

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie

**Biochemická analýza kloubních výpotků**

*Diplomová práce*

Autor:	Bc. Klára Habartová
Studijní program:	N1407 – Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 14. 5. 2015

.....

Podpis

Ráda bych upřímně poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Adéle Galandákové, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady a připomínky, ochotu a trpělivost při zpracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Panu Prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D., přednostovi Ortopedické kliniky FN OL děkuji za odběr biologického materiálu. Děkuji i Mgr. Kateřině Langové, Ph.D. z Ústavu lékařské biofyziky za statistické zpracování dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině za psychickou podporu při sepisování diplomové práce.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů IGA MZ ČR NT 14267-3/2013, RVO 61989592 a LO 1304.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Klára Habartová
Název práce:	Biochemická analýza kloubních výpotků
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015

### Abstrakt:

Studium opotřebení totálních endoprotéz (TEP) před jejich implantací do lidského těla se stalo povinnou součástí preklinického testování. Důvodem je zejména uvolňování částic polyethylenu vlivem tření z komponent kloubních náhrad. Uvolněné částice jsou častou příčinou aseptického uvolňování a periprotetické osteolýzy.

Testování otěru a odolnosti TEP se řídí mezinárodními normami ISO (ISO 14243-3:2014 a ISO 14242-1:2014), ve kterých je mimo jiné jako mazací kapalina doporučeno bovinní sérum, které má nahrazovat synoviální tekutinu (ST). V poslední době je používání bovinního sérum často kritizováno. Nedávné studie poukazují na skutečnost, že bovinní sérum se od ST liší kromě koncentrace proteinů také obsahem ostatních složek. Cílem diplomové práce bylo stanovit celkovou koncentraci proteinů a jednotlivých proteinových frakcí, a celkovou koncentraci kyseliny hyaluronové a její molekulovou distribuci v kloubních výpotcích (KV) získaných od čtyř skupin pacientů: *i*) s asepticky selhávající TEP kolenního kloubu (n = 25), *ii*) s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprotetické osteolýzy (n = 17), *iii*) bez TEP a s posledním stádiem osteoartrózy (n = 31) a *iv*) bez TEP, bez osteoartrózy a bez známek zánětu (n = 17).

Výsledky ukázaly, že celková koncentrace proteinů v KV dosahuje 40 mg/ml, což je přibližně 2x vyšší než koncentrace BS doporučená normami ISO. Z proteinových frakcí byly ve všech KV nejvíce zastoupeny albumin a  $\gamma$ -globulin, ostatní proteinové frakce se pohybovaly v rozmezí 1,8-6,1 mg/ml. Dále bylo zjištěno, že celková

koncentrace kyseliny hyaluronové v KV se pohybuje v rozmezí 1,7-5,7 mg/ml. U molekulové distribuce kyseliny hyaluronové byla pozorována nižší koncentrace všech frakcí u pacientů s TEP v porovnání s pacienty bez TEP.

Z výsledků vyplývá, že BS, které je v současné době doporučováno normami ISO jako mazací kapalina při testování odolnosti TEP, by bylo vhodné nahradit jinou mazací kapalinou, která by se svým složením více přiblížila složení KV.

Klíčová slova:	synoviální tekutina, osteoartróza, totální endoprotéza, kyseliny hyaluronové, plazmatické proteiny
Počet stran:	80
Počet příloh:	0
Jazyk:	Čeština

## Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Bc. Klára Habartová
Title:	Biochemical analysis of synovial fluid
Type of thesis:	Master
Department:	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Czech Republic
Advisor:	Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
The year of presentation:	2015

### Abstract:

Wear testing of total joint replacement (TJR) is a mandatory part of preclinical testing prior to implantation of TJR into the human body. This is mainly due to the release of polyethylene particles from the components of joint replacements. The particles are a common cause of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis.

Testing the abrasion and resistance of TJR is governed by International standards (ISO 14243-3:2014 and ISO 14242-1:2014), in which is as a lubricating fluid recommended bovine serum, which is designed to replace synovial fluid. Recently, the use of bovine serum is often criticized. Recent studies point to the fact that the bovine serum differs from synovial fluid except for the protein concentration also in other components. The aim of this thesis was to determine the total protein concentration and the individual protein fractions, and the total concentration of hyaluronic acid and its molecular distribution in synovial fluid obtained from patients that were divided into four groups: *i*) patients with aseptic loosening joint (n = 25), *ii*) patients with TJR without aseptic loosening joint and without periprosthetic osteolysis (n = 17), *iii*) patients without TJR and with osteoarthritis (n = 31), and *iv*) patients without TJR and without osteoarthritis, non-inflammatory (n = 17).

The results showed that total protein concentration reaches 40 mg/ml, which is nearly two times higher than the recommended concentration in bovine serum by ISO

standards. From the protein fractions albumin and  $\gamma$ -globulin were most abundant in all synovial fluid samples, other protein fractions ranged from 1.8 to 6.1 mg/ml. It was further found that the total concentration of hyaluronic acid in the synovial fluid ranged from 1.7 to 5.7 mg/ml. Concerning the molecular distribution of the hyaluronic acid it was observed lower concentrations of all fractions in patients with TJR compared to patients without TJR.

Conclusion the results reveal that the bovine serum currently recommended by ISO standards as a lubricating fluid for testing resistance TJR would be appropriate to replace by another lubricating liquid, with composition closer to that of synovial fluid.

Keywords:	synovial fluid, osteoarthritis, total knee replacement, hyaluronic acid, plasma proteins
Number of pages:	80
Number of appendixes:	0
Language:	Czech

## Seznam zkratek

BMI	body mass index
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GIT	gastrointestinální trakt
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor
IL	interleukiny
ISO	International Organization for Standardization
KH	kyselina hyaluronová
KV	kloubní výpotek
m.	sval (musculus)
MMP	metaloproteinázy
NSA	nesteroidní antirevmatika
OA	osteoartróza
PBS	fosfátový pufr
PRG-4	proteoglykan 4
RTG	rentgen
ST	synoviální tekutina
TEP	totální endoprotéza
TJR	total joint replacement
TGF- $\beta_1$	transformující růstový faktor
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan



# Obsah

1. Úvod.....	11
2. Teoretická část .....	12
2.1. Kolenní kloub (articulatio genus).....	12
2.1.1. Artikulující kosti .....	12
2.1.1.1. Stehenní kost (femur) .....	13
2.1.1.2. Holenní kost (tibia).....	13
2.1.1.3. Čěška (patella) .....	14
2.1.2. Vazivový aparát .....	15
2.1.2.1. Kloubní pouzdro .....	15
2.1.2.2. Kloubní chrupavka (cartilago articularis).....	16
2.1.2.3. Menisky .....	17
2.1.2.4. Vazy.....	18
2.1.3. Kolemkloubní svaly .....	19
2.1.4. Synoviální tekutina .....	19
2.1.4.1. Složení synoviální tekutiny .....	20
2.1.4.2. Vyšetření kloubního výpotku .....	21
2.2. Onemocnění kloubů .....	25
2.2.1. Osteoartróza .....	25
2.2.1.1. Etiopatogeneze .....	25
2.2.1.2. Diagnostika.....	27
2.2.1.3. Klasifikace .....	30
2.3. Terapie kloubních onemocnění .....	30
2.3.1. Režimová opatření .....	31
2.3.2. Rehabilitace a fyzioterapie.....	32
2.3.2.1. Pohybová terapie .....	32
2.3.2.2. Fyzikální terapie (fyziatrie) .....	32
2.3.3. Farmakologická terapie.....	33
2.3.3.1. Nesteroidní antirevmatika .....	33
2.3.3.2. SYSADOA (chondroprotektiva) .....	37
2.3.3.3. Kortikosteroidy .....	39
2.3.4. Operační léčba .....	42
2.3.4.1. Výkony prováděné mimo kloub .....	42
2.3.4.2. Výkony zachovávající postižený kloub.....	44

2.3.4.3.	Výkony, při nichž se postižený kloub odstraňuje.....	45
3.	Cíle práce .....	56
4.	Experimentální část.....	57
4.1.	Biologický materiál.....	57
4.1.1.	Zpracování kloubního výpotku.....	57
4.2.	Chemikálie, roztoky, přístroje a spotřební materiál .....	57
4.2.1.	Chemikálie .....	57
4.2.2.	Roztoky.....	58
4.2.2.1.	Stanovení proteinových frakcí.....	58
4.2.2.2.	Stanovení molekulové distribuce kyseliny hyaluronové.....	58
4.2.3.	Přístroje.....	59
4.2.4.	Spotřební materiál.....	59
4.3.	Metody .....	60
4.3.1.	Stanovení celkových proteinů.....	60
4.3.2.	Stanovení proteinových frakcí .....	60
4.3.3.	Stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové.....	61
4.3.4.	Stanovení molekulové distribuce kyseliny hyaluronové .....	61
4.3.5.	Statistické vyhodnocení .....	62
5.	Výsledky .....	64
5.1.	Stanovení celkových proteinů a proteinových frakcí.....	64
5.2.	Stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové a její molekulová distribuce ....	67
6.	Diskuze .....	73
7.	Závěr .....	76
8.	Použitá literatura .....	77

# 1. Úvod

Totální endoprotéza kolenního kloubu je často využívána při léčbě posledního stádia osteoartrózy. Pacientům poskytuje úlevu od bolesti a dochází k obnově funkce postiženého kloubu, čímž se zvyšuje kvalita jejich života. Během posledních desetiletí se však značně změnila skupina pacientů, kterým je tento zákrok indikován. Většina pacientů má až o 20% větší BMI, je fyzicky aktivnější a je u nich očekáváno prodloužení délky života až o 25%. Všechny tyto faktory vyvolávají potřebu odolnějších materiálů, které by mohly být využity na výrobu TEP, protože současné moderní náhrady mají životnost přibližně 15 let. Tato doba bývá často zkrácena kvůli komplikacím, které mohou nastat. Jedná se především o aseptické uvolňování a periprotetickou osteolýzu, na jejichž vzniku se mimo jiné podílejí částice polyethylenu, které se postupem času vlivem tření uvolňují z komponent TEP. Tyto komplikace jsou často spojeny s časově náročnými reoperacemi zatěžujícími jak pacienta, tak zdravotnický systém.

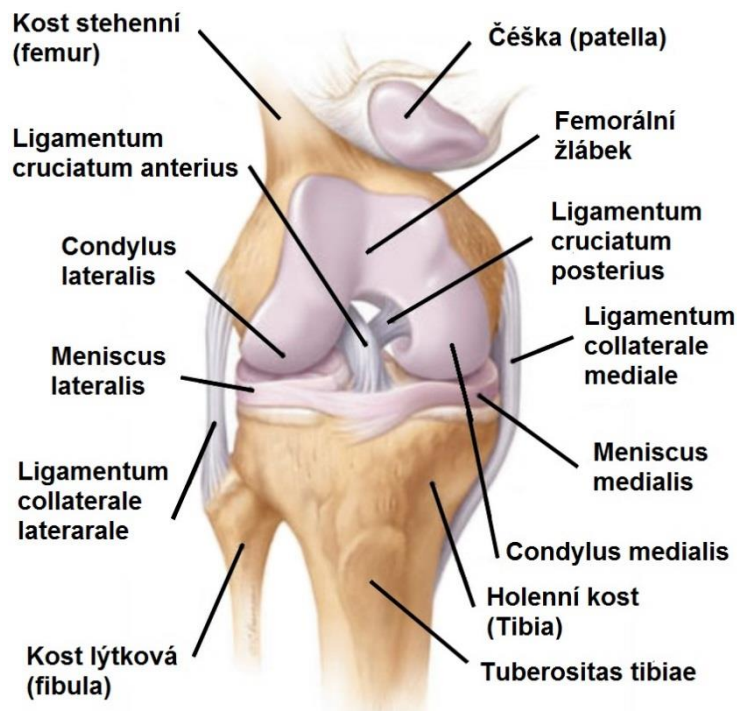
Všechny nové materiály jsou proto před implantací do lidského těla testovány na kloubních simulátorech, kde se zjišťuje odolnost, otěr a rychlost jejich opotřebení. Hlavně z etických důvodů však v simulátorech nemůže být použit kloubní výpotek (KV) získaný od pacientů. Mezinárodní normy ISO doporučují jako mazací kapalinu pro *in vitro* testy bovinní sérum, které má nahradit KV. Dřívější biotribologické studie sice ukázaly, že při použití bovinního séra jsou simulovány *in vitro* podmínky, za kterých byly na testovaných implantátech nalezeny podobné charakteristiky opotřebení, jaké byly nalezeny na implantátech získaných při reoperacích, ale poslední klinické studie došly k jiným závěrům. Bylo zjištěno, že bovinní sérum se svým složením od KV značně liší. Obsahuje vyšší koncentraci celkových proteinů, jiné zastoupení jednotlivých proteinových frakcí a neobsahuje některé látky, které jsou pro KV charakteristické. Výsledky biotribologických testů provedených s materiály tedy ne zcela odpovídají, výsledkům dosaženým po implantaci TEP. Z tohoto důvodu vznikla potřeba nalezení nové mazací tekutiny, která by se svým složením více podobala KV pacientů s TEP, a tudíž lépe simulovala podmínky, kterým jsou materiály vystaveny uvnitř lidského těla.

Cílem diplomové práce bylo porovnat složení KV odebraných od čtyř skupin pacientů. Práce byla zaměřena na celkovou koncentraci proteinů a jednotlivých proteinových frakcí a celkovou koncentraci kyseliny hyaluronové a zastoupení různých molekulových hmotností kyseliny hyaluronové v KV.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Kolenní kloub (articulatio genus)

Kolenní kloub (obr. 1) je složený kloub s velmi komplikovanou stavbou. Artikulují zde spolu dvě nejdelší kosti lidského těla, takže síly, které zde působí, jsou značné. Stabilita kloubu je zajištěna především mohutným vazivovým aparátem a silnými kolemkloubními svaly, které se zde upínají nebo začínají. Tvar kloubních ploch se na jeho stabilitě podílí minimálně. Složitá stavba kloubních vazů a značný rozsah pohybů spolu s extrémními nároky kladenými na kloub jsou příčinou toho, že k poraněním vazivového aparátu kolenního kloubu dochází velmi často <sup>1</sup>.



Obr. 1: Kolenní kloub <sup>2</sup>

#### 2.1.1. Artikulující kosti

Artikulujícími kostmi v kolenním kloubu jsou kost stehenní (femur), kost holenní (tibia) a češka (patella), které mezi sebou vytváří kloub femoropatelní a kloub femorotibiální. Celkový rozsah kloubních ploch je mnohem větší než u ostatních velkých kloubů.

Osy diafýzy stehenní a holenní kosti svírají ve frontální rovině tupý úhel otevřený zevně. Jeho velikost se pohybuje kolem 174°. Pokud je úhel výrazně větší vzniká genu

varum (nohy do O), výrazně menší úhel má za následek genu valgum (nohy do X). Osa diafýzy stehenní kosti se nazývá anatomická osa. Spojnice středu hlavice stehenní kosti s eminentia intercondylaris tibiae tvoří tzv. mechanickou osu. Anatomická a mechanická osa spolu svírají úhel přibližně o velikosti 6°. Jeho velikost se mění v závislosti na velikosti kolodiafyzárního úhlu proximální stehenní kosti, kterému je třeba věnovat pozornost při implantaci totální endoprotézy (TEP) kolenního kloubu <sup>1</sup>.

#### **2.1.1.1. Stehenní kost (femur)**

Stehenní kost je nejdelší a nejmohutnější rourovitou kostí v lidském těle. V sagitární rovině je mírně prohnutý vpřed. Proximální konec stehenní kosti (hlavice), má tvar koule, v jejímž zadním dolním kvadrantu je různě hluboká trojboká jamka. Hlavice se pomocí oploštěného krčku připojuje k tělu kosti, které bez zřetelné hranice přechází do distálního konce kosti. Distální konec stehenní kosti je rozšířený v příčném i předozadním směru a vybíhá ve dva kloubní hrboly (mediální a laterální kondyl) <sup>3</sup>.

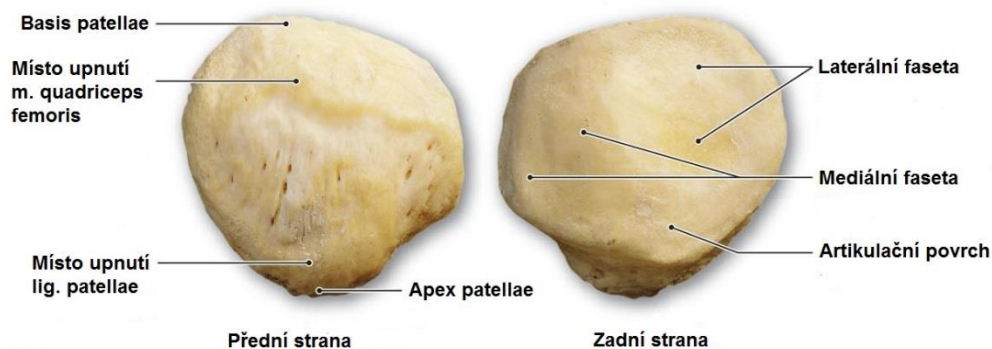
#### **2.1.1.2. Holenní kost (tibia)**

Jedná se o mohutnou, hlavní nosnou kost bérce s proximálně rozšířeným koncem určeným pro spojení s kondyly stehenní kosti <sup>1</sup>. Na bérce je uložena na palcové straně tak, že osa jejího těla leží na přímce spojující středy kyčelního, kolenního a horního hlezenního kloubu. Proximální konec holenní kosti je rozšířený ve dva dozadu skloněné kloubní hrboly (mediální a laterální kondyl), nesoucí nepatrně prohloubené kloubní plochy. Na spodní ploše laterálního hrbolu je kloubní ploška variabilního tvaru pro spojení s hlavicí lýtkové kosti (fibula). Boční plochy obou kloubních hrbolů vybíhají v oválnou drsnatinu (tuberositas tibiae). Chrupavka na proximálním konci holenní kosti je uprostřed mediální plochy vysoká až 2 mm, uprostřed zevní plochy dosahuje až 4 mm a směrem k okrajům obou ploch její výška klesá.

Ve své horní třetině je tělo holenní kosti silné. Směrem dolů mu postupně ubývá na mohutnosti a nejslabší je v místě přechodu do distálního konce kosti. Tělo holenní kosti má po celé délce trojúhelníkový průřez – má tedy tři okraje a tři plochy. Distální konec kosti je slabší než proximální a vybíhá ve vnitřní kotník <sup>3</sup>.

### 2.1.1.3. Češka (patella)

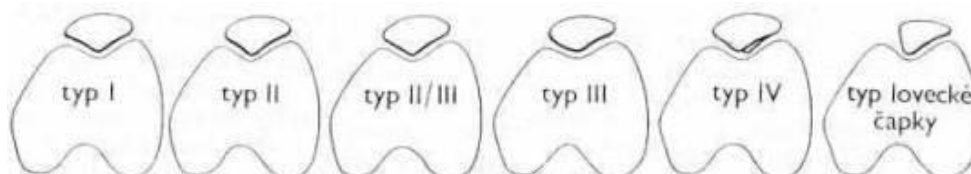
Češka (obr. 2) je největší sezamská kost (kost volně uložená ve šlaše) v lidském těle. Má přibližně srdčitý nebo trojúhelníkovitý tvar. V přímém kontaktu je pouze se stehenní kostí. Od holenní kosti je oddělena tukovými polštářky. Zadní plocha češky přiléhá na přední plochu stehenní kosti. Zadní plocha je oblou vertikální hranou rozdělena na dvě části (mediální a laterální faseta). Dolní okraj češky je lehce zahnutý a vybíhá v hrotnatý vrchol (apex patellae)<sup>3</sup>. Vnitřní povrch češky je pokryt chrupavkou o tloušťce 4 – 7 mm v centrální části<sup>1</sup>.



Obr. 2: Češka<sup>4</sup>

Tvarem a velikostí laterální a mediální fasety v rentgenovém (RTG) obraze se zabývali Wiberg a později Baumgartl, kteří rozlišili celkem 6 základních typů češky (obr. 3). První tři typy byly považovány za normální, druhé tři za patologické.

- Typ I – obě fasety jsou stejně velké a konkávní.
- Typ II – obě fasety jsou konkávní, mediální je větší.
- Typ II/III – mediální faseta je rovná a menší, laterální je větší a konkávní.
- Typ III – mediální faseta je menší a konvexní, laterální je konkávní.
- Typ IV – mediální faseta je malá, strmá, konvexní, patella má naznačenou dvojitou hranu.
- Typ lovecké čapky – mediální faseta zcela chybí<sup>1</sup>.



Obr. 3: Wiberg-Baumgartlova klasifikace tvarů češky<sup>5</sup>

## 2.1.2. Vazivový aparát

### 2.1.2.1. Kloubní pouzdro

Dutina kolenního kloubu je největším synoviálním prostorem v lidském těle. Její členění úzce souvisí s uspořádáním synoviální vrstvy pouzdra.

#### Fibrózní vrstva

Upíná se na stehenní kost ve vzdálenosti asi 1 – 1,5 cm od okrajů kloubních ploch. Na holenní kosti se upíná v těsné blízkosti kloubních ploch. Na česce, která je vsazena do přední části pouzdra, úpon těsně lemuje kloubní chrupavku. Přední část pouzdra až k postranním vazům je velmi slabá. Teprve v této oblasti postupně nabývá na tloušťce a v dorzální části nad oběma hrboly stehenní kosti vytváří mohutné vazivové slupky <sup>1</sup>.

Fibrózní vrstva je tvořena vrstvou silného kolagenního vaziva a na některých místech bývá zpevněna kapsulárními a extrakapsulárními vazy, úpony nebo začátky svalů. V místech, kde kloubní dutina komunikuje s okolními burzami, nebo kde do pouzdra vstupují cévy a nervy je naopak zeslabená. Má především mechanickou funkci, zabezpečuje stabilitu a pohyblivost kloubu <sup>3</sup>.

#### Synoviální vrstva

Má mnohem členitější uspořádání a vytváří řadu řas a duplikatur. V postranních a dorzálních úsecích sleduje kromě dvou zeslabených míst vrstvu fibrózní. V místě srůstu pouzdra s bází menisků je její kontinuita přerušena. Směrem vpřed se synoviální vrstva od fibrózní postupně odděluje a začíná se mezi nimi vytvářet vrstva areolárního tukového vaziva <sup>1</sup>.

Základ synoviální membrány je tvořen nesouvislou vrstvou plochých až kubických buněk (synovialocyty), které vzdáleně připomínají fibroblasty. Mají ovoidní tvar s početnými mikroklyky na povrchu, které vytvářejí morfologický předpoklad pro aktivní roli synovialocytů při transportu látek mezi okolní tkání a kloubní dutinou. Mezi synovialocyty jsou četné mezery. Synoviální membrána na nitrokloubním povrchu tedy není tvořena pouze synovialocyty, ale i vrstvou kolagenních vláken.

Podle stavby a funkce se rozlišují dva typy synovialocytů:

- a) **Synovialocyty typu A** – mají výraznou fagocytární aktivitu a plní funkci obranného systému kloubu. Jsou schopny reagovat s antigenem jednoho typu bílých krvinek, na které mají velký stimulační vliv. K nárůstu tohoto vlivu

dochází při revmatickém onemocnění nebo při proniknutí cizorodých látek do kloubní dutiny.

- b) **Synovialocyty typu B** – jsou hlavním producentem kolagenních a elastických vláken kloubního pouzdra a amorfni mezibuněčné hmoty. Jsou poměrně početné v období růstu.

Oba typy synovialocytů produkují cytokiny, které mají silný vliv na chondroblasty kloubní chrupavky, různé typy prostaglandinů a kyselinu hyaluronovou<sup>3</sup>.

#### **2.1.2.2. Kloubní chrupavka (cartilago articularis)**

Tvar kloubních hlavic je významně dotvářen především kloubními chrupavkami. Kloubní chrupavka povlékající kloubní konce kostí je typem hyalinní chrupavky. Je pružná, sklovitě hladká a poměrně přesně kopíruje tvar kloubních konců, ale není rovnoměrně silná. Silnější je v centrální části kloubní plochy a v místech, kde si sousedící kosti příliš neodpovídají tvarem. Nejtlustší je chrupavka na kloubní ploše česky kolenního kloubu, kde dosahuje 7 – 8 mm.

Chondrocyty hyalinních chrupavek jsou buňky okrouhlého až vřetenovitého tvaru s krátkými ostnatými výběžky. Buňky se po dělení nevzdalují, ale zůstávají ve skupinách, kterým se vzhledem ke stejnému původu buněk říká izogenetické skupiny. Kolem izogenetických skupin jsou jemná pouzdra tvořená kolagenními vlákny a základní hmotou. Jemná kolagenní vlákna jsou produkována právě pomocí chondrocytů. Vlákna se na celkovém objemu mezibuněčné hmoty podílejí asi z 50 %. Tvoří je kolagen II., IX. a XI. typu, formující prostorové sítě, které mají určitou prostorovou orientaci. U kloubních chrupavek se jedná o oblouky vzájemně se křížících vláken.

Podle úpravy vláken a chondrocytů lze v chrupavce rozlišit čtyři vrstvy:

- a) **První vrstva (povrchová)** – oploštěné chondrocyty jsou uloženy mezi kolagenními vlákny probíhajícími prakticky rovnoběžně s kloubním povrchem.
- b) **Druhá vrstva** – vlákna se zatáčejí do hloubky chrupavky a jsou zakotvena až do kostní kompakty. Vytvářejí systém oblouků vzdorujících tlaku. Mezi jemnými vlákny této vrstvy je minimální množství mezibuněčné hmoty a téměř zde chybí buňky.



- c) **Třetí vrstva** – obsahuje větší buňky kulovitěho tvaru, uložené v síťovité (plexiformní) vrstvě vláken. Buňky jsou uspořádány do štíhlých sloupců a intenzivně produkují většinu mezibuněčné hmoty celé chrupavky.
- d) **Čtvrtá vrstva** – sousedí s kostí. Velké chondrocyty a vazivová vlákna leží ve zvápenaté mezibuněčné hmotě, kterou vlákna chrupavky přecházejí přímo do kosti<sup>1,3</sup>.

Kloubní chrupavka nemá krevní ani mízní cévy a nervová vlákna. Jedinou výjimku tvoří vrcholy kapilárních klíčků kosti, které zasahují do nejhlubší vrstvy chrupavky. Látková výměna chrupavky je proto zajištěna téměř výhradně difúzí ze synoviální tekutiny. Z biomechanického hlediska je kloubní chrupavka velmi porézní materiál, který se svým chováním podobá houbě se schopností zadržet velké množství tekutiny. Proteoglykanové molekuly amorfni mezibuněčné hmoty vážou nejen obrovské množství vody, ale přítomnost chondroitin sulfátu a kyseliny hyaluronové výrazně zvyšuje viskozitu vnitřního prostředí chrupavky. Ve své hmotě má chrupavka submikroskopické otvory, kterými je do ní a z ní vytlačována synoviální tekutina. Při jakémkoli zatížení chrupavky dochází k její pružné deformaci, při které je z amorfni mezibuněčné hmoty vytlačována synoviální tekutina do kloubní štěrbiny a zároveň roste denzita mezibuněčné hmoty. Při odlehčení proudí synoviální tekutina zpět do chrupavky, kam je nasávána osmotickými silami proteoglykanů<sup>3</sup>.

### **2.1.2.3. Menisky**

Drobné menisky lze nalézt v řadě kloubů lidského těla. Anatomicky, funkčně i klinicky jsou však nejvýznamnější menisky kolenního kloubu (meniskus laterální a meniskus mediální). Oba menisky (obr. 4) jsou lamely srpkovitěho tvaru složené z hustého vaziva, které přechází ve vazivovou chrupavku. Můžeme je rozdělit na tři části – přední roh, střední část a zadní roh. Na příčném průřezu mají klínovitý tvar. Svou bází srůstají s kloubním pouzdem a jeho prostřednictvím i s některými dalšími strukturami.

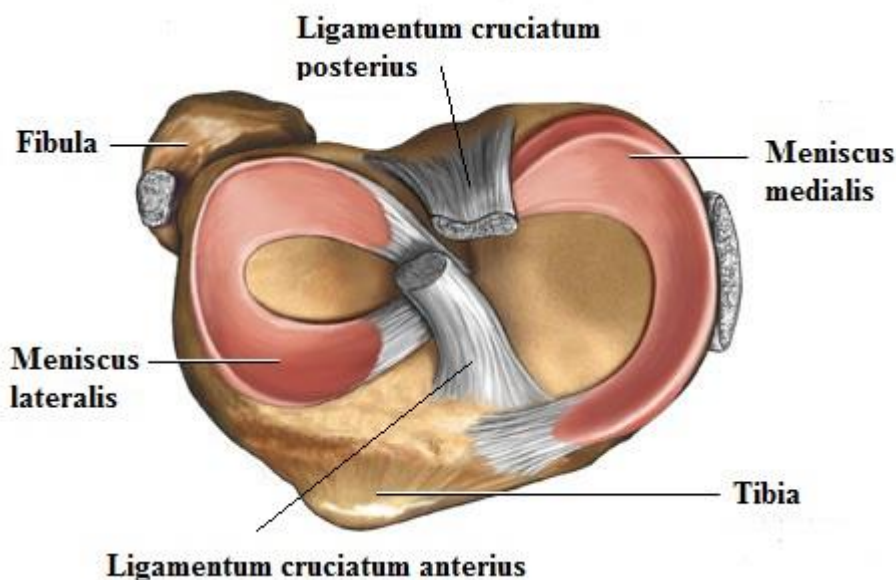
Menisky jsou tvořeny vazivovou tkání, která je složena zejména z kolagenních vláken a proteoglykanů. Při bázi má charakter hustého vaziva, v centrální části přechází ve vazivovou chrupavku. Kolagenní vlákna jsou orientována ve třech směrech, čímž je zajištěna vzájemná vazba všech vláken a také odolnost menisku proti silám, které na něj působí. Úkolem menisků je rovnoměrná distribuce tlakové síly, působit jako tlumič, napínat kloubní pouzdro a bránit jeho uskřínutí a roztírat synoviální tekutinu.

### **Meniskus mediální (meniscus medialis)**

Je větší než laterální meniskus a má tvar písmene C. Nepokrývá celou chrupavku mediálního kondylu, ale nechává v jejím středu miskovitě prohloubenou oválnou plochu. Mediální meniskus je méně pohyblivý než laterální, což je dáno jeho způsobem fixace.

### **Meniskus laterální (meniscus lateralis)**

Díky těsné blízkosti úponů svých rohů má laterální meniskus tvar velkého písmene O. I když je svou velikostí menší, než mediální meniskus pokrývá téměř celou kloubní plochu zevního kondylu holenní kosti s výjimkou malé centrální části. Díky tomu, že se úpony jeho rohů téměř dotýkají, je laterální meniskus fixován v jednom místě, což má společně s celkovou stavbou femorotibiálního kloubu za následek jeho značnou pohyblivost <sup>1</sup>.



Obr. 4: Menisky kolenního kloubu <sup>6</sup>

#### **2.1.2.4. Vazy**

Kolenní kloub má nejsložitější a nejmohutnější vazivový aparát ze všech kloubů v lidském organismu. Vazy výrazně prominující do kloubní dutiny jsou označovány jako intraartikulární stabilizátory a na svém povrchu jsou kryty synoviální membránou. Řada dalších vazů zesiluje povrch kloubního pouzdra. Tyto vazy jsou označovány jako vazy kapsulární.

#### **Zkřížené vazy**

Jsou jednou ze zvláštností kolenního kloubu a současně také jeho nejvýznamnějším vazivovým stabilizátorem. Každý vaz tvoří řada snopců různého

začátku, úponu i délky. Jsou odděleny řídkým vazivem, kterým probíhají cévy a nervy. Jejich označení „přední zkřížený vaz“ a „zadní zkřížený vaz“ je odvozeno od úponu obou vazů na holenní kost. Na stehenní kosti jsou začátky vazů obráceně.

### **Kapsulární vazy**

Kapsulární vazy slouží k zesílení povrchu kolenního kloubu. Nejvýznamnějším vazivovým stabilizátorem na vnitřní straně kloubu je vnitřní postranní vaz, který má trojúhelníkovitý tvar a je složen z dlouhých předních vertikálních vláken a z kratších zadních šikmých vláken. Na vnější straně je kolenní kloub stabilizovaný vnějším postranním vazem oblého až lehce oválného průřezu.

### **2.1.3. Kolemkloubní svaly**

V těsné blízkosti kolenního kloubu se upíná nebo začíná řada svalů. Podle jejich funkce se rozdělují na extenzory a flexory. Řada flexorů má také rotační účinek.

### **Extenzní aparát**

Jediným extenzorem je čtyřhlavý sval stehenní (musculus quadriceps femoris), který je nejmohutnějším svalem lidského těla. Jeho úprava i způsob přenášení tahu svalů na proximální část holenní kosti je značně složitá. Proto je na místě označení extenzní aparát kolenního kloubu, jehož součástí kromě samotného svalu jsou:

- a) Čěška – centralizuje úpony jednotlivých částí svalu.
- b) Retinakula čěšky – vazivové pruhy fixující čěšku k okolním strukturám.
- c) Ligamentum patellae – je hlavní úpon čtyřhlavého stehenního svalu.

### **Flexory**

Mezi flexory kolenního kloubu jsou řazeny např. svaly musculus (m.) biceps femoris, m. semimembranosus, m. gastrocnemius a m. popliteus. Většina z těchto svalů jsou i vnitřní rotátory. Výjimku tvoří pouze m. biceps femoris jako zevní rotátor a m. gastrocnemius, který má funkci posturální (zabezpečuje vzpřímený postoj) <sup>1</sup>.

### **2.1.4. Synoviální tekutina**

Synoviální tekutina (ST) je dialyzátem krevní plazmy. K dialýze dochází přes stěnu kapilár probíhajících pod povrchem synoviální membrány, přes kterou se tekutina dostává do kloubní dutiny.

### **2.1.4.1. Složení synoviální tekutiny**

Složení i množství ST v kloubu je velmi proměnlivé. U velkých kloubů končetin se množství tekutiny odhaduje na 2 – 4 ml (např. kolenní kloub) <sup>3</sup>. Hlavní funkcí ST v kloubu je udržení pružnosti chrupavky a snížení tření jednotlivých kloubních ploch, čímž se také snižuje jejich opotřebení. Dále zabezpečuje transport živin, odpadních produktů a dalších metabolitů z nebo do kloubu.

ST je složena z plazmatických proteinů, kyseliny hyaluronové (KH), proteoglykanu 4 (PRG4), fosfolipidů, cytokinů a růstových faktorů a krevních buněk.

#### **Plazmatické proteiny**

Hlavní složkou synoviální tekutiny jsou malé plazmatické proteiny, konkrétně albuminy a globuliny ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ ). Velké plazmatické proteiny v ST nejsou, protože neprojdou přes synoviální membránu. Celková koncentrace všech proteinů v ST zdravého kloubu se pohybuje mezi 19 – 28 mg/ml, což je asi 1/3 jejich koncentrace v krevní plazmě <sup>7</sup>. Nejvíce je v ST zastoupen albumin, jehož koncentrace je asi 7 – 18 mg/ml <sup>8</sup>, jednotlivé globuliny jsou potom zastoupeny v koncentracích pohybujících se mezi 1 – 3 mg/ml <sup>7</sup>.

#### **Kyselina hyaluronová a proteoglykan 4**

KH a PRG4 jsou primární makromolekuly zodpovědné za lubrikační vlastnosti ST. Název KH vznikl složením řeckého slova hyalos (sklovitý) a uronová kyselina, která je přítomna v polymeru <sup>9</sup>. Ve zdravém kloubu je koncentrace KH asi 2,5 – 4 mg/ml a PRG4 0,035 – 0,24 mg/ml. U pacientů s osteoartrózou dochází k poklesu koncentrace KH na 1,2 – 2,2 mg/ml, u revmatoidní artritidy je koncentrace 0,7 – 2,7 mg/ml. Mimo jiné dochází u těchto onemocnění také k depolymerizaci KH, čímž dochází k snížení její molekulové hmotnosti a zhoršení viskoelastických vlastností.

#### **Cytokiny a růstové faktory**

Cytokiny a růstové faktory přítomné v ST jsou důležité regulátory pro buněčnou populaci v kloubní dutině, včetně chondrocytů a synovialocytů. Do ST se mohou dostávat z krevní plazmy nebo jako produkty chondrocytů, synovialocytů případně buněk z okolních tkání. Cytokiny se podle své funkce rozdělují na prozánětlivé a protizánětlivé. Mezi prozánětlivé cytokiny patří např. interleukiny (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-8 a tumor nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ ). Z protizánětlivých cytokinů můžeme v ST nalézt

IL-4, IL-10 a IL-13. Růstové faktory potom zastupují hlavně insulinu podobný růstový faktor (IGF-1) a transformující růstový faktor (TGF- $\beta_1$ )<sup>7</sup>.

V ST zdravého člověka je většina cytokinů a růstových faktorů přítomna v relativně nízkých koncentracích. Při poranění kloubu nebo jeho onemocnění však dochází ke zvýšení jejich koncentrace<sup>10</sup>. Bylo také zjištěno, že některé cytokiny hrají důležitou roli v patogenezi onemocnění a urychlují degeneraci kloubu, čímž přilákaly pozornost jako možné terapeutické cíle při léčbě kloubních onemocnění<sup>7</sup>. IL-1 a TGF- $\beta_1$  mají vliv na produkci KH a PRG4 synovialocyty a chondrocyty<sup>10</sup>.

### **Proteolytické enzymy**

Proces degradace kloubní chrupavky je primárně zprostředkováván proteolytickými enzymy, jejichž hladina v ST je přísně regulovaná. Jedná se hlavně o matrixové metaloproteinázy (MMP) MMP-1 a MMP-3. Jejich hladina v ST zdravého kloubu je nízká, pokud však dojde k poranění nebo onemocnění kloubu, dochází ke zvýšení jejich koncentrace.

### **Krevní buňky**

ST zdravého kloubu je ve srovnání s krví na buňky relativně chudá. Z krevních buněk se v ST nejčastěji vyskytují leukocyty (konkrétně monocyty), kterých obsahuje méně než 2000 buněk/ml, přičemž krev obsahuje 3540 – 9060 leukocytů/ml<sup>7</sup>. Erytrocyty ST zdravého kloubu neobsahuje<sup>11</sup>. U některých onemocnění jako např. revmatoidní artritida, se počet leukocytů signifikantně zvyšuje a do ST se také mohou dostávat neutrofily, lymfocyty a makrofágy<sup>7</sup>.

#### **2.1.4.2. Vyšetření kloubního výpotku**

Při patologických procesech se množství ST v kloubu výrazně zvyšuje, mění se také její vzhled a složení. Takto vzniklou ST označujeme jako kloubní výpotek (KV). Odběr KV a jeho laboratorní vyšetření tvoří jeden ze základních pilířů diagnostiky.

#### **Odběr kloubního výpotku (kloubní punkce, artrocentéza)**

Kloubní punkce je prováděna za přísně aseptických podmínek po očištění místa vpichu 70% ethanolem a dezinfekci jodovým preparátem. Je používána jednorázová stříkačka s jehlou o vyšším průměru ke snadné aspiraci často hustého materiálu. Punkce kolenního kloubu je prováděna u pacienta ležícího s extendovaným kolenem. Vpich je volen v místě báze česky asi 1,5 cm pod úrovní její zevní hrany. Jehla je vedena

do suprapatelárního recesu skloněná mírně ventrálně a kraniálně, aby nedošlo k poranění infrapatelárního tukového tělesa. Při provádění punkce je snaha o odsání veškerého kloubního obsahu. Při nálezů krve je kloub propláchnut 1% roztokem mezokainu, po punkci hnisavého výpotku se používá k výplachu ředěný roztok jodového preparátu (Betadine) a fyziologický roztok.

U každého vzorku je provedeno:

- a) Makroskopické vyšetření
- b) Mikrobiologické vyšetření
- c) Cytologické vyšetření
- d) Biochemické vyšetření

### **Makroskopické vyšetření**

Biologický materiál získaný při punkci je hodnocen z hlediska čirosti, barvy a viskozity (tab. 1). Za normálních okolností je KV čirý. V přítomnosti zánětu se stává zakalený, protože při zánětu dochází ke zvýšení počtu přítomných buněk. U revmatických zánětů, zvláště v jejich počátku, bývá lehce zakalený. Výrazné zakalení můžeme pozorovat, pokud se jedná o dnovou artritidu a chondrokalcinózu. U traumatické artritidy může docházet ke vzniku zakalení díky přítomnosti erytrocytů, čistá krev bývá punktována u hemofiliků. Přítomnost krve ve formě drobných „žilek“ bývá arteficiální. Příčinou je nabodnutí malých krevních cév při artrocentéze.

Normální KV je bezbarvý nebo lehce nažloutlý. Slámově žluté zbarvení bývá příznačné pro osteoartrózu, u revmatiků jsou KV nazelenalé, často s příměsí tzv. rýžových tělísek. U dnové artritidy mívají KV mléčné zbarvení. Viskozita je za normálních podmínek vlivem přítomnosti KH oproti ostatním tělním tekutinám značná. Při revmatickém onemocnění zpravidla dochází k jejímu poklesu.

Rozsah kloubního zánětu se dá orientačně stanovit podle Ropesové. Ke KV je do zkumavky přidáno několik kapek ledové kyseliny octové. U KV ze zdravého kloubu dojde k vytvoření husté soudržné sraženiny, která nejde roztřepat. To samé platí i u osteoartrózy. Naopak v přítomnosti zánětlivého onemocnění je precipitát nestabilní a po zatřepání se tvoří zákal <sup>11</sup>.

Tabulka. 1: Charakteristiky KV <sup>11</sup>

skupina	typ	barva	zákal	viskozita	precipitát
nezánětlivá	norma	nažloutlá	čirý	velmi vysoká	pevný
	trauma	xantochromní	zkalený	vysoká	pevný
	OA	slámová	čirý	vysoká	pevný
zánětlivá	revmatická horečka	žlutá	zkalený	snížená	nestabilní
	revmatická artritida	nazelenalá	opalescentní	nízká	chabý
pyogenní	TBC artritida	žlutobílá	zkalený	nízká	nestabilní
	septická artritida	šedobílá	silně zkalený	velmi nízká	netvoří se

### Mikrobiologické vyšetření

Všechny typy KV, kromě septického zánětu, jsou sterilní. Vyšetřuje se však každý zakalený vzorek. Nejprve je zhotoven mikroskopický preparát, kde se po obarvení hodnotí buněčné elementy. Především se kvantitativně popisují mikroorganismy. Pokud jsou ve vzorku nalezeny bakterie, je použito gramovo barvení, pomocí kterého jsou přítomné bakterie rozděleny na gramnegativní (růžové) a grampozitivní (modrofialové). Podle mikroskopického nálezu se KV následně kultivuje na pevná kultivační média.

V KV hnisavých artritid bývají z grampozitivních bakterií přítomny *Staphylococcus aureus*, koaguláza-negativní stafylokoky a pyogenní streptokoky. Z gramnegativních tyčinek se jedná nejčastěji o salmonely, z gramnegativních koků jsou to především *Neisseria gonorrhoeae*. Pokud došlo k infekci kloubní náhrady, v KV jsou přítomny koaguláza-negativní stafylokoky a koryneformní bakterie včetně *Propionibacterium acnes*.

## **Cytologické vyšetření**

K vyšetření KV na přítomnost buněčných elementů je materiál odebírán do heparizované zkumavky. Rozeznáváme dvě skupiny buněčných druhů vyskytujících se v kloubní tekutině:

- a) Exsudované buněčné elementy (krevní buňky)
- b) Buňky místního tkáňového původu

Za normálních okolností jsou v KV přítomny pouze monocyty. Z exsudovaných buněk jsou u patologických stavů zastoupeny především polymorfonukleární granulocyty, jejichž podíl k mononukleárům stejně jako jejich absolutní počet je typický pro jednotlivé typy zánětů. Například u revmatoidní artritidy je jejich počet uváděn jako  $10 - 20 \cdot 10^9$  buněk/l.

## **Mikroskopické vyšetření**

Z nebuněčných složek KV mají velkou diagnostickou cenu krystaly. Hlavním představitelem krystalových artropatií je dna, která se projevuje přítomností jehlancovitých krystalů mononatriumurátu. U revmatoidní artritidy se často v KV vyskytují krystaly cholesterolu, které ale nevyvolávají minimální intraartikulární dráždění.

## **Biochemické vyšetření**

Z biochemických markerů se vyšetřuje zejména koncentrace glukózy a proteinů. U zdravého kloubu je hladina glukózy v KV shodná s hladinou v krvi. U revmatických zánětů dochází zvýšením glykolýzy v granulační tkáni a zvýšením počtu leukocytů k poklesu množství glukózy v KV. Výrazné snížení je typické pro septické artritidy.

Proteinů je v KV zdravého pacienta mnohem méně než v krevním séru (asi 1/3)<sup>11</sup>. Při zánětu dochází v KV ke zvýšení koncentrace proteinů, takže u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou je jejich celková koncentrace vyšší než u zdravých pacientů. Zánět synoviální membrány ovlivňuje její funkci filtrování proteinů, což má za následek, že např. v KV pacientů s revmatoidní artritidou můžeme najít vysokomolekulární proteiny jako fibrinogen,  $\beta_2$  makroglobulin a  $\alpha_2$  glykoprotein, které se v ní normálně nevyskytují<sup>7</sup>. Příznakem lokálního zánětu je zvýšený obsah laktátu.



## **2.2. Onemocnění kloubů**

Kloubní onemocnění v současné době patří mezi nejrozšířenější choroby. Nejčastěji se, zejména u starších pacientů, můžeme setkat s osteoartrózou. U dětí může docházet ke vzniku vrozené dysplazie kyčelního kloubu (nepoměr mezi velikostí hlavičky stehenní kosti a kloubní jamkou). Ze zánětlivých onemocnění se potom můžeme setkávat s revmatoidní artritidou nebo dnou.

### **2.2.1. Osteoartróza**

Jedná se o degenerativní kloubní onemocnění charakterizované degradací kloubní chrupavky, subchondrální sklerózou, tvorbou osteofytů a změnami měkkých tkání, které zahrnují kloubní pouzdro, synoviální membránu a kloubní svaly a vazy <sup>11</sup>. Dochází tedy ke komplexnímu biologickému a mechanickému selhávání postiženého kloubu <sup>12</sup>. Pro osteoartrózu (OA) jsou typické změny na drobných kloubech rukou, váhonosných kloubech a páteři. Součástí OA může být také zánět synoviální membrány <sup>11</sup>.

Artróza postihuje všechny etnické skupiny ve všech částech světa, přičemž častěji bývají postiženy ženy než muži <sup>12</sup>. Je jedním z nejčastějších onemocnění dolních končetin u starších lidí. OA kolenního nebo kyčelního kloubu trpí více jak 20 % lidí starších 50 let <sup>13</sup>. Radiologická prevalence OA je mnohem vyšší než klinická. První radiologické známky tohoto onemocnění se objevují už kolem 40. roku života, u pacientů s preartrózou ještě dříve.

#### **2.2.1.1. Etiopatogeneze**

Vznik OA je obecně dáván do souvislosti s působením mechanických nebo biologických faktorů, které narušují homeostázu chrupavky, subchondrální kosti, kloubní výstelky a kloubních stabilizátorů. Vznik OA a rychlost jejího rozvoje závisí na stupni závažnosti strukturálních abnormalit kloubu a na velikosti zátěže, která se ke kloubu dostává přes fyziologické ochranné prvky (svalový aparát, subchondrální kost) <sup>12</sup>. OA kolenního kloubu se ve většině případů rozvíjí velmi pomalu a klinicky i na rentgenových snímcích zůstává stabilní po mnoho let <sup>13</sup>.

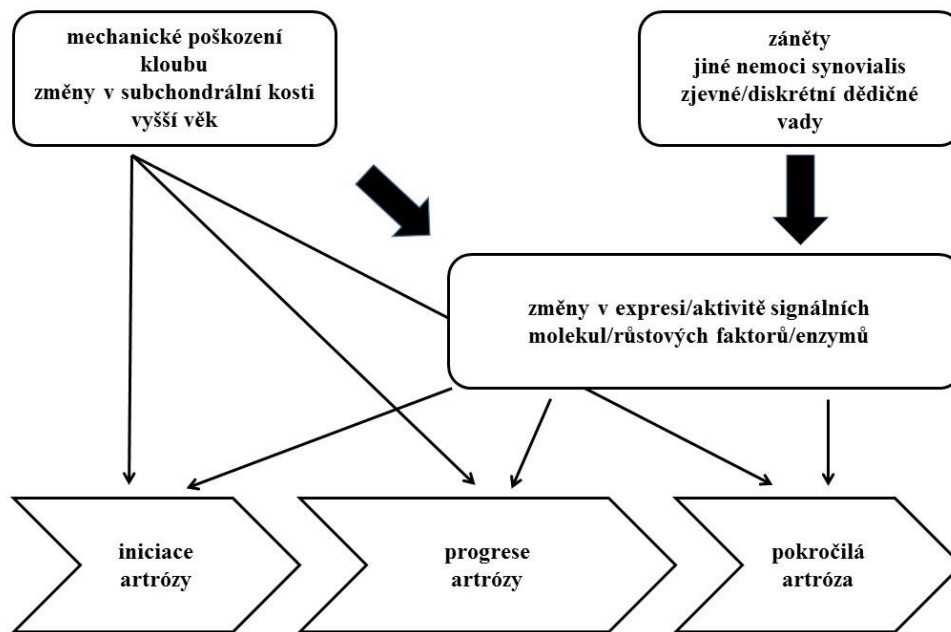
Předpokládá se, že existují dvě základní patogenetické cesty vzniku OA:

- a) Na normální kloub působí abnormální zátěž.
- b) Na stigmatizovaný kloub působí normální zátěž.

První známkou časných artrotických změn v chrupavce je zvýšené zadržování vody (tzv. prosáknutí chrupavky), které je provázené snížením obsahu proteoglykanů, čímž dochází k narušení základních biomechanických a tribologických vlastností chrupavky. S pokračující zátěží se v chrupavce objevují trhliny, které se nedaří zhojit a postupně se šíří na její další části. Současně může docházet k rozběhnutí zánětu, který celou situaci dále zhorší uvolňováním kyslíkových radikálů a proteolytických enzymů, čímž se destrukce chrupavky urychluje <sup>12</sup>. Důležitou roli v procesu vzniku a rozvoje OA sehraává samotná kost <sup>14</sup>. Poruchy biomechanických vlastností kloubu indukují adaptační změny v subchondrální kosti, především subchondrální sklerózu a tvorbu osteofytů (kostních výrůstků). Oba tyto znaky patří mezi důležité radiologické charakteristiky tohoto onemocnění <sup>12</sup>. Zůstává však nejasné, jestli primárně dochází ke změnám na kloubní chrupavce nebo kosti <sup>15</sup>.

OA jako taková vzniká jako důsledek souhry celé řady okolností, má tedy tzv. multifaktoriální etiopatogenezi (obr. 5).

- a) Genové dispozice
- b) Chronické přetížení kloubu – často bývají postiženi obézní nebo těžce pracující lidé, přičemž obezita má kromě mechanického vlivu také biologický vliv na kloubní homeostázu.
- c) Vývojové vady kloubu
- d) Neuromuskulární poruchy
- e) Zánětlivá kloubní onemocnění
- f) Metabolická či endokrinní onemocnění
- g) Nutriční vlivy
- h) Vlivy etnické
- i) Věk
- j) Pohlaví



Obr. 5: Současná představa o etiopatogenezi OA <sup>12</sup>

V některých případech se může OA rozvinout jako následek nitrokloubního poranění, nejčastěji kotníku nebo kolenního kloubu. Přetržení kloubních vazů s sebou totiž ve více jak polovině případů nese také poškození kloubní chrupavky. K tomu dochází vlivem narušení mezibuněčné hmoty chrupavky, což vede k nepřiměřené produkci proteolytických enzymů (MMP-3) a prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ ) a následné apoptóze chondrocytů. Pacienti s touto formou OA jsou většinou o 10 – 14 let mladší než ti pacienti, u kterých se onemocnění rozvinulo z jiného důvodu <sup>16</sup>.

### 2.2.1.2. Diagnostika

Diagnostika degenerativních onemocnění se opírá především o klinické vyšetření a zobrazovací metody.

#### Klinické vyšetření

Stejně jako u každého jiného onemocnění se u OA začíná odběrem anamnézy a klinickým vyšetřením <sup>12</sup>. Mezi typické příznaky OA patří chronické bolesti, k jejichž zmírnění dochází při odpočinku, nejčastěji u pacientů starších 40 let. Bolesti se většinou odvíjí od denního rytmu, přičemž největší bývají večer a nejmenší ráno, může se také projevat ranní ztuhlost <sup>13</sup>, která na rozdíl od revmatických zánětlivých onemocnění bývá kratší než 30 minut. Potíže bývají často vázány na změnu počasí. Kromě běžných bolestí zažívá spousta pacientů s OA období zvláště silných, ostrých a obtížně ztišitelných bolestí (tzv. flare). Později dochází ke zhoršování funkce postiženého kloubu, objevují

se otoky, drásaty a omezení hybnosti. Charakteristické jsou také kloubní deformity, které vznikají na podkladě kostní hypertrofie, nekrózy nebo zbytnění synoviální výstelky.

Obvyklým nálezem u postiženého kloubu je, kromě bolesti, napětí. Může být také patrná ztráta ušlechtilého tvaru kloubu v důsledku zvětšení objemu jeho měkkých nebo tvrdých tkání. Typický je rovněž krepitus (vrzání kloubu), který může být důsledkem fibrilárního postižení chrupavky měkký a jemný nebo tvrdý až distanční způsobený ztrátou většího povrchu chrupavky. Může se také vytvořit KV, který je čirý a má slámově žluté zbarvení. S rozvojem OA se rovněž zhoršuje rozsah hybnosti postiženého kloubu, může dojít k rozvoji kloubní nestability a úbytku svalové hmoty. Pokročilé stupně OA také doprovází kulhání a narušení stereotypu chůze. Každý z těchto jmenovaných příznaků omezuje běžné denní aktivity a zhoršuje kvalitu života.

### **Zobrazovací techniky**

Nejvíce používanou zobrazovací metodou je RTG<sup>12</sup>. Jsou na něm pozorovatelné hlavní morfologické změny (obr. 6):

- a) **Zúžení kloubní štěrbin** – u váhonosných kloubů je ve většině případů asymetrické a nejčastěji je lokalizováno v místě soustředění největšího tlaku (např. mediální část kolenního kloubu).
- b) **Subchondrální skleróza** – vytváří se v místě zúžení kloubní štěrbin a může se rozšiřovat jak horizontálně tak vertikálně vzhledem ke kosti.
- c) **Kostní cysty** – tvoří se ve větším množství v subchondrální kosti kolem okrajů sklerotických lézí. Mohou být různých velikostí.
- d) **Osteofyty** – okrajové osteofyty nejčastěji vznikají na kosti, kolem okrajů kloubní chrupavky. Centrální osteofyty mají tvar knoflíku a utváří se na artikulačních plochách kloubu, které nepokrývá chrupavka<sup>17</sup>.

Pro hodnocení artrotického kloubu je používaná klasifikace podle Kellgren-Lawrence:

- a) I. stupeň – nepatrné zúžení kloubní štěrbin, počínající osteofyty
- b) II. stupeň – jisté osteofyty a určité zúžení kloubní štěrbin
- c) III. stupeň – zřetelné, někdy vícečetné osteofyty, značné zúžení kloubní štěrbin, zjevná subchondrální skleróza, někdy deformace kloubní kontury

- d) IV. stupeň – velké osteofyty, zaniklá kloubní štěrбина, rozsáhlá skleróza a jednoznačná deformace kloubní kontury<sup>12</sup>



Obr. 6: RTG snímky zdravého kolenního kloubu (vlevo) a kloubu postiženého OA (vpravo)<sup>18</sup>

### Diagnostická kritéria

Klinický obraz OA je heterogenní, což vedlo k potřebě formulovat jednoznačná diagnostická kritéria, která by umožňovala konzistentní stanovení diagnózy. Nejznámější jsou pravidla, která vypracovala *American College of Rheumatology* (tab. 2).

Tabulka 2: Klinická a RTG kritéria pro OA kolenního kloubu

Kritérium	Nález
Bolest	Ano
RTG nález osteofytů	Ano
Věk	> 50 roků
Ranní ztuhlost	Kratší než 30 min
Krepitus	Ano

Uvedená kritéria je však nutno brát s určitou rezervou, protože u pacientů nad 60 let jsou na RTG snímku patrný alespoň minimální osteofyty. Přidáním parametru bolestivosti by se tak výrazně zvýšil záchyt OA. Evropská liga proti revmatizmu proto vydala doporučení, které zakládá diagnózu OA kolenního kloubu na přítomnosti:

- a) **Některých rizikových faktorů** – žena, věk, nadváha, stav po úrazu kolene, porucha mechanické osy kloubu, nestabilita, pracovní a rodinná zátěž, nález Heberdenových uzlů.
- b) **Tří stížností** – bolest při zátěži, krátkodobá ranní ztuhlost, funkční omezení.
- c) **Tří klinických příznaků** – krepitus, omezená hybnost, ztráta ušlechtilosti kloubního tvaru.

### 2.2.1.3. Klasifikace

K rozdělení širokého spektra artrotických onemocnění se nejčastěji používají třídící principy etiologické, anatomické a podle specifických rysů. Dříve se OA rozlišovala na primární (idiopatickou), u které nebyla zjištěna zjevná predispozice k OA a sekundární, u níž byla příčina vzniku OA zjištěna. Toto členění však dnes trochu postrádá smysl, protože každá OA má nějaký svůj vyvolávací faktor. Z anatomického hlediska je rozlišována OA kolenního kloubu (gonartróza), kyčelního kloubu (koxartróza) atd. Podle počtu současně postižených kloubů se zase dělí na monoartikulární (postižen jeden kloub), oligoartikulární (postiženy dva klouby) nebo polyartikulární (postiženy více než dva klouby).

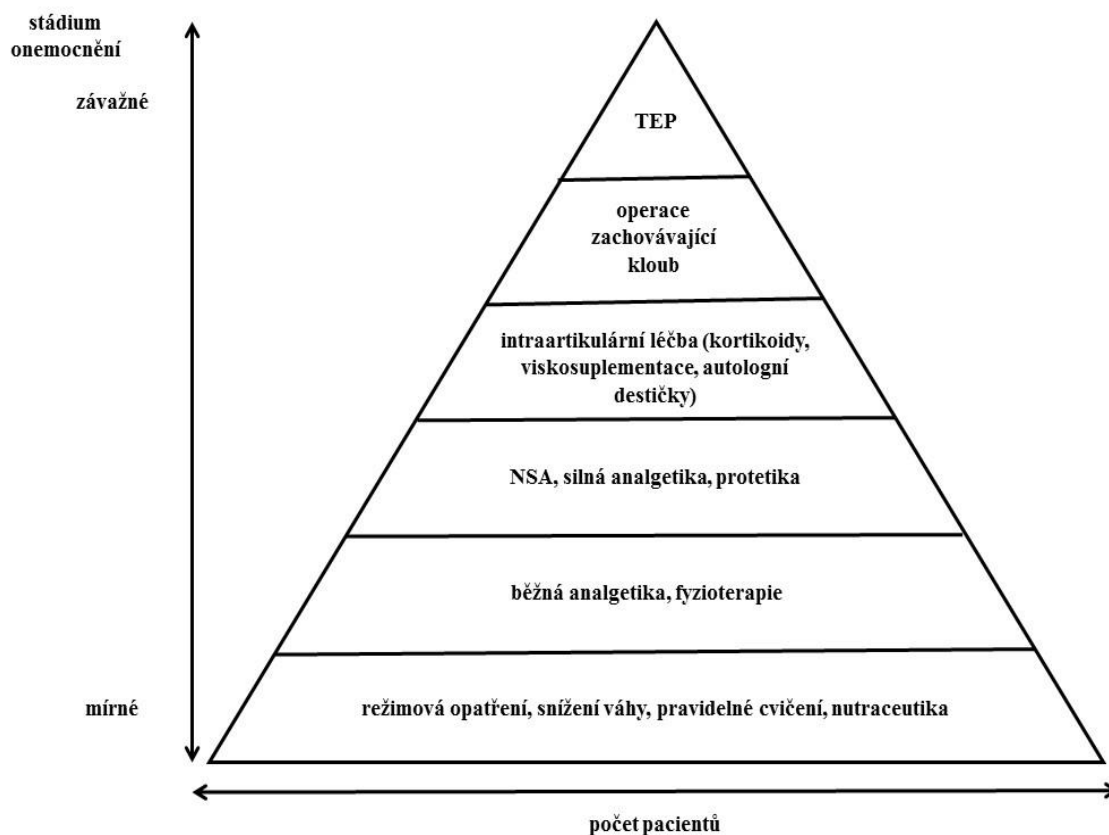
Podle specifických rysů je OA rozdělována na atrofickou, normotrofickou a hypertrofickou, s kostními erozemi či bez nich, s nestabilitou či bez ní apod. Dále také existuje spousta členění specifických pro jednotlivé lokalizace (např. u kyčelního kloubu se rozeznává mediální typ (koncentrický) od superolaterálního typu (excentrického)). OA se dá také rozdělovat podle rychlosti rozvoje na stacionární formu, která se zhoršuje postupně, a progresivní formu schopnou během několika měsíců doslova zničit celý kloub <sup>12</sup>.

## 2.3. Terapie kloubních onemocnění

Jednou z nejdůležitějších součástí jakékoliv léčebné strategie je úleva od potíží, především snížení nebo odstranění bolesti, s čímž také úzce souvisí další důležitá součást, kterou je snaha o udržení popřípadě zvětšení funkční kapacity postiženého kloubu.

Každá léčebná strategie je pokud možno „šita“ pacientovi na míru. Je brán ohled na potřeby a možnosti pacienta, počet postižených kloubů a jejich lokalizace a samozřejmě se zohledňuje také jeho věk, další onemocnění, sociální zázemí nebo typ osobnosti. Léčebné prostředky bývají nasazovány postupně a úměrně stavu pacienta

(tzv. pyramidový přístup, obr. 7), přičemž při zhoršení onemocnění dochází k nasazení nástroje z vyššího patra, se současným využitím nástrojů z pater nižších.



Obr. 7: Pyramidová koncepce léčby <sup>12</sup>

### 2.3.1. Režimová opatření

Před zahájením léčby dochází nejprve k edukaci pacienta, protože informovaný a poučený pacient je schopen zvládat život s onemocněním lépe než ten, který byl obeznámen pouze se základními informacemi.

Nejprve se některým pacientům doporučuje redukce váhy spojená s pravidelným cvičením, aby došlo ke zpevnění svalů v okolí kloubu a ke snížení zátěže na postižený kloub. Výhodou cvičení je bezesporu to, že může být použito v podstatě u všech skupin pacientů, protože existuje pouze minimální množství kontraindikací.

Další součástí režimových opatření je používání zevních pomůcek snižujících velikost zátěže přenášené postiženým kloubem. Podle stupně onemocnění a stavu ostatních kloubů se u lehčích typů onemocnění doporučuje vycházková hůl, u závažnějších potom francouzské nebo podpažní berle. Hlavním principem této terapie je pohyb s odlehčením bolestivého kloubu. Při konzervativní léčbě se také často

používají ortézy, které se přikládají zevně na postižený kloub. Ortézy mají na kloub hlavně efekt stabilizační, dále pak také biomechanický a proprioreceptivní <sup>12</sup>.

### **2.3.2. Rehabilitace a fyzioterapie**

Rehabilitace patří mezi nejstarší medicínské obory. U jejího zrodu nestálo mnoho velkých vědců, ale spíš nadané sestry a lékaři pečující o nevléčitelně nemocné pacienty. Velkou roli při jejím rozvoji sehráli také epidemické choroby postihující pohybový aparát. Postupem času se moderní léčebná rehabilitace stala medicínským oborem, který zasahuje téměř do všech ostatních tím, že na ně navazuje svojí úlohou obnovit funkci těla. Léčebná rehabilitace využívá jak moderních neurofyziologických poznatků, tak principů starodávných léčebných metod <sup>11</sup>.

#### **2.3.2.1. Pohybová terapie**

Funkční pohybová terapie je základním nástrojem fyzioterapie u degenerativních kloubních onemocnění. Jde o poměrně lacinou, ale přitom velmi efektivní formu léčby. Jejím cílem je zabránění omezování rozsahu pohybu, obnovení ztraceného rozsahu pohybu nebo zvýšení funkční kapacity postiženého pohybového segmentu. Pohyb je vykonáván buď pasivně (pasivní vedení, reflexní stimulace pohybu) nebo aktivně, kdy pacient cvičí sám případně pod vedením fyzioterapeuta. Při fyzioterapii se využívá cviků v leže, v sedě na židli či míči a ve stoje s oporou např. o žebřiny. U pacientů s artrózou váhonosných kloubů je často doporučován stacionární rotoped a plavání, neboť při plavání jsou klouby odlehčeny a přitom vykonávají opakovaný pohyb. Výběr plaveckého stylu záleží na druhu poškozeného kloubu a míře jeho poškození (např. při pokročilé artróze kyčle je styl „prsa“ nemožný) <sup>12</sup>.

#### **2.3.2.2. Fyzikální terapie (fyziatrie)**

Fyzikální terapie využívá působení různých druhů fyzikálních energií na lidský organismus. Společným rysem všech metod fyzikální terapie je jejich účinek na aferentní nervový systém, který vyvolává lokální nebo celkovou odezvu. Zvýšením aferentace do centrálního nervového systému dochází k nastartování autoreparačních mechanismů cílených do ošetřované oblasti. Tímto způsobem může dojít k odstranění funkční poruchy dříve, než dojde k její přeměně na poruchu strukturální. V případě pokročilých strukturních poruch je zase využíváno analgetického efektu fyzikální terapie.



Účinky působící fyzikální energie dělíme na:

- a) Přímé - ovlivnění biochemických a fyzikálních procesů ve tkáních, na něž tato energie přímo působí.
- b) Reflexní - účinky zprostředkované nervovým nebo endokrinním systémem.

Obecně můžeme převažující účinky fyzikální terapie rozdělit do pěti základních skupin:

- a) Analgetické – používané terapie mohou mít hluboký (např. magnetoterapie) nebo povrchový (např. infračervené záření, kryoterapie) analgetický účinek.
- b) Myorelaxační – nejvýraznější myorelaxační účinky má např. ultrazvuk, laser a interferenční proudy.
- c) Trofotropní – k metodám s trofotropními účinky patří např. vakuokompresivní terapie, magnetoterapie a laser.
- d) Antiedematózní – používá se např. negativní termoterapie, magnetoterapie a ultrazvuk.
- e) Antiflogistické – patří sem např. magnetoterapie, laser, ultrazvuk a galvanizace <sup>11</sup>.

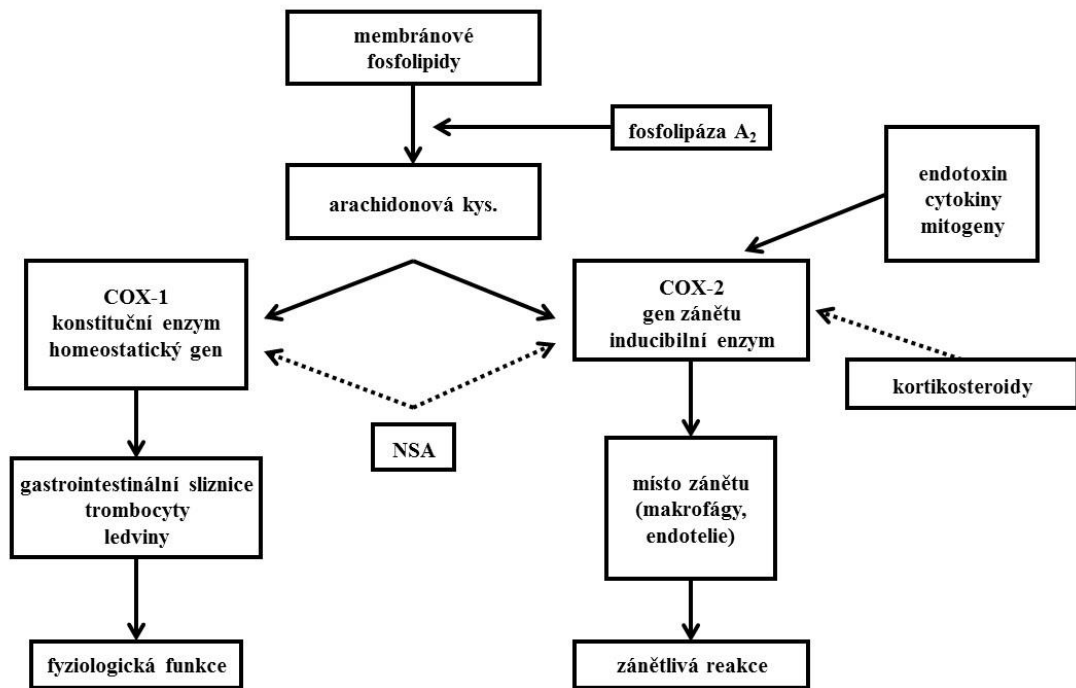
### **2.3.3. Farmakologická terapie**

#### **2.3.3.1. Nesteroidní antirevmatika**

Nesteroidní antirevmatika (NSA) jsou podávána pacientům se zánětlivými stavy jako je např. revmatoidní artritida nebo artróza. Při léčbě je využíván jak jejich analgetický tak antiflogistický účinek. Nejčastěji bývají indikována ve schématu konzervativní léčby OA kolenního a kyčelního kloubu.

V roce 1971 byl popsán inhibiční účinek NSA na enzym cyklooxygenázu (COX) (obr. 8). Ta je ukotvena v buněčné membráně a iniciuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny z fosfolipidů buněčných membrán. Prostaglandiny jsou důležitými mediátory zánětu a také hrají roli při udržování homeostázy ve tkáních. COX má dvě formy, COX-1 a COX-2. Forma COX-1 je označována jako konstitutivní. V mnoha tkáních je přítomna trvale v relativně stabilním množství a je zodpovědná za syntézu prostaglandinů udržujících fyziologické funkce. Ve sliznici gastrointestinálního traktu (GIT) (především v žaludku) umožňuje vznik cytoprotektivních prostaglandinů, které zvyšují slizniční cirkulaci, sekreci bikarbonátů a zvětšuje tloušťku hlenové vrstvy. V trombocytech je zase odpovědná za katalýzu

syntézy proagregačního tromboxanu  $A_2$ . Forma COX-2 je naproti tomu indukovaná. Je syntetizována makrofágy a endotelovými buňkami v místě zánětu a jeho tvorba je vyvolána mediátory zánětu (např. IL-1 a TNF- $\alpha$ ). COX-2 katalyzuje syntézu prostaglandinů, jež se účastní rozvoje zánětu, čímž dochází ke vzniku bolesti. Celkové množství COX-2 v organismu se může při zánětu zvýšit na osm – desetinásobek. Naproti tomu množství COX-1 se v organismu zvyšuje pouze dvojnásobně až čtyřnásobně.

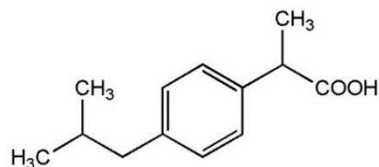


Obr. 8: Schéma inhičičního účinku NSA na COX <sup>11</sup>

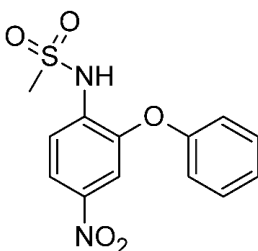
Podle afinity ke COX rozdělujeme NSA do 3 skupin:

- a) **Neselektivní inhibitory COX** – do této skupiny patří např. ibuprofen (obr. 9) nebo diklofenak (obr. 10). Při dlouhodobém užívání léčiv z této skupiny dochází k častému výskytu nežádoucích účinků, protože inhibicí COX-1 dochází k ovlivňování všech ostatních funkcí, za které je tento enzym zodpovědný, čímž dochází hlavně k poškození GIT, renálnímu poškození a inhibici agregace krevních destiček.
- b) **Preferenční inhibitory COX-2** – patří sem např. nimesulid (obr. 11) a meloxicam (obr. 12). Tyto látky působí na COX-2 ve vyšší míře než na COX-1. Poměr inhibice COX-1 a COX-2 se u jednotlivých látek liší, přičemž nejvíce žádoucí je maximální inhibice COX-2 a minimální inhibice COX-1.

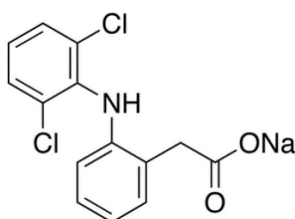
c) **Selektivní inhibitory COX-2** (tzv. coxiby) – do této skupiny řadíme např. celecoxib (obr. 13). Tento typ látek blokuje v podstatě výhradně isoformu COX-2, přičemž vykazuje vysoký protizánětlivý účinek s minimálními vedlejšími účinky na GIT <sup>19</sup>.



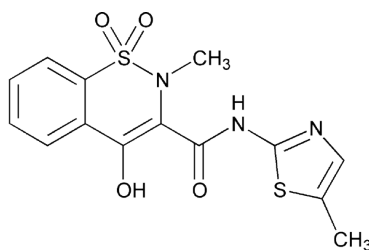
Obr. 9: Strukturální vzorec ibuprofenu



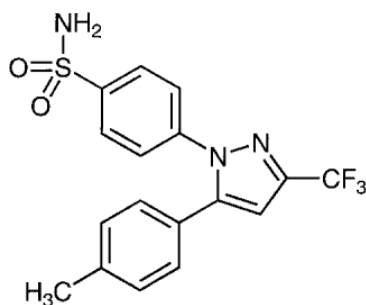
Obr. 10: Strukturální vzorec diklofenaku



Obr. 11: Strukturální vzorec nimesulidu



Obr. 12: Strukturální vzorec meloxicamu



Obr. 13: Strukturální vzorec celecoxibu

Mezi další mechanismy účinku patří také inhibice produkce leukotrienů a volných kyslíkových radikálů, snížení produkce některých cytokinů nebo inhibice uvolňování lyzozomálních enzymů.

Z farmakokinetického hlediska rozlišujeme NSA podle délky biologického poločasu (přibližně odpovídá délce účinku léku) na NSA s krátkým poločasem (1 – 6 hod), se středním poločasem (12 – 14 hod) a s dlouhým poločasem (24 hod a víc). Rychlost nástupu účinku je určena rychlostí jejich vstřebávání z GIT.

Chemicky jsou NSA většinou deriváty jednoduchých organických kyselin, např. fenamáty díky své dobré rozpustnosti v tucích snadno překonávají kožní bariéru, a proto jsou aplikovány ve formě masti nebo gelu. Asi nejrozšířenějším NSA je diklofenak, který je derivátem kyseliny octové.

Většina NSA je metabolizována v játrech na inaktivní metabolity, které jsou následně vylučovány ledvinami. U starších pacientů s poruchou funkce ledvin a jater, se proto musí počítat s jejich kumulováním v organismu, díky čemuž může docházet ke vzniku nežádoucích účinků. NSA se také vyznačují velkou afinitou k plazmatickým bílkovinám a mohou tudíž vytěšňovat ostatní léčiva z této vazby (např. kumarinová antikoagulantia (warfarin) nebo antidiabetika).

NSA jsou indikována pacientům s OA a traumatickou synovialitidou, dále pak také při burzitidách, traumatech svalové tkáně nebo vazivových poraněních. Ve spolupráci s revmatologem jsou podávána pacientům revmatoidní artritidou případně s artritidou při systémových chorobách pojivové tkáně. V neposlední řadě jsou používána jako prevence tvorby paraartikulárních osifikací po implantacích endoprotéz. NSA snižují intenzitu bolesti, zlepšují pohybové funkce postižených kloubů a usnadňují rehabilitaci. U pacientů s nárazovou bolestí (např. při námaze) jsou využívána NSA s krátkým biologickým poločasem. Pacientům s konstantní bolestivostí jsou podávána NSA s dlouhým poločasem.

Nejčastěji jsou NSA podávána perorálně ve formě tablet (např. meloxicam). Další možností je lokální aplikace ve formě masti nebo gelu (např. diklofenak, fenamáty) při lehčích traumatech měkkých tkání, jako jsou třeba distorze, v počátečních stádiích artrózy končetinových kloubů a také u mimokloubního revmatismu (např. burzitidy, kapsulitidy). NSA mohou být podávány i ve formě čípků, sirupů (hlavně u dětí) a v mimořádných případech intravenózně nebo intramuskulárně.

## Nežádoucí účinky

Nejčastější nežádoucí účinky, ke kterým může docházet při léčbě pomocí NSA, jsou účinky na:

- a) GIT – dyspepsie, bolesti břicha, peptidický vřed, cholestáza.
- b) Játra – elevace aminotransferáz, zvýšení hladiny alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy.
- c) Ledviny – přechodné zvýšení hladiny kreatininu, akutní renální selhání.
- d) Krev – hemolytická anemie, trombocytopenie, neutropenie.
- e) Kůže – fotosenzitivita, exantém (urtika).
- f) Centrální nervový systém (CNS) – bolesti hlavy, závratě, hučení v uších.
- g) Dýchání – bronchospasmus.

### 2.3.3.2. SYSADOA (chondroprotektiva)

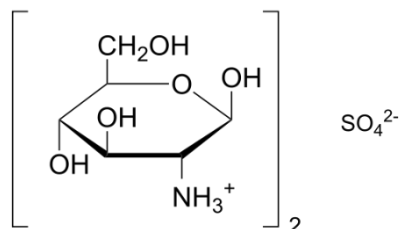
SYSADOA, neboli symptomaticky pomalu působící léky v léčbě OA, jsou látky mající vliv na zpomalení degenerativního procesu a na částečnou obnovu kloubní chrupavky. Některé studie také dokládají jejich vliv na snížení bolesti poškozených kloubů a zlepšení rozsahu pohybu. Účinnost těchto látek na pozitivní změnu struktury chrupavky sice vyžaduje další studie, ale je všeobecně přijímána skutečnost, že mají tzv. chorobu modifikující účinek. Podávání chondroprotektiv teoreticky zmírňuje nerovnováhu mezi syntézou a degenerací proteoglykanů, ke které dochází u OA a jí podobným onemocněním, čímž dochází ke zmírnění poškození nebo obnově kloubní chrupavky. Efekt nastupuje obvykle se zpožděním (za 1 – 2 měsíce) a po vysazení většinou přetrvává po dobu nejméně dalších 2 měsíců. Nejznámějšími látkami, které se řadí do této skupiny jsou glukosaminsulfát, chondroitinsulfát a KH<sup>11</sup>.

### Glukosaminsulfát

Glukosaminsulfát (obr. 14) je ve vodě rozpustný aminomonosacharid. Podobně jako chondroitin se získává ze zvířecích chrupavek a krabích ulit. Některé studie naznačují, že glukosamin inhibuje IL-1 $\beta$ , což může vést ke snížení degradace chrupavky a regulaci zánětu. Glukosamin je prekurzorem při syntéze glykosaminoglykanů, které jsou hlavní součástí chrupavky, a chondroitin sulfátu. Užíváním léčiv s jeho obsahem

tak může docházet ke zvýšení syntézy glykosaminoglykanů a následnému snížení degradace chrupavky <sup>20</sup>.

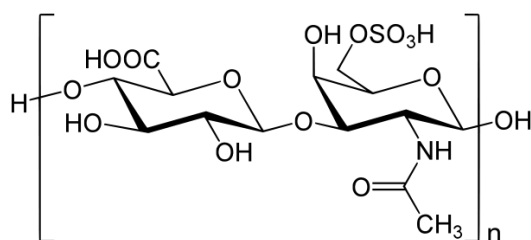
Nežádoucí účinky užívání glukosaminsulfátu zahrnují obtíže GIT (nauzea, zvracení, bolesti břicha, zácpa), bolesti hlavy, palpitace a kožní reakce. Nevyskytují se příliš často a po vysazení léku ustupují <sup>11</sup>.



Obr. 14: Strukturální vzorec glukosaminsulfátu

### Chondroitinsulfát

Chondroitinsulfát (obr. 15) je v těle většinou vázaný na proteiny, se kterými vytváří proteoglykany. Je tvořen nerozvětvenými polysacharidovými řetězci různých délek, které obsahují dva různé monosacharidy – D-glukuronát a N-acetylgalaktosamin. N-acetylgalaktosamin je na hydroxylové skupině v poloze 4 nebo 6 sulfatován. Tyto řetězce jsou navázány na hydroxylové skupiny serinových zbytků v proteinech. Chondroitin je důležitou součástí chrupavky. Jeho záporný náboj zadržuje vodu, čímž dodává chrupavce potřebnou pružnost a odolnost proti opotřebení. Chondroitinu jsou také přisuzovány protizánětlivé účinky, přičemž mechanismus je shodný s glukosaminsulfátem <sup>20</sup>. U některých pacientů může dlouhodobé užívání vyvolávat potíže GIT (nauzea, tlak v žaludku) a kožní vyrážky <sup>11</sup>. Perorální dostupnost se pohybuje v rozmezí 15 – 24 % <sup>20</sup>.



Obr. 15: Strukturální vzorec chondroitinsulfátu

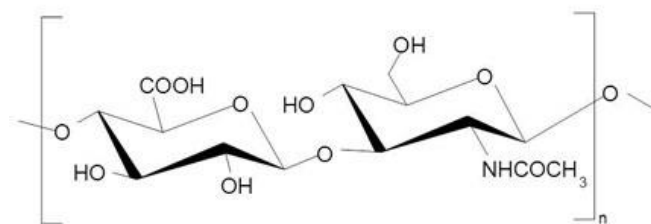
### Kyselina hyaluronová

Jedná se o polysacharid, který tvoří kyselina glukuronová a disacharidové jednotky N-acetylglukosaminu. Většina řetězců je tvořena 12 500 disacharidovými jednotkami. V kloubu najdeme KH (obr. 16) v chrupavce a ST. Je produkována

chondrocyty a synoviocyty. KH je viskoelastická, tzn. má vlastnosti jak elastických pevných těles, tak viskózních tekutin. Při náhlém statickém zatížení působí řetězce KH v globulární konformaci na chrupavčité kloubní ploše jako nárazník. Při pohybu pod vlivem střížných sil se svinutá struktura molekuly rozvine do lineární formy, čímž dochází k poklesu viskozity KH a je optimalizován její lubrikační efekt. Ukončení působení sil vede ke zpětnému nárůstu viskozity a KH nabývá elastických vlastností.

U zdravých lidí se koncentrace KH v ST pohybuje mezi 2,5 – 4 mg/ml. Při OA dochází k poklesu koncentrace na polovinu až třetinu původního množství a k její depolymerizaci. Tím dochází ke snižování její molekulové hmotnosti a současně se také zhoršují její viskoelastické vlastnosti. Proto začala být KH v některých případech aplikována intraartikulárně, tzv. viskosuplementace. Příznivý efekt intraartikulární aplikace není podmíněn pouze náhradou depolymerizované KH, ale také jejími protizánětlivými účinky. Po aplikaci dochází ke snížení hladiny zánětlivých mediátorů včetně prostaglandinů a cyklického adenosinmonofosfátu.

Preparáty obsahující KH jsou neimunogenní, mají přirozené reologické vlastnosti a schopnost difundovat ST. Mezi nežádoucí účinky patří lokální zvýšení teploty, bolest nebo mírný edém. Léčba je spojena i s částečným placebo efektem. Je indikována hlavně u pacientů s rizikovou aplikací NSA nebo pacientům, u kterých nebylo dosaženo ústupu obtíží nasazením NSA celkovou a lokální aplikací.



Obr. 16: Strukturální vzorec kyseliny hyaluronové

### 2.3.3.3. Kortikosteroidy

Lokální injekce kortikosteroidů jsou používány pro zmírnění zánětu a bolesti např. u pacientů s OA, úžinovým syndromem, burzitidami, dnou a revmatoidní artritidou. Terapie pomocí intraartikulární aplikace kortikosteroidů se používá od roku 1953, kdy Hollander publikoval výsledky léčby pacientů s revmatoidní artritidou.

Kortikoidy jsou hormony, které se přirozeně vyskytují v lidském organismu. Jsou produkovány kůrou nadledvin a přímo nebo nepřímo ovlivňují většinu tkání:

- a) Tuková tkáň – lipolytický účinek (zvyšuje hladinu glycerolu a mastných kyselin)
- b) Svalová tkáň – katabolický účinek (úbytek svalové tkáně)
- c) Kostní tkáň – osteoporotický
- d) Krev – úbytek např. erytrocytů, lymfocytů
- e) Kardiovaskulární systém – zvýšení krevního tlaku
- f) Plíce – bronchodilatace
- g) CNS – psychická stabilita, iritabilita
- h) Játra – anabolický účinek (stimulace glukoneogeneze a proteosyntézy)
- i) Imunitní systém – imunosuprese, protizánětlivý účinek

Kortikosteroidy se na cílové buňce váží na plazmatický receptor, pomocí kterého vstupují do buněčného jádra, kde ovlivňují syntézu m-RNA a následně proteosyntézu (hlavně syntézu enzymů). Hlavním mechanismem jejich protizánětlivého účinku je inhibice fosfolipázy A<sub>2</sub>, která uvolňuje kyselinu arachidonovou (prekurzor syntézy prostaglandinů).

Běžně užívané kortikoidy jsou syntetická analoga hydrokortizonu (kortizolu). Suspenze fungují v malých množstvích při rozpouštění povrchu krystalů účinné látky v kontaktu se zánětlivou tkání. V kloubech přestupují do synoviálních buněk a poté jsou vstřebány do krevního oběhu. Jednotlivé preparáty se liší délkou biologického poločasu, rozpustností a rozsahem protizánětlivého účinku. Některé léky obsahují látky s krátkodobým i dlouhodobým účinkem (např. celestone – obsahuje betametazon fosfát a acetát). Tyto preparáty jsou indikovány pacientům s akutním zánětem. Pro pacienty s chronickým zánětem jsou vhodnější látky s dlouhodobým účinkem. Dávka kortikoidu se určuje podle velikosti oblasti, do které je aplikována. Při lokální aplikaci se ke kortikosteroidu přidává i lokální anestetikum, které má diagnostický efekt a také okamžitě ulevuje od bolesti.



## **Aplikace kortikosteroidů**

Nitrokloubní (intraartikulární) aplikace potlačuje zánět, čímž dochází ke zmírnění otoku a bolesti a následnému zvětšení rozsahu pohybu. Tento typ aplikace můžeme využít např. při léčbě:

- a) **Revmatoidní artritidy** – používá se jako doplněk celkové bazální léčby k potlačení zvýšené zánětlivé aktivity jednotlivých kloubů, nebo z důvodu nutnosti změny bazální léčby kvůli malé účinnosti nebo kontraindikacím. Doporučují se maximálně 3 aplikace kortikosteroidů do jednoho kloubu během jednoho roku.
- b) **Artrózy** – lokální aplikace má lepší účinky, pokud jsou obtíže u nosných kloubů (koleno, kyčel) způsobeny zánětlivou reakcí. Při artróze se většinou používá ke zmenšení otoku a bolesti u pacientů, u kterých je např. odkládána implantace totální endoprotézy.

Mimokloubní aplikace se používají např. v případě poranění vazů, onemocnění šlach a úžinového syndromu.

## **Komplikace lokální léčby mohou zahrnovat:**

- a) **Lokální nežádoucí účinky** – pravděpodobnost výskytu se zvyšuje při častých aplikacích vysokých dávek. U 2 – 10 % pacientů se po mimokloubní aplikaci objevuje vzplanutí bolesti. Ve většině případů se jedná o reakci na některou součást suspenze nebo na krystaly kortikoidu. V místě aplikace může docházet ke vzniku lokální depigmentace, subkutánní atrofie, krvácení a případně podlitiny. Při častých aplikacích se mohou tvořit tzv. perikapsulární kalcifikace. K jejich vzniku dochází vysrážením kortikoidů za přítomnosti konzervačních přísad některých lokálních anestetik (např. parabeny). Jedná se o bělavou hmotu na povrchu šlach a kloubní výstelky. Dále může docházet ke vzniku steroidní artropatie, k rupturám šlach a kloubní infekci (např. *Staphylococcus aureus*). Mezi vzácné komplikace patří poškození nervu.
- b) **Celkové nežádoucí účinky** – u 1 – 5 % pacientů se 24 – 48 hod po operaci objevuje začervenání spojené s teplem a pocením tváří. Může také dojít k děložnímu krvácení, u diabetických pacientů může docházet ke zvýšení glykémie. Mezi méně časté nežádoucí účinky patří např. nauzea, pankreatitida

nebo dysforie. Velmi vzácně mohou kortikoidové injekce způsobit anafylaktický šok <sup>11</sup>.

### **2.3.4. Operační léčba**

V ortopedii se využívají jak konzervativní, tak operační léčebné metody. Rozvoj operačních metod umožnil kromě pokroků v oblasti anesteziologie, radiodiagnostiky a aseptického operování, také vznik medicínského průmyslu, který se postupem času vyvinul v těsnou spolupráci výrobců s technicky nadanými ortopedy.

V posledních několika letech došlo také k rozvoji konceptu regenerační medicíny. Jejím účelem je ošetření, regenerace či nahrazení poškozených buněk, tkání nebo celých částí pohybového aparátu. Cílem je snaha o vytvoření integrované funkční jednotky, tvořené kmenovými buňkami a speciálním nosičem, která by byla schopná regenerovat rozsáhlá poškození povrchu chrupavky nebo defekty kostí.

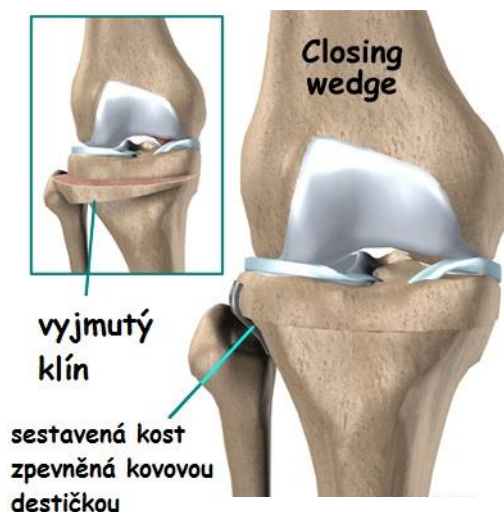
Zjednodušeně můžeme operační léčebné metody rozdělit na:

- a) Výkony prováděné mimo kloub (tzv. extraartikulární operace).
- b) Výkony prováděné na kloubech, které ho zachovávají.
- c) Výkony, při nichž se postižený kloub odstraňuje <sup>12</sup>.

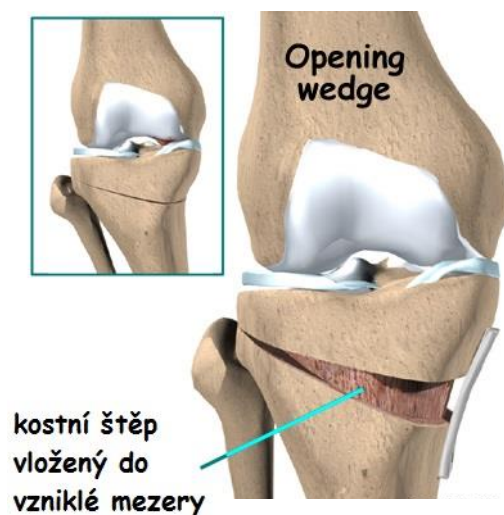
#### **2.3.4.1. Výkony prováděné mimo kloub**

##### **Osteotomie**

Nejčastěji se provádí osteotomie kolenního kloubu, kdy je její pomocí korigován *genus varum* (tzv. nohy do O) nebo *genus valgum* (tzv. nohy do X) vzniklý při OA případně jiném typu onemocnění. Je i jednou z alternativních metod k aloplastice kolenního kloubu <sup>21</sup>. Při osteotomii se protne kost pod nebo nad postiženým kloubem a kostní úlomky se následně sestaví do žádoucího postavení pomocí osteosyntetických prostředků (např. šrouby, dráty a zevní fixátory) <sup>12</sup>. Pro korekci *genus varum* je používána osteotomie holenní kosti, při léčbě *genus valgum* se využívá osteotomie stehenní kosti. Osteotomie bývá prováděna buď tzv. *closing wedge* nebo v posledních letech více používanou tzv. *opening wedge* technikou. *Closing wedge* technika (obr. 17) je založena na vytnutí klínu a následném zpětném sestavení kosti v požadovaném úhlu. U *opening wedge* techniky (obr. 18) dochází k naříznutí kosti a jejímu následnému naklonění do požadovaného úhlu. Vzniklá mezera je posléze vyplněna pomocí kostního štěpu nebo syntetického klínu <sup>21</sup>.



Obr. 17: Closing wedge osteotomie <sup>22</sup>



Obr. 18: Open wedge osteotomie <sup>22</sup>

Osteotomie je doporučována pro pacienty mladší 50 let se stabilními kolenními vazy a s odchylkou úhlu (kyčle – koleno – kotník) maximálně 10 – 15° <sup>21</sup>. Cílem osteotomie je snížení zátěže postiženého místa, zlepšení rozsahu pohybu, úleva od bolesti a vyrovnání délky končetiny nebo jejího tvaru. Po operaci následují různě dlouhé fáze odlehčení (např. pomocí ortéz, francouzských případně podpažních berlí) a intenzivní rehabilitace <sup>12</sup>. Nejčastější příčiny selhání osteotomie jsou nadměrná korekce vedoucí ke vzniku *patella baja* a následnému snížení rozsahu pohybu, nebo degenerace původně zdravé části kloubu <sup>21</sup>.

Mezi extraartikulární výkony v ortopedii dále patří např. amputace, biopsie, dekompresní operace nebo odstranění postižené tkáně (ablace, excize, exstirpace, resekce).

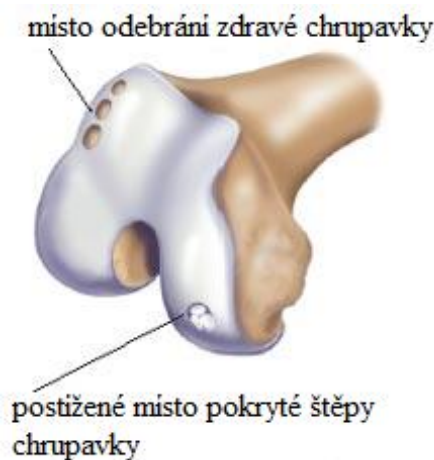
### 2.3.4.2. Výkony zachovávající postižený kloub

#### Débridement

Jedná se o operační postup, při němž dochází k zarovnání kloubního povrchu, zahlazení poškozené části chrupavky, snesení osteofytů, vyjmutí volných tělísek případně ošetření degenerovaného labra.

#### Chondroplastiky

Obnovy poškozeného kloubního povrchu můžeme dosáhnout např. pomocí tzv. mozaikové plastiky, nebo využitím autologních *in vitro* kultivovaných chondrocytů<sup>12</sup>. Metoda mozaikové plastiky (obr. 19) byla vyvinuta na konci 90. let 20. století<sup>23</sup>. Spočívá v autologní transplantaci zdravé chrupavky získané z části kloubu, která nenese váhu. Z postiženého místa jsou nejprve odstraněny fragmenty chrupavky a volná tělíska. Následně jsou implantovány malé cylindrické štěpy chrupavky o průměru 2,7 – 8,5 mm. Velikosti štěpů jsou ve většině případů kombinovány, aby došlo k co nejsouvislejšímu pokrytí poškozeného místa<sup>24</sup>. Mozaiková plastika se používá k léčbě poškozené chrupavky např. v kolenu, kotníku nebo kyčli<sup>23</sup>.



Obr. 19: Mozaiková plastika<sup>25</sup>

Další výkony, které spadají do kategorie výkonů zachovávajících postižený kloub, jsou např. artrolýza, menisektomie, případně sutury a náhrady menisků, stabilizační výkony (řeší problémy nestabilní kloubu) a synovektomie.

### 2.3.4.3. Výkony, při nichž se postižený kloub odstraňuje

#### Artrodéza

Při artrodéze (obr. 20) jsou resekovány povrchy artikulujících kostí a následně jsou sesazeny tak, aby došlo k jejich srůstu ve funkčně příznivém postavení. Stabilita je zajištěna pomocí vnitřní dlahy, zevního fixátoru, šrouby, Kirschnerovými dráty případně sádrou. K začlenění ztuženého kloubu do funkčně pohybových vzorců je využívána rehabilitace. Nevýhodou tohoto zákroku je přetěžování okolních kloubů, narušení pohybových mechanismů, nižší funkční kapacita nebo zkrácení končetiny<sup>12</sup>.



Obr. 20: RTG snímek kolenního kloubu po provedení artrodézy<sup>26</sup>

#### Exartikulace

Jedná se o odstranění distální části končetiny v úrovni kloubu. Indikace k tomuto operačnímu výkonu jsou převážně traumatologické a onkologické, případně nezvládnutelná infekce.

## Aloplastika

Při aloplastice je postižená část kloubu nahrazena endoprotézou<sup>12</sup>. Je považována za jednu z posledních možností léčby kloubních onemocnění. Implantátem může být nahrazen skoro každý kloub lidského těla (včetně prstů na ruku). Nejčastěji je však aloplastika indikována k léčbě onemocnění kolenního a kyčelního kloubu.

Náhrada kolenního kloubu může být buď unikompartmální (obr. 21) nebo totální (obr. 22). Při unikompartmální aloplastice lze nahradit pouze laterální, mediální případně patelofemorální část kloubu, přičemž nejčastěji bývá nahrazována část mediální. Aplikace unikompartmální náhrady by neměla být prováděna u pacientů, kteří trpí deformitami genu varum či valgum většími než 5°, mají poškozený přední zkřížený vaz, subluxaci kloubu větší než 5 mm a zánětlivé artritidy. Celkový výsledek operace závisí na BMI pacienta, jeho věku a předoperačním rozsahu pohybu kloubu. Navzdory těmto kontraindikacím jsou pozorovány dobré až skvělé výsledky u 81 – 90 % pacientů s mírou přežití 10 – 15 let.

Totální endoprotéza je naopak indikována u pacientů, kteří mají výrazně omezený rozsah pohybu, silné bolesti a zdegenerovanou kloubní chrupavku ve více částech kloubu. Dlouhodobé pozorovací studie ukázaly, že 85 – 95 % implantátů vydrží 10 – 15 let<sup>21</sup>.



Obr. 21: Unikompartmální náhrada kolenního kloubu<sup>27</sup>



Obr. 21: Totální endoprotéza kolenního kloubu <sup>28</sup>

### **Historie vývoje implantátů**

Hledání vhodného operačního výkonu, který by řešil omezeně pohyblivý, bolestivý a zcela degenerovaný kolenní kloub, započalo už v 19. století. Počátkem vývoje byla resekční artroplastika, kdy mezi resekované kloubní povrchy byl vkládán lalok z kloubního pouzdra, kůže, svalová tkáň, tuk nebo chromovaná sliznice vepřového močového měchýře. Ve 30. letech minulého století použil Campbell volný fasciální štěp. Výsledky většiny těchto operací nebyly dobré, protože postupně docházelo k rozvoji nestability kloubu, omezení pohybu a také návratu bolesti. Dalším stupněm vývoje bylo použití interpozita z kovu při operaci provedené Campbellem, Boydem a Smith Petersenem.

První TEP, která nahrazovala celý kloubní povrch, byl implantát vyvinutý Waldiusem a Shiersem. K implantaci byla nutná velká resekce kosti. Holenní a stehenní část byla ukotvena intramedulárně mohutnými dřívky a vzájemně spojena kloubem, který umožňoval pohyb pouze v sagitální rovině. Pevné spojení však vedlo k mechanickému uvolňování komponent a k únavovým zlomeninám. Tyto typy TEP byly postupně zdokonaleny tak, že umožňovaly omezený pohyb ve všech rovinách a používají se v mezních onkologických indikacích nebo při těžkém postižení vazivových stabilizátorů kolenního kloubu dodnes. Zároveň se jedná o TEP s nejvyšším stupněm vnitřní stability <sup>11</sup>.

Dalším pokrokem ve vývoji byly vzájemně nespojené kondylární náhrady s nižším stupněm vnitřní stability. Roku 1971 publikoval Gunston velmi dobré krátkodobé výsledky svého „*polycentric knee*“. Pokrokem byla snaha o částečné respektování fyziologické kinematiky kloubu. Implantát byl složen ze dvou tibiálních polyetylenových částí a dvou kovových hemisférických částí nahrazujících povrch kondylů stehenní kosti. Tvar holenních komponent umožňoval při flexi fyziologickou změnu centra rotace kloubu, ke které dochází při zachování zkřížených vazů. Komponenty byly fixovány pomocí kostního cementu <sup>29</sup>. Velmi malé kontaktní plochy ale vedly k velké koncentraci tlaku na jednotku plochy a časnému selhávání TEP. Počátkem 70. let vyvinul Coventry tzv. „*geomedic knee*“, u kterého implantace probíhala se zachováním zkřížených vazů a celkově byly ignorovány principy popsané Gunstonem. Tvar plata holenní kosti byl v sagitální rovině blízký tvaru kondylů stehenní kosti a v kombinaci se zachováním zkřížených vazů nebyl umožněn fyziologický posun, což mělo za následek kinematický konflikt. Chybějící artikulační plocha pro čěšku byla zase příčinou femoropatelárních potíží. Freeman a Swanson vytvořili implantát tvořený z celistvé holenní i stehenní komponenty, jejíž plató mělo konkávní tvar a předpokládalo odstranění obou zkřížených vazů. Kvůli obavě před přílišnou resekci kosti a zhoršením podmínek pro artrodézu neměla holenní komponenta dřík a docházelo tak k jejímu časnému uvolňování <sup>11</sup>.

Roku 1973 vyvinul Insall implantát se stehenní komponentou tvořenou chromkobaltmolybdenem. Komponenta měla také symetrickou přední část a vytvářela artikulační plochu pro čěšku. Polyetylenová holenní komponenta měla dvě konkávní plochy, které zvýšenými okraji kopírovaly tvar kondylů stehenní kosti. Dalšího zvýšení vnitřní stability bylo dosaženo tvarem centrální části plata zasahující mezi kondyly stehenní kosti. Holenní komponenta byla nejprve celá i s dříkem z polyethylenu, později došlo ke zdokonalení využitím kovové části s dříkem, do které byla pevně zasazena polyetylenová vložka. Nerespektování fyziologického posunu kondylů stehenní kosti při pohybu vedlo k omezení flexe na 90 – 100°. V roce 1978 Install a Burstein představili implantát se zadní stabilizací, která simulovala funkci zadního zkříženého vazů. Výhodami tohoto implantátu byl snadnější chirurgický přístup po resekci zadního zkříženého vazů a snadnější balancování vazivových stabilizátorů kolenního kloubu. K nevýhodám patřila ztráta proprioceptivní funkce zadního zkříženého vazů, nutnost větší kostní resekce stehenní kosti, možnost změny výše kloubní linie, a tím zhoršení



funkce femoropatelního kloubu a v neposlední řadě také možnost uskřínutí hypertrofické synovie z oblasti peripatelární nebo z oblasti šlachy m. quadriceps femoris<sup>30</sup>. Tento typ implantátu byl později modifikován dalším zvýšením interkondylické části plata a je využíván k revizním operacím a u pacientů s extrémní valgózní deformitou<sup>11</sup>.

Další směr vývoje udali v polovině 70. let Goodfellow a O'Conner s implantátem „*oxford knee*“. Ten je charakterizován možností pohybu dvou polyethylenových inzertů na kovové destičce na holenní kosti. Stabilita kloubu je potom zajištěna intaktními postranními a zkříženými vazy. Systém pohyblivých polyethylenových artikulačních vložek umožňuje omezený rotační a translační pohyb mezi holenní a tehenní kostí. S cílem prodloužit životnost polyethylenové vložky snížením tlaku na jednotku plochy, je holenní i stehenní komponenta maximálně kongruentní. Možnost pohybu polyethylenových vložek na kovové části holenní komponenty také snižuje zatížení na rozhraní implantát – kost, které je charakteristické pro implantáty s vyšší mírou vnitřní stability. Systém umožňuje použít holenní komponentu s možností zachování obou zkřížených vazů nebo pouze zadního zkříženého vazy. V obou případech je však pohyb realizován dvěma pohyblivými polyethylenovými vložkami, které umožňují vzájemný pohyb v axiální ose i malý předozadní posun. Použití tohoto typu implantátu vyžaduje vytvoření identických prostorů v extenzi i flexi kolenního kloubu a přesné balancování stabilizátorů kolenního kloubu. Přiblížení se k fyziologickým podmínkám umožňuje i celistvá rotační polyethylenová vložka na holenní komponentě. Míra vnitřní stability je potom určena tvarem a kongruencí polyethylenu. Použití tohoto implantátu je také možné v případě, že není zachován zadní zkřížený vaz nebo je ke korekci deformity nutná jeho resekce<sup>31</sup>.

## **Indikace**

Aloplastika kolenního kloubu je elektivní operační výkon, jehož střednědobé i dlouhodobé výsledky s využitím současných implantátů a s dodržением přesné operační techniky jsou velmi dobré, ale stále plně nenahrazují funkci zdravého kolenního kloubu. To je způsobeno zejména absencí předního zkříženého vazy a jeho proprioceptivní funkce a také alterací funkce zadního zkříženého vazy, ke které dochází i za použití implantátu umožňujícího vaz zachovat. Tyto změny jsou častou příčinou omezení flexe v kloubu a souvisí i se spoustou dalších obtíží, se kterými se lze u pacientů po implantaci setkat. Vždy je třeba zvážit obtíže pacienta v souvislosti s jeho věkem a nároky na pohybovou aktivitu, protože zejména u mladších aktivních pacientů s vyššími nároky často dochází

pooperačně ke snížení pohybové aktivity. Před samotnou operací je také nutné seznámit pacienta s možnými komplikacemi zákroku a omezeními, která život s TEP provází.

Základními pilíři indikace jsou:

- a) Anamnéza
- b) Subjektivní potíže
- c) Objektivní vyšetření
- d) RTG nález
- e) Postoj nemocného k operaci

U subjektivních obtíží pacienta často dominuje bolest. Jedná se hlavně o klidovou bolest, často rezistentní vůči konzervativní terapii. Dále to může být nedostatečný rozsah pohybu v postiženém kloubu, který omezuje denní aktivity a nestabilita kloubu alterující nosnost končetiny. U případů s výraznými osovými odchylkami je nutné vzít v úvahu jejich předpokládanou progresi, a tím také zhoršení výchozích podmínek při implantaci. V subjektivním pooperačním hodnocení pacienta hraje hlavní roli odstranění bolesti a zlepšení rozsahu pohybu.

Předpokladem indikace k TEP kolenního kloubu je vyčerpání možností konzervativní léčby. Výrazným rizikovým faktorem u TEP je nadváha, která může způsobovat větší mechanické namáhání implantátu a obtížnější operační přístup ke kloubu, což může vést k alteraci hojení operační rány. Je také nutné vyloučit jinou příčinu obtíží, např. radikulární bolest při degenerativním onemocnění páteře, meniskové léze a burzitidy nebo onemocnění periferního cévního systému.

Nejčastější indikací k provedení TEP kolenního kloubu je gonartróza a zánětlivá revmatická onemocnění (např. revmatoidní artritida). Indikováni k provedení TEP mohou být také pacienti se systémovými onemocněními (např. dna, hemofilie, aseptická nekróza) a s výraznou deformitou kolenního kloubu často valgózního charakteru, u které hrozí progresse, díky které se zhorší podmínky pro případné pozdější provedení implantace.

## **Kontraindikace**

Mezi absolutní kontraindikace pro provedení TEP patří ischemické onemocnění tepen dolních končetin, pokročilá ateroskleróza postihující CNS, závažná kardiopulmonární onemocnění a infekční ložiska postihující kolenní kloub včetně mykóz. Relativními kontraindikacemi jsou věk pacienta, obezita, onemocnění CNS omezující aktivní spolupráci po provedené operaci a infekční ložiska kdekoli v organismu včetně chronických infekčních onemocnění.

## **Komplikace**

Aloplastika je stejně jako každá operace spojena se všemi typickými pooperačními komplikacemi jako jsou:

- a) **Hojení rány** – předpokladem pro úspěšnou operaci je primární zhojení rány. Zpomalené hojení zvyšuje riziko infekce TEP. V prevenci poruch hojení a následné hluboké infekce je třeba vzít v úvahu anatomii cévního zásobení měkkých tkání přední části kloubu, správný výběr kožní incize, šetrnou operační techniku a rizikové faktory ze strany pacienta (obezita, malnutrice, diabetes mellitus). Akutní zánětlivou reakci lze oslabit pomocí NSA a chemoterapie metotrexátem.
- b) **Neurovaskulární komplikace** – poranění peroneálního nervu není častou komplikací (0,3 – 2 %) a zřídka vzniká přímým zásahem nástroje. Nejčastěji bývá způsobeno trakcí a následnou ischemií při korekci valgózní deformity spojené s flexní kontrakturou, těsným obvazem nebo polohou končetiny při operaci.
- c) **Komplikace vycházející z extenzorového aparátu** – zlepšení designu implantátů, přesnější postavení komponent a zdokonalení operační techniky při balancování ligamentózního aparátu vede ke zmenšení počtu komplikací vycházejících z oblasti extenzorového aparátu. Přesto je femoropatelární kloub častou příčinou bolesti a dysfunkce TEP kolenního kloubu, a tím pádem i příčinou revizních operací. Dále může také docházet ke zlomeninám česky vlivem její přílišné resekce, tepelné nekrózy vzniklé při cementování nebo porušením cévního zásobení.
- d) **Pooperační ztuhlost** – omezení pohybu v operovaném kloubu vede k obtížím hlavně při vstávání ze sedu a chůzi po schodech. Pooperační ztuhlost operovaného kloubu způsobená bolestí obvykle odezní za 6 – 8 týdnů a ke zlepšení rozsahu

pohybu dochází asi 3 měsíce po operaci. Ztuhlost kloubu může způsobovat infekce nebo mechanické problémy komponent a vazivových stabilizátorů.

- e) **Tromboembolická choroba** – Incidence fatální plicní embolie je nižší než po alopastice kyčelního kloubu. Častěji vznikají tromby v hlubokých žilách lýtky (85 – 90 %). Součástí prevence vzniku tromboembolické choroby je farmakologická léčba nízkomolekulárními hepariny, perorálními antikoagulancii a léčba za pomoci mechanických pomůcek (např. kompresní punčochy). Významnou prevencí je také časná mobilizace pacienta <sup>11</sup>.
- f) **Infekční komplikace** – alopastika kolenního kloubu je spojena s výskytem infekce asi u 0,4 – 2 % případů. Nejčastěji je způsobena přítomností *Staphylococcus aureus* (50 – 65 %) a *Staphylococcus epidermis* (25 – 30 %) <sup>32</sup>. Významnou rizikovou skupinou jsou pacienti s revmatoidní artritidou, diabetem mellitem, s předcházejícími operačními výkony v oblasti kolenního kloubu, obezitou nebo kožní ulcerací. Možnosti terapie infikované TEP jsou antibiotická suprese, revize, debridement s antibiotickou terapií, resekční artroplastika, artrodéza, reimplantace, případně amputace <sup>11</sup>.
- g) **Patelofemorální komplikace** – incidence patelofemorálních komplikací po provedení alopastiky se pohybuje okolo 2 – 10 %. Mezi tento typ komplikací jsou zahrnovány fraktury čéšky, patelofemorální nestabilita, selhání patelární komponenty a natržení extensorů.
- h) **Opotřebení polyethylenu** – je častou pozdní komplikací TEP kolenního kloubu. Faktory, které mají vliv na rychlost opotřebení polyethylenu jsou váha a pohybová aktivita pacienta, molekulární hmotnost a homogenita polyethylenu, tloušťka polyethylenové vrstvy a shoda s komponentou stehenní kosti. Nejčastěji však k opotřebení polyethylenové části dochází vlivem tření kovové stehenní komponenty o polyethylenovou část hoelnní komponenty při pohybu kloubu. Při procesu opotřebení polyethylenu často dochází k jeho delaminaci, což má za následek odlupování makroskopických kousků, které způsobují osteolýzu. Při asymetrickém opotřebení může docházet ke vzniku varózní nebo valgózní deformity.
- i) **Aseptické uvolňování** – je nejčastější příčinou selhání TEP. K uvolňování TEP dochází vlivem kumulace mechanického stresu a osteolýzy, způsobené

uvolňováním částic z implantátu. Během tohoto procesu dochází k úbytku kostní hmoty pod implantátem, což má za následek pokles implantátu a vychýlení z osy. K selhání holenní komponenty dochází častěji než stehenní<sup>32</sup>.

### **Používané materiály**

Na výrobu TEP je používána celá škála materiálů. Hlavním kritériem, které všechny musí splňovat je inertnost a odolnost vůči opotřebením. Právě opotřebením materiálů a s ním spojené uvolňování fragmentů, primárně z polyethylenových komponent, stojí za jedním z nejčastějších důvodů selhání endoprotézy – aseptickým uvolňováním<sup>21</sup>. Většina moderních implantátů kolenního kloubu je tvořena stehenní komponentou z Co-Cr slitiny a holenní polyethylenovou vložkou upevněnou na titanové destičce. Kobaltové slitiny jsou převážně složeny z kobaltu, chromu a molybdenu a jsou široce používány nejen k výrobě stehenních komponent, ale i jiných implantátů. Vyznačují se svojí tvrdostí, odolností vůči korozi a biokompatibilitou. Jejich nevýhodou je, že v malé míře mohou obsahovat také nikl a železo, což může u některých pacientů vyvolávat alergické reakce. Titan a jeho slitiny se kromě vysoké biokompatibility vyznačují také lehkostí. Jejich velkou nevýhodou ovšem je, že snadno může dojít k jejich poškrábání, čímž se zvyšuje opotřebením implantátu. Čistý titan se používá pouze k povrchovému ošetření implantátu, protože usnadňuje a urychluje vrůstání kosti do implantátu. Ze slitin titanu se na výrobu implantátů využívají především Ti6Al4V a Ti6Al7Nb.

Nedávno byla pro výrobu stehenní komponenty vyvinuta slitina zirkonia. Termicky řízenou oxidací je kovová slitina zirkonu převedena na oxid (tzv. oxinium), který spojuje odolnost keramiky a pevnost kovu. Klinické studie zatím ukazují dobré výsledky dva a pět let po provedení alopplastiky. Další novou slitinou je pórovitý tantal, jehož unikátní vlastnosti ho dělají vhodnou alternativou k ostatním používaným materiálům. Jeho pórovitá struktura umožňuje vrůstání kosti do implantátu a elasticita zase dovoluje fyziologické přenesení napětí z implantátu na kost, čímž se snižuje napětí na jejich rozhraní.

K výrobě holenních vložek se využívá polyethylen o ultravysoké molekulární hmotnosti. Jeho vlastnosti jako pevnost, odolnost proti opotřebením, nízké tření a možnost vytvarovat ho do požadovaných tvarů přispěli k jeho vysoké popularitě. Gama záření používané ke sterilizaci polyethyleny také zvyšuje jeho zesíťování a tím současně jeho

odolnost proti opotřebení. Bohužel gama záření podporuje tvorbu volných radikálů, které v kombinaci s kyslíkem mohou způsobovat oxidativní degeneraci polyethylenu. Z tohoto důvodu bývá polyethylen sterilizován v prostředí bez přítomnosti kyslíku. Stabilizace případně vznikajících volných radikálů lze docílit i přidáním antioxidantu (např. vitamín E), který zároveň zlepšuje odolnost polyethylenu proti vzniku a šíření únavových trhlin.

### **Způsoby fixace**

Implantáty mohou být fixovány buď cementem, nebo bez něj. Kostní cement je směsí akrylového cementu (polymethylmetakrylát) a dalších přísad zahrnujících barium (zajišťuje výsledné směsi radiokontrast) a antibiotika. Fixace bez cementu spočívá ve speciální úpravě povrchu implantátu tak, že kost jej buď obrostne anebo do něj přímo vrostne. Toho je dosaženo pomocí např. speciálního síťovaného povrchu implantátu, případně pomocí některých pórovitých kovů (titan) či hydroxyapatitu. Endoprotézy kolenního kloubu jsou ve většině případů fixované cementem nebo hybridní s bez cementově fixovanou stehenní komponentou a cementovanou holenní komponentou <sup>33</sup>.

### **Testování nových materiálů**

Nové materiály na výrobu TEP musí projít preklinickým testováním, které by mělo simulovat prostředí, jakému budou materiály vystaveny uvnitř lidského těla <sup>34</sup>. Všechny provedené testy musí splňovat podmínky, které doporučují mezinárodní normy ISO 14243-1 <sup>35</sup> a ISO 14243-3 <sup>36</sup>. Při testování jsou využívány simulátory kloubních náhrad, ve kterých je jako mazací tekutina použito bovinní sérum reprezentující ST. Studie z posledních několika let však ukazují, že bovinní sérum nedokáže plně napodobit ST v *in vivo* podmínkách. Výsledky biotribologických *in vitro* testů, které se zabývají stanovením otěru a opotřebení materiálů používaných na výrobu TEP, se od klinických zjištění opotřebení TEP v lidském těle značně liší <sup>34,37-39</sup>. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben vyšším množstvím bovinního séra, které se při biotribologických testech používá <sup>39</sup> a dále složením bovinního séra, které se značně liší od složení ST po implantaci TEP do lidského těla <sup>37,38</sup>. Normy (ISO 14243-1 a ISO 14243-3) v současné době doporučují používání bovinního séra s celkovou koncentrací proteinů 17 g/l, přičemž v ST zdravého kloubu byla stanovena koncentrace až 30 g/l <sup>40</sup>. Norma se omezuje pouze na toto doporučení, přičemž nezohledňuje složení ST např. obsah jednotlivých proteinových frakcí, celkovou koncentraci KH a koncentraci různých molekulových

hmotností KH, obsah stopových prvků (např. Ca, Mg), osmolalitu a viskozitu mazací kapaliny a další vlastnosti, které by mohly mít vliv na opotřebení implantátu<sup>37</sup>. Poslední studie jsou proto zaměřeny na stanovení co nejpřesnějšího složení ST po TEP kolenního kloubu a navržení složení mazací kapaliny pro biotribologické testy, která by se co nejvíce podobala složení ST v klinických podmínkách<sup>34,37,38</sup>.

### 3. Cíle práce

Záměrem předkládané diplomové práce bylo porovnat složení kloubních výpotků odebraných od čtyř skupin pacientů: *i*) s asepticky selhávající totální endoprotézou (TEP) kolenního kloubu, *ii*) s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprotetické osteolýzy, *iii*) bez TEP a s posledním stádiem osteoartrózy a *iv*) bez TEP, bez osteoartrózy a bez známek zánětu.

Konkrétní cíle byly:

- a) Stanovení celkové koncentrace proteinů a jednotlivých frakcí proteinů ve vzorcích kloubních výpotků.
- b) Stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové a molekulová distribuce kyseliny hyaluronové ve vzorcích kloubních výpotků.



## 4. Experimentální část

### 4.1. Biologický materiál

Od listopadu 2012 do října 2014 byly za přísně aseptických kautel odebrány KV z kolenního kloubu u 90 pacientů. Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin:

- a) Pacienti s asepticky selhávající TEP kolenního kloubu (**případy**)
- b) Pacienti s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprotetické osteolýzy (**K1**)
- c) Pacienti bez TEP a s posledním stádiem OA (**K2**)
- d) Pacienti bez TEP, OA a bez známek zánětu (**K3**)

KV byly odebrány standardní technikou kloubní punkce na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. U pacientů, kteří byly reoperováni, proběhl odběr těsně před protětím kloubního pouzdra. Aspirovaný KV byl transportován ve vychlazeném polystyrenovém boxu na Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc, kde byl následně zpracován podle předem daného protokolu.

Odběr a zpracování KV bylo prováděno s povolením etické komise LF UP a FN Olomouc v souladu s českou legislativou. Všichni pacienti podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

#### 4.1.1. Zpracování kloubního výpotku

Aspirované KV byly po transportu ihned centrifugovány (10 min, 2500 rpm, 4° C), aby došlo k odstranění buněk a jiných částic. Poté byly vzorky rozděleny na alikvoty (2 ml) a zamraženy (-80 °C).

## 4.2. Chemikálie, roztoky, přístroje a spotřební materiál

### 4.2.1. Chemikálie

Agarosa, bromfenolová modř, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, Coomassie blue, CuSO<sub>4</sub>, EDTA, ethanol, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, methanol, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH, sacharóza, Stains-All, Tris, Hyaluronidáza (z hovězích varlat) – byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich (USA).

Select-HA LoLadder, Select-HA HiLadder, Select-HA MegaLadder – byly zakoupeny od firmy AMS Biotechnology (Velká Británie).

Pronáza (*Streptomyces griseus*, nuclease free, specific activity 89,0254 PUK/mg) – byla zakoupena od firmy Calbiochem (USA).

Tris-barbitalový pufr (10x) byl zakoupen od firmy Sebia (USA).

## **4.2.2. Roztoky**

### **4.2.2.1. Stanovení proteinových frakcí**

#### **Fyziologický roztok**

0,9 % NaCl

#### **Tris-barbitalový pufr**

Pro experimenty byl zásobní roztok 10x zředěn.

#### **Fosfátový pufr (PBS)**

NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,00896 mol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,00147 mol/l)

#### **Roztok Coomassie blue**

Coomassie blue (1,25 g), methanol (250 ml), CH<sub>3</sub>COOH (50 ml), deionizovaná voda (200 ml)

#### **Odbarvovací roztok**

Methanol (125 ml), CH<sub>3</sub>COOH (35 ml), deionizovaná voda (340 ml)

#### **Hyaluronidáza**

Roztok hyaluronidázy (71 g/l) byl připraven rozpuštěním 3,55 mg v 50 µl PBS

### **4.2.2.2. Stanovení molekulové distribuce kyseliny hyaluronové**

#### **Pronáza**

Roztok pronázy (3040 PUK) byl připraven rozpuštěním 34,148 mg v roztoku NaCl (0,15 mol/l).

#### **TAE pufr**

10x TAE: Tris (400 mmol/l), CH<sub>3</sub>COONa (50 mmol/l), EDTA (9 mmol/l); pH = 7,9; pro experimenty byl zásobní roztok 10x zředěn.

### **Roztok bromfenolové modři**

Roztok bromfenolové modři (0,02%) se sacharózou (2 mol/l) byl připraven rozpuštěním 2 mg bromfenolové modři a 6,85 g sacharózy v TAE pufu.

### **Barvicí roztok**

Barvicí roztok (0,005%) byl připraven rozpuštěním 0,05 g Stains-All v 1000 ml 50% ethanolu.

### **4.2.3. Přístroje**

Magnetická míchačka *RH digital* (IKA; Německo)

Mikrovlnná trouba (Daewoo Electronics; Jižní Korea)

Minitřepačka *VX-200* (Labnet International; USA)

pH metr *inoLab Level 1* s elektrodou *SenTix41* (WTW; Německo)

Skener *CanoScan 5600F* (Canon; Japonsko)

Spektrofotometr *Infinite 200 Pro* (Tecan; Rakousko)

Sušárna *KCW 100* (LAB system; Česká Republika)

System pro elektroforézu se zdrojem napětí *PowerPac universal* (Bio-Rad Laboratories; USA)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf; Německo)

Váhy *AX105 Delta Range* (Mettler Toledo; Švýcarsko)

Vodní lázeň *OLS 200* (Grant Instruments; Velká Británie)

### **4.2.4. Spotřební materiál**

Plastové mikrozkuřavky, automatické pipety, sterilní špičky (Eppendorf; Německo)

Hydragel Protein K20 kit (Sebia; USA)

Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (HA – ELISA) (Echelon; USA)

## 4.3. Metody

### 4.3.1. Stanovení celkových proteinů

**Princip metody:** Koncentrace celkových proteinů byla stanovena Biuretovou metodou. Metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidu izolovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu <sup>41</sup>.

KV byly naředěny fyziologickým roztokem v poměru 1 : 1. K 50  $\mu$ l KV byly přidány 2 ml 10 % roztoku NaOH, 250  $\mu$ l 1 % roztoku CuSO<sub>4</sub> a byla provedena inkubace (25 min; pokojová teplota). Poté bylo 200  $\mu$ l roztoku přepipetováno na 96-jamkovou desku a změřena absorbance při 546 nm.

Celková koncentrace proteinů byla vyhodnocena metodou kalibrační křivky.

### 4.3.2. Stanovení proteinových frakcí

**Princip metody:** Koncentrace proteinových frakcí (albuminu a  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinu) byly stanoveny pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Tato metoda využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku <sup>42</sup>.

Vzorky KV byly naředěny hyaluronidázou v poměru 20:1 <sup>37</sup>. Do jamek aplikačního hřebene bylo napipetováno 10  $\mu$ l vzorku (dublet) a inkubováno ve vlhké komůrce (8 min; pokojová teplota). Po inkubaci byly vzorky pomocí aplikačního zařízení přeneseny z aplikačního hřebene na agarosový gel, ten byl následně přenesen do elektroforetické vany s Tris-barbitalovým pufrem a provedena elektroforéza (30 min; 90 V; pokojová teplota). Po ukončení elektroforézy byl agarosový gel usušen (80°C, 2 hod), obarven v roztoku Coomassie blue (4 min) a postupně odbarven ve třech lázních s odbarvovacím roztokem (3x2 min). Na závěr byl gel opláchnut destilovanou vodou, usušen při pokojové teplotě a naskenován.

Vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky programem ElfoMan 2.6. U každého vzorku bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých frakcí a následně byla z celkové koncentrace proteinů vypočtena koncentrace jednotlivých frakcí ve vzorku.

### 4.3.3. Stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové

**Princip metody:** Koncentrace kyseliny hyaluronové byla stanovena metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Tato metoda je založena na specifické reakci mezi antigenem a protilátkou, která je imobilizována na pevný povrch (jamka mikrotitrační destičky). Detekční protilátka je značena pomocí enzymu, který katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt, jehož množství je stanoveno spektrofotometricky<sup>43</sup>.

Vzorky KV byly naředěny ředícím roztokem (1 : 1500). Ke 100  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l HA detektoru a inkubováno (1 hod; 37 °C) na 96-jamkové desce. Poté bylo z každé jamky odebráno 100  $\mu$ l roztoku, přeneseno na 96-jamkovou desku pokrytou specifickou monoklonální protilátkou a inkubováno (30 min; 4 °C). Následně byl roztok z desky odstraněn, jamky byly opláchnuty promývacím pufrům (3x100  $\mu$ l) a bylo aplikováno 100  $\mu$ l enzymu. Po inkubaci (30 min; 37 °C) byly jamky opláchnuty promývacím pufrům (3x100  $\mu$ l) a bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku substrátu (45 min; pokojová teplota; tma). Poté byla reakce ukončena přidáním 50  $\mu$ l zastavovacího roztoku a změřena absorbance žlutě zbarveného produktu při 405 nm.

Celková koncentrace KH byla vyhodnocena metodou kalibrační křivky.

### 4.3.4. Stanovení molekulové distribuce kyseliny hyaluronové

**Princip metody:** Molekulová distribuce kyseliny hyaluronové byla stanovena pomocí elektroforézy na agarosovém gelu (viz. 4.3.2.)

#### Příprava vzorků

KV byly smíchány s roztokem pronázy v poměru 2:1 a inkubovány (5 hod, 37°C, 300 rpm). Takto připravené vzorky byly do provedení elektroforézy uchovány při 4°C. Před použitím byly KV naředěny TAE pufrům se sacharózou (2 mol/l) a bromfenolovou modří tak, aby výsledná koncentrace KH ve vzorcích byla 0,5 mg/ml.

#### Příprava agarosového gelu (0,5%)

1,67 g agarosy bylo rozpuštěno ve 300 ml deionizované vody, povařeno v mikrovlnné troubě a vytemperováno ve vodní lázni (48 °C, 15 min). Poté bylo k roztoku agarosy přidáno 36 ml 10x TAE pufru, směs byla nalita do elektroforetické vany

a po 20 min byl vzniklý gel převrstven 1x TAE pufrem. Agarosový gel byl před elektroforézou uskladněn (noc, pokojová teplota).

## **Provedení**

Vzorky KV (7 µg/jamku; 14 µl) a markery molekulové hmotnosti (LoLadder, HiLadder a MegaLadder) byly aplikovány v dubletu do jamek připraveného agarosového gelu a následně byla provedena elektroforéza (8 hod; 60 V; pokojová teplota). Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do vany s roztokem Stains-All (noc; pokojová teplota) a obarven. Poté byl gel přenesen do vany s deionizovanou vodou (1 hod, míchání na houpačce), odbarven na světle (20 min) a naskenován<sup>44</sup>.

## **Vyhodnocení**

Vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky pomocí programu ElfoMan 2.6, kdy byl sken gelu nařezán podle jednotlivých markerů molekulové hmotnosti a u každého markeru bylo stanoveno jeho procentuální zastoupení ve vzorku KV. Následně byla z celkové koncentrace KH vypočtena koncentrace jednotlivých molekulových hmotností KH.

### **4.3.5. Statistické vyhodnocení**

Ke statistickému vyhodnocení byl použit statistický software IBM SPSS Statistics 22 a program Microsoft Excel 2010.

Pro porovnání čtyř skupin byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Tento test byl zvolen kvůli malé velikosti porovnávaných vzorků. Popisná statistika byla provedena pomocí statistických ukazatelů – mediánu, minima a maxima. Výsledky byly přehledně shrnuty do tabulek. V tabulkách je uvedena hodnota mediánu, nejnižší naměřená hodnota (minimum), nejvyšší zjištěná hodnota (maximum) a dosažená hladina statistické signifikance (p) Kruskal-Wallisova testu. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Pokud byla dosažená hladina signifikance nižší než 0,05 (v tabulce zvýrazněno tučným písmem), považovali jsme rozdíly mezi skupinami za statisticky významné. Následně byly provedeny post hoc testy mnohonásobného porovnávání neparametrickými Mann-Whitney U-testy s Bonferroniho korekcí. Výsledky post hoc testů (signifikance) jsou uvedeny v krabicových grafech pomocí svorek. Krabicové grafy ukazují rozložení veličin, u nichž byly nalezeny významné rozdíly mezi skupinami. Vodorovná čára v krabici znázorňuje hodnotu mediánu, dolní hrana krabice hodnotu 1. kvartilu, horní hrana hodnotu 3. kvartilu.

Anténky ukazují maximální a minimální naměřené hodnoty, pokud byly v souboru nalezeny odlehlé a extrémní hodnoty jsou zakresleny kroužky a hvězdičkami.

Homogenita porovnávaných souborů vzhledem k pohlaví byla ověřena Fisherovým přesným testem.

## 5. Výsledky

Pro analýzu KV byly odebrány vzorky od 25 pacientů s asepticky selhávající TEP kolenního kloubu (**Případy**), 17 pacientů s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprostetické osteolýzy (**K1**), 31 pacientů bez TEP a s posledním stádiem osteoartrózy (**K2**) a 17 pacientů bez TEP, bez osteoartrózy a bez známek zánětu (**K3**). Základní charakteristika pacientů v jednotlivých skupinách je uvedena v tab. 3. U skupiny K3 byl zaznamenán signifikantně nižší věk pacientů v porovnání se skupinami případy, K1 a K2. Dále nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v pohlaví pacientů ( $p = 0,119$ ) mezi skupinami.

Tabulka 3: Základní charakteristika pacientů v jednotlivých skupinách

Skupina		Případy	K1	K2	K3
Pohlaví	Muži	8	10	18	11
	Ženy	17	7	13	6
Celkem		25	17	31	17
Věk [roky]		67,2 (61,0; 74,9)	69,1 (65,4; 77,0)	62,9 (55,3; 71,5)	37,6 (28,3; 44,3)*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (minimum; maximum). \* hodnota je signifikantně odlišná od hodnot ve skupinách případy ( $p < 0,0001$ ), K1 ( $p < 0,0001$ ) a K2 ( $p < 0,0001$ ).

### 5.1. Stanovení celkových proteinů a proteinových frakcí

Koncentrace celkových proteinů v KV byla stanovena pomocí Biuretovy metody. U skupiny K3 byla nalezena vyšší koncentrace celkových proteinů v porovnání se skupinou případy ( $p = 0,074$ ) a K2 ( $p = 0,055$ ), přestože hodnoty signifikance jsou hraniční (tab. 4, graf I).

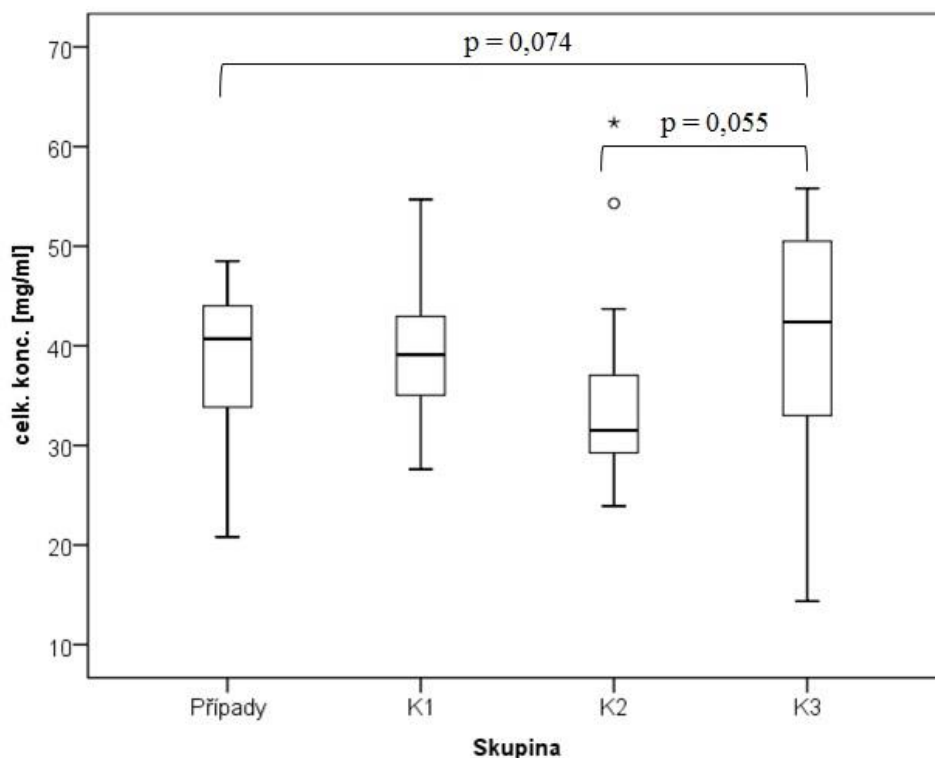
Ke stanovení koncentrace proteinových frakcí (albuminu a  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinů) v KV byla využita elektroforéza na agarosovém gelu (obr. 23). U skupiny K2 byla pozorována signifikantně nižší koncentrace albuminu v porovnání se skupinami případy ( $p < 0,0001$ ) a K1 ( $p = 0,036$ ), viz graf II. Dále byla u skupiny K2 pozorována signifikantně nižší koncentrace  $\beta_1$ -globulinu v porovnání se skupinou K3 ( $p = 0,047$ ), viz graf III. U dalších studovaných proteinových frakcí ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinů) nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami (tab. 4).



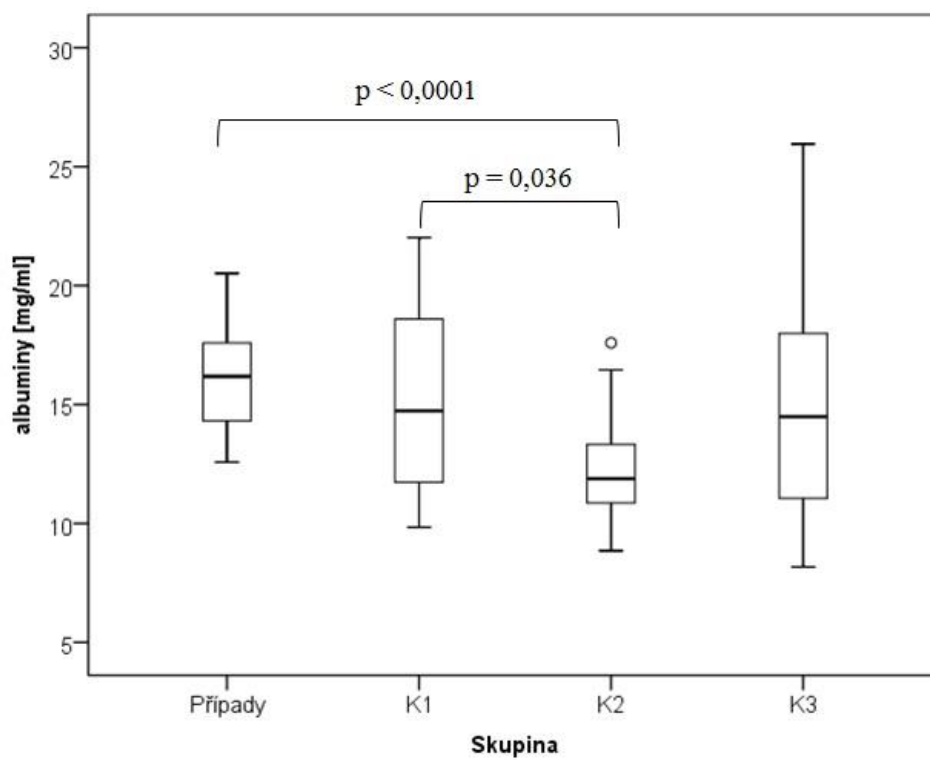
Tabulka 4: Koncentrace celkových proteinů a proteinových frakcí u jednotlivých skupin pacientů

	Případy	K1	K2	K3	p
<b>celkové proteiny</b> [mg/ml]	40,7 (20,8; 48,5)	39,1 (27,6; 54,7)	31,5 (23,9; 62,4)	42,4 (14,4; 55,8)	0,011
<b>albuminy</b> [mg/ml]	16,2 (12,6; 20,5)	14,7 (9,8; 22,0)	11,9 (8,9; 17,6)	14,5 (8,2; 26,0)	0,0001
<b>α<sub>1</sub>-globuliny</b> [mg/ml]	2,0 (0,5; 4,6)	2,3 (1,1; 3,1)	1,8 (1,0; 6,3)	2,5 (0,6; 4,6)	0,085
<b>α<sub>2</sub>-globuliny</b> [mg/ml]	3,5 (1,3; 7,1)	4,1 (1,9; 8,5)	3,9 (2,0; 12,0)	4,5 (0,9; 8,8)	0,483
<b>β<sub>1</sub>-globuliny</b> [mg/ml]	5,7 (2,1; 7,3)	5,3 (2,8; 10,4)	4,4 (2,7; 8,6)	6,1 (1,5; 9,0)	0,017
<b>β<sub>2</sub>-globuliny</b> [mg/ml]	2,2 (0,0; 4,0)	1,8 (1,0; 4,2)	1,8 (1,1; 6,2)	2,2 (0,9; 4,4)	0,653
<b>γ-globuliny</b> [mg/ml]	9,6 (3,8; 13,7)	10,0 (6,7; 15,0)	8,9 (5,1; 18,2)	11,0 (3,2; 20,4)	0,220

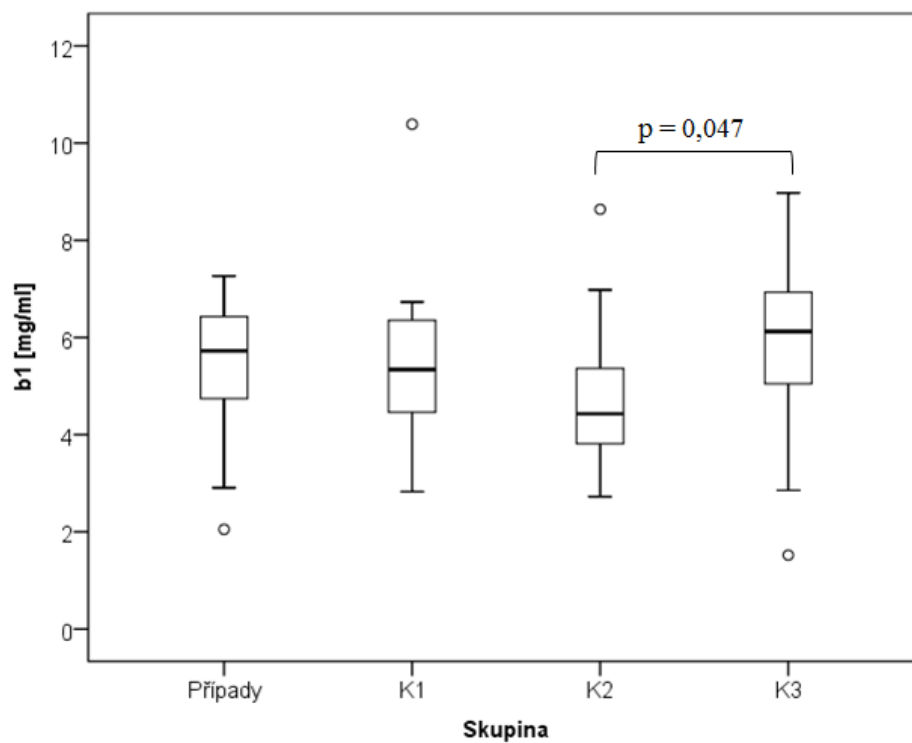
K vyhodnocení hladiny signifikance (p) byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.



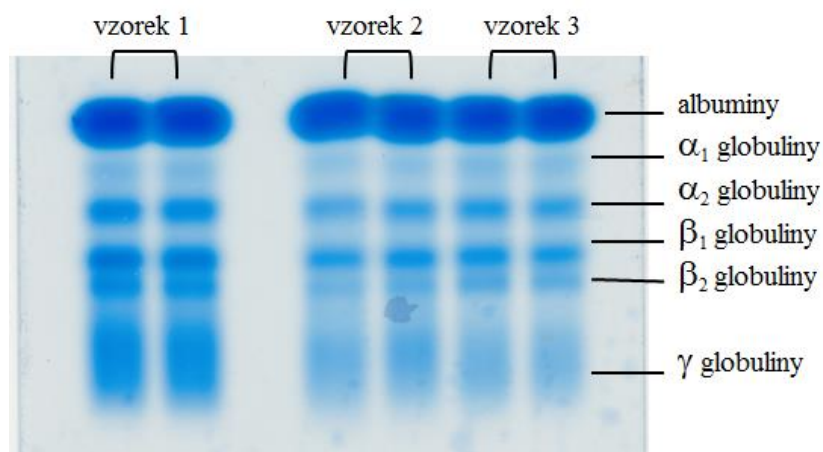
Graf I: Koncentrace celkových proteinů



Graf II: Koncentrace albuminu



Graf III: Koncentrace  $\beta_1$ -globulinu



Obr. 23: Zastoupení jednotlivých proteinových frakcí ve vzorcích KV. Uvedená data jsou reprezentativním výsledkem stanovení.

## 5.2. Stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové a její molekulová distribuce

Celková koncentrace KH ve vzorcích KV byla stanovena metodou ELISA. Výsledky ukazují, že mezi skupinami případy, K1, K2 a K3 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v celkové koncentraci KH (tab. 5).

Ke stanovení koncentrace jednotlivých molekulových hmotností KH ve vzorcích KV byla použita metoda elektroforézy na agarosovém gelu (obr. 24). Konkrétně byly studovány molekulové hmotnosti 6100, 4570, 3050, 1520, 1090, 966, 572, 495, 310, 214 a 110 kDa.

U skupiny K1 byl pozorován statisticky významný pokles koncentrace KH u molekulových hmotností 4570 ( $p = 0,034$ ; graf IV), 3050 ( $p = 0,04$ ; graf V), 1520 ( $p = 0,032$ ; graf VI) a 1090 ( $p = 0,032$ ; graf VII) v porovnání se skupinou K3. Dále byl u skupiny K1 pozorován statisticky významný pokles koncentrace KH u molekulových hmotností 3050 ( $p = 0,032$ ; graf V), 1520 ( $p = 0,006$ ; graf VI), 1090 ( $p = 0,012$ ; graf VII), 966 ( $p = 0,029$ ; graf VIII), 572 ( $p = 0,018$ ; graf IX), 495 ( $p = 0,018$ ; graf X) a 310 ( $p = 0,035$ ; graf XI) v porovnání se skupinou K2. U nejvyšší molekulové hmotnosti (6100 kDa), ani u dvou nejnižších molekulových hmotností KH (210 a 110 kDa) nebyl pozorován žádný signifikantně významný rozdíl v koncentracích mezi jednotlivými skupinami. Překvapivě nebyl pozorován signifikantní rozdíl v molekulové

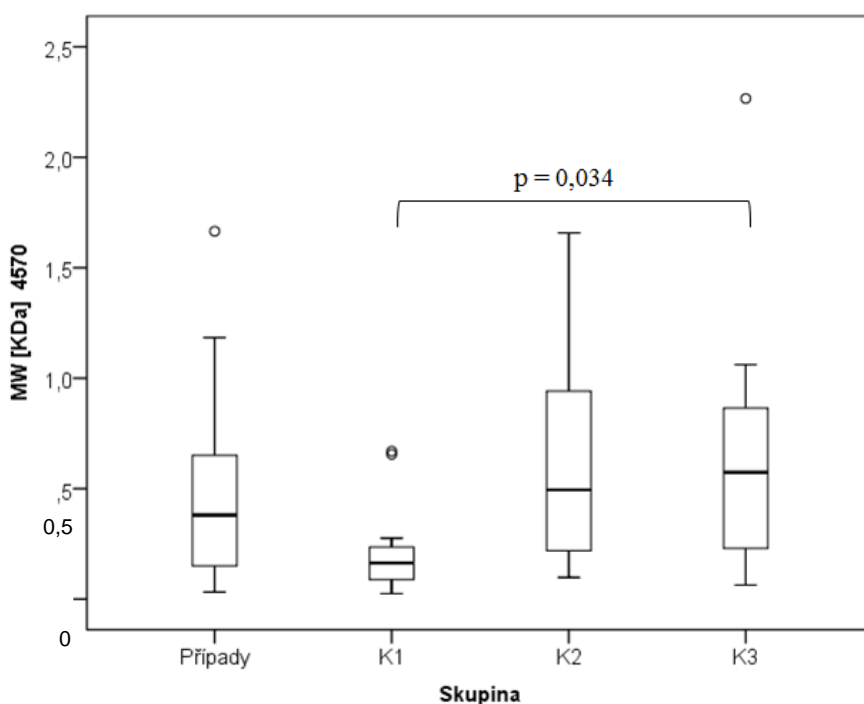
distribuci KH mezi skupinami s TEP kolenního kloubu (případy a K1) ani mezi skupinami bez TEP (K2 a K3).

Tabulka 5: Celková koncentrace KH a koncentrace molekulových hmotností KH

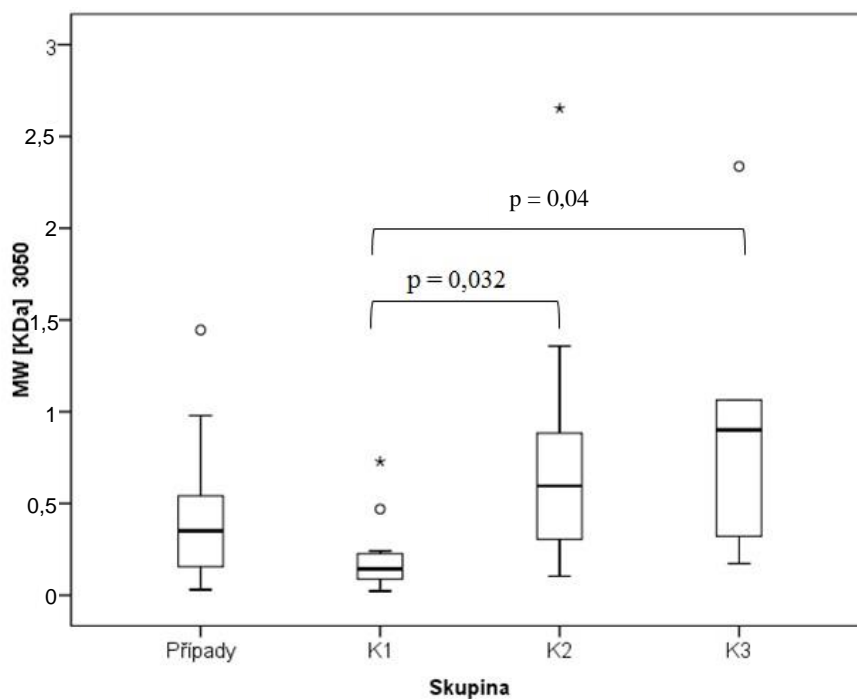
	<b>Případy</b>	<b>K1</b>	<b>K2</b>	<b>K3</b>	<b>p</b>
<b>KH [mg/ml]</b>	3,6 (0,3; 16,7)	1,7 (0,2; 16,5)	5,7 (0,7; 15,8)	2,9 (0,4; 25,7)	0,041
<b>MW 6100</b>	0,4 (0,0; 1,5)	0,1 (0,1; 0,9)	0,8 (0,1; 1,6)	0,5 (0,1; 1,7)	0,051
<b>MW 4570</b>	0,4 (0,0; 1,7)	0,2 (0,0; 0,7)	0,5 (0,1; 1,7)	0,8 (0,1; 2,3)	0,028
<b>MW 3050</b>	0,4 (0,0; 1,5)	0,1 (0,0; 0,7)	0,6 (0,1; 2,7)	0,9 (0,2; 2,3)	0,005
<b>MW 1520</b>	0,3 (0,0; 1,4)	0,1 (0,0; 0,8)	0,6 (0,1; 2,7)	0,4 (0,1; 2,4)	0,003
<b>MW 1090</b>	0,3 (0,0; 1,5)	0,1 (0,0; 0,9)	0,5 (0,1; 1,7)	0,3 (0,0; 2,2)	0,005
<b>MW 966</b>	0,3 (0,0; 1,2)	0,1 (0,0; 1,9)	0,6 (0,1; 1,7)	0,3 (0,0; 2,4)	0,014
<b>MW 572</b>	0,3 (0,0; 1,3)	0,1 (0,0; 2,0)	0,6 (0,1; 1,6)	0,3 (0,0; 2,5)	0,008
<b>MW 495</b>	0,3 (0,0; 1,2)	0,1 (0,0; 2,2)	0,6 (0,1; 1,3)	0,3 (0,0; 2,5)	0,010
<b>MW 310</b>	0,3 (0,0; 1,4)	0,1 (0,0; 1,8)	0,5 (0,1; 1,5)	0,2 (0,0; 2,3)	0,024
<b>MW 214</b>	0,3 (0,0; 1,8)	0,1 (0,0; 2,4)	0,5 (0,1; 1,5)	0,1 (0,0; 2,4)	0,062
<b>MW 110</b>	0,3 (0,0; 1,4)	0,2 (0,0; 2,0)	0,5 (0,1; 1,4)	1,3 (0,1; 2,6)	0,092

KH [mg/ml] - celková koncentrace KH. MW [KDa] – molekulová hmotnost jednotlivých frakcí KH.

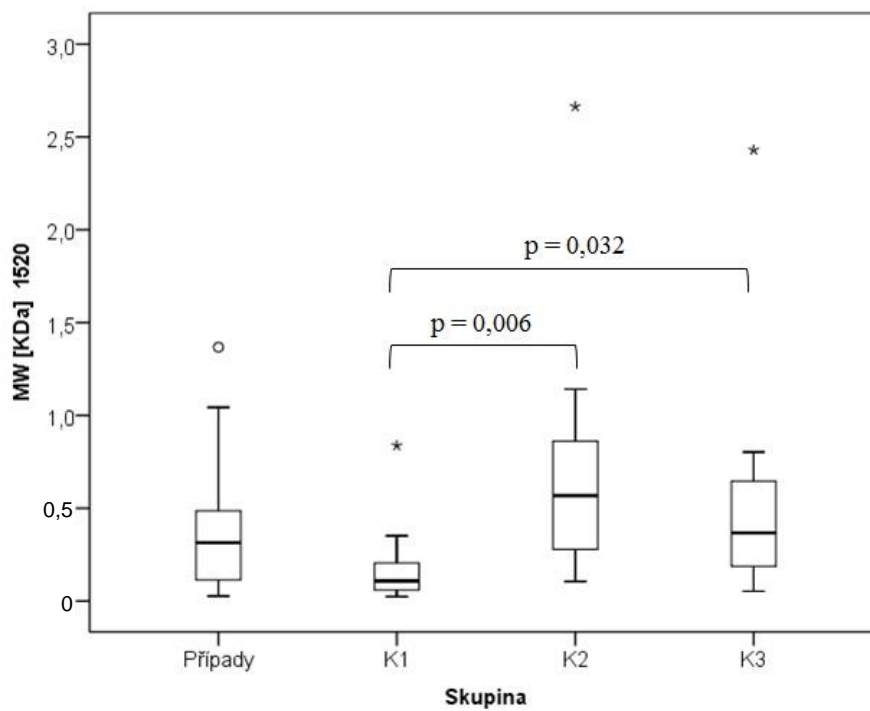
K vyhodnocení hladiny signifikance (p) byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.



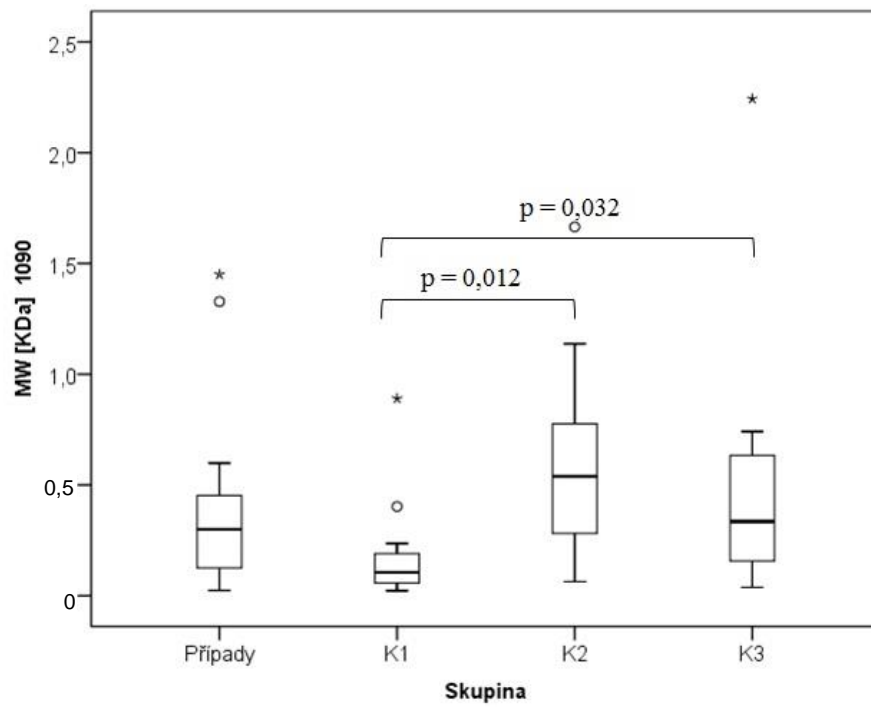
Graf IV: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 4570 KDa.



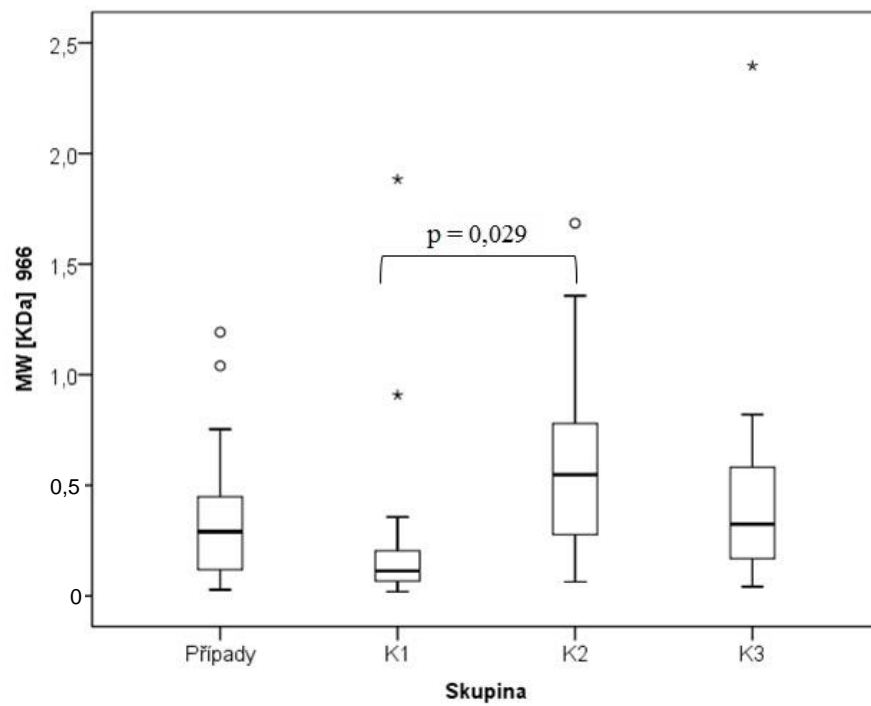
Graf V: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 3050 KDa.



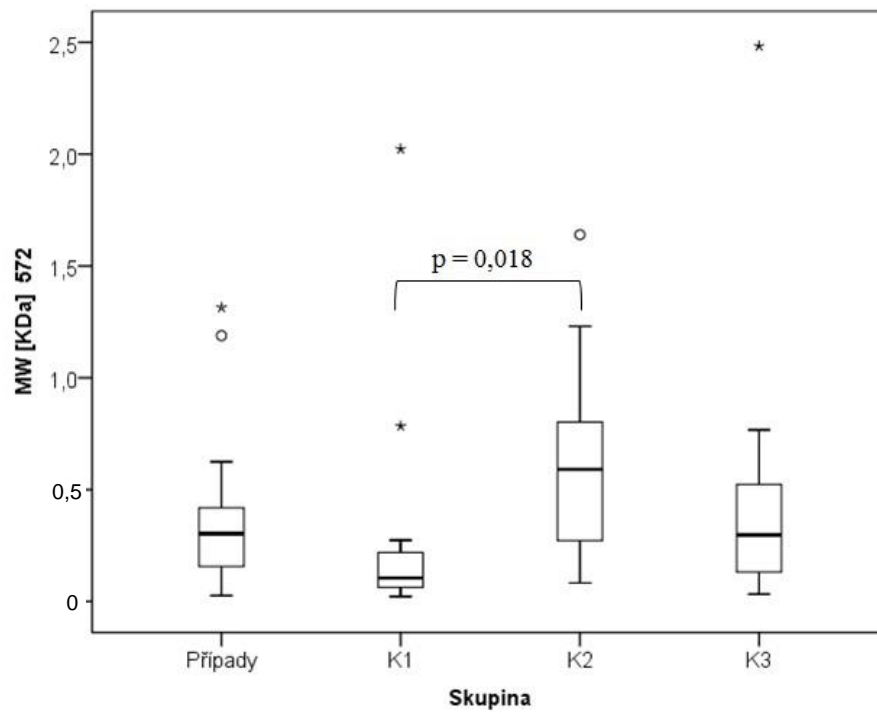
Graf VI: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 1520 KDa.



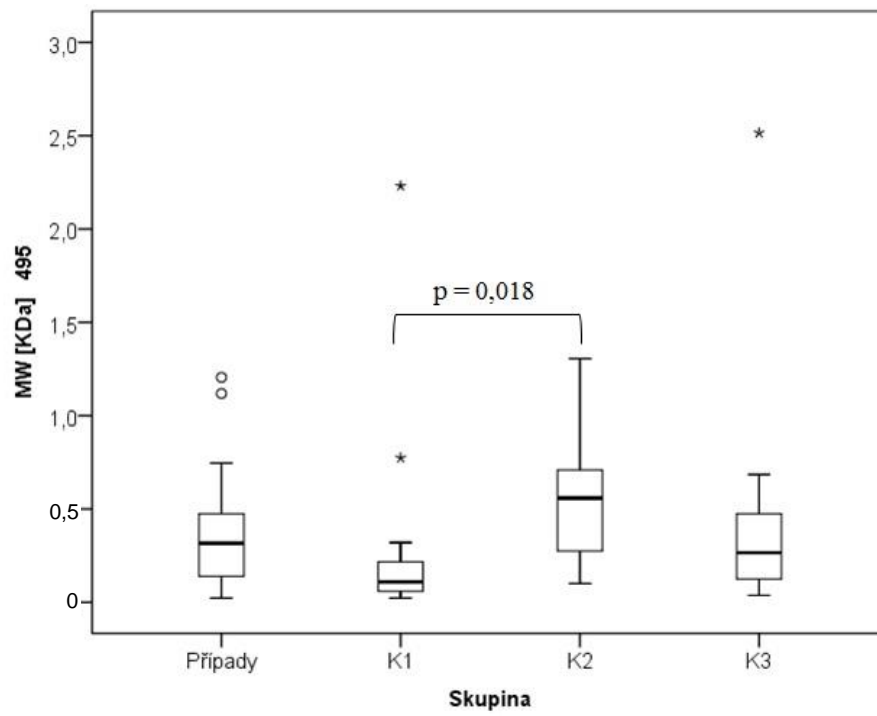
Graf VII: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 1090 KDa.



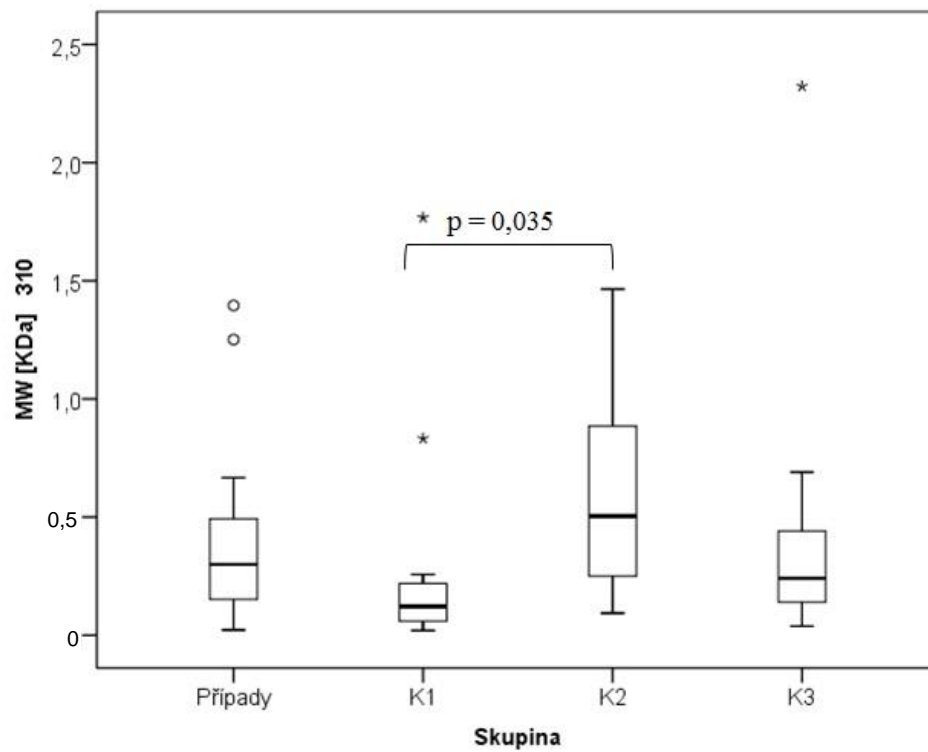
Graf VIII: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 966 KDa.



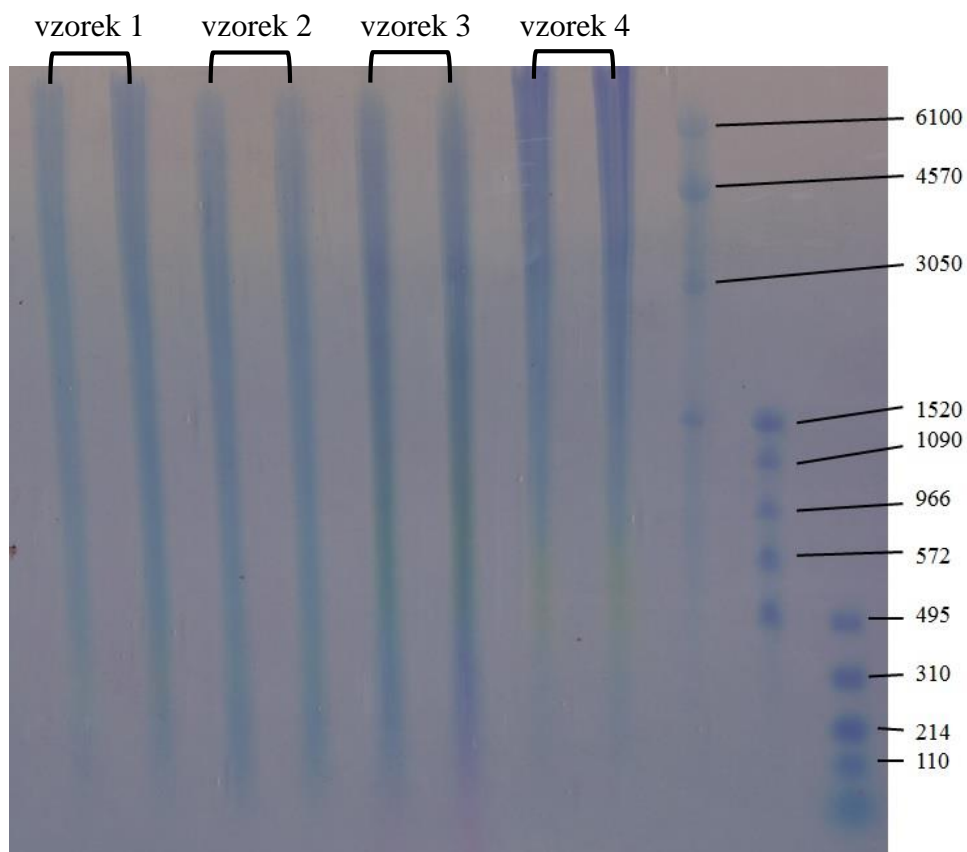
Graf IX: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 572 KDa.



Graf X: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 495 KDa.



Graf XI: Koncentrace KH o molekulové hmotnosti 310 KDa.



Obr. 24: Molekulová distribuce KH ve vzorcích KV. Uvedená data jsou reprezentativním výsledkem stanovení.



## 6. Diskuze

*In vitro* testování nových materiálů na výrobu TEP se stalo v průběhu let samozřejmostí. Předpovědi možného chování materiálů po implantaci do lidského těla jsou však značně ovlivněny mazací tekutinou, která v kloubním simulátoru nahrazuje KV. Podle doporučení mezinárodních norem ISO (ISO 14243-3:2014 a ISO 14242-1:2014) je v simulátorech používáno bovinní sérum<sup>37</sup>. I když bovinní sérum je schopno do jisté míry napodobit KV v *in vivo* podmínkách, jejich podobnost byla v posledních letech značně diskutována<sup>37,38,40</sup>. Nedávné studie ukazují, že pacienti s TEP kolenního kloubu mají v KV až 2x vyšší koncentraci celkových proteinů, než je koncentrace proteinů v bovinním séru doporučená dle ISO. Značné rozdíly byly nalezeny také ve viskozitě, koncentraci jednotlivých proteinových frakcí, KH, fosfolipidů, PRG4 a stopových prvků<sup>37,40</sup>. Všechna tato zjištění vedou k potřebě vyvinout novou mazací tekutinu, která bude lépe odpovídat klinickým podmínkám.

V diplomové práci byly porovnávány vzorky KV získaných od pacientů s asepticky selhávající TEP kolenního kloubu (**případy**), pacientů s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprotetické osteolýzy (**K1**), pacientů bez TEP a s posledním stádiem osteoartrózy (**K2**) a pacientů bez TEP, bez osteoartrózy a bez známek zánětu (**K3**). Kromě vody jsou v KV zastoupeny v největším množství proteiny. Jedním z cílů diplomové práce bylo porovnat celkovou koncentraci proteinů v KV. U skupiny případy byla nalezena nižší koncentrace celkových proteinů v porovnání se skupinou K3. Rovněž byla pozorována nižší koncentrace celkových proteinů u skupiny K2 v porovnání se skupinou K3. Tyto rozdíly však byly na hranici signifikance. Celková koncentrace proteinů dosahovala ve všech skupinách hodnoty přibližně 40 g/l. Zjištěné výsledky jsou v souladu s výsledky předchozích studií<sup>40,45</sup>. Nicméně koncentrace proteinů v bovinním séru doporučená mezinárodními normami ISO je 17 g/l<sup>37</sup>.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovení koncentrace proteinových frakcí a jejich porovnání mezi jednotlivými skupinami pacientů. Přestože zastoupení těchto frakcí v bovinním séru pro biotribologické testování kloubních náhrad není doporučeno normami ISO, bylo prokázáno, že se jejich obsah liší nejen u různých komerčně dostupných bovinních sér, ale i u KV. Některé mazací kapaliny používané při testování kloubních náhrad mohou obsahovat poměr frakcí proteinů, se kterým se v klinické praxi nelze setkat, což může mít vliv na rychlost opotřebení materiálu TEP<sup>40</sup>. V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že KV ve všech studovaných skupinách obsahují nejvyšší

koncentraci albuminu a  $\gamma$ -globulinu. Tyto výsledky jsou shodné s výsledky předchozích studií<sup>37,40</sup>. Dále byl pozorován pokles koncentrace  $\beta_1$ -globulinu u pacientů s osteoartrózou (K2) v porovnání s pacienty s TEP (případy a K1), tento pokles však nebyl signifikantní na rozdíl od výsledků studie Guenther *a kol.*, kteří pozorovali signifikantně nižší koncentraci  $\beta$ -globulinů u pacientů s osteoartrózou v porovnání s pacienty s TEP. Úplně opačný trend v porovnání s výsledky studie Guenther *a kol.*, jsme zaznamenali u koncentrace albuminu. U pacientů s osteoartrózou (K2) byla pozorována signifikantně nižší koncentrace albuminu v porovnání se skupinami s TEP (případy a K1), zatímco Guenther *a kol.* pozorovali signifikantně vyšší koncentraci albuminu u pacientů s osteoartrózou v porovnání s pacienty s TEP. Tyto rozdíly mohou být způsobeny fyziologickou odlišností jednotlivých pacientů a poměrně malou skupinou pacientů, kteří byly do studie zahrnuti.

Další složkou KV, která má vliv na opotřebení nejen kloubních náhrad, ale i původního kloubu je KH, která svou přítomností přispívá především k vysoké viskozitě KV<sup>40</sup>. V diplomové práci byla prokázána vyšší koncentrace HA u pacientů s osteoartrózou (K2) než u pacientů s TEP (případy a K1), ale rozdíl nebyl signifikantní. Získané výsledky jsou v souladu se studií Guenther *a kol.*, ale nejsou v souladu s dřívějšími studii, kde vyšší koncentrace KH u pacientů s osteoartrózou v porovnání s pacienty s TEP byla signifikantní<sup>45,46</sup>. Tento rozdíl může být způsoben metodou, která byla použita ke stanovení celkové koncentrace KH. V diplomové práci, stejně jako v práci Guenther *a kol.* byla koncentrace HA stanovena metodou ELISA, zatímco Yamada *a kol.* použili vysoce účinnou kapalinovou chromatografii<sup>46</sup> a Mazzucco *a kol.* použili gelovou (permeační) chromatografii<sup>45</sup>. Nicméně zjištěná přítomnost KH u pacientů s TEP, přestože nedosahovala hodnot stanovených u zdravých pacientů, potvrzuje teorii, že dochází k obnově funkce synoviální části kloubní membrány, a k částečné obnově funkce synovialocytů, které se mimo jiné podílí na produkci KH<sup>45</sup>.

V dřívějších studiích byla často molekulová hmotnost KH udávána celkovým průměrem<sup>45,46</sup>. Její distribuce však nemusí být pro všechny molekulové hmotnosti konstantní, a proto se zdá lepší určit koncentraci pro každou molekulovou hmotnost zvlášť. Posledním cílem diplomové práce bylo stanovit koncentraci jednotlivých molekulových hmotností KH v KV. V rámci diplomové práce byla nalezena signifikantně nižší koncentrace KH u téměř všech molekulových hmotností u pacientů s TEP (K1) v porovnání se skupinami bez TEP (K2 a K3). Tento pokles může souviset

se skutečností, že u skupiny K1 byla nalezena nejnižší celková koncentrace KH, přestože rozdíl od ostatních skupin nebyl signifikantní. Dále byl u skupiny K3 zaznamenán mírný, ale nesignifikantní pokles v koncentraci HA směrem k nižším molekulovým hmotnostem v porovnání se skupinou K2. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky studie Ludwig *a kol.*, kteří rovněž pozorovali pokles koncentrace HA o nižších molekulových hmotnostech u zdravých pacientů v porovnání s pacienty s osteoartrózou <sup>47</sup>.

## 7. Závěr

Diplomová práce se zabývala studiem složení KV získaných od čtyř skupin pacientů: *i*) s asepticky selhávající totální endoprotézou (TEP) kolenního kloubu, *ii*) s TEP bez jakékoliv známky aseptického selhávání nebo periprotetické osteolýzy, *iii*) bez TEP a s posledním stádiem osteoartrózy a *iv*) bez TEP, bez osteoartrózy a bez známek zánětu. Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- a) Bylo zjištěno, že KV získané od pacientů ve skupině K3 obsahují nejvyšší koncentraci celkových proteinů v porovnání s pacienty ve skupinách případy a K2, přestože hodnoty signifikance jsou hraniční.
- b) Byla stanovena koncentrace jednotlivých frakcí proteinů (albuminu a  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinů) ve vzorcích KV. U skupiny K2 byla pozorována signifikantně nižší koncentrace albuminu v porovnání se skupinami případy a K1. Dále byla u skupiny K2 pozorována signifikantně nižší koncentrace  $\beta_1$ -globulinu v porovnání se skupinou K3. U dalších studovaných proteinových frakcí ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  a  $\gamma$ -globulinů) nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami.
- c) Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v celkové koncentraci KH mezi jednotlivými skupinami.
- d) Byla stanovena koncentrace jednotlivých molekulových hmotností KH ve vzorcích KV. U skupiny K1 byl pozorován statisticky významný pokles koncentrace KH téměř u všech molekulových hmotností v porovnání se skupinami K2 a K3. Výjimkou byla KH s nejvyšší molekulovou hmotností 6100 KDa a s dvěma nejnižšími molekulovými hmotnostmi 210 a 110 KDa, u kterých nebyl pozorován žádný signifikantně významný rozdíl v koncentracích mezi jednotlivými skupinami. Překvapivě nebyl pozorován signifikantní rozdíl v molekulové distribuci KH mezi skupinami s TEP kolenního kloubu (případy a K1) ani mezi skupinami bez TEP (K2 a K3).

## 8. Použitá literatura

1. Bartoníček J, Heřt J. Základy klinické anatomie pohybového aparátu. Maxdorf, Praha 2004.
2. Anonymous: [www.ohiodance.org/dance-education/dance-wellness/knee-anatomy](http://www.ohiodance.org/dance-education/dance-wellness/knee-anatomy) přečteno 10. 2. 2015
3. Dylevský I, Druga R, Mrázková O. Funkční anatomie člověka. Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha 2000.
4. Anonymous: [www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/images/patella.jpg](http://www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/images/patella.jpg) přečteno 13. 3. 2015
5. Anonymous: [www.hc-vsetin.cz/ftk/semi/sarka\\_baka2\\_soubory/image002.jpg](http://www.hc-vsetin.cz/ftk/semi/sarka_baka2_soubory/image002.jpg) přečteno 13. 3. 2015
6. Anonymous: [img.webmd.com/dtmcms/live/webmd/consumer\\_assets/site\\_images/media/medical/hw/n2214.jpg](http://img.webmd.com/dtmcms/live/webmd/consumer_assets/site_images/media/medical/hw/n2214.jpg) přečteno 14. 3. 2015
7. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine* 2012; 4: 15 – 37.
8. Myant C, Underwood R, Fan J, Cann PM. Lubrication of metal-on-metal hip joints: The effect of protein content and load on film formation and wear. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2012; 6: 30 – 40.
9. Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 2007; 44: 59 – 74.
10. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials* 2007; 13: 26 – 39.
11. Dungal P. Ortopedie. Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha 2005.
12. Gallo J, Holibka R, Kalina R, Kamínek P, Šos Z, Špička J, Uvízl M. Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult. Univerzita Palackého v Olomouci 2011.
13. Courtney P, Doherty M. Osteoarthritis. *British Journal of Hospital Medicine* 2014; 75: 66 – 70.

14. Jones G. Osteoarthritis: Where are we for pain and therapy in 2013?. *Australian Family Physician* 2013; 42: 766 – 769.
15. Sharma AR, Jagga S, Lee S, Nam J. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 19805 – 19830.
16. Riordan EA, Little C, Hunter D. Pathogenesis of post – traumatic OA with a view to intervention. *Best Practice and Research. Clinical Rheumatology* 2014; 28: 17 – 30.
17. Burgener FA, Korman M, Pudas T. *Differential diagnosis in conventional radiology*. Thieme, Stuttgart 2008.
18. Anonymous: [www.drgurdeepsingh.com/content/282/Knee-Replacement.html](http://www.drgurdeepsingh.com/content/282/Knee-Replacement.html) přečteno 13. 1. 2015
19. Hampl F, Rádl S, Paleček J. *Farmakochemie*. Vysoká škola chemicko – technologická v Praze 2007.
20. Sherman AL, Ojeda-Correal G, Mena J. Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis. *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation* 2012; 4: 110 – 116.
21. Proffen B, Vavken P, Dorotka R. Surgical management of osteoarthritis. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2013; 163: 243 – 250.
22. Anonymous: <http://www.eorthopod.com/tibial-osteotomy/topic/69> přečteno 2. 12. 2014
23. Girard J, Roumazeille T, Sakr M, Migaud H. Osteochondral mosaicplasty of the femoral head. *Hip International* 2011; 21: 542 – 548.
24. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodó G, Kish G. Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; 391: 328 – 336.
25. Anonymous: <http://www.baseballprospectus.com/article.php?articleid=15664> přečteno 3. 12. 2014
26. Anonymous: [www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/94-B/11\\_Supple\\_A/137/F3](http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/94-B/11_Supple_A/137/F3) přečteno 26. 3. 2015

27. Anonymous: [www.mrjameslewis.co.uk/partialkneereplacement.html](http://www.mrjameslewis.co.uk/partialkneereplacement.html) přečteno 28. 3. 2015
28. Anonymous: [intermountainhealthcare.org/blogs/2014/02/new-research-on-total-knee-replacement/](http://intermountainhealthcare.org/blogs/2014/02/new-research-on-total-knee-replacement/) přečteno 28. 3. 2015
29. Gunston FH. Polycentric knee arthroplasty. Prosthetic simulation of normal knee movement. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 1971; 2: 272 – 277.
30. Allardyce TJ, Scuderi GR, Insall JN. *Surgical techniques in total knee arthroplasty*. Springer Science and Business Media, New York 2002.
31. Goodfellow JW, Kershaw CJ, Benson MK, O'Connor JJ. The oxford knee for unicompartamental osteoarthritis. The list of 103 cases. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 1988; 5: 692 – 701.
32. Mulcahy H, Chew FS. Current concepts in knee replacement: complications. *American Journal of Roentgenology* 2014; 202: 76 – 86.
33. Mulcahy H, Chew FS. Current concepts in knee replacement: features and imaging assessment. *American Journal of Roentgenology* 2013; 201: 828 – 842.
34. Zietz C, Reinders J, Schwiesau J, Paulus A, Kretzer JP, Grupp T, Utzschneider S, Bader R. Experimental testing of total knee replacements with UHMW-PE inserts: impact of severe wear test conditions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2015; 26: 121 – 134.
35. ISO 14242-1:2014. International Organization for Standardization, London: *Implants for surgery: Wear of total hip-joint prostheses – Part 1: Loading and displacement parameters for wear-testing machines and corresponding environmental conditions for test*. 2014
36. ISO 14243-3:2014. International Organization for Standardization, London: *Implants for surgery: Wear of total knee-joint prostheses. Loading and displacement parameters for wear-testing machines with displacement control and corresponding environmental conditions for test*. 2014
37. Brandt JM, Brière LK, Marr J, MacDonald SJ, Bourne RB, Medley JB. Biochemical comparisons of osteoarthritic human synovial fluid with calf sera

- used in knee simulator wear testing. *Journal of Biomedical Materials Research* 2010; 94A: 961 – 971.
38. Wang A, Essner A, Schmidig G. The effects of lubricant composition on in vitro wear testing of polymeric acetabular components. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied biomaterials* 2004; 68: 45 – 52.
  39. Reinders J, Sonntag R, Kretzer JP. Synovial fluid replication in knee wear testing: an investigation of the fluid volume. *Journal of Orthopaedic research* 2015; 33: 92 – 97.
  40. Guenther LE, Pyle BW, Turgeon TR, Bohm ER, Wyss UP, Schmidt TA, Brandt JM. Biochemical analyses of human osteoarthritic and periprosthetic synovial fluid. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in medicine* 2014; 2: 127 – 139.
  41. Kingsley GR. The determination of serum total protein, albumin and globulin by the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 1939; 131: 197 – 200.
  42. Peč P. *Laboratorní cvičení z biochemie*. Univerzita Palackého v Olomouci 2008.
  43. McMeekin T. *Detecting pathogens in food*. 2003
  44. Lee HG, Cowman MK. An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. *Analytical Biochemistry* 1994; 2: 278 – 287.
  45. Mazzucco D, Scott R, Spector M. Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties. *Biomaterials* 2004; 25: 4433 – 4445.
  46. Yamada H, Morita M, Henmi O, Miyauchi S, Yoshida Y, Kikuchi T, Terada N, Washimi O, Washimi Y, Seki T. Hyaluronan in synovial fluid of patients with loose total hip prosthesis. Comparison with hyaluronan in patients with hip osteoarthritis and idiopathic osteonecrosis of femoral head. *Archives of Orthopaedic and trauma surgery* 2000; 9: 521 – 524.
  47. Ludwig TE, McAllister JR, Lun V, Wiley JP, Schmidt TA. Diminished cartilage-lubricating ability of human osteoarthritic synovial fluid deficient in proteoglycan 4: Restoration through proteoglycan 4 supplementation. *Arthritis and Rheumatism* 2012; 64: 3963 – 3971.