



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV KONSTRUOVÁNÍ

INSTITUTE OF MACHINE AND INDUSTRIAL DESIGN

BIOTRIBOLOGIE UMĚLÝCH SLZ PRO LÉČBU SYNDROMU SUCHÉHO OKA

BIOTRIBOLOGY OF ARTIFICIAL TEARS FOR THE TREATMENT OF DRY EYE SYNDROME

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Mikuláš Černošlávka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Martin Vrbka, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav konstruování
Student:	Bc. Mikuláš Černošlák
Studijní program:	Strojní inženýrství
Studijní obor:	Konstrukční inženýrství
Vedoucí práce:	doc. Ing. Martin Vrbka, Ph.D.
Akademický rok:	2020/21

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Biotribologie umělých slz pro léčbu syndromu suchého oka

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Syndrom suchého oka patří v oftalmologické praxi mezi nejčastější oční onemocnění. Jedná se o multifaktoriální chronické onemocnění, které vede k nestabilitě a k narušení slzného filmu. Léčba je založena na náhradě nefunkčního očního filmu umělými slzami v podobě očních kapek, které zabrání vysychání a poškození povrchu oka. Současný vývoj umělých slz cílí na využití nových materiálů, nejčastěji na bázi derivátu kyseliny hyaluronové. Podstatou této diplomové práce je pomocí tribologických měření stanovit optimální složení umělého slzného filmu ve stádiu jeho vývoje.

Typ práce: výzkumná

Výstup práce: publikační výsledek (J, D)

Projekt: TAČR Trend

Cíle diplomové práce:

Hlavním cílem je experimentální popis vývoje součinitele tření umělého slzného filmu s využitím pin-on-plate simulátoru. Práce bude zaměřena především na kvantifikaci účinku vyvíjených derivátů kyseliny hyaluronové na součinitel tření a viskozitu.

Dílčí cíle diplomové práce:

- provést kritickou rešerši aktuálních vědeckých publikací,
- navrhnout tribologický model simulující kontakt oka a víčka včetně úpravy simulátoru a návrhu podmínek experimentů pro analýzy součinitele tření,
- experimentálně popsat vývoj viskozity a součinitele tření komerčně dostupných očních kapek,
- posoudit účinnost navržených derivátů kyseliny hyaluronové na vývoj viskozity a součinitele tření,
- konfrontovat získané poznatky s dosud publikovanými studiemi zabývajícími se vývojem a tribologií umělých slz.

Požadované výstupy: průvodní zpráva.

Rozsah práce: cca 72 000 znaků (40 – 50 stran textu bez obrázků).

Časový plán, struktura práce a šablona průvodní zprávy jsou závazné:

<http://ustavkonstruovani.cz/texty/magisterske-studium-ukonceni/>

Seznam doporučené literatury:

ROBA, M., E. G. DUNCAN, G. A. HILL, N. D. SPENCER and S. G. P. TOSATTI. Friction Measurements on Contact Lenses in Their Operating Environment. *Tribology Letters*. 2011, 44(3), 387-397. ISSN 1023-8883. doi:10.1007/s11249-011-9856-9.

PULT, H., S. G. P. TOSATTI, N. D. SPENCER, J.-M. ASFOUR, M. EBENHOCH and P. J. MURPHY. Spontaneous Blinking from a Tribological Viewpoint. *The Ocular Surface*. 2015, 13(3), 236-249. ISSN 15420124. doi:10.1016/j.jtos.2014.12.004.

SU, Ch.-Y., L.-K. YEH, Ch.-Ch. LAI, K.-Y. LI, Ch.-L. TSENG and H.-W. FANG. Effects of lysosomal deposition on the friction coefficient of hydrogel contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2020, 43(2), 144-148. ISSN 13670484. doi:10.1016/j.clae.2019.09.007.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2020/21

V Brně, dne

L. S.

prof. Ing. Martin Hartl, Ph.D.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je součástí projektu TAČR TREND, jehož cílem je vývoj nové suroviny pro léčbu syndromu suchého oka. Vyvíjenou surovinou je derivát kyseliny hyaluronové, který je v této práci porovnáván s nativními kyselinami hyaluronovými a komerčními očními kapkami. Zkoumána je reologie a tribologie vzorků s důrazem na analýzu viskozity, mukoadhezivitu a součinitele tření. K analýze součinitele tření je používán vytvořený tribologický model oka v konfiguraci pin-on-plate, který simuluje posuvné rychlosti odpovídající fyziologickému mrkání. Porovnání s nativními kyselinami hyaluronovými a produkty dostupnými na trhu ukazuje, že derivát dosahuje vyšší viskozity, projevuje mukoadhezivní vlastnosti a zároveň dosahuje nízkého součinitele tření. Tyto klíčové parametry ukazují, že modifikace kyseliny hyaluronové je možnou cestou ve vývoji léku na léčbu syndromu suchého oka.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biotribologie, kyselina hyaluronová, oko, reologie, součinitel tření, viskozita

ABSTRACT

This master's thesis is a part of the project TAČR TREND, which aim is the development of new ingredient for treatment of dry eye syndrome. Developed ingredient is derivative of hyaluronic acid, which is in this thesis compared with native hyaluronic acids and commercial eye drops. Aim of this thesis is to describe rheological and tribological properties of measured samples in terms of viscosity, mucoadhesivity and coefficient of friction. Coefficient of friction was measured on created tribological model of the eye in pin-on-plate configuration which represents physiologically relevant sliding speeds of blinking. Comparison with native hyaluronic acids and commercial products of eye drops showed, that derivative reaches higher values of viscosity, has mucoadhesive properties and has low values of coefficient of friction. Those key parameters show that modification of hyaluronic acid is promising way for drug development for dry eye syndrome.

KEYWORDS

Biotribology, hyaluronic acid, eye, rheology, coefficient of friction, viscosity

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

ČERNOHLÁVEK, Mikuláš. *Biotribologie umělých slz pro léčbu syndromu suchého oka*. Brno, 2021, 103 s. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131907>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav konstruování. Vedoucí práce doc. Ing. Martin Vrbka Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému vedoucímu doc. Martinu Vrbkovi za cenné rady a za ochotu při vypracování této diplomové práce a celé biotribologické skupině z Ústavu konstruování za pomoc při experimentech. Dále bych rád poděkoval firmě Contipro a.s. a to hlavně Dr. Glorii Huertě-Angeles za ochotu a cenné rady, které poskytla při vypracování reologické části této práce. Poděkování patří také skupině analytické chemie, za pomoc při provádění reologických experimentů. Tato práce vznikla za podpory řešení projektu TAČR TREND Technologičtí lídři s názvem Výzkum a vývoj farmaceutické suroviny do umělých slz pro léčbu syndromu suchého oka, registrační číslo FW10110060.

PROHLÁŠENÍ AUTORA O PŮVODNOSTI PRÁCE

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně, pod odborným vedením doc. Ing. Martina Vrbky Ph.D. Současně prohlašuji, že všechny zdroje obrazových a textových informací, ze kterých jsem čerpal, jsou řádně citovány v seznamu použitých zdrojů.

.....

Podpis autora

OBSAH

1	ÚVOD	15
2	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ	16
2.1	Oko	16
2.2	Slzný film	18
2.3	Kontaktní čočky	19
2.3.1	Materiály kontaktních čoček	20
2.4	Syndrom suchého oka	21
2.4.1	CLADE	21
2.4.2	Léčba syndromu suchého oka pomocí umělých slz	22
2.5	Kyselina hyaluronová	24
2.5.1	Mukoadhezivita kyseliny hyaluronové	24
2.6	Analýza vědeckých publikací	25
2.6.1	Tribologie oka	25
2.6.2	Reologie a mukoadhezivita slz	29
2.6.3	Klinické studie	32
2.6.4	Numerické studie	34
2.6.5	Experimentální studie	36
3	ANALÝZA PROBLÉMU A CÍL PRÁCE	48
3.1	Analýza problému	48
3.2	Analýza a zhodnocení řešerše	49
3.3	Cíl práce	50
3.4	Vědecká otázka a hypotéza	51
3.4.1	Vědecké otázky	51
3.4.2	Hypotézy	51
4	MATERIÁL A METODY	52
4.1	Použitá experimentální zařízení	52
4.1.1	Kinexus Pro+	52
4.1.2	Bruker UMT TriboLab	53
4.2	Reologie	54
4.2.1	Parametry reologických experimentů	54

4.2.2	První fáze – Měření viskozitních charakteristik vzorků	55
4.2.3	Druhá fáze – Výpočet mukoadhezivního indexu	56
4.2.4	Třetí fáze – Vliv sterilizace	56
4.3	Tribologie	57
4.3.1	Tribologický model oka	57
4.3.2	Popis tribologických experimentů	62
4.3.3	První fáze – Validací experimenty	63
4.3.4	Druhá fáze – Testování komerčních očních kapek	63
4.3.5	Třetí fáze – Testování nativních KH a derivátů	64
4.4	Maziva	64
4.4.1	Kyselina hyaluronová a derivát	64
4.4.2	Komerční oční kapky	66
5	VÝSLEDKY	67
5.1	Reologie	67
5.1.1	Komerční oční kapky	67
5.1.2	Nativní kyselina hyaluronová a derivát	70
5.2	Tribologie	75
5.2.1	Úvodní experimenty pro ověření tribologického modelu oka	75
5.2.2	Komerční oční kapky	76
5.2.3	Nativní kyselina hyaluronová a derivát	78
6	DISKUZE	82
6.1	Reologie	82
6.1.1	Komerční oční kapky	83
6.1.2	Nativní kyseliny hyaluronové a derivát	84
6.2	Tribologie	86
6.2.1	Tribologický model oka	86
6.2.2	Komerční oční kapky	87
6.2.3	Nativní kyselina hyaluronová a derivát	88
6.3	Zhodnocení komerčních očních kapek a derivátů	89
6.3.1	Zhodnocení komerčních očních kapek	89
6.3.2	Zhodnocení derivátů	90
7	ZÁVĚR	92
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	93
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK, SYMBOLŮ A VELIČIN	97

10	SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ	99
11	SEZNAM TABULEK	102
12	SEZNAM PŘÍLOH	103

1 ÚVOD

Syndrom suchého oka patří v současné době mezi nejčastější oční onemocnění. Počet pacientů se globálně zvyšuje, a to také s ohledem na rozvoj moderních technologií (tzv. Monitor Eye Syndrom), rostoucí oblibu užívání kontaktních čoček či civilizační choroby (např. cukrovka). Nejvíce postiženou skupinou jsou však kancelářské profese, kde syndromem suchého oka trpí 30-60 % zaměstnanců [1]. Toto multifaktoriální onemocnění se projevuje nedostatečnou tvorbou slz nebo poškozením slzného filmu. Svědění, pálení a řezání vlivem suchosti očí způsobuje diskomfort, který významně snižuje kvalitu života a vede až k pracovní neschopnosti. V případě neléčení může dojít až ke strukturálním změnám rohovky a omezení či ztrátě vidění. Jedná se tedy o závažný socioekonomický problém, který nelze přehlížet. Problematikou suchého oka se ve světě zabývá řada špičkových výzkumných týmů a farmaceutické firmy společně s výrobcí kontaktních čoček investují velké finanční částky do tohoto výzkumu [2]. Léčba spočívá v aplikaci umělých slz, které nahrazují funkci přirozeného slzného filmu.

Umělé slzy hydratují oční povrch, zlepšují mazání mezi okem a víčkem a zvyšují stabilitu slzného filmu. Příhodných viskoelastických a fyzikálněchemických vlastností roztoků očních kapek je dosaženo pomocí specifických polymerů. Mezi používané polymery patří methylcelulóza a její deriváty, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a také kyselina hyaluronová [3].

Vývoj umělých slz se opírá o výzkum v oblasti aplikované biotribologie, jehož cílem je pomocí experimentálních měření součinitele tření a viskozity stanovit ideální složení umělého slzného filmu. Touto problematikou se zabývá i tato diplomová práce, která je řešena v rámci projektu TAČR TREND. Cílem diplomové práce je vyvinout experimentální model oka a pomocí něho analyzovat součinitel tření nejen komerčně dostupných očních kapek, ale i nově vyvíjených derivátů kyseliny hyaluronové. Součástí práce je i analýza reologických vlastností zmíněných roztoků.



Obr. 1-1 Oko postižené syndromem suchého oka.

2 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ

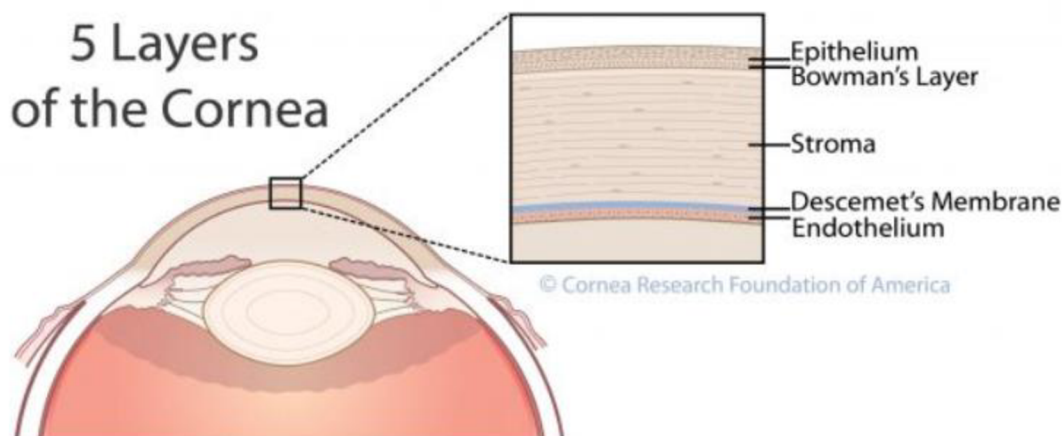
2.1 Oko

Oko je smyslový orgán reagující na světlo o vlnové délce 400-760 nm. Vnímání světla je zajištěno tyčinkami a čípkami, což jsou fotoreceptory uložené v sítnici oka. Oko umožňuje vnímat také tvar, pohyb a prostorové rozložení předmětů. Jelikož je oko komplikovaný smyslový orgán zaměří se následující rešerše pouze na oblasti, které se týkají této diplomové práce.

Rohovka (Cornea)

Rohovka je opticky průsvitná tkáň, která převádí obraz do sítnice na zadní straně oka. Z plochy celého oka zabírá rohovka přibližně 1/6. Rohovka přijímá živiny a kyslík z lakrimálních tekutin, vodných roztoků a také z krevních cév, které probíhají na rozmezí rohovky a sklera. Rohovka je přibližně 0,5 mm silná ve střední oblasti a 0,7 mm po okrajích [4].

Celkově se rohovka skládá z 5 vrstev [4]. První vrstvou je rohovkový epitel tvořený 5–6 vrstvami buněk a má celkovou tloušťku okolo 50-100 μm . Tato vrstva je nejdůležitější z hlediska vstřebávání léku. Druhou vrstvou je Bowmanova membrána nacházející se mezi epitelem a stromou. Třetí vrstvou je stroma zaujímající až 90 % rohovky. Stroma je tvořena z 85 % vodou, zajišťuje pevnost rohovky a umožňuje její transparentnost. Čtvrtou vrstvou je Descemetova membrána. Poslední vrstvou je rohovkový endotel, který zajišťuje její hydrataci. Skládá se z jedné vrstvy hexagonálních buněk 5 μm vysokých a 20 μm širokých.



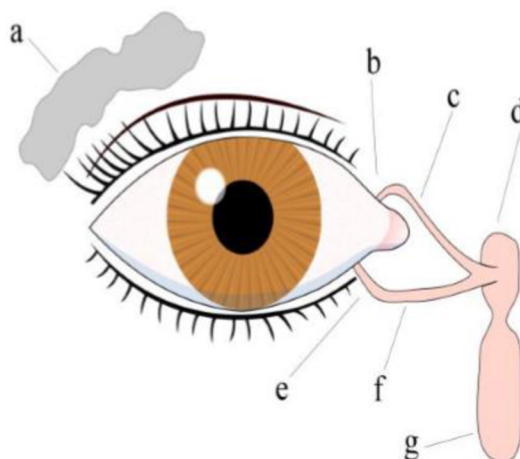
Obr. 2-1 Schématické zobrazení 5 vrstev nacházejících se v rohovce [5].

Spojivka (Conjunctiva)

Spojivka je tenká, cévnatá mukózní membrána, která leží na vnitřní straně očních víček a na povrchu rohovky zapojující se do tvorby a udržování prekorneálního slzného filmu. Tato vysoce specializovaná vrstva tekutin (slzný film) kryje povrch epitelu rohovky, spojivky a stěny spojivkového vaku. Slzy jsou potřebné pro výživu rohovky, odstraňování cizích materiálů (bakterie) a mazání očních víček pro jejich snadný pohyb po oční kouli [4].

Noso-lakrimální odvodný systém

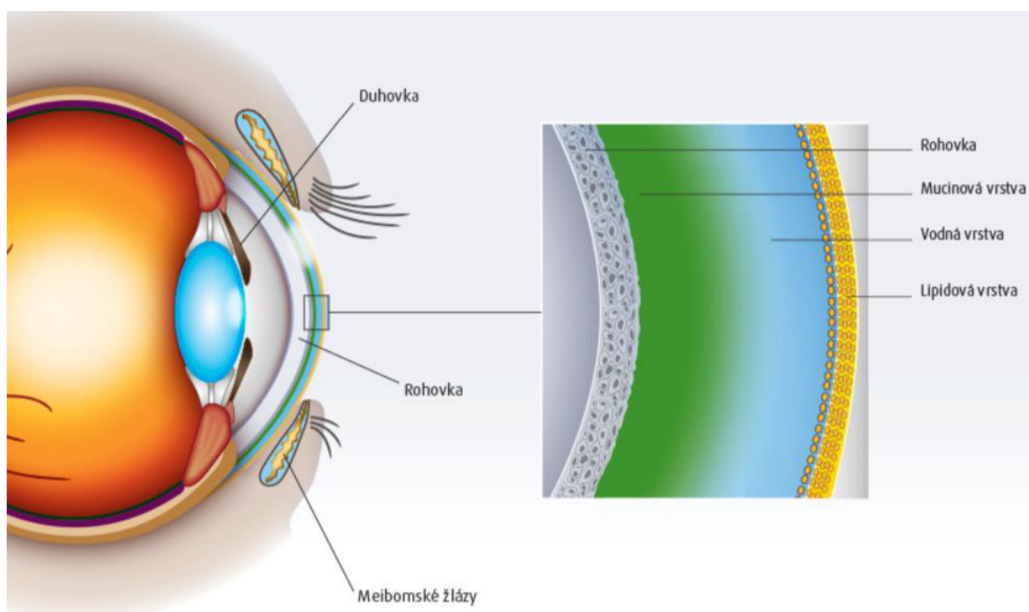
Funkcí tohoto systému je odvod slz z oka a také léků ze slzného filmu. Noso-lakrimální odvodný systém je tvořen ze tří částí: sekrečního, distribučního a exkrecečního systému [4]. Sekreční systém se skládá ze základních sekretorů, které se spouštějí mrkáním a změnami teploty z důvodu vypořádání slz a reflexních sekretorů, které reagují na fyzické nebo emoční stimuly. Distribuční systém se skládá z očních víček a slzného menisku na okraji víčka. Tento systém pracuje na principu roztírání slz po očním povrchu během mrkání, což zabraňuje tvorbě suchých míst na oku. Exkreceční systém se skládá z lakrimálního puncta, slzného kanálku, slzného vaku a noso-lakrimálního kanálku (Obr. 2-2). U lidí jsou dvě puncta vstupem slzných canalicul a jsou umístěny na slzné papile. Slzy jsou z většiny vstřebány mukózní membránou, která spojuje slzný kanálek a slzný vak. Jen velmi malé množství slz dosáhne oblastí nosu. Normální průtok slz je dle studie provedené Larkem 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ [4].



Obr. 2-2 Schéma lakrimálního systému, kde a) slzná žláza, b) horní lakrimální punctum, c) horní slzný kanál, d) slzný vak, e) spodní lakrimální punctum, f) dolní slzný kanál, g) noso-lakrimální kanál [6].

2.2 Slzný film

Je produkován slznou žlázou a rozprostírán pravidelně po povrchu rohovky a spojivky pohybem víček. Hlavními funkcemi slzného filmu jsou zvlhčování a ochrana oka před mechanickým poškozením a bakteriální infekcí. Slzy totiž působí jako fyzikální bariéra pro choroboplodné zárodky. Slzný film se skládá ze tří vrstev (Obr. 2-3).



Obr. 2-3 Schématické zobrazení slzného filmu [7].

Vnitřní mucinová vrstva je produkována pohárkovými buňkami spojivky. Ze všech tří vrstev je nejtenčí a dosahuje tloušťky kolem $0,2 \mu\text{m}$ [8]. Je tvořena především bílkovinami a cukry a umožňuje přilnutí k povrchu oka. Vrstva bílkovin a cukrů se nazývá glykokalyx. Součástí glykokalyxu je i mucin MUC5AC [9], který se následně nachází rozpuštěný ve vodné vrstvě. Má velmi dobré mazací vlastnosti a vytváří gelové struktury. Je produkován spojivkovými buňkami a hraje významnou roli při udržování stability slzného filmu. Muciny se také podílejí na shear thinning efektu slzného filmu a chrání oční povrch před zvýšeným třením.

Střední vrstva je tvořena vodou, elektrolyty, enzymy a minerály a bývá označována jako vrstva vodná. Dosahuje tloušťky kolem $10 \mu\text{m}$ a tvoří asi 90 % slzného filmu [8]. Tvoří se v slzných žlázách pod horním okrajem očnice. Její funkcí je zvlhčování povrchu oka. Mucinová a vodná vrstva bývají někdy společně označovány jako muko-vodná vrstva [9] z důvodu, že ve vodné vrstvě jsou obsaženy rozpuštěné bílkoviny a cukry a nejedná se o striktně oddělené vrstvy.

Vnější lipidová vrstva je produkována Meibomskými žlázkami. Ze všech tří vrstev je nejtenčí a dosahuje tloušťky kolem $0,1 \mu\text{m}$. Hlavní funkcí je stabilizace a zabránění odpařování slzného filmu zvýšením jeho povrchového napětí [8]. To je umožněno tukovým charakterem obsažených látek (volné mastné kyseliny, volné lipidy).

Slzný film vyžaduje pro svoji stabilitu vysokou viskozitu za velmi malé (až nulové) smykové rychlosti a během mrkání nízkou viskozitu, aby nedocházelo k poškození epitelu na povrchu rohovky. Tiffany [10] zjistil, že viskozita nativních lidských slz se pohybuje v rozmezí 65,5 mPa.s za nízkých smykových rychlostí a 10,1 mPa.s. za vysokých smykových rychlostí. Smyková rychlost je definována jako rychlost dvou vůči sobě se pohybujících objektů. V případě oka je to rohovka a víčko, podělené jejich vzdáleností, a potom platí jednotka smykové rychlosti s^{-1} . Smyková rychlost, které jsou lidské slzy vystavovány je přibližně $0 s^{-1}$ u otevřeného oka a typicky $1000 s^{-1}$ během mrkání [9].

Poškození slzného filmu je nejčastěji způsobeno nedostatkem tekutiny ve střední vodné vrstvě nebo poruchou lipidové složky. Dochází k porušení ochranné funkce a oko na danou skutečnost reaguje zvýšenou tvorbou slz.

2.3 Kontaktní čočky

Kontaktní čočky se v poslední době staly velmi rozšířené. Jedním z důvodů může být jednoduchá aplikace kontaktních čoček a okamžitá korekce zrakové vady. Oproti jiným druhům korekce zraku (brýle, laserová operace) se nejedná o omezující nebo invazivní aplikaci. Ačkoliv vývoj v této oblasti dosáhl velkých pokroků, stále se nejedná o ideální stav a další vývoj je nezbytný pro eliminaci nežádoucích účinků.

Poprvé byla myšlenka kontaktních čoček zmíněna v 19. století Muellerem a Fickem [6]. První PMMA čočky byly představeny v první polovině 20. století. Následovalo roku 1974 patentování siloxan-metakrylátového polymeru, který měl oproti PMMA vyšší propustnost pro plyny. První měkké kontaktní čočky vynalezl Otto Wichterle roku 1961 [6]. Jednalo se o měkké kontaktní čočky vyrobené z materiálu polyHEMA (polyhydroxyethylmetakrylát). Následoval další vývoj kombinací kopolymerů jako HEMA a NVP (vinylpyrolidin) a vznik nových čoček majících speciální komerční názvy (Etafilcon, Delafilcon apod.) [6].

Mnoho standardizovaných čoček se v současnosti charakterizuje podle obsahu vody. Čočky s vyšším obsahem vody mají větší póry, takže proteiny jimi snáze prostupují. U čoček s menším obsahem vody jsou póry menší a dochází ke kumulaci proteinů na povrchu čočky. Jelikož struktura proteinů je typicky 3D, mají proteiny tendenci ztrácet svou strukturu při vystavení hydrofobnímu povrchu. Pokud se proteiny nedokáží znovu složit do původní struktury, tak tyto rozvolněné (či denaturované) proteiny mohou spustit imunitní reakci a vznik infekce. Snížení množství proteinů na povrchu čočky se tedy stává klíčovým faktorem pro výrobce čoček. Jednou z možných metod řešení je čištění povrchu čoček speciálním roztokem, který obsahuje čistící činidlo [11].

2.3.1 Materiály kontaktních čoček

Vzhledem ke svému rozmachu bylo potřeba výrobu kontaktních čoček standardizovat a aktuálně jsou materiály pro měkké kontaktní čočky řízeny normou ISO 18369-1:2017 [12].

Hydrofilní materiály

Hydrofilní materiály kontaktních čoček jsou vyráběny použitím různých monomerů. Tyto monomery mají důležitou roli z hlediska obsahu vody, propustnosti kyslíku, biokompatibility, pevnosti a pružnosti a mechanické stability [6]. Výroba čoček probíhá polymerizací, kdy jsou monomery svázány dohromady pomocí termálních nebo katalytických procesů. Kontrola teploty během výroby je důležitá z důvodu vnitřního napětí materiálu. Pokud má hydrofilní čočka vnitřní napětí, dojde při kontaktu s vodou k její deformaci.

Mnoho standardních čoček se charakterizuje podílem vody. Propustnost kyslíku (Dk) hydrofilních materiálů kontaktních čoček bez obsahu silikonu je funkcí obsahu vody specifického materiálu. Většina konvenčních hydrogelů má Dk 10–35 [6].

Silikonové elastomery

Jelikož byla propustnost kyslíku u hydrofilních čoček limitována pokusily se společnosti Toyo, Bausch a Lomb a Dow Chemical použít silikonové elastomery [6]. Hlavní výhodou těchto elastomerů byla vysoká propustnost kyslíku, nicméně elastomery byly značně hydrofóbní. Bylo tedy potřeba povrch kontaktních čoček hydrofilizovat, přičemž ale došlo ke snížení propustnosti kyslíku a materiál ztratil svou hlavní výhodu [6]. Vzhledem k tomu byly čočky komerčně dostupné jen omezenou dobu.

Silikon-hydrogely

Kombinaci silikonových elastomerů a hydrogelu představil poprvé Bowden roku 1999 [6]. Bowden dával vkládal do toho materiálu velké ambice, jelikož věřil, že může splňovat všechny důležitá kritéria. Prvotní výroba těchto čoček probíhala odléváním, nicméně nejednalo se o nejlepší možnost výroby. Změna nastala roku 2008, kdy firma Contamac začala vyrábět tyto čočky pomocí obrábění [6]. Výhodou obrábění byl fakt, že již nebylo nutné povrch čoček dále upravovat. U odlévaných čoček byla nutná další úprava pro dosažení optimální hydratace.

Avšak stále je prostor pro vylepšování vlastností těchto materiálů. Zlepšením povrchu čoček se zabývali Keir a Jones [13], kteří navrhli několik metod. Mezi tyto metody můžeme zařadit:

- povlakování plazmou s velkým refrakčním indexem
- oxidaci plazmou za vzniku hydrofilních křemičitanů
- nanoskelné technologie
- vysokomolekulární zvlhčovací přípravky na bázi polyvinylpyrolidinu, které zevnitř zvlhčují povrch čočky
- patentovaná MeniSilk technologie, kterou kontaktní čočky získávají hydrofilní vlastnosti potřebné pro zajištění komfortu

2.4 Syndrom suchého oka

Onemocnění charakterizované očními symptomy a změnou očního povrchu, které jsou vyvolány nestabilitou slzného filmu nebo jeho hyperosmolaritou [8]. Vzniká tedy z důvodu sníženého zvlhčování povrchu oka. Jako příčiny vzniku bývají označovány vlivy životního prostředí (výfukové plyny, ozon, suchý vzduch z vytápění, vítr), špatná životospráva (kouření) nebo dlouhodobá práce na počítači, tabletu či mobilu [2]. Dlouhodobé používání multimediálních zařízení vede ke snížení frekvence mrkání a „suchým“ očím. Bylo zjištěno, že některé nemoci (cukrovka, chronická revmatitida) a užívání některých léků (hormonální antikoncepce, antihistaminika, antidepresiva) může mít vliv na vznik a průběh syndromu suchého oka. Syndrom suchého oka se projevuje pálením, řezáním, zhoršením zraku nebo pocitem cizího tělíska či písku v oku [2]. V roce 2007 byla představena klasifikace syndromu suchého oka pracovní skupinou DEWS (Dry Eye WorkShop). Dle míry postižení se rozlišují 4 stupně, od subjektivních bez poškození očního povrchu až po těžká poškození očního povrchu [8].

Syndrom suchého oka mění reologii slz [9]. Vlivem zánětu epitelových buněk dochází k poškození produkce a efektivity mucinů. Ovlivnění koncentrace a molekulové hmotnosti mucinů MUC5AC a MUC16 vede ke snížení efektivity mazání slzného filmu. Při nadbytku mucinu narůstá viskozita a dochází k rozmazanému vidění. V opačném případě je mazání nedostatečné. Společně se zánětem tkání a změnou struktury mucinů se objevuje zvýšené tření. Poškozený slzný film nedokáže zadržovat vodu, a to vlivem narušení mucinů, které ztrácí schopnost vázat vodu [9].

2.4.1 CLADE

Problematikou mechanismu onemocnění suchého oka s ohledem na užívání kontaktních čoček (CLADE) se velmi podrobně zabývá studie **Takashi Kojimy** [14].

CLADE je zde popisován jako multifaktoriální onemocnění projevující se mnoha příznaky např. pocitem cizího tělesa, suchostí, tlakem v oku a rozmazaným viděním. Diskomfort na konci dne je také typickým příznakem CLADE a příznaky jsou horší večer/v noci než během dne. Toto je způsobeno porušením povrchu oka vlivem déletrvající suchosti nebo práci s VDT (visual display terminal). Zároveň bylo zjištěno, že dochází ke zhoršení ostrosti vidění a vlivem brzkého rozpadu slzného filmu vzniká například astigmatismus. Tyto změny kvality vidění vedou ke snížení funkce zraku jako celku.

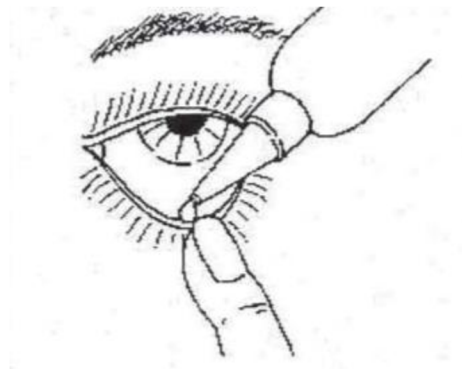
Meibomské žlázy hrají klíčovou roli v udržování zdravého slzného filmu pomocí tvorby lipidové vrstvy slzného filmu. Lipidová vrstva stabilizuje slzný film a zabraňuje odpařování vodných komponent a snižuje povrchové napětí slzného filmu. Zde se Kojima odkazuje na studii Arity, který ukázal zvýšení produkce meibomských žláz u uživatelů kontaktních čoček. Detailní mechanismus však není dosud znám, ale existují dvě možnosti. Jednou je nepřímý mechanismus vysvětlený snížením objemu vodné části v oblasti před kontaktní čočkou. Druhou je přímý mechanismus, který je vysvětlen přímou mechanickou stimulací meibomských žláz kontaktní čočkou.

Kojima naznačuje, že vlastnosti kontaktních čoček mohou ovlivňovat CLADE. Jako rizikové faktory dále udává obsah vody, vlastnosti povrchu, modul pružnosti E a design hran kontaktních čoček.

Vliv tření mezi kontaktní čočkou a spojivkou může způsobit zánět na povrchu oka. Tyto změny mohou vést k podráždění buněk účastnících se na zánětlivé reakci, které následně způsobí sekreci cytokinů zánětu a matrixu metaloproteázy (MMPs). Cytokiny zánětu společně s MMPs mohou způsobit poškození epitelu povrchu oka a následnou nestabilitu slzného filmu.

2.4.2 Léčba syndromu suchého oka pomocí umělých slz

Umělé slzy nahrazují vodnou složku slzného filmu. Jejich základem jsou deriváty přírodních polymerů (celulóza) a syntetických polymerů (polyvinylové a polyvinylalkoholové). Používají se především pro léčbu lehčích průběhů onemocnění (první a druhý stupeň) a přizpůsobují se každému pacientovi zvlášť. Pro první stupeň onemocnění se mohou užívat slzy s konzervačními látkami (benzalkonium chlorid, thiomersal), ale jen po omezenou dobu (4 týdny) z důvodu možné toxicity pro tkáň rohovky a spojivky. V případě druhého stupně už se preferují slzy bez konzervačních látek, z důvodu častější aplikace. Volí se umělé slzy s vyšší viskozitou obsahující soli kyseliny hyaluronové [8].



Obr. 2-4 Ukázka správné aplikace očních kapek [4].

Aktuálně je nejrozšířenější léčbou použití očních kapek na bázi polyvinyl alkoholu, polyvidonu, hydroxypropyl guaru, celulózy a kyseliny hyaluronové [15]. Tyto polymery zlepšují stabilitu slzného filmu, snižují napětí na povrchu oka a zlepšují kvalitu očního povrchu. Přípravky umělých slz se také často zaměřují na napodobení osmolarity přirozených slz (která je přibližně 304 mOsm/l nebo 304 mOsm/kg), jelikož hyperosmolarita (zkoncentrování tekutiny) slz je jedním z faktorů způsobujících zánět a zhoršuje stabilitu slzného filmu. Některé přípravky umělých slz mají speciální složení, aby byly hypotonické (např. Hybak, Thealoz Duo a Thealoz Duo gel). Tím brání rozvoji hyperosmolarity slzného filmu u pacientů se suchým okem. Další složkou umělých slz jsou elektrolyty, zejména NaCl, přidávané pro zvýšení tonicity. Kromě elektrolytů lze pro dosažení tonicity použít také organické osmolyty jako je glycerin, polyoly nebo aminokyseliny. U organických osmolytů bylo prokázáno, že mají protizánětlivé účinky na různé typy buněk [16].

Jednou z nejběžnějších forem aplikace umělých slz jsou oční kapky, které se aplikují na spodní víčko (obr. 2-4). Kapky jsou pak snadno vstřebány pomocí reflexu mrkání. Prekorneální oblast poté dosáhne normálního objemu okolo 7 μ l. Účinná látka vstupuje do rohovky prostřednictvím pasivní difuze [4].

V současnosti existuje velké množství forem léků používaných pro léčbu oka, nicméně stále okolo 70 % je ve formě očních kapek [4]. Oční kapky si uchovávají svou oblíbenost z důvodu ceny, komfortu, účinnosti a stability. Umělé slzy se ale mohou také používat ve formě gelů a mastí (deriváty retinolu, karbomeru a kyseliny hyaluronové) [8].

2.5 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (KH) je přirozeně se objevující glykosaminoglykanový polymer tvořený opakujícími se disacharidy D-glukoronikové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminy spojenými pomocí glukuronidových β (1 \rightarrow 3) vazeb [15]. V lidském těle vážícím 70 kg je přibližně 15 g KH nacházející se v synoviální kapalině, sklivci oka, srdečních chlopních, ale také v kůži a skeletálních tkáních [15]. Kyselina hyaluronová vykazuje viskoelastické vlastnosti, které umožňují mazat oční povrch a zároveň snižovat tření během cyklu mrkání. Má také schopnost vázat vodu a její dobré mazací vlastnosti se využívají pro léčbu syndromu suchého oka. Zároveň působí protizánětlivě a má hojivé účinky, což je velkou výhodou kyseliny hyaluronové oproti dalším polymerům.

2.5.1 Mukoadhezivita kyseliny hyaluronové

Mukoadheze je definována jako přilnavost dvou povrchů, kdy jedním z nich je mukózní membrána [17]. Mukoadhezivita umožňuje uvolňování aktivní léčivé látky blízko místa jejího působení (tedy rohovka). Mukoadheze se projevuje ve dvou krocích. Prvním krokem je průnik a provázání mukoadhezivního polymeru jeho funkčními skupinami jako jsou například hydroxylová (-OH), karboxylová (-COOH), amidová (-NH₂) nebo sulfátová (-SO₄H) s mucinovými řetězci. Druhým krokem je vytvoření vodíkových vazeb mezi mukoadhezivním polymerem a mucinovými řetězci.

Ve chvíli, kdy dojde k začlenění mukoadhezivních polymerů do gelové nebo mukózní vrstvy, dochází ke zvýšení odolnosti gelu proti deformaci a posílení této vrstvy. Flexibilita polymerových řetězců je důležitá pro první fázi, kde dochází ke spojení a zapletení se s mucinovými řetězci, aby bylo možné následně vytvoření vodíkových vazeb mezi těmito řetězci [17, 18]. Mukoadhezivní polymery tedy slouží jako „nosiče“ aktivní léčivé látky, ale mohou také sloužit pro ochranu a krytí poškozených tkání či jako maziva v závislosti na svých charakteristikách [9].

Na očním povrchu se mukoadheze vztahuje na interakci mezi muciny a muko-vodnou vrstvou slzného filmu, stejně jako na membránově vázané muciny glykokalyxu apikálních epitelových buněk. Kyselina hyaluronová je vysoce flexibilní polyanion schopný se dobře splétat, vázat se s molekulami mucinu na očním povrchu. Graca a její kolegové shrnuli in vitro metody pro vyhodnocení mukoadhezivních vlastností u oftalmologických přípravků na bázi kyseliny hyaluronové [19]. Navrhli rozlišovat rozdíl mezi viskozitou roztoků obsahujícího jak mucin, kyselinu hyaluronovou a jejich směsí. Tento přístup je využíván v této práci.

2.6 Analýza vědeckých publikací

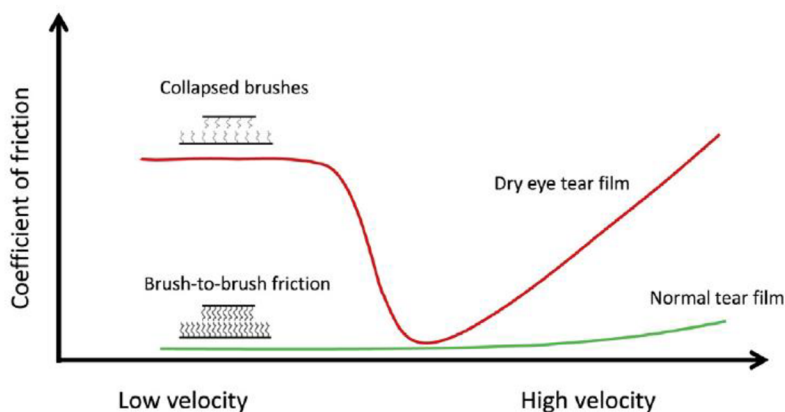
V této kapitole jsou rozebrány vědecké články. V úvodu je detailně popsána tribologie oka důležitá pro pochopení celého problému. Následují reologické, klinické, numerické a experimentální studie zabývající se převážně očními kapkami na bázi kyseliny hyaluronové a měřením součinitele tření u kontaktních čoček či přímo rohovky.

2.6.1 Tribologie oka

Tribologický systém je definován jako dva vzájemně se pohybující členy, jejichž kontaktní plochy jsou mazány z důvodu snížení tření. Pro oko platí, že během procesu mrkání jsou vzájemně působícími členy stěrače očního víčka (horní a dolní) a rohovka. Mazání je zajištěno přítomností slzného filmu. Při použití kontaktních čoček se počet tribologických členů navyšuje o přední a zadní stranu kontaktní čočky. U měkkých kontaktních čoček se navíc k těmto všem členům připojuje ještě část spojivky [20].

Autoři studie [20] tvrdí, že při tribologii mrkání nemůže být brána v potaz klasická Stribeckova křivka. Důvodem je přítomnost glykokalyxu a mucinů tvořících kartáčkové struktury. Hydrofilní kartáčky snižují součinitel tření i v mezním režimu, a to až na úroveň režimu hydrodynamického. Kromě kartáčků je tribologický model oka ovlivněn ještě kontaktním tlakem, rychlostí mrkání, drsností a strukturou povrchu. Dalšími důležitými parametry jsou materiálové charakteristiky jako modul pružnosti E (tkáně a kontaktní čočky) a složení slzného filmu, který má vliv na viskozitu a tloušťku slzného filmu.

U pacientů se syndromem suchého oka se předpokládá, že mucinová vrstva a glykokalyxové kartáčky jsou poničeny, méně zhuštěny, méně hydratovány, v tenčí vrstvě nebo úplně chybí. To vede ke zvýšení součinitele tření během malých rychlostí mrkání. Navíc zvýšenou viskozitou dojde ke zvýšení hydrodynamického tlaku za vyšší rychlosti, jak ukazuje Obr. 2-5.



Obr. 2-5 Stribeckova křivka zobrazující vývoj součinitele tření u zdravých jedinců (zelená křivka) a u pacientů trpících syndromem suchého oka (červená křivka) [20].

Autoři této studie definovali 7 hlavních parametrů ovlivňujících tribologii oka, které budou probrány dále.

1) Viskozita slzného filmu

U tekutin majících newtonské charakteristiky se předpokládá se zvýšením rychlosti přítomnost homogenního mazacího filmu, který má dostatečnou tloušťku, aby odděloval kontaktní dvojici. Pokud toto nastane, tak se součinitel tření stává závislý na viskozitě maziva. Zvýšení rychlosti vede ke zvýšení součinitele tření z důvodu viskozity.

Slzný film má však ne-newtonské charakteristiky a je označován jako shear thinning kapalina. V závislosti na tomto je viskozita slzného filmu nejvyšší při malých rychlostech, což se projevuje během otevřené fáze oka. Při pohybu očního víčka během mrkání se snižuje viskozita, aby se zabránilo poškození očního povrchu.

Pacienti se syndromem suchého oka mají jiné složení a jinou viskozitu slzného filmu. Autoři hlásí viskozitu až 3x větší než u zdravých subjektů. Navíc se u těchto pacientů objevuje větší teplotní nestabilita. Z těchto důvodů může slzný film při nižších teplotách na povrchu oka vykazovat vyšší viskozitu. Ve výsledku se může viskózní kapalinové mazání pravděpodobně zvyšovat až do hodnot vyšších, než je komfortní pro oční povrch.

2) Tlak a modul pružnosti E očního víčka

Zvýšení tlaku je spojeno se zvyšováním tření mezi kontaktní dvojicí. Tlak mazacího filmu v této aplikaci příliš neovlivňuje viskozitu maziva, ale mění tvar povrchu speciálně u materiálů s nízkým E . Tato deformace kontaktních materiálů vede k vytlačení materiálu. Při malém modulu E kontaktní dvojice a s větším poloměrem stěrače víčka se objevuje vyšší mezní mazání a zpožděný nástup plně kapalinového režimu. Autoři předpokládají, že pokud tlak víčka tolik neovlivňuje tření během mrkání, tak modul pružnosti E zcela jistě ano.

3) Geometrie stěrače očního víčka

Rychlý nástup přeměny na plně kapalinový režim může být důležitý s ohledem na vyhnutí se opotřebením během mrkání. Toto může záležet na geometrii stěrače očního víčka. Správná pozice a profil kontaktní dvojice jsou nezbytné při změně z mezního stavu mazání do hydrodynamického stavu mazání a jsou intenzivně řešeny současným výzkumem.

Autoři se dále odkazují na hydrodynamický model Jonese, podle kterého se horní víčko nepatrně odchlípuje od rohovky během procesu mrkání, což následně bylo potvrzeno i dalšími studiemi [21]. Odchlípnutí kontaktní čočky od povrchu bylo pozorováno minimálně v rozmezí 1 μm . Výše uvedené souvisí s geometrií stěrače víčka, kdy je rádius méně zakřivený na začátku mrkání.

4) Rychlost mrkání

Rychlost mrkání je důležitá pro oddělení stěrače očního víčka od kontaktní dvojice a pro produkci hydrodynamického mazacího filmu. Zvýšení rychlosti vede ke změně mezného režimu na plně kapalinový a je možné, že rychlost se liší u symptomatických a asymptomatických pacientů. Další výzkum se zaměřuje na vztah mezi rychlostí mrkání a třením. Autoři současně uvádějí, že není známa rychlost mrkání u pacientů se syndromem suchého oka.

5) Drsnost povrchu a jeho texturování

Obecně platí, že minimální tloušťka mazacího filmu potřebná pro plně kapalinové mazání závisí na drsnosti povrchu a to tak, že mazací film musí být vyšší, než jsou drsnosti povrchů kontaktní dvojice. Současné hodnoty drsnosti povrchu rohovky, spojivky a stěrače očního víčka nejsou známy, nicméně autoři označují jejich drsnost vyšší než $0,7 \mu\text{m}$ za nepravděpodobnou. Navíc přítomnost membránových mucinů (glykokalyx) snižuje drsnost povrchu rohovky a stěrače víčka, což vede k nízkému brush-to-brush tření i za malých rychlostí.

Mikrostruktury jsou ve strojírenství používány pro zlepšení mazání mezi kontaktní dvojicí oddělenou mazivem. V lidském těle jsou rohovka a spojivka pokryty speciálními strukturami nazývanými microvilli a microplicae, které vytvářejí podobný mikro-texturovaný povrch. Povrch obou orgánů je také navíc pokrytý glykokalyxem.

Změna slzného filmu společně se změnou microvilli a microplicae u pacientů se syndromem suchého oka vede ke změně přirozených mikrotextrur a glykokalyxu. Změnou tohoto dochází ke změně tribologického systému spontánního mrkání. Zhroucení kartáčků může vést ke zvýšení tření za malých rychlostí, což může bránit přeměně na hydrodynamický režim mazání.

6) Tloušťka maziva

Tloušťka slzného filmu se liší u pacientů se syndromem suchého oka a zdravých jedinců. Normální tloušťka filmu je $3 \mu\text{m}$, zatímco u pacientů se syndromem suchého oka je to okolo $2 \mu\text{m}$. Tloušťka filmu také značně roste během zavírací fáze mrkání z důvodu malého otvoru mezi víčky. Tloušťka hydrodynamického slzného filmu je v rozmezí $0,1\text{--}2 \mu\text{m}$, v závislosti na drsnosti povrchu. Smíšený režim mazání se může objevit v případě velmi tenkého slzného filmu v kombinaci se zvýšenou drsností povrchu a rozpadlými kartáčky.

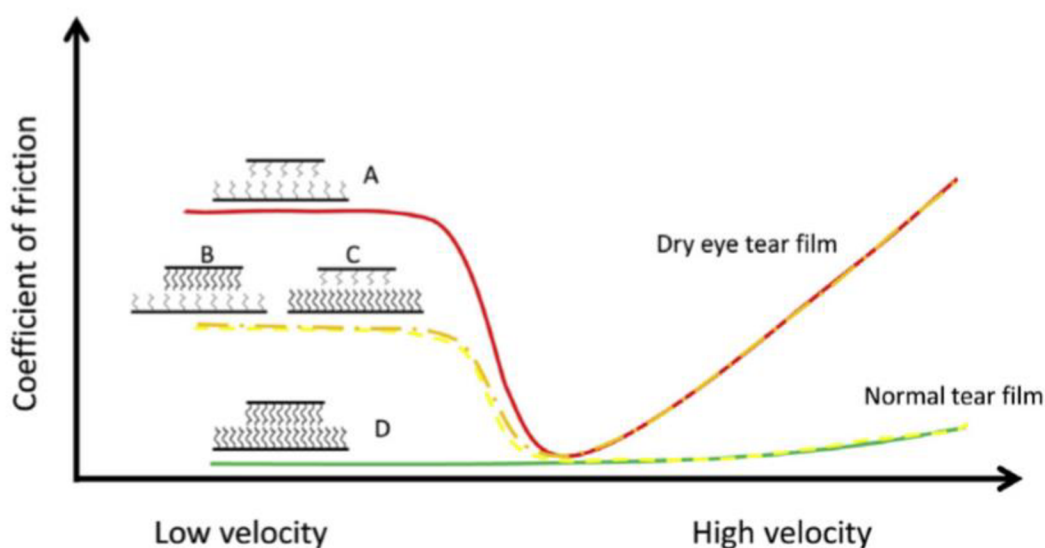
Po mrknutí se centrální slzný film značně ztenčí, zatímco se zvýší jeho tloušťka v slzném rezervoáru slzného vaku. Navíc u pacientů se syndromem suchého oka je narušena stabilita slzného filmu. Pacienti sice mohou mrknout před rozpadem slzného filmu, ale tento slzný film je před dalším cyklem mrkání velmi tenký, a tedy nedostatečný pro oddělení kontaktní dvojice.

7) Kontaktní čočky

Součinitel tření u první generace měkkých silikon-hydrogelových čoček byl značně vyšší než u rohovky. Později byly vyvinuty nové materiály mající menší součinitel tření, který, jak se ukázalo, koreluje s komfortem. Tyto čočky mající nízký součinitel tření obsahují vysoký obsah vody (např. Delafilcon A) nebo obsahují zvlhčující prvky jako polyvinylpyrolidin (PVP) nebo polyvinylalkohol (PVA).

Autoři uvádějí, že součinitel tření (in vitro) během mazání je potenciálně ovlivněn posuvnou rychlostí, normálovou silou a viskozitou roztoku.

Pro zajištění měření brush-to-brush tření materiálu čoček musí být posuvná rychlost při experimentu velmi nízká (0,1 mm/s), jelikož už při rychlosti 0,3 mm/s se povrchové vlastnosti kontaktní dvojice (čočka-stěrač) stávají méně důležité z hlediska tření a opotřebení. Dokonce čočky s malým součinitelem tření vykazují hydrofilní povrchový kartáček, který napodobuje brush-to-brush tření u zdravých jedinců (bez kontaktních čoček). Nicméně u čoček s vyšším součinitelem tření bude jejich povrch ovlivňovat součinitel tření na počátku cyklu mrkání. Součinitel tření bude ještě vyšší u nositelů kontaktních čoček trpících syndromem suchého oka. V takovém případě budou muciny na stěrači víčka záporně nabity a nebude správně vytvořen kartáček na obou površích kontaktní dvojice (čočka-stěrač). To vede ke zvýšení tření za malých rychlostí.



Obr. 2-6 Graf ukazující vliv součinitele tření u uživatelů kontaktních čoček (s malým i vyšším součinitelem tření) a s normálními i zborcenými kartáčky [20].

Vliv součinitele tření u uživatelů kontaktních čoček je popsán na **Obr. 2-6**. Červená křivka (A) ukazuje nejvyšší součinitel tření za malých rychlostí u pacientů se syndromem suchého oka, kteří nosí čočky mající vyšší součinitel tření, Žlutá čárkovaná křivka (B) popisuje zvýšený součinitel tření za malých rychlostí u zdravého slzného filmu a kontaktních čoček majících vyšším součinitelem tření, Oranžová čárkovaná křivka (C) značí zvýšený součinitel tření za malých rychlostí u pacientů se syndromem suchého oka používajících čočky s malým součinitelem tření. Zde vznikají velké smykové síly za zvýšené rychlosti z důvodu vysoké viskozity slzného filmu. Zelená křivka (D) značí nejnižší součinitel tření za malých rychlostí ve zdravém slzném filmu a u osob používajících čočky s malým součinitelem tření. Malé smykové síly za vysoké rychlosti jsou z důvodu malé viskozity a newtonských vlastností slzného filmu.

Tloušťka slzného filmu nacházejícího se před čočkou je 3 μm u jedinců bez syndromu suchého oka. Tato tloušťka slzného filmu je stejná také u osob, které nenosí kontaktní čočky. Z toho důvodu může být uvažován stejný mechanismus vyhodnocení pro obě výše jmenované skupiny.

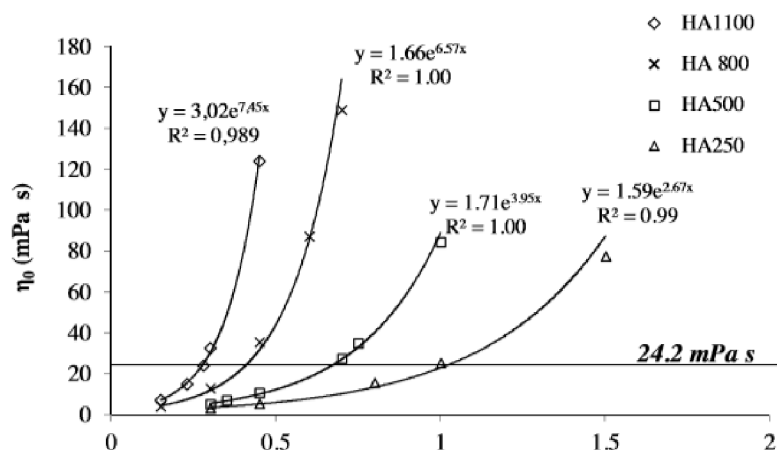
U pacientů se syndromem suchého oka je předpokládáno, že dochází ke zvýšení tření a opotřebení z důvodu chybějících přirozených kartáčků a dalšího ztenčování slzného filmu způsobeného přítomností kontaktní čočky. Pro zamezení tohoto negativního jevu je potřeba vyrobit čočky s obsahem hustě rozmístěných polymerových kartáčků schopných odolávat vysokému kontaktnímu tlaku. Tohoto může být dosaženo použitím ve vodě-rozpustných povrchových kartáčků definovaných jako zvlhčující prvky. Použití takového hydrofilního materiálu může vysvětlovat, proč studie označují míru hydratace jako korelující parametr s komfortem.

2.6.2 Reologie a mukoadhezivita slz

Graca [19] testovala nativní kyseliny hyaluronové o vysoké molekulární hmotnosti (1,8–2,2 MDa) v koncentracích 0,15 a 0,3%. Výzkumníci popisují vlastnosti vysokomolekulové kyseliny hyaluronové jako podobné mucinům, hlavně z hlediska viskoelastivity a biofyzikálních vlastností. To má blahodárné účinky na vznik a dlouhé udržení hydratace a času působení, dosažením vyhovujícího mazání očního povrchu. Nicméně cílem práce bylo studium mukoadhezivitu přípravků očních kapek obsahujících kyselinu hyaluronovou a validovat in vitro metody pro budoucí zkoumání mukoadhezivitu.

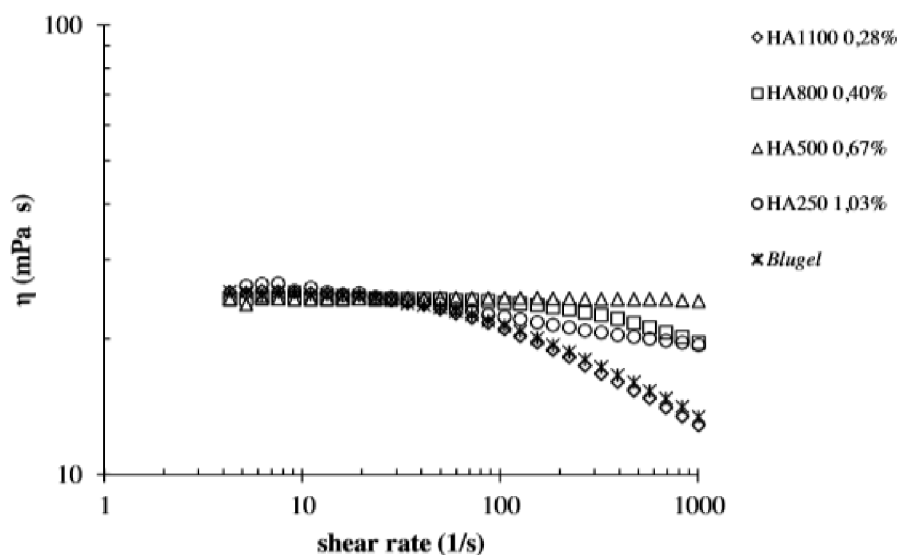
Výsledky mukoadhezivních testů ukazují na interakce mezi kyselinou hyaluronovou a mucinu, a to silnější u vzorku s vyšší koncentrací rozpuštěného polymeru (0,3 %). Zvýšená viskozita po přidání mucinu a neměnná struktura řetězce v průběhu času jsou ukazatele stability spojení kyseliny hyaluronové a mucinu, která zajišťuje delší působení léku na povrchu rohovky a tím účinnější léčbu.

Salzillo [22] ve své práci testovala reologické a hydrodynamické vlastnosti komerčních očních kapek a vzorků s kyselinou hyaluronovou. Pro viskozitní testování byly vybrány vzorky HA1100, HA800, HA500 a HA250 o různých koncentracích. Jak je ukázáno na **Obr. 2-7**, nezávisle na délce řetězce, viskozita exponenciálně rostla s koncentrací. Tento jev byl ještě více patrný s rostoucí molekulovou hmotností vzorku. Toto je v souladu s vysoce viskózními vlastnostmi kyseliny hyaluronové, které jsou hlavně z důvodu složitých fyzikálních vazeb mezi polymerními řetězci, jenž se projevují přítomností dlouhých řetězců a/nebo vyšších koncentrací.



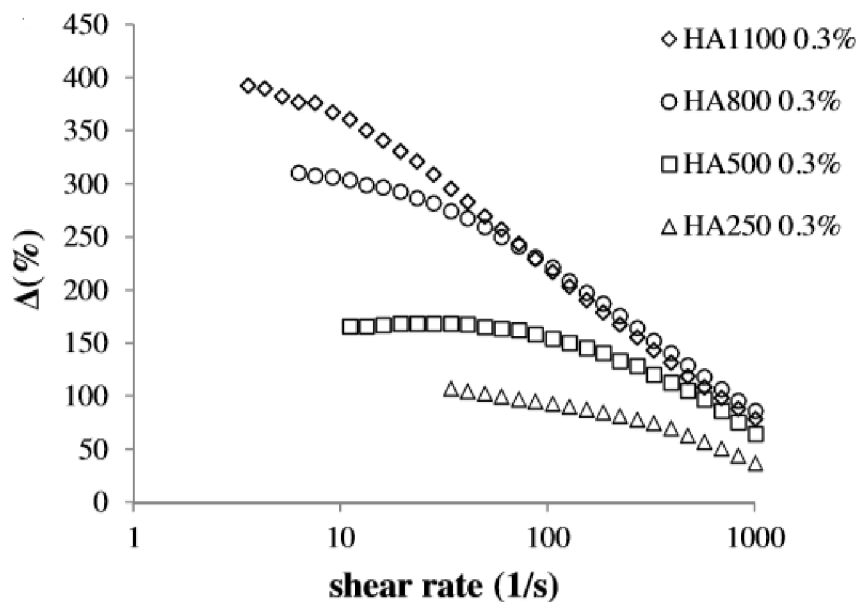
Obr. 2-7 Viskozita v bodě 0 pro jednotlivé vzorky HA v závislosti na jejich MW a koncentraci [22].

Salzillo naměřila viskozitní křivky vybraných přípravků a nejlepšího vzorku na trhu (Blugel) (**Obr. 2-8**) pro lepší porovnání viskozity závislé na smykové rychlosti. Složení HA1100 a Bugelu bylo natolik podobné, že bylo výzkumníky označeno až za ekvivalentní. Z toho důvodu bylo očekávána podobná viskozitní charakteristika. Při zvažování dalších složení je viditelné, že ačkoliv mají stejné hodnoty v bodě 0, chovají se odlišně za vysokých smykových rychlostí. Nicméně čím se snižuje molekulová hmotnost vzorku, tím dochází k menším změnám ve viskozitě v průběhu působení smykových rychlostí. Patrné to může být u HA500, která si udržuje konstantní viskozitu pod různými podmínkami. Proto docházelo k případům, kdy za vysokých smykových rychlostí, byla molekulová hmotnost inverzní viskozitě roztoků.



Obr. 2-8 Viskozitní křivky pro vybrané roztoky HA a kapky Blugel [22].

Za malých smykových rychlostí dosahovala nejvyššího mukoadhezivního indexu HA1100, poté následovala HA800, HA500 a HA250. Pro všechny přípravky platilo, že mukoadhezivita se snižovala se vzrůstající smykovou rychlostí (Obr. 2-9). Čím vyšší byla molekulová hmotnost, tím byl tento jev ztelnější. Výsledkem měření je fakt, že HA1100 je nejvíce mukoadhezivním roztokem až do hodnoty smykové rychlosti 60 s^{-1} , potom se stávají mukoadhezivní indexy podobné.

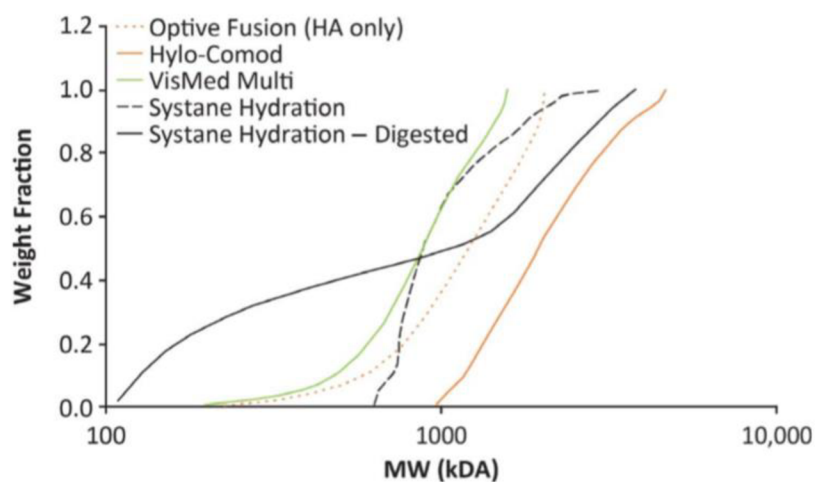


Obr. 2-9 Mukoadhezivní index jako funkce smykové rychlosti u měřených vzorků KH [22].

2.6.3 Klinické studie

Aragona [16] při svých studiích testoval 18 komerčně dostupných kapek. Průměrná molekulová hmotnost a polydispersní index (PDI) jejich polymerů byly měřeny rozptylem světla na chromatografu s vícenásobným rozpadem světla a detektory refrakčního rozpadu.

Vzorky očních kapek byly ředěny v poměru 1:3 (v/v) standardním fosfátovým pufrům filtrovaným 0,45 μm silnou proteinovou membránou a oddělených na velikostně rozlišených sloupcích (300 mm dlouhé, 7,8 mm vnitřní průměr). Referencí pro molekulové hmotnosti a PDI byl albumin z hovězího séra. Šest testovaných produktů (Artelac Rebalance, Blink intensive Tears, Optive Fusion, Systane Hydration, a Thealoz Duo Gel) obsahovaly navíc další polymery a byly analyzovány před a po měření hyaluronidázou za podmínek pro 1 mg kyseliny hyaluronové, 37 °C, 2 hodiny, 60 otáček/min v kombinaci orbitální/lineární vibrace ve vodní lázni pro získání jejich molekulové hmotnosti. Hylo-Parin nevyžadoval proces hyaluronidázy, protože heparinový kopolymer nijak výrazně neovlivňoval molekulovou hmotnost. **Obr. 2-10** ukazuje molekulové hmotnosti podle analýzy hmotnostního zlomku u přípravků obsahujících vysoké (> 1000 kDa), střední (500-1000 kDa) a nízké (<500 kDa) molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové. Společně s analýzou molekulární hmotnosti byla měřena také osmolarita a reologické vlastnosti kapek.



Obr. 2-10 Výsledky analýzy MH u očních kapek na bázi kyseliny hyaluronové [16].

Další klinické studie shrnul ve své práci **Huynh** [15]. První jmenovaná studie [23] se zaměřila na porovnání 0,1 % roztoku KH versus 0,5 % karboxymethylcelulózy (CMC) u pacientů se suchým okem. Celkově se výzkumu zúčastnilo 80 pacientů. Pacienti si aplikovali 1 kapku třikrát denně. Výsledky ukázaly, že vyšší komfort ohlásila kontrolní skupina používající kapky s KH. Pacienti byli kontrolováni po 35 a 84 dnech měřením zákalu na povrchu oka. U obou léčeb došlo ke snížení zákalu na očním povrchu. Po 35 dnech bylo snížení o 47,7 % u KH a o 41,2 % u CMC. Po 84 dnech vyšlo najevo, že KH je efektivnější při snižování oční skvrnitosti (65,4 % redukce vs 56,4 %). Autoři se při hodnocení této studie odkazují na fakt, že KH se přirozeně nachází v slzách a má skvělé zvlhčovací schopnosti a mukoadhezivní vlastnosti. Očekávané nepříznivé účinky KH jsou tedy malé. Studie prokázala, že KH byla dobře hodnocena pacienty a preferována oproti CMC. Vyhodnocení kvality očního povrchu navíc ukázalo pozitivní biologický efekt na rohovku a spojivku, jelikož zde bylo méně skvrn na konci experimentu.

Druhá studie [24] testovala 0,1 % roztok vysokomolekulové KH. Celkově bylo do experimentu zapojeno 70 pacientů vybraných dle kritérií výše. Pacienti byli rozděleni na dvě skupiny, z nichž jedna používala 0,1 % KH a druhá 0,9% solný roztok. Kapky byly užívány 3–4x denně po 1–2 kapkách. Terapie trvala 28 dní. Efektivnost kapek byla následně zjišťována Schirmerovým testem, Rose Bengal testem a dotazníkem preferencí u pacientů. Studie sesbírala subjektivní i objektivní data, nicméně obě skupiny hovořily ve prospěch KH. Schirmerův test ukázal velké rozdíly mezi KH a solným roztokem, kde KH prokazovala vyšší četnost slz oproti kapkám solného roztoku. Rose Bengal test prokázal, že KH má výraznější benefit na povrchu oka. Z hlediska hodnocení pacientů byly KH více preferovány. Úlevu od pálení hlásilo 42 % uživatelů KH oproti 25 % solného roztoku. Při řezání v oku pociťovalo úlevu 49 % uživatelů KH oproti 31 % užívajících solný roztok.

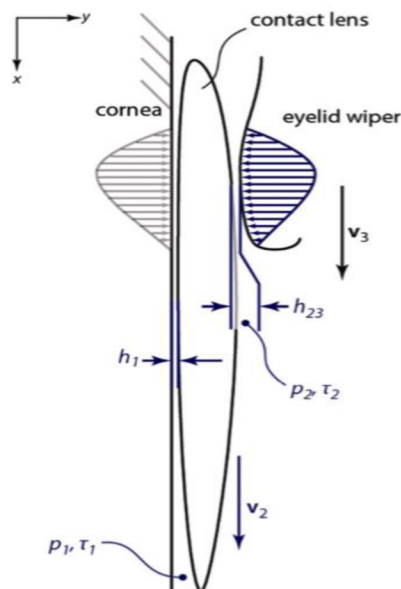
Vznikla hypotéza, že účinnost KH je způsobena její přítomností v slzách a její koncentrace se zvyšuje při poškození očního povrchu a během léčení rohovky. KH může pomáhat při zlepšování stability slzného filmu. Výsledky Schirmerova testu ukazují, že schopnost KH vázat vodu vede ke zvýšení zvlhčování a snižování výparu slz.

Poslední jmenovaná studie [25] testovala rozdílné kapky s KH pro léčbu syndromu suchého oka. Koncentrace kapek byly 0,1, 0,18 a 0,3 % KH a testovány byly na myších. Studie používala podkožní injekce scopolamine hydrobromidu (rostlinný alkaloid) 4x denně a vytvářela suché prostředí pomocí ofuku vzduchem pro navození suchého oka. V této studii bylo 5 testovaných skupin, 1x bez jakýchkoliv kapek, 1x se solným roztokem a poté 0,1%, 0,18% a 0,3% kapky s obsahem KH. Všem subjektům byly podávány 2 μ l očních kapek 4x denně. Primární účinnost byla získána časem rozpadu slz, rohovkovými fluorescein skvrnami, korneální hladkostí a histologickou analýzou různých bodů. Po 28 dnech bylo ukázáno, že rozpad slz byl zlepšen u roztoků 0,18 % KH a 0,3 % KH. Výsledky analýzy pomocí rohovkového fluoresceinu ukázaly na tyto samé roztoky. KH o koncentraci 0,3 % KH byla nejlépe se chovajícím roztokem. Histologická analýza ukázala, že všechny tři koncentrace KH zvyšují počty pohárkových buněk. Studie poukázala na fakt, že 0,3 % KH může být nejvíce efektivní koncentrací pro léčbu syndromu suchého oka. Výsledky také ukázaly na jasné zlepšení stavu při použití 0,3% KH oproti jakýmkoliv jiným koncentracím. Autoři vyslovili hypotézu, že snížená zánětlivost povrchu oka může být spojena se zvýšenou hustotou pohárkových buněk. Nicméně také poukazují na fakt, že experimenty byly provedeny pouze na myších, a proto jsou potřeba další testy.

2.6.4 Numerické studie

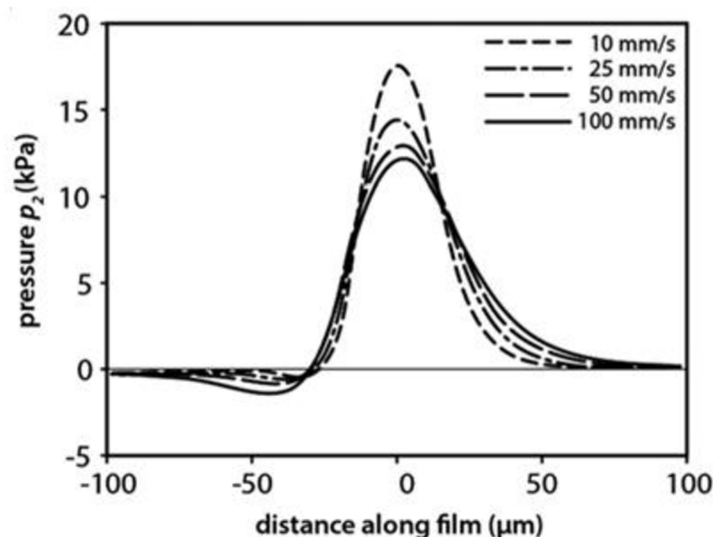
Dunn [21] představila numerickou studii obsahující mazací model kontaktní čočky, rohovky a stěrače očního víčka, který respektuje zákony proudění popsané Reynoldsovým vztahem.

Tento model představuje 3 tělesa ve vzájemném pohybu za přítomnosti vody. Povrchy jsou označeny jako $y = 0$ rohovka (v relativním pohledu jako placatá), $y = h_1$ je konformní zakřivení plochy, $y = h_2$ je přední pohled na zakřivení plochy a $y = h_3$ je stěrač očního víčka (**Obr. 2-11**). Z toho vyplývá, že slzný film na rohovce je h_1 a přední zakřivení (víčko) má tloušťku slzného filmu $h_{23} = h_3 - h_2$. Elastický válec stěrače očního víčka má $E_{34} = 1,25$ MPa a rádius $R_3 = 0,5$ mm. Samotný stěrač se pohybuje rychlostí $v_3 = 10$ mm/s ze souřadnice $x = 0$. Na počátku simulace je čas $t = 0$.



Obr. 2-11 Popis použitých veličin v numerickém modelu [21].

Tyto počáteční podmínky byly vloženy do 1-D Reynoldsovy rovnice, která přiřazuje tlak tekutiny ke stlačené tloušťce slzného filmu pomocí výpočtu Poisselova proudění. Pohyb čočky byl vypočítán integrací rozloženého napětí σ na ploše S , kde směrové vektory normálové a třecí síly byly označeny e_n a e_f . Po ustálení pohybu čočky použili autoři 1-D Reynoldsovu rovnici na základnu rohovky, kde rohovka byla brána jako nehybný povrch mající nulovou rychlost ($v = 0$). Iterace byly vyvolány malými přírůstků času Δt . Počet iterací rostl až po dosažení normálové síly $F_n = 30$ mN. Další simulace byly provedeny za počáteční rychlosti stěrače $v_3 = 25, 50$ a 100 mm/s.



Obr. 2-12 Profily tlaku podél očního víčka pro všechny 4 počáteční rychlosti $v_3 = 10, 25, 50$ a 100 mm/s [21].

Simulace modelu předpověděla, že s rostoucí počáteční rychlostí se sníží maximální tlak mezi stěračem víčka a kontaktní čočkou a tloušťka filmu se naopak zvýší. Navíc, jak se režim posouvá dále ze smíšeného mazacího režimu do plně hydrodynamického režimu, kapalina více odolává zatížení a zvyšuje se její tloušťka z důvodu viskózního stříhu.

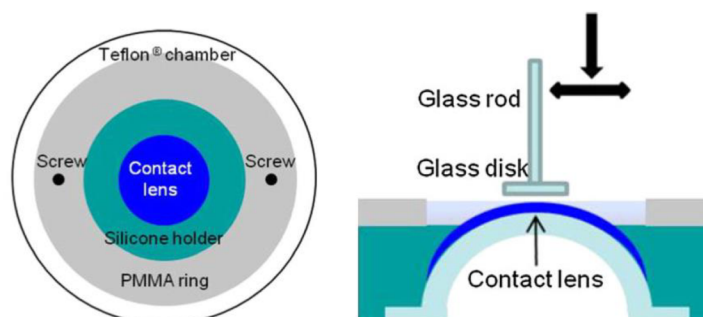
Během simulace byl u nejvyšší posuvné rychlosti při 100 mm/s maximální tlak 12,3 kPa, nicméně při nejnižší rychlosti 10 mm/s vyrostl tlak až na 17,6 kPa (**Obr. 2-12**). Jak se stěrač očního víčka pohyboval směrem dolů dosahoval maximální rychlosti 120 mm/s a směrem nahoru se pohyboval rychlostí 70 mm/s. Z toho vyplynulo, že při pohybu směrem dolů byla při plně hydrodynamickém režimu nejvyšší tloušťka mazacího filmu a to 900 nm. Jak se víčko pohybovalo zpět směrem nahoru, tak se tloušťka měnila na 600 nm.

Tento model tedy ukazuje na současnou existenci dvou tribologických systémů během mrkání oka s kontaktní čočkou. Na přední straně se za vysokých rychlostí objevuje hydrodynamický nebo elastohydrodynamický režim a pod kontaktní čočkou (k rohovce) vzniká mezní stav mazání.

2.6.5 Experimentální studie

Roba [26] jako první upozornila na nutnost zahrnout do měření součinitele tření i fyziologické vlastnosti oka. Domnívala se, že bez simulace biologicky odpovídajícího prostředí nebudou výsledky relevantní. Pro experiment použila komerčně dostupné kontaktní čočky a vytvořila měřicí protokol. Tato práce se stala referenční pro mnoho následujících výzkumů.

Experiment probíhal na mikrotribometru Basalt®. Držák čočky je zobrazen na **Obr. 2-13**. Kontaktní čočka byla umístěna v teflonové součásti na plastovém držáku (cyklo olefin polymer), jehož zakřivení odpovídalo vnitřnímu poloměru kontaktní čočky. Proti posunutí byla čočka jištěna silikonovým držákem z polyvinylsiloxanu a plastovým kroužkem z PMMA (polymethylmethakrylát). Silikonový držák a PMMA jsou spojeny s teflonovou částí dvěma šrouby. Protikus tvořila skleněná tyčinka a disk.

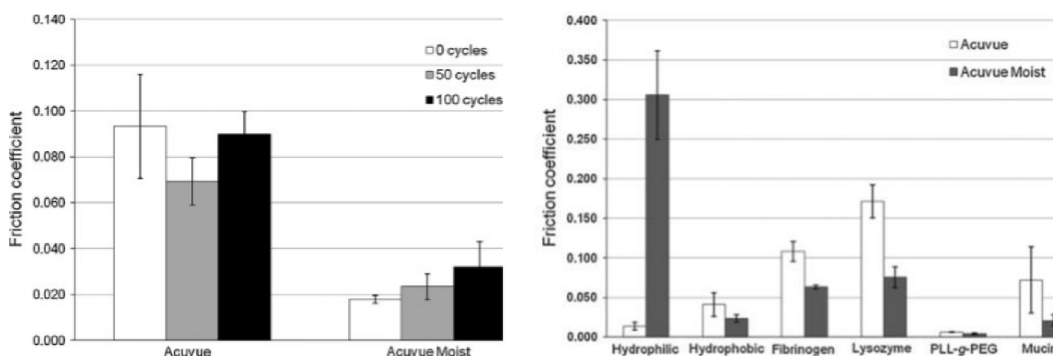


Obr. 2-13 Schématické zobrazení držáku čočky včetně schéma měření [26].

Použité kontaktní čočky ACUVUE® a NIGHT & DAY® se lišily obsahem vody a to 58 % a 24 % v tomto pořadí. Rozdílný byl i modul pružnosti E a to 0,3 MPa u ACUVUE® a 1,5 MPa u NIGHT & DAY®. Těsně před měřením byly kontaktní čočky vyndány z roztoku a upevněny do držáku. Mazivem bylo TLF obsahující fosfátový pufr a lysozomy o koncentraci 5 mg/mL.

Při měření tření byly použity tři sety po 7 normálových silách v rozsahu 0,25–5 mN. Opotřebením čoček bylo simulováno 2x50 cykly se zatížením 2 mN. Posuvná rychlost byla 0,1 mm/s, ale byla naměřena data i při 1 a 10 mm/s. Kontaktní tlak byl vypočítán pomocí Hertzovy teorie a pro použité normálové síly byl v rozpětí 2,6–6,5 kPa.

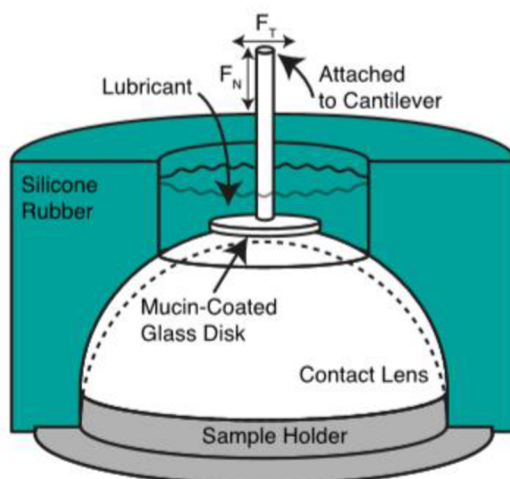
Experiment se zaměřil na tři hlavní oblasti. Zkoumán byl vliv počtu zátěžných cyklů, vliv posuvné rychlosti a volba povlakování u protikusu. Jak je patrné z **Obr. 2-14a**, vyšší počet zátěžných cyklů (simulující stárnutí čočky) nevedl ke zvýšení součinitele tření. Se zvyšující se posuvnou rychlostí rostl součinitel tření u obou typů kontaktních čoček. Pro třetí případ dosáhl nejmenšího součinitele tření skleněný disk pokrytý PLL-g-PEG, zatímco vyšších hodnot tření bylo dosaženo u disků s hydrofilním povlakem a povlakem lysozomů (**Obr. 2-14b**).



Obr. 2-14 Vliv počtu zátěžných cyklů na součinitel tření (a), vliv povrchové úpravy skleněného protikusu na součinitel tření (b) [26].

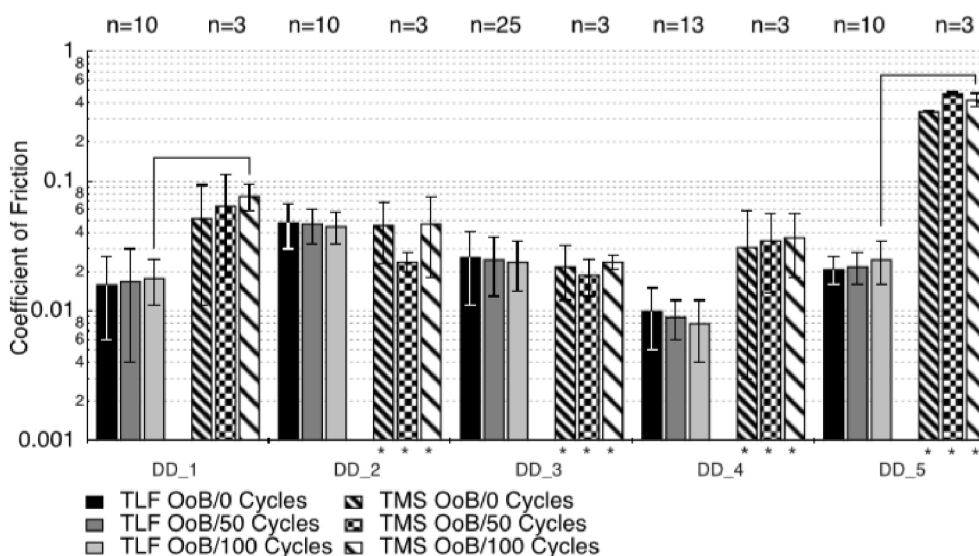
Z výsledků experimentu vyplynulo, že nejlepší kombinace byla získána při posuvné rychlosti 0,1 mm/s, disku pokrytém vrstvou mucinu a mazivem ve formě TLF s obsahem séra a lysozomů. Zároveň bylo obhájeno, že měření bez fyziologicky relevantních vlastností vede k nepřesným výsledkům a stanovené podmínky experimentu se staly referenční pro další výzkumy.

Sterner [27] měřil součinitel tření mezi měkkou kontaktní čočkou a skleněným diskem pokrytým vrstvou mucinů (**Obr. 2-15**). Cílem bylo simulovat proces opotřebení u kontaktních čoček a naměřit součinitel tření před a po procesu stárnutí. Měření probíhalo na mikrotribometru a parametry experimentu bylo zvoleny s odkazem na Robu. Jako mazivo byly použity varianty TMS (tear mimicking solution) a TLF (tear-like fluid). TMS bylo připraveno rozředěním 5 ml séra na 100 ml pomocí pufru a přidáním 500 mg lysozomu. Složení TLF bylo připraveno podle Mirejovského. Držák čočky byl vyroben z cykloolefinového polymeru.

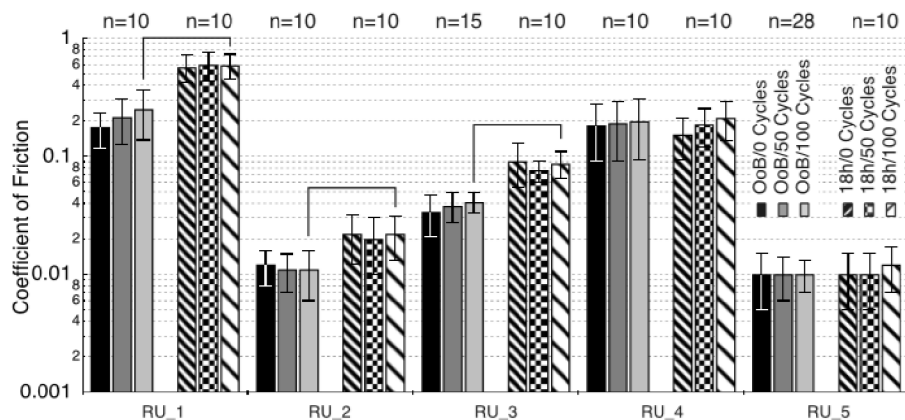


Obr. 2-15 Schéma měření součinitele tření, které použil Sterner a kol.[27].

Byly použity 2 typy čoček RU a DD po 5 druzích od každého typu. Z **Obr. 2-16** a **Obr. 2-17** je patrné, že TLF ve většině případů dosahovala nižších hodnot součinitele tření než TMS. Hodnoty součinitele tření se pohybovaly v rozmezí 0,01–0,18.



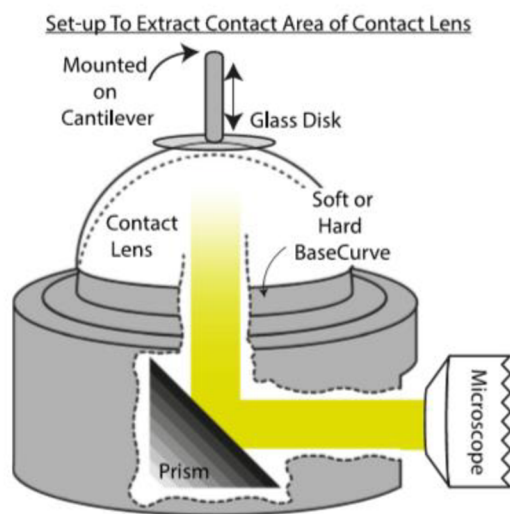
Obr. 2-16 Graf znázorňující vliv TLF a TMS na součinitel tření u zkoumaných čoček při počtu opakování <10 a zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 [27].



Obr. 2-17 Graf znázorňující vliv TLF a TMS na součinitel tření u zkoumaných čoček při počtu opakování >10 a zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 [27].

Výsledky výzkumu ukázaly, že současné materiály kontaktních čoček vykazují vyšší součinitel tření po procesu stárnutí. Bylo zjištěno, že přidáním zvlhčujícího prostředku je možné snížit tření během delšího nošení kontaktních čoček. Zároveň bylo prokázáno, že složení maziva ovlivňuje hodnoty součinitele tření u různých materiálů měkkých kontaktních čoček.

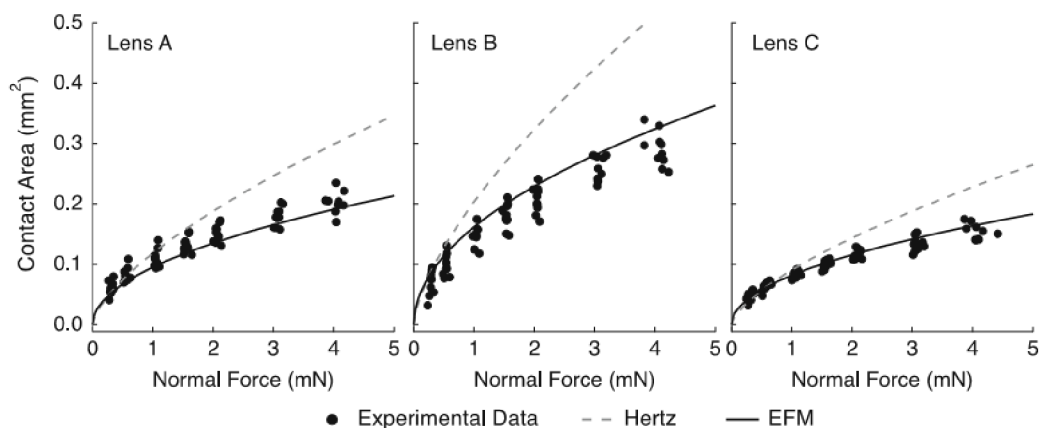
Druhý výzkum vedený **Sternere**m [28] se zaměřil na nelinearitu mezi třecí a normálovou silou u měkkých poddajných materiálů. Použil novou metodiku pro přesnější vyhodnocení založenou na výpočtu průměrné posuvné práce W_{avg} . Průměrná práce vychází z kontaktní plochy, smykového napětí a posuvné vzdálenosti. Funkčnost nové metodiky demonstroval měřeními na 3 typech komerčně dostupných čoček a králičích rohovkách. Parametry experimentu a měřicí zařízení opět vycházely z výzkumu Roby [26]. Jedinou úpravou byla modifikace umožňující pozorování kontaktu pomocí mikroskopu (**Obr. 2-18**). Mazivem bylo tentokrát pouze TLF.



Obr. 2-18 Schématické zobrazení měřicí aparatury jakou použil Sterner [28].

Při experimentu byly použity 3 sety po 7 normálových silách s rozsahem 0,25–4 mN. Normálové síly byly voleny tak, aby odpovídaly kontaktním tlakům vznikajícím během mrkání mezi očním víčkem a rohovkou. Posuvná rychlost činila 0,1 mm/s a byla volena z důvodu zachování mezního mazání a minimalizování efektu viskózního stříhu. Vzorkovací frekvence byla stanovena na 100 bodů/s.

Pro kontaktní plochu byly použity 2 modely, a to Hertzův a EFM. V EFM se oproti Hertzovi objevuje navíc parametr t , tedy tloušťka filmu. Zároveň při EFM vychází závislost plochy na zátěžné síle jen $F_N^{1/2}$ oproti Hertzovi, kde je závislost $F_N^{2/3}$.

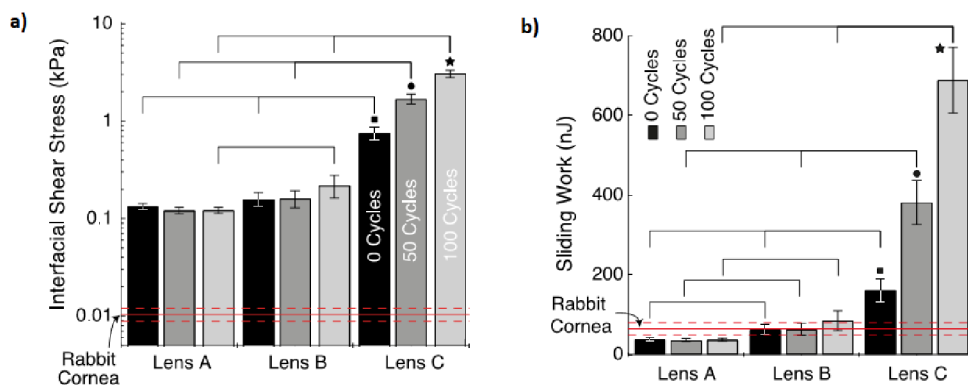


Obr. 2-19 Porovnání mezi modelem EFM (plná čára) a Hertzem (čárkovaná čára) při predikci jak velká bude kontaktní plocha během experimentu [28].

Autoři se ve studii zaměřili na evaluaci tří problémů. Z hlediska závislosti velikosti kontaktní plochy na normálové síly byla u všech typů kontaktních čoček dobrá shoda mezi predikovaným modelem EFM a experimentálními daty (**Obr. 2-19**). Oproti tomu Hertzův model značně překračoval reálnou kontaktní plochu.

Druhým bodem výzkumu bylo měření smykového napětí. Testování bylo prováděno pro všechny 3 typy čoček s počtem cyklů 0, 50 a 100. Z výsledků vyplynulo, že kontaktní čočky C měly značný nárůst smykového napětí po 50 a 100 cyklech. Toto zjištění dle autorů odpovídá realitě, jelikož tento typ čočky měl vyšší součinitel tření za stejných experimentálních podmínek. Zároveň autoři poukazují na případ, že výsledky byly o řád vyšší, než jsou hodnoty smykového napětí pro rohovku (**Obr. 2-20a**).

Posledním bodem výzkumu bylo měření průměrné práce. Průměrná práce byla měřena po 0, 50 a 100 zatěžovacích cyklech. Výsledky (**Obr. 2-20b**) průměrné práce se s počtem cyklů výrazně lišily jen u kontaktní čočky typu C. Zde byl patrný nárůst práce s rostoucím počtem cyklů. Hodnotám naměřeným na rohovce odpovídala pouze čočka B.

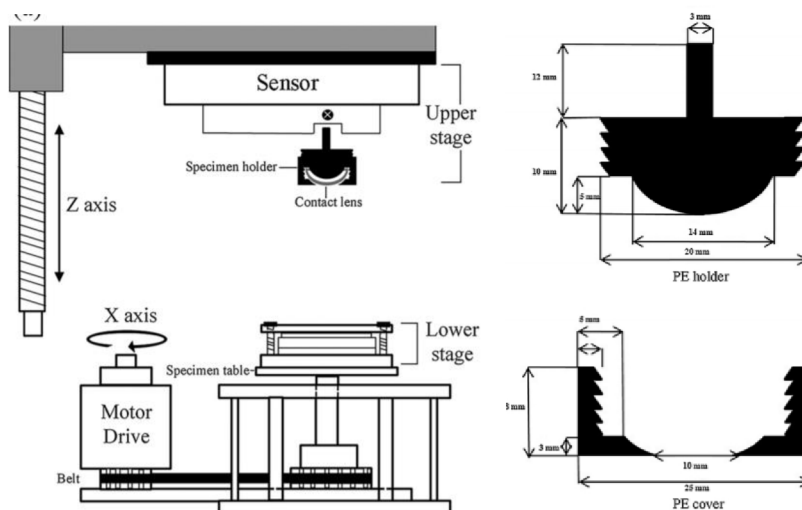


Obr. 2-20 Grafy zobrazující výsledky experimentů při zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 s porovnáním hodnoty naměřené na králičí rohovce; (a) velikost smykového napětí; (b) velikost průměrné práce [28].

Výsledkem výzkumu bylo získání metody pro zjišťování součinitele tření, kde bude zahrnuta nelinearita mezi třecími a normálovými silami u měkkých poddajných materiálů. Touto veličinou se stala průměrná práce. Autoři zároveň prezentovali funkčnost metody měřením 3 druhů kontaktních čoček a králičí rohovky.

Su [11] vyvinul roztok pro kontaktní čočky bez konzervačních látek, který navíc obsahoval látky zlepšující mazání. Další funkcí roztoku měla být schopnost odstranit vysoký obsah lysozomu. Pro experiment byly použity dva druhy kontaktních čoček. První byly čočky ACUVUE® s vyšším obsahem vody (Etafilcon-A) a druhé byly beziontové čočky s nižším obsahem vody (Polymacon). Výsledky měření ukázaly, že vyvinutý roztok může snižovat obsah lysozomu a zároveň zlepšovat mazací vlastnosti.

Chemickou analýzou proteinů dle Bio-Rad DC byly připraveny koncentrace lysozomů do citlivosti 5 $\mu\text{g/ml}$. Celkově bylo připraveno osm různých roztoků s lysozomy o koncentracích 0,05–3,2 mg/ml.



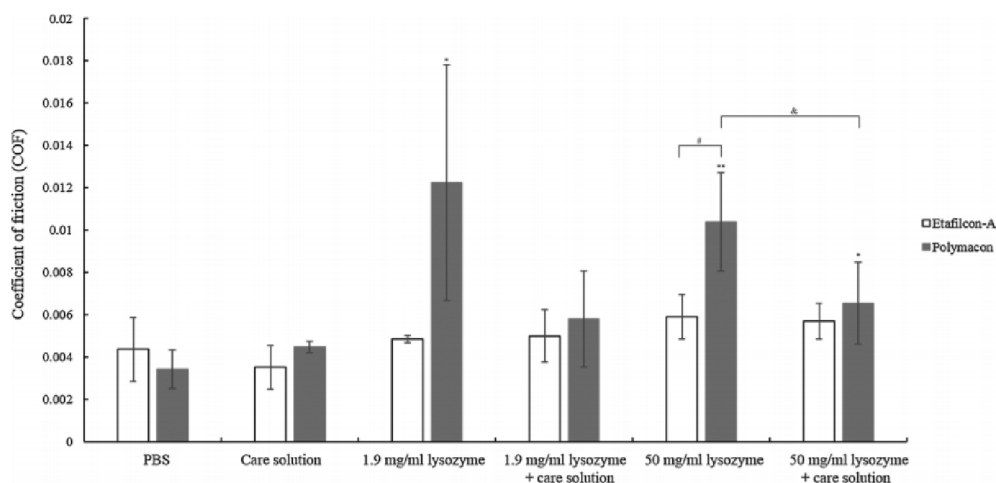
Obr. 2-21 Schématické zobrazení měřicího řetězce (a), polyethylenového držáku čočky (b) [11].

Při studii bylo použito zařízení UMT-2. Vrchní část zařízení obsahovala držák vzorku a byla spojena se senzorem měřícím normálovou a tangeční sílu. Kontaktní čočka byla uložena v držáku vyrobeném z polyethylenu (**Obr. 2-21**) a proti pohybu byla zajištěna dotažením závitem. Spodní část zařízení se skládala z vnějšího a vnitřního nerezového kroužku, PTFE (polytetrafluorethylen) kroužku, křemenného skla a PTFE krytky. Pomocí šesti šroubů byla spodní část připojena na stůl spojený s motorem.

Experiment probíhal usazením očištěné kontaktní čočky do PE držáku. Horní část zařízení se poté začala přibližovat ke křemennému sklu až na vzdálenost 0,2 mm. Po 5 minutách bylo nalito 10 ml PBS nebo zkoumaného roztoku do spodní části zařízení. Horní část se následně přibližovala sklu, dokud nebylo dosaženo požadované normálové síly 60 mN. Křemenné sklo poté rotovalo rychlostí 1 otáčky za minutu po dobu 15 minut. Po ukončení měření se horní část vrátila do původní pozice. Podělením třecí a normálové síly byl získán součinitel tření. Z posledních 600 s byly hodnoty součinitele tření zprůměrovány a porovnány. Celý proces se opakoval čtyřikrát.

Efekt snížení koncentrace lysozomů pomocí vyvinutého roztoku byl pozitivní u obou druhů kontaktních čoček. Používaly se dva druhy koncentrací 1,9 mg/ml a 50 mg/ml do nichž byly čočky ponořeny na 24 h. Následně byly čočky očištěny vyvíjeným roztokem. U vyšší hodnoty koncentrace došlo ke značnému snížení obsahu lysozomů. Ačkoliv byly čočky vyrobeny z různých materiálů hodnoty byly pro oba typy velmi podobné.

Z výsledků měření součinitele tření vyplynulo, že koncentrace lysozomů u čoček typu Etafilcon-A nijak razantně neovlivňuje jejich součinitel tření. Naopak u čoček typu Polymacon byl nárůst součinitele tření znatelný, jak je vidět na **Obr. 2-22**.

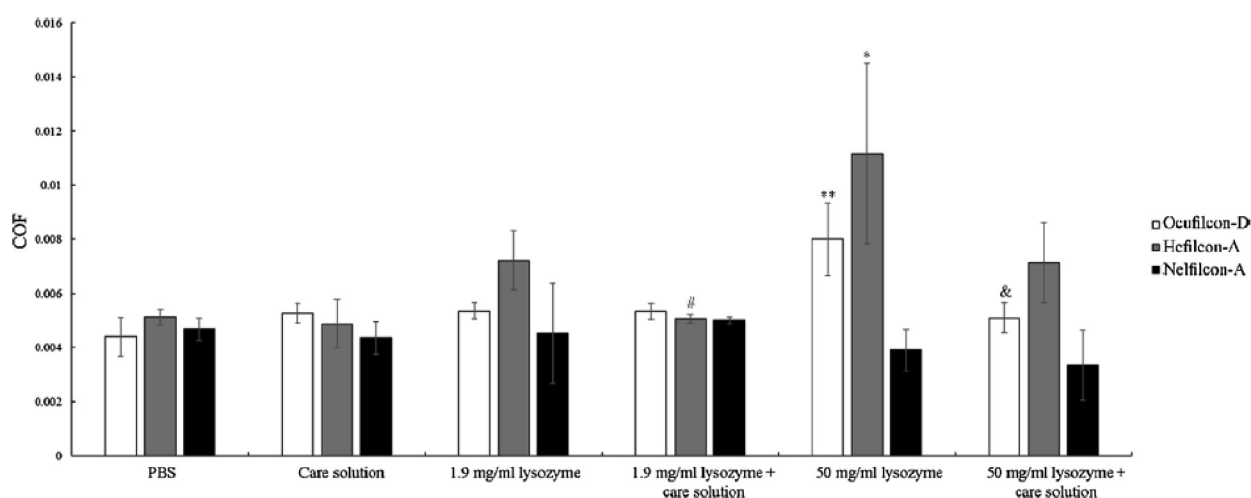


Obr. 2-22 Naměřené součinitele tření u čoček Etafilcon-A a Polymacon s ohledem na použitá maziva [11].

Nárůst součinitele tření u čoček Etafilcon-A byl nepatrný a autoři se domnívají, že byl způsoben z důvodu nekonformní změny lysozomů. Nicméně upozorňují na možnost, že u druhého typu čoček mohlo dojít konformní přeměnou lysozomů naopak ke zvýšení součinitele tření. Přidáním vyvíjeného roztoku mohlo dojít k odstranění lysozomů z povrchu, ale díky konformní fázi lysozomu nedošlo ke změně součinitele tření. Dle autorů není tření ale jediný faktor, který ovlivňuje konformní přeměnu lysozomů. Odkazují se na jiné studie, kde bylo prokázáno, že lysozomy se adsorbují na kontaktní čočce, pokud jsou vystaveny přítomnosti laktoferrinu nebo lipidů. Autoři tedy poukazují na fakt, že v případě měření v prostředí odpovídajícím reálným slzám může být výsledek jejich roztoku jiný než v této studii.

Su [29] se v této druhé studii zabýval závislostí mezi usazováním lysozomu a součinitelem tření na třech různých typech kontaktních čoček. Výsledky studie ukázaly, že každý materiál kontaktních čoček má odlišné třecí charakteristiky v roztoku lysozomů s nebo bez použití čistícího roztoku. Navíc, současná analýza ukázala, že efekt lysozomu na součinitel tření u hydrogelových kontaktních čoček příliš neodpovídal výsledkům usazování lysozomu. Při experimentu byly použity tři druhy hydrogelových kontaktních čoček. Jednalo se o materiály Ocufilecon-D, Hefilcon-A a Nefilcon-A. Použitý roztok odpovídal složením studii od stejných autorů uvedené výše [11] a stejně tak i použité koncentrace 1,9 mg/ml a 50 mg/ml.

Testy probíhaly na zařízení UMT-2 a schéma měření bylo zachováno jako ve studii [11]. Objem maziva 10 ml zůstal zachován a použity byly roztoky PBS, lysozomů, kombinace lysozomů a čistícího roztoku nebo samotný čistící roztok. Podmínky experimentu byly 60 mN zátěžná síla, posuvná rychlost 1,05 mm/s, rychlost rotace 1 otáčka za minutu, poloměr otáčení 10 mm a čas rotace 900 s. Podělením třecí a normálové síly byl získán součinitel tření. Z posledních 600 s byly hodnoty součinitele tření zprůměrovány a porovnány (**Obr. 2-23**). Celý proces měření se opakoval čtyřikrát.

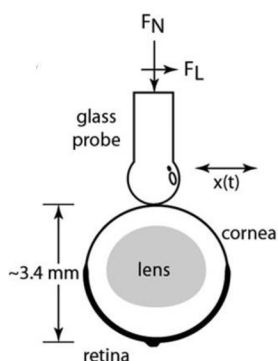


Obr. 2-23 Graf ukazující hodnoty součinitele tření pro různé druhy kontaktních čoček s použitím různých koncentrací roztoků [29].

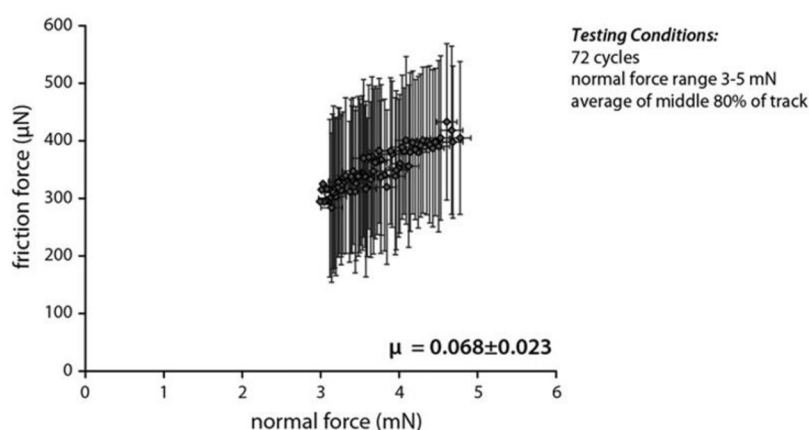
V této studii, kterou vedla **Dunn** [30] byly prováděny experimenty na laboratorních myších typu C57/B6, které se běžně používají jako modelové organismy. Měřil se součinitel tření na povrchu rohovky myši a následně se sledovalo poškození rohovky. Imunitní buňky rohovky byly proto obarveny zeleným fluorescínem (eGFP) pro lepší pozorování.

Experiment probíhal na recipročním mikrotribometru. Měřicí sondou byla neheparizovaná trubička zatavená do podoby 8 mm dlouhé části s koulí na konci o poloměru 0,96 mm (**Obr. 2-24**). Pohyb byl zajištěn piezoelektricky s frekvencí 0,5 Hz a rychlostí posuvu 250 $\mu\text{m/s}$. Aplikovaná normálová síla činila 3–5 mN a kontaktní tlak byl 12 kPa. Deformace způsobená normálovou silou a třením byla měřena kapacitním senzorem. Síly se následně vypočítaly ze známé tuhosti flexur a kalibračních rovnic senzorů. Z důvodu velmi malé frekvence recipročního pohybu nebyly brány v potaz dynamické vlivy.

Výsledkem studie je součinitel tření $\mu=0,068 \pm 0,023$ získaný po 72 cyklech recipročního pohybu. Zatížení normálovou silou proběhlo po přiblížení sondy a poté nastal laterální pohyb. Měření třecí a normálové síly proběhlo se standardní úchylkou (**Obr. 2-25**).

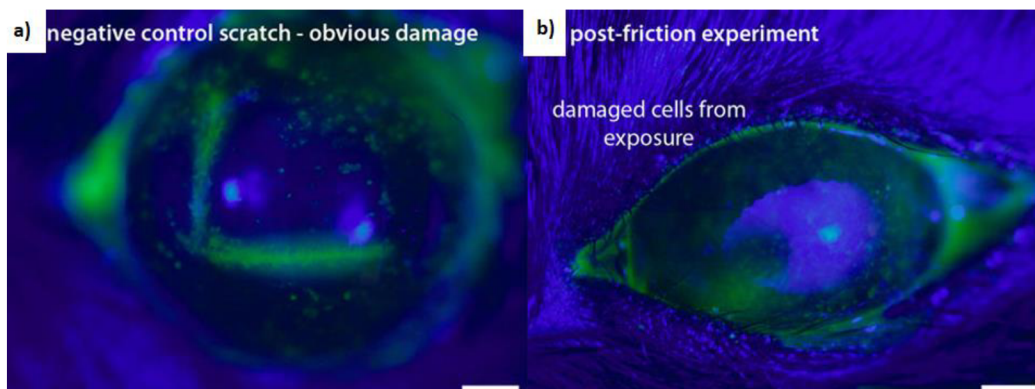


Obr. 2-24 Měřící schéma znázorňující měřící sondu a myši rohovku [30].



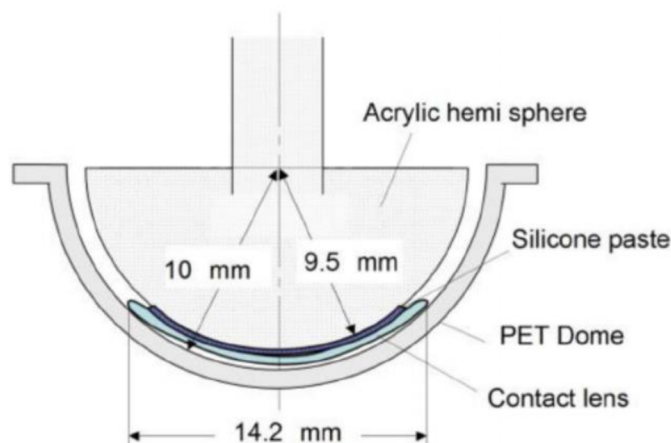
Obr. 2-25 Graf znázorňující naměřené hodnoty součinitele tření po 72 cyklech recipročního pohybu [30].

Autoři provedli negativní kontrolu trhlin pomocí ostrého skla, kterým působili velmi malou silou (1,5 mN) na malou plochu (0,012 mm²) jak je patrné na **Obr. 2-26**. Tlak způsobující poškození rohovky byl velký cca 120kPa, což je oproti tlaku na lidskou rohovku 30x více (1–5 kPa normální tlak). Měření se zatížením 4,5mN nijak nepoškodilo rohovku. Stereoskopické snímky navíc neukázaly žádnou známku mechanického poškození.



Obr. 2-26 Stereometrické snímky ukazující a) rohovku poškozenou negativním testem, b) mechanicky nepoškozenou rohovku po konci experimentu, poškozené buňky vznikly vlivem nedostatečné lubrikace (suchost oka) [30].

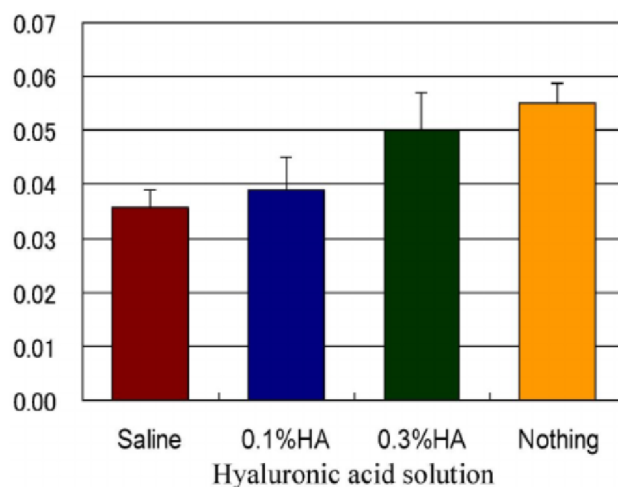
Mabuchi [31] se zaměřil na měření součinitele tření za vyšších posuvných rychlostí. Vyvinul a použil k tomu speciální kyvadlový simulátor Herein, který umožnil vyvinout rychlost až 90 mm/s. Jako mazivo byly použity tři typy očních kapek, konkrétně solný roztok, 0,1 % kyselina hyaluronová a 0,3 % kyseliny hyaluronové. Průměrná molekulová hmotnost udávaná autory pro kyselinu hyaluronovou je 1 MDa. K testování použil kontaktní čočky ACUVUE z materiálu Narafilcon A. Držák vzorků měl vnitřní průměr 9 mm a vnější průměr 14,2 mm. Kontaktní tlak experimentu byl 1,1 kPa. Před samotným experimentem byla kontaktní čočka omyta v solném roztoku pro zbavení nečistot. Poté byla kontaktní čočka zafixována do držáku (**Obr. 2-27**) tvořeného akrylátovou polokoulí a protikusem z PET. Víčko zde bylo simulováno tenkou vrstvou silikonu. Měření probíhalo natažením ramena kyvadla do počáteční polohy $\pi/6$ a následného uvolnění s volným dokyvem do nulové rychlosti.



Obr. 2-27 Obrázek znázorňující řez držákem kontaktní čočky [31].

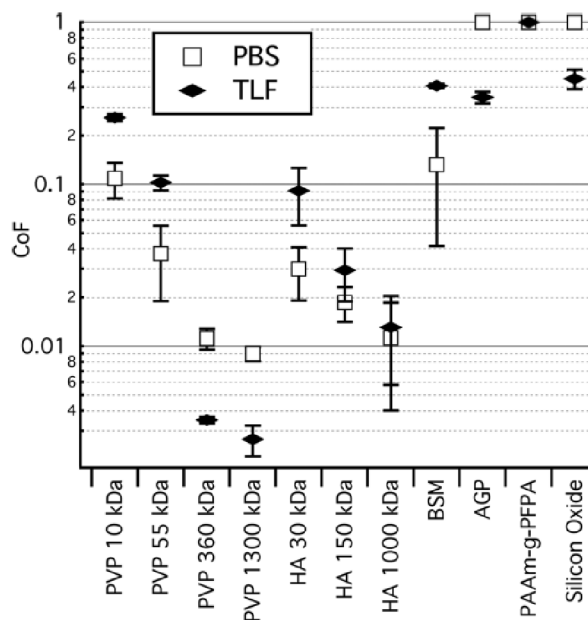
Analýza součinitele tření (**Obr. 2-28**) ukázala, že hodnota součinitele tření rostla s koncentrací kyseliny hyaluronové. Nejmenší součinitel tření 0,036 byl naměřen v solném roztoku. Roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1 a 0,3 % dosáhly hodnoty součinitele tření 0,039 a 0,050. Nejvyšší součinitel tření měl suchý kontakt a to 0,055. Společně se součinitelem tření byla měřena také viskozita. Pro solný roztok, 0,1 % a 0,3 % kyselinu hyaluronovou byla viskozita 0,92 mPa.s, 3,13 mPa.s a 27,66 mPa.s v uvedeném pořadí. Propojení reologie a tribologie ukázalo, že vyšší viskozita kyseliny hyaluronové měla tendenci zvyšovat součinitel tření.

Autoři vyzdvihují, že měření pomocí kyvadlového simulátoru umožnilo dosáhnout poměrně vysokých hodnot posuvné rychlosti a zároveň sinusový cyklus útlumu dobře simuloval režim mrkání. Zároveň ale upozorňují na fakt, že pro dosažení fyziologických rychlostí mrkání je tato rychlost stále nedostatečná a v tomto případě limitována použitým zařízením. Oproti ostatním článkům zabývajících se tímto tématem se ale stále jedná o značné navýšení v hodnotě posuvné rychlosti.



Obr. 2-28 Graf znázorňující výsledné hodnoty součinitele tření pro jednotlivá maziva [31].

Tým pod vedením **Sternera** [32] se ve své práci zaměřil na porovnání kyseliny hyaluronové a polyvinylpyrrolidinu (PVP) z hlediska součinitele tření. Pro imitaci fyziologických podmínek použil dva modely na bázi glykoproteinů. Rozpouštědly bylo PBS a TLF (tear-like-fluid). Kontaktní dvojice byla tvořena PDMS pinem a plátem s nanosenou vrstvou lysozomů jak promotorů adheze. Celkově byly testovány 4 molekulové hmotnosti PVP (10, 55, 360 a 1300 kDa) a 3 molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové (30, 150 a 1000 kDa).



Obr. 2-29 Hodnoty součinitele tření pro PVP a KH v prostředí TLF a PBS [32].

Na základě výsledků se PVP i kyseliny hyaluronové ukázaly jako dobrá maziva v mezném režimu mazání. Součinitel tření se měnil v závislosti na molekulové hmotnosti. Snižoval se s molekulovou hmotností a silnějším mazacím filmem, který odpovídal vyšší molekulové hmotnosti. Glykoproteiny použité ve studii vykazovaly pozitivní interakce pouze za specifických podmínek na hydrofobních površích.

Při porovnání polymerů PVP a kyseliny hyaluronové měl nižší součinitel tření PVP (**Obr. 2-29**). Dosažená hodnota součinitele tření u modelu s glykoproteiny byl 0,03–0,04. U obou testovaných polymerů autoři naměřili součinitel tření v případě adsorbovaných vzorků $<0,01$ a v případě vysokomolekulové PVP bylo dokonce v konfiguraci s pinem namáčeným do BSM dosaženo součinitele tření 0,005.

3 ANALÝZA PROBLÉMU A CÍL PRÁCE

3.1 Analýza problému

Syndrom suchého oka patří mezi nejčastější oční onemocnění současné doby. S ním je spojené poškození či nedostatečná tvorba slzného filmu. Slzný film je přírodní mazivo nutné pro správnou funkci mrkání a také vyživuje a chrání oční povrch. V případě, že je slzný film poškozen či chybí některá jeho složka dochází ke zdravotním potížím, které při neléčení vedou až k nevratným změnám v oku a poškození vidění.

Řešením je aplikace umělých slz, které nahrazují přírodní slzný film. Umělé slzy také hydratují oční povrch, zlepšují mazání mezi víčkem a okem a zvyšují stabilitu samotného slzného filmu. Jejich výhodou je jednoduchá aplikace a variabilita složení. Mohou nahrazovat jednu chybějící složku slzného filmu, či jeho všechny tři složky. Potřebných fyzikálněchemických a viskoelastických vlastností roztoků umělých očních kapek je dosaženo pomocí specifických polymerů. Mezi aplikované polymery patří methylcelulóza a její deriváty, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a také kyselina hyaluronová [3], která je předmětem této práce. Kyselina hyaluronová je přirozená lidskému tělu, jelikož je obsažena např. v očním sklivci, kloubní chrupavce, synoviální kapalině a kůži. Právě díky svým výjimečným biokompatibilním a léčivým vlastnostem je ideální surovinou pro umělé slzy. Chemickými úpravami nativní kyseliny hyaluronové je možné vytvářet její deriváty, které mají slibný potenciál v amplifikaci jejích reologických vlastností a léčebných účinků. Tímto se zabývá společnost Contipro, která vyvíjí své vlastní deriváty kyseliny hyaluronové. Vývoj umělých slz závisí také na výzkumu v oblasti aplikované biotribologie, jehož cílem je pomocí experimentálních měření součinitele tření a viskozity stanovit ideální složení umělého slzného filmu. Touto problematikou se zabývá i tato diplomová práce, která je řešena v rámci projektu TAČR TREND a ve spolupráci s biotechnologickou společností Contipro a.s.

Měření součinitele tření je možné provádět v různých konfiguracích a použít různé druhy tribometrů. Neméně důležitá je také volba správné tribologické soustavy. V poslední době, také roste oblíbenost kontaktních čoček a je důležité tento člen zahrnout do tribologických měření. Komfort uživatelů kontaktních čoček je ovlivněn právě velikostí součinitele tření. Všechny tyto podmínky vychází z vědeckých článků, numerických a tribologických modelů [21]. Z numerických modelů také vyplývá, že při použití kontaktní čočky se v oblasti před a za čočkou nachází rozdílné režimy mazání. Pro vyhodnocení součinitele tření bude potřeba vytvořit tribologický model oka, který bude simulovat podmínky mrkání. Z toho důvodu je třeba stanovit v jaké oblasti budou experimenty probíhat, stanovit jejich podmínky a vybrat metodiku, která bude nejlepší pro vyhodnocení roztoků očních kapek, nativních kyselin hyaluronových a vyvíjených derivátů.

3.2 Analýza a zhodnocení rešerše

Z rešerše je patrné, že syndrom suchého oka je multifaktoriální onemocnění moderní doby, které je potřeba neprodleně řešit, jelikož počet pacientů se bude stále zvyšovat. I přes velké finanční investice do výzkumu stále neexistuje lék na úplně vyléčení. Dostupné jsou ale léky ve formě umělých slz, které pomáhají projevy zmírňovat [2, 8, 14].

Kritickým faktorem je slzný film nacházející se na povrchu oka. V případě poškození tohoto velmi tenkého filmu dochází k mnoha komplikacím, které mohou vést až ke zhoršení či ztrátě vidění. Autoři studie [20] definovali 7 základních parametrů, které mohou ovlivňovat kvalitu a kvantitu slzného filmu. Jedním z těchto parametrů jsou kontaktní čočky, které mají značný dopad na syndrom suchého oka. Kontaktní čočky jsou poměrně novou metodou korekce zraku, která si rychle získala oblibu. Nicméně se s ní pojí značné problémy, související s materiály kontaktních čoček a rozdělením už tak tenkého slzného filmu kontaktní čočkou na dvě části, na což upozornila celá řada studií [14, 26, 27].

Studie zabývající se reologií slz a kyseliny hyaluronové sledovaly vývoj viskozity vzorků v závislosti na smykové rychlosti a jejich mukoadhezivní index [19, 22]. Nativní slzy jsou definovány jako ne-newtonské kapaliny. Studie Tiffanyho [10] změřila viskozitu nativních slz v rozmezí 65–10 mPa.s a tyto hodnoty lze brát jako referenční. Mukoadheze je důležitá z důvodu výskytu glykokalyxu na povrchu oka. Muciny glykokalyxu se chemickými vazbami spojují s mukoadhezivními polymery a umožňují tak přenos léčivé látky difúzí do rohovky [9]. Míru této interakce udává mukoadhezivní index. Ne všechny polymery ale projevují pozitivní interakce s muciny. Studie zkoumající mukoadhezivitu ukázaly, že v případě mukoadhezivního polymeru roste mukoadhezivní index s koncentrací a s molekulovou hmotností daného polymeru [9, 22].

Komerční oční kapky fungují jako umělý slzný film, jelikož nahrazují reálné slzy. Hlavní účinnou látkou jsou polymery. Klinické studie ukázaly, že komerční oční kapky obsahující kyselinu hyaluronovou jsou účinné při potlačování projevů syndromu suchého oka [15]. Kyselina hyaluronová posiluje proces hojení epitelu rohovky, zlepšuje mazání očního povrchu váže vodu a chrání pohárkové buňky, které sekretují muciny [15]. Oční kapky se liší typem polymeru, jeho koncentrací (0,1–0,5 %) a molekulovou hmotností (přibližně 100–2000 kDa). Všechny tyto parametry ovlivňují viskozitu roztoků, ale také jejich klinickou účinnost.

Dalším důležitým faktorem, který vyplynul z rešerše, je proces mrkání. Během mrkání se odehrává celá řada mechanismů, a to ve velmi krátkém čase. Rychlost mrkání je udávána v rozmezí 0–300 mm/s [20, 21]. U pacientů se syndromem suchého oka není rychlost mrkání známa [20]. Na numerické modely mrkání se zaměřila studie [21], která více přiblížila mechanismus a průběh samotného mrkání.

I v rámci tribologie jsou důležité biomembránové kartáčky z glykokalyxu. Při jejich poškození dochází ke zpožděnému nástupu hydrodynamického režimu mazání. V rámci tribologických modelů jsou nahrazovány muciny nebo lysozomy.

Pro měření součinitele tření byla zásadní studie Roby [26], která se stala referenční pro mnoho dalších studií [27, 28]. Zapojení fyziologických podmínek přiblížilo experimenty více reálným podmínkám v oku. Parametry experimentů ze studií ukazují velmi malá zatížení (jednotky až desítky mN), velkých rozsah posuvných rychlostí (0,1–90 mm/s) a velmi malé kontaktní tlaky (2–8 kPa). Studie zaměřené na měření součinitele tření kyseliny hyaluronové [32] probíhaly zpravidla na mikrotribometrech, které umožňují dosáhnout fyziologického kontaktního tlak, ale jsou limitovány v maximální posuvné rychlosti. Z rešerše vyplynulo, že se žádná studie nezabývala vlivem vyšších posuvných rychlostí, které odpovídají fyziologickému mrkání. Jedinou studií, která se blížila byla studie Mabuchiho [31], která ale dosáhla pouze rychlosti 90 mm/s. Výsledný součinitel tření je dle vědeckých publikací v řádu tisícín až setin [11, 29].

Dalším důležitým aspektem je také mazivo. V biotribologických měřeních oka se používají speciálně připravované roztoky napodobující reálné slzy (TLF a TMS) [27, 28], roztoky obsahující různé koncentrace proteinů, lipidů a dalších látek přítomných v slzném filmu [29] nebo komerčně dostupné či vlastní roztoky očních kapek [11]. Testovány byly také roztoky kyseliny hyaluronové, které se liší koncentrací a molekulovou hmotností polymeru [31, 32].

3.3 Cíl práce

Hlavním cílem je experimentální popis vývoje viskozity a součinitele tření umělého slzného filmu. Práce bude zaměřena především na kvantifikaci účinku nativní kyseliny hyaluronové, jejího derivátu a komerčních očních kapek na součinitel tření a viskozitu. Konkrétně bude sledován vliv molekulové hmotnosti, u které je předpoklad, že bude mít zásadní vliv jak na reologii, tak tribologii měřených vzorků.

Dílčí cíle diplomové práce:

- provést kritickou rešerši aktuálních vědeckých publikací,
- navrhnout tribologický model simulující kontakt oka a víčka včetně úpravy simulátoru a návrhu podmínek experimentů pro analýzy součinitele tření,
- navrhnout metodiku vyhodnocení jak pro součinitel tření, tak pro viskozitu,
- experimentálně popsat vývoj viskozity a součinitele tření komerčně dostupných očních kapek,
- posoudit účinnost nativních kyselin hyaluronových, derivátu a komerčních očních kapek na základě experimentálních výsledků,
- konfrontovat získané poznatky s dosud publikovanými studiemi zabývajícími se vývojem a tribologií umělých slz.

3.4 Vědecká otázka a hypotéza

3.4.1 Vědecké otázky

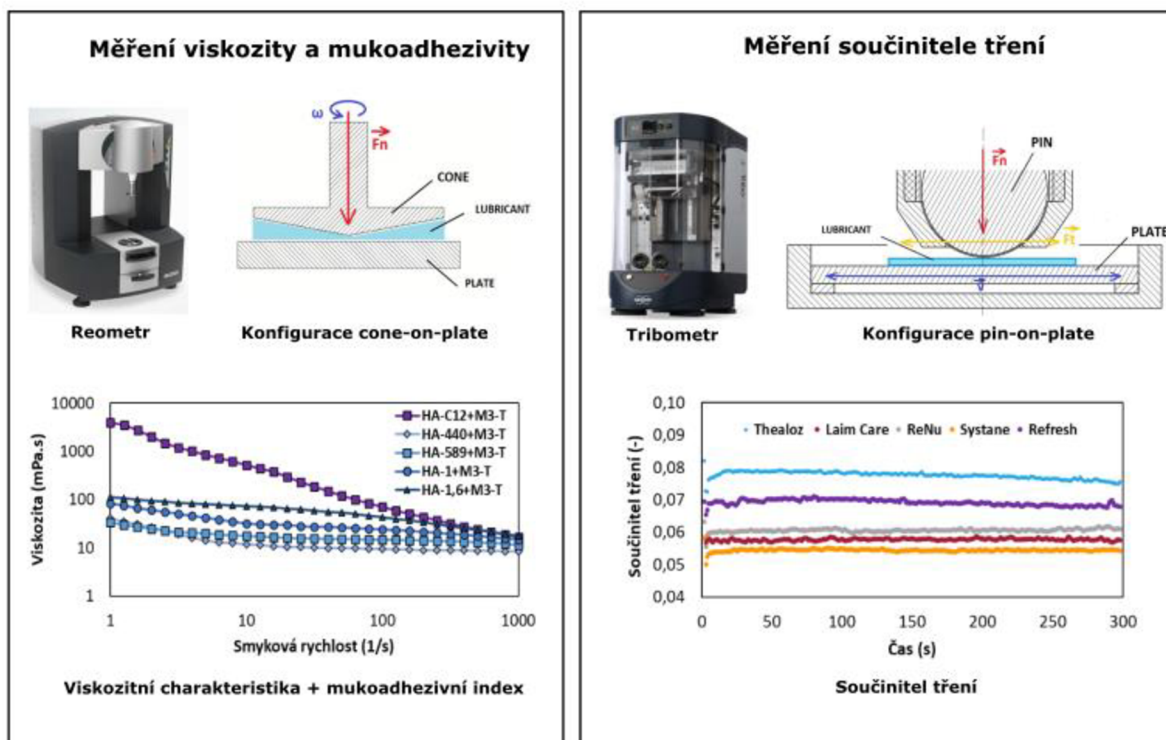
- 1) Jaký bude vliv molekulové hmotnosti vyvíjeného derivátu kyseliny hyaluronové na jeho viskozitní charakteristiku? Bude derivát viskozitně odpovídat nativním kyselinám hyaluronovým podobné molekulové hmotnosti nebo bude jeho viskozitní charakteristika odpovídat vzorkům s vyšší molekulovou hmotností?
- 2) Jak bude molekulová hmotnost nativních kyselin hyaluronových a vyvíjeného derivátu ovlivňovat součinitel tření?

3.4.2 Hypotézy

- 1) Na základě reologických studií [19] vyplývá, že viskozita nativních kyselin hyaluronových roste s rostoucí molekulovou hmotností. Derivát kyseliny hyaluronové již není čistá kyselina hyaluronová, ale je chemicky modifikovaný. Vzhledem k příměsím použitým při výrobě derivátu (např. kyselině laurové) bude jeho viskozitní charakteristika pravděpodobně posunuta směrem k chování vzorků s vyšší molekulovou hmotností. Předpokladem je, že viskozitní chování derivátu bude odpovídat vzorku s molekulovou hmotností 1,6 MDa, a případně ho i překoná.
- 2) Jak bylo zmíněno v předešlé hypotéze, viskozita nativních kyselin hyaluronových roste s jejich molekulovou hmotností. Rostoucí viskozita může ovlivňovat tribologická měření, kdy vlivem zvyšující se viskozity může docházet k nárůstu vnitřních smykových sil roztoku, čímž dojde ke zvýšení součinitele tření. Předpokladem tedy je, že součinitel tření poroste s rostoucí molekulovou hmotností vzorků kyseliny hyaluronové.

4 MATERIÁL A METODY

Schéma experimentů



Obr. 4-1 Schéma experimentů diplomové práce.

4.1 Použitá experimentální zařízení

4.1.1 Kinexus Pro+

Měření viskozity probíhalo na rotačním reometru Kinexus Pro+ od firmy Netzsch (**Obr. 4-2**). Reometr se skládá ze dvou hlavních částí - pohyblivé části (rotoru) a statické části mezi kterými je umístěn měřený vzorek [33]. K reometru dodává firma speciální software rSpace, který poskytuje vše potřebné pro vyhodnocení a práci s daty.



Obr. 4-2 Reometr Kinexus Pro+ [33].

4.1.2 Bruker UMT TriboLab

Bruker UMT (Universal Mechanical Tester) (**Obr. 4-3**) je jeden z nejrozšířenějších tribometrů na trhu od roku 2000. UMT TriboLab je další generací tohoto tribometru nabízející větší všestrannost a modularitu. Bruker UMT TriboLab umožňuje pracovat za rychlostí od 0 po 5000 otáček/min a také za vysokých kroutivých momentů [34]. Existuje možnost instalace teplotních a vlhkostních komor. Pro naše experimenty je důležitý reciproční pohon, který umožňuje testování v konfiguraci pin-on-plate za rychlostí až 60 Hz s posuvem v rozmezí 0,1–25 mm.



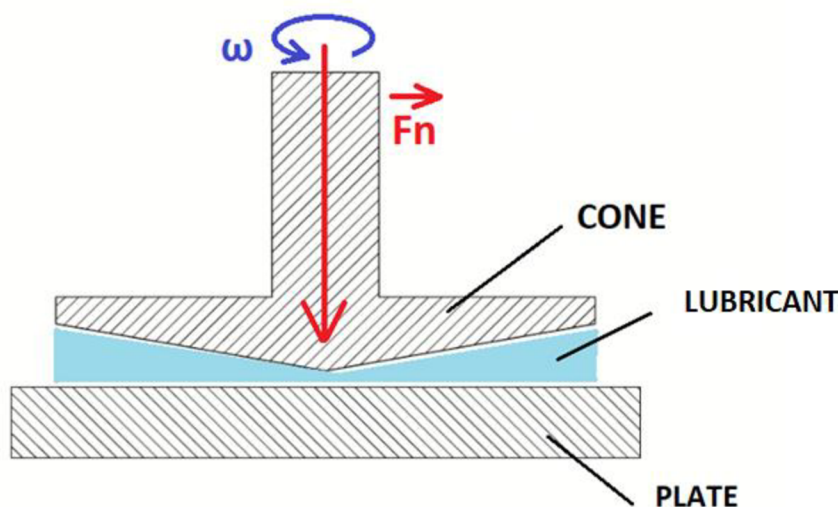
Obr. 4-3 Bruker UMT TriboLab [34].

4.2 Reologie

První část diplomové práce se zabývá reologií roztoků kyseliny hyaluronové a komerčních očních kapek. Reologické vlastnosti jsou klíčovými parametry charakterizujícím roztoky z hlediska fyzikálního. Cílem této části diplomové práce bylo charakterizovat roztoky z hlediska jejich viskozitních charakteristik, porovnat je mezi sebou a určit účinnost derivátu. Zároveň na základě výsledků této fáze proběhla selekce vzorků pro tribologickou část diplomové práce.

4.2.1 Parametry reologických experimentů

Měření viskozity probíhalo na reometru Kinexus Pro+ uvedeném v kapitole 4-1. Následná mukoadhezivita byla vypočítána na základě naměřené viskozitní charakteristiky vzorků. Při měření viskozity byl do horní části zařízení vložen kuželový nástavec CP/60 L0881 SS a do spodní části byl na spodní geometrii (disk) vložen měřený vzorek. Následně byl kuželový nástavec spuštěn směrem k disku (**Obr. 4-4**). Otáčením kuželu (cone) proti disku určitou silou byla získána viskozitní charakteristika měřeného vzorku. Celkově bylo měřeno 68 bodů viskozity v rozsahu smykové rychlosti 0–5000 s⁻¹.



Obr. 4-4 Konfigurace cone-on-plate.

Konkrétní podmínky reologických experimentů jsou uvedeny v **Tab. 4-1** níže. Uvedené hodnoty platily pro všechny testované roztoky.

Tab. 4-1 Parametry reologických experimentů.

Podmínky experimentů	
Měřený objem	1 ml
Smyková rychlost	0–5000 s ⁻¹
Teplota	37 a 25 °C
Počet opakování	3

4.2.2 První fáze – Měření viskozitních charakteristik vzorků

Jedná se o úvodní fázi, jejímž cílem bylo experimentální naměření viskozitních charakteristik jednotlivých vzorků. Měření probíhala podle metodiky uvedené výše v kapitole 4-2 a respektovala parametry uvedené v **Tab. 4-1** výše. Celkově byla tato fáze ze všech časově nejnáročnější, jelikož zde proběhlo měření všech vzorků uvedených v **Tab. 4-5**. Zjišťovány byly viskozitní charakteristiky jak komerčních očních kapek, tak nativních kyselin hyaluronových, ale také vyvíjeného derivátu. Vzorky se od sebe navíc lišily použitým pufrům a mucinem a měření probíhala za dvou teplot.

Výsledkem této fáze jsou naměřené viskozitní charakteristiky vzorků, které byly následně analyzovány a porovnávány. Jako jedna z metod pro porovnání se používal následující vztah (1). Ten vychází ze vztahu uvedeném ve studii [9] a jedná se o poměr mezi dynamickou viskozitou za malých smykových rychlostí (otevřené oko) a dynamickou viskozitou za vysokých smykových rychlostí. Tato metoda se používala u komerčních očních kapek.

$$Q = \frac{\eta_1}{\eta_{1000}} \quad (1)$$

kde:

η_1	[Pa.s]	dynamická viskozita za smykové rychlosti 1 s ⁻¹
η_{1000}	[Pa.s]	dynamická viskozita za smykové rychlosti 1000 s ⁻¹
Q	[-]	koeficient viskoelasticity

Další metodou hodnocení viskozitních charakteristik bylo porovnání viskozity s hodnotami reálných slz, které stanovil ve své studii Tiffany [10]. Referenčními byly hodnoty 65 mPa.s. a 10 mPa.s odpovídající reálným slzám. Tato metoda se používala jak pro komerční oční kapky, tak pro kyseliny hyaluronové a derivát.

Na základě výsledků z této fáze bylo dále možné stanovit mukoadhezivní index a diskutovat rozdíly mezi jednotlivými látkami.

4.2.3 Druhá fáze – Výpočet mukoadhezivního indexu

Druhou fází bylo numerické vyhodnocení mukoadhezivního indexu. Po naměření viskozitní charakteristiky byly získány hodnoty dynamických viskozit jednotlivých vzorků. Následně bylo potřeba zjistit mukoadhezivitu testovaných vzorků. Ta byla získána výpočtem ze vztahu (2), který vychází ze studie Gracy [19].

$$\Delta[\%] = \frac{[\eta_{muc+KH} - (\eta_{muc} + \eta_{KH})]}{(\eta_{muc} + \eta_{KH})} \times 100 \quad (2)$$

kde:

η_{muc+KH}	[Pa.s]	dynamická viskozita vzorku mucinu, pufru a KH
η_{muc}	[Pa.s]	dynamická viskozita vzorku mucinu a pufru
η_{KH}	[Pa.s]	dynamická viskozita vzorku KH a pufru
Δ	[%]	mukoadhezivní index

Vzorky s mucinem zde imitují chování vzorku po aplikaci na oční povrch a jsou porovnávány s hodnotou viskozity bez mucinu. Výsledkem je číslo v procentech, které udává zvýšení viskozity po kápnutí přípravku do oka a jeho promísení (interakcí) s mucinem v oku. Mukoadhezivní index je metodika používaná vědeckou obcí pro vyhodnocení účinnosti očních kapek a jejich možné srovnání [9, 19, 22].

4.2.4 Třetí fáze – Vliv sterilizace

Posledním krokem reologické fáze bylo naměření dynamické viskozity vzorků po jejich sterilizaci. Cílem sterilizace je pomocí fyzikálních nebo chemických procesů odstranit nebo usmrtit zárodky mikroorganismů. Bez tohoto procesu není možné certifikovat léčivou látku pro lidské použití. Jedná se tedy o validní informace potřebné pro celkové posouzení účinnosti vyvíjeného léku. Tato metoda se týkala pouze vzorků nativních kyselin hyaluronových a derivátů. Komerční oční kapky jsou již certifikovaná léčiva, která prošla tímto procesem.

Pro posouzení viskozity byly vybrány dvě metody sterilizace. První metodou byla sterilizace filtrací (dále označená jako filtrace) a druhou byla sterilizace teplem (dále sterilizace). Filtrace probíhala manuálním protlačováním látky přes filtr Ophthalsart NML (**Obr. 4-5**) s poretitou 0,2 μm od firmy Sartorius. Jedná se o filtry s acetátovou membránou přímo určené pro filtraci očních kapek. Sterilizace teplem probíhala v autoklávu za teploty 120 °C a tlaku 1,5 atmosféry po dobu 60 minut. Následně se měřily opět hodnoty dynamické viskozity (za stejných podmínek jako v předchozích dvou případech), přičemž výsledná data byla porovnávána se stavem viskozity před procesem sterilizace.



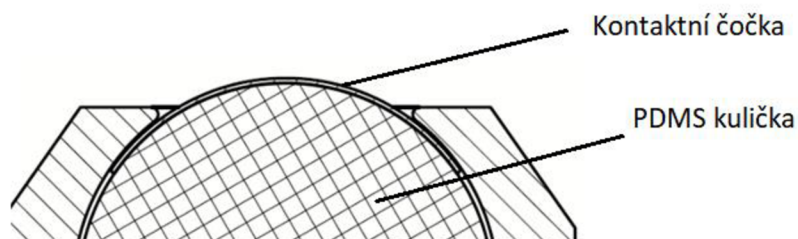
Obr. 4-5 Stříkačkový filtr Sartorius Ophtalsart NML [35].

4.3 Tribologie

Druhou částí diplomové práce jsou tribologické experimenty. Měření probíhala na vytvořeném tribologickém modelu v konfiguraci pin-on-plate a měla za cíl analyzovat vzorky z hlediska jejich součinitele tření.

4.3.1 Tribologický model oka

Tribologický model oka je tvořen silikonovou kuličkou (simulující oční kouli), kontaktní čočkou a silikonovým plátem (simulujícím víčko). Silikonová kulička je uložena do nerezového držáku. Na silikonovou kuličku je následně umístěna kontaktní čočka (Obr. 4-6). Silikonový plát tvořící protikus byl uložen ve vaně.



Obr. 4-6 Řez pinem zobrazující uložení silikonové kuličky a kontaktní čočky v držáku.

Model oční bulvy (Pin)

Oční bulva je simulována silikonovou kuličkou o průměru 17,2 mm. Tento rozměr odpovídá vnitřnímu poloměru kontaktní čočky. Kulička z vulkanizovaného silikonu Elastosil® LR 3003 byla vyrobena firmou SILROC v tvrdostech 10, 20, 30, 40 a 50 Sh. Modul pružnosti E zvoleného materiálu se pohybuje v rozmezí 300–1120 kPa v závislosti na jeho tvrdosti. Materiál na bázi silikonu byl zvolen s ohledem na největší podobnost s rohovkovou tkání, která má dle studií [36] průměrný modul pružnosti E 207 kPa. Velikost kuličky byla volena s ohledem na kontaktní čočku, aby nebylo nutné kontaktní čočku nijak upravovat a nedocházelo k její deformaci.

Model očního víčka (Plate)

Oční víčko je modelováno jako silikonový plát o rozměrech 70x35x4 mm, který byl vkládán do vany upevněné na recipročním modulu. Pláty byly vyrobeny ze stejného materiálu jako kuličky a tvořily protikus k modelu oční bulvy a na ní umístěné kontaktní čočky. Celkově byly dodány dva typy plátů o tvrdostech 30 a 50 Sh.

Kontaktní čočky

Kontaktní čočky se obecně dělí podle doby, kdy je možné jejich používání, tedy jednodenní, čtrnáctidenní a měsíční/kontinuální. Hlavním parametrem z toho vyplývajícím je obsah vody, který se zvyšuje s očekávanou dobou užívání. Dalším parametrem je materiál, ze kterého jsou čočky vyrobeny. Posledním jmenovaným parametrem je optická mohutnost, která není pro náš případ zcela ovlivňujícím faktorem. Vybrány byly totiž kontaktní čočky s D +0,5, kdy je jejich tloušťka víceméně konstantní. Veškeré parametry použitých kontaktních čoček jsou uvedeny v **Tab. 4-2**.

Tab. 4-2 Parametry použitých kontaktních čoček.

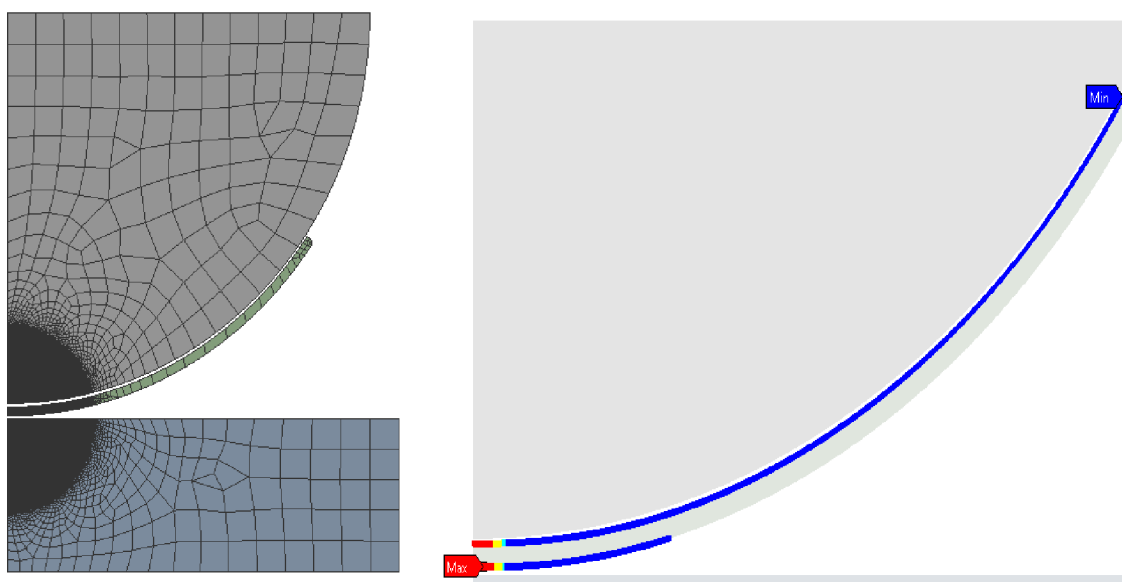
Typ kontaktních čoček	Obsah vody [%]	Materiál	Typ
1-DAY Acuvue Moist	58	Etafilcon A	1denní
Biofinity	48	Comfilcon A	měsíční
PureVision 2 HD	36	Balafilcon A	kontinuální

Analýza kontaktní oblasti

U tribologického modelu oka byla provedena analýza kontaktních těles v programu ANSYS Workbench. Prvním cílem byla klasická úloha se známou normálovou silou a cílem bylo zjištění kontaktního tlaku při zatěžování 1 N. Z této úlohy vyplynul kontaktní tlak 160 kPa. Druhým cílem bylo zjištění velikosti normálové síly, která by za současné konfigurace modelu oka odpovídala kontaktním tlakům nacházejícím se mezi očním víčkem a kontaktní čočkou. V tomto případě se jednalo o inverzní úlohu, kdy byl znám požadovaný kontaktní tlak (2–7 kPa) a byla zjišťována jemu odpovídající normálová síla.

Elastosil[®] LR 3003 použitý jako materiál kuličky a plátu je v této analýze modelován jako hyper-elastický materiál, vulkanizovaný silikon (Rubber Silicone VMQ). Tento materiál svými materiálovými vlastnostmi odpovídá použitému Elastosilu o tvrdosti 30–40 Sh. Kontaktní čočka je modelována jako lineární elastický materiál definovaný E a μ .

Vzhledem k použitým materiálům bylo potřeba provést nelineární analýzu. Vstupem byl čtvrtinový 2D model tvořený výsečí kuličky, kontaktní čočky a plátu. Na svislou hranu těles byla aplikována axisymetrie. Kontaktní oblasti byly vytvořeny mezi kuličkou a vnitřní stranou kontaktní čočky a plátem a vnější stranou kontaktní čočky. V obou konfiguracích byl nastaven kontakt se třením o hodnotě součinitele tření 0,02, respektive 0,05. Okrajové podmínky tvořila normálová síla působící na horní vodorovnou hranu výseče kuličky a „fixed support“ na spodní straně víčka (**Obr. 4-7**). Konečno-prvková síť byla vytvořena z 59 705 elementů a 180 362 uzlů. V oblasti dotyku byla aplikována velmi jemná síť pomocí funkce „face sizing“ s poloměrem oblasti 2 mm a velikostí elementu 0,01 mm.



Obr. 4-7 Ukázka meshe (vlevo) a kontaktní oblasti (vpravo) z provedené nelineární analýzy.

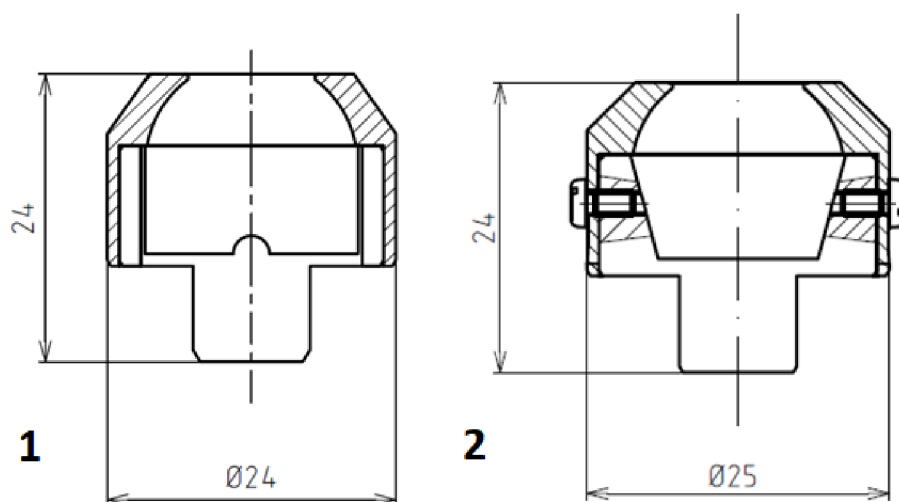
Kontaktní tlak byl zjišťován pomocí nástroje „contact tool“ a analýza probíhala, dokud nedošlo ke konvergenci. Vzhledem k hyper-elastickému materiálu bylo třeba použít funkce velkých deformací. Normálová síla byla zadávána ručně a probíhaly iterace, dokud nebylo dosaženo požadovaného kontaktního tlaku (2–7 kPa). Jako hodnotící kritérium byl vybrán kontaktní tlak 4,5 kPa a v **Tab. 4-3** jsou hodnoty normálové síly odpovídající této konfiguraci. Hodnoty pro střed intervalu (z hlediska kontaktního tlaku) zajišťují, že i při odchylkách snímače bude dosaženo požadovaného kontaktního tlaku 2–7 kPa. Jedná se tedy o doporučenou hodnotu normálové síly pro měření součinitele tření za současné konfigurace.

Tab. 4-3 Hodnoty normálových sil pro interval tlaků 2–7 kPa pro jednotlivé kontaktní čočky.

Kontaktní čočka	Normálová síla (2 kPa)	Normálová síla (7 kPa)	Normálová síla (4,5 kPa)
Balafilcon A	0,0615 mN	0,660 mN	0,275 mN
Comfilcon A	0,0680 mN	0,820 mN	0,340 mN
Etafilcon A	0,1560 mN	1,730 mN	0,750 mN

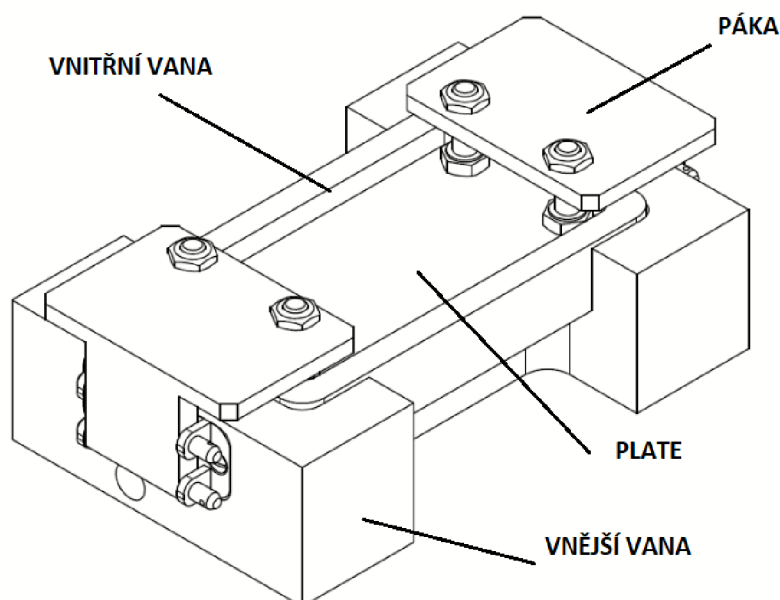
Konstrukce držáků

V rámci diplomové práce bylo potřeba zkonstruovat držáky vzorků (**Obr. 4-8**). Pro model oka posloužil nerezový držák z oceli 1.4301. Rozdílem mezi oběma typy byl způsob fixace vzorku. V prvním případě se jednalo o šroubový mechanismus utahování vzorku, kdy je zajištěno dostatečné předpětí i v poměrně širokém tolerančním intervalu silikonové kuličky. Držák se skládá ze spodního a horního dílu. Ve spodním dílu je vyrobena malá polokoule pro vystředění kuličky a zamezení jejímu protáčení při utahování. Ve výřezu v horní části držáku byl vytvořen rádius, aby bylo zamezeno stříhání kontaktní čočky během dotahování vzorku. Druhá varianta držáku se také skládá ze dvou dílů. Spojení dílů dohromady je zajištěno šrouby M2 a přizpůsobení toleranci kuličky je vyřešeno drážkou v horním dílu. Oproti první variantě se tento držák zároveň liší kónickým vybráním spodního dílu.



Obr. 4-8 Dvě varianty držáky modelu oka.

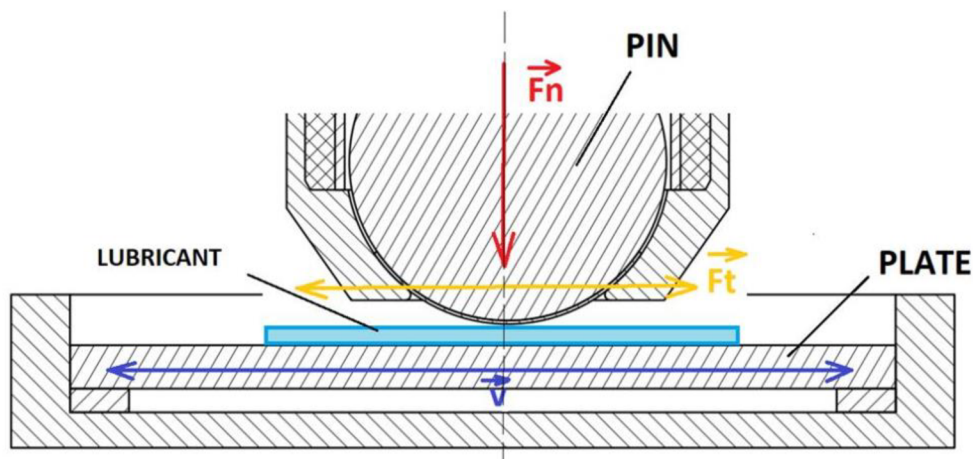
Pro model očního víčka byla zkonstruována nerezová vana o rozměrech 100x65x35,5 mm (Obr. 4-9). Sestava se skládá z vnější vany, do které se vkládá vana vnitřní. Vnitřní vana slouží pro uložení silikonového plátu, tedy modelu očního víčka. Vnější vana slouží pro upevnění na platformu tribometru a pro vytápění vzorku. Vyhřívání je řešeno dvěma topnými patronami od firmy Hotset a teplota je snímána termočlánkem od stejné firmy. Patrony o výkonu 145 W jsou umístěny podélně pod vnitřní vanou pro zajištění rovnoměrného ohřevu. Po stranách vnější vany jsou dvě páky se šrouby M4 s pružinami, kde je přtlakem pružin zajišťována rovinnost vzorku. Konstrukční řešení vany umožňuje jednoduchou montáž a snadné čištění během měření.



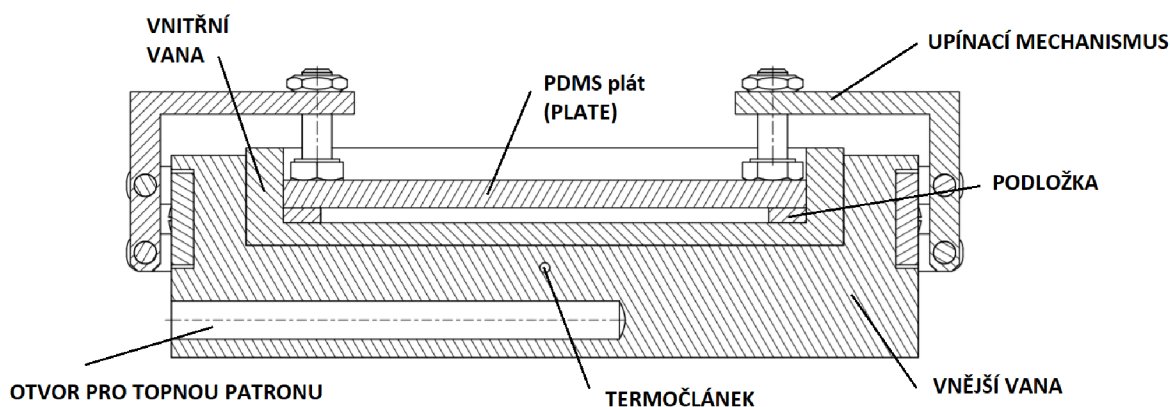
Obr. 4-9 3D model sestavy vany.

4.3.2 Popis tribologických experimentů

Měření součinitele tření probíhalo na tribometru Bruker UMT TriboLab (popsaném v kapitole 4.1) v konfiguraci pin-on-plate (**Obr. 4-10**) s použitím recipročního modulu tribometru. Do horní části zařízení byl upevněn držák modelu oka (pin). Do spodní části byla na reciproční modul upevněna vana se silikonovým plátem (plate). Pin je následně přitlačován požadovanou normálovou silou proti plátu, který je uložen ve vaně. Spodní pohyblivá část s vanou následně vykoná lineární vratný pohyb o určité frekvenci a výsledná třecí síla je získána pomocí tenzometrických snímačů.



Obr. 4-10 Konfigurace pin-on-plate.



Obr. 4-11 Schématické zobrazení řezu vany se vzorkem.

Parametry experimentů byly získány na základě validačních experimentů tribologického modelu oka. Za těchto podmínek (**Tab. 4-4**) probíhalo měření součinitele tření u komerčních očních kapek a nativních kyselin hyaluronových včetně derivátů. Celkově se každé měření skládalo ze tří částí. Prvních 60 s byl záběh, který se do vyhodnocení nepočítal a následovaly dva cykly po 300 s vlastního měření součinitele tření, které bylo vyhodnocováno. Výsledný součinitel tření byl získán průměrováním hodnot. Statistické zhodnocení výsledků je řešeno pomocí směrodatné odchylky.

Tab. 4-4 Parametry tribologických experimentů proběhlé ve druhé a třetí fázi.

Podmínky experimentů	
Zátěžná síla	1 N
Tvrдость PDMS plátu	30 Sh
Tvrдость PDMS kuličky	10 Sh
Posuvná rychlost	6 Hz
Kontaktní čočka	14denní
Teplota	37 °C
Počet opakování	5x2

4.3.3 První fáze – Validační experimenty

Tyto experimenty měly za úkol validovat navržený tribologický model oka. Jako referenční kapalina se používala karboxymethylcelulóza (CMC), která viskozitně odpovídá kyselině hyaluronové, ale je mnohem levnější. Smyslem této fáze bylo stanovení optimální konfigurace jak měřicího zařízení, tak použitých materiálů. Cílem těchto experimentů bylo stanovit co nejlepší podmínky měření, které budou co nejvíce odpovídat vědeckým článkům a zároveň budou vykazovat stabilní výsledky. V rámci této fáze se testovaly jednotlivé typy kontaktních čoček, tvrdosti silikonových kuliček, sady normálových zatížení, vliv rychlosti a teploty. Výsledkem první fáze byl tedy ucelený soubor podmínek, které lze použít v dalších fázích projektu pro měření součinitele tření.

4.3.4 Druhá fáze – Testování komerčních očních kapek

V druhé fázi následovalo testování komerčních kapek. Na základě poznatků z validačních experimentů došlo k úpravě parametrů experimentu tak, aby mohly být testovány komerční roztoky. Experimenty byly provedeny pro jednotlivé roztoky a konfigurace. Vzorky v této fázi nebylo nutné nijak připravovat, jelikož se jednalo o finální produkty.

4.3.5 Třetí fáze – Testování nativních KH a derivátu

V poslední fázi byla testována nativní kyselina hyaluronová a vyvíjený derivát. Testované roztoky jsou uvedeny v **Tab. 4-6** Maziva použitá pro měření součinitele tření a podmínky experimentu odpovídaly těm pro komerční oční kapky, aby mohly být výsledky následně porovnány. Cílem této fáze bylo pozorování a analýza chování součinitele tření u vyvíjeného derivátu v porovnání s nativními kyselinami hyaluronovými. Sledován byl zároveň vliv koncentrace rozpuštěného polymeru a také vliv použitého pufru.

4.4 Maziva

Pro reologickou i tribologickou část byla separátně připravována maziva. Postup byl v obou případech téměř shodný, nicméně pro reologická měření následovalo ještě ředění pufrům na potřebnou koncentraci či přidání mucinu. Tato kapitola přibližuje přípravu vzorků pro oba typy měření se zaměřením na použitý polymer. V příloze (Příloha 1) se nacházejí protokoly, které obsahují detailní popis přípravy vzorků pro reologickou část.

4.4.1 Kyselina hyaluronová a derivát

Příprava vzorků

V rámci měření viskozity bylo pracováno s nativní kyselinou hyaluronovou s molekulovou hmotností v rozmezí 440 kDa–1,6 MDa a derivátem kyseliny hyaluronové (**Tab. 4-5**). Nativní kyseliny hyaluronové i derivát byly dodány v podobě prášků, takže před každým měřením bylo potřeba vzorky připravit. Aby bylo dosaženo potřebné koncentrace bylo třeba navážit přesně dané množství polymeru a rozpustit jej v požadovaném množství rozpouštědla (pufru). Pro koncentraci 0,1 % bylo navažováno množství 1 mg/ml, v případě 0,2 % 2 mg/ml a v případě 0,3% roztoku se jednalo o 3mg/ml. Nejčastěji bylo připravováno množství 10 ml pro reologické a 20 ml pro tribologické testy. Po rozpuštění vzorků v pufru byly vzorky míchány na magnetické míchače po dobu 29 hodin za účelem dokonalého rozpuštění polymeru v pufru.

V případě, že se jednalo o vzorky s mucinem byl separátně připraven mucin. Mucin byl používán ve formě sušeného gastrin mucinu typu II a III od firmy Sigma Aldrich. Po rozmíchání byl mucin pipetován do připravených roztoků kyseliny hyaluronové a derivátu. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 60 minut na 37 °C na temperované třepače s LIA. Toto však platilo pouze pro reologická měření. V tribologické části se s mucinem nepracovalo.

Vzorky

Celkově bylo měřeno 6 různých druhů polymerů, přičemž 4 byly nativní kyseliny hyaluronové, jeden vzorek byl vyvíjený derivát a jeden vzorek byla karboxymethylcelulóza.

Tab. 4-5 Maziva použitá pro měření viskozity a mukoadhezivitu.

Název	Molekulová hmotnost	Koncentrace
HA-C12	Ekvivalent 500 kDa	0,3 %
HA-440	440 kDa	0,3 %
HA-589	589 kDa	0,3 %
HA-1	1 MDa	0,3 %
HA-1,6	1,6 MDa	0,3 %
CMC	-	0,5 %

Na základě výsledků měření viskozity byly vybrány tři nativní kyseliny hyaluronové a derivát, které následně podstoupily tribologické testování. Hlavní změnou jsou odlišné koncentrace derivátu uvedené v **Tab. 4-6**. Karboxymethylcelulóza byla připravena v koncentraci, kdy viskozitně odpovídá testovaným produktům a mohla být tedy využita jako testovací mazivo pro validační experimenty.

Tab. 4-6 Maziva použitá pro měření součinitele tření.

Název	Koncentrace
HA-1,6	0,3 %
0,3-HA-C12	0,3 %
0,2-HA-C12	0,2 %
0,1-HA-C12	0,1 %
HA-440	0,3 %
HA-589	0,3 %
CMC	0,5 %

Pufry

Speciální podkapitolu tvoří pufry neboli rozpouštědla. Ačkoliv se nejedná o samostatné vzorky jedná se o jejich podstatnou část, jelikož jsou v nich rozpouštěny polymery. Celkově byly použity tři typy pufřů (**Tab. 4-7**), ve kterých byly rozpouštěny měřené polymery. Pro reologická měření byly využívány HEPES-pufr a THEA-pufr. Pro následná tribologická měření byly vzorky kyseliny hyaluronové a derivátu rozpouštěny vždy v pufru fyziologickém a THEA-pufru.

Tab. 4-7 Pufry, jejich označení a složení.

Pufr	Označení	Složení
Fyziologický	F-pufr	0,9% roztok NaCl v demi vodě
HEPES	H-pufr	20mM HEPES v demi vodě
THEA	T-pufr	3% Trehalosa, 0,2% NaCl, 0,121% Tromethamol v demi vodě – úprava pH na 7,2 pomocí HCl

4.4.2 Komerční oční kapky

Pro měření viskozity i součinitele tření bylo vybráno 5 druhů očních kapek. Jedná se o komerčně dostupné oční kapky, které se liší svým složením (**Tab. 4-8**), převážně z hlediska použitého polymeru. Některé kapky obsahují více než jeden polymer, tedy obsahují další kopolymery. Kopolymery jsou přidávány z důvodu zlepšení regenerace či hojení tkání, ale také z důvodu snížení ceny výsledného produktu. Dalšími složkami jsou rozpouštědla (pufry) a osmolyty, které doplňují portfolio chemických vlastností potřebných pro správné fungování produktu. Oční kapky nebyly rozpouštěny v žádném z pufřů, ale byly testovány jako finální produkty.

Tab. 4-8 Použité oční kapky a jejich složení.

Produkt	Polymer	Osmolyt	Pufr
ReNu MultiPlus	Povidon (PVP)	-	Tetraboritan sodný Chlorid sodný
Systane Ultra	Polyethylenglykol 400 0,4% Glykol 0,3% Hydroxypropyl guar	Sorbitol	Kyselina boritá Aminomethyl propanol
Laim-Care	Kyselina hyaluronová 0,3 %	-	-
Refresh	Karboxymethylcelulóza sodná 0,5%	-	Kyselina boritá Chlorid sodný
Thealoz Duo	Carbopol 974P 0,25 g Hyaluronát sodný 0,15 g	Trehalóza 3 g Sorbitol	Hydroxid sodný voda

5 VÝSLEDKY

5.1 Reologie

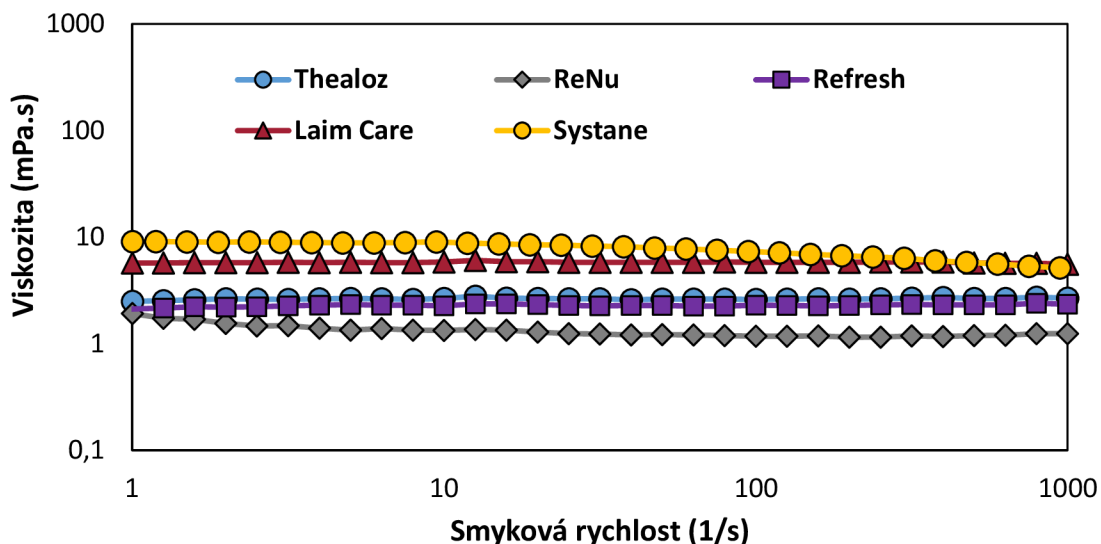
Cílem reologie bylo naměření viskozitní charakteristiky nativních KH, derivátu a komerčních očních kapek. V první fázi byly měřeny dynamické viskozity jednotlivých vzorků a ve druhé fázi byl následně počítán mukoadhezivní index vzorků. Experimentální část uzavřelo naměření viskozity vzorků po provedení sterilizace.

Data byla měřena za teploty 25 °C a 37 °C. Nicméně výsledky ukázaly, že rozdíly mezi teplotami byly nepatrné, a proto byla zvolena jako finální teplota testování 37 °C. Vzorky po reakci s mucinem imitují chování roztoku po aplikaci na oční povrch a budou tedy porovnávány s hodnotami viskozity pro reálné slzy.

5.1.1 Komerční oční kapky

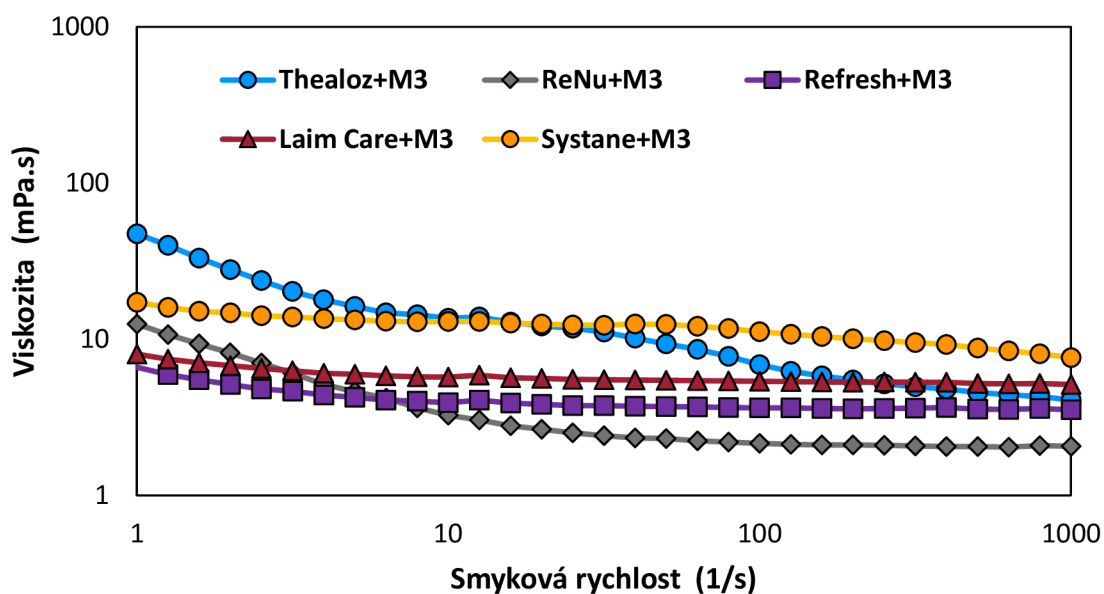
Viskozitní charakteristika

Viskozitní charakteristika komerčních očních kapek byla měřena ve dvou krocích, před a po interakci s mucinem. Z výsledků (**Obr. 5-1**) vyplývá, že nejvyšší viskozitu měly kapky Systane, jejich hlavní aktivní složkou jsou tři polymery. Druhou nejvyšší viskozitu měly kapky Laim Care s obsahem KH. Následovaly kapky Thealoz, Refresh a nejnižší viskozitu měly kapky ReNu. Zároveň se ukázalo, že testované komerční kapky nevykazují shear thinning efekt a jejich viskozita se vlivem smykové rychlosti mění pouze minimálně. Jediné kapky, které prokázaly mírný shear thinning efekt byly kapky Systane.



Obr. 5-1 Průběh viskozity komerčních očních kapek v rozmezí 1 s⁻¹ a 1000 s⁻¹.

Na grafu (Obr. 5-2) lze vidět změnu viskozitní charakteristiky vzorků po jejich interakci s mucinem III. Kapky Thealoz vykazují značný nárůst viskozity v oblasti malých smykových rychlostí, což je ve shodě se shear thinning chováním reálných slz. Podobné chování vykazaly také kapky ReNu, nicméně s menšími hodnotami viskozity v bodech 1 s⁻¹ a 1000 s⁻¹.



Obr. 5-2 Viskozitní charakteristika komerčních očních kapek po jejich interakci s mucinem III.

Tab. 5-1 Tabulka hodnot viskozity a koeficientu Q u komerčních očních kapek po reakci s mucinem III.

Vzorek	η_1 (mPa.s)	η_{1000} (mPa.s)	Q1/1000
Thealoz	47,2	4,1	11,5
Laim Care	8	5,1	1,6
ReNu	12,5	2,1	6,0
Refresh	6,6	3,5	1,9
Systane	17,2	7,6	2,3

Mukoadhezivní index

Mukoadhezivní index byl pro jednotlivé komerční oční kapky počítán na základě vzorce (4.1). Souhrnné výsledky jsou uvedeny v **Tab. 5-2** a to pro 4 smykové rychlosti. Z výsledků je patrné, že nejlepší mukoadhezivitu ukázaly kapky Thealoz Duo, kde se mukoadhezivní vlastnosti vzorku projevily ve 3 ze 4 smykových rychlostech. Závislost mukoadhezivní na smykové rychlosti se u kapek neprojevila. Druhé nejlepší byly kapky Systane. Interakce s mucinem se neprojevily u kapek Laim Care a Refresh. V případě kapek Laim Care obsahujících KH je to překvapivé zjištění, které bude analyzováno v diskuzi.

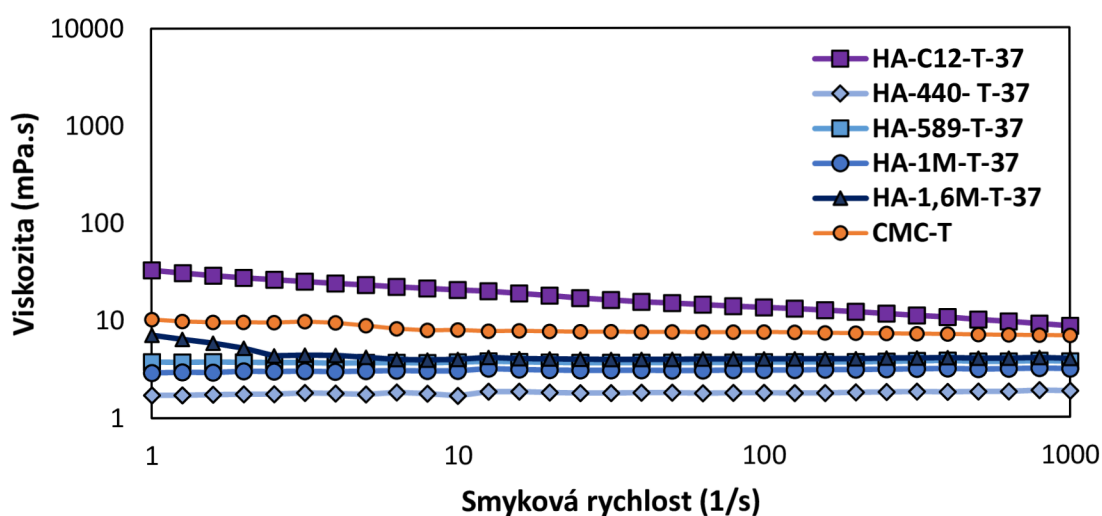
Tab. 5-2 Mukoadhezivní index komerčních očních kapek pro smykové rychlosti 1; 10; 100 a 1000 s⁻¹.

Vzorek	Δ_1 (%)	Δ_{10} (%)	Δ_{100} (%)	Δ_{1000} (%)
Thealoz Duo	143	278	50	-
ReNu	-	5	-	-
Refresh	-	-	-	-
Laim Care	-	-	-	-
Systane	10,2	-	17,2	5,6

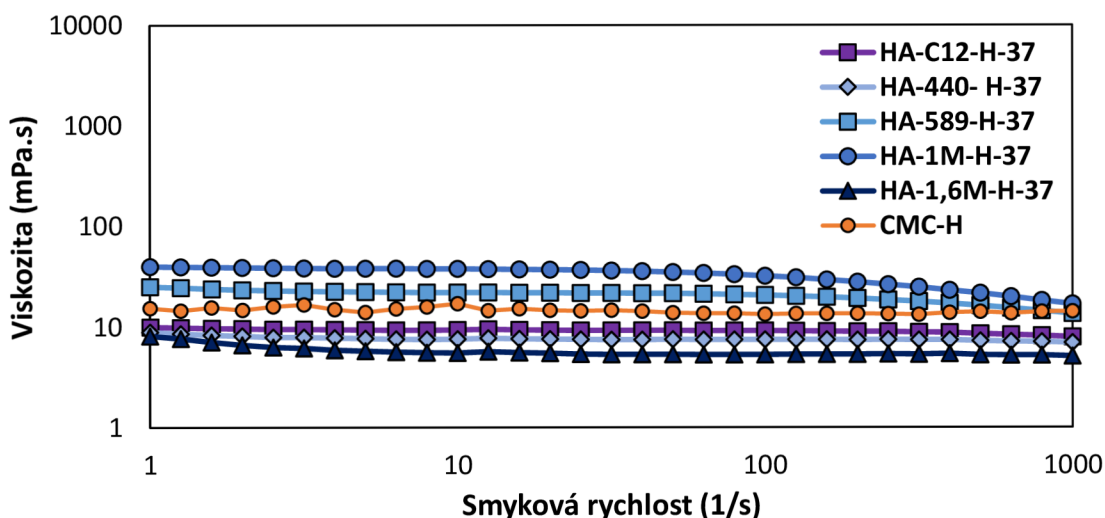
5.1.2 Nativní kyselina hyaluronová a derivát

Viskozitní charakteristika

Nativní KH a derivát (HA-C12) byly rozpouštěny ve dvou pufrch a následně byla měřena jejich viskozitní charakteristika před interakcí s mucinem. Z grafu (Obr. 5-3) lze vidět, že v případě T-puftru s obsahem trehalózy se vzorky nativní KH srovnaly vzestupně podle své molekulové hmotnosti. Drobnou výjimkou jsou molekulové hmotnosti 589 kDa a 1 MDa. Derivát dosáhl nejvyšší hodnoty viskozity jak za malých, tak za vysokých smykových rychlostí. Naopak v případě vzorků rozpuštěných v H-puftru (Obr. 5-4) byly výsledky nezávislé na molekulové hmotnosti vzorků. Vzorek CMC je uveden pro potvrzení, že jeho viskozitní charakteristika odpovídá testovaným KH a je validní pro tribologii.



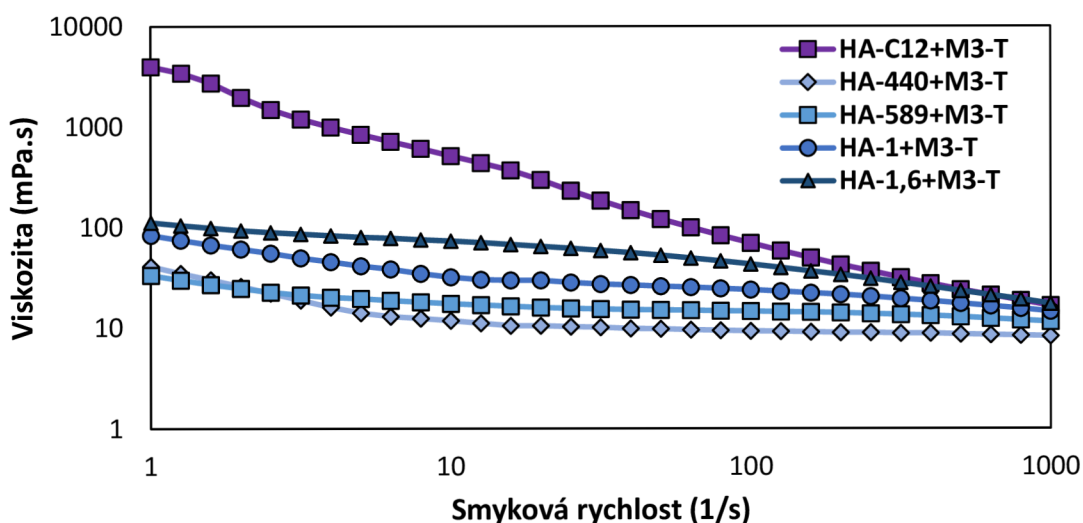
Obr. 5-3 Viskozitní charakteristika vzorků KH v T-puftru.



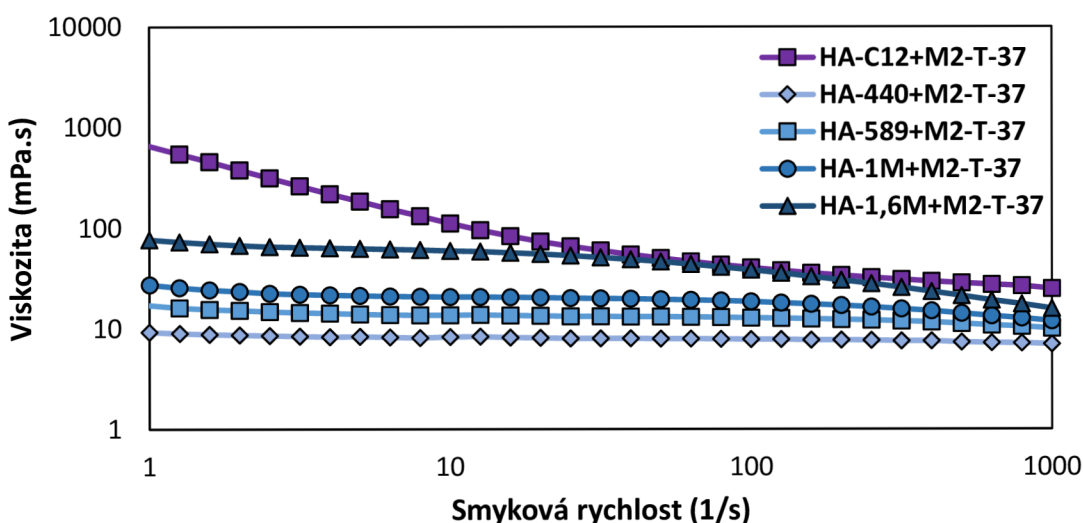
Obr. 5-4 Viskozitní charakteristika vzorků KH v H-puftru.

Vliv mucinu a pufru

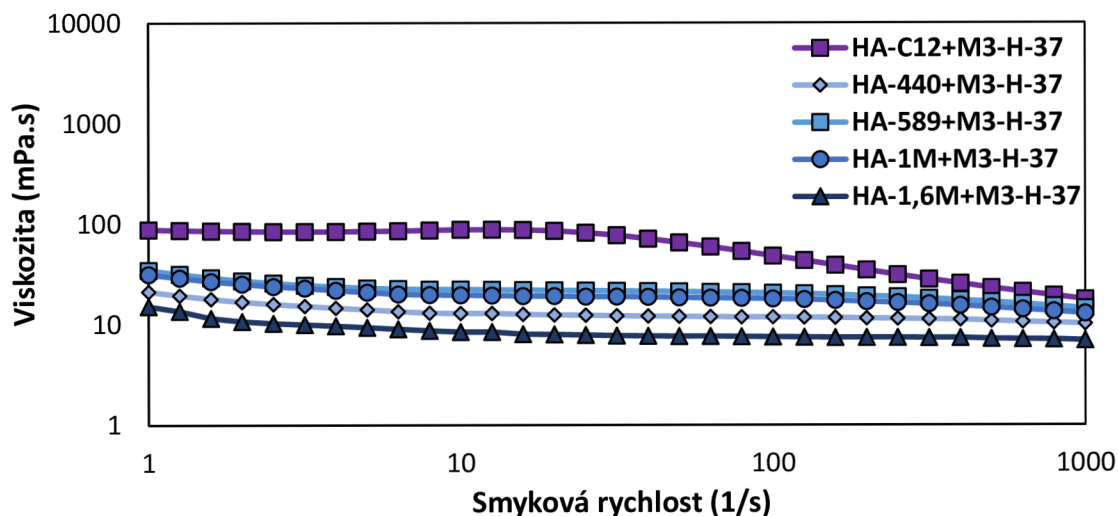
Celkově byly nativní KH a derivát testovány se dvěma typy mucinů a dvěma typy pufrů za jednotné koncentrace 0,3 %. Výsledky ukázaly, že nejkonzistentnější výsledků dosáhly KH a derivát v konfiguraci s mucinem III a T-pufrem (**Obr. 5-5**). V případě mucinu II a T-pufru (**Obr. 5-6**) došlo k interakci derivátu s mucinem, a to vedlo v oblasti malých smykových rychlostí k velmi vysoké viskozitě derivátu (4000 mPa.s). Navíc se zde neprojevoval v takové míře shear thinning efekt, jaký by byl očekáván u nativních slz. Interakce mucinu III s H-pufrem vedla k nerelevantním výsledkům (**Obr. 5-7**), kde byla interakcí zcela ovlivněna vnitřní viskozita vzorků. Graf (**Obr. 5-8**) naopak ukazuje dobrou interakci mucinu II s H-pufrem, ale výsledná viskozita derivátu je v řádu tisíců mPa.s.



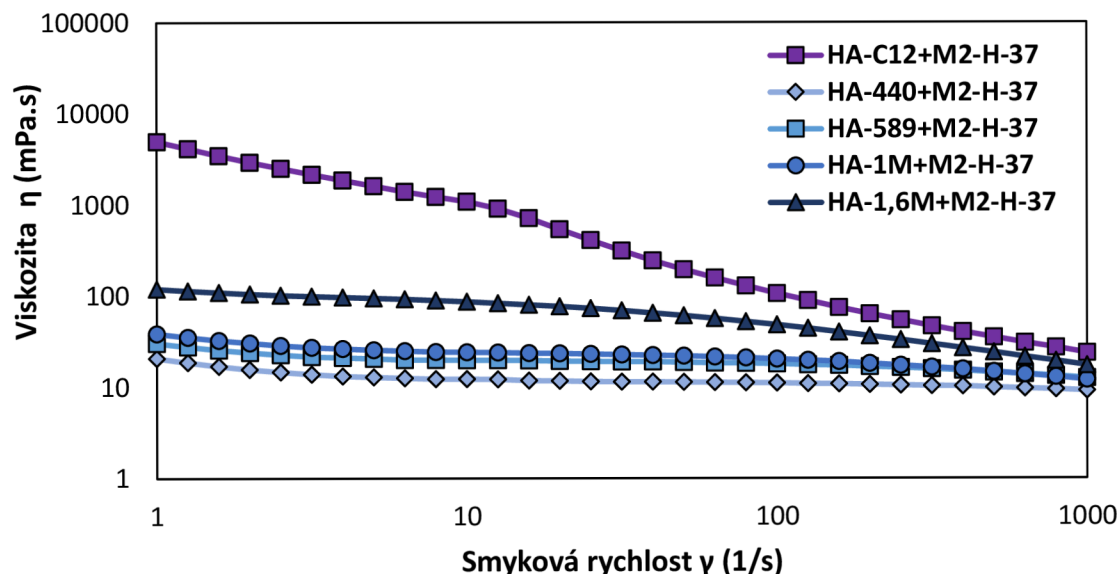
Obr. 5-5 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M3 v T-pufru.



Obr. 5-6 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M2 v T-pufru.



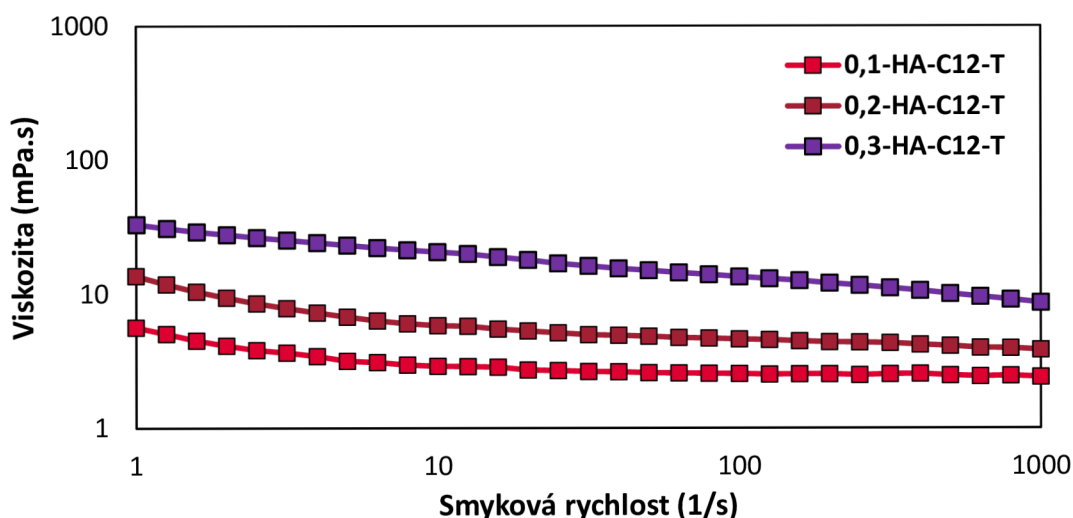
Obr. 5-7 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M3 v H-pufru.



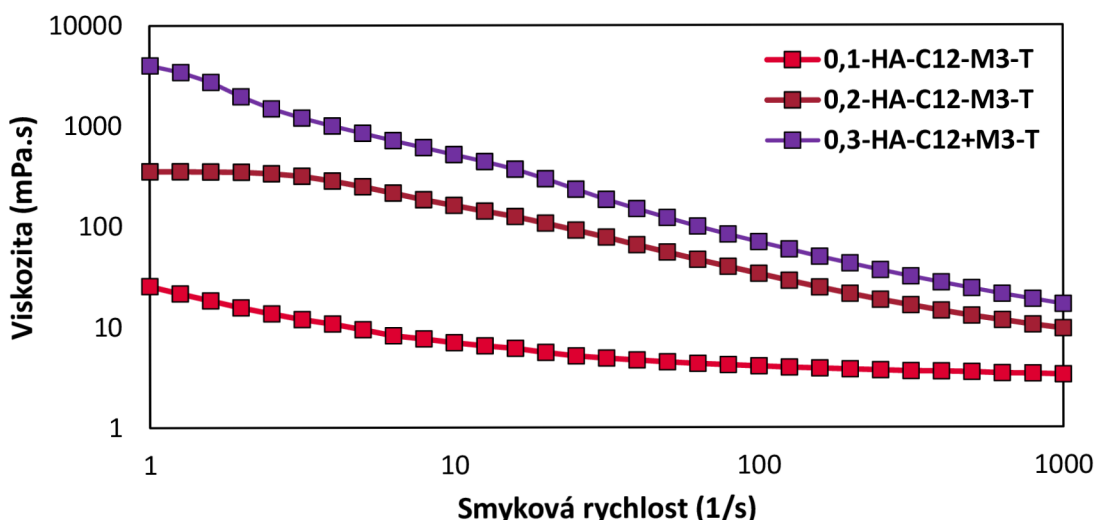
Obr. 5-8 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M2 v H-pufru.

Vliv koncentrace

Vzhledem k velmi vysokým hodnotám viskozity derivátu za malých smykových rychlostí byla provedena další analýza. Došlo ke snížení koncentrace rozpuštěného polymeru v roztoku na 0,2 % a 0,1 %. Grafy (Obr. 5-9, Obr. 5-10) ukazují, že snížení koncentrace vede ke snížení viskozity. V případě derivátu o koncentraci 0,1 % se již jedná o viskozitní charakteristiku blízkou reálným slzám.



Obr. 5-9 Viskozitní charakteristika derivátu s rozdílnou koncentrací derivátu.



Obr. 5-10 Viskozitní charakteristika derivátu s rozdílnou koncentrací derivátu po aplikaci mucinu.

Mukoadhezivní index

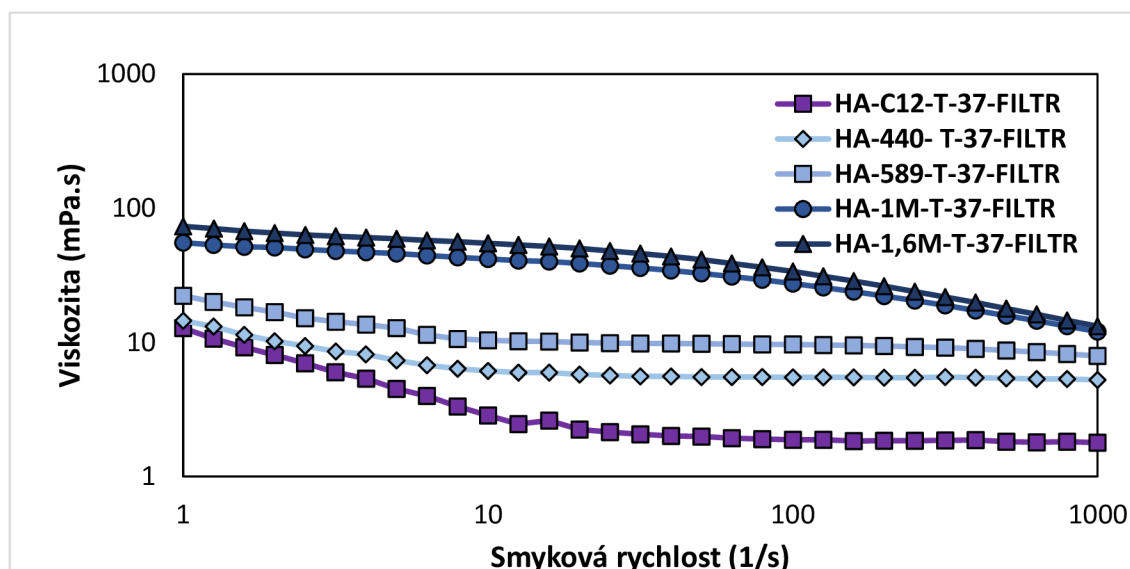
Stejně jako v případě komerčních očních kapek byl mukoadhezivní index počítán dle vztahu (4). Z **Tab. 5-3** lze vidět, že všechny roztoky kyseliny hyaluronové včetně derivátu prokázaly mukoadhezivní vlastnosti. Velikost hodnoty mukoadheze se ukázala závislá na smykové rychlosti, kde nejvyšších hodnot dosahoval index pro malé smykové rychlosti. V případě vyšších smykových rychlostí již byla hodnota mukoadhezivního indexu nižší. Výjimkou jsou vzorky 589 kDa a 1,6 MDa, kde byla mukoadhezivita nejvyšší za smykové rychlosti 1 s^{-1} .

Tab. 5-3 Mukoadhezivní index pro smykové rychlosti 0,1; 1; 10; 100 a 1000 s⁻¹.

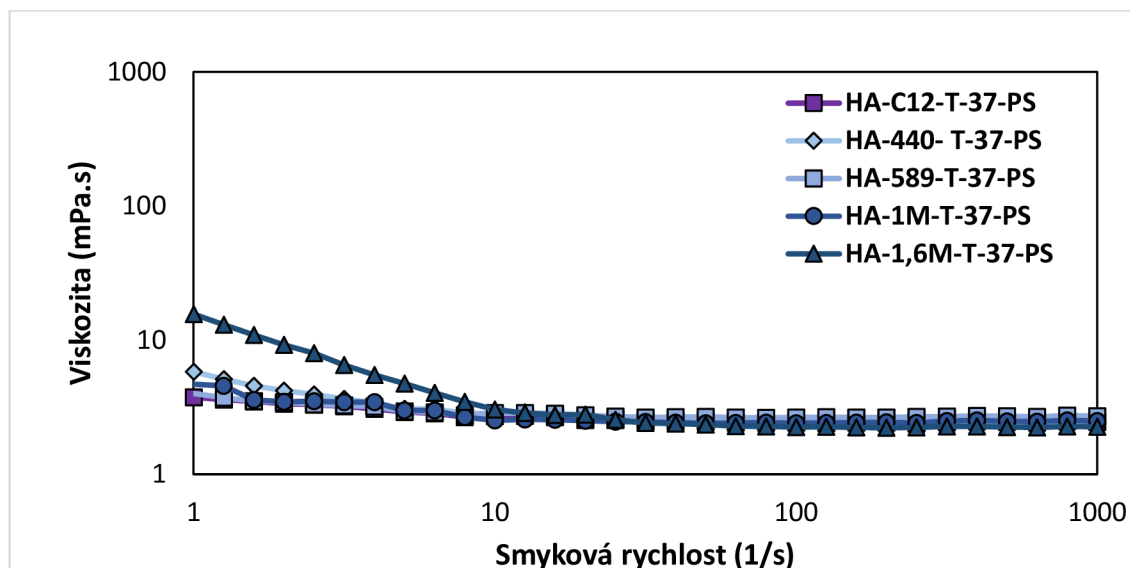
Vzorek	Δ_1 (%)	Δ_{10} (%)	Δ_{100} (%)	Δ_{1000} (%)
HA-C12	9112,5	1577,6	349,7	59,0
HA-440	245,4	158,7	144,7	118,4
HA-589	140,5	164,0	158,3	104,3
HA-1	538,9	444,1	370,6	192,0
HA-1,6	549,1	962,3	618,3	194,9

Vliv sterilizace

V poslední fázi reologických experimentů byly měřeny viskozitní charakteristiky vzorků po filtraci a sterilizaci teplem. Ačkoliv se jedná o odlišné procesy z hlediska metodiky, tak výsledky dopadly v obou případech velmi podobně. Z hlediska hodnocení derivátu můžeme říct z grafů (**Obr. 5-11, Obr. 5-12**) je patrné, že derivát měl viskozitu ze všech měřených vzorků nejhorší. Filtrace ukázala na schopnost vzorků zachovat si viskozitu za malých smykových rychlostí. Sterilizace teplem vykazuje větší pokles viskozity než v případě sterilizace filtrací. Rozdíl je patrný na grafu (**Obr. 5-12**), kde od hodnoty smykové rychlosti 10 s⁻¹ je viskozita všech vzorků v podstatě shodná. Jediná KH o nejvyšší molekulové hmotnosti (1,6 MDa) vykazuje vysokou viskozitu za malých smykových rychlostí.



Obr. 5-11 Vliv filtrace na viskozitní charakteristiku vzorků.



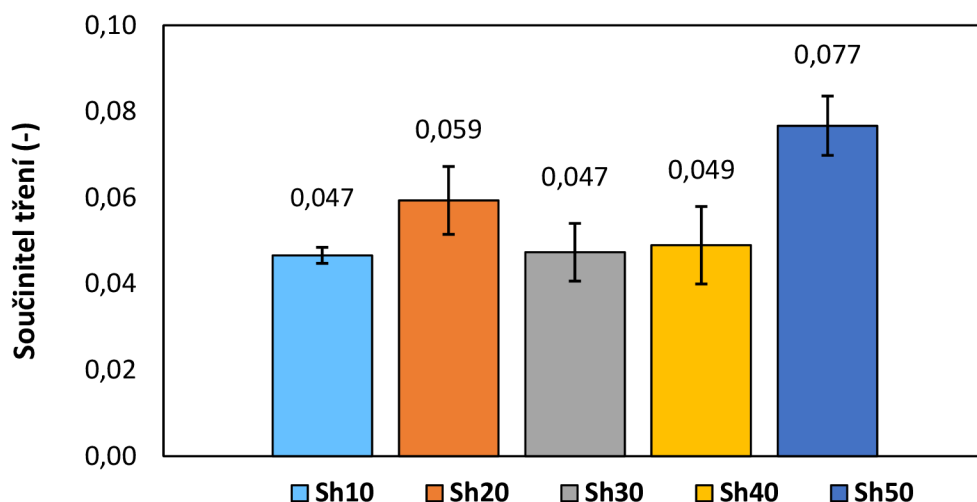
Obr. 5-12 Vliv sterilizace v autoklávu na viskozitní charakteristiku vzorků.

5.2 Tribologie

5.2.1 Úvodní experimenty pro ověření tribologického modelu oka

Prvním úkolem byla validace vytvořeného tribologického modelu oka. Před měřením nativních KH, derivátu a komerčních očních kapek bylo potřeba stanovit podmínky těchto experimentů. Testován byl vliv normálové síly, vliv posuvné rychlosti, vliv tvrdosti materiálů, ale také vliv použité kontaktní čočky a teplotní závislost. Pro tuto fázi byl použit 0,5% roztok CMC, který viskozitně odpovídá KH a dobře simuluje chování budoucích vzorků. Na základě těchto měření vznikly podmínky experimentů (**Tab. 4-4**), které byly použity pro další měření.

Z výše uvedených parametrů byla nejvíce ovlivňující normálová síla a tvrdost kontaktních materiálů. Normálová síla byla testována v rozmezí 1–5 N v závislosti na tvrdosti protikusů. Byla pozorována závislost normálové síly na tvrdosti materiálů. Jednotlivým tvrdostem kuliček odpovídala vždy maximální hodnota normálové síly, po jejímž překročení došlo ke značnému nárůstu tření. Vliv tvrdosti materiálů ukazuje graf (**Obr. 5-13**). Zde je vidět, že kuličky o tvrdosti 10 a 30 Sh mají velmi podobný výsledný součinitel tření, který se lišil až na třetím desetinném místě. Zároveň je patrné, že tvrdost 10 Sh má nejmenší směrodatnou odchylku ze všech měřených vzorků. Z toho důvodu byla vybrána tato tvrdost pro následné experimenty.



Obr. 5-13 Vliv tvrdosti materiálu kuličky na součinitel tření za $F_n = 1$ N.

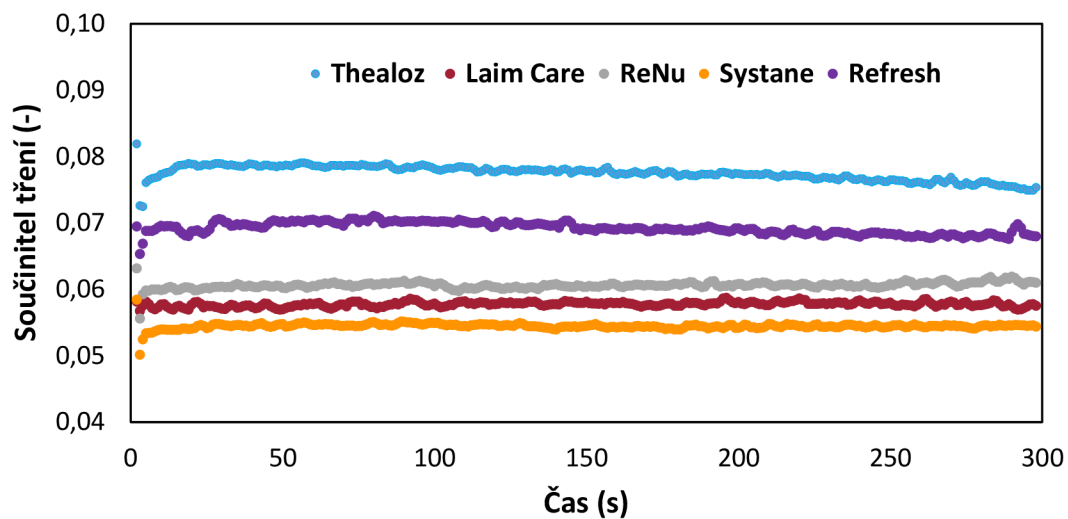
Vliv posuvné rychlosti byl nepatrný v rozmezí 5–8 Hz. Nejstabilnější bylo chování při posuvné rychlosti 6 Hz, a proto byla tato hodnota zvolena pro další experimenty. Po přepočtu vychází průměrná hodnota rychlosti na 156 mm/s.

Porovnání výsledků součinitele tření s a bez kontaktní čočky ukázalo na nižší součinitel tření při použití kontaktní čočky. Zároveň se od sebe lišily jednotlivé druhy kontaktních čoček, a to převážně z hlediska životnosti. Nejlepší poměr životnosti a součinitele tření vykázaly čočky Bioinfinity® a proto byly použity pro následující experimenty.

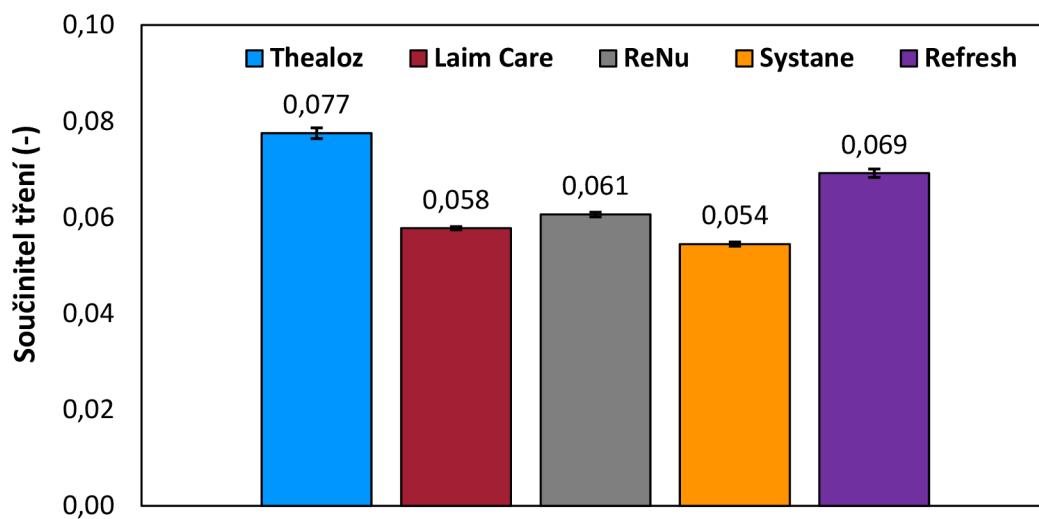
Testovaný vliv teploty ukázal, že tento parametr významně neovlivňuje výsledný součinitel tření. Testovány byly teploty 25 a 37 °C a na základě výše uvedeného byla pro další experimenty zvolena teplota 37 °C simulující teplotu lidského těla.

5.2.2 Komerční oční kapky

Součinitel tření byl měřen pro 5 typů komerčních očních kapek. Podmínky experimentu respektovaly hodnoty uvedené v kapitole 4. Výsledky měření součinitele tření u komerčních očních kapek (Obr. 5-14, Obr. 5-15) ukázaly na zásadní vliv použitého polymeru. Nejvyššího součinitele tření dosáhly kapky Thealoz Duo obsahující jako aktivní látku kombinaci dvou polymerů a navíc trehalózu. Naopak nejnižšího součinitele tření dosáhly kapky Systane mající jako aktivní látku tři kopolymery. U kapek obsahujících samostatnou KH (Laim Care) byl výsledný součinitel tření druhý nejnižší. Kapky Refresh obsahující karboxymethylcelulózu měly druhý nejvyšší součinitel tření. Střední hodnoty součinitele tření dosáhly kapky ReNu tvořené polymerem PVP.



Obr. 5-14 Průběh součinitele tření komerčních očních kapek v závislosti na čase, n=10.

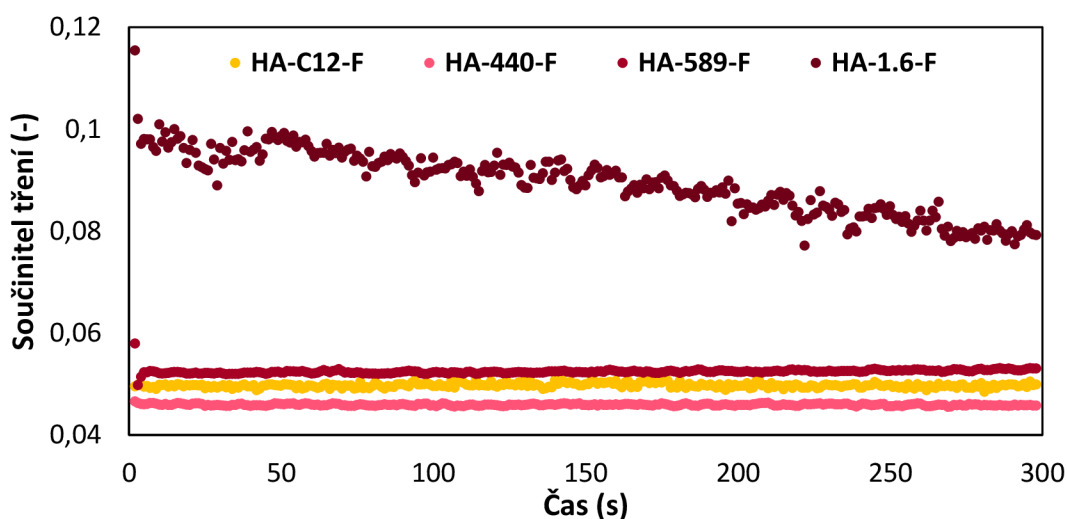


Obr. 5-15 Průměrná hodnota součinitele tření komerčních očních kapek za velkých smykových rychlostí.

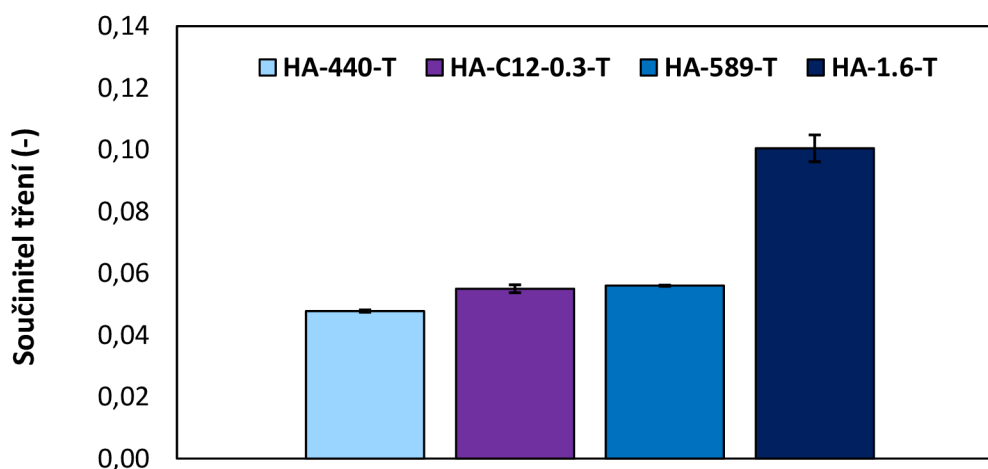
5.2.3 Nativní kyselina hyaluronová a derivát

Vliv molekulové hmotnosti

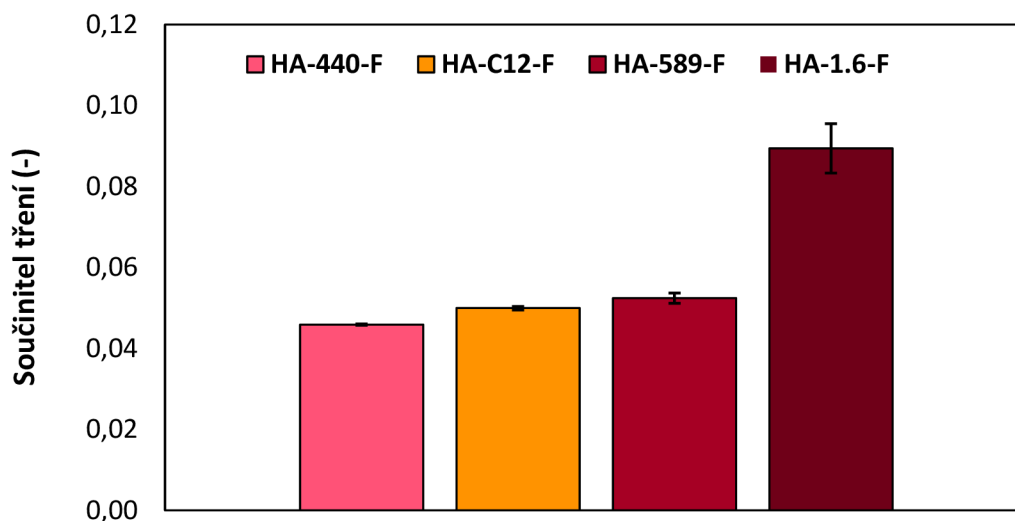
Pro hodnocení vlivu molekulové hmotnosti byly porovnávány vzorky za jednotné koncentrace 0,3 %. Vývoj součinitele tření v čase (**Obr. 5-16**) byl téměř neměnný kromě nejvyšší molekulové hmotnosti 1,6 MDa, u které byl sledován pokles součinitele tření v čase. To lze vidět na směrodatných odchylkách v následujících grafech. U T-pufru byl trend stejný. Z grafu (**Obr. 5-17**) je patrné, že nejmenšího součinitele tření dosáhla KH o nejmenší molekulové hmotnosti. Následně se součinitel tření zvyšoval vždy s rostoucí molekulovou hmotností. Zajímavé je srovnání derivátu HA-C12, který má molekulovou hmotnost přibližně 500 kDa. Při pohledu na graf je vidět, že hodnota jeho součinitele tření se nacházela přesně mezi nativními KH o MH 440 kDa a 589 kDa. U fyziologického pufru se projevil stejné charakteristiky, což lze vidět na **Obr. 5-18** i **Obr. 5-16**.



Obr. 5-16 Vývoj součinitele tření v závislosti na čase pro vzorky v F-pufru.



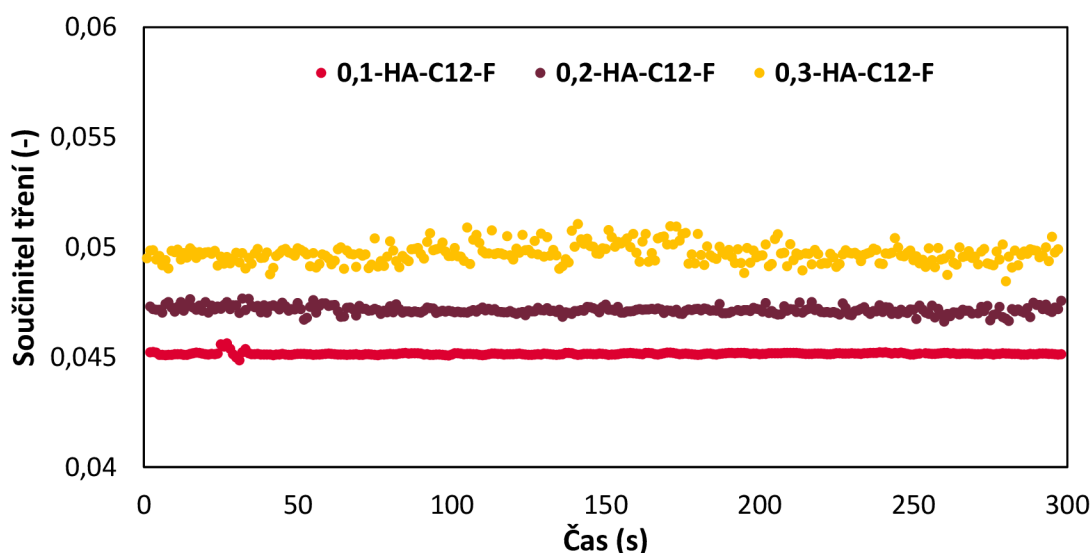
Obr. 5-17 Sloupcový graf zobrazující průměrné hodnoty součinitele tření KH a derivátu v T-pufru.



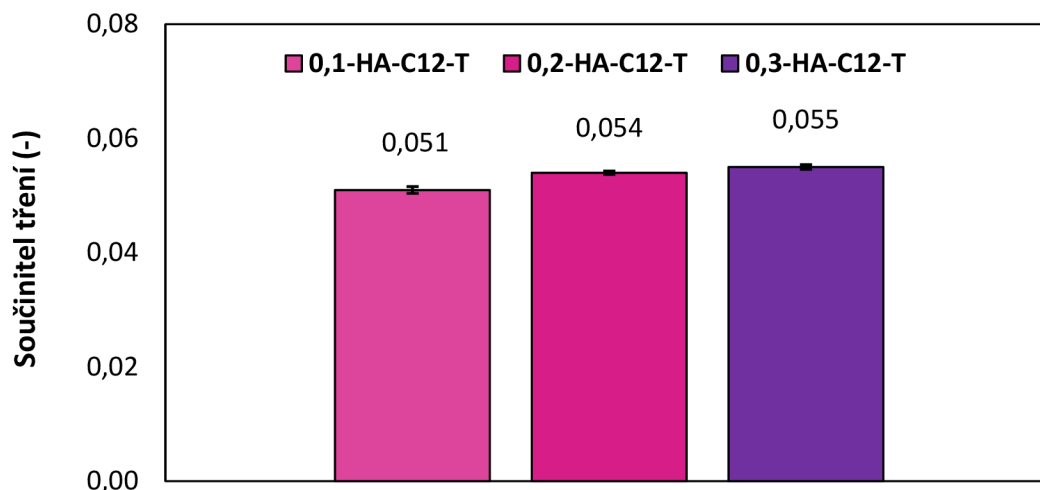
Obr. 5-18 Sloupcový graf zobrazující průměrné hodnoty součinitele tření KH a derivátu v F-puftru.

Vliv koncentrace

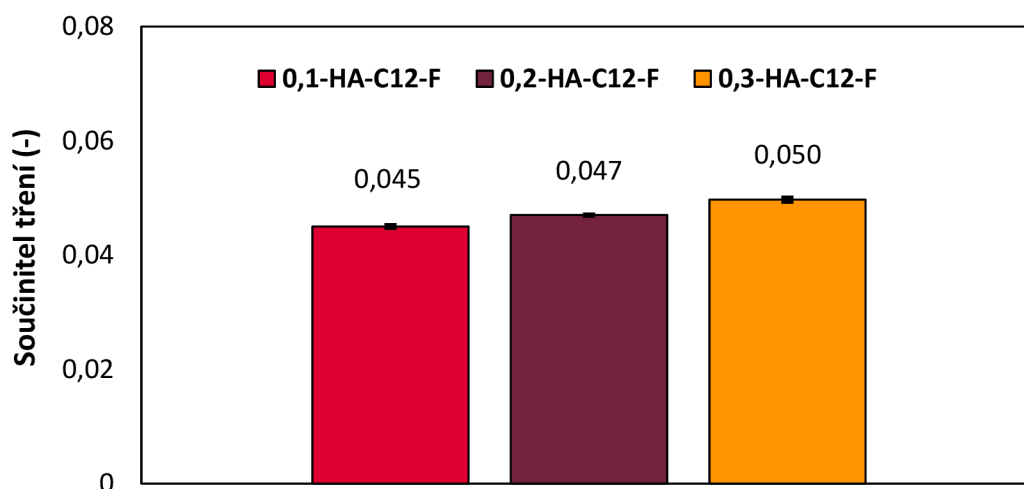
Vliv koncentrace na součinitel tření byl zkoumán u derivátu HA-C12. Podnětem k tomu byly značné rozdíly ve viskozitě (Obr. 5-5) derivátu při změně jeho koncentrace. Vývoj součinitele tření v čase byl téměř neměnný pro všechny koncentrace (Obr. 5-19). Tento trend platil i pro T-pufr. Z grafu (Obr. 5-20) lze vidět, že s rostoucí koncentrací rostl také součinitel tření. Nicméně rozdíl mezi součinitelem tření mezi 0,1 % a 0,3 % je pouze 7,8 %. V případě fyziologického pufru (Obr. 5-21) byly hodnoty nižší, nicméně trend součinitele tření byl zachován. Rozdíl mezi hodnotami součinitele tření byl u fyziologického pufru mezi koncentrací 0,1 % a 0,3 %, celkově 11,1 %.



Obr. 5-19 Vývoj součinitele tření v závislosti na čase pro různé koncentrace derivátu v F-puftru.



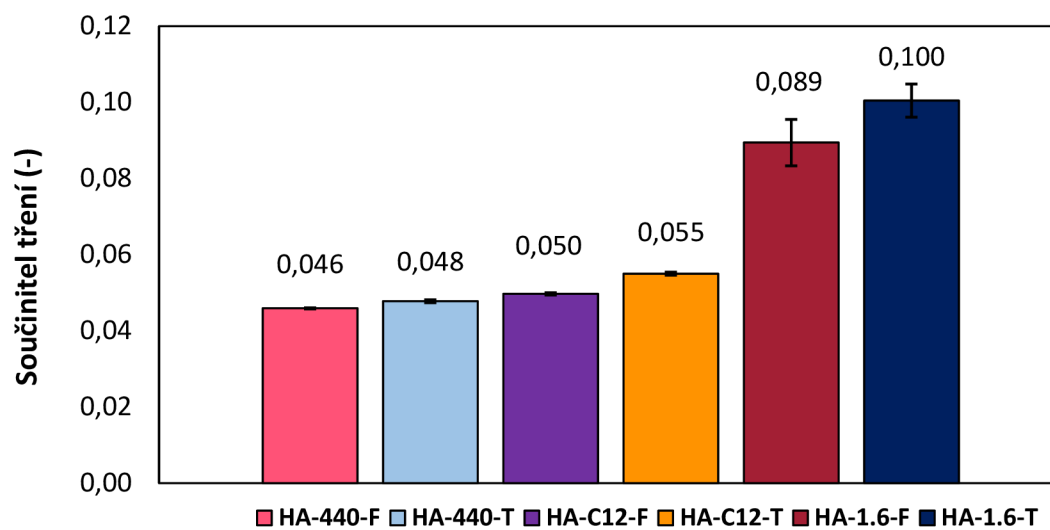
Obr. 5-20 Graf zobrazující změnu součinitele tření derivátu v závislosti na koncentraci polymeru (T-pufry).



Obr. 5-21 Graf zobrazující změnu součinitele tření derivátu v závislosti na koncentraci polymeru (F-pufry).

Vliv pufry

Vzhledem k tomu, že byly použity dva rozdílné pufry, byl analyzován jejich dopad na součinitel tření. V případě vzorků rozpuštěných v T-pufry, který obsahuje trehalózu byla výsledná hodnota součinitele tření vždy vyšší než v případě vzorků rozpuštěných ve fyziologickém pufry. Rozdíly mezi jednotlivými hodnotami se lišily v závislosti na molekulové hmotnosti vzorků nebo koncentraci. Na grafu (Obr. 5-22) jsou vybrané vzorky, které demonstrují rozdíly mezi hodnotami součinitele tření u vzorků s odlišným pufrem. Z grafu lze odvodit, že rozdíly se zvyšovaly s molekulovou hmotností vzorku, kde u nejmenší MH 440 KDa byl rozdíl pouhých 4,3 % u nejvyšší molekulové hmotnosti byl rozdíl již 11 %.



Obr. 5-22 Graf zobrazující změnu součinitele tření měřených vzorků v závislosti na pufru.

6 DISKUZE

Diplomová práce se skládala ze dvou částí, části reologické a části tribologické. Reologická část se zabývala viskozitními charakteristikami a mukoadhezivitou měřených vzorků a jejím cílem bylo zhodnocení měřených vzorků, hlavně vyvíjeného derivátu. Tribologická část se zaměřila na analýzu součinitele tření u komerčních očních kapek, nativních KH a derivátu, a to ve smyslu jejich vzájemného porovnání.

Je potřeba upozornit, že přesné složení derivátu je utajeno, jelikož se jedná o vyvíjenou surovinu a firma Contipro má za cíl si danou surovinu patentovat. Z toho důvodu je zhodnocení derivátu provedeno na základě získaných experimentálních dat a porovnáním s ostatními vzorky. Odtajněnými informacemi jsou průměrná molekulová hmotnost derivátu a to 500 kDa a příměs kyseliny laurové (C12).

6.1 Reologie

Měření viskozitních charakteristik probíhalo na reometru Kinexus Pro+ v laboratořích společnosti Contipro a.s. Použitý reometr vykazoval stabilní hodnoty viskozity od smykové rychlosti 1 s^{-1} a proto jsou od této hodnoty data vyhodnocována. Reologická měření měla za cíl porovnat hodnoty viskozity před a po aplikaci mucinu. K tomu sloužil in-vitro model, který simuloval chování vzorků po aplikaci na očních površích. Oproti mucinům nacházejícím se v reálném oku (MUC5AC, MUC16) byl pro in-vitro model použit sušený gastrin mucin typu II a III. Jedná se však o relevantní imitaci používanou ve vědeckých publikacích, jelikož dostupnost očních mucinů je značně ztížena. Mukoadhezivní vlastnosti polymerů jsou klíčové pro účinnou léčbu syndromu suchého oka, protože ovlivňují dobu působení účinné látky na povrchu oka.

Tento model představený Hassanem a Gallem [37], používala také Graca [19]. Madsen [38] upozorňuje na fakt, že tento model není vhodné používat jako jedinou metodu pro vyhodnocení mukoadhezivity vzorků. Z toho důvodu byl představen ještě koeficient Q na základě vztahu (1), ale vzhledem k tomu, že se jedná o číslo tvořené poměrem viskozit je tato metoda brána pouze jako doplňková. Přesnější metodou je porovnání hodnot viskozity za malé a velké smykové rychlosti s hodnotami ze studie [10] (65 mPa.s a 10 mPa.s).

Při vyhodnocování účinnosti vzorků jsou nejdůležitější mukoadhezivní vlastnosti, následně porovnání naměřené viskozity s hodnotami [10] a následně koeficient Q. Takto bylo také přistupováno k výsledkům v této diplomové práci.

6.1.1 Komerční oční kapky

Reologie očních kapek se zaměřila na popis vybraných produktů nacházejících se aktuálně na trhu. Velkým problémem současných komerčních roztoků je totiž nedostatečná hodnota viskozity [9], kdy během mrkání (namáhání smykovou rychlostí) nedochází k její dostatečné změně. Některé komerční produkty tak nedostatečně simulují nativní slzy, které mají jako ne-newtonské kapaliny rozdíl mezi viskozitou otevřeného oka (nulová smyková rychlost) a viskozitou během mrkání (vysoké smykové rychlosti).

Grafy (**Obr. 5-1** a **Obr. 5-2**) ukazují rozdíly mezi viskozitou před a po aplikaci mucinu. Je patrné, že interakce s mucinem mění viskozitní charakteristiku směrem nahoru. To souvisí s mukoadhezivními vlastnostmi polymerů. Jak lze vidět z hodnot mukoadhezivního indexu (**Tab. 5-2**), některé polymery neprokázaly pozitivní vliv interakce s mucinem. Překvapivé jsou výsledky u kapek Laim Care obsahujících KH. Na základě vlastností KH a studií zkoumajících oční kapky s obsahem KH [9, 16, 19] byla očekávána pozitivní reakce KH s mucinem, která se ovšem nepotvrdila. To je pravděpodobně způsobeno přidruženými látkami očních kapek nebo sterilizačním procesem, jelikož mukoadhezivní vlastnosti nativní KH byly v této práci potvrzeny. Naopak dobré mukoadhezivní dosáhly kapky Thealoz Duo, a to pravděpodobně díky obsahu polysacharidu trehalózy [39], ale také soli KH. Vysoká viskozita u kapek Systane odpovídá poznatkům ze studie [9], kde autoři popisují vliv kombinace více polymerů jako příčinu zvýšení viskozity. Zároveň se u těchto kapek projevíly pozitivní interakce s mucinem. Kapky Refresh obsahující CMC neprojevily pozitivní interakce s mucinem a z hlediska viskozity patřily k nejhorším před i po interakci s mucinem. To koreluje s klinickými studiemi [18], kde byla CMC pacienty považována za méně účinnou než KH. Obecně je patrné, že kapky tvořené větším počtem polymerů dosáhly vyšší viskozity za malých smykových rychlostí, což ukazuje na možnost směřování dalšího vývoje očních kapek.

Další z metod hodnotící účinnost komerčních očních kapek je na základě koeficientu Q (**Tab. 5-1**). Hodnotě pro $Q=6,5$ stanovené ve studii [9] se nejvíce blížily kapky ReNu mající $Q=6,0$, a poté kapky Thealoz s $Q=11,5$. Zbylé kapky měly $Q<3$. Přesnější metodou je porovnání hodnot viskozit z provedených měření (tab. 5-X) s hodnotami udávanými ve studii [10] (65 mPa.s. a 10 mPa.s). Zde je patrné, že jediné komerční kapky blížící se nativním slzám jsou kapky Thealoz (47,2 mPa.s a 4,1 mPa.s). Detailnější analýze kapek Laim Care brání absence informací o molekulové hmotnosti polymeru, kterou výrobce neudává. Na tuto skutečnost naráží i autoři studie [9], kteří poukazují, že absence informací od výrobců nejen o molekulové hmotnosti, ale často i o koncentraci použitých polymerů, značně ztěžuje následnou analýzu výsledků.

Na základě výsledků mukoadhezivních vlastností společně s hodnotami součinitele Q a porovnání viskozit za malé a velké smykové rychlosti lze označit za nejlepší kapky (z testovaných) kapky Thealoz Duo. Jako druhé nejlepší lze stanovit kapky Systane, které prokázaly mukoadhezivní vlastnosti.

6.1.2 Nativní kyseliny hyaluronové a derivát

Vliv molekulové hmotnosti

Z grafu (**Obr. 5-3**) lze vidět viskozitní charakteristiku nativních KH a derivátu rozpuštěných v T-puftru. Hodnoty viskozity pro 440, 589, 1 a 1,6 byly za malé smykové rychlosti 1,7; 3,77; 2,9 a 7,1 mPa.s. Kromě malého rozdílu mezi 589 kDa a 1MDa se jednotlivé nativní kyseliny hyaluronové seřadily vzestupně podle své molekulové hmotnosti což je v souladu s výsledky studií [9, 22]. U derivátu je patrný shear thinning efekt, stejný jako je u nativních slz. V případě H-puftru (**Obr. 5-4**) však pravděpodobně došlo k nežádoucím interakcím mezi složkami puftru a polymerními řetězci kyseliny hyaluronové. Tím nastala změna viskozity jednotlivých vzorků a výsledky neodpovídaly předpokladům ze studií [9, 22]. V tomto konkrétním případě se H-puftr ukázal jako nevhodné rozpouštědlo pro KH a toto se ještě prohloubilo po interakci s mucinem.

Viskozitní charakteristika nativních kyselin hyaluronových i derivátu po interakci s mucinem je detailně ukázána na grafech (**Obr. 5-5 až Obr. 5-8**). Muciny II a III se od sebe odlišují svou chemickou čistotou, která se následně projevuje v míře interakce nejen s molekulami polymerů, ale také s pufry. Chemicky čistší mucin III měl dobré interakce s T-pufrem obsahujícím trehalózu. Došlo zde opět k vzestupnému zarovnání KH podle jejich molekulové hmotnosti. V případě reakce stejného mucinu s H-pufrem ale vznikaly nežádoucí interakce, které vedly k výsledkům odporujícím studiím. V případě mucinu II došlo v případě obou pufřů k zachování vzestupného chování závislosti viskozity na molekulové hmotnosti. Rozdíl byl v hodnotě viskozity derivátu, kde za smykové rychlosti 1 s^{-1} byla viskozita 4952 mPa.s (H-puftr) a 653 mPa.s (T-puftr). To souvisí s větší interakcí mucinu II, H-puftru a derivátu až do hodnot příliš vysokých pro reálné použití v oku. Při pohledu na všechny 4 grafy lze vidět pozitivní interakce mucinu II a H-puftru a mucinu III a T-puftru. Na základě tohoto lze usoudit, že chemická čistota, typ rozpouštědla, ale také výběr polymeru jsou zásadní parametry ovlivňující viskozitní charakteristiku vzorků při vývoji očních kapek.

Výsledky mukoadheze ukázaly, že nejvyššího mukoadhezivního indexu bylo dosaženo u derivátu, a to s velkým rozdílem oproti nativním KH. U nativních KH byla patrná síla mukoadheze, která rostla s rostoucí molekulovou hmotností. Tento poznatek je v souladu se studií Salzillo [22]. U derivátu se jedná o velmi dobrý výsledek značící vhodnost modifikace KH z hlediska navyšování mukoadhezivní.

Vliv koncentrace

Vliv koncentrace byl zkoumán pouze u derivátu na základě jeho viskozitních charakteristik. Vzhledem k vysoké viskozitě při koncentraci 0,3 % byla provedena ještě analýza s koncentrací 0,1 % a 0,2 % a to v obou pufrech. Nárůst viskozity s rostoucí koncentrací v oblasti malých smykových rychlostí viditelný na grafu (**Obr. 5-9**) je v souladu se studií provedenou Salzillo [22].

Po interakci s mucinem dosáhl derivát při koncentraci 0,3 % hodnot viskozity v oblasti malých smykových rychlostí téměř 4000 mPa.s. To je hodnota téměř 100x převyšující viskozitu reálných slz uváděnou Tiffanyem [10]. U nejnižší koncentrace derivátu 0,1 % je patrné přiblížení hodnotám viskozity nativních slz, které uvádí ve své studii Tiffany [10]. V případě koncentrací 0,2 % a 0,3 % jsou hodnoty viskozity příliš vysoké, což by vedlo k ucpaní slzných žláz. Je zajímavé, že derivát o koncentraci 0,3 % měl podobné viskozitní charakteristiky jako derivát o koncentraci 0,1 % po interakci s mucinem. Je ovšem otázkou, zda si preparát v koncentraci 0,1 % zachová dostatečné léčivé účinky, respektive, jak změna koncentrace ovlivní biologické vlastnosti derivátu. Na tuto otázku nelze bez dalšího výzkumu odpovědět.

Vliv sterilizace

Sérii reologických měření uzavřelo naměření viskozity vzorků po proběhlé sterilizaci teplem a sterilizaci filtrací. Jednalo se o doplňková měření, která jsou ale z hlediska vývoje léku potřebná pro certifikaci k lidskému použití. V obou případech sterilizace došlo k poklesu viskozity derivátu, a to až pod úroveň všech ostatních roztoků nativní kyseliny hyaluronové.

V průběhu filtrace byl značný rozdíl mezi molekulovými hmotnostmi KH. S rostoucí molekulovou hmotností rostl i odpor při protlačování roztoku, jelikož pravděpodobně docházelo k ucpaní pórů ve filtru. To souvisí s rostoucí velikostí molekul KH. Největší odpor proti protlačení kladl překvapivě derivát, který má poměrně malou molekulovou hmotnost, ale nejedná se o čistou KH. Zde se pravděpodobně projevoval vliv příměsí jako je kyselina laurová. Vlivem filtrace pravděpodobně dochází k následnému poklesu viskozity z důvodu nepropustnosti filtru pro některé příměsí, ze kterých je derivát složen.

Po sterilizaci teplem byl patrný pokles viskozity již pouhým pohledem. Dříve více viskózní roztoky jako KH (1,6 MDa) a derivát byly nyní méně viskózní, což potvrdila i následná analýza dat. Důvodem je vliv teploty a tlaku v autoklávu, kdy dochází k hydrolýze KH, což je v korelaci se studiemi [40, 41].

6.2 Tribologie

Pro tribologickou část byl vytvořen tribologický model oka a zkonstruovány držáky vzorků (pin/plate). Univerzální tribometr umožnil testování za vysokých posuvných rychlostí, které odpovídají fyziologickým hodnotám mrkání. Tím bylo umožněno analyzovat chování maziv za těchto rychlostí, čehož by na mikrotribometru nebylo možné dosáhnout. Hlavním přínosem této části práce je pohled na chování vzorků za vysokých posuvných rychlostí, která nebyla dosud provedena.

V kapitole 4 je uvedeno, že byly testovány v cyklech 60 s (záběh) a poté 300 s a 300 s měření součinitele tření. Smyslem bylo simulovat možné stárnutí kontaktní čočky jako v případě studie Sternera [27], ale nedošlo k žádným velkým rozdílům mezi hodnotami součinitele tření v prvním a druhém cyklu. Odchytky nebyly pravidelné a jejich velikost byla do 5 %, což lze považovat za zanedbatelné. Z toho důvodu byly následně hodnoty po prvním a druhém cyklu průměrovány do výsledné hodnoty součinitele tření.

6.2.1 Tribologický model oka

Jedním z cílů diplomové práce bylo vytvoření tribologického modelu oka. Ten je tvořen kuličkou a plátem z lékařského silikonu a kontaktní čočkou. Na základě validačních experimentů (kap. 5-1) byla stanovena konfigurace tvrdosti materiálů 10 Sh kulička a 30 Sh plát. Silikon kuličky simulující oční bulvu měl E 300 kPa což se blíží udávanému modulu pružnosti rohovky 207 kPa [36]. Model na bázi silikonů použil i Sterner [32], ale bez kontaktní čočky. Při porovnání se studii Roby [26], Sternera [28] a Su [11, 29], kteří používali skleněné, PMMA nebo PE držáky je tento model bližší reálnému oku. Zlepšení modelu přinesl Mabuchi [31], který využíval kyvadlový simulátor, takže zachoval sférickou kontaktní oblast věrně simulující kontaktní oblast rohovka-čočka-víčko. Nicméně držák pod kontaktní čočkou byl z akrylátu. I oproti tomuto modelu je vytvořený tribologický model posunutím vpřed, především z hlediska materiálového.

Volba lineárně vratného pohybu umožňuje lépe simulovat průběh rychlosti v oku, kdy dochází k periodickému zrychlování a zpomalování což imituje reálné mrkání. Průměrná hodnota dosažené rychlosti byla 156 mm/s. To je v souladu s rychlostí reálného mrkání, která je vědeckými publikacemi udávána v rozmezí 100–300 mm/s [20, 21], jelikož přesná hodnota je individuální každému člověku. Oproti studii Mabuchiho [31], který dosáhl nejvyšší rychlosti 90 mm/s se jedná o značné vylepšení modelu. Ostatní studie [26, 30, 32] měřily součinitel tření za malých posuvných rychlostí 0,1–10 mm/s, což odpovídá režimu otevřeného oka nebo fází začátku mrkání.

Pro stanovení kontaktního tlaku byla vytvořena nelineární analýza (kap. 4.3.1), jelikož vzhledem k charakteristice materiálů nemohla být využita klasická Hertzova teorie. Kontaktní tlak použitý při tribologickém testování byl vyšší, než je v reálném oku (160 kPa oproti udávaným 2–7 kPa). Vzhledem k tomu, že se jednalo o komparativní studii a cílem práce bylo porovnání vzorků mezi sebou, tak vyšší kontaktní tlak nemá na výsledky podstatný vliv. Všechny vzorky byly měřeny za totožných podmínek. Navíc byla vytvořena MKP analýza pro rozmezí fyziologického kontaktního tlaku 2–7 kPa, aby byla známá potřebná normálová síla v případě dalších prací (**Tab. 4-3**).

6.2.2 Komerční oční kapky

U komerčních očních kapek byly rozdíly mezi hodnotami součinitele tření způsobeny převážně aktivní látkou (polymerem). Součinitel tření ovlivňovaly také použité puify, osmolyty a konzervační látky, nicméně dá se předpokládat, že jejich vliv na výslednou hodnotu součinitele tření byl menší než v případě polymerů. Nelze se zde zcela odkázat na literaturu, jelikož analýza stejného typu kapek neproběhla.

Při vyhodnocení součinitele tření komerčních očních kapek je lze rozdělit podle počtu aktivních polymerů. Kapky obsahující nejvyšší počet aktivních látek (Systane) dosáhly nejnižšího součinitele tření a to $0,054 \pm 0,0004$. Mezi kapky obsahující dva polymery se řadily kapky Thealoz, které naopak dosáhly nejvyššího součinitele tření ($0,077 \pm 0,001$). Tyto kapky obsahují jako aktivní polymery Carbopol a sůl kyseliny hyaluronové. Obsahují ale také jako jediné trehalózu, která pravděpodobně stojí za zvýšeným třením. Pro potvrzení nebyly zjištěny studie zabývající se tribologií trehalózy. Následovaly tři kapky obsahující pouze jednu aktivní látku. Jednalo se o kapky Laim Care, ReNu a Refresh. Kapky Laim Care obsahující KH dosáhly druhého nejnižšího součinitele tření ($0,058 \pm 0,0003$) a nejnižšího tření z kapek obsahujících jeden polymer. To značí velmi dobré tribologické vlastnosti KH. Výrobce neuvádí molekulovou hmotnost, což znemožňuje podrobnější analýzu. Kapky ReNu obsahující povidon měly součinitel tření $0,061 \pm 0,0005$. Poslední testované byly kapky Refresh obsahující karboxymethylcelulózu. Ty dosáhly druhého nejvyššího součinitele tření ($0,069 \pm 0,0008$). V porovnání s KH vyšla CMC o poznání hůře.

6.2.3 Nativní kyselina hyaluronová a derivát

Vliv molekulové hmotnosti

Vliv molekulové hmotnosti na součinitel tření je patrný na grafech (**Obr. 5-17** a **Obr. 5-18**) a byl zjišťován za jednotné koncentrace 0,3 %. U obou pufrů došlo ke stejným trendům, kde se jednotlivé vzorky nativní KH srovnaly vzestupně podle své molekulové hmotnosti. To souvisí s viskozitou vzorků a odpovídá režimu hydrodynamického mazání, kterého bylo při těchto rychlostech dosaženo. V tomto režimu tření roste s viskozitou kapalin. Ve studii provedené Sternerem [32], byl naopak pozorován klesající trend s rostoucí molekulovou hmotností nativní KH. Experimenty v této studii ale probíhaly za malých posuvných rychlostí 0,1 mm/s, tedy se jedná o jiný režim mazání. Mabuchi [31], který testoval KH o molekulové hmotnosti 1 MDa dosáhl při rychlosti 90 mm/s součinitele tření 0,05. V experimentech této DP nebyla tato molekulová hmotnost zahrnuta pro tribologická měření. Při porovnání s hodnotami KH o molekulové hmotnosti 589 kDa a 1,6 MDa, které dosáhly součinitele tření $0,052 \pm 0,0004$ (respektive $0,089 \pm 0,0006$) pro fyziologický pufr a $0,056 \pm 0,0007$ (respektive $0,10 \pm 0,004$) pro T-pufr se jedná o validní výsledek. Vyšší součinitel tření bude pravděpodobně souviset s konfigurací, odlišným materiálem kontaktní čočky nebo vyšší posuvnou rychlostí.

U derivátu se výsledný součinitel tření pohyboval mezi hodnotami nativních KH o molekulové hmotnosti 440 kDa a 589 kDa pro oba pufrы. Tento trend neodpovídá naměřené viskozitě vzorků. Ukazuje spíše na vliv struktury modifikovaného polymeru (např. délka řetězce, prostorové uspořádání), kde se pravděpodobně vlivem nedostatečné relaxace polymerů snižuje výsledný součinitel tření. Toto tvrzení nelze bohužel nijak podložit vzhledem k neznámému chemickému složení derivátu.

Vliv koncentrace

Vliv koncentrace na součinitel tření byl sledován u derivátu (**Obr. 5-20**, **Obr. 5-21**). S rostoucí koncentrací rostl i výsledný součinitel tření, a to platilo pro oba pufrы. Tento trend je v souladu se studií Mabuchiho [31], který testoval nativní KH za koncentrace 0,1 % a 0,3 %. Rozdíl mezi koncentracemi v rámci součinitele tření byl ve studii Mabuchiho 28 %. V rámci derivátu byl rozdíl 7,8 % pro T-pufr a 11,1 % pro F-pufr. Průměrné hodnoty součinitele tření u T-pufру (pro vzestupné koncentrace) byly $0,051 \pm 0,0006$; $0,054 \pm 0,0003$ a $0,055 \pm 0,0004$. V případě F-pufру se jednalo o $0,045 \pm 0,0003$; $0,047 \pm 0,0003$ a $0,050 \pm 0,001$. Výsledky jsou tedy v korelaci i v rámci směrodatných odchylek. Také zde platila závislost, že rostoucí viskozita vzorku vedla k vyššímu součiniteli tření.

Vliv pufru

Změna součinitele tření v závislosti na pufru je pozorovatelná na grafu (**Obr. 5-22**). Chemické složení pufrů ovlivňovalo interakce s polymery a v případě T-pufu vedlo k vyššímu součiniteli tření než v případě vzorků s fyziologickým pufrům. To pravděpodobně souvisí s obsahem trehalózy, která reaguje s polymery a navyšuje viskozitu výsledného vzorku.

6.3 Zhodnocení komerčních očních kapek a derivátů

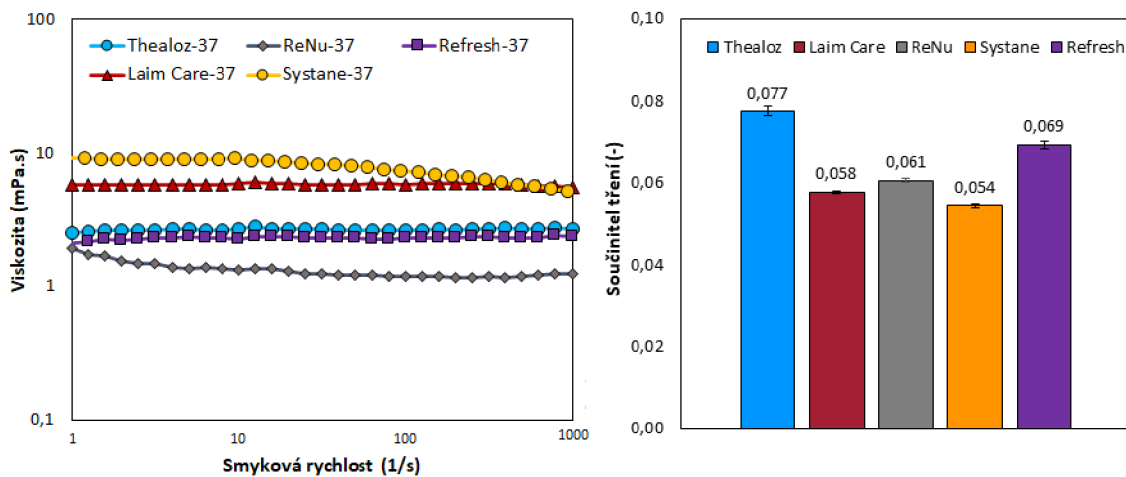
Jak vyplynulo z rešerše, efektivní komerční kapky (respektive umělý slzný film) by měly mít mukoadhezivní vlastnosti, vykazovat shear thinnig efekt a dosahovat hodnot viskozity podobných nativním slzám. Zároveň by měly mít co nejnižší součinitel tření, aby nedocházelo ke zvýšenému mechanickému poškození epitelů.

6.3.1 Zhodnocení komerčních očních kapek

Z provedených experimentů vyplynul značný vliv obsažené aktivní látky (polymeru) na reologii i tribologii vzorků. Nejvyšší viskozitu v průběhu smykové rychlosti dosáhly kapky Systane a Laim Care, které zároveň dosáhly dvou nejnižších součinitelů tření. U kapek Systane se ukázala synergie většího počtu polymerů, které zvyšují viskozitu a zároveň byl zachován nízký součinitel tření. Také se částečně projevíly mukoadhezivní vlastnosti. Kombinace těchto faktorů rozhodla o tom, že se jedná o nejlepší vzorek z testovaných kapek. Kapky Thealoz prokázaly velmi dobré interakce s muciny a součinitel tření měly nejvyšší z testovaných vzorků. Kapky Laim Care s obsahem KH vykázaly dobré hodnoty viskozity i nízký součinitel tření, ale nepotvrdily se u nich mukoadhezivní vlastnosti. Kapky ReNu a Refresh patřily k nejhorším.

Tab. 6-1 Zhodnocení reologických a tribologických vlastností komerčních očních kapek.

Vzorek	Polymer	Mukoadhezivita	Viskozita s mucinem (mPa.s)	Viskozita bez mucinu (mPa.s)	Součinitel tření (-)
Thealoz Duo	Carbopol Sůl KH	Ano	47,2–4,1	2,5–2,7	0,077 +- 0,001
ReNu	PVP	-	12,5–2,1	1,9–1,2	0,061 +-0,0005
Refresh	CMC	-	6,6–6,8	2,1–2,35	0,069 +-0,0008
Laim Care	KH	-	8–5,1	5,7–5,6	0,058 +-0,0003
Systane	Polyethylenglykol, Glykol, Hydroxypropyl guar	Ano	17,2–7,6	9,1–5,3	0,054 +-0,0004

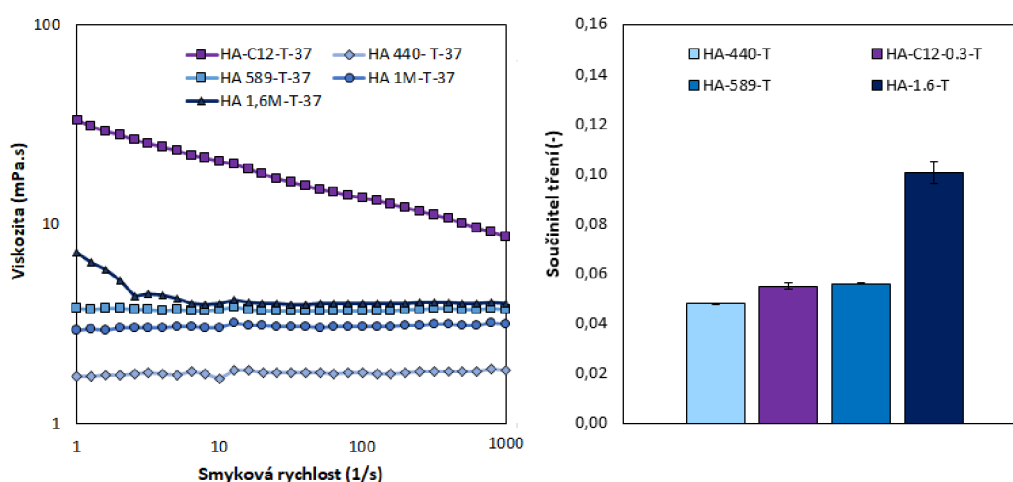


Obr. 6-1 Porovnání reologie a tribologie komerčních očních kapek.

6.3.2 Zhodnocení derivátu

Jak již bylo zmíněno v úvodu kapitoly přesné složení derivátu je utajeno a z toho důvodu je zhodnocení derivátu provedeno na základě získaných experimentálních dat a porovnáním s ostatními vzorky. Odpovědi na vědecké otázky stanovené v kapitole 3 vychází z výsledků shrnutých v předchozích dvou podkapitolách diskuze.

První vědecká otázka pracovala s hypotézou, že modifikovaná KH (derivát) dosáhne vyšší viskozity v porovnání s nativními KH. To se potvrdilo, jelikož viskozitní charakteristika derivátu byla vždy vyšší než u všech ostatních nativních kyselin hyaluronových s výjimkou závěrečných sterilizačních procesů. Koncentrace derivátu se ukázala jako významný parametr, která při interakci s mucinem značně ovlivňuje viskozitu převážně za malých smykových rychlostí.



Obr. 6-2 Porovnání reologie a tribologie derivátu.

Vzhledem k tomu, že má derivát molekulovou hmotnost přibližně 500 kDa jedná se o velmi dobrý výsledek značící možné směřování ve vývoji očních kapek. Dosažená vyšší viskozita u menší molekulové hmotnosti ukazuje, že pro deriváty (respektive modifikované KH) neplatí klasický trend rostoucí viskozity s molekulovou hmotností udávaný ve vědeckých článcích. Menší molekulová hmotnost je i finanční výhodou, jelikož výsledný produkt se následně může uvádět na trh s výhodnější cenou. Ekonomické hledisko je tedy jedním z faktorů, jelikož kapky na syndrom suchého oka jsou plně hrazeny koncovým uživatelem a výsledná cena zde může být rozhodujícím parametrem. Proti této konfiguraci derivátu se ukázaly reologické výsledky sterilizace, které ukázaly na značný pokles viskozity související s hydrolýzou KH.

Z hlediska tribologie se u derivátu projevil velmi malý součinitel tření při porovnání s viskozitou (**Obr. 6-2**). Hodnota součinitele tření se umístila mezi nativními KH o molekulové hmotnosti 440 kDa a 589 kDa. V tomto bodě odpovídá výsledek experimentů stanovené hypotéze, která vycházela z rostoucího součinitele tření v závislosti na molekulové hmotnosti. Ačkoliv se původně předpokládalo, že součinitel tření bude vzhledem k předpokládané viskozitě nejvyšší nebylo tomu tak. Závislost součinitele tření derivátu na jeho molekulové hmotnosti je s ohledem na modifikované KH pozitivní. Je pravděpodobné, že u derivátu vlivem změněné struktury polymerů nedochází k jejich dostatečné relaxaci (oproti nativním KH), čímž je výsledný součinitel tření nižší. Jedná se o hypotézu, která nemůže být detailněji prozkoumána z důvodu utajeného složení derivátu. Vliv kyseliny laurové na tribologii nebyl ve vědeckých článcích zjištěn.

Při porovnání derivátu s hodnotami součinitele tření komerčních očních kapek lze vidět, že výsledná hodnota součinitele tření derivátu byla za koncentrace 0,3 % $0,055 \pm 0,0004$ v T-pufu. To je jen o tisícinu vyšší hodnota než v případě kapek Systane, které měly součinitel tření ze všech kapek nejmenší. V případě pufu fyziologického byla hodnota součinitele tření derivátu menší o pět tisícín. Při snížení koncentrace byl výsledný součinitel tření derivátu ještě nižší.

Úplným závěrem lze tedy říct, že modifikace KH prokázala dobré viskozitní vlastnosti v kombinaci s mukoadhezivitou a nízkým součinitelem tření. Z toho lze usoudit, že cesta vývoje komerčních očních kapek modifikací KH je nadějným řešením. V porovnání s komerčními očními kapkami byl derivát jako surovina ve všech ohledech lepší, nicméně se nejedná o výsledný produkt. Vliv sterilizace ukazuje, že tento proces může ovlivňovat viskozitu derivátu a je potřeba další výzkum v této oblasti.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci řešení projektu TAČR Trend a jednalo se o první a částečně druhou etapu tohoto projektu. V diplomové práci byla zkoumána reologie a tribologie vybraných roztoků komerčních očních kapek a kyseliny hyaluronové, a to jak v nativní podobě, tak v podobě vyvíjeného derivátu. Hlavním přínosem diplomové práce je komplexní pohled, který umožňuje charakterizovat vyvíjený derivát v porovnání s dostupnými produkty na trhu a také s nativní formou kyseliny hyaluronové ze které derivát vychází. Výstupem práce je článek ve vědeckém časopisu *International Journal of Biological Macromolecules*.

Reologická část práce se zaměřila na zjištění viskozitních charakteristik vzorků před a po aplikaci mucinu. In vitro model obsahující mucin umožnil predikovat hodnoty viskozity vzorků po aplikaci na oční povrch, kde v reálném případě dojde k interakci s očními muciny na rohovce. Výsledky ukázaly značné rozdíly ve viskozitě, kde aplikace mucinu nejen, že mění hodnoty viskozity, ale také často chování jednotlivých polymerních řetězců. Interakce mucinu s polymery je ovlivněna jejich mukoadhezivními vlastnostmi, které jsou v této práci představeny pomocí mukoadhezivního indexu. Některé polymery v komerčních očních kapkách neprokázaly afinitu k mucinu, což negativně ovlivnilo jejich mukoadhezivitu a viskozitu.

Tribologická část práce hodnotila vyvíjený derivát, nativní kyseliny hyaluronové a komerční oční kapky z hlediska průměrného součinitele tření. Analýza součinitele tření proběhla na vytvořeném tribologickém modelu oka v konfiguraci pin-on-plate, který simuluje posuvné rychlosti odpovídající fyziologickému mrkání. Výsledky měření ukázaly, že hodnota součinitele tření je ovlivněna typem polymeru, molekulovou hmotností, ale také koncentrací roztoků a zvoleným pufrem. Měření potvrdila, že kyselina hyaluronová může dosahovat velmi malého součinitele tření v porovnání s ostatními testovanými polymery, což ji řadí jako vhodnou surovinu pro lék na léčbu syndromu suchého oka.

Vyvíjený derivát prokázal, že modifikace kyseliny hyaluronové je vhodnou cestou pro vývoj léku na léčbu syndromu suchého oka. Výsledky reologických i tribologických měření potvrdily, že derivát dosahuje shear thinning vlastností a zároveň si zachovává malý součinitel tření v porovnání s ostatními měřenými vzorky. Zároveň se potvrdily i pozitivní mukoadhezivní vlastnosti derivátu, které navíc překonaly mukoadhezivitu nativních kyselin hyaluronových.

Tato práce se zaměřila na hodnocení reologie a součinitele tření, ale neposkytuje informace o tloušťce a formování umělého slzného filmu. Navazující výzkum by se měly zaměřit na evaluaci tloušťky umělého slzného filmu pomocí optických metod jako je fluorescenční mikroskopie. Tím bude možné a dále zpřesnit hodnocení derivátu i z tohoto hlediska.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] AGGARWAL, Shruti a Anat GALOR. What's new in dry eye disease diagnosis? Current advances and challenges [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*. 2018, roč. 7, č. 0, s. 1–7. ISSN 1759796X.
- [2] ODEHNAL, Milan a Jiří MALEC. Problematika suchého oka. 2013, roč. 27, č. 2.
- [3] LEE, David, Qiaozhi LU, Sven D. SOMMERFELD, Amanda CHAN, Nikhil G. MENON, Tannin A. SCHMIDT, Jennifer H. ELISSEEFF a Anirudha SINGH. Targeted delivery of hyaluronic acid to the ocular surface by a polymer-peptide conjugate system for dry eye disease. *Acta Biomaterialia*. 2017, roč. 55, s. 163–171. ISSN 18787568.
- [4] ROSS, G.M. *Ocular biotribology and contact lens lubrication mechanisms*. 2009. Dostupné z: <http://eprints.aston.ac.uk/10925/>
- [5] FRANCIS W. PRICE, JR., MD MATTHEW T. FENG, MD. Descemet's Stripping Only (DSO)... a substitute for DMEK? *Descemet Stripping Only (DSO)*. 2020. Dostupné z: [http://www.cornea.org/Learning-Center/Descemet-s-Stripping-Only-\(DSO\).aspx](http://www.cornea.org/Learning-Center/Descemet-s-Stripping-Only-(DSO).aspx)
- [6] ANTON W. KOLLER. The friction coefficient of soft contact lens surface in relation to comfort and performance. 2014. (Unpublished Doctoral thesis, City University London). Dostupné z: <http://openaccess.city.ac.uk/13791/>
- [7] URSAPHARM SPOL. S R.O. *Syndrom suchého oka*. 2019. Dostupné z: <https://evotears.com/cz/syndrom-sucheho-oka/>
- [8] VOKROJOVÁ, Mudr Magdaléna, D PH a F N KV. Syndrom suchého oka aneb když běžná lubrikancia nestačí. 2016, s. 0–4.
- [9] MÜLLER-LIERHEIM, Wolfgang G.K. Why chain length of hyaluronan in eye drops matters. *Diagnostics*. 2020, roč. 10, č. 8. ISSN 20754418.
- [10] TIFFANY, John M. Viscoelastic Properties of Human Tears and Polymer Solutions. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1994, s. 267–270. doi: 10.1007/978-1-4615-2417-5_45
- [11] SU, Chen-Ying, Chi-Chun LAI, Lung-Kun YEH, Kuan-Yi LI, Bo-Wu SHIH, Ching-Li TSENG a Hsu-Wei FANG. The characteristics of a preservative-free contact lens care solution on lysozyme adsorption and interfacial friction behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018, roč. 171, č. June, s. 538–543. ISSN 09277765.
- [12] ISO 18369-1:2017, Ophthalmic optics — Contact lenses — Part 1: Vocabulary, classification system and recommendations for labelling specifications..
- [13] KEIR, Nancy a Lyndon JONES. Wettability and Silicone Hydrogel Lenses. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2013, roč. 39, č. 1, s. 99–107. ISSN 1542-2321.
- [14] KOJIMA, Takashi. Contact lens-associated dry eye disease: Recent advances worldwide and in Japan. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2018, roč. 59, č. 14 Special Issue, s. DES102–DES108. ISSN 15525783.

- [15] HUYNH, Alexander a Ronny PRIEFER. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. *Carbohydrate Research*. 2020, roč. 489, č. February, s. 107950. ISSN 00086215.
- [16] ARAGONA, Pasquale, Peter A. SIMMONS, Hongpeng WANG a Tao WANG. Physicochemical Properties of Hyaluronic Acid-Based Lubricant Eye Drops. *Translational Vision Science & Technology*. 2019, roč. 8, č. 6, s. 2. ISSN 2164-2591.
- [17] SMART, J. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, roč. 57, č. 11, s. 1556–1568. ISSN 0169409X.
- [18] ANDREWS, Gavin P., Thomas P. LAVERTY a David S. JONES. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, roč. 71, č. 3, s. 505–518. ISSN 09396411.
- [19] GRAÇA, Angélica, Lídia GONÇALVES, Sara RAPOSO, Helena RIBEIRO a Joana MARTO. Useful In Vitro Techniques to Evaluate the Mucoadhesive Properties of Hyaluronic Acid-Based Ocular Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2018, roč. 10, č. 3, s. 110. ISSN 1999-4923.
- [20] PULT, Heiko, Samuele G.P. TOSATTI, Nicholas D. SPENCER, Jean Michel ASFOUR, Michael EBENHOCH a Paul J. MURPHY. Spontaneous Blinking from a Tribological Viewpoint. *Ocular Surface*. 2015, roč. 13, č. 3, s. 236–249. ISSN 19375913.
- [21] DUNN, Alison C., John A. TICHY, Juan M. URUEÑA a W.Gregory SAWYER. Lubrication regimes in contact lens wear during a blink. *Tribology International*. 2013, roč. 63, s. 45–50. ISSN 0301679X.
- [22] SALZILLO, Rosanna, Chiara SCHIRALDI, Luisana CORSUTO, Antonella D'AGOSTINO, Rosanna FILOSA, Mario DE ROSA a Annalisa LA GATTA. Optimization of hyaluronan-based eye drop formulations. *Carbohydrate Polymers*. 2016, roč. 153, s. 275–283. ISSN 01448617.
- [23] GROSS, Dorothea, Marc CHILDS a Jean-Marie PIATON. Comparative study of 0.1% hyaluronic acid versus 0.5% carboxymethylcellulose in patients with dry eye associated with moderate keratitis or keratoconjunctivitis. *Clinical Ophthalmology*. 2018, roč. Volume 12, s. 1081–1088. ISSN 1177-5483.
- [24] CONDON, Patrick I., Charles G. MCEWEN, Mark WRIGHT, Graeme MACKINTOSH, Robin J. PRESCOTT a Carolyn MCDONALD. Double blind, randomised, placebo controlled, crossover, multicentre study to determine the efficacy of a 0.1% (w/v) sodium hyaluronate solution (Fermavisc) in the treatment of dry eye syndrome. *British Journal of Ophthalmology*. 1999, roč. 83, č. 10, s. 1121–1124. ISSN 00071161.
- [25] YOU, In Cheon, Ying LI, Rujun JIN, Min AHN, Won CHOI a Kyung Chul YOON. Comparison of 0.1%, 0.18%, and 0.3% Hyaluronic Acid Eye Drops in the Treatment of Experimental Dry Eye. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018, roč. 34, č. 8, s. 557–564. ISSN 1080-7683.
- [26] ROBA, M., E. G. DUNCAN, G. A. HILL, N. D. SPENCER a S. G.P. TOSATTI. Friction measurements on contact lenses in their operating environment. *Tribology Letters*. 2011, roč. 44, č. 3, s. 387–397. ISSN 10238883.

- [27] STERNER, Olof, Rudolf AESCHLIMANN, Stefan ZÜRCHER, Kathrine OSBORN LORENZ, Joseph KAKKASSERY, Nicholas D. SPENCER a Samuele G.P. TOSATTI. Friction measurements on contact lenses in a physiologically relevant environment: Effect of testing conditions on friction. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2016, roč. 57, č. 13, s. 5383–5392. ISSN 15525783.
- [28] STERNER, O., R. AESCHLIMANN, S. ZÜRCHER, C. SCALES, D. RIEDERER, N. D. SPENCER a S. G.P. TOSATTI. Tribological Classification of Contact Lenses: From Coefficient of Friction to Sliding Work. *Tribology Letters*. 2016, roč. 63, č. 1. ISSN 10238883.
- [29] SU, Chen Ying, Lung Kun YEH, Chi Chun LAI, Kuan Yi LI, Ching Li TSENG a Hsu Wei FANG. Effects of lysosomal deposition on the friction coefficient of hydrogel contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2019, č. March, s. 1–5. ISSN 14765411.
- [30] DUNN, Alison C., Juan Manuel URUEÑA, Enrique PUIG, Victor L. PEREZ a W. Gregory SAWYER. Friction Coefficient Measurement of an In Vivo Murine Cornea. *Tribology Letters*. 2013, roč. 49, č. 1, s. 145–149. ISSN 1023-8883.
- [31] MABUCHI, Kiyoshi, Hiroko IWASHITA, Rina SAKAI, Masanobu UJIHIRA a Yuichi HORI. Development of a pendulum machine for measuring contact lens friction. *Biosurface and Biotribology*. 2021, č. October 2020, s. bsb2.12004. ISSN 2405-4518.
- [32] STERNER, Olof, Chrysanthi KARAGEORGAKI, Massimiliano ZÜRCHER, Stefan ZÜRCHER, Charles W. SCALES, Zohra FADLI, Nicholas D. SPENCER a Samuele G. P. TOSATTI. Reducing Friction in the Eye: A Comparative Study of Lubrication by Surface-Anchored Synthetic and Natural Ocular Mucin Analogues. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017, roč. 9, č. 23, s. 20150–20160. ISSN 1944-8244.
- [33] *Research grade rheometer for complex fluids characterization* [online]. [cit. 2020-11-1]. Dostupné z: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/products-solutions/rheology/kinexus-pro/>
- [34] BRUKER. UMT TriboLab Mechanical Tester and Tribometer. *Datasheet*. 2015.
- [35] *Sartorius Ophthalsart NML* [online]. 2021. [cit. 2021-2-20] Dostupné z: <https://sartorius.cz/produkt/sartorius-ophthalsart-nml/>
- [36] SHIH, Po-Jen, Chun-Ju HUANG, Tzu-Han HUANG, Hung-Chou LIN, Jia-Yush YEN, I-Jong WANG, Hui-Jyun CAO, Wen-Pin SHIH a Chi-An DAI. Estimation of the Corneal Young's Modulus In Vivo Based on a Fluid-Filled Spherical-Shell Model with Scheimpflug Imaging. *Journal of Ophthalmology*. 2017, roč. 2017, s. 1–11. ISSN 2090-004X.
- [37] HASSAN, Emad Eldin a James M. GALLO. *A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength*. 1990. ISSN 1573904X. Dostupné z: doi:
- [38] MADSEN, Flemming. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. *Journal of Controlled Release*. 1998, roč. 50, č. 1–3, s. 167–178. ISSN 01683659.
- [39] LAIHIA, Jarmo a Kai KAARNIRANTA. Trehalose for Ocular Surface Health. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 5, s. 809. ISSN 2218-273X.

- [40] SAND, B. B., K. MARNER a M. S. NORN. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca: A double masked clinical trial. *Acta Ophthalmologica*. 1989, roč. 67, č. 2, s. 181–183. ISSN 17553768.
- [41] DELUISE, V P a W S PETERSON. The use of topical Healon tears in the management of refractory dry-eye syndrome. *Annals of ophthalmology*. 1984, roč. 16, č. 9, s. 823—824. ISSN 0003-4886.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK, SYMBOLŮ A VELIČIN

<i>CLADE</i>	contact lens associated dry eye
<i>CMC</i>	karboxymethylcelulóza
<i>DEWS</i>	Dry Eye WorkShop
<i>HEMA</i>	hydroxymethylakrylát
<i>KH</i>	kyselina hyaluronová
<i>MH</i>	molekulová hmotnost
<i>MMPs</i>	matrix metaloproteázy
<i>NVP</i>	vinylpyrolidin
<i>PBS</i>	fosfátový pufr
<i>PDI</i>	polydispersní index
<i>PDMS</i>	polydimethylsiloxan
<i>PE</i>	polyethylén
<i>PMMA</i>	polymethylmethakrylát
<i>polyHEMA</i>	polyhydroxyethylmetakrylát
<i>PTFE</i>	polytetrafluorethylen
<i>PVA</i>	polyvinylalkohol
<i>PVP</i>	polyvinylpyrolidin=povidon
<i>TLF</i>	tear-like fluid
<i>TMS</i>	tear mimicking solution
<i>VDT</i>	visual display terminal
Δ	mukoadhezivní index
<i>E</i>	modul pružnosti
F_n	normálová síla

v	rychlost
μ	součinitel tření
W_{avg}	průměrná posuvná práce
η	dynamická viskozita
Q	koeficient viskoelastivity

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obr. 1-1	Oko postižené syndromem suchého oka.	15
Obr. 2-1	Schématické zobrazení 5 vrstev nacházejících se v rohovce [5].	16
Obr. 2-2	Schéma lakrimálního systému, kde a) slzná žláza, b) horní lakrimální punctum, c) horní slzný kanál, d) slzný váček, e) spodní lakrimální punctum, f) dolní slzný kanál, g) nosolakrimální kanál [6].	17
Obr. 2-3	Schématické zobrazení slzného filmu [7].	18
Obr. 2-4	Ukázka správné aplikace očních kapek [4].	23
Obr. 2-5	Stribeckova křivka zobrazující vývoj součinitele tření u zdravých jedinců (zelená křivka) a u pacientů trpících syndromem suchého oka (červená křivka) [19].	25
Obr. 2-6	Graf ukazující vliv součinitele tření u uživatelů kontaktních čoček (s malým i vyšším součinitelem tření) a s normálními i zborcenými kartáčky [19].	28
Obr. 2-7	Viskozita v bodě 0 pro jednotlivé vzorky HA v závislosti na jejich MW a koncentraci [21].	30
Obr. 2-8	Viskozitní křivky pro vybrané roztoky HA a kapky Blugel [21].	31
Obr. 2-9	Mukoadhezivní index jako funkce smykové rychlosti u měřených vzorků KH [21].	31
Obr. 2-10	Výsledky analýzy MH u očních kapek na bázi kyseliny hyaluronové [15].	32
Obr. 2-11	Popis použitých veličin v numerickém modelu [20].	35
Obr. 2-12	Profily tlaku podél očního víčka pro všechny 4 počáteční rychlosti $v_3 = 10, 25, 50$ a 100 mm/s [20].	35
Obr. 2-13	Schématické zobrazení držáku čočky včetně schéma měření [25].	36
Obr. 2-14	Vliv počtu zátěžných cyklů na součinitel tření (a), vliv povrchové úpravy skleněného protikusu na součinitel tření (b) [25].	37
Obr. 2-15	Schéma měření součinitele tření, které použil Sterner a kol. [26].	38
Obr. 2-16	Graf znázorňující vliv TLF a TMS na součinitel tření u zkoumaných čoček při počtu opakování < 10 a zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 [26].	38
Obr. 2-17	Graf znázorňující vliv TLF a TMS na součinitel tření u zkoumaných čoček při počtu opakování > 10 a zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 [26].	39
Obr. 2-18	Schématické zobrazení měřicí aparatury jakou použil Sterner [27].	39
Obr. 2-19	Porovnání mezi modelem EFM (plná čára) a Hertzem (čárkovaná čára) při predikci jak velká bude kontaktní plocha během experimentu [27].	40

Obr. 2-20 Grafy zobrazující výsledky experimentů při zatěžovacích cyklech 0, 50 a 100 s porovnáním hodnoty naměřené na králičí rohovce; (a) velikost smykového napětí; b) velikost průměrné práce [27].	41
Obr. 2-21 Schématické zobrazení měřicího řetězce (a), polyethylenového držáku čočky (b) [11].	41
Obr. 2-22 Naměřené součinitele tření u čoček Etafilcon-A a Polymacon s ohledem na použitá maziva [11].	42
Obr. 2-23 Graf ukazující hodnoty součinitele tření pro různé druhy kontaktních čoček s použitím různých koncentrací roztoků [28].	43
Obr. 2-24 Měřící schéma znázorňující měřící sondu a myší rohovku [29].	44
Obr. 2-25 Graf znázorňující naměřené hodnoty součinitele tření po 72 cyklech recipročního pohybu[29].	44
Obr. 2-26 Stereometrické snímky ukazující a) rohovku poškozenou negativním testem, b) mechanicky nepoškozenou rohovku po konci experimentu, poškozené buňky vznikly vlivem nedostatečné lubrikace (suchost oka) [29].	45
Obr. 2-27 Obrázek znázorňující řez držákem kontaktní čočky [30].	46
Obr. 2-28 Graf znázorňující výsledné hodnoty součinitele tření pro jednotlivá maziva [30].	46
Obr. 2-29 Hodnoty součinitele tření pro PVP a KH v prostředí TLF a PBS [31].	47
Obr. 4-1 Schéma experimentů diplomové práce.	52
Obr. 4-2 Reometr Kinexus Pro+ [32].	53
Obr. 4-3 Bruker UMT TriboLab [33].	53
Obr. 4-4 Konfigurace cone-on-plate.	54
Obr. 4-5 Stříkačkový filtr Sartorius Ophtalsart NML [34].	57
Obr. 4-6 Řez pinem zobrazující uložení silikonové kuličky a kontaktní čočky v držáku.	57
Obr. 4-7 Ukázka meshe (vlevo) a kontaktní oblasti (vpravo) z provedené nelineární analýzy.	59
Obr. 4-8 Dvě varianty držáky modelu oka.	61
Obr. 4-9 3D model sestavy vany.	61
Obr. 4-10 Konfigurace pin-on-plate.	62
Obr. 4-11 Schématické zobrazení řezu vany se vzorkem.	62
Obr. 5-1 Průběh viskozity komerčních očních kapek v rozmezí 1 s ⁻¹ a 1000 s ⁻¹	68

Obr. 5-2 Viskozitní charakteristika komerčních očních kapek po jejich interakci s mucinem III.....	68
Obr. 5-3 Viskozitní charakteristika vzorků KH v T-pufru.	70
Obr. 5-4 Viskozitní charakteristika vzorků KH v H-pufru.....	70
Obr. 5-5 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M3 v T-pufru.	71
Obr. 5-6 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M2 v T-pufru.	71
Obr. 5-7 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M3 v H-pufru.....	72
Obr. 5-8 Viskozitní charakteristika vzorků KH po interakci s M2 v H-pufru.....	72
Obr. 5-9 Viskozitní charakteristika derivátu s rozdílnou koncentrací derivátu.	73
Obr. 5-10 Viskozitní charakteristika derivátu s rozdílnou koncentrací derivátu po aplikaci mucinu.....	73
Obr. 5-11 Vliv filtrace na viskozitní charakteristiku vzorků.	74
Obr. 5-12 Vliv sterilizace v autoklávu na viskozitní charakteristiku vzorků.	75
Obr. 5-13 Vliv tvrdosti materiálu kuličky na součinitel tření za $F_n = 1 \text{ N}$	76
Obr. 5-14 Průběh součinitele tření komerčních očních kapek v závislosti na čase, $n=10$. 77	
Obr. 5-15 Průměrná hodnota součinitele tření komerčních očních kapek za velkých smykových rychlostí.	77
Obr. 5-16 Vývoj součinitele tření v závislosti na čase pro vzorky v F-pufru.....	78
Obr. 5-17 Sloupcový graf zobrazující průměrné hodnoty součinitele tření KH a derivátu v T-pufru.	78
Obr. 5-18 Sloupcový graf zobrazující průměrné hodnoty součinitele tření KH a derivátu v F-pufru.	79
Obr. 5-19 Vývoj součinitele tření v závislosti na čase pro různé koncentrace derivátu v F-pufru.....	79
Obr. 5-20 Graf zobrazující změnu součinitele tření derivátu v závislosti na koncentraci polymeru (T-pufr).	80
Obr. 5-21 Graf zobrazující změnu součinitele tření derivátu v závislosti na koncentraci polymeru (F-pufr).	80
Obr. 5-22 Graf zobrazující změnu součinitele tření měřených vzorků v závislosti na pufru.	81
Obr. 6-1 Porovnání reologie a tribologie komerčních očních kapek.	90
Obr. 6-2 Porovnání reologie a tribologie derivátu.	90

11 SEZNAM TABULEK

Tab. 4-1 Parametry reologických experimentů	55
Tab. 4-2 Parametry použitých kontaktních čoček	58
Tab. 4-3 Hodnoty normálových sil pro interval tlaků 2–7 kPa pro jednotlivé kontaktní čočky	60
Tab. 4-4 Parametry tribologických experimentů proběhlé ve druhé a třetí fázi.....	63
Tab. 4-5 Maziva použitá pro měření viskozity a mukoadhezivitu	65
Tab. 4-6 Maziva použitá pro měření součinitele tření	65
Tab. 4-7 Pufry, jejich označení a složení	66
Tab. 4-8 Použité oční kapky a jejich složení	66
Tab. 5-1 Tabulka hodnot viskozity a koeficientu Q u vzorků po reakci s mucinem III....	69
Tab. 5-2 Mukoadhezivní index komerčních očních kapek pro smykové rychlosti 1; 10; 100 a 1000 s ⁻¹	69
Tab. 5-3 Mukoadhezivní index pro smykové rychlosti 0,1; 1; 10; 100 a 1000 s ⁻¹	74
Tab. 6-1 Zhodnocení reologických a tribologických vlastností komerčních očních kapek	89

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Protokoly_Reologie

Příloha 2 – Výkresy