

TERAPIE KOMÓRKOWE W WETERYNARII – CZĘŚĆ I. KOMÓRKI MACIERZyste: RODZAJE, ŹRÓDŁA I DROGI PODANIA

Karolina Aleksandra Chodkowska

WIN-FS w Bobrowcu

W ostatnich latach terapie komórkowe stały się jednym z najbardziej dynamicznie rozwijających się kierunków badań w medycynie weterynaryjnej. Rosnące zainteresowanie tym obszarem wynika z kilku czynników. Jednym z nich jest

rozwój biologii komórki oraz biotechnologii. Istotną rolę odgrywa także wzrost zapotrzebowania na nowe, skuteczne metody leczenia chorób przewlekłych i zwyrodnieniowych u zwierząt. W szczególności dotyczy to schorzeń układu ruchu, chorób zapalnych oraz trudno gojących się uszkodzeń tkanek, w których możli-

wości klasycznych metod terapeutycznych są ograniczone (23, 75).

Intensywny rozwój badań nad komórkami macierzystymi to nie tylko rosnąca liczba publikacji naukowych. To także szereg zaawansowanych projektów naukowych i wdrożeniowych. Jednak przede wszystkim to coraz większa licz-

Cellular therapies in veterinary medicine – Part I. Stem cells: types, sources, and routes of administration

Mesenchymal stem cells (MSCs) are currently considered one of the key components of the rapidly developing field of regenerative medicine in veterinary practice. For more than two decades, continuous efforts have been undertaken to develop commercially available therapies for new indications and additional animal species. The therapeutic potential of MSCs results primarily from their ability to modulate the immune response. In addition, these cells can reduce inflammatory processes and stimulate tissue regeneration through the secretion of numerous biologically active factors. In clinical practice, MSCs are used mainly in the treatment of musculoskeletal disorders in dogs and horses. Recent scientific reports indicate that this type of therapy may also be effective in other fields, including ophthalmology, dermatology, and dentistry. Despite promising clinical outcomes, the use of MSCs is still associated with several limitations, such as the lack of full standardization of procedures, variability in cellular properties depending on the donor, and the limited number of long-term clinical studies. The aim of this review is to present the current state of knowledge regarding the mechanisms of action, clinical indications, and safety of MSC-based cell therapies in veterinary medicine.

Keywords: cell therapy, mesenchymal stem cells, immunomodulation, regenerative medicine.

ba produktów komercyjnych i usług oferowanych zarówno w medycynie ludzi jak i w weterynarii. W wielu krajach powstają kolejne banki komórek macierzystych oraz wyspecjalizowane, certyfikowane laboratoria oferujące izolację, hodowlę i przygotowanie materiału komórkowego do zastosowań klinicznych. Terapie komórkowe w weterynarii są głównie dedykowane ortopedii psów i koni (22). Niemniej, zakres potencjalnych zastosowań i gatunków docelowych stopniowo się rozszerza. Kolejne prace naukowe obejmują m.in. dermatologię, okulistykę, stomatologię oraz choroby o podłożu zapalnym i immunologicznym (9, 23, 54).

Szczególne znaczenie w badaniach i praktyce klinicznej przypisuje się mezenchymalnym komórkom macierzystym (mesenchymal stem cells, MSC). Komórki te są obecnie najczęściej wykorzystywanym typem komórek w terapiach regeneracyjnych stosowanych u zwierząt. Wynika to przede wszystkim z ich stosunkowo łatwej izolacji z różnych tkanek organizmu, wysokiego potencjału proliferacyjnego oraz właściwości immunomodulacyjnych. Współczesne badania wskazują, że ich działanie terapeutyczne wynika głównie z mechanizmów parakrynych, w tym z wydzielania licznych biologicznie aktywnych cząsteczek (29). Te bioaktywne czynniki wydzielnicze mogą skutecznie modulować proces zapalny oraz wspierać regenerację uszkodzonych tkanek (54, 75). Pomimo rosnącego zainteresowania tego rodzaju terapiami w weterynarii, wiele aspektów ich stosowania wciąż pozostaje przedmiotem intensywnych badań i dyskusji. Dotyczy to między innymi wyboru optymalnego źródła komórek, rodzaju dawcy, sposobu przygotowania materiału biologicznego (proces hodowli) oraz drogi podania preparatu komórkowego. Istotnym zagadnieniem pozostaje także ocena bezpieczeństwa terapii oraz potencjalnych działań niepożądanych związanych z ich stosowaniem (23).

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie weterynaryjnej, ze szczególnym uwzględnieniem źródeł komórek, typów dawców, dróg podania oraz bezpieczeństwa stosowania terapii komórkowych.

Definicja mezenchymalnych komórek macierzystych i mechanizm działania

Mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells, MSC) to populacja multipotencjalnych komórek progenitorowych obecnych w wielu tkankach organizmu. Komórki te posiadają zdolności do samoodnowy oraz różnicowania w różne typy komórek pochodzenia mezenchymalnego (osteocyty, chondrocyty oraz adipocyty) (25, 49). Zdolność ta stanowi podstawę ich potencjalnego zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Pierwsze obserwacje dotyczące komórek o właściwościach mezenchymalnych opisano w latach 60. XX wieku w szpiku kostnym. Naukowcy wykazali wówczas obecność komórek zrębu zdolnych do przylegania do podłoża hodowlanego oraz różnicowania w komórki tkanki

kostnej i chrzęstnej (27). Kolejne badania potwierdziły, że podobne komórki występują również w wielu innych tkankach organizmu, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (10, 45, 57).

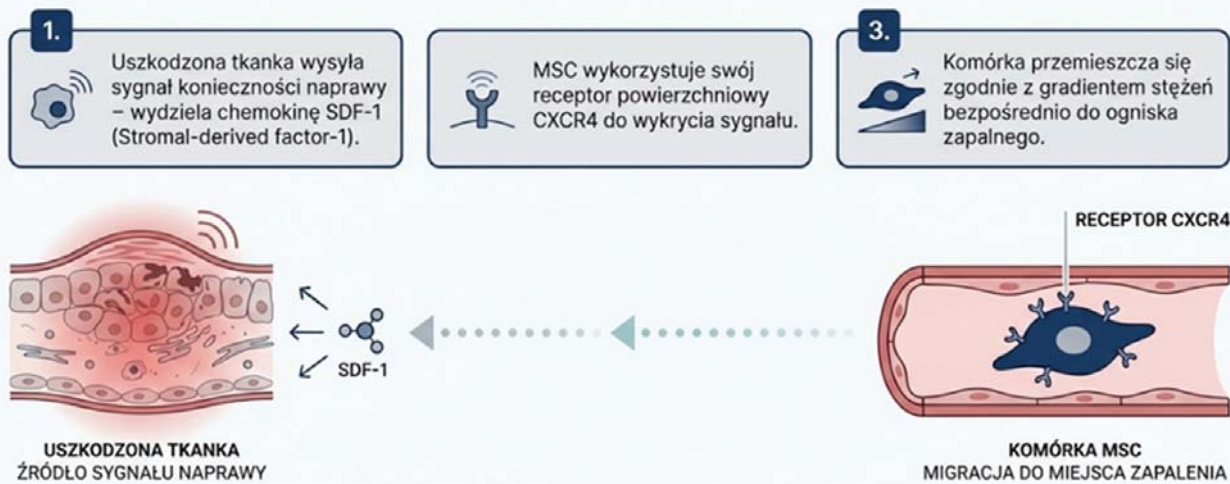
W celu ujednoczenia definicji MSC Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (International Society for Cellular Therapy, ISCT) zaproponowało minimalne kryteria identyfikacji tych komórek. Zgodnie z wytycznymi MSC powinny spełniać trzy podstawowe warunki: 1) muszą wykazywać zdolność przylegania do plastikowej powierzchni w standardowych warunkach hodowli komórkowej. 2) powinny wykazywać określony profil markerów powierzchniowych, w tym ekspresję antygenów takich jak CD73, CD90 i CD105 oraz brak ekspresji markerów hematopoetycznych, m.in. CD34, CD45 czy CD14.

3) powinny posiadać zdolność różnicowania w kierunku osteogennym, chondrogennym oraz adipogennym w warunkach *in vitro* (25).

W weterynarii, głównie ze względu na różnice międzygatunkowe, identyfikacja MSC jest bardziej złożona niż w medycynie człowieka. Wynika to także z ograniczonej liczby dostępnych przeciwciał umożliwiających dokładną charakterystykę markerów powierzchniowych komórek u zwierząt. Wiele badań wykazało jednak, że MSC izolowane od zwierząt wykazują podobne cechy biologiczne do komórek ludzkich. Dotyczy to m.in. zdolności przylegania do plastiku, multipotencjalnego różnicowania oraz ekspresji markerów, takich jak CD29 czy CD44 (57, 75). Należy zaznaczyć, że współczesne badania wskazują, że działanie terapeutyczne MSC nie wynika wyłącznie z ich zdolności do różnicowania w nowe komórki tkanek. Coraz więcej doniesień naukowych jasno wskazuje, że kluczową rolę odgrywają jednak mechanizmy parakryne. Komórki te wydzielają liczne czynniki biologicznie aktywne, takie jak cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (57, 75). Wymienione substancje mogą modulować przebieg procesu zapalnego, wpływać na odpowiedź immunologiczną oraz wspierać procesy regeneracyjne w uszkodzonych tkankach (12, 36, 57, 69). Z tego względu w literaturze coraz częściej podkreśla się, że MSC pełnią rolę komórek regulatorowych środowiska tkankowego i właśnie przez wydzielanie mediatorów biologicznych wpływają na procesy naprawcze i regeneracyjne zachodzące w organizmie (12, 57).



Rycina 1. Główne mechanizmy działania parakrynnego mezenchymalnych komórek macierzystych. MSC wydzielają liczne mediatory biologiczne tworzące tzw. sekretom, obejmujący m.in. cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Substancje te wpływają na procesy angiogenezy, modulację odpowiedzi immunologicznej, polaryzację makrofagów oraz regenerację uszkodzonych tkanek.



Rycina 2. Mechanizm migracji (homingu) mezenchymalnych komórek macierzystych do miejsca uszkodzenia tkanki. Uszkodzona tkanka wydziela chemokinę SDF-1 (stromal-derived factor-1), która tworzy gradient chemotaktyczny. MSC wykrywają ten sygnał za pomocą receptora CXCR4, co umożliwia ich kierunkową migrację wzdłuż gradientu chemokin do ogniska zapalenia lub uszkodzenia.

Mechanizm działania mezenchymalnych komórek macierzystych

Początkowo zakładano, że terapeutyczne działanie MSC wynika głównie z ich zdolności do różnicowania w komórki uszkodzonych tkanek. Jednak po latach badań wiadomo już, że w większości przypadków główny mechanizm działania ma charakter parakrynnny (Rycina 1). Oznacza to, że komórki te wpływają na otaczające tkanki przede wszystkim poprzez wydzielanie licznych cząsteczek biologicznie aktywnych (45, 49, 50). MSC wydzielają grupę mediatorów, w tym cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

Do najważniejszych należą między innymi vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) oraz transforming growth factor beta (TGF-β). Czynniki te mogą wspierać proces angiogenezy, stymulować regenerację tkanek oraz ograniczać proces zapalny w miejscu uszkodzenia (45, 49, 74). Jednym z najlepiej udokumentowanych efektów biologicznych MSC jest ich zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej. Jest to związane ze zdolnością do regulacji aktywności wielu populacji komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów T, limfocytów B, komórek NK oraz komórek dendrytycznych. Ponadto, wykazano, że

MSC mogą hamować proliferację aktywowanych limfocytów T oraz sprzyjać powstawaniu limfocytów regulatorowych (Treg). Dodatkowo mogą wpływać na polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu przeciwzapalnego (M2) (30, 45, 50). Co ciekawe, coraz więcej prac sygnalizuje, że MSC mogą również oddziaływać na komórki rezydujące w uszkodzonych tkankach. Wydzielane przez nie czynniki wzrostu mogą stymulować proliferację lokalnych komórek progenitorowych oraz wspierać procesy naprawy tkanek. W wielu modelach eksperymentalnych wykazano także, że MSC mogą ograniczać apoptozę komórek oraz zmniejszać uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym (45, 49). Zatem, mamy do czynienia

z dwukierunkowym wspieraniem procesu regeneracji-bezpośrednio przez same komórki macierzyste i pośrednio przez substancje przez nie wydzielane. Niezwykle istotną cechą MSC jest także zdolność do migracji w kierunku tkanek objętych procesem zapalnym lub uszkodzeniem. Zjawisko to określane jest jako homing (45, 49, 63) (Rycina 2). Taki rodzaj przemieszczania się komórek regulowany jest przez liczne chemokiny oraz ich receptory. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów jest interakcja między receptorem CXCR4 obecnym na powierzchni MSC a chemokiną stromal-derived factor-1 (SDF-1), którą jest produkowana w miejscu uszkodzenia tkanki (45, 49).

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się również na rolę sekretomu MSC. Kolejne badania wskazują, że znaczną część efektów terapeutycznych przypisywanych komórkom macierzystym mogą wywoływać cząsteczki uwalniane przez te komórki, w tym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające białka, lipidy oraz mikroRNA (53). Z tego względu w wielu ośrodkach badawczych prowadzone są intensywne prace nad wykorzystaniem sekretomu MSC jako alternatywy dla terapii komórkowych (45, 49, 74). Temat sekretomu i innych terapii typu cell-free zostanie poruszony w kolejnym artykule.

Źródła komórek macierzystych i charakterystyka dawców

Jednym z kluczowych zagadnień w badaniach nad terapiami komórkowymi jest określenie źródła komórek oraz charakterystyka dawcy, od którego pozyskuje się materiał biologiczny. Należy zaznaczyć, że właściwości biologiczne MSC mogą się różnić w zależności od rodzaju tkanki, z której zostały wyizolowane. Choć MSC wykazują wspólny zestaw cech fenotypowych (ekspresja markerów CD73, CD90, CD105 przy jednoczesnym braku markerów hematopoetycznych), ich potencjał proliferacyjny oraz zdolności do różnicowania wieloliniowego mogą się znacząco różnić w zależności od tkanki źródłowej. Różnice mogą być także związane z cechami samego dawcy (wiek, stan zdrowia, warunki środowiskowe) (11, 23, 57, 74). Wszystkie te czynniki mogą wpływać między innymi na zdolność proliferacyjną komórek, ich potencjał różnicowania oraz właściwości immunomodulacyjne (54, 69, 72). Należy zatem przyjąć, że skuteczność terapii komórkowej w medycynie weterynaryjnej jest ściśle uzależniona od wyboru optymalnego źródła MSC.

Źródła mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą być izolowane z wielu tkanek organizmu zwierząt. W weterynarii najczęściej wykorzystywanymi źródłami MSC są tkanka tłuszczowa oraz szpik kostny uznawane za klasyczne źródła tych komórek (57, 78). W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzą również tkanki płodowe, takie jak krew pępowinowa, galareta Whartona, łożysko czy błony płodowe. Źródła te charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym oraz stosunkowo niską immunogennością (39, 44, 66). Jak już wcześniej wspomniano, pochodzenie komórek może wpływać na ich zdolność proliferacji, potencjał różnicowania oraz profil wydzielanych mediatorów biologicznych. Z tego względu wybór odpowiedniego źródła MSC jest istotnym elementem planowania terapii regeneracyjnych. Poniżej przedstawiono podstawowe informacje o wybranych rodzajach tkanek źródłowych używanych w badaniach naukowych i weterynaryjnych protokołach terapeutycznych.

Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa obecnie jest jednym z najczęściej wykorzystywanych źródeł MSC w medycynie weterynaryjnej. Komórki te w literaturze są określane jako adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC). Charakteryzują się wysoką wydajnością izolacji oraz stosunkowo łatwym pobraniem materiału biologicznego (78). W wielu badaniach wykazano, że ten rodzaj komórek posiada zdolność różnicowania w kierunku osteogennym, chondrogennym oraz adipogennym (3). Ponadto komórki te wykazują właściwości immunomodulacyjne (26, 32, 47, 57). Z tego względu AD-MSC są szeroko badane i stosowane w terapiach regeneracyjnych u psów i koni, szczególnie w leczeniu chorób układu ruchu (7, 9, 22, 23). Ostatnio pojawiają się także liczne doniesienia dotyczące skutecznych terapii komórkowych u kotów właśnie z użyciem tego rodzaju komórek (2, 61, 68). To co należy bezwzględnie podkreślić to fakt, że tkanka tłuszczowa jest uznawana za szczególnie atrakcyjne źródło MSC ze względu na minimalnie inwazyjne procedury pobrania materiału oraz wysoką dostępność komórek w tkance. Materiał biologiczny może być pozyskiwany m.in. podczas planowych zabiegów chirurgicznych (np. ovariohisterektomia u psów i kotów) (33). Po pobraniu tkanki, komór-

ki izolowane są najczęściej poprzez enzymatyczne trawienie, a następnie namnażane w warunkach hodowli komórkowej w celu uzyskania liczby komórek odpowiedniej do zastosowania terapeutycznego. Badania wskazują na istotne różnice pomiędzy MSC pochodzącymi z różnych lokalizacji tkanki tłuszczowej. Komórki izolowane z okolic podskórnych mogą wykazywać wyższy potencjał proliferacyjny oraz dłużej zachowywać zdolność multipotencjalną w hodowli komórkowej w porównaniu z komórkami pochodzącymi z tkanki tłuszczowej trzewnej (62). Jednocześnie tkanka tłuszczowa trzewna może dostarczać większą liczbę komórek w materiale wyjściowym.

Szpik kostny

Szpik kostny był pierwszym opisanym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych i przez wiele lat stanowił podstawowy materiał do badań nad MSC zarówno u ludzi jak i zwierząt (10, 11, 12, 57). Komórki pochodzące z tego źródła (bone marrow-derived MSC, BM-MSC), wyróżniają się dobrze poznany profil biologicznym oraz wysoką zdolnością różnicowania w kierunku tkanki kostnej i chrzęstnej (57, 69). Mimo powyższych walorów, źródło to powoli zostaje zastępowane przez inne tkanki. Wynika to głównie z faktu, że pobranie materiału biologicznego jest procedurą stosunkowo inwazyjną. U psów wymaga ono zazwyczaj znieczulenia ogólnego, natomiast u koni stosuje się sedację oraz znieczulenie miejscowe (67, 52). Opisywano również potencjalne powikłania związane z pobraniem materiału, takie jak krwawienie, infekcja czy w rzadkich przypadkach uszkodzenia struktur klatki piersiowej podczas biopsji mostka (41). Dodatkowym ograniczeniem tego źródła jest fakt, że MSC stanowią jedynie niewielki odsetek wszystkich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego. Ponadto ich liczba zmniejsza się wraz z wiekiem dawcy (3). Z tego względu w celu uzyskania liczby komórek odpowiedniej do zastosowania terapeutycznego konieczne jest ich namnażanie w warunkach hodowli *in vitro* (57, 69).

Krew pępowinowa

Krew pępowinowa stanowi ważne źródło komórek macierzystych o wysokim potencjale proliferacyjnym. Komórki izolowane z tego materiału wykazują zdolność intensywnego namnażania w warunkach hodowli komórkowej, a także stosunko-

wo dużą stabilność fenotypową podczas kolejnych pasażów. W porównaniu z MSC izolowanymi z tkanek dorosłych często charakteryzują się większym potencjałem proliferacyjnym oraz dłuższą zdolnością do podziałów komórkowych (15). Ponadto, komórki te wykazują także stosunkowo niską immunogenność. To z kolei czyni je atrakcyjnym materiałem dla terapii allogenicznych (39, 65, 66). W weterynarii badania nad MSC izolowanymi z krwi pępowinowej prowadzone są głównie u koni. Analizowany jest ich potencjał w regeneracji tkanek, w szczególności w leczeniu urazów ścięgien, więzadeł oraz innych struktur układu ruchu (39, 75). Materiał biologiczny może być pozyskiwany w okresie okołoporodowym, bez konieczności wykonywania procedur inwazyjnych u dawcy. Z tego względu krew pępowinowa jest coraz częściej rozważana jako potencjalne źródło komórek wykorzystywanych w weterynaryjnej medycynie regeneracyjnej.

Galareta Whartona

Galareta Whartona, element tkanki łącznej pępowiny, jest kolejnym ważnym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych. Komórki izolowane z tej tkanki określane są jako Wharton's jelly-derived MSC (WJ-MSC). Wykazują one zdolność różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej oraz tłuszczowej (77). Dodatkowo charakteryzują się wysoką aktywnością proliferacyjną w warunkach hodowli komórkowej (65, 66, 71). Jedną z najważniejszych cech MSC pochodzących z galarety Whartona są ich właściwości immunomodulacyjne (3). Komórki te mogą wpływać na aktywność komórek układu odpornościowego oraz modulować przebieg procesów zapalnych. Zdolność ta związana jest z wydzielaniem licznych mediatorów biologicznych, takich jak cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu (65, 66, 71). Co ciekawe, WJ-MSC wykazują również ograniczoną ekspresję cząsteczek zgodności tkankowej MHC klasy II. To z kolei zmniejsza ryzyko reakcji immunologicznej po ich podaniu (14, 44). Z tego względu komórki te są rozważane jako szczególnie interesujące źródło materiału do terapii allogenicznych (44, 75).

Łożysko i błony płodowe

Łożysko oraz błony płodowe stanowią kolejne ważne źródło mezenchymalnych komórek macierzystych. Tkanki te zawierają populację komórek o wysokim poten-

cjale proliferacyjnym oraz zdolności różnicowania w kierunku różnych typów komórek mezenchymalnych. MSC izolowane z łożyska i błon płodowych posiadają właściwości parakryne. Wydzielają liczne mediatorów biologicznych, które mogą uczestniczyć w regulacji procesów zapalnych oraz wspierać regenerację uszkodzonych tkanek (4, 5, 44). Istotną zaletą tego źródła komórek jest łatwa dostępność materiału biologicznego. Tkanek płodowe mogą być pozyskiwane po porodzie, bez konieczności wykonywania inwazyjnych procedur u dawcy. Dzięki temu materiał do izolacji MSC można uzyskać w sposób stosunkowo bezpieczny i etycznie akceptowalny (4, 5). Komórki izolowane z łożyska i błon płodowych wykazują także stosunkowo niską immunogenność, co sprawia, że są rozważane jako potencjalne źródło komórek dla terapii allogenicznych. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie wykorzystaniem tych komórek w weterynaryjnej medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza w leczeniu uszkodzeń tkanek miękkich oraz chorób układu ruchu (44, 75).

Błona maziowa stawów

Błona maziowa stawów stanowi jedno z mniej konwencjonalnych, lecz aktualnie intensywnie badanych źródeł MSC. Komórki izolowane z tej tkanki określane są jako synovium-derived MSC (S-MSC). W licznych badaniach wykazano, że charakteryzują się one szczególnie wysokim potencjałem chondrogenym (28, 58). Oznacza to, że wykazują zdolność różnicowania w kierunku komórek chrząstki stawowej, co czyni je interesującym materiałem w badaniach nad regeneracją chrząstki (52). W porównaniu z MSC izolowanymi z innych źródeł, takich jak szpik kostny czy tkanka tłuszczowa, komórki pochodzące z błony maziowej mogą wykazywać większą zdolność do różnicowania chondrogenego oraz stosunkowo szybkie tempo proliferacji w hodowli komórkowej. Z tego względu stanowią obiecujący materiał do badań nad leczeniem chorób zwyrodnieniowych stawów oraz urazów struktur stawowych. Dotychczas, większość badań nad MSC pochodzącymi z błony maziowej ma charakter eksperymentalny. Prowadzone są one zarówno w modelach laboratoryjnych, jak i w badaniach przedklinicznych u zwierząt, w szczególności u koni oraz psów (25, 58, 70). Analizowany jest przede wszystkim ich potencjał w regeneracji chrząstki stawowej, leczeniu uszkodzeń stawów oraz terapii chorób

zwyrodnieniowych układu ruchu. W przyszłości komórki te mogą stanowić uzupełnienie dostępnych źródeł MSC wykorzystywanych w weterynaryjnej medycynie regeneracyjnej.

Miazga zębowa

Miazga zębowa to kolejne potencjalne źródło komórek macierzystych, które w ostatnich latach przyciąga rosnące zainteresowanie badaczy. Komórki izolowane z tej tkanki określane są jako dental pulp stem cells (DPSC). Charakteryzują się one wysoką zdolnością proliferacji oraz potencjałem różnicowania w kierunku wielu typów komórek, w tym komórek kostnych, chrzęstnych oraz nerwowych (24, 73). Ze względu na swoje właściwości biologiczne komórki te są obecnie intensywnie badane w kontekście medycyny regeneracyjnej. W badaniach eksperymentalnych analizowany jest ich potencjał w regeneracji tkanek kostnych, chrząstki oraz w terapii uszkodzeń nerwów. W weterynarii prace dotyczące MSC izolowanych z miazgi zębowej mają jednak nadal głównie charakter eksperymentalny i prowadzone są przede wszystkim w modelach laboratoryjnych (24, 38, 73). Pomimo ograniczonej liczby badań klinicznych wyniki dotychczasowych analiz sugerują, że komórki te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w regeneracji tkanek oraz w leczeniu chorób układu ruchu u zwierząt. Konieczne są jednak dalsze badania dotyczące ich właściwości biologicznych, bezpieczeństwa stosowania oraz możliwości standaryzacji metod izolacji i hodowli komórek (75).

Jak wynika z przedstawionych danych, mezenchymalne komórki macierzyste mogą być izolowane z wielu różnych tkanek organizmu zwierząt. W praktyce weterynaryjnej najczęściej wykorzystywanymi źródłami MSC pozostają szpik kostny oraz tkanka tłuszczowa, których właściwości biologiczne oraz bezpieczeństwo stosowania zostały najlepiej poznane w badaniach eksperymentalnych i klinicznych (Tabela 1). Należy jednak podkreślić, że rośnie zainteresowanie alternatywnymi źródłami komórek. Coraz więcej ciekawych doniesień naukowych i badań koncentruje się na tkankach okołoporodowych i mniej konwencjonalnych tkankach dorosłych. Mimo że, co już podkreślono, prace te mają głównie charakter eksperymentalny, to wiązane są z nimi duże nadzieje, w szczególności w tematach regeneracji nerwów i ogólnie medycynie regeneracyjnej.

Tabela 1. Źródła mezenchymalnych komórek macierzystych wykorzystywane w weterynaryjnej medycynie regeneracyjnej oraz ich podstawowe cechy biologiczne i zastosowania kliniczne.

Najczęściej stosowanymi źródłami MSC pozostają szpik kostny oraz tkanka tłuszczowa, jednak w ostatnich latach rośnie zainteresowanie komórkami pochodzącymi z tkanek okołoporodowych, takich jak krew pępowinowa, galareta Whartona czy błony płodowe.

Źródło MSC	Główne gatunki docelowe	Zalety	Ograniczenia	Typowe zastosowania w weterynarii
Szpik kostny (BM-MS)	koń, pies, kot	dobrze scharakteryzowane komórki; wysoki potencjał różnicowania w kierunku tkanki kostnej i chrzęstnej	pobranie inwazyjne; mniejsza liczba komórek w materiale wyjściowym	ortopedia koni (ścięgna, więzadła), choroba zwyrodnieniowa stawów
Tkanka tłuszczowa (AD-MS)	pies, kot, koń	wysoka wydajność izolacji; łatwiejsze pobranie materiału; szybkie namnażanie	większa zmienność biologiczna między dawcami	choroba zwyrodnieniowa stawów u psów i koni, urazy ortopedyczne
Krew pępowinowa (UC-MS)	koń, pies	wysoki potencjał proliferacyjny; młody materiał komórkowy; dobre właściwości immunomodulacyjne	ograniczona dostępność materiału; konieczność bankowania	badania eksperymentalne, potencjalne terapie allogeniczne
Galareta Whartona (WJ-MS)	koń, pies	bardzo wysoka proliferacja; niska immunogenność; dobre właściwości parakryne	materiał dostępny tylko okołoporodowo	medycyna regeneracyjna, badania nad terapiami allogenicznymi
Łożyisko i błony płodowe (P-MS)	koń, pies	materiał łatwy do pozyskania po porodzie; dobre właściwości immunomodulacyjne	mniejsza liczba badań klinicznych	regeneracja tkanek miękkich, badania eksperymentalne
Krew obwodowa (PB-MS)	koń	minimalnie inwazyjne pobranie materiału	bardzo niska liczba MSC w próbce	badania eksperymentalne
Synovium / błona maziowa (SM-MS)	koń, pies	wysoki potencjał chondrogeny	pobranie inwazyjne; ograniczona liczba badań	choroba zwyrodnieniowa stawów, regeneracja chrząstki

Wybór odpowiedniego źródła komórek ma kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii regeneracyjnych. Różnice w potencjale proliferacyjnym, zdolności różnicowania oraz właściwościach immunomodulacyjnych mogą wpływać na przebieg procesów naprawczych w uszkodzonych tkankach (Tabela 2). Z tego względu dalsze badania nad właściwościami MSC pochodzących z różnych tkanek są niezbędne dla optymalizacji protokołów terapeutycznych w medycynie weterynaryjnej.

Charakterystyka dawców. Relacja dawca–biorca w terapiach z wykorzystaniem MSC

W terapii mezenchymalnymi komórkami macierzystymi relacja między dawcą a biorcą komórek stanowi jeden z fundamentalnych elementów projektowania strategii terapeutycznych. Na tej podstawie wyróżnia się komórki autologiczne, allogeniczne oraz ksenogeniczne. W niektórych publikacjach opisywane są także komórki syngeniczne (pochodzące od osobnika genetycznie identycznego). Jednak w weterynarii mają one niewielkie znaczenie praktyczne (75). Rodzaj relacji między dawcą a biorcą wpływa na przebieg i organizację terapii komórkowej. Determinuje on między innymi

sposób przygotowania produktu komórkowego, a także czas potrzebny do rozpoczęcia leczenia. Ma również znaczenie dla kosztów terapii oraz dostępności odpowiedniego materiału biologicznego. Relacja dawca–biorca wpływa również na ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej po podaniu komórek. Ponadto, w przypadku niektórych modeli terapeutycznych może ona także decydować o możliwości standaryzacji produktu komórkowego oraz jego przygotowania w formie gotowej do użycia terapii (off-the-shelf) (22, 23, 75).

Komórki autologiczne

Komórki autologiczne są pobierane od tego samego zwierzęcia, które następnie otrzymuje terapię. Takie podejście jest uznawane za najbardziej bezpieczne immunologicznie, ponieważ minimalizuje ryzyko rozpoznania komórek jako obcych przez układ odpornościowy biorcy. Z tego względu autologiczne MSC przez wiele lat stanowiły podstawowy model terapii komórkowej w weterynarii (13, 15, 19, 75). Brak różnic w zakresie antygenów zgodności tkankowej pomiędzy dawcą a biorcą minimalizuje ryzyko reakcji alloimmunologicznej oraz odrzucenia komórek po ich podaniu. Z tego powodu auto-

logiczne MSC przez wiele lat stanowiły podstawowy model terapii komórkowej rozwijanej w medycynie weterynaryjnej, szczególnie w leczeniu chorób układu ruchu u koni i psów (75, 76). W przypadku stosowania tego rodzaju komórek niebywałą korzyścią jest brak konieczności poszukiwania i kwalifikacji zewnętrznego dawcy. Istotnym ograniczeniem takiego podejścia jest jednak czasochłonność i złożoność całej procedury. Materiał biologiczny należy najpierw pobrać, następnie wyizolować komórki, a w wielu przypadkach także namnażać je w hodowli *in vitro*. Proces ten wydłuża czas do rozpoczęcia terapii oraz zwiększa koszt leczenia (23, 59, 75). W praktyce klinicznej problemem może być również sam zabieg pobrania materiału, zwłaszcza gdy źródłem komórek jest szpik kostny (41).

Dodatkowym czynnikiem limitującym terapię autologiczną jest zmienność biologiczna materiału komórkowego. Właściwości MSC mogą zależeć od wieku oraz stanu zdrowia dawcy. W literaturze opisano między innymi spadek zdolności proliferacyjnych komórek wraz z wiekiem zwierzęcia oraz zmiany w ich potencjale różnicowania (13, 46, 75). Negatywny wpływ na właściwości MSC mogą mieć również choroby przewlekłe, zaburzenia metaboliczne oraz toczące się procesy za-

Tabela 2. Porównanie właściwości biologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z różnych tkanek.

Komórki pochodzące z tkanek okołoporodowych (np. galareta Whartona, łożysko) wykazują zwykle wyższy potencjał proliferacyjny oraz niższą immunogenność niż MSC izolowane z tkanek dorosłych.

Źródło MSC	Wydajność izolacji	Potencjał proliferacyjny	Potencjał różnicowania	Właściwości immunomodulacyjne	Immunogenność	Dojrzałość biologiczna komórek	Uwagi
Szpiak kostny (BM-MS)	umiarkowana	umiarkowany	bardzo dobry (osteogenny, chondrogenny)	dobra	niska-umiarkowana	komórki dorosłe	klasyczne źródło MSC w weterynarii
Tkanka tłuszczowa (AD-MS)	wysoka	wysoki	dobry (osteogenny, chondrogenny, adipogenny)	dobra	niska	komórki dorosłe	najczęściej stosowane u psów
Krew pępowinowa (UC-MS)	niska-umiarkowana	wysoki	dobry	bardzo dobra	bardzo niska	komórki młode	potencjalne źródło do terapii allogenicznych
Galareta Whartona (WJ-MS)	umiarkowana	bardzo wysoki	dobry	bardzo dobra	bardzo niska	komórki perinatalne	duży potencjał proliferacyjny
Łożysko / błony płodowe (P-MS)	umiarkowana	wysoki	dobry	bardzo dobra	bardzo niska	komórki perinatalne	łatwe pozyskanie po porodzie
Błona maziowa (SM-MS)	niska	umiarkowany	bardzo dobry chondrogenny	dobra	niska	komórki dorosłe	szczególnie interesujące w chorobach stawów

palne (19, 21). Stąd pojawienie się komercyjnych banków komórek macierzystych, które pobierane są od młodych, zdrowych zwierząt i mogą stanowić dla nich istotne wsparcie terapeutyczne na kolejne lata. Nie jest to jednak powszechna i tania procedura. W licznych badaniach eksperymentalnych oraz klinicznych wykazano dobrą tolerancję autologicznych MSC po podaniu dostawowym, doogniskowym lub dożylnym u zwierząt. Terapie takie były stosowane między innymi w leczeniu zmian zwyrodnieniowych stawów, uszkodzeń ścięgien oraz innych schorzeń ortopedycznych u koni i psów (7, 8, 13, 14).

Komórki allogeniczne

Komórki allogeniczne pochodzą od innego osobnika tego samego gatunku. Aktualnie jest to jeden z najważniejszych kierunków rozwoju weterynaryjnych terapii komórkowych (23, 33, 34, 59). Główną zaletą takiego podejścia jest możliwość przygotowania produktu typu off-the-shelf. Oznacza to, że komórki mogą być wcześniej wyizolowane, przebadane, namnożone, zamrożone i przechowywane w banku komórek. Dzięki temu terapia może zostać wdrożona znacznie szybciej niż w przypadku produktu autologicznego (23, 75). Taki model produkcji komórek umożliwia również tworzenie banków

MSC oraz opracowywanie standaryzowanych produktów komórkowych przeznaczonych do zastosowań klinicznych. Z tego względu komórki allogeniczne są najczęściej wykorzystywane w pracach nad komercyjnymi produktami komórkowymi rozwijanymi dla medycyny weterynaryjnej (46, 60). Zastosowanie allogenicznych MSC umożliwia także większą standaryzację produktu komórkowego. W procesie kwalifikacji można wybrać młodych, zdrowych dawców o korzystnych właściwościach biologicznych komórek, co pozwala ograniczyć część zmienności charakterystycznej dla materiału autologicznego (22, 23, 60, 75). W praktyce coraz częściej rozwijane są banki komórek pochodzących od wyselekcjonowanych dawców, szczególnie z tkanek okołoporodowych oraz od młodych zwierząt (43, 75, 76). Istotnym ograniczeniem terapii allogenicznej pozostaje jednak ryzyko immunogenności. Przez wiele lat MSC uważano za komórki o właściwościach immunologicznie uprzywilejowanych. Obecnie wiadomo jednak, że mogą one wywoływać odpowiedź immunologiczną. Jest to szczególnie obserwowane w przypadku powtórnych podań lub niezgodności w zakresie cząsteczek zgodności tkankowej MHC (17, 20). W badaniach eksperymentalnych oraz klinicznych opisano między innymi ekspresję

MHC II przez część końskich MSC oraz powstawanie przeciwciał po podaniu allogenicznych komórek u koni (17, 48, 52, 64). W niektórych badaniach obserwowano również reakcje miejscowe po wielokrotnym podaniu komórek, co wskazuje na możliwość rozwinięcia odpowiedzi immunologicznej wobec allogenicznych MSC (40, 52). W przypadku innych gatunków ryzyko to wydaje się jednak mniejsze, a wiele badań wskazuje na dobrą tolerancję takich terapii. Nie oznacza to jednak, że terapia allogeniczna jest z założenia niebezpieczna. W licznych badaniach klinicznych wykazano dobrą tolerancję allogenicznych MSC u psów i koni, zwłaszcza w leczeniu chorób układu ruchu, takich jak zmiany zwyrodnieniowe stawów czy uszkodzenia, jednak podkreślić należy, że bezpieczeństwo terapii zależy od wielu czynników (8). Znaczenie mają między innymi źródło komórek, ich stan różnicowania, liczba podań, droga podania, dopasowanie dawca-biorca oraz warunki hodowli komórkowej (1, 14, 15, 75). Z tego względu komórki allogeniczne wymagają szczególnie starannej kwalifikacji dawcy, obejmującej szczegółowy wywiad, badanie kliniczne oraz badania w kierunku chorób zakaźnych. Konieczna jest także rygorystyczna kontrola jakości produktu komórkowego na etapie hodowli i przygotowania do zastosowania klinicznego.

Komórki ksenogeniczne

Komórki ksenogeniczne pochodzą od osobnika należącego do innego gatunku. Takie podejście jest stosunkowo rzadkie i w weterynarii ma obecnie głównie znaczenie eksperymentalne (60). W literaturze opisano różne modele badań z wykorzystaniem komórek ksenogenicznych, między innymi u myszy, szczurów, królików, psów oraz naczelnych (1, 55, 56, 60). W wielu badaniach komórki pochodzące od jednego gatunku wykorzystywano w modelach chorób u innego gatunku w celu oceny ich właściwości regeneracyjnych oraz immunomodulacyjnych (1, 60). Modele ksenogeniczne są szczególnie często stosowane w badaniach przedklinicznych. Umożliwiają one analizę mechanizmów działania MSC, takich jak modulacja odpowiedzi immunologicznej, wydzielanie czynników parakrynych oraz stymulowanie procesów regeneracyjnych w uszkodzonych tkankach (1, 12, 29). W badaniach eksperymentalnych analizowano między innymi wpływ ksenogenicznych MSC na regenerację tkanki kostnej, naprawę chrząstki stawowej, leczenie uszkodzeń rdzenia kręgowego oraz regenerację mięśnia sercowego (12, 69). Teoretyczną zaletą takiego podejścia jest szeroka dostępność materiału biologicznego oraz możliwość opracowania wysoko wystandaryzowanych produktów komórkowych. W przypadku modeli eksperymentalnych pozwala to także na łatwiejsze porównywanie wyników badań prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych (12, 29). W praktyce jednak bariera immunologiczna oraz obawy dotyczące bezpieczeństwa biologicznego są znacznie większe niż w przypadku terapii allogenicznych (60, 69). Ryzyko związane z zastosowaniem komórek ksenogenicznych obejmuje przede wszystkim możliwość odrzucenia komórek przez układ odpornościowy biorcy. Ponadto możliwe jest (potencjalnie) przeniesienie patogenów międzygatunkowych. Dodatkowym ograniczeniem mogą być różnice biologiczne pomiędzy gatunkami, które mogą wpływać na przeżywalność komórek po podaniu oraz na ich właściwości immunomodulacyjne i regeneracyjne (55, 56, 60). Z tych powodów zastosowanie ksenogenicznych MSC w rutynowej praktyce weterynaryjnej pozostaje obecnie ograniczone. Podstawowe różnice pomiędzy terapiami autologicznymi, allogenicznymi i ksenogenicznymi przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Podział terapii z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych w zależności od relacji pomiędzy dawcą a biorcą komórek.

Różnice te dotyczą przede wszystkim ryzyka immunologicznego, dostępności materiału biologicznego oraz możliwości standaryzacji produktu komórkowego.

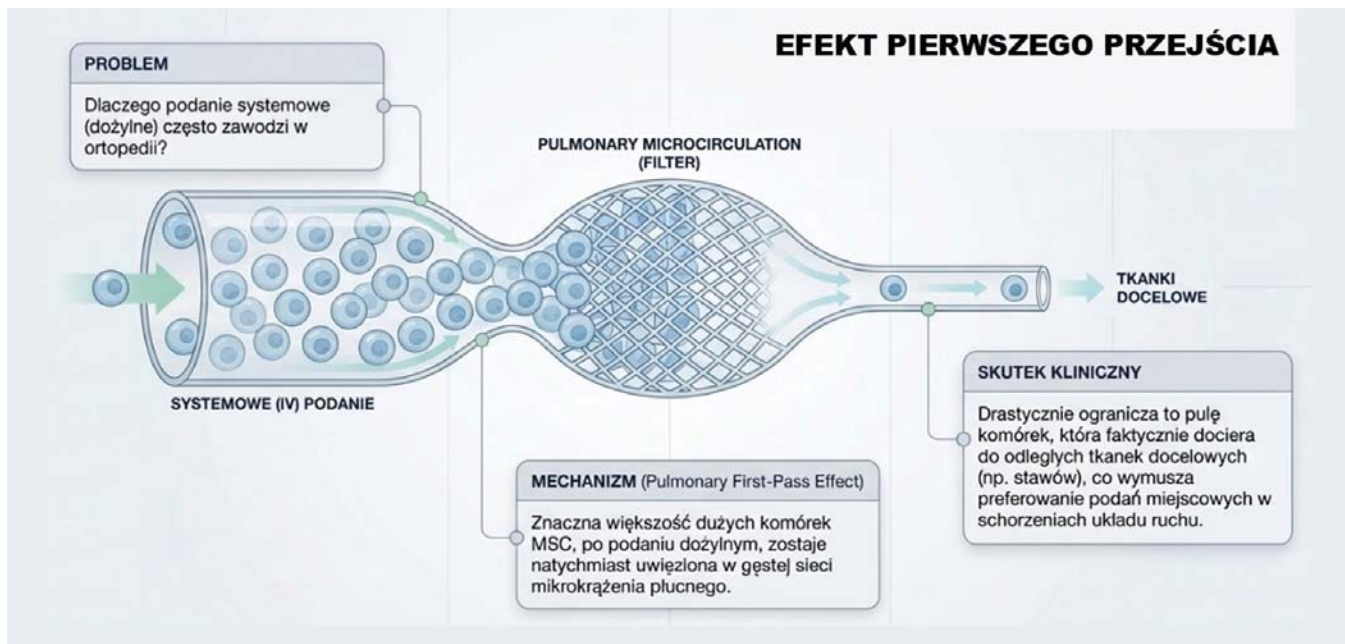
Cecha	Autologiczne MSC	Allogeniczne MSC	Ksenogeniczne MSC
Dawca	ten sam osobnik	osobnik tego samego gatunku	osobnik innego gatunku
Ryzyko immunologiczne	bardzo niskie	niskie–umiarkowane	wysokie
Dostępność materiału	ograniczona	dobra	bardzo dobra
Czas przygotowania terapii	długi	krótki	krótki
Możliwość standaryzacji	ograniczona	dobra	potencjalnie bardzo dobra
Zastosowanie kliniczne	szerokie	rosnące	głównie badawcze

Drogi podania mezenchymalnych komórek macierzystych

Skuteczność terapii z wykorzystaniem MSC zależy nie tylko od właściwości biologicznych samych komórek, ale także od sposobu ich podania. Wybór drogi podania może wpływać na przeżywalność komórek, ich dystrybucję w organizmie oraz zdolność do oddziaływania na tkanki objęte procesem chorobowym (1, 29, 34, 35, 57, 69). W weterynarii stosuje się kilka podstawowych dróg podania MSC, w tym: podanie miejscowe, dostawowe, dożylnie oraz w niektórych przypadkach także podanie dotętnicze lub doogniskowe (46, 75). Jedną z najczęściej stosowanych metod jest podanie miejscowe lub doogniskowe. W tym przypadku komórki wprowadza się bezpośrednio w obręb uszkodzonej tkanki. Takie podejście jest szeroko wykorzystywane w leczeniu chorób ortopedycznych u koni, takich jak uszkodzenia ścięgien czy więzadeł. Podanie miejscowe pozwala na uzyskanie wysokiego stężenia komórek w miejscu uszkodzenia oraz ogranicza ich rozprzieszenie w organizmie (16, 31). Drugą często stosowaną drogą jest podanie dostawowe. Metoda ta jest szczególnie powszechna w leczeniu chorób zwyrodnieniowych stawów u psów i koni. Bezpośrednie podanie MSC do jamy stawowej umożliwia ich oddziaływanie na tkanki stawu, w tym chrząstkę stawową, błonę maziową oraz struktury okołostawowe. W badaniach eksperymentalnych i klinicznych wykazano, że takie podanie może prowadzić do zmniejsze-

nia stanu zapalnego oraz poprawy funkcji stawu (6, 7, 37, 42, 51). W niektórych przypadkach stosuje się również podanie systemowe, najczęściej drogą dożylną. Takie podejście pozwala na dystrybucję komórek w całym organizmie i jest wykorzystywane przede wszystkim w chorobach o charakterze ogólnoustrojowym lub zapalnym (18). Należy jednak pamiętać, że po podaniu dożylnym znaczna część komórek może ulec zatrzymaniu w mikrokrążeniu płucnym, co ogranicza ich dostępność w innych tkankach (1, 29, 57). Zjawisko to określane jest jako tzw. pulmonary first-pass effect (powoduje zatrzymywanie znacznej części komórek w mikrokrążeniu płucnym) stanowi jedno z głównych ograniczeń systemowego podania MSC (21) (Rycina 3). W badaniach eksperymentalnych analizowano także inne drogi podania, takie jak podanie dotętnicze, dokanałowe, dokanałowe do rdzenia kręgowego czy dojamowe. Metody te są jednak stosowane głównie w modelach badawczych lub w wybranych wskazaniach klinicznych (29, 75). Wybór konkretnej metody zależy przede wszystkim od rodzaju choroby, lokalizacji uszkodzenia oraz celu terapii.

Dynamiczny rozwój badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi powoduje, że terapie komórkowe coraz częściej znajdują zastosowanie w medycynie weterynaryjnej. Choć wiele aspektów związanych z biologicznymi właściwościami MSC, ich źródłami oraz drogami podania zostało już dobrze opisanych, wciąż pozostaje wiele zagadnień



Rycina 3. Efekt pierwszego przejścia (pulmonary first-pass effect) po dożylnym podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych. Po podaniu systemowym znaczna część MSC zostaje zatrzymana w mikrokrążeniu płucnym ze względu na ich stosunkowo duży rozmiar oraz właściwości adhezyjne. Zjawisko to istotnie ogranicza liczbę komórek docierających do odległych tkanek docelowych, takich jak stawy czy uszkodzone tkanki mięśniowo-szkieletowe, co w praktyce klinicznej często uzasadnia stosowanie podań miejscowych.

wymagających dalszych badań i standaryzacji. W szczególności dotyczy to praktycznego wykorzystania tych terapii w konkretnych jednostkach chorobowych u różnych gatunków zwierząt.

W kolejnych częściach cyklu zostaną omówione aktualne możliwości zastosowania MSC w leczeniu chorób u psów, kotów, koni i innych zwierząt gospodarskich, ze szczególnym uwzględnieniem schorzeń układu ruchu, chorób neurologicznych oraz wybranych wskazań internistycznych. Coraz większe zainteresowanie budzą również strategie terapeutyczne określane jako cell-free. Są one oparte na wykorzystaniu produktów wydzielanych przez MSC, takich jak sekretom czy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Kierunki te mogą w przyszłości istotnie zmienić sposób wykorzystania biologicznych terapii regeneracyjnych w weterynarii. ●

Piśmiennictwo

- Ankrum J. A., Ong J. F., Karp J. M.: Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. „Nat. Biotechnol.”, 2014, 32, 252-260.
- Arzi B., Clark K. C., Sundaram A., Spriet M., Verstraete F. J., Walker N. J., Borjesson D. L.: Therapeutic efficacy of fresh, allogeneic mesenchymal stem cells for severe refractory feline chronic gingivostomatitis. „Stem Cells Transl. Med.”, 2017, 6, 1710-1722.
- Barberini D. J., Freitas N. P. P., Magnoni M. S., Maia L., Listoni A. J., Heckler M. C., Amorim R. M.: Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. „Stem Cell Res. Ther.”, 2014, 5, 25.
- Barboni B., Russo V., Berardinelli P., Mauro A., Valbonetti L., Sanyal H., Mattioli, M.: Placental stem

cells from domestic animals: translational potential and clinical relevance. „Cell Transplant.”, 2018, 27, 93-116.

- Barboni B., Russo V., Berardinelli P., Muttini A., Mattioli, M.: 12 Applications of Placenta-Derived Cells in Veterinary Medicine. „Placenta The Tree of Life”, 2016, 217.
- Barrachina L., Remacha A. R., Romero A., Vázquez F. J., Albareda J., Prades M., Rodellar, C.: Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. „Vet. Immunol. Immunopathol.”, 2016, 171, 57-65.
- Black L. L., Gaynor J., Adams C., Dhupa S., Sams A. E., Taylor R., Harman, R.: 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. „Vet. Ther.”, 2008, 9, 192-200.
- Broeckx S. Y., Martens A. M., Bertone A. L., Van Brantegem L., Duchateau L., Van Hecke L., Spaas J. H.: The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: a randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. „Equine Vet. J.”, 2019, 51, 787-794.
- Brondeel C., Pauwelyn G., De Bakker E., Saunders J., Samoy Y., Spaas J. H.: Mesenchymal stem cell therapy in canine osteoarthritis research: „experientia docet” experience will teach us). „Front. Vet. Sci.”, 2021, 8, 668881.
- Caplan A. I.: Mesenchymal stem cells. „J. Orthop. Res.”, 1991, 9, 641-650.
- Caplan A. I.: Mesenchymal stem cells: time to change the name!. „Stem Cells Transl. Med.”, 2017, 6, 1445-1451.
- Caplan A. I., Dennis J. E.: Mesenchymal stem cells as trophic mediators. „J. Cell. Biochem.”, 2006, 98, 1076-1084.
- Carrade D. D., Borjesson D. L.: Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. „Comp. Med.”, 2013, 63, 207-217.
- Carrade D. D., Affolter V. K., Outerbridge C. A., Watson J. L., Galuppo L. D., Buerchler S., 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.

- Carrade D. D., Owens S. D., Galuppo L. D., Vidal M. A., Ferraro G. L., Librach F., Borjesson D. L.: Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. „Cytotherapy”, 2011, 13, 419-430.
- Carvalho A. M., Badial P. R., Álvarez L. E. C., Yamada A. L. M., Borges A. S., Deffune E., Garcia Alves A. L.: Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. „Stem Cell Res. Ther.”, 2013, 4, 85.
- Cequier A., Vázquez F. J., Vitoria A., Bernad E., Fuente S., Serrano M. B., Barrachina, L.: The systemic cellular immune response against allogeneic mesenchymal stem cells is influenced by inflammation, differentiation and MHC compatibility: in vivo study in the horse. „Front. Vet. Sci.”, 2024, 11, 1391872.
- Cho H. S., Song W. J., Nam A., Li Q., An J. H., Ahn J. O. i wsp., Youn H. Y.: Intravenous injection of allogeneic canine mesenchymal stem cells in 40 client-owned dogs: a safety assessment in veterinary clinical trials. „BMC Vet. Res.”, 2024, 20, 375.
- Colbath A. C., Dow S. W., Hopkins L. S., Phillips J. N., McIlwraith C. W., Goodrich L. R.: Allogeneic vs. autologous intra-articular mesenchymal stem cell injection within normal horses: Clinical and cytological comparisons suggest safety. „Equine Vet. J.”, 2020, 52, 144-151.
- Depuydt E., Broeckx S. Y., Chiers K., Patruno M., Da Dalt L., Duchateau L., Spaas J. H.: Cellular and humoral immunogenicity investigation of single and repeated allogeneic tenogenic primed mesenchymal stem cell treatments in horses suffering from tendon injuries. „Front. Vet. Sci.”, 2022, 8, 789293.
- Devireddy L. R., Boxer L., Myers M. J., Skasko M., Screven, R.: Questions and challenges in the development of mesenchymal stromal/stem cell-based therapies in veterinary medicine. „Tissue Engineering Part B: Reviews”, 2017, 23, 462-470.
- Dias I. E., Cardoso D. F., Soares C. S., Barros L. C., Viegas C. A., Carvalho P. P., Dias I. R.: Clinical application of mesenchymal stem cells therapy in musculoskeletal injuries in dogs—A review of the scientific literature. „Open Vet. J.”, 2021, 11, 188.
- Dias I. E., Pinto P. O., Barros L. C., Viegas C. A., Dias I. R., Carvalho P. P.: Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? „BMC Vet. Res.”, 2019, 15, 358.

24. Dissanayaka W. L., Zhu X., Zhang C., Jin, L: Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. „J. Endod.“, 2011, 37, 1074-1080.
25. Dominici M. L. B. K., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Horwitz E. M.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. „Cytotherapy“, 2006, 8, 315-317.
26. Fraser J. K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M. H.: Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. „Trends Biotechnol.“, 2006, 24, 150-154.
27. Friedenstein A. J., Gorskaja U. F., Kulagina, N.: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. „Exp. Hematol.“, 1976, 4, 267-274.
28. Gale A. L., Linardi R. L., McClung G., Mammone R. M., Ortvad K. F.: Comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. „Front. Vet. Sci.“, 2019, 6, 178.
29. Galipeau J., Sensébé, L.: Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. „Cell Stem Cell“, 2018, 22, 824-833.
30. Gao F., Chiu S. M., Motan D. A. L., Zhang Z., Chen L., Ji H. L., Lian, Q.: Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. „Cell Death Dis.“, 2016, 7, e2062-e2062.
31. Geburek F., Roggel F., van Schie H. T., Beineke A., Estrada R., Weber K., Stadler P. M.: Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells: a controlled experimental trial. „Stem Cell Res. Ther.“, 2017, 8, 129.
32. Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. „Circ. Res.“, 2007, 100, 1249-1260.
33. Guercio A., Di Bella S., Casella S., Di Marco P., Russo C., Piccione, G.: Canine mesenchymal stem cells (MSC s): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. „Cell Biol. Int.“, 2013, 37, 789-798.
34. Gugjoo M. B., Sharma G. T.: Equine mesenchymal stem cells: properties, sources, characterization, and potential therapeutic applications. „J. Equine Vet. Sci.“, 2019, 72, 16-27.
35. Gugjoo M. B., Chandra V., Wani M. Y., Dhama K., Sharma G. T.: Mesenchymal stem cell research in veterinary medicine. „Curr. Stem Cell Res. Ther.“, 2018, 13, 645-657.
36. Hardy, S.: Mesenchymal stem cells as trophic mediators of neural differentiation. Praca doktorska, Durham University, 2010.
37. Harman R., Carlson K., Gaynor J., Gustafson S., Dhupa S., Clement K., Adams, C.: A prospective, randomized, masked, and placebo-controlled efficacy study of intraarticular allogeneic adipose stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs. „Front. Vet. Sci.“, 2016, 3, 81.
38. Homayounfar N., Verma P., Nosrat A., El Ayachi I., Yu Z., Romberg E., Fouad A. F.: Isolation, characterization, and differentiation of dental pulp stem cells in ferrets. „J. Endod.“, 2016, 42, 418-424.
39. Iacono E., Brunori L., Pirrone A., Pagliaro P. P., Ricci F., Tazzari P. L., Merlo, B.: Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. „Reproduction“, 2012, 143, 455-468.
40. Joswig A. J., Mitchell A., Cummings K. J., Levine G. J., Gregory C. A., Smith III R., Watts A. E.: Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. „Stem Cell Res. Ther.“, 2017, 8, 42.
41. Kasashima 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.
42. Kim S. E., Pozzi A., Yeh J. C., Lopez-Velazquez M., Au Yong J. A., Townsend S., Petrucci, K.: Intra-articular umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy for chronic elbow osteoarthritis in dogs: a double-blinded, placebo-controlled clinical trial. „Front. Vet. Sci.“, 2019, 6, 474.
43. Kisiday J. D., Kopesky P. W., Evans C. H., Grodzinsky A. J., McIlwraith C. W., Frisbie D. D.: Evaluation of adult equine bone marrow and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. „J. Orthop. Res.“, 2008, 26, 322-331.
44. Lange-Consiglio A., Corradetti B., Bizzaro D., Magatti M., Ressel L., Tassan S., Cremonesi, F.: Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. „J. Tissue Eng. Regen. Med.“, 2012, 6, 622-635.
45. Levy O., Kuai R., Siren E. M., Bhere D., Milton Y., Nissar N., Karp J. M.: Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. „Sci. Adv.“, 2020, 6, eaba6884.
46. Markoski M. M.: Advances in the use of stem cells in veterinary medicine: from basic research to clinical practice. „Scientifica“, 2016, 2016, 4516920.
47. Mizuno, H.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. „J. Oral Biosci.“, 2013, 55, 132-136.
48. Mocchi M., Dotti S., Del Bue M., Villa R., Bari E., Perteghella S., Grolli, S.: Veterinary regenerative medicine for musculoskeletal disorders: can mesenchymal stem/stromal cells and their secretome be the new frontier? „Cells“, 2020, 9, 1453.
49. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat, V.: Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. „Cytometry A“, 2018, 93, 19-31.
50. Najji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma, N.: Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. „Cell. Mol. Life Sci.“, 2019, 76, 3323-3348.
51. Olsson D. C., Teixeira B. L., Jeremias T. D. S., Réus J. C., Canto G. D. L., Porporatti A. L., Trentin A. G.: Administration of mesenchymal stem cells from adipose tissue at the hip joint of dogs with osteoarthritis: a systematic review. „Res. Vet. Sci.“, 2021, 135, 495-503.
52. Pezzanite L. M., Fortier L. A., Antczak D. F., Cassano J. M., Brosnahan M. M., Miller D., Schnabel L. V.: Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. „Stem Cell Res. Ther.“, 2015, 6, 54.
53. Phinney D. G., Pittenger M. F.: Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. „Stem Cells“, 2017, 35, 851-858.
54. Picazo R. A., Rojo C., Rodríguez-Quiros J., González-Gil, A.: Current Advances in Mesenchymal Stem Cell Therapies Applied to Wounds and Skin, Eye, and Neuromuscular Diseases in Companion Animals. „Animals“, 2024, 14, 1363. <https://doi.org/10.3390/ani14091363>.
55. Pig J. H., Ishihara A., Wellman M. L., Russell D. S., Bertone A. L.: Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. „Vet. Comp. Orthop. Traumatol.“, 2013, 26, 453-460.
56. Pigott J. H., Ishihara A., Wellman M. L., Russell D. S., Bertone A. L.: Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. „Vet. Immunol. Immunopathol.“, 2013, 156 (1-2), 99-106.
57. Pittenger M. F., Discher D. E., Péault B. M., Phinney D. G., Hare J. M., Caplan A. I.: Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. „NPJ Regen. Med.“, 2019, 4, 22.
58. Prado A. A. F., Favaron P. O., da Silva L. C. L. C., Baccarin R. Y. A., Migliano M. A., Maria D. A.: Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. „BMC Vet. Res.“, 2015, 11, 281.
59. Prządka P., Buczak K., Frejlich E., Gąsior L., Suliga K., Kielbowicz, Z.: The role of mesenchymal stem cells (MSCs) in veterinary medicine and their use in musculoskeletal disorders. „Biomolecules“, 2021, 11, 1141.
60. Punzon E., García-Castillo M., Rico M. A., Padilla L., Pradera, A.: Local, systemic and immunologic safety comparison between xenogeneic equine umbilical cord mesenchymal stem cells, allogeneic canine adipose mesenchymal stem cells and placebo: A randomized controlled trial. „Front. Vet. Sci.“, 2023, 10, 1098029.
61. Quimby J. M., Webb T. L., Randall E., Marolf A., Valdes-Martinez A., Dow S. W.: Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. „J. Feline Med. Surg.“, 2016, 18, 165-171.
62. Rashid U., Yousaf A., Yaqoob M., Saba E., Moaen-ud-Din M., Waseem S., Sandhu M. A.: Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources. „BMC Vet. Res.“, 2021, 17, 388.
63. Rombouts W. J. C., Ploemacher R. E.: Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. „Leukemia“, 2003, 17, 160-170.
64. Schnabel L. V., Pezzanite L. M., Antczak D. F., Philippe M. J. B., Fortier L. A.: Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. „Stem Cell Res. Ther.“, 2014, 5, 13.
65. Seo M. S., Kang K. K., Oh S. K., Sung S. E., Kim K. S., Kwon Y. S., Yun, S.: Isolation and characterization of feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. „Veterinary Sciences“, 2021, 8, 24.
66. Seo M. S., Park S. B., Kim H. S., Kang J. G., Chae J. S., Kang K. S.: Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. „J. Vet. Sci.“, 2013, 14, 151.
67. Smith R. K. W., Werling N. J., Dakin S. G., Alam R., Goodship A. E., Dudhia, J.: Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. „PLoS One“, 2013, 8, e75697.
68. Soltero-Rivera M., Hart S., Blandino A., Vapniarsky N., Arzi, B.: Mesenchymal stromal cell therapy for feline chronic gingivostomatitis: long term experience. „Front. Vet. Sci.“, 2023, 10, 1171922.
69. Squillaro T., Peluso G., Galderisi U.: Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. „Cell Transplant.“, 2016, 25, 829-848.
70. Teunissen M., Iwsp.: Synovial membrane-derived mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic joints in dogs possess lower chondrogenic-, and higher osteogenic capacity compared to normal joints. „Stem Cell Res. Ther.“, 2022, 13, 457.
71. Troyer D. L., Weiss M.: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. „Stem Cells“, 2008, 26, 591-599.
72. Uccelli A., Moretta L., Pistoia, V.: Mesenchymal stem cells in health and disease. „Nat. Rev. Immunol.“, 2008, 8, 726-736.
73. Utumi P. H., Fracaro L., Senegaglia A. C., Fragoso F. Y. I., Miyasaki D. M., Rebelatto C. L. K., Junior J. A. V.: Canine dental pulp and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as alternative sources for cell therapy in dogs. „Res. Vet. Sci.“, 2021, 140, 117-124.
74. Vízoso F. J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R.: Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. „Int. J. Mol. Sci.“, 2017, 18, 1852.
75. Voga M., Adamic N., Vengust M., Majdic, G.: Stem cells in veterinary medicine—current state and treatment options. „Front. Vet. Sci.“, 2020, 7, 278.
76. Williams Z. J., Pezzanite L. M., Chow L., Rockow M., Dow S. W.: Evaluation of stem-cell therapies in companion animal disease models: a concise review (2015-2023). „Stem Cells“, 2024, 42, 677-705.
77. Yang V. K., Meola D. M., Davis A., Barton B., Hoffman A. M.: Intravenous administration of allogeneic Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with congestive heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease. „Am. J. Vet. Res.“, 2021, 82, 487-493.
78. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Hedrick M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. „Mol. Biol. Cell“, 2002, 13, 4279-4295.

Karolina Aleksandra Chodkowska,
e-mail: k.chodkowska82@gmail.com