Nowe opcje diagnostyczne i terapeutyczne w osteoartrozie u psów

ALEKSANDRA WYPYCH, JOANNA SZCZEPANEK*, GRZEGORZ WĄSIATYCZ**,
CHANDRA SH. PAREEK***, ANDRZEJ TRETYN****, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI****,
PAWEŁ ANTOSIK**

Pracownia Rezonansu Magnetycznego, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

*Laboratorium Genomiki Człowieka, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

**Katedra Chirurgii Weterynaryjnej, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

***Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

****Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

*****Katedra Diagnostyki i Nauk Klinicznych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Otrzymano 12.07.2019

Zaakceptowano 22.11.2019

Wypych A., Szczepanek J., Wąsiatycz G., Pareek Ch. Sh., Tretyn A., Jaśkowski J. M., Antosik P.
New diagnostic and therapeutic options in canine osteoarthritis

Summary

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease of the joints, characterized by irreversible destruction of articular cartilage. The disease process is accompanied by changes of immunological nature, resulting in local inflammatory reactions, with the production of proinflammatory cytokines and metalloproteinases. There is currently no effective treatment resulting in repair of degraded cartilage. Clinical application of mesenchymal cells (MSCs) creates new possibilities in the treatment of incurable diseases. Multipotent MSCs exhibit immunosuppressive activity and limited immunogenicity and have the potential to differentiate *in vitro* towards adipocytes, osteocytes, chondrocytes, myocytes and endothelial cells. Thanks to these biological properties, they are increasingly used in clinical therapies. In few scientific papers, the safety of cellular therapies in the group of dogs diagnosed with OA has been confirmed. In patients undergoing treatment with autologous intra-articular injections, no serious adverse effects were observed, and in the vast majority of patients an improvement in the clinical condition and reduction of pain and joint pain were achieved. The paper presents the current state of knowledge on osteoarthritis in dogs, on the biological properties of adipose tissue stem cells and their use in OA therapy and on monitoring the progress of treatment by imaging diagnostics.

Keywords: osteoarthritis, mesenchymal cells, chondrogenesis, cellular therapy

Choroba zwyrodnieniowa i zapalenie stawów to obecnie najczęstszy problem ortopedyczny u psów. Zmiany zachodzące w stawie w wyniku procesu chorobowego są nieodwracalne i wciąż brakuje markerów wczesnej diagnostyki, jak również skutecznych opcji terapeutycznych. Dotychczas przeprowadzono nie-liczne badania z zakresu medycyny regeneracyjnej psów, poświęcone badaniu potencjału osteo- i chondrogenego w kierunku zapobiegania wadom kości i chrząstki oraz chorobom zapalnym. W niniejszej pracy zaprezentowano aktualny stan wiedzy z zakre-

su patofizjologii artrozy, możliwości wprowadzenia nowej terapii w oparciu o komórki mezenchymalne, jak również monitorowania terapii i oceny postępu leczenia na podstawie badań obrazowych i markerów biologicznych (biochemia, immunologia, genetyka).

Choroba zwyrodnieniowa stawów u psów

Choroba zwyrodnieniowa (*osteoarthritis* – OA) należy do najczęściej diagnozowanych schorzeń ortopedycznych, ostatecznie prowadzących do pogorszenia sprawności fizycznej u psów (74). Z jej powodu psy

Ryc. 1. Etapy rozwoju osteoartrozy u psów (na podstawie <https://www.jointperformance.com.au/wp-content/uploads/2016/09/canine-degenerative-osteoarthritis.jpg>; zmodyfikowano)

cierpią znacznie częściej niż w następstwie reumatoidalnego zapalenia stawów (42). Osteoartroza dotyczy 20% rocznych psów, 35% w wieku poniżej 4 lat i aż 45%-80% psów w wieku 8-12 lat (2).

Cechą charakterystyczną OA jest zniszczenie chrząstki stawowej, tworzenie się wyrostów kostnych (osteofitów) oraz przebudowa kości. Zmiany patologiczne zachodzą także w składzie płynu stawowego oraz w błonie maziowej, kości podchrzęstnej, mięśniach, ścięgnach i więzadłach (ryc. 1). Zmianom tym towarzyszy różnego stopnia proces zapalny tkanek miękkich. Staw może być określany jako „organ”, którego wszystkie składowe ulegają procesowi chorobowemu. W przebiegu *osteoarthritis* często występują typowe komponenty stanu zapalnego (32, 61).

Choroba zwyrodnieniowa jest uwarunkowana wieloczynnikowo, a czynniki prowadzące do jej rozwoju mogą mieć charakter idiopatyczny lub wtórny (49). Jej rozwój uzależniony jest od różnych czynników, takich jak: czynniki dziedziczne, obciążenia mechaniczne oraz choroby metaboliczne (17, 70). U psów OA najczęściej rozwija się wtórnie w dwóch przypadkach: jako następstwo przeciążeń prawidłowego stawu (urazy mechaniczne, niestabilność stawu) lub w konsekwencji normalnego obciążenia nieprawidłowego anatomicznie stawu (dysplazja, choroby rozwojowe) (2, 23, 48, 61, 70, 75).

Potwierdzono również predyspozycje osobnicze i rasowe do rozwoju osteoartrozy. W grupie ryzyka są przede wszystkim psy otyłe (nadmierne obciążenie stawów) i w podeszłym wieku (starzenie się chrząstki). Niektóre rasy, takie jak labrador retriever i owczarek niemiecki, są predysponowane do rozwoju zapalenia stawów, przewyższając częstość występowania zmian

zwyrodnieniowych stawów u innych ras. Choroba zwyrodnieniowa może dotyczyć każdego ze stawów, niemniej jednak najczęściej obejmuje stawy: biodrowy, kolanowy, ramienny i łokciowy (23). Psy ras olbrzymich predysponowane są do występowania chorób rozwojowych – dysplazji w obrębie stawów biodrowych i łokciowych, a z kolei u psów ras miniaturowych częściej diagnozowane są schorzenia obejmujące stawy: kolanowy i biodrowy. U psów rasy labrador retriever w wieku > 8 lat proces zwyrodnieniowy często obejmuje kilka stawów, np. łokieć, ramię, biodro, kolano (39, 40, 66).

Na poziomie molekularnym osteoartroza może być postrzegana jako zaburzenia równowagi pomiędzy szlakami prozapalnymi katabolicznymi i naprawczymi anabolicznymi z zaburzoną równowagą cytokin prozapalnych (w tym IL-1 i TNF). Zaburzenia homeostazy cytokin prowadzą do aktywacji enzymów proteolitycznych, a w konsekwencji do niszczenia chrząstki. Następstwami są: zapalenie błony maziowej, zwyrodnienie chrząstki stawowej, utrata macierzy zewnątrzkomórkowej i ostatecznie całkowita erozja powierzchni chrząstki. Zmianom towarzyszy nasilenie objawów bólowych, jak również upośledzenie czynnościowe (26).

Utrzymanie prawidłowej homeostazy wymaga skoordynowanej syntezy i degradacji makrocząstek macierzy chrząstki stawowej. Udział w powstaniu zaburzeń równowagi w syntezie i destrukcji chrząstki stawowej mają liczne czynniki: mechaniczne, biochemiczne i genetyczne (57, 79). Zniszczenie chrząstki jest powszechną cechą patologiczną różnych typów zapalenia stawów (w tym OA) i stanowi główną przyczynę dysfunkcji stawów (11, 20, 54). W degradacji

chrząstki stawowej uczestniczą 2 szlaki. Pierwszy jest wewnętrznym szlakiem, w którym same chondrocyty rozkładają macierz zewnątrzkomórkową chrząstki (*extracellular matrix* – ECM). Drugi to zewnętrzna ścieżka, przez którą tkanki lub komórki inne niż chondrocyty, zlokalizowane w błonie maziowej, tkance łuszczyki lub naciekające komórki zapalne rozkładają ECM chrząstki przez płyn maziowy. W obu ścieżkach enzymatyczne trawienie ECM powoduje zniszczenie chrząstki. Progresja choroby zwyrodnieniowej obejmuje trzy etapy: proteolityczny rozkład macierzy chrząstki, fibrylację i erozję powierzchni chrząstki, którym towarzyszy uwalnianie produktów rozpadu do płynu maziowego oraz zapalenie błony maziowej, na skutek działalności proteaz i cytokin prozapalnych (ryc. 1). Proces zwyrodnieniowy poprzedzony jest zwiększeniem objętości kolagenu oraz zmianami poziomu proteoglikanu. Kluczową rolę w indukcji i progresji choroby zwyrodnieniowej stawów odgrywają cytokiny i czynniki wzrostu. Cytokiny, które mają wpływ na metabolizm chrząstki stawowej, można podzielić na trzy grupy: kataboliczne (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α), regulatorowe i inhibitory enzymów (IL-4, -6, -8, -10, IFN- γ) oraz anaboliczne (IGF, COMPs, TGF- β) (31, 33). Cytokiny prozapalne, w tym interleukina-1 α i β oraz czynnik martwicy nowotworów α , indukują powstanie uszkodzeń chrząstki stawowej poprzez zwiększenie syntezy enzymów degradujących macierz i zmniejszenie syntezy białek macierzy (63, 77). Do głównych enzymów związanych z degradacją macierzy w chrząstce, należą: metaloproteinazy, agrekazy, proteazy serynowe, proteazy asparaginianowe oraz proteazy cysteinowe. Interleukina-1 i czynnik martwicy nowotworu indukują syntezę IL-6, której podwyższone stężenie może prowadzić do rozwoju osteoartrozy (11, 20, 54, 77).

Zmiany w stawie powstałe w wyniku procesu chorobowego są nieodwracalne i towarzyszy im chroniczny ból. Ze względu na brak możliwości całkowitego wyleczenia terapia ma charakter prewencyjny, a jej celem jest powstrzymanie progresji i zmniejszenie dolegliwości bólowych (3, 24). W tradycyjnej terapii OA (multimodalnej) stosuje się leczenie farmakologiczne (w celu zwalczania bólu oraz stanu zapalnego) oraz fizjoterapię (wraz ze środkami ortopedycznymi) (61). W terapii choroby zwyrodnieniowej stawów podejmowane są próby wzmocnienia struktury, odbudowy i przywrócenia funkcji chrząstki stawowej. Jak dotąd nie ma mocnych dowodów potwierdzających skuteczność tych metod. Wśród nowych koncepcji terapeutycznych znajdują się: inhibitory cytokin prozapalnych, inhibitory 5-lipooksygenazy, metaloproteaz oraz czynniki wzrostu układu nerwowego i angiogenezy, jak również indukcja wytwarzania endogennych opioidów oraz włączenie statyn, które opóźniałyby proces starzenia chondrocytów (70, 78).

Znaczący postęp diagnostyki genetycznej i obrazowej umożliwia lepsze scharakteryzowanie etiopa-

togenezy *osteoarthritis* oraz lepszą charakterystykę zmian obejmujących stawy. W połączeniu z klasyczną diagnostyką laboratoryjną biochemiczną i immunologiczną, głównie płynu stawowego, stwarza możliwość wprowadzenia nowych koncepcji profilaktyki, terapii oraz monitorowania wyników leczenia. Szczególne znaczenie ma wykrywanie wczesnych etapów, obejmujących dyskretne zmiany, co umożliwia obrazowanie z wykorzystaniem MRI oraz monitorowanie poziomu biomarkerów w płynie stawowym. Równie istotne znaczenie ma wdrożenie terapii umożliwiającej nie tylko zatrzymanie progresji choroby, ale również odbudowę chrząstki. Taki potencjał wykazuje terapia z wykorzystaniem iniekcji dostawowych z MSC/SVF.

Monitorowanie progresji choroby i postępu terapii

OA jest chorobą zróżnicowaną pod względem czynników etiologicznych, które w konsekwencji prowadzą do rozwoju charakterystycznych zmian w chrząstce, kości podchrzęstnej i błonie maziowej. W przeciwieństwie do ludzkiego OA, genomiczne podłoże choroby stawów u psów nie zostało dotychczas dobrze scharakteryzowane. Ze względu na dyskretny przebieg wczesnych faz rozwoju choroby znacznie utrudnione jest zarówno jej wczesne rozpoznanie, jak i wdrożenie postępowania terapeutycznego, które mogłoby zapobiec zmianom strukturalnym w chrząstce i rozwojowi niewydolności stawu. Stąd też potrzeba poszukiwania biochemicznych i genetycznych markerów monitorowania początkowych faz patogenez choroby zwyrodnieniowej oraz stworzenie wysokoczułej i swoistej metody weryfikacji leczenia. Wiadomo, że nie ma możliwości identyfikacji jednego czułego i specyficznego markera predykcyjnego dla OA, który korelowałby ze stopniem zniszczenia chrząstki, stąd też prowadzone są badania w kierunku identyfikacji kombinacji markerów (7, 25, 53).

Determinantów stanu zapalnego OA poszukuje się wśród genów zaangażowanych w szlaki komórkowe, których zaburzenia mogą prowadzić do degradacji macierzy chrząstki stawowej. W grupie tej znajdują się przede wszystkim degradujące enzymy kolagenolityczne, w tym katepsyny K, katepsyny S i metaloproteinazy macierzy (MMP), których ekspresja jest charakterystyczna dla komórek jednojądrzastych błony maziowej (TRAP-dodatnich). Uważa się, że pośród proteinaz kluczową rolę odgrywają metaloproteinazy. MMP są proteazami, które uczestniczą w degradacji i przebudowie ECM. Aktywność proteolityczna MMP jest regulowana przez specyficzne inhibitory znane jako tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP). Dobrze udokumentowano, że osteoblasty ekspresują i wydzielają dużą ilość kwaśnej fosfatazy (TRAP). Wykazano, że ten czynnik jest użytecznym markerem histochemicznym do identyfikacji osteoklastów i wskaźnikiem biochemicznym resorpcji osteoklastów.

Alam i wsp. (1) podjęli próbę monitorowania zmian stężeń TRAP, MMP-2 i TIMP-2 w płynie sta-

wowym i surowicy, we wczesnych stadiach zmian zwyrodnieniowych u psów. Pomimo iż w badaniu potwierdzono udział tych markerów w progresji choroby, sami badacze sugerują, że istnieje konieczność dalszych badań w celu określenia roli tych enzymów jako celów terapeutycznych w leczeniu OA u psów. Obserwacje Hegemann i wsp. (41) potwierdzają, że poziom TIMP-1 w surowicy może być potencjalnym czynnikiem wykrywania wczesnych zmian zwyrodnieniowych w chrząstce, a także sugerują, że w OA u psów zniszczenie macierzy za pośrednictwem MMP-3 nie ma większego znaczenia. Jednak MMP-3 wydaje się być czułym markerem miejscowego stanu zapalnego w psim zapaleniu stawów. Garner i wsp. (29) opracowali panel biomarkerów do diagnozy wczesnej OA u psów. Panel ten składa się z białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP1), interleukiny 8 (IL-8), substancji pochłaniającej pochodne keratynocytów (KC), metaloproteinazy macierzy 2 (MMP2), metaloproteinazy macierzy 3 (MMP3) i metaloproteinazy macierzy 13 (MMP13). Analiza poziomu 3 chemokin (MCP1, IL-8 i KC) w płynie maziowym umożliwia specyficzne odróżnianie prawidłowych i objętych zwyrodnieniem stawów kolanowych. Panel ten wykazał podobną skuteczność diagnostyczną u psów ze spontaniczną chorobą zwyrodnieniową stawów, a włączenie MMP2 i MMP3 zwiększyło użyteczność panelu w diagnostyce i monitorowaniu leczenia.

Ponieważ stan zapalny jest coraz częściej uważany za jeden z kluczowych czynników rozwoju OA, cytokiny są oceniane jako potencjalni kandydaci na markery biochemiczne. Cytokiny prozapalne, przeciwzapalne, angiogenne i chemotaktyczne są coraz częściej badane pod kątem korelacji z progresją OA (31, 56). Obecnie najsilniejszą moc diagnostyczną potwierdzono dla interleukiny 6 (IL-6), jak również IL-1 β , IL-15, czynnika martwicy nowotworów- α (TNF α) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). W kombinacji z czynnikami degradacji kości i chrząstki mogą stanowić czułe narzędzie diagnostyczne i prognostyczne. Potrzebne są jednak dalsze badania, których celem byłaby identyfikacja biomarkerów płynu maziowego, surowicy i moczu oraz ocena ich czułości i specyficzności w monitorowaniu OA (28).

Matyas i wsp. (60) jako czułe i specyficzne dla wczesnych zmian chrząstki związanych z izolowanym urazem stawów typują 2 inne markery: proteoglikan (aggrecan proteoglycan, aggrecan 846 epitope) oraz enzym rozkładający kolagen typu II (Col2-3/4C long mono and Col2CTx). W przypadku wczesnego stadium ich poziom jest podwyższony. Z kolei Zhou i wsp. (85) zidentyfikowali polimorfizmy skojarzone z genami PTPRD, PARD3B i COL15A1, których ekspresja jest związana z OA stawu biodrowego. Wilke i wsp. (82) nie zdołali określić korelacji występowania SNP w 4 genach kandydackich (fibronektyna 1, łańcuch alfa 1 kolagenu typu 9, łańcuch alfa 2 kolagenu typu 9 i białko oligometryczne chrząstki) w przebiegu pęk-

nięcia więzadła krzyżowego przedniego (będącego jedną z przyczyn OA) w populacji psów nowofundlandzkich. Badanie markerów mikrosatelitarnych sąsiadujących z 14 kandydującymi genami kolagenu dla dysplazji łokciowej również nie pozwoliło zidentyfikować znaczących związków z rozwojem choroby (Salg i wsp. (72)). Marker mikrosatelitarny (FH2320) na psim chromosomie 3 (CFA3) został powiązany z rozwojem osteofityzacji panewki u portugalskich psów wodnych (15). W oddzielnym badaniu obejmującym psy labrador retriever i greyhound zidentyfikowano przypuszczalne *loci* cech ilościowych przyczyniające się do makroskopowych objawów OA stawu biodrowego na chromosomach 5, 18, 23 i 31 (40, 59). Dalsza ocena ilościowa tego samego rodowodu ujawniła również, że schorzenie jest dziedziczone addytywnie i bez dominacji (40).

Diagnostyka obrazowa

Badanie radiologiczne jest nieodzownym elementem rozpoznania osteoartrozy u psów. Może również, w zależności od czułości i swoistości wybranej techniki, weryfikować skuteczność terapii, monitorować skuteczność jej działania, ale przede wszystkim być markerem pierwszych objawów OA. Obrazy wykonane konwencjonalną techniką (rtg) stanowią podstawową metodę obrazowania układu kostnego. Obraz jest jednowymiarowy i sumaryczny. Duża zawartość w tkance kostnej wapnia, który silnie pochłania promieniowanie rentgenowskie, sprawia, że rentgenogramy doskonale uwidaczniają strukturę kości. Na jego podstawie można określić stopień zaawansowania takich zmian zwyrodnieniowych, jak: (1) wzmożona sklerotyzacja, (2) przewężenie szpary stawowej (3) przebudowa stawu (osteofity). Tkanki miękkie (mięśnie, więzadła, chrząstki, ścięgna) mają niski współczynnik pochłaniania promieni rentgenowskich i są słabo widoczne, dlatego też początkowe stadia choroby często są w nim nieuchwytnie. Wnioskowanie o ich stanie jest możliwe tylko na podstawie objawów pośrednich np. pogrubienia cienia tkanek miękkich czy zatarcia zarysów mięśni. Przy znacznym uszkodzeniu stawu i ścięczeniu warstwy chrząstki szklistej można zaobserwować przewężenie szpary stawowej. Jak podkreślają autorzy licznych prac, dopiero dalsze stadia choroby manifestują się bardziej charakterystycznymi – wychwytanymi w klasycznym prześwietleniu, zmianami (13, 14, 55, 69, 84). Obrazowanie metodą MR jest niezwykle skuteczną techniką oceny układu mięśniowo – szkieletowego. Co prawda, nie uwidacznia dobrze wapnia czy warstwy korowej kości, ale ma znacząco lepszą kontrastowość tkanek miękkich niż jakkolwiek inna metoda obrazowania. Wśród innych korzystnych cech badania należy jeszcze wymienić nieinwazyjność, brak promieniowania jonizującego oraz obrazowanie wielopłaszczyznowe.

Przed wprowadzeniem do zastosowania klinicznego badania MR nie istniała żadna nieinwazyjna technika

pozwalająca na tak dokładne zobrazowanie chrząstek stawowych. W 2007 r. d'Anjou i wsp. (19) na grupie 8 dużych psów z eksperymentalnie wywołaną chorobą zwyrodnieniową porównywali skuteczność zastosowania techniki MR (1,5 T) z wielorzędową tomografią komputerową. Uzyskane obrazy zostały poddane ocenie morfologicznej i czasowej osteofitozy, stwardnienia podchrzęstnego, wysięku w stawie i pogrubienia błony maziowej stawu kolanowego. Badania przeprowadzono w 4 różnych punktach czasowych. Osteofitoza, stwardnienie podchrzęstne oraz wysięk były oceniane w TK, zaś pogrubienie błony maziowej przy pomocy MR. Jako wniosek jednoznacznie wskazali, że MR wykazuje większą czułość w wykrywaniu pierwszych objawów OA (19).

Przy omawianiu etiologii choroby zwyrodnieniowej wiele uwagi poświęca się urazom chrząstki szklistej. Jej uszkodzenie jest przyczyną powstawania zmian o charakterze przewlekłym i sprzyja powstawaniu przedwczesnych zmian o charakterze zwyrodnieniowym w stawie. Chrząstka szklista jest słabo unaczyniona, dlatego też przy uszkodzeniu ma ograniczone możliwości samonaprawy. Zastosowanie odpowiedniego protokołu badania z trójwymiarowymi sekwencjami echa spinowego i gradientowego ułatwia zobrazowanie chrząstki szklistej i włóknistej oraz struktury torebkowo-więzadłowej i ścięgien. Pozwala również pozyskać bardzo cienkie, ciągle przekroje powierzchni stawowej. W ostatnim czasie rośnie liczba technik stosowanych do oceny chrząstki stawowej. Wśród najnowszych technik można wymienić obrazowanie dyfuzyjne (DWI) oraz mapowanie czasów relaksacji podłużnej i poprzecznej. DWI informuje o gęstości komórkowej zmian, mapowanie czasów T1 i T2 określają zawartość kolagenu, proteoglikanów oraz aminokwasów w chrząstce (13, 14, 55, 69, 84).

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu rezonansu magnetycznego w diagnozowaniu uszkodzeń stawu kolanowego u psów pojawiły się w 1991 r. (5). W materiale pośmiertnym, poza łątkami, można było ocenić typowe symptomy choroby zwyrodnieniowej stawu, proces zapalny oraz zmierzyć grubość chrząstki stawowej. Badanie wykonano na skanerze niskopoleowym, ale kontrastowość badanych tkanek była na tyle wysoka, że na podstawie otrzymanych obrazów stworzono opis anatomii prawidłowej psiego stawu kolanowego. W późniejszych latach technika MR okazała się przydatna do oceny zdrowych, jak i chorych stawów kolanowych u psów (5, 83). W jednym z badań porównywano dokładność i czułość nieinwazyjnej diagnostyki obrazowej z inwazyjną artroskopią. Ostatecznie rezonans magnetyczny okazał się bardzo precyzyjną techniką diagnozowania uszkodzeń łątki przysiadkowej zwłaszcza u większych psów (58).

Rozwój diagnostyki obrazowej, zastosowanie skanerów o wyższej indukcji pola magnetycznego (1,5 T/3 T) oraz odpowiednich cewek w znacznym stopniu wpłynęły na jakość obrazu MR. Wyniki badań

opublikowane w 2008 r. wykazały, że na podstawie obrazów uzyskanych na 1,5 T skanerze rozpoznanie rozerwania łątki przysiadkowej (*meniscal tear*) w następstwie uszkodzenia ACL, w sekwencji PD TSE, możliwe jest z 100% czułością i 94% swoistością (12). Żadna inna dostępna metoda diagnostyczna nie odznacza się tak wysoką czułością. Co więcej, pozyskane obrazy MR ujawniły dodatkowe subkliniczne zmiany w więzadłach krzyżowych przednich i tylnych oraz w łątkach. Wystąpiła wyraźna statystyczna zgodność między MR a wynikami chirurgicznymi zarówno w przypadku uszkodzenia chrząstki, jak i stopnia zapalenia kości i stawów. Autorzy pracy bazowali na specjalnie stworzonym na potrzeby badania protokole i potwierdzają, że uszkodzenia więzadła krzyżowego i łątek można dokładnie ocenić w badaniu MR. Natomiast wadą zastosowanego protokołu była niemożność oceny stopnia uszkodzenia chrząstki (12).

Obecnie w badaniach skupiono się na trzech grupach biomarkerów płynu maziowego u psów: mediatorach prozapalnych, enzymach i ich inhibitorach oraz produktach degeneracji zewnątrzkomórkowej chrząstki. Zostały one zbadane w stawach łokciowych, biodrowych i kolanowych zarówno zdrowych psów, jak i psów z naturalnie występującą i indukowaną eksperymentalnie OA. Żaden z tych biomarkerów nie jest obecnie stosowany w praktyce do wykrywania psiej OA na wczesnym etapie. Wykazano pozytywny związek między biomarkerami płynów maziowych u psów a OA, jednak jak dotąd nie opracowano żadnego molekularnego testu diagnostycznego.

Komórki mezenchymalne w weterynarii regeneracyjnej

Głównym celem medycyny regeneracyjnej jest naprawa i odtworzenie tkanek lub narządów uszkodzonych w wyniku urazu, choroby nabytej lub wady wrodzonej, jak również w wyniku fizjologicznych procesów starzenia. Wśród zabiegów terapeutycznych z jej zakresu należałoby wymienić: somatyczną terapię komórkową, inżynierię tkankową lub biomedyczną oraz lecznicze terapie genowe (27, 37). W ortopedii najczęściej zastosowanie znajdują mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* – MSCs). W 2005 r. Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowych ujednoliciło nomenklaturę i zaleciło używanie określenia „multipotencjalne mezenchymalne komórki zrębowe” (*multipotent mesenchymal stromal cells*) (43). MSCs są szeroko stosowane, dzięki wykazywanym właściwościom immunomodulacyjnym, przeciwzapalnym oraz przeciwbólowym.

Mechanizm działania MSCs obejmuje przede wszystkim aktywację procesów zapobiegających stanowi zapalnemu, stymulację mechanizmów regeneracyjnych, indukcję odbudowy chrząstki stawowej oraz zwiększenie ilości płynów maziowych w stawach. Komórki mezenchymalne identyfikowane i charakteryzowane są na podstawie obecności markerów

Tab. 1. Wybrane antygeny powierzchniowe mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (opracowanie na podstawie danych literaturowych (6, 38, 49, 62))

Typ znacznika	Oznaczone cząsteczki
Swoiste antygeny powierzchniowe	CD105 (SH2), CD73 (SH3/SH4), CD90 (Thy-1), przy jednoczesnym braku CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79a, lub CD19 i HLA-DR
Powierzchniowe markery multipotencjalności	STRO-1, CD105 i CD166
Cząsteczki adhezyjne	integriny: $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD106, CD166 (ALCAM-1), L-selektyna, CD44
Cytokiny i czynniki wzrostu stymulujące wzrost komórek MSC	interleukiny: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 i 15; LIF, SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Receptory cytokin i czynników wzrostu	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, CD118 (LIFR), CD117 (SCFR), CD114 (G-CSFR), IFN- γ R, TGF- β IR, bFGFR, PDGFR, EGFR

powierzchniowych (67) (tab. 1). Cechują się również ekspresją genów specyficznych dla komórek macierzystych (np. Oct4, Sox2, Rex1) (46). Należy jednak pamiętać, że ekspresja niektórych markerów może się zmieniać w warunkach hodowli *in vitro* wraz z kolejnymi pasażami lub zmianami warunków prowadzenia hodowli (73, 80).

U osobników dorosłych MSCs zlokalizowane są w wielu tkankach, m.in. w szpiku, tkance tłuszczowej, okostnej, błonie maziowej, mięśniach szkieletowych, ścięgnach skóry, kościach, płucach, więzadłach przyczepia i miażdżycie zębów (4, 52). Z punktu widzenia zastosowań w ortopedii główny rezerwuuar stanowi tkanka tłuszczowa (tłuszcz otrzewnowy lub podskórny) lub błona maziowa (65, 86). Homogenna populacja tych komórek, z racji źródła pochodzenia nazywana jest „*adipose-derived stem cells*” (ADSCs, ASCs) (27, 38).

Właściwości MSCs, obejmujące zdolność do wielokierunkowego różnicowania, immunomodulacji i endogennej regulacji naprawy uszkodzonych tkanek przyczyniły się do coraz szerszego stosowania w weterynarii regeneracyjnej (31, 50). Komórki macierzyste pozyskane z tkanki tłuszczowej mogą się różnicować w komórki o tym samym pochodzeniu embrionalnym (multipotencja), a więc posiadają zdolność do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych, kostnych, chrzęstnych i mięśniowych oraz wykazują potencjał naczyniotwórczy, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (8, 21, 22, 36, 45, 47, 71).

MSCs mają zdolność syntetyzowania i wydzielania bardzo licznych cytokin i czynników wzrostowych istotnych w procesie regeneracji (64, 68). W tym miejscu warto wspomnieć, że nie wszystkie cytokiny i czynniki wzrostu wydzielane mają pozytywny wpływ na proces regeneracji (np. transformujący czynnik wzrostu beta (TGF β) działa immunosupresyjnie i wspomaga tworzenie chrząstki, ale również stymuluje proces włóknienia) (76). Najprawdopodobniej związki wydzielane przez MSC działają na sąsiadujące komórki i tkanki, stymulując neowaskularyzację, hamując proces apoptozy i włóknienia, działając promitotycznie i chemotaktycznie na inne komórki oraz sterując ich różnicowaniem. Właściwości immunomodulacyjne umożliwiają zahamowanie proliferacji i regulację

funkcji limfocytów T, B i NK. Ponadto mają wpływ na aktywność komórek prezentujących antygeny oraz stymulację proliferacji limfocytów T supresorowych (64, 68).

W dotychczasowych badaniach wykazano korzystny wpływ MSCs przede wszystkim w leczeniu układu kostno-stawowego. Jednostki chorobowe,

w których badano skuteczność transplantacji komórek macierzystych lub prekursorowych u psów z zaburzeniami wywołanymi eksperymentalnie, to: nietrzymanie moczu, owrzodzenia śluzówki, cukrzyca, dystrofia mięśniowa, ubytki kości i ubytki chrząstek stawowych. W dziedzinie ortopedii terapia z wykorzystaniem MSCs obejmuje przede wszystkim: leczenie zmian zwyrodnieniowych w obrębie stawów, naprawę uszkodzeń mięśni i przyczepów ścięgien oraz rekonstrukcję chrząstki stawowej. Skuteczne zastosowanie kliniczne pochodnych MSCs w medycynie regeneracyjnej psów eksperymentalnie wykazano do leczenia niektórych ortopedycznych zmian, takich jak: torbiel kości panewki, brak zrostu kości udowej i choroba Legg-Perthes-Calve (16, 80).

W badaniach eksperymentalnych wykazano, że po ok. 2 tygodniach można zauważyć poprawę sprawności fizycznej i zmniejszenie dolegliwości bólowych. Skuteczność terapii uzyskano u ok. 80% pacjentów, a ich trwałość szacuje się na 6-12 miesięcy (44). Daje to nadzieję na leczenie jednostek chorobowych, dla których brakuje rozwiązań terapeutycznych wśród obecnie stosowanych protokołów. Istotą rozwiązań medycyny regeneracyjnej wydaje się jej interdyscyplinarność. W weterynarii terapia z wykorzystaniem MSCs jest wciąż w fazie rozwoju i należy ją traktować jako medycynę doświadczalną. Aby w pełni wykorzystać potencjał komórek macierzystych, muszą zostać spełnione niezbędne warunki wspomagające tworzenie nowych tkanek. Do takich elementów należą m.in. czynniki wzrostu, stymulujące różnicowanie oraz „szkielet”, na którym organizowana będzie nadbudowa nowej tkanki wraz z siecią naczyń krwionośnych.

Zastosowanie terapii MSC w leczeniu osteoartrozy u psów

Dotychczas przeprowadzono jedynie kilka badań z zakresu medycyny regeneracyjnej psów, poświęconych badaniu potencjału osteo- i chondrogenego w kierunku zapobiegania wadom kości i chrząstki oraz chorobom zapalnym, w tym chorobie zwyrodnieniowej stawów (9, 10, 16, 18, 35, 51, 81).

Vilar i wsp. (81) oraz Guercio i wsp. (35) ocenili efekty terapii MSC u psów dotkniętych chorobą zwyrodnieniową stawów biodrowych i chorobą zwyrod-

nieniową stawów kości ramiennej. W badaniu Guercio i wsp. (35) wykazano znaczną poprawę w ocenie kulawizny i zmniejszenie objawów bólu w zakresie ruchu po miesiącu leczenia MSC u trzech psów (na podstawie ocenianych przez lekarza weterynarii oraz właściciela; ale nie wprowadzono żadnej grupy kontrolnej). W kolejnej pracy Guercio i wsp. (34) oceniali stan czterech pacjentów z OA stawów łokciowych, do których podano namnażane i oceniane w warunkach *in vitro* MSCs, pozyskane z tkanki tłuszczowej. Jako ich nośnika użyto osocza bogatopłytkowego lub kwasu hialuronowego. Komórki przeznaczone do iniekcji badano pod kątem mikrobiologicznym i wirusologicznym oraz w kierunku potencjalnego ryzyka transformacji nowotworowej. Zastosowane leczenie wywołało wyraźną poprawę kliniczną. Ponieważ w badaniu nie zastosowano grupy kontrolnej, nie można jednoznacznie potwierdzić efektu terapeutycznego iniekcji dostawowych MSC.

Dwie inne grupy badaczy analizowały porównawczo wyniki dla 18, 14 i 8 psów poddanych terapii MSC, odpowiednio, po okresie trzech lub sześciu miesięcy, w porównaniu z grupą placebo, w której nie uzyskano poprawy (9, 10, 81). Black i wsp. (10) opublikowali wyniki badania klinicznego, w którym ocenili efekty autologicznych dostawowych wstrzyknięć komórek zrębowej frakcji naczyniowej (*stromal vascular fraction* – SVF) z tkanki tłuszczowej u 21 psów (w wieku od 1 do 11 lat), z diagnozą obustronnego OA, trwającego ponad 6 miesięcy. Badanie miało charakter wieloośrodkowy, było randomizowane, podwójnie zaślepione. W grupie badanej zastosowano iniekcje dostawowe 4-5 mln jądrzastych komórek SVF. Kontrolę stanowiły psy, u których zastosowano placebo (pobierano tkankę tłuszczową, ale iniekcje dostawowe przeprowadzano z wykorzystaniem PBSu). U wszystkich psów przerwano terapię steroidowymi lekami przeciwzapalnymi oraz chondroprotektantami. W badaniu oceniano za pomocą skali numerycznej pięć kryteriów u każdego z pacjentów – kulawiznę w chodzie, kulawiznę w biegu, ból w trakcie manipulacji stawem, zakres ruchów oraz ogólne funkcjonowanie zwierzęcia. Testy wykonywano przed rozpoczęciem terapii komórkowej oraz 30, 60 i 90 dni po niej. W analogicznych punktach czasowych na pytania dotyczące 13 parametrów, m.in. chodu, biegania, skakania, wchodzenia po schodach, wstawania czy ogólnej chęci do ruchu i zabawy odpowiadali właściciele. W badaniu wykazano, że terapia komórkami SVF tkanki tłuszczowej może dać dobre efekty w leczeniu psów z OA stawów biodrowych. Zgodnie z oceną lekarzy w grupie badanej wykazała statystycznie istotny wzrost ocen w czterech z pięciu parametrów (z wyjątkiem ogólnej funkcjonalności zwierząt). Według oceny opiekunów, poprawa stanu ich psów była widoczna w obu grupach (co dowodzi subiektywności ocen właścicieli). W kolejnym badaniu przeprowadzonym przez Black i wsp. (9) na 18 psach wykazano skuteczność terapeutyczną (utrzymującą się 180 dni po zabiegu) „macierzy-

stych komórek mezenchymalnych i regenerujących” w leczeniu zapalenia stawów łokciowych. Iniekcje dostawowe wykonywano z wykorzystaniem populacji heterogennych komórek świeżo izolowanych z tkanki tłuszczowej. W badaniu prowadzono hodowlę *in vitro* w celu namnażania i oczyszczania oraz identyfikacji i oceny ilości zawartych komórek w pozyskiwanych frakcjach lipoaspiratu. Kriston-Pál i wsp. (51) zastosowali trzewną tkankę tłuszczową jako źródło MSC w terapii dysplazji łokciowej i osteortrozy u 30 psów. W badaniu podawano dostawowo allogeniczne MSC zawieszone w 0,5% kwasie hialuronowym. Znaczącą poprawę osiągnięto bez stosowania żadnych leków, co oceniono na podstawie stopnia kulawizny w toku rocznej obserwacji. Artroskopia kontrolna u jednego psa po iniekcji komórek wskazywała na regenerację chrząstki. Analiza histologiczna biopsji chrząstki potwierdziła, że zregenerowana chrząstka była typu szklistego. Wyniki te pokazują, że przeszczep allogenicznych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej jest nowym, nieinwazyjnym i wysoce skutecznym narzędziem terapeutycznym w leczeniu dysplazji łokciowej u psów.

Osteoartroza jest częstym zaburzeniem u psów. Jej dyskretny początek uniemożliwia postawienie wczesnego rozpoznania i opóźnia wdrożenie leczenia. Analiza biomarkerów płynu stawowego może umożliwić wykrywanie OA na wczesnym etapie, przed pojawieniem się objawów radiograficznych. Ponadto specyficzne determinanty mogą pomóc w prognozowaniu choroby, monitorowaniu odpowiedzi na leczenie i być wykorzystane do oceny stopnia zaawansowania choroby. Wydaje się, że w przyszłości komórki macierzyste mogą mieć bardzo szerokie zastosowanie również w weterynarii. Wyniki nielicznych prac naukowych potwierdzają bezpieczeństwo terapii z wykorzystaniem MSC/SVF w grupie psów z rozpoznaniem OA. Wśród pacjentów poddanych leczeniu z wykorzystaniem iniekcji dostawowej nie zaobserwowano poważnych efektów niepożądanych, a u przeważającej większości pacjentów uzyskano poprawę stanu klinicznego oraz redukcję dolegliwości bólowych i stawowych. Wydaje się zatem, iż terapia miejscowa z wykorzystaniem komórek mezenchymalnych z tłuszczu może być efektywną i bezpieczną metodą, alternatywną dla tradycyjnych opcji leczniczych. Jest to również mało inwazyjna i stosunkowo tania metoda (w porównaniu do pozyskiwania komórek z frakcji szpiku kostnego), umożliwiająca ekstrakcję MSCs w dużych ilościach. Wprowadzenie iniekcji MSC/SVF do rutynowej praktyki weterynaryjnej wymaga jednak dalszych badań podstawowych (w zakresie weryfikacji markerów, umożliwiających monitorowanie postępów terapii) oraz opracowania kompletnych protokołów obrazowania (w celu opisanie mechanizmu terapeutycznego działania dostawowych wstrzyknięć komórkowych). Celem wielu badań przedklinicznych na psach jest testowanie metody przed wprowadzeniem

jej do medycyny człowieka, w licznych przypadkach jednak wyniki badań mogą służyć również rozwojowi medycyny weterynaryjnej.

Dotychczasowe badania wykonywane były na nielicznych grupach pacjentów, co przekłada się na niską istotność statystyczną wyników. W większości przypadków próby nie były randomizowane, zaślepienie i nie stosowano grupy kontrolnej, a ocena korzyści miała charakter subiektywny i życzeniowy. W badaniach stosowane są również różne jakościowo i ilościowo iniekcje: zarówno heterogenne frakcje komórkowe pochodzące z bezpośredniej lipoaspiracji, jak i hodowane, i dobrze scharakteryzowane immunofenotypowo komórki z pasażu *in vitro*. Stąd też wyniki dotychczasowych prac eksperymentalnych z zakresu nauki podstawowej, jak i prób przedklinicznych oraz klinicznych są niewystarczające dla prognozowania skali docelowej przydatności.

Piśmiennictwo

- Alam M. R., Ji J. R., Kim M. S., Kim N. S.: Biomarkers for identifying the early phases of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs. *J. Vet. Sci.* 2011, 12, 273-280.
- Anderson K. L., O'Neill D. G., Brodbelt D. C., Church D. B., Meeson R. L., Sargan D., Summers J. F., Zulch H., Collins L. M.: Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci. Rep.* 2018, 8, 5641.
- Aragon C. L., Hofmeister E. H., Budberg S. C.: Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007, 230, 514-521.
- Baer P. C., Geiger H.: Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012, 2012, 812693.
- Baird D. K., Hathcock J. T., Rumph P. F., Kincaid S. A., Visco D. M.: Low-field magnetic resonance imaging of the canine stifle joint: normal anatomy. *Vet. Radiol. Ultrasound* 1998, 39, 87-97.
- Bakker de E., Ryssen Van B., De Schauwer C., Meyer E.: Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Vet. Q.* 2013, 33, 225-233.
- Bakker de E., Stroobants V., VanDael F., Ryssen B. V., Meyer E.: Canine synovial fluid biomarkers for early detection and monitoring of osteoarthritis. *Vet. Rec.* 2017, 180, 328-329.
- Barry F. P., Murphy J. M.: Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004, 36, 568-584.
- Black L., Gaynor J., Adams C., Dhupa S., Sams A. E., Taylor R., Harman S., Gingerich D. A., 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.
- Black L., Gaynor J., Gahring D., Adams C., Aron D., Harman S., Gingerich D. A., Harman R.: Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Ther.* 2007, 8, 272-284.
- Blanco F. J., Guitian R., Vazquez-Martul E., de Toro F. J., Galdo F.: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998, 41, 284-289.
- Blond L., Thrall D. E., Roe S. C., Chailloux N., Robertson I. D.: Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging for meniscal tears in dogs affected with naturally occurring cranial cruciate ligament rupture. *Vet. Radiol. Ultrasound* 2008, 49, 425-431.
- Burkart R., Glaser C., Hyhlik-Durr A., Englmeier K. H., Reiser M., Eckstein F.: Magnetic resonance imaging-based assessment of cartilage loss in severe osteoarthritis: accuracy, precision, and diagnostic value. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 2072-2077.
- Carrier C. B.: Diagnostic imaging of osteoarthritis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1997, 27, 777-814.
- Chase K., Lawler D. F., Carrier D. R., Lark K. G.: Genetic regulation of osteoarthritis: A QTL regulating cranial and caudal acetabular osteophyte formation in the hip joint of the dog (*Canis familiaris*). *Am. J. Med. Genet A* 2005, 135, 334-335.
- Crovace A., Favia A., Lacitignola L., Di Comite M. S., Staffieri F., Francioso E.: Use of autologous bone marrow mononuclear cells and cultured bone marrow stromal cells in dogs with orthopaedic lesions. *Vet. Res. Commun.* 2008, 32 Suppl 1, S39-44.
- Cruz A. M., Hurtig M. B.: Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2008, 24, 101-116.
- Csaki C., Matis U., Mobasheri A., Ye H., Shakibaei M.: Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol.* 2007, 128, 507-520.
- D'Anjou M. A., Moreau M., Troncy E., Martel-Pelletier J., Abram F., Raynauld J. P., Pelletier J. P.: Osteophytosis, subchondral bone sclerosis, joint effusion and soft tissue thickening in canine experimental stifle osteoarthritis: comparison between 1.5 T magnetic resonance imaging and computed radiography. *Vet. Surg.* 2008, 37, 166-177.
- Dai M., Sui B., Xue Y., Liu X., Sun J.: Cartilage repair in degenerative osteoarthritis mediated by squid type II collagen via immunomodulating activation of M2 macrophages, inhibiting apoptosis and hypertrophy of chondrocytes. *Biomaterials* 2018, 180, 91-103.
- Dicker A., Le Blanc K., Astrom G., van Harmelen V., Gotherstrom C., Blomqvist L., Arner P., Ryden M.: Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 2005, 308, 283-290.
- Erickson G. R., Gimble J. M., Franklin D. M., Rice H. E., Awad H., Guilak F.: Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 290, 763-769.
- Felson D. T., Lawrence R. C., Dieppe P. A., Hirsch R., Helmick C. G., Jordan J. M., Kington R. S., Lane N. E., Nevitt M. C., Zhang Y., Sowers M., McAlindon T., Spector T. D., Poole A. R., Yanovski S. Z., Ateshian G., Sharma L., Buckwalter J. A., Brandt K. D., Fries J. F.: Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* 2000, 133, 635-646.
- Felson D. T., Lawrence R. C., Hochberg M. C., McAlindon T., Dieppe P. A., Minor M. A., Blair S. N., Berman B. M., Fries J. F., Weinberger M., Lorig K. R., Jacobs J. J., Goldberg V.: Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. *Ann. Intern. Med.* 2000, 133, 726-737.
- Fox D. B., Cook J. L.: Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 219, 756-761.
- Freitag J., Kenihan M. A.: Mesenchymal Stem Cell Therapy in Osteoarthritis and Regenerative Medicine. *Curr. Sports Med. Rep.* 2018, 17, 441-443.
- Frese L., Dijkman P. E., Hoerstrup S. P.: Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus. Med. Hemother.* 2016, 43, 268-274.
- Garner B. C., Kuroki K., Stoker A. M., Cook C. R., Cook J. L.: Expression of proteins in serum, synovial fluid, synovial membrane, and articular cartilage samples obtained from dogs with stifle joint osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament disease and dogs without stifle joint arthritis. *Am. J. Vet. Res.* 2013, 74, 386-394.
- Garner B. C., Stoker A. M., Kuroki K., Evans R., Cook C. R., Cook J. L.: Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J. Knee Surg.* 2011, 24, 251-264.
- Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 2007, 100, 1249-1260.
- Goldring M. B.: The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect. Tissue Res.* 1999, 40, 1-11.
- Goldring M. B., Otero M.: Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2011, 23, 471-478.
- Goldring S. R., Goldring M. B.: The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004, S27-36.
- Guercio A., Di Bella S., Casella S., Di Marco P., Russo C., Piccione G.: Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol. Int.* 2013, 37, 789-798.
- Guercio A., Di Marco P., Casella S., Cannella V., Russotto L., Purpari G., Di Bella S., Piccione G.: Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol. Int.* 2012, 36, 189-194.
- Halvorsen Y. C., Wilkison W. O., Gimble J. M.: Adipose-derived stromal cells – their utility and potential in bone formation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000, 24 Suppl 4, S41-44.
- Harasymiak-Krzyzanowska I., Niedojadlo A., Karwat J., Kotula L., Gil-Kulik P., Sawiuk M., Kocki J.: Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol. Biol. Lett.* 2013, 18, 479-493.
- Harrell C. R., Markovic B. S., Fellabaum C., Arsenijevic A., Volarevic V.: Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 109, 2318-2326.
- Hart B. L., Hart L. A., Thigpen A. P., Willits N. H.: Long-term health effects of neutering dogs: comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers. *PLoS One.* 2014, 9, e102241.

40. Hays L., Zhang Z., Mateescu R. G., Lust G., Burton-Wurster N. I., Todhunter R. J.: Quantitative genetics of secondary hip joint osteoarthritis in a Labrador Retriever-Greyhound pedigree. *Am. J. Vet. Res.* 2007, 68, 35-41.
41. Hegemann N., Kohn B., Brunnberg L., Schmidt M. F.: Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10, 714-721.
42. Hielm-Bjorkman A. K., Kuusela E., Liman A., Markkola A., Saarto E., Huttunen P., Leppaluoto J., Tulamo R. M., Raekallio M.: Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, 222, 1552-1558.
43. Horwitz E. M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Deans R. J., Krause D. S., Keating A., International Society for Cellular T.: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, 7, 393-395.
44. Hulak M.: Medycyna regeneracyjna w weterynarii. *Zdrowie Uroda* 2014, 52-53.
45. Im G. I., Jung N. H., Tae S. K.: Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors. *Tissue Eng.* 2006, 12, 527-536.
46. Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J. M., Bunnell B. A.: Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell Biochem.* 2006, 99, 1285-1297.
47. Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I., Bruder S. P.: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem.* 1997, 64, 295-312.
48. Johnston S. A.: Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1997, 27, 699-723.
49. Kong L., Zheng L. Z., Qin L., Ho K. K. W.: Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J. Orthop. Translat.* 2017, 9, 89-103.
50. Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Fukusumi T., Nishikawa S., Ohta K., Kano Y., Ozaki M., Noguchi Y., Sakai D., Kudoh T., Kawamoto K., Eguchi H., Satoh T., Tanemura M., Nagano H., Doki Y., Mori M., Ishii H.: Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev. Growth Differ.* 2013, 55, 309-318.
51. Kriston-Pal E., Czibula A., Gyuris Z., Balka G., Seregi A., Sukosd F., Suth M., Kiss-Toth E., Haracska L., Uher F., Monostori E.: Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis. *Can. J. Vet. Res.* 2017, 81, 73-78.
52. Kulus M., Kulus J., Jankowski M., Borowiec B., Jeseta M., Bukowska D., Brüssow K. P., Kempisty B., Antosik P.: The use of mesenchymal stem cells in veterinary medicine. *Med. J. Cell Biol.* 2018, 101-107.
53. Legrand C. B., Lambert C. J., Comblain F. V., Sanchez C., Henrotin Y. E.: Review of Soluble Biomarkers of Osteoarthritis: Lessons From Animal Models. *Cartilage* 2017, 8, 211-233.
54. Lopez-Armanda M. J., Carames B., Lires-Dean M., Cillero-Pastor B., Ruiz-Romero C., Galdo F., Blanco F. J.: Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14, 660-669.
55. Lovati A. B., Pozzi A., Bongio M., Recordati C., Berzero G., Moretti M.: A comparative study of diagnostic and imaging techniques for osteoarthritis of the trapezium. *Rheumatology (Oxford)* 2015, 54, 96-103.
56. Mabey T., Honsawek S.: Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* 2015, 6, 95-105.
57. Martel-Pelletier J., Boileau C., Pelletier J. P., Roughley P. J.: Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2008, 22, 351-384.
58. Martig S., Konar M., Schmokel H. G., Rytz U., Spreng D., Scheidegger J., Hohl B., Kircher P. R., Boisclair J., Lang J.: Low-field MRI and arthroscopy of meniscal lesions in ten dogs with experimentally induced cranial cruciate ligament insufficiency. *Vet. Radiol. Ultrasound* 2006, 47, 515-522.
59. Mateescu R. G., Burton-Wurster N. I., Tsai K., Phavaphutanon J., Zhang Z., Murphy K. E., Lust G., Todhunter R. J.: Identification of quantitative trait loci for osteoarthritis of hip joints in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2008, 69, 1294-1300.
60. Matyas J. R., Atley L., Ionescu M., Eyre D. R., Poole A. R.: Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 543-552.
61. Millward I. R.: Multimodal Management of Canine Osteoarthritis, Second Edition. *N. Z. Vet. J.* 2017, 65, 224.
62. Minguell J. J., Erices A., Conget P.: Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 2001, 226, 507-520.
63. Mueller M. B., Tuan R. S.: Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM.R.* 2011, 3, S3-11.
64. Mussano F., Genova T., Corsolini M., Schierano G., Pettini F., Di Venere D., Carossa S.: Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile Characterization of Undifferentiated and Osteoinduced Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017, 2017, 6202783.
65. Oedayrajsingh-Varma M. J., van Ham S. M., Knippenberg M., Helder M. N., Klein-Nulend J., Schouten T. E., Ritt M. J., van Milligen F. J.: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006, 8, 166-177.
66. O'Neil D. G., Church D. B., McGreevy P. D., Thomson P. C., Brodbelt D. C.: Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England. *PLoS One.* 2014, 9, e90501.
67. Penny J., Harris P., Shakesheff K. M., Mobasheri A.: The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2012, 17, 892-908.
68. Pikula M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P.: Komórki macierzyste i czynniki wzrostu gojeniu ran. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 2015, 69, 874-885.
69. Quatman C. E., Hettrich C. M., Schmitt L. C., Spindler K. P.: The clinical utility and diagnostic performance of magnetic resonance imaging for identification of early and advanced knee osteoarthritis: a systematic review. *Am. J. Sports Med.* 2011, 39, 1557-1568.
70. Rychel J. K.: Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim. Med.* 2010, 25, 20-25.
71. Ryden M., Dicker A., Gotherstrom C., Astrom G., Tammik C., Arner P., Le Blanc K.: Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 311, 391-397.
72. Salg K. G., Temwicheit J., Imholz S., Hazewinkel H. A., Leegwater P. A.: Assessment of collagen genes involved in fragmented medial coronoid process development in Labrador Retrievers as determined by affected sibling-pair analysis. *Am. J. Vet. Res.* 2006, 67, 1713-1718.
73. Schwarz C., Leicht U., Drosse I., Ulrich V., Luibl V., Schieker M., Rocken M.: Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet. Res. Commun.* 2011, 35, 487-499.
74. Shah K., Drury T., Roic I., Hansen P., Malin M., Boyd R., Sumer H., Ferguson R.: Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects. *Stem Cells Int.* 2018, 2018, 7309201.
75. Sherwood J. M., Roush J. K., Armbrust L. J., Renberg W. C.: Prospective Evaluation of Intra-Articular Dextrose Prolotherapy for Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2017, 53, 135-142.
76. Stepien-Wyrobiec O., Hrycek A., Wyrobiec G.: Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie tocznia rumieniowatego układowego. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 2008, 62, 688-693.
77. Tetlow L. C., Adlam D. J., Woolley D. E.: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 585-594.
78. Vasseur P. B., Johnson A. L., Budsberg S. C., Lincoln J. D., Toombs J. P., Whitehair J. G., Lentz E. L.: Randomized, controlled trial of the efficacy of carprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in the treatment of osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995, 206, 807-811.
79. Vaughan-Scott T., Taylor J. H.: The pathophysiology and medical management of canine osteoarthritis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 1997, 68, 21-25.
80. Vieira N. M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B. E., Zatz M.: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 2010, 19, 279-289.
81. Vilar J. M., Batista M., Morales M., Santana A., Cuervo B., Rubio M., Cugat R., Sopena J., Carrillo J. M.: Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet. Res.* 2014, 10, 143.
82. Wilke V. L., Conzemius M. C., Rothschild M. F.: SNP detection and association analyses of candidate genes for rupture of the cranial cruciate ligament in the dog. *Anim. Genet.* 2005, 36, 519-521.
83. Winegardner K. R., Scrivani P. V., Krotscheck U., Todhunter R. J.: Magnetic resonance imaging of subarticular bone marrow lesions in dogs with stifle lameness. *Vet. Radiol. Ultrasound* 2007, 48, 312-317.
84. Yura S., Harada S., Kobayashi K.: Diagnostic Accuracy on Magnetic Resonance Imaging for the Diagnosis of Osteoarthritis of the Temporomandibular Joint. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015, 9, ZC95-97.
85. Zhou Z., Sheng X., Zhang Z., Zhao K., Zhu L., Guo G., Friedenbergs S. G., Hunter L. S., Vandenberg-Foels W. S., Hornbuckle W. E., Krotscheck U., Corey E., Moise N. S., Dykes N. L., Li J., Xu S., Du L., Wang Y., Sandler J., Acland G. M., Lust G., Todhunter R. J.: Differential genetic regulation of canine hip dysplasia and osteoarthritis. *PLoS One* 2010, 5, e13219.
86. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001, 7, 211-228.

Adres autora: dr Joanna Szczepanek, ul. Wileńska 4, 97-100 Toruń;
e-mail: szczepanek@umk.pl