

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Kmenové buňky a jejich využití pro veterinární  
účely**

kalářská práce

Autor práce: Eliška Lajblová

Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Kmenové buňky a jejich využití pro veterinární účely" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

Eliška Lajblová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce prof. Ing. Mgr. Merkář Sedmíkové za vedení, rady a připomínky. Dále bych poděkovala Mgr. Danielovi Bezděkovi za možnost odborné konzultace a poskytnutí materiálů v oblasti výzkumu kmenových buněk a jejich využití pro veterinární účely. Dalším komu bych chtěla poděkovat je RNDr. Petře Markové za odbornou revizi, poskytnutí materiálů v oblasti lidské medicíny a věcné připomínky. A v neposlední řadě celé své rodině a přátelům, kteří mě podporovali.

# Kmenové buňky a jejich využití pro veterinární účely

## Souhrn

Kmenové buňky se nacházejí ve všech mnohobuněčných organismech. Je to nediferencovaná buňka, která je schopna se přeměnit v celou škálu buněčných typů. Dále mají schopnost sebeobnovy a díky těmto vlastnostem se dostávají do popředí vědeckého zájmu. Právě tento potenciál kmenových buněk se zdá být novým směrem, kam se ubírá veterinární i lidská medicína. Pokud by se podařilo objasnit principy fungování kmenových buněk při regeneraci tkáně bylo by možné léčit doposud nevléčitelné nemoci.

První polovina bakalářské práce je zaměřena na obecné informace o kmenových buňkách, jejich vlastnostech a rozdělení. Existují tři základní typy kmenových buněk. Embryonální kmenové buňky (ESC), které jsou odebírány z embrya ve stádiu blastocysty. Právě ESC mají potenciál dát vzniknout celému organismu, ale při jejich odběru a zpracování vzniká plno etických otázek. Je na každém státu, jak se k této problematice postaví. Druhým typem jsou dospělé kmenové buňky, které se v určitém množství nachází ve všech tkáních těla. Jsou to buňky již více diferencované, ovšem stále schopné dát vznik různým typům buňkám. Nejvíce jsou klinicky zkoušeny mesenchymální kmenové buňky, kmenové buňky odebrané z tukové tkáně a v neposlední řadě kmenové buňky pocházející z extrafetálních zdrojů jako je pupečnicková tkáň či krev. Posledním typem kmenových buněk jsou indukované pluripotentní kmenové buňky. Jsou to uměle vytvořené kmenové buňky, které vznikají genetickým přeprogramováním dospělé již diferencované buňky. Jedná se o poměrně novou metodu, a proto ještě není zcela objasněn princip přeprogramování. Ovšem pokud by se povedlo tyto nejasnosti objasnit znamenalo by to možnost získávání lidských ESC bez jakýchkoli etických otázek.

Druhá polovina práce je věnovaná právě praktickému využití kmenových buněk pro veterinární i lidskou medicínu. V současné době se výzkum pro veterinární účely nejvíce zabývá defekty vazů a šlach, osteoartrózou a osteochondrálními defekty. Dále se úspěšně testuje použití mezenchymálních kmenových buněk pro osteosyntézu a léčbu rozsáhlých defektů kůže. V České republice se léčba kmenovými buňkami zaměřuje hlavně na psy, koně a kočky. Řada vážných nevléčitelných onemocnění člověka vzniká ztrátou nebo selháním určitého typu buněk v těle. To platí zejména u chorob spojených se stárnutím, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba či osteoartróza.

**Klíčová slova** : kmenová buňka, kůň, pes, osteoartróza, osteochondróza, šlachy

# **Stem cells and their use in veterinary practice**

## ***Summary***

Stem cells are found in all multicellular organisms. They are undifferentiated cells which are capable of being converted into a wide variety of cell types. They also have ability to self-renew and thanks to these features come to the foreground of scientific interest. It is this potential of stem cells that seems to be the new direction in veterinary and human medicine. If we would be able to explain the principles of functioning of stem cells in tissue regeneration, it may be possible to treat many previously untreatable diseases.

The first half of this thesis is focused on general information about stem cells, their properties and distribution. There are three basic types of stem cells. Embryonic stem cells (ESC) that are collected from an embryo at the blastocyst stage. ESC has the potential to give rise to a whole organism, but in their collecting and processing is a lot of ethical issues. It is up to each country to cope with this issue. The second type are adult stem cells that are located in a certain amount in all tissues of the body. They are more differentiated cells, but still able to give rise to different types of cells. The most clinically tested stem cells, mesenchymal stem cells, are taken from adipose tissue and also stem cells derived from extrafetal sources such as umbilical cord blood or tissue. The last type of stem cells are induced pluripotent stem cells (iPSC). These are artificially created stem cells arising by genetic reprogramming of already differentiated adult cells. This is a relatively new method and therefore is not fully understood the principle of reprogramming. But if it would be possible to clarify these uncertainties it would mean the possibility of obtaining human ESC without any ethical issues.

The second half is about a practical use of stem cells for human and veterinary medicine. Currently, research for veterinary is the most concerned to defect of ligaments and tendons, osteoarthritis and osteochondral defects. Furthermore, successfully tested is use of mesenchymal stem cells for treatment of osteosynthesis and treatment of large defects of skin. In the Czech Republic stem cell therapy focuses mainly on dogs, horses and cats. Many serious incurable disease in humans are caused by loss or failure of specific cell types in the body. This is particularly true for diseases associated with aging such as Alzheimer's or Parkinson's disease and osteoarthritis.

**Keywords:** stem cell, horse, dog, osteoarthrosis, osteochondrosis, tendon

## Obsah

1. Úvod .....	2
2. Cíl práce.....	3
3. Literární přehled .....	4
3.1 Co je kmenová buňka .....	4
3.1.1 Vlastnosti kmenových buněk .....	5
3.1.2 Typy kmenových buněk .....	6
3.2. Možnosti léčby ve veterinárním lékařství .....	14
3.2.1. Osteoartróza.....	15
3.2.2 Dysplazie kyčelního kloubu (DKK).....	19
3.2.4 Osteochondróza .....	22
3.2. 5 Imunitně zprostředkovaná polyartritida .....	25
3.2.6 Poškození šlach a vazů, fraktury kostí .....	26
3.3 Terapie kmenovými buňkami v humánní medicíně .....	29
3.3.1 Onemocnění pohybového aparátu .....	30
3.3.2 Neurodegenerativní onemocnění .....	31
4. Závěr.....	35
5. Seznam literatury.....	36
6. Přílohy .....	45

# 1. Úvod

V dnešní době se kmenové kmenové buňky stávají stále častěji diskutovaným tématem vzhledem k jejich potenciálu sebeobnovy a diferenciaci do různých buněčných typů. Díky stále se rozvíjejícím technologiím v oblasti výzkumu se kmenové buňky zdají být novým směrem v oblasti medicíny. Tento potenciál by mohl umožnit čelit nejenom nemocem 21. století, ale mohl by poskytnout alternativní možnosti léčby i u ostatních nemocí.

V současnosti se výzkum ve veterinární medicíně v České republice zaměřuje především na léčbu koní a psů. Léčí se defekty vazů a šlach, osteoartróza, různé etiologie, osteochondrální defekty, dále se úspěšně testuje použití mezenchymálních kmenových buněk pro osteosyntézu a léčbu rozsáhlých defektů kůže. Před několika lety se u zvířat s takovými problémy muselo ve většině případů přistoupit k eutanázii, dnes je možnost podstoupit buněčnou terapii, která zmírňuje symptomy onemocnění a v některých případech může dojít k úplnému uzdravení.

## **2. Cíl práce**

Cílem této práce je shrnutí dosavadních poznatků o kmenových buňkách, jejich rozdělení a vlastnostech. Dále představení stávajících poznatků o studiích kmenových buněk a jejich praktickému využití ve veterinárních disciplínách i největších úspěchů v lidské medicíně nejenom na území České republiky, ale i v zahraničí.



## 3. Literární přehled

### 3.1 Kmenová buňka

Kmenové buňky se nacházejí ve všech mnohobuněčných organismech. Je to nediferencovaná buňka, která je schopna se přeměnit v celou škálu buněčných typů. Zároveň produkuje celou řadu růstových a protizánětlivých faktorů, které pozitivně ovlivňují buněčnou proliferaci. Tyto jedinečné vlastnosti umožňují organismu trvalou regeneraci poškozených tkání a orgánů (Potten a Loeffler, 1990).

Kmenové buňky můžeme rozdělit do třech základních skupin. Kmenové buňky embryonální (ESC), získávané z vnitřní buněčné masy embrya (embryoblastu) stádiu blastocysty. Dospělé kmenové buňky (ASC), které se nacházejí ve všech tkáních těla, a indukované pluripotentní kmenové buňky, které mohou být uměle vytvořeny genetickou manipulací ([www.cellmagel.cz](http://www.cellmagel.cz)).

Použití embryonálních kmenových buněk je spojeno s celou řadou problémů. Mezi ně patří zejména problémy etického charakteru, kdy podle obecně platného názoru je ke vzniku těchto buněčných linií nutné zahubit životaschopné embryo. Závažnějším problémem se pak jeví sklon ke vzniku nádorů a rakovinotvornému bujení. I přes toto riziko jsou státy, kde je možné podstoupit léčbu pomocí ESC (Ukrajina). (Bezděk, 2015, pers. comm.)

Nejčastěji používané jsou dospělé kmenové buňky, které je možné izolovat z celé řady tkání a následně expandovat (pomnožit) v laboratoři. Odebírají se například z kostní dřene, tukové tkáně a z pupečnickové stěny. Do této skupiny patří například hematopoetické kmenové buňky a mesenchymální kmenové buňky (MSC). Z hlediska aplikace mohou být buňky rozděleny na buňky autologní (buňky jsou odebrány a aplikovány stejnému jedinci), alogenní (cizího původu), což představuje nejnovější světový trend. Vyloučena není do budoucna ani aplikace xenogenní (z jiného živočišného druhu) ([www.cellmagel.cz](http://www.cellmagel.cz)).

MSC mají vysoký reparační potenciál a mohou tak být v budoucnu velkým přínosem nejenom ve veterinární, ale i v humánní medicíně. Ovšem výzkum účinnosti kmenových buněk v regenerativní medicíně je stále ve fázi výzkumů, a proto je stále nejasné, které buňky jsou pro terapeutické využití nejvhodnější.

### 3.1.1 Vlastnosti kmenových buněk

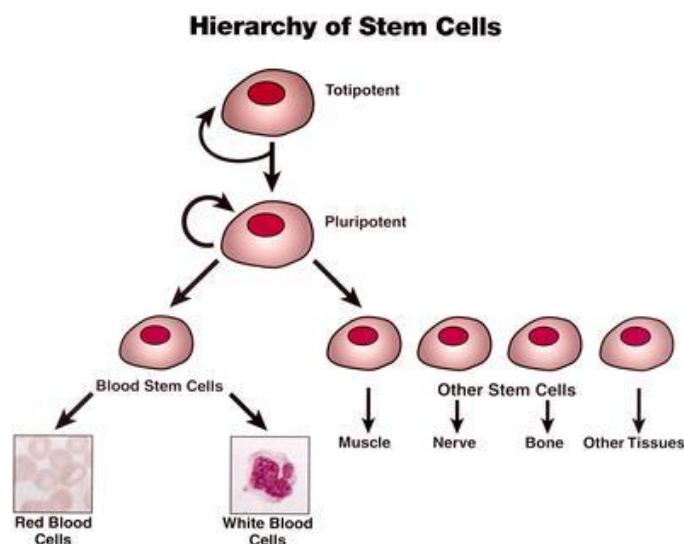
Schopnost diferenciaci do nejrůznějších typů buněk je hlavní vlastností kmenových buněk v organismu. Tato vlastnost umožňuje růst a regeneraci organismu. To, v jakou buňku se kmenová buňka promění, záleží na nejbližším prostředí kolem ní. Toto prostředí nazýváme nika. Z hlediska schopnosti diferenciaci rozeznáváme buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní.

Buňky totipotentní mají potenciál vzniku jakékoliv buňky v organismu a tím i možnost dát vzniknout celému organismu. Nacházejí se v embryu a jsou schopny vytvořit embryoblast i trofoblast. Po splnutí spermie a vajíčka vzniká zygota, což je vlastně první totipotentní buňka. Ze začátku zygota produkuje totipotentní buňky, které se až po několika dnech začínají diferencovat. Totipotentní buňka, odebrána odkudkoliv, se po přenesení do vhodného prostředí diferencuje v buňky dané niky (např. mezi buňky nervové, kdy je schopna se přeměnit v neuron.) Právě tato vlastnost je hlavním důvodem k vědeckému výzkumu a léčebnému využití.

Totipotentní buňky dávají vzniknout buňkám pluripotentním, které jsou schopny se přeměnit v buňky tří zárodečných listů (ektodermu, mesodermu a entodermu) a tím dávají vzniknout jednotlivým tkáním a orgánům. Buňky pluripotentní se však nemohou přeměnit v buňku totipotentní. Tyto buňky nejsou již schopné dát vznik novému jedinci, protože nejsou schopny tvořit trofoblast. Pluripotentní buňka má omezenou schopnost tvorby buněčných typů. Preferuje vznik buňky ze zárodečného listu, ze kterého buňka pochází.

Multipotentní buňky mají omezenou schopnost přeměny. Dlouhodobě si zachovávají schopnost sebeobnovy a přeměny ve specializované typy buněk. Dlouhou dobu se myslelo, že mohou dát vzniknout jen buňkám, které jsou jí typově blíže příbuzné. Ovšem ukázalo se, že např. buňky hematopoetické se mohou diferencovat jak do buněk kosterního svalstva, tak do neuronů.

Buňky unipotentní, neboli progenitorové buňky, jsou schopny produkovat jen jediný typ buněk a jsou schopny samoobnovy. Jedná se o přechod mezi kmenovými a somatickými buňkami.



**Obr. 1:** Rozdělení kmenových buněk z hlediska jejich schopnosti diferenciacce

Vedle schopnosti diferenciovat do nejrůznějších buněčných typů, se kmenové buňky podílí na udržení tkáňové homeostázy, což představuje udržení stálé struktury a velikosti tkání. Obnova tkání je potřebná během celého života jedince. Je nutné zajistit jistou rovnováhu mezi proliferací, diferenciací a buněčnou smrtí buněk (Sadler, 2009).

### 3.1.2 Typy kmenových buněk

Existují tři základní typy kmenových buněk. Embryonální kmenové buňky získávané z embrya. Dospělé kmenové buňky, které můžeme najít v již vytvořených tkáních a indukované pluripotentní kmenové buňky, což jsou odebrané somatické buňky, geneticky vrácené do stádia kmenové buňky a dále kultivované. Podle existence „in vivo“ (v živém organismu) a „in vitro“ (v uměle vytvořených podmínkách) rozlišujeme kmenové buňky primární in vivo a sekundární in vitro ([www.cellmagel.cz](http://www.cellmagel.cz)).

### Embryonální kmenové buňky

#### Historie

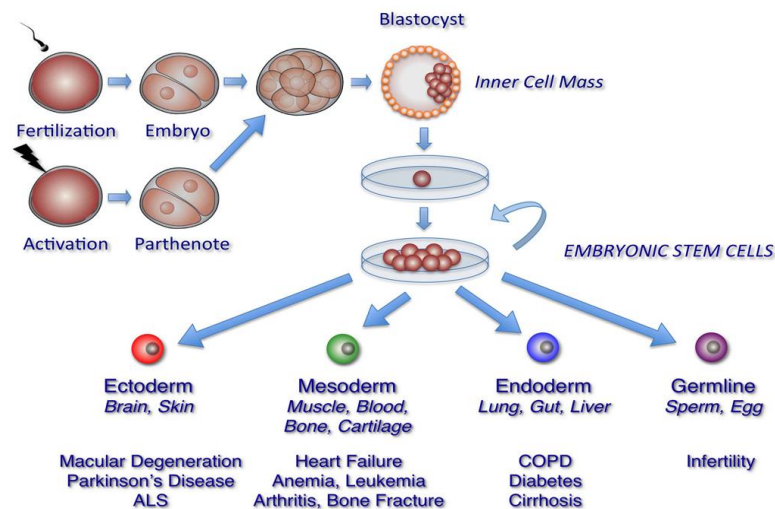
Již v 70. letech 20. století si vědci začali všimnout podobnosti buněk, které dávají vznik teratokarcinomu u myši a buněk, ze kterých vzniká vyvíjející se embryo. Jejich podobnost je tak velká, že je možné, aby se nádorové kmenové buňky spojily s embryonálními kmenovými buňkami a vyvinuly se v normální, celou myš (Martin, 1980).

Poprvé se embryonální kmenové buňky podařilo izolovat v roce 1981 z myšního embrya. Doposud nebylo možné získat buněčné kultury in vitro. Jediný způsob, jak získat buněčné kultury, bylo in vivo z teratokarcinomů (Evans a Kaufman, 1981).

Teprve v roce 1998 se objevují první zmínky o lidských embryonálních kmenových buňkách. Buněčné linie z blastocysty si po nediferencované proliferaci in vitro po dobu 4-5 měsíců stále zachovávají potenciál k tvorbě trofoblastu a přeměně ve všechny tři zárodečné listy, včetně střevního epitelu, chrupavky, kosti, hladké a příčně pruhované svaloviny, neurálního a vrstevnatého dlaždicovitého epitelu. Od tohoto úspěchu a zjištění si vědci začínají uvědomovat, že takto izolované buněčné linie mohou mít využití ve vývojové biologii, v objevování nových léčiv a v transplantační medicíně (Thomson et al., 1998).

### Získávání ESC

ESC jsou pluripotentní kmenové buňky získávané z vnitřní masy embrya ve stádiu blastocysty (embryoblastu). Toto stádium vzniká několik dní po oplození a obsahuje 50-150 buněk (Thomson et al., 1998). Buňky embryoblastu se dále kultivují za určitých podmínek tak, aby se zachovaly jejich vlastnosti a hlavně jejich pluripotence. Při odebírání ESC dochází k destrukci zárodku a tak vzniká etická otázka, zda tento několik dní starý zárodek spadá pod morální lidské zákony. Této problematice je věnována samostatná kapitola Legislativa.



**Obr.2:** získávání ESC

Je také vysoká pravděpodobnost odmítnutí organismu ESC derivované z embrya, často přirovnávané k transplantaci od náhodného dárce. Toto by šlo vyřešit tím, že by se přeneslo jádro somatické buňky do enukleovaného oocyty a vzniklo tak embryo, které by neslo požadovanou genetickou informaci a nebylo by počato procesem plození. Avšak nedostatek oocyty brání využití této metody v širším měřítku. Začalo se tedy uvažovat o použití oocytů jiného druhu a dát tak vzniknout mezidruhovým liniím kmenových buněk.

Ovšem i toto je veřejností odmítáno z hlediska etického, protože není dovoleno slučovat lidskou a zvířecí DNA (Fulka et al., 2008).

### **Legislativa**

Na začátku je třeba zmínit, že není třeba pro získání každé ESC nové embryo. Buňky získané z embrya je možné namnožit v laboratoři a vytvořit tak buněčnou linii, schopnou produkovat téměř neomezené množství ESC. Tyto linie produkují ESC se stejnou genetickou informací (Park et al., 2004). Získané buněčné linie jsou ukládány v buněčných bankách po celém světě. Nicméně je třeba občas tyto linie obměnit, a tak si jednotlivé státy mezi sebou běžně své linie vyměňují. Nové buněčné linie jsou důležité i pro experimentální účely pro pochopení funkce jednotlivých genů ve vývinu jedince a vývoji nemocí (Nieto et al., 2006).

Získávání lidských embryonálních buněk na úkor smrti embrya přineslo ve Spojených státech amerických spoustu ohlasů z hlediska etického. V roce 2001 prezident Bush zrušil financování výzkumu embryonálních kmenových buněk, ale po vlně nesouhlasu opět povolil financování výzkumu za účelem hledání nových léků a prostředků pro boj proti nemocem. Omezil ho však pouze na použití již zamražených embryí, získávání nových není dovoleno. Nelze však vyloučit potřebu získání nových zdrojů embryonálních kmenových buněk a využití embryonálních kmenových buněk získaných z jiných organismů (ne člověka), se nejeví jako správná cesta, jelikož není lehké tyto buňky přeměnit a tím dosáhnout úspěchů v lidské léčbě. Je tedy žádoucí získávání nových kultur embryonálních kmenových buněk (Landry a Zucker, 2004).

V roce 2009 Barack Obama vydává nařízení týkající se odstranění bariér ve výzkumu kmenových buněk. Vidí potenciál ve výzkumu jak embryonálních, tak neembryonálních kmenových buněk k léčbě dosud neléčitelných nemocí. Uvědomuje si, že za posledních 8 let byly možnosti vědců z institucí jako je National Institutes of Health na výzkum embryonálních kmenových buněk velmi omezené, ale i přesto byly výsledky povzbudivé a je třeba tento výzkum podpořit znovufinancováním. Věří tak ve větší úspěchy amerických vědců vedoucí k vývoji nových terapií, které pomohou lidstvu léčit dosavadní nemoci (The White House, 2009).

V Evropské unii nejsou vydány žádné směrnice, které by jednotně upravovaly výzkum a použití embryonálních kmenových buněk v členských státech. Proto je na každém státu, jak se rozhodne tuto problematiku regulovat.

V květnu roku 2003 byla ustanovena International Stem Cell Initiative (ISCI), organizace, která má za cíl srovnat lidské ESC linie. Hlavním místem je britská banka

kmenových buněk (UK Stem Cell Bank). Úkolem bylo shromáždit co nejvíce lidských ESC linií. Tyto linie podstupují přesně stanovené testy za určitých podmínek, aby mohly být využívány v dalším výzkumu. Laboratoře, vyzvané k účasti v ISCI, musí prokázat, že linie lidských ESC byly odebrány podle etických pravidel, která jsou obecně společností přijímána. Celkem se přidalo 17 laboratoří a přispělo tak 59 liniemi lidských ESC pro studie ISCI. Studie zahrnuje analýzu 17 povrchových antigenů průtokovou cytometrií, kvantitativní RT-PCR analýzu transkripčních úrovní více než 100 genů a změny exprese těchto genů během diferenciaci, mikrobiologické analýzy, dále DNA fingerprinting, analýzu karyotypu, histologické hodnocení vytvořených teratomů a další. Většina testů je prováděna v centrálních referenčních laboratořích (Adewumi et al., 2007).

Zákon číslo 227/2006 Sb. o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů, nařizuje povolení k výzkumu ESC získaných z lidských embryí. Všechny projekty jsou po udání licence kontrolovány nadále vládou, zda není porušen zákon. Výzkum je povolen pouze za účelem přínosu ve vědě a medicíně. Klonování je zakázáno.

Ve Spojeném království je výzkum co nejvíce omezen na využití dosavadních linií. Ovšem je možné využít embrya určená pro umělé oplození, která nebyla pro tento účel využita. Pro získávání ESC z embryí je státem vyžadováno získání licence (Her Majesty's Government, 2008).

V Německu je samotná derivace ESC z lidských embryí zcela zakázána. Je povolen pouze dovoz buněčných linií z jiných států a prováděn výzkum na těchto liniích. Tyto linie nesmí být získány po datu 1. května 2007. Pro povolení výzkumu je třeba prokázat přínos pro medicínu a vědu. Francie přísně reguluje výzkum lidských ESC. Získávání nových embryí záměrně pro výzkum je zakázáno. Výzkum lze provádět na ESC z embryí, která byla prvotně určena pro umělé oplození. Ovšem dárce musí poskytnout souhlas. A tyto podmínky musí splňovat i ESC importované, které jsou jiným státem darovány. Importované ESC nesmí být od jiného státu zakoupeny. Pro povolení výzkumu je nutné prokázat nutnost použití právě ESC ( <http://www.eurostemcell.org/>).

V některých zemích mimo EU jsou k této problematice tolerantnější, kdy je výzkum jen minimálně omezen. Například v Jižní Koreji je dokonce povoleno terapeutické klonování (ne rozmnožovací). Díky této velké svobodě výzkumu jsou schopné tvořit kolonie, které geneticky velice odpovídají příjemci. Tato svoboda může asijské státy posouvat do popředí ve výzkumu kmenových buněk (Dhar a Hsi-en Ho, 2009).

## **Dospělé kmenové buňky**

Dospělé kmenové buňky (ASC – adult stem cell) se alespoň v malém množství nacházejí ve všech tkání těla. Na rozdíl od ESC mají omezenější schopnost přeměny v další typy buněk. Existuje velké množství ASC, které se nacházejí ve všech tkáních organismu. Proto se zaměřím na ty, které jsou v praxi využívány. Nejčastěji jsou pro klinické účely testovány a využívány tzv. mesenchymální kmenové buňky (MSC).

### ***Mesenchymální kmenové buňky***

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou pluripotentní (někdy se uvádí multipotentní) buňky mesodermálního původu. Nejvíce prozkoumané a využívané v regenerativní medicíně jsou MSC odebrané z kostní dřeně, pupečníku a tukové tkáně (Burry a Murphy, 2003). Proliferační schopnost MSC z kostní dřeně *in vitro* je však omezená (32 dní od izolace k implantaci). Zpoždění 2-4 týdny z důvodu získání dostatečného množství buněk potřebných k léčbě je limitující faktor pro využití autologních kmenových buněk odebraných z kostní dřeně (Guest et al., 2010).

Lange-Consiglio et al. (2012) prokázali, že implantované alogenní kmenové buňky získané z amnionu (AMSC) jsou koňmi dobře přijímány. AMSC jsou schopny po izolaci *in vitro* diferencovat do mesodermální a ektodermální linie. AMSC mohou být zamrazeny a opět rozmrazeny bez ztráty své funkční integrity, morfologie, diferenciací schopnosti a přítomnosti specifických markerů kmenové buňky. Ovšem diferenciací schopnost se nepatrně snižuje. Doubling time (doba potřebná pro zdvojnásobení populace) je u čerstvě izolovaných AMSC 1,16 dnů a pro kryokonzervované je to 1,88 dnů.

Tyto buňky jsou mononukleární, adherentní k plastiku a se schopností diferenciací do osteoblastů, chondrocytů a adipocytů. Vyznačují se schopností proliferace *in vitro* bez ztráty nediferencovaného fenotypu (Dominici et al., 2006). Objeveny byly v kostní dřeni jako nehematopoetické buňky již koncem 18. století, své jméno obdržely však až v roce 1991 Caplanem (Caplan, 1991).

### **Primokultury MSC**

Primokultury obsahují buňky odebrané přímo z organismu. Aspirát či výplach kostní dřeně je promyt a umístěn přímo do kultivačních nádob. MSC se nechávají přirozeně přisednout k povrchu kultivačních nádob a po 72 se neadorované buňky odmyývají.

Lze použít i jiných metod jako je separace či zahuštění pomocí gradientové centrifugace. Dále je možná metoda přímé izolace potřebných buněk na základě jejich

viditelných znaků pomocí magnetické či fluorescenční separace. Při této metodě jsou z buněčné suspenze vybírány buňky nesoucí určitý viditelný znak (nejčastěji Stro-1), nebo jsou naopak označeny buňky nesoucí jiné než žádané znaky a ty jsou poté odseparovány. K vyšetí se využívá právě zbylá suspenze (Vlas et al., 2011).

Získávání MSC z tukové tkáně je zatíženo konzistencí výchozí tkáně. Je třeba nejprve uvolnit mezibuněčné vazby a tím umožnit uvolnění jednotlivých buněk do suspenze. K tomuto rozvolnění se využívají mechanické způsoby, jako jsou ultrazvukové lázně nebo je možné využít působení enzymů jako je kolagenóza, trypsin, papain a solné roztoky o různých koncentracích. Dále je třeba odmyt nežádoucí buňky nacházející se v tukové tkáni. Jedná se hlavně o adipocyty s akumulovanými lipidy (Oedayrajsingh et al., 2006).

Obecně jsou MSC poměrně nenáročné na podmínky kultivace. Nevyžadují speciální úpravy kultivačních nádob a ani úpravu roztoku, v kterém se kultivují. MSC jsou také schopny dobrého vývoje směřující k tvorbě jiných buněčných typů než osteoblastů, chondrocytů a adipocytů. Tento proces je známý jako transdiferenciace nebo plasticita (Greco et al., 2007), kdy byl popsán vznik neurálních buněk (Jiang et al., 2010), kardiomyocytů (Hou et al., 2013) a dalších.

Zvláštním typem MSC jsou buňky z fetální tkáně, zejména z pupečníku, pupečnickové krve a jater. MSC získané z těchto zdrojů nabývají v závislosti na stáří plodu více vlastností embryonálních buněk včetně většího rozsahu diferenciací či plasticity (Guillot et al., 2007).

Díky svým vlastnostem patří MSC mezi velmi nadějný zdroj buněk pro medicínu, hlavně u těch oborů, kde jsou vlastní regenerativní procesy velmi omezené, či je poškození organismu tak velké, že vlastní regenerativní procesy nejsou dostačující pro obnovu tkáně. Tento případ se týká zejména nervové soustavy, pojivové tkáně (zejména kloubní chrupavky), nebo například při rozsáhlejších poraněních, jako je poškození pokožky, kostí, vaziva či celého vnitřního orgánu.

### **Zjištění viability MSC in vitro**

Viabilita, také životaschopnost, je velice důležitý parametr při práci s buňkami. Při práci s buněčnými kulturami je nezbytně nutné rozlišit živé buňky od neživých. Pro první posouzení se používá světelný mikroskop. Další způsob předpokládá zachování integrity membrány živé buňky. Životaschopnost buněk je posuzována po působení barviv nejčastěji trypanové modři nebo fluorescenčního propidium iodidu. Dále lze detekovat funkčnost metabolismu buňky. Po podání látky živá buňka začne enzymaticky tuto buňku měnit a pak je



možno detekovat vznikající produkt. Poslední využívanou metodou je detekce uniklých cytoplasmatických enzymů porušenou membránou buňky (Garvican et al., 2014).

### **Přímá metoda určení viability MSC**

Nejčastěji využívanou metodou pro stanovení buněčné viability je použití trypanové modři. Barvivo přes fungující membránu (u živých buněk) neprostupuje, a tak živá buňka zůstává neobarvená. Aby barvivo buňku obarvilo modře, musí být membrána značně poškozena a tím byl umožněn vstup makromolekul barviva do buňky. Tato metoda umožňuje detekovat jen kolem 60% mrtvých buněk, protože k detekci musí být buňky barvivem silně prostoupeny (Mascotti, 2000).

Nevýhodou této metody je statistické hodnocení malého počtu buněk. Trypanová modř má silné cytotoxické účinky na živé buňky, proto musí hodnocení být ukončeno do 5 minut po přidání chemikálie, poté již barvivo začíná barvit i buňky původně viabilní. Tato metoda barvení trypanovou modří za použití světelného mikroskopu je velice jednoduchá a také rychlá. Byla vyvinuta i metoda, při které se namísto mikroskopu využívá průtoková cytometrie. Toto spojení umožňuje dosáhnout přesnějších výsledků a odstraňuje subjektivní hodnocení.

### **Nepřímé metody určení viability MSC**

U nepřímých metod se detekuje funkční stav metabolismu buněk. Je využíváno schopností buněk redukovat tetrazoliové soli. Soli přidané do suspenze buněk jsou enzymaticky buňkou redukovány na formazan, který lze detekovat. Intenzita přeměny těchto solí na formazan je přímo úměrná aktivitě mitochondriálních a cytoplasmatických dehydrogenáz v buňkách (Beridge et al., 1996).

## **Indukované pluripotentní kmenové buňky**

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) jsou uměle vytvořeny z již dospělé diferenciované buňky. Jedná se o genetické přeprogramování tkáňové buňky na buňku, která získává opět vlastnosti kmenové buňky. Tato buňka je opět pluripotentní, má vysoký diferenciační potenciál a je tedy schopna dát vzniknout všem buňkám těla.

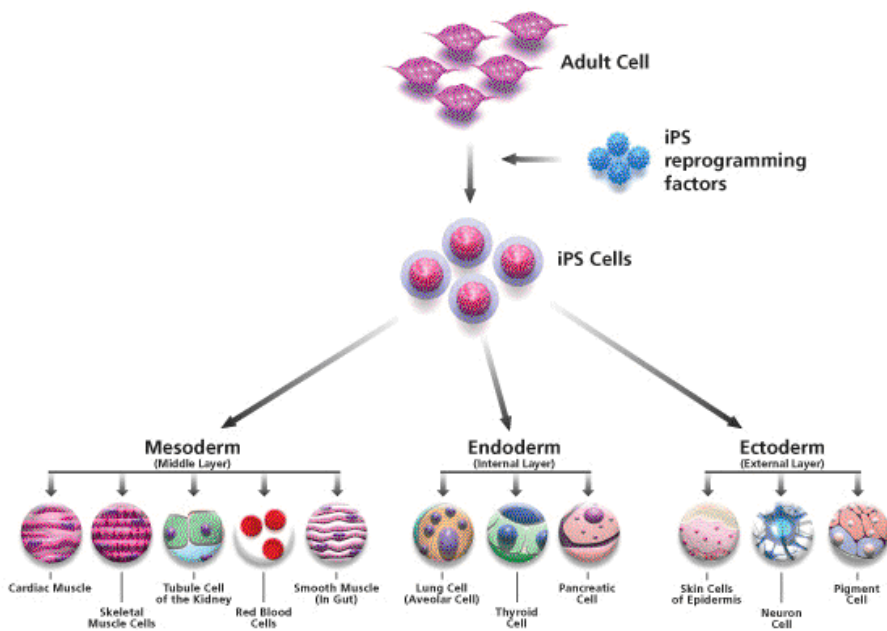
Jedná se o poměrně novou metodu získávání kmenových buněk. Poprvé byly vytvořeny z myších fibroblastů. Vědci věděli jen velmi málo o faktorech, které způsobují toto přeprogramování. V roce 2006 zkusili použít tyto 4 transkripční faktory: Oct 3/4, Sox2, c-Myc a Klf4. Získané buňky vykazovaly stejné morfologické a růstové vlastnosti, jako

kmenové buňky embryonální. Stejně tak měly stejné genové markery. Subkutánní transplantace u myši linie „nude“ vedla ke vzniku tumoru. Tento novotvar obsahoval celou řadu tkání, pocházejících ze všech tří zárodečných vrstev. Přidání iPSC do myši blastocysty umožnilo vývoj embrya. To dokazuje, že je možné z fibroblastů vytvořit pluripotentní kmenovou buňku přidáním několika definovaných faktorů (Takahashi a Yamanaka, 2006).

Tento způsob získávání embryonálních kmenových buněk by odstranil hned několik problémů spojených se způsobem získávání a jejich případného využití. Jedním z nich je odstranění etického problému při získávání lidských embryonálních kmenových buněk. Další výhodou je tvorba pluripotentních buněk přímo z tkáně pacienta a tím snížené riziko odmítnutí tkáně organismem.

Lidské iPSC z fibroblastů se podařilo vytvořit v roce 2007. Vědci použili stejné 4 faktory jako při úspěšném získání iPSC u myši. Získané lidské iPSC vykazovaly stejné vlastnosti jako ESC. Jedná se zejména o jejich morfologii, proliferaci, povrchové antigeny, exprese genu a telomerázovou aktivitu. Tyto buňky se mohou diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů (Takahashi et al., 2007).

V roce 2012 byli za tento objev oceněni John B. Gurdon a Shinya Yamanaka Nobelovou cenou v oboru fyziologie a lékařství. Potvrdili fakt, že zralé buňky mohou být zpět přeprogramovány a stát se tak pluripotentními (kmenovými), což bylo do této doby odmítáno. John B. Gurdon v roce 1962 objevil, že diferenciaci buňky je vratná. Jeho hypotéza spočívá v tom, že si genom buňky uchovává potřebné informace pro tvorbu všech typů buněk. Tuto hypotézu si ověřil na pokusu se žabími vajíčky, kdy vyměnil jádro vajíčka za jádro z dospělé buňky střeva pulce. Vajíčko se vyvinulo ve zcela funkčního klona pulce, ze kterého se stala dospělá žába (Gurdon, 1962). Tento experiment vyvolal plno skeptických ohlasů, ale po potvrzení dalšími vědci byl tento objev společností přijat. O více jak 40 let později přišel Shinya Yamanaka na způsob, jak přeprogramovat dospělou myší buňku na pluripotentní kmenovou buňku, která je schopna dát vzniknout všem buňkám těla (Takahashi a Yamanaka, 2006).



**Obr. 3:** indukované pluripotentní kmenové buňky

Indukované pluripotentní kmenové buňky představují slibný způsob pro boj s nemocemi, se kterými si veterinární a ani lidská medicína nedokázala zatím poradit. Díky relativně nedávnému prvnímu úspěšnému získání iPSC je pouze otázkou krátkého času, než se začne tento typ buněk hojněji využívat v klinické či veterinární praxi.

### **3.2. Možnosti léčby ve veterinárním lékařství**

V České republice se ve veterinární praxi můžeme setkat s využitím kmenových buněk v léčbě koní, psů a koček. Léčba kmenovými buňkami u psů se osvědčila u osteoartrózy, kdy může být postižena kyčel, loket, koleno či rameno jako následek dysplazie nebo jiné vrozené malformace či při běžném opotřebení kloubů. Dále se využívají při léčbě psí imunitně zprostředkované polyartritidě, poranění šlach a vazů, nebo je lze aplikovat v kombinaci s chirurgickou operací kloubů či šlach. U koní se potvrdil účinek kmenových buněk při léčbě defektů a poranění šlach a vazů či léčbě artritických kloubů.

U nás je v současné době povoleno využívat pro klinické aplikace pouze autologní suspenze kmenových buněk. Léčba je možná zejména dvěma typy přípravků obsahujícími kmenové buňky. První je autologní suspenze mononukleárních buněk kostní dřeně (MNC). Jedná se o suspenzi obsahující celou řadu buněčných populací s obsahem buněk hemopoetických, mezenchymálních, progenitorových a dospělých jaderných buněk. Dalším přípravkem je autologní suspenze expandovaných (namnožených) mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Tato suspenze obsahuje čisté kultury MSC. Na výrobu je mnohem náročnější, kdežto účinnost léčby je vyšší. Výhodou je také možnost uchovávat léčebnou dávku dlouhodobě zmrazenou v dusíku a v případě nutnosti ji znovu namnožit a využít.

Pro praxi se také testuje a připravuje možnost využití pupečnickových MSC. Jedná se o suspenzi kmenových buněk různých koncentrací a složení, získaných z tkání pupečníků vybraných novorozených mláďat příslušného živočišného druhu. Pupečníky se odebírají odborníky při porodu a jsou okamžitě zpracovávány, expandovány, zamrazovány v tekutém dusíku a takto připraveny pro okamžitou aplikaci v případě potřeby. Jedná se tedy o aplikaci alogenní. Výhodou této metody je odbourání nutného odběru zdrojové tkáně každému zvířecímu pacientovi a tím zlevnění celé metodiky. Produkty z pupečnicku jsou bezpečné i přes jeho alogenní aplikaci. Nedochozí k reakci GvHD (Graft-versus-host disease – reakce štěpu proti hostiteli) a jiným problémům spojeným s inkompatibilitou. Tato metoda je terapeuticky vysoce efektivní díky velkému množství a vlastnostem MSC z pupečníků.

Léčba kmenovými buňkami je vhodná pro ta zvířata, která nereagují dobře na klasickou léčbu nebo netolerují léky proti bolesti. Dále v situaci, kdy chirurgické ošetření není možné např. vzhledem k vysokému věku jedince nebo zdravotnímu stavu. Léčba je také vhodná pro jedince, kteří mají jeden nebo více kloubů postižených artritidou nebo mají imunitně zprostředkovanou polyartritidu. Naopak není vhodná pro jedince, kteří mají nádorové bujení či jiný neidentifikovaný útvar. Kontraindikací pro léčbu je akutní systémová infekce, neurologické poruchy jako jsou degenerativní myelopatie nebo choroba meziobratlových plotének, poškození míchy a nervů. Dále není vhodná pro léčbu vnitřních orgánů, jako je srdce, ledviny či játra (<http://eponacell.cz/>).

### **3.2.1. Osteoartróza**

Jedná se o degenerativní onemocnění kloubů. Toto onemocnění je charakteristické poškozením kloubní chrupavky a tvorbou nové tkáně v jejím okolí. Průběh je typický pomalým, ale trvalým zhoršováním zdravotního stavu. Rozlišujeme artrózu primární a sekundární. Primární, méně častá artróza, je způsobená stářím jedince nebo obezitou. Sekundární artróza vzniká vlivem jiných pohybových poruch jako je dysplazie kyčelního kloubu, ruptury koleních vazů aj. Tyto poruchy mohou být jak vrozené, tak získané. Často je v klubu přítomen i zánět, a proto může být toto onemocnění velmi bolestivé, ovšem každý jedinec na tuto bolest reaguje jinak (Bernebaum, 2013). Vzhledem k příčinám vedoucím ke vzniku osteoartrózy jsou k tomuto onemocnění náchylnější větší rasy psů, ale můžeme se s ním setkat u všech plemen.

Dosavadní možnosti léčby neumožňují artrózu u psů vyléčit. Nejdůležitější jsou systémová opatření upravující pohybové aktivity psa. Není dobré psa zcela zbavit pohybu. Může docházet ke ztuhlosti kloubů a zhoršené výživě kloubních chrupavek. Naopak velké

namáhání kloubů vede k jejich rychlejšímu opotřebenému. Proto je ideální pravidelný pohybový režim rozdělený do stejně dlouhé doby. Pokud jedinec trpí nadváhou, je třeba ji regulovat dietou. Dále se k léčbě využívají chondroprotektiva, obsahují látky chránící chrupavku před její degradací. Chondroprotektiva dodávají potřebné stavební látky zajišťující pružnost a pevnost kloubních chrupavek. Po dlouhodobém podávání se projeví i jejich protizánětlivé účinky a tím i zmírnění bolesti jedince. Při větším rozsahu osteoartrózy a při rozsáhlém zánětu v kloubu se využívají léky patřící do skupiny nesteroidních protizánětlivých látek. Tyto léky se podílí na potlačení zánětu v postižených kloubech, a tím na odstranění bolesti. Účinek se objevuje téměř okamžitě po podání léčiv a není vyloučeno jeho dlouhodobé působení. U některých přípravků je omezena možnost dráždění sliznice. V praxi se tyto přípravky využívají při nárazovém zhoršení pohyblivosti a dlouhodobě jen u pacientů s pokročilou osteoartrózou.

Protizánětlivý účinek mají dále kortikosteroidy, ale pro jejich nežádoucí vedlejší účinky, jako je zhoršování poškození chrupavky, je jejich využití omezeno na přísně indikované případy a jejich užívání by nemělo být dlouhodobé. Často jsou tyto možnosti kombinovány s chirurgickým zákrokem (Hyclová, 2006).

Murphy et al. (2003) zkoumal účinek MSC z kostní dřeně při léčbě osteoartrózy u koz. Osteoartróza byla navozena v kolením kloubu testovaných zvířat celkovým vyříznutím mediálního menisku a resekci zkříženého vazy. Dospělé kmenové buňky byly izolovány z kostní dřeně koz. Po 6 týdnech jim bylo zpětně intraartikulárně aplikováno 10 milionů autologních MSC. U takto léčených kloubů byla evidována výrazná regenerace mediálního menisku a vytvoření chrupavky podobné hyalinní. Injikované buňky byly také přítomny v nově vytvořené tkáni. Degenerace kloubní chrupavky, osteofytická přestavba a subchondrální skleróza byly redukovány v kloubech ošetřených MSC.

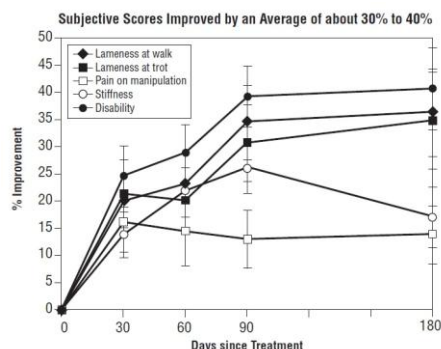
Léčba mesenchymálními buňkami odebranými z tukové tkáně (AD-MS) je také jednou z možností, jak léčit onemocnění spojené s pohybovým aparátem. Léčba zahrnuje odebrání tukové tkáně pacienta, izolace MSC a aplikace zpět pacientovi. Léčba pomocí autologních AD-MS ve veterinární regenerativní medicíně je dostupná od roku 2003. Studie léčby osteoartrózy kyčelního kloubu prokázala účinnost jedné intraartikulárně podané dávce autologních AD-MS. Zdá se, že AD-MS jsou přínosem v léčbě osteoartrózy u psů i koní (Black et al., 2007). Osteoartróza je ve Spojených státech amerických jedním z nejčastějších příčin chronické bolesti u psů. Postižených je víc jak 20% psí populace (10 - 12 milionů psů v USA) (Moore et al., 2001). U takto nemocných psů záznamy prokazují, že ve většině případů podávání nesteroidních protizánětlivých látek neposkytuje psovi dostatečnou úlevu od

bolesti (Lascelles a Main., 2002). Léčba pomocí AD-MSC poskytuje možnost, jak těmto psům pomoci.

Studie autorů Black et al. (2008), která probíhala ve Spojených státech, zkoumala účinek jedné dávky AD-MSC na poškození loketního kloubu u psů. Studie se zúčastnilo celkem 14 psů, kteří byli diagnostikováni na chronickou osteoartrózu v loketním kloubu. Ze studie byli vyřazeni psi, u kterých se prokázal výskyt virového, bakteriálního, mykotického onemocnění nebo jiné závažné systémové onemocnění. Všichni psi vybraní ke studii byli tedy zdraví bez systémového onemocnění. Pokud byl pes před zařazením do studie léčen jakoukoli alternativní metodou, byla tato léčba přerušena 10 dní před zařazením do studie.

Psům bylo odebráno minimálně 15 g tuku pro izolaci MSC. Zpětně bylo aplikováno 3 až 5 milionu autologních MSC v 0,6 ml fosforovém pufru přímo do kloubu. Psi byli hodnoceni před odebráním tukové tkáně a 2 až 14 dní před aplikací AD-MSC. Po intraartikulární injekci AD-MSC byli psi kontrolováni 30., 60., 90. a 180. den po aplikaci. Majitelé při každé kontrole vyplňovali dotazník, který vyhodnocoval pohybový stav pacienta. Hodnotila se chůze, běh, skok, prudké otočky, ztuhlost po ránu a večer, nepřírozené podřepy při vyprazdňování, potíže při chůzi a ochota si hrát.

Čtrnáct psů (6 kastrováných fen a 8 kastrováných psů) ve věkovém rozmezí od 10 měsíců do 11 let bylo přijato do studie na základě potvrzení osteoartrózy v loketním kloubu. Plemena byla různá, například zlatý retrívr a labradorský retrívr a jejich kříženci, bullmastiff, newfoundland, sheltie a springeršpaněl. Jedenáct psů zařazených do studie mělo bilaterální onemocnění loketního kloubu a AD-MSC jim byly aplikovány do obou kloubů. Každý kloub byl vyhodnocen zvlášť a z těchto údajů byl udělán průměr, podle kterého byli tito psi hodnoceni. Výsledky studie prokazují, že terapie pomocí AD-MSC zlepšuje pohyblivost loketního kloubu a zlepšení kulhání. Největší zlepšení (30% až 40%) se projevilo u funkční schopnosti a kulhání (Tab. 1).



**Graf 1:** vývoj jednotlivých ukazatelů pro porovnání účinku AD-MSC v časovém období do 180 dnů.

Účinek AD-MSCs při léčbě osteoartrózy je také vidět u léčeného pětiletého teriéra (Harley - 6,8 kg) ve Spojených státech. U pacienta bylo pozorováno chronické kulhání na obě zadní končetiny, šest měsíců trvající problémy s chůzí do schodů, ztuhlost kloubů při vstávání a obtíže s rozhýbáním. Jedinec preferuje ležení před sezením. Kulhání přetrvává od šesti měsíců věku. Rentgenové snímky prokázaly formování abnormalit na obou stehenních i holenních kostech. Předcházející řešení tohoto problému spočívalo v omezení pohybového režimu psa a podávání nesteroidních antiflogistik jednou denně. Majitel se rozhodl k léčbě pomocí AD-MSC po tom, co Harley začal mít gastrointestiální problémy po podání nesteroidních antiflogistik. Harley byl dočasně krměn upravenou stravou. Po týdnu mu bylo odebráno 15 g tukové tkáně z oblasti třísel

Pacientovi byl aplikován 1 ml buněčné suspenze (1,5 milionu buněk) do každého kloubu. Šest dní po proceduře byl pacient více aktivní, projevoval zájem o hru a pokoušel se chodit do schodů. Po třinácti dnech od léčby byl Harley vypuštěn na dvorek, kde již běhal, hrál si s míčem, chodil po schodech a seděl. Harley během rekonvalescence nebral žádné nesteroidní protizánětlivé léky a výsledky jsou více než uspokojivé (Meredith, 2005).

Dalším pacientem s degenerativním onemocněním kloubu byla osmiletá fena křížence knírače. Nesteroidní antiflogistika podávaná jednou denně nepřinášela psovi dostatečnou úlevu, a tak se majitelé rozhodli zkusit jinou léčbu. Fena byla obecně zdravá a s optimální váhou. Bylo pozorováno trvalé kulhání při chůzi i klusu, bolest při manipulaci a ztuhlost kloubů. Rentgenové vyšetření potvrdilo závažné degenerativní onemocnění. V okolí kloubu se prokázala přítomnost osteofytů a deformace hlavice kosti stehenní. Acetanbulum bylo mělké a deformované. Majitel popisoval největší obtíže při skákání, chození po schodech a ztuhlost kloubů po ránu.

Pacientovi bylo odebráno 41,3 g tukové tkáně z oblasti třísel. O dva dny později bylo pacientovi intraartikulárně injikováno 5 000 000 kmenových a dalších regenerativních buněk, které pocházely z pacientovy vlastní tukové tkáně. Měsíc od aplikace AD-MSC prokázalo ortopedické vyšetření zlepšení ve třech z pěti parametrů. Po dalším měsíci dokonce u čtyř z pěti parametrů u levého kyčelního kloubu a všech pěti parametrů u pravého kyčelního kloubu. O další měsíc později byla zlepšení stabilní až na jeden parametr, u kterého pozorujeme zhoršení, a to ztuhlost při chůzi (Tab. 2). Hodnocení majitele v prvním měsíci vykazuje zlepšení v 7 z 11 sledovaných parametrů. O měsíc později bylo toto zlepšení již v 8 parametrech. Další měsíc to bylo již 9 sledovaných parametrů a majitel přirovnal stav svého psa k normálu (Tab. 3). Po půl roce od aplikace pacient stále neprojevuje známky kulhání a viditelně se zlepšila kvalita jeho života ([www.vet-stem.com](http://www.vet-stem.com)).

### 3.2.2 Dysplazie kyčelního kloubu (DKK)

DKK je dědičně podmíněný špatný vývoj kyčelních kloubů. Na jeho vzniku se kromě dědičných predispozic podílí i vlivy vnějšího prostředí. Pro toto onemocnění je typická volnost v kyčelním kloubu. Kloub je tvořen hlavicí kosti stehenní a jamkou (acetanbulum). U DKK není hlavice stehenní kosti pevně a hluboko usazená v acetanbulu. Dále hlavice a acetanbulum není hladké, ale deformované. Tato deformace způsobuje větší opotřebenání kloubů a zvyšuje tření (Storer et al., 2006).

Hlavní příčinou vzniku DKK je dědičnost. Bylo zjištěno, že při křížení dvou jedinců bez nálezu DKK je pravděpodobnost, že bude mít potomek pozitivní nález v průměru 26%. U dvou pozitivních rodičů je tato pravděpodobnost v průměru 77%. Při zhoršujícím se stavu DKK u rodičů roste i stupeň postižení u potomků. Ke vzniku DKK přispívají u štěňat faktory jako je chybné utváření acetanbula (aplazie, hypoplazie), zpožděná osifikace kyčelní hlavice, nedostatečné osvalení pánevní oblasti a končetin, sakralizace posledního 7. bederního obratle a jeho spojení s kostí křížovou. U štěňat by se měl hlídat obsah energie v krmivu, správný poměr vápníku a fosforu a vitamin C, který je potřebný pro syntézu kolagenu, a tak správnou tvorbu kosti. Dále je třeba štěňatům do 6 měsíců věku, co nejvíce omezit aktivity, které intenzivně namáhají klouby jako je například běh u kola (Hyclová, 2006).

Klinické příznaky se nemusí vždy projevit u mladého jedince. Záleží na stupni dysplazie (lehký, střední, těžký) a fyzického namáhání jedince a tyto faktory ovlivňují, kdy se dysplazie projeví. Konzervativní léčba je podobná jako u artrózy. Je třeba hlídat váhu jedince, kontrolovat pohyb psa. Nejlepší je pravidelný pohyb, který je potřeba i pro cvičení svalů a zamezuje ztuhlosti kloubů. Naopak prospěšný pohyb je plavání a pohyb na měkkém podkladu. Stejně jako u artrózy se pacientovi mohou podávat různá nesteroidní antiflogistika a analgetika pro zmírnění bolesti. Dále se podávají chondroprotektiva, která podporují regeneraci kloubní chrupavky (Slabý, 2011).

Operativní řešení je také možné. Jednou z účinných metod, která se provádí u štěňat do 4 měsíců věku, je juvenilní symfyziodéza. Působením vysokofrekvenčního elektrického proudu se způsobí termické poškození růstové zóny v místě pánevní spony stydké. Pánev přestává v místě pánevního dna růst, ale zbytek dále roste. Takto uměle modifikovaná pánev umožňuje lepší překrytí hlavice kyčelní jamkou. Tato metoda umožňuje zlepšení obou kyčelních kloubů (Slabý, 2011).

Další využívanou metodou, která lze využít u starších štěňat nejčastěji do 1 roku, je trojitá osteotomie pánve. Důvodem pro zvolení této metody je nedostatečné zanoření kloubní



hlavice do jamky i přesto, že jamka je dost hluboká a veliká. Naopak nedostatečně vytvořená jamka a jiné deficity jsou zábranou pro úspěšnost této metody. Principem této metody je přerušení pánve na třech místech a to kosti sedací, kyčelní i stydké. Toto přerušení umožňuje natočení acetabula tak, aby okraj jamky lépe překrýval hlavici kosti stehenní. Po nalezení správné polohy jamky dochází k fixaci pomocí kostních šroubů, ploténky a drátů. Tento zákrok je mnohem náročnější jak časově, tak na požadavky vybavení a zkušenosti operátora než u juvenilní symfyziodézy. Také pooperační péče je náročnější, kdy je vyžadován klidový režim do doby úplného zhojení pánve (Slabý, 2011).

Další možností je DARTroplastika. Jedná se o transplantaci spongiózních a kortikálních kostních štěpů z pánevního křídla do oblasti kloubní jamky. Takto přesunutě štěpy prodlužují kloubní jamku a tím zabraňují vykloubení kyčelní hlavice. Pacienty jsou nejčastěji mladí psi s pokročilou dysplazií kyčelního kloubu, doprovázenou deformační artrózou a pacienti s těžkou subluxací, dále psi jakéhokoliv věku s těžkou artrózou, u kterých není možno použít endoprotézu. Možná je také resekce hlavice, při které dochází k odříznutí kloubní hlavice. Tím se odstraní zdroj bolesti a po čase dochází k tvorbě fibrózního spojení. Vzniká tzv. pakloub. Tato metoda je vhodná pro psy s vysokým stupněm artrózy a bolesti. Ovšem tuto metodu lze využít jen u psů do 15 kg. Důležitá je hlavně vhodná a trpělivá rekonvalescence (Slabý, 2011).

Definitivní řešení je pak totální kloubní náhrada (endoprotéza). Tato operace je vysoce náročná jak finančně, tak technicky a personálně. Chirurgicky jsou odstraněny artrózou silně deformované části hlavice a jamky a jsou nahrazeny umělou náhradou. Endoprotéza se skládá ze dvou komponent, stehenní a pánevní. Jamka se nahrazuje polyethylenovou jamkou a hlavice kovovou protézou. V případě nekomplikovaného průběhu, je pacientovi umožněn zcela bezbolestný pohyb. Ovšem pacienti jsou pro tento typ zákroku důkladně vybíráni (Slabý, 2011).

### **Dysplazie loketního kloubu (DKL)**

Účinek MSCs z kostní dřevě na léčbu dysplazie loketního kloubu zkoumali Bezděk a Musil (2015). Dva a půl roku stará fena labradorského retrívra byla na kliniku v Českém Brodě přivedena s potížemi s kulháním na levou hrudní končetinu, které přetrvávalo poslední čtyři měsíce. Majitelé pozorovali zhoršení stavu po pohybové aktivitě. Klinické vyšetření prokázalo kulhání 2. stupně na levou hrudní končetinu, zbytnělost loketního kloubu s částečně omezeným rozsahem flexe a extenze. Rentgenové snímky prokázaly dysplazii loketního

kloubu s diagnózou processus coronoideus isolatus - FCP (fragmented media coronoid process). Pravá končetina byla bez nálezu.



**Obr. 4:** Levý loket – na snímku jsou patrné degenerativní artrotické změny patrné



**Obr. 5:** Pravý loket bez nálezu

Po provedení artroskopie levého loketního kloubu a odstranění volného fragmentu se pacientův stav výrazně zlepšil. Pouze po větší námaze se objevilo mírné kulhání. Preventivním podáváním chondroprotektiv se tento stav podařilo udržet následující dva roky. Postupně se stav zhoršoval a již se začalo objevovat kulhání 3. stupně. Poté, co bylo vyzkoušeno několik nesteroidních antiflogistik bez známky zlepšení, se majitelé rozhodli přistoupit k terapii kmenovými buňkami.

Odběr kostní dřeně byl proveden v celkové inhalační anestézii. Odebraný vzorek byl předán certifikované laboratoři pro kultivaci kmenových buněk. Za 16 dní byla připravena buněčná suspenze čisté kultury autologních MSC. Jedna dávka pro tento případ činila 1,5 ml, což představovalo přibližně 10 milionů buněk. Pacient byl po aplikaci kontrolován v intervalu 6, 12, 16 a 24 týdnů.

První známky zlepšení stavu majitelé pozorovali již 4 týdny po aplikaci. Kontrola po 6 týdnech ukázala zlepšení kulhání z 3. stupně na 1. stupeň. Za dva měsíce kulhání vymizelo úplně a flexe a extenze loketního kloubu nevyvolávaly projevy bolesti. Rozsah pohybu byl však stále částečně omezen. Stav bez kulhání vydržel rok od aplikace, kdy po velké námaze, došlo opět k projevům kulhání 1. stupně. Pacient velice dobře reagoval na podání nesteroidních antiflogistik. V současné době (2 roky od zahájení léčby), je stav pacienta

udržován preventivním podáváním chondroprotektiv. Nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky spojené s léčbou MSC (Bezděk a Musil, 2015).

### 3.2.4 Osteochondróza

Onemocnění kloubních chrupavek hlavně dlouhých kostí postihuje zejména rostoucí velké a obří plemena psů. Na vzniku se podílí hned několik faktorů jako je dědičnost, plemenná příslušnost, výživa a rychlost růstu. Hladká kloubní chrupavka pokrývající kost zajišťuje bezproblémový pohyb kloubu. Kloubní chrupavka je zvlhčována kloubní tekutinou (synovií) a tím brání před poškozením kosti při nárazech. Pokud dojde k poškození hladkého povrchu chrupavky nebo není dostatek kloubní tekutiny, pohyb se stává bolestivým (Ytrehus et al., 2007).

U osteochondrózy dochází pod vlivem nežádoucích faktorů na chrupavkách kloubních ploch dlouhých kostí k poruše v přeměně růstové chrupavky v kost. Dochází k zesílení chrupavky a nedostatečnému spojení chrupavky s kostí a tím i nedostatečnému prokrvení. Vlivem špatného prokrvení se chrupavce nedostává dostatek výživy a tím dochází k nekrotizaci tkáně. Tato odumřelá část chrupavky se může po nevhodném pohybu odlomit a tím se uvolnit do kloubní dutiny. Toto cizí těleso způsobuje bolestivost a nestabilitu kloubu. U neléčených případů dochází časem ke vzniku artrózy. Odloučený fragment chrupavky se často zvětšuje vlivem ukládání vápníku. Nejvíce bývá postižen kloub ramenní, kolenní, loketní a hlezenní (Ytrehus et al., 2007).

U zvířat často pozorujeme období s výraznějším kulháním a období, kdy jedinec nemusí vůbec kulhat. Toto střídání je způsobeno změnami v poloze odlomeného fragmentu v kloubní dutině. V pozdějším věku se kulhání ve většině případů zesiluje vlivem zvětšení fragmentu a následných artrotických změn. Nejčastěji tímto onemocněním trpí plemena jako je bernský salašnický pes, německá doga, německý ovčák, rotvajler, zlatý retrívr a irský setr. Ovšem onemocnění bylo zjištěno i u menších plemen psů, jako je border kolie, bígl, kokršpaněl a whippet. S osteochondrózou se můžeme setkat i u koček. Mnohem častěji se toto onemocnění vyskytuje u samců než samic. U hlezenního kloubu je to však naopak. Počátek nemoci lze diagnostikovat ve stáří 4 měsíců, ovšem většinou je to kolem 10. měsíce stáří (Musil, 2015, pers. comm.).

Pokud dojde k časně diagnostice, je možné přistoupit ke konzervativní léčbě. Ta spočívá v klidovém režimu na 4-8 týdnů. Je zapotřebí nemocnému jedinci zabránit v běhání, skákání a jiných pro kloub náročných pohybu. Během tohoto režimu jsou psůvi podávána

chondroprotektiva, která obsahují látky potřebné pro regeneraci chrupavky. Dále je dobré psovi hlídat dietu. Hlídat by se měl i příjem vápníku. Nadměrný příjem vápníku podporuje rozvoj osteochondrózy. Jelikož se toto onemocnění většinou nepodaří diagnostikovat v takovou dobu, aby zabrala konzervativní léčba, ve většině případů se přistupuje k chirurgickému řešení. V praxi se jedná o psy starší 7 měsíců. Při operaci se odstraní uvolněný fragment chrupavky, znekrotizovaná část chrupavky a je možné oživení tkáně pod defektem, kdy dojde k navrtání kosti. Způsobené krvácení umožňuje rychlejší hojení vyplnění defektu fibrózní chrupavkou (Hyclová, 2006).

Na konci roku 2011 byla na veterinární kliniku v Českém Brodě předvedena dvouletá fenka border kolie Abby. Majitelka pozorovala potíže s pohybovým aparátem projevující se potížemi se vstáváním na obě zadní končetiny, časté sedání na procházkách a rychlá unavitelnost. Po delším odpočinku se projevila ztuhlost kloubů. Klinické vyšetření prokázalo kulhání 2. stupně na obě zadní končetiny a zkrácený krok pánevních končetin. Dále se prokázala bolestivost obou kyčelních kloubů na extenzi s omezeným rozsahem extenze. Rentgenové snímky ukázaly přítomnost dysplazie kyčelního kloubu s tvarovými změnami v obou kyčelních kloubech s výskytem osteoartritických změn. V levém kolenním kloubu byla diagnostikována osteochondrální (OCD) léze na laterálním kondylu femuru s kalcifikovaným volným fragmentem (Bezděk a Musil, 2015).



**Obr. 6:** RTG – patrná dysplazie kyčelního kloubu



**Obr. 7:** šipka ukazuje kalcifikovaný fragment odloučené kloubní chrupavky

V inhalační anestézii byla chirurgicky ošetřena OCD léze. Podařilo se odstranit volný fragment. Defekt na laterálním kondylu femuru byl již obnoven vazivově chrupavčitou tkání. Při tomto zákroku se rovnou odebrala kostní dřev z proximální části pravého humeru. Celkový objem odebrané kostní dřev činil 60 ml a byla převezena do certifikované

laboratoře ke kultivaci. Za tři týdny byly zpětně aplikovány dávky o objemu 1,5 ml s obsahem 10 milionů buněk do obou kyčelních kloubů a levého kolenního kloubu. Pacientovi byl podán carprofen injekčně ihned po aplikaci MSC a další dva dny v tabletové formě.

Majitelka pozorovala zlepšení od 4. týdne po aplikaci kmenových buněk. První kontrolní klinické vyšetření proběhlo 6 týdnů po aplikaci. Bylo prokázáno zlepšení kulhání na 1. stupeň a při maximální extenzi byla pozorována mírná bolestivost v obou kyčelních kloubech. Při vyšetření po 3 měsících od aplikace nebylo pozorováno kulhání. Vyšetření kyčelních kloubu bylo bez bolestivosti i přes částečně omezený rozsah pohybu. Opakovaná vyšetření po 4 a 6 měsících od léčby pomocí MSC se projevilo jako trvale zlepšení zdravotního stavu pacienta. Bez projevů kulhání a bolestivosti v obou kyčelních kloubech a kolenním kloubu při maximální flexi a extenzi. Pacient je pravidelně kontrolován každý rok a stav je setrvalý i po 3 letech od aplikace MSC. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky léčby kmenovými buňkami (Bezděk a Musil, 2015).

Účinek MSC na léčbu defektů koleních kloubů u mini-prasat zkoumal Nečas et al. Experiment byl prováděn na 40 miniprasatech pocházejících z certifikovaného chovu z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově. Věk prasat se pohyboval od 5 do 7 měsíců. Hmotnost prasat byla v rozmezí od 14 do 22 kg. Do této studie bylo zařazeno i 20 prasat z ústavu v Liběchově. U deseti z nich byly na levém kolenním kloubu vytvořeny 4 iatrogenní defekty (dva na mediálním a laterálním femorálním kondylu a dva na mediální a laterální straně sulcus trochlearis kosti stehenní), které narušovaly celou tloušťku chrupavky až k subchondrální kosti. Pro účel této studie byly kolenní klouby hodnoceny pouze z hlediska hojení defektů chrupavky na mediálním a laterálním kloubním hrbolu. Prasata byla rozdělena do tří skupin podle způsobu léčby a typu defektu chrupavky.

Do první skupiny (A – 10 prasat) byla zařazena prasata, která měla defekt chrupavky na mediálním kloubním hrbolu kosti stehenní a byla léčena pomocí MSC na kolagen-chitosanovém nosiči. Ve druhé skupině (B – 10 prasat) byla prasata s defektem kloubní chrupavky na laterálním hrbolu kosti stehenní. U této skupiny byl aplikován pouze nosič bez MSC. U dalších 10 prasat (skupina C) byly na zátěžové ploše laterálního hrbolu stehenní kosti cirkulárním skalpelem vytvořeny defekty o průměru 6 mm a subchondrální kost byla poškozena metodou mikrofraktury. Laterální artrotomie levého kolenního kloubu byla provedena v oblasti laterálního kloubního hrbolu stehenní kosti u skupiny A. Chrupavka a subchondrální kost byly navrtány do hloubky 12 mm a kolagen-chitosanový nosič s obsahem MSC byl umístěn do takto vytvořeného defektu. U skupiny B byl postup stejný s tím rozdílem, že zákrok byl proveden na mediálním kloubním hrbolu. Aplikován byl pouze

kolagen-chitosanový nosič bez MSC. Zvířata byla utracena 16 týdnů od zákroku a povrch chrupavky v místě defektu byl hodnocen makroskopicky.

Pro obarvení byl použit hematoxylin-eozin. Pro ověření přítomnosti extracelulární matrix v hyalinní chrupavce byla použita metoda barvení PAS (Periodic Acid-Schiff) reakce a imunohistochemická protilátka pro detekci kolagenu typu II. Pro hodnocení kvality nově vznikající chrupavky bylo využito kombinace výsledků histologické a imunohistochemických analýzy. Místo barvení safraninem O, byla použita PAS reakce a původ chondrocytů nalezených v defektech chrupavky byl potvrzen barvením MSC pomocí CM-DiI.

Nově vytvořená tkáň vyplňující defekt kloubní chrupavky v případě skupiny A byl v 60 % případů hladký. U zbylých 40 % jedinců povrch vykazoval makroskopické eroze, fisury či osteofyty. V případě skupiny B a C byly tyto makroskopicky viditelné eroze, fisury či osteofyty přítomné u všech sledovaných případů. Histologické a imunohistochemické výsledky analýzy podle modifikované klasifikace O'Driscolla ukázaly výrazný rozdíl u sledovaných skupin. Skupiny A léčená MSC osázeným nosičem dosáhla skóre  $14,7 \pm 3,82$ . Ostatní dvě skupiny nevykazovaly výrazný rozdíl. Skupina B, které byl aplikován pouze nosič bez MSC, dosáhl bodové hodnocení  $5,3 \pm 2,88$  a skupina C ošetřena metodou mikrofraktury podobné hodnocení  $5,2 \pm 0,64$ . Imunohistochemická analýza ve všech případech potvrdila alespoň malé množství kolagenu II. U skupiny A však toto množství bylo znatelně vyšší než u ostatních dvou skupin. U 89 % prasat ze skupiny A imunofluorescenční analýza ukázala fluorescenčně značené buňky na CM-DiI. U zbylých dvou skupin tyto buňky nebyly pozorovány (Tab. 4 a 5).

Autoři prokázali, že MSC na kolagen-chitosanovém nosiči mají schopnost vyplnit defekty chrupavky kolenního kloubu hyalinní chrupavkou, na rozdíl od totožných nosičů implantovaných bez MSC, kde byly defekty vyplněny fibrózní chrupavkou, které vykazovaly horší výsledky jak makroskopické, histologické tak i imunohistochemické.

### **3.2. 5 Imunitně zprostředkovaná polyartritida**

Jedná se o zánětlivé onemocnění, které postihuje klouby. Toto onemocnění postihuje více kloubů najednou. Zánět je způsoben invazí bílých krvinek z krve do kloubu. Nejčastěji se jedná o neutrofilu, které bojují proti bakteriím a jiným cizorodým částicím. Při destrukci cizích částic uvolňují do okolí látky pro okolní tkáň škodlivé. Zvýšený počet bílých krvinek v kloubní tekutině způsobuje otok a bolestivost kloubů. Průběh je obvykle akutní a rychle se rozvíjející (Stull et al., 2008).

Imunitně zprostředkovaná polyartritida se může projevit jako následek jiné nemoci. Pokud nemoc způsobí imunitní reakci a regulace je poškozena, imunitní systém začne bojovat nejen proti primární chorobě, ale začne napadat i vlastní tkáň. Nemoci, které vyvolávají tuto reakci, jsou ty, které obvykle vyvolávají silnou imunitní reakci, jako jsou infekční onemocnění a rakovina. Infekční onemocnění je nejčastěji způsobeno bakteriemi, které přenášejí klíšťata. Při rakovině je možné, aby imunitní systém fungoval v takové míře, že dojde k napadení kloubů. Pokud se neprokáže, že polyartritidu způsobuje jiné onemocnění, jedná se o primární (idiopatickou) polyartritidu (Stull et al., 2008).

### **3.2.6 Poškození šlach a vazů, fraktury kostí**

K těmto poraněním může dojít u jakéhokoliv zvířete bez ohledu na jeho věk. Nejvyšší poškození šlachy je její ruptura. Narušení šlachy může být částečné i úplné. Častěji k němu dochází u šlachy, která je postižena zánětem, ale může k němu dojít i po mechanickém nárazu. Často se s poraněním šlach a vazů setkáváme u koní. Nejčastější postižené měkké tkáně u sportovně využívaných koní jsou šlachy povrchového ohýbače prstů a léze závěsného vazů. Šlachy a vazy se hojí pomalu a většinou nejsou schopny se navrátit k původní elasticitě a pružnosti. Dlouhá doba rehabilitace a častý výskyt recidivy po navrácení jedince do života před zraněním brání úspěšnému léčení pacienta. Během procesu hojení, kdy probíhá zánětlivá reakce, dále dominuje fibroplazie. Tento proces hojení je spíše nahrazování hypercelulární tkáně, která není dostatečně organizována, než proces regenerace. U takto zhojené šlachy můžeme pozorovat zvýšenou ztuhlost a sníženou elasticitu (Richardson et al. 2007).

Nejvíce jsou zatím prozkoumány a léčebně využívány v problematice šlach a vazů MSC odebrané z kostní dřevě a tukové tkáně. Zdá se však, že se podařilo nalézt i jiné zdroje, které budou v budoucnu použitelné pro stejný účel. Mezi tyto buňky patří například extrafetální kmenová buňky nebo fetální kmenové buňky (Cremonesi et al., 2013).

### **MSC a léčba šlach**

Po aplikaci MSC do poraněné šlachy se tyto buňky přeměňují na tenocyty. Tenocyty jsou základní stavební buňky šlachy. Tyto buňky tvoří kolagenní vlákna prvního typu, která navrací šlaše její původní elasticitu a pružnost. Takto vzniklá nová šlacha je stejného složení jako tkáň původní a tím se snižuje riziko vzniku recidivy a sekundárních onemocnění.

Rychlost a účinnost léčby dává možnost sportovním koním vrátit se zpět na dráhu (Chaudhury, 2012).

Mezi extrafetální zdroje MSC, které lze odebírat neinvazivní metodou, patří pupeční šňůra, a to jak tkáň, tak i krev a amnion. Buňky izolované z pupeční tkáně jsou heterogenní, a proto tvoří rychle proliferující populace (Corradetti et al., 2011). Dosud nebyly tyto buňky v klinické praxi využity, ale Carrade et al. (2011) aplikovali alogenní a autologní koňské MSC odebrané z pupečnickové krve nebo tkáně pupeční šňůry. Buňky injikovali do zdravých kloubů koní, aby otestovali imunologickou odpověď na tyto typy buněk. Nebyl pozorován rozdíl mezi zánětem vyvolávající autologní a alogenní způsob implantace. Vyvolaný zánět byl klinicky mírný a nezpůsobil žádné potíže s chůzí a jiná pohybová omezení. Je proto zřejmé, že MSC odvozené z extrafetální tkáně nevyvolávají žádnou akutní imunitně zprostředkovanou odpověď. MSC odvozené z amnionu jsou již praxi klinicky využívány.

Terapeutickou aplikaci u koní s poraněním šlach provedla Lange - Consiglio et al. (2015), v Itálii a porovnávala účinek MSC odebraných z kostní dřeně a amnionu (AMSC) v léčbě poranění šlach a vazů u koní. Ke svému pokusu použila celkem 92 sportovních koní s poraněním šlach, které diagnostikoval stejný veterinární lékař. Koně byli rozděleni do 6 skupin podle stupně postižení šlachy. Vybraní jedinci museli mít ultrazvukem detekovatelnou lézi v kategorii 4-6. Tyto kategorie byly označeny jako mírná (stupeň 4), středně těžká (stupeň 5) a těžká (stupeň 6). Koně byli rozděleni do dvou náhodných skupin. Skupina A (51 koní) byla léčena pomocí alogenních rozmražených AMSC. (Tab. 6). Zbýlých 44 koní léčili čerstvými MSC odebranými z kostní dřeně (Tab. 7). V každé skupině byli jedinci, kteří provozovali různé sportovní disciplíny. Interval mezi poraněním a aplikací byl u AMSCs 6-15 dní a u MSC z kostní dřeně 16-35 dní. Po aplikaci byly končetiny obvázány sterilním obvazem po dobu 48 hodin a koně během tohoto času odpočívaly v boxu. Následně byl koním upraven pohybový režim. Po dobu dalších 15 dnů byli voděni 15 minut denně a dalších 15 dní 20 minut denně. Koně během této léčby neužívaly žádné nesteroidní protizánětlivé léky a antibiotika. Rok po aplikaci byli koně kontrolováni jak klinicky, tak ultrazvukem přibližně jednou měsíčně. Další kontrola proběhla 2 roky po tom, co se koně navrátily ke svému tréninku, pokud ovšem nedošlo k recidivě.

Každému koni bylo odebráno přibližně 28 ml kostní dřeně. Vzorky byly kultivovány 26 dní a podařilo se získat v průměru  $8 \times 10^6$  buněk. Doba populačního zdvojení byla  $3,42 \pm 0,22$  dní.

Alogenně transplantované AMSC koním ze skupiny A byly dobře tolerovány. Po aplikaci nebyly pozorovány záněty v kloubech, ani bolestivost a to i přesto, že koním nebyla



podávána nesteroidní antiflogistika. Pacienti byli schopni chůze a ostrého obratu brzy po aplikaci kmenových buněk. Všichni koně, kterým se aplikovali AMSC, se vrátili ke své předcházející aktivitě za 4-5 měsíců po aplikaci. S výjimkou jednoho parkurového koně, který uhynul 3 měsíce po aplikaci v důsledku střevní koliky. Dva drezurní koně se opětovně zranili po návratu ke sportu. Nebyla zjištěna korelace mezi věkem jedince a vznikem recidivy, ovšem byla zjištěna mezi vznikem recidivy a sportovním využitím koně. Dva roky po aplikaci AMSC byl výskyt recidivy 4 %. U drezurních koní byl výskyt častější a to 14,29 %. Ultrazvukové výsledky jedinců, kteří měli stejné poranění šlachy, ukázalo aktivnější a rychlejší hojení u těch jedinců, kteří byly léčení AMSC.

Doba potřebná pro zotavení pomocí AMSC a MSC odebraných z kostní dřeně je podobná (v obou skupinách koní je minimální doba rekonvalescence 4 měsíce). Ovšem výskyt recidivy byl znatelně nižší u léčby s AMSC. U léčby pomocí AMSC byl výskyt recidivy 4 %, kdežto u MSC odebraných z kostní dřeně 23,08 % (Tab. 8). Je možné, že tento výsledek je způsoben možností aplikovat AMSC ještě před začátkem strukturálních změn v poraněné šlaše. Prodloužená potřebná doba pro kultivaci MSC z kostní dřeně in vitro, zkrácená doba vhodná pro implantaci buněk a pravděpodobně v důsledku ne zcela optimální regeneraci jsou jedinci náchylnější k recidivě zranění. Takto špatně regenerovaná tkáň může ztratit svou původní pružnost a tím se může stát funkčně méně výkonná než zdravá šlacha

V praxi jsou ovšem stále nejvíce využívané MSC odebrané z kostní dřeně. Léčba je zdlouhavá, protože růst buněk in vitro vyžaduje alespoň 3 týdny kultivace. Během této doby se na šlaše začínají objevovat ultrastrukturální změny, které ovlivňují regeneraci tkáně a zvyšují riziko vzniku recidivy. Cílem buněčné terapie je obnovit původní strukturální a biomechanickou funkci poškozené tkáně šlachy. Je tedy důležité, aby aplikace MSC proběhla co nejdříve po akutní zánětlivé fázi ještě před tím, než dojde k migraci fibroblastů a tvorbě nové fibrózní tkáně v místě poranění. V praxi to znamená nejpozději 30 dnů od úrazu (Fortier a Smith, 2008).

Zcela však není objasněno, zda léčebný účinek MSC spočívá ve schopnosti diferenciaci buněk do tenocytů a s tím spojenou tvorbou extracelulární matrix, nebo spíše produkcí růstových hormonů, které dále stimulují buňky uvnitř šlachy (Chong a Chang, 2009). Je také možné, že oba tyto faktory působí současně (Fortier a Travis, 2011).

Časná implantace AMSC je výhodnější pro hojení šlachy snížením zánětu, aktivací nativních kmenových buněk a podporou produkce kolagenu a dalších bílkovin extracelulární matrix (Reed and Leahy, 2013). AMSC se zdají být primitivnější než dospělé buňky jedince. To umožňuje jejich větší transplantovatelnost v porovnání s kmenovými buňkami kostní

dřeně (Guest et al., 2010). Porovnáme-li koně ve studii Lange-Consiglie et al. (2015), kteří měli stejná poranění šlachy a byli léčeni ve stejném časovém intervalu, zjistíme, že léčba AMSC je účinnější než léčba autologními MSC z kostní dřeně. AMSC používané ke studii byly kryoprezervované, a i přes to, že takto zpracovaným buňkám se snižuje schopnost proliferace, vykazovaly stále vyšší efektivitu léčby než čerstvě odebrané MSC z kostní dřeně.

V některých studiích upřednostňují jedнокrokovou izolaci MSC z kostní dřeně, kdy buňky nepodléhají laboratorní manipulaci, která omezuje proliferační a funkční možnosti MSC z kostní dřeně. Prodloužená kultivace může vést ke sníženému léčebnému potenciálu. Tato metoda umožňuje aplikaci malého množství buněk a následné produkci buněk, které jsou minimální buněčnou manipulací a bez rizika buněčné transformace během růstu in vitro (Koch et al., 2009).

### **3.3 Terapie kmenovými buňkami v humánní medicíně**

Stejně jako ve veterinárním lékařství, tak i v humánní medicíně, se v současné době zavádí terapie pomocí kmenových či progenitorových buněk do klinické praxe. V lékařské praxi je však situace odlišná, protože použití buněčných přípravků je ve většině případů regulováno zákonem o léčivech (Zákon č. 378/2007 Sb.). To znamená, že každý přípravek v jednotlivých indikacích musí být hodnocen v klinických studiích, než se dostane do běžného užívání. Klinické studie mají za úkol zajistit zejména bezpečnost, účinnost a terapeutický efekt pro pacienta ve srovnání s dosavadní standardní léčbou. Proces hodnocení přípravku v klinických studiích je velmi zdlouhavý a komplikovaný, a proto nelze buněčnou terapii doposud rutinně využívat.

V některých výjimečných případech lze buněčné přípravky používat přímo bez nutnosti klinických hodnocení a toto použití je regulováno zákonem o lidských tkáních a buňkách (Zákon č. 296/2008 Sb.). Jedná se zejména o přípravky odvozené z tukové tkáně určené pro kosmetické účely (výplně vrásek, augmentace prsou či jiných podkožních nerovností atd.) nebo z kostní dřeně určené pro podporu hojení kritické končetinové ischemie (viz. stanovisko SÚKL). Žádný z těchto přípravků nesmí být zásadně manipulován (buňky nesmí být kultivovány) a buňky musí sloužit v místě aplikace ke stejné základní funkci, k jaké sloužily v původní zdrojové tkáni. O tom, podle jakého zákona bude použití buněčného přípravku s obsahem kmenových buněk regulováno, rozhoduje buď Státní ústav pro kontrolu léčiv České republiky nebo vyšší evropská instance European Medicine Agency(EMA).

Hlavní oblasti, které jsou intenzivně zkoumány v souvislosti s kmenovými buňkami u člověka, jsou poruchy pohybového aparátu (stejně jako u zvířecích pacientů),

neurodegenerativní onemocnění, různé typy ischemií, poranění páteře, diabetes apod. Obecně lze říct, že možnosti využití těchto přípravků jsou teprve zkoumány, proto se lze setkat s celou řadou klinických studií, které se zabývají zcela odlišnou problematikou ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Stejně jako ve veterinárním lékařství, tak i zde je možné využívat buňky autologního nebo alogenního původu. Objevují se i první studie s indukovanými pluripotentními buňkami (iPSC). Autologní přípravky jsou více akceptovány z důvodu jejich úplné shodnosti s dárcem (stejný původ). Na druhou stranu alogenní přípravky se mohou dlouhodobě uchovávat v kryokonzervovaném stavu a být použity v případě akutní potřeby bez nutnosti odběru zdrojové tkáně a následné dlouhodobé kultivace např. akutní infarkt myokardu, kdy je nutno zahájit terapii v co nejkratší době (Rigol et al., 2014). Jako zdrojová tkáň může sloužit kostní dřev, tuková tkáň, pupečnicková krev, ale i například stimulovaná periferní krev. Jaká zdrojová tkáň bude použita, se ve většině případů odvíjí od účelu, za jakým mají být izolované buňky použity.

### **3.3.1 Onemocnění pohybového aparátu**

#### **kultivované MSC kostní dřev.**

Wakitani et al. (2002) se zabýval účinkem MSC z kostní dřevě při léčbě defektu kloubní chrupavky u lidí. Studie se zúčastnilo 24 pacientů s osteoartrózou v kolenním kloubu. Všichni pacienti podstoupili osteotomii. Nakultivované buňky kostní dřevě byly vloženy do kolagenového gelu a transplantovány do kloubní chrupavky u 12 pacientů. Zbýlých 12 pacientů sloužilo k porovnání účinku. U pacientů léčených MSC se již po 6,3 týdne začíná objevovat bílá měkká tkáň pokrývající defekt. Po 42 týdnech lze pozorovat začínající tvorbu chrupavky podobné původní hyalinní chrupavce. I když se klinické zlepšení u obou skupin výrazně neliší, artroskopické a histologické vyšetření bylo u pacientů léčených MSC výrazně lepší. O dva roky později Wakitani et al. (2004) prokázal výrazné klinické zlepšení u dvou pacientů (26 let - muž, 44 let - žena) s defektem kolení chrupavky za využití stejné metody jako v předešlé studii. Za 6 měsíců po transplantaci se klinické symptomy (bolest, schopnost chůze) výrazně zlepšily. Klinické zlepšení trvalo v jednom případě 4 roky a ve druhém 5 let a 9 měsíců po transplantaci.

Kuroda et al. zkoumali účinek MSC na kolagenovém nosiči při léčbě defektu chrupavky kloubu u hráče juda (31 let). Za sedm měsíců artroskopie odhalila tvorbu hladké tkáně v místě defektu. Histologické testy prokázaly vyplnění defektu tkání podobné původní

hyalinní chrupavce. Po roce se pacient vrátil na svou předcházející sportovní úroveň a nebyly pozorovány žádné komplikace spojené s léčbou MSC.

Emadedin et al. zkoušel účinek MSC po intraartikulární injekci. Studie se zúčastnilo 6 žen, které měly osteoartrózu kolene. Rok od transplantace nebyly pozorovány žádné lokální ani systémové nežádoucí účinky. Bolest, schopnost chůze a celkový funkční stav kolene se zlepšil až na 6 měsíců od aplikace, poté se příznaky mírně zhoršily. Porovnání magnetické resonance před a po aplikaci potvrzuje, že poškozená chrupavka regeneruje.

### **MSC z tukové tkáně**

Park se zabýval výzkumem MSC izolovaných z tukové tkáně (ADMSC) a jejich využitím pro onemocnění spojené s pohybovým aparátem. Tento účinek demonstroval na čtyřech pacientech, dva z nich trpěli osteonekrozou hlavice femuru pravé kyčle a zbylí dva byli diagnostikováni s osteoartrózou kolena. Pacientům byli aplikovány kmenové buňky obohaceny krevní plazmou. Výsledky magnetické resonance prezentoval jako výrazné zlepšení u všech pacientů. Ovšem nelze pouze na základě magnetické rezonance posoudit opravdový stupeň zlepšení.

O rok později Koh a Choi aplikovali ADMSC s obohacenou krevní plazmou 25-ti pacientům s osteoartrózou kolena. Další dvě injekce obohacené krevní plazmy byly aplikovány týdně. Výsledky porovnávali s kontrolní skupinou pacientů, kterým byla aplikována pouze obohacená krevní plazma bez MSC. U sledované skupiny byly výsledky podle Lysholma a Tegnera a VAS analýzy (visual analogue scale) výrazně lepší než u kontrolní skupiny. Přitom předoperační vyšetření pomocí stejných metod prokázalo horší výsledky u sledované skupiny. Nebyly pozorovány výrazné klinické rozdíly mezi oběma skupinami, nicméně skupina léčená pomocí MSC vykazovala větší zlepšení.

## **3.3.2 Neurodegenerativní onemocnění**

### **Amyotrofická laterální skleróza (ALS)**

ALS je rychle se rozvíjející neurodegenerativní onemocnění postihující motorické neurony s následnou funkční ztrátou. Vlivem postupného odumírání motorických neuronů dochází ke svalové slabosti až atrofii. Pacienti v pozdějších stádiích nemoci zůstávají paralyzováni ovšem jejich psychické vnímání bývá nepoškozeno. Lidé s ALS umírají nejčastěji do 5 let od diagnostiky onemocnění, kdy již nedokáží ovládat dýchací svalstvo.

Přesné příčiny vzniku onemocnění nejsou u 90% případů objasněny. Zbýlých 10% případů mají genetickou formu ALS (Turner et al., 2013).

Jelikož není známá přesná příčina vzniku onemocnění, neexistuje žádná účinná léčba ALS. U pacientů v počátečních stádiích nemoci se používá lék rilutek s účinnou látkou riluzol. V roce 1993 byl oficiálně publikován patent společnosti Rhone-Poulenc Rorer S.A. na léčbu ALS riluzolem, který prodlužuje život pacientů až o 3 měsíce než u pacientů, kterým bylo podáváno placebo. Tento přípravek inhibuje zpracování glutamátu (základní excitační neurotransmitter v CNS). Právě o glutamátu se předpokládá, že hraje významnou roli v buněčné smrti a je tak zodpovědný za rozpad motorických neuronů. Další podpůrné metody, které mohou pacienti podstoupit jsou například dechová cvičení, užívání léku proti bolesti, vitamíny skupiny E a B, kreatin a koenzym Q10.

Terapie kmenovými buňkami se zdá být slibnou alternativou pro boj s tímto onemocněním a to díky svému potenciálu v obnově buněk. Několik studií prokázalo, že MSC odebrané z kostní dřeně vedou ke zlepšení zdravotního stavu pacienta, ale vše je jen ve stádiu klinických příprav. Buněčná terapie se zaměřuje na dvě možnosti jak bojovat proti této nemoci. Prvním způsobem je nahrazení poškozených motorických neuronů. Ovšem dosáhnout tohoto cíle nese nutnost překonání nejednoduchých překážek, proto se často schyluje ke druhé možnosti a to snaze o zvýšení ochrany neuronů. To by se mohlo dít pomocí náhrady podpůrných buněk jako jsou astrocyty a oligodendrocyty (Kan et al., 2007).

## **Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění postihující osoby nad 65 let. Jedná se o jednu z nejčastějších forem demence a to až z 80%. Je charakteristická postupným snižováním mentální funkce včetně ztráty paměti a kognitivních schopností. Přesné příčiny vzniku tohoto onemocnění nejsou dosud zcela objasněny.

V mozku pacientů trpících alzheimerovou chorobou byl objeven protein tzv. betaamyloid, vyplňující prostory mezi neurony a klubka vláken proteinu „tau“, který se nachází v okolí neuronů. Tyto proteiny působí cytotoxicky a dochází k postupnému zmenšování až smrti neuronů. Nejprve jsou postižena centra zodpovídající za paměť a jazyk a postupně je postižen celý mozek. Nervové dráhy jsou narušeny sníženou koncentrací acetylcholinu v mozku, který je důležitým neurotransmiterem (Galimberti a Scarpini, 2010).

Doposud nebyl nalezen lék, který by dokázal zastavit postup Alzheimerovi choroby. Existují však farmakologické i nefarmakologické metody léčby, které pouze zmírňují klinické symptomy. Nedokážou však zastavit či alespoň zpomalit změny probíhající na neuronech

v mozku. A proto terapie pomocí kmenových buněk nabízí slibný způsob léčby Alzheimerovi choroby.

Terapie kmenovými buňkami se ubírá dvěma směry. První směr vede k podpoře aktivace endogenních kmenových buněk a tím regeneraci. Druhým způsobem by mohla být regenerace poškozených buněk transplantovanými kmenovými buňkami. Bae et al., nedávno publikovali úspěch při léčbě Alzheimerovi choroby u myši pomocí MSC odebraných z kostní dřeně. Potvrdili tím účinek MSC na depozita betaamyloidu a jeho odbourávání.

## **Parkinson**

Parkinsonova choroba je dalším neurodegenerativním onemocněním, charakteristická motorickými systémovými poruchami. Vznik onemocnění přímo souvisí s nadměrným úbytkem buněk v části středního mozku nazvané substantia nigra. Tyto odumírající buňky jsou zodpovědné za tvorbu dopaminu, což je neurotransmitter zajišťující přenos signálů mezi neurony. Doposud nebyla zjištěna přesná příčina vzniku tohoto onemocnění a proto není ani stanovena léčba, která by zastavila postup této nemoci.

Zatím nejúčinnějším lékem zmírňující symptomy Parkinsonovy choroby je L-Dopa, který je prekurzorem chybějícího dopaminu. Všechny dostupné léčivé přípravky kombinují L-Dopa spolu s inhibítorem Dopa-dekarboxylázy, který zamezí přeměně L-Dopa na dopamin již na periférii. L-Dopa má krátký poločas rozpadu proto se obvykle podává v menších dávkách častěji. Jeho účinek se však s dlouhodobým užíváním snižuje a proto se obvykle dávky zvyšují a jsou podávány častěji. Nežádoucí účinky jsou pozorovány u většiny pacientů dlouhodobě léčených L-Dopou. Mezi tyto pozdní komplikace patří například dyskinézy, psychické poruchy a náhlé fluktuace „on-off“, kdy pacient přechází ze stavu dobré hybnosti, do stavu omezené pohyblivosti. To je hlavním důvodem k hledání jiných způsobů léčby Parkinsonovy choroby.

Fyzioterapie může pacientovi oddálit symptomy onemocnění. Pravidelné cvičení napomáhá udržet a zlepšit svalovou sílu, zachovat rozsah pohybu v jednotlivých kloubech. Součástí fyzioterapie je také dechové cvičení a rehabilitace řeči. V případech rychlého postupu nemoci lze přistoupit k chirurgickému řešení, kdy lze zničit nebo naopak stimulovat určitou část mozku. K tomuto řešení se ovšem přistupuje až ve chvíli, kdy ostatní neinvazivní metody nezabírají.

Největší naděje vědci vkládají do výzkumu ESC a iPSC pro léčbu Parkinsonovy nemoci. Značný pokrok byl dosažen při vytváření plně funkčních dopaminových neuronů

z lidských ESC. Předtím, než mohou být tyto buňky využity při léčbě Parkinsonovy nemoci je třeba ověřit jejich účinnost na zvířecích modelech (Buttery a Parker, 2014).

## 4. Závěr

Buněčná terapie se zdá být nadějnou možností pro boj proti nemocem, které doposud nejsme schopni vyléčit, pouze zpomalujeme jejich průběh a tlumíme příznaky. Většina dosavadních studií prokázala potenciál kmenových buněk v regeneraci poškozených tkání, ať už se jedná o chrupavky, kosti nebo například nervovou tkáň. Regenerativní medicína jako rychle se rozvíjející interdisciplinární obor, se zaměřuje právě na obnovu poškozených funkcí orgánů, tkání a buněk a může zahrnovat celou řadu různých technologií, včetně buněčné terapie.

Schopnost kmenových buněk diferencovat do buněk okolní tkáně, z nich dělá jedinečný nástroj pro boj s těmito chorobami, které zahrnují degenerativní buněčné procesy. Působením těchto buněk dochází k nastartování a zesílení hojivých procesů, které pomáhají obnovit poškozenou tkáň. Hojení poškozených struktur tak probíhá rychleji a prakticky bez vedlejších účinků, které s sebou může nést zejména symptomatická farmakologická léčba.

V ČR i ve světě probíhají v současné době stovky až tisíce klinických studií, které se zaměřují na terapii kmenovými buňkami v různých indikacích. Cílem těchto studií je prokázat zejména bezpečnost jejich použití a také účinnost v jednotlivých indikacích a tím poznat jejich skutečné možnosti. Cesta k běžnému používání produktů na bázi kmenových buněk je však ještě hodně dlouhá a trnitá. Jejich používání ve veterinárním lékařství u vyšších savců je proto velmi důležitým zdrojem nenahraditelných informací, na základě kterých lze alespoň částečně predikovat, jak se buňky budou chovat v lidském těle.



## 5. Seznam literatury

Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., et al. 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *National Biotechnology*. 25 (7). s. 803-816.

Bae, J.S., Jin, H.K., Lee, J.K., Richardson, J.C., Carter, J.E. 2013. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to the reduction of amyloid- $\beta$  deposits and the improvement of synaptic transmission in a mouse model of pre-dementia Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 10 (5). s. 524-531.

Bernebaum, F. 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not oosteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 21 (1). s. 16-21.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 4. s. 14-19.

Bezděk, D. 12 ledna 2015. pers. comm.

Black, L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D.A., Harman, R. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter controlled trial. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8 (4). s. 272-284.

Burry, F.P., Murphy, J.M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36 (2004). s. 568-584.

Buttery, P.C., Barker, R.A. 2014 Treating Parkinson's Disease in the 21st Century: Can Stem Cell Transplantation Compete?. *The Journal of Comparative Neurology*. 522. s. 2802-2816.

Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 9 (5). s. 641–650.

Carrade, D.D., Owens, S.D., Galuppo, L.D., Vidal, M.A., Ferrari, G.L., Librach, F., et al. 2011. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogenic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy*. 13. s. s. 419-430

Corradetti, B., Lange Consiglio, A., Barucca, M., Cremonesi, F., Bizzaro, D. 2011, Size-seived subpopulations of mesenchymal stem cell from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix. *Cell Proliferation*. 44. s. 330-342.

Cremonesi, F., Corradetti, B., Lange-Consiglio, A. 2011. Fetal adnexa derived stemcells from domestic snímal: progress and perspectives. *Theriogenology*. 75. s. 1400-1415

Dhar, D., Hsi-en Ho, J. 2009. Stem Cell Research Policies around the World. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 82 (3). s. 113-115.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prokop D.J., Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 (4). s. 315–317.

Emadedin, M., Aghdami, N., Taghiyar, L., Fazeli, R., Moghadasali, R., Jahangir, S., Farad, R., Eslaminejad, B.M. 2012. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Archives of Iraian Medicine*. 15 (7). s. 422-428.

Evans, M.J., Kaufman, M.H. 1981. Estabilishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292. s. 154-156.

Fortier, L.A., Smith, R.K. 2008. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injurie sof sport horses. *Veterinary Clinics of North America Equine Praktice*. 24.s. 191-201

Fortier, L.A., Travis, A.J. 2011. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2. s. 9.

Fulka, F. jr., Moško, T., Fulková, F., Syková, E. 2008. Mezidruhové embryonální kmenové buňky: biologické a etické aspekty. *Akademický bulletin*. 6. s. 12-13.

Galimberti, D., Scarpini, E. 2010. Treatment of Alzheimer's disease: symptomatic and disease-modifying approaches. *Current Aging Science*. 3 (1). s. 46-56.

Garvican, E.R., Cree, S., Bull, L., Smith, R.K.W., Dudhia, J. 2014. Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Research & Therapy*. 5. s. 94.

Greco, S.J., Zhou, C., Ye, J.H., Rameshwar, P. 2007. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 16 (5). s. 811–826.

Guest, D.J., Smith, M.R., Allen, W.R. 2010. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*. 42. s. 636-642.

Guillot, P.V., Gotherstrom, C., Chan, J., Kurata, H., Fisk, N.M. 2007. Human First-trimester Fetal MSC Express Pluripotency Markers and Grow Faster and Have Longer Telomeres Than Adult MSC. *Stem Cells*. 25 (3). s. 646–654.

Gurdon, J.B. 1962. Adult droga derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*. 4 (2). s. 256-273.

Hou, J., Lü, A.L., Liu, B.W., Xing, Y.J., Da, J., Hou, Z.L., Ai, S.Y. 2013. The Combination of BMP-2 and 5-AZA Reveals Advantage of Rat Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Cardiomyocytes. *Cell Biology International*. 37 (12). s. 1291-1299.

Chaudhury, S., 2012. Mesenchymal stem cell applications to tendon healing. *Muscles Ligaments Tendon Journal*. 2 (3). s. 222-229.

Chong, A.K., Chang, J., Go, J.C. 2009. Mesenchymal stem cells and tendon healing. *Frontiers in Bioscience*. 14. s. 4598-4605.

Jiang, J., Lv, Z., Gu, Y., Li, J., Xu, L., Xu, W., Lu, J., Xu, J. 2010. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neuroscience Research*. 66 (1). s. 46–52.

Kan, I., Melamed, E., Offen, D. 2007. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handbook of experimental Pharmacology*. 180. s. 219-242.

Koh, Y.G., Choi, Y.J. 2012. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *The Knee*. 19 (6). s. 902-907.

Koch, T.G., Berg, L.C., Betts, D.H. 2009. Current and future regenerative medicine: principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Canadian Veterinary*. 50. 155-165.

Kružík P., Moos J., Vlček R. 2006. Analyzátory buněk a částic, *In vitro diagnostika*, 2006, 3, s. 4-5.

Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., Kurosaka, M. 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 15 (2). s. 226-231.

Landry, D.W., Zucker, H.A. 2004. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 114 (9). s. 1184-1186.

Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S. et al. 2012. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 6. s. 622-635.

Lange-Consiglio, A., Tassan, S., Corradetti, B., Meucci, A., Pereno, R., Bizzaro, D., Cremonesi, F. 2015. Porovnání mezenchymálních stromálních buněk odvozených z amnionu a kostní dřeně v léčbě poranění vazů a šlach u koní. *Veterinární lékař*. 13 (1). s. 17-26.

Lascelles, B.D., Main, D.C. 2002. Surgical trauma and chronically painful conditions—within our comfort level but beyond theirs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. s. 221. 215-222.

Martin, G.R. 1980. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 209 (4458). s. 768-776.

Mascotti, K., McCullough, J., Burger, S.R. 2000. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*. 40 (6). s. 693-696.

Meredith, Ch.M. 2005. Adipose Derived Stem Cell Therapy in the Treatment of Canine Degenerative Joint Disease Secondary to Conformational Abnormalities. *Vet-stem*. Dostupné z <<http://www.vet-stem.com/arthritis.php>>

Moore, G.E., Burkman, K.D., Carter, M.N., Peterson, M.R. 2001. Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases (1993-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 219 (2). s. 209-214.

Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B., Barry, F.P. 2003. Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 48 (12). s. 3464-3474.

Musil, V. 15 ledna 2015. pers. comm.

Nečas, A., Plánka, L., Srnec, R., Chrha, M., Hlučilová, J., Klíma, J., Starý, D., Křen, L., Amler, E., Vojtová, L., Jančář, J., Gál, P. 2010. Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite

scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres. *Physiological Research*. 59 (2010). s. 605-614.

Nieto, A., Cobo, F., Barroso-Deljesús, A., Barnie, A.H., Catalina, P., Cabrera, C.M., Cortes, J.L., Montes, R.M., Concha, A. 2006. Embryonic stem cell bank: work proposal. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2 (2). s. 117-126.

Oedayrajsingh-Varma, M., Van Ham, S., Knippenberg, M., Helder, M., Klein-Nulend, J., Schouten, T., Ritt, M., van Milligen, F. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Informa Healthcare*. 8 (2). 166-177.

Park, J. 2011. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *Journal of Medical Case Reports*. 5. s. 296.

Park, S.P., Lee, Y.J., Lee, K.S., Ah Shin, H., Cho, H.Y., Chung, K.S., Kim, E.Y., Lim, J.H. 2004. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Human Reproduction*. 19 (3). s. 676-84.

Potten, C.S., Loeffler, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 110 (4). s. 1001-1020.

Reed, S.A., Leahy, E.R. 2013. Growth and development symposium: Stem cell therapy in equine tendon injury. *Animal Science Journal*. 91. s. 59-65.

Rhone-Poulenc Doder S.A. Application de l'amino-2 trifluoromethoxy-6 benzothiazole (riluzole) pour obtenir un médicament destiné au traitement des maladies du motoneurone. France. WO 1993017683 A1. 19 září 1993.

Rigol, M., Solanes, N., Roura, S., Roque, M., Novena, L., Dantas, A.P., Martorell, J., Stiges, M., Ramirez, J., Bayes-Genis, A., Heras, M. 2014. Allogenic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *European Journal of Clinical Investigation*. 44 (1). s. 83-92.

Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D., Smith, R. 2007. Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology*. 25. s. 409-416.

Sadler, T.W. 2009. *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. s. 385. ISBN: 9780781790697.

Storer, S.K., Skaggs, D.L. 2008. Developmental Dysplasia of the Hip. *American Family Physician*. 74 (8). s. 1310-1316.

Stull, J.W., Evason, M., Carr, A.P., Waldner, Ch. 2008. Canine immune-mediated polyarthritis: Clinical and laboratory findings in 83 cases in western Canada (1991–2001). *Canadian Veterinary Journal*. 49 (12). s. 1195-1203

Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 (4). s. 663-676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131 (5). s. 861-872.

Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282. s. 1145-1147.

Turner, M.R., Hardiman, O., Benatar, M., Chio, A., et al. 2013. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*. 12 (3). s. 310-322.

Vlas, T., Merglová, L., Panzner, P., Hanzlíková, J., Koza, V., Lysák, D. 2011. Imunomodulační vliv mesenchymálních kmenových buněk na nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů. *Alergie*. 4 (2011). s. 257-262.

Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., Yoneda, M. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 10 (3). s. 199-206.

Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakanuta, Y., Horibe, S. 2004. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplantation*. 13 (5). s. 595-600.

Ytrehus, B., Carlson, C.S., Ekman, S. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Veterinary Pathology*. 44 (4). s. 429-448.

### **Legislativní dokumenty**

Her Majesty's Government. 13th November 2008. Human Fertilisation and Embryology Act 2008. Chapter 22. Dostupné z

<[http://www.legislation.gov.uk/ukpga/2008/22/pdfs/ukpga\\_20080022\\_en.pdf](http://www.legislation.gov.uk/ukpga/2008/22/pdfs/ukpga_20080022_en.pdf)>.

The White House. Executive Order 13505 of March 9, 2009. Removing Barriers to Responsible Scientific Research Involving Human Stem Cells. *Federal Register*. s. 74 (46).

Zákon č. 227 ze dne 26. dubna 2006 o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů České republiky*. 2006. částka 75. s. 2850-2861. Dostupné také z <<http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/ViewFile.aspx?type=c&id=4921>>.

Zákon č. 296 ze dne 16. července 2008 o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů České republiky*. 2008. částka 97. s. 4441. Dostupné z <[http://www.mzcr.cz/legislativa/dokumenty/transplantace-a-bezpecnost-tkani-a-bunek\\_6117\\_1786\\_11.html](http://www.mzcr.cz/legislativa/dokumenty/transplantace-a-bezpecnost-tkani-a-bunek_6117_1786_11.html)>.

Zákon č. 378 ze dne 6. prosince 2007 o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů České republiky*. 2007. částka 115. s. 5342. Dostupné z <[http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/leciva\\_5619\\_2493\\_11.html](http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/leciva_5619_2493_11.html)>.



## **Internetové zdroje**

CellMaGel, s.r.o. [online]. 2013 [cit. 2015-2-12]. Dostupné z

ClinicalTrials. gov. [online]. 5 prosince 2013 [cit. 2015-4-1]. Dostupné z  
<[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)>.

EponaCell [online]. 2010-2015 [cit. 2015-3-15]. Dostupné z <<http://eponacell.cz/>>.

EuroStemCell [online]. 2008-2015 [cit. 2015-3-10]. Dostupné z  
<<http://www.eurostemcell.org/stem-cell-regulations>>.

Hyclová, P. VETCENTRUM Duchek s.r.o. [online]. 2006 [cit. 2015-3-25]. Dostupně z  
<<http://www.vetcentrum.cz/>>.

Slabý, J. 2011. Dysplazie kyčelního kloubu psů – dokážeme ji včas rozpoznat a účinně léčit?  
Klinika ARVET. Písek. Dostupné z <<http://www.arvet.cz/poskytovane-sluzby/ortopedie.php>>.

Vet-stem [online]. 2011 [cit. 2015-3-10]. Dostupné z <<http://vet-stem.com/>>.

## 6. Přílohy

### Obrázky

Obr. 1: Dostupné z <[www.cellmagel.cz](http://www.cellmagel.cz)>.

Obr.2: Dostupné z <<http://www.impactaging.com/papers/v3/n5/full/100328.html>>.

Obr. 3: Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/ipsc.html>>.

Obr. 4 – 7: Bezděk, D., Musil, R. 2015. Použití autologních mesenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně v léčbě degenerativních kloubních onemocnění u psů. Veterinární lékař. 13 (1). s. 7-14.

### Grafy

Graf 1: Black, L.L., Gaynor, J., Adams, C., Dhupa, S., Sams, A.E., Taylor, R., Harman, S., Gingerich, D.A., Harman, R. 2008. Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. Veterinary Therapeutics. 9 (3). s. 192-200.

### Tabulky

Tab. 1

<b>TABLE 1. Orthopedic Examination Scores (mean <math>\pm</math> SEM) in 14 Dogs with Osteoarthritis of the Elbow Joint before and after Intraarticular Injection of Autologous Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells*</b>						
<i>Time</i>	<i>Lameness at Walk</i>	<i>Lameness at Trot</i>	<i>Pain on Manipulation</i>	<i>Joint Stiffness</i>	<i>Functional Disability</i>	<i>Composite Score</i>
Baseline	2.7 $\pm$ 0.14	2.9 $\pm$ 0.08	2.1 $\pm$ 0.08	2.7 $\pm$ 0.13	3.0 $\pm$ 0.23	13.3 $\pm$ 0.51
30 days	2.2 $\pm$ 0.20	2.3 $\pm$ 0.19	1.8 $\pm$ 0.11	2.3 $\pm$ 0.14	2.2 $\pm$ 0.20	10.6 $\pm$ 0.69
60 days	2.1 $\pm$ 0.22	2.3 $\pm$ 0.19	1.8 $\pm$ 0.13	2.1 $\pm$ 0.18	2.1 $\pm$ 0.20	10.3 $\pm$ 0.79
90 days	1.7 $\pm$ 0.22	2.0 $\pm$ 0.21	1.8 $\pm$ 0.09	2.0 $\pm$ 0.14	1.7 $\pm$ 0.18	9.2 $\pm$ 0.70
180 days	1.7 $\pm$ 0.24	1.8 $\pm$ 0.25	1.8 $\pm$ 0.10	2.3 $\pm$ 0.16	1.6 $\pm$ 0.23	9.2 $\pm$ 0.82
Significance <sup>†</sup>	<i>P</i> < .001	<i>P</i> = .002	<i>P</i> = .108 (NS)	<i>P</i> = .002	<i>P</i> < .001	<i>P</i> < .001

\*Individual scores for various parameters: lameness, 1 (normal) to 6 (nonambulatory); pain, 1 (no pain) to 3 (severe); range of motion (stiffness), 1 (normal) to 4 (pain on any joint manipulation); functional disability, 1 (normal; no stiffness) to 5 (does not want to walk); composite score maximum, 24.

<sup>†</sup>Repeated measures analysis of variance on ranks.

NS = not significant.

Zdroj : Black, L.L., Gaynor, J., Adams, C., Dhupa, S., Sams, A.E., Taylor, R., Harman, S., Gingerich, D.A., Harman, R. 2008. Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of

Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. Veterinary Therapeutics. 9 (3). s. 192-200.

Tab. 2 Dostupné z <<http://vet-stem.com/>>.

**Table 1 – Veterinary Orthopedic Assessments**

	Test-R				
	Pre-treatment	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
<b>Veterinary</b>					
<b>Orthopedic Exam</b>					
<b>Left Hip</b>					
<b>Lame-walk</b>					
Not detectable		1	1	1	1
Intermittent					
Persistent	3				
Persistent-Non					
Ambulatory w/assist					
Non-ambulatory					
<b>Lame-Trot</b>					
Not detectable		1	1	1	1
Intermittent					
Persistent	3				
Persistent-Non					
Ambulatory w/assist					
Non-ambulatory					
<b>Pain on Manipulation</b>		NG			
No pain					1
Mild Pain			2	2	
Severe Pain	3				
<b>Range of Motion</b>					
No limitation			1		
Pain only at full		2		2	2
Pain at less than full	3				
Pain at any attempt					
<b>Functional Disability</b>					
Normal activity		1	1	1	
Slightly stiff gait					2
Stiff					
Very stiff	4				
Does not want to walk					
<b>Subjective</b>					
Worse					
Unchanged					
Slightly improved					
Good improvement		2	2	2	2
Excellent					

Table 1 Continued

	Pre-treatment	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
<b>Right Hip</b>					
<b>Lame-walk</b>					
Not detectable		1	1	1	1
Intermittent					
Persistent	3				
Persistent-Non					
Ambulatory w/assist					
Non-ambulatory					
<b>Lame-Trot</b>					
Not detectable		1	1	1	1
Intermittent					
Persistent	3				
Persistent-Non					
Ambulatory w/assist					
Non-ambulatory					
<b>Pain on Manipulation</b>					
No pain		1	1		1
Mild Pain				2	
Severe Pain	3				
<b>Range of Motion</b>					
No limitation		1	1		
Pain only at full				2	2
Pain at less than full	3				
Pain at any attempt					
<b>Functional Disability</b>					
Normal activity		1	1	1	
Slightly stiff gait					2
Stiff					
Very stiff	4				
Does not want to walk					
<b>Subjective</b>					
Worse					
Unchanged					
Slightly improved					
Good improvement		2	2	2	2
Excellent					

Tab. 3 Dostupné z <<http://vet-stem.com/>>.

**Table 2 – Owner Quality of Life Assessments**

	Pre-treatment	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
<b>Lame-walk</b>					
No problem	1	1	1	1	1
A little					
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Run</b>					
No problem			1	1	
A little	2	2			2
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Jump, eg car, furniture</b>					
No problem		1	1	1	1
A little					
Quite a bit	3				
Severe					
Won't do					
<b>Turning suddenly</b>					
No problem		1		1	1
A little	2		2		
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Get up from lying</b>					
No problem		1	1		
A little	2			2	2
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Lying down from stand</b>					
No problem	1	1	1	1	1
A little					
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Climbing stairs</b>		NA			
No problem				1	1
A little			2		
Quite a bit	3				
Severe					
Won't do					

**Table 2 Continued**

	Pre-treatment	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
<b>Descending stairs</b>		NA			
No problem				1	1
A little			2		
Quite a bit	3				
Severe					
Won't do					
<b>Squatting to urinate</b>					
No problem		1	1	1	1
A little					
Quite a bit	3				
Severe					
Won't do					
<b>Stiffness in am</b>					
No problem		1			
A little			2	2	2
Quite a bit	3				
Severe					
Won't do					
<b>Stiffness at end of day</b>					
No problem		1		1	
A little	2		2		2
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Difficulty-slippy floors</b>					
No problem		1	1	1	1
A little	2				
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Willingness to play-v</b>					
No problem	1	1	1	1	1
A little					
Quite a bit					
Severe					
Won't do					
<b>Condition change</b>					
Become worse					
No change					
Slightly improved					
Marked improvement		2	2		2
Excellent				1	
<b>Energy level</b>					
Become worse					
No change					
Slightly improved					
Marked improvement		2	2		2
Excellent				1	

Tab. 4 a 5

Macroscopic evaluation	Group A (transplantation of scaffold + MSCs)	Group B (transplantation of scaffold)	Group C (micropicking)
<i>Smooth surface</i>	60	0	0
<i>Surface erosion/fissure or osteophytes</i>	40	100	100

Animal	Group A (transplantation of scaffold + MSCs) Ten tissue samples				Group B (transplantation of scaffold) Ten tissue samples				Animal	Group C (micropicking) Ten tissue samples			
		PAS	IHC	IFS		PAS	IHC	IFS			PAS	IHC	IFS
F 125	15	+	+++	+	4	-	+	-	E 56	5	-	+	-
F 186	14	+	+++	+	5	-	+	-	F 60	4	-	+	-
F 185	13	+	++	-	6	+	++	-	E 11	3	-	+	-
F 127	16	+	+++	+	7	-	+	-	F 70	5	-	++	-
F 197	18	+	+++	+	5	-	++	-	E 52	6	-	+	-
F 139	14	+	+++	+	4	-	+	-	F 71	5	-	++	-
F 196	13	+	++	+	6	-	+	-	F 28	6	-	+	-
F 126	15	+	+++	+	5	+	+	-	F82	7	-	+	-
F 187	14	+	+++	+	6	-	+	-	F84	7	-	+	-
F 188	15	-	+	-	5	-	+	-	E75	4	-	+	-

Zdroj: Nečas, A., Plánka, L., Srnec, R., Chrha, M., Hlučilová, J.,

Klíma, J., Starý, D., Křen, L., Amler, E., Vojtová, L., Jančář, J., Gál, P. 2010. Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres. *Physiological Research*. 59 (2010). s. 605-614.

Tab. 6

Případ 1					Kulhavost		Otok		Zesílení			
Disciplína	Počet koní (celkem = 51)	Věk koní (v letech)	Poškozená struktura	Končetina	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Mírné léze	Těžké léze
Parkur	23	3-9	8 SL, 13 SDFT, 2 DDFT	23 f	7 11 1	7 2 1	7 10 1	1 3 1	7 10 1	1 3 1	4 3 2	4 10 0
Drezúra	14	7-12	5 SL, 9 SDFT	4 h, 10 f	3 6	2 3	3 6	2 3	3 6	2 3	2 7	3 2
Všestrannost	4	4-8	4 SDFT	4 f	1	3	1	3	1	3	3	1
Klusácké dostihy	3	3-8	1 SL, 2 SDFT	1 h, 2 f	0 1	1 1	0 1	1 1	0 1	1 1	1 1	0 1
Rovinné dostihy	7	2-5	1 DDFT, 6 SDFT	7 f	1 5	0 1	1 5	0 1	1 5	0 1	1 4	0 2

SL, suspensory ligament – závěsný vaz, SDFT, superficial digital flexor tendon – šlacha povrchového ohýbače prstů, DDFT, deep digital

Tab. 7

					Kulhavost		Otok		Zesílení			
Disciplína	Počet koní (celkem = 44)	Věk koní (v letech)	Poškozená struktura	Končetina	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Mírné léze	Těžké léze
Parkur	14	4-9	4 SL, 9 SDFT, 1 DDFT	14 f	2 4 0	2 5 1	2 4 0	2 5 1	2 4 0	2 5 1	2 3 1	2 6 0
Drezúra	12	8-12	4 SL, 8 SDFT	6 h, 6 f	4 7	0 1	4 7	0 1	4 7	0 1	2 6	2 2
Všestrannost	5	4-8	5 SDFT	5 f	3	2	5	0	5	0	3	2
Klusácké dostihy	3	4-7	2 SL, 3 SDFT	2 h, 3 f	1 3	1 0	1 3	1 0	1 3	1 0	1 2	1 1
Rovinné dostihy	8	2-3	1 DDFT, 7 SDFT	8 f	1 4	0 3	1 4	0 3	1 4	0 3	1 4	0 3

SL, suspensory ligament – závěsný vaz, SDFT, superficial digital flexor tendon – šlacha povrchového ohýbače prstů, DDFT, deep digital

Tab. 8

Disciplína	Skupina A (celkem = 50)		Skupina B (celkem = 39)	
	Počet koní (%)	Poškozená struktura	Počet koní (%)	Poškozená struktura
Parkur	0/22 (0,00)	-	3/12 (25,00)	1 mírná SL 2 těžká SDFT
Drezúra	2/14 (14,29)	2 těžká SDFT	4/9 (44,44)	1 mírná SDFT 2 těžká SDFT
Všestrannost	0/4 (0,00)	-	1/5 (20,00)	1 těžká SL 1 těžká SDFT
Klusácké dostihy	0/3 (0,00)	-	0/5 (0,00)	-
Rovinné dostihy	0/7 (0,00)	-	1/8 (12,50)	1 těžká SDFT

SL, suspensory ligament – závěsný vaz, SDFT, superficial digital flexor tendon – šlacha povrchového ohýbače prstů, DDFT, deep digital flexor tendon – šlacha hlubokého ohýbače prstů

Tab. 6-8: Zdroj: Lange-Consiglio, A., Tassan, S., Corradetti, B., Meucci, A.,

Pereno, R., Bizzaro, D., Cremonesi, F. 2015. Porovnání mezenchymálních stromálních buněk odvozených z amnionu a kostní dřeně v léčbě poranění vazů a šlach u koní. Veterinární lékař. 13 (1). s. 17-26.