

**Mladi za napredek Maribora 2014**  
**31. srečanje**

**Zdravljenje z matičnimi celicami pri konjih v veterinarski  
ortopediji**

**Zdravstvo in veterina**

Raziskovalna naloga

0€đ !kP Q P Q S Š Ü C Z Ö Ü C E Q Ě Ő U Ü W W Á Ö X Ò Ò S  
T ^ } đ !kP Q P Q S Š Ü C Z Ö Ü C E  
¥ [ | a k P Q P Q S Š Ü C Z Ö Ü C E

**2014, Maribor**

## Vsebina

1.	UVOD .....	5
1.1.	Cilji raziskave .....	5
1.2.	Hipoteze .....	5
2.	TEORETIČNI DEL NALOGE .....	6
2.1.	Matične celice .....	6
2.2.	Najpogostejše poškodbe lokomotornega aparata pri konjih .....	7
2.3.	Matične celice kot terapija pri poškodbah lokomotornega aparata konj .....	7
2.4.	Pridobivanje vzorca tkiva za kulturizacijo matičnih celic .....	7
2.4.1.	Kostni mozeg .....	7
2.4.2.	Maščobno tkivo .....	8
2.5.	Kulturizacija matičnih celic .....	9
2.6.	Najpogostejše poškodbe, ki jih zdravimo z matičnimi celicami .....	10
2.6.1.	<b>Tendonitis</b> .....	10
2.6.2.	<b>Osteoartritis</b> .....	11
2.6.3.	<b>Laminitis</b> .....	11
2.7.	Ostale alternativne terapije zdravljenja pri poškodbah lokomotornega aparata .....	11
2.7.1.	<b>ESWT-terapija</b> .....	11
2.7.2.	<b>PRP terapija</b> .....	13
3.	MATERIALI IN METODE DE LA .....	14
3.1.	Metodologija .....	14
3.2.	Metoda opazovanja .....	14
3.3.	Laboratorijsko delo in sekcija .....	14
3.3.1.	Šolski laboratorij .....	14
3.3.2.	Veterinarska fakulteta, Univerze v Ljubljani .....	16
3.4.	Terensko delo in laboratorijsko delo .....	19
3.4.1.	Laboratorij podjetja Animacel d.o.o. ....	19
3.4.2.	Veterinarska bolnica Slovenska Bistrica (klinika za konje) .....	20
3.5.	Materiali in pripomočki .....	30
4.	RAZPRAVA .....	31
5.	ZAKLJUČEK .....	34
5.1.	Ugotovitve raziskave in vprašanja za nadaljnjo raziskovanje .....	34
5.2.	Statistika uspešnosti zdravljenja poškodb lokomotornega aparata pri konjih .....	35
6.	SKLEP .....	38
6.1.	Zdravljenje z matičnimi celicami je uspešnejše od drugih terapij za zdravljenje poškodb pri športnih konjih .....	38
6.2.	Z matičnimi celicami moramo začeti zdraviti takoj po poškodbi. ....	38
6.3.	Matične celice so se sposobne razviti v katerekoli telesne celice. ....	38
6.4.	Število matičnih celic, ki jih apliciramo na mesto poškodbe vpliva na zdravljenje. .	39
7.	DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	40
8.	LITERATURA .....	41
9.	ZAHVALA .....	42

## KAZALO SLIK:

Slika 1: Izgled matičnih celic pod elektronskim mikroskopom (vir: <a href="http://www.animacel.com">http://www.animacel.com</a> )	6
Slika 2: Razkuževanje kirurškega polja pred odvzemom maščobnega tkiva (vir: lastna fotografija, 2013)	9
Slika 3: Sprednja konjska okončina med odstranjevanjem kože (vir: lastna fotografija, 2014)	15
Slika 4: Površinske strukture po odstranitvi kože (vir: lastna fotografija 2013)	15
Slika 5: Kuhanje kosti (vir: lastna fotografija 2014)	16
Slika 6: Prednja konjska noga po odstranitvi kože (vir: lastna fotografija, 2014)	17
Slika 7: Prednja okončina konja distalno od komolčnega sklepa (vir: lastna fotografija, 2014)	18
Slika 8: Sprepariran model prednje konjske noge (vir: lastna fotografija, 2014)	19
Slika 9: Kostni prednje konjske okončine (vir: P. Popesko, Anatomski atlas domačih živali III)	21
Slika 10: Mišice in kite prednje konjske noge (vir: P. Popesko, Anatomski atlas domačih živali III)	22
Slika 11: Prevodna anestezija (vir: lastna fotografija, 2014)	24
Slika 12: Obrito in razkuženo mesto odvzema maščobnega tkiva pri konju (vir: lastna fotografija, 2013)	26
Slika 13: Rtg pred aplikacijo matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2013)	27
Slika 14: Aplikacija matičnih celic v sklep (vir: lastna fotografija, 2013)	28
Slika 15: Aplikacija matičnih celic v površinsko upogibalko (vir: lastna fotografija 2013)	29
Slika 16: UZ prikaz aplikacije (vir: lastna fotografija, 2013)	29
Slika 17: UZ pred aplikacijo matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2013)	30
Slika 18: UZ po aplikaciji matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2014)	30

## **Povzetek**

Z raziskovalno nalogo sva želela spoznati kaj to matične celice so, kako jih pridobivamo in kako ter kje te celice shranjujejo. Zanimalo naju je tudi ali je metoda z terapijo matičnih celic boljša od drugih metod in če je, kdaj in pri katerih boleznih ali poškodbah v ortopediji pri konjih lahko takšno terapijo uporabimo. Zdravljenje z matičnimi celicami je inovativen postopek v veterinarski medicini, ki v relativno kratkem času in ob sprejemljivih stroških, omogoča učinkovito zdravljenje in lajšanje težav pri številnih živalskih boleznih. Zanimalo naju je tudi katere poškodbe so v ortopediji konj pri nas, v Sloveniji najpogostejše in ali se za terapijo z matičnimi celicami lastniki konj v Sloveniji odločajo. Najprej sva preučila teoretične vire in se nato posvetovala s strokovnjaki, ki so nama razložili vse podrobnosti, tako o pridobivanju kolonij celic, transportu vzorcev, gojenju celičnih kultur kot tudi samo praktično delo veterinarja v kliniki, kjer sva imela možnost spremljati tako diagnostiko poškodb kot tudi sam potek terapije z matičnimi celicami. Ugotovila sva, da je ta metoda zdravljenja zelo aktualna in predvsem učinkovita pri poškodbah konj.

## **1. UVOD**

Zdravljenje z matičnimi celicami je inovativna metoda zdravljenja tako v medicini kot tudi v veterini. Z matičnimi celicami v kratkem času s sprejemljivimi stroški dosežemo učinkovito zdravljenje in lajšanje težav v številnih primerih pri živalih in ljudeh. Za raziskovalno nalogo zdravljenje z matičnimi celicami pri konjih v veterinarski ortopediji sva se odločila zato, ker je to zelo aktualna in predvsem učinkovita metoda zdravljenja.

### **1.1. Cilji raziskave**

V raziskovalni nalogi bi rada spoznala, kaj so matične celice, na kakšen način jih je mogoče pridobiti in kako se shranjujejo. Zanima naju tudi, ali je ta vrsta opravljanja terapij boljša od drugih vrst zdravljenja ortopedskih poškodb konjev, ter kdaj in pri katerih travmah v ortopediji pri konjih lahko uporabimo terapijo z matičnimi celicami. Želiva pa se seznaniti tudi z drugimi metodami zdravljenja mišično-skeletnih bolezni pri konjih, ter primerjavo teh terapij z zdravljenjem s pomočjo matičnih celic. Svoje teoretično znanje pa bova dopolnjevala ob spremljanju kliničnih primerov na veterinarski kliniki za zdravljenje konj. Najin namen je tudi, da podrobno spoznava enega od kliničnih primerov zdravljenja z matičnimi celicami.

### **1.2. Hipoteze**

- Matične celice so se sposobne razviti v katerekoli telesne celice.
- Zdravljenje z matičnimi celicami je uspešnejše od drugih terapij za zdravljenje poškodb pri športnih konji.
- Z matičnimi celicami moramo začeti zdraviti takoj po poškodbi.
- Število matičnih celic, ki jih apliciramo na mesto poškodbe, vpliva na zdravljenje poškodbe.

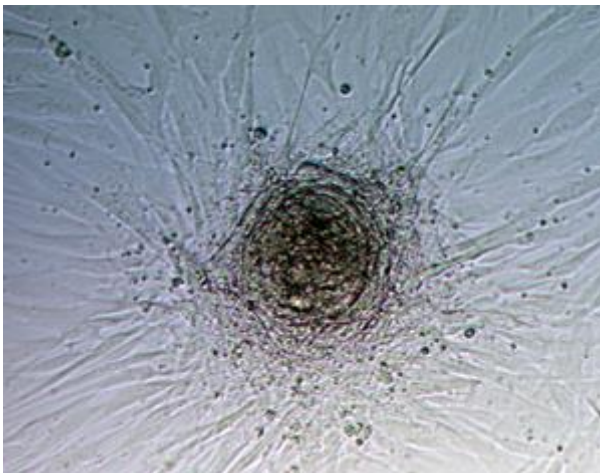
## 2. TEORETIČNI DEL NALOGE

### 2.1. Matične celice

Zdravljenje z matičnimi celicami je oblika regenerativne medicine, ki je v svetu znana kot nov in zelo obetaven postopek. Področje regenerativne medicine pa je v velikem razmahu.

Matične celice so nediferencirane biološke celice, ki se lahko diferencirajo v specializirane celice. Imajo izreden potencial za razvoj v katere koli telesne celice. Imajo sposobnost mitotične delitve. Matične celice najdemo v mnogoceličnih organizmih, so ne specializirane celice, ki imajo sposobnost neomejenega samoobnavljanja in diferenciacije v specializirane celice. Matične celice so v času embrionalnega razvoja odgovorne za nastanek vseh tkiv in organov. V postembrionalnem razvoju pa matične celice obnavljajo odmrle, obolele ali poškodovane celice.

Matične celice se delijo asimetrično, nekatere v matične celice, druge v npr. hrustančno tkivo.



Slika 1: Izgled matičnih celic pod elektronskim mikroskopom (vir: <http://www.animacel.com>)

Matične celice razdelimo na:

- embrionalne matične celice, ki so totipotentne, kar pomeni, da se lahko diferencirajo v vsa telesna tkiva;
- IPS celice, ki so pluripotentne, kar pomeni, da se lahko razvijejo v večino telesnih tkiv;
- odrasle matične celice, ki so multipotentne in se lahko razvijejo v nekatera telesna tkiva.

Pri zdravljenju konj se najpogosteje uporabljajo mezenhimske zarodne celice kostnega mozga (adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells BM-MSK) in mezenhimske zarodne celice maščobnega tkiva (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells AT-MSK).

## **2.2. Najpogostejše poškodbe lokomotorne aparata pri konjih**

Najpogostejše poškodbe lokomotorne aparata delovnih in športnih konj so osteoarthritis, laminitis, tendinitis in zlomi kosti.

## **2.3. Matične celice kot terapija pri poškodbah lokomotorne aparata konj**

Zdravljenje z matičnimi celicami v konjski ortopediji je indicirano pri tendonitisih, laminitisih in osteoarthritisih. Uporaba matičnih celic v veterinarski medicini pri konjih je v svetu zelo razširjena, vendar pa je o zdravljenju mišično-skeletnih obolenj konj na voljo zelo malo literature. Kljub temu da je zdravljenja z matičnimi celicami vedno več, je opisanih kliničnih primerov o dolgotrajnem zdravljenju muskularno-skeletnih boleznih malo. Veliko kliničnih študij je bilo nejasnih, saj niso vključevale ustreznih kontrolnih skupin. Vsekakor uporaba matičnih celic v veterinarski medicini pri konjih narašča hitreje od znanstvenih in kliničnih dokazov. Potrebno pa se je zavedati, da v zvezi z uporabo matičnih celic ni zakonodaje, se ji pa tako v svetu kot v Sloveniji hitro približujemo, saj je uporaba matičnih celic vse pogostejša.

## **2.4. Pridobivanje vzorca tkiva za kulturizacijo matičnih celic**

### **2.4.1. Kostni mozeg**

Aspirat kostnega mozga je mogoče pri konju pridobiti iz prsnice (sternum) ali iz medenične kosti (tuber coxae) z uporabo Jamshidi-igle. Iz aspirata kostnega mozga je mogoče in vitro v 2 do 3 tednih vzgojiti mezenhimske matične celice. Konja je potrebno za odvzem vzorca ustrezno sedirati. Biti mora v stoječem položaju. Mesto odvzema obrijemo in razkužimo. S tem preprečimo infekcijo vzorca. Za odvzem se uporablja Jamshidi-igla. Predvsem pri odvzemu iz sternuma je potrebno biti pazljiv, saj se odvzem opravlja v neposredni bližini srca.

#### **2.4.2. Maščobno tkivo**

Maščobno tkivo se pridobiva na bazi repa. Konja se pred odvzemom sedira in fiksira v stoječem položaju. Mesto odvzema se nahaja na levi ali desni strani korena repa. Mesto je potrebno najprej obriti, priporočena površina meri približno 15 cm<sup>2</sup>. Površino je potrebno nato razkužiti, kot pravilno in ustrezno razkuževanje se šteje večkratno spiranje z dezinfekcijskim sredstvom in čiščenje s sterilno gazo, lahko se uporabi tudi jodovo raztopino. Razkuževanje mesta je temeljnega pomena, saj je najpogostejši vir okužbe celične kulture v laboratoriju. Pri operativnem posegu potrebujemo kirurški prt, ki se namesti na polje odvzema. Pri operativnem delu odvzema se uporabljata dve pinceti, skalpel za odpiranje rane in škarje za odvzem maščobnega tkiva ter šivalni material. Pomembno je, da se za odpiranje rane in za sam odvzem ne uporablja istega skalpela ali škarij in s tem zmanjšamo možnost, da bi iz površine kože na maščobo prenesli viri celične okužbe. Rana mora omogočiti čim lepši izrez maščobe, potrebno pa je pridobiti enega ali dva koščka maščobnega tkiva. Ni priporočljivo odzemanje več manjših koščkov, saj se posoda odpira samo enkrat ali dvakrat, vsako ponovno odpiranje pa poveča možnosti kontaminacije. Pomembno je, da posode za vzorce ne izpostavljamu kontaminaciji. S posodo je potrebno ravnati v sterilnih rokavicah. Pokrovček posode mora biti vedno obrnjen navzdol proti tlom. Ko je vzorec zaprt v posodi, ga je potrebno dati v vrečko in v transportno škatlo.





**Slika 2: Razkuževanje kirurškega polja pred odvzemom maščobnega tkiva (vir: lastna fotografija, 2013)**

## **2.5. Kulturizacija matičnih celic**

Odvzeto maščobno tkivo se prečisti z encimom kolagenaza in nato nasadi na gojišče za nekaj tednov, s tem se omogoči ohranitev mezenhimskih zarodnih celic maščobnega tkiva (AT-MSCs). Lahko pa iz odvzetega dela maščobnega tkiva izoliramo celice maščobnega tkiva kot frakcijo vaskularne strome (AD-SVF). Uporaba obeh načinov je sicer že opisana v literaturi, vendar se AD-SVF celice uporabljajo pogosteje, saj so zaradi nižjih stroškov zdravljenja lastnikom bolj dostopni, krajši pa je tudi čas, ki ga veterinar potrebuje za pridobitev, kulturizacijo in aplikacijo zarodnih celic maščobnega tkiva (AT-MSCs). Vendar pa je potrebno poudariti, da je med celicami izoliranimi s pomočjo frakcije vaskularne strome, zaradi manjkajoče kulturizacije samo od 20 do 40 odstotkov zarodnih celic. Klinični dokazi podpirajo uporabo na oba načina pridobljenih matični celic pri terapiji mišičnoskeletnih obolenj. V podjetju Animacel biotehnologija d.o.o. vzorec maščobnega tkiva po prejemu razgradijo na celice in nasadijo na posebna gojišča. Matične celice se lepijo na plastično podlogo, kar jim omogoča, da jih lahko ločijo od ostalih celic. Vendar pa se na podlogo lepijo tudi fibroblasti. Matične celice ločijo od fibroblastov po tem, da se fibroblasti ne diferencirajo v druga tkiva. Celice ločimo glede na prisotnost proteinov določenih na celični membrani. Celične kulture inkubirajo pri 37 °C in 5 odstotkov

ogljikovega dioksida. Gojišča je potrebno redno menjavati zaradi odpadnih produktov (vsake 2 do 3 dni), potrebno pa jim je dodajati tudi hrano. Matične celice pa lahko tudi shranijo. Priporočeno je predhodno odvzemanje tkiva pri kirurških posegih, npr. kastracija in sterilizacija, kjer je mogoče odvzeti maščobno tkivo. V podjetju Animacel nato poskrbijo, da so celice shranjene. Celice shranijo pri  $-70$  do  $-80$  °C z dodanimi krioprotektanti. To so snovi, ki preprečijo nastanek kristalov pri zamrzovanju, ker pa se je teh potrebno pred aplikacijo znebiti, potrebujejo od 1 do 2 dni, da jih odstranijo. Ta način shranjevanja uporabljajo takrat, ko celice shranjujejo krajši čas, ko pa matične celice shranjujejo za daljše obdobje jih shranjujejo v tekočem dušiku. Ko pride do poškodbe so celice v 1 do 2 dneh pripravljene za aplikacijo. Kar pomeni, da lahko začnemo prej sanirati škodo po poškodbah in je čas zdravljenja in okrevanja krajši.

## **2.6. Najpogostejše poškodbe, ki jih zdravimo z matičnimi celicami**

### **2.6.1. Tendonitis**

Vlaknasto tkivo, ki povezuje mišice in kosti, se imenuje tetiva. Tendinitis pa je akutno ali kronično vnetje, za katerega je značilna bolečina pri narastišču tetive na kost. Tendinitis je posledica trganja (rupture) tetivnih vlaken v različnih stopnjah. Najpogosteje se pojavlja pri športnih in delovnih konjih. Tetive, ki se najpogosteje poškodujejo, pa so fleksorne tetive. Pri športnih konji pride najpogosteje do ruptur površinske upogibalke, pri delovnih konjih pa do poškodbe globinske upogibalke. Tendinitis je pogosto posledica intenzivnih treningov in prevelikega raztezanja tetive. Do ruptur tetiv prihaja, ko so sile raztezanja večje do elastičnosti same tetive. Tendinitis je običajno aseptični proces, ko pa po poškodbi tetive pride do vdora mikroorganizmov, se lahko tendinitis pokaže tudi kot gnojni karakter.

V prvi študiji uporabe BM-MSC pri terapiji tendonitisa površinske upogibalke (Pacini et.al, 2007), v kateri so primerjali 11 konj, ki so jih zdravili z BM-MSC in 15 kontrolnih konj, ki so jih zdravili po tradicionalnih metodah. Pri obeh skupinah so uporabljali enak protokol rehabilitacije. V tekmovališče se je v 9 do 12 mesecih vrnilo 82 odstotkov konj, zdravljenih z BM-MSC, prav tako pa so ti konji ostali brez ponovnih poškodb še nadaljnji dve leti.

### **2.6.2. Osteoarthritis**

Osteoarthritis je progresivna, degenerativna bolezen, za katero je značilna razgradnja sklepnega hrustanca, subhondralne kosti in sinuvijalne spremembe. Gre za mišično skeletno obolenje, ki je raznoliko in večkrat vzročno povezano in prizadene predvsem sinuvijalne sklepe. Etiologijo predstavljajo mehanski, genetski, metabolni, travmatski in biološki dejavniki, ki porušijo normalno ravnovesje razgradnje in sinteze sklepnega hrustanca in subhondralne kosti, poruši se razmerje sinteze in razgradnje ekstracelularnega matriksa, ki ga sintetizirajo hondrociti. Osteoarthritis je najpogostejša oblika artritisa, prizadet je predvsem hrustanec. Pri osteoartritisu govorimo o razgrajevanju hrustanca iz različnih vzrokov. Osteoarthritis je bolezen sklepov, ki jo spremljajo motena gibljivost, bolečina in vnetje.

### **2.6.3. Laminitis**

Laminitis je vnetje lamelnih struktur kopita, ki je posledica trenutne ishemije in koagulopatije, ki privedeta do sprememb v funkciji tkiva in degenerativnih procesov stika med roževino in lamelami kopita. Vzroki laminitisa so različni in najpogosteje je vzrok zanj interakcija različnih dejavnikov na enkrat. Dejavniki so razdeljeni v skupine, in sicer: alimentarni in endotoksemija, mehanski ter dejavniki povezani s cirkulacijo krvi in z organskimi obolenji.

## **2.7. Ostale alternativne terapije zdravljenja pri poškodbah lokomotorne aparata**

### **2.7.1. ESWT-terapija**

V primerjavi konj zdravljenih z ESWT-terapijo in konj zdravljenih z matičnimi celicami so rezultati pri konjih terapiranih z matičnimi celicami precej boljši. 95 odstotkov konj se po zdravljenju vrne nazaj v trening, le 13 odstotkov teh pa se ponovno poškoduje. Le 20 do 25 odstotkov konj pa se v trening vrne po zdravljenju z drugimi vrstami terapij, na primer z ESWT-terapijo.

Terapija ESWT ( angl. Extracorporeal shock wave therapy, nem.Stosswellen ) ali zunajtelesna terapija s šokovnimi valovi. Ta vrsta terapije se uporablja za zdravljenje določenih ortopedskih bolezni. ESWT-terapija je bila prvič uporabljena pred dvajsetimi leti v humani medicini za razbijanje ledvičnih kamnov. V devetdesetih letih pa se je tovrstna terapija razširila na področje humane ortopedije za zdravljenje kalcifikacije ramenskega sklepa in

pete. To je omogočilo tudi nedaven vstop na področje ortopedije konjev. Z izvajanjem te vrste terapije so pri konjih v Veterinarski bolnici Slovenska Bistrica odločili leta 2008.

Poznani sta klasična ESW-terapija in terapija, ki se izvaja z nefokusiranimi tlačnimi valovi. V zadnjih letih sta bili obe vrsti terapije testirani pri konjih. Klasična oblika terapije se izvaja s prenašanjem zvočnega valovanja preko nameščenega aplikatorja na pacienta na točno določeno ciljno mesto pod ultrazvočno kontrolo. Žarišče je lahko do globine 5 cm v tkivu in širine 2,4 do 25 mm. Jakost energije je lahko do 1,49 mJ/mm, ki doseže področja, v katerih je tlak 800 barov in traja le del sekunde. Kinetična energija pri drugi obliki terapije pa se prenaša preko pacientove kože direktno na ciljno mesto kot elastičen sunek kot pečat. Tlačni valovi se razširijo žarkasto v notranjost tkiva, kar pomeni, da ne potrebujemo optične kontrolne naprave. Pri uporabi balistično tlačnih valov se proizvedena energija prenaša v tkivo z aplikatorjem preko kontaktnega mesta. Valovi pri tej vrsti terapije mehansko poškodujejo celično membrano, kar prepreči nociceptorjem produkcijo bolečinskih signalov. Spremenjeno kemično okolje v celici zvišuje nastanek »pain inhibiting« substanc. To omogoča zdravljenje večjega ciljnega področja naenkrat. Oba tipa ESW-terapije povečata cirkulacijo krvi v tkivu. To poveča vsebnost kisika v krvi, hkrati pa zmanjša nivo ogljikovega dioksida v tkivu, kar je pomemben dejavnik pri vseh vrstah poškodb tetiv. Tovrstna terapija dokazano zvišuje metabolične aktivnosti na področjih, ki so slabše prekrvavljena. Skozi ta proces se oblikujejo nova vlakna, ki se poravnajo. Izboljšana krvna cirkulacija in poravnavanje vlaken pomagata preprečiti zlepljanje tetivnih vlaken. Kalcificirane tetive pa na ta način postanejo bolj elastične. Visoka energija omogoči poškodovanemu tkivu razpad, medtem ko nizka energija privede do regeneracije tkiva s stimulacijo delitve celic. Mesta, ki so pokazala izjemno dober odziv na ESWT-terapije so povezave tetiv s kostmi. V tem področju, v katerem je omejena periostalna reakcija, kasneje pride do močnejše povezave na stiku med kostjo in tetivo. Odlične rezultate na splošno dosežemo pri zdravljenju obolelih tetiv v področju biclja, na katerem tetive izhajajo iz povezave s sezamoidnimi kostmi. ESWT-terapija ima pozitiven vpliv na sanacijske procese motenj prizadete površinske in globinske tetive upogibalke ali suspenzorne vezi globoke tetive upogibalke. Osteoporozne spremembe na sezamoidnih kosteh, določene razširjene motnje v področju zakopitnice se dobro odzivajo na ESWT-terapijo. Odvisno od obolenja se zdravi enkrat do trikrat v dvotedenskih intervalih. Pri vsakem zdravljenju se aplicira povprečno 2000 udarcev na ciljno področje z določeno izbrano vrednostjo energije. Osnovni pogoj za uspešnost terapije zahteva natančno diagnozo pred začetkom terapije, prav tako pa tudi pri nadaljevanju zdravljenja.

### **2.7.2. PRP terapija**

Takojšnji rezultati po kirurški obravnavi mišično-skeletni obolenj so sicer dobri, vendar so dolgoročni rezultati pogosto manj uspešni. V zadnjem času se tako v medicinski kot tudi v veterinarski praksi vedno bolj usmerja k izkoriščanju naravne zmožnosti telesa za samostojno celjenje telesa in izboljšanje procesov celjenja. Ena od uspešnih metod, ki omogoča izboljšanje pogojev za celjenje, je s trombociti obogatena plazma v angleščini imenovana platelet rich plasma ali PRP. Ta metoda je učinkovita tako v primerih, v katerih kirurško zdravljenje ni možno kot tudi vzporedno s kirurškim zdravljenjem za stimulacijo in izboljšanje celjenja.

S trombociti obogatena plazma je tekočina z veliko koncentracijo trombocitov, ki vsebujejo proteine rastnih faktorjev. Trombociti izhajajo iz citoplazme megakariocitov, z eksocitozo aktivno sproščajo rastne faktorje in s tem sprožajo celjenja rane. Poleg trombocitov pa je v plazmi obogateni s trombociti pomembna tudi sama plazma, v njej se nahajajo proteini, albumini, imunoglobulini, faktorji komplementa in strjevanja krvi.

Pacient pri vsakem zdravljenju prejme PRP iz lastne krvi. Pri odvzemu krvi za to vrsto terapije se konja sedira, pripraviti je potrebno centrifugo, 6 epruvel, razkužilo, alkoholne tampone ter brivnik. Mesto odvzema je potrebno najprej obriti in nato še razkužiti. Konju se kri odvzame iz vene jugularis po odvzemu pa se razporedi v 6 epruvel. Kri je potrebno centrifugirati, s tem se pridobijo tri frakcije; prva frakcija je frakcija rdečih krvničk, druga je krvna plazma in tretja, frakcija trombocitno bogate plazme, ki se kasneje aplicira na mesto poškodbe. Koncentracija trombocitov, prisotnih v s trombociti obogateni plazmi, lahko varira nujno pa je, da je vsaj osemkrat večja od koncentracije trombocitov v krvnem obroku.

### **3. MATERIALI IN METODE DE LA**

#### **3.1. Metodologija**

Pri svojem raziskovalnem delu sva uporabila metodo opazovanja, delo v laboratoriju, opravila sekcijo in delo na terenu.

#### **3.2. Metoda opazovanja**

Želela sva se seznaniti, kaj so matične celice in kako se uporabljajo v veterinarski medicini. Z mentorico smo se 4. 12. 2013 udeležili predavanja *Matične celice v klinični veterinarski praksi*, ki ga je organiziralo podjetje Animacel d.o.o., in je potekalo v prostorih Veterinarske bolnice Slovenska Bistrica. Izčrpnemu in zanimivemu predavanju je sledil praktični prikaz odvzema maščobnega tkiva pri konju z namenom vzgojitve in kasnejšega injiciranja matičnih celic. Predavali so doc. dr. Miomir Knežević, univ. dipl. biol., prof. dr. Bojan Zorko, dr. vet. med., prof. dr. Gregor Majdič, dr. vet. med., dr. Katarina Čeh, dr. vet. med. ter Milan Hren, dr. vet. med, ki so nama posredovali številne koristne in poučne informacije ter znanja o matičnih celicah in njihovi terapiji. Poučili pa so naju tudi o praktičnih vidikih rokovanja s pripravljenimi matičnimi celicami za injiciranje in pripravi vzorca maščobnega tkiva za transport do laboratorija. Predavanje nama je omogočilo odgovore na številna najina vprašanja, vendar pa sva končno morala soočiti tudi s tem, da bova morala nadgraditi znanje iz anatomije, da bova lahko povsem razumela, katere so tipične poškodbe športnih konjev in kaj določena travma razkriva ter mesta, na katerih je potrebno odvzeti vzorce za pripravo matičnih celic in mesta aplikacije oziroma injiciranja pripravljenih matičnih celic.

#### **3.3. Laboratorijsko delo in sekcija**

##### **3.3.1. Šolski laboratorij**

Za popolno razumevanje delovanja in klinične uporabnosti matičnih celic za terapijo obolenj skeletno mišičnega sistema je potrebno dobro poznavanje in razumevanje anatomije in fiziologije gibal. Osnove anatomije in fiziologije gibalnega aparata sva si pridobila s pregledom anatomskih atlasov in literature s področja anatomije konj. Tako pridobljeno znanje o mišičnoskeletnem sistemu sva dopolnila s pomočjo praktičnega spoznavanja anatomskih struktur konjskih okončin. Pri tem so nama pomagali profesorji anatomije, ki so naju vodili in naju seznanili z znanjem o vseh strukturah, ki sva jih želela spoznati. Z

namenom poznavanja anatomske strukture konjskih okončin sva secirala prednjo konjsko nogo distalno od metakarpalnega sklepa. Zaščitna sredstva, ki sva jih uporabljala, so pomembna, saj s tem zmanjšamo potencialno možnost prenosa okužbe iz kadavra nase. Uporabila sva zaščitno kapo, masko, rokavice in plašč. Pripravila sva si delovno površino in dva kirurška seta. Na mizo sva postavila pladenj, ob njega pa razvrstila škarje, držalo in rezilo za skalpel, različne pincete in različne peane. Ko je bilo vse pripravljeno, sva se lotila dela. Najprej sva nogo položila na pladenj in s pomočjo skalpela odstranila kožo s celotne površine.



**Slika 3: Sprednja konjska okončina med odstranjevanjem kože (vir: lastna fotografija, 2014)**

Po odstranitvi kože, sva si najprej ogledala vidne površinske strukture, največ časa pa sva posvetila ogledovanju površinske in globinske upogibalke.



**Slika 4: Površinske strukture po odstranitvi kože (vir: lastna fotografija 2013)**

Nadaljnje delo je potekalo tako, da sva opravila preparacijo posameznih mišic, vezi in kit, zanimala naju pa je predvsem površinska upogibalka. Celotni proces sva tudi skrbno fotografirala. Prav te številne fotografije pa so nama pomagale pri nadaljnjem razumevanju klinične slike primera, ki sva ga opazovala. Ko sva si dodobra ogledala vse anatomske strukture, sva se odločila, da bova kosti skuhalo in s tem povzročila mehčanje in odstopanje mišičnega tkiva in hrustanca, ki je še ostal na njih.



**Slika 5: Kuhanje kosti (vir: lastna fotografija 2014)**

Nato sva s kosti mehansko odstranila manjše dele, ki po kuhanju niso sami odstopili. Kosti sva ponovno skuhalo v vodi z dodanim natrijevim hidroksidom (NaOH), ko pa so se osušile, sva jih premazala z vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in jim s tem pridobila belino ter podaljšala odpornost in trajnost.

### **3.3.2. Veterinarska fakulteta, Univerze v Ljubljani**

Zanimala pa naju je anatomska zgradba celotne prednje okončine, zato smo z mentorico obiskali Veterinarsko fakulteto v Ljubljani, Nacionalni veterinarski inštitut in Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, kjer nas je sprejel mag. Tomislav Paller, dr.vet.med. in naju najprej seznanil s pravili dela na oddelku, to je z zahtevami po ustrezni higieni in varnosti zaposlenih in vseh, ki prihajajo na praktične vaje. Najprej smo se preoblekli v čista delavna oblačila in se predstavili iz čistega dela v nečisti del: obuli smo si škornje, nato pa smo se odpravili proti secirnici, kjer smo si pred vstopom vanjo v dezbarieri razkužili škornje in si nataknili rokavice, masko in kapo. V secirnici smo imeli že pripravljeno



prednjo okončino konja in secirne instrumente, ki smo jih potrebovali za delo. Sekcijo smo opravili na sprednji levi konjski nogi. Tokrat smo imeli možnost, da smo si lahko ogledali anatomsko zgradbo noge distalno od nadlahtnice. Tako kot v šoli smo najprej odstranili kožo, to smo opravili s pomočjo škarij in skalpela. Nato smo odstranili fascijo in si pod njo podrobno ogledali mišice in vezi.



**Slika 6: Prednja konjska noga po odstranitvi kože (vir: lastna fotografija, 2014)**

Največ časa sva posvetila podrobnemu ogledu površinske upogibalke. Ker sva tokrat imela možnost anatomskega post mortem pregleda noge že od humerusa navzdol, sva si lahko ogledala tudi mesto, na katerem se površinska upogibalka pripenja na mišico. Vsekakor sva pri tem usvojila veliko znanja, ki nama je pomagalo pri razumevanju zdravljenja z matičnimi celicami.



**Slika 7: Prednja okončina konja distalno od komolčnega sklepa (vir: lastna fotografija, 2014)**

Profesorji veterinarske fakultete so nama pokazali tudi izpreparirana modela prednje noge konja, ki ga hranijo v formalinu, tako sva si lahko natančneje ogledala strukturiranost karpalnega in bicljevaga sklepa.



**Slika 8: Sprepariran model prednje konjske noge (vir: lastna fotografija, 2014)**

### **3.4. Terensko delo in laboratorijsko delo**

#### **3.4.1. Laboratorij podjetja Animacel d.o.o.**

V sklopu terenskega dela sva obiskala tudi podjetje Animacel d.o.o., v katerem sva se tudi podrobneje seznanila z laboratorijskim delom pridobivanja in shranjevanja vzorcev matičnih celic. V podjetju sta naju sprejela dr. Katarina Čeh, dr. vet. med. in Luka Mohorič, ki sta naju obogatila s številnimi novimi informacijami o matičnih celicah. Podrobneje sta naju seznanila s postopkom pravilnega odvzema, transporta in hrambe matičnih celic. Zvedela sva, kakšen je postopek kulturizacije matičnih celic v njihovem laboratoriju, to je od odvzema maščobnega tkiva do aplikacije matičnih celic na mesto poškodbe, in se seznanila s postopki shranjevanja matičnih celic. Razkazali so nama laboratorij, aparature in prostore, v katerih se shranjujejo matične celice. Ob prihodu v laboratorij sva si najprej nadela kirurško masko, rokavice in kapo, nato pa so nama pokazali, kako videti gojišče, na katerem kulturizirajo matične celice. Gojišče morajo na dva do tri dni zamenjati, saj celice izločajo odpadne produkte, prav tako pa jim morajo z gojiščem zagotavljati hrano. Celične kulture inkubirajo pri 37 °C. Kulture matičnih celic sva pogledala tudi pod mikroskopom, kar nama je pomagalo, da sva si lažje predstavljala, kako matične celice videti. Postopek kulturiranja se začne tako, da iz odvzetega

maščobnega tkiva v laboratoriju osamijo matične celice, ki jih je potrebno namnožiti. Ta postopek običajno traja do sedem do dvanajst dni. Matične celice, ki jih pridobivajo iz maščobnega tkiva, se lepijo na plastično podlago. Z encimi jih odcepijo od podlage in nasadijo na primerno gojišče za celične kulture, na katerem se nato začnejo matične celice asimetrično deliti, kar pomeni, da se ena razvije v matično celico, druga pa v željeno tkivo. Pri pridobivanju matičnih celic iz maščobnega tkiva se na plastično podlago lepijo tudi fibroblasti, vendar se ti za razliko od matičnih celic ne diferencirajo v druga tkiva. Celice ločimo glede na prisotnost določenih proteinov na celični membrani, te proteine pa raziskujemo in določamo s pomočjo protiteles, ki se vežejo na te iskane proteine.

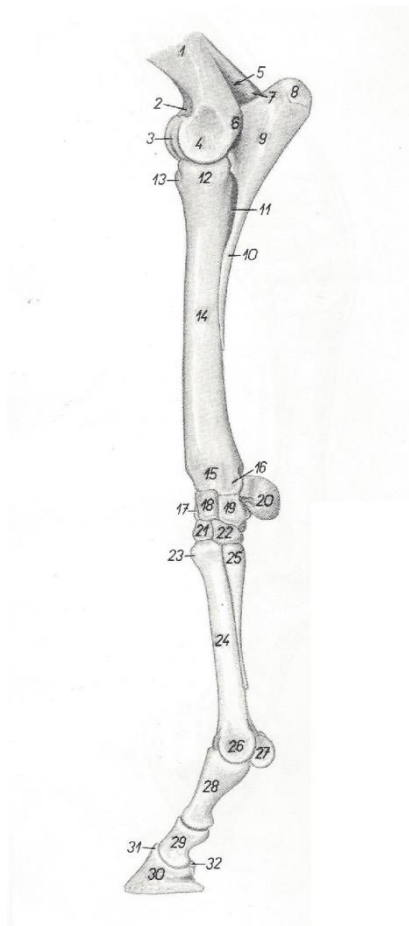
### **3.4.2. Veterinarska bolnica Slovenska Bistrica (klinika za konje)**

Med raziskovanjem se nama je ponudila priložnost, da spremljava dva klinična primera zdravljenja z matičnimi celicami, ki ju je vodil veterinar Milan Hren, dr. vet. med. v Veterinarski bolnici Slovenska Bistrica. Prvi je bil primer osteoartritisa, drugi pa primer tendinitisa.

Za lažje razumevanje poteka kliničnih primerov bova opisala anatomsko zgradbo sprednje noge pri konju in diagnostiko šepanja konj.

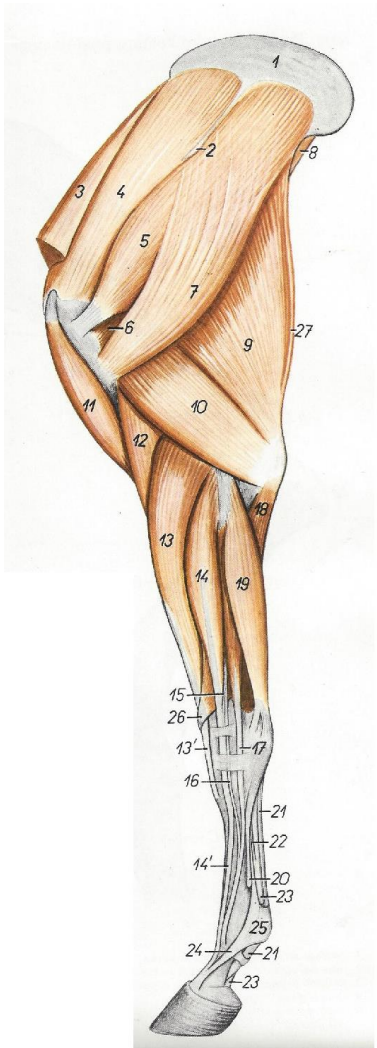
#### *➤ Anatomsko zgradbo sprednje noge konja*

- Kost prednje noge distalno od nadlahtnice (oss humeri) sestavljajo komolčnica (oss ulnae), koželjnica (oss radii), zapestni sklep (a. carpus), 3. dlančnica ali piščalnica (ossis metacarpalis III), 4. dlančnica ali zapiščalnica (ossis metacarpalis IV), 2. dlančnica ali zapiščalnica (ossis metacarpalis II), stranska zgornja kitna kost (oss sesamoideum proximale), sredinska zgornja kitna kost (oss sesamoideum proximale), zgornja prstnica ali biceljnica (phalanx proximalis), srednja prstnica ali venčnica (phalanx media), spodnja kitna kost ali zakopitnica (oss sesamoideum distale), spodnja prstnica ali kopitnica (phalanx distalis). Za razumevanje prvega kliničnega primera sva poglobila znanje o anatomski zgradbi biceljevega sklepa.



**Slika 9: Kosti prednje konjske okončine (vir: P. Popesko, Anatomski atlas domačih živalinj III)**

- Za drugi klinični primer pa sva podrobno preučila kito površinske upogibalke prstov (*musculus flexor digitorum superficialis*), pri konju izvira iz sredinskega nadčvrša nadlahtnice. V kito preide nad zapestjem: kita poteka medialno od zapestnice po upogibni strani zapestnega sklepa in nato po palmarni strani bicljevega sklepa, kjer se razcepi v dve veji in pritrdi na venčnico.



**Slika 10: Mišice in kite prednje konjske noge (vir: P. Popesko, Anatomski atlas domačih živalinj III)**

➤ *Diagnostične metode, ki jih uporabljamo pri diagnosticiranju šepanja*

Pri diagnostiki šepanja se uporabljajo osnovne in specialistične pregledovalne metode. Vzrok za šepanje je poleg kliničnega pregleda mogoče diagnosticirati z rentgenskim in ultrazvočnim slikanjem ter s prevodno anestezijo (provokativni test).

- RTG

Rentgensko slikanje temelji na načelu uporabe *rentgenskih žarkov*, ki prehajajo različno intenzivno skozi tkiva. Tisti žarki, ki prodrejo skozi tkivo, zadenejo film in ga počrnijo. Pojem sevanje pomeni emisijo in gibanje energije skozi prostor in materijo. Skozi prostor se lahko energija giblje v obliki elektromagnetnega valovanja in sevanja delcev. V času diagnostičnega

postopka je obvezna zaščita osebja. Obvezno je imeti zaščitni svinčeni ovratnik, plašč, rokavice, priporoča pa se tudi uporaba zaščitnih očal. Lastnik živali lahko rentgensko slikanje svoje živali odkloni, kar moramo upoštevati. Žival mora biti med posegom ustrezno fiksirana. Če je žival nemirna, jo sediramo.

- **ULTRAZVOK**

Ultrazvočno slikanje pravilno imenujemo ehografija. Temelji pa na uporabi zvoka z nam neslišno visoko frekvenco, ki je zdravju neškodljiva. Z ultrazvočno sondo pošiljamo zvok (valovanje) na del telesa, ki ga pregledujemo, posebni prejemnik pa zazna odmev v obliki slike, ki jo imenujemo ehogram. Valovanje se v telo prenese s posebno sondo, ki jo namažemo z gelom in položimo neposredno na kožo. Konja je potrebno med ehografijo ustrezno fiksirati in mesto pregleda obriti.

- **PREVODNA ANESTEZIJA NA SPREDNJI NOGI KONJA**

Prevodna anestezija je lokalna anestezija z vbrizganjem lokalnega anestetika okrog večjih aferentnih živcev. Če vbrizgavamo anestetik paranevralno, potem za določen čas blokiramo prevodnost določenega živca. Pred aplikacijo mora biti vbodno mesto obrito in razkuženo, prav tako mora biti anestetik steril in ogret na telesno temperaturo. Aplikacija mora pred vbrizgavanjem anestetika potekati pod strogimi aseptičnimi pogoji. Paziti moramo, da pomotoma ne apliciramo anestetika v žile, ki običajno potekajo tik ob živcih. Temu se izognemo tako, da pred tem, ko bomo aplicirali anestetik, z batom brizge rahlo aspiriramo mesto aplikacije.





Slika 11: Prevodna anesteziija (vir: lastna fotografija, 2014)

- Blokada nervusa medianusa je indicirana za posege na palmarnih delih kopita, podplatu in kopitnici. Nervus medianus je največji živec, ki izhaja iz pleksusa brahialisa skupaj z ulnarnim živcem. Poteka po medialni strani preko komolčnega in karpalnega sklepa. Iz nervusa medianusa izhajajo živčne veje, ki oživčujejo periost karpusa in upogibalke. Najprimernejši mesti za blokado sta na medialni strani tik pod komolčnim sklepom in na sredini podlakti, kjer ga najdemo za dlan nad kostanjem. Anestetik lahko apliciramo na obremenjeni nogi ali z naslonjeno nogo na leseni kozi.
- Blokada nervusa ulnarisa, ki prav tako prihaja iz brahialnega živčnega pleteža. Mesto za aplikacijo je na lateropalmarni strani podlakti, to je za dlan visoko nad karpalnim sklepom.



- Blokada n. musculocutanea je indicirana, če želimo anestezirati medialno stran bicljevega sklepa. Mesto za aplikacijo najdemo za dlan visoko nad kostanjem na dorzomedialni strani podlakti.
- Blokada n. palmarisa:

Visoko ali proksimalno prevodno anestezijo opravimo pred bolečimi posegi v palmarnem področju noge ali pa v diagnostične namene. Med apliciranjem anestetika je noga dvignjena, nemirnim živalim pa namestimo nosno zadrgo. Vbodno mesto za aplikacijo anestetika je za štiri prste distalno od karpusa. Lateralna veja tega živca poteka ob lateralnem robu globinske upogibalke, medialna pa ob medialnem robu iste globinske upogibalke. Anestetik apliciramo subfascialno in ker v podkožju na tem področju potekajo še kožne veje živcev, apliciramo anestetik še subkutano.

S srednjo prevodno anestezijo blokiramo živce v iste namene, s tem da je po tej prevodni anesteziji omrtvičeno le področje distalno od bicljevega sklepa. Anestetik apliciramo, ko je noga dvignjena in žival ustrezno fiksirana. Mesto za aplikacijo je neposredno nad bicljevimi sklepom. Medialni in lateralni živec se na nogi dobro otipata. Za aplikacijo anestetika je potrebno napraviti kožno gubo paralelno z živcem, v katere apliciramo.

Namen nizke prevodne anestezije n. digitalisa palmarisa je blokada teh živcev. S tem pa onemogočimo bolečino v fleksornem področju – v diagnostične namene – distalno od mesta aplikacije anestetika. Ta živec najdemo na področju biceljnice ob lateralnem in medialnem robu upogibalk. Med aplikacijo mora biti noga dvignjen: pred vbodom igle z eno oko napnemo kožo distalno od predvidenega mesta vboda in nato apliciramo anestetik v podkožje. Običajno z nizko prevodno anestezijo blokiramo tako lateralno kot medialno živčno vejo.

➤ *Odvzem vzorca maščobnega tkiva za kulturizacijo matičnih celic*



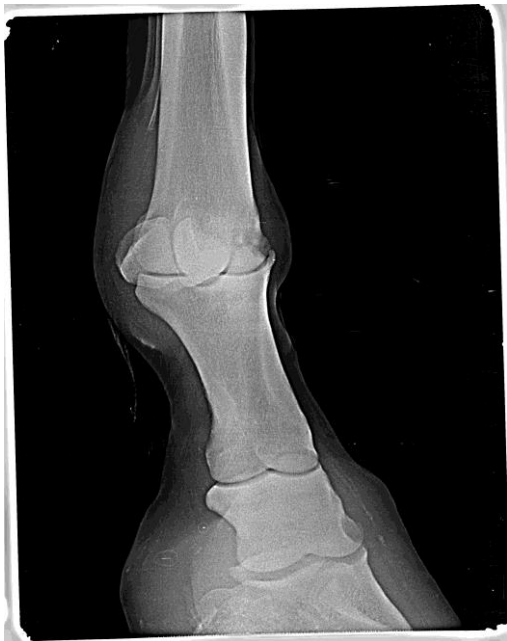
**Slika 12: Obrito in razkuženo mesto odvzema maščobnega tkiva pri konju (vir: lastna fotografija, 2013)**

Pred pričetkom priprave konja na odvzem vzorca se morajo veterinar, ki poseg opravlja, in vsi prisotni ustrezno zaščititi: s tem pa se zmanjša možnost okužbe vzorca med odvzemom. Zaščitna sredstva so: kirurški plašč, kapa, maska in kirurške rokavice. Konja je potrebno pred odvzemom ustrezno pripraviti, in sicer se konja pravilno sedira z ustreznimi pomirjevalnimi sredstvi, uporablja se intravenozna aplikacija sedativa. Ko je konj sediran, mora biti fiksiran v stoječem položaju. Mesto odvzema je potrebno najprej pobriti in razkužiti. Pri odvzemu je najbolj pomembno, da se držimo načel asepse, saj bi morali kontaminirani vzorec v laboratoriju zavreči in ponoviti postopek odvzema. Na obrito in razkuženo mesto položimo kirurško kompreso, ki jo pritrdimo s hrošči, da dobimo primerno veliko kirurško polje za odvzem vzorca. Veterinar pri odvzemu potrebuje držalo za skalpel in rezilo, dvojne škarije, dve pinceti in resorbtivni šivalni material. Vsi kirurški pripomočki morajo biti

sterilni. Veterinar najprej s skalpelom naredi rez na bazi repa, nato pa rano poveča s škarpami, pri njenem odpiranju pa si pomaga s pinceto. Že uporabljeno pinceto in škarje nato zamenja z drugimi, sterilnimi škarpami in pinceto ter s tem dodatno zmanjša možnost kontaminacije odvzetega vzorca. S sterilnimi škarpami in pinceto veterinar odreže primerno velik košček maščobe in ga shrani v sterilno posodico. Pri odvzemu in shranjevanju odvzetega vzorca je nujno potrebna sterilnost tako osebjā kot tudi vseh pripomočkov, ki jih uporabljamo pri posegu.

### **PRVI KLINIČNI PRIMER: OSTEOARTRITIS**

Kot prvi obravnavan klinični primer sva imela dresurnega konja z imenom Belko, ki je bil ob poškodbi star 18 let. Konja so kupili v tujini, imel pa je z opravljen veterinarski pregled. Po trimesečnih treningih je začel šepati s sprednjo desno nogo. Pri kliničnem pregledu je bilo opaziti šepanje 2/5 stopnje na sprednjo desno nogo. Provokativni test je bil čezmerno pozitiven. Klinično je opaziti večjo napolnjenost bicljevlega sklepa na sprednji desni nogi, če bi jo primerjali z levo.



**Slika 13: Rtg pred aplikacijo matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2013)**

#### Terapija:

Veterinar mu je intraartikularno apliciral 50 mg Na - hyaluronata in 5 mg Triamcinolona. Pri aplikaciji je potrebno paziti, da upoštevamo načela asepsa. Mesto

aplikacije je bilo potrebno najprej mehansko očistiti, obriti in razkužiti. Za razkuževanje pa je bilo moč uporabiti klorheksidin, jodovo raztopino (betadin) in alkohol.

Pri naslednjem kontrolnem pregledu čez štirinajst dni je konj še vedno šepal 1/5 stopnjo na sprednjo desno nogo. Ponovno mu je bil intraartikularno apliciran Na – hyaluronat in odvzet vzorec maščobe za vzgojitev matičnih celic (AT-MSC).

Pri ponovnem kontrolnem pregledu, po štirinajstih dneh, je veterinar še vedno diagnosticiral šepanje 1/5 stopnje na sprednjo desno nogo. Konju je ponovno apliciral matične celice (AT-MSC) intraartikularno v bicljev sklep sprednje desne noge.



**Slika 14: Aplikacija matičnih celic v sklep (vir: lastna fotografija, 2013)**

Čez štiri mesece, po aplikaciji matičnih celic, je veterinar opravil kontrolni pregled, pri katerem je ugotovil, da pri gibanju v ravnini in v kasu ni več opaziti šepanja. Ponovno se je opravil provokativni test, ki je bil negativen.

Po šestih mesecih konj ponovno deloval brez omejitev.

## DRUGI KLINIČNI PRIMER: TENDINITIS

Drugi klinični primer, ki sva ga obravnavala je bil parkuraški konj Dren, star 15 let. Po tekmi je začel šepati.

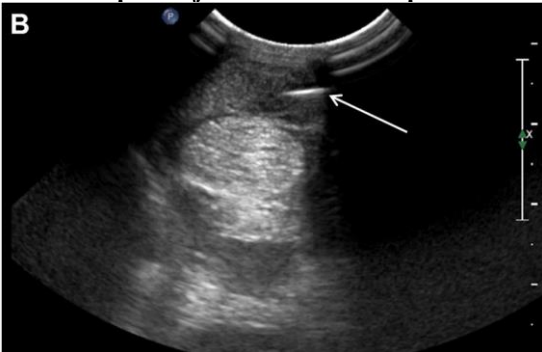
Veterinar pri kliničnem pregledu ugotovi, da ima konj zatečeno površinsko upogibalko na sprednji levi nogi.

Terapija:

Veterinar mu je pod strogimi načeli asepsse intraartikularno apliciral matične celice (AT-MSC) na mesto poškodbe. Aplicira se približno 10 milijonov celice na 1cm<sup>3</sup> mesta poškodbe.

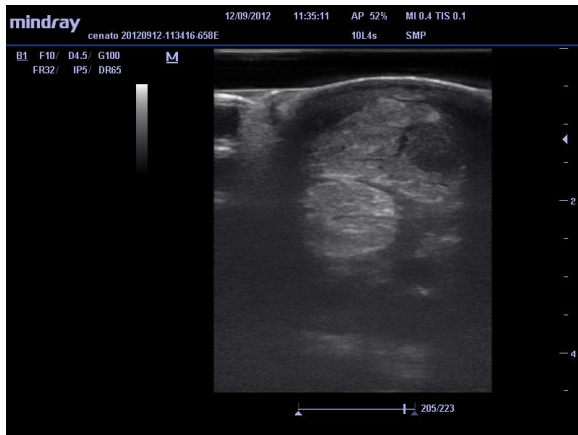


Slika 15: Aplikacija matičnih celic v površinsko upogibalko (vir: lastna fotografija 2013)



Slika 16: UZ prikaz aplikacije (vir: lastna fotografija, 2013)

Ob kontrolnem pregledu z ultrazvokom se je mesto poškodbe popolnoma zacelilo, konj ni več šepal.



Slika 17: UZ pred aplikacijo matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2013)



Slika 18: UZ po aplikaciji matičnih celic (vir: lastna fotografija, 2014)

### 3.5. Materiali in pripomočki

Pri svojem delu sva uporabljala pripomočke, ki sva jih že poznala, veliko pa je bilo takšnih, ki sva jih spoznala med raziskovalnim delom. Materiali, ki sva jih uporabljala: zaščitna sredstva, kirurški inštrumentarij (držala in rezila za skalpele, anatomske pincete, kirurške pincete, različni peani, različne škarje, sekcijski noži), različna gojišča za nasaditev matičnih celic, svetlobni in elektronski mikroskop, izolatorji, gaze, vatranci, brizge, igle, razkužilna sredstva.

#### 4. RAZPRAVA

Pisati raziskovalno nalogo in o katerem raziskovalnem področju jo pisati vsekakor ni bila težka odločitev. Od odločitve do realizacije je bila težka pot. Pisanje sva začela z izbiro točne teme. Raziskovalno nalogo z naslovom *Zdravljenje konj z matičnimi celicami v veterinarski ortopediji pri konjih*, sva si izbrala, ker je to tema v veterinarski medicini, ki je v tem času zelo aktualna.

Prvi korak pri raziskovanju je bil zbiranje informacij iz najrazličnejših virov, bilo pa jih je potrebno skrbno preučiti in izluščiti bistvo. Že tukaj sva se v raziskovanju srečala s prvo težavo. Virov je zelo malo, še manj pa je tistih zanesljivih in strokovno podprtih, zato sva vse pridobljene vire kritično ocenila. Največ sva izvedela od strokovnjakov, ki se s tem področjem profesionalno ukvarjajo.

Ob začetku pisanja raziskovalne naloge sva si postavila štiri hipoteze, ki so naju pri raziskovanju usmerjale. Kljub temu pa so se nama porajala še številna druga vprašanja, na katera sva poskušala odgovoriti.

Svoje raziskovanje sva pričela z zbiranjem virov, ker pa je bilo le teh zelo malo, sva se 4.12.2013 udeležila predavanja *"Matične celice v klinični veterinarski praksi"*, v prostorih Veterinarske bolnice Slovenska Bistrica. Vse znanje, ki sva ga pridobila sva uporabila pri pisanju teoretičnega dela naloge.

Prišla sva do spoznanja, da je zdravljenje z matičnimi celicami oblika regenerativne medicine, ki je v veterinarski medicini pri konjih vedno bolj razširjena. Matične celice so nediferencirane celice, ki imajo izreden potencial za razvoj v katerekoli telesne celice. V času embrionalnega razvoja so matične celice odgovorne za nastanek vseh tkiv in organov, kasneje v post embrionalnem razvoju pa matične celice obnavljajo poškodovane celice. Poznamo embrionalne matične celice, IPS celice in odrasle matične celice.

Svojo prvo hipotezo sva potrdila, saj se matične celice lahko razvijejo v katerekoli telesne celice. Vsekakor pa sva spoznala tudi, da je matičnih celic pri mlajših osebkih več, s starostjo pa se število matičnih celic v telesu manjša. S tem razlogom veterinarji lastnike živali spodbujajo, da bi se odločili za odvzem vzorca tkiva pri mlajših živalih, iz tkiva bi se izdelale

matične celice ter se shranile v banki, tako bi bile te celice na voljo ob morebitnih kasnejših poškodbah ali boleznih njihove živali. Tako bi lahko v primeru poškodbe z zdravljenjem začeli takoj po nastanku le – te. Za pripravo shranjenih matičnih celic potrebuje podjetje Animacel d.o.o., 1-2 dni, kadar pa veterinar maščobno tkivo odvzame po poškodbi, je čas, ki je potreben za odvzem tkiva, osamitev in namnožitev matičnih celic daljši. Daljši čas, pa pomeni, da bo saniranje poškodbe dolgotrajnejše. Čas od diagnosticiranja poškodbe, do začetka zdravljenja z matičnimi celicami mora biti čim krajši, saj se pri celjenju oblikuje brazgotinasto tkivo. Matične celice pa imajo tudi sposobnost protivnetnega delovanja, imunski odziv pa matičnih celic ne zavrača.

Predavanju pa je sledil tudi praktični prikaz odvzema maščobnega tkiva za namnožitev matičnih celic. Primer nama je pomagal predvsem razumeti klinični potek odvzema, med odvzemom pa je veterinar Milan Hren, dr. vet. med. tudi opozarjal na najpogostejše napake, ki se lahko zgodijo in povzročijo kontaminacijo vzorca. Največji pomen pri odvzemanju maščobnega tkiva ima zagotavljanje načel asepse. Pred odvzemom se konja pripravi na poseg, kar pomeni da se kirurško mesto obrije in razkuži, nato se namesti kirurška kompresna. Ustrezno se za svoje delo zaščiti tudi veterinar. Odvzame se 1 – 2 koščka maščobe, saj se posodica za transport tkiva, ne sme večkrat odpirati.

Zanimalo naju je tudi, katere so najpogostejše poškodbe športnih in delovnih konj v Sloveniji. Ugotovila sva, da se najpogosteje pojavljajo laminitis, osteoartritis in tendinitis. V veterinarski medicini konj pa veterinarji z matičnimi celicami najpogosteje zdravijo tendinitise in osteoartritise.

Kasneje sva se odločila, da se bova podrobno seznanila z dvema kliničnima primeroma. Prvi je bil primer osteoartritisa, drugi pa primer tendinitisa. Za lažje razumevanje kliničnih primerov pa sva poglobila svoje znanje anatomije konj. Osredotočila sva se na kosti prednje okončine, predvsem bicljev sklep in na mišice ter kite sprednje okončine, predvsem na kito površinske upogibalke prstov. Znanje sva začela pridobivati s pomočjo anatomskih atlasov in ostalih knjig s področja anatomije. Za lažjo predstavo pa sva opravila dve sekciji prednje ekstremitete konja. Najprej sva secirala nogo distalno od metakarpalnega sklepa, nato pa še distalno od nadlahtnice.

Ali je zdravljenje z matičnimi celicami uspešnejše od drugih terapij za zdravljenje poškodb pri športnih konjih, je bila ena izmed najinih hipotez. To hipotezo sva s pomočjo preučevanja strokovnih veterinarskih člankov potrdila. Saj so vse raziskave kazale, da se je zdravljenje z



matičnimi celicami pokazalo kot najuspešnejša terapija zdravljenja mišično skeletnih obolenj pri konjih.

Vsekakor sva pri raziskovalnem delu prišla do mnogo novih spoznanj, ki nama bodo v veliko pomoč pri nadaljnjem izobraževanju. Skozi raziskovalno delo sva se soočala z mnogimi težavami, ki sva jih s trdim delom z lahkoto razrešila. Najino raziskovalno delo se bo kljub zaključeni raziskovalni nalogi, še nadaljevalo, saj je tema naloge zelo zanimiva in trenutno obstaja še veliko neodgovorjenih vprašanj.

## **5. ZAKLJUČEK**

### **5.1. Ugotovitve raziskave in vprašanja za nadaljnjo raziskovanje**

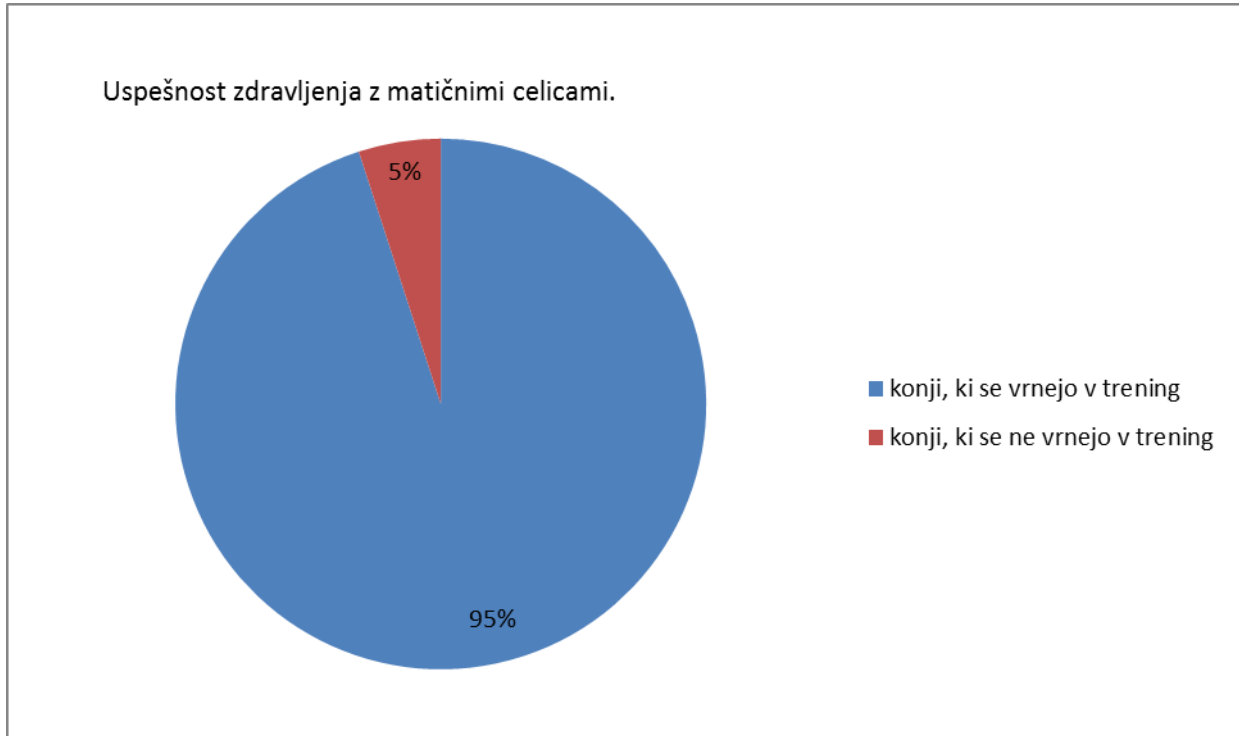
Mišično skeletni sistem je težje obnovljiv kot druga tkiva. V večini primerov na mestu poškodbe nastane tkivo, ki po morfologiji in funkciji ni enako prvotnemu. Pride do procesa reparacije, ne pa regeneracije, zato novo nastalo tkivo ni nikoli v enaki meri uporabno kot prvotno tkivo.

S trenutno razvitimi postopki za zdravljenje z matičnimi celicami, se v večini primerov dosega prognozično ugodni rezultati pri zdravljenju ortopedskih poškodb konjev. Uspeh zdravljenja je različen glede na vrsto obolenja, pri hujših kroničnih poškodbah seveda ne moremo pričakovati popolne obnove poškodovanega tkiva, vendar kljub temu s terapijo matičnih celic zmanjšamo ali odpravimo bolečine. Živali po zdravljenju z matičnimi celicami ne potrebujejo več protibolečinske terapije ali pa je ta zmanjšana na minimum, kar pomeni manj obiskov pri veterinarju, manjša je uporaba zdravil in večja je kakovost življenja živali.

Vsekakor pa se v regenerativni medicini konj veliko obeta. Nadaljnje raziskave morajo biti usmerjene v določitev optimalnega števila celic za posamezni klinični primer, prav tako način administracije, količina in razporeditev odmerkov. Posebni interes je ugotoviti interakcije med matičnimi celicami in biološkimi produkti (kot PRP) ter sposobnost teh produktov, da privlačijo matične celice na mesto poškodovanega tkiva.

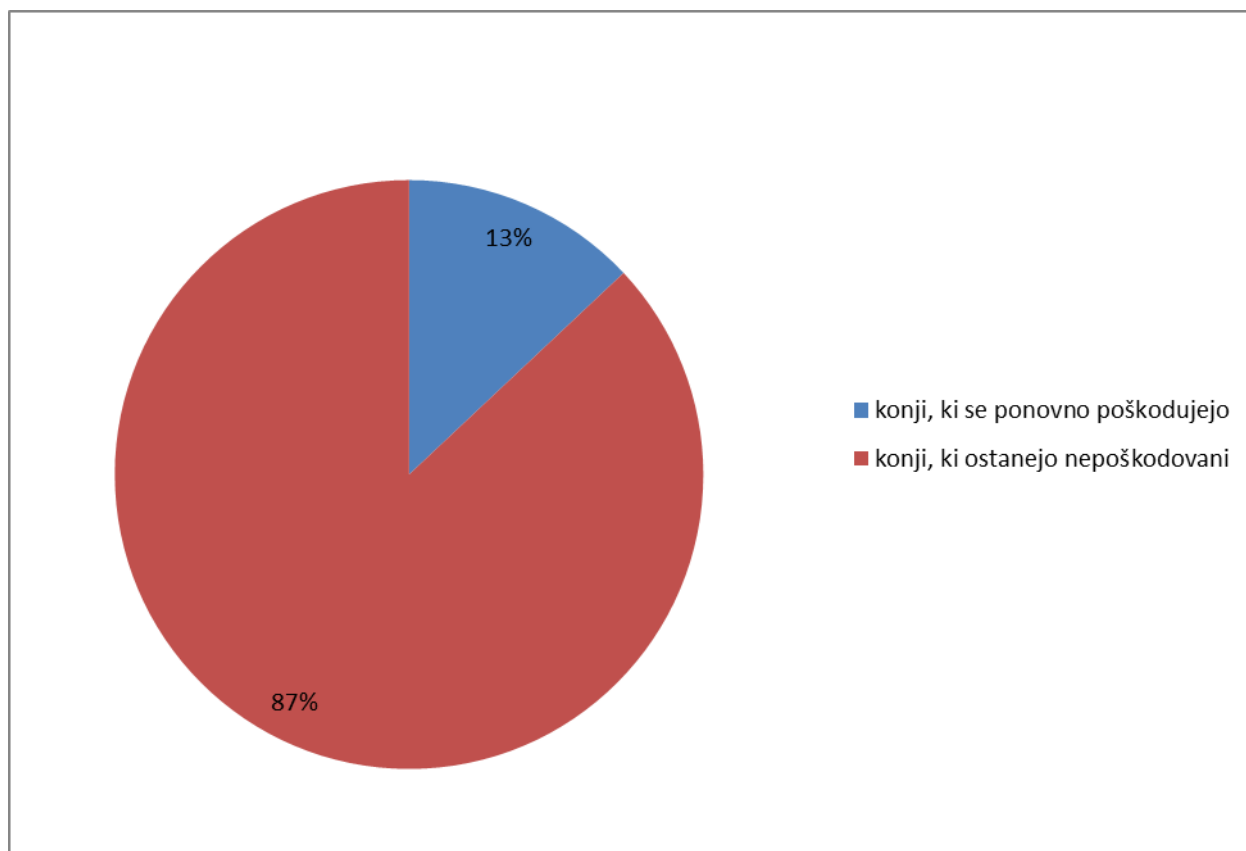
## 5.2. Statistika uspešnosti zdravljenja poškodb lokomotorne aparata pri konjih

Grafikon 1: »Uspešnost zdravljenja z matičnimi celicami«



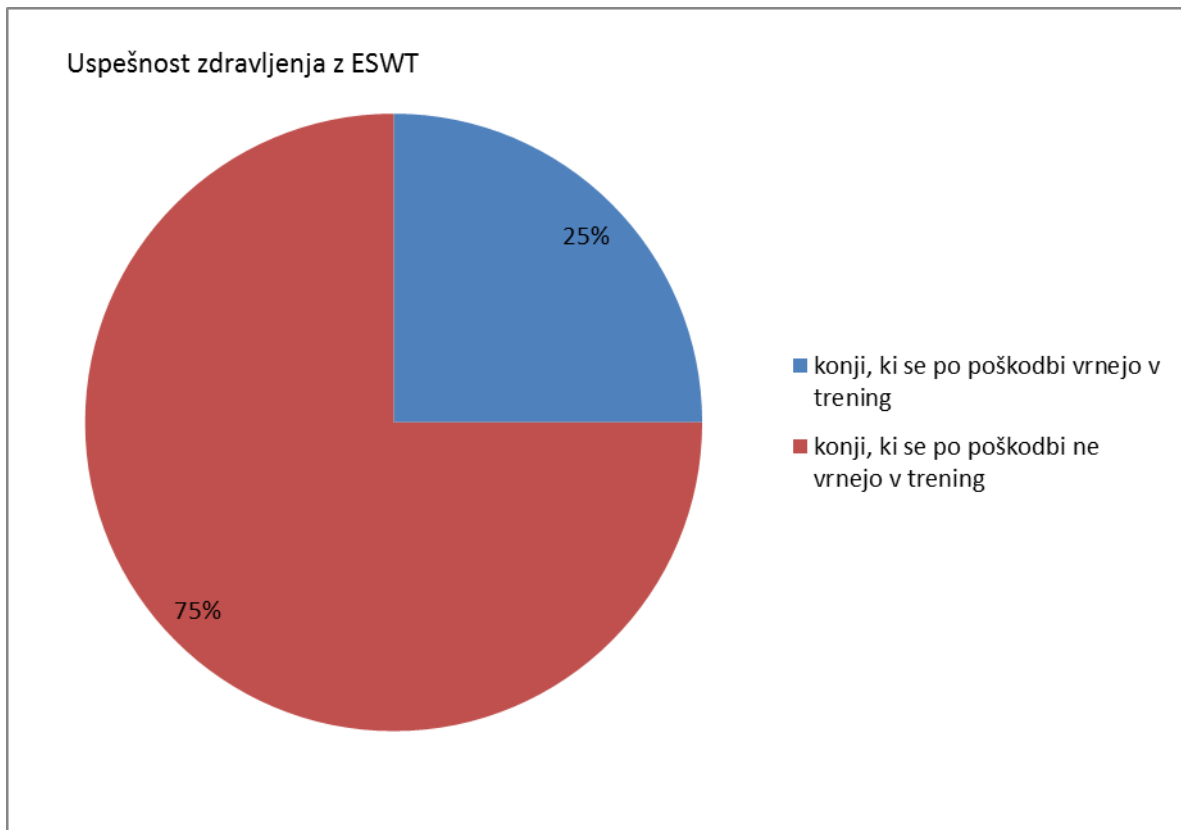
Rezultati kažejo, da se po zdravljenju poškodb z matičnimi celicami 95% športnih konj, vrne v proces treninga, 5% zdravljenjih konj pa se v proces treninga ne vrne več.

Grafikon 2: »Konji, ki se po zdravljenju z matičnimi celicami ponovno poškodujejo.«



Po podatkih veterinarjev se sedeminosemdeset odstotkov tekmovalnih konj , če jih zdravimo z matičnimi celicami ne poškoduje več na istem mestu poškodbe, trinajst odstotkov tekmovalnih konj, pa se kljub terapiji ponovno poškoduje.

Grafikon 4: »Uspešnost zdravljenja z metodo ESWT«



Podatki kažejo, da se petindvajset odstotkov tekmovalnih konj, ki jih zdravimo s terapijo ESWT, v proces treninga vrne, med tem, ko se jih petinsedemdeset odstotkov ne more več ukvarjati s tekmovalnim športom.

Po rezultatih zgornjih grafikonov lahko torej trdimo, da je vsekakor boljša izbira terapije poškodb zdravljenje z matičnimi celicami, saj rezultati zdravljenja kažejo tako boljše rehabilitacijo, možnost vrnitve konja v proces treninga, kot tudi manjšo pojavnost ponovnih poškodb in posledično razvoja take poškodbe v kronična obolenja.

## **6. SKLEP**

### **6.1. Zdravljenje z matičnimi celicami je uspešnejše od drugih terapij za zdravljenje poškodb pri športnih konjih.**

Vsekakor se je zdravljenje z matičnimi celicami izkazalo uspešnejše kot zdravljenje z tradicionalnimi metodami, kot je npr. kirurško zdravljenje. Pacini je opisal študijo, v kateri so v primerjavo vzeli 11 konj, ki so jih zdravili z matičnimi celicami, pridobljenimi iz kostnega mozga in 15 konj, ki so jih zdravili s tradicionalnimi metodami. Pri obeh skupinah so uporabljali enak protokol rehabilitacije. Rezultati zdravljenja so bili boljši pri konjih, zdravljenih z matičnimi celicami. V 9 – 12 mesecih se je v tekmovalno vrnilo 82 odstotkov konj, zdravljenih z matičnimi celicami. Vsi ti konji pa so tudi ostali brez poškodb še nadaljnji dve leti, vsekakor je to dober razlog, da se veterinarji vse pogosteje odločajo za terapijo z matičnimi celicami. Tudi veterinar Milan Hren, dr. vet. med. je pri zdravljenju z matičnimi celicami dosegel velik odstotek konjev, ki so se vrnilo v trening in ni prišlo do ponovne poškodbe na istem mestu. Od konjev zdravljenih z matičnimi celicami se jih 95 odstotkov vrne v trening, od teh pa se jih le 13 odstotkov ponovno poškoduje na istem mestu, kljub terapiji z matičnimi celicami. Pri zdravljenju z ESWT terapijo pa se v trening po poškodbi ponovno vrne samo od 20 do 25 odstotkov športnih konj.

### **6.2. Z matičnimi celicami moramo začeti zdraviti takoj po poškodbi.**

V različnih strokovnih člankih je opisano, da je potrebno pričeti z zdravljenjem poškodb gibal pri konjih takoj po poškodbi. Tako na primer v strokovnih člankih opisujejo, da je uporaba matičnih celic v zgodnji (akutni) fazi obolenja oziroma poškodbe učinkovitejša v primerjavi z zdravljenjem, ko se je že oblikovalo fibrozno brazgotinasto tkivo. Aplikacija matičnih celic pa tudi zavira imunski odgovor, kar pospeši celjenje poškodb.

### **6.3. Matične celice so se sposobne razviti v katerekoli telesne celice.**

Poznamo tri vrste matičnih celic: embrionalne matične celice, ki so totipotentne (lahko se diferencirajo v vsa telesna tkiva), IPS celice, ki so pluripotentne (se lahko razvijejo v večino telesnih tkiv), odrasle matične celice, ki so multipotentne (lahko se razvijejo v nekatera telesna tkiva). Embrionalne matične celice, se lahko diferencirajo v vsa tkiva, kar je glavni razlog, da se v svetu vse bolj teži k temu, da bi se lastniki živali odločali za shranjevanje matičnih celic pri mlajših živalih. Pomembno pa je tudi dejstvo, da se s staranjem živali število matičnih celic v telesu manjša.

#### **6.4. Število matičnih celic, ki jih apliciramo na mesto poškodbe vpliva na zdravljenje.**

Optimalno število matičnih celic, ki jih apliciramo na mesto poškodbe, je 10 milijonov na 1cm<sup>3</sup> poškodbe. Število matičnih celic, ki jih apliciramo, pa je odvisno od stopnje poškodbe. Pri lažjih poškodbah je število apliciranih matičnih celic manjše, pri obsežnejših poškodbah pa je potrebno aplicirati večje število matičnih celic.

## **7. DRUŽBENA ODGOVORNOST**

Pri raziskovalni nalogi sva spoznala, da se pri zdravljenju z matičnimi celicami upoštevajo tudi načela družbene odgovornosti, v smislu varovanja narave in odnosa ljudi do uporabe zdravil. Terapija z matičnimi celicami je namreč terapija s telesu lastnimi celicami in na ta način, se uporablja manj kemijskih terapevtikov in sintetičnih zdravil. Se pa vsekakor upošteva tudi etična načela, da se teh celic ne zlorablja v škodljive namene. Ljudi sva ozavestila z metodo in diagnostiko zdravljenja, ki je uspešna in vendarle ne invazivna, kjer naravno rezervo telesa, s postopkom gojitve celic izkoristimo pri zdravljenju.



## 8. LITERATURA

1. Peter Popesko, anatomski atlas domačih živali III , 1980, Ljubljana , Mladinska knjiga, TOZD Koprodukcija (126; 127, 145, 146,147,152)
2. Oskar Schaller, Illustrated veterinary anatomical nomenclature,2007- 2nd edition, Stuttgart, Enke
3. Thomas O. McCracken, Robert A. Kainer, Thomas L. Spurgeon, Spurgeonov barvni atlas anatomije domačih živali, 2007, Ljubljana, Tehniška založba Slovenije d.d., (
4. Dr. Janez Banič, dr. Jože Kogovšek, Kirurški praktikum,1989, Ljubljana, VTOZD za veterinarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani
5. Gillian Higgins, Stephanie Martrin, Anatomija konja temelj uspešnosti, 2013, Ljubljana, Tehniška založba Slovenije d.d.
6. Oskar Schaller, Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature, 2007, Stuttgart, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG
7. Leo Rigler, Anatomija domačih živali osteologia in syndesmologia, 2000, Ljubljana, Veterinarska fakulteta v Ljubljani
8. Gustav Schwab, Najlepše antične pripovedke, 1988, Ljubljana, Mladinska knjiga
9. Gregor Fazarinc, Anatomija domačih sesalcev miologija, 2009, Ljubljana, Veterinarska fakulteta
10. Lauren V. Schnabel et al., 2013, therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when?, The Veterinary Journal, (1-8)
11. <http://www.vbsb.si/zdravljenje-z-mehanskimi-udarnimi-valovi/> (13.1.2014, 21:51)
12. [http://www.izvorna-celica.si/site/index.php?view=o\\_maticnih\\_celica/](http://www.izvorna-celica.si/site/index.php?view=o_maticnih_celica/) (20.12.2013, 16:47)
13. <http://www.dominvrt.si/clanek/ljubljencki/video-pri-nas-razvili-revolucionarno-metodo-zdravljenja.html> (6.12.2014, 12:14)

## **9. ZAHVALA**

Iskreno bi se rada zahvalila najini mentorici, ki naju je spremljala in vodila od prve zamisli do konca raziskovalnega dela. Zahvalila bi se podjetju Animacel biotehnologija d.o.o, predvsem dr. Katerini Čeh, dr. vet. med ter Luki Mohoriču, Veterinarski fakulteti v Ljubljani, Nacionalnemu veterinarskemu inštitutu in Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo ter mag. Tomislavu Pallerju, dr. vet. med. Za raziskavo kliničnih primerov pa bi se rada posebej zahvalila veterinarju Milanu Hrenu, dr. vet. med. in Veterinarski bolnici Slovenska Bistrica. Hvala tudi vsem ostalim profesorjem na šoli, laborantki in lektorju. Vsekakor pa hvala najinim razumevajočim staršem in prijateljem, brez katerih najine raziskovalne naloge ne bi bilo.