

Stem cells in treatment of tendon disorders in horses

Kalisiak O.^{1,2}, Cegielski M.^{3,4}, Horse Health Centre, Psucin¹, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW², Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University³, Stem Cells Spin S.A.⁴

This article aims at the presentation of a novel, promising method of tendon disorders treatment in horses. There are already 15 years after publication of the first paper about isolation and differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. What do we know today about the use of stem cells in treating tendinopathies in horses? In clinical trials mesenchymal stem cells (bone marrow derived – BM-MSCs, adipose derived – AD-MSCs, blood derived – BDBC, tendon derived – TD-MSCs, allogenic or xenogenic stem cells), and embryonic stem cells, ESCs, have been used. Allogenic and xenogenic mesenchymal stem cells were well tolerated and did not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. In histopathological examination BM-MSCs, AD-MSCs and TD-MSCs have been found to be involved in and improved the tendon healing process. Clinical improvement of superficial digital flexor tendinitis outcome after BM-MSCs therapy has been proven. However, the mechanism of stem cell-mediated tendon structure repair is still unclear, as the survival time and rate of differentiation of mesenchymal stem cells is poor.

Keywords: tendon injuries, stem cells, therapy, healing process.

Ubiegłoroczna nagroda Nobla w dziedzinie medycyny została przyznana dwóm naukowcom: Johnowi B. Gurdonowi i Shiny'emu Yamanace, których badania przyczyniły się do rozwoju terapii z zastosowaniem komórek macierzystych. Udowodnili oni bowiem – choć w odstępie 40 lat – że dojrzałe, wyspecjalizowane komórki somatyczne mogą zostać przeprogramowane tak, aby stać się ponownie komórkami macierzystymi. Dzięki ich badaniom, jak i pracy wielu innych naukowców, komórki macierzyste od lat stosowane są w medycynie ludzkiej i weterynarii, a skuteczność terapii opartych na ich wykorzystaniu jest wysoka.

U koni pierwsze doniesienia na temat pozyskania komórek macierzystych ze szpiku kostnego, ich hodowli *in vitro* i różnicowaniu mają 15 lat (1), a pierwsza praca kliniczna o ich zastosowaniu przy uszkodzeniu ścięgien mięśni zginaczy palców została opublikowana 10 lat temu (2). Dziś, choć od wielu lat komórki macierzyste stosowane są w praktyce weterynaryjnej, wciąż pozostaje wiele pytań bez odpowiedzi. W tym artykule postaramy się

Komórki macierzyste w leczeniu ścięgien u koni

Olga Kalisiak^{1,2}, Marek Cegielski^{3,4}

z Centrum Zdrowia Konia w Psucinie¹ i Zakładu Diagnostyki Klinicznej i Laboratoryjnej Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie² oraz Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu³ i Stem Cells Spin S.A.⁴

podsumować dotychczasową wiedzę na temat klinicznych rezultatów stosowania komórek macierzystych u koni.

Najczęstszym zastosowaniem komórek macierzystych u koni jest leczenie ścięgien. Wynika to z tego, że aseptyczne zapalenia ścięgien mięśni zginaczy palców oraz mięśni międzykostnych są bardzo powszechnym problemem zdrowotnym koni, jak i z tego, że dotychczasowe metody leczenia są mało skuteczne. W ostatniej dekadzie skuteczność leczenia została zwiększona dzięki wykorzystaniu wstrzyknięć dośięgnowych pod kontrolą ultrasonograficzną, dzięki którym lekarz może podać środki lecznicze bezpośrednio w miejsce uszkodzenia. Biologiczne środki lecznicze podawane dośięgnowo można podzielić na 2 grupy:

- 1) czynniki wzrostu, jak np. osocze bogatopłytkowe (platelet rich plasma – PRP), supernatant szpiku kostnego lub homogenat z porożogennych komórek MIC-1;
- 2) komórki macierzyste.

Do leczenia ścięgien wykorzystuje się następujące rodzaje komórek macierzystych:

- 1) mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells – MSCs):
 - a) szpikowe,
 - b) tłuszczowe,
 - c) krwi,
 - d) ścięgnowe,
 - e) allogeniczne lub ksenogeniczne.
- 2) embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells – ESCs).

Komórki macierzyste szpikowe

Szpik kostny jest heterogennym środowiskiem komórkowym składającym się z hematopoetycznych i niehematopoetycznych komórek macierzystych (3). Grupa niehematopoetycznych komórek macierzystych jest heterogenna. Oprócz mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (bone marrow derived mesenchymal stem cells – BM-MSCs), podejrzewa się istnienie w szpiku kostnym progenitorowych komórek endotelialnych, multipotentjalnych komórek progenitorowych dorosłego organizmu (multipotential adult

progenitor cells – MAPCs) i bardzo małych embrionalnopodobnych komórek macierzystych (very small embryonic-like stem cells – VSEL; 4).

Komórki macierzyste pozyskiwane ze szpiku są najstarszą, najpowszechniejszą i najlepiej zbadaną z powyżej opisanych metod. Szpik można pobrać od konia poddanego sedacji, będącego w pozycji stojącej. Szpik kostny pozyskuje się z mostka lub z guza biodrowego. Badania Kasashima i wsp. (5) wykazały, że najbezpieczniejszym miejscem wkłucia do mostka jest okolica 5. żebra (4. – znajduje się między kończynami piersiowymi, 6. – jest już na wysokości wierzchołka serca), a znacznym ułatwieniem prawidłowego wkłucia jest kontrola ultrasonograficzna.

Badania wykonane w Colorado State University (6) nie wykazały istotnej różnicy w liczbie komórek jednojądrzastych (MNCs) oraz mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-MSCs) uzyskanych z mostka i guza biodrowego, jednak w obu przypadkach zanotowano, że liczba mezenchymalnych komórek macierzystych w pierwszych 5 ml pobranego szpiku jest około trzykrotnie wyższa od liczby tych komórek pozyskanych w kolejnych 5 ml. Jest to prawdopodobnie związane z tym, że kolejne partie szpiku są rozcieńczane krwią obwodową. Te wyniki są w sprzeczności z uzyskanymi przez zespół z wydziału weterynaryjnego uniwersytetu w Lipsku (7), którzy zaobserwowali znacząco niższą liczbę mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku w aspiracie z guza biodrowego w porównaniu z aspiratem z mostka. Różnice te mogą wynikać z wieku koni użytych do badania: 2–5 lat w badaniu w Colorado State University, 13 lat w badaniu w Lipsku.

Należy pamiętać, że komórki macierzyste stanowią tylko 0,001 do 0,01% komórek jednojądrzastych szpiku. Przy dużych uszkodzeniach ścięgien minimalna dawka lecznicza wynosi 10×10^6 komórek macierzystych (8, 9), co oznacza, że aby uzyskać taką liczbę komórek pobrany szpik kostny należy hodować przez ok. 4 tygodnie.

Komórki macierzyste pochodzenia szpikowego są najczęściej opisywanymi komórkami macierzystymi w leczeniu

koni. Wiele o nich wiadomo w badaniach *in vitro*, jednak co się z nimi dzieje *in vivo* pozostaje niejasne. Badacze zastanawiają się, czy działanie mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku wynika z możliwości ich zróżnicowania się w tenocyty, czy też polega na wydzielaniu czynników wzrostu stymulujących komórki będące w miejscu uszkodzenia (10). Dodatkowo, mezenchymalne komórki macierzyste mają właściwości immunomodulujące, które, zmniejszając proces zapalny, korzystnie wpływają na proces gojenia (11, 12). Na korzyść teorii o korzystnym działaniu komórek macierzystych poprzez wydzielanie przez nie czynników wzrostu świadczy niska przeżywalność tych komórek *in vivo*: mniej niż 5% po 10 dniach i 0,2% po 90 dniach (13). Świadczy to także przeciwko teorii o przekształcaniu się komórek macierzystych w tenocyty. Dodatkowo należy pamiętać, że przed podaniem mezenchymalne komórki macierzyste są hodowane w płynach zawierających produkty krwiopochodne, takie jak surowica, osocze czy osocze bogatopłytkowe, będących samoistnie bogatym źródłem czynników wzrostu, dlatego oddzielenie skuteczności tych komórek od skuteczności wstrzykiwanych wraz z nimi czynników wzrostu jest bardzo trudne.

Pomimo sporów naukowych, udowodniono kliniczną skuteczność mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego w leczeniu zapalenia ścięgien mięśni zginaczy palców u koni wyścigowych: liczba nawrotów choroby wyniosła 50% u koni biorących udział w wyścigach płaskich oraz 25,7% u koni biegających w wyścigach płotowych (9). Jest to znacząca poprawa w stosunku do badania Dyson (14) z 2004 r., w którym nawrotów choroby było 63,15% u koni biorących udział w wyścigach płaskich oraz 57,14% u koni biegających w wyścigach płotowych. Badania prowadzone u koni sportowych, które doznały zapalenia ścięgien zginaczy palca lub m. międzykostnego wykazują, że 84,5% zwierząt po terapii mezenchymalnymi komórkami macierzystymi szpiku powróciło do poziomu użytkowania sprzed urazu (15).

Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego

W ostatnich latach rozpowszechniły się techniki wykorzystujące komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego. Materiał pobiera się z okolicy nasady (rzepa) ogona u stojącego konia poddanego sedacji. W pobranym materiale znajdują się komórki jądrzaste pochodzenia tłuszczowego (adipose derived nucleated cells – AD-NCS), których 2–4% (16) stanowią

komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego (adipose derived mesenchymal stem cells – AD-MSCs). Tak jak w przypadku komórek macierzystych pochodzenia szpikowego, aby uzyskać minimalną leczniczą dawkę konieczna jest ich hodowla *in vitro*. Czas hodowli jest porównywalny do czasu hodowli komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (17, 18). Należy podkreślić, że oferty laboratoriów obiecujących komórki macierzyste w okresie kilku dni są niemożliwe – bez hodowli otrzymać można tylko komórki jądrzaste pochodzenia tłuszczowego, wśród których są oczywiście także komórki macierzyste, ale w liczbie bardzo nieznacznej.

Ciekawe jest to, że także komórki jądrzaste pochodzenia tłuszczowego mają korzystny wpływ na gojenie się ścięgien. W 6 tygodni po iniekcji doścignowej tych komórek w miejsce uszkodzenia, w obrazie histopatologicznym widoczna była zwiększona ilość kolagenu typu III, lepszy układ włókien ścięgowych i zmniejszenie nacieku komórek zapalnych w stosunku do miejsca, gdzie podano placebo (19). Różnice te nie były jednak widoczne w badaniu ultrasonograficznym. Brak także badań potwierdzających skuteczność kliniczną terapii komórkami macierzystymi pochodzenia tłuszczowego lub komórkami jądrzastymi pochodzenia tłuszczowego.

Mezenchymalne komórki macierzyste krwi obwodowej

Mezenchymalne komórki macierzyste znajdują się także we krwi obwodowej koni (blood derived blood cells – BDSs). Z oczywistych przyczyn pobranie krwi jest znacznie łatwiejsze niż pobranie szpiku lub tkanki tłuszczowej, jest bezpieczniejsze i nie wymaga sedacji zwierzęcia, co powoduje, że metoda ta jest wielce obiecująca. Jednak tylko u 1/3 koni ich liczba we krwi jest wystarczająca do hodowli komórkowej (20). Poddanie koni terapii hiperbarycznej zwiększa liczbę komórek macierzystych we krwi obwodowej tak, że ich liczba jest wystarczająca do przeprowadzenia hodowli u wszystkich badanych koni (20). Oczywiście ze względu na techniczne zastosowanie terapii hiperbarycznej nie będzie miało zastosowania klinicznego w leczeniu koni, oczekuje się więc na znalezienie innej metody zwiększającej liczbę komórek macierzystych we krwi obwodowej.

Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia ścięgowego

Pobranie komórek macierzystych pochodzenia ścięgowego jest dużo bardziej

skomplikowane niż pobranie szpiku lub tkanki tłuszczowej – wiąże się to mianowicie z koniecznością wycięcia fragmentu mięśnia prostownika długiego palców, do czego konieczne jest znieczulenie ogólne zwierzęcia. Jakie są więc przewagi komórek macierzystych pochodzenia ścięgowego (TD-MSCs) nad poprzednio omawianymi komórkami? Komórek macierzyste stanowią zaledwie 0,01% komórek ścięgowych, jednak ich hodowla przebiega szybciej i minimalną dawkę leczniczą można uzyskać już po ok. 14 dniach hodowli (21). Dodatkowo mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia ścięgowego cechuje wyższa przeżywalność w miejscu podania (choć po 4 tygodniach od podania, tylko niewielka ich liczba jest nadal obecna) oraz większa synteza kolagenu typu III niż po podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku i komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego. Podanie komórek macierzystych pochodzenia ścięgowego poprawiało ułożenie włókien ścięgowych podczas procesu gojenia ścięgna. Pomimo tych optymistycznych wyników histopatologicznych, nie ma dotąd badań potwierdzających przewagę stosowania tych komórek w przypadkach klinicznych. Nie do końca jest także zweryfikowany brak długotrwałych konsekwencji usunięcia mięśnia prostownika długiego palców u koni wyczynowych. Dodatkowo badania wykonywane nad komórkami macierzystymi/progenitorowymi pochodzenia ścięgowego u szczurów (22) wykazały, że liczba komórek progenitorowych w ścięgnię, jak ich zdolność różnicowania się w tenocyty, zmniejsza się dramatycznie wraz z wiekiem zwierzęcia.

Allogeniczne i ksenogeniczne komórki macierzyste

Obecnie allogeniczne i ksenogeniczne komórki macierzyste są coraz częściej stosowane w regeneracji tkanek zwierząt. Wiele badań (23), w tym u koni (24, 25, 26), wykazało, że odpowiedź immunologiczna organizmu biorcy jest taka sama w przypadku komórek autogenicznych i allogenicznych.

Prowadzone od 10 lat badania naukowe na uzyskanych z poroża jelenia porożogennych komórkach macierzystych o symbolu MIC-1 wykazały, że komórki te mają bardzo duży potencjał proliferacyjny, a przeszczepiane ksenogenicznie uczestniczą w regeneracji tkanek innych ssaków (27, 28). Podobnie jak mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego, komórki porożogenne nie mają na swojej powierzchni antygenów zgodności tkankowej MHC klasy II i wykazują słabą ekspresję antygeny MHC klasy I.

Dzięki temu, po wprowadzeniu ich do obcego gatunku nie wywołują reakcji zapalnej (29). Dodatkowo za tolerancję immunologiczną mogą odpowiadać wydzielane przez nie czynniki przeciwzapalne, takie jak TGFβ1, które hamują odpowiedź immunologiczną (30). Z własnych doświadczeń klinicznych wiadomo, że podanie komórek ksenogenicznych koniom nie wywołuje klinicznie ani ultrasonograficznie odpowiedzi immunologicznej, a w okresie 5 lat od podania nie zaobserwowano żadnych zmian o charakterze nowotworzenia u badanych zwierząt.

Komórki macierzyste allogeniczne i ksenogeniczne mogą być ciekawą alternatywą dla autologicznych komórek macierzystych, których pozyskiwanie wiąże się z dodatkowym zabiegiem chirurgicznym, a czas podania jest przesunięty w czasie ze względu na konieczność hodowli komórkowej. W przypadku komórek allogenicznych i ksenogenicznych nie ma tego ograniczenia – hodowla komórkowa jest prowadzona w sposób ciągły, dzięki czemu iniekcję można wykonać w optymalnym terminie, tj. ok. 7 dni po uszkodzeniu ścięgna (31).

Komórki macierzyste pochodzenia embrionalnego

Komórki te są największą nadzieją w terapii chorób ortopedycznych u koni. Mogą się rozwijać nie tylko w komórki mezenchymy, ale także ektodermy, endodermy i mezodermy. Badania udowodniły, że macierzyste komórki embrionalne nie są odrzucane przez biorcę, pomimo że pochodzą od embrionu, będącego genetycznie obcym osobnikiem. Ta cecha powoduje, że można myśleć o hodowli tych komórek na skalę przemysłową i znika ograniczenie czasowe związane z koniecznością hodowli komórek od konkretnego osobnika. Dodatkowo embrionalne komórki macierzyste potrafią migrować do innych uszkodzonych miejsc w obrębie tego samego ścięgna (13), dzięki czemu ich działanie lecznicze nie ogranicza się do zmian widocznych ultrasonograficznie, a obejmuje całą uszkodzoną strukturę. Kolejną przewagą tych komórek jest ich wyższa przeżywalność w miejscu podania – udowodniono, że po 90 dniach liczba embrionalnych komórek macierzystych w miejscu podania stanowiła 60% podanej liczby, a zliczając komórki w całym badanym ścięgnię – 100%. Liczby te świadczą o tym, że komórki macierzyste pochodzenia embrionalnego, jako jedyne z omawianych, mają możliwość namnażania się *in vivo*. Nie wykazano także żadnych przypadków nowotworzenia u zwierząt, u których zostały one podane.

Podsumowanie

Zastosowanie komórek macierzystych wydaje się obiecującą formą terapii ścięgien u koni. Jednocześnie więcej badań klinicznych jest koniecznych, aby ocenić skuteczność terapii komórkami macierzystymi z różnych źródeł oraz porównać ze skutecznością terapii za pomocą czynników wzrostu. Dzięki tym informacjom łatwiej będzie dobrać optymalną metodę leczenia ścięgien, tj. skuteczną, prostą i najmniej kosztowną.

Piśmennictwo

- Fortier L.A., Nixon A.J., William J., Cable C.S.: Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 1998, **59**, 1182-1187.
- Smith R.K.W., Korda M., Blunn G.W., Goodship A.E.: Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* 2003, **35**, 99-102.
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machaliński B., Kucia M.: Bone-marrow-derived stem cells – our key to longevity? *J. Appl. Genet.* 2007, **48**, 307-319.
- Serakinci N., Keith W.N.: Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur. J. Cancer.* 2006, **42**, 1243-1246.
- Kasahima Y., Ueno T., Tomita A., Goodship A.E., Smith R.K.W.: Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet. J.* 2011, **43**, 288-294.
- Adams M. K., Goodrich L.G., Rao S., Olea-Popelka F.J., Phillips J.N., Kisiday J.D., McIlwraith C.W.: Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Vet. J.* 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00646.
- Delling U., Lindner K., Ribitsch I., Julke H., Brehm W.: Comparison of Bone Marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can. J. Vet. Res.* 2012, **76**, 52-56.
- Pacini S., Spinabella S., Trombi L., Fazzi R., Galimberti S., Dini F., Carlucci F. and Petrini M.: Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 2007, **13**, 2949-2955.
- Godwin E.E., Young N.J., Dudhia J., Beamish I.C., Smith R.K.: Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 2012, **44**, 25-32.
- Richardson L.W., Dudhia J., Clegg P.G., Smith R.: Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends. Biotechnol.* 2007, **9**, 409-416.
- Stewart M.C., Stewart A.A.: Mesenchymal stem cells: Characteristics, sources and mechanisms of action. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2011, **27**, 243-261.
- Peroni J.F., Borjesson D.L.: Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2011, **27**, 351-362.
- Guest D.J., Smith M.R., Allen W.R.: Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 2010, **42**, 636-642.
- Dyson S.J.: Medical management of superficial digital flexor tendonitis: A comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 2004, **36**, 415-419.
- Burk J., Badylak S. F., Kelly J. and Brehm W.: Equine cellular therapy—from stall to bench to bedside?. *Cytometry* 2012 [doi: 10.1002/cyto.a.22216; Article first published online: 18 OCT 2012].
- Frisbie D. D., Smith R. K. W.: Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J.* 2010, **42**, 86-89.
- Vidal M. A., Kilroy G. E., Lopez M. J., Johnson J. R., Moore R. M., Gimble J. M.: characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.* 2007, **36**, 613-622.

- Ranera B., Lyahyai J., Romero A., Vazquez F.J., Remacha A.R., Bernal M.L., Zaragoza P., Rodellar C., Martin-Burriel I.: Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, **144**, 147-154.
- Nixon A.J., Dahlgren L.A., Haupt J.L., Yeager A.E., Ward D.L.: Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 2008, **69**, 928-937.
- Dhar M., Neilsen N., Beatty K., Eaker S., Adair H., Geiser D.: Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: Isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment. *Equine Vet. J.* 2012, **44**, 600-605.
- Stewart A.A., Barrett J.G., Byron C.R., Yates A.C., Durgam S.S., Evans R.B., Stewart M.C.: Comparison of equine tendon-, muscle-, and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix. *Am. J. Vet. Res.* 2009, **70**, 750-757.
- Zhou Z., Akinbiyi T., Xu L., Ramcharan M., Leong D. J., Ros S. J., Colvin A. C., Schaffler M. B., Majeska R. J., Flattow E. L., Sun H. B.: Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging Cell.* 2010, **9**, 911-915.
- Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P.: Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *J. Inflamm.* 2005, **2**, 8.
- Guest D.J., Smith M.R.W., Allen W.R.: Monitoring the fate of autologous and allogenic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine Vet. J.* 2008, **40**, 178-181.
- Carrade D.D., Owens S.D., Galuppo L.D., Vidal M.A., Ferraro G.L., Librach F., Buerchler S., Friedman M.S., Walker N.J., Borjesson D.L.: Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placental derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 2011, **13**, 419-430.
- Carrade D.D., Affolter V.K., Outerbridge C.A., Watson J.L., Galuppo L.D., Buerchler S., Kumar V., Walker N.J., Borjesson D.L.: Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 2011, **13**, 1180-1192.
- Cegielski M., Dziewiszek W., Zabel M., Dziegiel P., Izzycki D., Zatoński M., Bochnia M.: Experimental application of xenogenous antlerogenic cells in replacement of auricular cartilage in rabbits. *Xenotransplantation* 2008, **15**, 374-383.
- Cegielski M., Dziewiszek W., Zabel M., Dziegiel P., Kuryszko J., Izykowska I., Zatoński M., Bochnia M.: Experimental xenoinplantation of antlerogenic cells into mandibular bone lesions in rabbits: two-year follow-up. *In Vivo* 2010, **24**, 165-172.
- Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J.: Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007, **25**, 2739-2749.
- Zheng Z.H., Li X.Y., Ding J., Jia J.F., Zhu P.: Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008, **47**, 22-30.
- Hu X., Wang J., Chen J., Luo R., He A., Xie X., Li J.: Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2007, **31**, 438-443.

Dr Olga Kalisiak,
e-mail: olga.kalisiak@orange.pl