

## ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Ε. Ρίζος<sup>1</sup>, Π. Τυρνεοπούλου<sup>2</sup>, Λ. Παπάζογλου<sup>2</sup>, Ν. Διακάκης<sup>2</sup>, Α. Αγγελή<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

<sup>2</sup>Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

([erizos@auth.gr](mailto:erizos@auth.gr), \*[aggeli@cheng.auth.gr](mailto:aggeli@cheng.auth.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

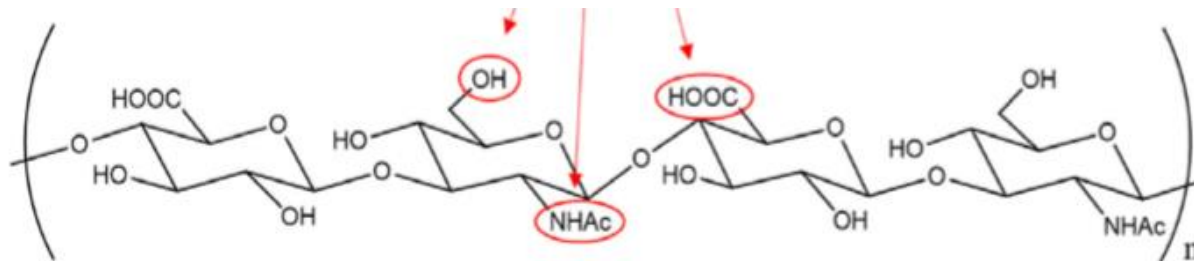
Το αρθρικό υγρό (ΑΥ) αποτελεί ένα σημαντικό βιολογικό υλικό για τον οργανισμό, καθώς είναι υπεύθυνο για την απρόσκοπτη λειτουργία των αρθρώσεων. Κύριος ρόλος του είναι η προστασία του αρθρικού χόνδρου, αποτελώντας ταυτόχρονα την πηγή του σε θρεπτικά συστατικά και αποβάλλοντας τις άχρηστες ουσίες από αυτόν. Λόγω της ιξωδοελαστικότητας που του προσφέρει το σημαντικότερο συστατικό του, το υαλουρονικό οξύ (ΥΟ), συνεισφέρει στη λίπανση των επιφανειών του χόνδρου και στην απορρόφηση των πιέσεων που ασκούνται στις αρθρώσεις κατά την κίνηση. Για να μπορέσει το ΑΥ να επιτελέσει τις παραπάνω λειτουργίες του, κρίσιμο ρόλο παίζει η κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Στην παρούσα διεπιστημονική μελέτη πραγματοποιήθηκε η πρώτη συστηματική προσπάθεια καταγραφής των ρεολογικών ιδιοτήτων του υγιούς ΑΥ. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η μηχανική συμπεριφορά μίας μεγάλης σειράς δειγμάτων ΑΥ προερχόμενη από διαφορετικούς τύπους αρθρώσεων ίππων, ενός ζωικού μοντέλου που προσομοιάζει πολύ καλά τη λειτουργία των ανθρωπίνων αρθρώσεων, έχοντας βέβαια και από μόνο του πολύ μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Τα αποτελέσματα της έρευνας φανερώνουν τη σημασία της βιοποικιλότητας των οργανισμών στις μετρούμενες ρεολογικές παραμέτρους. Αποτελούν επίσης μία καλή βάση δεδομένων εμβιομηχανικών ιδιοτήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναφορά για την μελέτη και την παρακολούθηση της παθολογικής κατάστασης του ΑΥ, χρησιμοποιώντας τη ρεολογία του ΑΥ ως πιθανό βιολογικό δείκτη για την οστεοαρθρίτιδα, αναδεικνύοντας τη τάση για πρόληψη αλλά και εξατομικευμένη προσέγγιση της θεραπείας.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αρθρικό υγρό είναι ένα παράγωγο του πλάσματος του αίματος, το οποίο παράγεται φυσιολογικά μέσω μιας διαδικασίας ώσμωσης του μέσω της αρθρικής μεμβράνης στην αρθρική κοιλότητα και περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια και υαλουρονικό οξύ (ΥΟ) <sup>[1,2]</sup>. Ως προς τη λειτουργία του, έχει διττό ρόλο να διαδραματίσει. Από βιοχημική άποψη, αποτελεί ένα εξαιρετικό μέσο μεταφοράς θρεπτικών συστατικών, όπως νερό και γλυκόζη, στα κύτταρα του αρθρικού χόνδρου <sup>[3,4]</sup>. Από εμβιομηχανική σκοπιά, λόγω της αξιοσημείωτης ρεολογικής συμπεριφοράς που παρουσιάζει, είναι υπεύθυνο για την αποτελεσματική λίπανση των επιφανειών του αρθρικού χόνδρου καθώς και για την απορρόφηση των μηχανικών πιέσεων που δέχονται οι αρθρώσεις κατά την κίνησή τους <sup>[5]</sup>. Το τελευταίο συμβαίνει λόγω της ιξωδοελαστικής φύσης του, που σημαίνει πως παρουσιάζει ταυτόχρονα ιξώδεις και ελαστικές ιδιότητες ανάλογα με το φορτίο το οποίο δέχεται. Συγκεκριμένα, όταν υπόκειται σε χαμηλές συχνότητες παραμόρφωσης, οι οποίες αντιστοιχούν σε αργές κινήσεις της άρθρωσης, το ΑΥ έχει την ικανότητα να λειτουργεί ως ιξώδες υγρό, λιπαίνοντας τις επιφάνειες του αρθρικού χόνδρου. Αντίστοιχα, κατά την εφαρμογή σε αυτό υψηλών συχνοτήτων παραμόρφωσης (δηλαδή σε γρήγορες και απότομες κινήσεις της άρθρωσης), συμπεριφέρεται ως ελαστικό υγρό. Αποθηκεύει δηλαδή την ενέργεια από τις μηχανικές πιέσεις που ασκούνται στις αρθρώσεις κατά την κίνηση, προστατεύοντάς τες από τη φθορά, απορροφώντας τους κραδασμούς.

Το συστατικό που φέρεται να είναι κυρίως υπεύθυνο για τον ιξωδοελαστικό χαρακτήρα και γενικότερα για τη ρεολογική συμπεριφορά που παρουσιάζει το ΑΥ είναι το υαλουρονικό οξύ (ΥΟ),

ένας υψηλού μοριακού βάρους γραμμικός πολυσακχαρίτης, τα μόρια του οποίου στο υγρό συνθέτουν μία δομή με αξιοσημείωτη ιξωδοελαστικότητα (Σχήμα 1). Η θεωρία της συνεισφοράς των πρωτεϊνών, μέσω της συσσωμάτωσης και αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια του ΥΟ<sup>[6]</sup>, στην ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων του ΑΥ, αν και δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, όλο και πιο πολύ κερδίζει έδαφος τελευταία, καθώς είναι δύσκολο να επιβεβαιωθεί πειραματικά.



**Σχήμα 1.** Μοριακή δομή της επαναλαμβανόμενης μονάδας δισακχαρίτη του υαλουρονικού οξέος που αποτελείται από D-γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (με κόκκινα βέλη σημειώνονται οι χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου)<sup>[7]</sup>.

Για την αποτελεσματική λειτουργία του αρθρικού υγρού, σημαντικό ρόλο παίζει η κατάσταση στην οποία βρίσκεται η άρθρωση. Σε παθολογικές καταστάσεις της, όπως στην περίπτωση της οστεοαρθρίτιδας, το ΑΥ υφίσταται μεταβολές, μέσω ενός μηχανισμού αποπολυμερισμού του ΥΟ<sup>[8]</sup>, στη συγκέντρωση και στο μοριακό βάρος το που περιέχει. Αμφότερα μειώνονται, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του ΑΥ, που με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω εκφυλισμό της άρθρωσης (καταστροφή του χόνδρου και σημαντικές μεταβολές στα επικείμενα οστά, στους συνδέσμους), αυξάνοντας τον ρυθμό εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων της ασθένειας<sup>[9]</sup>.

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί θεραπεία για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας, παρά μόνο χρησιμοποιούνται στρατηγικές διαχείρισης των συμπτωμάτων της. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα ενδοαρθρικά σκευάσματα ιξωδοαναπλήρωσης, τα οποία έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα ως προς την αναλγητική δράση τους, περιορίζοντας σημαντικά τον πόνο, αλλά η βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων του ΑΥ δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

Εφόσον το ΑΥ διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην σωστή λειτουργία της άρθρωσης, η καταγραφή της ρεολογικής του συμπεριφοράς κρίνεται εξίσου σημαντική. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των επιπέδων των τιμών των ιξωδοελαστικών παραμέτρων του ΑΥ, προερχόμενα από υγιείς αρθρώσεις ίππων, με στόχο να αποτελέσουν μία βάση δεδομένων εμβιομηχανικών ιδιοτήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναφορά για την μελέτη και την παρακολούθηση της παθολογικής κατάστασης του ΑΥ, χρησιμοποιώντας τη ρεολογία του ως πιθανό βιολογικό δείκτη για την τάση προς τις παθολογικές καταστάσεις του.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Δείγματα Αρθρικού Υγρού

Για το σκοπό της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν 29 δείγματα αρθρικού υγρού προερχόμενα από 19 ίππους αθλητικής ιππασίας των φυλών Warmblood (WB) και Thoroughbred (TB), οι οποίοι προέρχονταν από τις ίδιες εγκαταστάσεις ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο εκπαίδευσης. Όλες οι αρθρώσεις από τις οποίες συλλέχθηκε αρθρικό υγρό των ίππων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη αξιολογήθηκαν υγιείς τόσο με βάση τα ευρήματα της κλινικής τους εικόνας κατά την

ορθοπεδική τους εξέταση (κατά την κίνηση σε τροχασμό, σε ευθεία και σε κύκλο) όσο και μετά από ακτινολογικό έλεγχο, με τη σύμφωνη γνώμη 2 έμπειρων κτηνιατρών ακτινολόγων.

Η συλλογή των δειγμάτων του αρθρικού υγρού από τη μετακάρπιοφαλαγγική (fetlock), τη μεσοκαρπική (carpus) και τη 2<sup>η</sup> μεσοφαλαγγική άρθρωση (coffin) έλαβε χώρα σε συνθήκες στάβλου μετά από προετοιμασία με άσηπτο τρόπο της περιοχής στην οποία πραγματοποιήθηκε η παρακέντηση (Σχήμα 2α). Η διαδικασία συλλογής του αρθρικού υγρού περιελάμβανε τη λήψη 1-3 ml από την εκάστοτε άρθρωση μετά από εφαρμογή χειρουργικής αντισηψίας εισάγοντας βελόνες 21G x 1 1/2" (0.80 x 40mm) προσαρμοσμένες σε σύριγγες κάθετα στην άρθρωση. Η παραπάνω διαδικασία του ερευνητικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της ιατρικής δεοντολογίας και των οδηγιών για τη χρήση ζώων στην έρευνα και έχοντας πλήρη ενημέρωση ο ιδιοκτήτης του ζώου.

### Ρεολογική ανάλυση των δειγμάτων

Τα δείγματα του αρθρικού υγρού (Σχήμα 2β), αμέσως μετά τη συλλογή τους (όσο αυτό ήταν εφικτό), υπέστησαν πλήρη ρεολογικό χαρακτηρισμό σε ρεόμετρο ελεγχόμενης τάσης (AR-G2, TA Instruments, UK) με τη χρήση γεωμετρίας τιτανίου παράλληλων πλακών διαμέτρου 40 mm (Σχήμα 2γ). Η θερμοκρασία εξέτασης των δειγμάτων ήταν οι  $37.5 \pm 0.1$  ° C, όσο και η θερμοκρασία του σώματος του ίππου, ελεγχόμενη από το σύστημα Peltier που είναι εφοδιασμένο το όργανο.



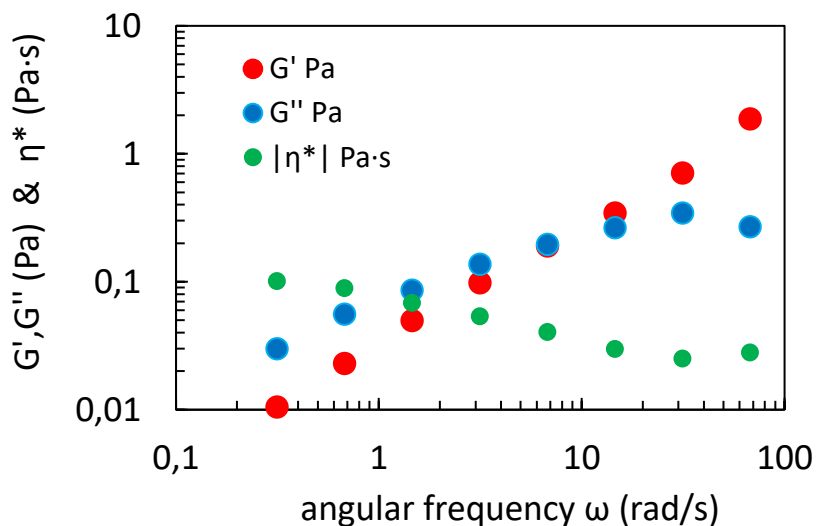
**Σχήμα 2.** Συλλογή αρθρικού υγρού της μετακάρπιοφαλαγγικής άρθρωσης, από τη μονάδα ιπποειδών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (α). Δείγματα υγιούς αρθρικού υγρού ίππων (β). Ρεόμετρο AR-G2 της TA Instruments (γ).

Η καταγραφή των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω δυναμικών ταλαντωτικών μετρήσεων (dynamic oscillatory tests) για τη μέτρηση του ελαστικού μέτρου  $G'$  και του ιξώδους μέτρου  $G''$  καθώς και μετρήσεων σταθερής κατάστασης του ιξώδους ως προς το ρυθμό διάτμησης (shear flow steady state experiments). Το ελαστικό μέτρο  $G'$  (storage modulus) περιγράφει τις ελαστικές ιδιότητες του υλικού και αποτελεί ένα μέτρο της ενέργειας που αποθηκεύεται στο υλικό όταν υπόκειται σε δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ το ιξώδες μέτρο  $G''$  (loss modulus) αντιπροσωπεύει τις ιξώδεις ιδιότητες του υλικού και παρέχει την πληροφορία για την ενέργεια που χάνεται από το υλικό (υπό μορφή θερμότητας) λόγω της εφαρμογής σε αυτό δυνάμεων παραμόρφωσης.

Η διερεύνηση του ελαστικού και του ιξώδους μέτρου πραγματοποιήθηκε μέσω δυναμικών ταλαντωτικών μετρήσεων μέσω πειραμάτων: i) ως προς το χρόνο εφαρμογής της ταλαντευόμενης τάσης παραμόρφωσης υπό σταθερή συχνότητα ταλάντωσης (dynamic time sweep test), ii) ως προς την συχνότητα της ταλάντωσης της ταλαντευόμενης τάσης παραμόρφωσης υπό σταθερό εύρος ταλάντωσης (dynamic frequency sweep test), iii) ως προς το εύρος μεταβολής της ταλαντευόμενης τάσης παραμόρφωσης υπό σταθερή συχνότητα ταλάντωσης (dynamic strain sweep test).

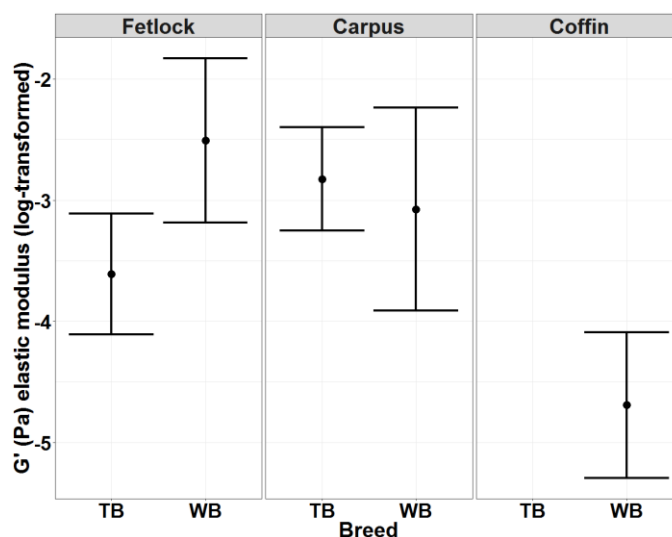
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά, από την ποιοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων ( $\eta^* = f(\omega)$ ), με τη σημείωση ότι υπάρχει εφαρμογή του κανόνα Cox-Merz στα υλικά αυτά), επιβεβαιώνεται η μη-Νευτωνική, με χαρακτήρα διατμητικής λέπτυνσης (έστω και μικρή), συμπεριφορά των δειγμάτων του αρθρικού υγρού (Σχήμα 3). Από τη μελέτη των μετρήσεων των μηχανικών του ιδιοτήτων ως προς την συχνότητα ταλάντωσης της τάσης παραμόρφωσης προκύπτει ο ιξωδοελαστικός του χαρακτήρας. Από φυσικής σημασίας, το παραπάνω δηλώνει ότι σε χαμηλές συχνότητες ταλάντωσης, οι οποίες αντιστοιχούν σε αργές κινήσεις της άρθρωσης, κυριαρχεί ο ιξώδης χαρακτήρας του ΑΥ ( $G'' > G'$ ), επιτρέποντάς του λειτουργήσει ως το φυσικό λιπαντικό των επιφανειών των αρθρικών χόνδρων. Αντίθετα, στις υψηλότερες συχνότητες, κυριαρχεί ο ελαστικός του χαρακτήρας ( $G' > G''$ ), λειτουργώντας ως αποσβεστήρας των μηχανικών πιέσεων που δέχεται η άρθρωση κατά τις γρήγορες και απότομες κινήσεις της, προστατεύοντάς την.



**Σχήμα 3.** Μεταβολή του ελαστικού μέτρου ( $G'$ ), του ιξώδους μέτρου ( $G''$ ), καθώς και του δυναμικού ιξώδους ( $\eta$ ) ως προς την γωνιακή συχνότητα ( $\omega$ ), δείγματος ΑΥ από φυσιολογική μετακάρπιοφαλαγγική άρθρωση ίππου στους 37.5 °C.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4) παρουσιάζεται το εύρος των τιμών του ελαστικού μέτρου ( $G'$ ) της σειράς των δειγμάτων που μελετήθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Από την ποσοτική μελέτη των τιμών, φαίνεται το μεγάλο εύρος τους, το οποίο αναλύοντάς το σε υποομάδες ως προς τη φυλή των ίππων αλλά και τον τύπο της άρθρωσης, εμφανίζονται σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικές διαφορές, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση.



**Σχήμα 4.** Εύρος τιμών του ελαστικού μέτρου ( $G'$ ) της σειράς των δειγμάτων που μελετήθηκαν στη παρούσα έρευνα, ανάλογα με τον τύπο της άρθρωσης και τη φυλή του ίππου.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, από την ποσοτική ανάλυση των τιμών των ρεολογικών παραμέτρων, προκύπτει ότι ο ιξωδοελαστικός χαρακτήρας του υγιούς αρθρικού υγρού των ίππων είναι σχετικά μικρός, ιδιαίτερα και σε σύγκριση με άλλα ζωικά μοντέλα<sup>[10,11]</sup>. Αυτή η πολύ λεπτόρρευση φύση του, δεδομένου των λειτουργιών που είναι επιφορτισμένη να κάνει, ίσως να οφείλεται στο αυξημένο βάρος και τις μεγάλες μηχανικές καταπονήσεις που υφίσταται ο ίππος, σε συνδυασμό με την ανάγκη που φέρεται να έχει το σύνθετο μυοσκελετικό του σύστημα να διατηρήσει το ενεργειακό κόστος κατά τη διάρκεια της κίνησης σε υψηλά φορτία στο ελάχιστο δυνατό επίπεδο. Η σημασία της βιοποικιλότητας των οργανισμών στις μετρούμενες ρεολογικές παραμέτρους φανερώνεται στο μεγάλο εύρος των τιμών τους. Αυτή η πρώτη συστηματική προσπάθεια καταγραφής των ρεολογικών ιδιοτήτων του ΑΥ, μπορεί επίσης να αποτελέσει μία καλή βάση δεδομένων ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για την μελέτη και την παρακολούθηση της παθολογικής κατάστασης του ΑΥ, χρησιμοποιώντας τη ρεολογία του (συμπληρωματικά πάντα με τις συμβατικές βιοχημικές και κλινικές εξετάσεις) ως πιθανό βιολογικό δείκτη για την οστεοαρθρίτιδα, αναδεικνύοντας παράλληλα τη τάση για πρόληψη αλλά και εξατομικευμένη προσέγγιση της θεραπείας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. (2007). *Biorheology*. 44:59–74.
- [2] Van Den Hoogen BM, Van De Lest CHA, Van Weeren PR, Lafeber FPJG, Lopes-Cardoso M, Van Golde LMG, Barneveld A. (1998). *British Journal of Rheumatology*. 37:671-676.
- [3] Ghosh S, Choudhury D, Das NS, Pingguan-Myrphy B. (2014). *Lubrication Science*
- [4] Bali R, Shukla AK. (2000). *Tribology Letters*. 9:233–239.
- [5] Chernos M, Grecov D, Kwok E, Bebe S, Babsola O, Anastassiades T. (2017). *Biomedical Engineering Letters*. 7:17–24.
- [6] Oates KMN, Krause WE, Jones RL, Colby RH. (2006). *Journal of the Royal Society Interface*. 3:167–174.
- [7] López-Ruiz E, Jiménez G, Álvarez de Cienfuegos L, Antich C, Sabata R, Marchal JA, Gálvez-Martín P. (2019). *European Cells and Materials*. 37:186-213.
- [8] Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, Hara F, Yoshida K, Akagi M, Munakata H, Hamanishi C. (2003). *Pathophysiology*. 9:215-220.
- [9] Shah YY, Maldonado-Camargo L, Patel NS, Biedrzycki AH, Yarmola EG, Dobson J, Rinaldi C, Allen KD. (2017). *Journal of Biomechanics*. 60:9-14.

- [10] Goudoulas TB, Kastrinakis EG, Nychas SG, Papazoglou LG, Kazakos GM, Kosmas PV. (2010). *Annals of Biochemical Engineering*. 38:57-65.
- [11] Safari M, Bjelle A, Gudmundsson M, Högfors C, Granhed H. (1990). *Biorheology*. 27:659–674.