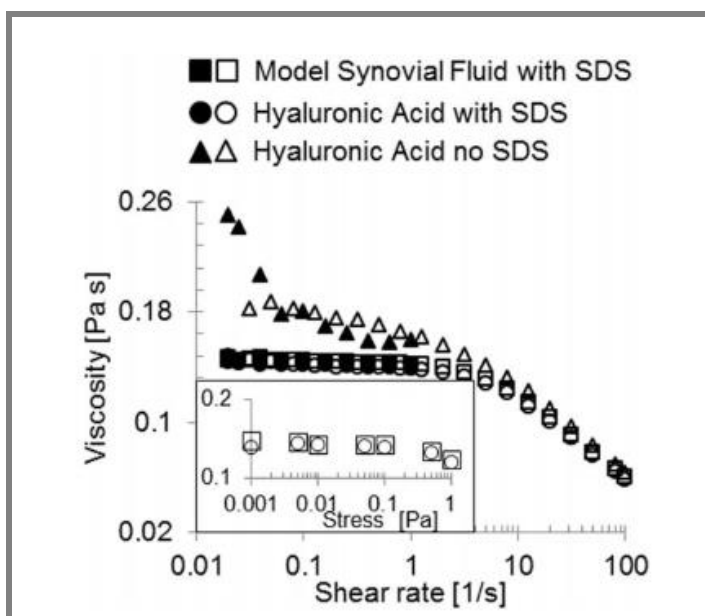
Autoři se zabývali vlivem koncentrace proteinů v synoviální kapalině na její reologii. Otázkou bylo, zda proteinové agregáty či interakce proteinů s kyselinou hyaluronovou mohou ovlivnit reologické vlastnosti synoviální kapaliny. Bylo použito několik technik stanovení reologických vlastností u modelových kapalin obsahujících albumin, γ -globulin a kyselinu hyaluronovou. Tímto měla být odstraněna chyba měření, která by mohla vzniknout adsorpcí proteinů na povrchy, a výsledky by měly být závislé pouze na reologických vlastnostech daného roztoku.

Materiál a metody

Měření proběhly na reometru AR-G2 od firmy TA Instruments v konfiguraci plate-plate (60 mm průměr), single gap Couette a double gap Couette. Vzorky byly podrobeny rotačním a oscilačním testům pro různé rozsahy smykových spádů, frekvencí pohybu a napětí. Pro simulování synoviální kapaliny byly použity modelové roztoky obsahující kombinace albuminu (10 mg/ml), γ -globulinu (0,5 mg/ml) a kyseliny hyaluronové (3,4 mg/ml) s molekulovou hmotností 1,6 MDa. Jednotlivé složky byly rozpuštěny v roztoku PBS s pH 7,4.

Výsledky

Reologické vlastnosti modelové synoviální kapaliny při konstantním smyku jsou závislé pouze na vlastnostech kyseliny hyaluronové, kterou obsahuje (Obr. 29). Přítomnost a koncentrace proteinů albuminu a γ -globulinu nemá na dynamickou viskozitu žádný vliv. Autoři usuzují, že lubricin, který je rovněž součástí synoviální kapaliny, by mohl mít na reologii vliv. Tento protein však ve studii použit nebyl.



Obr. 29 Výsledky měření viskozit kyseliny hyaluronové a modelové synoviální kapaliny [29]

Závěr

Pokud je z výsledků odstraněn vliv mezifázové reologie, která je způsobena především adsorpcí proteinů na povrchy měřících těles, je reologie roztoku modelové synoviální kapaliny závislá výhradně na vlastnostech kyseliny hyaluronové napříč celým rozsahem smykového spádu, napětí a frekvence.

4 ANALÝZA, INTERPRETACE A ZHODNOCENÍ POZNATKŮ ZÍSKANÝCH NA ZÁKLADĚ REŠERŠE

4

4.1 Interakce složek synoviální kapaliny

4.1

Synoviální kapalina je komplexní roztok, jehož hlavními složkami jsou proteiny, kyselina hyaluronová, fosfolipidy, atd. Tyto složky se samostatně a v kombinaci s dalšími složkami synoviální kapaliny podílí na mazání kloubní chrupavky v závislosti na aktuálních podmínkách a režimu mazání v kontaktu.

Protein albumin, díky své hydrofilní povaze, adsorbuje na povrch chrupavky velmi obtížně. Adsorbovaný film bývá relativně tenký a pouze lokálně rozmístěný [14]. Oproti albuminu vykazuje γ -globulin vysoce hydrofobní chování. Na povrchu chrupavky vytváří rovnoměrný a stabilní mazací film [14]. Tato vrstva chrání povrch chrupavky a za podmínek mezního mazání zabraňuje poškození kolagenové struktury chrupavky. Díky této vrstvě je tření v kontaktu po rehydrataci chrupavky nižší ale po uražení delší kluzné dráhy, kdy dochází k přechodu do mezního mazání, způsobuje tato vrstva vyšší tření v kontaktu. Adsorbovaný γ -globulin má tendenci reagovat i s povrchem druhé chrupavky. V kontaktu tedy dochází k něčemu, co vzdáleně připomíná adhezi. Přetrhávání vazeb pak vede k nárůstu tření. Vzhledem k rozdílům v adsorpci proteinů a dříve popsanému mechanismu vykazuje čistý roztok γ -globulinu vyšší tření, než čistý albuminový roztok [18,23].

Při smíchání proteinů vede přítomnosti albuminu v roztoku k omezení adsorpčních vlastností γ -globulinu. Albumin je schopný adsorbovat, na rozdíl od povrchu chrupavky, na vrstvu γ -globulinu výrazně lépe. Při vysoké koncentraci má tendenci i molekuly γ -globulinu nahrazovat [16]. Albuminová vrstva má ale nízkou smykovou odolnost a může docházet k desorpci. Tyto výsledky podporuje i studie [14], kde byla pozorována výraznější adsorpce albuminu z roztoku obou proteinů oproti čistému roztoku. U studie [16] byla naopak pozorována vyšší adsorpce γ -globulinu z čistého roztoku. Vzhledem k tomu, že albumin omezuje adsorpci γ -globulinu a tvoří vrstvu s nízkou smykovou odolností, je vytvoření základní γ -globulinové vrstvy klíčové pro stabilitu adsorbovaného filmu. Stabilita vrstvy je pak závislá na poměru proteinů v roztoku. U stabilního filmu lze sledovat rovnoměrnou strukturu [14] a počet částic γ -globulinu výrazně vyšší oproti albuminu [16]. Při vysokém obsahu albuminu lze pozorovat separované adsorbáty.

Přimíchání HA a fosfolipidů do základního roztoku (PBS, solný roztok) rovněž způsobí pokles tření. Ve studii [9] nebylo snížení tření na koncentraci HA závislé, kdežto u studie [15] byl pokles na koncentraci závislý. Tento rozdíl může být do určité míry způsobený odlišným základním roztokem. Snížení tření u HA rovněž závisí na její molekulové hmotnosti. Ve studii [20] bylo u HA s molekulovou hmotností 5 MDa tření výrazně nižší oproti HA s molekulovou hmotností 10 kDa. Pozorování struktury chrupavky pomocí fluorescenční mikroskopie ukázalo, že kyselina hyaluronová proniká skrz strukturu chrupavky a soustředí se v okolí chondrocytů. Zde pravděpodobně stimuluje chondrocyty k syntéze nové HA. U fosfolipidů byla ve studiích [9,15] pozorována závislost koncentrace na snížení tření. Pokud se obě složky smíchaly, byla reakce z hlediska tření synergická a hodnoty součinitele byly ještě nižší. Hodnoty však byly oproti synoviální kapalině vyšší a výrazně se snížil vliv molekulové hmotnosti HA [20].

Při smíchání HA a proteinů je patrný rozdíl mezi albuminem a γ -globulinem. Při interakci albuminu a HA dochází, díky záporně nabitým molekulám obou látek, k jejich vzájemnému odpuzování. Tím dochází k narušení adsorpce [21] látek a interakce je tedy z hlediska tření nepříznivá [16]. Narušení adsorpce je tak výrazné, že výsledný roztok vykazuje tření velmi podobné čistému solnému roztoku [21]. Při pozorování kontaktu fluorescenční mikroskopií byly pozorovány pouze velmi malé lokalizované částice. Naproti tomu reakce HA s γ -globulinem je pro tření chrupavky prospěšná. HA tvoří s γ -globulinem komplexní struktury [16]. Lepší tvorba gelové vrstvy na povrchu chrupavky způsobuje výrazné snížení tření v kontaktu oproti roztoku HA a albuminu. Tento jev byl potvrzen i studií [21], kdy byla s pomocí fluorescenční mikroskopie pozorována tvorba uniformního filmu napříč celou kontaktní oblastí.

Přimíchání albuminu a γ -globulinu k fosfolipidům rovněž snižuje tření [23]. K dalšímu snížení tření dojde, pokud se do roztoku přidá HA a dojde ke smíchání všech čtyř základních složek synoviální kapaliny. Komplexní synoviální kapalina vykazovala nejnižší tření ve všech studiích, které s tímto roztokem pracovaly [15, 17, 23]. Pokud se však k HA a fosfolipidům přimíchá pouze jeden protein, dochází k nárůstu tření.

4.2 Osteoartritická chrupavky

Při osteoartróze dochází ke změnám ve struktuře chrupavky a mění se i složení synoviální kapaliny v závislosti na stádiu osteoartrózy. Tyto změny pak mohou mít méně či více výrazný vliv na tření v kloubu. V prvotních fázích dochází k postupnému rozrušení gelové vrstvy na povrchu chrupavky. Odstranění této vrstvy vedlo ve studii [18] k nárůstu tření γ -globulinu po rehydrataci ale tření na konci testu bylo nižší. Tento jev byl způsobený nižší adsorpcí proteinu na povrch chrupavky. Vzhledem k nižšímu množství adsorbovaného proteinu nebyly adhezní síly v kontaktu tak výrazné. Nižší adsorpci si lze vysvětlit výsledky z článku [21], kde bylo pomocí fluorescenční mikroskopie pozorováno, že u chrupavky s rozrušenou gelovou vrstvou má γ -globulin tendenci adsorbovat spíše na zbytky této vrstvy, než na odhalenou kolagenovou strukturu. Gelová vrstva je totiž z velké části tvořena HA a fosfolipidy a γ -globulin má tendenci se na HA vázat. Naopak albumin adsorboval spíše v oblastech, kde již došlo k odhalení kolagenových vláken. To může být způsobeno jeho odpuzováním s molekulami HA.

Výsledky studie [17] ukazují, že ani lehké poškození kolagenových vláken nemusí vést k výraznému nárůstu tření. Závislost stupně poškození na tření byla pozorována ve studii [22], kde bylo ale poškození, díky rýhování povrchu, výrazné i u nejméně poškozeného vzorku. Další studie [24], která pracovala s hodně poškozenou chrupavkou, ukázala, že HA a γ -globulin jsou schopny snižovat tření i za výrazně zhoršených podmínek s tím, že pokles tření u γ -globulinu byl závislý na jeho koncentraci, kdežto u HA nebyl. Testy probíhaly na různě poškozených chrupavkách ale korelace mezi drsností povrchu a třením nalezena nebyla.

4.3 Reologie

Synoviální kapalina se chová jako newtonská kapalina. Autoři článku [29] potvrdili, že proteiny albumin a γ -globulin nemají na reologii synoviální kapaliny

žádný vliv. Primární složkou ovlivňující reologické vlastnosti synoviální kapaliny se zdá být kyselina hyaluronová. Podle autorů článku může mít na reologii vliv i lubricin známý též pod názvem proteoglykan 4 (PRG4). Tento fosfolipid však součástí experimentů nebyl. Pseudoplastické chování kyseliny hyaluronové je způsobeno napřímením lineárních řetězců tvořících molekuly a jejich orientací ve směru proudění kapaliny.

Při osteoartróze dochází ke zhoršování reologických vlastností synoviální kapaliny, které je způsobeno snižováním koncentrace a molekulové hmotnosti endogenní HA. Reologické vlastnosti osteoartritické synoviální kapaliny vykazují velký rozptyl. Viskozita analyzovaných synoviálních kapalin v článku [26] se při stejných podmínkách pohybovala v rozsahu 3 řádů. Byl zaznamenán i výrazný rozdíl mezi synoviální kapalinou z pravého a levého kolene u pacientů s bilaterální artrózou. Složení a vlastnosti synoviální kapaliny se tedy odvíjí od konkrétní situace v daném kloubu jako například od stupně poškození artrózou.

Viskosuplementy s vyšší molekulovou hmotností a koncentrací HA vykazují vyšší viskozitu a lepší viskoelastické vlastnosti [25]. Rovněž jsou patrné výrazné rozdíly v reologických vlastnostech mezi lineární a síťovanou HA [26]. U nízkomolekulární HA lze při nízkých spádech pozorovat viskozitní plató. U vysokomolekulární HA je výraznější míra poklesu viskozity a newtonského chování se projevuje v celém měřeném rozsahu smykového spádu. U nízkomolekulární lineární HA je elastický modul pružnosti vyšší než viskózní. U vysokomolekulární lineární HA dochází při určité frekvenci k tzv. crossover pointu, kdy začnou hodnoty elastického modulu převyšovat hodnoty viskózního modulu pružnosti a látka tím mění svůj charakter. U síťované HA převyšují hodnoty elastického modulu v celém rozsahu měřeného smykového spádu a viskosuplement se chová jako tuhý gel.

Smíchání synoviální kapaliny a exogenní kyseliny hyaluronové způsobí nárůst viskozity a zlepšení viskoelastických vlastností s tím, že charakter roztoku je výrazně závislý na druhu HA, kterou viskosuplement obsahuje. U nízkomolekulární HA k nárůstu viskozity téměř nedojde [27]. Vysokomolekulární lineární HA způsobí nárůst viskozity o jeden řád, síťovaná HA o dva řády. Při vysokých hodnotách smykového spádu se rozdíly ve viskozitách zmenšují a vliv viskosuplementu na chování synoviální kapaliny se snižuje. Přimíchání nízkomolekulární HA [28] zvýší pouze viskózní modul pružnosti. Tento typ tedy z hlediska vylepšování viskoelastických vlastností příliš vhodný není. Díky vyššímu elastickému modulu je synoviální kapalina schopna přenášet vyšší podíl zatížení aplikovaného na chrupavku. Rovněž zaručuje lepší pohlcování rázového zatížení. Vysokomolekulární HA zvýší oba moduly pružnosti a u výsledného roztoku lze rovněž naměřit crossover point. Oproti čisté HA nastává crossover point při vyšší frekvenci pohybu. Nastává tak situace, že při běžné chůzi se synoviální kapalina chová jako viskózní kapalina, kdežto při běhu jako tuhý gel. Síťovaná HA zvýší hodnoty obou dynamických modulů pružnosti o dva řády s tím, že elastický modul je vždy vyšší.

Na základě provedené kritické rešerše lze konstatovat, že doposud nebyly publikovány studie, které by se věnovaly vlivem složení synoviální kapaliny, jako komplexního roztoku, na tření. Chybí studie, které by mapovaly vliv koncentrace jednotlivých složek na chování komplexní synoviální kapaliny popř. články, které

by mapovaly změny ve tření u fyziologické a osteoartritické synoviální kapaliny. Většina článků mapuje tření pouze u roztoků obsahující jednotlivé složky synoviální kapaliny. Výjimkou jsou studie [15,23], kde mazací roztoky obsahovaly tři a více složek synoviální kapaliny. Testování tribologických vlastností viskosuplementů je rovněž poměrně neprobádanou oblastí. Jedinou publikací, která se zabývá touto problematikou, je článek [19], kde se však pouze porovnávalo tření u různých typů léčiv. Viskosuplementy jsou zde zastoupeny Hyalganem a Synviscem s tím, že nižší tření vykazuje Hyalgan, což autoři připisují jeho nižší viskozitě. Studie mapující vliv viskosuplementů na tření v kontaktu chrupavka-chrupavka nebo chrupavka-sklo, který by byl mazaný osteoartritickou synoviální kapalinou, doposud publikovány nebyly. Přitom studie zabývající se reologií této problematiky již publikovány byly. Z těchto studií lze vyčíst, že viskosuplementace zvyšuje viskozitu a zlepšuje viskoelastické vlastnosti synoviální kapaliny. Hlavní parametry, které mají na tyto zlepšení vliv, jsou koncentrace a molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové obsažené ve viskosuplementu.

5 VYMEZENÍ CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE A NÁVRH ZPŮSOBU JEJÍHO ŘEŠENÍ

5

5.1 Vymezení cíle práce

5.1

Disertační práce se zabývá studiem tribologických dějů probíhajících v lidských synoviálních kloubech postižených osteoartrózou po viskosuplementaci. Cílem práce je analýza vlivu koncentrace a molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, dodané do kloubu během viskosuplementace, na tření v kontaktu v závislosti na složení synoviální kapaliny.

Pro úspěšné splnění cíle disertační práce je potřeba splnit několik dílčích cílů:

- Navrhnout metodiku pro odběr a uchovávání vzorků chrupavek.
- Pomocí proteinových roztoků a modelových synoviálních kapalin posoudit vliv jednotlivých složek synoviální kapaliny na tření v kontaktu.
- Provést sérii experimentů s roztoky synoviální kapaliny a kyseliny hyaluronové s cílem objasnit vliv koncentrace a molekulové hmotnosti exogenní kyseliny hyaluronové na změny v tření po viskosuplementaci.
- Provést sérii experimentů s roztoky synoviální kapaliny a komerčních viskosuplementů s cílem porovnat jejich efektivitu při snižování tření a porovnat výsledky s čistou kyselinou hyaluronovou o stejné molekulové hmotnosti a koncentraci.
- Analyzovat viskozity a viskoelastické vlastnosti synoviálních kapalin, roztoků kyseliny hyaluronové, komerčních viskosuplementů a jejich roztoků.
- Vyhodnotit experimenty, porovnat výsledky reologie a tření a získané poznatky zobecnit na situaci v reálném kloubu.

5.2 Vědecká otázka a pracovní hypotéza

5.2

Vědecká otázka

„Jaký je vliv koncentrace a molekulové hmotnosti exogenní kyseliny hyaluronové, dodané do kloubního pouzdra během viskosuplementace, na tření kloubní chrupavky?“

Pracovní hypotéza

„Viskosuplementy se síťovanou kyselinou hyaluronovou a vysokou molekulovou hmotností způsobí výraznější pokles součinitele tření v kontaktu oproti viskosuplementům s lineární kyselinou hyaluronovou s nízkou molekulovou hmotností.“

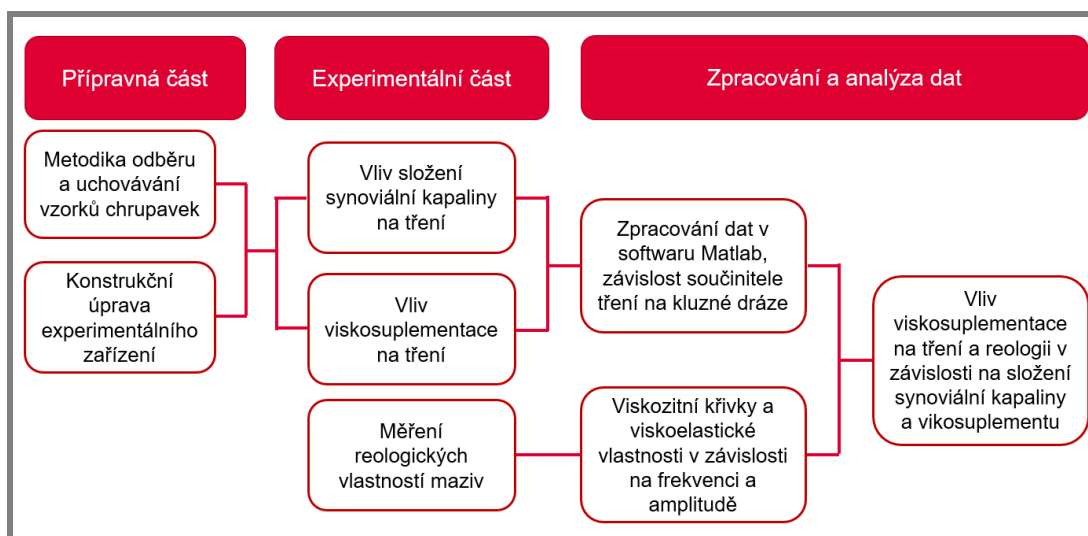
Články v rešeršní části práce ukazují, že přidání HA do základního roztoku [9, 22, 30] nebo např. do roztoku fosfolipidů [9, 23] způsobuje pokles tření. Otázkou

je, jak dále vývoj součinitele tření ovlivní přítomnost proteinů v mazacím roztoku a jejich reakce s exogenní HA. Základní představu může dát článek od Murakamiho a kol. [23], 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 základního roztoku způsobí pokles tření u obou typů chrupavky. Pokud jsou v roztoku přítomny oba proteiny, bývá hodnota součinitel tření ještě nižší.

V žádném článku nebyla provedena studie zabývající se vlivem molekulové hmotnosti a síťováním HA na tření a mazání. Přitom z článků zabývajících se reologií HA [26,28] vyplývá, že HA s vysokou molekulovou hmotností má oproti HA s nízkou molekulovou hmotností vyšší viskozitu a lepší viskoelastické vlastnosti. Pokud je HA navíc síťovaná, jsou reologické vlastnosti výrazně lepší. Pokud bychom vycházely z teorií platných v klasické tribologii, měl by nárůst viskozity maziva vést k vyšším hodnotám součinitele tření při smíšeném mazání. Díky formování gelové vrstvy však lze v mezním režimu mazání očekávat nižší tření [18,21].

5.3 Návrh způsobu řešení

Na základě vytyčených cílů a vyslovené vědecké otázky bude řešení disertační práce rozděleno do tří základních etap – přípravná fáze, experimentální část a vyhodnocení a analýza dat. V každé části bude potřeba zvládnout několik dílčích úkolů. Předběžné schéma disertační práce lze vidět na obr. 30.



Obr. 30 Schéma řešení disertační práce

5.3.1 Přípravná část

Před započítím experimentů bude potřeba navrhnout metodiku pro odběr a uchovávání vzorků chrupavek a provést konstrukční úpravy na tribometru Bruker UMT TriboLab, na kterém budou probíhat experimenty mapující vývoj tření v kontaktu chrupavka-sklo.

V rámci návrhu metodiky bude v první fázi potřeba navrhnout vhodnou náhradu lidské chrupavky pro měření tření. Možnými náhradami jsou buďto zvířecí chrupavka nebo hydrogel. Pravděpodobnější variantou však bude zvířecí chrupavka. Na základě rešerše bude vytipováno vhodné zvíře a kloub pro odběr vzorku.

Nejčastější typy náhrad jsou chrupavky z hovězího kolene [2,22], hovězího femuru [30,31] či prasečího kolene [23]. Vzorky chrupavky budou z kloubu odebírány i se subchondální tkání. Nástroj pro odběr musí být zvolen tak, aby nedocházelo k mechanickému ani tepelnému poškození chrupavky. Jako vhodný nástroj se jeví dutá fréza od společnosti Medin a.s., která je přímo určená pro vrtání do kostí během ortopedických zákroků. Odebrané vzorky bude potřeba dlouhodoběji uchovávat. Z analýzy rešerše [2,4,17,22] vychází jako vhodné přechovávácí médium roztok PBS. Chrupavka, jakožto biologická tkáň, bude poměrně rychle degradovat. Proto bude nutné tuto buněčnou degradaci výrazně zpomalit zchlazením nebo zamrazením vzorků. Otázkou je, jak teplota a doba skladování ovlivní mechanické vlastnosti chrupavky. Proto budou u takto skladovaných vzorků prováděny po určitých časových intervalech testy tření a výsledky budou porovnávány s výsledky pro čerstvě odebraný vzorek. Na základě výsledků budou vytipovány vhodné podmínky pro uchovávání vzorků a doba, po kterou lze vzorky skladovat.

Podstatná část experimentů v experimentální části bude probíhat na komerčním tribometru Bruker UMT TriboLab v konfiguraci pin-on-plate. Před započítím experimentů bude potřeba vyrobit do zátěžného mechanismu stroje držák na válcovitý vzorek chrupavky a dále vanu, do které se upevní třecí protikus o rozměrech 70 x 35 x 4 mm a vana se zaplní mazivem. Pro přiblížení experimentů reálným podmínkám bude potřeba mazivo vyhřívat na 37 °C.

5.3.2 Experimentální část

5.3.2

Experimentální část bude rozdělena na tři souběžné větve. První bude zaměřena na experimenty mapující vliv složení synoviální kapaliny na tření v kontaktu chrupavka-sklo. Druhá část se bude zabývat vlivem viskosuplementace na tření v kontaktu chrupavka-sklo a poslední část se bude zabývat reologickými vlastnostmi maziv používaných během experimentů mapujících tření v kontaktu.

V první části bude analyzován vliv složení synoviální kapaliny na tření v kontaktu chrupavka-sklo. K experimentům bude využít univerzální tribometr Bruker UMT Tribolab (Obr. 31) v konfiguraci pin-on-plate. Toto zařízení umožňuje v dané konfiguraci spolu s navrženými moduly reciproční pohyb při zatížení až 50 N při maximální rychlosti 15 mm/s a délce dráhy 25 mm.



Obr. 31 Bruker UMT TriboLab

Jako výchozí mazivo poslouží fyziologická a osteoartritická synoviální kapalina. Složení těchto kapalin bylo stanoveno díky spolupráci s FN Olomouc. Na základě koncentrace jednotlivých složek v modelové synoviální kapalině budou míchány roztoky obsahující jednotlivé složky v různých kombinacích. Složení modelových kapalin je uvedeno v tab. 1. Cílem fáze je analyzovat rozdíly v chování mezi fyziologickou a osteoartritickou synoviální kapalinou a vliv jednotlivých složek a jejich reakcí na tření v kontaktu.

Tab. 1 Složení modelových synoviálních kapalin

	Albumin (mg/ml)	γ -globulin (mg/ml)	Kyselina hyaluronová (mg/ml)	Fosfolipidy (mg/ml)
Fyziologická SK	20	3,6	2,5	0,15
Osteoartritická SK	24,9	6,1	1,49	0,34

V druhé části bude analyzován vliv viskosuplementace na tření v kontaktu. Bude využito stejného experimentálního zařízení a podmínek jako v první fázi. Osteoartritická synoviální kapalina bude míchána v poměru 1:1 s roztoky nativní HA s různou molekulovou hmotností a koncentrací a komerčními viskosuplementy (Tab. 2). Cílem fáze bude analyzovat vliv molekulové hmotnosti a koncentrace HA na tření v kontaktu a analyzovat rozdíly v tření u jednotlivých komerčních přípravků.

Tab. 2 Přehled viskosuplementů

Viskosuplement	Koncentrace HA (mg/ml)	Molekulová hmotnost HA (kDa)
ERECTUS	12	1 100
GENVISC GOLD	16	1 800
HYALGAN	20	500 – 730
MONOVISC	22	1 000 – 2 900
OPTIVISC SINGLE	30	3 000
OSTENIL PLUS	20	1 600
SYNVISC ONE	8	6 000

Ve třetí části se budou analyzovat reologické vlastnosti synoviálních kapalin, roztoků nativní kyseliny hyaluronové a viskosuplementů či jejich kombinací. Vzhledem k nevybavenosti a omezeným znalostem na řešitelském pracovišti bude tato část řešená ve spolupráci s divizí Tkáňového inženýrství firmy Contipro a.s. U roztoků nativní kyseliny hyaluronové a u viskosuplementů budou měřeny viskozitní křivky a viskoelastické vlastnosti, tzn. závislost viskozního a elastického

modulu pružnosti na frekvenci popř. amplitudě oscilačního pohybu. Část roztoků HA a viskosuplementů bude rovněž míchána s modelovou synoviální kapalinou a měření budou opakována. Pro měření bude využito reometrů TA Instruments (Obr. 32) AR-G2 a Discovery HR-3. Jedná se o modulární reometry, které mohou měřit v několika konfiguracích. Pro naše testy bude využito konfigurace cone-plate popř. plate-plate. Experimenty budou probíhat při teplotě 37 °C neboť teplota je jeden z klíčových parametrů ovlivňujících viskozitu. Viskozitní křivky budou měřeny pro rozsah smykových spádu 0,01 – 5 000 s⁻¹. Viscoelastické vlastnosti budou měřeny v závislosti na frekvenci oscilačního pohybu v rozsahu 0,05 – 5 Hz při aplikovaném strainu 5 % a v závislosti na amplitudě oscilačního pohybu v rozsahu 0,001 – 1,5 rad při frekvenci oscilačního pohybu 1 Hz.



Obr. 32 Reometry TA Instruments Discovery HR-3 a AR-G2

5.3.3 Zpracování a analýza dat

5.3.3

Zpracování dat z testů tření proběhne v softwaru Matlab. Z hodnot normálové a třecí síly, získaných během měření na Brukeru, bude vyhodnocován součinitel tření v závislosti na čase popř. kluzné dráze. Vzhledem k recipročnímu charakteru pohybu tribometru bude potřeba z dat odfiltrovat hodnoty součinitele tření měřené v úvratích recipročního pohybu a data budou průměrována, čímž dojde rovněž ke snížení vlivu kolísání hodnot normálové a třecí síly. Tyto nepřesnosti mohou být způsobeny nedokonalou geometrií vzorku chrupavky či špatným usazením skleněného protikusku do nerezové vany.

Z dat naměřených na reometrech budou vyhodnocovány závislosti viskozity na smykovém spádu a viskózního a elastického modulu pružnosti na frekvenci a amplitudě oscilačního pohybu. Experimenty budou vždy prováděny 3x za stejných podmínek. Z výsledných hodnot pak budou vypočítávány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Kromě průběhů křivek budou vyhodnocovány i některé další hodnoty sledovaných veličin. Důležitá bude analýza viskózního a elastického modulu pružnosti při 0,5 Hz a 2,5 Hz, což jsou frekvence, které odpovídají chůzi a běhu. Další důležitou hodnotou bude frekvence, při které dochází k tzv. crossover pointu. V tomto bodě se protínají křivky viskózního a elastického modulu

a v podstatě se mění charakter látky z viskózní na gelovou strukturu. Z průběhů hodnot viskozit bude vyhodnocován tzv. viskozitní spád, který je charakterizován jako poměr hodnot viskozity při určité vysoké a nízké hodnotě smykového spádu. Toto číslo pak charakterizuje míru poklesu viskozity v závislosti na smykovém spádu, resp. jak moc neneutonsky se kapalina chová.

Data z měření tření a reologických vlastností budou porovnáována s cílem pochopení dějů, ke kterým v kloubu při viskosuplementace dochází a nalezení korelace mezi reologickými vlastnostmi viskosuplementů a jejich efektivitou při snižování tření v kloubu.

6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

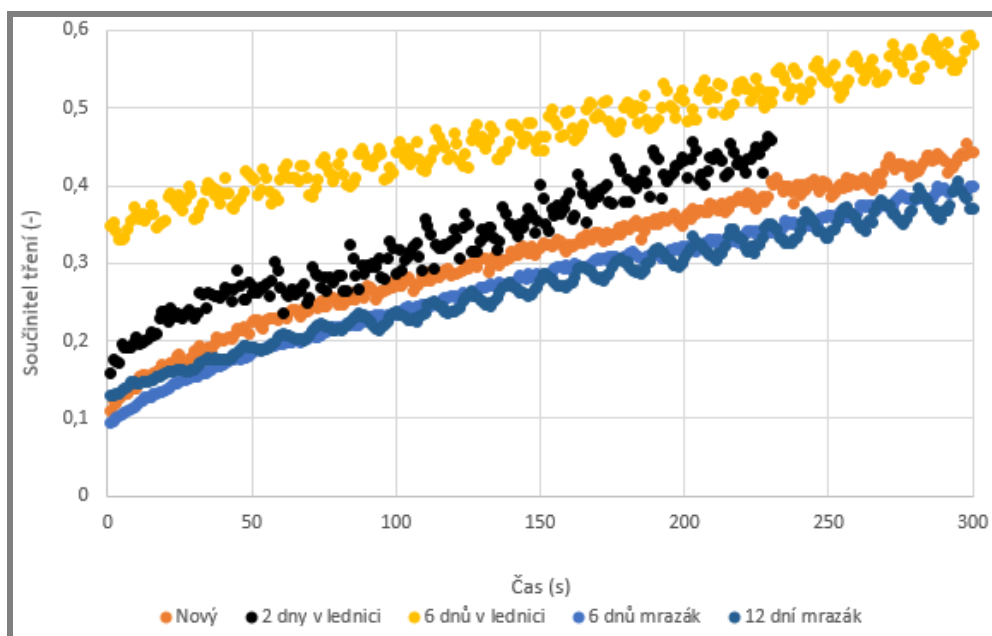
6

6.1 Metodika odběru a skladování vzorků chrupavek

6.1

Pro splnění cílů disertační práce bylo v první řadě potřeba navrhnout a experimentálně ověřit metodiku pro extrahování a uchovávání vzorků chrupavek. 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 kulovitému tvaru pak byly vzorky odebírány z kyčelních hlavic. Prasečí femury byly vždy v den porážky přivezeny z místních jatek a pomocí duté frézy byly odebrány vzorky o průměru 5,6 mm a výšce 1 cm. Z rešerše se ukázalo jako vhodné skladovací medium roztok PBS. Extrahované vzorky tedy byly uchovávány v tomto roztoku různě dlouhou dobu buďto v lednici nebo v mrazáku. Postupně pak na vzorcích byly prováděny měření tření a výsledky porovnávány s výsledkem čerstvě extrahovaného pinu.

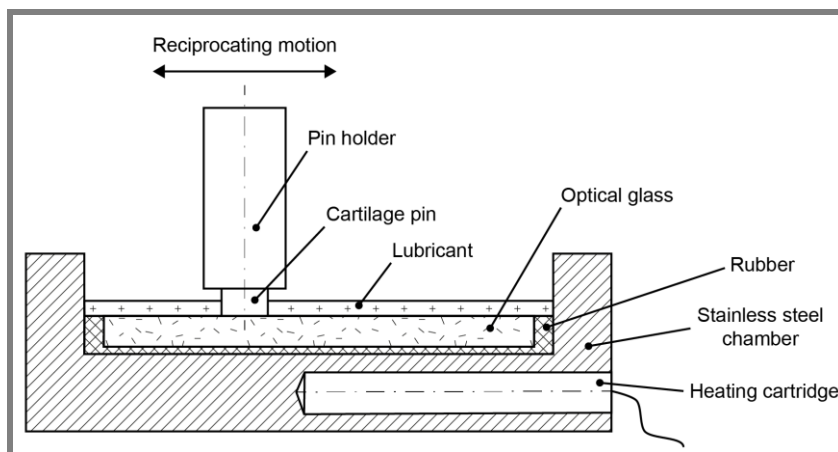
Porovnávací měření probíhaly na zařízení MTM v konfiguraci pin-on-disc při aplikovaném zatížení 5 N a kluzné rychlosti 10 mm/s. Výsledky (Obr. 33) ukázaly, že skladování vzorků v lednici při 4 °C vede už po poměrně krátké době (2 dny) k degradaci kloubní chrupavky, což je projevilo na nárůstu hodnot součinitele tření oproti měření s čerstvým pinem. Naopak skladování pinů v mrazáku při -20 °C nemělo na výsledky experimentů zásadní vliv a proto skladování pinů v roztoku PBS při -20 °C bude využíváno i během dalších etap řešení disertační práce.



Obr. 33 Závislost součinitele tření na čase u různě skladovaných vzorků chrupavek

6.2 Úvodní měření mapující vliv proteinových roztoků a HA na tření

Pro úvodní experimenty s proteinovými roztoky a HA již bylo využito tribometru Bruker UMT TriboLab v konfiguraci pin-on-plate, kdy vzorky chrupavky konají reciproční pohyb po skleněné desce (optické sklo B270). Před samotnými experimenty však bylo nutné navrhnout držák pro upevnění vzorku chrupavky do zátěžného mechanismu stroje a vyhřívanou vanu na mazivo, do které se upevní skleněná deska. Schéma měřícího zařízení lze vidět na obr. 34.

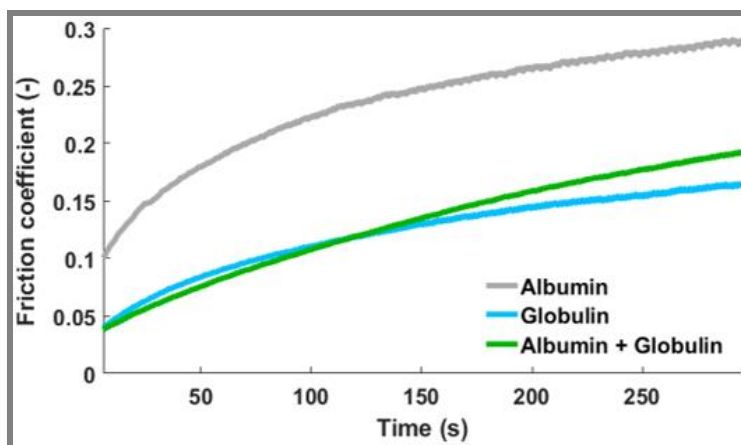


Obr. 34 Schéma měřícího zařízení

Reciproční testy proběhly při zatížení 5 N (odpovídá kontaktnímu tlaku 1 MPa), smykové rychlosti 10 mm/s a dráze pohybu 20 mm. Experimenty proběhly při teplotě 37 °C, kdy byla nerezová vana s mazivem vyhřívána pomocí topných patron.

Jako mazivo sloužily roztoky PBS obsahující proteiny albumin (24,9 mg/ml) a γ -globulin (6,1 mg/ml) či jejich kombinaci. Koncentrace proteinů vychází z osteoartrické modelové synoviální kapaliny. Tyto roztoky byly v druhé fázi smíchány v poměru 1:1 s roztokem HA o koncentraci 10 mg/ml. Tato koncentrace byla zvolena na základě analýzy komerčních viskosuplementů. Cílem měření bylo analyzovat vliv jednotlivých proteinů na tření a jejich reakci s viskosuplementem (HA).

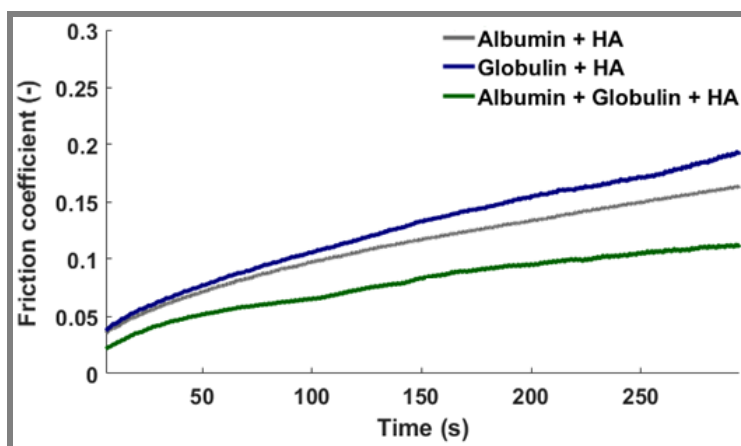
Výsledky měření s proteinovými roztoky lze vidět na obr. 35. Roztok γ -globulinu vykazuje nižší tření i navzdory nižší koncentraci v roztoku. Počáteční hodnota součinitele tření je 0,04, což je méně než poloviční hodnota oproti výsledkům měření s albuminem. Na konci měření je tento trend velmi podobný. Hodnoty součinitel tření jsou 0,14 pro albumin a 0,28 pro γ -globulin. γ -globulin vykazuje výrazné hydrofobní chování a z roztoku adsorbuje na povrch chrupavky celkem snadno. Vazby mezi proteinem a základním tělesem jsou navíc poměrně silné, tudíž nedochází téměř k žádné desorpci. Albumin má přesně opačné vlastnosti, vyznačuje se hydrofilními vlastnostmi. Na povrchu chrupavky vytváří vrstvy s nízkou smykovou odolností a poměrně snadno může docházet k jeho desorpci. Při adsorpci obou proteinů ze společného roztoku dochází na povrchu chrupavky nejdříve k vytvoření tenké vrstvy γ -globulinu. Hodnoty součinitel tření jsou tedy na počátku experimentu velmi podobné roztoku γ -globulinu. Na vrstvu γ -globulinu adsorbuje albumin, což se ve výsledcích projevilo růstem hodnot součinitele tření.



Obr. 35 Závislost součinitele tření na čase u proteinových roztoků

Na obr. 36 jsou vidět výsledky měření s proteinovými roztoky smíchanými s HA. Nejvyšší hodnoty součinitele tření jsou obdrženy pro roztok γ -globulinu. Hodnoty tření jsou dokonce vyšší než u jednoduchého proteinového roztoku. Naopak u albuminu došlo k výraznému poklesu tření, kdy hodnota součinitele tření po 300 s testu poklesla z 0,3 na 0,15. Reakce těchto dvou látek je tedy z hlediska tření chrupavky synergická. U roztoku obou proteinů není poklesu tření tak výrazný jako u albuminu. Tento efekt je pravděpodobně způsoben γ -globulinem a jeho reakcí s HA.

Výsledky této části měření byly v květnu 2018 prezentovány na konferenci 24th International Conference Engineering Mechanics 2018 ve Svatce [32].



Obr. 36 Závislost součinitele tření na čase u roztoků proteinů a HA

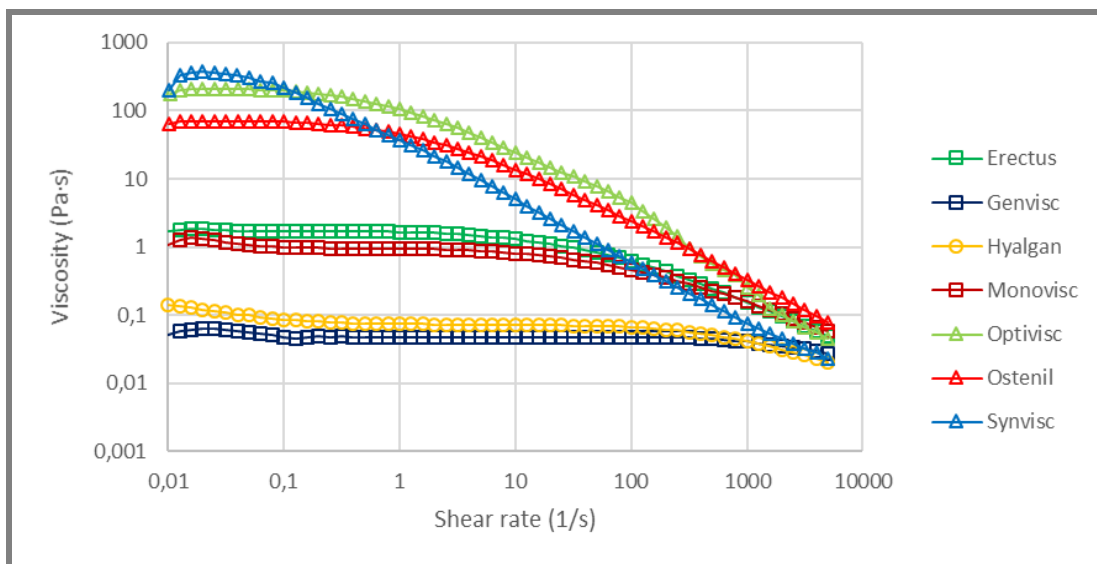
6.3 Analýza reologie maziv

6.3

V rámci řešení disertační práce byla absolvována 4 týdenní stáž ve firmě Contipro a.s., se kterou naše výzkumná skupina v současné době navazuje dlouhodobou spolupráci. Cílem stáže byla analýza reologických vlastností roztoků nativní kyseliny hyaluronové a komerčních viskosuplementů před a po smíchání s modelovou synoviální kapalinou. Tato modelová kapalina svým složením odpovídá osteoartrické synoviální kapalině. Byly naměřeny viskozitní křivky a viskoelastické vlastnosti celkem 7 roztoků nativní kyseliny hyaluronové s molekulou hmotností

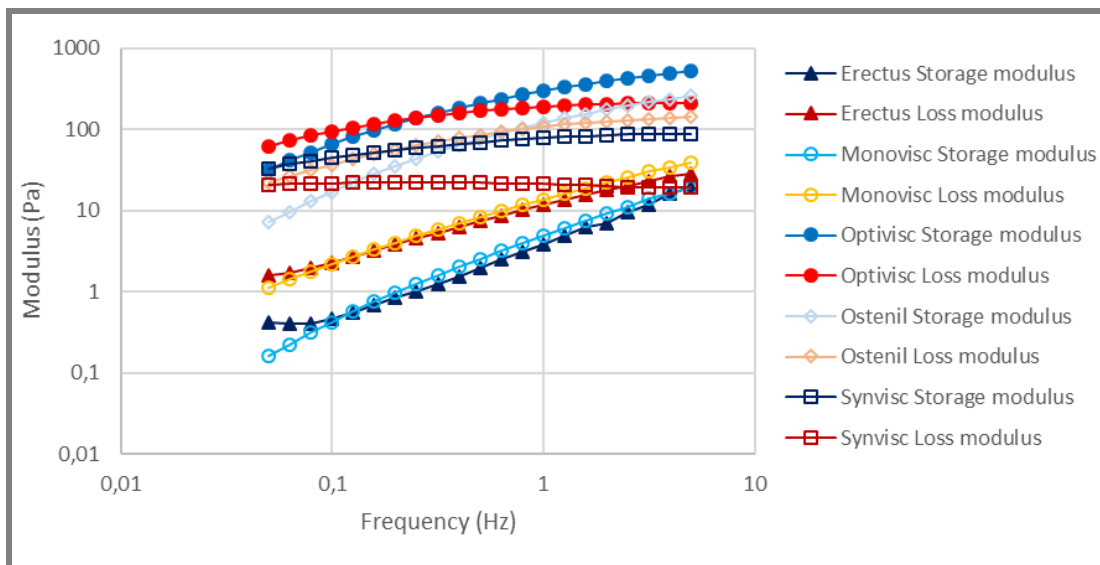
v rozsahu 77 – 2 010 kDa a s různými koncentracemi. Na základě průzkumu trhu bylo vytipováno 7 komerčních viskosuplementů tak, aby bylo molekulovou hmotností a koncentrací obsažené HA pokryto celé spektrum trhu. U těchto viskosuplementů rovněž proběhla analýza viskozit a viskoelastických vlastností. Na základě těchto měření bylo vytipováno několik roztoků nativní HA a viskosuplementů, které byly v další fázi experimentů smíchány v poměru 1:1 s modelovou synoviální kapalinou a měření byly zopakovány.

Na obr. 37 lze vidět výsledky měření viskozitních křivek komerčně dostupných viskosuplementů. Všechny preparáty se vyznačují pseudoplastickým chováním a podle výsledků v grafu je lze v zásadě rozdělit do 3 skupin na viskosuplementy s vysokou, střední a nízkou viskozitou. Do první skupiny patří Synvisc (viskozita při 1 s^{-1} – $36,6 \pm 2,2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), Optivisc (viskozita při 1 s^{-1} – $102,5 \pm 3,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) a Ostenil (viskozita při 1 s^{-1} – $45 \pm 0,9 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). Do druhé skupiny patří Monovisc (viskozita při 1 s^{-1} – $1 \pm 0,08 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) a Erectus (viskozita při 1 s^{-1} – $1,5 \pm 0,15 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). Do třetí skupiny patří Hyalgan (viskozita při 1 s^{-1} – $0,07 \pm 0,002 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) a Genvisc (viskozita při 1 s^{-1} – $0,05 \pm 0,0003 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).



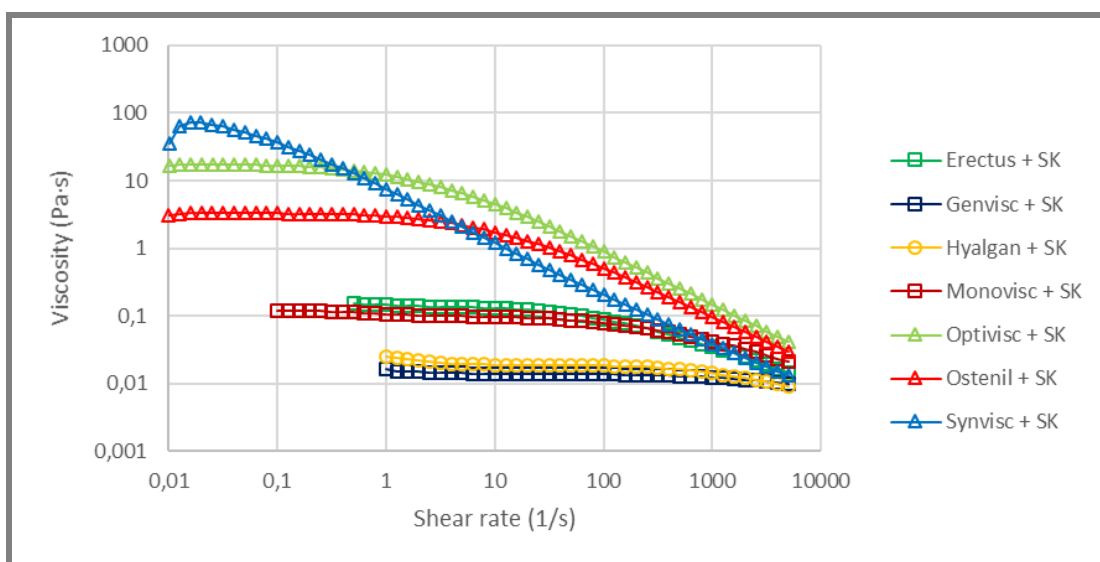
Obr. 37 Viskozitní křivky komerčně dostupných viskosuplementů

Na obr. 38 jsou uvedeny výsledky měření viskoelastických vlastností komerčních viskosuplementů. Oproti měření viskozit zde chybí výsledky měření pro Genvisc a Hyalgan. U těchto viskosuplementů se viskoelastické vlastnosti nepodařilo naměřit (záporný elastický modul pružnosti). Ve výsledcích lze napříč viskosuplementy nalézt všechny tři možné případy výsledků, které mohou nastat. Vyskytují se zde viskosuplementy, které mají v celém rozsahu frekvence pohybu viskózní modul vyšší než elastický – Monovisc a Erectus. Na druhou stranu je tu Synvisc, který má elastický modul vždy vyšší než viskózní. Za všech podmínek si tedy udržuje charakter tuhého gelu. Posledním případem jsou viskosuplementy, u kterých dochází ke crossover pointu – Optivisc a Ostenil. U Optiviscu nastává crossover point při $0,27 \pm 0,013 \text{ Hz}$ a moduly mají hodnotu $134,24 \pm 6,63 \text{ Pa}$. U Ostenilu je crossover point při $0,7 \pm 0,009 \text{ Hz}$ a moduly mají hodnotu $97,7 \pm 0,29 \text{ Pa}$.



Obr. 38 Viskoelastické vlastnosti komerčních viskosuplementů

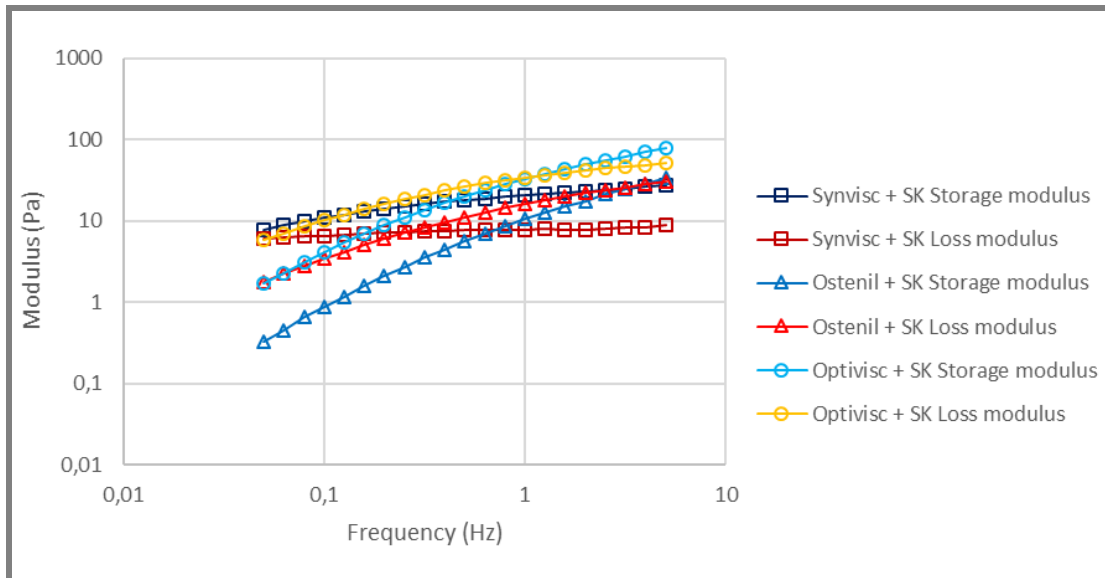
V druhé části měření byly komerční viskosuplementy míchaný s modelovou synoviální kapalinou. Výsledky měření viskozitních křivek lze vidět na obr. 39. Stejně jako u čistých viskosuplementů zůstává jejich rozdělení do 3 skupin podle viskozit. Pouze vlivem naředění viskosuplementu roztokem PBS ze synoviální kapaliny dochází k poklesu hodnot viskozit. Viskozity smíchaných roztoků při smykovém spádu 1 s^{-1} jsou – $13,8 \pm 1,2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Optivisc); $7,8 \pm 1,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Synvisc); $3,1 \pm 0,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Ostenil); $0,13 \pm 0,007 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Erectus); $0,1 \pm 0,007$ (Monovisc); $0,037 \pm 0,16 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Hyalgan) a $0,02 \pm 0,004 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (Genvisc). U méně viskózních látek nejsou viskozity při nízkých smykových spádech uváděny z důvodu velkého rozptylu dat, který je pravděpodobně způsoben limity dané metodikou měření.



Obr. 39 Viskozitní křivky roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu

U tří nejvíce viskózních roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu byly naměřeny viskoelastické vlastnosti. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 40.

Roztoky si zachovaly základní vlastnosti podle viskosuplementů, ze kterých jsou umíchány. U Synviscu stále elastický modul převyšuje viskózní modul pružnosti a u roztoků obsahující Ostenil a Optivisc dochází ke crossover pointu. U roztoku Optiviscu nastává při $1,17 \pm 0,03$ Hz a moduly mají hodnotu $35,65 \pm 0,32$ Pa. U Ostenilu je crossover point při $3,96 \pm 0,24$ Hz a moduly mají hodnotu $28,57 \pm 0,73$ Pa.



Obr. 40 Viskoelastické vlastnosti roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu

Výsledky ukazují, že vyšší koncentrace a molekulová hmotnost HA vede k vyšším viskozitám a lepším viskoelastickým vlastnostem roztoku před i po smíchání s modelovou synoviální tekutinou. Smíchání s modelovou SK vede k rozředění HA roztokem PBS a další složky jako proteiny pravděpodobně nemají na reologii vliv. Většina roztoků HA má napříč analyzovaným spektrem viskózní povahu, pouze u 2 % HA s nejvyšší molekulovou hmotností se podařilo naměřit crossover point, kdy se charakter látky mění z viskózní na gelovou. Nejlepší reologické vlastnosti byly naměřeny pro viskosuplementy Optivisc, Ostenil a Synvisc, které obsahují HA s vysokou koncentrací nebo molekulovou hmotností. U Optiviscu a Ostenilu se podařilo naměřit crossover pointy jak pro čisté, tak i pro smíchané roztoky. Synvisc si vždy zachovával charakter gelu. Tyto tři viskosuplementy se tedy zdají z hlediska vylepšování reologických vlastností synoviální kapaliny jako nejlepší volba. Překvapivé byly výsledky Genviscu, u kterého výrobce udává obsah 1,6 % HA s MW 1 800 kDa. Výsledky se však ze všeho nejvíce blíží Hyalganu, který obsahuje 1 % HA s MW 500 – 730 kDa. Výsledky měření reologických vlastností budou porovnány s výsledky měření tření s totožnými roztoky s cílem nalézt korelaci mezi reologickými vlastnostmi viskosuplementů a jejich vlivem na tření v kontaktu chrupavek. Výsledky stáže a následná měření na Ústavu konstruování povedou nejméně na jednu společnou publikaci.

7 ZÁVĚR

Toto pojednání k státní doktorské zkoušce shrnuje současné poznatky v oblasti tření kloubní chrupavky a reologických vlastností synoviální kapaliny a viskosuplementů. Viskosuplementy se mimo jiné využívají u pacientů trpících osteoartrózou k obnově reologických vlastností synoviální kapaliny a snížení tření v kontaktu opotřebených osteoartritických chrupavek. Na základě analýzy poznatků získaných z rešeršní části práce jsou vydefinovány cíle disertační práce, je položena vědecká otázka a navržena pracovní hypotéza. V další části je navržen metodický postup řešení práce, který je založen na experimentální části rozdělené do tří souběžných větví zabývajících se vlivem složení synoviální kapaliny na tření, vlivem viskosuplementace na tření a analýzou reologických vlastností synoviální kapaliny a viskosuplementů. V poslední části jsou shrnuty dosavadní výsledky řešení disertační práce, přičemž se již podařilo zvládnout přípravnou fázi, byly provedeny úvodní experimenty mapující vliv proteinů na tření a díky stáži ve společnosti Contipro a.s. byla provedena analýza reologických vlastností nativní HA a komerčních viskosuplementů. Při řešení práce tedy již byly splněny některé dílčí cíle práce, čímž byl položen základ pro úspěšné vyřešení disertační práce.

8 LITERATURA

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] KATTA, Jayanth, Zhongmin JIN, Eileen INGHAM a John FISHER. *Biotribology of articular cartilage—A review of the recent advances*. 2008, **30**(10), 1349-1363. DOI: 10.1016/j.medengphy.2008.09.004. ISSN 13504533.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] TEHRANZADEH, J., F. BOOYA a J. ROOT. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid: a review. *Acta Radiologica*. 2016, **46**(3), 288-296. DOI: 10.1080/02841850510016027. ISSN 0284-1851.
- [7] BHOSALE, A. M. a J. B. RICHARDSON. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*. 2008, **87**(1), 77-95. DOI: 10.1093/bmb/ldn025. ISSN 0007-1420.
- [8] ŽABKA, M. Viskosuplementácia v liečbe osteoartrózy kolena. *Farmakoterapia*. 2014, 4(1), 46-50.
- [9] 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.
- [10] 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. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012, **20**(11), 1336-1346. DOI: 10.1016/j.joca.2012.07.004. ISSN 10634584.
- [11] LEGRÉ-BOYER, V. *Viscosupplementation: Techniques, indications, results*. 2015, **101**(1), S101-S108. DOI: 10.1016/j.otsr.2014.07.027. ISSN 18770568.
- [12] BALAZS, E. A., J. E. DENLINGER. Viscosupplementation : A new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology*. 1993, **20**, 3-9.
- [13] 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.
- [14] 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, Part J: Journal of Engineering Tribology*. 2007, **221**(3), 237-245. DOI: 10.1243/13506501JET245. ISSN 1350-6501.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] MURAKAMI, T, K NAKASHIMA, Y SAWAE, N SAKAI a N HOSODA. Roles of adsorbed film and gel layer in hydration lubrication for articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*. 2009, **223**(3), 287-295. DOI: 10.1243/13506501JET536. ISSN 1350-6501.
- [19] CHERNIAKOVA, Yu M a L S PINCHUK. Tribological aspects of joint intraarticular therapy. *Acta of bioengineering and biomechanics*. 2011, **13**(1), 57. ISSN 1509-409X.
- [20] KWIECINSKI, J. J., S. G. DOROSZ, T. E. LUDWIG, S. ABUBACKER, M. K. COWMAN a T. A. SCHMIDT. The effect of molecular weight on hyaluronan's cartilage boundary lubricating ability – alone and in combination with proteoglycan 4. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011, **19**(11), 1356-1362. DOI: 10.1016/j.joca.2011.07.019. ISSN 10634584.
- [21] MURAKAMI, T, K NAKASHIMA, S YARIMITSU, Y SAWAE a N SAKAI. Effectiveness of adsorbed film and gel layer in hydration lubrication as adaptive multimode lubrication mechanism for articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*. 2011, **225**(12), 1174-1185. DOI: 10.1177/1350650111415756. ISSN 1350-6501.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.

- [25] MAZZUCCO, Dan, Gareth MCKINLEY, Richard D. SCOTT a Myron SPECTOR. Rheology of joint fluid in total knee arthroplasty patients. *Journal of Orthopaedic Research*. 2002, **20**(6), 1157-1163. DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00050-5. ISSN 0736-0266.
- [26] 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.
- [27] BHUANANTANONDH, P., D. GRECOV a E. KWOK. Rheological Study of viscosupplements and Synovial Fluid in Patients with Osteoarthritis. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2012, **32**(1), 12-16. DOI: 10.5405/jmbe.834. ISSN 1609-0985.
- [28] BHUANANTANONDH, Petcharatana, Dana GRECOV, Ezra KWOK a Pierre GUY. Rheology of osteoarthritic synovial fluid mixed with viscosupplements: A pilot study. *Biomedical Engineering Letters*. 2011, **1**(4), 213-219. DOI: 10.1007/s13534-011-0034-7. ISSN 2093-9868.
- [29] 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), 5965-5973. DOI: 10.1039/C4SM00716F. ISSN 1744-683X.
- [30] 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, **220**(1), 23-31. DOI: 10.1243/095441105X69060. ISSN 0954-4119.
- [31] 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.
- [32] REBENDA, D., P. ČÍPEK, D. NEČAS, M.VRBK A M. HARTL. Effect of hyaluronic acid on friction of articular cartilage. In: *ENGINEERING MECHANICS 2018*. Praha: Institute of Theoretical and Applied Mechanics of the Czech Academy of Sciences, 2018, s. 709-712. DOI: 10.21495/91-8-709. ISBN 978-80-86246-88-8. ISSN 1805-8248.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura kloubní chrupavky [5]	7
Obr. 2 Hodnoty součinitele tření roztoků HA a fosfolipidů [9]	11
Obr. 3 Řez chrupavkou s fluorescenčně označenou HA [9]	11
Obr. 4 Složení testovaných roztoků [14]	12
Obr. 5 Vývoj součinitele tření proteinových roztoků [14]	13
Obr. 6 Vliv proteinových roztoků na tření za podmínek smíšeného mazání [14]	14
Obr. 7 Hodnoty statického a dynamického součinitele tření HA, PRG4 a SAPL [15]	15
Obr. 8 Složení testovaných roztoků [16]	16
Obr. 9 Počty částic adsorbovaných z jednotlivých roztoků [16]	16
Obr. 10 Hodnoty tření osteoartritických chrupavek v konfiguraci a) chrupavka-chrupavka (MCA), b) chrupavka - sklo (SCA) [17]	18
Obr. 11 Vývoj součinitele tření jednoduchých proteinových roztoků [18]	19
Obr. 12 Rozdíly ve vývoji tření u chrupavky s a bez gelové vrstvy [18]	19
Obr. 13 Přehled testovaných léčiv [19]	20
Obr. 14 Vývoj součinitele tření jednotlivých léčiv: 1 - hydrokortizon, 2 - Kenalog-40, 3 - Diprospan, 4 - linkomycin, 5 - Synvisc, 6 - Hyalgan, 7 - SK+sérum, 8 - hydrokortizon+sérum, 9 - chondrozamin [19]	21
Obr. 15 Závislost součinitele tření na molekulové hmotnosti HA [20]	22
Obr. 16 Hodnoty součinitele tření roztoku proteoglykanů a HA s různou molekulovou hmotností [20]	23
Obr. 17 Průběhy součinitele tření roztoku HA smíchaného s proteiny [21]	24
Obr. 18 Hodnoty součinitele tření pro chrupavky s různým stupněm poškození [22]	25
Obr. 19 Vývoj součinitele tření jednoduchých roztoků [23]	27
Obr. 20 Hodnoty součinitele tření roztoku HA a fosfolipidů s různými proteiny [23]	27
Obr. 21 Hodnoty viskozit naměřené pro jednotlivé roztoky [25]	30
Obr. 22 Viskoelastické vlastnosti analyzovaných roztoků [25]	30
Obr. 23 Viskoelastické vlastnosti lineární a síťované HA [26]	32
Obr. 24 Viskozity roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [26]	32
Obr. 25 Závislost viskozity na smykovém spádu roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [27]	34
Obr. 26 Viskoelastické vlastnosti roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu [27]	34
Obr. 27 Viskozity viskosuplementů [28]	36
Obr. 28 Měření viskoelastických vlastností viskosuplementů [28]	36
Obr. 29 Výsledky měření viskozit kyseliny hyaluronové a modelové synoviální kapaliny [29]	37
Obr. 30 Schéma řešení disertační práce	44
Obr. 31 Bruker UMT TriboLab	45
Obr. 32 Reometry TA Instruments Discovery HR-3 a AR-G2	47
Obr. 33 Závislost součinitele tření na čase u různě skladovaných vzorků chrupavek	49
Obr. 34 Schéma měřicího zařízení	50
Obr. 35 Závislost součinitele tření na čase u proteinových roztoků	51

Obr. 36	Závislost součinitele tření na čase u roztoků proteinů a HA	51
Obr. 37	Viskozitní křivky komerčně dostupných viskosuplementů	52
Obr. 38	Viskoelastické vlastnosti komerčních viskosuplementů	53
Obr. 39	Viskozitní křivky roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu	53
Obr. 40	Viskoelastické vlastnosti roztoků synoviální kapaliny a viskosuplementu	54

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Složení modelových synoviálních kapalin	46
Tab. 2 Přehled viskosuplementů	46

