



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Model osteoartrózy u zvířat a histologická analýza chrupavky**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Vendula Kubíčková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>MVDr. Zuzana Satinská</b>
Termín odevzdání práce:	2017

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Vendula Kubíčková
Název práce	Model osteoartrózy u zvířat a histologická analýza chrupavky
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	MVDr. Zuzana Satinská
Rok obhajoby práce	2017
Klíčová slova	osteoartróza, viskosuplementace, Synvisc, Hyodine
Počet stran	48
Počet příloh	5
Jazyk	Český (anglický)

### **Abstrakt**

V rámci bakalářské práce bude popsán mechanismus vzniku artrózy u lidí, možnosti diagnostiky (klinické příznaky, RTG), terapie a prevence. Dále budou popsány histologické známky OA, histologická technika zpracování a barvení řezů s důrazem na zpracování a specifické barvení chrupavky. V praktické části bude provedeno histologické zpracování, barvení a vyhodnocování vzorků z kolenních kloubů prasat a králíků. Budou zpracovány a hodnoceny kolenní klouby zdravých zvířat a kolenní klouby u zvířat, jimž byla experimentálně indukována OA. U kloubů byla měřena tloušťka chrupavky a porovnávána chrupavka zdravá, s indukovanou artrózou a chrupavka u kloubů léčených viskosuplementačním materiálem.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Vendula Kubíčková
Title of thesis	Model of osteoarthritis in the animals, and histological analysis of the cartilage
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	MVDr. Zuzana Satinská
The year of presentation	2017
Keywords	osteoarthritis, viscosupplementation, Synvisc, Hyodine
Number of pages	48
Number of appendices	5
Language	Czech (English)

### **Abstract**

In this bachelor thesis will be described the mechanism of formation of osteoarthritis in humans, diagnostic options (clinical symptoms, X-ray), therapy of the osteoarthritis and prevention. In practical part, histological signs of OA, histological technique of processing and staining samples and evaluation of samples from the knee joints of rabbits and pigs will be described. Samples from knee joints will be evaluated in healthy animals knee joints and knee joints of animals with experimentally induced OA. Then will be measured the joint cartilage thickness and compared with healthy cartilage, the cartilage with induced osteoarthritis and the cartilage treated with viscosupplementation substance.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci, její teoretickou a praktickou část, vypracovala samostatně pod vedením MVDr. Zuzany Satinské za použití citované literatury.

V Olomouci dne

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala MVDr. Zuzaně Satinské za cenné rady, odborné vedení a přátelský přístup při vedení bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Bc. Lence Nespěchalové za pomoc při vypracování praktické části.

## Seznam zkratk

DIP	Distální interfalangeální skloubení
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
GAG	Glykosaminoglykany
HA	Kyselina hyaluronová
HE	Barvení Hematoxylin – Eosin
IPA	Isopropylalkohol
OA	Osteoartróza
PBS	Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
RTG	Rentgen

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Osteoartróza.....	9
2.1. Definice onemocnění .....	9
2.2. Etiopatogeneze .....	10
2.3. Diagnostika .....	11
2.4. Terapie.....	12
2.5. Gonartróza.....	13
3. Kolenní kloub zvířat .....	14
4. Chrupavka.....	15
4.1. Hyalinní chrupavka .....	15
4.2. Elastická chrupavka .....	16
4.3. Vazivová chrupavka.....	16
5. Histologické zpracování .....	16
5.1. Barvení chrupavky .....	16
5.2. Preparáty z tvrdé tkáně.....	17
6. Praktická část.....	18
6.1. Chemikálie a přístroje .....	18
6.1.1. Chemikálie .....	18
6.1.2. Přístroje.....	19
6.2. Histologické a barvicí metody .....	20
6.3. Synvisc a Hyalgan.....	23
6.4. Příprava kontrolního vzorku kloubu z prasete .....	24
6.5. Příprava bločku pro krájení na mikrotomu .....	25
6.6. Krájení vzorku na mikrotomu .....	25
6.7. Hodnocení vzorku kolenního kloubu prasete.....	26
6.8. Hodnocení vzorku kolenního kloubu králíka.....	30
7. Závěr.....	37
8. Seznam literatury .....	41
9. Přílohy .....	44

## 1. Úvod

Osteoartróza je nezánettivé degenerativní onemocnění kloubu, jež mění jeho morfologii. Onemocnění postihuje více než 15 % lidské populace a u osob starších 65 let je tímto onemocněním postižena nadpoloviční většina. Pokud artróza postihuje kolenní kloub, nazýváme ji gonartróza. Jako terapie se zde využívá punkce výpotku, aplikace protizánětlivých mastí, medikamentů a v těžších případech i operativní léčba. Tato práce je však zaměřena na léčbu pomocí viskosuplementace, jejíž účinnost bude demonstrována na kolenních kloubech experimentálních zvířat. Na základě výsledků bude zhodnocena korelace mezi klinickými příznaky a výsledky. Pro účely tyto práce bude pracováno se dvěma viskosuplementačními látkami, a to Synvisc a Hyalgan, jejichž účinnost bude porovnávána.



## **2. Osteoartróza**

### **2.1. Definice onemocnění**

Osteoartróza je nezánnětlivé degenerativní onemocnění kloubů. Při onemocnění dochází k degradaci kloubní chrupavky, subchondrální skleróze, tvorbě osteofytů a změně měkkých tkání. Změny na měkkých tkáních zahrnují zejména synoviální membránu, kloubní pouzdro, kloubní vazy a svaly. Změnou prochází i synoviální tekutina, která je při OA slámově žlutá, namísto bezbarvé či lehce nažloutlé, mění se její viskozita (řídne) a není tak schopna efektivně minimalizovat tření a tlumit nárazy. Její vysoká lubrikační schopnost je spjata z její viskozitou a je nutná k minimalizaci tření mezi kloubními povrchy. (Dungl a kol, 2005).

Osteoartrózu můžeme též definovat podle Galla a kol. (2011), jako heterogenní skupinu onemocnění synoviálního kloubu, jež mění morfologii kloubu. Ubývá kloubní chrupavky, tvoří se kloubní výrůstky (osteofyty), kostní cysty a může být doprovázena též subchondrální sklerózou. Onemocnění postihuje kloubní vazy a kloubní pouzdro, synoviální membránu a periartikulární svaly.

Artrózou může být postižen jakýkoliv kloub v těle, ale výskyt OA v kloubech je různý od typu kloubu. Podle Javůrka (1996) jsou nejčastěji postiženy klouby páteře a to v 60 % případů, dále klouby zápěstí a prstů ruky 20 až 30 %, kolenní kloub ve 25 % a kyčelní v 7,5 % případů, dále hlezenní kloub a klouby prstů nohy ve 4 % a nejméně postižené bývají ramenní a loketní klouby, kde se OA vyskytuje jen v 1 až 2 % případů.

Rizikové faktory pro OA zahrnují věk, pohlaví, genetickou predispozici, poruchy biomechaniky, úraz, obezitu, etnické a geografické vlivy. Choroba je neobvyklá do 40 let věku, avšak první degenerativní změny kloubu můžeme pozorovat již kolem dvacátého pátého roku života. Touto chorobou trpí 15 % populace, u osob starších 65 let je postižena nadpoloviční většina a nad 75 let je OA postiženo více než 80 % populace. Onemocnění také

častěji postihuje ženy a bílé plemeno. Mezi genetické vlivy pak můžeme řadit Heberdenovy uzly (tuhé zduření na dorsu DIP kloubů), jež se též vyskytují častěji u žen (Dungl a kol., 2011). Gallo a kol. (2011) o genové predispozici pro OA uvádí, že ačkoliv zatím nebyl objeven „gen pro artrózu“, byla již zjištěna řada molekul, které by riziko vzniku OA mohly zvyšovat.

## **2.2. Etiopatogeneze**

Dle Galla a kol. (2011) je vznik OA popisován jako působení mechanických a/nebo biologických faktorů narušující homeostázu chrupavky kloubu, subchondrální kosti, kloubní výstelky a kloubních stabilizátorů a předpokládá dvě patogenetické cesty: a) působení abnormální zátěže na normální kloub b) působení normální zátěže na stigmatizovaný kloub.

Vznik OA a rychlost jejího rozvoje závisí na strukturálních abnormalitách a velikosti zátěže kloubu, která se k němu dostává přes fyziologické ochranné prvky. Tyto ochranné prvky jsou tvořeny svalovým aparátem, vazy a subchondrální kostí a jejich stav tedy podmiňuje riziko vzniku artrózy (Gallo a kol., 2011).

Uvádí se, že prvotní známkou změn na chrupavce je zvýšené zadržování vody a tím snížené množství proteoglykanů v chrupavce. Prosáknutím chrupavky u ní dochází k poruše jejich vlastností, a to jak biomechanických, tak tribologických. Při dalším zatěžování chrupavky dochází v její struktuře k tvorbě trhlin, které se chrupavkou šíří až ke kosti. V tuto chvíli se v chrupavce tvoří zánět, jenž uvolňuje kyslíkové radikály a proteolytické enzymy a tím přispívá k další destrukci chrupavky (Gallo a kol., 2011).

Podle Koudely a kol. (2004) můžeme popsat čtyři stádia artrózy: a) zúžení kloubní štěrbiny, b) subchondrální a okrajové produktivní změny (skleróza, osteofyty), c) subchondrální cysty a deformace kloubních konců, d) zánik kloubní štěrbiny, destrukce kloubu, kostní nekrózy, patologické postavení v kloubu.

### 2.3. Diagnostika

Diagnostika OA je založena na klinickém vyšetření a zobrazovacích metodách.

Při klinickém vyšetření do anamnézy zahrneme únavu kloubu, projevující se už v počátcích onemocnění, která je zprvu ponámahová, v pokročilejším stádiu pak klidová a noční, při rozcházení je přítomna tzv. startovací bolest. Zjišťujeme také zhrubělou kresbu kloubu až deformity, poruchy osy končetiny, svalovou atrofii, otok měkkých tkání, výpotky, omezení hybnosti v krajních polohách (Koudela a kol., 2004).

Typickým příznakem je již zmiňovaná chronická bolest, ať už startovací nebo zhoršující se při zátěži, která při odpočinku polevuje. S rozvojem nemoci se může objevit též kloubní nestabilita a úbytek svalové hmoty. Pro pokročilejší stupně OA na dolních končetinách je typické kulhání a narušení stereotypu chůze. Potíže bývají vázané také na změnu počasí (Gallo a kol., 2011).

Při diagnostice zobrazovacími metodami se podle Koudely a kol. (2004) využívají rentgen, magnetická rezonance, výpočetní tomografie a sonografické vyšetření. Rentgenový snímek je zhotovován v anteroposteriorní, bočné, eventuálně axiální projekci a umožňuje vizualizaci preartrotických stavů vedoucích ke vzniku artrózy. Dle Galla a kol. (2011) je u váhonosných kloubů doporučeno provedení alespoň jedné projekce vstoje. Na RTG snímku se sledují lokalizované či globální zúženiny kloubní štěrbiny, tvorba osteofytů, subchondrální skleróza a přítomnost kostních cyst (obr. 1). Při hodnocení artrotického kloubu se využívá klasifikace podle Kellgren-Lawrence, jež je považována za zlatý standard (viz tab. 1). Kloub se označuje jako artrotický, jestliže nález odpovídá druhému a vyššímu stupni v níže uvedené tabulce.

Magnetická rezonance je vhodná při diagnostice měkkého ramene, lézí menisků a vazů kolenního kloubu (Koudela a kol., 2004).



Obr. 1 RTG kolenního kloubu s artrózou III. Stupně podle Kellgren-Lawrence; předozadní projekce (a); bočná projekce (b), (převzato z knihy *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult*, Gallo a kol., 2011).

Tab. 1 Kellgren -Lawrencova klasifikace osteoartrózy (převzato z knihy *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult*, Gallo a kol., 2011).

Stupeň	Popis
I.	Nepatrné zúžení kloubní štěrbiny, počínající osteofyty
II.	Jisté osteofyty a určité zúžení kloubní štěrbiny
III.	Zřetelné, někdy vícečetné osteofyty, značné zúžení kloubní štěrbiny, zjevná subchondrální skleróza, někdy deformace kloubní kontury
IV.	Velké osteofyty, zaniká kloubní štěrbina, rozsáhlá skleróza a jednoznačná deformace kloubní kontury

## 2.4. Terapie

Při terapii by měla být brána v úvahu fáze choroby, její stupeň, věk pacienta a jeho tolerance k léčebným metodám a medikaci. Je důležité, aby léčba byla komplexní. Mezi základní pravidla nejen léčby, ale i prevence, patří každodenní cvičení, redukce váhy na optimum, u kterého obecně platí, že kolik centimetrů máme nad sto centimetrů, tolik bychom měli vážit. Dále dieta s preferencí vlákniny a vyvarování se červeného masa a sport. U sportů se

doporučují zejména ty, jež klouby nezatěžují, jako je například plavání (Koudela a kol., 2004).

Úprava stravování tedy má při terapii jistý význam. Zejména pak omezení červeného masa, jež je bohaté na puriny. Metabolické dráhy purinů vedou v organismu k nadprodukcí urátů (kyseliny močové), jež se ve formě krystalků usazují v kloubech a mohou přispět k rozvoji OA (Navrátil, 2008).

Podle Galla a kol. (2011) je vhodné využít pyramidový přístup k léčbě (viz příloha č. 1).

## **2.5. Gonartróza**

Jedná se o artrózu kolenního kloubu. V populaci se vyskytuje v 60 % nad 65 let věku. Postihuje často sportovce a nejčastěji vzniká následkem úrazu, v důsledku revmatických onemocnění, zánětlivých onemocnění nebo osových odchylek (Koudela a kol., 2004).

Nemoc se vyznačuje zejména tupou bolestí zhoršující se při zátěži a ustupující v klidu. Později se objevuje bolest klidová, kloub má tendenci tuhnout po období klidu, nebo ráno (Dungl a kol., 2005).

Jako terapie se využívá medikamentózní léčba a případná (odlehčující) punkce výpotku. Doporučuje se posilování čtyřhlavého stehenního svalu. Lokálně se doporučuje aplikace protizánětlivých mastí a gelů, u pacientů s klasifikací OA do stupně III. podle Kellgrena-Lawrence můžeme využít nitrokloubní podávání kyseliny hyaluronové. V neposlední řadě je léčba možná operativně (Koudela a kol., 2004).

### 3. Kolenní kloub zvířat

Articulatio genus, neboli kolenní kloub, můžeme rozdělit na femorotibiální kloub (articulatio femorotibialis) a čéškový kloub (articulatio femoropatellaris), přičemž oba klouby na sobě funkčně i morfologicky závisí (Najbrt a kol., 1982).

Na tvorbě femorotibiálního kloubu se podílí femur a tibia, která je z tohoto důvodu na proximálním konci velmi silná. Na tomto konci můžeme nalézt plochy pro kondyly femuru, resp. pro meniskus a úponové plochy pro meniskové a zkřížené vazy (ligamenta cruciata). Tento kloub se vyznačuje inkongruencí kloubních ploch tibie, jež u každého kondylu femuru vyrovnává jeden meniskus (meniskus articularis). Oba menisky jsou spojeny s tibií kraniálními a kaudálními vazy, laterální meniskus je navíc spojen s femurem. Kloubní pouzdro je rozsáhlé a pojme oba kondyly. Mezi tyto kondyly se vsouvá membrana synovialis a tvoří tak dvě synoviální dutiny. Mezi těmito dutinami ve středu kloubu probíhají zkřížené vazy (ligamenta cruciata genus) a to kaudální a kraniální. Tento kloub umožňuje pohyby jako flexe a extenze a díky posunovatelnosti menisků je též možný rotační pohyb (König, Liebich, 2004).

Čéškový kloub je sáňkový kloub, jež se skládá z patelly a kladky femuru. Pohyb v tomto kloubu je umožněn tím, že patella klouže synchronně s pohybem femorotibiálního kloubu po kladce femuru. Kloubní pouzdro poskytuje dostatek prostoru pro proximálně vsunutý úpon m. quadriceps femoris a je spojeno s kloubní dutinou femorotibiálního kloubu s níž distálně sousedí. Úponovými šlachami m. quadriceps femoris jsou tzv. čéškové vazy (ligamenta patellae), které odstupují na kraniální ploše patelly a upínají se na drsnatinu na přední ploše tibie. Tyto vazy se druhově rozlišují (König, Liebich, 2004).

Zde uvedená anatomie kloubu popisuje uspořádání kloubu u koní, ovce, prasete i psa s drobnými rozdíly. Jeden z takových rozdílů je vzájemná komunikace synoviálních dutin, kdy u koně je komunikace vzácná, naopak u prasete spolu velmi široce komunikují. U psa

je tomu podobně jako u prasete. U psa jsou navíc do kaudálního úseku kloubního pouzdra pojata kosti ossa sesamoidea m. gastrocnemii (Najbrt a kol., 1982).

## **4. Chrupavka**

Chrupavka je tuhá a pružná tkáň tvořená buňkami zvanými chondrocyty a mezibuněčnou hmotou, jejíž složkami jsou proteoglykany a kolagenní fibrily. Díky její pevné konzistenci, která je dána právě proteoglykany a fibrilami, je schopna omezené změny tvaru, který se po polevení tlaku vrací do původní podoby. Je bezcévná, zásobování chondrocytů probíhá difuzí skrz mezibuněčnou hmotu. Na základě složení mezibuněčné hmoty rozlišujeme tři druhy chrupavek, a to hyalinní, elastickou a vazivovou (Lullmann-Rauch, 2012).

### **4.1. Hyalinní chrupavka**

Vacek (1996) popisuje hyalinní chrupavku jako nejrozšířenější druh chrupavky, která je v tenké vrstvě poloprůhledná sklovitého vzhledu.

Chondrocyty zralé chrupavky uložené v mezibuněčné hmotě se již dále nedělí a jsou oválného až kulatého tvaru. Obsahují běžné buněčné organely, (Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum, lysozom), granula glykogenu (zisk energie) a tukové kapénky. Okolo každého chondrocytu je barvicí se bazofilní dvorec (Lullmann-Rauch, 2012).

Kolagenní fibrily u kloubní chrupavky jsou asi 50-100 nm tenké a jsou tvořeny kolagenem typu II a příměsemi typu IX a XI. Vlákná probíhají všemi směry a tvoří tak síť, jež dodává chrupavce pevnost (Lullmann-Rauch, 2012).

Proteoglykany tvoří proteinový komplex tvořící amorfní složku chrupavky. Tento komplex obsahuje kyselinu hyaluronovou, chondroitinsulfát a keratansulfát (Vacek, 1996). Pro správnou biomechanickou funkci chrupavky je důležitý také obsah vody v mezibuněčné

hmotě, jež je udržován díky schopnosti proteoglykanů (HA) vázat vodu (Lullmann-Rauch, 2012).

Z hyalinní chrupavky jsou složeny např. kloubní chrupavka, dýchací cesty (průdušnice, nosní přepážka apod.), chrupavky žeber, růstové ploténky nebo útvary vyvíjejícího se skeletu (Lullmann-Rauch, 2012).

## **4.2. Elastická chrupavka**

Stavba chrupavky elastické je podobná, jako u chrupavky hyalinní. Rozdíl je v poměru elastických vláken k vláknům kolagenním. Jimi tvořená síť dává chrupavce pružnost v tlaku a ohybu. Tento druh chrupavky můžeme najít v ušním boltci, příklopce hrtanové nebo malých chrupavkách hrtanu (Vacek, 1996).

## **4.3. Vazivová chrupavka**

Chrupavka vazivová obsahuje krom kolagenních fibril také elastická vlákna, díky nimž je svou stavbou podobná kolagennímu vazivu. Mezi svazky těchto vláken jsou uloženy oválné chondrocyty. Pro tento typ chrupavky je typický výskyt v meziobratlových ploténkách nebo meniscích kolenního kloubu (Vacek, 1966).

## **5. Histologické zpracování**

### **5.1. Barvení chrupavky**

V preparátu hyalinní chrupavky barvené hematoxylinem a eosinem (HE) jsou viditelné zbarvené chondrocyty a mezibuněčná hmota. Dvorec chondrocytů i mezibuněčná hmota jsou tedy barvitelné bazickými barvivy. (Lullmann-Rauch, 2012).



Kolagenní fibrily nejsou pod světelným mikroskopem rozeznatelné kvůli amorfní složce mezibuněčné hmoty (proteoglykany), jež má stejné optické vlastnosti jako fibrily. Pro zviditelnění fibril je můžeme vystavit reakci se slabými roztoky zásad po delším působení 10 % roztoku chloridu sodného. Poté vlákna nabobtnají a stávají se viditelnými (Vacek, 1996). Jejich průběh však můžeme znázornit polarizačním mikroskopem (Lullmann-Rauch, 2012).

Elastická vlákna v chrupavce elastické můžeme zviditelnit barvením na elastin, ale i při rutinním barvení, jako u hyalinní chrupavky, můžeme rozpoznat elastická vlákna, jež hyalinní chrupavka neobsahuje (Lullmann-Rauch, 2012).

Jedno z možných barvení je pomocí aldehydového fuchsinu, kdy se elastická vlákna zbarví fialově a pomocí Harrisova hematoxylinu můžeme zviditelnit i jádra buněk. Dalším z příkladů barvení chrupavky je barvení pomocí alciánové modři, kdy se GAG barví modře až modrozeleně a dobarvení jádrovou červení umožní vizualizaci jader (Vacek, 1996).

Také barvení pomocí barviv Safraninu O a Fast Green umožňuje červené zbarvení GAG a kontrastní zelené zbarvení matrix. Jádra se při tomto barvení také zbarví do červena (Wei a kol., 2015).

## **5.2. Preparáty z tvrdé tkáně**

Pro zhotovení preparátu z tvrdé tkáně (kosti) je třeba kost zbavit minerálních solí, tzv. ji demineralizovat. V případě demineralizace kosti hovoříme o odvápnění, kdy kost zbavujeme vápenatých solí.

Proces odvápnění je přeměna nerozpustných solí na soli rozpustné účinkem zředěných kyselin. Odvápnění by mělo proběhnout co nejrychleji, a proto bychom měli zajistit dostatečné množství dekalciфикаční tekutiny a její výměnu minimálně jednou denně. Doba odvápnění však závisí na použité dekalciфикаční tekutině. Stupeň odvápnění můžeme

stanovit biochemicky, v praxi se však nejlépe využívá zkouška naříznutím tkáně skalpelem. Pro odvápnění se využívá kyselina mravenčí nebo kyselina etylendiamintetraoctová neboli EDTA (Vacek, 1996).

Odvápnění pomocí EDTA spočívá ve vyvázání vápenatých a hořečnatých iontů. Výhodou je, že EDTA lze připravit s příslušnou hodnotou pH, nevýhodou je delší čas odvápnění (Vacek, 1996).

Odvápněním kosti nám umožňuje z ní krájením zhotovit tenké řezy. Aby se kost nerozpadla v důsledku nízkého obsahu minerálních solí, zhotovujeme z kosti tzv. výbrusy, jejichž nevýhoda však spočívá v relativně silných preparátech (Vacek, 1996).

## **6. Praktická část**

### **6.1. Chemikálie a přístroje**

#### **6.1.1. Chemikálie**

- Chelaton III
  - EDTA (lach:ner), Lot: PP/2014/15340
  - Hydroxid sodný Micropearls (lach:ner), Lot: PP/2013/13727
- PBS
  - Chlorid sodný (Penta), Lot: 1910231014
  - Chlorid draselný (Penta), Lot: 2012181215
  - Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného G.R. (lach:ner), Lot: PP/2015/09237
  - Dihydrogenfosforečnan draselný P.A. (lach:ner), Lot: PP/2014/09800

- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich), Lot: SABF0920V
- Xylen (lach:ner), Lot: PP/2016/04522
- Gillův hematoxylin II (DiaPath), Lot: 2015X05220
- Ethanol 96 % (Penta), Lot: 1806120615
- Pertex (Histolab), Lot: 1711230
- Kyselina chlorovodíková 35 % (Penta), Lot: 1810161013
- Ledová kyselina octová 99,8 % (Penta), Lot: 2101070116
- 0,1 % roztok jádrové červeně v síranu hlinitém (Merck), Lot: HC063733
- Lugolův roztok (Sigma-Aldrich), Lot: SZBC0040V
- Harrisův hematoxylin roztok, modifikovaný (Sigma-Aldrich), Lot: 088K4351
- Fast Green FCF (Sigma-Aldrich), Lot: EC 219-091-5
- Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich), Lot: BCBL5253V
- Pracovní roztoky použité v barvicích postupech, jejichž výrobce a šarže není zmíněna výše, byly již v přesné koncentraci a složení namíchány ve firmě Contipro a.s. (viz příloha č. 2).

### **6.1.2. Přístroje**

- Analytické váhy el. Mettler Toledo XS204IM
- Barvicí automat Leica ST5020
- Digestoř Merci M1200
- Magnetické míchadlo Heidolph MR3001K s FP
- Mikroskop Nikon MBA 85020 včetně příslušenství
- Mikroskop Olympus CX40RF200
- Montovací automat Leica CV 5030

- Motoristický rotační mikrotom Leica RM 2255 s příslušenstvím Leica HI 1210 + HI 1220
- Tkáňový automat Leica TP 1020
- Zalévací jednotka Leica EG 1150C + 1150H

## 6.2. Histologické a barvicí metody

- **Příprava dekalcifikačního roztoku**
  - a. Do 600 ml kádinky bylo naváženo 100 g EDTA a doplněno do 500 g roztokem PBS, roztok byl postaven na magnetickou míchačku.
  - b. K roztoku bylo přidáno 12,5 g hydroxidu sodného, pro lepší rozpouštění EDTA.
  - c. Po rozpuštění EDTA v PBS bylo upraveno pH pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,4.
  - d. Odměrným válcem byl změřen objem roztoku, přelit do lahve a byl k němu přilit stejný objem (1:1) 4 % paraformaldehydu (rozpuštěný v PBS).
  - e. Namíchaný dekalcifikační roztok by upraven pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 7,4.
  - f. Roztok je možno ihned použít, popř. uchovávat na tmavém místě, stejně jako vzorky v něm odvápnované.
- **Histologické barvení Hematoxylin – Eosin**
  - a. Barvení bylo provedeno na fixovaných buněčných kulturách na odparafinovaných řezech.
  - b. Odparafinované řezy opláchnuté destilovanou vodou (3 min) byly barveny Gillovým hematoxylinem II 5-10 min.
  - c. Diferencováno v 70 % ethanolu – 5x ponořit.
  - d. Diferencováno v 70 % kyselém ethanolu – 5x ponořit.

- e. Promýváno v tekoucí studené kohoutkové vodě 5 min.
  - f. Krátce opláchnuto v destilované vodě.
  - g. Po oklepání zbytkové vody ze skel byly sklíčka ponořena na 1 min nebo déle (dle stáří roztoku) do pracovního roztoku eosinu.
  - h. Diferencováno 96 % ethanolem 5x – 10x ponořit.
  - i. Opláchnuto krátce v destilované vodě.
  - j. Dehydratováno v alkoholové řadě 1x80%, 1x96%, 1x denaturovaný ethanol – v každé lázni 1 min.
  - k. Dehydratováno v acetonu 1x1 min.
  - l. Projasněno xylenem 2x3 min.
  - m. Poté bylo zalito montovacím médiem Pertex, překryto krycím sklíčkem, ponecháno zaschnout (nejlépe do druhého dne).
- **Histologické barvení Safranin O – Fast Green**
    - a. Řezy byly odparafinovány a převedeny do destilované vody
    - b. Poté byly barveny hematoxylinem (Gill II), po dobu 2 min.
    - c. Diferencovány v 70 % ethanolu, 5x ponořit.
    - d. Diferencovány v kyselém 70 % ethanolu, 5x ponořit.
    - e. Poté byly promývány kohoutkovou vodou po dobu 10 min.
    - f. Opláchnuto v destilované vodě.
    - g. Barvení 0,1 % roztokem Safranin O po dobu 2 min.
    - h. Sklíčka byla opláchnuta v destilované vodě.
    - i. Poté byla sklíčka promyta kohoutkovou vodou po dobu 7 min.
    - j. Opláchnuto v destilované vodě.
    - k. Poté bylo provedeno barvení 0,05 % roztokem Fast Green po dobu 20 min.
    - l. Krátký oplach 1 % kyselinou octovou, ledovou.

- m. Opláchnuto v destilované vodě.
  - n. Odvodněno acetonem a projasněno xylenem.
  - o. Jako poslední byla sklíčka zalita montovacím médiem Pertex, překryta krycím sklíčkem, ponechána zaschnout (nejlépe do druhého dne).
- **Histologické barvení Alciánovou modří**
    - a. Řezy byly odparafinovány v alkoholu: 2x5 min xylen, 2x3 min 100 % IPA, 2x3 min 80 % IPA, 2x3 min 70 % IPA.
    - b. Promyty v destilované vodě.
    - c. Poté byly barveny 1 % roztokem alciánové modři, rozpuštěné v 3 % ledové kyselině octové po dobu 1-2h.
    - d. Opláchnuty v destilované vodě 2x3 min.
    - e. Poté byly barveny Nuclear Red 3-5 min.
    - f. Opláchnuto v destilované vodě 3 min.
    - g. Opláchnuto v 70 % ethanolu, 10x ponořit.
    - h. Opláchnuto v 80 % ethanolu 10x ponořit.
    - i. Opláchnuto v 100 % ethanolu 2x2 min.
    - j. Odvodněno v acetonu 3 min.
    - k. Projasněno xylenem 2x3 min.
    - l. Zamontováno Pertexem.
  - **Histologické barvení aldehydovým fuchsinem**
    - a. Řezy byly odparafinovány, opláchnuty v destilované vodě a 1 hod oxidovány v Lugolově roztoku.
    - b. Poté byly barveny v 5 % roztoku thiosíranu sodného po dobu 1–2 min.
    - c. Opláchnuto ve vodě a 15 min barvit v aldehydovém fuchsinu.
    - d. Opláchnuto v 70 % ethanolu a diferencovat v nové dávce 70 % ethanolu.

- e. Jádra byla dobarvena Harrisovým hematoxylinem po dobu 3 min.
- f. Odvodněno 70 % ethanolem, projasněno xylenem.
- g. Poté byly řezy zality montovacím médiem Pertex, překryty krycím sklíčkem a ponechány zaschnout (nejlépe do druhého dne).

### **6.3. Synvisc a Hyalgan**

Tyto dvě látky byly použity pro léčbu indukované OA kolenního kloubu. Jsou to přípravky na bázi kyseliny hyaluronové, jež je běžnou součástí kolenního kloubu.

Synvisc je gelová směs, vyrobená z hyaluronanu, který pochází z kuřecích hřebínků. Hyaluronan se běžně vyskytuje v našem těle, ve velkém množství je přítomna v kloubech, kde slouží jako lubrikant, a tlumič nárazů. Je tedy potřebný pro správnou funkci kloubů. Synvisc je určen pro osoby trpící gonartrózou, kteří nepocítili úlevu od bolesti po terapii tělesným cvičením, dietou nebo lécích proti bolesti. Synvisc je podáván injekčně aplikací gelu do kloubu, jež provádí lékař. Účinek jednorázové aplikace gelu je až šest měsíců (Synvisc One, 2016).

Hyalgan je kyselina hyaluronová je formě hyaluronátu sodného, která se ve formě injekce aplikuje přímo do kolenního kloubu postiženého OA. Léčebná kúra obsahuje pět injekcí v týdenních intervalech, jež poskytuje úlevu od bolesti kloubu až na dobu 6 měsíců (Hyalgan, 2017).

V obou případech by se pacient po aplikaci této látky měl vyvarovat namáhavé činnosti, jež vyvíjí tlak na kolenní kloub, po dobu dvou dní (Johns Hopkins Arthritis Center, 2012).

#### **6.4. Příprava kontrolního vzorku kloubu z prasete**

Kontrolní vzorek chrupavky pro stanovení stupně OA byl získán z kolenního kloubu prasete (viz příloha č. 3). Abychom mohli z kloubu vzorky chrupavky získat, bylo nutno nejdříve odstranit tkáň, jako svaly, vazy šlachy apod. Pomocí skalpelu byl na koleni proveden parapatelární řez, jež do kolene umožnil přístup. Tento řez poskytuje nejvhodnější přístup do kolene s možností pohmatem kontrolovat pohyblivost a stabilitu kloubu. Pomocí chirurgických nástrojů, jako jsou skalpel, nůžky a pinzety, byl kolenní kloub očištěn od okolní tkáně a končetina byla v kloubu po přetnutí ligamentum collaterale mediale, ligamentum collaterale laterale, ligamentum cruciatum caudale a ligamentum cruciatum cradiale rozdělena. Pro získání vzorku chrupavky s následným histologickým zpracováním a barvením, bylo nutno kost odvápnit. Před samotným odvápněním byla provedena fixace vzorku ve formaldehydu, aby nedošlo k poškození tkáně dekalciфикаční tekutinou. Odvápnění celého femuru a tibie by však bylo neefektivní a zdlouhavé, proto byl z femuru a tibie pilkou odřezán vzorek v oblasti kondylů a trochlea femoris. Odřezané vzorky byly vloženy do sklenice a zality dekalciфикаční tekutinou, konkrétně chelatonem III. Tímto způsobem bylo připraveno pět vzorků ve dvou opakováních.

U vzorků byla každý den měněna dekalciфикаční tekutina a po čtrnácti dnech odvápnování byly vzorky vyjmuty a pilkou seříznuty na menší vzorky, které byly ponechány odvápnění po dobu 16 týdnů. Seříznutí vzorků na menší velikost opět urychlilo proces odvápnování. V průběhu dekalciфикации byla její míra kontrolována vpichem do tkáně, pro zjištění její tvrdosti. Obdobným způsobem byly připraveny veškeré preparáty z tvrdé tkáně popsané v této bakalářské práci.



## **6.5. Příprava bločku pro krájení na mikrotomu**

Pro přípravu parafinového bločku bylo nutné vzorky okrájet na malé kousky (viz příloha č. 4). Při krájení vzorků kloubu s chrupavkou bylo dbáno na to, aby nedošlo k poškození povrchu chrupavky na jiných místech než na těch, kde byla krájena. Vzorky chrupavky byly poté vloženy do kazety pro histologické vzorky. Před vložením kazet do zalévacího tkáňového automatu, byly kazety proprány v 60 % ethanolu. Jelikož parafín je nemísitelný s vodou, bylo nezbytné vzorky odvodnit v alkoholové řadě 60 %, 70 %, 80 %, 90 % a třikrát 100 % ethanolu. Okrájení vzorků na malé kousky zkracuje dobu odvodňování. Poté byly vzorky v automatu zality do parafínu. Celý proces odvodňování trvá 15 hodin.

## **6.6. Krájení vzorku na mikrotomu**

Vzorky zalité v parafinovém bločku byly vloženy do mikrotomu (viz příloha č. 5). Před krájením samotným bylo nutné bločky srovnat dle nože, aby vzorky měly rovnoměrnou tloušťku po celé ploše bločku. Poté bylo z bločku seříznuto několik plátků vzorku o tloušťce 20  $\mu\text{m}$ , čímž bylo zajištěno další zarovnání bločku se vzorkem chrupavky. Plátky krájené z bločku určené k barvení a vyhodnocení byly krájeny na tloušťku 5  $\mu\text{m}$ . Pro lepší krájení vzorku se doporučuje na bloček před každým řezem dýchnout, aby parafín, ve kterém je vzorek zalit, lehce povolil. Po odkrojení několika plátků jsou nakrájené vzorky pomocí pinzety a jehly přeneseny do vodní lázně s demineralizovanou vodou vyhřátou na 40 °C. Ve vodní lázni bylo poté provedeno vizuální hodnocení krájených plátků a byly vybrány nejzdařilejší plátky se vzorkem chrupavky. Ty byly ve vodní lázni podebráním vzorku nanесeny na označené podložní sklíčko. Podložní sklíčko s nanесeným vzorkem bylo přeneseno na ploténku vyhřátou na 50 °C, na které sklíčko se vzorkem zasychalo a bylo připraveno pro následné barvení, viz kapitola Histologické barvicí metody.

## 6.7. Hodnocení vzorku kolenního kloubu prasete

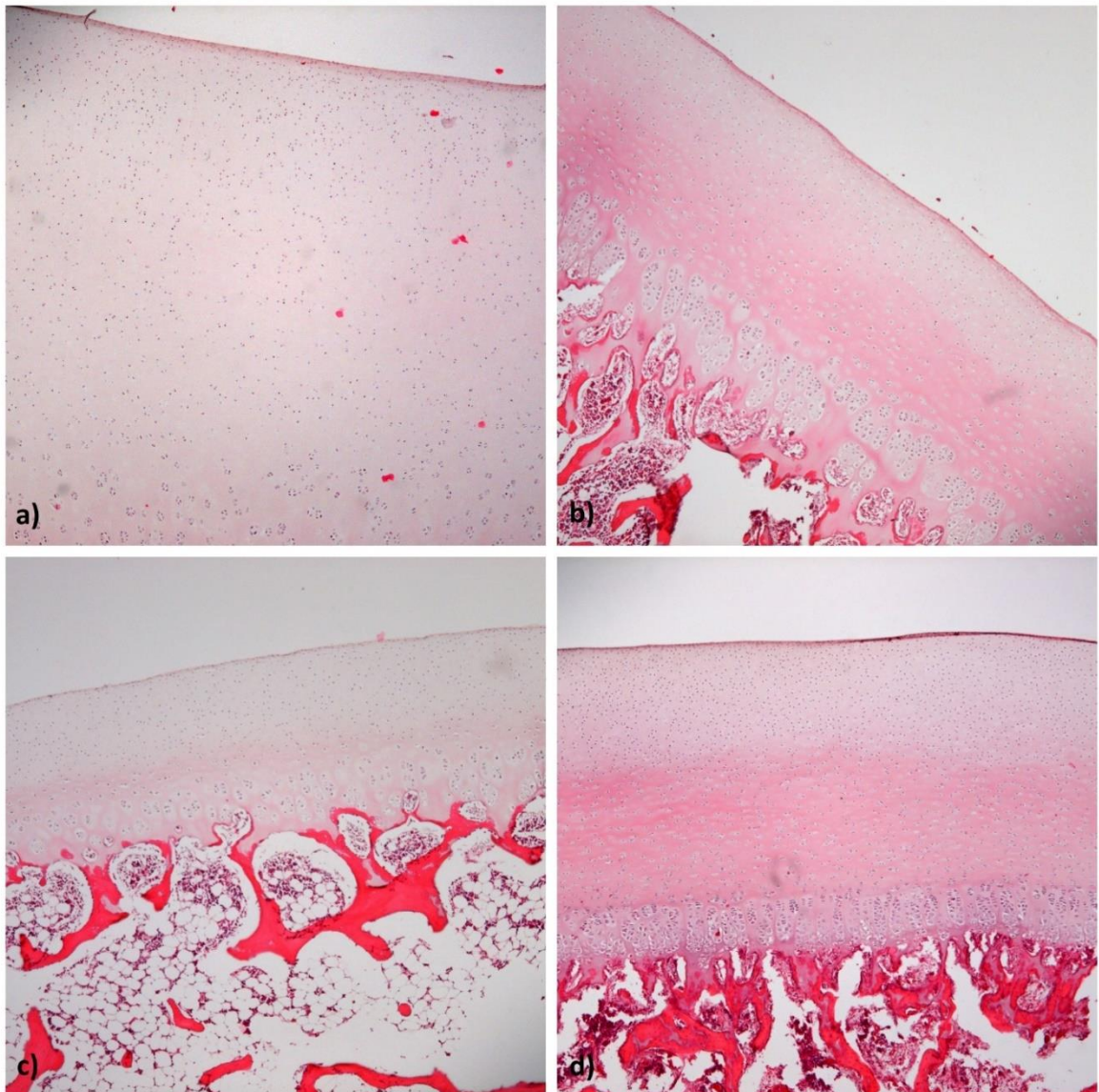
Pro zmapování morfologie a složení zdravé chrupavky byl zvolen kolenní kloub prasete. Prase nebylo vystaveno situacím a podmínkám, ve kterých by došlo k poškození jeho kolenních kloubů a chrupavek, proto vzorky získané z tohoto kloubu označujeme jako kontrolní. Na vzorcích byla provedena demonstrace různých typů barvení a posouzení, zda je barvení vhodné pro diagnostiku OA a zdali toto barvení bude dále použito pro hodnocení kloubů s OA u králíka. Pro získání kontrolních vzorků jsme použili pravá kolena dvou zdravých prasat a z každého kolene byly po odvápnění vybrány čtyři reprezentativní vzorky pro další zpracování. Z každého dílčího vzorku dvou kloubů byly poté vytvořeny řezy, jež byly podrobeny specifickému barvení a měření šířky chrupavky.

Měření šířky chrupavky probíhalo pod mikroskopem pomocí nástrojů v programu pro zpracování živého obrazu z mikroskopu. Chrupavka byla měřena na třiceti místech u čtyřech vzorků z každého kolene. Poté byly hodnoty zprůměrovány, abychom určili šířku chrupavky, jež reprezentuje zdravou chrupavku. Samozřejmostí bylo vypočtení střední hodnoty a směrodatné odchylky měření, ke které při hodnocení průměrné šířky chrupavky musíme přihlídnout.

Tab. 2 Tloušťka chrupavky kolenního kloubu zdravých prasat [ $\mu\text{m}$ ]

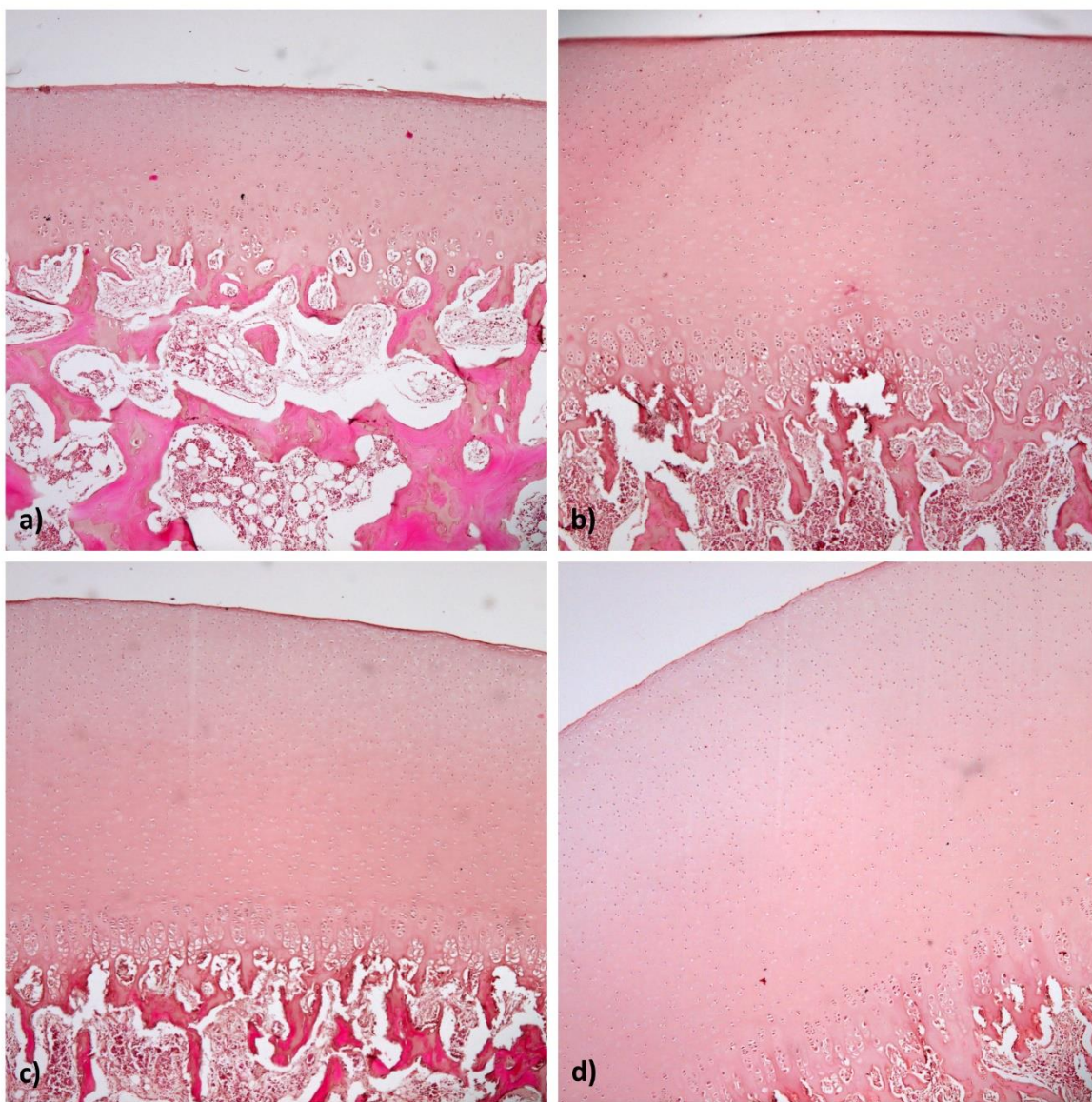
	<b>Průměr</b>	<b>SMODCH</b>	<b>Medián</b>
První koleno	1124.07	231.16	1143.00
Druhé koleno	1029.36	382.54	852.06

Barvení HE bylo zvoleno, jako barvení umožňující nejlepší viditelnost morfologie chrupavky, pro hodnocení. U chrupavky na obrázcích můžeme vidět, že její povrch není poškozen, barvení je homogenní, jádra jsou malá a nedeformovaná s kulatým tvarem. Tyto znaky přiřazujeme zdravé chrupavce.



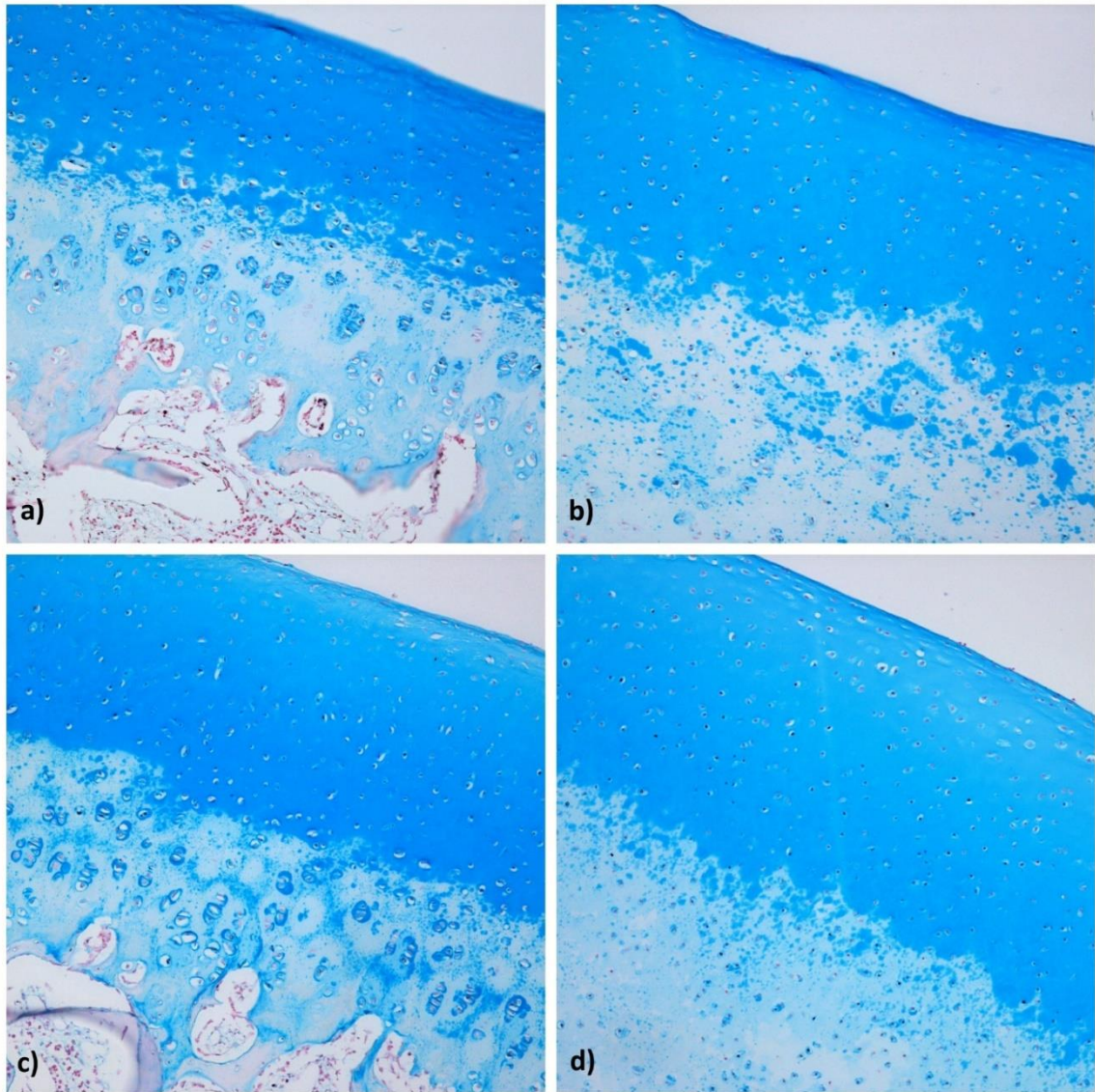
Obr. 2 Barvení HE, zviditelnění morfologie chrupavky; a), d) první koleno; c), d) druhé koleno; zvětšení 40x

Barvení aldehydovým fuchsinem zviditelňuje kolagenní vlákna. Síla zbarvení preparátu je přímo úměrná množství kolagenních vláken. U tohoto barvení si však musíme dávat pozor na skutečnost, že u léčené chrupavky dochází k silnějšímu zbarvení než u kontrolního vzorku, jelikož obsahuje více vazivových vláken. U tohoto způsobu barvení, jsem měla možnost pozorovat, že nejvíce znehodnocuje preparát, především pak povrch chrupavky.



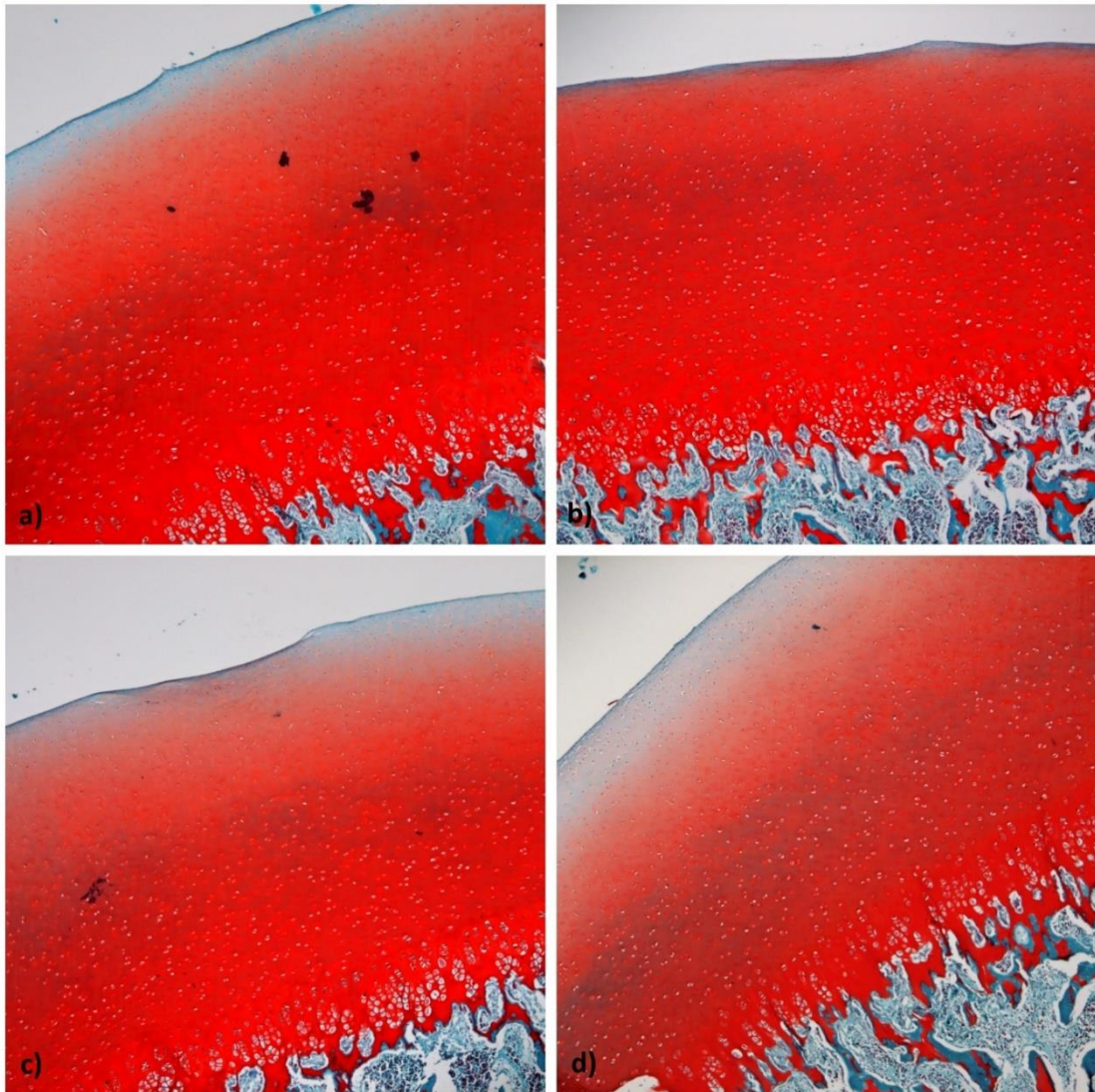
Obr. 3 Barvení aldehydovým fuchsinem, barvení kolagenních vláken; a), d) první koleno; c), d) druhé koleno; zvětšení 40x

Alciánová modř je barvení do výrazně modré barvy, jejíž síla je přímo úměrná koncentraci GAG v chrupavce. Jak si můžeme povšimnout, největší koncentrace GAG se vyskytuje při povrchu chrupavky a zhruba v její polovině koncentrace GAG výrazně klesá. V matrix už přítomnost GAG není tak hojná.



Obr. 4 Barvení alciánovou modří, barvení GAG; a), d) první koleno; c), d) druhé koleno; zvětšení 100x

Nejkontrastnější použité barvení představuje barvení pomocí Safranin O – Fast Green umožňující červené zbarvení GAG a zelené zbarvení matrix. Síla červeného zbarvení je přímo úměrná koncentraci GAG. Pokud bychom se měli rozhodnout, zda pro vizuální hodnocení koncentrace GAG využijeme Alciánovou modř nebo Safranin O – Fast Green, volila bych tuto metodu, jelikož poskytuje mnohem kontrastnější zobrazení. Na rozdíl od Alciánové modří nám umožňuje vidět, že nejpovrchovější vrstvička chrupavky také neobsahuje vysoké koncentrace GAG a je tedy zbarvená do zelena. Tento jev můžeme nejvýrazněji vidět na obrázku 5a.



Obr. 5 Barvení Safranin O – Fast Green, barvení GAG a matrix; a), d první koleno; c), d) druhé koleno; zvětšení 40x

## 6.8. Hodnocení vzorku kolenního kloubu králíka

Po barvení vzorků různými diferenciálními barvivami bylo možno hodnotit stav chrupavky. U vzorků však byla hodnocena i tloušťka chrupavky, která se s postupující OA snižuje. U reprezentativních vzorků byla tloušťka chrupavky měřena na třiceti místech. Z měření byla vypočítána směrodatná odchylka, která nám udává, jak moc jsou hodnoty odchýleny od průměru hodnot. Pomocí t-testu byly také porovnávány rozdíly mezi kontrolním vzorkem bez OA, vzorkem osm týdnů po indukci OA, vzorkem šesti měsíců po indukci OA a vzorky

kloubů léčenými Synviscem a Hyalganem. Pokud je hodnota t-testu menší, než 0,05 nachází se mezi porovnávanými vzorky statisticky významný rozdíl, jak uvádí např. Elsaid a kol. (2012)

V tabulce naměřených hodnot byly pro každou skupinu vzorků chrupavky, s výjimkou kontroly, vybrány dva reprezentativní vzorky, u kterých byla na třiceti místech měřena šířka chrupavky. Naměřené hodnoty nám posloužily jako výchozí data pro výpočet statisticky významného rozdílu mezi vzorky.

Tab. 3 Porovnávání tloušťky chrupavky kolenního kloubu u králíků zdravých (ZK), u skupiny s indukovanou OA a u skupin léčených Synviscem (SYN) a Hyalganem (HYA). Tabulka popisuje průměrné hodnoty tloušťky chrupavky jednotlivých vzorků [ $\mu\text{m}$ ], směrodatné odchyly a střední hodnotu po 8 týdnech a 6 měsících.

<b>Vzorky chrupavky</b>	<b>Průměr</b>	<b>Směrodatná odchylna</b>	<b>Medián</b>
ZK	1000.63	353.20	1132.33
OA 8t	1816.23	326.93	1873.86
OA 6M	1198.81	464.02	1005.85
HYA 8t	1779.34	342.85	1751.22
HYA 6M	1389.10	705.60	1294.09
SYN 8t	1602.11	646.64	1473.89
SYN 6M	1661.99	696.84	1555.30

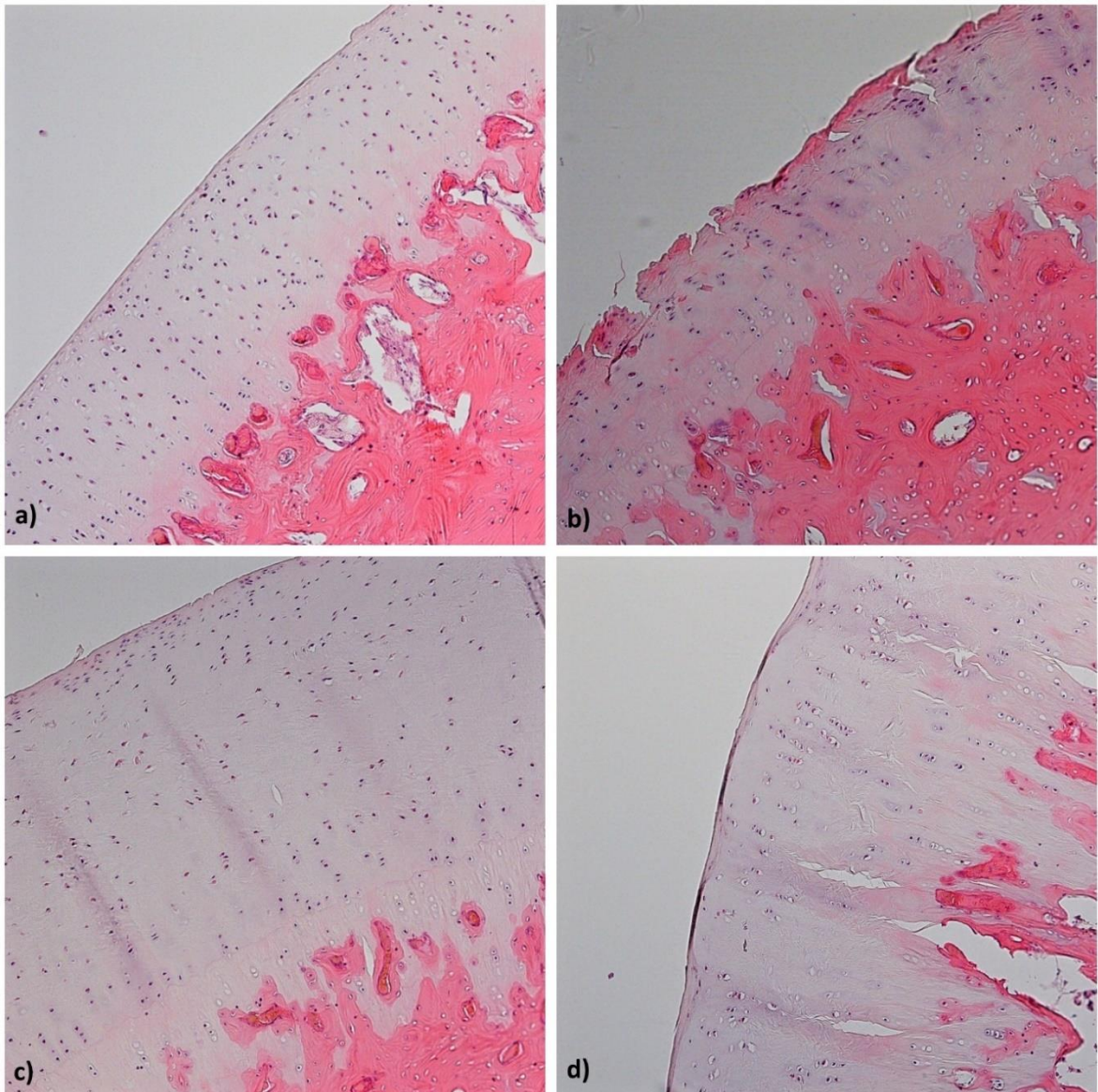
Tab. 4 Porovnávání tloušťky kolenního kloubu králíků zdravých, s indukovanou OA a léčených Synviscem a Hyalganem; vypočtené hodnoty t-testu mezi vzorky: kontrolním bez artrózy (ZK), osteoartróza po osmi týdnech od indukce (OA 8t), osteoartróza po šesti měsících od indukce (OA 6M), osteoartróza léčená Hyalganem (HYA), osteoartróza léčená Synviscem (SYN)

<b>Vzorky chrupavky</b>	<b>Hodnoty T-test</b>	<b>Statisticky významný rozdíl</b>
ZK - OA 8t	0.0000	ano
ZK - OA 6M	0.0275	ano
OA 8t - HYA 8t	0.5128	ne
OA 6M - HYA 6M	0.0600	ne
OA 8t - SYN 8t	0.0143	ano
OA 6M - SYN 6M	0.0000	ano
HYA 8t - SYN 8t	0.0438	ano
HYA 6M - SYN 6M	0.0218	ano

Hodnoty t-testu neukázaly mezi artrotickými vzorky a vzorky po aplikaci Hyalganu statisticky významný rozdíl. Na druhou stranu po aplikaci Synviscu je rozdíl mezi chrupavkou po aplikaci léčebné látky a chrupavkou bez léčebného zásahu výrazný. Z tohoto

měření, ale i z porovnávání obou látek spolu můžeme dojít k závěru, že Synvisc se zdá jako léčebná látka účinnější.

Při barvení vzorku jsme mohli pozorovat koncentraci GAG v chrupavce, či elastických vláken. Dále byl hodnocen povrch chrupavky a tvar chondrocytů.

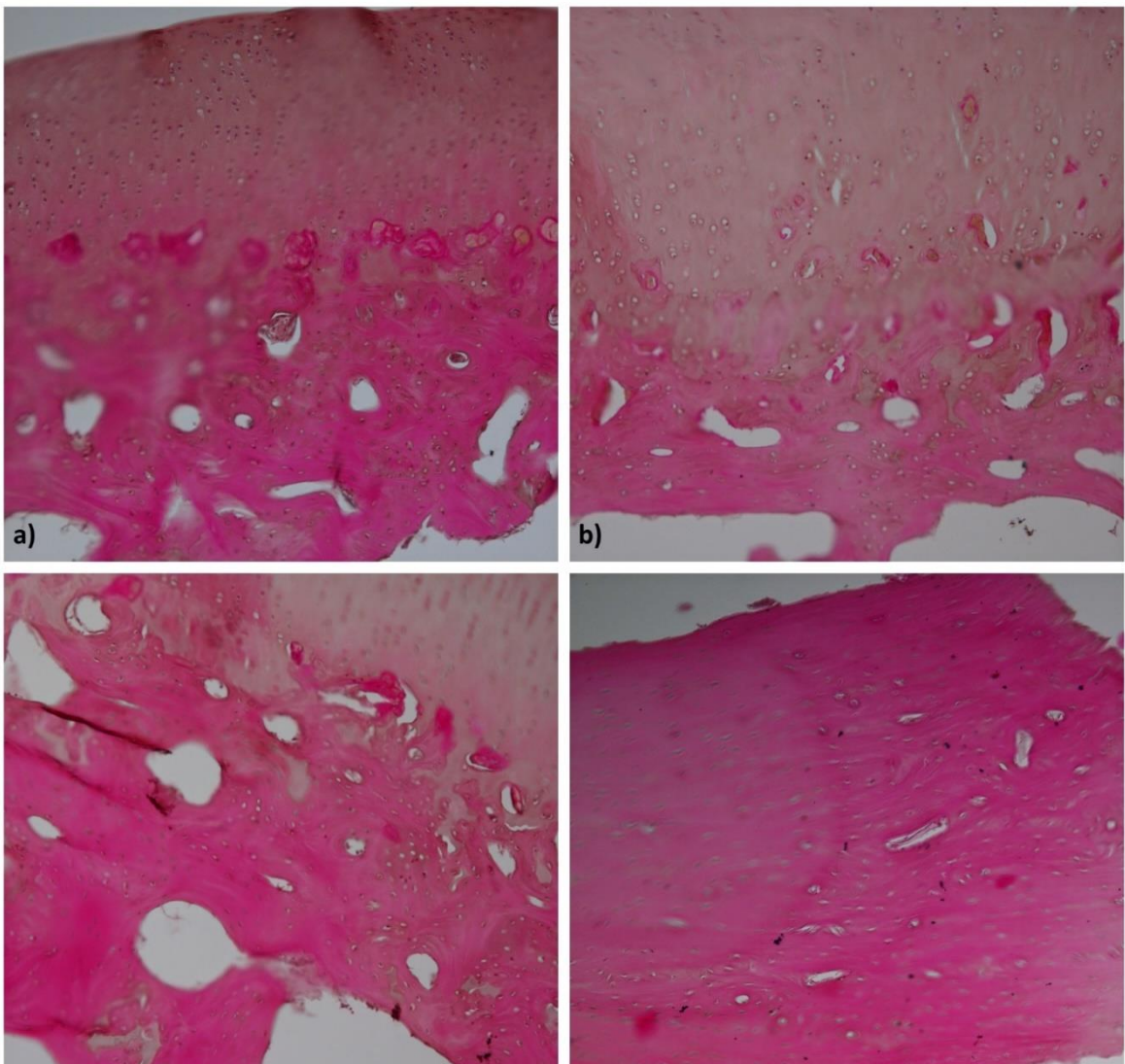


Obr. 2 Barvení HE, zviditelnění morfologie chrupavky; a) kontrolní chrupavka bez OA; b) chrupavka s OA; c) chrupavka léčená Hyalganem; d) chrupavka léčená Synviscem; vše šest měsíců; zvětšení 100x

Barvení HE je jedním ze základních barvení v histologii a v tomto případě také nejvhodnější barvení pro hodnocení morfologie chrupavky. Na obrázku 6a je zachycena zdravá králičí chrupavka. Její povrch je nepoškozen, barvení je homogenní, jádra jsou malá



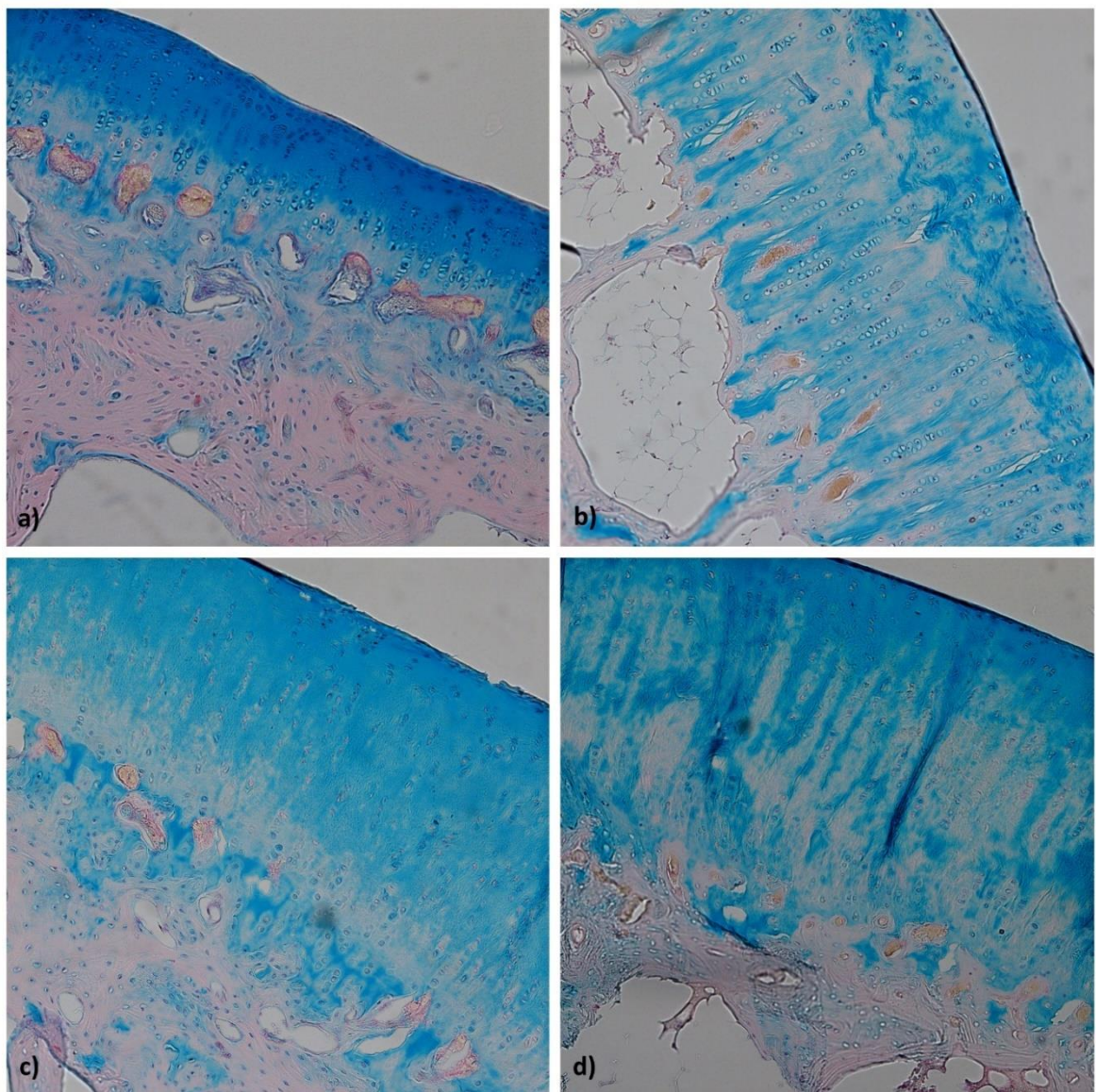
nedeformovaná. Obrázek 6b nám poskytuje pohled na chrupavku s 6 měsíců neléčenou artrózou. Již na první pohled je povrch chrupavky značně poškozen, chrupavka je tenčí, nehomogenně barvena s deformovanými jádry. Podobné skutečnosti popisuje i Bendele (2001). Snímky 6c a 6d představují chrupavky léčené. V obou případech můžeme pozorovat jen lehké deformity jader. V porovnání s 2b můžeme tedy látkám připustit pozitivní účinek na chrupavku.



Obr. 3 Barvení Aldehydový fuchsin pro kolagenní vlákna; a) kontrolní chrupavka bez OA; b) chrupavka s OA; c) chrupavka léčená Hyalganem; d) chrupavka léčená Synviscem; b), d) šest měsíců, c) osm týdnů; zvětšení 100x

Barvení pomocí aldehydového fuchsinu nám umožňuje barvit kolagenní vlákna. Nejslabší barvení můžeme vidět na obrázku 7b, kde je chrupavka zasažena OA. Snímky 7c

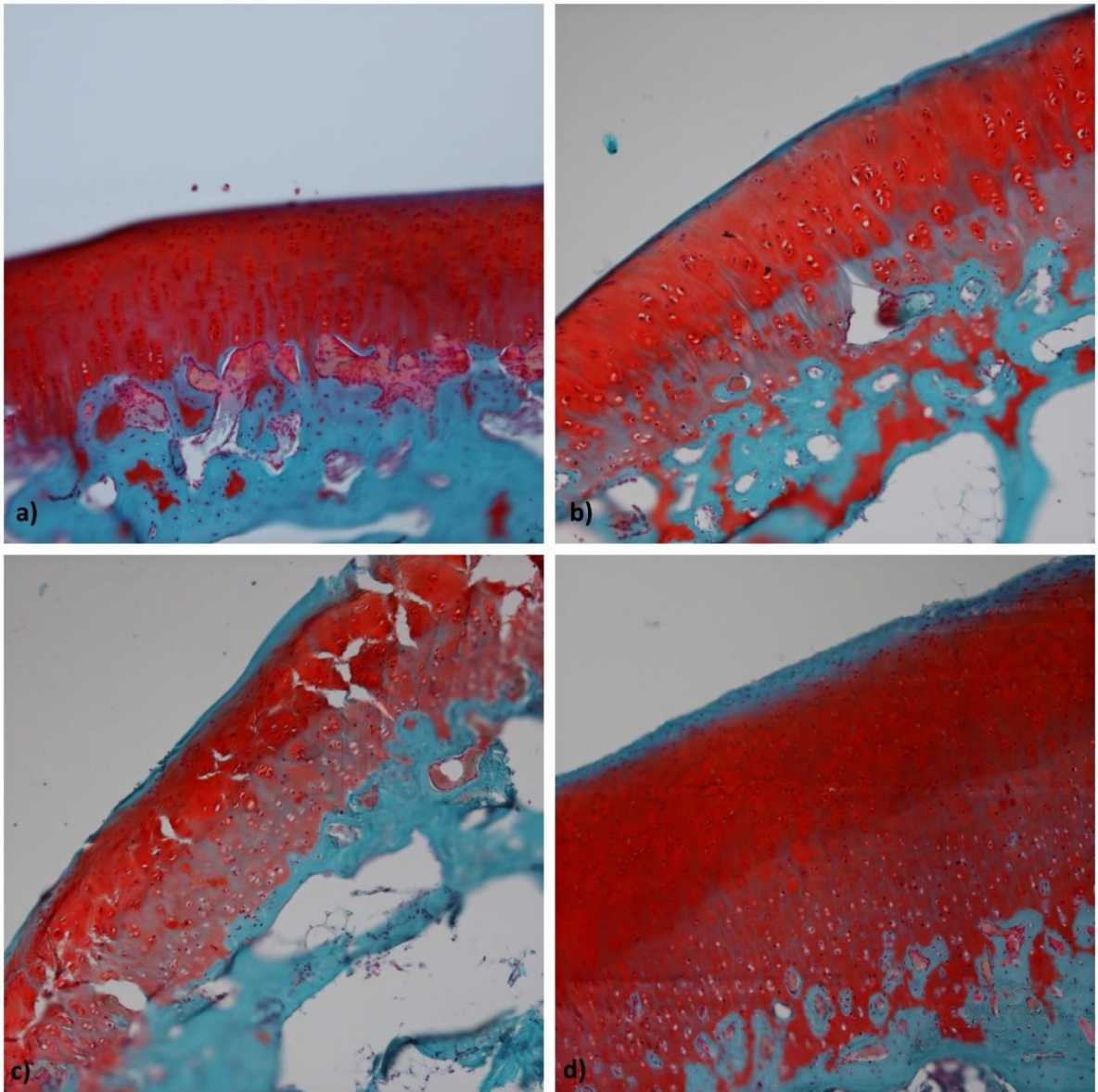
a 7d jsou chrupavky léčené a množství kolagenu se nám jeví při nejmenším stejné jako na kontrolním snímku 7a. U Synviscu (7d) můžeme pozorovat i více barvené kolagenní vlákna. U zhojené chrupavky se vyskytuje více kolagenních vláken, tzv. vazivová chrupavka, proto se zhojené chrupavky tak výrazně barví aldehydovým fuchsinem, jež kolagenní vlákna barví.



Obr. 4 Barvení Alcíanovou modří pro GAG; a) kontrolní chrupavka bez OA; b) chrupavka s OA; c) chrupavka léčená Hyalganem; d) chrupavka léčená Synviscem; b), c) šest měsíců, a), d) osm týdnů; zvětšení 100 x

Síla barvení alcíanovou modří je přímo úměrná koncentraci GAG v chrupavce. Na snímku 8a můžeme vidět kontrolní vzorek bez OA, kdy tmavě modré homogenní zbarvení ukazuje na vysokou koncentraci GAG v chrupavce. I když povrch chrupavky 8b není

mechanicky poničen, jedná se o chrupavku postiženou OA. Jedná se o prvotní známky změn na chrupavce, kdy zvýšené zadržování vody v chrupavce vede ke sníženému množství proteoglykanů, na které se GAG navazují. Na snímcích 8b, 8c a 8d můžeme tedy pozorovat chrupavku OA postiženou, avšak na snímcích 8c a 8d si můžeme povšimnout zvýšení koncentrace GAG vlivem léčby.



Obr. 5 Barvení Safranin O – Fast Green pro GAG; a) kontrolní chrupavka bez OA; b) chrupavka s OA; c) chrupavka léčená Hyalganem; d) chrupavka léčená Synviscem; vše šest měsíců; zvětšení 100x

Barvení Safranin O – Fast Green umožňuje červené zbarvení GAG a kontrastní zelené zbarvení matrix. Jde o obdobu barvení alciánovou modří, jelikož na chrupavce

pozorujeme stejné jevy. Síla červeného zbarvení je zde také přímo úměrná koncentraci GAG v chrupavce.

## 7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala problematikou osteoartrózy, jakožto nezánettivého degenerativního onemocnění kloubů. V teoretické části jsem se věnovala komplexnímu popisu tohoto onemocnění, jeho diagnostikou a terapií. Dále byla popsána stavba lidského a zvířecího kloubu. V neposlední řadě nechyběl popis samotné chrupavky a obecný popis tvorby vzorků pro praktickou část.

Praktická část byl zaměřena na popis rozdílů chrupavky zdravé, nemocné a léčené a histologických metod. Podařilo se mi zmapovat rozdíly mezi těmito třemi skupinami na základě použitých barvení. Mnou použitá barvení by jistě našla uplatnění v preklinickém testování přípravků spojených s léčbou OA, jelikož jsme schopni pomocí těchto histologických metod určit, zda je kloub postižen OA či nikoliv a dle šířky chrupavky jsme schopni odhadnout stupeň OA. Barvicí techniky nám však nejen umožňují vizualizovat degradaci chrupavky, ale i terapeutický efekt léčiva. Například barvením aldehydovým fuchsinem jsme schopni vizualizovat zhojenou chrupavku, tzv. vazivovou, u níž se barvivo váže na nová kolagenní vlákna.

V rámci této práce byly jako terapeutické látky zvoleny Synvisc a Hyalgan. Po vizuálním zhodnocení histologických preparátů i po zhodnocení měření šířky chrupavky usuzuji, že pro léčbu OA je vhodnější přípravek Synvisc. U kloubů, kde jako viskosuplementační látka byl použit Synvisc dochází k revitalizaci chrupavky, o čemž svědčí i statisticky významný rozdíl mezi chrupavkou postiženou OA a chrupavkou po terapii Synviscem. U látky Hyalgan jsem statisticky významný rozdíl mezi postiženým kloubem a kloubem po terapii nezaznamenala, avšak dle histologického pozorování i tato látka vykazuje terapeutický účinek.

Podářilo se mi tedy prokázat, že viskosuplementace je účinná terapeutická metoda v léčbě OA. Tuto práci bych dále ve spolupráci s přípravky firmy Contipro a.s. rozvedla v práci diplomovou, kde bych se zabývala viskosuplementačním modelem.

## **Conclusion**

In this bachelor thesis, I studied problematics of osteoarthritis, as a noninflammatory degenerative joint disease. In theoretical part, I complexly described this disease, diagnostics and therapy. Then I described morphology of human and animal joint. Last but not least, there was not missing a description of the cartilage itself and a description of making samples for the practical part.

Practical part was focused on description of a healthy cartilage in comparison with diseased and treated one, and description of histological methods. I successfully charted differences between these groups of cartilages based on used dyeings. Used dyeings could surely find assertions within preclinical testing of medicaments related with OA therapy, because we, with help of these histological methods, are able to determine whether the joint is diseased with OA, or is not, furthermore, by the width of cartilage, we are able to estimate the stage of disease. Dyeing methods help us not only to visualize degradation of a cartilage, but a therapeutical effect of a medicament, too. For example, by dyeing with aldehydic fuchsin, we are able to visualize cured cartilage, so-called fibrous cartilage, where the dye binds on new collagen fibres.

In this thesis were Synvisc and Hyalgan used like a therapeutical substances. After visual evaluation of histological samples and measurement of cartilage width, I assume that the Synvisc is more suitable substance for OA treatment, than Hyalgan. At joints, where the Synvisc was used as a viscosupplementation substance, the cartilage was revitalized, which was evidenced by a statistically significant difference between the cartilage diseased by OA and the cartilage treated with Synvisc. With using Hyalgan, I did not notice a statistically significant difference between the cartilage diseased by OA and the cartilage after therapy, but according to histological observation, this substance, has a therapeutical effect too.

Accordingly, I succeeded to prove that viscosupplementation is effective as a therapeutical method in OA treatment. I would like, with cooperation of Contipro a.s., to expand this thesis to thesis dissertational, where would be a viscosupplementary model examined.



## 8. Seznam literatury

### Literatura

BENDELE, A. M. (2001): Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact* 1(4): 363-376

DUNGL, Pavel. A kol. *Ortopedie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005, 1273 s. ISBN 80-247-0550-8.

ELSAID, K. A. a kol (2012): The impact of forced joint exercise on lubricin biosynthesis from articular cartilage following ACL transection and intra-articular lubricin's effect in exercised joints following ACL transection. *Osteoarthritis and Cartilage* 20: 940-948

GALLO, Jiří. *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 211 s. ISBN 978-802-4424-866.

JAVŮREK, Jan. *Život s artrózou*. Praha: Grada-Avicenum, 1996, 138 s. ISBN 80-716-9313-8.

KÖNIG, H. E. a LIEBICH, H. G. *Anatomie domácích savců: 1. díl pohybový aparát*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská Grafia, 2003. 286 s. ISBN 80-88700-56-6

KOUDELA, Karel. *Ortopedie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 255 s. ISBN 80-246-0654-2.

LÜLLMANN-RAUCH, Renate. Histologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2012. 576 s.  
ISBN 978-80-247-3729-4

NAJBRT, Radim. A kol., Veterinární anatomie 1. 2. uprav. vyd. Praha: Státní zemědělské  
nakladatelství, 1973. 524 s. ISBN (Váz.)

NAVRÁTIL, Leoš. Vnitřní lékařství: pro nelékařské obory. 1. vyd. Praha: Grada  
Publishing, 2008. 424 s. ISBN 978-80-247-2319-8.

VACEK, Zdeněk. Histologie a histologická technika. Histologická technika II. část. 1. vyd.  
Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 185 s. ISBN 80-  
7013-202-7

WEI, B. a kol. (2015): Use of quantitative MRI for the detection of progressive cartilage  
degeneration in a mini-pig model of osteoarthritis caused by anterior cruciate ligament  
transection. J. Magn. Reson. Imaging

### **Internetové zdroje**

Hyalgan (Sodium Hyaluronate): Defy The Pain [online]. Fidia Pharma USA Inc, Parsippany,  
© 2017, Last updated: January 2017 [cit. 2017-02-13]. Dostupné z: <http://hyalgan.com/>

Johns Hopkins, Arthritis Center: Hyaluronate (Synvisc® & Hyalgan®) [online]. Johns  
Hopkins Arthritis Center © 2017, Last updated: April 25, 2012 [cit. 2017-02-13]. Dostupné  
z: <https://www.hopkinsarthritis.org/patient-corner/drug-information/hyaluronate-synvisc-hyalgan/>

Synvisc One: Hylan G - F 20 [online]. Sanofi-aventis U.S. LLC, A SANOFI COMPANY,

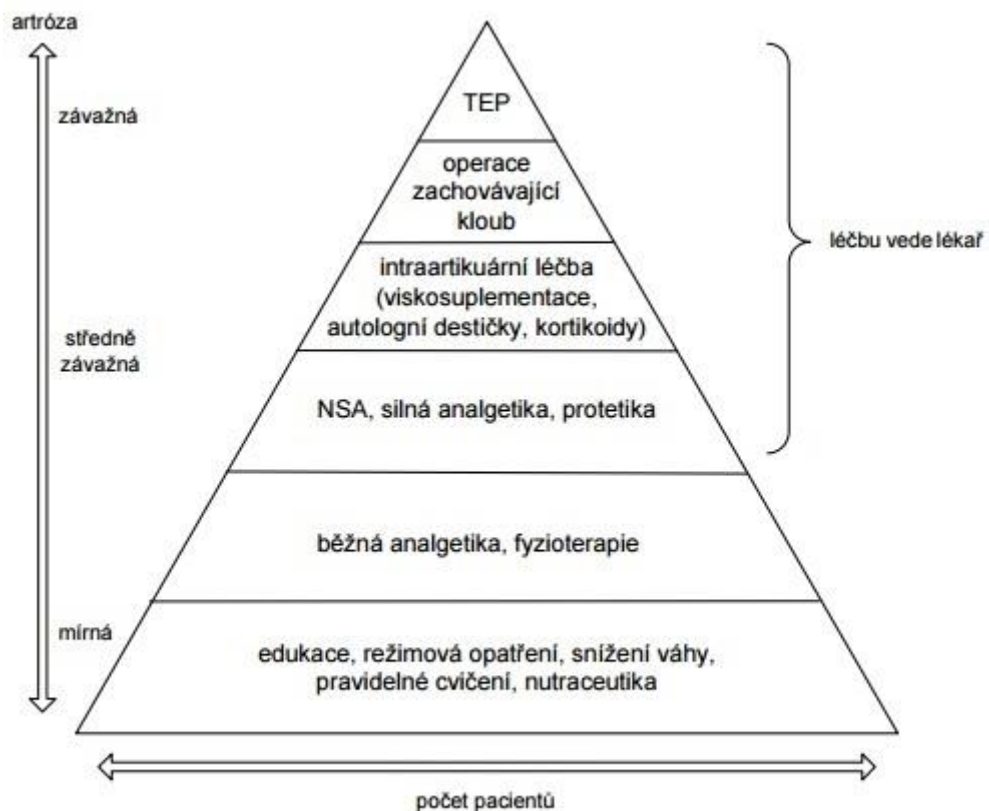
© 2002 – 2015, Last updated: September 2016 [cit. 2017-02-13]. Dostupné z:

<http://www.synviscone.com/>

## 9. Přílohy

### Příloha č. 1

Pyramidová koncepce léčby osteoartrózy (převzato z knihy *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult*, Gallo a kol., 2011).



Každé zhoršení artrózy by mělo vést k nasazení nástroje z vyššího patra, přičemž se současně využívají efektivní přístupy z nižších pater; NSA – nesteroidní antirevmatika, TEP – totální endoprotéza.

## Příloha č. 2

Označení chemikálií použitých v barvicích protokolech již předem namíchaných ve firmě Contipro a.s., bez výrobce a šarže.



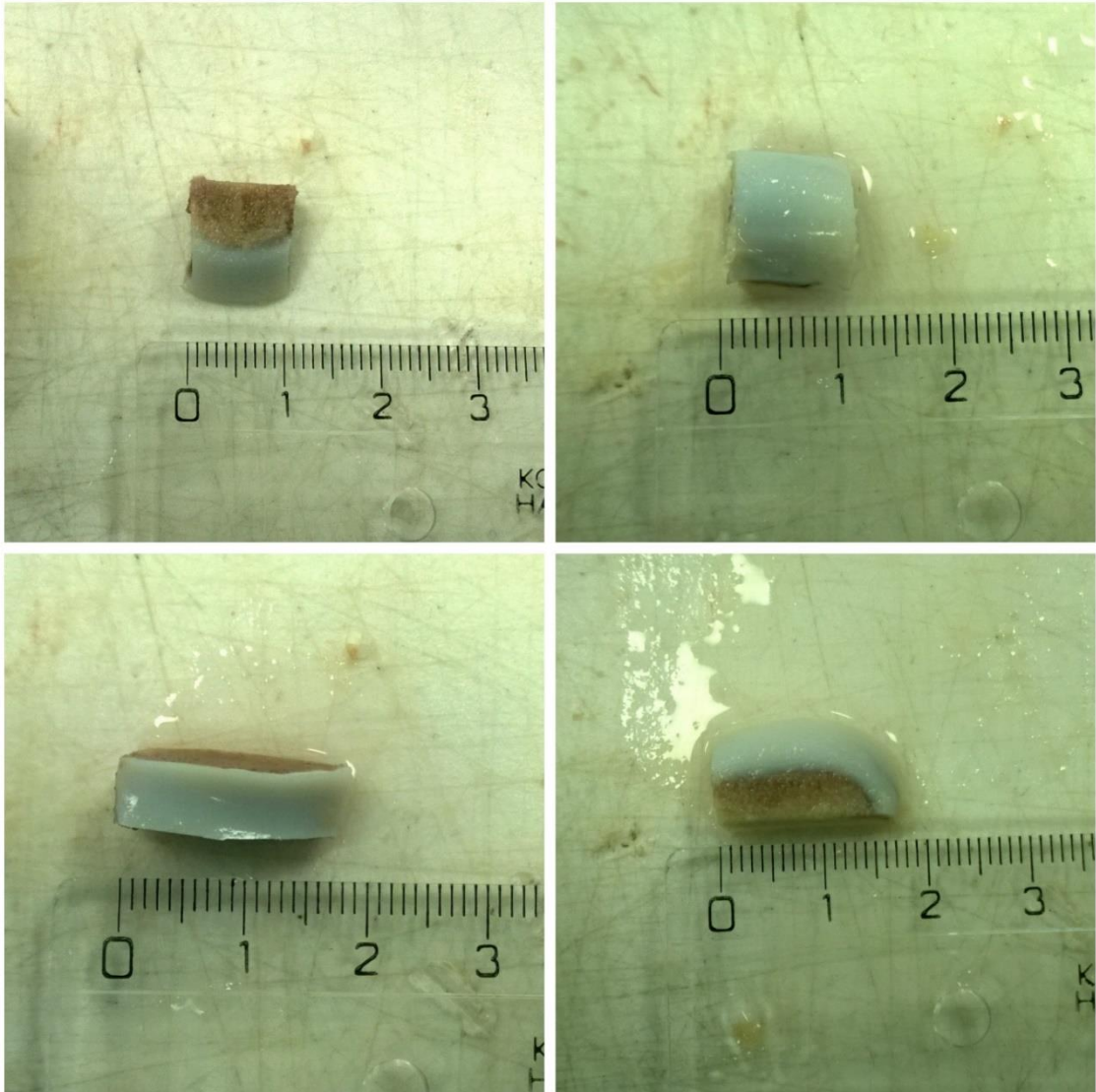
### Příloha č. 3

Příprava odběru vzorku chrupavky z prasečího kolene.



#### Příloha č. 4

Velikost čtyř náhodně vybraných vzorků kloubů s částí chrupavky, přepravené pro vložení do histologické kazety a následné zalití do parafinu.



## Příloha č. 5

Zaparařinovaný vzorek vložený do mikrotomu, s nožem umožňujícím krájet tvrdé tkáně – odvápněné kosti.

