



**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

**STUDIUM TOKOVÝCH A VISKOELASTICKÝCH  
VLASTNOSTÍ LABORATORNĚ PŘIPRAVENÝCH  
SYNOVIÁLNÍCH KAPALIN POMOCÍ  
MAKROREOLOGICKÝCH TECHNIK**

STUDY ON FLOW AND VISCOELASTIC PROPERTIES OF LABORATORY PREPARED SYNOVIAL FLUIDS  
BY MACRORHEOLOGICAL TECHNIQUES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Aneta Veldamonová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1411/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Aneta Veldamonová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Studium tokových a viskoelastických vlastností laboratorně připravených synoviálních kapalin pomocí makroreologických technik

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši zaměřenou na umělé synoviální kapaliny.
- 2) Laboratorně připravit synoviální kapalinu, jejíž vlastnosti budou srovnatelné s reálnými vzorky.
- 3) Otestovat mechanické vlastnosti umělých synoviálních kapalin v závislosti na fyzikálně–chemických podmínkách simulujících podmínky v lidském těle.
- 4) Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.

### 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.

-----  
Aneta Veldamonová  
student(ka)

-----  
Ing. Jiří Smilek, 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**

Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou a následnou charakterizací umělé synoviální kapaliny. Příprava byla zaměřena především na výběr vhodných poměrů látek nacházejících se v reálné synoviální kapalině a majících vliv na tokové a viskoelastické vlastnosti (kyselina hyaluronová, lubricin, fosfolipidy a proteiny), zjištěných na základě podrobného studia odborné literatury. Za účelem ověření vlastností laboratorně připravené synoviální kapaliny byla charakterizována i reálná synoviální kapalina z hlezna koně, která byla získána z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Vzorke reálné i synoviální kapaliny byly charakterizovány pomocí makroreologických technik. Experimentálně získaná data byla dále porovnávána s daty z patentu, ze kterého se vycházelo při přípravě umělé synoviální kapaliny. Jako doplňková metoda k charakterizaci synoviálních kapalin byla použita klasická termogravimetrie a izotermální termogravimetrie pro studium vlhkosti a vázanosti vody.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with preparation and characterization of synthetic synovial fluid. Preparation was focused mostly on finding proper ratios of substances existing in real synovial fluid which have influence on viscoelastic properties. Based on study of literature, these substances are hyaluronic acid, lubricin, phospholipids and proteins. Samples of real synovial fluid from horse hock acquired from University of veterinary and pharmaceutical sciences Brno were tested for comparison with synthetically prepared synovial fluid. Both synthetic and real synovial fluid were characterized by macrorheological techniques. The experimentally obtained data were then compared with data from the patent on which the preparation of synthetic synovial fluid was based on. Thermogravimetry and isothermal thermogravimetry were used as additional method for the study of moisture and water binding of synovial fluids.

## **Klíčová slova**

Synoviální kapalina, reologie, viskozita, tokové vlastnosti

## **Key words**

Synovial fluid, rheology, viscosity, flow properties

VELDAMONOVÁ, A. *Studium tokových a viskoelastických vlastností laboratorně připravených synoviálních kapalin pomocí makroreologických technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D..

## **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 práce a děkana FCH VUT.

.....  
Aneta Veldamonová

### *Poděkování:*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. za poskytnuté materiály, rady a pomoc při interpretaci dat při vypracovávání bakalářské práce.*

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Kloubní pouzdro .....	8
2.2	Synoviální kapalina .....	8
2.2.1	Kyseliny hyaluronová .....	8
2.2.2	Proteoglykan 4 .....	9
2.2.3	Plazmatické proteiny .....	10
2.2.4	Lipidy .....	10
2.2.5	Cytokiny a růstové faktory .....	10
2.2.6	Proteolytické enzymy .....	11
2.2.7	Krevní buňky .....	11
2.3	Reologie .....	11
2.3.1	Newtonské kapaliny .....	12
2.3.2	Nenewtonské kapaliny .....	12
2.4	Měření reologických vlastností .....	13
2.4.1	Statické metody .....	14
2.4.2	Dynamické metody .....	14
2.4.3	Reologie synoviální kapaliny .....	15
3	Současný stav řešené problematiky .....	16
3.1	Složení synoviálních kapalin ve zdravých a umělých kloubech .....	16
3.2	Možné interakce mezi kyselinou hyaluronovu a proteiny .....	17
3.3	Lubrikační funkce kyseliny hyaluronové .....	17
3.4	Možné využití Ramanových spekter při diagnostice dny .....	19
3.5	Složení synoviální kapaliny po prodělání zlomeniny .....	20
3.6	Příprava umělé synoviální kapaliny pro tribologické testování implantátů .....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
4.1	Použité chemikálie .....	22
4.2	Použité přístroje a zařízení .....	22
4.3	Příprava vzorků umělé synoviální kapaliny podle patentu US 8716204 B2 .....	22
4.4	Vzorek koňské synoviální kapaliny .....	23
4.5	Měření tokových vlastností synoviálních kapalin .....	23
4.6	Měření tokových vlastností v závislosti na čase .....	23

4.7	Namáhání vzorku .....	23
4.8	Klasická termogravimetrie .....	23
4.9	Izotermální termogravimetrie .....	23
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	24
5.1	Porovnání tokových vlastností umělých a reálných synoviálních kapalin .....	24
5.2	Tokové testy umělé synoviální kapaliny v závislosti na čase .....	26
5.3	Namáhání vzorku .....	28
5.4	Klasická termogravimetrie .....	29
5.5	Izotermální termogravimetrie .....	30
6	ZÁVĚR.....	31
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32

## 1 ÚVOD

Synoviální kapalina se nachází v kloubních dutinách, přičemž je především zodpovědná za zmírňování tření mezi chrupavkami během pohybu, zvyšování a udržování pružnosti chrupavek. Bohužel s věkem se synoviální kapalina opotřebovává, a dochází tak k ničení chrupavek, což způsobuje zdravotní problémy. V dnešní době se také stále více objevují onemocnění, která způsobují předčasnou degradaci synoviální kapaliny. Také se však vyskytují různé typy přípravků, které by měly zlepšovat stav synoviální kapaliny a ulevovat od bolesti, ale jejich složení a reologické vlastnosti jsou nejednotné. Proto je třeba vyvinout umělou synoviální kapalinu, která by měla srovnatelné vlastnosti (viskozitu, hustotu, složení, časovou stabilitu) s reálnou synoviální kapalinou. Abychom byli schopni připravit umělou synoviální kapalinu, která by mohla nahradit poškozenou synoviální kapalinu, musíme znát přesné složení a funkce jednotlivých složek zdravé synoviální kapaliny. Komplikacemi při přípravě umělé synoviální kapaliny jsou především její časová nestálost a degradace složek vlivem enzymů nacházejících se přirozeně v těle. Je tedy zatím otázkou, zda může umělá synoviální kapalina nahradit reálnou.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kloubní pouzdro

Kloubní pouzdro ohraničuje kloub tak, že spojuje kosti po obvodu jejich styčných ploch. Pouzdro je tvořeno vnější a vnitřní vrstvou, které jsou od sebe nejčastěji odděleny řídkým vazivem s tukovými buňkami. Méně časté je jejich přímé spojení [1].

Vnější vrstvu pouzdra představuje pevná fibrózní membrána, která je tvořena obalem z kolagenních vláken, mezi nimiž se nachází fibroblasty, které tyto vlákna produkují. Místy může být membrána zpevněna kapsulárními vazy, které jsou součástí pouzdra, nebo jen plochými pruhy vazů na povrchu membrány. Další zesílení je zajištěno extrakapsulárními vazy, úpony a začátky svalů. Vnější pouzdro tedy zajišťuje hlavně mechanické funkce kloubu, jakými jsou například pohyblivost a stabilita [1].

Vnitřní vrstvu představuje synoviální membrána, která se upíná na kosti těsně vedle kloubních chrupavek, a ohraničuje tak kloubní dutinu uvnitř kloubu. Synoviální membrána je tvořena především synovialocyty, které mají na povrchu mikroklky umožňující transport látek mezi okolím a dutinou. Podle funkce a stavby rozlišujeme dva typy synovialocytů:

- Synovialocyty typu A – jsou fagocytující buňky, a mají tak především obranou funkci.
- Synovialocyty typu B – vytváří hlavně kolagenní a elastická vlákna kloubního pouzdra a amorfní mezibuněčnou hmotu.

Oba typy buněk produkují kyselinu hyaluronovou, která je hlavní složkou synoviální kapaliny. Její koncentrace je v synoviální kapalině 2,5–2,7 g/l [1].

### 2.2 Synoviální kapalina

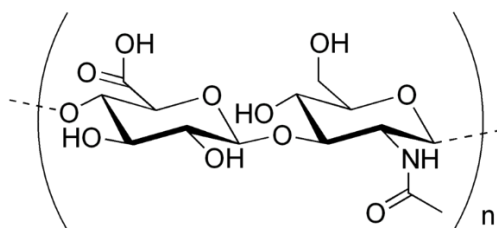
Synoviální kapalina je neneutronská kapalina (neřídí se Newtonovým zákonem, tzn. že nemá konstantní viskozitu), která se nachází v dutinách kloubních pouzder. Její hlavní funkcí je zmírňovat tření mezi chrupavkami během pohybu, zvyšovat a udržovat jejich pružnost. Také dodává chrupavkám živiny a následně z nich přenáší katabolické produkty (např. metaloproteinázy MMP-1 a MMP-3). Její objem a složení jsou závislé nejen na typu kloubu, ale i na jeho zdravotním stavu. Mezi její hlavní složky patří kyselina hyaluronová, proteoglykan 4, plazmatické proteiny a lipidy. Koncentrace jednotlivých složek synoviální kapaliny a jejich vzájemný poměr vypovídají nejen o samotné synoviální kapalině (hustotě, viskozitě), ale i o stavu kloubu [1]. Proto budou jednotlivé složky synoviální kapaliny rozebrány v následujících podkapitolách, jelikož bez těchto informací se neobejdeme při přípravě vlastní umělé synoviální kapaliny.

#### 2.2.1 Kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je hlavní složkou synoviální kapaliny. Jedná se o heteropolysacharid spadající do skupiny glykosaminoglykanů. Její řetězec je lineární a skládá se z opakující se disacharidové podjednotky, která je tvořena N-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou, jak je znázorněno na obrázku 1. Jednotlivé disacharidové podjednotky jsou spojené glykosidickou vazbou  $\beta$  (1→4), kdežto N-acetyl-D-glukosamin a D-glukuronová kyselina



jsou spojeny glykosidickou vazbou  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) [2]. Pomocí měření RTG-rozptylu filmu bylo zjištěno, že sekundární struktura řetězce má helikální tvar, který může být stočen z dvou až čtyř řetězců. Tato struktura je stabilizována vodíkovými můstky, které mohou spojit mezi hydroxylovou a acetamidovou skupinou nebo hydroxylovou skupinou a kyslíkem v glukoronové jednotce [3].



Obrázek 1: Struktura disacharidové podjednotky kyseliny hyaluronové

Prostorově objemnější polární skupiny (karboxylová a hydroxylová), které jsou navázané v řetězci, zaujímají nejčastěji ekvatoriální pozici, kdežto prostorově menší atomy vodíku zaujímají axiální pozici. Takto vytvořené uspořádání v polymeru je energeticky velmi stabilní[4].

Kyselině hyaluronové byla dříve přisuzována především lubrikační funkce [5], ale tato funkce byla později vyvrácena [6]. Nyní se předpokládá se, že její hlavní funkcí je při zatížení kloubů vytvořit vrstvu mezi povrchy chrupavek, a zmírňovat tak tření. Při zatížení kloubů vytvoří hyaluronan gelovou vrstvu mezi chrupavkami důsledkem zvýšení jeho koncentrace, což je zapříčiněno vytlačení vody a nízkomolekulárních látek rozpustných ve vodě. Tato gelová vrstva pak chrání povrchy chrupavek před třením, při němž může být chrupavka poškozena [4].

### 2.2.2 Proteoglykan 4

Proteoglykan 4, neboli lubricin, je mucinózní glykoprotein, který je vylučován synoviálními buňkami, povrchovými chondrocyty kloubních chrupavek a buňkami menisků a disků, přičemž rychlost sekrece se liší podle typu buněk. Molekuly lubricinu se nacházejí nejen volně v synoviální kapalině, ale jsou také navázané na povřích kloubních chrupavek. Vytvořená vrstva tak zajišťuje lubrikaci a snížené tření při pohybu [7]. Nedávné studie také ukázaly, že lubricin zabraňuje ukládání bílkovin ze synoviální kapaliny na chrupavku a také inhibuje adhezi synoviálních buněk k povrchu chrupavky [8].

Lubricin je kódovaný genem PRG4. Různé exonové sestřihy a posttranslační modifikace vedou k rozdílům v proteinové primární struktuře. Existuje sedm forem lubricinu, z nichž šest je nalezeno u lidí. U lubricinu převažuje proteinová složka, která je celkově složena z 1404 aminokyselin. Cukernou složku představuje kyselina sialová, což je kyselý polysacharid vázány k proteinové části přes kyslík [8].

Skupina vědců se v čele s Alquraini a kolektiv [9] také zabývala možností protizánětlivé role lubricinu v synoviální kapalině kvůli jeho schopnosti interagovat s různými typy receptorů. Zaměřili se na možnou schopnost lubricinu vázat se na Toll-like receptory („receptory podobné genu Toll“) a sledovali, zda bude mít tato interakce protizánětlivý účinek u pacientů, kteří trpí zánětlivým onemocněním kloubu (osteoartritidou, revmatoidní

artritidou). Potvrdili, nejenže je lubricin schopný vázat se na dva typy Toll-like receptorů (TLR 2 a TLR 4), ale také že tato vazba zprostředkovává další protizánětlivou úlohu lubricinu. Tato informace poskytuje možnost využít lubricin jako protizánětlivé činidlo při zánětlivých onemocněních.

Bylo zjištěno, že synoviální kapaliny ve fyziologických smykových rychlostech ( $\gamma=10^{-1} \text{ s}^{-1}$  až  $\gamma=2 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$ ) u pacientů, kteří postrádali lubricin kvůli genetické nedostatečnosti nebo následkem onemocnění, nevykazovaly elastické chování. Z dalšího měření se tedy došlo k závěru, že PRG4 zajišťuje rozptýlení deformující síly při pohybu kloubu [7].

### 2.2.3 Plazmatické proteiny

Nezbytnou součástí synoviální kapaliny jsou plazmatické proteiny. Celková koncentrace proteinů v synoviální kapalině je 19–28 mg/ml. Výskyt proteinů v synoviální kapalině je podmíněn jejich molekulovou hmotností. Nejvíce je zastoupen albumin v koncentraci 12 mg/ml, jehož molekulová hmotnost je 69 kDa. Dalšími hojně zastoupenými proteiny jsou  $\beta_1$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  globuliny, z nichž každý má koncentraci 1–3 mg/ml v závislosti na jejich molekulové hmotnosti [10].

Obsah a koncentrace proteinů se v synoviální kapalině při zánětu v kloubu a zranění mění, což vyvolává strukturální a funkční změny. Například při revmatoidní artritidě dochází k narušení synoviální membrány, díky čemuž se do synoviální kapaliny dostanou velké plazmatické proteiny jako je fibrinogen (340 kDa),  $\beta_1$  lipoprotein (3200 kDa) nebo  $\alpha_2$  glykoprotein (1000 kDa). Právě zvýšená koncentrace fibrinogenu v synoviální kapalině v testech nasvědčuje tomuto onemocnění [10].

### 2.2.4 Lipidy

V lidské synoviální kapalině bylo identifikováno 130 druhů lipidů, které byly rozděleny do osmi tříd (fosfatidylcholin, lyzofosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, plazmalogen, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, sfingomyelin a ceramidy). Největší zastoupení má fosfatidylcholin, který představuje přibližně 67 % všech fosfolipidů. Následuje sfingomyelin, který zaujímá 17 % a lyzofosfatidylcholin (10 %) [11].

Přestože se lipidy vyskytují v synoviální kapalině jen ve stopovém množství (314,2 nmol/ml), významně přispívají ke snížení tření mezi chrupavkami [12]. Bohužel molekulární podstata mazání poskytovaná fosfolipidy zůstává neobjasněná. Jedna studie naznačuje, že tření se snižuje se vzrůstající délkou řetězce mastné kyseliny fosfatidylcholinu, a také že se tření snižuje, pokud fosfolipidy obsahují nenasycené mastné kyseliny. Proto fosfatidylcholin představuje možné doplnění či alternativu k současně dostupným viskosuplementačním produktům [13].

### 2.2.5 Cytokiny a růstové faktory

Cytokiny a růstové faktory jsou důležitými regulačními faktory, které ovlivňují nejen chondrocyty a synoviální buňky, ale také stav samotné synoviální kapaliny. Tyto regulační molekuly se mohou do prostoru kloubů dostat z plazmy nebo mohou být sekretovány z buněk jako produkty z chondrocytů či synovialocytů. Různé cytokiny mohou anabolickými nebo katabolickými účinky měnit složení a strukturu synoviální kapaliny a okolní tkáň.

V normální synoviální kapalině je hladina cytokinů a růstových faktorů stabilní, ale při kloubních poranění a onemocněních se jejich koncentrace zvyšuje. Významnými cytokiny jsou TGF- $\beta$  a IL-1, které značně ovlivňují sekreci maziv chondrocyty a synovialocyty. Zatímco TGF- $\beta$  zvyšuje sekreci PRG4 chondrocytů, tak IL-1 ji snižuje. Zvýšená koncentrace těchto dvou cytokinů také způsobuje zvýšenou produkci kyseliny hyaluronové a při zranění mohou mít výrazný vliv na rozvoj dalších onemocnění, např. revmatoidní artritidy [10].

### **2.2.6 Proteolytické enzymy**

Proteolytické enzymy jsou zodpovědné za degradační procesy v kloubech. Hlavními degradujícími enzymy jsou matrixové metaloproteinázy MMP-1 a MMP-3, jejichž hladina je v synoviální kapalině u zdravého kloubu stálá, ale při poranění či onemocnění kloubu se jejich koncentrace zvyšuje. Další enzymy zastoupené v synoviální kapalině jsou distintegrin a metaloproteinázy s motivy trombospondinu (ADAMTS), které degradují agrekan vyskytující se v mezibuněčné hmotě chrupavky. Zastoupení jednotlivých proteolytických enzymů a jejich aktivitu ovlivňují také přítomné inhibitory a aktivátory, jakými jsou například plazmin, katepsin B či inhibitor metaloproteináz (TIMP) [10].

### **2.2.7 Krevní buňky**

Celkový obsah krevních buněk v synoviální kapalině je velmi nízký. Nejvíce se zde vyskytují leukocyty (<200 leukocytů/mm<sup>3</sup>), jejichž počet je někdy, např. u revmatoidní artritidy, zvýšený. Do synoviální kapaliny se mohou dostat také lymfocyty, makrofágy a neutrofilové. Ve zdravé synoviální kapalině se erythrocyty prakticky nenachází, ale při poranění se do ní mohou dostat [10].

## **2.3 Reologie**

Reologie je interdisciplinární obor zahrnující fyzikální chemii s mechanikou, která se zabývá tokem a deformací látek vlivem působení vnějších sil. Podle mechanických vlastností rozdělujeme materiály na tři základní skupenství: plynné, kapalné a pevné, avšak žádný ze zmíněných materiálů se nechová ideálně. Právě díky studiu deformace a toku materiálů jsme schopni odvodit reologické vlastnosti, které hrají důležitou roli v řadě odvětví. Např. ve stavebnictví, potravinářském průmyslu či v lékařství [15].

Existují dva mezní typy chování materiálů: elastické a viskózní. Pro tuhé látky je typické elastické chování, kdy při působení vnější síly dochází k elastické deformaci a po odstranění vnější síly se látka vrátí do původního stavu. Naproti tomu je pro kapaliny typické viskózní chování, kdy při působení vnější síly dochází k nevratné deformaci, kdy se kapalina po odstranění vnější síly nevrátí do původního stavu. Mezi těmito dvěma extrémy je tzv. viskoelastické chování, kdy je odezva na působící sílu závislá na čase [16].

V reologii se kapaliny rozdělují na newtonské a nenevtonské kapaliny. V prvním případě se jedná o kapaliny, které se řídí Newtonovým zákonem viskozity a v druhém případě jde o kapaliny, které se jim neřídí. Podrobněji budu oba typy kapalin rozebrány v následujících podkapitolách [15].

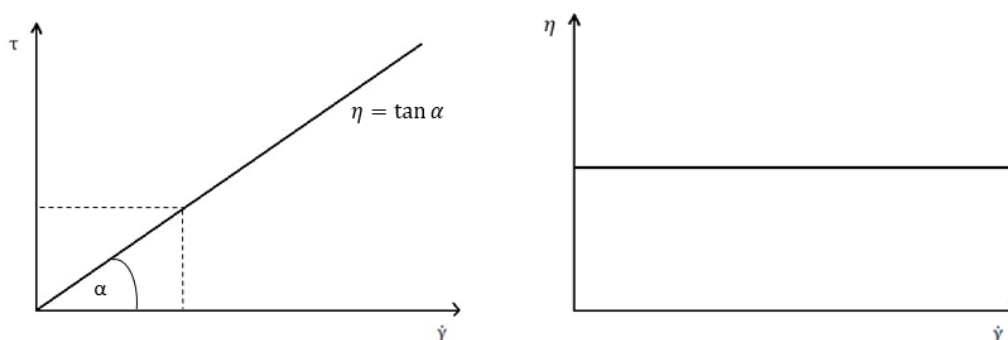
### 2.3.1 Newtonské kapaliny

Jestliže se viskozita kapaliny při určité teplotě a tlaku nemění, tak se jedná o newtonskou kapalinu. Pro tuto kapalinu je také charakteristické, že viskozita zůstává konstantní s měnící se smykovou rychlostí i časem. Newtonské kapaliny se řídí Newtonovským zákonem viskozity:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dy} = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

kde je tečné napětí  $\tau$  přímo úměrné gradientu rychlosti deformace  $dv/dy$  neboli smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$ , přičemž konstantou úměrnosti je dynamická viskozita  $\eta$ .

Na obrázku 2 lze vidět tokovou křivku (vlevo), která vyjadřuje závislost smykového napětí ( $\tau$ ) na smykové rychlosti ( $\dot{\gamma}$ ) a viskózní křivku newtonských kapalin (vpravo) vyjadřující závislost viskozity ( $\eta$ ) na smykové rychlosti ( $\dot{\gamma}$ ). Tečné napětí roste se zvyšující se smykovou rychlostí, přičemž dynamická viskozita je směrnicí této závislosti [17].



Obrázek 2: Toková (vlevo) a viskózní (vpravo) křivka newtonské kapaliny.

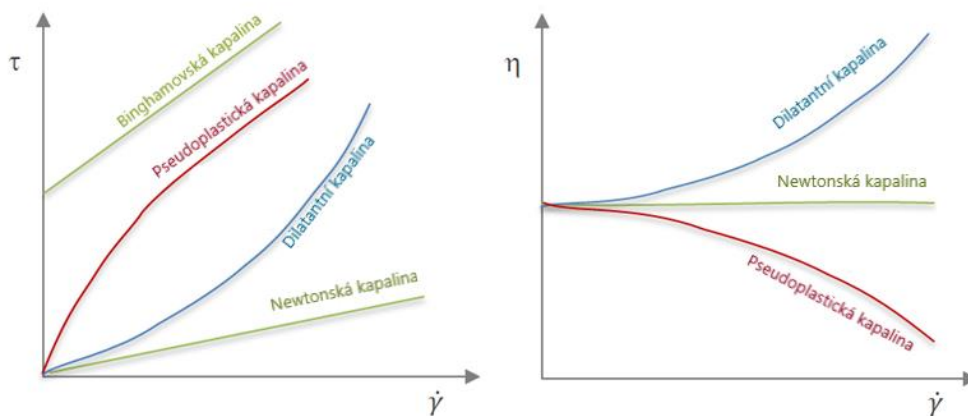
### 2.3.2 Nenewtonské kapaliny

Kapaliny, které se neřídí Newtonským zákonem viskozity, se nazývají nenewtonovské kapaliny. Pro tyto kapaliny tedy nelze stanovit konstantní hodnotu viskozity v celém oboru možných hodnot tečného napětí při určité teplotě a tlaku, a proto se charakterizují tokovými křivkami, tzv. reogramy. Ty mohou vyjadřovat závislost  $\tau = \tau(\dot{\gamma})$ ,  $\eta = \eta(\tau)$  nebo  $\eta = \eta(\dot{\gamma})$ . U nenewtonských kapalin se viskozita nazývá zdánlivou a závisí na smykovém napětí, smykové rychlosti a na historii vzorku [17].

Nenewtonské kapaliny mohou mít jak časově nezávislé, tak časově závislé chování. Mezi časově nezávislé kapaliny patří pseudoplastické, dilatantní a Binghamovské kapaliny. Kapaliny, jejichž vlastnosti jsou závislé na čase působení napětí, se rozdělují na tixotropní a reopektické [17].

Nejčastější typ časově nezávislého chování mají pseudoplastické kapaliny neboli smykově řidnoucí kapaliny. Vyznačují se snižováním zdánlivé viskozity se zvyšující se smykovou rychlostí. Tento jev lze vysvětlit pomocí asociačních struktur, které nejsou spojitě, ale neustále vznikající a zanikající. Jelikož se vzrůstající smykovou rychlostí se tyto struktury

rozbíjejí, tak se zmenšuje počet přechodných asociačních spojů, a proto viskozita systému klesá. Jsou to např. roztoky a taveniny polymerů a lyofilní koloidy [16]. Druhým typem jsou dilatantní kapaliny, u kterých se naopak zdánlivá viskozita zvyšuje se zvyšující se smykovou rychlostí (tzv. smykově houstnoucí kapaliny). Toto chování systému spočívá v tom, že se zvyšující se smykovou rychlostí v systému se zvyšuje i podíl uspořádaných částic, které v rozpouštědle zaujmou jistou rovnovážnou polohu a strukturu. Tím pádem při vyšší smykové rychlosti není dostatečné množství rozpouštědla, které by zaujmul prostor mezi částicemi. Tento nedostatek rozpouštědla pak způsobí zvýšení tření mezi částicemi a zvýšenou viskozitu [17]. Posledním typem jsou Binghamovské kapaliny, které mají plastickou složku deformace. Proto dochází k toku až po překročení tzv. prahového napětí. Do této skupiny kapalin spadají např. kašovitá suspenze křídla a vápna [17]. Na obrázku 3 jsou zobrazeny tokové a viskozitní křivky všech tří typů kapalin v porovnání s newtonskou kapalinou.



Obrázek 3: Tokové a viskozitní křivky nenewtonských kapalin.

U kapalin, které mají časově závislou složku deformace, se mění zdánlivá viskozita s dobou působení napětí. U tixotropních kapalin se zdánlivá viskozita s dobou působení smykového napětí snižuje. Po ukončení působení napětí zase zdánlivá viskozita narůstá. V grafu měření tokové křivky tixotropní kapaliny se objevuje hysterezní smyčka, neboť závislost napětí na smykové rychlosti při zvyšování a snižování napětí není konstantní. Obecně platí, že čím větší je uzavřená oblast smyčky, tím je chování kapaliny více závislé na čase. Mezi tixotropní kapaliny patří např. nátěrová barva. U reopektických kapalin se zdánlivá viskozita zvyšuje s časem působení smykového napětí. Ponechá-li se kapalina v klidu, tak se viskozita vrátí přibližně na svou původní hodnotu. Na tokové křivce reopektické kapaliny se také vyskytuje hysterezní křivka, která ale probíhá proti směru hodinových ručiček. Patří sem např. suspenze bentonitu [17].

## 2.4 Měření reologických vlastností

Pro charakterizaci reologických vlastností se používá celá řada měřících nástrojů, například kapilární viskozimetry, viskozimetry s padající kuličkou, rotační viskozimetry a rotační reometry [20]. Rotační reometr měří kroutící moment při dané smykové rychlosti, smykovou rychlost při dané torzi nebo torzi aplikovanou při různých frekvencích. Přičemž sensorový

system přepočítává měřené veličiny na reologické. Rozlišujeme dvě základní metody pro měření rotačním reometrem: statickou a dynamickou.

### 2.4.1 Statické metody

#### *Relaxační test*

Prvním typem statické metody je tzv. relaxační test, který měří relaxaci napětí s časem při konstantní deformaci a teplotě. Před započítím experimentu je materiál odpočatý a v čase  $t = 0$  je materiál okamžitě, tj. s nekonečně vysokou stříhovou rychlostí, deformován konečným smykem. Tento smyk je dále udržován po neomezenou dobu. Odezvovou funkcí je relaxační modul:

$$G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma_0}$$

, který je možné chápat jako materiálovou funkci popisující lineárně viskoelastické chování materiálu za dané teploty a tlaku [15].

#### *Creepový test*

Druhým typem je tzv. creepový test, který měří změnu deformace v čase při konstantním napětí a teplotě. V okamžiku startu je testovaný materiál dokonale odpočatý. Budícím signálem je skoková změna smykového napětí na určitou hodnotu. Toto napětí je udržováno po neomezenou dobu. Odezvovou funkcí tohoto testu je creepová poddajnost:

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0} [15].$$

### 2.4.2 Dynamické metody

#### *Rotační test*

Hodnoty viskozit nenewtonovských kapalin nejsou konstantní, a proto se provádí tokové testy, které spadají pod rotační testy. Vytvářejí se reogramy obsahující tokovou nebo viskozni křivku. Tokové křivky získáme měřením smykového napětí při různých smykových rychlostech, kdežto viskozni křivky vyjadřují závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti. Zdánlivá viskozita se vypočte jako poměr okamžité hodnoty smykového napětí a smykové rychlosti. Tokové testy lze provádět v jednom ze dvou módů. První mód zahrnuje kontrolovanou smykovou rychlost (CSR), který simuluje procesy, které jsou závislé na rychlosti proudění nebo objemovém průtoku. Druhý mód zahrnuje kontrolované smykové napětí (CSS), kdy tyto testy simulují aplikace závislé na síle, např. sílu potřebnou k zahájení čerpání materiálu či sílu k vytěsnění materiálu z trubice [20].

#### *Oscilační testy*

Při amplitudovém testu je nastavena konstantní frekvence oscilace a mění se amplituda deformace. Měřením získáme graf, kdy na ose x je vynesena amplituda deformace a na ose y jsou vyneseny viskoelastické moduly, elastický  $G'$  a viskozni  $G''$ . Pokud je  $G' > G''$ , pak je vzorek možné označit jako Viskoelastický materiál s převahou elasticity. Jestliže však  $G'' > G'$ , tak je vzorek možné označit jako viskoelastickou tekutinu. Díky deformačním (amplitudovým) testům můžeme stanovit lineární viskoelastickou oblast (LVO). LVO je

oblast, ve které vzorek podléhá ještě vratné deformaci. Po překročení této oblasti dochází k nevratnému poškození pevné struktury vzorku. Proto se z této oblasti vybírá amplituda deformace pro frekvenční test [20].

Při frekvenčním testu sensor osciluje s konstantní amplitudou deformace, přičemž se mění frekvence oscilace senzoru od největší po nejmenší v nastaveném rozsahu. Měření probíhá v oblasti LVO, která je stanovována amplitudovým testem. Pomocí frekvenčních testů získáme oscilační závislosti na frekvenci, informace o chování a vnitřní struktuře látek [20].

### **2.4.3 Reologie synoviální kapaliny**

Synoviální kapalina spadá do skupiny neneutonských kapalin. Přesněji se jedná o pseudoplastickou kapalinu, tzn. že se zvyšující se smykovou rychlostí se snižuje zdánlivá viskozita. Reologické vlastnosti synoviální kapaliny se liší v závislosti na tom, zda se nachází ve zdravém nebo či nemocném kloubu. Zdravá synoviální kapalina vykazuje vyšší viskozitu díky správného složení než ta, která podlela degenerativnímu onemocnění (např. revmatoidní artritidě) či zranění. Všeobecně se tak tedy reologické vlastnosti synoviální kapaliny zhoršují, což má neblahý vliv na mazání a celkovou funkčnost kloubu [21].

Pro reologické vlastnosti synoviální kapaliny má podstatný vliv molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové a její struktura. Zdravá synoviální kapalina by měla mít molekulovou hmotnost okolo 5000-6000 kDa, strukturu lineárních řetězců a zasíťování, které má vliv na viskozitu a rozpustnost [22].

Viskozita měřená při smykové rychlosti blízké nule představuje schopnost odolávat trvalé deformaci při dlouhodobém zatížení. Viskozita nulové smykové rychlosti zdravé synoviální kapaliny je v rozmezí od 1 Pa.s do 175 Pa.s, kdežto při osteoartritidě je rozmezí 0,1-1 Pa.s [23].

Crossover frekvence sleduje změny viskoelastických vlastností, kterými prochází synoviální kapalina během silových změn v koleni. K těmto změnám dochází při přechodu z chůze na běh a naopak. Pro zdravou synoviální kapalinu byla stanovena hodnota crossover frekvence na 0,41 Hz, zatímco u nemocné na 1,8 Hz. Frekvence pro chůzi je 0,5 Hz a frekvence pro běh 3 Hz [23].

Za normálních podmínek jsou koeficienty tření mezi povrchy chrupavek v rozmezí hodnot 0,002-0,01. Při zhoršování mazací schopnosti synoviální kapaliny se tento koeficient zvyšuje [21].

### 3 Současný stav řešené problematiky

Se studiem laboratorních synoviálních kapalin se pojí nejen jejich samotná příprava, ale i znalost a schopnost rozpoznání onemocnění. Vyvíjí se nové metody, které využívají právě jako diagnostický nástroj reologické vlastnosti. Mezi nejrozšířenější onemocnění, které postihují synoviální kapaliny patří např. osteoartróza a dna.

#### 3.1 Složení synoviálních kapalin ve zdravých a umělých kloubech

Před implantací úplného náhradního kloubu (TJR) do lidského těla jsou nutné preklinické biotribologické testy, které zkoumají opotřebení umělého kloubu. Jako náhrada synoviální kapaliny, jakožto mazací kapaliny v kloubu, se nejčastěji využívá bovinní sérum (BS) [24]. V nedávné době, ale došlo ke kritice BS kvůli rozdílnému obsahu látek a mechanickým vlastnostem, a proto se skupina výzkumníků začala zabývat vývojem tzv. umělého séra, která by mohla nahradit synoviální kapalinu v umělých kloubech [25]. Cílem studie tedy bylo stanovit biochemické složení umělého séra získané během artroplastiky kyčle a kolenního kloubu a zjistit, zda složení odpovídá ISO normám. Vzorky byly získány od 152 pacientů, kteří byli rozděleni do čtyř skupin: Skupina I, pacienti s aseptickým uvolňováním TJR; Skupina II, pacienti s TJR, ale bez známek aseptického uvolňování; Skupina III, pacienti bez TJR a s konečnou fází osteoartrózy; a Skupina IV, pacienti bez TJR a bez osteoartrózy. Po vysrážení ze synoviální kapaliny, byla koncentrace albuminu zjištěna pomocí metody, která je založená na Biuretově reakci (reaktivitě peptidové vazby v proteinu s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v alkalickém prostředí) a dále byl vzniklý barevný komplex podroben měření absorbance při 546 nm. Celková koncentrace proteinů byla stanovena stejným způsobem. Ze standardních křivek byly následně vypočítány koncentrace albuminu a celková koncentrace proteinů. Koncentrace  $\gamma$ -globulinu byla zjištěna z jejich rozdílu. Koncentrace fosfolipidů byla stanovena pomocí komerčně dostupné kolorimetrické soupravy (BioAssay Systems). Nejprve byla synoviální kapalina zředěna (1:4) v 0,5% Tritonu X-100. Následně byly vzorky směsi (20  $\mu\text{l}$ ) dány do jamkové destičky a zde smíchány s činidlem (88  $\mu\text{l}$ ). Po inkubaci (30 min) byl zbarvený produkt proměřen při 570 nm a koncentrace byla vypočtena podle kalibrační křivky. Koncentrace kyseliny hyaluronové byla zjištěna pomocí metody ELISA a získaný žlutý roztok byl proměřen při 405 nm. Viskozita synoviální kapaliny byla proměřena pomocí vibračního viskozimetru SV-1A. 2 ml vzorku byly nality mezi dvě sensorické desky, pomocí termostatu JULABO 6 se vzorek zahřál na 37°C a okamžitě byla změřena hodnota viskozity. Z výsledků vyplývá, že koncentrace kyseliny hyaluronové i fosfolipidů byla výrazně nižší u pacientů s TJR než u pacientů bez TJR. Nakonec také nebyl zjištěn zásadní rozdíl mezi skupinami v celkové koncentraci bílkovin a albuminu, ale u  $\gamma$ -globulinu skupiny III byla koncentrace výrazně nižší než u skupiny I. Důležitým zjištěním bylo, že celková koncentrace proteinů ve většině synoviálních kapalin byla vyšší než 36,8 mg/ml, což je hodnota doporučená ISO normami. Tato studie ukázala, že nejen albumin a  $\gamma$ -globulin jsou potřebné pro umělé mazivo kloubů, ale také že další důležitými složkami jsou kyselina hyaluronová a fosfolipidy. Proto je potřeba věnovat se dalšímu studiu umělé synoviální kapaliny, která by měla takové složení a vlastnosti jako reálná synoviální kapalina.



### 3.2 Možné interakce mezi kyselinou hyaluronovou a proteiny

Zhang a spol. [26] se ve své studii zabývali otázkou, zda proteiny s kyselinou hyaluronovou agregují či se vzájemně ovlivňují za zlepšení celkových viskoelastických a tokových vlastností, nebo zda byly tyto dříve pozorované vlastnosti způsobeny systematickými chybami při měření vycházejících z adsorpce proteinů na rozhraní. Na přípravu modelového roztoku synoviální kapaliny byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové, hovězí sérum albuminu (BSA) a  $\gamma$ -globulin při koncentracích uvedených v tabulce 1. Viskoelastické a tokové vlastnosti byly zkoumány pomocí reometru AR-G2 (TA Instruments). Pro experimenty zahrnující mezifázové vlastnosti byl použit senzor tvořený ze soustředných válců a pro experimenty zabývající se celkovou reologií byl použit senzor typu deska/deska. Předpokladem bylo, že pokud by docházelo k agregaci proteinů nebo k interakci mezi kyselinou hyaluronovou a BSA, tak by změna geometrie při měření neměla vliv na výslednou hodnotu viskozity. Avšak, změnou geometrie na paralelní desky došlo nejen ke snížení viskozity, ale také ke změně smykové viskozity při nulovém namáhání. Z toho vyplynulo, že dříve popsané reologické vlastnosti byly způsobeny adsorpcí proteinů na rozhraní, a ne interakcí proteinů s kyselinou hyaluronovou.

Tabulka 1: Složení modelového vzorku synoviální kapaliny

Roztok	HA [mg/ml]	BSA [mg/ml]	$\gamma$ -globulinu [mg/ml]
Synoviální kapalina	3,4	10	0,5
HA	3,4	0	0
BSA	0	10	0

### 3.3 Lubrikační funkce kyseliny hyaluronové

Murray J. Grissom a spol. [27] se ve své studii zaměřili na mazací funkci a složení synoviální kapaliny po provedení artroskopie. Využili koňskou synoviální kapalinu, která umožnila opakovaná měření a také proto, že patellofemorální kloub koní lze operovat artroskopicky stejně jako lidský kolenní kloub. Synoviální kapalina byla odebírána z kloubu před úrazem (0 den) a následně po 10 dnech a po 3 měsících od operace. Vzorky byly analyzovány na mezní mazání (*boundary lubrication*) snižující tření mezi kloubními chrupavkami a na koncentraci kyseliny hyaluronové a lubricinu. Ke vzorkům, které neměly dostatečnou mazací funkci, byla následně přidávána vysokomolekulární kyselina hyaluronová (4000 kDa) s otázkou, zda se mazací funkce vzorku obnoví. Z naměřených dat vyšlo najevo, že zatímco kinetické tření se po operaci zvýšilo (10 den) a po třech měsících se vrátilo zpět k výchozím hodnotám před úrazem, tak hodnoty statického tření se neměnily. Bylo zjištěno, že po úrazu přecházela kyselina hyaluronová k formám s nižší molekulovou hmotností (degradace) a koncentrace lubricinu se zvýšila. Regresní analýza ukázala, že kinetické tření klesá se zvyšujícím se množstvím vysokomolekulárního hyaluronanu. Vědci došli k závěru, že přechodné nedostatečné mazání synoviální kapaliny po artroskopii může být eliminováno pomocí suplementace vysokomolekulárního hyaluronanu.

Jak již bylo zmíněno výše, nedostatečné mazání mezi chrupavkami vede často ke zvýšenému tření a následně ke vzniku osteoartrózy. Mazacími účinky kyseliny hyaluronové ve srovnání se synoviální kapalinou u pacientů s osteoartrózou se zabývala studie, kterou vedl Michael Corvelli [28]. Vzorky chrupavek byly získány z kravských kolenních kloubů a ihned promyty ve fosfátovém pufru (PBS) o teplotě 4 °C, aby se zabránilo vazbě zbytků synoviální kapaliny a PRG4 na jejich povrch. Chrupavky byly následně rozřezány na disky a rozděleny do pěti skupin, které byly podrobeny různým typům degradace, s cílem dosáhnout různých modelů osteoartritického onemocnění. Také byla odebrána osteoartritická chrupavka od jednoho pacienta. Pomocí reometru ARES (TA Instruments) byly naměřeny hodnoty normálové a tečné síly, díky kterým byly následně vypočítány odvozeny koeficienty tření. Měření ukázalo, že kyselina hyaluronová snižuje hodnotu kinetického koeficientu tření ve vzorku chrupavky o 70 % a hodnotu statického koeficientu tření o 75 %. Ve srovnávacím testu napodobovala kyselina hyaluronová charakteristické tření synoviální kapaliny, a proto vědci došli k závěru, že se dá používat jako účinné mazivo pro léčbu osteoartrózy.

Osteoartrózou se také zabývala další studie [29], která se ale zaměřila na změny, k nimž dochází během postupného vývoje onemocnění. Tyto změny jdou v klinickém prostředí obtížně kvantifikovat kvůli neneutonským vlastnostem kapaliny a omezeným objemům vzorků. Studie představila novou techniku, která k měření mechanických vlastností synoviální kapaliny využívá magnetické nanočástice. Nanočástice byly distribuovány do 100 µl vzorku synoviální kapaliny a následně byl přidán permanentní magnet. Bylo předpokládáno, že procento magnetických částic, které se dostane k magnetu za určitý časový úsek by pravděpodobně souviselo s viskozitou SK. Pro ověření tohoto vztahu byly provedeny testy s bovinní synoviální kapalinou, která byla postupně degradována ultrazvukem. Tady se potvrdilo, že množství přenesených částic v daném časovém úseku se zvyšovalo s postupnou degradací kapaliny. Nakonec byly testy provedeny i u synoviální kapaliny zdravých a nemocných koňských kloubů. Zde bylo množství přenesených nanočástic v daném časovém úseku vyšší u SK, která byla získána z kloubů nemocných koní. Ze všech získaných údajů vyplývá, že tato technika má dobrý potenciál pro klinické vyhodnocování vzorků a mělo by se více prozkoumat její klinické využití.

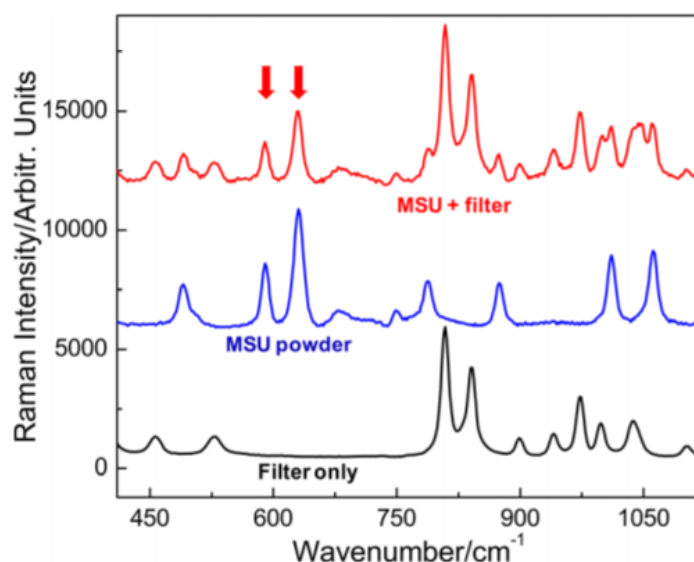
Nečas a spol. [30] se ve své studii zabývali tloušťkou mazacího filmu v závislosti na složení synoviální kapaliny a na materiálu implantátu. Jedním z hlavních cílů studie bylo pochopit tribologické procesy uvnitř kloubu, aby se minimalizovalo opotřebování třecích ploch implantátů. Bylo vytvořeno několik modelových vzorků SK s různými obsahy látek (tabulka 2) a jako simulátory kloubních implantátů byly použity tři různé typy materiálů: kovová slitina CoCrMo, BIOLOX® forte ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a BIOLOX® delta (75%  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 24%  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Měření byla provedena za použití kyvadlového simulátoru kyčelního kloubu a tloušťka filmu byla vyhodnocena pomocí interferometrie. Při statických testech bylo zjištěno, že tloušťka adsorbované vrstvy se zvyšuje nezávisle na materiálu implantátu. Proto byly provedeny dynamické testy, které odhalily, že tvorba mazacího filmu je ovlivněna složením. Nejsilnější mazací film byl pozorován u vzorku s nejvyšší koncentrací kyseliny hyaluronové a fosfolipidů.

Tabulka 2: Složení modelových vzorků

Vzorek	Albumin [mg/ml]	$\gamma$ -globulin [mg/ml]	KH [mg/ml]	Fosfolipidy [mg/ml]	Celková koncentrace [mg/ml]	Objem [ml]
25% BS	neznámé	neznámé	–	–	22,4	12
Model SK1	28	11	1,1	0,17	40,27	
Model SK2	28	9,4	1,9	0,31	39,61	
Albumin	28	–	–	–	28	
$\gamma$ -globulin	–	11	–	–	11	
KH1	–	–	5	–	5	
KH2	–	–	20	–	20	

### 3.4 Možné využití Ramanových spekter při diagnostice dny

Dna je onemocnění, při které dochází k tvorbě krystalů monosodium urátu (MSU) v synoviální kapalině kloubů. Klasicky se toto onemocnění zjišťuje pomocí mikroskopické metody, ale novější studie se zabývala Ramanovou spektroskopií jako potencionálním diagnostickým nástrojem. Naneštěstí, fluorescenční pozadí organické fáze může snížit nebo i zrušit Ramanův signál [31]. Hlavním cílem této studie tedy bylo analyzovat fluorescenční pozadí, Ramanův signál a identifikovat vlnovou délku, která je vhodná pro tuto analýzu. Pro analýzu bylo použito sedm vzorků získaných od pacientů, kteří vykazovali příznaky dny (symptomatické) a tři vzorky bez příznaků (asymptomatické). Získané vzorky synoviálních tekutin byly následně štěpeny enzymy (hyaluronidáza a proteináza), aby se krystaly uvolnily z organické části a snížila se tak viskozita pro následnou filtraci. Filtrace proběhla přes polypropylenový filtr, tak aby uchovala krystaly MSU pro Ramanovu analýzu. Přítomnost krystalů z filtrace byla potvrzena rastrovací elektronovou mikroskopií. Také byly připraveny syntetické krystaly, jejichž Ramanova spektra byla použita jako referenční pro klinicky získané vzorky. Absorpční spektrometr/fluorometr (SpectraMax M2, Molecular Devices, CA) byl použit pro získání absorpčních a fluorescenčních křivek jak před štěpením synoviální kapaliny, tak po jejím štěpení, aby se zjistilo, zda štěpení ovlivní měření. Pro Ramanovu analýzu byl použit spektrometr HRS-VIS-25 (Mightex). Spektra byla pozorována v rozsahu excitačních vlnových délek v rozmezí 532 nm až 785 nm. Ramanova spektrální analýza ukázala, že vzorky vykazovaly významnou úroveň fluorescence při excitačních vlnových délkách menších jak 700 nm, což bránilo ve sběru Ramanova signálu. Nejlepší výsledek byl získán při nejdelší excitační vlnové délce 785 nm, aniž by byl maskován fluorescencí. Příklad Ramanova spektra při excitační vlnové délce 785 nm je zobrazen na obrázku 4. Jsou zde vidět Ramanova spektra klinických krystalů MSU uložených na polypropylenovém filtru, čistých krystalů MSU a samotného filtru. Bylo tedy potvrzeno, že Ramanova spektroskopie je vhodná jako diagnostický nástroj.



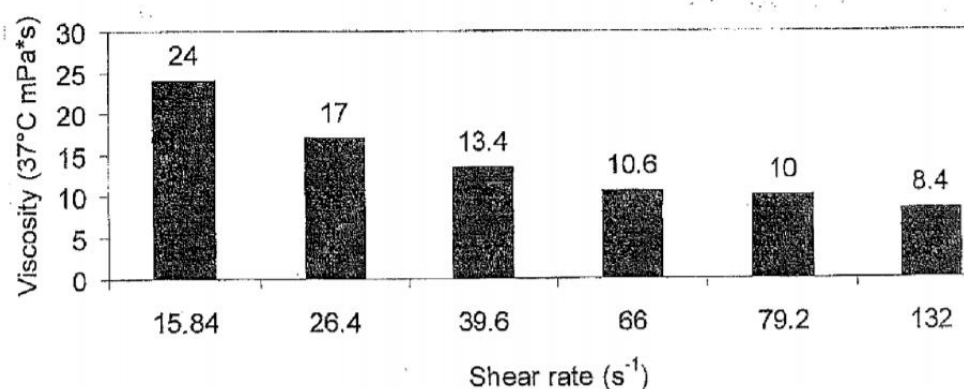
Obrázek 4: Ramanovo spektrum při excitační vlnové délce 785 nm.

### 3.5 Složení synoviální kapaliny po prodělání zlomeniny

Intraartikulární fraktury jsou jedny z nejvíce frekventovaných zlomenin. Při těchto zlomeninách může být postižen nejen kloub, ale také synoviální kapalina. Studie provedena na univerzitě v USA [32] se zabývala složením synoviální kapaliny v závislosti na čase po prodělání intraartikulární zlomeniny kotníku. Od 54 pacientů byla získána synoviální kapalina, u které se zjišťovala koncentrace cytokinů, matrixových metaloproteináz (MMP), katalytických produktů chrupavky a produktů hemového metabolismu. Pomocí kompetitivní imunitní zkoušky bylo zjištěno množství kolagenu typu II v synoviální kapalině, které ukazovalo na stupeň degradace chrupavky. Pro zjištění koncentrace glykosaminoglykan sulfátů (sGAG) byla použita Alcianová modř, která je v kyselém prostředí zbarvila modře. Celková koncentrace biliverdinu a bilirubinu, produktů metabolismu hemu, byla zjištěna pomocí kolorimetrické metody Ticknera a Gutterdge, která byla upravena tak, aby umožnila při měření eliminovat kyselinu askorbovou. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech časových intervalech (0-2 dny, 3-9 dní a  $\geq 10$  dní). Bylo zjištěno, že závažnost zlomeniny měla vliv na seskupení synoviální kapaliny, a to podle počtu intraartikulárních zlomových linií. Bylo zjištěno, že koncentrace prozánětlivých cytokinů byly vyšší během prvních 3-9 dnů od zlomeniny, než ve vzorcích odebraných po 10 dnech. Časový sběr SK během prvních dvou dnů odhalil počáteční prudký vzrůst prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů, matrixových metaloproteináz MMP-9 a sGAG. Během 3-9 dnů došlo k nárůstu bilirubinu, biliverdinu a produktů katabolismu chrupavky. Po 10 dnech došlo ke snížení koncentrace cytokinů, ale koncentrace produktů katabolismu chrupavky zůstala nezměněná. Také nebyl nalezen žádný vztah mezi počtem zlomových linií a koncentracemi analytů. Nicméně studie poskytla nový pohled na zánětlivé výkyvy v synoviální kapalině, které mohou následně vést k rozvoji posttraumatické osteoartrózy.

### 3.6 Příprava umělé synoviální kapaliny pro tribologické testování implantátů

Vývojáři umělých ortopedických implantátů se snaží co nejvíce prodloužit životnost implantátů, a proto je pro jejich testování nezbytná umělá synoviální kapalina, která má stejné vlastnosti jako reálná. Americký patent č. US 8716204 B2 popisuje složení a způsob výroby umělé synoviální kapaliny, která se svými viskoelastickými a tokovými vlastnostmi napodobuje reálnou synoviální kapalinu [33]. Složení umělé synoviální kapaliny popsané v patentu je: 12 mg/ml albuminu, 7 mg/ml  $\gamma$ -globulinu, 0,1 mg/ml dipalmitoylfosfatidylcholinu a 2 mg/ml kyseliny hyaluronové. Vše se nachází ve fosfátovém fyziologickém roztoku, který byl připraven rozpuštěním tablety (Sigma Aldrich) obsahující látky pro fosfátový fyziologický roztok v definovaném množství vody. Celá směs má pH přibližně 7,1 a osmolalitu asi 297 mOsm/kg. Směs je považována za stabilní, dokud se udržuje stabilní pH (7,1) po dobu alespoň 90 dnů. Pro testování byl použit rotační viskozimetr LV-DV-1 Plus (The Brookfield). Na obrázku 5 je zobrazen záznam z měření viskozity při 37 °C. Je z něj patrné, že připravená synoviální kapalina vykazuje pseudoplastické chování, tedy se zvyšující se smykovou rychlostí klesá viskozita.



Obrázek 5: Viskozita umělé synoviální kapaliny připravená v patentu US 8716204 B2.

Cílem rešerše bylo podrobně nastudovat literaturu a díky získaným informacím připravit umělou synoviální kapalinu, která by odpovídala svým složením a vlastnostmi reálné synoviální kapalině. V průběhu zpracovávání rešerše byl vybrán patent US 8716204 B2 [33] jako nejvhodnější, a podle něj se následně připravovala umělá synoviální kapalina v experimentální části bakalářské práce.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

kyselina hyaluronová (1500-1760 kDa)

albumin z hovězího séra, Sigma-Aldrich

$\gamma$ -globulin z hovězí krve, Sigma-Aldrich

1,2-dipalmytoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, Sigma-Aldrich

chlorid sodný

chlorid draselný

bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný

dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného

deionizovaná voda

reálné vzorky synoviální kapaliny byly získány z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně

### 4.2 Použité přístroje a zařízení

reometr AR-G2 Ta Instruments

analytické váhy Sealtec SBC 31

magnetická míchačka Variomag Poly

pH metr WTW pH 330

FTIR spektrofotometr (Nicolet iS50).

Termogravimetrický analyzátor Q5000 (TA Instruments)

ultrazvuk UCC 1 Ultrasonic Compaq Cleaner powersonic

membránový extrudér LiposoFast-Basic & Stabilizer (Avestin)

### 4.3 Příprava vzorků umělé synoviální kapaliny podle patentu US 8716204 B2

Umělá synoviální kapalina byla připravována v souladu s patentem US 8716204 B2 [33]. Na přípravu pufru bylo naváženo 400 mg NaCl, 10 mg KCl, 14 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 89 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Vše bylo kvantitativně převedeno do 250 ml kádinky s 50 ml deionizované vody a rozpuštěno. Bylo změřeno pH na hodnotu 7,2. Vzhledem k tomu, že potřebné pH bylo 7,4, bylo nutné pomocí roztoku NaOH zvýšit pH. Po úpravě měl roztok pH 7,4.

Na analytických vahách bylo naváženo 5 mg fosfolipidů, 110 mg kyseliny hyaluronové, 600 mg albuminu a 350 mg globulinu. Nejprve bylo do připraveného pufru přidáno navážené množství fosfolipidů. Pufir s fosfolipidy v 250 ml kádince byl poté vložen do ultrazvuku na 30 minut, přičemž ultrazvuk byl predehřát na 50 °C, aby došlo k rychlejšímu rozsuspendování fosfolipidů. Poté byla do směsi za laboratorní teploty přidána kyselina hyaluronová a výsledná směs byla míchána na míchačce při 240 ot./min, dokud nebyla kyselina hyaluronová rozpuštěná (4 hodiny). Následně byl přidán albumin a směs byla opět míchaná na míchačce při 240 ot./min do rozpuštění (2 hodiny). Nakonec byl přidán  $\gamma$ -globulin a směs byla opět míchaná na míchačce při 240 ot./min do rozpuštění (1 hodina). pH výsledné směsi bylo 7,1.

#### 4.4 Vzorek koňské synoviální kapaliny

Vzorky koňské synoviální kapaliny byly získány po domluvě s MVDr. Kristínou Žuffovou, Ph.D. z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Vzorky byly odebírány z hlezna při operacích a od odebírání do 24 hodin byly proměřeny.

#### 4.5 Měření tokových vlastností synoviálních kapalin

Měření probíhalo na reometru AR-G2 TA Instruments, přičemž byl použit senzor typu deska/deska o průměru 25 mm. Byly provedena měření při teplotách 25 °C a 37 °C. 25 °C představovalo laboratorní teplotu a 37 °C simulovalo tělesnou teplotu. Před samotným měřením byly vzorky synoviálních kapalin temperovány na požadovanou teplotu a relaxovány po dobu 5 minut. Následně byl spuštěn ustálený tokový test (*steady state flow test*), u kterého byly nastaveny následující parametry: smyková rychlost od  $\dot{\gamma} = 0,01 \text{ s}^{-1}$  až  $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$ , mód: dekadický logaritmus, počet bodů za dekádu: 6. Měření probíhalo vzestupně, takže se smyková rychlost postupně zvyšovala. Každý bod viskozitní křivky byl měřen třikrát, s tím že odchylka měřené smykové rychlosti nesměla být větší než 5 % v čase měření jednoho bodu: 10 s. Maximální doba měření jednoho bodu byla omezena na 5 min.

#### 4.6 Měření tokových vlastností v závislosti na čase

Nutným parametrem u umělé synoviální kapaliny je časová stálost jejich tokových vlastností. Z tohoto důvodu bylo v následujícím experimentu zkoumána závislost změny tokových vlastností (viskozity) v průběhu času. Nastavení experimentu bylo stejné jako je popsáno v předchozím odstavci. Měření bylo provedeno v průběhu 40 dnů.

#### 4.7 Namáhání vzorku

Synoviální kapalina je v kloubech neustále podrobována silovému namáhání čímž se postupem času zhoršují její tokové vlastnosti. Proto byl proveden experiment, který simuloval namáhání v kloubu a následně byly proměřeny tokové vlastnosti. Vzorek umělé synoviální kapaliny byl podroben extruzi na membránovém extrudéru. Byl použit membránový filtr o velikosti pórů 100  $\mu\text{m}$ . Extruze na daném vzorku byla provedena nejdříve jednou a pak pro další měření pětkrát.

#### 4.8 Klasická termogravimetrie

Měřeno bylo na přístroji TGA Q5000 (TA Instruments) v rozsahu teplot 20-200 °C. Reálná synoviální kapalina byla měřena ve vzduchu s rychlostí ohřevu 5 °C/min. Umělá synoviální kapalina byla měřena ve vzduchu i v dusíku s rychlostí ohřevu 10 °C/min. Průtok plynu byl konstantní 20  $\text{dm}^3/\text{min}$ . Důvodem rozdílných parametrů byla různá množství vzorků umělé a reálné synoviální kapaliny.

#### 4.9 Izotermální termogravimetrie

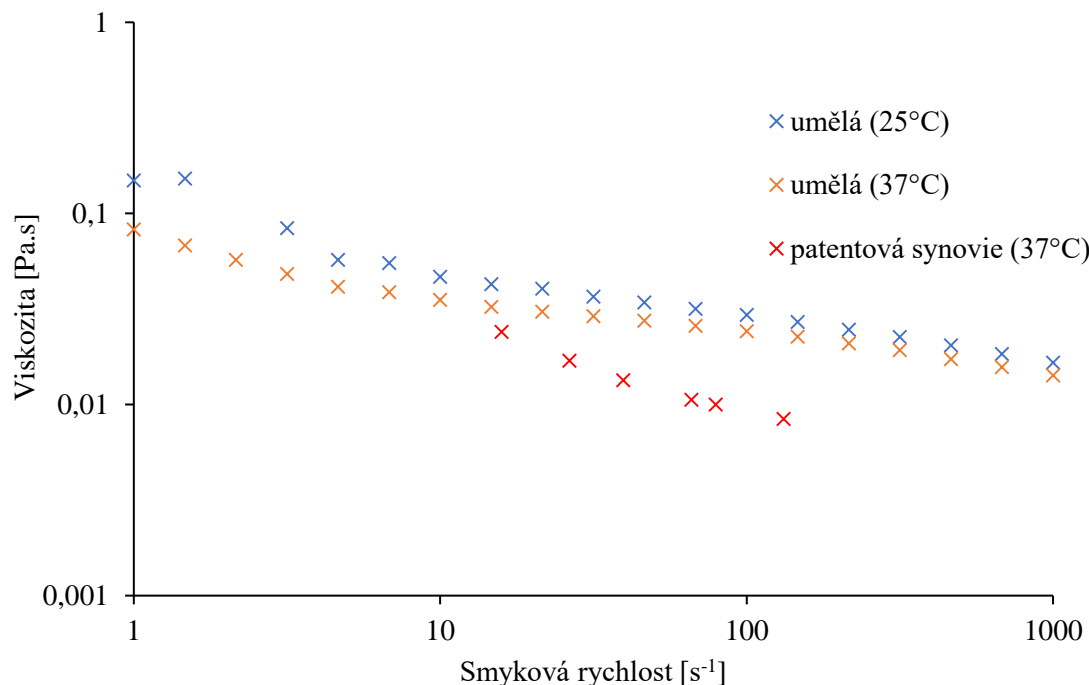
Měření probíhalo na přístroji TGA Q5000 (TA Instruments). Vzorek umělé i reálné synoviální kapaliny byl zahříván na konstantní teplotu 70 °C, čímž docházelo k postupnému odpařování vody.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Porovnání tokových vlastností umělých a reálných synoviálních kapalin

Na měření tokových testů na reometru AR-G2 (Ta Instruments) byla vybrána geometrie deska/deska s průměrem 25 mm, kvůli menším objemům získané reálné synoviální kapaliny. Vždy se měřilo při dvou teplotách, 25 °C a 37 °C. 25 °C představovalo laboratorní teplotu, kdežto 37 °C simulovalo tělesnou teplotu.

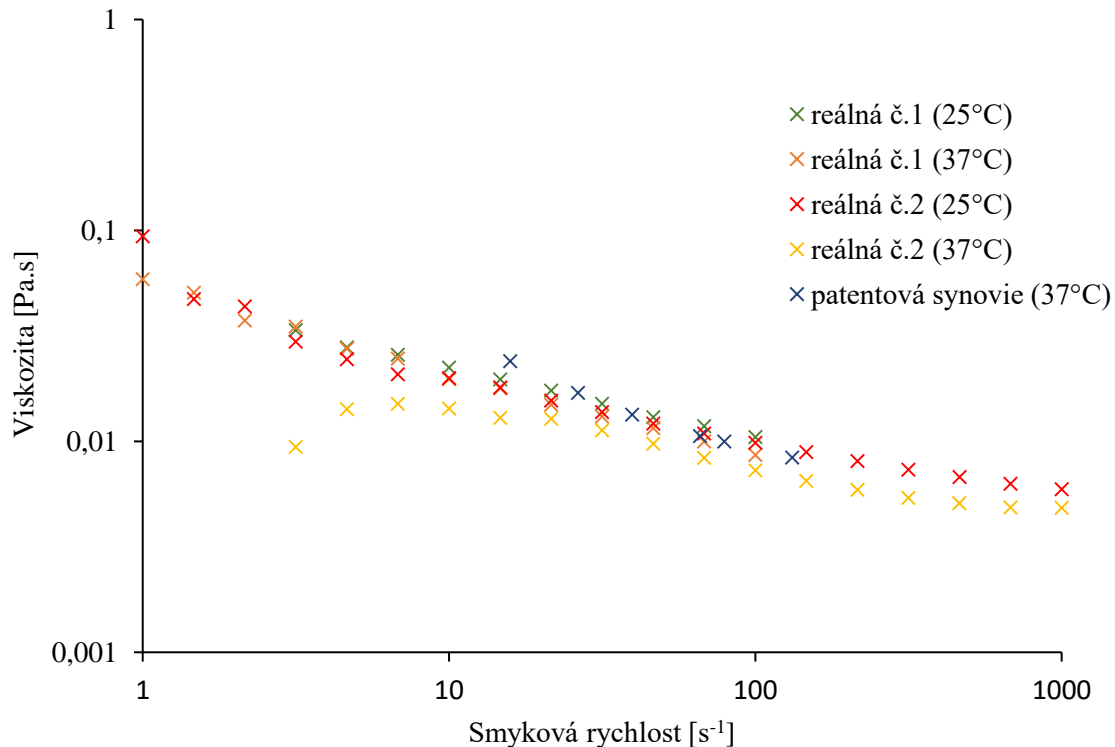
Na obrázku 6 jsou zaznamenány viskózní křivky laboratorně připravené synoviální kapaliny, které byly naměřeny při 25 °C a 37 °C. Tyto viskózní křivky odpovídají pseudoplastickému chování. Bylo předpokládáno, že viskozita při 25 °C bude vyšší než při 37 °C, jelikož se obecně se zvyšující se teplotou viskozita snižuje. Na obrázku jde vidět, že viskózní křivka při 37 °C má nižší hodnoty viskozity než viskózní křivka při 25 °C, tudíž se předpoklad potvrdil. I když to není na pohled velký rozdíl, tak v lidském těle by tento rozdíl mohl být podstatný a umělá synoviální kapalina by špatně plnila svou funkci v kloubu, jelikož změnou viskozity by se zhoršily její mazací schopnosti. Také zde můžeme vidět porovnání s viskózní křivkou umělé synoviální kapaliny, jejíž hodnoty byly uvedené v patentu US 8716204 B [33]. Je vidět, že jejich připravená synoviální kapalina má nižší hodnoty viskozity při daných smykových rychlostech než námi připravená. Proto bude při případném dalším zkoumání bude potřeba, aby se při vyšších smykových rychlostech snížila viskozita. Toho by se dalo dosáhnout navážením menšího množství kyseliny hyaluronové, jelikož ta je především zodpovědná za viskozitu synoviální kapaliny anebo snížením její molekulové hmotnosti.



Obrázek 6: Graf viskózních křivek umělých synoviálních kapalin při různých teplotách (25 °C a 37 °C) v porovnání s daty uvedenými v patentu US 8716204 B2 [33].

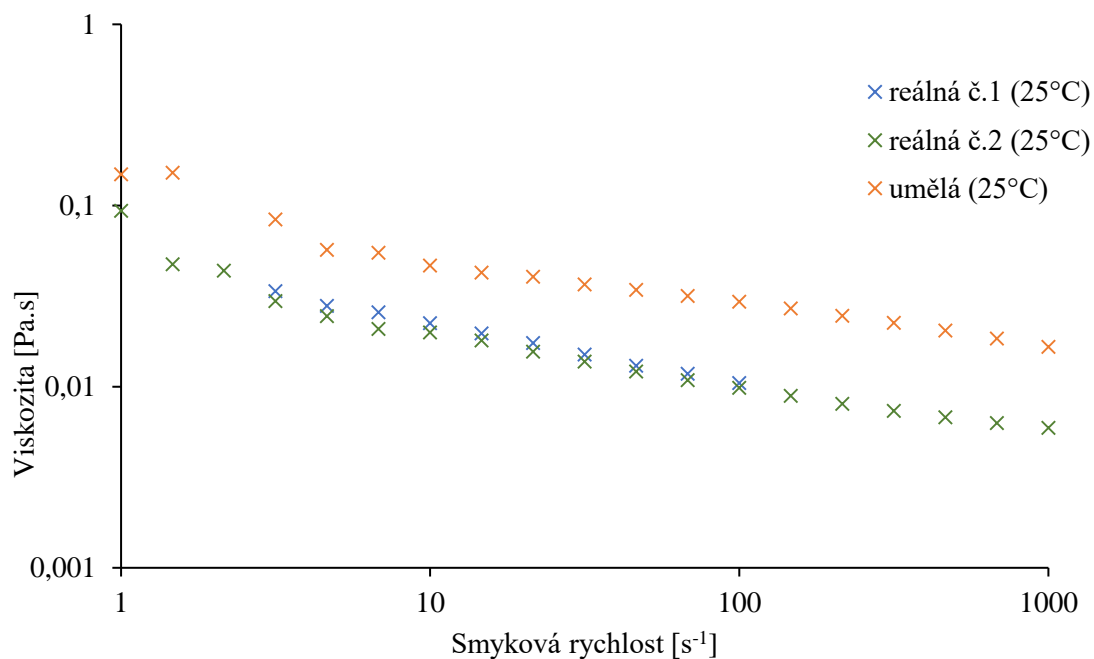


Celkově byly získány tři různé vzorky reálné synoviální kapaliny, ale pracovalo se pouze se dvěma, jelikož jedna už byla v degradovaném stavu (byly viditelně vysrážené složky ve směsi). Viskózní křivky reálných synoviálních kapalin při 25 °C a 37 °C jsou zobrazené na obrázku 7. Viskózní křivky vykazují pseudoplastické chování, ale jde vidět, stejně jako u umělé synoviální kapaliny, že jejich viskozita je při 37 °C nižší než u 25 °C. Je zde znázorněné také porovnání s patentovanou synoviální kapalinou, jejíž hodnoty odpovídají reálné synoviální kapalině. To byla pro nás kontrola, že reálné vzorky synoviálních kapalin nebyly degradované či jinak poškozené. U žluté křivky docházelo při nižší smykové rychlosti k prokluzu na senzoru, proto je vidět na začátku takový pokles viskozity.

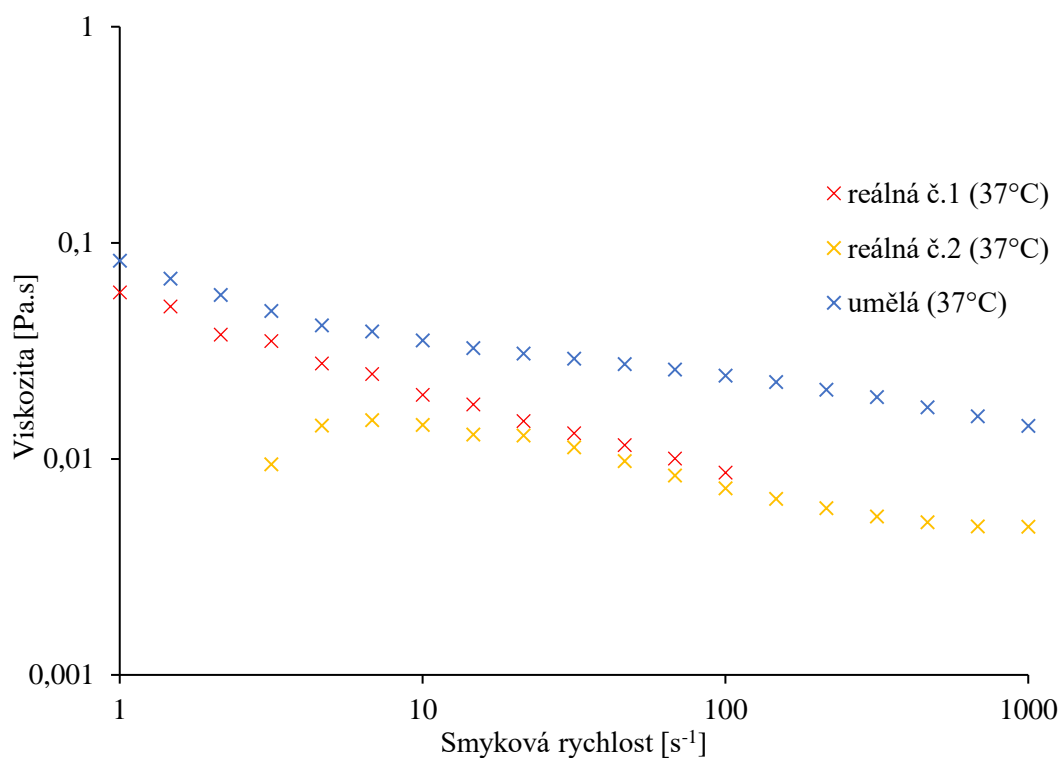


Obrázek 7: Graf viskózních křivek reálných synoviálních kapalin při různých teplotách (25 °C a 37 °C) v porovnání s daty uvedenými v patentu US 8716204 B2 [33].

Vzájemné porovnání viskózních křivek reálné a umělé synoviální kapaliny při 25 °C je zaznamenané na obrázku 8. Jejich snižování viskozity se zvyšující se smykovou rychlostí je souměrné, ale hodnoty se v daných smykových rychlostech liší. Podobný jev je zaznamenan na obrázku 9, kde je zobrazené jejich porovnání při 37 °C. Při nejnižší smykové rychlosti je jejich rozdíl nepatrný, ale se zvyšující se smykovou rychlostí jejich rozdíl roste. Viskózní křivka umělé synoviální kapaliny není tolik strmá jako reálné synoviální kapaliny. Je tedy potřeba snížit viskozitu směsi, jak již bylo zmíněno výše.



Obrázek 8: Graf porovnání viskózních křivek umělé a reálné synoviální kapaliny při 25 °C.

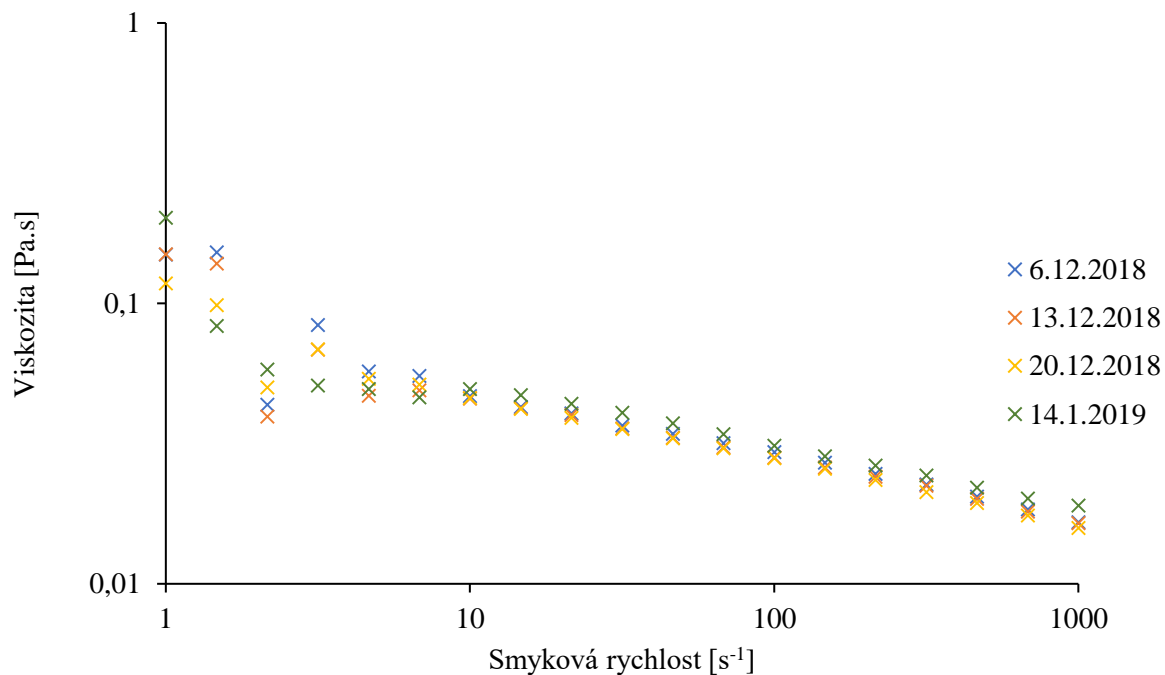


Obrázek 9: Graf porovnání viskózních křivek umělé a reálné synoviální kapaliny při 37 °C.

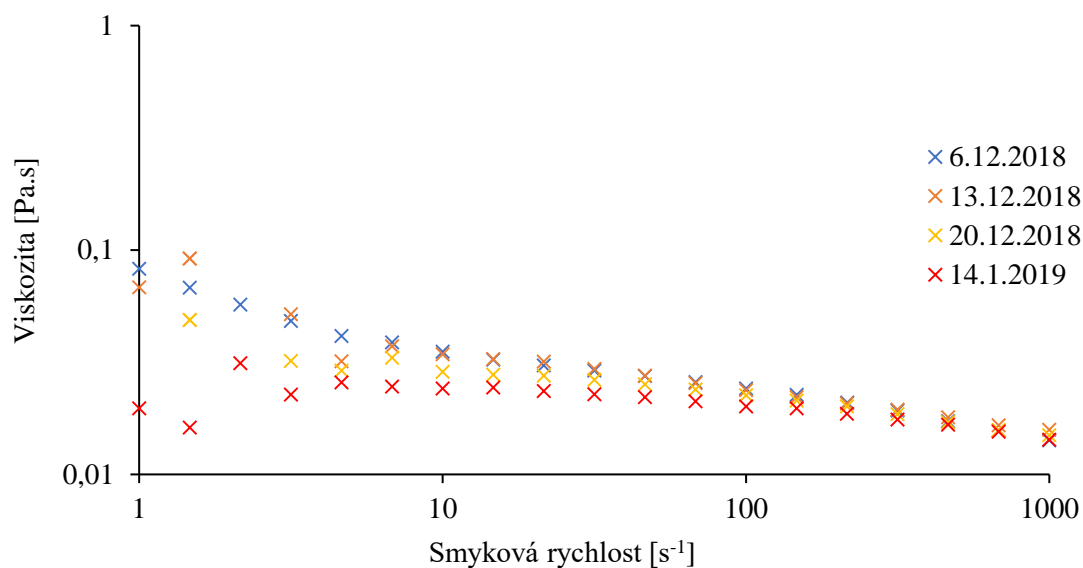
## 5.2 Tokové testy umělé synoviální kapaliny v závislosti na čase

Pro zjištění, zda laboratorně připravená synoviální kapalina degraduje či nikoliv, byly provedeny tokové testy v daných časových intervalech. Podle patentu US 8716204 B2 [33], podle kterého jsme postupovali při přípravě umělé synoviální kapaliny se uvádělo,

že takto připravená synoviální kapalina je stabilní po dobu 6 měsíců. Kvůli menšímu objemu vzorku byly testy provedeny pouze čtyřikrát, v průběhu 40 dnů. Naše umělá synoviální kapalina byla připravena 6.12.2018 a ten den ještě proměřena. Následně se tokové testy prováděly 13.12.2018, 20.12.2018 a 14.1.2019. Viskózní křivky v jednotlivých dnech při 25 °C jsou zobrazené na obrázku 10 a při 37 °C na obrázku 11. Při 25 °C se tokové křivky neliší, kdežto při 37 °C se viskozita nepatrně s časem snižuje. To může být způsobeno nestabilitou při vyšších teplotách.



Obrázek 10: Graf viskózních křivek při časové degradaci umělé synoviální kapaliny při 25 °C.

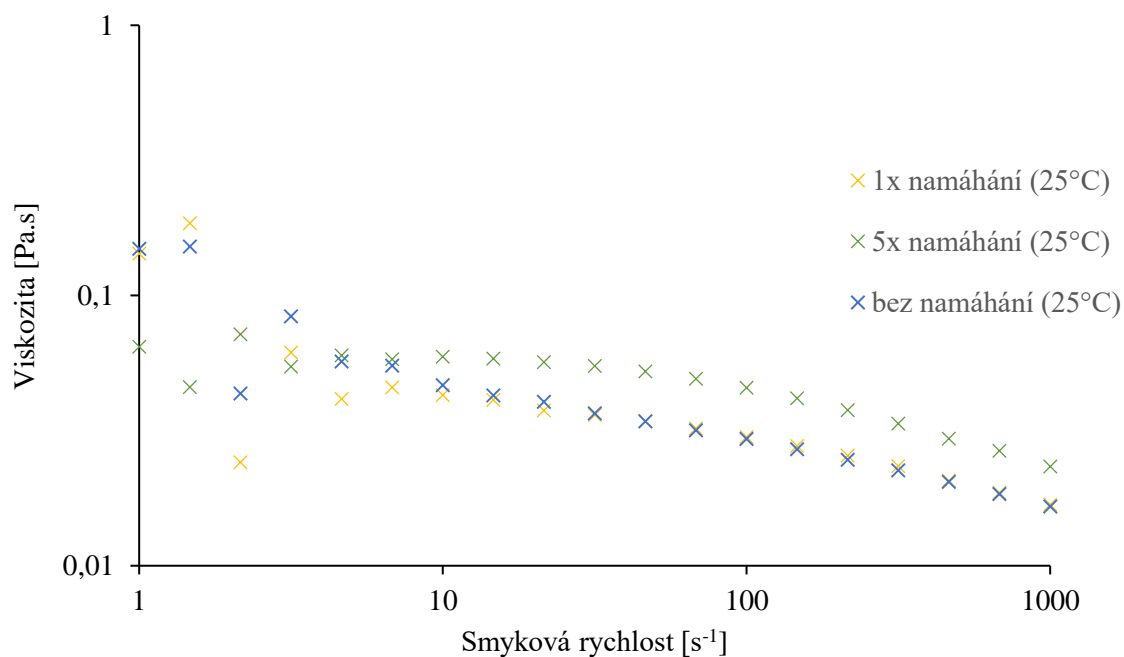


Obrázek 11: Graf viskózních křivek při časové degradaci umělé synoviální kapaliny při 37 °C.

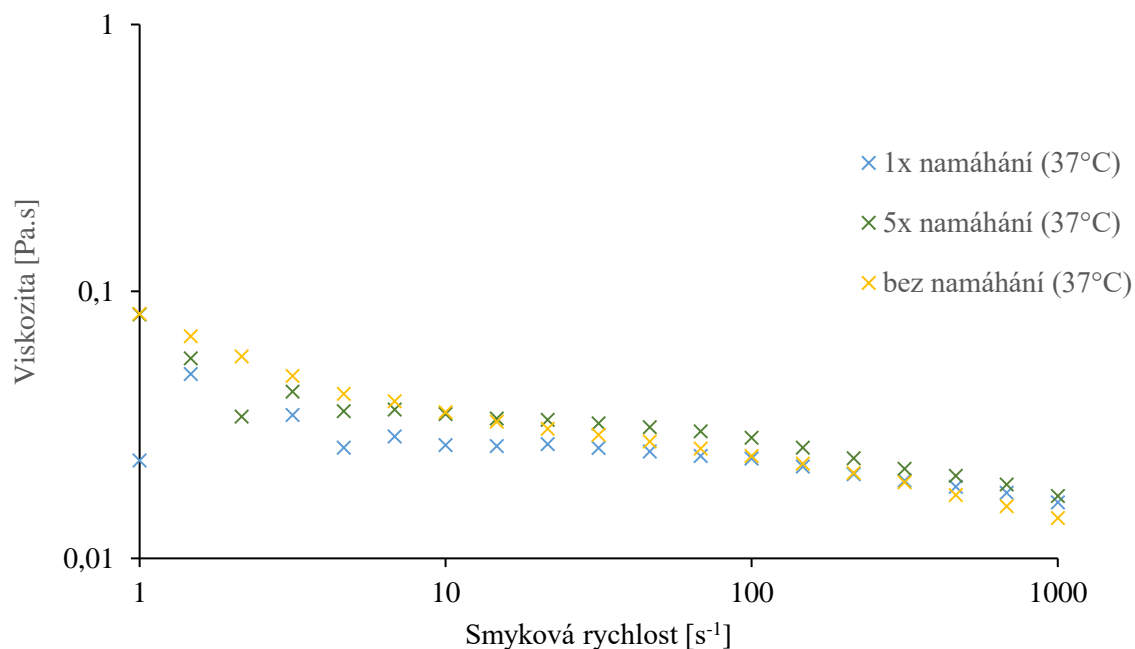
Viskozita umělé synoviální kapaliny se při 37 °C s časem nepatrně snižuje, proto by bylo potřeba celou směs stabilizovat, aby byla použitelná jako náhrada zdravé synoviální kapaliny.

### 5.3 Namáhání vzorku

Jelikož je synoviální kapalina v kloubech neustále namáhána mohou se časem zhoršovat její vlastnosti, které zajišťují správné mazání. Pro simulování namáhání synoviální kapaliny v kloubu byl zvolen membránový extrudér s velikostí pórů 100  $\mu\text{m}$ . Na obrázku 12 jsou zaznamenány tokové křivky umělé synoviální kapaliny po jedné extruzi a po pěti opakujících se extruzích v porovnání s nenamáhanou umělou synoviální kapalinou při 25 °C. Je z něj patrné, že při jedné extruzi, nedošlo defacto k žádné změně viskozity, ale při pětikrát opakované extruzi se viskozita nepatrně zvýšila. Na obrázku 13 je obdobný graf, jehož hodnoty ale byly měřené při 37 °C. V tomto grafu k nárustu viskozity po pětikrát opakované extruzi nedošlo a viskozita se tedy nezměnila. U měření při 25 °C se mohlo jednat o chybu, která mohla být způsobena rozbitím některých molekul, čímž se změnila jejich molekulová hmotnost, a tak i viskozita synoviální kapaliny.



Obrázek 12: Graf porovnání viskózních křivek před a po namáhání při 25 °C.

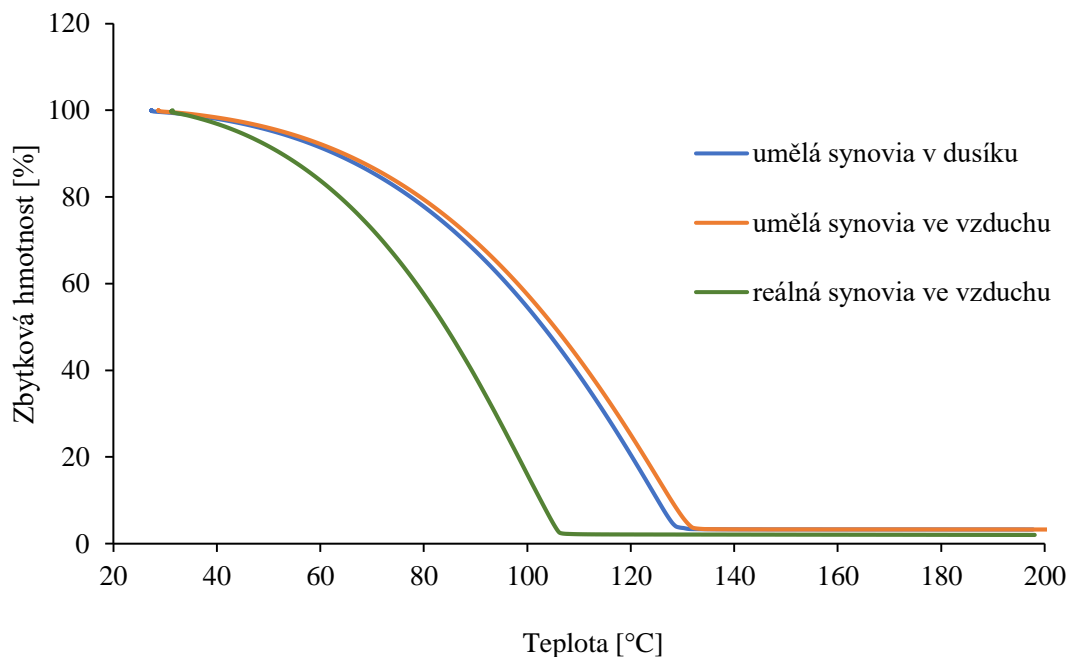


Obrázek 13: Graf porovnání viskózních křivek před a po namáhání při 37 °C.

Celkově jsou výsledky z tohoto experimentu nejednoznačné, proto by bylo potřeba provést tribologické testy, které dokážou přesněji simulovat namáhání v kloubu a zjistit, zda námi připravená synoviální kapalina odpovídá normám [34].

#### 5.4 Klasická termogravimetrie

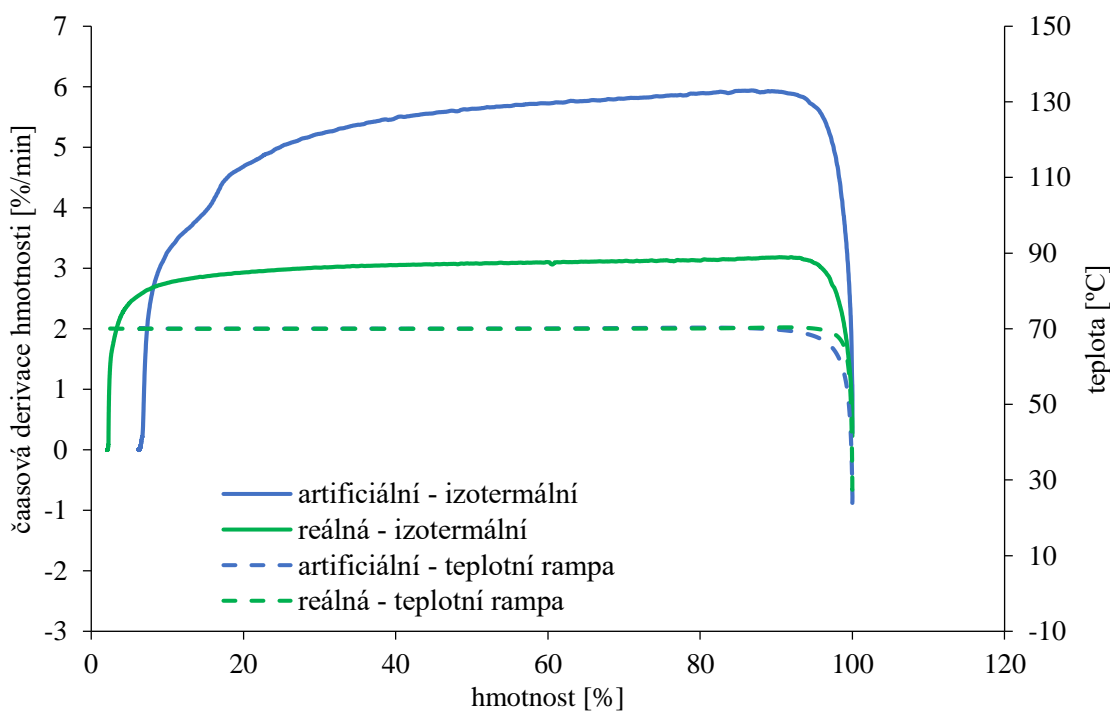
Klasická termogravimetrie nám umožňuje zaznamenávat změny ve složení vzorku a vlastnosti při tepelném zatížení. V našem experimentu jsme tak mohli určit vlhkost a teplotní degradaci vzorků. Klasické termogravimetrii byla podrobena jak reálná, tak umělá synoviální kapalina. Jejich grafy jsou znázorněné na obrázku 14. Při klasické termogravimetrii byl u umělé synoviální kapaliny použit vzduch a dusík. Obecně je stanovení vlhkosti v dusíku přesnější, jelikož ve vzduchu může být částečná vlhkost, ale v tomto případě zde není vidět rozdíl mezi výsledky. Vlhkost v umělé kapalině byla pomocí dusíku stanovena na 96,56 hm% a pomocí vzduchu na 96,41 hm.%. Vlhkost v reálném vzorku byla stanovena pomocí vzduchu na 97,7 hm.%. Rozdíl v trendu křivky u reálné synoviální kapaliny oproti umělým synoviálním kapalinám souvisí s jinou rychlostí ohřevu.



Obrázek 14: Graf klasické termogravimetrie.

### 5.5 Izotermální termogravimetrie

Izotermální termogravimetrie je metoda, při které se měří hmotnost zkoumané látky při určité konstantní teplotě. Naše měření probíhalo při 70 °C, tudíž docházelo pouze k odpařování vody. U reálné synoviální kapaliny je úbytek hmotnosti s časem konstantní, kdežto u umělé synoviální kapaliny hmotnost ubývá rychleji jak je vidět na obrázku 15. Z toho plyne, že v reálné synoviální kapalině je voda lépe vázána nebo se nachází v jiné formě.



Obrázek 15: Graf izotermální termogravimetrie.

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá studiem tokových a viskoelastických vlastností umělé synoviální kapaliny. Hlavním cílem bakalářské práce bylo připravit umělou synoviální kapalinu a prozkoumat její vlastnosti v porovnání s referenčním vzorkem v podobě reálné synoviální kapaliny získané z hlezna koně, kterou poskytla Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně.

V první části experimentální činnosti byly zkoumány tokové vlastnosti laboratorně připravené synoviální kapaliny v porovnání s reálnou synoviální kapalinou. Experimentálně naměřená data obou kapalin byla také porovnávána s odbornou literaturou, konkrétně s patentem [33], který sloužil jako primární zdroj pro přípravu umělé synoviální kapaliny v laboratoři. Bylo zjištěno, že umělá synoviální kapalina má při 25 °C nepatrně vyšší viskozitu při daných smykových rychlostech než při 37 °C. V porovnání s patentovanou synoviální kapalinou, má naše umělá synoviální kapalina při vyšších smykových rychlostech vyšší viskozitu, což může být pravděpodobně zapříčiněno větším množstvím některé ze složek směsi. Jelikož je především kyselina hyaluronová zodpovědná za viskozitu směsi, tak buď navážením jejího menšího množství anebo snížením její molekulové hmotnosti, by se dalo dosáhnout snížení viskozity směsi. Ze vzájemného porovnání tokových křivek reálné a umělé synoviální kapaliny lze vyčíst, že jejich snižování viskozity se zvyšující se smykovou rychlostí je prakticky souměrné, ale hodnoty se v daných smykových rychlostech liší.

Druhá experimentální část předložené bakalářské práce se zabývala degradací umělé synoviální kapaliny v čase. Bohužel kvůli menšímu objemu vzorku, byly tokové testy provedeny pouze čtyřikrát v průběhu 40 dnů. Při 25 °C se viskózní křivky nelišily, kdežto při 37 °C se viskozita nepatrně s časem snižovala. Na snížení mohla mít vliv vyšší teplota, jelikož se obecně se zvyšující se teplotou snižuje viskozita.

Ve třetí části byl vzorek umělé synoviální kapaliny namáhán pomocí membránového extrudéru, který měl simulovat namáhání synoviální kapaliny v kloubu. Viskózní křivky při 37 °C po namáhání nevykazovaly signifikantní změny v tokových vlastnostech, kdežto u viskózní křivky při 25 °C (pětkrát namáháno) došlo ke změně. Experimentální výsledky z této části byly nepřesné, a proto by bylo potřeba podrobit umělou synoviální kapalinu tribologickým testům, které dokáží přesněji simulovat namáhání v kloubu.

V dalším části experimentální činnosti se stanovovala pomocí klasické termogravimetrie vlhkost vzorků. Vlhkost v umělé synoviální kapalině byla pomocí dusíku stanovena na 96,56 hm% a pomocí vzduchu na 96,41 hm.%. Vlhkost v reálném vzorku byla stanovena pomocí vzduchu na 97,7 hm.%. Jednotlivě vlhkosti se neliší, z čehož vyplývá, že připravená synoviální kapalina má srovnatelnou vlhkost jako reálná.

V poslední experimentální části byly vzorky podrobeny izotermální termogravimetrii. Zjistilo se, že v reálné synoviální kapalině je voda vázána lépe než v umělé synoviální kapalině, jelikož má nižší hodnotu derivace hmotnosti a úbytek je konstantní.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DYLEVSKÝ, I: *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [2] TOMANDL, J: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-6973-2.
- [3] LAPČÍK, L., S. DE SMEDT, J. DE SMEDT a P. CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, 98(8), 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z
- [4] TAMER, M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013, 6(3), 111-125. DOI: 10.2478/intox-2013-0019.
- [5] OGSTON, A. G. a J. E. STANIER. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *The Journal of Physiology*. 1953, 119(2-3), 244-252. DOI: 10.1113/jphysiol.1953.sp004842.
- [6] RADIN, E. L., D. A. SWANN a P. A. WEISSER. Separation of a Hyaluronate-free Lubricating Fraction from Synovial Fluid. *Nature*. 1970, 228(5269), 377-378. DOI:10.1038/228377a0.
- [7] JAY, G. D., J. R. TORRES, M. L. WARMAN, M. C. LADERER a K. S. BREUER. The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104(15), 6194-6199. DOI: 10.1073/pnas.0608558104.
- [8] JIN, C., A.H. EKWALL, J. BYLUND, et al. Human Synovial Lubricin Expresses Sialyl Lewis x Determinant and Has L-selectin Ligand Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287(43), 35922-35933. DOI: 10.1074/jbc.M112.363119.
- [9] ALQURAINI, A., S. GARGUILO, G. D'SOUZA, L. X. ZHANG, T. A. SCHMIDT, G. D. JAY a K. A. ELSAID. The interaction of lubricin/proteoglycan 4 (PRG4) with toll-like receptors 2 and 4: an anti-inflammatory role of PRG4 in synovial fluid. *Arthritis Research & Therapy*. 2015, 17(1). DOI: 10.1186/s13075-015-0877-x.
- [10] HUI, A. Y., W. J. MCCARTY, K. MASUDA, G. S. FIRESTEIN a R. L. SAH. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2012, 4(1), 15-37. DOI: 10.1002/wsbm.157.
- [11] KOSINSKA, M. K., G. LIEBISCH, G. LOCHNIT, et al. A Lipidomic Study of Phospholipid Classes and Species in Human Synovial Fluid. *Arthritis & Rheumatism*. 2013, 65(9), 2323-2333. DOI: 10.1002/art.38053.



- [12] JUNG, S., A. PETELSKA, P. BELDOWSKI, W. K. AUGÉ, T. CASEY, D. WALCZAK, K. LEMKE a A. GADOMSKI. Hyaluronic acid and phospholipid interactions useful for repaired articular cartilage surfaces—a mini review toward tribological surgical adjuvants. *Colloid and Polymer Science*. 2017, 295(3), 403-412. DOI: 10.1007/s00396-017-4014-z.
- [13] CHEN, Y., R. W. CRAWFORD a A. OLOYEDE. Unsaturated phosphatidylcholines lining on the surface of cartilage and its possible physiological roles. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2007, 2(1). DOI: 10.1186/1749-799X-2-14.
- [14] BLEWIS, M. E., G. E. NUGENT-DERFUS, T. A. SCHMIDT, B. L. SCHUMACHER a R. L. SAH. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials*. 2007, 13, 26-39. DOI: 10.22203/eCM.v013a03.
- [15] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. Brno: Malé Centrum, 1996.
- [16] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-7080-475-0.
- [17] HOLUBOVÁ, R.. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [18] SCHÁTZ, M., VONDRÁČEK, P. *Zkoušení polymerů*. Skriptum, VŠCHT Praha 1988
- [19] CHHABRA, R.P. a J.F. RICHARDSON. Non-Newtonian Fluid Behaviour. *Non-Newtonian Flow and Applied Rheology*. Elsevier, 2008, s. 1-55. DOI: 10.1016/B978-0-7506-8532-0.00001-9.
- [20] MEZGER, T. *Applied rheology: with Joe Flow on rheology road*. 5st edition. Graz: Anton Paar, 2015. ISBN 978-3-9504016-0-8.
- [21] SCHURZ, J a V. RIBITSCH. Rheology of synovial fluid. *Biorheology*. 1987, 24(4), 385-399.
- [22] NICHOLLS, M., A. MANJOO, P. SHAW, F. NIAZI a J. ROSEN. A Comparison Between Rheological Properties of Intra-articular Hyaluronic Acid Preparations and Reported Human Synovial Fluid. *Advances in Therapy*. 2018, 35(4), 523-530. DOI: 10.1007/s12325-018-0688-y.
- [23] FAM, H, J.T. BRYANT a M. KONTOPOULOU. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology*. 44(2), 59-74.

- [24] MAVRAKI, A. a P.M. CANN. Lubricating film thickness measurements with bovine serum. *Tribology International*. 2011, 44(5), 550-556. DOI: 10.1016/j.triboint.2010.07.008.
- [25] GALANDÁKOVÁ, A., J. ULRICHOVÁ, K. LANGOVÁ, A. HANÁKOVÁ, M. VRBKA, M. HARTL aj. GALLO. Characteristics of synovial fluid required for optimization of lubrication fluid for biotribological experiments. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017, 105(6), 1422-1431. DOI: 10.1002/jbm.b.33663.
- [26] 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.
- [27] GRISSOM, M. J., M. M. TEMPLE-WONG, M. S. ADAMS, et al. Synovial Fluid Lubricant Properties Are Transiently Deficient After Arthroscopic Articular Cartilage Defect Repair With Platelet-Enriched Fibrin Alone and With Mesenchymal Stem Cells. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2014, 2(7). DOI: 10.1177/2325967114542580.
- [28] CORVELLI, M., B. CHE, C. SAEUI, A. SINGH aj. ELISSEEFF. Biodynamic performance of hyaluronic acid versus synovial fluid of the knee in osteoarthritis. *Methods*. 2015, 84, 90-98. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.019.
- [29] SHAH, Y., L. MALDONADO-CAMARGO, N. S. PATEL, A. H. BIEDRZYCKI, E. G. YARMOLA, J. DOBSON, C. RINALDI a K. D. ALLEN. Magnetic particle translation as a surrogate measure for synovial fluid mechanics. *Journal of Biomechanics*. 2017, 60(4), 9-14. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.05.015.
- [30] 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*. 2018, 117, 206-216. DOI: 10.1016/j.triboint.2017.09.001.
- [31] YANG, S., B. LI, M. N. SLIPCHENKO, A. AKKUS, N. G. SINGER, Y. N. YENI a O. AKKUS. Laser wavelength dependence of background fluorescence in Raman spectroscopic analysis of synovial fluid from symptomatic joints. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2013, 44(8), 1089-1095. DOI: 10.1002/jrs.4338.
- [32] ADAMS, S. B., R. M. REILLY, J. L. HUEBNER, V. B. KRAUS a D. L. NETTLES. Time-Dependent Effects on Synovial Fluid Composition During the Acute Phase of Human Intra-articular Ankle Fracture. *Foot & Ankle International*. 2017, 38(10), 1055-1063. DOI: 10.1177/1071100717728234.

- [33] STARK, N., M. S. STRECKENBACH, S. GILCHRIST, T. SCHWENKE a B. THOMAS. *Synthetic synovial fluid compositions and methods for making the same*. US 8,716,204 B2.
- [34] BORTEL, E., B. CHARBONNIER a R. HEUBERGER. Development of a Synthetic Synovial Fluid for Tribological Testing. *Lubricants*. 2015, **3**(4), 664-686.  
DOI: 10.3390/lubricants3040664.