



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ ARTIFICIÁLNÍCH SYNOVIÁLNÍCH KAPALIN

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF ARTIFICIAL SYNOVIAL LIQUIDS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Hrochová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1384/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Eliška Hrochová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace mechanických vlastností umělého synoviálního kapalin

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat rešerši zabývající se sumarizací metod přípravy umělého synoviálního kapalin a metodikami charakterizace jejich mechanických vlastností.
- 2) Definovat vhodné postupy přípravy funkčních vzorků umělého synoviálního kapalin.
- 3) Optimalizovat metody charakterizace mechanických vlastností připravených vzorků se zaměřením zejména na tzv. mikroskopické přístupy.
- 4) Porovnat získané charakteristiky s reálným vzorkem.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Eliška Hrochová  
student(ka)

-----  
Ing. Michal Kalina, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou optimalizace postupu přípravy umělé synoviální kapaliny. Hlavním předmětem studia jsou mechanické vlastnosti reálných i uměle připravených vzorků synoviální kapaliny. Pro charakterizaci byla použita DLS mikrorheologie, termogravimetrická analýza (TGA) a infračervená spektroskopie (FTIR). Teoretická část této práce je rešerší metod přípravy umělé synovie a souhrnem definic reologických pojmů. Experimentální část se zaměřuje na přípravu a charakterizaci umělé synovie. V rámci bakalářské práce byla provedena optimalizace této přípravy v několika dílčích krocích (způsob dispergace komponent, volba molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, povaha a iontová síla použitého disperzního prostředí). Připravený funkční vzorek synoviální kapaliny byl následně porovnán z hlediska materiálových charakteristik a mechanických vlastností s reálným vzorkem koňské synoviální kapaliny. Modifikací postupu, který vychází z patentu US 8716204, bylo možno vytvořit umělou synoviální kapalinu, která splňuje viskoelastický charakter reálné matrice a je stabilní v čase.

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the optimization of preparation of artificial synovial liquids. The main subjects of study are the mechanical properties of real and artificial synovial fluid samples. DLS microrheology, thermogravimetric analysis (TGA) and infrared spectroscopy (FTIR) were used for characterization. The theoretical part of this thesis is represented by a literature research of a methods of preparation of artificial synovia and summary of definitions of rheological terms. The experimental part focuses on the preparation and characterization of the artificial synovial liquids originating from the published patent US 8716204. In the framework of the bachelor thesis, this preparation was optimized in several partial steps (method of dispersion of components, choice of molecular weight of hyaluronic acid, nature and ionic strength of used dispersion medium). The prepared optimized sample of synovial fluid was in following experimental characterization steps compared in terms of material characteristics and mechanical properties with the real horse synovial fluid sample. By modifying the process based on the aforementioned patent, an artificial synovial fluid could be formed. That meets the viscoelastic nature of the real matrix and that is stable over time.

## **Klíčová slova**

umělá synoviální kapalina, reologie, mikrorheologie, dynamický rozptyl světla, viskoelastický modul, komplexní viskozita

## **Keywords**

artificial synovial liquid, rheology, microrheology, dynamic light scattering, viscoelastic modulus, complex viscosity

HROCHOVÁ, Eliška. *Příprava a charakterizace mechanických vlastností umělé kapalin*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....

Eliška Hrochová

### **Poděkování:**

Mé největší poděkování patří Ing. Michalu Kalinovi Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. a celému biokoloidnímu týmu za ochotnou spolupráci.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Synoviální tekutiny .....	8
2.1.1	Chemické složení synoviálních tekutin .....	8
2.1.2	Základní požadované vlastnosti .....	9
2.1.3	Artifciální synoviální kapaliny .....	9
2.2	Reologie .....	10
2.2.1	Historie reologie .....	10
2.2.2	Základní veličiny .....	11
2.2.3	Dělení na Newtonovské a Nenewtonovské kapaliny .....	11
2.2.4	Princip reologie .....	12
2.2.5	Reologické modely .....	14
2.2.6	Reologické testování .....	15
2.2.7	Komplexní viskozita a ztrátový úhel .....	15
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	16
4	CÍLE PRÁCE .....	18
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
5.1	Použité chemikálie a přístroje .....	19
5.1.1	Použité chemikálie .....	19
5.1.2	Použité přístroje .....	19
5.2	Detailní podmínky měření pro použité metody .....	19
5.3	Použité metody charakterizace synoviálních kapalin .....	19
5.3.1	DLS mikreologie .....	19
5.3.2	TGA .....	20
5.3.3	FTIR .....	20
5.3.4	Membránová extruze .....	20
5.4	Příprava artifciální synoviální kapaliny .....	21
5.4.1	Příprava puřačního roztoku (50 ml) .....	21
5.4.2	Přídavek fosfolipidů, pH kontrola .....	21
5.4.3	Přídavek kyseliny hyaluronové a bílkovin .....	21
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	22
6.1	Optimalizace přípravy artifciální synoviální kapaliny .....	22
6.1.1	Vliv molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové .....	22
6.1.2	Vliv iontové síly .....	24
6.2	Materiálová charakterizace .....	26
6.2.1	TGA .....	26
6.2.2	FTIR .....	28
6.2.3	DLS mikreologie .....	30
6.3	Stabilita artifciálních vzorků .....	31

6.3.1	Stabilita časová.....	31
6.3.2	Stabilita teplotní .....	31
6.3.3	Stabilita umělého kloubního maziva při namáhání .....	32
6.4	Porovnání vlastností umělého a reálného vzorku kloubního maziva z mikrorheologického hlediska .....	33
7	ZÁVĚR.....	35
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	37

# 1 ÚVOD

Živočichové ke svému životu potřebují pohyb. Potřebují ho k tomu, aby přežili útok dravce, k tomu, aby si došli pro potravu, aby docházelo k pohybu střev a řádnému prokrvení. K tomu, aby se živočichové mohli pohybovat, potřebují pohyblivé spojení kostry. Stejně jako musí být promazány panty dveří a různé spoje, aby o sebe nedřely, stejně tak muselo v průběhu evoluce dojít ke vzniku fyziologického mazadla. Toto mazadlo se jmenuje synoviální kapalina a nachází se v kloubních pouzdrech živočichů.

Kloubní výplně jsou velmi diskutovanou problematikou. Velmi často je kloubní náhrada jediným řešením onemocnění kloubu, kdy dojde ke změně složení synoviální kapaliny uvnitř kloubu, ten je následně přetěžován a dochází k oděru kloubní hlavice a jamky, což působí bolesti. Národní registr kloubních náhrad (NRKN) uvádí přehledy počtu vyměněných kloubů v průběhu let 2003-2012. Zatímco v roce 2003 došlo v České republice k výměně 5640 kloubů, v roce 2012 odpovídalo množství kloubních náhrad číslu 13130 [1]. Je evidentní, že tento strmý nárůst ovlivňuje i vyspělost dostupné techniky. Vystává zde však otázka, je třeba počkat, než se kloub zničí natolik, aby byl pacient vhodným adeptem na endoprotézu? Každá operace je velkým zásahem do organismu, a to s sebou, i v dnešní vyspělé a technicky precizní době, nese mnoho rizik. Výměna poškozeného kloubu za umělý nemusí být organismem přijata, nebo může dojít k infekci. Následně je potřeba reoperovat kloub nebo provést revizní zákrok, což je další nápor na organismus. Daleko šetrnější by bylo poškození kloubu podchytit v počátku a injekční aplikací zdravé stabilní synovie podpořit proces uzdravování relativně neinvazivní cestou.

Tato práce používá jako srovnávací matrice synovie koní. Všeobecně známý fakt, že prasata jsou anatomicky člověku blíže, není možno použít ve smyslu studia synovie. Prasata většinu života proleží, příliš se nepohybují, jejich klouby jsou extrémně přetěžované. Koně jsou pohybově daleko dynamičtější, mají velké klouby a onemocnění pohybového aparátu jsou velmi obdobná lidským. Pokud by bylo možno připravit umělé synovii, která by odpovídala reálnému vzoru, tudíž by ji měl organismus přijmout, a měla by i léčivý efekt, pak by bylo teoreticky možné předcházet velkým operačním výkonům nebo aspoň zkrátit dobu rekonvalescence.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Synoviální tekutiny

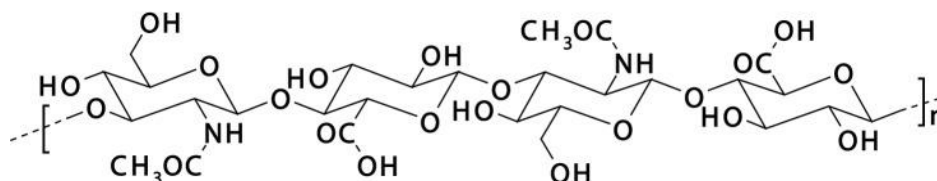
Synoviální tekutiny jsou průhledné kapaliny vyplňující kloubní prostor. Jejich základní a nenahraditelnou funkcí je snižování vnitřního tření hlavic kostí v pohyblivých kloubních spojích, což výrazně napomáhá jejich menšímu opotřebenosti a zabraňuje bolesti. Synoviální tekutina slouží i jako zdroj živin a látek potřebných k syntéze nových buněk chrupavky (chondrocytů), protože chrupavka nemá žádné krevní zásobení, kterým bývá jinde v organismu dopravována drtivá většina zdrojů energie. Zároveň je její přítomnost nezbytná pro zpracování odpadních látek (odumřelých buněk). Synoviální tekutiny je možno najít například v čelistním, kyčelním a kolenním kloubu nebo v meziobratlových ploténkách [2].

#### 2.1.1 Chemické složení synoviálních tekutin

Synoviální tekutina vzniká jako krevní filtrát, který je protlačen skrz stěnu kapilár obtékající kloub. Základem synoviálních tekutin jsou následující látky: kyselina hyaluronová (hyaluronan), voda, prolaktin, lubricin a leukocyty (zastupují funkci imunitní kontroly). Synoviální tekutina zdravých kloubů nesmí obsahovat erytrocyty, jejichž přítomnost může indikovat vážná poranění nebo onemocnění [3].

#### *Kyselina hyaluronová*

Kyselina hyaluronová (HA) jakožto lineární polymer (viz. Obrázek 1) [4] určuje primární strukturu synoviální kapaliny. Ve fyziologickém prostředí ji není možno nalézt, protože je vysoce nestabilní a rychle přechází na hyaluronanový anion. Z hlediska chemické struktury je to polymer složený z disacharidových jednotek *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny [3]. Výhodou aplikace umělého HA je to, že se tato látka běžně nachází v organismu, tudíž není tělu cizí a není problém s jejím přijetím. To ovšem znamená, že si lidský organismus dokázal vytvořit potřebnou dráhu pro odbourávání HA a při jejím využití pro přípravu umělých náhrad je tento nežádoucí faktor třeba brát v potaz.



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové [4]

Je třeba rozlišovat jednotlivé typy HA dle jejich molekulové hmotnosti, protože ta jim propůjčuje i odlišné vlastnosti. Extracelulární HA se v přítomnosti nežádoucího bujení rozkládá na nízkomolekulární formu, která je schopna způsobit rozpad buněk díky sledu reakcí podporujících přirozenou imunitu organismu a funguje tudíž jako signální molekula [5]. Vysokomolekulární forma zajišťuje stabilitu a elasticitu celé matrice. Na molekulární úrovni vytváří organizované struktury, které mechanicky zpevní celek a tvoří tak jakousi vnitřní kostru, která dokáže zvýšit odolnost vůči vnějším působícím silám [6]. HA se v organismu kromě kloubů vyskytuje i v oku a v měkkých tkáních, kde svou přítomností výrazně zpomaluje proces stárnutí kůže [7].



## ***Prolaktin***

Prolaktin je tvořen jednoduchým řetězcem aminokyseliny cysteinu, jehož jednotlivé jednotky jsou propojeny třemi disulfidickými můstky. Bylo dokázáno, že přibližně 50 % těchto seskupení je z hlediska sekundární struktury uspořádáno do  $\alpha$ -helixové konformace [8]. Díky přítomnosti prolaktinu dochází k syntéze proteoglykanů a v kombinaci s přítomnými kortikoidy dochází ke stimulaci chondrocytů a následně pak vzniku kolagenu II. typu [3]. Zásadnější význam pro kloubní výplň mají protizánětlivé vlastnosti prolaktinu. Vysoká hladina tohoto hormonu nepoukazuje jen na reprodukční problematiku, ale i na zánětlivé procesy ve spojitosti s autoimunitními onemocněními [9].

## ***Lubricin***

Lubricin slouží spolu s dalšími krevními proteiny jako je albumin a globulin k zefektivňování viskózních vlastností synoviální tekutiny. Tento glykoprotein je esenciální součástí chrupavek a slouží kromě ochrany jejich povrchu i jako stimulant růstu nových buněk. Studie prováděná na myších ukázala, že nedostatek lubricinu první generace myší způsobil v druhé generaci hypermobilitu kloubů s následným porušením kloubních pouzder [10].

### **2.1.2 Základní požadované vlastnosti**

Mechanismus zatížení kloubu při základním pohybu jako je doskok probíhá následovně. Při výskoku je kloub nezatížen, synoviální tekutina je volně rozptýlena. Kloubní chrupavku si je možno představit jako porézní materiál, který v okamžiku zvýšeného tlaku v důsledku doskoku vytlačí ze synoviální tekutiny vodní složku, takže dojde k zahuštění tohoto materiálu a ten je odolnější, chrupavka je zpevněná a dále se již nedeformuje. Po odlehčení dochází opět k navázání vodné složky a naředění synoviální tekutiny. Tento mechanický proces je nezbytný pro proudění živin a odstraňování odpadních látek z kloubu pryč. Základním požadavkem je tedy schopnost rychle měnit viskozitu v závislosti na změnách tlaku. Dále nesmí docházet k degradaci synoviální kapaliny v čase a musí být teplotně stabilní [11].

### **2.1.3 Artificiální synoviální kapaliny**

Hlavním složkou uměle připravené synoviální kapaliny je kyselina hyaluronová. Ta je však přirozeně organismem odbourávána, tudíž je potřeba, aby byla kombinována s dalšími látkami, které by její degradaci zpomalovaly, a tak by udržovaly kloub v lepší kondici.

#### ***Poly( $\epsilon$ -kaprolakton)–poly(ethylen glykol)–poly( $\epsilon$ -kaprolakton)***

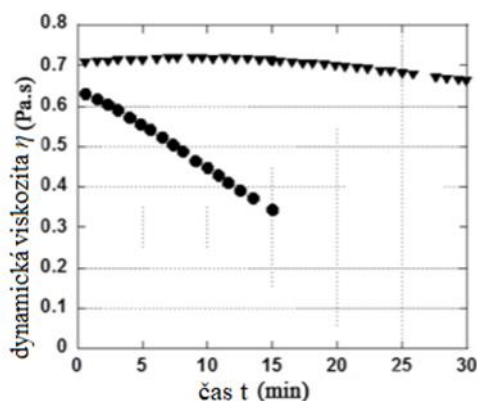
První možností je poly( $\epsilon$ -kaprolakton)–poly(ethylen glykol)–poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCEC). V práci [12, 13] byl studován PCEC pomocí gelové permeační chromatografie, rentgenové difrakční analýzy a reologického testování, které bylo primárně zaměřeno na změny struktury v závislosti na teplotě. Bylo zjištěno, že PCEC v kombinaci s HA dosahuje lepších výsledků z hlediska časové degradace než samotný PCEC, a proto je vhodný jako umělá náhrada synoviálních tekutin.

## ***Sulfonované algináty***

Algináty jsou látky hojně se vyskytující v přírodě. Lze je získat z řasy *Laminaria hyperborea*. Pro využití jako aditivum do synoviálních kapalin byly zkoumány algináty s různým stupněm sulfonace. Využitím kvalitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) bylo určeno množství sekvence DNA ve smyslu množství živé tkáně po aplikaci alginátu ve vzorku. Z měření vyplývá, že kromě přijatelných aseptických vlastností navíc alginát funguje jako protizánětlivé médium. Daleko vhodnější se jevila varianta více sulfonovaných alginátu, protože vykazovaly vyšší účinnosti při snižování oxidativního stresu a zánětlivých markerů, ovlivňujících aktivitu makrofágů odpovídající standardní synoviální tekutině a bylo jich třeba v nižších koncentracích než méně sulfonovaných alginátů [14, 15].

## ***Mannitol v kombinaci s kyselinou hyaluronovou (HA)***

Mannitol je cukerný alkohol, který je používán při léčbě onemocnění či zhoršení funkce ledvin, například oligourie. Tento výraz definuje snížení průměrné tvorby a produkce moči. Významnou vlastností mannitolu je kontrola osmolarity, tudíž se používá i jako náhradní sladidlo pro diabetiky [16]. Z hlediska zařazení mezi aditiva, tedy látky, které se přidávají do potravin pro zlepšení jejich vlastností ve smyslu změny barvy, snížení energetické hodnoty či konzervace, získal mannitol označení E421 [17]. Obrázek 2 ukazuje, že přídavek mannitolu výrazně zlepšuje stabilitu HA, což prodlužuje její ochranný účinek uvnitř kloubu proti jeho poškození [18].



Obrázek 2 : Grafická závislost poklesu viskozity vlivem oxidativního stresu na čase pro čistou HA (●) a HA v kombinaci s mannitolem (▼)[18]

## **2.2 Reologie**

Předmět reologického studia je zaměřen na mechanické vlastnosti sledovaného materiálu. Reologie primárně sleduje deformaci a tok materiálů. Pojem reologie vychází ze složení dvou slov *rheos* neboli tok, proudění a *logos* neboli věda [18].

### **2.2.1 Historie reologie**

Reologie byla poprvé definována profesorem Binghamem jako studium míry deformace a toku látek a tato definice byla přijata Americkou reologickou společností, která byla založena v roce 1929. Historie reologie však sahá daleko hlouběji do minulosti. Již v roce 1678 Robert Hook definoval teorii elasticity a tím hned po Newtonovi představil

komplexnější pohled na vlastnosti tekutin [20, 21]. Dle Newtonova zákona lze posuzovat látky ve spojení s tokem (spíše kapalný charakter), zatímco Hookův zákon vnímá tekutiny spíše jako hutné materiály podléhající vnější síle jako látky o větším množství částic na jednotku objem (vytyčení mezní hranice mezi kapalinami a pevnými látkami). Reálná soustava vykazuje vlastnosti, které je možno zařadit do obou předcházejících skupin, a proto se takovéto soustavy nazývají viskoelastické [21].

### 2.2.2 Základní veličiny

Reologické měření se blíže zaměřuje na viskozitu a elasticitu látek. Viskozitu neboli vazkost, je možno rozdělit na kinematickou a dynamickou. Všechny kapaliny lze definovat pomocí jejich vnitřního tření neboli dynamické viskozity, tedy míry tření částic a jejich odporu vůči toku. Kinematická viskozita  $\nu$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ] je definována pro tok kapaliny vyvolaný gravitační silou a je popsána následující rovnicí (1) jako podíl dynamické viskozity  $\eta$  [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ] a hustoty kapaliny  $\rho$  [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ] [22].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (1)$$

Tento typ viskozity je definován pomocí časové závislosti průtoku kapaliny mezi dvěma rýskami. Oproti tomu dynamická viskozita  $\eta$  je definována Newtonovým zákonem, který říká, že dynamická viskozita  $\eta$  je konstantou úměrnosti mezi působícím napětím  $\tau$  a gradientem rychlosti mezi dvěma sousedními vrstvami proudící kapaliny (zlomek) podle následující rovnice (2)[22]:

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} \quad (2)$$

### 2.2.3 Dělení na Newtonovské a Neneutonovské kapaliny

Pro Newtonovské kapaliny platí, že velikost jejich tečného napětí je přímo úměrná rychlosti jejich deformace a jejich viskozita je závislá pouze na teplotě. S rostoucí teplotou viskozita newtonovských kapalin klesá, což definuje Arrheniova rovnice (3), kde  $\Delta G$  vyjadřuje volnou enthalpii (míru aktivační energie) a neznámá  $A$  stanovuje referenční viskozitu při určité teplotě [22].

$$\eta = A \cdot e^{\frac{\Delta G}{RT}} \quad (3)$$

Neneutonovské kapaliny mění svou viskozitu v závislosti na tečném napětí nebo změně rychlosti ve směru kolmém na směr rychlosti. Mezi takové kapaliny řadíme téměř všechny reálné kapaliny a zejména pak disperze [22].

Neneutonovské kapaliny, jejichž viskozita je závislá na čase, je možno rozdělit na:

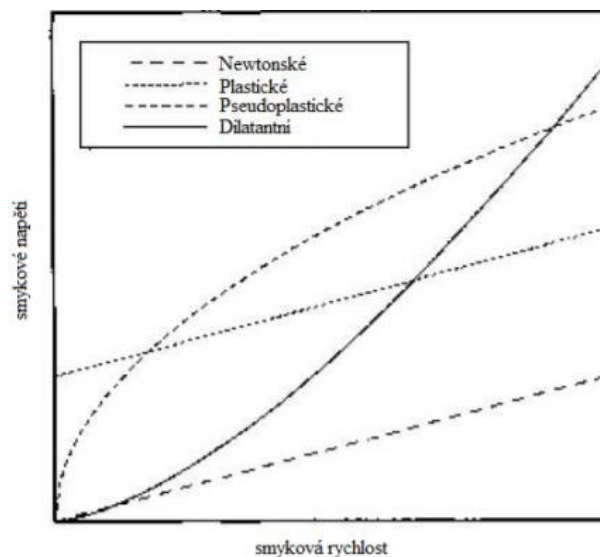
- tixotropní: časem řidnou, viskozita klesá např. jogurt
- reopetické: časem naopak houstnou, jejich viskozita roste např. sádra

Binghamské kapaliny představují množinu látek, jejichž viskozita je časově nezávislá a závisí na teplotě.

Obrázek 3 graficky znázorňuje kapaliny, k jejichž deformaci dochází až po překonání prahového napětí a jsou děleny na:

- pseudoplastické: viskozita klesá nepřímo úměrně smykovému napětí např. šampón
- dilatantní: viskozita roste přímo úměrně tečnému napětí např. mokrá píseň
- plastické: deformace nastane až po překročení určité meze např. tvaroh [23]

Existují dvě varianty vyhodnocení reologického měření. První možností je toková křivka, která zobrazuje závislost smykové napětí na smykové rychlosti. Druhou možností je viskozitní křivka představující závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti [22, 24, 25].



Obrázek 3: Tokové křivky rozdílných látek [24]

#### 2.2.4 Princip reologie

Vlivem konání práce na kapalinu působí smykové napětí vyvolané například vnější silou. Toto napětí je přeměněno na teplo a označováno jako vnitřní tření. Viskozita s definovanými pojmy souvisí tak, že vyjadřuje míru neochoty jednotlivých částic kapaliny k pohybu. Reologie pak všechny tyto veličiny spojuje a udává vztah mezi vnějšími parametry ovlivňujícími zkoumanou látku a projevem těchto parametrů na chování látky o specifickém složení [23]. Je třeba rozlišovat reologii od reometrie. Reologie jako vědní disciplína zahrnuje definice a vzorce potřebné pro popis zkoumaných materiálů. Reometrie se zaměřuje na vyjádření dat, tedy zahrnuje samotné měření, zpracování dat a jejich následné vyhodnocení [23].

#### *Mikroreologie*

Mikroreologie je částí reologie zaměřující se na studium kapalin v nejmenším možném měřítku jejich struktury. Sledované rozměry se pohybují v rozmezí nanočástic. Na tak malé úrovni překvapivě některé materiály vykazují zcela odlišné vlastnosti od makroskopického chování v rozměrech zaznamenaných pouhým okem. Výhodou mikroreologie je malá potřeba vzorku, tudíž na analýzu není potřeba odebírat velké objemy. Z hlediska toho, zda je

na analyzovaný vzorek aplikováno vnější pole, je možno mikroreologii dále dělit na pasivní a aktivní.

V **aktivní mikroreologii** je tok částic ovlivněn pomocí magnetického či elektrického pole. Mikroreologie je výhodná pro studium velmi špatně extrahovatelných biomolekul, které je možno získat jen v malých objemech. Pro stanovení zakalených vzorků je praktičtější využití makroreologie [24].

Mikroreologie dokáže poskytnout dostatečně detailní informace o vlastnostech materiálů, které je následně možno používat v lidském těle. V posledních letech dochází k velkým pokrokům v oblasti protetiky. Nejčastěji používané endoprotézy nahrazují kolenní a kyčelní klouby, u kterých je vyžadováno, aby tvořily stabilní základnu pohybové soustavy. Pro totální endoprotézy (TEP) jsou nejčastěji využívány materiály na bázi kov-polymer, které jsou odolné, stálé a biokompatibilní s fyziologickým prostředím. Úzké spojení mezi endoprotézou a synoviální kapalinou tvoří jejich vzájemné chemické interakce. Pokud bude kloubní náhrada z materiálu, jenž bude v přítomnosti synoviální tekutiny degradovat, způsobí to v lepším případě bolesti, v nejhorším případě toxický šok a smrt [21, 26].

Do metod aktivní mikroreologie je možné zařadit i metodu elektroforetického rozptylu světla (ELS – electrophoretic laser scattering), ve které se aplikuje na vzorek v kapiláře elektrické pole. U nabitých částic dochází k pohybu směrem k opačně nabitým elektrodám. Vzorkem opět prochází laser. Dochází k posunutí frekvence světelného záření vlivem pohybujících se částic, tuto elektroforetickou mobilitu je možno jinak označit jako zeta potenciál [27].

**Pasivní mikroreologie** měří pohyb částic pomocí videosnímačů, nebo přerušováním laserového paprsku při styku těchto částic s proudem fotonu. Každá částice je ovlivňována přidáním další látky, která se zakomponuje do jejich struktury a předmětem sledování je pouze Brownův pohyb jednotlivých částic, z něhož jsou vyvozovány vlastnosti struktury látky [24].

Dynamický rozptyl světla (DLS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS) je jednou z měřících metod mikroreologie. Při použití klasického DLS nedochází k destrukci vzorku, protože vlivem Brownova pohybu dochází k pohybu jednotlivých částic vzorku, což způsobí změny intenzity rozptýleného světla pocházejícího z laserového zdroje. Výstupem měření je distribuční diagram definující počet a velikost částic ve vzorku [28]. Z mikroreologického pohledu je třeba se zaměřit na vlastnosti prostředí, proto je do matrice v květu přidán tzv. „tracer“, na něhož je pak nastaveno měření. Předmětem zájmu je potom vliv prostředí na definovaný tracer. Nejčastějšími materiály pro tracery jsou silikon nebo polystyren v nanometrových rozměrech [29].

Difúzní vlnová spektroskopie (DWS) dokáže předčít měřící rozsah DLS a posunuje měření až do oblastí nanorozměrů. Princip měření je velmi podobný DLS, rozdíl je v tom, že paprsek dopadá na opaleskující vzorek, což způsobí násobně větší rozptyl světla než u DLS [30].

Další metodou využitelnou pro mikroreologická měření je fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), která je založena na detekci pohybu fluorescenčně značených částic traceru, po jejich ozáření excitačním laserem. Neopomenutelnou výhodou FCS oproti

ostatním pasivním metodám je možnost fokusace na určitou část celé matrice, kterou je možno sledovat [31].

### ***Makroreologie***

Makroreologie popisuje chování měřených kapalin v reálném měřítku. Její výhodou je komplexní pohled na chování kapaliny jako viskózního kontinua. Nevýhodou je velká spotřeba vzorku. [22].

#### **2.2.5 Reologické modely**

Pro popis chování sledovaných materiálů jsou používány reologické modely, které pokrývají celou škálu od ideálně viskózních (Newtonovské kapaliny) až po ideálně elastické (Hookovy pevné látky). Je tedy možno hovořit o sledování viskoelastických vlastností.

Newtonův model vychází z rovnice (2). Definuje jednoduché ideálně viskózní kapaliny při ustáleném toku a konkrétně je reprezentován hydraulickým válcem s kapalinou o viskozitě  $\eta$  [32].

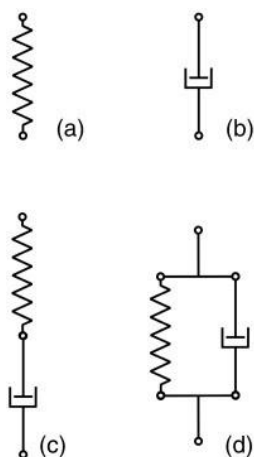
Hookův model popisuje ideálně elastické látky a prakticky ho tvoří pružina o modulu pružnosti ve smyku nebo modulu torze  $G$ . Matematicky je využíván Hookův zákon pro smyk, kde je tečné napětí  $\tau$  [Pa] přímo úměrné součinu modulu torze  $G$  [ $\text{n}\cdot\text{m}^{-2}$ ] a deformace ve smyslu zkosení  $\gamma$  [33].

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (4)$$

Hookův zákon je možno definovat z pohledu tahu a tlaku v odlišné formě, kde  $\sigma$  představuje mechanické napětí,  $E$  představuje modul pružnosti v tahu neboli Yongův modul. Tato složka definuje poměr napětí a vyvolané deformace tělesa. Poslední člen  $\varepsilon$  (mechanické napětí v tahu) neboli poměrná deformace, je určen jako podíl prodloužení tělesa ku původní délce [34].

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (5)$$

Předešlé dva modely tvoří extrémy v chování jednotlivých materiálů a vychází z teorie. Reálné systémy se nacházejí mezi těmito dvěma mezemi, proto je třeba dodefinovat další modely, které tvoří přechod od ideálně viskózních k ideálně elastickým látkám. Maxwellův model představuje soustavu pružiny a pístu v sérii, kde pružina prezentuje Hookovskou (elastickou) část a píst s kapalinou Newtonovskou (viskózní) část modelu. Používá se pro popis viskoelastických kapalin. Další možností je použití Kelvinova (Voightova) modelu, představující chování pevných viskoelastických těles. Ten obsahuje paralelně zapojený hydraulickým válcem s kapalinou o známé viskozitě a pružinou o definované pružnosti (elastická složka). Poslední model označovaný jako Tuckettův zahrnuje komplikovanější soustavu skládající se z pružiny (primárně elastická složka), Kelvinova modelu a hydraulického pístu (primárně viskózní složka). Veškeré výše popsané modely znázorňuje Obrázek 4 [35].



Obrázek 4: Reologické modely: a) Hookův, b) Newtonův, c) Maxwellův, d) Kelvinův [35]

## 2.2.6 Reologické testování

Testování vzorků je možno rozdělit z reologického hlediska na tři skupiny. První skupina zahrnuje dynamicko-mechanickou analýzu (DMA), která na deformovaný materiál vkládá smykové napětí. Tato analýza definuje základní strukturu materiálu na molekulární úrovni.

Další možností testování je dynamicko-mechanická termální analýza (DMTA). Měřením v torzi dochází ke stanovení fyzikálně chemických vlastností materiálů jako funkce teploty.

Extenzionální měření představuje poslední metodu reologického testování, která se odlišuje od předchozích v tom, že dochází k deformaci vzorku [25].

## 2.2.7 Komplexní viskozita a ztrátový úhel

Komplexní viskozita představuje průběh oscilační funkce při změnách smykového napětí a je složena z reálné a imaginární části. Reálnou část komplexní viskozity tvoří dynamická viskozita  $\eta'$  definována v kapitole 2.2.2.

$$\eta^* = \eta' - i\eta'' = \frac{G''}{\omega} + i \frac{G'}{\omega} \quad (6)$$

Mimofázový (ztrátový) modul představuje imaginární složku komplexní viskozity. Tato veličina je definována jako poměr elastického (storage, soufázového) modulu a úhlové rychlosti. Elastický modul je možno nazývat Youngův modul a slouží k definici míry elastické pevnosti materiálu [36].

Ztrátový úhel ( $\delta$ ) představuje poměr viskozitního a elastického smykového modulu, jak je znázorněno vzorcem (7). To znamená, že popisuje rozdíl v pružnostech materiálu, když je na něj nahlíženo jako na elastickou a viskózní látku.

$$\operatorname{tg}(\delta) = \frac{G'}{G''} \quad (7)$$

Cílem zavedení těchto veličin je celkový pohled na chování sledovaného materiálu, což vede teoretické modely k reálně měřitelným výsledkům. Čím vyšší hodnoty ztrátový úhel nabude, tím viskóznější charakter látka vykazuje. Pokud je naopak hodnota ztrátového úhlu menší než jedna, je možno hovořit o elastických látkách [37].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Onemocnění kloubů jsou jedním z nejčastějších zdravotních komplikací lidské populace. V listopadu 2012 byl zveřejněn článek o osteoartritidě koní, kde byly pozorovány podobné výsledky, jako u lidských pacientů trpících podobnými diagnózami. Proto je pro studium synoviálních kapalin využívána koňská synovie, která se lidské velmi blíží s ohledem na to, že každý vzorek synovie je v rámci populace jedinečný [38].

Zhang a kol. [39] zkoumali vliv bílkovin v synovii na její reologické vlastnosti. Na reologii má majoritní vliv množství kyseliny hyaluronové a fosfolipidů. Přítomnost proteinů je důležitá ve velmi malých pohybech kloubů (klidová forma), čímž není myšlen běh či chůze. U starších nebo nemocných pacientů je možno sledovat rozdíly ve složení synovie oproti zdravým a mladším jedincům. Při nemoci či traumatu kloubů obecně dochází ke snižování koncentrace kyseliny hyaluronové a tím i ke snížení viskozity celé synovie. Oproti tomu u nemocných pacientů roste koncentrace proteinů v synoviální kapalině. Pro přípravu umělé synovie byl použit hyaluronan sodný (Sigma-Aldrich 53747), albumin hovězího séra (BSA) (Sigma-Aldrich A3059), a  $\gamma$ -globulin (Sigma-Aldrich G5009). Kyselina hyaluronová měla molekulovou hmotnost odpovídající 1,6 MDa a byla získána pomocí bakterie *Streptococcus equi*. Umělá synovie obsahovala 3,4 mg/ml kyseliny hyaluronové, 10 mg/ml BSA a 0,5 mg/ml  $\gamma$ -globulin. Tato směs byla rozmíchána ve fosfátovém pufru (pH 7,4). Tato práce se zaměřovala na interakci složek a charakterizaci synovie bez zatížení. Výsledky práce na umělé kapalině byly srovnatelné s měřením reálných vzorků. Ale je třeba brát v úvahu, že reálné vzorky poskytují relativně široký interval hodnot v závislosti na stáří, námaze nebo onemocnění.

Publikace Galla a kol. se zaměřuje na dynamické vlastnosti synovie. Pro výzkum byl použit mechanický simulátor kyčelního kloubu. Zde byla v kontaktu hlavička stehenní kosti a pánevní jamka, která byla vytvořena převážně optického skla, které zde sloužilo k sledování změn tloušťky mazacího filmu při pohybu kloubu. Rozměry simulátoru odpovídaly reálně používaným kloubním náhradám. Parametry tloušťky mazacího filmu jsou v praxi důležité například pro částečné kloubní náhrady, kdy se zachovává krček a dochází pouze k opracování povrchu stehenní kosti. Tabulka 1 uvádí složení umělých synovií, které byly použity pro měření na simulátoru. Bylo potvrzeno, že tato složení odpovídají reálným vzorkům, a to při aktivním pohybu. V tabulce jsou uvedeny dvě mírně odlišná složení synovie, vycházející ze dvou skupin pacientů. První synoviální kapalina (SK 1) odpovídá pacientům s nezávažným ubýváním kostní hmoty. Druhá skupina (SK2) představuje pacienty s terminálním stádiem osteoporózy před operací.



Tabulka 1: Složení umělého synovia dle článku z roku 2018

Vzorek	Albumin [mg/ml]	$\gamma$ -globulin [mg/ml]	kyseliny hyaluronové [mg/ml]	Fosfolipidy [mg/ml]
SK1	28	11	1,1	0,17
SK2	28	9,4	1,9	0,31

Tyto dvě kapaliny byly srovnávány i s 25% roztokem bovinního sérového albuminu, který bývá také používán jako kloubní výplň u endoprotéz v závislosti na použitém materiálu endoprotézy [40]. Bylo zjištěno, že samotný albumin nedokáže pokrýt vlastnosti komplexní matrice, a proto je ve většině případů pro aplikaci méně vhodný než výše popsané směsi [41].

Tato bakalářská práce se zaměřuje na patent US 8716204 z roku 2014. Zvyšující se počet kloubních náhrad nutí trh k jejich čtenějšímu testování. To však není možno provádět s reálnými vzorky, protože jejich objem je velmi malý a jejich strukturní složení se v závislosti na mnoha faktorech liší. Proto bylo třeba připravit umělou náhradu, která z hlediska složek odpovídá realu tak, aby byla stabilní a relativně levná. V patentu je uvedeno, že první pokusy o přípravu umělých synovií byly ve formě čistě vodných roztoků, zde však nebylo možné nalézt odpovídající viskoelastické vlastnosti. Stejně tak selhaly pokusy s bovinním sérovým albuminem. Bylo třeba připravit komplexní matici bohatou jak na minerály, tak na složky propůjčující umělému synoviu stabilitu a neneutnovský charakter [42].

## 4 CÍLE PRÁCE

- sumarizace metod přípravy umělého synoviálního kapalin a metodik charakterizace jejich mechanických vlastností
- definice vhodných postupů přípravy funkčních vzorků umělého synoviálního
- optimalizace metod charakterizace mechanických vlastností připravených vzorků se zaměřením zejména na tzv. mikroskopické přístupy
- porovnání získaných charakteristik s reálným vzorkem

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 5.1.1 Použité chemikálie

- $\gamma$ -globulin (Sigma Aldrich)
- Albumin (Sigma Aldrich)
- dipalmitoyl fosfatidylcholin (Sigma Aldrich)
- kyselina hyaluronová (1500-1700 kDa)
- chlorid sodný (Penta Chrudim)
- chlorid draselný (Penta Chrudim)
- hydrogenfosforečnan sodný (Penta Chrudim)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Penta Chrudim)
- ultra čistá (Milli-Q) voda

#### 5.1.2 Použité přístroje

- ultrazvuková čistička (Bandelin)
- pH metr (Greisinger)
- výrobek na ultračistou deionizovanou vodu (Elga)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- magnetická míchačka (Thermo Scientific)
- termogravimetrický analyzátor-TGA Q5000 (TA Instruments)
- FTIR spektrometr-Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific)
- membránový extrudér LiposoFast-Basic & Stabilizer (Avestin)

### 5.2 Detailní podmínky měření pro použité metody

Primárním úkolem byla charakterizace reálných vzorků, aby následně mohly být umělé vzorky připravovány pomocí takto nadefinované předlohy. Pro reálný model synoviální kapaliny byly použity vzorky koňské synovie, které byly získány z kliniky chorob koní pod Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno (VFU). Vzorky byly odebrány z hlezna do sterilních injekčních stříkaček. Vzorky koňské synovie byly do 24 hodin proměřeny, aby nedošlo k jejich přirozené biologické degradaci. Reologická měření probíhala při teplotě 25 °C, která měla simulovat laboratorní podmínky a při 37 °C, což mělo představovat fyziologickou teplotu. Pro charakterizaci byly použity metody statické a dynamické termogravimetrické analýzy (TGA), FTIR spektroskopie a DLS mikroeologie.

### 5.3 Použité metody charakterizace synoviálních kapalin

#### 5.3.1 DLS mikroeologie

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, tak dynamický rozptyl světla využívá rozptyl paprsku procházejícího zkoumaným prostředím. Mikroeologický měřicí modul za pomoci traceru (polystyrenové nanočástice PS 100 nm) dokázal určit viskoelastické moduly  $G'$ ,  $G''$  a komplexní viskozitu  $\eta^*$ , což byly hlavní sledovací parametry pro porovnání

jednotlivých studovaných vzorků. Měření bylo prováděno 3krát při dvou teplotách (25 °C, 37 °C). Každé měření obsahuje 15 měřených hodnot v 10sekundových intervalech.

### 5.3.2 TGA

Byly provedeny dvě varianty termogravimetrické analýzy (TGA), které popisují úbytek hmoty jako funkci času (dynamická) nebo teploty (statická). Při dynamické docházelo k postupnému navyšování teploty a byl sledován úbytek hmoty v závislosti na síle vazeb ve vzorcích. Přesné nastavení zobrazuje Tabulka 2. Statická neboli izotermální TGA slouží k sledování změn ve vzorku při jedné konstantní teplotě. Zde byl pro vyhodnocení použit diferenciální tvar, který dokáže lépe rozlišit úbytky hmoty, které nastaly těsně po sobě [43].

Tabulka 2 : Nastavení rychlosti ohřevu pro dynamické TGA

vzorek	nastavení
artificiální – N	Ramp 10.00 °C/min to 200.00 °C
artificiální – vzduch	Ramp 10.00 °C/min to 200.00 °C
1. kůň reálná – vzduch	Ramp 5.00 °C/min to 200.00 °C

Pro izotermální variantu měření bylo aplikováno přibližně 50 mg synoviální kapaliny. Nejprve došlo ke skokovému ohřátí vzorku na 70 °C, tato teplota byla následně konstantní po dobu 30 minut a během celé této doby byl sledován úbytek hmotnosti vzorku v závislosti na čase. Po uplynutí 30 minut byla teplota skokově zvýšena na 200 °C. Následujících 10 minut po tomto zvýšení byl úbytek hmotnosti měřen proto, aby mohl být stanoven obsah popela ve vzorku.

### 5.3.3 FTIR

Fourierova transformační infračervená spektroskopie je založena na změně vibračně rotačních stavů molekul po přijetí energie ze světelného zdroje o vlnové délce odpovídající infračervené oblasti. Takto je možno rychle stanovit složení vzorku. Tato metoda je nedestruktivní a jejím výstupem jsou spektra definující závislost transmitance nebo absorpance na převrácené hodnotě vlnové délky neboli vlnočtu. Tato metoda je vhodná pro matrice s typickou prostorovou strukturou, která jim propůjčuje určité vlastnosti [44, 45].

FTIR měření probíhalo za laboratorní teploty na jednorázovém ATR krystalu (materiál = diamant). Pro časově rozlišené měření byla na ATR krystal aplikována kapka analyzované synovie (cca 10 µl). Pomocí softwaru Omnic Series byla zaznamenávána FTIR spektra v čase (každých 10 sekund 1 měření, tvořící průměr z 8 dílčích skenů s rozlišením 1 cm<sup>-1</sup>) do doby úplného vyschnutí naneseného vzorku (nejméně 120 minut).

### 5.3.4 Membránová extruze

Membránový extrudér je využíván v nanotechnologické oblasti při přípravě lipozomů o definované velikosti. Aparatura je sestavena ze dvou injekčních stříkaček, mezi kterými je nástavec s membránou o definované velikosti póru. Jedna stříkačka se naplní suspenzí lipozomů a jejich protlačení přes membránu do druhé stříkačky dochází k separaci částic dle velikosti. Tím je možno získat monodisperzní matici.

V tomto případě aparatura sloužila k odlišnému účelu. Bylo třeba zvolit membránu s většími otvory, než byla předpokládána velikost částic, protože separace byla v tomto případě nežádoucí. Jediným účelem bylo simulovat tlakové namáhání (jako při pohybu) na umělé synovii v rozměrech srovnatelných s kloubním pouzdem.

#### **5.4 Příprava umělé synoviální kapaliny**

Pro přípravu umělé synoviální kapaliny byl použit patent US 8716204, kde bylo třeba optimalizovat některé mezikroky přípravy umělé synovie. V patentu je uvedeno, že má být směs po přidání fosfolipidů míchána do rozpuštění. Nikde však není uvedeno, že při práci s fosfolipidy je třeba dbát na mez fázového přechodu. Teplotní teplota má zásadní vliv na enkapsulační účinnost fosfolipidů. Teplota 50 °C se nachází nad teplotou fázového přechodu. Tato teplotní hranice definuje změny v mikroskopické struktuře fosfolipidů. Při teplotách nad 41,46 °C dochází k strukturální změně dipalmitoyl fosfatidylcholinu (DPPC) z pevné fáze na strukturu tekutých krystalů [46]. Zde dochází ke vzniku vezikulárních útvarů. Vezikuly vypadají jako micely, jen na jejich povrchu není fosfolipidová dvojvrstva, ale jednoduchá vrstva fosfolipidů. Tyto útvary jsou stabilní, tudíž zaručují dobrou opakovatelnost při měření umělých vzorků. Tyto teoretické znalosti byly prakticky aplikovány a došlo k výraznému posunu. Měření bylo opakovatelné a matrice se stala stabilnější.

##### **5.4.1 Příprava pufrčního roztoku (50 ml)**

- 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl

Výše zmíněné chemikálie byly přesně naváženy na analytických vahách a na magnetické míchačce byly míchány do rozpuštění v ultračisté deionizované vodě.

##### **5.4.2 Přídavek fosfolipidů, pH kontrola**

Po úplné solvaci byly do směsi přidány fosfolipidy, konkrétně 0,1 mg/ml dipalmitoyl fosfatidylcholin, kádinka byla kryta pomocí parafilmu a umístěna do ultrazvukové vodní lázně temperované na 50 °C. Po vizuální kontrole, kdy došlo k rovnoměrnému rozptýlení fosfolipidů v roztoku a jeho zakalení, bylo třeba zkontrolovat hodnotu pH tohoto roztoku, která by se měla pohybovat okolo 7,4.

##### **5.4.3 Přídavek kyseliny hyaluronové a bílkovin**

Další krok představoval přídavek 2 mg/ml kyseliny hyaluronové. Pro měření byla používána kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 1300–1500 kDa. Vzorek bylo třeba řádně rozmíchat za použité magnetické míchačky po dobu přibližně 4 hodin. Nakonec bylo přidáno 12 mg/ml albuminu a 7 mg/ml  $\gamma$ -globulin. Po propojení celé matrice bylo opět třeba zkontrolovat pH, aby bylo dosaženo výsledné hodnoty 7,1.

Takto připravený vzorek umělé synoviální kapaliny byl proměřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS pomocí mikroeologického měřicího modulu, který sleduje vliv měřeného vzorku na pohyb traceru (polystyrenové nanočástice o nominální velikosti 100 nm).

## **6 VÝSLEDKY A DISKUZE**

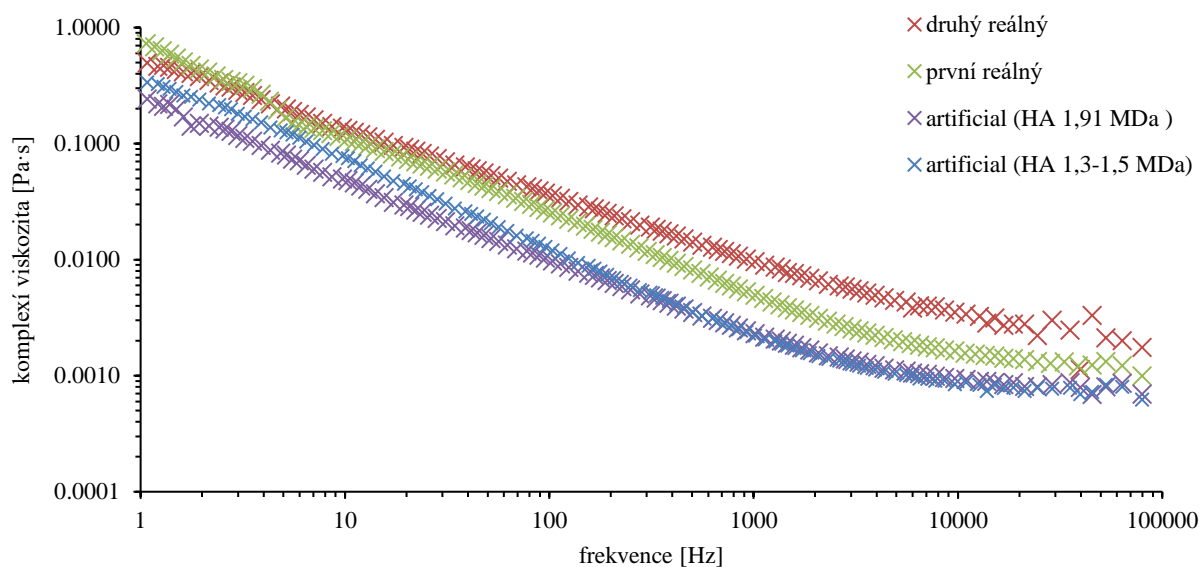
Cílem bakalářské práce bylo optimalizovat postup přípravy umělého vzorku synoviální kapaliny založeného na kyselině hyaluronové. Tento postup přípravy vychází z patentu [42]. V rámci BP bylo nutné se zaměřit jednak na optimalizaci dispergace jednotlivých komponent synoviální kapaliny, studium vlivu molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové a vliv iontové síly použitého disperzního prostředí. Funkční vzorek připravený dle takto optimalizovaného postupu byl svými vlastnostmi následně srovnáván s reálným vzorkem synoviální kapaliny, který byl pro účely BP získán v rámci spolupráce s Veterinární a Farmaceutickou Univerzitou (VFU) Brno. Hlavní náplní experimentální části BP bylo následně provést materiálové a mechanické charakterizace z fyzikálně chemického pohledu. Pro porovnání byly použity metody termogravimetrické analýzy, Fourierovy transformační infračervené spektroskopie a DLS mikreologie. Mechanické charakteristiky připravených vzorků umělé synoviální kapaliny byly rovněž studovány z hlediska jejich termické a časové stability. Pro definování dynamických vlastností v reálném prostředí byl u umělé matrice použit membránový extrudér.

Již při měření reálných vzorků bylo jasné, že rozptyl reálných hodnot je široký. Přestože byly vzorky sbírány v horizontu půl roku, nebylo možné nashromáždit větší množství dat. Reálné vzorky byly získány pouze v případě úrazu hlezna koňů, kteří byli dovezeni na VFU Brno. Pro lepší mapování by bylo vhodné sbírat vzorky z více zdrojů po delší čas. Zde byl ovšem problém se zpracováním vzorku. Reálné vzorky byly stabilní maximálně po dobu 24 hodin.

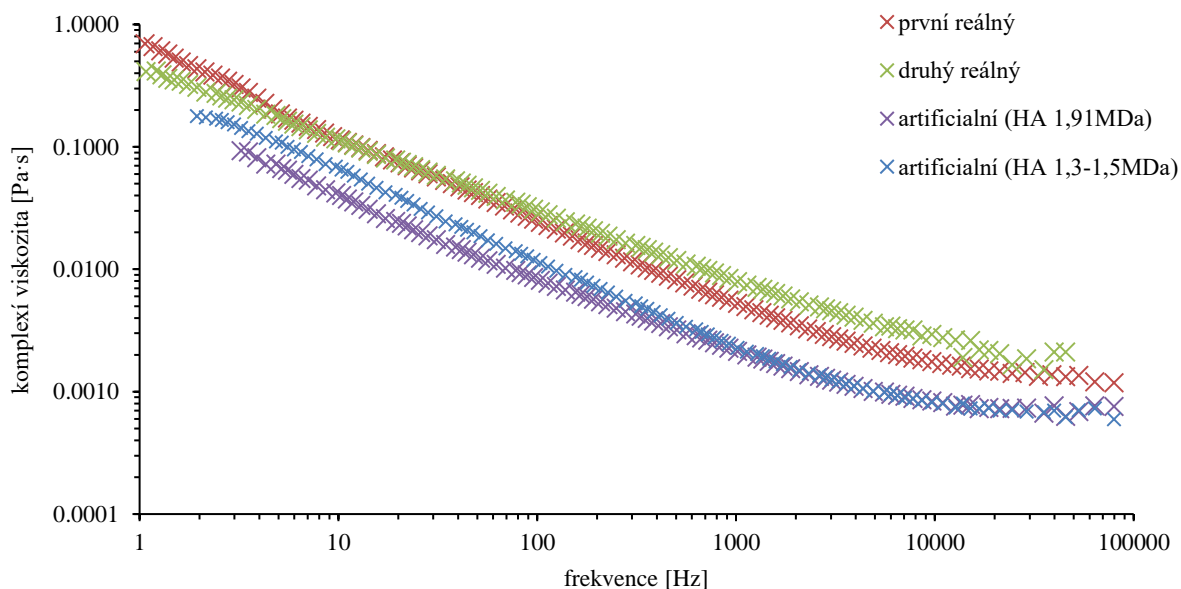
### **6.1 Optimalizace přípravy umělé synoviální kapaliny**

#### **6.1.1 Vliv molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové**

V rámci optimalizace přípravy funkčního vzorku synoviální kapaliny bylo nutno ověřit vliv několika parametrů. První z nich byl vliv molekulové hmotnosti použité kyseliny hyaluronové. V živých organismech se pro účely zvyšování viskozity kapalin v kloubních výplních uplatňuje zejména vysokomolekulární HA, a proto i v rámci této části práce byly porovnávány synoviální kapaliny připravené ze dvou vzorků vysokomolekulární HA ( Obrázek 5 a 6)



Obrázek 5: Srovnání komplexních viskozit při 25 °C u reálných vzorků a umělého vzorku s použitím kyseliny hyaluronové (HA)

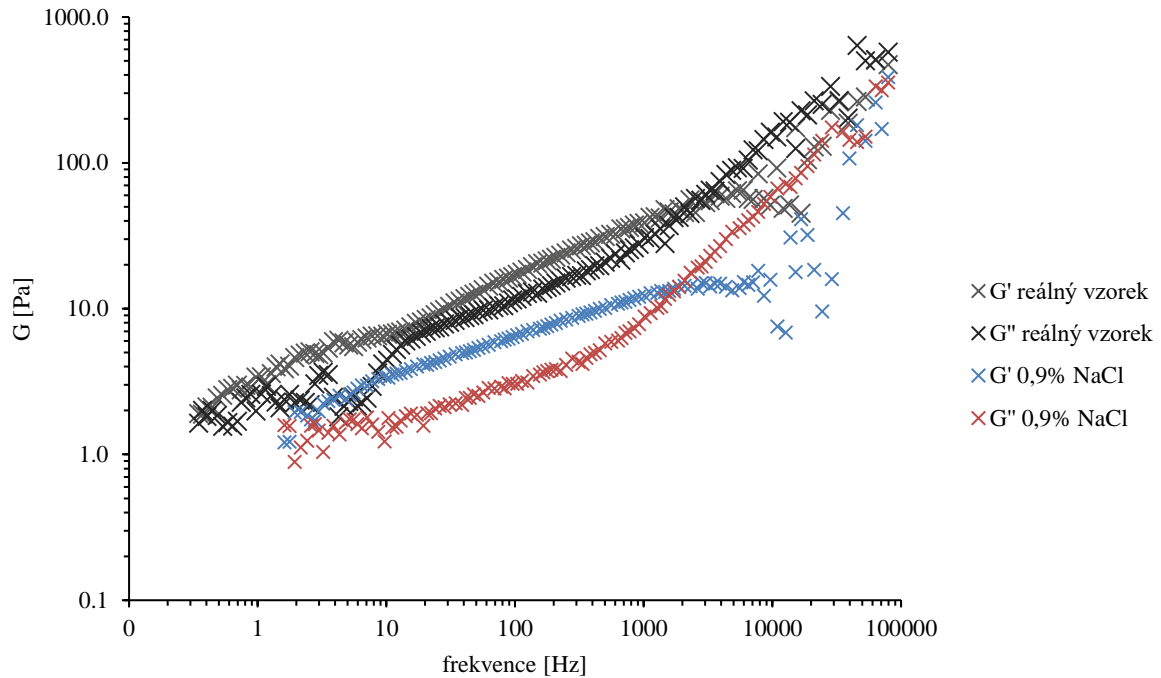


Obrázek 6: Srovnání komplexních viskozit při 37 °C u reálných vzorků a umělého vzorku s použitím kyseliny hyaluronové (HA)

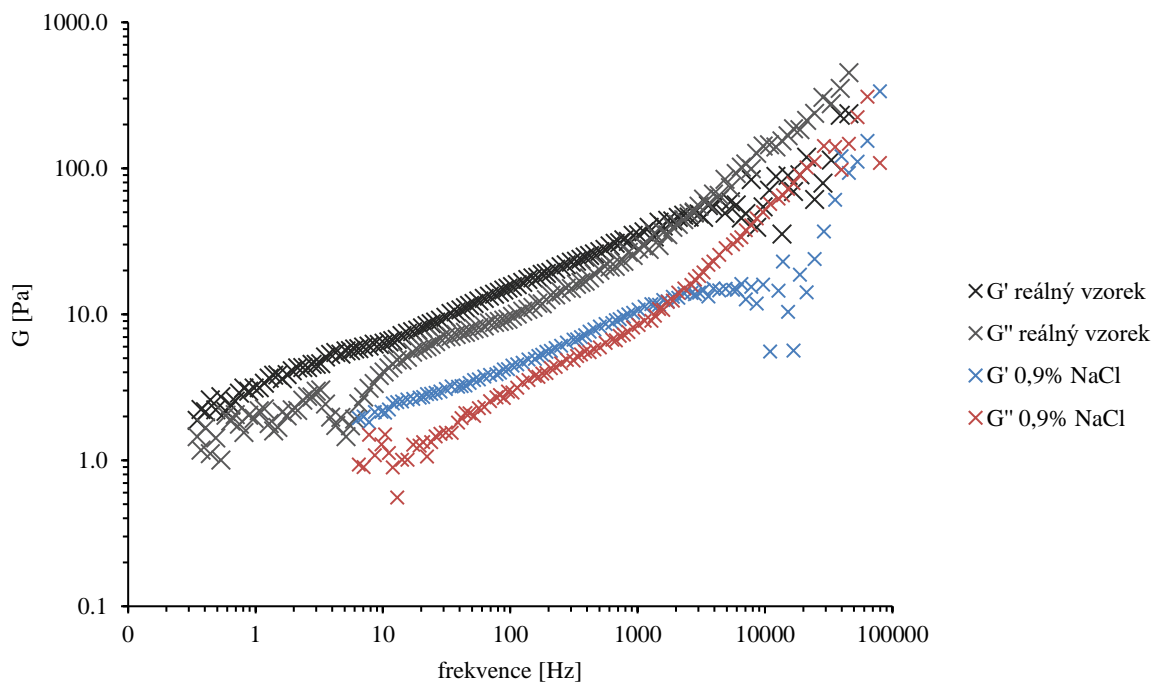
Pro porovnání byly použity dvě rozdílné HA, první o molekulové hmotnosti 1,3–1,5 MDa, druhá o molekulové hmotnosti 1,91 MDa. Obrázek 5 a 6 zobrazuje vliv obou kyselin na stanovené viskozity měřené při laboratorní teplotě a při 37 °C. Přestože průběhy funkcí vypadají podobně, lepších výsledků dosahovala synoviální kapalina s HA s 1,3–1,5 MDa a to z několika důvodů. Jednak při použití vyšší molekulové hmotnosti HA bylo pozorováno horší propojení matrice než u nižší molekulové hmotnosti. Vyšší molekulová hmotnost HA je rovněž náchylnější na štěpení při namáhání, tím pádem i méně stabilní.

### 6.1.2 Vliv iontové síly

Pro porovnání vlivu iontové síly byl v patentu původní roztok s přesně definovaným poměrem minerálních látek zaměněn za 0,9 hm.% roztok chloridu sodného, který se v laboratorních podmínkách používá jako záměna za fyziologický (fosfátový) pufrální roztok.

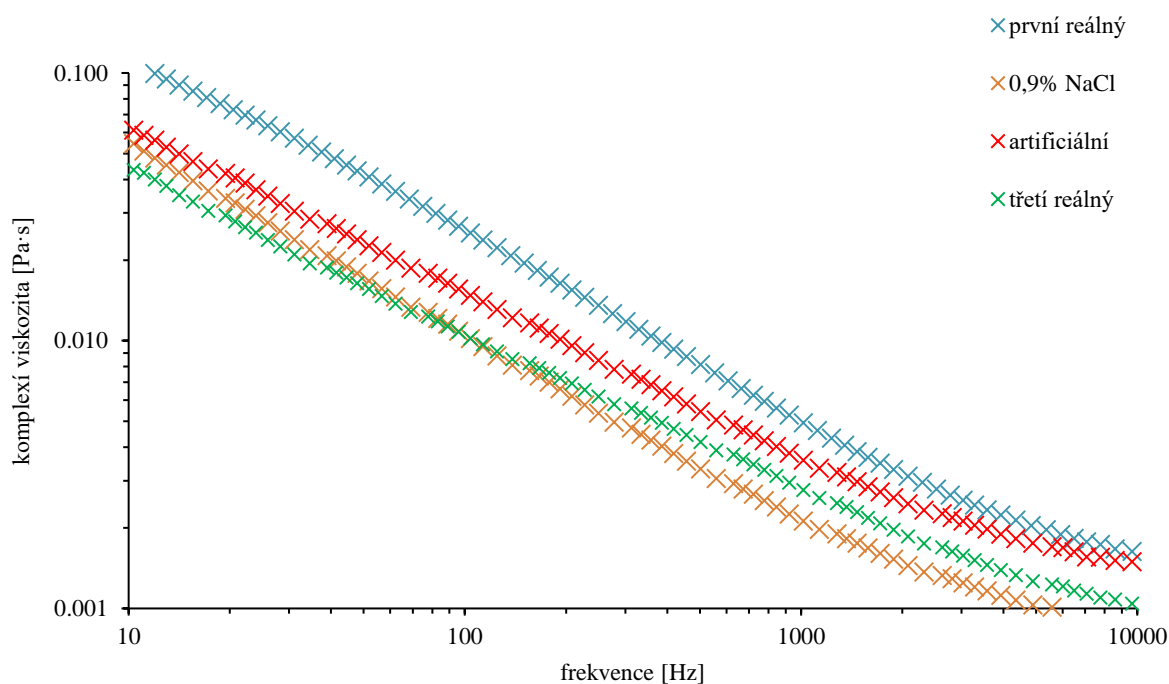


Obrázek 7: Porovnání vlivu iontové síly (25 °C)

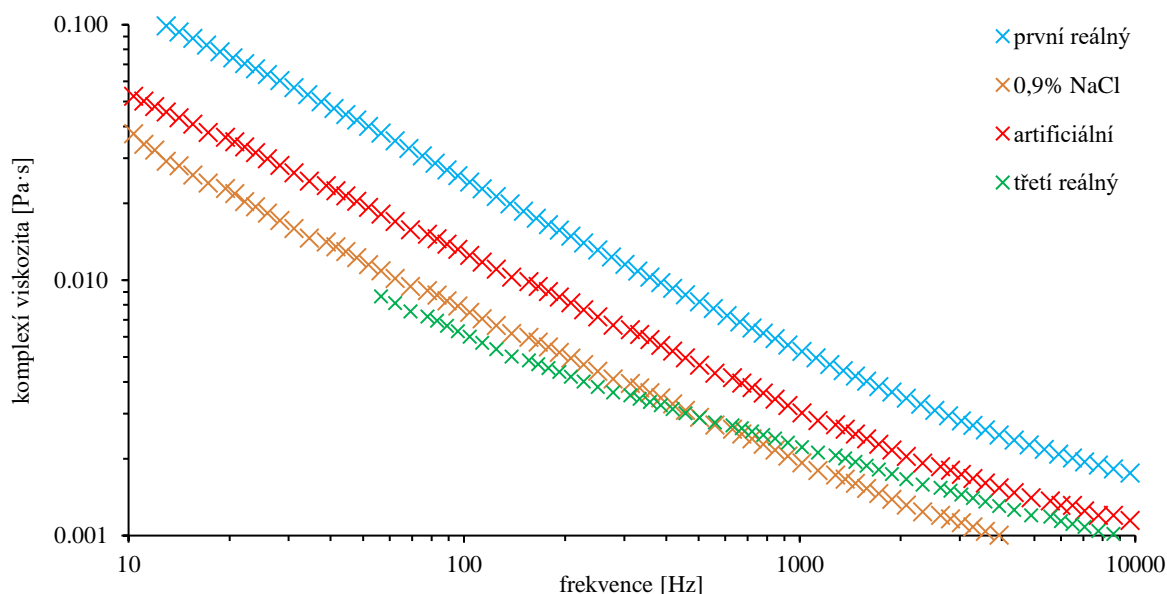


Obrázek 8: Porovnání vlivu iontové síly (37 °C)





Obrázek 9: Porovnání komplexní viskozity reálných vzorků a vzorku s 0,9 % NaCl (25 °C)



Obrázek 10: Porovnání komplexní viskozity reálných vzorků a vzorku s 0,9 % NaCl (37 °C)

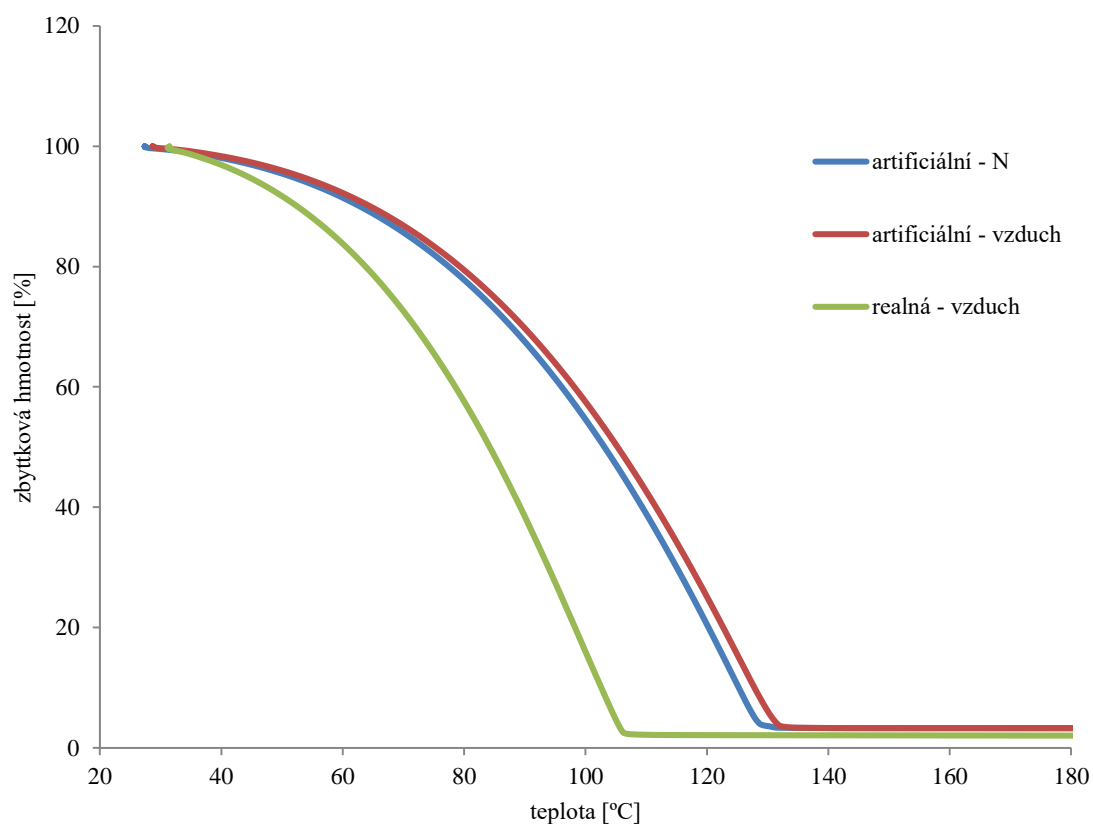
Obrázek 7 a 8 ukazují, že 0,9 hm.% roztok chloridu sodného není schopen pokrýt specifické složení solí tvořících základ synoviální kapaliny. Viskoelastické moduly jsou na první pohled odlišné, viskoelastická oblast pro NaCl odpovídá nižším frekvencím než u reálného vzorku. Kromě výrazně nižších naměřených viskoelastických modulů bylo určeno, že ani hodnoty komplexní viskozity neodpovídají reálným vzorkům, což ukazuje Obrázek 9 a 10. Z výsledků byla (pro lepší přehlednost) vyřazena data pro druhý reálný vzorek, protože se téměř ve všech bodech shodoval s prvním reálným vzorkem.

## 6.2 Materiálová charakterizace

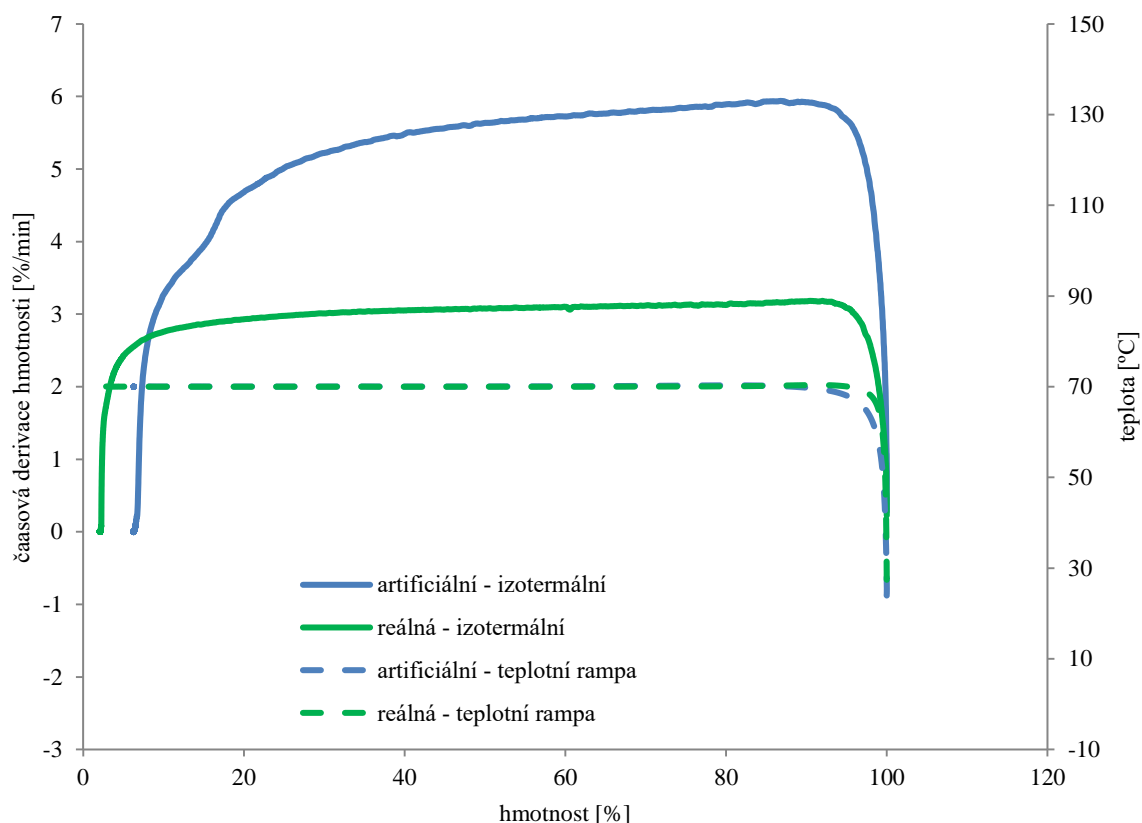
Na základně optimalizačních kroků přípravy bylo definováno vhodné složení umělého synoviálního kapalinu. Takto připravený funkční vzorek byl následně porovnáván z hlediska základních fyzikálně-chemických materiálových charakteristik se vzorkem reálné synoviální kapalinu získané z VFU. Pro tyto účely byla použita termogravimetrická analýza, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a DLS mikrorheologie.

### 6.2.1 TGA

První využitou metodou porovnávající funkční vzorek umělého synoviálního kapalinu s reálným byla termogravimetrická analýza. Tato metoda byla využita ve dvou měřicích módech, a to v izotermálním a dynamickém.



Obrázek 11: Termogravimetrická analýza (neizotermální–dynamická)



Obrázek 12: Derivační termogravimetrická analýza (izotermální–statická)

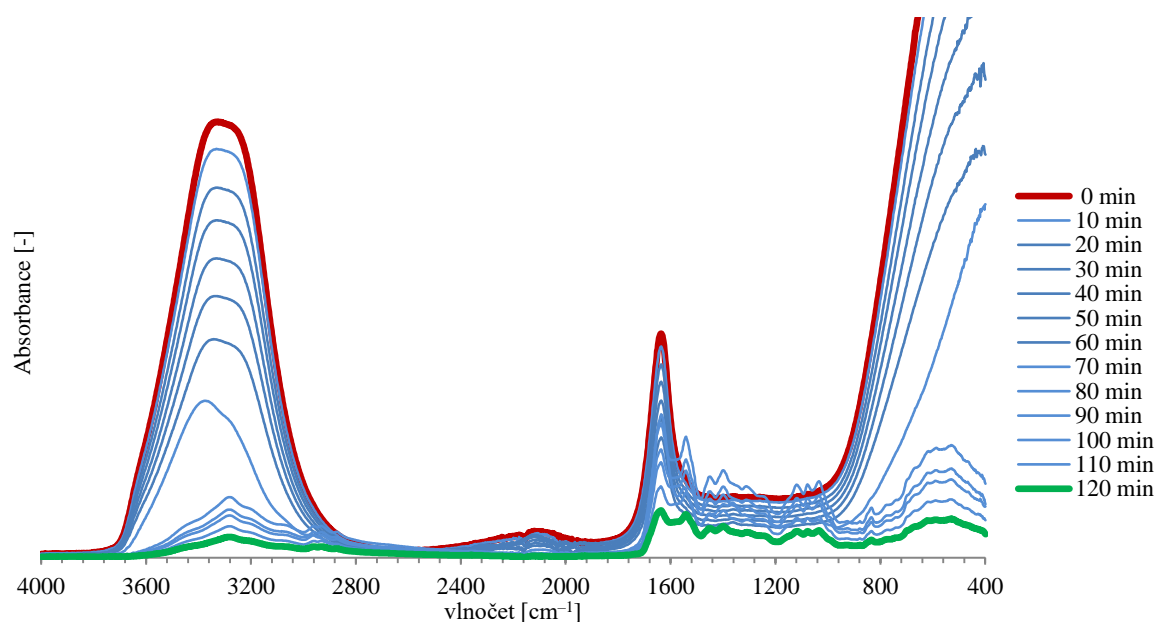
Tabulka 3: Výsledky TGA

vzorek	vlhkost [hm.%]
artifciální – N:	96.56
artifciální – vzduch:	96.41
1. reálný – vzduch:	97.70

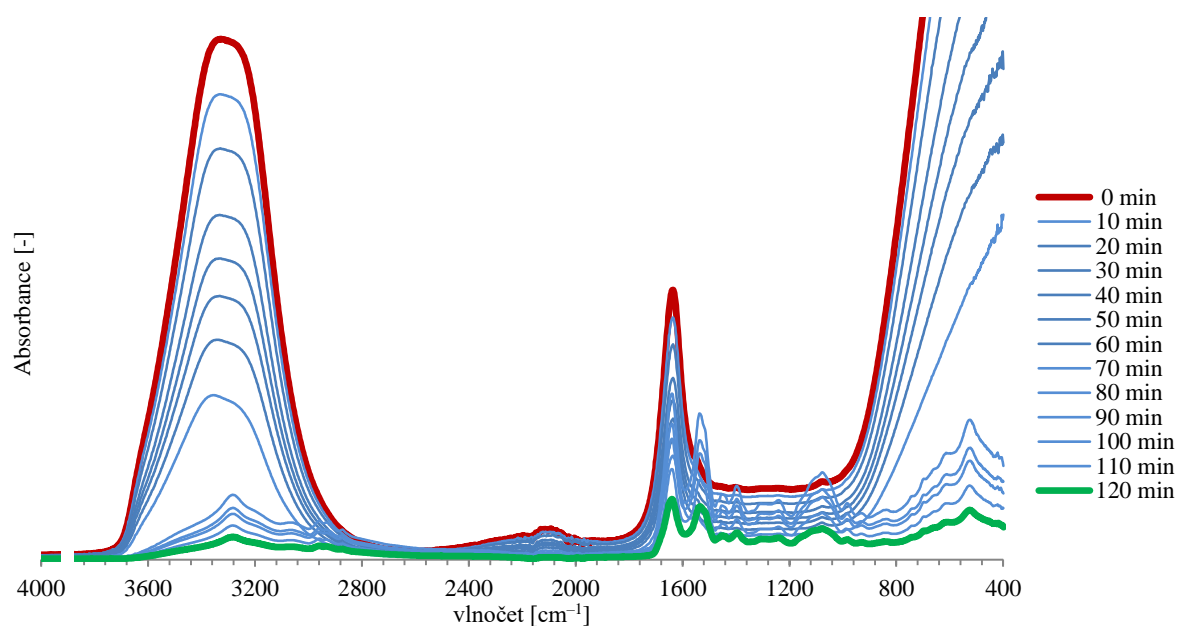
Z výsledků TGA je zřejmé, že u reálného i artifciálního vzorku došlo ke stejnému váhovému úbytku odpařené vody. Proto nebylo možno rozeznat odlišnosti mezi těmito vzorky. Tyto výsledky v Obrázku 11 byly určeny z klasického uspořádání TGA experimentu, kdy byla aplikována konstantní teplotní rampa 10 °C (resp. 5 °C) /min. Pro lepší rozlišení způsobu vázání vody ve vzorku bylo následně využito rovněž izotermálního uspořádání TGA experimentu, kde bylo možné pozorovat množství vázané a volné vody ve vzorcích. Obrázek 12 potvrzuje, že u reálné matrice docházelo k odparu vody, která nebyla nijak vázána na matrici synoviální kapaliny, což je zřejmé z průběhu termogravimetrického záznamu, který je prakticky rovnoběžný s osou x. Tento trend je typický pro odpar z volné hladiny. Oproti tomu křivka pro artifciální vzorek ukazuje, že přibližně 82% hmotnosti představovalo volnou vodu, ale ve zbytku je možno pozorovat mírně odlišný trend. Proto je možné předpokládat, že zbylých 18% hmoty obsahuje vodu odlišně navázanou (např. vodíkové můstky). Celkový hmotnostní obsah vody v obou (artifciální, reálný) vzorcích byl téměř shodný, což zobrazuje Tabulka 3: Výsledky TGA.

## 6.2.2 FTIR

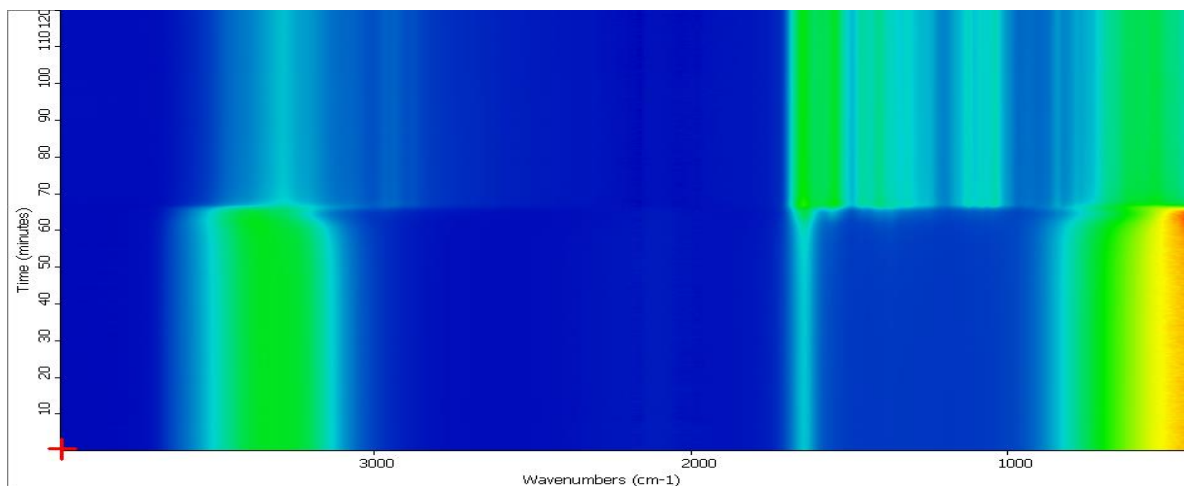
Další metodou využitou pro srovnání umělé a reálné synoviální kapaliny byla FTIR spektrometrie. Pro porovnání vzorků bylo měření nastaveno tím způsobem, že byl vždy na ATR krystal FTIR spektrometru aplikován kapalný vzorek synoviální kapaliny a následně byla zaznamenávána FTIR spektra v čase až do úplného vysušení vzorku. Tímto způsobem měření bylo možné jednak porovnat základní strukturální charakteristiky reálné a umělé synoviální kapaliny a dále rovněž bylo možné sledovat odlišnosti ve způsobu vazby vody v matici. Pokud by byla tato voda vázána různými interakcemi, tak by se to projevilo v časovém záznamu FTIR, tedy v rychlosti sušení jednotlivých vzorků.



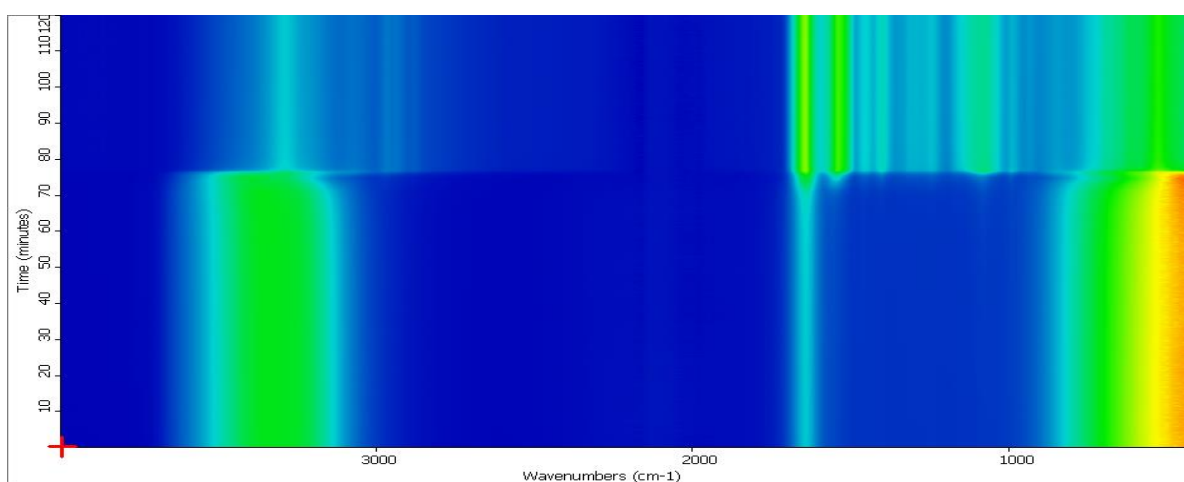
Obrázek 13: Časová změna FTIR spekter v průběhu sušení reálného vzorku



Obrázek 14: Časová změna FTIR spekter v průběhu sušení umělého vzorku



Obrázek 15: 2D časově rozlišený ATR záznam sušení reálného vzorku synovie

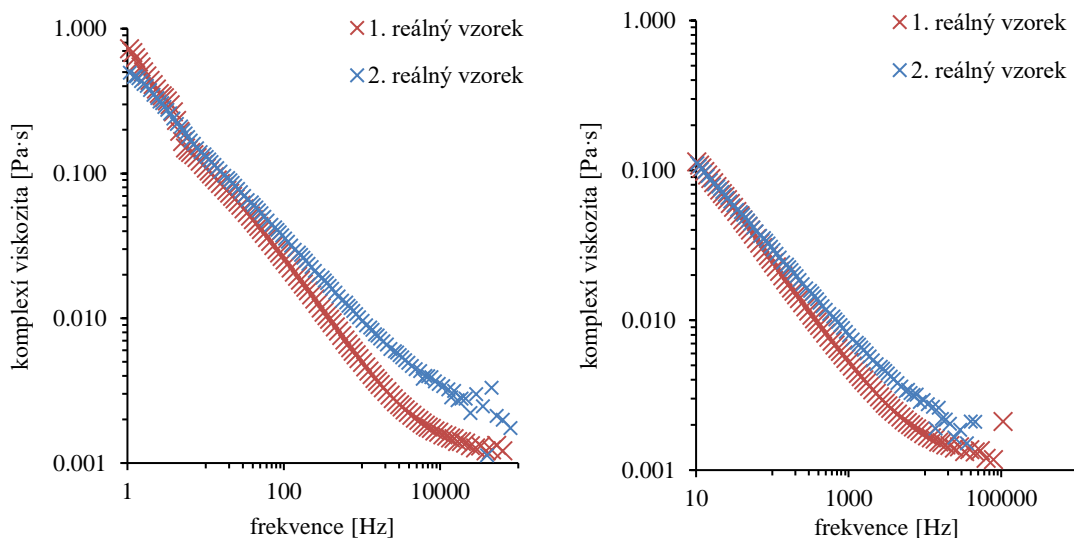


Obrázek 16: 2D časově rozlišený ATR záznam sušení umělého vzorku synovie

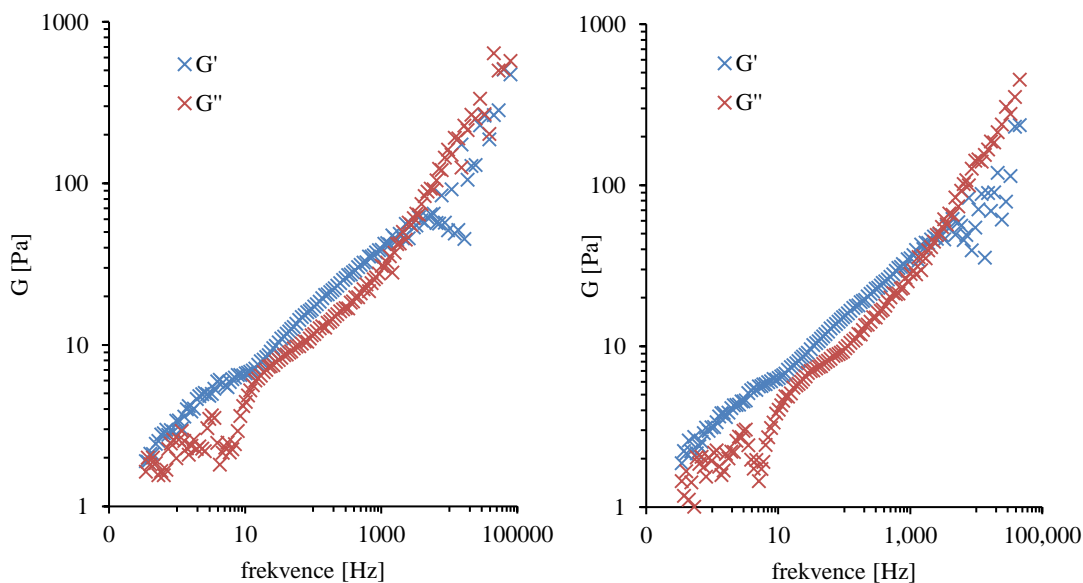
Spektra na Obrázku 13 a 14 si v polohách pík odpovídají, tudíž je možno říct, že se oba dva vzorky strukturálně shodují. První pík v oblasti  $3280\text{ cm}^{-1}$  představuje -OH skupiny (jak volné, tak vázané), které se vyskytují v HA a aminokyselinách. Stejně tak je tento pík charakteristický pro -NH skupinu, která tvoří základní strukturu aminokyselin. Další oblast  $2930\text{ cm}^{-1}$  představuje alkylovou C-H skupinu ( $\text{sp}^3$  hybridizace), která tvoří základ organické hmoty. Hodnota  $2100\text{ cm}^{-1}$  definuje pásmový přechod heteroatomů ze základního do excitovaného stavu. Ve sledovaných maticích heterocykly zastupují aminokyseliny v proteinech jako fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan. Pík v oblasti  $1630\text{ cm}^{-1}$  charakterizuje jak přítomnost amidové skupiny v postranním řetězci HA, tak přítomnost skupiny -CO. Karbonylová skupina je posledním píkem ze trojice (-OH, -CH, -CO), kterou je možno zaznamenat, pokud vzorek obsahuje karboxylovou kyselinu. Zde je to kyselina glukuronová v HA. Polypeptidové řetězce jsou základem aminokyselin, z nichž jsou sestaveny proteiny a jejich vlnočty odpovídá  $1520\text{ cm}^{-1}$ . Fosfátová skupina s vlnočtem  $1030\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje jednak v použitém fosfolipidu (DPPC), a také ve fosfátovém pufru. Poslední pík s hodnotou  $500\text{ cm}^{-1}$  představuje disulfidické můstky S-S, které determinují stabilitu terciální struktury proteinů. 2D časově rozlišené ATR záznamy sušení vzorků na Obrázku 15 a 16 se shodují s naměřenými spektry a není zásadní rozdíl mezi umělým a reálným vzorkem.

### 6.2.3 DLS mikroreologie

Stěžejní pro budoucí možné aplikace umělé synoviální kapaliny je, aby dosahovala stejných mechanických vlastností jako reálné vzorky. Pro tyto účely byla využita reologie, konkrétně mikroreologie. Ta poskytuje obdobné charakteristiky jako klasická reologie, ale z hlediska odběru vzorku je výhodnější, protože pro analýzu postačí malé množství vzorku (0,1–1 ml).



Obrázek 17 a 18: Srovnání závislosti komplexních viskozit na frekvenci u reálných vzorků při 25 °C (vlevo) a 37 °C (vpravo)



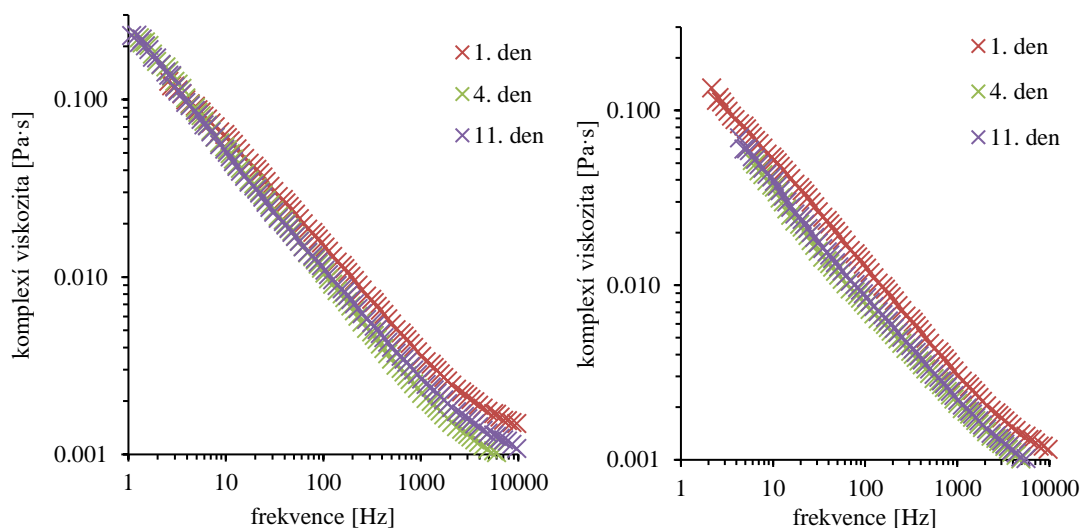
Obrázek 19 a 20: Viskoelastické moduly průměrného reálného vzorku při 25 °C (vlevo) a 37 °C (vpravo)

Obrázek 17 až 20 zobrazují mikroreologickou charakteristiku reálných vzorků, která byla nezbytná pro následující srovnání s uměle připraveným vzorkem. v kapitole 6.4. Při 37 °C je možno pozorovat nižší viskozitu než při 25 °C.

### 6.3 Stabilita umělé vzorků

Pro aplikaci vzorků je kromě mechanických vlastností důležitá i stabilita. Při přípravě umělých vzorků byly pozorovány tři deformační vlivy a to čas, teplota a namáhání. Tyto vlivy mají hlavní podíl na životnosti reálných vzorků, proto bylo třeba definovat vlastnosti umělých vzorků i z tohoto pohledu.

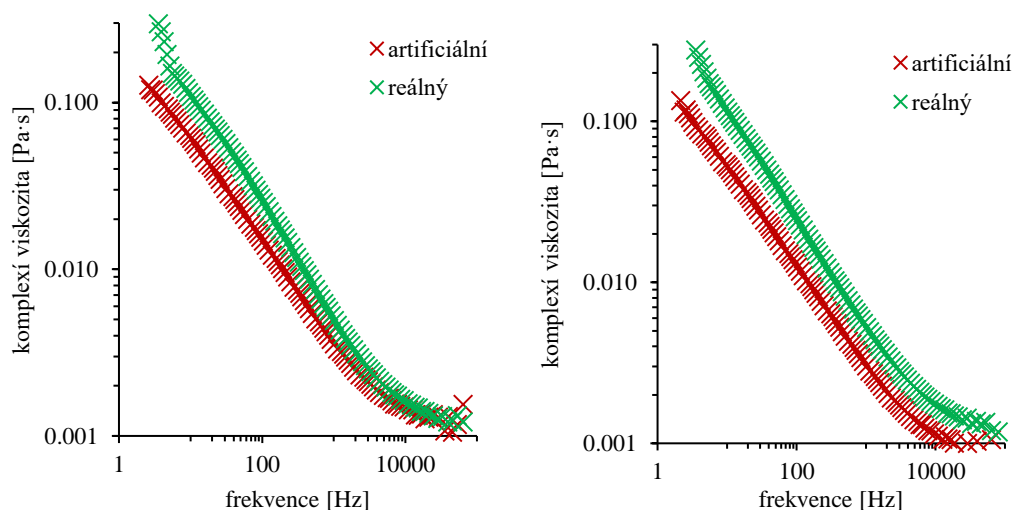
#### 6.3.1 Stabilita časová



Obrázek 21 a 22: Časová stabilita umělého vzorku při 25 °C (vlevo) a při 37 °C (vpravo)

Obrázek 21 a 22 zobrazují mikreologické měření časové stability umělých vzorků při teplotě 25 a 37 °C. Bylo dokázáno, že při tomto způsobu přípravy je umělý vzorek stabilní.

#### 6.3.2 Stabilita teplotní

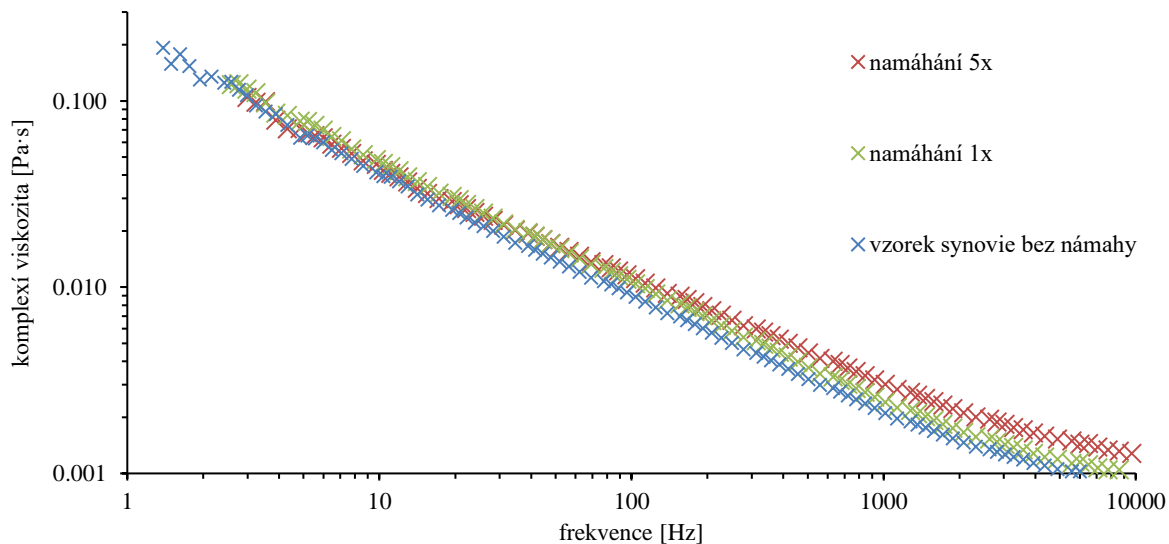


Obrázek 23 a 24: Teplotní stabilita vzorků při 25 °C (vlevo) a 37 °C (vpravo)

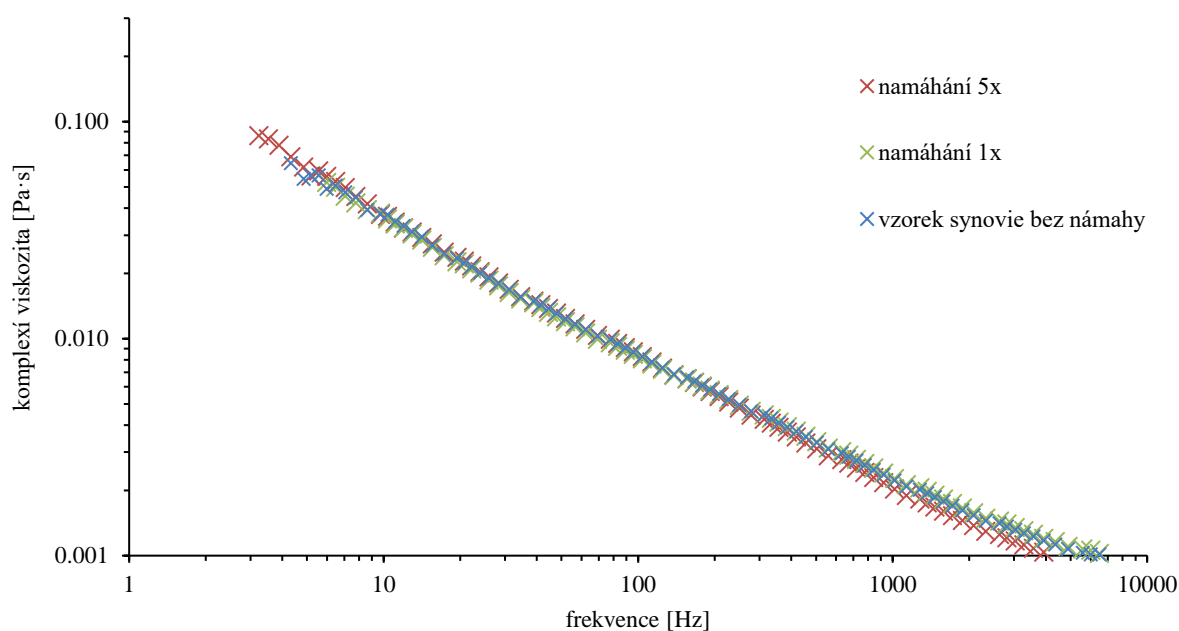
Z Obrázků 23 a 24 je zřejmé, že průběh funkce komplexní viskozity u umělých vzorků se velmi blíží reálným vzorkům. Při všech měřeních, která se snažila simulovat reálné podmínky

bylo dbáno na dodržení maximální teploty 37 °C, aby tak bylo možno napodobit fyziologické prostředí a aby nedocházelo k ovlivnění výsledků měření primárně zaměřených na jiné parametry.

### 6.3.3 Stabilita umělé synovie při namáhání



Obrázek 25: Srovnání komplexních viskozit při mechanickém namáhání (25 °C)



Obrázek 26: Srovnání komplexních viskozit při mechanickém namáhání (37 °C)

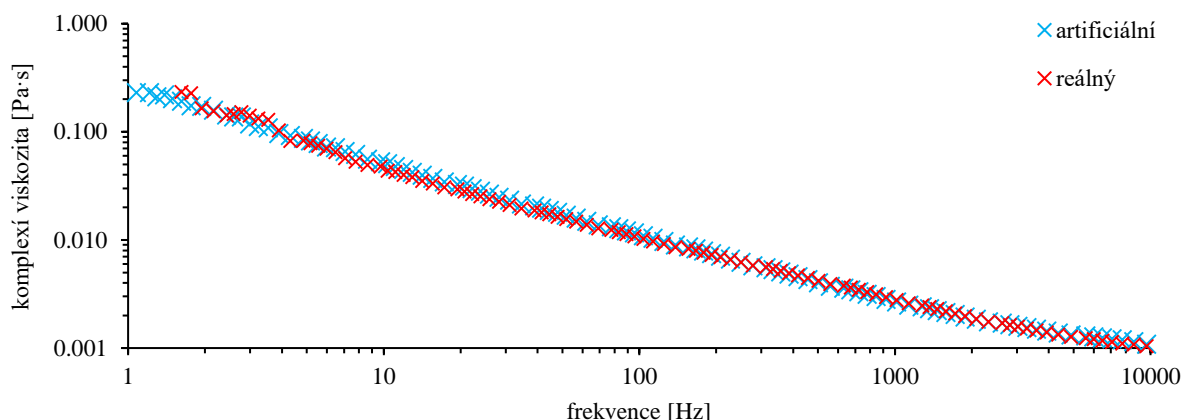
Pro mechanické namáhání byl použit membránový extrudér s 100 nm filtry. Tato aparatura měla simulovat podmínky v kloubech, kde při námaze působí relativně velká síla na malou plochu. Časové rozpětí mezi dokončením namáhání a začátkem reologické charakterizace nebylo delší než 2 minuty. Výsledky v Obrázcích 25 a 26 jednoznačně ukazují, že tento způsob mechanického namáhání neměl na matrici v tomto časovém horizontu vliv. To odpovídá i předpokladu rychlého obnovení struktur po působení síly. Je pravděpodobné, že



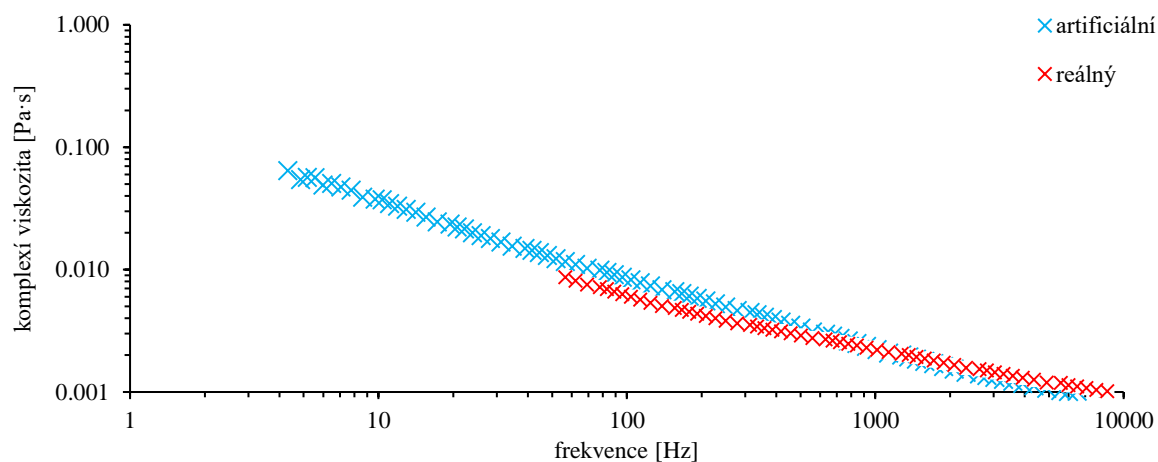
matrice reagovala tak, rychle, že její změnu a opětovné formování původní struktury nebylo možno touto aparaturou zaznamenat.

#### 6.4 Porovnání vlastností umělého a reálného vzorku synoviální kapaliny z mikrorheologického hlediska

Po optimalizaci přípravy umělých vzorků byly za (dle možností) stejných podmínek porovnány vlastnosti reálné a umělé matrice. Vyhodnocení probíhalo pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS, za použití mikrorheologického měřicího modulu.



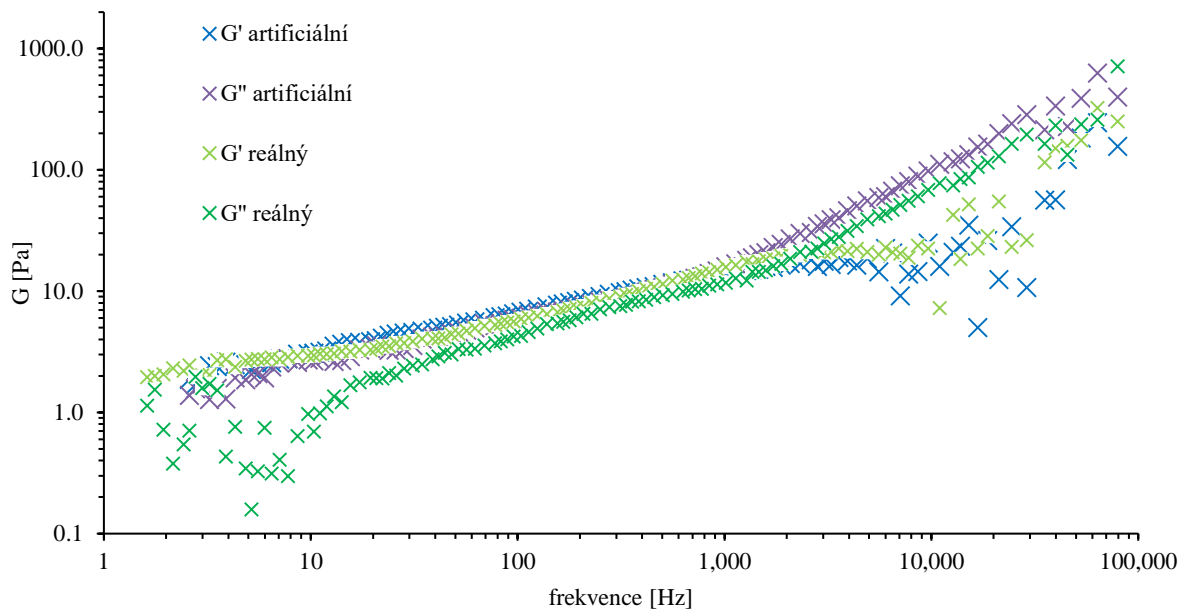
Obrázek 27: Srovnání komplexních viskozit pro umělý a reálný vzorek (25 °C)



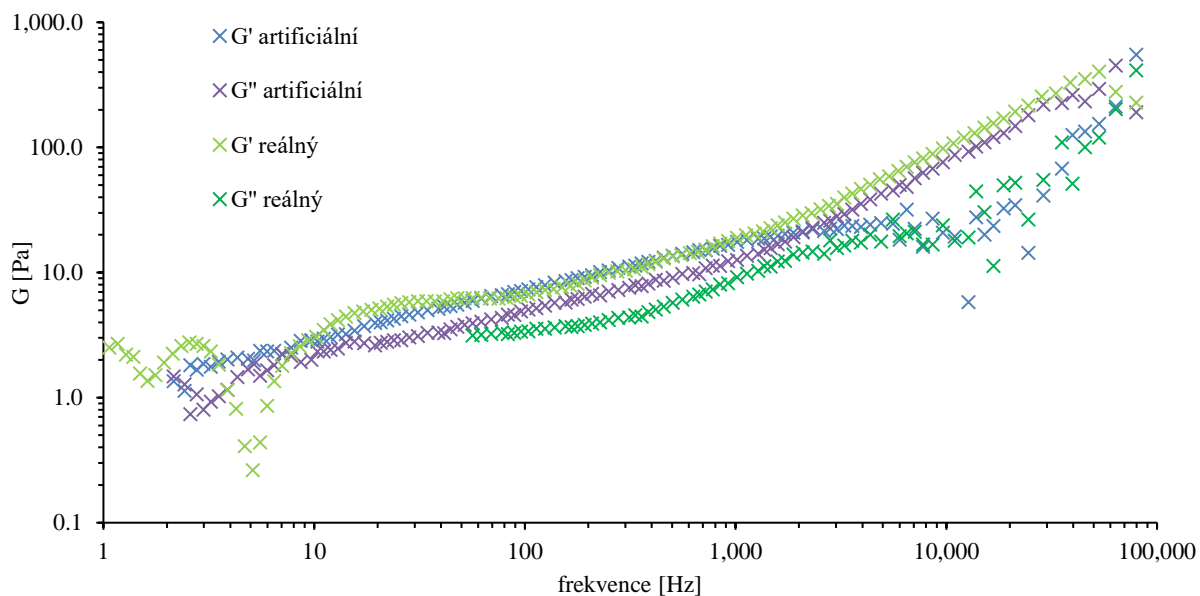
Obrázek 28: Srovnání komplexních viskozit pro umělý a reálný vzorek (37 °C)

Z Obrázků 17 a 18 je patrné, že počáteční hodnota komplexní viskozity u reálného vzorku se v závislosti na teplotě liší. Pro obě teploty (25 °C a 37 °C) se komplexní viskozita při velmi nízkých frekvencích pohybuje pod hodnotou 1 Pa·s. Výsledky odpovídají předpokladu, že se zvyšující se teplotou klesá hodnota viskozity dle Arrheniovy rovnice (3).

Z Obrázků 27 a 28 je zřejmé, že za pomoci výše popsaného postupu je možno připravit umělou synovii, která odpovídá reálnému vzorku. Při 37 °C program nebyl schopen použít naměřené hodnoty viskozity při nižších frekvencích, proto má křivka reálného vzorku počátek přibližně při frekvenci 100 Hz.



Obrázek 29: Srovnání viskoelastických modulů pro umělé a reálné vzorky (25 °C)



Obrázek 30: Srovnání viskoelastických modulů pro umělé a reálné vzorky (37 °C)

Viskoelastické moduly reálných vzorků na Obrázcích 19 a 20 se při různých teplotách výrazně neliší, což vypovídá o stabilitě a odolnosti synoviální kapaliny. Tato vlastnost je velmi důležitá pro funkční využití synoviální kapaliny v organismu, protože pokud by docházelo k výrazným změnám viskoelastických modulů, mohlo by docházet k výrazným strukturním změnám. To by mělo za následek nestabilitu celé matrice, která má být při namáhání odolná, aby ochránila kloub před poraněním.

Obrázek 29 a 30 potvrzují, že i průběhy funkcí popisujících jednotlivé moduly si byly velmi blízké jak u umělého, tak u reálného vzorku.

## 7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na optimalizaci přípravy funkčního vzorku umělé synoviální kapaliny, jeho charakterizaci a na následné studium mechanických vlastností. Tyto přístupy ke studiu synoviálních kapalin byly zvoleny zejména kvůli tomu, že v rámci bakalářské práce bylo nejprve nutné optimalizovat přípravu samotného funkčního vzorku, aby dosahoval vlastností reálných synoviálních kapalin. Případné další vlivy (sterilní příprava vzorků za využití čistých prostor bez bakteriální kontaminace) budou předmětem navazujících prací.

Prvním cílem této práce bylo vypracovat rešerši pro sumarizaci metod přípravy umělé synoviální kapaliny. V rešerši byly zmíněny jak základní stavební jednotky synoviální kapaliny, tak její způsoby modifikace, které měly příznivý efekt na její reologické vlastnosti. Následně byly definovány základní termíny a principy reologie.

Po prozkoumání teorie a možností modifikace bylo třeba vytvořit model, dle kterého by byly upravovány vlastnosti umělého vzorku. Pro charakterizaci byla použita koňská synovie, která se nejvíce blíží lidské synovii. Umělé vzorky byly připravovány dle patentu US 871620, kde však bylo třeba optimalizovat vybrané kroky přípravy funkčního vzorku. Například při přidávku použitého fosfolipidu (DPPC) bylo doporučeno použít ultrazvuk, chybělo však doplnění o konkrétní teplotu nad 42 °C, díky které se proces velmi urychlil, jak bylo blíže vysvětleno v kapitole 5.4. Při přípravě umělé synovie bylo třeba definovat, jakou molekulární hmotnosti kyseliny hyaluronové (HA) použít. Pro sledování vlivu molekulové hmotnosti byla použita DLS mikroeologie. Experimentálně bylo zjištěno, že lepší výsledky poskytuje HA o molekulové hmotnosti 1,3–1,5 MDa. Lidský organismus obsahuje HA o různé molekulové hmotnosti v závislosti na její funkci a umístění. HA o vyšší molekulové hmotnosti byla hůře kompatibilní s matricí. To konkrétně znamenalo, že se celý proces přípravy, než došlo k jejímu úplnému rozmíchání, (v porovnání s HA s nižší molekulové hmotnosti) prodloužit řádově o několik hodin. Následně byl sledován vliv iontové síly, opět s použitím DLS mikroeologie. Pufr definovaný v patentu byl nahrazen 0,9% roztokem NaCl. Vliv iontové síly byl blíže popsán v kapitole 6.1.2 kde bylo potvrzeno, že složení pufru je zásadní pro následný mechanický charakter celé matrice a 0,9% roztok NaCl není pro tuto aplikaci vhodný.

Pro charakterizaci synoviálních kapalin byla použita termogravimetrická analýza (TGA) ve dvou měřicích variantách. Dynamický mód měření neodhalil zásadní odlišnosti ve strukturách reálného a umělého vzorku, proto byl použit statický izotermální způsob měření. Výsledky toho měření ukazují drobné odlišnosti ve způsobu vazby molekul vody ve vzorcích. Další metodou pro charakterizaci byla infračervená spektroskopie (FTIR). Metoda jednak posloužila pro jednoduché strukturální porovnání umělé synoviální kapaliny se vzorky reálnými a dále také k posouzení vlivu sušení na měřené FTIR spektra. Tyto výsledky byly interpretovány jak ve formě spekter, tak 2D časově rozlišený ATR záznamů sušení. Je možno říct, že spektra umělého vzorku odpovídala hodnotám spekter reálného vzorku. Dle polohy píků bylo možno určit strukturální složení obou matric. Z výsledků měření bylo zjištěno, že absorpční spektra reálného i umělého vzorku si odpovídají, tudíž je strukturální složení obou matric stejné. Obecně je možno říct, že byly pozorovány píky pro -OH skupiny,

základní C-H vazby, pásové přechody heterocyklů v aminokyselinách, -COOH skupiny aminokyselin i kyseliny glukuronové, která je strukturním základem HA. Stejně tak byly zřetelné píky pro fosfátovou skupinu ve fosfolipidu (DPPC) a fosfátovém pufru. Poslední pík odpovídal disulfidickým můstkům, které jsou nezbytné pro stabilitu terciální struktury proteinů.

Pro aplikovatelnost vzorku je zásadní jejich stabilita. V této práci byla stabilita sledována pomocí DLS mikrereologie a posuzována z tří hledisek dále popsanych. Časová stabilita uměle připravených vzorků je pro aplikaci neopomenutelným parametrem. Pomocí úpravy teploty ultrazvuku při použití fosfolipidu (DPPC) bylo docíleno vyšší stability ve výhledu 2 týdnů. Ještě delší stabilitu by mohla vzorkům propůjčit sterilní příprava v laminárním (čistém) boxu. Dalším sledovaným vlivem byla teplota, protože synovie obsahuje, kromě jiného i bílkoviny, které při vyšší teplotě mohou podléhat denuraci. Pro sledování teplotního vlivu byly vybrány dvě teploty a to laboratorní (25 °C) a fyziologická teplota (37 °C). Jak mikrereologické charakteristiky potvrdily, při vyšší teplotě (37 °C) došlo ke snížení komplexní viskozity. Pokud by byla tato teplota zvýšena příliš, došlo by ke ztrátě viskózních vlastností a mohlo by dojít k poranění kloubů. Synoviální kapalina je v průběhu života organismu namáhána, proto je třeba docílit její stability z mechanické stránky. Membránový extrudér byl použit jako experimentální aparatura pro mechanické namáhání. Hlavním důvodem využití extrudéru byla jeho konstrukční podobnost s chrupavkou a kloubním pouzdem v reálu. Filtr extrudéru s (dostatečně velkými) 100 nm póry, zaručoval namáhání matrice bez nebezpečí separace jejích složek. Měření potvrdilo mechanickou odolnost matrice tak, že po namáhání nedošlo ke změně viskoelastických modulů.

Shrnutím všech výsledků je možno říci, že uměle připravená synovie splňovala fyzikálně-chemické vlastnosti odpovídající reálně proměřených vzorků. Pro možnosti reálné aplikace uměle připravené náhrady do kloubu je třeba vzorek dále prozkoumat. V budoucím výhledu bude vzorek připravován v čistých prostorách za sterilních podmínek a následně bude zkoumána jeho stabilita a opakovatelnost měření.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Hip Joint replacements selected outputs and their Analysis for the period 2003–2012* [online]. 2014, -(81) [cit. 2019-04-15]. ISSN 0001-5415.
- [2] Pohybové ústrojí [online]. 2011, 18/2011(3-4) [cit. 2018-03-18]. ISSN 1212-4575.
- [3] SAARI, Herkko, Yrj T. KONTTINEN, Claes FRIMAN a Timo SORSA. Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation*. 1993, **17**(4), 403-415. DOI: 10.1007/BF00916581. ISSN 0360-3997.
- [4] TAMER, Tamer Mahmoud. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013, **6**(3), 111-125. DOI: 10.2478/intox-2013-0019. ISSN 1337-9569.
- [5] CYPHERT, Jaime M., Carol S. TREMPUS a Stavros GARANTZIOTIS. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *International Journal of Cell Biology*. 2015, 1-8. DOI: 10.1155/2015/563818. ISSN 1687-8876.
- [6] SCOTT, J E, C CUMMINGS, A BRASS a Y CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, 274(3), 699-705. DOI: 10.1042/bj2740699. ISSN 0264-6021.
- [7] ROBERT, L., A.-M. ROBERT a G. RENARD. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*. 2010, 58(3), 187-198. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.09.010. ISSN 03698114.
- [8] FREEMAN, Marc E., Béla KANYICKSKA, Anna LERANT a György NAGY. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. 2000, 80(4), 1523-1631. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523. ISSN 0031-9333.
- [9] MAREK, Josef. Hyperprolaktinemie v praxi. *INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI*. 2008, 10(12), 549–554.
- [10] RHEE, David K., Jose MARCELINO, MacArthur BAKER, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, 115(3), 622-631. DOI: 10.1172/JCI22263. ISSN 0021-9738.
- [11] KONVIČKOVÁ, Svatava a Jaroslav VALENTA. *Biomechanika člověka: svalově kosterní systém*. Vyd. 2. Praha: Česká technika – nakladatelství ČVUT, 2007. ISBN 80-010-3424-0.
- [12] GUO, Junde, Yue LI, Yu LI, Hailin LU, Ligu QIN, Meng HUA a Guangneng DONG. Biotribological application of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) hydrogel as an efficient carrier with slow-release lubrication effect. *Journal of Materials Science*. 2017, **52**(20), 1-5. DOI: 10.1007/s10853-017-1326-9. ISSN 0022-2461.

- [13] GUO, Junde, Yue LI, Hailin LU, Yu LI, Xing LI, Ligu QIN a Guangneng DONG. PCEC hydrogel used on sustained-release hyaluronic acid delivery with lubrication effect. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018, 135(22), 1-5. DOI: 10.1002/app.46228. ISSN 00218995.
- [14] KERSCHENMEYER, Anne, Øystein ARLOV, Vera MALHEIRO, Matthias STEINWACHS, Markus ROTTMAR, Katharina MANIURA-WEBER, Gemma PALAZZOLO a Marcy ZENOBI-WONG. Anti-oxidant and immune-modulatory properties of sulfated alginate derivatives on human chondrocytes and macrophages. *Biomaterials Science*. 2017, 5(9), 1756-1765. DOI: 10.1039/C7BM00341B. ISSN 2047-4830.
- [15] S. EROGLU, Mehmet, Ebru TOKSOY ONER, Esra CANSEVER MUTLU a Muge SENNAROGLU BOSTAN. Sugar Based Biopolymers in Nanomedicine; New Emerging Era for Cancer Imaging and Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017, 17(13), 1507-1520. DOI: 10.2174/1568026616666161222101703. ISSN 15680266.
- [16] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6251, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6251> (accessed Mar. 25, 2018).
- [17] Potravinářská aditiva, aromata a enzymy. In: *STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV* [online]. Praha: Státní zdravotní ústav, 2012 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/potravinarska-aditiva>
- [18] RINAUDO, Marguerite, Bernard LARDY, Laurent GRANGE a Thierry CONROZIER. Effect of Mannitol on Hyaluronic Acid Stability in Two in Vitro Models of Oxidative Stress. *Polymers*. 2014, 6(7), 1948-1957. DOI: 10.3390/polym6071948. ISSN 2073-4360.
- [19] UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ, Fakulta technologická. Reologie. 2014. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_03.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf)
- [20] BARNES, H.A. *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier, 1998. ISBN 04-448-7469-0.
- [21] BARNES, Howard A., J. F. HUTTON a Kenneth. WALTERS. *An introduction to rheology*. 3. New York: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1989. Rheology series, 3. ISBN 978-044-4871-404.
- [22] PEKAŘ, Miloslav. *Fyzikální chemie a fotochemie: [praktikum]*. Brno: Vysoké učení technické, 2003. ISBN 80-214-2470-2.
- [23] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [24] STRUBLE, Leslie J.; Ji, Xihuang. HANDBOOK OF ANALYTICAL TECHNIQUES IN CONCRETE SCIENCE AND TECHNOLOGY. New York, USA: William Andrew Publishing, 1999. Rheology, s. 333-367. ISBN 0-8155-1437-9.

- [25] Prakticky relevantní reologická analýza polymerů pomocí moderních reometrů. In: *CHEMAGAZÍN* [online]. Česká republika: CHEMAGAZÍN, 2010 [cit. 2018-09-03].
- [26] LIU, Wei a Chi WU. Rheological Study of Soft Matters: A Review of Microrheology and Microrheometers. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2018, 219(3), 1-4. DOI: 10.1002/macp.201700307. ISSN 10221352.
- [27] McNeil-Watson F. (2013) Electrophoretic Light Scattering. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg
- [28] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. *WARWICK* [online]. Warwick: Malvern instruments [cit. 2018-09-03].
- [29] CICUTA, Pietro a Athene M. DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter*. 2007, 3(12), 3. DOI: 10.1039/b706004c. ISSN 1744-683X.
- [30] Microrheology. GARDEL, M. L., M. T. VALENTINE a D. A. WEITZ. *Microscale Diagnostic Techniques* [online]. Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 1-49 [cit. 2018-09-03]. ISBN 978-3-540-26449-1.
- [31] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2009, 25(11), 6368-6376 [cit. 2018-09-2]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463.
- [32] OSSWALD, Tim a Natalie RUDOLPH. *Polymer Rheology: fundamentals and applications*. Munich: Hanser Publications, 2013. ISBN 978-1-56990-523-4.
- [33] VYBÍRAL, Bohumil. MECHANIKA PRUŽNÉHO TĚLESA: Studijní text pro řešitele FO a ostatní zájemce o fyziku. *FYZIKÁLNÍ OLYMPIÁDA* [online]. Česká republika: Arcsin, 2002 [cit. 2018-09-02]. Dostupné z: <http://fyzikalniolympiada.cz/texty/pruznost.pdf>
- [34] WANG, Rong, Jianzhong SHANG, Xin LI, Zirong LUO a Wei WU. Vibration and damping characteristics of 3D printed Kagome lattice with viscoelastic material filling. *Scientific Reports*. 2018, 8(1), 2. DOI: 10.1038/s41598-018-27963-4. ISSN 2045-2322.
- [35] AUGUSTO, Pedro E.D., Albert IBARZ a Marcelo CRISTIANINI. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Creep and recovery behaviours. In: *Food Research International*. Canada: Elsevier, 2013, s. 170. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.06.027. ISSN 0963-9969.
- [36] LI, Shu-Ping, Ge ZHAO a Hong-Yuan CHEN. The Relationship between Steady Shear Viscosity and Complex Viscosity. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2005, 26(4), 415-419. DOI: 10.1081/DIS-200054555. ISSN 0193-2691. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DIS-200054555>.
- [37] Grillet, A. M., Wyatt, N. B., Gloe, L. M.: *Polymer Gel Rheology and Adhesion*, Rheology, Dr. Juan De Vicente (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, InTech, 2012. [online].

- [38] MCILWRAITH, C. W., D. D. FRISBIE a C. E. KAWCAK. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research*. 2012, 1(11), 297-309. DOI: 10.1302/2046-3758.111.2000132. ISSN 2046-3758.
- [39] ZHANG, Z., S. BARMAN a G. F. CHRISTOPHER. The role of protein content on the steady and oscillatory shear rheology of model synovial fluids. *Soft Matter*. 2014, 10(32), 5965-5973. DOI: 10.1039/C4SM00716F. ISSN 1744-683X.
- [40] GALLO, J., M. HARTL, M. VRBKA, T. NÁVRAT a I. KŘUPKA. Co by měl vědět ortoped o biotribologii totální endoprotézy kyčelního kloubu. *Acta chirurgiae orthopaediae et traumatologiae Čechoslovaca*. 2013, 80, 377-385
- [41] NEČAS, D., M. VRBKA, D. REBENDA, J. GALLO, A. GALANDÁKOVÁ, L. WOLFOVÁ, I. KŘUPKA a M. HARTL. In situ observation of lubricant film formation in THR considering real conformity: The effect of model synovial fluid composition. *Tribology International* [online]. Elsevier, 2018, 117, 206-216. DOI: 10.1016/j.triboint.2017.09.001. ISSN 0301-679X.
- [42] *Synthetic synovial fluid compositions and methods for making the same*. US 8,716,204 B2. Uděleno May 6, 2014
- [43] RAMACHANDRAN, V. S. *Handbook of thermal analysis of construction materials*. Norwich, N.Y.: Noyes Publications/William Andrew Pub., 2003. ISBN 978-0-8155-1487-9.
- [44] MACKIE, David M., Justin P. JAHNKE, Marcus S. BENYAMIN a James J. SUMNER. Simple, fast, and accurate methodology for quantitative analysis using Fourier transform infrared spectroscopy, with bio-hybrid fuel cell examples. *MethodsX*. 2016, 3(1), 128-138. DOI: 10.1016/j.mex.2016.02.002. ISSN 22150161.
- [45] ISMAIL, Ashraf A., Frederick R. VAN DE VOORT a Jacqueline SEDMAN. Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications. *Instrumental Methods in Food Analysis*. Elsevier, 1997, 18(1), 93-139. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. DOI: 10.1016/S0167-9244(97)80013-3. ISBN 9780444818683.
- [46] (LI, Jing, Xuling WANG, Ting ZHANG, Chunling WANG, Zhenjun HUANG, Xiang LUO a Yihui DENG. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, 10(2), 8. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.004. ISSN 18180876.