



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška UŠENIČNIK

**TERAPEVTSKA UPORABA MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA PRI
PSU (*Canis familiaris*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška UŠENIČNIK

**TERAPEVTSKA UPORABA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC
IZ MAŠČOBNEGA TKIVA PRI PSU (*Canis familiaris*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**THERAPEUTIC USE OF CANINE (*Canis familiaris*) ADIPOSE-
DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Peter Dovč.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 13. september 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602.9:591.81(043.2)
- KG biotehnologija/mezenhimске matične celice/maščobno tkivo/terapevtska uporaba/biomateriali/pes
- AV UŠENIČNIK, Urška
- SA DOVČ, Peter (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2017
- IN TERAPEVTSKA UPORABA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA PRI PSU (*Canis familiaris*)
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 18 str., 1 sl, 36 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Prikazan je pomen uporabe mezenhimskih matičnih celic v terapiji različnih boleznih in poškodb kjer zaradi njihovega imunomodulatornega, antiapoptotičnega delovanja in diferenciacijskega potenciala pripomorejo k hitrejši regeneraciji. Za njihovo uspešno uporabo je potrebno znanje o postopkih izolacije, karakterizacije, diferenciacije in shranjevanja celic, ter o različnih dostavnih sistemih, ki se razlikujejo med različnimi terapijami. Diplomsko delo prav tako vsebuje prednosti in slabosti uporabe biomaterialov kot nosilcev pri različnih načinih aplikacije celic, ki lahko zaradi odprtega sistema pripomorejo k njihovemu boljšemu nadzoru in diferenciaciji. Na koncu je delovanje mezenhimskih matičnih celic pri psu prikazano na primeru osteoartritisa, periodontalnih boleznih, regeneracije kože, kroničnih poškodb, kroničnega vnetja črevesja in tumorja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602.9:591.81(043.2)
- CX biotechnology/mesenchymal stem cells/adipose tissue/therapeutic use/biomaterials/canine
- AU UŠENIČNIK, Urška
- AA DOVČ, Peter (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2017
- TI THERAPEUTIC USE OF CANINE (*Canis familiaris*) ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 18 p., 1 fig., 36 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The importance of therapeutic use of mesenchymal stem cells is outlined through their immunomodulatory and antiapoptotic effects as well as differentiation potential, which all contribute to faster regeneration. For successful therapeutic use the knowledge about isolation of mesenchymal stem cells, their characterization, differentiation and preservation is needed. Due to their specific effects different application systems which are adapted to different therapies play an important role. Strengths and weaknesses of biomaterials for different applications are discussed as they can be beneficial because of better control over the cells and their differentiation in an open system. At the end the therapeutic effect of mesenchymal stem cells are presented in the case of osteoarthritis, periodontal disease, skin regeneration, chronic wounds, chronic bowel disease and tumor.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
1.1 MATIČNE CELICE	1
1.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE	1
2 IZOLACIJA	2
3 KARAKTERIZACIJA	3
4 DIFERENCIACIJA	4
4.1 OSTEOGENEZA	4
4.2 ADIPOGENEZA	5
4.3 HONDROGENEZA	5
4.4 MIOGENEZA	5
4.5 NEVROGENEZA	6
5 TERAPEVTSKA UPORABA	6
5.1 DELOVANJE	6
5.2 DOSTAVNI SISTEM	7
5.2.1 Brez uporabe biomaterialov	7
5.2.1.1 Celična suspenzija	7
5.2.1.2 Konstrukcija celičnih plasti	8
5.2.1.3 Celični peleti ali mikrotkiva	8
5.2.2 Uporaba biomaterialov	9
5.2.2.1 Biomateriali naravnega izvora	9
5.2.2.2 Sintetični biomateriali	10
5.3 OSTEOARTRITIS	10
5.4 PERIODONTITIS	11
5.5 REGENERACIJA KOŽE	12
5.6 KRONIČNA POŠKODBA HRBTENJAČE	12
5.7 KRONIČNA VNETNA ČREVESNA BOLEZEN	13
5.8 TUMOR	13
6 SKLEPI	14
7 VIRI	14

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Mezenhimske matične celice izolirane iz maščobnega tkiva in njihova fibroblastom podobna morfologija	4

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADSC – mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva (ang. adipose derived mesenchymal stem cells)

BMP – ang. bone morphogenetic protein

BMSC – mezenhimske matične celice iz kostnega mozga (ang. bone marrow derived mesenchymal stem cells)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium

MSC – mezenhimske matične celice (ang. mesenchymal stem cells)

ESC – embrionalne matične celice (ang. embryonic stem cells)

FBS – ang. fetal bovine serum

HGF – hepatocyte growth factor

IBMX – 3-isobutil-1-metilksantin

IDO – indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase

IL – interlevkin

iPSC – inducirane pluripotentne matične celice (ang. induced pluripotent stem cells)

NGF – ang. nerve growth factor

nHA – nano hidroksiapetit

NT-3 – nevrotrofin-3

PBS – ang. phosphate-buffered saline

PGE – prostaglandin E

PLA – ang. polylactic acid

PRP – ang. platelet-rich plasma

TGF – transformirajoči rastni faktor (ang. transforming growth factor)

TNF – tumor necrosis factor

1 UVOD

Raziskovanje in terapevtska uporaba mezenhimskih matičnih celic (MSC) je zaradi svojih prednosti pred drugimi terapijami v porastu. Zanimivo odkritje MSC, ki se nahajajo v ožilju maščobnega tkiva, je odprlo vrata terapiji zaradi lažjega pridobivanja MSC, v primerjavi s kostnim mozgom, in njihove raznovrstne uporabnosti, ki delno izvira iz njihovih še vedno nepopolno raziskanih lastnosti.

1.1 MATIČNE CELICE

Matične celice razdelimo na embrionalne matične celice (ESC), ki so pridobljene iz notranje celične mase blastociste, ter postnatalne oz. odrasle matične celice, ki se nahajajo v različnih tkivih (Zuk, 2010), z namenom regeneracije ob senescenci in poškodbah organizma (Young in Black, 2004). Glede na njihovo plastičnost oz. sposobnost diferenciacije jih delimo na unipotentne, bipotentne, multipotentne, pluripotentne in totipotentne matične celice (Young in Black, 2004).

Iz embrionalnih tkiv lahko pridobimo, poleg ESC, tudi amnijske epitelijske celice, fetalne matične celice in matične celice iz popkovnične krvi. Prva dva tipa celic sta pluripotentna, torej so se celice zmožne diferencirati v večino celičnih vrst odraslega organizma, vendar nimajo več potenciala za razvoj trofoblasta, kar je značilno za totipotentne matične celice. Fetalne matične celice in matične celice iz popkovnične krvi pa so multipotentne, torej je njihov diferenciacijski potencial omejen na manjše število celičnih vrst (Jeras, 2007).

Odrasle matične celice glede na njihov izvor razdelimo na endodermalne, kamor na primer spadajo matične celice gastrointestinalnega trakta, pankreasa, urogenitalnega trakta in jetrne ovalne celice, mezodermalne, kot so matične celice pridobljene iz kostnega mozga, srca, krvotvorne in stromalne matične celice, ter na ektodermalne, ki so matične celice živčnega sistema, kože in oči (Jeras, 2007).

1.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

Obstoj MSC je prvi dokazal nemški patolog Julius Friedrich Cohnheim leta 1867, ki jih je takrat imenoval mezenhimske prekurzorske celice (Cohnheim, 1867, cit. po Knight in Hankenson, 2013). Njihova celična kultura je bila nato pridobljena v devetnajstem stoletju, ko jo je Alexander J. Friedenstein uspešno izoliral iz kostnega mozga, za katerega je trdil, da je rezervoar matičnih celic za obnovo mezenhimskih tkiv (Afanasyev in sod., 2009).

Uporaba MSC v terapevtske namene hitro narašča. Če primerjamo njihove lastnosti z ESC in induciranimi pluripotentnimi matičnimi celicami (iPSC) je ključna razlika v tvorbi teratomov, ki lahko nastanejo ob aplikaciji ostalih ostalih tipov matičnih celic ob nenadzorovani diferenciaciji, medtem ko se ob uporabi mezenhimskih matičnih celic temu izognemo. To izhaja iz razlike v njihovem razvojnem potencialu, kjer so ESC in iPSC pluripotentne, MSC pa multipotentne (Whitworth in Banks, 2014).

Matične celice izolirane iz maščobnega tkiva (ADSC) prav tako spadajo med MSC, ki imajo fibroblastom podobno morfolologijo in sposobnost pripenjanja na podlago. Da je maščobno tkivo prav tako vir MSC so pokazali Zuk in sod. (2002). Takrat znanim celicam PLA (ang. processed lipoaspirate) so dokazali isti diferenciacijski potencial, CD označevalce, izražanje genov in proteinov ter fenotip kot MSC izoliranim iz kostnega mozga. Poleg tega so bile sposobne izražati označevalce neurogenskega fenotipa (Zuk in sod., 2002). Tudi na podlagi drugih raziskav zato predvidevajo celo njihovo pluripotentnost in ne zgolj multipotentnost (Zuk, 2010).

ADSC se lahko diferencirajo v različne mezodermalne tipe celic (adipogene, miogene, osteogene in hondrogene celice), prav tako pa so pokazali možnost za njihovo pluripotentnost, saj lahko tudi vstopijo v proces neurogeneze, lahko tvorijo oligodendrocite, Schwannove celice in celice epidermalnega tipa, kar nam daje ogromno možnosti za terapevtsko uporabo v različnih tkivih (Zuk, 2010).

2 IZOLACIJA

Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva ne predstavlja problema kot pri MSC iz kostnega mozga (BMSC). Sam dokaj neinvaziven postopek pridobivanja podkožnega maščobnega tkiva opravi veterinar pod narkozo z biopsijo ali liposukcijo (Vieira in sod., 2010). V primerjavi s kostnim mozgom lahko iz maščobnega tkiva izoliramo večje število celic, ki se tudi hitreje množijo, kar je ključni faktor pri njihovem kasnejšem namnoževanju do zadostnega števila celic za aplikacijo, kar predvsem predstavlja problem pri višji starosti pacienta (Kang in sod., 2008).

Sama količina maščobe, ki je potrebna za izolacijo ADSC, je različna med posamezniki, saj je veliko dejavnikov, ki vplivajo na njihovo koncentracijo, uspele pa so tudi izolacije iz samo 100 μ l maščobnega tkiva (Vieira in sod., 2010). V primeru prebadanja kože za odvzem maščobnega tkiva je možnost okužbe večji v primerjavi s prerezom. Ta postopek je, da se izognemo morebitnemu dodatnemu posegu, v primeru potrebe po terapiji z matičnimi

celicami, najbolje opraviti med rutinskimi posegi kot sta kastracija in sterilizacija. Za samo odločitev je treba upoštevati ekonomski vidik, saj shranjevanje celic lahko predstavlja dodaten strošek.

Pridobljeno maščobno tkivo se spiramo s PBS pufrom z dodatkom antibiotikov (penicilin, streptomycin), da se znebimo krvnih celic. Za razgradnjo tkiva uporabimo kolagenazo, katere aktivnost ustavimo z DMEM gojiščem z dodanim 10% FBS. S centrifugiranjem pridobimo pelet, ki ga lahko s filtriranjem očistimo ostankov tkiva. Pridobljene celice nasadimo v gojitveno posodico z DMEM gojiščem ob dodatku 10% FBS. Po približno 24 do 48 urah, se MSC pritrdijo na podlago, s spiranjem s PBS pufrom pa odstranimo nepritrjene celice. Za presaditev celic uporabimo tripsin, da pa pridobimo posamezne celice, jih presajamo ob 70-80% konfluenci. Celice gojimo pri 37°C in 5% CO₂ v gojitvenem mediju (DMEM z dodatkom 10%FBS), za daljše shranjevanje pa jih shranjujemo v krioprezervacijskem mediju (10% dimetilsulfoksid, 10% DMEM, 80% FBS) v zamrzovalni posodi, ki nam omogoča ohlajanje 1°C na minuto, do -80°C. Naslednji dan jih za daljše shranjevanje lahko zamrznemo v tekočem dušiku (Vieria in sod., 2010).

3 KARAKTERIZACIJA

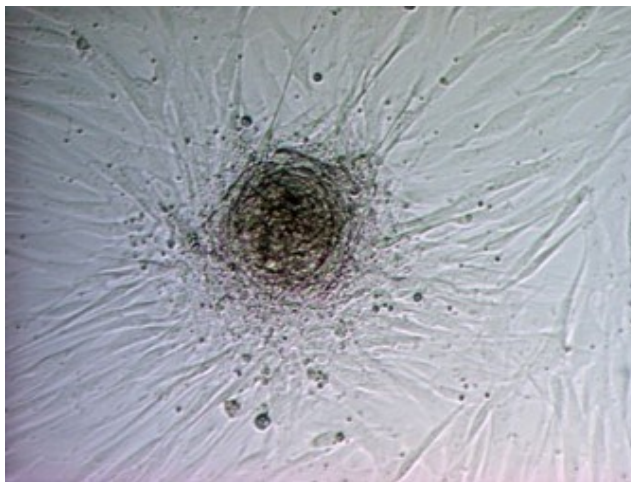
ISCT (International Society for Cellular Therapy) je leta 2006 predlagala minimalne kriterije za karakterizacijo človeških MSC:

- sposobnost pritrjevanja na plastično površino,
- izražanje specifičnih površinskih označevalcev in
- multipotentna sposobnost diferenciacije.

Za izražanje specifičnih površinskih označevalcev je značilno, da več kot 95% populacije celic izraža CD105 (endoglin), CD73 (ekto 5 nukleotidaza) in CD90 (Thy-1), ne izražajo pa (oz. izraža manj kot 2% populacije celic) označevalcev CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α ali CD19 in HLA razreda II, ki so značilni za hematopoetske celice. CD45 je značilen za levkocite, CD 34 označuje primitivne progenitorje hematopoetskih celic in endoteljskih celic, CD14 in CD11b sta označevalca značilna za monocite in makrofage, CD79 α in CD19 za B celice, HLA molekule pa so izražene v MSC stimuliranih z IFN- γ (Dominici in ost., 2006).

MSC karakteriziramo prav tako na podlagi značilne fibroblastom podobne morfologije. Poleg tega imajo sposobnost pripenjanja na podlago, rastejo v enocelični plasti ter imajo sposobnost diferenciacije v adipocite, osteocite, hondrocite in miocite v indukcijskem mediju. Za pasje MMC je značilna prisotnost označevalcev CD29, CD44 in CD90, ter odsotnost CD45, CD34, CD73 in MHC II (Ivanovska in sod., 2017).

Russell in sod. (2016) so ob primerjavi ADSC in BMSC ugotovili visoko izražanje CD29, CD44 in CD90 označevalcev, ter naknadno še označevalce iz nabora MHC I. Medtem ko so potrdili odsotnost označevalcev CD45 in MHC II, so zaznali nizko izražanje označevalcev CD73, CD8 in nizko izražanje CD4 (višje pri ADSC) ter CD34, ki so ga zaznali izključno pri ADSC.



Slika 1: Mezenhimske matične celice izolirane iz maščobnega tkiva in njihova fibroblastom podobna morfolologija (foto: Mohorič L., 2017)

4 DIFERENCIACIJA

4.1 OSTEOGENEZA

MSC preidejo v proces osteogeneze v indukcijskem mediju, ki vsebuje deksametazon, askorbinsko kislino in β -glicerofosfat (Yongsun in sod., 2016). Vendar je bilo dokazano, da je kombinacija deksametazona in askorbinske kisline slabša od proteina BMP-2 (ang. bone morphogenic protein 2) in askorbinske kisline (Volk in sod., 2012).

Birmingham in sod. (2012) so v svoji raziskavi uspeli inducirati diferenciacijo MSC v osteoblaste brez uporabe induktivnih faktorjev. To so dosegli s kokultivacijo osteoblastov, osteocit in MSC in posledično s posnemanjem naravnega kostnega okolja preko primernih biokemijskih faktorjev, ki jih sintetizirajo kostne celice. Osteoblasti se na podlagi aktivnosti alkalne fosfataze in mineralizacije izkažejo za počasnejšega induktorja osteogeneze v primerjavi z osteociti.

4.2 ADIPOGENEZA

Scott in sod. (2011) so preko analize objavljenih člankov na temo diferenciacije MSC v adipocite zaključili, da se v induktivnem mediju za adipogenezo ponavadi nahajajo tri ključne komponentne – inzulin, deksametazon in 3-izobutil-1-metil-ksantin (IBMX), katerih koncentracija lahko med vrstami in raziskavami niha. Inzulin inducira proliferacijo in diferenciacijo preadipocitov, ki se lahko naprej diferencirajo v adipocite. Deksametazon lahko poleg adipogeneze inducira tudi osteogenezo, kar pa je odvisno od celic, časa izpostavljenosti in predvsem koncentracije. IBMX skupaj z deksametazonom inducira adipogenezo preko PPAR γ receptorja in inducira transkripcijske faktorje, ki so pomembni za rast in diferenciacijo. Značilen je tudi dodatek indometacina v medij za ADSC.

4.3 HONDROGENEZA

Za stimulacijo MSC v hondrogenozo, je značilno gojenje celic pri visoki gostoti, kar dosežemo z mikropeleti, kar spominja na začetno zgoščevanje celic pri razvoju hrustanca med razvojem zarodka. Indukcijski medij vsebuje TGF- β , deksametazon in askorbinsko kislino. Prav tako sta značilni molekuli FGF-2 in BMP, ki spadata pod TGF- β in da stimulirata hondrogenozo. MSC lahko stimuliramo tudi preko genske modifikacije z vnosom genov za BMP-4 ali TGF- β ter z nizko koncentracijo kisika (hipoksija). Fenotipska markerja, katerih izražanje se poveča ob diferenciaciji sta Sox-9 in kolagen tipa II (Wei in sod., 2007).

Russell in sod. (2016) poročajo o neuspešni diferenciaciji ADSC. Pelet 250000 celic so gojili 21 dni v indukcijskem mediju pri različnih koncentracijah BMP-2, vendar se lakune vseeno niso pojavile, kar bi nakazovalo strukturo hrustančnega tkiva, pojavila pa se je nekroza celic.

4.4 MIOGENEZA

Za indukcijo miogeneze uporabljamo ali indukcijski medij, ki pri večini primerov vsebuje kombinacijo deksametazona in hidrokortizona na podlagi Zuk in sod. (2001), celično kokultivacijo z mioblasti, ali celo z mehanskimi vplivi (Forcales, 2015). Ob indukcijskem mediju ADSC začnejo izražati miogenske transkripcijske faktorje, kot so myod1, myf5 in myf6, kar vodi v podaljševanje, fuzijo in formiranje večjedrnih celic, ki izražajo miozinsko težko verigo (Zuk in sod., 2002).

4.5 NEUROGENEZA

Lee J. in sod. (2016) so raziskovali kako oblika celic, trdota matriksa in tip adhezijskih proteinov vplivajo na diferenciacijo ADSC in BMSC. Ugotovili so da okolje različno vpliva na različne tipe MMC glede na izražanje fenotipskih označevalcev. ADSC na mehki podlagi z lamininom vstopajo v nevrogenezo, medtem ko BMSC v adipogenezno. Za iniciacijo diferenciacije ima večji vpliv okolje v primerjavi z indukcijskim medijem, ki vsebuje β -merkaptotanol. MMC začnejo izražati nevronske označevalce kot so NESTIN (ang. neuroepithelial stem cell intermediate filament), MAP2 (ang. microtubule associated protein 2) in β 3 tubulin.

5 TERAPEVTSKA UPORABA

5.1 DELOVANJE

Za mehanizem delovanja ADSC je znano, da regeneracijo organizma spodbudijo preko več različnih poti. Sprva je bilo mišljeno, da je diferenciacijski potencial primarni razlog za njihovo delovanje, vendar so kasneje ugotovili, da predvsem regulirajo procese v drugih celicah, in s tem pospešijo že naravno prisotno celjenje (Harman, 2013).

Delujejo preko trofične podpore s sproščanjem citokinov in rastnih faktorjev v okolje, so imunomodulatorne in delujejo protivnetno z zaviranjem proliferacije T celic ter protiapoptotično. MSC sproščajo v okolje hepatocitni rastni faktor, vaskularno endotelijski rastni faktor, placentni rastni faktor in angiopoietin, ki spodbujajo revaskularizacijo tkiva. Kljub temu, da je delovanje pomembno zaradi komunikacije med celicami, diferenciacijski potencial še vedno pripomore k regeneraciji, predvsem v primeru uporabe nosilca, ki nudi primerno okolje za celično diferenciacijo. V primeru sistemske aplikacije kot je na primer intravenozna aplikacija, je kemotaksa ključnega pomena pri migraciji celic na oddaljeno mesto v organizmu, kjer so dejansko potrebne. Dokazano je, da MSC izražajo nekatere kemokine in pritrjevalne molekule, ki jim omogočajo prehajanje med tkivi (Harman, 2013).

Imunomodularni efekt ADSC so raziskovali Kang in sod. (2008), ki so dokazali, da ADSC zavirajo proliferacijo T celic. Ugotovili so, da aktivirane T celice sproščajo vnetni citokin TNF- α , ki aktivira odziv v ADSC, te pa preko sproščanja TGF- β , HGF, PGE2, inIDO modulirajo imunske celice. To povzroči, da T celice in ADSC začnejo sintetizirati IL-6. Sinteza drugih vnetnih citokinov, kot je IL-7A, pa se zmanjša.

IL-6 deluje protivnetno in imunomodulatorno, njegova sinteza s strani MSC pa se ob diferenciaciji zmanjša, kot so ugotavljali Li in sod. (2013). Pri uporabi donorskih MSC to predstavlja problem ob primeru diferenciacijskega postopka, saj to vodi v njihovo imunsko zavrnitev zaradi ustavitve imunomodulatornega delovanja.

5.2 DOSTAVNI SISTEM

Ob terapevtski uporabi je pomembno razmišljati o načinu dostave celic v organizem, saj obstajajo različni sistemi, ki predstavljajo različne prednosti in slabosti ob njihovi aplikaciji.

5.2.1 Brez uporabe biomaterialov

Če se izognemo uporabi biomaterialov, se izognemo tudi možnemu imunskemu odzivu in preraščanju fibroblastov na mestu implantacije (Chen in sod., 2012). Brez njihove uporabe se lahko poslužujemo različnih načinov aplikacije, kot je celična suspenzija, celične plasti in mikrotkiva. Izbira načina aplikacije je odvisna od vrste terapevtske uporabe. Na primer, celična suspenzija je bolj primerna za uporabo zdravljenja osteoartritisa v primerjavi s periodontalnimi boleznimi zaradi specifike mesta aplikacije.

5.2.1.1 Celična suspenzija

Celično suspenzijo lahko apliciramo z uporabo systemskega injiciranja ali direktno na mesto poškodbe, kjer s sproščanjem specifičnih dejavnikov pripomorejo k regeneraciji. Same ne sodelujejo pri izgradnji zdravega tkiva na prizadetem mestu, saj okolje v večini primerov ni primerno za njihovo pritrjevanje in proliferacijo. Med pripravo celične suspenzije celice navadno tretiramo s proteolitičnimi encimi, kot sta tripsin in dispaza, ki poškodujeta membranske proteine, ki so pomembni za medcelično komunikacijo in molekule zunajceličnega matriksa (Yang in sod., 2005).

Pri uporabi celične suspenzije so največje pomanjkljivosti izguba velikega števila celic, saj se v večini primerov ne integrirajo v tkivo. Zaradi tega je tudi vprašljivo njihovo delovanje skozi daljše časovno obdobje. V primeru integracije pa je seveda možna tudi neoplastična rast na nezaželenem mestu organizmu (Chen in sod., 2012).

5.2.1.2 Konstrukcija celičnih plasti

Da se izognemo uporabi nosilcev in proteolitičnih encimov ter s tem ohranimo membranske proteine in zunajcelični matriks, lahko celice za aplikacijo pridobimo s pomočjo konstrukcije celičnih plasti. Celice gojimo do konfluente, da se vzpostavijo medcelične povezave in jih nato odlepimo od površine gojitvene posodice brez uporabe encimov.

Yang in sod. (2005) so s temperaturno-odzivno gojitveno posodico uspeli pridobiti celično plast, ki jo je možno pridobiti brez uporabe proteolitičnih encimov, ki bi med pripravo za aplikacijo poškodovali celice. Na površino gojitvenih posodic so kovalentno vezali polimer poly(N-izopropilakrilamid), ki pod normalnimi gojitvenimi pogoji, torej pri 37°C, ustvarja hidrofoben značaj površine, na katero se celice lahko vežejo in proliferirajo. Ob padcu temperature pod 32°C postane polimer hidrofilen, kar povzroči spontan odcep celic s površine gojitvene posodice.

Poznani sta še dve tehnologiji, ki omogočata pridobivanje celic na tak način. Ena temelji na uporabi magnetne sile in gojenju celic na površini, na katero je vezan RGD (Arg-Gly-Asp). S spremembo položaja magneta se celice odlepijo s površine. Druga tehnologija pa temelji na polielektrolitičnem površju, ki omogoča odlepitev celic z električno napetostjo.

Tako lahko ohranimo medcelične povezave in endogen zunajcelični matriks, kar zagotavlja primerno mikrokolje za sproščanje rastnih faktorjev in citokinov, ki so ključnega pomena pri regeneraciji tkiva skozi daljše časovno obdobje (Yongusun in ost., 2016). Prav tako se ohranijo ionski kanalčki, receptorji za rastne faktorje in medcelične povezave, ki so pomembne za razvoj funkcionalnega tkiva (Yang in sod., 2005). Plasti celic se lahko uporabljajo posamezno ali pa se jih naloži eno na drugo, v primeru potrebe po debelejši plasti in se jih v taki obliki potem prenese na mesto poškodovanega tkiva brez dodanih mediatorjev (Yang in sod., 2005).

Največja pomanjkljivost, ki se ji izognemo ob uporabi večjega števila plasti, je ravno delikatna struktura, ki otežuje aplikacijo. Prav tako je znano, da je ob uporabi temperaturno-odzivnih gojitvenih posodic, količina zunajceličnega matriksa manjša in zato mogoče ni primerna za tkiva, kot so kosti, hrustanec in koreninski cement zoba (Chen in sod., 2012).

5.2.1.3 Celični peleti ali mikrotkiva

S tem načinom uporabimo skupek celic s premerom 100 do 500 μm , ki pod posebnimi pogoji imitirajo mikrokolje različnih tkiv. Zaradi njihove velikosti je možnost izgube celic manjša,

saj je tudi možnost za pritrjevanje večja v primerjavi z drugimi načini brez uporabe biomaterialov. Njihova struktura, ki je bolj podobna tkivu v primerjavi z drugima dvema načinoma uporabe celic brez biomaterialov, jim omogoča večjo sintezo zunajceličnega matriksa in rastnih faktorjev. Da dosežemo tkivu podobno strukturo, lahko za oblikovanje celičnega peleta uporabimo različne tipe celic. V primeru uporabe nediferenciranih celic v taki strukturi, je možnost nastanka tumorja večja (Chen in sod., 2012).

5.2.2 Uporaba biomaterialov

Lastnosti biomaterialov, ki so pomembne pri njihovi terapevtski uporabi, so biokompatibilnost, biorazgradljivost in primerne mehanske lastnosti (Dziadek in sod., 2017). Z uporabo biomaterialov posnemamo naravni zunajcelični matriks, ki pripomore k proliferaciji in aktivnemu sodelovanju celic ob zdravljenju skozi daljše časovno obdobje. Z njimi se izognemo izgubi večjega števila celic ob aplikaciji, ki je brez uporabe biomaterialov največja pomanjkljivost.

Amjadian in sod. (2016) so s kombinacijo PLA in želatine, torej biomateriala sintetičnega in naravnega izvora, uspeli ustvariti optimalnejše osteoinduktivno okolje za MSC, kot ga tvorita biomateriala posamično. Prav tako so funkcionalnost nosilca povečali z vključevanjem signalnih molekul nHA in deksametazona, ki so še dodatno vplivale na celične signalne poti. Njihova raziskava lepo prikazuje kompatibilnost biomaterialov in MSC kot način izboljšanja njihovega terapevtskega delovanja.

Zavedati se moramo tudi pomanjkljivosti uporabe biomaterialov, ki se v tkivnem inženirstvu pojavljajo. Ob razpadanju nosilca v organizmu, se ta prostor zapolni z veliko količino zunajceličnega matriksa in manjšim številom celic, kar je lahko pri določenih tkivih kot sta hrustanec in kost zaželeno, pri nekaterih drugih s potrebo po visoki celični gostoti pa nezaželeno. Prav tako lahko ob tem procesu pride do imunskega odziva z hudim vnetjem, ki poškoduje aplicirane celice in s tem zavrte učinkovitost zdravljenja, hkrati pa škoduje preostalemu zdravemu tkivu v okolici. Največja omejitev pri izdelavi nosilcev je pasivna difuzija, ki določa pretok snovi med celicami in okoljem, kar zagotavlja njihovo viabilnost in uspešnost zdravljenja (Yang in sod., 2005).

5.2.2.1 Biomateriali naravnega izvora

Polimeri naravnega izvora omogočajo dobro adhezijo, migracijo, proliferacijo in diferenciacijo celic, zaradi prisotnosti ligandov, ki se vežejo na celične receptorje, hkrati pa to

predstavlja možnost za imunski odziv. V organizmu se razgrajujejo encimatsko, kar pomeni da je hitrost procesa odvisna od koncentracije encimov na mestu vnosa in je zato težko predvidljiva. Druge njihove pomanjkljivosti so možnost prenosa bolezni in njihove slabe mehanske lastnosti (Dziadek in sod., 2017).

Kolagen, ki je zaradi svoje biokompatibilnosti, varnosti in nizke cene najbolj uporaben naravni polimer v tkivnem inženirstvu, preko vezave molekule integrina regulira pomembne celične dogodke. Zaradi njegove hitre degradacije, se po navadi uporablja v kombinaciji z ostalimi biomateriali, kot so hitozan, nHA, in PLA. Drugi biomateriali naravnega izvora, ki se poleg kolagena uporabljajo v tkivnem inženirstvu so hitozan, gelatin in fibrin, pomanjkljivostim katerih se prav tako izognemo s kombinacijo različnih polimerov (Chen in sod., 2012).

5.2.2.2 Sintetični biomateriali

Najbolj uporabljena sintetična polimera v biomedicini sta polilaktična kislina in poliglikonska kislina. Različna razmerja med tema dvema polimeroma omogočajo različne hitrosti degradacije in raven hidrofobnosti. Drugi sintetični polimeri, ki se uporabljajo, sta še polietilenglikol in polietilenoksid. Kinetika razgrajevanja sintetičnih polimerov je lahko bolj kontrolirana v primerjavi s polimeri naravnega izvora. Njihovo površje je ponavadi hidrofobno, kar predstavlja težavo pri komunikaciji s celicami in pri njihovem pritrjevanjem (Chen in sod., 2012).

5.3 OSTEOARTRITIS

MSC sodelujejo pri naravnem obnavljanju kosti ob mehanski obrabi in dodatnih poškodbah. Sprva kot pri vsakem celjenju nastopi vnetje, nato pa mezenhimska in angiogenska faza, v kateri se na mestu poškodbe začnejo razširjati krvne žile, ki omogočajo pristop MSC iz različnih endogenih tkiv, kot je kostni mozeg, endosteum in periosteum, MSC pa potujejo sistemsko po ožilju do mesta poškodbe. Tam se MSC usmerijo v postopek diferenciacije ali v hondrocite ali osteoblaste. V primeru osteoblastov gre za intramembransko osifikacijo, kjer pride do takojšnjega nalaganja kosti, v primeru hondrocitov pa za endohondralno osifikacijo, kjer se kost nalaga na hrustančni matriks (Knight in Hankenson, 2013).

Pri regeneraciji kosti so MSC prekursorji in modulatorji celjenja, zato jih lahko uporabimo na več načinov. Lahko jih *in vivo* stimuliramo z rastnimi faktorji, ki stimulirajo endogene MSC v diferenciacijo. Na trgu že obstajajo pripravki, ki delujejo po tem principu, kot je PRP (ang.

platelet-rich plasma), ki vsebuje različne rastne faktorje in zelo malo BMP, ki je pravzaprav ključnega pomena za celično signalizacijo osteogeneze. Drugi pripravek je demineraliziran kostni matriks brez celičnih komponent in prav tako kot PRP vsebuje zelo malo BMP. Zato se uporablja BMP kot posebna terapija, vendar sta odobrena za uporabo le BMP2 in BMP7, kljub temu, da je skupno znanih 15 BMP. Vsi ti pripravki stimulatorno delujejo na endogene MSC, ki pa jih lahko za bolj učinkovito zdravljenje večjih poškodb namnožimo *in vitro* in uporabimo na mestu poškodbe ali sistemsko z nosilcem ali brez (Knight in Hankenson, 2013).

Na razvoj osteoartritisa vpliva več faktorjev kot so starost, spol, genetska predispozicija, fizična teža, fizične poškodbe in nepravilno prileganje sklepa. Razvoj bolezni vpliva na zmožnost fizične aktivnosti in je povezan s povečanim tveganjem za razvoj kardiovaskularnih bolezni (Palazzo in sod., 2016).

Glavni akter pri osteoartritisu je vnetje, ki to bolezen bodisi sproži ali pa določa hitrost razvoja bolezni. Za to obstaja več hipotez, ki vse temeljijo na sproščanju vnetnih mediatorjev kot so citokini in prostaglandini s strani kosti, hrustanca in sinovialne tekočine, kar lahko vodi v povečanje delovanja proteinaz, večje poškodbe hrustanca, kar še povečuje sintezo mediatorjev. Veliko vlogo imajo tudi adipokini, sistemski faktorji, ki jih sprošča abdominalno maščobno tkivo (Berenbaum, 2013).

MSC ob aplikaciji, ponavadi v obliki suspenzije, vplivajo na imunske celice in s tem delujejo protivnetno, kar upočasni napredovanje bolezni. Same se tekom zdravljenja ne vgrajujejo v novo nastajajoči hrustanec, se pa vgrajujejo v meniskus. Zaradi njihovega posrednega delovanja, so efekti kratkotrajni in se zaradi tega simptomi bolezni lahko ponovno pojavijo. Za dolgotrajno delovanje se celice aplicira na nosilcu, lahko v kombinaciji s hialuronsko kislino, ki je ena izmed komponent zunajceličnega matriksa hrustanca in vpliva na diferenciacijo MSC v hondrocite (Whitworth in Banks, 2014).

5.4 PERIODONTITIS

Periodontitis oz. bolezen dlesni je bolezen, ki povzroča propad zobnih struktur, med katere spadajo alveolarna kost, periodontalni ligament in koreninski cement, kar vodi v izgubo celotnega zoba. Konvencionalne terapije ne regenerirajo vseh treh struktur, kar bi bilo potrebno za zdravljenje bolezni, zato je pogled usmerjen v najnovejšo tehnologijo zdravljenja z endogeno pridobljenimi matičnimi celicami (Pihlstrom in sod., 2005).

Celice lahko apliciramo na različne načine. Brez uporabe nosilca celice vnesemo v sistem z uporabo injekcije v obliki celične suspenzije. Pri tem moramo predvsem upoštevati izgubo

velikega števila celic, zato je alternativna uporaba mikrotkiva oz. celičnega peleta boljša izbira, saj je za odplak celic s prizadetega tkiva manj možnosti. Celice nanosene na nosilce omogočajo tudi večji nadzor nad potekom terapije (Chen in sod., 2012).

Ob aplikaciji ADSC v kombinaciji s PRP v prizadeto korenino, se po osmih tednih opazi novo nastajajoča kost na mestu nanosa, torej regeneracija periodontalnega tkiva (Tobita in Mizuno, 2010).

5.5 REGENERACIJA KOŽE

Pri poškodbi kože pride do vnetja, proliferacije celic, agiogeneze in sinteze zunajceličnega matriksa. Pri celjenju so pomembni citokini, kemokini in rastni faktorji sintetizirani s strani endogenih odraslih matičnih celic, katerih je lahko pri poškodbi večje površine kože (npr. pri opeklinah) premalo za učinkovito regeneracijo kože, kar lahko vodi v počasni celjenje ali celo kronično nezaceljene rane. Prav tako se lahko problem neceljenja ran pojavi pri sladkorni bolezni, terapiji s steroidi in imunosupresivi. Terapija z MSC omogoča hitrejše celjenje preko zmanjšanja lokalnega vnetja, povišane migracije in proliferacije keratinocitov in fibroblastov ter povišane angiogeneze.

Kim in sod. (2013) so z BMSC potrebovali vsaj 1×10^6 v rano injiciranih celic na kvadratni centimeter za uspešno regeneracijo okrogle rane s 6 mm premerom. Poleg injiciranja lahko celice apliciramo topično ali subkutano (Harman, 2013).

5.6 KRONIČNA POŠKODBA HRBTENJAČE

Poškodba hrbtenjače, ki vključuje poškodbo aksonov, izgubo nevronov in izgubo mielinskega ovoja, prekine nevronske povezave med možgani in preostalim organizmom, kar vodi v paralizo ali paraplegijo (Park in sod., 2012).

Zaradi vnetja, glialnega krastanja in inhibitornih molekul je regeneracija na mestu poškodbe zelo upočasnjena. Mikrookolje prav tako spodbuja diferenciacijo matičnih celic v glialne linije kot so astrociti in oligodendrociti, kar je pri uporabi MSC nezaželeno. Glialno krastanje se zmanjša z uporabo hondroproteinaze ABC, ki razgrajuje sulfatni hondroitin proteoglikan, vendar se z uporabo MSC lahko poveča sinteza vnetnih citokinov na mestu poškodbe. To vnetje lahko zmanjšamo z dodatno sistemsko aplikacijo MSC. Rast nevronov in njihovo regeneracijo lahko dodatno spodbudimo z gensko spremenjenimi MSC, ki izražajo BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor), ki ima antiapoptotičen vpliv in spodbuja preživelost

celic po poškodbi centralnega živčnega sistema, kar vodi v hitrejšo regeneracijo (Lee S. H. in sod., 2016).

Drugačna metoda za regeneracijo hrbtenjače je ob uporabo nosilca. Park in sod. (2012) so uporabili Matrigel, ekstrakt membranskih proteinov, ki ob 37° C tvori tridimenzionalni gel z visoko vsebnostjo rastnih faktorjev. Pomanjkljivost Matrigela je vsebnost kolagena IV, ki inhibira aksonsko rast in zato ne spodbuja regeneracije poškodbe, kar se opazi ob nezmožnosti podpiranja lastne fizične teže. Na nosilec so nanесли predhodno spodbujene MSC proti nevronske diferenciaciji, kar je po enem tednu po aplikaciji povrnilo funkcionalnost udom na podlagi BBB rezultatov. S tako kombinacijo se povišajo nevtrofični faktorji kot sta NGF in NT-3, ki pripomorejo k regeneraciji, poleg tega pa se zmanjša vnetje in astrogliozna (Park in sod., 2012).

5.7 KRONIČNA VNETNA ČREVESNA BOLEZEN

Na razvoj kronične vnetne črevesne bolezni vplivajo genetski faktorji, mikrobiota, okolje in imunološke nepravilnosti. Zdravi se z imunosupresivi kot so kortikosteroidi in ciklosporini, ki zmanjšujejo vnetje, vendar pri velikem številu psov izboljšanja simptomov, kot sta bruhanje in diareja ne opazimo. Največja pomanjkljivost pri tem načinu zdravljenja je, da izključno zmanjšuje vnetje, medtem ko ne spodbuja regeneracije črevesnega epitela, zato je alternativno zdravljenje z MSC boljša izbira (Pérez-Merino in sod., 2015).

5.8 TUMOR

Tumor tvori mikrookolje, ki neprestano povzroča stanje vnetja, s sproščanjem citokinov in drugih signalnih molekul, ki stimulirajo tudi migracijo in inkorporacijo MMC. Zaradi te lastnosti se razvijajo terapije z uporabo MMC za dostavo terapevtskih faktorjev s pomočjo genske terapije (Hong in sod., 2014).

MMC lahko razvoj tumorja spodbujajo preko imunomodulacije, nadzorovanjem apoptoze, angiogeneze in vaskularizacije s sproščanjem različnih molekul kot soIDO, dušikov oksid, prostaglandin E2, IL-6, ali ga zavirajo preko inhibicije Wnt/ β -katenin in Akt signalne poti, ki imata pomembno vlogo pri razvoju tumorja. Na koncu je njihovo delovanje odvisno od njihovega izvora, števila apliciranih celic, ravni njihove diferenciacije in tipa tumorja, s katerim interagirajo (Hong in sod., 2014).

6 SKLEPI

ADSC so najbolj optimalna izbira za celično terapijo in uporabo v tkivnem inženirstvu zaradi njihovih posebnih lastnosti, kot so multi- ali celo pluripotentnost, sposobnost imunomodulacije in enostavna izolacija. V primerjavi z MMC iz kostnega mozga se delijo kar 1,6-krat hitreje pri manjši koncentraciji FBS (Reich in sod., 2012), prav tako je njihovo pridobivanje lažje z višjo uspešnostjo izolacije (Russell in sod., 2016), njihova sposobnost diferenciacije pa se ohranja v višji meri tekom presajanja (Lee J. in sod., 2016).

Njihovo delovanje je zelo odvisno od uporabe nosilcev, saj je ob uporabi raztopine v obliki injekcije lahko prisotno le kratek čas, ker vplivajo le s sproščanjem faktorjev, ki vplivajo na okolje. Zato je pri različnih boleznih ali poškodbah treba upoštevati razlike v njihovem vplivu na celjenje ob različnih načinih aplikacije. V primeru uporabe raztopine je celoten terapevtski postopek preprost, tudi pri postopku same aplikacije, medtem ko se z uporabo nosilcev cena terapije poveča in mogoče celo pokaže potreba po ponovnem invazivnem posegu v sam organizem.

Samo znanje o njihovem holističnem delovanju je še pomanjkljivo in potrebno raziskovanja, predvsem tudi na področjih diferenciacije *in vitro* in *in vivo*, v smeri razumevanja samega procesa in optimalnih induktivnih pogojev ter medijev. Definitivno pa ne moremo zanikati njihove terapevtske učinkovitosti, ki skupaj z enostavnim pridobivanjem in namnoževanjem celic omogoča alternativno metodo za zdravljenje bolezni z višjo učinkovitostjo od sedaj ponujenih na trgu.

Zakonodaja o uporabi matičnih celic na področju veterine še ni predpisana v vseh državah in zato klinične študije niso potrebne, kar lahko predstavlja problem pri njihovi sedaj že razviti uporabi. Obstajajo podjetja, ki se že ukvarjajo s terapevtsko uporabo MSC. V Sloveniji je to podjetje Animacel d.o.o, ki se uspešno ukvarja z zdravljenjem kostnih obolenj pri (do sedaj) psih, konjih in mačkah že 6 let. To hitro in aktivno napredovanje terapevtske uporabe po odkritju ADSC je dober pokazatelj njene uspešnosti, ki ji raziskave in zakonodaja ne sledijo z isto hitrostjo.

7 VIRI

- Afanasyev B. V., Elstner E. E., Zander A. R. 2009. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation*, 1, 3: 35-38
- Amjadian S., Seyedjafari E., Zeynali B., Shabani I. 2016. The synergistic effect of nano-hydroxyapatite and dexamethasone in the fibrous delivery system of gelatin and poly(L-

- lactide) on the osteogenesis of mesenchymal stem cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 507: 1-11
- Berenbaum F. 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*, 21: 16-21
- Birmingham E., Niebur G.L., McHugh P.E., Shaw G., Barry F.P., McNamara L.M. 2012. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, 23: 13-27
- Chen F., Sun H. Lu H., Yu Q. 2012. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33: 6320-6344
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315-317
- Dziadek M., Stodolak-Zych E., Cholewa-Kowalska K. 2017. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: a review. *Materials Science and Engineering*, 71: 1175-1191
- Forcales S. 2015. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 123: doi: 10.3389/fnagi.2015.00123: 12 str.
- Harman R. J. 2013. Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Veterinary dermatology*, 5: 90-96
- Hong I., Leec H., Kang K. 2014. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? *Mutation Research*, 768: 98-106
- Ivanovska A., Grolli S., Borghetti P., Ravanetti F., Conti V., De Angelis E., Macchi F., Ramoni R., Martelli P., Gazza F., Cacchioli A. 2017. Immunophenotypical characterization of canine mesenchymal stem cells from perivisceral and subcutaneous adipose tissue by a species-specific panel of antibodies. *Research in Veterinary Science*; 114: 51-58
- Jeras M. 2007. Celično in tkivno inženirstvo V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B. in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 627-658
- Kang J. W., Kang K., Koo H. C., Park J. R., Choi E. W., Park Y. H. 2008. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 17: 681-694

- Kim J., Lee J., Lyoo Y. S., Jung D., Park H. 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary Dermatology*, 24: 242-249
- Knight M. N. in Hankenson K. D. 2013. Mesenchymal stem cells in bone regeneration. *Advances in Wound Care*, 2, 6: 306-316
- Lee J., Abdeen A. A., Tang X., Saif T. A., Kilian K. A. Matrix directed adipogenesis and neurogenesis of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow 2016. *Acta Biomaterialia*, 42: 46-55
- Lee S. H., Kim Y., Rhew D., Kim A., Jo K. R., Yoon Y., Choi K. U., Jung T., Kim W. H., Kweon O. 2016. Impact of local injection of brain-derived neurotrophic factor–expressing mesenchymal stromal cells (MSCs) combined with intravenous MSC delivery in a canine model of chronic spinal cord injury. *Cytotherapy*, 19, 1: 75–87
- Li P., Li S., Wu J., Zang W., Dhingra S., Sun L., Weisel R. D., Li R. 2013. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17, 9: 1136-1145
- Palazzo C., Nguyen C., Lefevre-Colau M., Rannou F., Poiraudau S. 2016. Risk factors and burden of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59: 134-138
- Park S., Lee Y. J., Lee S. H., Lee D., Choi K., Kim W., Kweon O., Han H. J. 2012. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy*, 14, 5 : 584-597
- Pérez-Merino E.M., Usón-Casaús J.M. , Zaragoza-Bayle C., Duque-Carrasco J., Mariñas-Pardo L., Hermida-Prieto M., Barrera-Chacón R., Gualtieri M. 2015. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes. *The Veterinary Journal*, 206: 385-390
- Pihlstrom B. L., Michaowicz B. S., Johnson N. W. 2005. Periodontal diseases. *Lancet*, 366: 1809-1820
- Reich C. M., Raabe O., Wenisch S., Bridger P.S., Kramer M., Arnhold S. 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells—a comparative study. *Veterinary Research Communications*, 36: 139-148

- Russell K. A., Chow N. H. C., Dukoff D., Gibson T. W. G., LaMarre J., Betts D. H., Koch T., G. 2016. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Plos One*, 11, 12: e0167442. doi: 10.1371/journal.pone.0167442: 18 str.
- Screvena R., Kenyona E., Myers M. J., Yancya H. F., Skasko M., Boxer L., Bigley E. C., Borjesson D. L., Zhu M. 2014. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161: 21–31
- Scott M. A., Nguyen V. T., Levi B., James A. W. 2011. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 20, 10: 1793-1804
- Tobita M. in Mizuno H. 2010. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration. *Current Stem Cell Resesarch and Therapy*, 5: 168-174
- Vieira N. M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B. E., Zatz M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, 19: 279-289
- Volk S. W., Wang Y., Hankenson K. D. 2012. Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: implications for MSC-based therapies. *Cell Transplantation*, 21, 10: 2189-2200
- Wei Y., Sun X., Wang W., Hu Y. 2007. Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytherapy*, 9, 8: 712-716
- Whitworth, D. J. in Banks, T. A. 2014. Stem cell therapies for threatening osteoarthritis: prescient or premature? *The Veterinary Journal* 202: 416-429
- Yang J., Yamato M., Kohno C., Nishimoto A., Sekine H., Fukai F., Okano T. 2005. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26: 6415–6422
- Yongsun K., Seung Hoon L., Byung-jae K., Wan Hee K., Hui-suk Y., Oh-kyeong K. 2016. Comparison of osteogenesis between adipose-derived mesenchymal stem cells and their sheets on poly- ϵ -caprolactone/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds in canine bone defects. *Stem Cells International*, 2016, doi: 10.1155/2016/8414715: 10 str.
- Young H. E. in Black A. C., jr. 2004. Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A* 276A: 75–102

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 4279–4295

Zuk P. A. 2010. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 1783-1787