

# Klinicko-patologické změny u koní po intra-artikulární aplikaci autologních a allogeních mezenchymálních kmenových buněk získaných z placenty

## Cytotherapy 2011

*Cytotherapy*, 2011; 13: 419–430

**informa**  
healthcare

### **Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses**

DANIELLE D. CARRADE<sup>1</sup>, SEAN D. OWENS<sup>1</sup>, LARRY D. GALUPPO<sup>2</sup>, MARTIN A. VIDAL<sup>2</sup>, GREGORY L. FERRARO<sup>3</sup>, FRED LIBRACH<sup>4</sup>, SABINE BUERCHLER<sup>2</sup>, MICHAEL S. FRIEDMAN<sup>5</sup>, NAOMI J. WALKER<sup>1</sup> & DORI L. BORJESSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pathology, Microbiology and Immunology, and <sup>2</sup>Surgical and Radiological Sciences, <sup>3</sup>Center for Equine Health and <sup>4</sup>Veterinary Blood Bank, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, California, USA, and <sup>5</sup>ThermoGenesis Corporation, Rancho Cordova, California, USA

# Intro

- Koňské mezenchymální kmenové buňky (MSCs) byly izolovány z mnoha tkání (kostní dřeň (BM), tuková tkáň (AT), pupeční šňůra (UCT) a pupečnicková krev (UCB))
- Výběr vhodného zdroje MSCs závisí na mnoha faktorech. (AT X invaze, kachexie; BM X invaze; UCT, UCB X alogení aplikace???)

- V equiní medicíně jsou MSCs široce používány k léčbě ortopedického zranění zahrnující šlachy, vazy, chrupavky a kosti.
- Pro terapeutické použití, MSC mohou být podávány intraartikulárně, intralezionálně, intravenózně nebo regionálně.
- MSCs, bez ohledu na původ tkáně, mají inherentně nízkou imunogenicitu *in vitro*. MSCs mohou vyvolávat expresi MHC I, ale nevyvolávají expresi MHC třídy II, nebo T-buněčné kostimulační molekuly
- MSC nevyvolávají proliferativní odpověď u allogenních lymfocytů

# Materials & Methods

- Šestnáct zdravých koní bylo rozděleno do tří skupin.
- Skupina 1 se skládala ze společných injekcí s autologní a alogenní aplikací MSC, Quarterhorse hříbata (n 6, dvě klisny, čtyři hřebci) ve věkovém rozmezí 6 až 8 měsíců.
- Skupina 2 se skládala z jejich matek (n 5), ve věkovém rozpětí 6-20 let.
- Skupina 3 skládala ze sourozenců ze sk. 1 (věkové rozmezí 2-4 roky). Tři koně v
- University of California (Davis, CA, USA, UCDC).

- Odebraná UCB zpracována pomocí systému MarrowXpress™ (MXP; Thermogenesis Corporation, Rancho Cordova, CA, USA), následně MNCs separovány na Ficolu a nasazeny do kultivačních lahví ve standardních kult. Podmínkách.
- Odebraná UCT byla rozřezána a natrávena pomocí 0,2% kolagenázy, 0,004% elastázy a 0,1% hyaluronidázy. Následně byl produkt přefiltrován přes sítko a promyt v PBS.

- Buňky byly nasazeny do kultivačních lahví ve standardních kult. Podmínkách.
- Po kultivaci byly MSCs z UCT i UCB zamrazeny následně rozmrazeny (37°C), resuspendovány v F1/1.
- MSCs byly do aplikace vloženy do 4-ml sterilních skleněných lahviček při pokojové teplotě (max 3h) MSCs zpracované tímto způsobem zůstávají životaschopné (95%) a proliferační schopnost je nejméně 24-48 hodin (DL Börjesson, nepublikovaná pozorování).

# MSC povrchová exprese MHC I, MHC II a CD86

- Alikvoty MSC byly promyty v PBS a označeny 100ul primární protilátky [MHC I (ABD Serotec, Raleigh, NC, USA; klon CVS22), MHC II (ABD Serotec; klon CVS20), CD86 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, klon IT2.2 přímo konjugované na fykoerytrinu (PE)

# Intra-artikulární aplikace MSCs

- Skupina 1 dostala jak allogenní tak autologní aplikaci MSCs
- Skupina 2 dostala allogenní aplikaci MSCs od svých hříbat
- Skupina 3 dostala allogenní aplikaci MSCs od svých sourozenců (společná pouze matka hříbat)
- Aplikace do L, P radiokarpálního kloubu, v dávce 7,5 mil. Buněk na kloub



# Patient monitoring and data collection

- Koně byli vyšetřeni (včetně analýzy chůze) a synoviální tekutiny byly sbírány v čase 0 a 6, 24, 48 a 72h po MSCs injekci.
- Kompletní fyzikální vyšetření bylo provedeno, včetně teploty, tepové frekvence a dechová frekvence. Kulhání bylo stanoveno vyšetřením pohybu v kroku a klusu na přímé linii a hodnoceno na stupnici od 0 do 5 na základě obecných směrů.

# Results

- Všechna zvířata byla v průběhu studie klinicky zdravá. Nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní rozdíly v tepové frekvenci, tělesné teplotě a dýchání.
- Žádné otoky kloubů, koně nevykazovali bolestivost kulháním.
- Žádné signifikantní rozdíly ve výsledcích kloubní tekutiny.

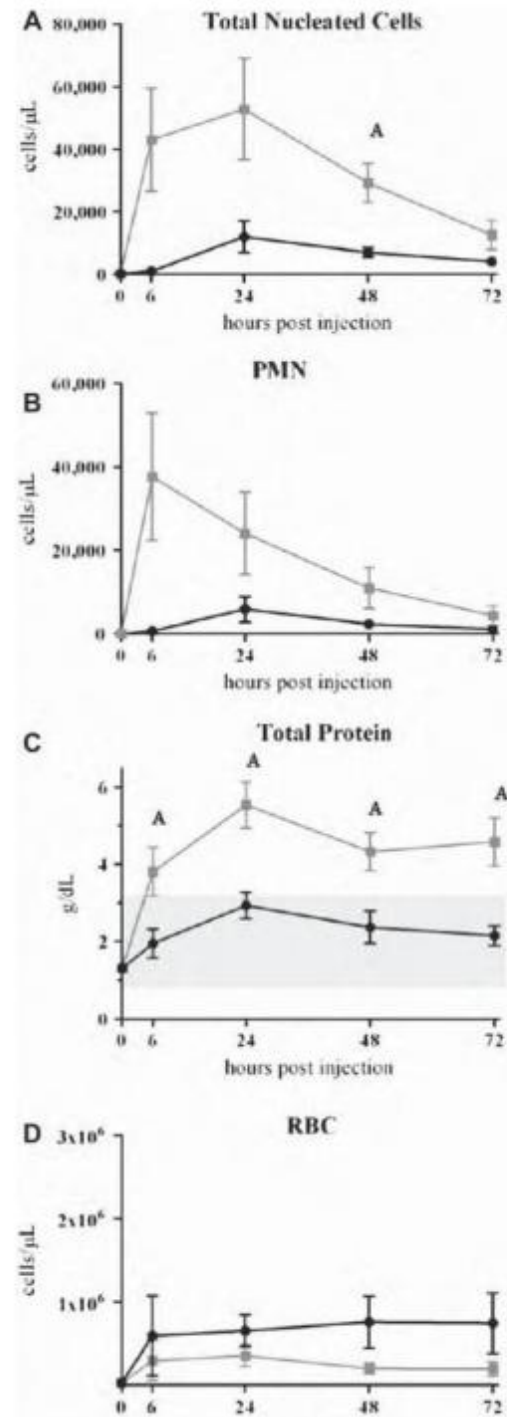
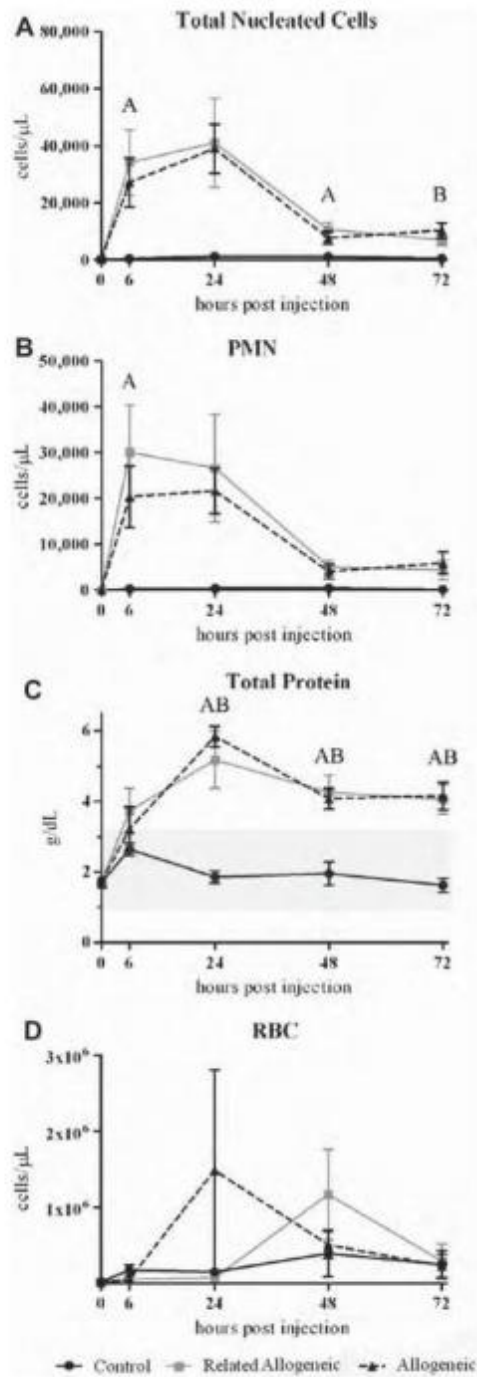


Figure 5. Results of synovial fluid analysis from dams after intra-

# Discussion

- Allogenní MSCs produkt nabízí výhodou téměř okamžité buněčné terapie pro léčbu akutních ortopedických lézí. Nedochází ke zpoždění, které je spojené s izolací a expanzí autologních MSCs.
- Data autorů článku naznačují, že intra-artikulární injekce MSC z UCT/UCB do zdravých kloubů je bezpečná.