

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Chirurgii

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikropęcherzykach
pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się
ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec.**

lek. wet. Krzysztof Buczak

Promotor

prof. dr hab. Zdzisław Kiełbowicz

Promotor pomocniczy

dr hab. Przemysław Prządka

Wrocław 2023

Pragnę serdecznie podziękować Panu prof. dr hab. Zdzisławowi Kielbowiczowi oraz dr hab. Przemysławowi Prządce za mentoring i merytoryczną opiekę na każdym etapie powstawania tej pracy.

Panu dr n.wet. Januszowi Bieżyńskiemu za wprowadzenie mnie w świat i tajniki chirurgii weterynaryjnej, a także zaszczerpienie we mnie poświęcenia do zawodu lekarza weterynarii.

*Mojej żonie, Kasi
za ciepło domowego ogniska i rodzinę,
dzięki której znajduję siłę do dalszego działania.*

*Rodzicom,
za wyrozumiałość, poświęcenie i zawsze pomocną dłoń.*

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	5
2.	Wprowadzenie	8
3.	Wstęp	11
3.1	Tkanka chrzęstna szklista	11
3.1.1	Morfologia i funkcja tkanki chrzęstnej szklistej	11
3.1.1.1	Chondrocyty i macierz pozakomórkowa	11
3.1.1.2	Budowa strukturalna chrząstki stawowej	13
3.1.1.3	Biomechanika chrząstki stawowej	14
3.1.2	Etiologia powstawania ubytków chrząstki	15
3.2	Diagnostyka ubytków chrząstki stawowej	17
3.2.1	Badanie fizykalne	20
3.2.2	Badanie radiologiczne	20
3.2.3	Badanie ultrasonograficzne	20
3.2.4	Badanie tomografem komputerowym	21
3.2.5	Artrografia	21
3.2.6	Badanie rezonansem magnetycznym	21
3.2.7	Artroskopia	22
3.3	Współczesne metody leczenia ubytków chrząstki stawowej	22
3.4	Mezenchymalne komórki macierzyste	26
3.4.1	Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych	26
3.4.2	Pozyskiwanie mezenchymalnych komórek macierzystych	30
3.5	Mikropęcherzyki błonowe	32
3.5.1	Charakterystyka mikropęcherzyków błonowych	32
3.5.2	Pozyskiwanie mikropęcherzyków błonowych	33
4.	Założenia i cel pracy	35
4.1	Założenia	35
4.2	Cel pracy	36
5.	Materiał i metody	37
5.1	Zwierzęta doświadczalne	38
5.2	Zabiegi chirurgiczne	39
5.2.1	Etap I – prefabrykacja BM-MSCs i MVs	39
5.2.1.1	Pobranie szpiku kostnego	39
5.2.1.2	Izolacja i hodowla BM-MSCs i MVs	42
5.2.2	Etap II – wszczepienie implantów	42
5.3	Diagnostyka obrazowa stawów kolanowych	51
5.4	Ocena makroskopowa stawów kolanowych	56

5.5	Ocena mikroskopowa ubytku chrząstki stawowej.....	56
5.6	Badania morfologiczne i biochemiczne krwi	57
5.7	Analiza statystyczna wyników	58
6.	Wyniki	59
6.1	Ocena radiologiczna operowanych stawów kolanowych.....	59
6.2	Ocena makroskopowa badanych stawów kolanowych	64
6.2.1	Grupa I badanych zwierząt – kontrola negatywna	64
6.2.2	Grupa II badanych zwierząt – kontrola pozytywna.....	65
6.2.3	Grupa III badanych zwierząt – mikropęcherzyki	66
6.2.4	Grupa IV badanych zwierząt – mezenchymalne komórki macierzyste.....	67
6.3	Ocena mikroskopowa ubytku chrząstki stawowej.....	68
6.3.1	Grupa I badanych zwierząt – kontrola negatywna	68
6.3.2	Grupa II badanych zwierząt – kontrola pozytywna.....	69
6.3.3	Grupa III badanych zwierząt – mikropęcherzyki	71
6.3.4	Grupa IV badanych zwierząt – mezenchymalne komórki macierzyste.....	75
6.4	Badania morfologiczne i biochemiczne krwi	79
7.	Dyskusja i omówienie wyników	86
8.	Wnioski	100
9.	Streszczenie w języku polskim.....	101
10.	Abstract	102
11.	Piśmiennictwo	103
12.	Spis tabel i rycin	113

1. Wykaz skrótów

ACI – ang. autologous chondrocyte implantation, autologiczny przeszczep chondrocytów

AD-MSCs – ang. adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej

AlAT – ang. alanine transaminase, aminotransferaza alaninowa

ALP – ang. alkaline phosphatase, fosfataza alkaliczna

AspAT – ang. aspartate transaminase, aminotransferaza asparaginowa

BM-MSCs – ang. bone marrow-derived mesenchymal stem cell, mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego

BMP-2 – ang. bone morphogenetic protein-2, białko morfogenetyczne kości

COMP – ang. cartilage oligomeric matrix protein, białko oligometryczne macierzy chrząstki

CrCL – ang. cranial cruciate ligament, więzadło krzyżowe doczaszkowe

CS – ang. chondroitin sulfate, siarczan chondroityny

DJD – ang. degenerative joint diseases, choroba zwyrodnieniowa stawów

ECM – ang. extracellular matrix, substancja pozakomórkowa

EDTA – ang. ethylenediaminetetraacetic acid, kwas wersenowy

EVs – ang. extracellular vesicles, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Exo – ang. exosomes, egzozomy

GAG – ang. glycosaminoglycans, glikozaminoglikany

HA – ang. hyaluronic acid, kwas hialuronowy

HiE – ang. hematoxylin and eosin stain, barwienie hematoksyliną i eozyną

HuES9 – ang. human embryonic stem cells line, linia ludzkich embrionalnych komórek mezenchymalnych

IBD – ang. inflammatory bowel disease, nieswoiste zapalenie jelit

ICRS – ang. International Cartilage Repair Society, Międzynarodowe Towarzystwo Chorób Chrząstki

IGF-1 – ang. insulin-like growth factor-1, insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IL-1 – ang. interleukin-1, interleukina 1

IL-6 – ang. interleukin-6, interleukina 6

IRAP – ang. interleukin-1 receptor antagonist protein, białko antagonistyczne receptora interleukiny-1

IVDD – ang. intervertebral disc diseases, choroba krążka międzykręgowego

KS – ang. keratan sulfate, siarczan keratanu

MACI – ang. matrix-induced autologous chondrocyte implantation, autologiczny przeszczep chondrocytów na błonach kolagenowych

MOS – ang. modified Outerbridge score, zmodyfikowana skala Outerbridge’a

MPR – ang. multiplanar reconstruction, rekonstrukcja wielopłaszczyznowa

MRI – ang. magnetic resonance imaging, rezonans magnetyczny

MSCs – ang. mesenchymal stem cells, mezenchymalne komórki macierzyste

MVs – ang. microvesicles, mikropęcherzyki

NGF – ang. nerve growth factor, czynnik wzrostu nerwów

OA – ang. osteoarthritis, osteoartroza

OATS – ang. osteochondral autograft transplantation surgery, autogeny przeszczep chrzęstno-kostny

OCD – ang. osteochondritis dissecans, oddzielająca martwica kostno-chrzęstna

PB-MSCs – ang. peripheral blood-derived mesenchymal stem cells, mezenchymalne komórki macierzyste krwi obwodowej

PBS – ang. phosphate buffered saline, buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PHC – ang. primary human chondrocyte, pierwotne ludzkie chondrocyty

PLT – ang. platelet count, płytki krwi

P-MSCs – ang. placenta-derived mesenchymal stromal cells, mezenchymalne komórki macierzyste łożyska

PRGF – ang. plasma rich in growth factors, osocze bogate w czynniki wzrostu

PRP – ang. platelet rich plasma, osocze bogatopłytkowe

RBC – ang. red blood cells, erytrocyty

RPM – ang. revolutions per minute, obroty na minutę

RTG – ang. X-ray examination, badanie rentgenowskie

RZS – ang. rheumatoid arthritis, reumatoidalne zapalenie stawów

SD – ang. standard deviation, odchylenie standardowe

sEA – ang. severe equine asthma, ciężka astma koni

SLBKM i N – Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

SMCSs – ang. synovial mesenchymal stem cells, mezenchymalne komórki macierzyste błony maziowej

TGF- β – ang. transforming growth factor beta, transformujący czynnik wzrostu β

TK – ang. computed tomography, tomograf komputerowy

TLI – ang. tendon and ligament injury, uszkodzenie ścięgien i więzadeł

TNF α – ang. tumor necrosis factor alpha, czynnik martwicy nowotworów

TP – ang. total protein, białko całkowite

UC-MSCs – ang. umbilical cord mesenchymal stem cells, mezenchymalne komórki macierzyste krwi pępowinowej

USG – ang. ultrasonography, badanie ultrasonograficzne

VEGF – ang. vascular endothelial growth factor, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

WBC – ang. white blood cells, leukocyty

2. Wprowadzenie

Osteoartroza (*łac. osteoarthrosis*, *ang. osteoarthritis* – OA), nazywana też chorobą zwyrodnieniową stawów (*ang. degenerative joint diseases* – DJD), jest nieuleczalnym jak do tej pory schorzeniem, obniżającym w znaczący sposób poziom życia ludzi i zwierząt. Szacuje się, że DJD występuję u 10 – 18% populacji mężczyzn i kobiet po 60 roku życia, a 80% badanych stwierdza negatywny wpływ choroby na ograniczenie ich poruszania się i aktywność fizyczną. Nieleczona może skutkować niepełnosprawnością i trwałym kalectwem [1–5]. U zwierząt sytuacja w populacji dotkniętych tą chorobą jest podobna, a naukowcy i klinicyści z całego świata w dalszym ciągu poszukują nowych i skuteczniejszych możliwości leczenia tego schorzenia. Zwierzęta, odczuwając ból, są w stanie go maskować, co dodatkowo utrudnia możliwość postawienia prawidłowego rozpoznania. Stwierdzono, że co najmniej 80% kulawizn, chorób stawów i otaczających je tkanek może mieć podłoże o tle DJD [6, 7].

Pomimo, że DJD jest w większości przypadków uzależniona od procesów starzenia się organizmu, etiologia tej choroby jest dużo bardziej złożona i wieloczynnikowa. Do najczęściej wymienianych czynników wpływających na rozwój tego schorzenia u ludzi i zwierząt można zakwalifikować wiek, płeć, u zwierząt rasę, otyłość, przebyte urazy i infekcje stawów, choroby degenerujące o tle autoimmunologicznym, choroby o tle metabolicznym czy czynniki genetyczne [3, 4, 8]. Brak ukrwienia oraz niewielka liczba chondrocytów w płynnej macierzy pozakomórkowej w stosunku do jej objętości uniemożliwia samoistną naprawę uszkodzonej powierzchni chrząstki. Pełna odbudowa jest możliwa tylko w okresie wczesnego rozwoju organizmu, a zwyrodnieniowa choroba stawów rozwija się i postępuje wraz z wiekiem. Powstawanie zmian zwyrodnieniowych w obrębie stawów można sklasyfikować jako pierwotne i wtórne. Pierwotnie zmiany rozwijają się wraz ze starzeniem się organizmu, gdzie wraz z wiekiem dochodzi do powolnej degeneracji chrząstki stawowej. Zmiany wtórne są najczęściej efektem przebytego urazu, nierównomiernie rozłożonego nacisku na chrząstkę (wrodzone lub nabyte zaburzenia, jak np. dysplazja stawu biodrowego) lub wynikiem destabilizacji stawu, czego przykładem jest całkowite zerwanie więzadła krzyżowego doczaszkowego (*ang. cranial cruciate ligament* – CrCL) [9]. Rozwijającej się DJD towarzyszy z reguły chroniczny ból na początku ruchu (tzw. ból startowy), który zmniejsza się w trakcie kontynuowania aktywności fizycznej. W zaawansowanych przypadkach dochodzi do ograniczenia i zmniejszenia ruchomości stawu, a nawet trwałej przebudowy i zmiany jego obrysu [1, 3, 5, 10]. DJD na poziomie mikroskopowym charakteryzuje się progresywną degradacją chrząstki stawowej, proces zapalny w obrębie błony maziowej, sklerotyzację kości

podchrzęstnej i formowanie się osteofitów w obrębie danego stawu [5, 7, 10, 11]. Terapia zachowawcza opiera się głównie na stosowaniu fizykoterapii i zniesieniu towarzyszącego bólu. Bardzo często we wczesnej fazie schorzenia wykorzystuje się doustne niesteroidowe leki przeciwzapalne, iniekcje dostawowe z kwasu hialuronowego czy kortykosteroidów. W przypadku pacjentów w zaawansowanych stadiach DJD zaleca się leczenie chirurgiczne w postaci alloplastyki [1, 5, 7, 8]. Wszystkie wspomniane warianty leczenia mają niestety swoje ograniczenia i nie przynoszą całkowitego wyleczenia tego zwyrodnienia. Dlatego nieustannie poszukuje się nowych, mniej inwazyjnych i alternatywnych metod leczenia DJD.

Od kilkunastu lat medycyna regeneracyjna jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną medycyny człowieka i zwierząt. Do leczenia mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (ang. mesenchymal stem cells – MSCs) i ich biologicznymi pochodnymi (mikropęcherzyki, ang. microvesicles – MVs) u ludzi w badaniach eksperymentalnych i przedklinicznych z zadowalającym efektem był najczęściej wykorzystywany model zwierzęcy [1, 12]. Z roku na rok potrzeba zastosowania alternatywnych metod leczenia w medycynie weterynaryjnej powiększa się i stale poszukuje się innych możliwości do wdrożenia terapii MSCs i ich biologicznych pochodnych [13–15]. Obserwuje się też wzrost zapotrzebowania na inne metody leczenia stanów chorobowych, w tym DJD, w których klasyczne metody leczenia nie przynosiły zamierzonych efektów. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań z wykorzystaniem MSCs w leczeniu określonych schorzeń nie są ostatecznie rozstrzygające [1, 13–15]. Niemniej terapia komórkowa jest obiecującą metodą leczenia chorób człowieka i zwierząt w nieodległej przyszłości i dlatego potrzebne są dodatkowe badania w celu optymalizacji źródeł pochodzenia komórek, ich liczby, czy metod aplikacji w celu standaryzacji procesu leczenia i oceny jego efektów [1,13].

W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących wykorzystania w medycynie regeneracyjnej, do leczenia ubytków chrząstki stawowej na dużym modelu zwierzęcym, wyników inżynierii tkankowej w postaci rusztowań zasiedlonych bioaktywnymi pochodnymi MSCs. Uszkodzenia chrząstki stawowej jako tkanki o swoistych zdolnościach regeneracyjnych, stanowią duże wyzwanie dla lekarzy. Do powstawania słabych uszkodzeń tkanki chrzęstnej i zwyrodnień w obrębie stawu kolanowego dochodzi najczęściej na tle urazowym lub w wyniku toczącego się w obrębie stawu przewlekłego stanu zapalnego. Nasilone zdolności chondrogenne przy użyciu MSCs pochodzących ze szpiku lub z tkanki tłuszczowej zostały wykazane w badaniach w modelu uszkodzenia chrząstki stawowej u owiec [16–18]. W ostatnich latach pojawił się pomysł prac badawczych nad właściwościami MSCs pochodzących ze szpiku owcy i zastosowania ich pochodnych, takich jak homogenat,

supernatant czy MVs do regeneracji tkanek. Nowym, nieopisanym aspektem badań jest wykorzystanie biomateriału w postaci gąbki kolagenowej typu spongostan, nasączonego produktami bioaktywnymi zawartymi w MVs, pozyskanych z hodowli MSCs pochodzących od owcy, w celu przyspieszenia procesu regeneracyjnego chrząstki stawowej. Ten sposób zastosowania MVs nie był do tej pory opisany w literaturze w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej.

Idea wykorzystania MVs w leczeniu ubytków chrząstki stawowej sprawiła, że powyżej omówione zagadnienie stało się podstawą doświadczenia, którego wyniki omówiono w niniejszej rozprawie doktorskiej.

3. Wstęp

3.1 Tkanka chrzęstna szklista

U dorosłych osobników tkanka chrzęstna pokrywa większość powierzchni stawowych, a także jest składową elementów budujących chrząstki nosowe, krtań, tchawicę, oskrzela, połączenia żeber z mostkiem czy płytki wzrostu w kościach długich. Podczas rozwoju embrionalnego tkanka ta tworzy zawiązek szkieletu, który sukcesywnie ulega różnicowaniu w tkankę kostną [19,20]. W trakcie ruchu chrząstka stawowa jest nieustannie poddawana oddziaływaniom mechanicznym, które są konieczne do jej prawidłowego funkcjonowania. W przeciwieństwie do obszarów nośnych na powierzchniach stawowych, nieobciążana chrząstka staje się cieńsza i bardziej podatna na urazy i degenerację. Tkanka chrzęstna szklista należy do tkanek łącznych o dużej gęstości, co skutkuje jej wysoką elastycznością i wytrzymałością na ściskanie. Jej regeneracja jest praktycznie niemożliwa, ze względu na brak przenikających do niej naczyń krwionośnych, limfatycznych i zakończeń nerwowych. Odżywianie chrząstki stawowej ma miejsce poprzez dyfuzję substancji odżywczych z mazi stawowej i w niewielkim stopniu z naczyń krwionośnych zaopatrujących kość pod chrząstką [20–22]. Jej głównym zadaniem jest rozpraszanie sił nacisku i obciążeń wywieranych na połączenie typu maziowego, które wytwarzane są w trakcie ruchu [9].

3.1.1 Morfologia i funkcja tkanki chrzęstnej szklistej

3.1.1.1 Chondrocyty i macierz pozakomórkowa

Chondrocyty stanowią niewielką część tkanki chrzęstnej szklistej [21]. W zależności od lokalizacji w tkance, różnią się kształtem i ułożeniem komórek. W części centralnej chrząstki mogą przybierać kulisty lub heksagonalny kształt, natomiast w części brzeżnej cechuje je bardziej spłaszczona sylwetka. Chondrocyty na obszarze chrząstki formują się w większe grupy, tworząc tzw. chondrony. Chondron jest strukturalną jednostką tkanki chrzęstnej. Obejmuje on grupę izogeniczną, którą tworzy 2-5 chondrocytów we wspólnej jamce chrzęstnej, otoczonej substancją podstawową i włóknami białkowymi. Przestrzeń pomiędzy chondronami wypełniona jest substancją międzykomórkową (ang. extra cellular matrix – ECM) [19, 20, 23, 24]. Chondrocyty należą do aktywnych metabolicznie komórek, których głównym zadaniem jest synteza i utrzymanie ECM i jej składowych, w tym kolagenu typu II, glikozaminoglikanów (ang. glycosaminoglycans – GAG), tworzących z białkami proteoglikany [23, 25]. Chondrocyty wykazują też zdolność do regulacji procesów katabolicznych w obrębie ECM,

poprzez wydzielanie enzymów proteolitycznych. Metabolizm macierzy jest regulowany m.in. za pomocą syntetyzowanych swoistych cytokin prozapalnych, w tym IL-1, IL-6, TNF α , IGF-1, TGF- β [23]. Mechanizm równowagi pomiędzy procesami anabolicznymi i katabolicznymi w obrębie ECM ma fundamentalny wpływ na prawidłową funkcję chrząstki stawowej. Zaburzenia związane z tymi procesami mogą mieć wpływ na rozwinięcie się OA w obrębie stawów typu maziowego [1, 23].

ECM składa się w głównej mierze z wody, białek kolagenowych i proteoglikanów [24,26]. Suchą masę chrząstki stawowej szklistej stanowi nawet do 40% żelowej substancji podstawowej i osadzonej w niej gęstej sieci włókien kolagenowych. Głównym kolagenem występującym w chrząstce jest kolagen typu II, a substancja podstawowa macierzy uformowana jest z proteoglikanów i glikoprotein strukturalnych [20]. Do najważniejszych GAG w ECM można zaliczyć siarczan chondroityny A i C (ang. chondroitin sulfate – CS), kwas hialuronowy (ang. hyaluronic acid – HA) i siarczan keratanu (ang. keratan sulfate – KS) [20, 25]. Tkanka chrzęstna zawdzięcza swoją odporność na odkształcenia obecności proteoglikanów, głównie agrekanu, który ma zdolność wiązania się z cząsteczkami HA i wody. Agrekan zawierający w swoim kompleksie liczne łańcuchy CS i KS łączy się z długimi łańcuchami HA, a następnie w takiej formie wiąże się bezpośrednio z powierzchnią włókien kolagenu typu II. Związane w ten sposób cząsteczki wody obecne w GAG stanowią do 80% całej masy chrząstki szklistej [19,21,26]. W zależności od relacji macierzy z chondrocytami można wyszczególnić jej 3 regiony: 1) macierz okołokomórkową; 2) macierz terytorialną; 3) macierz międzyterytorialną [26].

Liczna sieć białek kolagenowych ECM stanowi do 60% suchej masy chrząstki [26]. Ich ułożenie i typ są uzależnione od obszaru, w którym są zlokalizowane, a gęsta sieć włókien nadaje kształt i zapewnia odporność na rozciąganie chrząstki. Oprócz kolagenu typu II w macierzy można wyróżnić jeszcze kolagen włóknisty typu IX, XI, XVI, czy kolagen tworzący układy sieciowe typu VI i X. Włókna kolagenu wykazują równoległe wiązanie do powierzchni stawowej w strefie powierzchniowej (łac. *stratum tangential*). Kolagen typu II stanowi do 95% wszystkich fibryli białkowych w obrębie tkanki chrzęstnej. Jego głównym zadaniem jest zapewnienie integralności chrząstki poprzez odporność na siły rozciągające i ścierające oddziaływujące na powierzchnię stawową [26]. Oprócz licznych proteoglikanów i włókien kolagenu w macierzy znajdują się też inne białka strukturalne, których funkcją jest wiązanie cząsteczek z chondrocytami i ECM, a także białka o funkcji enzymatycznej, wśród których wyróżnić można m.in. chondronektynę, fibronektynę, tenascynę, anchorynę CII,

oligometryczne białko macierzy chrząstki (ang. cartilage oligometric matrix protein – COMP) [19,26].

3.1.1.2 Budowa strukturalna chrząstki stawowej

W chrząstce stawowej u dorosłych osobników można wyróżnić budowę warstwową, która uzależniona jest od morfologii i ułożenia przestrzennego chondrocytów, włókien kolagenowych i proteoglikanów [24]. Kształt i rozmieszczenie komórek oraz składników ECM różni się w każdej warstwie i pełni inną funkcję. W prawidłowo uformowanej chrząstce wyszczególniono 4 warstwy: warstwę powierzchniową, warstwę pośrednią, warstwę promienistą i warstwę zwapniałej chrząstki.

Warstwę zewnętrzną tworzy bardzo cienka warstwa powierzchniowa (łac. *stratum tangentialis*), która stanowi 10-20% całkowitej grubości chrząstki. Od strony jamy stawowej można w niej wyszczególnić *lamina splendens* – bezkomórkową warstwę, w której macierzy znajdują się polisacharydy, drobne włókna kolagenu i elastyny. Następną warstwę tworzy właściwa warstwa powierzchniowa, utkana z cienkiej warstwy chondrocytów ułożonych prostopadle do powierzchni stawowej. Warstwa ta cechuje się też wysoką zawartością kolagenu i niską GAG. W stosunku do innych warstw chrząstki stawowej, w warstwie powierzchniowej chondrocyty wykazują większą gęstość, co skutkuje syntezą ECM o zwiększonej zawartości włókien kolagenu. Włókna te, tak samo jak wspomniane powyżej chondrocyty, układają się równolegle do powierzchni stawowej. Układ ten zapewnia ochronę głębszych warstw przed siłami ściskającymi i skręcającymi oddziałującymi na powierzchnię stawową, a także pełni rolę bariery mechanicznej [26,27].

Druga warstwa, nazywana pośrednią (łac. *stratum intermedium sive transitionale*), zajmuje od 40% do 60% grubości chrząstki. Warstwa ta jest usiana większą liczbą aktywnych metabolicznie chondrocytów o sferycznym kształcie i ułożonymi skośnie, grubszymi włóknami kolagenu. Wyróżnia się w niej większą zawartość GAG, mniejszą włókien kolagenowych i cząsteczek wody, co zapewnia odporność na siły ściskające działające na połączenie stawowe.

Trzecia warstwa – promienista (łac. *stratum radiale*) – cechuje się największą wytrzymałością na siły ściskające. Razem z warstwą pośrednią stanowi główną masę tkanki chrzęstnej szklistej. W warstwie tej znacznie zwiększa się zawartość GAG, a włókna kolagenu i chondrocyty układają się w kolumnach przypominających słupki leżące prostopadle do powierzchni stawowej.

Najgłębsza, czwarta warstwa, nazywana warstwą zwapniałą chrząstki, łączy się bezpośrednio z kością pod chrząstką. Ta uboga w komórki warstwa oddzielona jest od kości podchrzęstnej warstwą rozdzielającą, tzw. „linią rozdzielającą” (ang. cement line), widoczną w obrazie mikroskopowym po wybarwieniu eozyną lub hematoksyliną. [9,21,24,26].

3.1.1.3 Biomechanika chrząstki stawowej

Chrzątka stawowa pokrywająca powierzchnie stawowe pełni rolę jednolitej warstwy, rozpraszającej działające na staw typu maziowego siły nacisku i przekazywanie ich na leżącą bezpośrednio pod nią kość. Ten skomplikowany proces jest możliwy dzięki wzajemnej kombinacji układu włókien kolagenowych i cząsteczek proteoglikanów, które wspólnie tworzą wytrzymałą sieć. Włókna kolagenu dobrze tolerują oddziaływania na siły ścinające, a uwodnione kompleksy proteoglikanów są wytrzymałe na siły ściskające, co w rezultacie skutkuje wzajemnym uzupełnianiem ich funkcji w trakcie ruchu [24,26].

Powierzchnie stawowe różnią się od siebie w zależności od pełnionej funkcji, na tej podstawie wyróżnia się kilka rodzajów połączeń typu maziowego:

- 1) stawy jednoosiowe np. staw promieniowo-łokciowy bliższy i dalszy, staw szczytowo-obrotowy;
- 2) stawy dwuosiowe np. staw promieniowo-nadgarstkowy, staw kolanowy;
- 3) stawy wieloosiowe np. staw ramienny, staw kolanowy;
- 4) stawy nieregularne np. stawy międzykręgowe;
- 5) stawy płaskie np. staw krzyżowo-biodrowy, staw nadgarstkowo-śródręczny.

W zależności od rodzaju stawu i wywieranych na niego obciążeń w trakcie ruchu, chrząstka stawowa dostosowuje swoją strukturę do potrzeb. Na powierzchniach, gdzie wywierany jest duży i częsty nacisk, chrząstka jest twardsza i zawiera macierz bogatą w proteoglikany, w przeciwieństwie do miejsc, gdzie działające siły nie mają tak dużego wpływu na odkształcanie się powierzchni [9]. Chrzątka stawowa szklista charakteryzuje się niskim współczynnikiem tarcia na poziomie rzędu 0,0005-0,04, który jest odwrotnie proporcjonalny do wzrostu wywieranego nacisku i pokrycia jej powierzchni mazią stawową [26]. Tak doskonałe zdolności biomechaniczne zapewnione są dzięki mikrostrukturze uformowanej z chondrocytów i składowych ECM, a przede wszystkim licznych proteoglikanów. Bardzo ważnym elementem pracy stawu jest dynamiczna mechanika płynu

chrząstki, która odpowiada za jej wiskoelastyczność [24,26]. Ta cecha uzależniona jest od relacji pomiędzy przepływem płynu w komórkach, a współczynnikiem tarcia. Jak nadmieniono, ECM składa się w głównej mierze z wody, włókien kolagenu i proteoglikanów, których grupy hydroksylowe przyciągają i łączą się z cząsteczkami wody i kationami sodu (Na^+). W efekcie, skutkuje to powstaniem gradientów osmotycznych i indukcją wewnętrznego dodatniego ciśnienia, nazywanego ciśnieniem obrzmienia (ang. swelling pressure). Sytuację tą można porównać do dmuchanego materaca, gdzie wewnętrzne ciśnienie utrzymywane jest dzięki ciągłej pracy dmuchawy [21]. Powierzchnia materaca stanowi najbardziej zewnętrzną część *stratum tangential* chrząstki stawowej, a rolę dmuchawy pełnią proteoglikany, łączące się z cząsteczkami wody. W momencie ruchu, gdy na chrząstkę oddziałują siły nacisku, woda związana z łańcuchami proteoglikanów jest z niej wypierana, co w efekcie prowadzi do jeszcze większego wzrostu ciśnienia i utwardzenia struktury chrząstki stawowej. Kiedy siły nacisku ustępują, cząsteczki wody na zasadzie działań elektrostatycznych powracają do macierzy i wiążą się ponownie z proteoglikanami, odtwarzając rusztowanie ECM [24,26]. Ten mechanizm i ruch płynu umożliwia dopływ składników odżywczych i eliminację produktów przemiany materii, ścisłą kontrolę odkształceń powierzchni chrząstki, a także nawilżanie powierzchni stawowej [9]. Jakikolwiek, zaburzenia w strukturze lub funkcji tych elementów mogą mieć fundamentalny wpływ na degenerację chrząstki i rozwinięcie się OA.

3.1.2 Etiologia powstawania ubytków chrząstki

Uszkodzenia stawów i pokrywającej ich powierzchnię chrząstki stawowej są bardzo częstymi urazami układu mięśniowo-szkieletowego u ludzi i zwierząt. Powtarzający się ucisk na chrząstkę stawową, przewyższający jej wytrzymałość, może prowadzić do jej penetrujących urazów, w rezultacie pozostawiając ją bez ochrony i odsłaniając kość podchrzęstną. W następstwie może dochodzić do inicjacji procesu zapalnego stawu i w przypadku braku wdrożenia terapii leczniczej, rozwinięcia się DJD [28]. Tkanka chrzęstna charakteryzuje się niskim potencjałem regeneracyjnym. Jakakolwiek zmiana w obrębie jej struktury będzie manifestowana w postaci kulawizny spowodowanej odczuwanym bólem, zmniejszeniem zakresu ruchu, utratą masy mięśniowej odciążanej kończyny, a nawet znaczną niepełnosprawnością pacjenta [29].

Do urazów struktury tkanki chrzęstnej może dochodzić w wyniku zadziałania bezpośrednio na powierzchnię stawu tępego urazu, pośrednio poprzez stopniowe, powtarzające

się jego obciążanie lub nagłe skręcenie stawu. Tego typu urazy można podzielić na dwie kategorie [28]:

- 1) powierzchowne ubytki tkanki chrzęstnej (ang. – chondral) – są to uszkodzenia nie penetrujące do głębszych struktur chrząstki, nie odsłaniające warstwy kości podchrzęstnej. W efekcie nie ma możliwości przemieszczenia się komórek i czynników wywodzących się ze szpiku kostnego, odpowiedzialnych za reparację tkanki chrzęstnej do miejsca urazu. Pomimo to dochodzi do mniej efektywnego gojenia się ubytku, co może skutkować ograniczeniem funkcji powierzchni stawowej i zapoczątkowania rozwoju procesów prowadzących do powstawania zmian zwyrodnieniowych w obrębie stawu [28,30];
- 2) głębokie ubytki tkanki chrzęstnej (ang. – osteochondral) – są to ubytki penetrujące przez całą warstwę chrząstki stawowej, odsłaniające warstwę kości podchrzęstnej. W wyniku tego typu urazów dochodzi do wynaczynienia naczyń krwionośnych kości podchrzęstnej i wypełnienia ubytku krwią, który następnie ulega organizacji. W efekcie, dochodzi do uaktywnienia komórek progenitorowych, makrofagów i komórek krwi, biorących czynny udział w gojeniu się tkanki chrzęstnej [30,31]. Pomimo penetracji do miejsca urazu MSCs pochodzenia szpikowego i ich różnicowania w chondrocyty, odpowiedzialne za produkcję ECM bogatą w proteoglikany, nie dochodzi do odtworzenia pierwotnej tkanki, która pokrywa nieuszkodzoną powierzchnię stawową. Tkanka chrzęstna szklista jest najczęściej zastępowana tkanką o charakterze tkanki chrzęstnej włóknistej, która cechuje się gorszymi właściwościami biomechanicznymi. Proces odtworzenia i modelowania struktury ubytku jest długotrwały i może trwać nawet 6 – 12 miesięcy [30,32].

Proces spontanicznej reparacji ubytków tkanki chrzęstnej stawowej jest przejściowy i niepełny. W przypadku małych ubytków, o nieznaczącej klinicznie powierzchni, dochodzi do proliferacji chondrocytów znajdujących się w pobliżu miejsca urazu i syntezy ECM. Niestety ta odpowiedź jest z reguły niewystarczająca do całkowitego zagojenia się ubytku [33]. Z kolei w sytuacji urazów głębokich, penetrujących do warstwy kości podchrzęstnej, wypełniająca ubytek tkanka chrzęstna włóknista w stosunku do chrząstki szklistej, cechuje się znacznie gorszymi parametrami wytrzymałości na ściskanie. Powstająca tkanka bliznowata o charakterze włóknisto-chrzęstnym, może na przestrzeni czasu ulegać ponownym urazom

i oddzieleniu się od warstwy kości. Zmiana parametrów biomechanicznych w miejscach przebytego urazu ma też znaczący wpływ na powstawanie nowych zakończeń nerwowych i odczuwanie bólu, a także indukcję stanu zapalnego stawu, co może prowadzić do rozwoju zmian erozyjnych [28,34].

3.2 Diagnostyka ubytków chrząstki stawowej

Diagnostyka schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego, w tym ubytków chrząstki stawowej powinna opierać się na zebraniu kompleksowego wywiadu lekarskiego i przeprowadzeniu specjalistycznego badania fizykalno-ortopedycznego, które w sytuacjach wątpliwych uzupełniane jest wynikami badań obrazowych. Bardzo często urazy stawów dostarczają dużych problemów w postawieniu prawidłowego rozpoznania, co w efekcie wymusza stosowanie zaawansowanych metod diagnostycznych takich jak rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging – MRI) lub artroskopia. Na przestrzeni lat obserwuje się znaczący rozwój technik, które mają na celu umożliwienie potwierdzenia diagnozy i wdrożenia odpowiedniego protokołu leczniczego. Wśród tych metod można wyróżnić techniki mniej inwazyjne, takie jak badanie radiologiczne (RTG), ultrasonograficzne (USG), tomograf komputerowy (TK) lub MRI. Obecnie, za złoty standard w ocenie i diagnostyce chorób stawów i urazów powierzchni stawowej, uważane jest badanie artroskopowe. Ta mało-inwazyjna technika umożliwia dokładną wizualizację struktury powierzchni stawowej pod powiększeniem, wraz z możliwością wdrożenia bezpośredniego leczenia ubytku chrząstki [35].

W roku 1961 Outerbridge na podstawie własnych obserwacji chondromalacji rzepki przedstawił 5-stopniową skalę makroskopowej oceny ubytku chrząstki stawowej [36]. Skala ta dość szybko została przyjęta wśród praktykujących lekarzy i do dziś jest wykorzystywana w postaci zmodyfikowanej skali chondromalacji według Outerbridge'a (ang. Modified Outerbridge Score – MOS). Od momentu publikacji, MOS została zaadoptowana przez innych autorów do oceny ubytków chrząstki w obrębie stawu ramiennego, łokciowego, biodrowego czy kolanowego [37–40]. Przedstawiony system oceny ma na celu ułatwienie komunikacji pomiędzy chirurgami i umożliwienie grupowania pacjentów w obrębie grup klinicznych wraz z czynnikami prognostycznymi. Taki rodzaj postępowania ułatwia późniejszą kwalifikację do danej procedury zabiegowej.

Współcześnie wykorzystywana skala MOS opiera się głównie na makroskopowej ocenie powierzchni chrząstki stawowej w trakcie przeprowadzanego zabiegu chirurgicznego z wykorzystaniem techniki mało inwazyjnej, jaką jest artroskopia.

Zmodyfikowana skala Outerbridge'a:

Stopień 0 (tkanka prawidłowa) – brak widocznych patologii na powierzchni chrząstki, prawidłowa błona maziowa bez cech zapalenia, kolor powierzchni stawowej biało-niebieski;

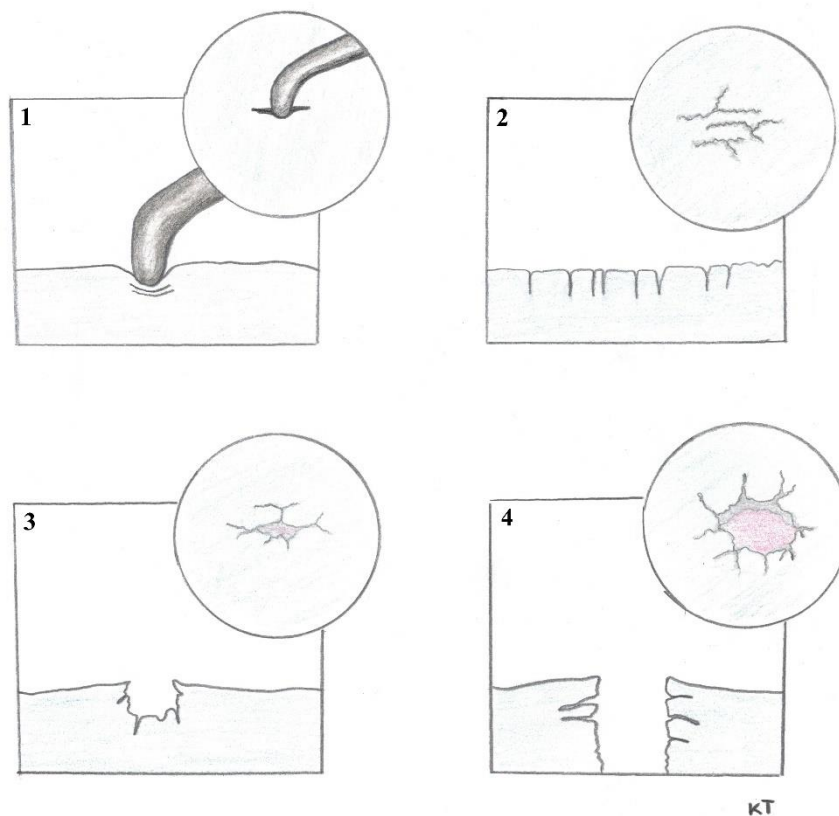
Stopień I (MOS I) – dochodzi do ścieńczenia warstwy powierzchniowej wraz z mikropęknięciami, chrząstka w miejscu urazu staje się obrzęknięta i traci swoją sprężystość, przybiera barwę biało-żółtą;

Stopień II (MOS II) – uszkodzenie warstwy powierzchniowej na obszarze poniżej 1 cm średnicy wraz ze zwłóknieniem struktury, uraz nie penetruje na całej głębokości chrząstki i nie odsłania kości podchrzęstnej;

Stopień III (MOS III) – głębokie zwłóknienie powierzchni chrzęstnej, penetrujące do warstwy kości podchrzęstnej. Może dochodzić do oddzielenia fragmentów chrzęstnych, obszar uszkodzeń powyżej 1 cm;

Stopień IV (MOS IV) – głębokie ubytki, odsłaniające kość podchrzęstną, dochodzi do zmian erozyjnych chrząstki stawowej.

Na rycinie 1 przedstawiono schemat uszkodzenia chrząstki stawowej w oparciu o zmodyfikowaną skalę MOS.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający uszkodzenie chrząstki stawowej w oparciu o zmodyfikowaną skalę MOS. Na rycinie nie uwzględniono stopnia 0 – prawidłowej powierzchni chrząstki stawowej. 1 – chondromalacja (rozmiękanie i obrzęk chrząstki stawowej; 2 – fibrylacja chrząstki i uraz jej powierzchni nie sięgający warstwy podchrzęstnej kości; 3 – szczelina o pełnej głębokości penetrująca do warstwy podchrzęstnej; 4 – erozja chrząstki stawowej pełnej głębokości penetrująca do warstwy podchrzęstnej. Rycina własna.

Jak nadmieniono, schorzenia układu mięśniowo-szkieletowego, a w szczególności choroby chrząstki stawowej bardzo często przysparzają problemów diagnostycznych. Na wczesnym etapie uszkodzenia chrząstki są trudne do rozpoznania. Wraz z trwaniem i pogłębianiem się procesu, towarzysząca urazom, rozwijająca się OA, charakteryzuje się postępującym stanem zapalnym, powolną degeneracją powierzchni stawowej, kości podchrzęstnej i przyległych tkanek. Zaawansowana DJD skutkuje w efekcie zaburzeniem prawidłowej funkcji stawu, bólem i ograniczeniem zakresu ruchu z różnego stopnia niepełnosprawnością u ludzi i zwierząt [41].

3.2.1 Badanie fizykalne

W medycynie weterynaryjnej badanie fizykalne opiera się na badaniu pacjenta w trakcie ruchu i w spoczynku w pozycji stojącej i/lub leżącej. Do głównych składowych badania ortopedycznego można zaliczyć oglądanie i omacywanie, wraz z porównawczym badaniem palpacyjnym kończyny dotkniętej procesem chorobowym i zdrowej. W trakcie badania przeprowadzane są wymuszeniowe próby prostowania i zgięciowe kończyn oraz specyficzne testy jak np. test szufladowy, kompresji piszczeli, czy test Campbella [9]. Badanie fizykalne w przypadku schorzeń stawów dostarcza informacji o bolesności danej okolicy, obecności nadmiernej ilości płynu stawowego, niestabilności stawu czy ograniczenia zakresu ruchu.

3.2.2 Badanie radiologiczne

Badanie radiologiczne jest użyteczne w przypadku głębokich ubytków powierzchni chrzęstnej, penetrujących przez całą warstwę chrząstki stawowej i odsłaniających kość podchrzęstną. W przypadku płytkich urazów warstwy powierzchniowej na radiogramach nie są uchwytny zmiany w obrębie struktury kostnej [42]. Standardowo wykonywane RTG (projekcja doczaszkowo-dooonowa, boczna, skośna) mają na celu wykluczenie podejrzenia złamania kości, jak również ocenę zaawansowania stopnia DJD w obrębie badanego stawu [43]. Badanie to okazuje się też przydatne w diagnostyce oddzielającej martwicy chrzęstno-kostnej u psów rosnących (ang. osteochondritis dissecans – OCD) [44,45].

3.2.3 Badanie ultrasonograficzne

Badanie ultrasonograficzne należy do technik małoinwazyjnych, łatwo dostępnych, szybkich i niskobudżetowych, co przemawia za wykorzystywaniem tej metody w monitoringu ubytków powierzchni chrzęstnej. W dostępnej literaturze istnieje wiele doniesień naukowych, w trakcie których posiłkowano się wykorzystaniem badań USG do śledzenia dynamiki przebiegu procesu reumatoidalnego zapalenia stawów, oceny jakości kości czy osteoporozy [46–48]. Niestety, badanie to nie może być wykorzystane w celu obrazowania każdej powierzchni stawowej, ze względu na brak możliwości przyłożenia głowicy do badanej okolicy, w celu wykonania pomiarów grubości i oceny integralności powierzchni chrzęstnej [43].

3.2.4 Badanie tomografem komputerowym

Badanie tomografem komputerowym (TK), podobnie jak badanie RTG, ma zastosowanie w przypadku głębokich ubytków warstwy chrzęstnej, penetrujących do kości podchrzęstnej. Badanie to jest bardziej dokładne i uwidacznia większą ilość detali, dotyczących rozmiarów, kształtu i głębokości ubytku [45,49]. Przydatnym narzędziem z wykorzystaniem badania TK w postawieniu ostatecznego rozpoznania i ewentualnego planowania około zabiegowego jest otrzymywany dwu- lub trójwymiarowy obraz badanych struktur i możliwość utworzenia rekonstrukcji 3D [43,50]. Niestety, długoterminowe wykorzystanie tej techniki w monitoringu leczenia ubytków chrzęstnych nie jest zalecane, ze względu na wysokie dawki emitowanego promieniowania jonizującego i koszt procedury diagnostycznej [46].

3.2.5 Artrografia

Artrografia polega na podaniu środka kontrastowego do jamy stawowej, w celu wypełnienia ubytku chrząstki, uwidocznienia obecności zmian zwyrodnieniowych i/lub pęknięć penetrujących do warstwy kości podchrzęstnej. Współcześnie do wizualizacji efektów tej techniki najczęściej jest wykorzystywane badanie TK lub MRI. Schmid i wsp. [51] w badaniach własnych dotyczących ubytków chrząstki w stawie skokowo-goleniowym u ludzi wykazali przewagę badania z wykorzystaniem kontrastu i obrazowaniem za pomocą TK nad MRI. Jednakże, technika ta ze względu na inwazyjność i dodatkowe generowanie kosztów nie jest zalecana w przypadku standardowego planowania okołoperacyjnego [52].

3.2.6 Badanie rezonansem magnetycznym

Badanie rezonansem magnetycznym jest jedną z częściej wykorzystywanych technik w celach określenia lokalizacji i wielkości ubytku chrzęstnego [53]. Dzięki badaniu możliwe jest bardzo dokładne obrazowanie struktury tkankowej bez negatywnego wpływu efektu promieniowania jonizującego na organizm – w trakcie badania MRI pobudzone protony wodoru znajdujące się w cząsteczkach wody w organizmie emitują fale magnetyczne, które po przetworzeniu przez mikroprocesor jednostki urządzenia są prezentowane w formie obrazów komputerowych. Różnorodność transmitowanych impulsów jest wykorzystywana do różnicowania w obrębie tkanek, co umożliwia wnikliwą analizę badanej okolicy o wysokiej wartości diagnostycznej. W efekcie, odpowiednio dobrana sekwencja do analizy stawu (T1-, T2-, PD - zależna, PD – zależna połączona z techniką saturacji tłuszczu tzw. FAT SAT), umożliwia wizualizację chrząstki stawowej [52,54]. Ograniczeniem stosowania MRI

w przypadku medycyny weterynaryjnej, może być dostępność do jednostek wykonujących tego typu badanie, która mimo rozbudowy infrastruktury medycznej w dalszym ciągu jest znacznie ograniczona [54]. Długi czas badania – zwierzę musi być poddane odpowiedniemu uspokojeniu farmakologicznemu – może dyskwalifikować pacjentów, którzy nie mogą być znieczuleni ze względu na choroby towarzyszące. Zwierzęta, u których w ciele występują implanty o właściwościach ferromagnetycznych, też nie powinny być poddawane tego typu badaniom.

3.2.7 Artroskopia

Badanie artroskopowe jest uznawane za złoty standard w diagnostyce i leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej stawowej w medycynie człowieka i weterynaryjnej [54,55]. Wykorzystanie techniki artroskopowej w porównaniu do klasycznej artrotomii skutkuje mniejszym odczuwaniem bólu pooperacyjnego i szybszym powrotem do pełnej sprawności po przebytym zabiegu operacyjnym [55]. Do oceny powierzchni stawowej wykorzystywana jest najczęściej zmodyfikowana skala Outerbridge'a. W trakcie badania makroskopowego z wykorzystaniem artroskopu, oprócz bardzo dokładnej oceny powierzchni ubytku, możliwe jest wdrożenie bezpośredniego leczenia. Badanie to cechuje się największą czułością w porównaniu do innych technik [43]. Niestety, ze względu na konieczność wprowadzenia do jamy stawowej jednego lub więcej portów, przez które następnie wprowadzana jest optyka i inne narzędzia chirurgiczne, metoda uznawana jest za inwazyjną.

3.3 Współczesne metody leczenia ubytków chrząstki stawowej

Lepsze zrozumienie etiopatogenezy urazów chrząstki stawowej i naturalnych ograniczeń procesów naprawczych organizmów żywych przyczyniło się do zwiększenia zainteresowania czynnościami wspierającymi reparację tkanki chrzęstnej stawowej. Dotychczas przeprowadzone badania podstawowe i kliniczne w zakresie regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych nie są zadowalające, co zmusza naukowców i klinicystów do dalszych poszukiwań skutecznych metod leczenia chorób chrząstki stawowej. Obecnie, w profilaktyce i leczeniu tego typu urazów, stosuje się zarówno metody zachowawcze z technikami medycyny regeneracyjnej na czele i leczenie chirurgiczne [29,56]. Pośród współcześnie stosowanych metod leczenia zachowawczego DJD w medycynie weterynaryjnej wymienia się:

- fizjoterapię i rehabilitację – specjaliści z zakresu weterynaryjnej medycyny sportowej i rehabilitacji posługują się szerokim wachlarzem metod wspomagających procesy

leczenia DJD i zniesienia odczucia bólu związanego z występowaniem OA u zwierząt. Wśród technik można wymienić m.in. terapię masażem manualnym (w tym chiropraktykę), terapię ruchową, terapię na bieżni wodnej, laseroterapię (nisko- i wysokoenergetyczną), termoterapię, elektroterapię, neuroterapię, pozaustrojową terapię falą uderzeniową, terapię rezonansem magnetycznym i metody medycyny niekonwencjonalnej jak akupunktura;

- farmakoterapię ogólnoustrojową – ta terapia ma na celu miejscowe wyciszenie stanu zapalnego i zniesienie lub złagodzenie odczuwanego bólu w obrębie chorego stawu, a co za tym idzie zwiększenie komfortu w trakcie ruchu zwierzęcia. Najczęściej stosowanymi w medycynie weterynaryjnej lekami są środki przeciwzapalne z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych I, II lub III generacji. Odkryciem ostatnich lat, z powodzeniem stosowanym u psów i kotów, są przeciwciała monoklonalne – bedinwetmab i frunewetmab (preparaty Librela i Solensia, ZOETIS, Belgia) - skierowane przeciwko czynnikom wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor – NGF) w postaci podskórnych iniekcji, aplikowanych raz na miesiąc. Wykazano, że stosowanie powyżej wymienionych preparatów skutecznie blokowało przekazywanie poprzez mediatory NGF sygnału do komórki nerwowej, co w efekcie skutkowało zniesieniem odczuwanego bólu związanego z OA [57,58];
- farmakoterapię miejscową – dostawowe iniekcje preparatów leczniczych mają na celu miejscowe wyciszenie stanu zapalnego i/lub poprawę funkcjonalności chorego stawu. W medycynie weterynaryjnej z powodzeniem stosowane są preparaty o działaniu przeciwzapalnym (glikokortykosteroidy), kwas hialuronowy i wiskoprotezy. Dostawowo mogą być aplikowane też wyspecjalizowane preparaty biologiczne wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej jak osocze bogatopłytkowe (ang. platelet rich plasma – PRP), białko antagonistyczne receptora interleukiny-1 (ang. inretleukin-1 receptor antagonist protein – IRAP) czy MSCs.

Wymienione powyżej metody leczenia zachowawczego mają na celu zniesienie dyskomfortu związanego z odczuwaniem w trakcie ruchu bólu i poprawienie funkcjonalności pracy chorego stawu. Metody te nie prowadzą do wyleczenia urazów chrząstki stawowej, w związku z czym w terapii DJD jednocześnie stosowane są bardziej inwazyjne techniki leczenia chirurgicznego [59,60]. Dobór postępowania operacyjnego jest uzależniony od rozległości ubytku chrzęstno-kostnego, stopnia zaawansowania DJD w obrębie danego stawu, wieku pacjenta i jego aktywności fizycznej. Wśród technik operacyjnych wyróżnia się metody:

- powierzchniowe – w wyniku głębszego uszkodzenia chrząstki stawowej penetrującego do warstwy podchrzęstnej dochodzi do krwawienia i formowania się skrzepu fibryny, który uzupełnia ubytek w kości. W efekcie, dochodzi do samoistnej migracji MSCs do miejsca ubytku, ich proliferacji i różnicowania się w komórki o charakterze chondrogennym, które biorą aktywny udział w procesie reparacji. W przypadku braku komplikacji dochodzi do wygojenia się ubytku w formie blizny, z wypełnieniem go strukturą o charakterze tkanki chrzęstno-włóknistej, która cechuje się znacznie gorszymi właściwościami biomechanicznymi, niż pierwotnie pokrywająca powierzchnię stawową tkanka chrzęstna szklista [9]. Współcześnie w medycynie człowieka i weterynaryjnej chirurdzy sięgają najczęściej po małoinwazyjne metody artroskopowe. Wykonywany tzw. „shaving” wraz z abrazją powierzchni stawowej polega na wygładzeniu ubytku powierzchni chrzęstno-kostnej do „pierwszej krwi” i usunięciu z jamy stawowej wolnych fragmentów oddzielonej chrząstki, przy wykorzystaniu specjalistycznego wiertła pod kontrolą optyki. Technika ta umożliwia dokładne zobrazowanie rozległości ubytku chrzęstno-kostnego zlokalizowanego na powierzchni stawowej. W celu pobudzenia formowania się skrzepu i migracji MSCs do powstałego ubytku dodatkowo stosuje się technikę mikrozlamań [29,59]. Technika ta polega na nawierceniu specjalnym wiertłem lub szydłem kostnym warstwy kości podchrzęstnej, w efekcie powodując mikrokrwawienie i utworzenie skrzepu bogatego w czynnik wzrostu pochodzące ze szpiku kostnego;
- reparacyjne – ograniczenia spowodowane wielkością i charakterem uszkodzenia powierzchni chrzęstnej leczonych poprzez tzw. „shaving” wymusiły wypracowanie innych technik operacyjnych, stosowanie których doprowadza się do wypełnienia ubytku tkanką chrzęstną szklistą. Są to autogenne przeszczepy chrzęstno-kostne (ang. osteochondral autograft transplantation surgery – OATS) i mozaikoplastyka z wykorzystaniem tzw. „autograftów”. W przypadku obu technik śródoperacyjnie pobierane są przeszczepy chrzęstno-kostne ze zdrowej, nieobciążanej powierzchni stawowej (najczęściej w formie cylindra), a następnie są implantowane we wcześniej przygotowanym miejscu powstałym po ubytku w chorej części stawu. Technika OATS jest zarezerwowana dla pacjentów, u których miejscowo zlokalizowany ubytek nie przekracza 2,5 – 3,5 cm średnicy [50]. Wśród ograniczeń przeszczepów z wykorzystaniem „autograftów” można wymienić problem z umocowaniem wszczepów w przygotowanym łożu chrzęstno-kostnym i obniżający się potencjał regeneracyjny związany z wiekiem pacjenta. Najlepsze efekty gojenia się ubytków były

- obserwowane u pacjentów młodych [29,50]. Techniki te były wykorzystane z sukcesem przy leczeniu ubytków cyst podchrzęstnych u koni [61,62] i OCD u psów [63,64];
- regeneracyjne – do tej grupy zabiegów operacyjnych zalicza się mikroślamania i przeszczepy płatów okostnej z MSCs (ang. autologous chondrocyte implantation – ACI). W przypadku mikroślamań, śródoperacyjnie u pacjenta po wykonaniu tzw. „shavingu” i abrazji ubytku tkanki chrzęstnej, sztyłem kostnym lub wiertłem nawierca się warstwę kości podchrzęstnej w celu spowodowania krwawienia i napływu komórek zapalnych, autogennych MSCs i czynników wzrostu, które biorą czynny udział w formowaniu się skrzepu fibryny i indukcji procesu gojenia ubytku [29,50]. Mikroślamania stanowią chętnie wykorzystywaną opcję leczenia ogniskowo zlokalizowanych, dobrze odgraniczonych, penetrujących do warstwy podchrzęstnej ubytków chrząstki. Jest to niedroga i technicznie prosta procedura, którą wykonuje się podczas artroskopii lub artrotomii stawu, bez konieczności ponownego operowania pacjenta w odstępie czasu [50]. Technika ACI polega na wcześniejszym pobraniu od pacjenta (3 do 8 tygodni przed implantacją właściwą) z nieobciążanych części danego stawu fragmentu zdrowej chrząstki. Następnie, po namnożeniu komórek w hodowli *in vitro* i osiągnięciu ich wymaganej liczby w preparacie, przystępuje się do śródoperacyjnego oczyszczenia ubytku, przykrycia go przeszczepem okostnej i implantacji autogennych chondrocytów do przygotowanego łoża chrzęstno-kostnego [50,65]. Problemy dotyczące umocowania przeszczepu autogennych chondrocytów zostały rozwiązane wraz z wprowadzeniem w 2013 roku na rynek biomedyczny implantu o nazwie MACI (Vericel, Stany Zjednoczone, ang. matrix-induced autologous chondrocyte implantation – MACI). Jest to implant utworzony z membran kolagenowych typu I-III z naniesionymi autogennymi chondrocytami pacjenta. Produkt jest stosowany do naprawy uszkodzeń chrząstki stawowej o pełnej grubości i powierzchni od 3 do 20 cm². Implant mocowany jest za pomocą kleju tkankowego bez potrzeby przeszczepu okostnej [50,65];
 - substytucyjne – do leczenia większych ubytków chrzęstno-kostnych stosuje się syntetyczne błony kolagenowe lub rusztowania 3D – „skafoldy” (ang. scaffold). Skafoldy tkankowe, poprzez swoją unikalną strukturę, naśladują macierz międzykomórkową umożliwiając i stymulując wrastanie komórek gospodarza, tworzenie nowej macierzy komórkowej i wiązanie nowych komórek i macierzy z tkanką gospodarza [66]. Rusztowania te, w celu pobudzenia procesu regeneracji, są dodatkowo zasiedlane równocześnie przygotowanymi w warunkach *in vitro* preparatami inżynierii

tkankowej zawierającymi MSCs, ich biopochodnymi, czy czynnikami wzrostu, jak IGF-1, TGF β -1, BMP-2 lub VEGF [67]. Skafold, dzięki swojej budowie dostarcza i sukcesywnie uwalnia w miejscu ubytku wyżej wymienione produkty bioaktywne. Rusztowania te po wszczepieniu do tkanek biorcy nie powinny stymulować odpowiedzi immunologicznej, a w wyniku powolnej degradacji rozkładają się do substancji prostych, które zostaną wykorzystane przez organizm. Osiągnięcie przedłużonego efektu uwalniania produktów komórkowych zasiedlających skafold podczas jego degradacji jest związane z wysokimi kosztami i zaawansowaną technologią produkcji implantów. Różnorodność stosowanych materiałów i ich kompatybilność z tkankami organizmu przemawiają za stosowaniem tego rodzaju produktów w leczeniu obszernych ubytków chrzęstno-kostnych. Naukowcy i klinicyści w trakcie przeprowadzonych badań z powodzeniem wykorzystywali swoistego rodzaju rusztowania chrzęstno-kostne utworzone z kolagenu, hydroksyapatytu, kwasu hialuronowego, fibryny, chitozanu, włókna węglowego, polilaktydu, tetrafluoroetylenu czy poliestru, które ułatwiały i przyspieszały regenerację powierzchni stawowej [66,67];

- alloplastyka – jest zaawansowaną techniką operacyjną stosowaną w przypadku rozległych ubytków i/lub degeneracji powierzchni stawowej spowodowanej przewlekłą DJD lub reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS). Endoprotezowanie stawów jest obecnie uznawane za najskuteczniejszą metodę leczenia zaawansowanej DJD w medycynie człowieka [59]. Technika ta ma na celu zastąpienie zniszczonego w wyniku choroby stawu, endoprotezą. Po okresie rekonwalescencji pacjent ma możliwość powrotu do pełnej sprawności. Obecnie, w medycynie weterynaryjnej w użytku komercyjnym, są dostępne implanty wraz ze specjalistycznym instrumentarium do endoprotezowania stawów biodrowych psów i kotów, a także stawów łokciowych i kolanowych u psów [68].

3.4 Mezenchymalne komórki macierzyste

3.4.1 Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) cieszą się obecnie bardzo dużym zainteresowaniem w świecie medycyny regeneracyjnej, zarówno człowieka jak i weterynaryjnej. MSCs rezydują niemal w każdej tkance i narządzie, w specyficznym

mikrośrodowisku, które stanowi ich niszę. Biorą udział w regeneracji narządów zarówno w sytuacjach fizjologicznych jak i patologicznych, tym samym są zaangażowane w utrzymaniu homeostazy tkankowej, niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania narządu [69]. W najprostszy sposób można je scharakteryzować jako komórki, które mają zdolność do samoodnowy i różnicowania w inne typy komórek [13]. Do ich cech można też zaliczyć zdolność regeneracji narządów i tkanek poprzez bezpośrednie różnicowanie i zastępowanie komórek somatycznych, które z czasem ulegają degradacji lub są uszkodzone, jak i wydzielanie czynników bioaktywnych, które modulują mikrośrodowisko uszkodzonej tkanki. Dzięki temu biorą czynny udział w utrzymaniu homeostazy komórek somatycznych obecnych w organizmie [56].

Odkrycie i opracowanie protokołów bezpiecznego pozyskiwania MSCs umożliwiło rozpoczęcie badań nad hodowlą komórkową w warunkach *in vitro*, a później wykorzystanie uzyskanych populacji komórek u żywych organizmów w celu próby zastąpienia chorych i zużytych komórek i/lub tkanek, a nawet narządów. Duża ilość prac badawczych nad MSCs w różnych dziedzinach nauki umożliwia obecnie ich wykorzystanie w medycynie człowieka [70] i weterynaryjnej [71].

Do charakterystycznych cech MSCs często wymienianych w opracowaniach naukowych zalicza się:

- utrzymywanie puli MSC w stanie niezróżnicowanym i zdolność samoodnowy;
- asymetryczny podział komórkowy;
- zdolność do różnicowania się w komórki różnych tkanek;
- ekspresję białek i czynników bioaktywnych sprzyjających regeneracji.

Możliwość wykorzystania MSCs budzi duże nadzieje w leczeniu m.in. chorób przewlekłych i zwyrodnieniowych czy uszkodzeń narządów wewnętrznych i tkanek [72]. Obecnie, MSCs pochodzące ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej są najczęściej stosowane klinicznie w medycynie weterynaryjnej. Ich terapeutyczne zastosowania u zwierząt obejmują leczenie chorób układu mięśniowo-szkieletowego (ścięgien, więzadeł i stawów). Dodatkowo, MSCs są stosowane w nawracającej ciężkiej astmie u koni (ang. severe equine asthma – sEA) [73], natomiast u kotów próbuje się je stosować w chorobach układu pokarmowego – nieswoiste zapalenie jelit – (ang. inflammatory bowel disease – IBD) i przewlekłej chorobie nerek [74,75]. Eksperymentalnie na myszach, szczurach i psach oceniano możliwości zastosowania MSCs w leczeniu ostrej niewydolności wątroby [76,77]. Ponadto,

auto- i allogeniczne komórki macierzyste znalazły zastosowanie w eksperymentalnym leczeniu u zwierząt urazów rdzenia kręgowego [78,79], indukowanego nietrzymania moczu [80], owrzodzeń błony śluzowej [81], dystrofii mięśniowych [82], ubytków kości [83], chrząstki stawowej [84] i cukrzycy [85].

Choroby układu mięśniowo-szkieletowego stanowią obecnie największy odsetek przypadków klinicznych w medycynie weterynaryjnej, w których wykorzystano MSCs. Choroby te mogą dotyczyć nie tylko aparatu stawowego, ale także otaczające je tkanki, jak mięśnie, więzadła, ścięgna i kości. W zależności od charakteru choroby, obserwuje się szereg objawów, takich jak stan zapalny i ból w danym obszarze ciała, kulawizny różnego stopnia czy niechęć zwierzęcia do podejmowania aktywności fizycznej. Do najczęstszych chorób układu mięśniowo-szkieletowego należą choroba zwyrodnieniowa stawów, urazy ścięgien i więzadeł (głównie u koni, ang. tendon and ligament injury – TLI) oraz choroba krążka międzykręgowego (ang. intervertebral disc disease – IVDD). Dotychczas leczenie tych schorzeń obejmowało techniki operacyjne, ogólnoustrojowe i miejscowe stosowanie preparatów przeciwzapalnych, kwasu hialuronowego, specjalistycznych produktów biologicznych (IRAP, PRP), ograniczenie ruchu czy fizjoterapię [86–89]. Medycyna regeneracyjna od kilku lat oferuje terapie eksperymentalne z użyciem MSCs, alternatywne do tradycyjnych metod leczenia.

Mezenchymalne komórki macierzyste rezydują w wielu tkankach i są odpowiedzialne za ich regenerację i utrzymanie prawidłowej funkcji narządu, przy czym ich pula różni się na różnym etapie życia danego organizmu. Komórki te różnią się między sobą morfologią, immunofenotypem, potencjałem proliferacyjnym, zdolnością do różnicowania się w inne typy komórek oraz zdolnością do generowania odpowiedzi immunologicznej w odniesieniu do tkanek biorcy [90,91].

W dzisiejszych czasach medycyna regeneracyjna wykorzystuje głównie dwa rodzaje MSCs – komórki pochodzenia allogenicznego i autogenicznego. Wśród naukowców na całym świecie toczy się debata na temat tego, czy istnieje różnica w bezpieczeństwie i skuteczności stosowania tych komórek w leczeniu żywych organizmów. Na podstawie relacji dawca-biorca, MSCs można sklasyfikować jako komórki pochodzenia allogenicznego, autologicznego lub ksenogenicznego. Komórki allogeniczne są pobierane od dawcy i wykorzystywane u innego biorcy tego samego gatunku. Komórki te mogą być z powodzeniem hodowane *in vitro*, co znacznie skraca czas oczekiwania na wdrożenie terapii w porównaniu z terapią komórkami autologicznymi. Autologiczne przeszczepienie komórek jest wykonywane u tego samego osobnika i zwykle wymaga odroczenia zabiegu przeszczepu, co jest ściśle związane

z koniecznością izolacji i hodowli komórek pobranych od pacjenta. Inną opcją w warunkach *ex tempore* jest pobranie komórek jednojądrzastych, charakteryzujących się mniejszą liczbą właściwych komórek macierzystych. Preparat komórkowy uzyskany w ten sposób, nie wymaga dodatkowej hodowli i izolacji w warunkach laboratoryjnych. Z drugiej strony, najrzadziej stosowanym źródłem MSCs są komórki typu ksenogenicznego, w których dawca należy do gatunku innego niż biorca, czego przykładem są porożogenne komórki macierzyste pobrane od jelenia szlachetnego - MIC-1. Komórki te zostały eksperymentalnie wprowadzone do uszkodzonych tkanek królików i podane w warunkach klinicznych koniom [92–94].

W erze rozkwitu medycyny regeneracyjnej naukowcy i klinicyści próbują zbadać, które komórki są lepsze — allogeniczne czy autologiczne. Przed podjęciem decyzji o rodzaju terapii, z której chce się skorzystać, należy rozważyć zalety i wady każdego typu MSCs. Logika podpowiada, że najbezpieczniejszym źródłem MSCs dla danego organizmu są komórki pobrane i wyizolowane bezpośrednio od niego. Uważa się, że wykorzystanie do leczenia komórek autologicznych od pacjenta jest bezpieczniejsze, ale z drugiej strony wiąże się z procedurą uzyskania (często jest to zabieg chirurgiczny) i przygotowania terapeutycznej dawki MSCs (izolacja i hodowla komórek). Wyżej wymienione problemy i koszt całej procedury powodują, że podejście to jest stosowane w ograniczonym zakresie. Liczba i jakość komórek autologicznych u konkretnego pacjenta zmienia się i jest również ściśle związana z jego wiekiem, płcią czy rodzajem choroby towarzyszącej [78,95].

Komórki o charakterze allogenicznym po pobraniu od dawcy można hodować i przechowywać w banku komórek przez nieokreślony czas. W ten sposób można określić konkretną partię komórek ze stałą liczbą MSCs, poziomem bezpieczeństwa i potencjałem zróżnicowania. Takie podejście mogłoby zmniejszyć typową zmienność, jak w przypadku komórek autologicznych, pozwalając na jednorodność terapii i oczekiwanych rezultatów, a także oszczędzić czas potrzebny na pobranie materiału i hodowlę komórkową [95,96]. W przypadku wykorzystania komórek allogenicznych należy również wziąć pod uwagę regulacje prawne obowiązujące w kraju, w którym ma być stosowany preparat leczniczy. W swojej pracy Bertoni i wsp. [97] ocenili wpływ auto- i allogenicznych MSCs na zdrowe stawy pęcino- we u koni. Autorzy ci wykazali, że allogeniczne MSCs pochodzące ze szpiku wywoływały znacznie więcej wysięku maziowego w porównaniu z allogenicznymi MSCs pochodzącymi z krwi pępowinowej, chociaż nie zaobserwowano istotnej różnicy w parametrach płynu maziowego. Interesujące jest jednak to, że wstrzyknięcia preparatów zawierających MSCs wywoływały łagodne do umiarkowanych miejscowe objawy zapalne

w porównaniu z placebo (buforowana fosforanami sól fizjologiczna, ang. phosphate-buffered saline – PBS), przy czym większa liczba komórek wykazywała słabszą reakcję zapalną w badaniach klinicznych i ultrasonograficznych [97].

Obecnie, na rynku komercyjnym dostępne są trzy produkty przeznaczone do terapii komórkowej u koni (Arti-Cell Forte i RenuTend, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Niemcy; HorStem, EquiCord S.L., Hiszpania) i jeden u psów (DogStem, EquiCord S.L., Hiszpania), dopuszczone do obrotu m.in. przez Europejską Agencję Leków. Analizując dostępne informacje, coraz więcej badaczy sugeruje, że wykorzystanie allogennyh lub autogennyh MSCs w medycynie regeneracyjnej można zastąpić komórkami pochodzenia ksenogenicznego. Niektóre badania wykazują, że immunogenność ksenogenicznych MSCs jest podobna do tych w konfiguracji auto- i allogenicznej [92,98].

3.4.2 Pozyskiwanie mezenchymalnych komórek macierzystych

Dotychczas wykonane badania dowodzą, że MSCs można z powodzeniem wyizolować z niemal każdej tkanki żywego organizmu [99,100]. Jednakże, ze względu na potencjał proliferacyjny i różnicujący tych komórek, najlepsze wyniki uzyskuje się pobierając materiał z tkanek dorosłych, takich jak szpik kostny (ang. bone marrow-derived mesenchymal stem cells – BM-MSCs), tkanki tłuszczowej (ang. adipose tissue-derived mesenchymal stem cells – AD-MSCs), krwi obwodowej (ang. peripheral blood-derived mesenchymal stem cells – PB-MSCs), lub tkanek okołoporodowych takich jak łożysko (ang. placenta-derived mesenchymal stem cells – P-MSCs) lub krwi pępowinowej (ang. umbilical cord-derived mesenchymal stem cells – UC-MSCs) [99,100].

Jak podaje piśmiennictwo, rodzaj komórek, w zależności od miejsca ich pochodzenia, ma istotny wpływ na potencjał ich różnicowania *in vivo* [14,101], a także na ich biologicznie istotne cechy. Kolejnym ważnym aspektem przy wyborze źródła MSCs powinno być ich zastosowanie w danej terapii.

BM-MSCs izoluje się bezpośrednio z aspiratu szpiku kostnego. Tkanka ta, podobnie jak w medycynie człowieka, jest jednym z najlepiej zbadanych źródeł pochodzenia MSCs w medycynie weterynaryjnej [102]. Niestety, pobranie materiału w tym przypadku wiąże się z inwazyjnym zabiegiem operacyjnym wykonywanym w sedacji i znieczuleniu miejscowym lub znieczuleniu ogólnym, z takim samym ryzykiem powikłań pooperacyjnych obserwowanych u ludzi, tj. zakażenie i/lub krwawienie [103,104]. Istnieją doniesienia

o przypadkach śmiertelnego nakłucia klatki piersiowej i serca [105] oraz jatrogennej odmy płucnowej u koni [106]. Niemniej jednak, u tych zwierząt, procedura pobrania BM-MSCs może być przeprowadzona na zwierzęciu stojącym bez większego ryzyka wspomnianych powikłań. Obecnie uważa się, że najbardziej odpowiednim miejscem do pobrania aspiratu jest biopsja za pomocą igły Jamshidi z czwartego lub piątego członu mostka u koni [107,108] i aspiracja z bliższej części kości ramiennej, kości udowej czy kości biodrowej u psów i kotów [109].

Wiadomo, że BM-MSCs stanowią tylko niewielką liczbę wszystkich jednojądrzastych komórek zrębu szpiku kostnego, a ich liczba maleje wraz z wiekiem [110]. W celu zwiększenia liczby MSCs stosuje się hodowlę i ich pasażowanie *in vitro* z aspiratu pobranego wcześniej od dawcy. Hodowla składa się z kilku etapów (założenie hodowli, namnażanie komórek, wymiana podłoża i zakończenie hodowli z określeniem fenotypu komórek) i jest ściśle zależna od liczby MSCs w dawce terapeutycznej preparatu, który chcemy uzyskać.

W ostatnich latach, coraz bardziej popularnym i łatwiej dostępnym źródłem materiału do pozyskiwania i izolacji MSCs jest tkanka tłuszczowa [101]. Łatwość pozyskania materiału sprowadza się do planowanej lipektomii lub lipoaspiracji wykonywanej podczas zabiegu profilaktycznego u psów i kotów jakim jest owariohisterektomia. Sugerowanym źródłem AD-MSCs jest tłuszcz podskórny lub trzewny [111]. Niewielką liczbę komórek jądrzastych zawierających śladowe ilości AD-MSCs można uzyskać z aspiratu bezpośrednio po jego pobraniu. Podobnie jak w przypadku BM-MSCs, aby uzyskać terapeutyczną dawkę komórek tłuszczowych, konieczna jest ich hodowla *in vitro*, poprzedzona specyficznymi procedurami laboratoryjnymi, takimi jak trawienie enzymatyczne, a następnie seria płukań i wirowań. Wykazano, że AD-MSCs mają wysoką zdolność proliferacji i wielokierunkowego różnicowania, co sprawia, że komórki te są często chętnie wykorzystywanym w medycynie regeneracyjnej źródłem. Komórki te były i są wielokrotnie stosowane w leczeniu schorzeń narządu ruchu, a ich biodostępność i metody pozyskiwania w porównaniu z BM-MSCs zawartymi w szpiku kostnym przemawiają za lepszym źródłem ich wykorzystania [112–114].

PB-MSCs można również uznać za alternatywne źródło MSCs. W porównaniu z metodami opisanymi powyżej pobranie próbki krwi jest najmniej kontrowersyjną metodą, niesie ze sobą najmniejsze ryzyko powikłań i nie wymaga farmakologicznego uspokojenia zwierzęcia do przeprowadzenia tej procedury. Jednak, obecne badania wymagają dalszej kontynuacji ze względu na niską biodostępność PB-MSCs we krwi obwodowej ludzi, psów i koni. Komórki te zostały również pomyślnie wyizolowane od królików, myszy i kawii

domowych [115,116]. Dhar i wsp. podaje, że tylko 3 na 10 badanych koni ma wystarczającą liczbę PB-MSCs we krwi do dalszej hodowli komórkowej. Zwierzęta te przed próbą aspiracji poddano również terapii w komorze hiperbarycznej, gdzie w efekcie doszło do zwiększenia liczby PB-MSCs we krwi obwodowej [117,118].

Innym obiecującym i coraz częściej wykorzystywanym źródłem komórek macierzystych w medycynie człowieka i weterynaryjnej są tkanki płodu (płyn owodniowy, błony płodowe, łożysko, galareta Whartona i krew pępowinowa) [119–122]. Wiadomo, że wydajność komórek MSCs spada wraz z wiekiem dawcy. Wykazano, że komórki uzyskane z tkanek płodowych mogą różnicować się nie tylko w komórki typu mezenchymalnego, ale także w komórki pozostałych trzech listków zarodkowych, co może stanowić o ich pluripotencji [123]. Inne, często wymieniane cechy komórek pochodzenia embrionalnego, to brak odrzucenia przez obcego biorcę (ksenogenność), zdolność do migracji poza miejsce aplikacji oraz dłuższy czas przeżycia komórek pochodzących od dorosłych dawców [124]. W porównaniu z pozyskiwaniem BM-MSCs lub AD-MSCs, procedura pobrania materiału jest klasyfikowana jako technika małoinwazyjna i odbywa się w okresie okołoporodowym. Wadą pozyskiwania materiału w trakcie porodu może być niska aseptyka samej procedury [125], a także konieczna obecność personelu medycznego – lekarza weterynarii lub przeszkolonego w zakresie położnictwa technika.

3.5 Mikropęcherzyki błonowe

3.5.1 Charakterystyka mikropęcherzyków błonowych

Niedostateczna ilość satysfakcjonujących wyników wieloletnich badań nad właściwościami regeneracyjnymi i immunomodulującymi MSCs zachęca naukowców i klinicystów do dalszych doświadczeń i poszukiwań alternatywnych, mniej inwazyjnych metod leczenia pacjentów. Do tej pory, MSCs były wykorzystywane w terapii klinicznej chorób układu mięśniowo-szkieletowego (w tym reparacji ubytków chrząstki stawowej), autoimmunologicznych, układu sercowo-naczyniowego, neurodegeneracyjnych, transplantologii, a także w leczeniu wspierającym terapię w zakażeniu koronawirusem SARS-CoV-2 [126].

Liczne badania wykazały, że za efekt terapeutyczny MSCs są odpowiedzialne wydzielane przez nie cytokiny i czynniki wzrostu. Ponadto, wśród aktywnych biopochodnych wydzielanych przez MSCs, które oddziałują na komórki i tkanki znajdujące się w otoczeniu,

wyróżnia się pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles – EVs), egzosomy (ang. exosomes – Exo) i MVs [126]. Pęcherzyki te różnicuje się w zależności od ich wielkości, pełnionej funkcji, drogi powstawania i uwalnianych zawartości. Pomimo obiecującego potencjału regeneracyjnego wykorzystanie wymienionych powyżej pęcherzyków w badaniach klinicznych jest w dalszym ciągu mocno ograniczone ze względu na brak standaryzacji w metodach ich izolacji i analizy [127].

MVs to struktury, których średnica wynosi od 0,1 μm do 1 μm [127]. Uwalniane są z powierzchni komórek i posiadają zdolność do przenoszenia biologicznie aktywnej zawartości komórek rodzicielskich, w tym białek wpływających na regenerację tkanek, jak też czynników zdolnych do wyciszenia stanu zapalnego. Stan zapalny jest kardynalnym objawem uszkodzenia chrząstki stawowej, a przeciwzapalne właściwości MVs pozyskanych z MSCs, pochodzących z tkanki tłuszczowej udokumentowano w badaniach *in vitro* [128,129]. MVs są uwalniane w czasie hodowli i ekspansji MSCs i stanowią naturalną zawartość pożywki hodowlanej, z której mogą zostać wyizolowane i wykorzystane w procesach regeneracji tkanek.

Ich skład odzwierciedla w dużej mierze pochodzenie komórkowe i określa zakres aktywności biologicznej przenoszonej przez MVs. Zdolność do wiązania się mikropęcherzyków z komórkami docelowymi umożliwia szeroki zakres działania. Ten rodzaj komunikacji międzykomórkowej odgrywa zasadniczą rolę w modulacji mikrośrodowiska, interakcji immunologicznych, procesów przeciwzapalnych i angiogenezy, gdyż w pęcherzykach transportowany jest cały pakiet informacji, który oprócz białek regulatorowych i receptorów zawiera również RNA, miRNA i lipidy niezbędne w prawidłowym procesie regeneracji tkanek.

W badaniach *in vitro*, wykonanych przez zespół Klimczak i wsp. [130], dotyczących izolacji i charakterystyki mikropęcherzyków pochodzących z MSCs izolowanych z tkanki tłuszczowej wykazano, że mikropęcherzyki transportują białka i miRNA, które wspierają i ułatwiają proces angiogenezy, niezbędnej w procesie gojenia przewlekłych ran, co przekłada się na proces regeneracji tkanek.

3.5.2 Pozyskiwanie mikropęcherzyków błonowych

MVs są wydzielane przez wszystkie typy komórek organizmów żywych na drodze bezpośredniego oddzielania się lub pączkowania na zewnątrz z powierzchni błony komórkowej. Ich obecność była identyfikowana w osoczu, moczu, nasieniu, ślinie, wydzielinie oskrzeli, płynie mózgowo-rdzeniowym, mleku, surowicy, płynie owodniowym, mazi

stawowej, łzach, limfie, żółci czy soku żołądkowym [127]. Obecność MVs w płynach ustrojowych może sugerować odgrywanie przez nie istotnej roli w homeostazie i procesach regeneracyjnych organizmu, a tym samym czyni je ważnym przedmiotem badań w ciągle ulepszanych strategiach diagnostycznych i terapeutycznych [131]. Pomimo intensywnej pracy naukowców, droga powstawania MVs nie jest do końca wyjaśniona, a wykorzystanie ich potencjału regeneracyjnego w badaniach klinicznych jest ograniczona ze względu na brak standaryzacji protokołów ich izolacji i hodowli na skalę przemysłową.

Powstawanie MVs odbywa się poprzez transport w kierunku powierzchni komórki białek regulatorowych, informacji molekularnej zawartej w kwasach nukleinowych i redystrybucję lipidów błonowych. W efekcie, dochodzi do zmiany krzywizny i sztywności błony komórkowej, a następnie do zaciśnięcia pęcherzyka wraz z jego zawartością na powierzchni komórki i jego uwolnienie do przestrzeni międzykomórkowej [131]. Proces ten stanowi unikalny i w pełni regulowany mechanizm powstawania MVs, w porównaniu do syntezy egzosomów czy ciałek apoptycznych.

Izolacja MVs stanowi pewnego rodzaju wyzwanie i konieczne jest osiągnięcie optymalnej czystości próbki przed jej zastosowaniem terapeutycznym. Obecnie, za złoty standard w pozyskiwaniu MVs z płynów ustrojowych, uznawane jest wirowanie różnicowe/ultrawirowanie, początkowo w niskiej, a następnie wzrastającej prędkości. Zabieg ten pozwala na usunięcie zanieczyszczeń komórkowych i powstanie osadu zawierającego MVs. Niestety, technika ta posiada ograniczenia, które rzutują na wydajność odzyskiwania MVs czy zawartość zanieczyszczeń w próbce, co w efekcie powoduje dużą zmienność obserwowaną w wynikach dostępnych badań [127,132].

4. Założenia i cel pracy

4.1 Założenia

Ze względu na niewielkie zdolności regeneracyjne, leczenie tkanki chrzęstnej stawowej jest nadal dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny człowieka i zwierząt. Dotychczas stosowane klasyczne metody leczenia DJD są coraz częściej zastępowane technikami mniej inwazyjnymi, z wykorzystaniem produktów inżynierii tkankowej, w tym MSCs i ich biopochodnych. Leczenie ubytków tkanki chrzęstnej stawowej i spowolnienie procesu powstawania zmian zwyrodnieniowych ma na celu wyeliminowanie uczucia bólu i poprawę lub powrót do pełnej funkcjonalności chorego stawu. Niepodjęcie leczenia prowadzi nieuchronnie do pogorszenia komfortu życia pacjenta, a także jego trwałego kalectwa. Jak dotąd nie wynaleziono skutecznej metody leczenia i/lub zapobiegania DJD. Mała inwazyjność i pozytywne efekty terapii eksperymentalnej i klinicznej MSCs zachęcają do dalszych badań. Od pewnego czasu naukowcy skupiają swoje wysiłki wokół terapii OA z wykorzystaniem egzosomów i/lub mikropęcherzyków, będących biopochodną MSCs. W stosunku do komórek progenitorowych mikropęcherzyki cechują się lepszą stabilnością, silniejszym efektem działania i mniejszym efektem immunogennym. Wszystkie te cechy sprawiają, że MVs zyskują coraz większe zainteresowanie zarówno wśród naukowców, a także w nieodległej przyszłości pewnie też klinicystów.

W dostępnej literaturze z zakresu medycyny regeneracyjnej brak jest danych dotyczących wykorzystania produktów inżynierii tkankowej w postaci rusztowań zasiedlonych mikropęcherzykami, do leczenia ubytków chrząstki stawowej na dużym modelu zwierzęcym. Do tej pory terapia OA z wykorzystaniem mikropęcherzyków była stosowana tylko w postaci iniekcji dostawowych u myszy, szczurów i królików [133]. Dysponując wiedzą dotyczącą właściwości regeneracyjnych MSCs w leczeniu OA, założono, że zaimplantowanie w doświadczalnie wykonanym ubytku tkanki chrzęstnej skafoldu kolagenowego nasączonego mikropęcherzykami spowoduje jego szybszą i bardziej efektywną regenerację.

W doświadczeniu własnym, ze względu na charakter uszkodzenia chrząstki stawowej i jego późniejsze wypełnienie, zdecydowano o przeprowadzeniu artrotomii stawu kolanowego i wypełnieniu ubytków chrząstki stawowej w bloczku kości udowej przy pomocy kolagenowych rusztowań nasączonych produktami bioaktywnymi (MSCs lub MVs). W dalszych etapach doświadczenia zaplanowano przeprowadzenie badania histologicznego miejsca reparacji ubytku chrząstki stawowej oraz wykonanie badania tomograficznego, a także morfologicznego i biochemicznego krwi obwodowej.

4.2 Cel pracy

Celem pracy była ocena miejscowej i ogólnej reakcji organizmu owcy na leczenie doświadczalnie wytworzonego ubytku chrząstki stawowej szklistej stawu kolanowego skafoldem kolagenowym nasączonym:

- autologicznymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSCs);
- autologicznymi mikropęcherzykami (MVs) pochodzącymi z BM-MSCs.

Cel pracy zrealizowano poprzez wykonanie ubytków chrzęstno-kostnych w blozku kości udowej i implantację skafoldów kolagenowych nasączonych preparatami bioaktywnymi, a następnie przeprowadzając:

- ocenę struktur operowanego stawu kolanowego z wykorzystaniem badania tomografii komputerowej;
- ocenę makroskopową badanych stawów kolanowych;
- ocenę mikroskopową fragmentu blozka kości udowej, w której został wykonany ubytek chrzęstno-kostny;
- ocenę ogólnej reakcji organizmu owcy na zastosowane leczenie poprzez monitorowanie parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi.

5. Materiał i metody

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu (uchwała nr 35/2019/P1 z dnia 19.06.2019).

Doświadczenie przeprowadzono na owcach, w dwóch etapach:

- a) I etap – prefabrykacja BM-MSCs i MVs,
- b) II etap – implantacja właściwa.

W I etapie od zwierząt, na 3 tygodnie przed planowanym II etapem doświadczenia, został pobrany szpik kostny celem izolacji i ekspansji BM-MSCs i MVs. II etap stanowiły zabiegi operacyjne wypełnienia doświadczalnie wytworzonego ubytku chrząstki stawowej, zlokalizowanego w bloczku kości udowej, za pomocą skafoldu kolagenowego nasączonego produktami bioaktywnymi. Bezpośrednio po zabiegu operacyjnym, w 90 dniu i 180 dniu obserwacji u zwierząt wykonano kontrolne badanie tomografem komputerowym. Po eutanazji owiec w 180 dniu po zabiegu, z operowanych stawów kolanowych wyizolowano preparaty tkankowe, które zostały poddane ocenie histologicznej. Dodatkowo od zwierząt bezpośrednio przed zabiegiem operacyjnym, a także w 3, 6 i 10 dniu od zakończonej procedury została pobrana krew obwodowa do badań morfologicznych i biochemicznych.

Izolację MSCs ze szpiku kostnego owiec [134] i produkcję mikropecherzyków [130] przeprowadzono w Samodzielnym Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych (SLBKMIn) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wg procedur opracowanych przez zespół prof. A. Klimczak. Pobranie szpiku kostnego, implantacja wszczepów do stawów kolanowych, pobranie krwi do badań laboratoryjnych oraz badania sekcyjne stawów kolanowych przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania histologiczne zostały wykonane w Zakładzie Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania morfologiczne i biochemiczne krwi wykonano w Weterynaryjnym Laboratorium Diagnostycznym „UNI-LAB” Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

5.1 Zwierzęta doświadczalne

Do badań wykorzystano 16 zwierząt, gatunku owca domowa (łac. *Ovis aries*), samiec, rasy Merynos polski, w wieku od 2 do 4 lat, o masie ciała od 43 do 66 kg (tabela 1).

Tabela 1. Grupy badanych zwierząt. OW – owca.

Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna	MVs	BM-MSCs
Numery badanych owiec			
OW 1 – 48 kg	OW 3 – 66 kg	OW 5 – 61 kg	OW 11 – 56 kg
OW 2 – 56 kg	OW 4 – 65 kg	OW 6 – 54 kg	OW 12 – 45 kg
		OW 7 – 65 kg	OW 13 – 48 kg
		OW 8 – 52 kg	OW 14 – 48 kg
		OW 9 – 57,5 kg	OW 15 – 50 kg
		OW 10 – 43 kg	OW 16 – 60 kg

Zwierzęta po sprowadzeniu do Katedry i Kliniki Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu odbyły 3-tygodniową kwarantannę, w trakcie której wykonane było badanie koproskopowe – wynik negatywny. Owce przez cały okres trwania doświadczenia przebywały w boksach mieszczących się w pomieszczeniach dla zwierząt gospodarskich o wymiarach 3,0 x 3,5 m, ze stałym dostępem do wody i temperaturą powietrza około 18 – 20°C, wilgotnością powietrza około 60 – 80%, naturalnym oświetleniem, zapewnionym regularnym przepływem i wymianą powietrza. Zwierzęta żywione były wysokiej jakości sianem łąkowym i suplementowane lizawkami solnymi (Multi-Lisal Se, Kopalnia Soli „KŁODAWA” S.A., Polska).

W II etapie przeprowadzonego doświadczenia (implantacja właściwa) wykorzystanych zostało 16 owiec, podzielonych na 4 grupy badanych zwierząt. U zwierząt z grupy I (2 owce) nie była wykonana żadna procedura chirurgiczna. Ostatecznie owce były poddane eutanazji w celu pozyskania zdrowych tkanek stawu kolanowego i przeprowadzenia porównawczej oceny histologicznej w stosunku do zwierząt operowanych. Owce z grupy doświadczalnej II, III i IV zostały poddane zabiegowi artrotomii prawego stawu kolanowego w trakcie, którego w miejsce ubytku tkanki chrzęstnej stawowej wprowadzono skafold kolagenowy (Spongostan Standard, FERROSAN A/S, Dania):

- grupa II – 2 owce, kontrola pozytywna dla etapu II, wykonany ubytek tkanki chrzęstnej stawu kolanowego został wypełniony skafoldem kolagenowym i nasączony 0,5 ml

jałowego płynu fizjologicznego (NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS, Fresenius Kabi Polska Sp. z o.o., Polska);

- grupa III – 6 owiec, w wykonany ubytek tkanki chrzęstnej stawu kolanowego zaimplantowany został skafold kolagenowy i nasączony 0,5 ml 0,9% NaCl, w którym zawieszono $2,87 \times 10^6$ autologicznych MVs/owcę pochodzących z BM-MSCs;
- grupa IV – 6 owiec, w wykonany ubytek tkanki chrzęstnej stawu kolanowego zaimplantowany został skafold kolagenowy i nasączony 0,5 ml 0,9% NaCl w którym zawieszono 20×10^6 autologicznych BM-MSCs/owcę.

Przed rozpoczęciem II etapu doświadczenia (implantacja właściwa) u każdego zwierzęcia zostało wykonane badanie radiologiczne i tomograficzne prawego stawu kolanowego, a także pobrano krew obwodową w celu wykonania badań morfologicznych i biochemicznych. Następnie w celu oceny reakcji ogólnoustrojowej na zastosowane preparaty została pobrana krew w 3, 6 i 10 dniu od zakończonej procedury chirurgicznej. Obserwacja zwierząt była prowadzona przez 180 dni. Kontrolne badania tomografii komputerowej wykonane zostały bezpośrednio po zabiegu chirurgicznym, w 90 dniu obserwacji i po zakończonym okresie obserwacji (180 dniach od wykonania procedury chirurgicznej), w celu oceny postępów gojenia eksperymentalnie wytworzonego ubytku w powierzchni chrzęstnej. Następnie, po 180 dniach od operacji owce zostały poddane eutanazji, a pobrany materiał z operowanych stawów kolanowych posłużył do badań histologicznych.

5.2 Zabiegi chirurgiczne

5.2.1 Etap I – prefabrykacja BM-MSCs i MVs

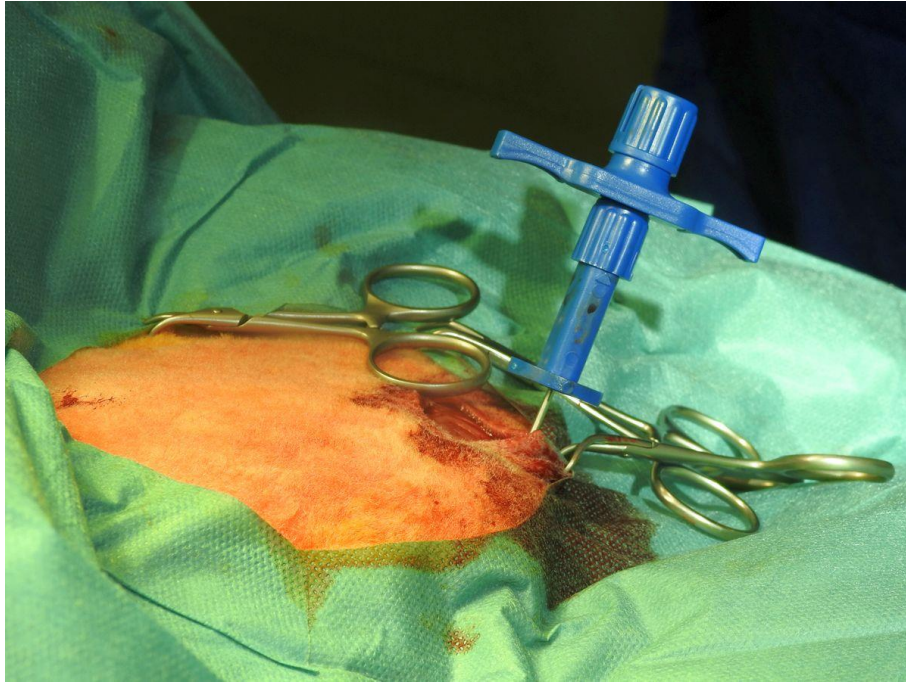
W I etapie doświadczenia od 12 owiec został pobrany szpik kostny z bliższej nasady kości ramiennej celem izolacji i ekspansji BM-MSCs i MVs.

5.2.1.1 Pobranie szpiku kostnego

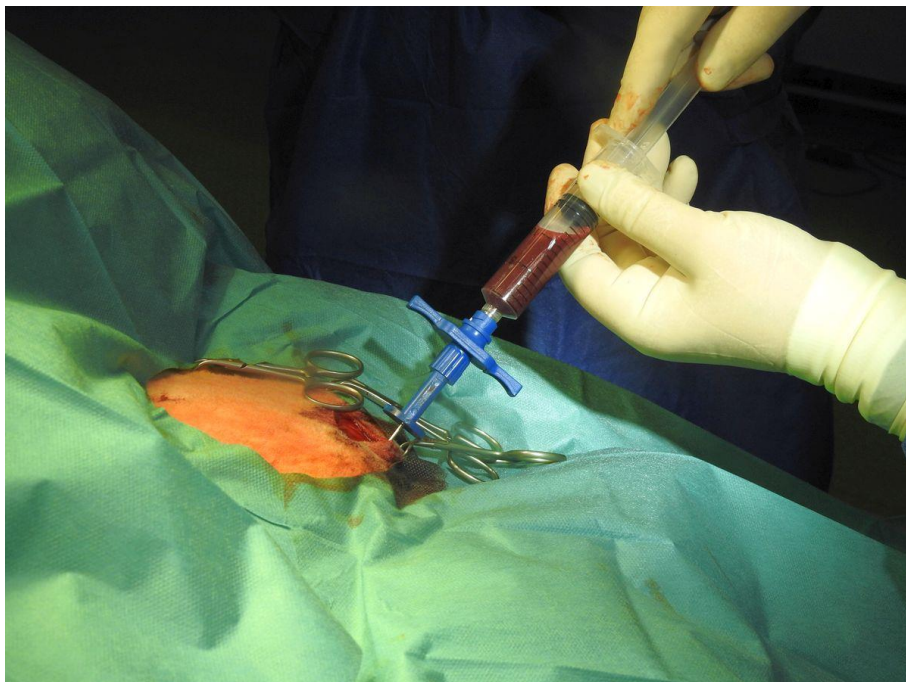
Po przeprowadzeniu wstępnego badania klinicznego i zakwalifikowaniu zwierząt do operacji, premedykacja u owiec została osiągnięta poprzez domięśniową iniekcję leków – medetomidyna w dawce 0,01 mg/kg mc (Cepetor 1mg/ml, ScanVet, Polska), butorfanol w dawce 0,1 mg/kg mc (Butomidol 10mg/ml, Orion Pharma, Polska) i ketamina w dawce 10

mg/kg mc (Bioketan 100mg/ml, Vetoquinol Biowet, Polska). Po uspokojeniu zwierząt do żyły odpromieniowej (łac. *vena cephalica*) założony został kateter dożylny (kaniula dożylna KD-FIX 20G 1.1 – 32mm, KDM, Niemcy), który posłużył do dożylnego podania leków przeciwbólowych oraz indukcji znieczulenia ogólnego – propofol w dawce 2-3 mg/kg mc (Propofol-Lipuro 10mg/ml, B.Braun, Niemcy). Po zaintubowaniu owiec, znieczulenie ogólne w trakcie procedury pobrania szpiku kostnego podtrzymywane było wziewnie z wykorzystaniem izofluranu (1,5-2,0 vol %, Iso-Vet 1000mg/g, Piramal Critical Care, Holandia) za pomocą aparatu anestezyjologicznego WATO Ex-55 Pro (Mindray, Niemcy). Analgezja śródoperacyjna w trakcie wykonywanej procedury była zapewniona poprzez podanie fentanylu w postaci bolusu w dawce 3mcg/kg mc lub zamiennie we wlewie ciągłym w dawce 0,3mcg/kg/h mc (Fentanyl WZF, 50µg/ml, Polfa Warszawa, Polska). Po przeprowadzeniu zabiegu zwierzęta otrzymały leki przeciwbólowe: meloksikam w iniekcjach podskórnych w dawce 0,4 mg/kg mc (Metacam 5 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Niemcy), który był powtarzany co 24 godziny przez 3 dni, metamizol w dawce 30 mg/kg mc (Pyralgivet 500 mg/ml, VetAgro, Polska) w iniekcjach dożylnych stosowany co 8 godzin, przez 2 dni oraz antybiotyk (amoksycylina w dawce 15 mg/kg mc – Betamox LA, ScanVet, Polska) w iniekcjach podskórnych co 48 godziny, w 3 dawkach.

Szpik kostny został pobrany z bliższej nasady kości ramiennej od 12 owiec poprzez aspirację krwi szpikowej do heparynizowanych strzykawek za pomocą igieł biopsyjnych do szpiku kostnego (igła biopsyjna 15G x 45mm, MEDAX Medical Devices, Włochy). W ciągu 1 godziny od pobrania zabezpieczony szpik kostny został przekazany do Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych IITD PAN we Wrocławiu.



Ryc. 2. Pobranie szpiku kostnego z bliźszej nasady kości ramiennej. Igła biopsyjna wprowadzona do bliźszej nasady kości ramiennej



Ryc. 3. Aspiracja szpiku kostnego z bliźszej nasady kości ramiennej u owcy

5.2.1.2 Izolacja i hodowla BM-MSCs i MVs

Izolacja i hodowla BM-MSCs

MSCs wyizolowano ze szpiku kostnego owiec metodą wirowania (30 min., 1410 RPM – obroty na minutę, ang. revolutions per minute) w gradiencie gęstości z wykorzystaniem Lymphoflotu i adhezji do naczynia plastikowego w hodowli w medium α MEM suplementowanego 10% FBS, 2 mM L-glutaminą, 1% koktajlem antybiotyków penicylina/streptomycyna oraz czynnikami wzrostowymi 20 ng/ml FGF-2 i 10 ng/ml TGF- β 1. Hodowle komórkowe od momentu izolacji do pierwszego pasażu prowadzono przez okres ok. 10-12 dni w temperaturze 37°C i 5% CO₂. W celu rozmnożenia MSCs komórki prowadzono do 2-3 pasaży i zakładano hodowlę w 3-poziomowych naczyniach hodowlanych o powierzchni 500 cm² w medium α MEM suplementowanym jw.. Hodowla komórek do 3 pasażu trwała przez kolejne 8 dni. Po tym czasie komórki MSCs były zbierane z naczynia hodowlanego przy użyciu akutazy i odwirowane (5min., 1100 RPM), a następnie 20 mln komórek zostało zawieszonych w 0,5 ml NaCl 0,9%/owcę i przekazane kurierowi Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Izolacja MVs produkowanych przez komórki BM-MSCs owcy

MVs pochodzące z komórek BM-MSCs były izolowane wg procedury opracowanej uprzednio w SLBKMIn [130], z niewielkimi modyfikacjami. Supernatanty z komórek BM-MSCs zbierano po 48 godzinach hodowli w medium hodowlanym (MEM α , 2mM glutamina, 1% roztwór antybiotyków penicylina/streptomycyna, 20 ng/ml FGF2, 10 ng/ml TGF β 1) pozbawionym surowicy, a następnie poddawano serii wirowań: 1800 RPM, 10 minut w temp. pokojowej; 4500 RPM, 10 minut oraz 12800 RPM, 40 minut w temperaturze 4°C. Osad mikropęcherzyków zbierano i płukano w PBS (wirowanie 12800 RPM, 40 minut w temperaturze 4°C). Mikropęcherzyki z trzech izolacji pulowano w objętości 200 μ l PBS i liczone metodą cytometrii przepływowej z użyciem kulek fluorescencyjnych (CountBright™ Absolute Counting Beads for flow cytometry, Molecular Probes, Stany Zjednoczone). Zebrane mikropęcherzyki zawieszano w 0,5 ml 0.9% NaCl w liczbie $2,87 \times 10^6$ MVs/owcę.

5.2.2 Etap II – wszczepienie implantów

Zabiegi wszczepienia implantów do stawów kolanowych odbyły się w planowym 3-tygodniowym odstępie od procedury pobrania szpiku kostnego. Zabiegi operacyjne były

przeprowadzone według ogólnie przyjętych zasad chirurgii ogólnej. Znieczulenie ogólne i monitoring śródoperacyjny były kontynuowane wg procedury opisanej w Materiały i metody pkt. 5.2.1.1. (Pobranie szpiku kostnego).

Procedurze chirurgicznej zostało poddanych 14 klinicznie zdrowych owiec z II, III i IV grupy doświadczalnej. U każdego zwierzęcia wykonano artrotomię stawu kolanowego prawej kończyny miednicznej. U owiec z grupy I nie była wykonana żadna procedura chirurgiczna.

Dostęp operacyjny do prawego stawu kolanowego przeprowadzono według techniki opisanej przez Allen'a i wsp. [135]. Cięcie skórne wykonano 3 cm bocznie od więzadła prostej rzepki, rozpoczynając na wysokości kłykcia bocznego kości udowej i przedłużając je do okolicy bliższej nasady kości piszczelowej.



Ryc. 4. Przygotowanie pola operacyjnego do artrotomii bocznej prawego stawu kolanowego



Ryc. 5. Rana skóry w trakcie artrotomii bocznej prawego stawu kolanowego

Tkanekę podskórną odpreparowano na tępo w celu odsłonięcia powięzi szerokiej uda (łac. *fasciae latae*) i nacięcia na tej samej wysokości do torebki stawowej.



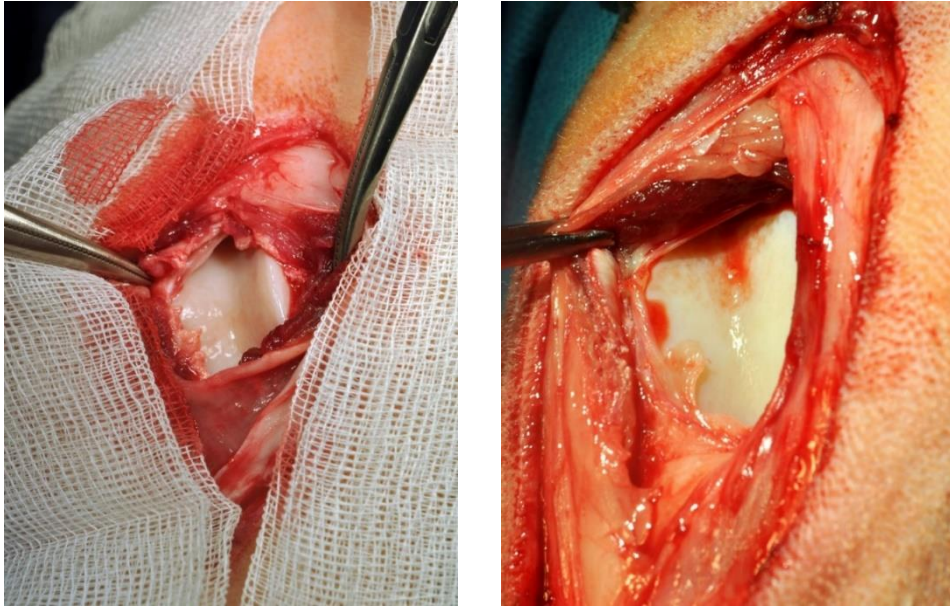
Ryc. 6. Rana skóry z odsłoniętą powierzchnią powięzi szerokiej uda w linii cięcia

W dalszej kolejności torebka stawowa została nacięta bocznie do więzadła prostego rzepki (łac. *ligamentum patellae*), a następnie cięcie przedłużono w kierunku bliższym do brzośca mięśnia czworogłowego uda (łac. *musculus quadriceps femoris*) i dalszym do okolicy guzka międzykłykciowego bocznego kości piszczelowej (łac. *tuberculum intercondylare laterale*). W trakcie artrotomii oszczędzano więzadło rzepkowo-udowe boczne (łac. *ligamentum patelofemorale laterale*) i ścięgno mięśnia dwugłowego uda (łac. *ligamentum musculus biceps femoris*).



Ryc. 7. Przecięcie torebki stawowej na całej grubości i poszerzenie dostępu operacyjnego do boczka kości udowej

Następnie, w pełnym wyproście stawu kolanowego dokonano zwichnięcia przysiódkowego rzepki, co umożliwiło dostęp do powierzchni chrząstki stawowej boczka kości udowej (łac. *trochlea ossis femoris*). W celu ustabilizowania rzepki w pozycji zwichniętej śródoperacyjnie zginano staw kolanowy, co pozwalało na dalszą część doświadczenia.



Ryc. 8. Śródoperacyjny obraz powierzchni chrząstki stawowej bloczka kości udowej

W doświadczeniu wykonano ubytek powierzchni chrząstki stawowej bloczka kości udowej o średnicy 6,5 mm i głębokości 10 mm, aż do warstwy kości podchrząstnej. Ubytki powstały z wykorzystaniem specjalistycznego trepanu do pobierania przeszczepów chrzęstno-kostnych o średnicy 6,5 mm (Richard Wolf GmbH, Niemcy) (ryc. 9).



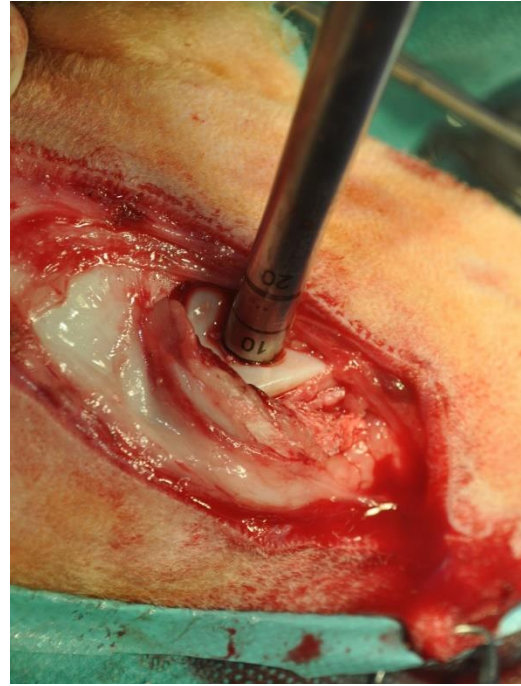
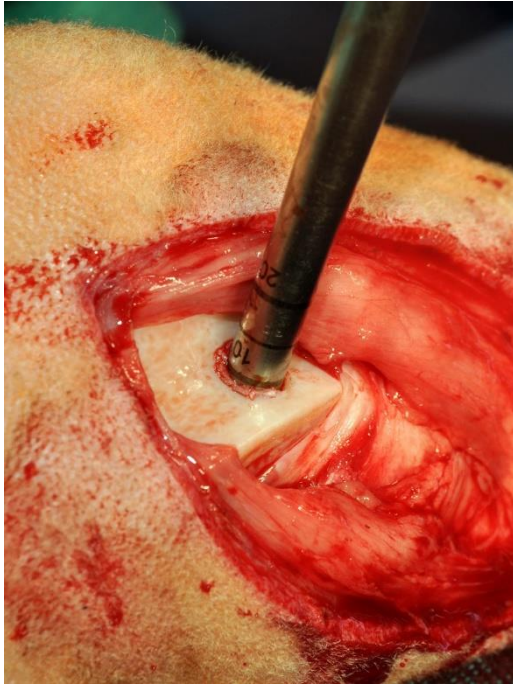
Ryc. 9. Trepan wykorzystywany do przeszczepów chrzęstno-kostnych (OATS)

Wycinki ubytku chrzęstno-kostnego zostały pobrane poprzez prostopadłe przyłożenie trepanu o średnicy 6,5 mm do powierzchni chrzęstnej w części centralnej bloczka kości udowej i jego pobijanie młotkiem ortopedycznym.

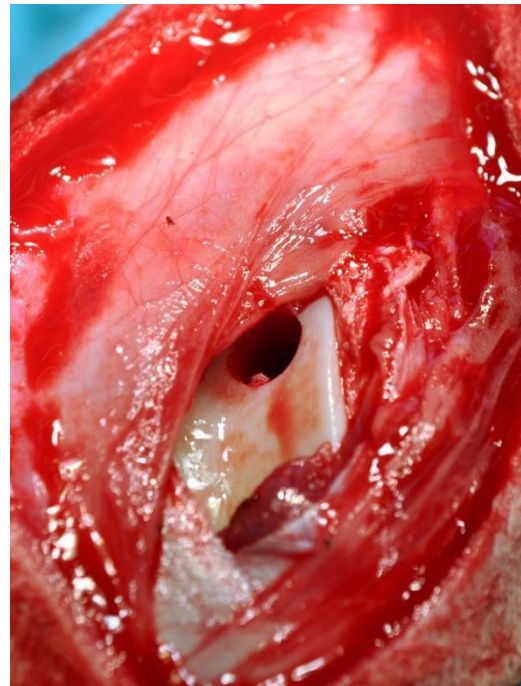
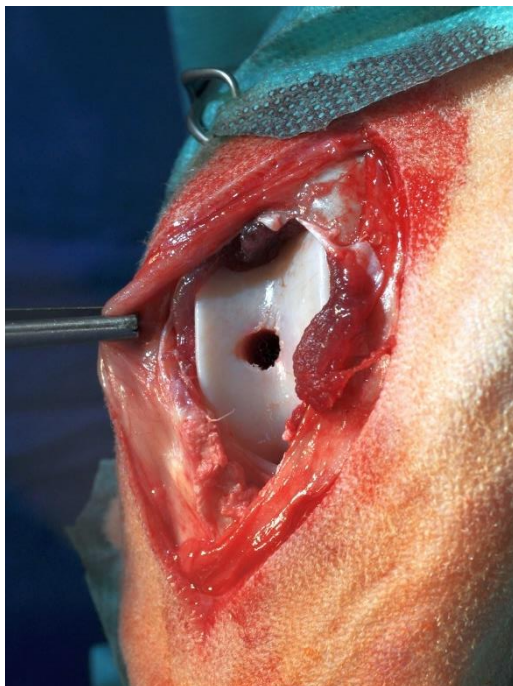


Ryc. 10. Wyznaczenie miejsca do wykonania ubytku i przyłożenie trepanu na powierzchni chrzęstnej bloczka kości udowej

Po wprowadzeniu trepanu na głębokość 10 mm na powierzchni bloczka kości udowej, wycinki chrzęstno-kostne znajdujące się wewnątrz narzędzia zostały usunięte. Miejsce nowo powstałego ubytku osuszono jałowym gazikiem.



Ryc. 11. Wytworzenie ubytku o głębokości 10 mm na powierzchni chrzęstnej stawowej bloczka kości udowej

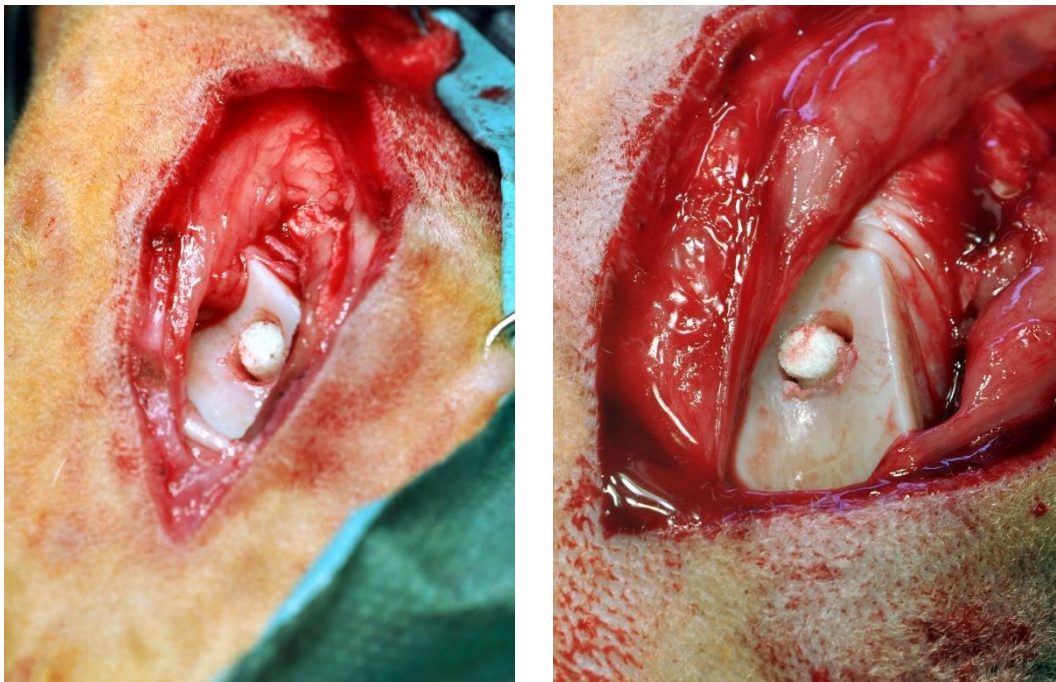


Ryc. 12. Ubytki w powierzchni chrzęstnej stawowej bloczka kości udowej penetrujące do warstwy kości podchrzęstnej

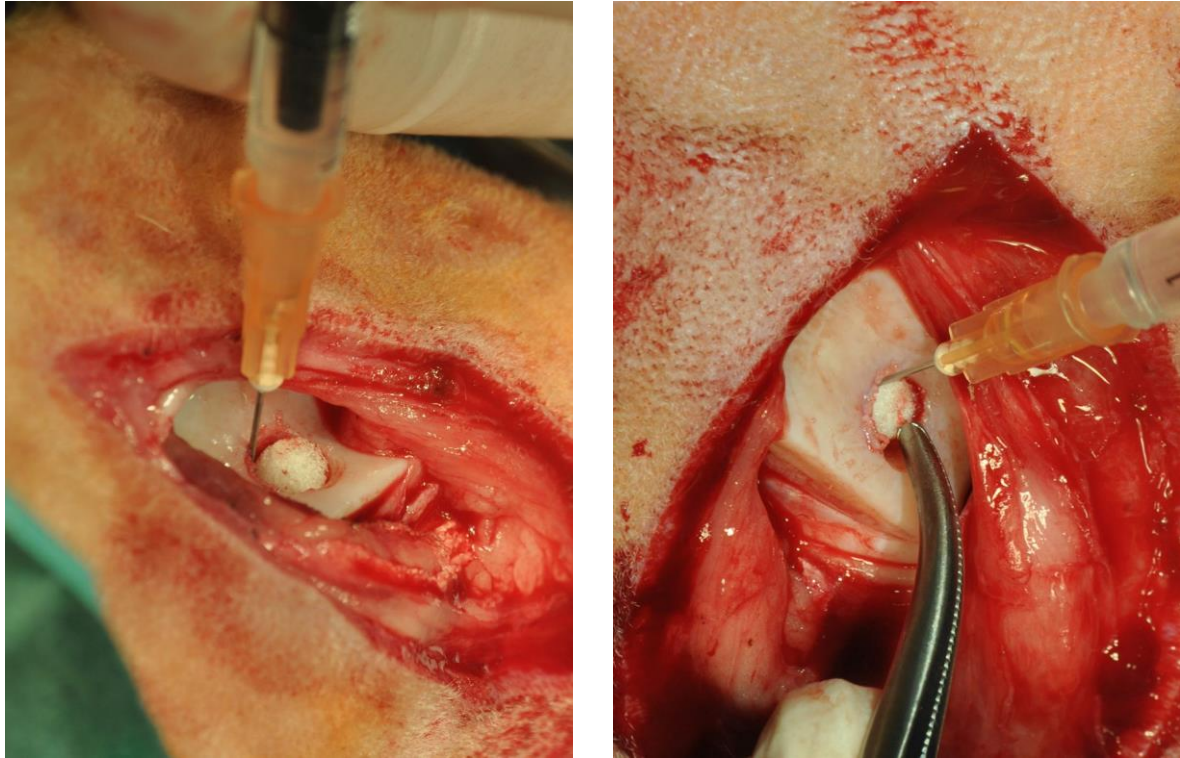
Ubytki w powierzchni chrzęstnej stawowej zostały wypełnione cylindrycznym skafoldem kolagenowym (Spongostan Standard, FERROSAN A/S, Dania) o rozmiarach 6,5 x 10 mm, który został nasączony: 0,9% NaCl, BM-MSCs lub MVs.



Ryc. 13. Usunięty cylindryczny ubytek chrzęstno-kostny o rozmiarach 6,5 x 10 mm



Ryc. 14. Wypełnienie ubytku chrzęstno-kostnego skafoldem kolagenowym



Ryc. 15. Nasączenie skafoldów kolagenowych za pomocą 0,9% NaCl, BM-MSCs lub MVs

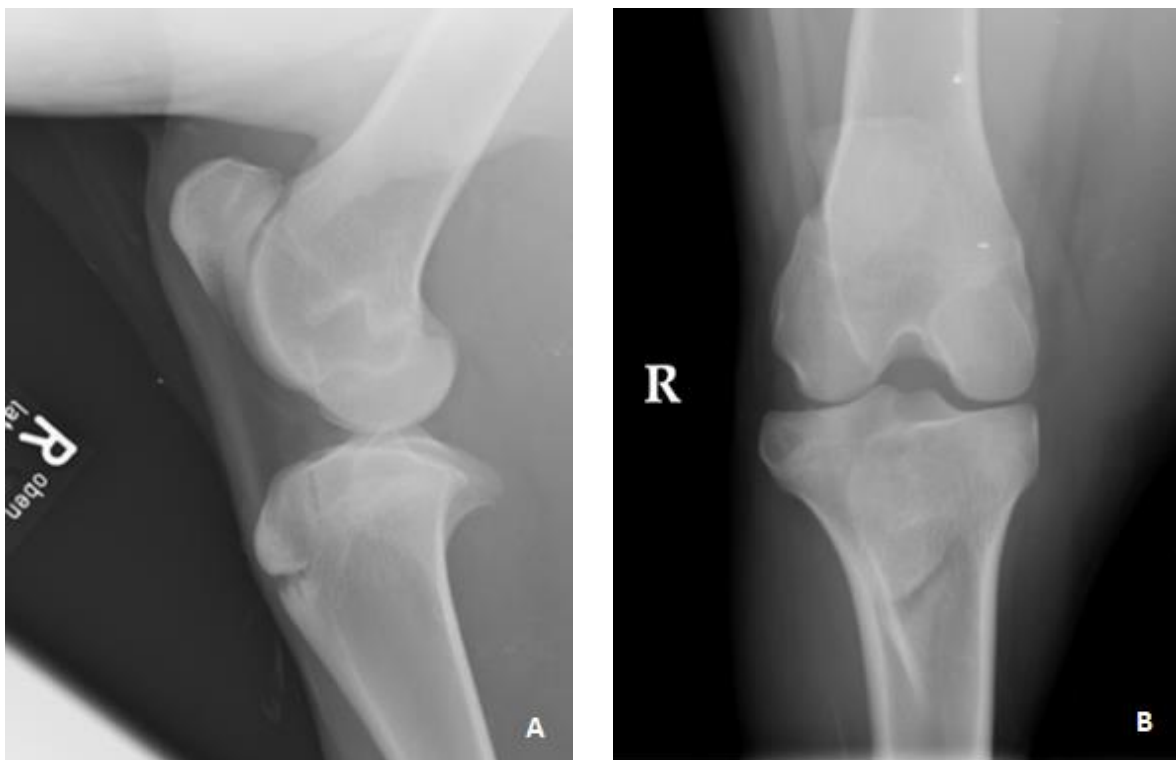
Po implantacji skafoldów kolagenowych i ich nasączeniu preparatami inżynierii tkankowej lub 0,9% NaCl odprowadzono zwicznę rzepek z powrotem na powierzchnię stawową bloczka kości udowej. Torebkę stawową zespolono szwami pojedynczymi przerywanymi z wykorzystaniem materiału wchłanialnego monofilamentowego 2/0 USP (Monosyn, B. Braun Surgical, Hiszpania). Pozostałe warstwy rany zszyto szwem ciągłym prostym z wykorzystaniem materiału długowchłanialnego monofilamentowego 1 USP (MonoMax, B. Braun Surgical, Hiszpania) do powięzi szerokiej uda i materiału wchłanialnego monofilamentowego 1 USP (Monosyn, B. Braun Surgical, Hiszpania) do tkanki podskórnej. Skórę zespolono szwami pojedynczymi przerywanymi materiałem niewchłanialnym monofilamentowym 1 USP (Dafilon, B. Braun Surgical, Hiszpania). U owiec po przeprowadzonych zabiegach operacyjnych nie stosowano formy usztywnienia w postaci opatrunku ustalającego, a zwierzęta miały możliwość swobodnego ruchu w boksach z suchą, nieśliską powierzchnią. Ranę pooperacyjną odkażono i założono jałowy plaster ochronny, który został usunięty po 48 godzinach. Szwy skórne usuwano po 12 dniach od procedury chirurgicznej.

W okresie pooperacyjnym u owiec zastosowano amoksycylinę (Betamox LA, ScanVet, Polska) w dawce 15mg/kg mc – w iniekcjach podskórnych 3-krotnie, co 48 godzin i leczenie

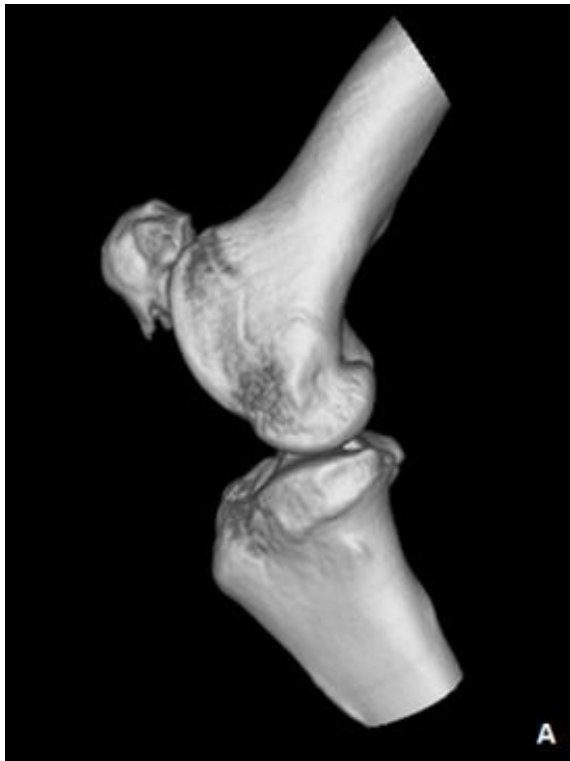
przeciwbólowe: meloksikam w dawce 0,4 mg/kg mc (Metacam 5mg/ml, Boehringer Ingelheim, Niemcy), który był powtarzany w iniekcjach podskórnych co 24 godziny, przez 3 dni, metamizol podawany dożylnie w dawce 30mg/kg mc (Pyralgivet 500mg/ml, VetAgro, Polska) stosowany co 8 godzin, przez 2 dni, oraz tramadol w dawce 5mg/kg mc (Tramal 100mg/2ml, Stada, Polska) w iniekcjach podskórnych co 8 godzin, przez 2 dni.

5.3 Diagnostyka obrazowa stawów kolanowych

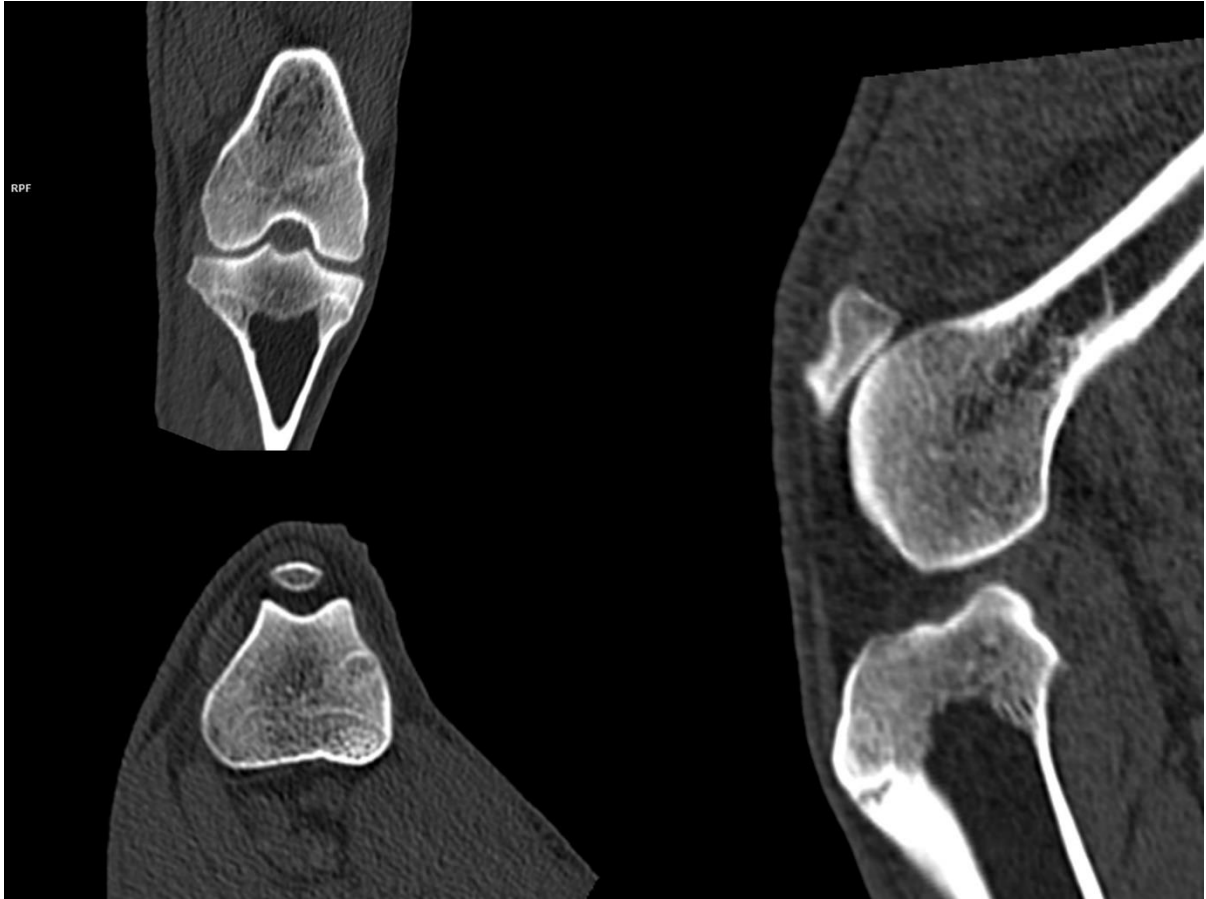
W celu wykluczenia towarzyszącej choroby stawów kolanowych i/lub obecnych zmian zwyrodnieniowych mogących mieć wpływ na przebieg i wynik doświadczenia, u wszystkich zwierząt wykonano przedoperacyjnie badanie radiologiczne i tomograficzne stawów kolanowych (ryc. 16-18).



Ryc. 16. Radiogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy prawy staw kolanowy owcy. A) zdjęcie w projekcji przyśrodkowo-bocznej, B) zdjęcie w projekcji doczaszkowo-doogonowej

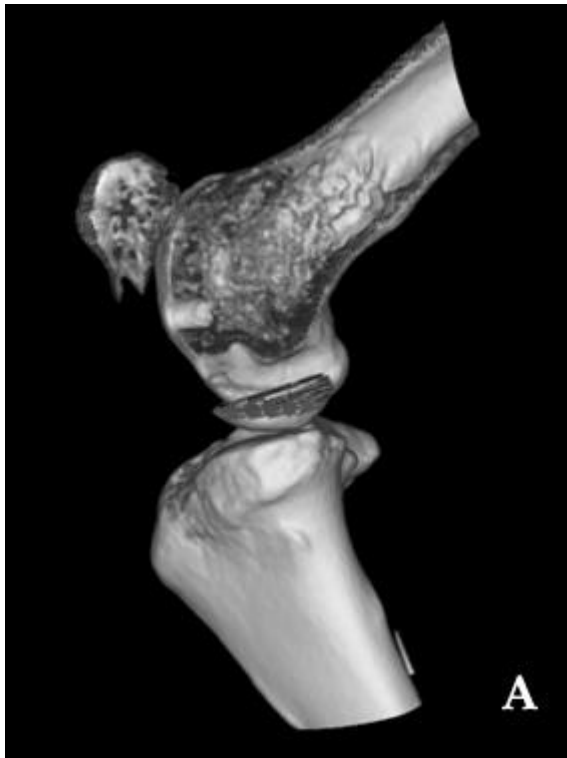


Ryc. 17. Tomogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy prawy staw kolanowy owcy w rekonstrukcji 3D. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego: zdjęcie A i B – RadiAnt DICOM Viewer, Medixant, ver. 2022.1.1; C i D – Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

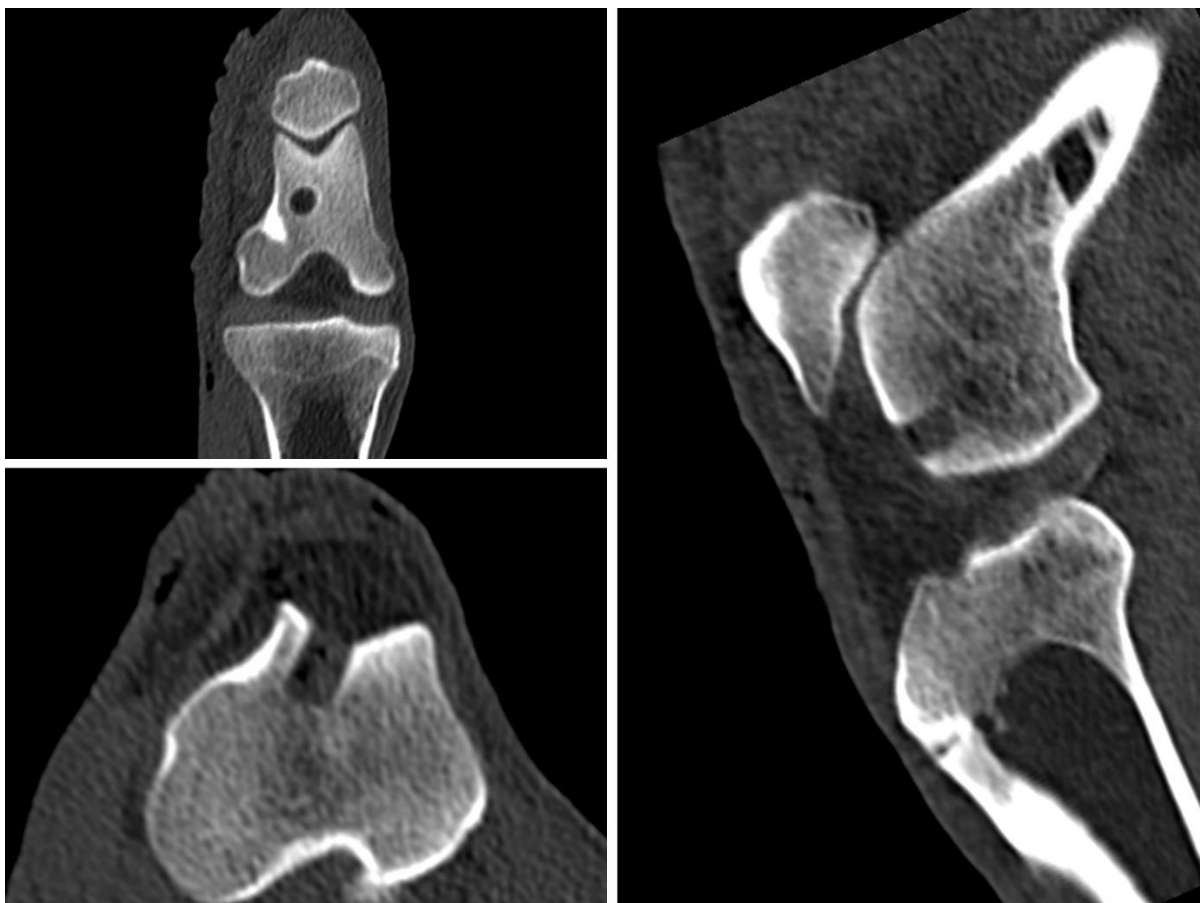


Ryc. 18. Tomogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy staw kolanowy owcy w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (ang. multiplanar reconstruction – MPR). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

Kontrolne badanie tomografii komputerowej operowanych stawów wykonano również bezpośrednio po zabiegach operacyjnych (ryc. 19-20), a także po 90 dniach i po zakończeniu 180 dniowego okresu obserwacji w 3 grupach badanych zwierząt – w grupie II (kontrola pozytywna), grupie III (MVs) i grupie IV (BM-MSCs).



Ryc. 19. Tomogramy przedstawiające staw kolanowy owcy w rekonstrukcji 3D bezpośrednio po zabiegu operacyjnym. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego: zdjęcie A i B – RadiAnt DICOM Viewer, Medixant, ver. 2022.1.1; C i D – Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.



Ryc. 20. Tomogramy przedstawiające staw kolanowy owcy w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej bezpośrednio po zabiegu operacyjnym (MPR). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

Badanie rentgenowskie stawów kolanowych u owiec było wykonane przy zastosowaniu radiografii cyfrowej, pośredniej za pomocą aparatu Vertex III D i użyciu lampy Siemens Polydoros LX 30 (Siemens Healthineers, Niemcy) z nastawieniami 60 kV i 10 mAs oraz skanera RTG Regius Model 110s (Konica Minolta Medical, Japonia). Badanie tomograficzne było wykonywane przy zastosowaniu tomografu komputerowego (SOMATOM Emotion 16, Siemens Healthineers, Niemcy). Załączone w opracowaniu doświadczenia tomogramy i rekonstrukcje 3D zostały poddane obróbce graficznej z wykorzystaniem programu komputerowego RadiAnt DICOM Viewer, Medixant, ver. 2022.1.1 i Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

5.4 Ocena makroskopowa stawów kolanowych

Ocenę makroskopową stawów kolanowych wykonano pośmiertnie u wszystkich badanych zwierząt, po zakończeniu okresu obserwacji – 180 dni od daty przeprowadzenia zabiegów operacyjnych. W celu przeprowadzenia eutanazji owce poddano premedykacji, która została osiągnięta poprzez domięśniową iniekcję leków – medetomidyna w dawce 0,01 mg/kg mc (Cepetor 1mg/ml, ScanVet, Polska), butorfanol w dawce 0,1 mg/kg mc (Butomidol 10mg/ml, Orion Pharma, Polska) i ketamina w dawce 10 mg/kg mc (Bioketan 100mg/ml, Vetoquinol Biowet, Polska). Po uspokojeniu zwierząt do żyły odpromieniowej (łac. vena cephalica) założony został kateter dożylny (Kaniuła dożylna KD-FIX 20G 1.1 – 32mm, KDM, Niemcy), który posłużył do podaży barbituranu – pentobarbital w dawce 60 mg/kg (Morbital 160mg/ml, Biowet, Polska). W celu określenia wpływu użytych biomateriałów i oceny blizny tkankowej, ocenie makroskopowej poddana została operowana okolica stawu kolanowego oraz miejsce wytworzonego ubytku na powierzchni chrząstki, w który zaimplantowano skafold kolagenowy.

5.5 Ocena mikroskopowa ubytku chrząstki stawowej

Ocenę mikroskopową wykonano po zakończonym 180-dniowym okresie obserwacji zwierząt. Pośmiertnie od owiec pobrano wycinki bloczka kości udowej powierzchni chrząstki, w którym został eksperymentalnie wytworzony ubytek chrząstko-kostny, a następnie z pobranego materiału przygotowano preparaty histologiczne.

Próbki chrząstek zostały utrwalone w 4% roztworze buforowanej formaliny (pH 7,2-7,4). Materiał następnie płukano w bieżącej wodzie i poddano procedurze odwapniania w dwuwersenianie sodowym (EDTA) i w mieszaninie 10 % kwasu mrówkowego oraz nasyconym roztworze cytrynianu sodu w rozcieńczeniu 1:1. Po odwapnieniu, materiał był płukany w wodzie bieżącej przez 24 godziny, a następnie odwodniony w szeregu alkoholowym i zatopiony w formalinie. Skrawki grubości 10 μ m barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (HiE), techniką wg. Mallorego oraz błękitem Alcjanu (ang. Alcian blue).

Analizy materiału dokonano w mikroskopie świetlnym Eclipse 80i (Nikon, Japonia) wyposażonym w oprogramowanie NIS-Elements Advanced Research i sprzężonym z kamerą cyfrową. Analizy makroskopowej dokonano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego z oprogramowaniem ZEISS ZEN.

W trakcie analizy mikroskopowej wykonano również ocenę półjakościową opartą o 14-punktową skalę, utworzoną i zmodyfikowaną na podstawie wytycznych zaproponowanych

przez Międzynarodowe Towarzystwo Chorób Chrząstki (ang. International Cartilage Repair Society – ICRS), zwaną w niniejszej pracy „zmodyfikowaną skalą ICRS”. W ocenie preparatów uwzględniono następujące cechy:

1. Odtworzenie ciągłości powierzchni chrząstki stawowej (0 – 5 pkt.)
2. Wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.)
3. Ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.)
4. Odbudowanie kości/tkanek podpierających chrząstkę (0 – 2 pkt.)
5. Niewywieranie lokalnych stanów zapalnych, nacieków komórek układu białokrwinkowego (brak komórek olbrzymich) (0 – 5 pkt.)
6. Brak makrofagów (0 – 1 pkt.)
7. Brak limfocytów (0 – 1 pkt.)
8. Brak granulocytów (0 – 1 pkt.)
9. Obecność szpiku (0 – 3 pkt.)
10. Angiogeneza w tkankach przyległych (0 – 3 pkt.)
11. Brak waskularyzacji/angiogenezy w obrębie ubytku chrząstki stawowej (0 – 2 pkt.)
12. Rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.)
13. Zaawansowanie procesów przebudowy (0 – 1 pkt.)
14. Ocena ogólna (0 – 2 pkt.)

U każdej owcy z grup doświadczalnych III i IV przeprowadzono ocenę preparatów mikroskopowych w 5 kolejnych polach widzenia, wystawiając 1 notę dla poszczególnych pól widzenia. W grupie II – kontrola pozytywna – ze względu na liczebność zwierząt (2 osobniki w badanej grupie) zdecydowano o zwiększeniu pól obserwacji – do 10 pól widzenia. Maksymalna suma punktów do uzyskania w zmodyfikowanej skali ICRS wynosiła 34,0.

5.6 Badania morfologiczne i biochemiczne krwi

Bezpośrednio przed zabiegiem operacyjnym, a także w 3, 6 i 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, pobierano próbkę krwi obwodowej z żyły szyjnej zewnętrznej owiec. Do badań morfologicznych pobierano 2 ml krwi do probówek hematologicznych z napylnym K₂EDTA (PROFILAB, Polska), natomiast do badań biochemicznych pobierano 5,0 ml krwi do probówek PP przeznaczonych do separacji surowicy z granulatem i przyśpieszaczem wykrzepiania (PROFILAB, Polska).

Badania morfologiczne i biochemiczne krwi wykonano w współpracy z Weterynaryjnym Laboratorium Diagnostycznym „UNI-LAB” Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w celu oceny reakcji ogólnoustrojowej na wdrożone leczenie.

Uzyskane próbki krwi obwodowej badano kolejno w następujących urządzeniach:

1. Morfologia – analizator hematologiczny Scil Vet abc (Horiba, Niemcy).

W badaniach morfologicznych krwi wzięto pod uwagę:

- eryocyty (RBC) – jednostka T/l
- leukocyty (WBC) – jednostka G/l
- płytki krwi (PLT) – jednostka G/l

2. Biochemia – wirówka laboratoryjna MPW-250 (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska) i automatyczny analizator biochemiczny EPOLL 300 (Alpha Diagnostics, Polska). W uzyskanej po wirowaniu surowicy badano:

- aktywność aminotransferazy asparaginowej (AspAT) – jednostka U/l
- aktywność aminotransferazy alaninowej (AlAT) – jednostka U/l
- aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) – jednostka U/l
- stężenie mocznika – jednostka mmol/l
- stężenie kreatyniny – jednostka $\mu\text{mol/l}$
- stężenie białka całkowitego – jednostka g/l
- stężenie albumin – jednostka g/l

Do analizy wyników krwi obwodowej posłużono się zakresami wartości referencyjnych dla owcy domowej opublikowanymi w podręczniku Winnickiej [136].

5.7 Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną dla wyników oceny mikroskopowej w formie zmodyfikowanej skali ICRS oraz wyników badań morfologicznych i biochemicznych krwi obwodowej przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych (w przypadku zmiennych spełniających warunki rozkładu normalnego) oraz testu Manna-Whitney’a (w przypadku braku spełnienia warunków rozkładu normalnego). Rozkład normalny zmiennych badano za pomocą testu Shapiro Wilka. Analizy wykonywano przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wyniki opracowano statystycznie w programie Statistica 13.3 (Statsoft Polska, Kraków). Wyniki w tabelach (tabela 5 – 9) oraz na wykresach (ryc. 38 – 39) przedstawiono w postaci średnich (\bar{x}) \pm odchylenie standardowe (SD) (ang. standard deviation – SD).




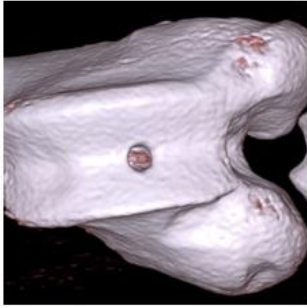

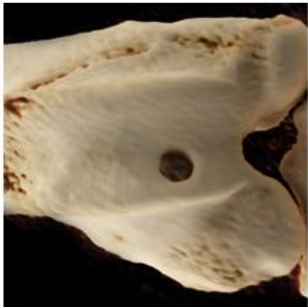



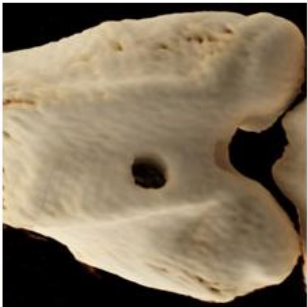


6. Wyniki

6.1 Ocena radiologiczna operowanych stawów kolanowych


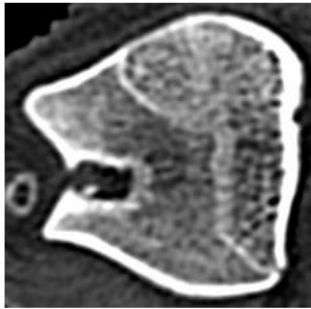
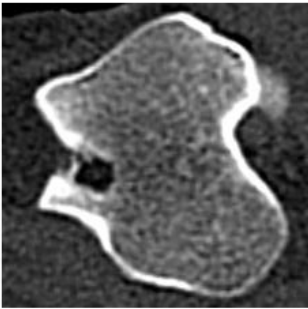
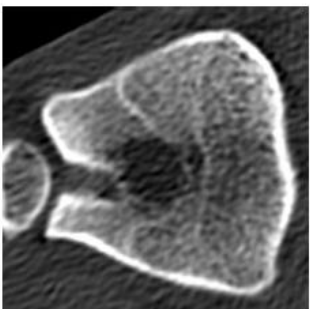
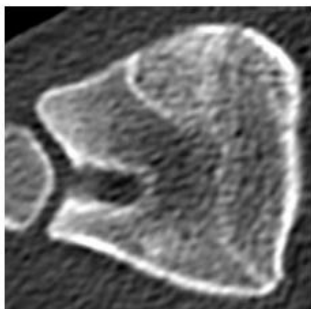
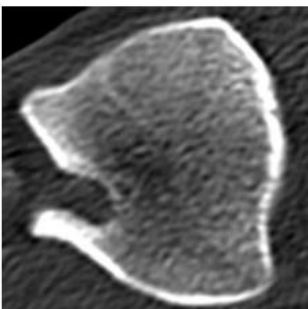
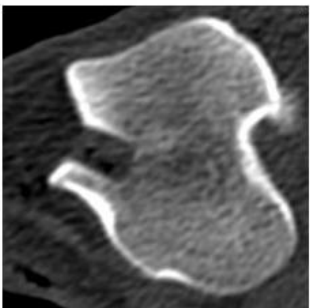
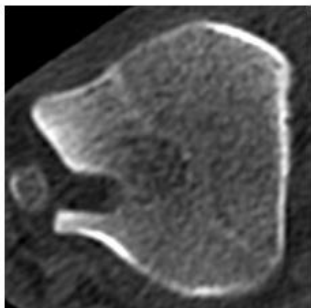
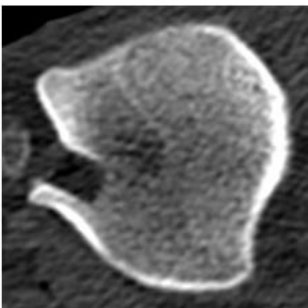
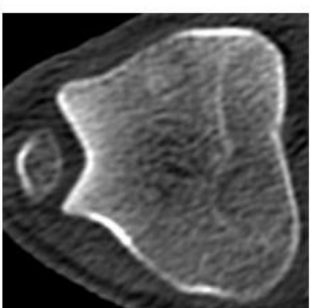
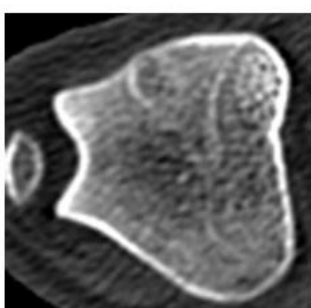
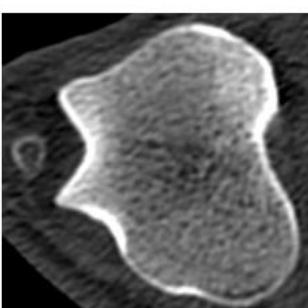
W trakcie kontrolnych badań rentgenowskich i tomografii komputerowej prawych stawów kolanowych u owiec z grupy II, III i IV wykonanych przedoperacyjnie nie stwierdzono obecności zmian zwyrodnieniowych mogących mieć wpływ na przebieg i wynik doświadczenia.

Kontrolne badanie tomografii komputerowej operowanych stawów kolanowych wykonano bezpośrednio po zabiegach operacyjnych, po 90 dniach i po zakończeniu 180 dniowego okresu obserwacji w 3 grupach badanych zwierząt – w grupie II (kontrola pozytywna), grupie III (MVs) i grupie IV (BM-MSCs). Przebieg procesu gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej przedstawiono na poniższych tomogramach, odpowiednio w rekonstrukcji 3D (ryc. 21) oraz w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna poprzeczna (ryc. 22), płaszczyzna strzałkowa (ryc. 23) i płaszczyzna czołowa (ryc. 24).

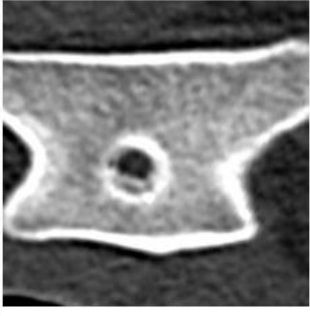
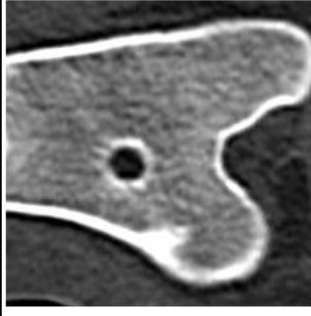
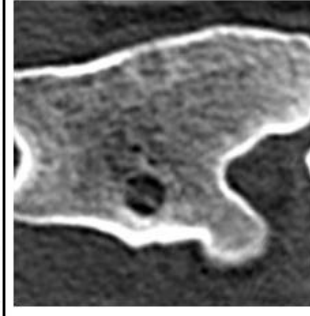
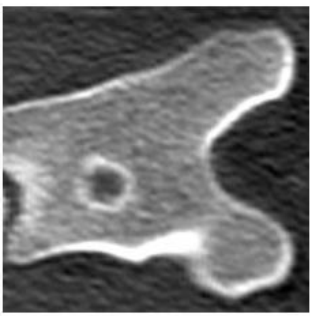
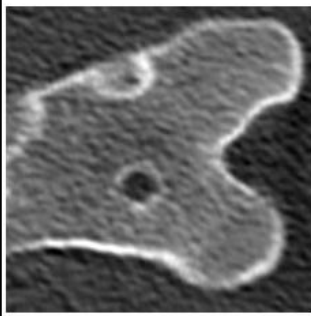
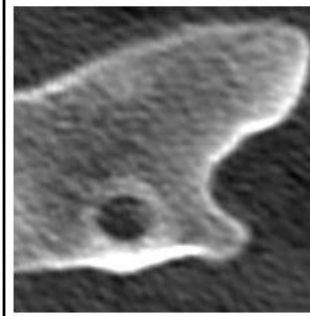
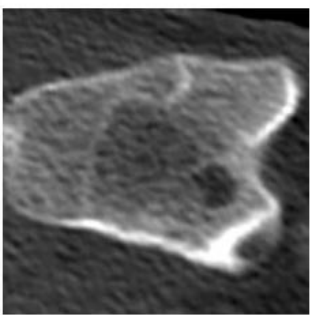
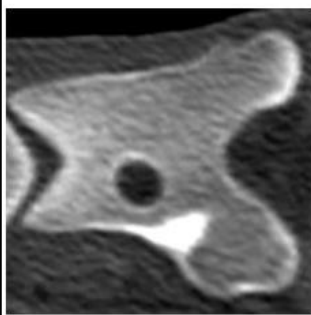
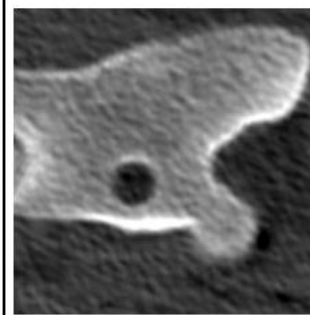
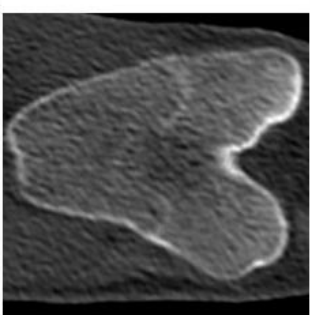
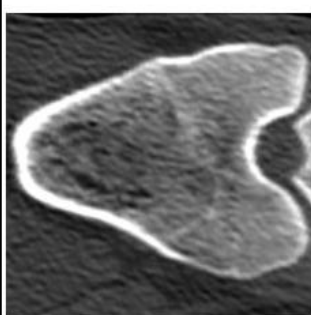
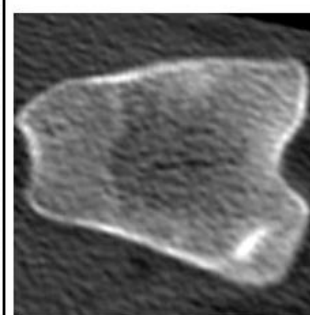
Na tomogramach porównano wypełnienie eksperymentalnie utworzonego ubytku chrzęstno-kostnego w bloczku kości udowej, w stosunku do tomogramów przed- i pooperacyjnych. Analizując tomogramy w II, III i IV grupie badanych zwierząt bezpośrednio po zabiegu operacyjnym wykazano ostre krawędzie wytworzonego ubytku penetrujące do warstwy podchrzęstnej kości. W tkankach miękkich stwierdzono obecność gazu oraz zwiększoną ilość wolnego płynu związanego z wykonaniem procedury chirurgicznej. W kontrolnych badaniach tomografii komputerowej wykonanych po 90 oraz 180 dniach od zabiegu operacyjnego we wszystkich przypadkach nie obserwowano obecności gazu w tkankach miękkich, ani zwiększonej objętości płynu. W dniu 90 i 180 wykazano sukcesywne wygładzenie krawędzi oraz zmniejszenie średnicy wytworzonego śródoperacyjnie ubytku chrzęstno-kostnego związane z postępującymi procesami regeneracyjnymi. Poza tym, obrys oraz densyjność kości pozostawała prawidłowa. Po zakończeniu 180-dniowego okresu obserwacji nie stwierdzono też rozwoju istotnych klinicznie zmian strukturalnych i zwyrodnieniowych w obrębie operowanych stawów kolanowych. Na podstawie analizy tomogramów (ryc. 21-24) można stwierdzić, że do lepszego wypełnienia nowo powstałą tkanką eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej doszło w grupie III i IV badanych zwierząt, w porównaniu do grupy II – kontrola pozytywna.

	Przedoperacyjne	Bezpośrednio po zabiegu	90 dni od zabiegu	180 dni od zabiegu
Grupa II 0,9% NaCl				
Grupa III MV's				
Grupa IV autologiczne BM-MSCs				

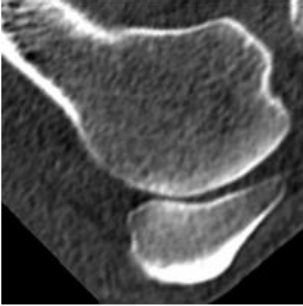
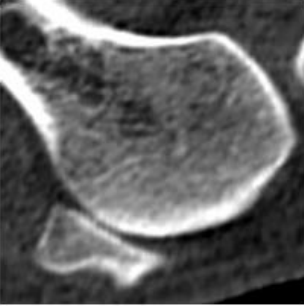
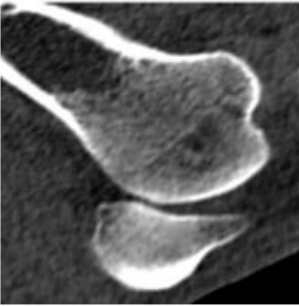
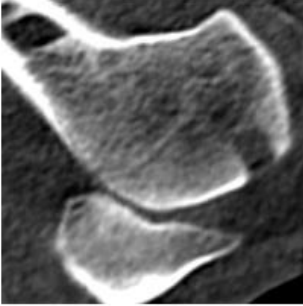
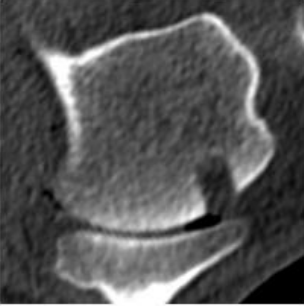

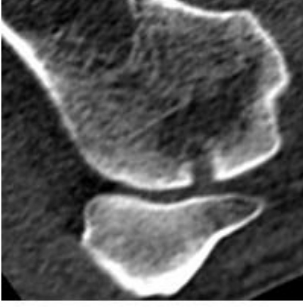
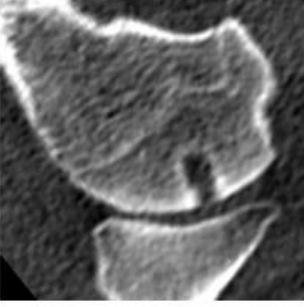
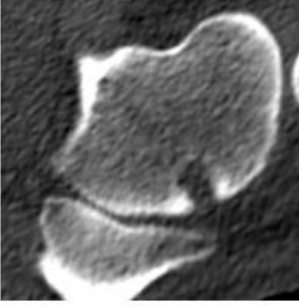
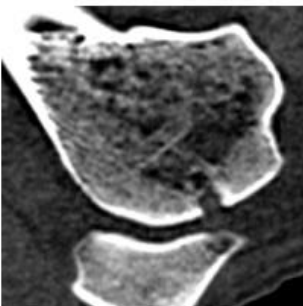
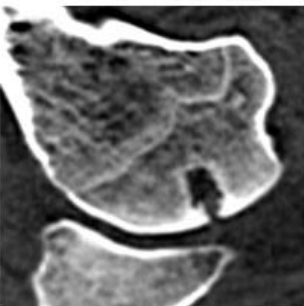
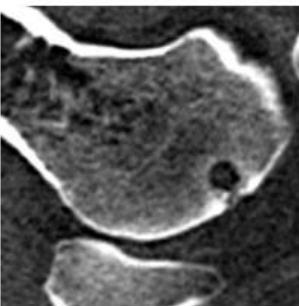
Ryc. 21. Porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji 3D. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

180 dni od zabiegu			
90 dni od zabiegu			
Bezpośrednio po zabiegu			
Przedoperacyjne			
	Grupa II 0,9% NaCl	Grupa III MVs	Grupa IV autologiczne BM-MSCs

Ryc. 22. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna poprzeczna (ang. transverse plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

180 dni od zabiegu			
90 dni od zabiegu			
Bezpośrednio po zabiegu			
Przedoperacyjne			
	Grupa II 0,9% NaCl	Grupa III MV's	Grupa IV autologiczne BM-MSCs

Ryc. 23. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna strzałkowa (ang. sagittal plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

	<p style="text-align: center;">Grupa II 0,9% NaCl</p>	<p style="text-align: center;">Grupa III MV's</p>	<p style="text-align: center;">Grupa IV autologiczne BM-MSC's</p>
Przedoperacyjne			
Bezpośrednio po zabiegu			
90 dni od zabiegu			
180 dni od zabiegu			

Ryc. 24. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna czołowa (ang. frontal plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.

6.2 Ocena makroskopowa badanych stawów kolanowych

6.2.1 Grupa I badanych zwierząt – kontrola negatywna

Okolica zdrowych stawów kolanowych u owiec w grupie I – kontrola negatywna – nie wykazywała cech obrzęku, przebudowy tkankowej i zwyrodnienia stawu. Skóra była pokryta prawidłową, niestrzyżoną okrywą włosową. W trakcie badania palpacyjnego stwierdzono niezmienny zakres ruchu stawu podczas próby pełnego zgięcia i jego wyprost, a także brak ruchów rotacyjnych. Nie wykazano niestabilności udowo-piszczelowej. Masa mięśniowa kończyn miednicznych pozostawała zachowana. Tkanka podskórna, powięź mięśniowa i torebka stawowa w ocenie makroskopowej nie wykazywały cech zapalno-degeneracyjnych. Po przecięciu torebki stawowej ze stawu wydobywała się przejrzysta, lepka maź stawowa o prawidłowej objętości. Powierzchnia stawowa na bloczku kości udowej była gładka, błyszcząca, spójna i nie wykazywała cech zapalenia, a w obrębie stawu kolanowego nie stwierdzono obecności zmian zapalno-zwyrodnieniowych wskazujących na rozwijającą się DJD.



Ryc. 25. Zdjęcie prawidłowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z I grupy badanych zwierząt – kontrola negatywna

6.2.2 Grupa II badanych zwierząt – kontrola pozytywna

Operowana okolica nie wykazywała cech przebudowy i powiększenia obrysu stawów. W badaniu manualnym w trakcie próby pełnego zgięcia i wyprostowania, zakres ruchu stawów kolanowych był zbliżony do stawów nieoperowanych u zwierząt w grupie I – kontrola negatywna. Nie stwierdzono również ruchów rotacyjnych ani niestabilności udowo-piszczelowej. Masa mięśniowa kończyn miednicznych nie wykazywała cech atrofii. W miejscu ówczasnie przygotowanego pola operacyjnego zaobserwowano odrośnięcie okrywy włosowej na całym obszarze. Na skórze zauważalna była wygojona, przesuwalna skórna blizna pooperacyjna. W trakcie preparacji tkanek miękkich zauważono niewielkich rozmiarów bliznę tkankową i brak materiału szewnego w miejscu wcześniej wykonanego zespolenia chirurgicznego obejmującego tkankę podskórną, powięź mięśniową i torebkę stawową. W badaniu sekcyjnym stawu kolanowego stwierdzono obecność przejrzystej mazi stawowej o prawidłowej lepkości i objętości – w porównaniu do mazi stawowej obserwowanej w I grupie badanych zwierząt. Powierzchnia bloczka kości udowej w ocenie makroskopowej nie wykazywała cech zwyrodnienia – była błyszcząca i gładka. W miejscu eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego nie stwierdzono obecności pierwotnie zaimplantowanego skafoldu kolagenowego. Nieznacznie zapadnięta powierzchnia ubytku była wypełniona białawą strukturą przypominającą twór łącznotkankowy (ryc. 26). Na obszarze stawu nie stwierdzono obecności zmian degeneracyjnych sugerujących rozwijającą się DJD.



Ryc. 26. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z II grupy badanych zwierząt – kontrola pozytywna. Zapadnięta powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została pokryta w całości białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym

6.2.3 Grupa III badanych zwierząt – mikropecherzyki

Operowane stawy kolanowe nie wykazywały cech przebudowy. W badaniu ortopedycznym stwierdzono prawidłowy zakres ruchu stawów w trakcie próby zginania i prostowania, a także klinicznie nie zaobserwowano niestabilności udowo-piszczelowej. Masa mięśniowa operowanych kończyn miednicznych była porównywalna do masy kończyn w kończynie nieoperowanej. Na całej powierzchni pola operacyjnego odnotowano regularne odrośnięcie okrywy włosowej. Po ogoleniu włosów, w miejscu dostępu operacyjnego obserwowano wygojoną bliznę skórą. W trakcie preparacji tkanek miękkich nie stwierdzono obecności materiału szewnego. Blizna łącznotkankowa zespalała tkankę podskórną, powięź mięśniową i torebkę stawową była linijna. Po przecięciu torebki stawowej z wnętrza stawu kolanowego wydobywała się klarowna maź stawowa o prawidłowej objętości, lepkości i barwie. W odniesieniu do kontroli negatywnej – powierzchnia stawowa stawów kolanowych u owiec w grupie III była podobna (lśniąca i gładka) i nie wykazywała cech erozyjnych i/lub wytwórczych. Wypełnienie eksperymentalnie utworzonego ubytku chrzęstno-kostnego było całkowite. Makroskopowo nie stwierdzono obecności implantowanego skafoldu kolagenowego, a ubytek był pokryty białawą, błyszczącą tkanką o charakterze łącznotkankowym (ryc. 27). Badane stawy kolanowe nie nosiły cech aktywnego stanu zapalnego i/lub OA.



Ryc. 27. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z III grupy badanych zwierząt – MVs. Powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została szczelnie wypełniona w całości białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym

6.2.4 Grupa IV badanych zwierząt – mezenchymalne komórki macierzyste

Badane stawy kolanowe były porównywane do kończyn nieoperowanych u owiec z grupy eksperymentalnej I – kontrola negatywna. W trakcie próby pełnego zgięcia i wyprostowania obserwowano prawidłowy zakres ruchu stawu. Nie stwierdzono również niestabilności udowopiszczelowej. Masa mięśniowa kończyn miednicznych pozostawała zachowana i porównywalna z kończynami nieoperowanymi. W miejscu pola operacyjnego obserwowano odrośnięcie okrywy włosowej na całym obszarze skóry. Po zgoleniu okrywy włosowej stwierdzono obecność wygojonej, łatwo przesuwalnej blizny skórnej. W trakcie oceny wygojonej blizny łącznotkankowej nie odkryto obecności materiału szewnego. Tkanki miękkie cechowały się niedużą, liniową blizną. Po usunięciu torebki stawowej obserwowano przejrzystą, lepkaż stawową o objętości zbliżonej do stawów u owiec z grupy I badanych zwierząt. Powierzchnia chrząstki była jednolita i błyszcząca, nie manifestowała charakteru zwyrodnieniowego. W eksperymentalnie wytworzonym ubytku bloczka kości udowej nie odnotowano obecności implantowanego skafolda kolagenowego. Powierzchnia ubytku została pokryta w całości białawą, błyszczącą tkanką o charakterze łącznotkankowym (ryc. 28).



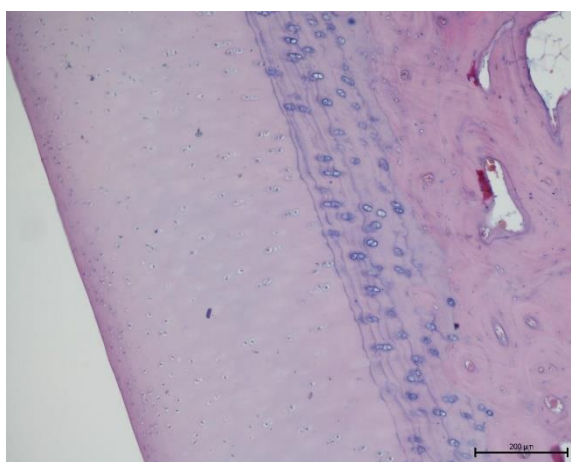
Ryc. 28. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z IV grupy badanych zwierząt – BM-MSCs. Cała powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została wypełniona białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym

6.3 Ocena mikroskopowa ubytku chrząstki stawowej

Wyniki oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec przedstawiono w tabelach 2-4, odpowiednio dla grupy II (tabela 2), grupy III (tabela 3) i grupy IV (tabela 4). Wielopunktowa zmodyfikowana skala ICRS odnosi się do chrząstki zdrowej. Oznacza to, że wynik w grupie I badanych zwierząt – kontrola negatywna – wynosił 34,0 punkty u każdej badanej owcy.

6.3.1 Grupa I badanych zwierząt – kontrola negatywna

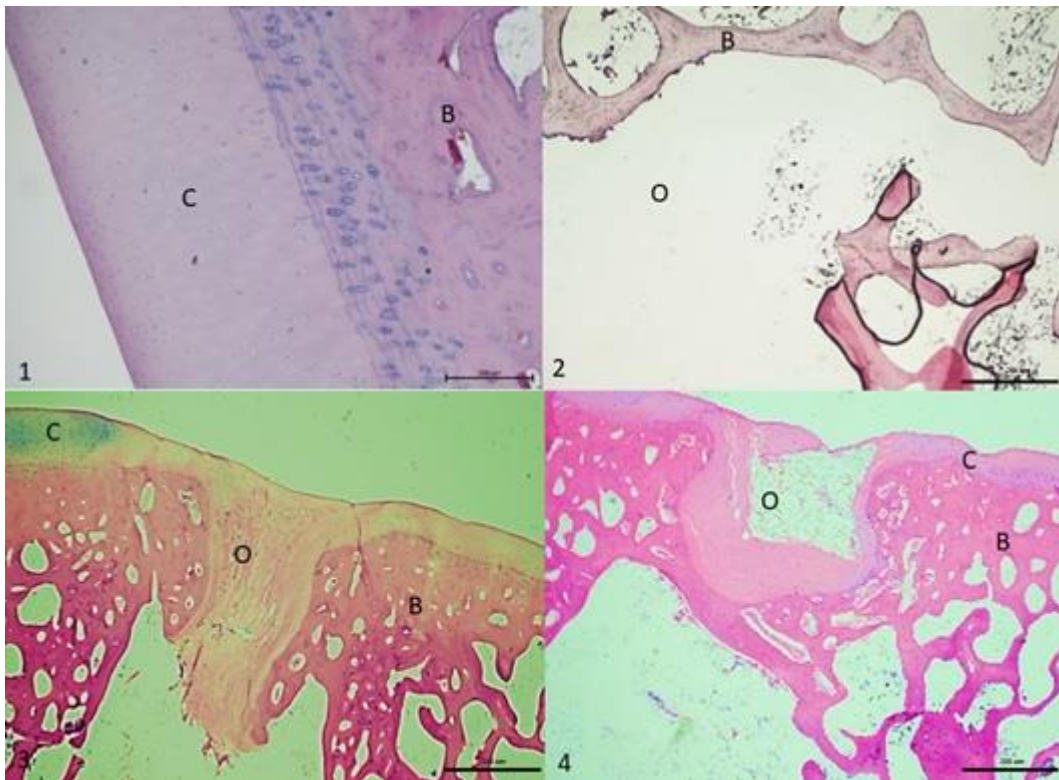
Prawidłowa chrząstka stawowa u dorosłej owcy jest relatywnie gruba (około 800-1000 μm). Budują ją 2 wyraźnie widoczne strefy: warstwa przyległa do powierzchni stawowej (powierzchniowa) oraz warstwa przyległa do tkanki kostnej. Warstwa powierzchniowa o grubości 600-800 μm , zawiera głównie pojedyncze chondrocyty, układające się licznie tuż pod powierzchnią stawową. Głębiej leżą owalne chondrocyty, otoczone macierzą międzykomórkową. W strefie leżącej najgłębiej, wchodzącej w kontakt ze strefą przyległą do tkanki kostnej, dominują grupy izogeniczne zawierające od 3-4 chondrocytów. Chondrocyty leżące w strefie przyległej do tkanki kostnej charakteryzują się obszarami silnie zasadochłonnymi z widocznymi liniami kompresji. W strefie tej hipertroficzne chondrocyty tworzą grupy izogeniczne zawierające od 2-3 komórek (ryc. 29). Zasadochłonne linie kompresji są wynikiem procesów starzenia się macierzy międzykomórkowej. W poddanych analizie preparatach, w barwieniu metodą Alcian blue nie stwierdzono podwyższonej intensywności reakcji w obrębie chondrocytów, co świadczy o braku ich pobudzenia do syntezy macierzy chrzęstnej.



Ryc. 29. Prawidłowa chrząstka stawowa u owcy z grupy I badanych zwierząt – kontrola negatywna. Barwienie HiE, pow. 100x

6.3.2 Grupa II badanych zwierząt – kontrola pozytywna

W grupie II – kontrola pozytywna – obraz histologiczny wykazał brak intensywnych procesów odbudowy i przebudowy usuniętej i nowo powstałych tkanek obecnych w obszarze uszkodzenia krytycznego. Wnętrze ubytku nie zawierało żadnych ognisk nasilonej fibrogenezy ani osteogenezy (ryc. 30). Na powierzchni, wokół otworu wykonanego w chrząstce, obserwowano zjawisko nasuwania się tkanek, w kierunku od krawędzi do centrum otworu chrząstki stawowej, któremu towarzyszyła łagodna fibrogeneza, tworząca wąską błonę na powierzchni otworu. W błonie tej stwierdzono obecność makrofagów. W tym obszarze widoczna była również angiogeneza w przestrzeniach pomiędzy beleczkami kości podchrzęstnej ubytku. W innych obszarach preparatów mikroskopowych nie odnotowano podwyższonej aktywności komórek tkanki łącznej i nabłonkowej. Również ilość tkanki tłuszczowej wydawała się być zredukowana w tym obszarze (ryc. 30).



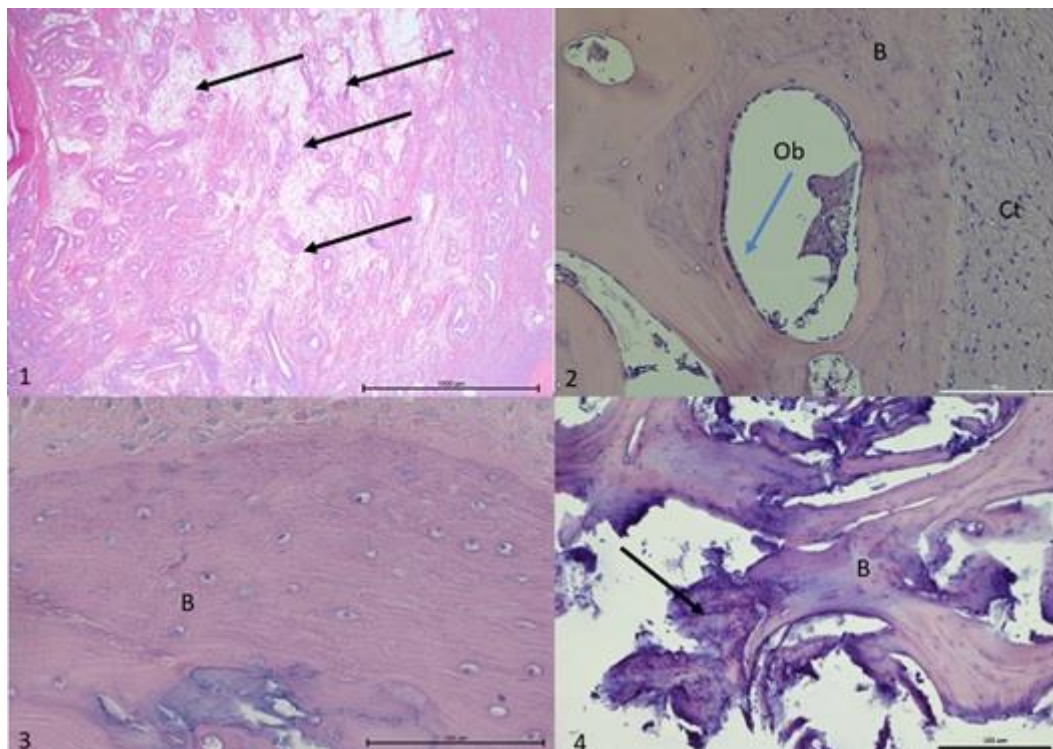
Ryc. 30. Porównanie charakteru stanu miejsca po wykonanym ubytku krytycznym w poszczególnych grupach. 1 – grupa I (kontrola negatywna); 2 – grupa II (kontrola pozytywna); 3 – grupa III (MVs); i 4 – grupa IV (BM-MSCs). Barwienie: 1, 2, 4 – HiE; 3 – wg. Mallorego. Powiększenie – 100x. C – chrząstka stawowa, O – ubytek krytyczny, B – kość

Tabela 2. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie II – scaffold kolagenowy nasączony 0,9% NaCl.

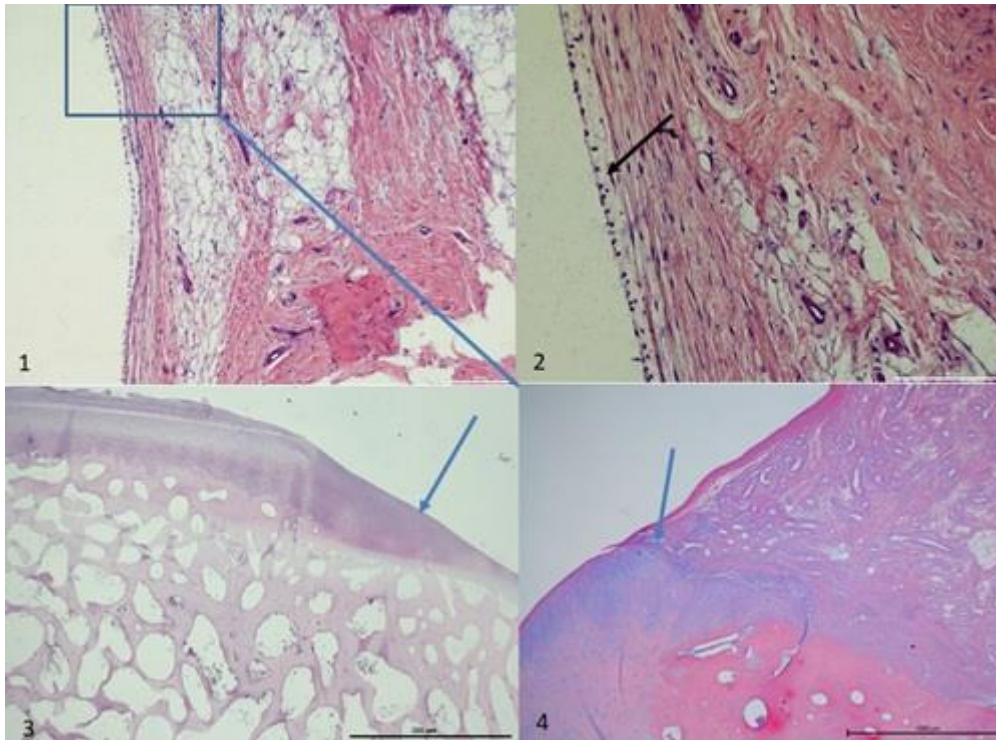
Lp.	Cecha	Uśredniona nota dla poszczególnych zwierząt w danej grupie eksperymentalnej		Średnia punktacja
1.	Odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej (0 – 5 pkt.)	0	0	0
2.	Wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.)	1	0	0,5
3.	Ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.)	0	0	0
4.	Odbudowanie kości/tkanek podpierających chrząstkę (0 – 2 pkt.)	0	0	0
5.	Niewywieranie lokalnych stanów zapalnych, nacieków komórek układu białokrwinkowego (brak komórek olbrzymich) (0 – 5 pkt.)	3	4	3,5
6.	Brak makrofagów (0 – 1 pkt.)	1	1	1
7.	Brak limfocytów (0 – 1 pkt.)	1	1	1
8.	Brak granulocytów (0 – 1 pkt.)	1	1	1
9.	Obecność szpiku (0 – 3 pkt.)	1	1	1
10.	Angiogeneza w tkankach przyległych (0 – 3 pkt.)	2	1	1,5
11.	Brak waskularyzacji/angiogenezy w obrębie ubytku chrząstki stawowej (0 – 2 pkt.)	0	0	0
12.	Rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.)	1	1	1
13.	Zaawansowanie procesów przebudowy (0 – 1 pkt.)	0	0	0
14.	Ocena ogólna (0 – 2 pkt.)	0	0	0
	SUMA (maks. 34,0 pkt.)	11	10	10,5

6.3.3 Grupa III badanych zwierząt – mikropęcherzyki

Dwie odmienne procedury, zastosowane w grupie III i IV wykazały istotne różnice morfologiczne w uzyskanym wypełnieniu eksperymentalnie utworzonego ubytku chrzęstno-kostnego. W grupie III badanych zwierząt (MVs) otwór w części powierzchniowej uległ całkowitemu zarośnięciu przez tkankę łączną tworząc czop, zamykający przestrzeń leżącą pod nim. Czop był połączony z przyległą tkanką kostną, stopniowo zarastając szyjkę ubytku. W rezultacie w ścianie można było wyróżnić część centralną wypełnioną przez tkankę łączną z licznymi naczyniami krwionośnymi (ryc. 31.1). Naczynia te następnie stopniowo przechodziły do boków w tkankę o charakterze chrzęstno-włóknistym, którą w obszarach peryferyjnych zastępowała tkanka kostna beleczkowa (ryc. 31.2). Powierzchnia stawowa została pokryta przez błonę łącznotkankową zbudowaną głównie z równolegle biegnących do powierzchni włókien kolagenowych, pod którymi widoczne były fibrocyty wraz z towarzyszącymi naczyniami krwionośnymi (ryc. 32.4). W tej grupie silna angiogeneza była obserwowana we wszystkich obszarach nowo powstałych tkanek. W tkance łącznej widoczne były makrofagi, obecne w okolicach naczyń krwionośnych, jak i powierzchni nowopowstałej tkanki. Chrzątka stawowa w obu przypadkach nie została odbudowana, jednakże istnieje wyraźna granica, gdzie prowadząc obserwacje od obszarów peryferyjnych w kierunku centrum otworu, chrzątka szklista była stopniowo zamieniana na chrzątkę włóknistą.



Ryc. 31. Obraz morfologiczny obszaru bloczka kości udowej po wykonaniu ubytku krytycznego w grupie III. 1 – część centralna czopu. Widoczne liczne skupiska tkanki tłuszczowej (strzałka), której towarzyszą naczynia krwionośne. Barwienie HiE, pow. 100x. 2 – obszar brzeżny – widoczna przebudowa tkanki kostnej grubowłóknistej w kość wtórną. Barwienie HiE, pow. 200x. 3 i 4 – obszar pod chrząstką stawową – widoczna struktura tkanki typowa dla blizny kostnej zawierająca tkanki o różnym stopniu zaawansowania rozwoju w tym pozostałości po wykonaniu ubytku (strzałka). Barwienie HiE, pow 200x. Ct – tkanka łączna, Ob. – osteoblasty, B – kość



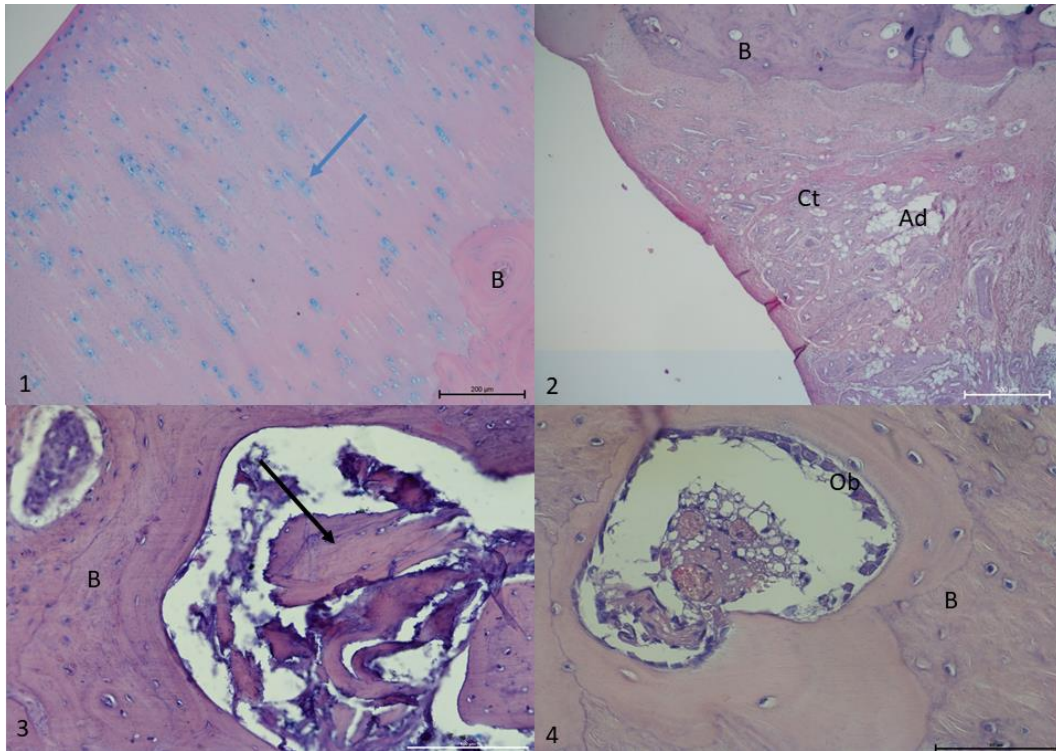
Ryc. 32. Różnice w mechanizmie zamykania otworu po wykonanym ubytku. 1, 2, 3 – grupa II, 4 – grupa III. 1, 2 (powiększenie obrazu 1) – widoczna cienka błona tworząca torebkę ograniczającą od wewnątrz otwór krytyczny, od pozostałych tkanek, z obecnymi makrofagami na powierzchni powstała z tkanki łącznej przyległej do otworu, pod którą leżą komórki tłuszczowe. Barwienie HiE, pow. 40x i 100x. 3 – charakterystyczne zmniejszenie grubości chrząstki stawowej przemieszczającej się poprzez działanie mechaniczne do wnętrza otworu (strzałka). Barwienie HiE, pow. 40x. 4 – widoczne połączenie nowopowstałej tkanki tworzącej czop z chrząstką stawową (strzałka). W tym przypadku, chrząstka stawowa nie jest „wciskana” do wnętrza otworu. Barwienie Alcian Blue, pow. 40x

Tabela 3. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie III badanych zwierząt - MVs.

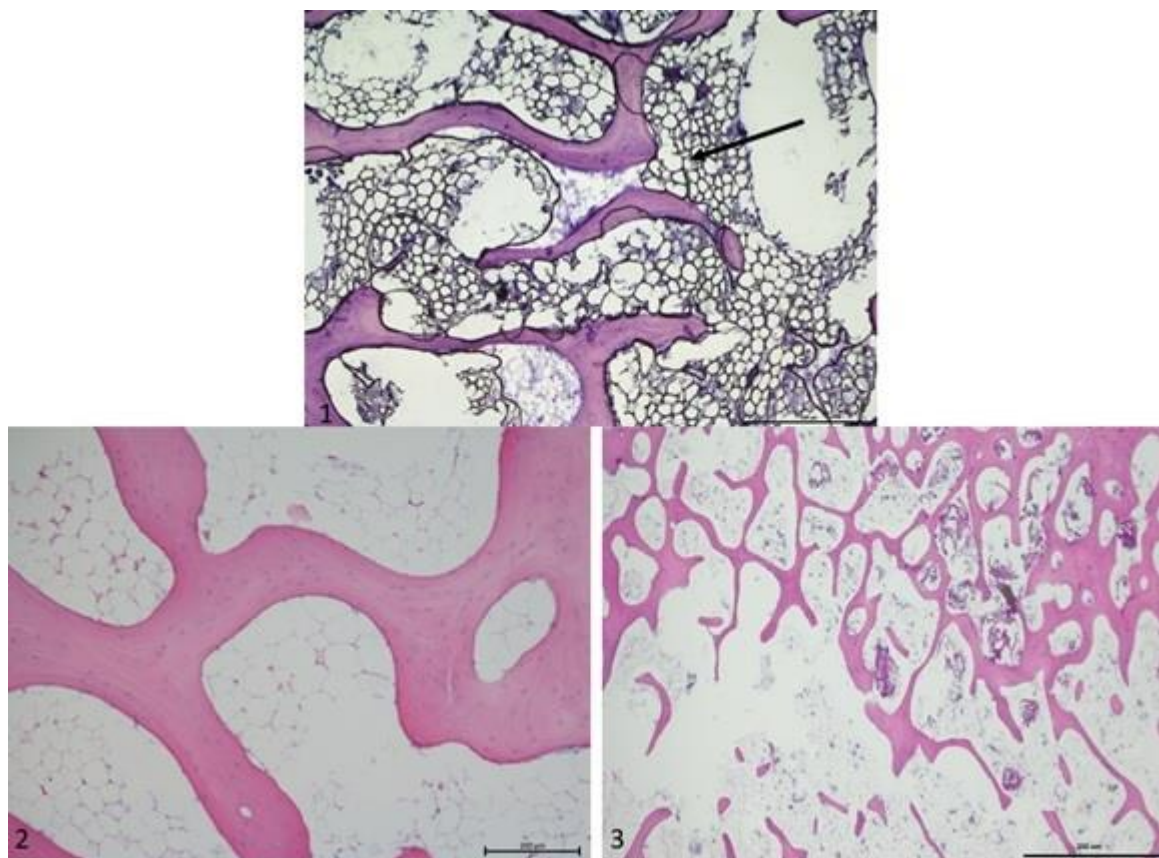
Lp.	Cecha	Uśredniona nota dla poszczególnych zwierząt w danej grupie eksperymentalnej						Średnia punktacja
1.	Odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej (0 – 5 pkt.)	5	5	5	5	5	5	5
2.	Wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.)	4	5	5	5	4	4	4,5
3.	Ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.)	2	2	3	1	2	2	2
4.	Odbudowanie kości/tkanek podpierających chrząstkę (0 – 2 pkt.)	1	1	1	1	1	1	1
5.	Niewywieranie lokalnych stanów zapalnych, nacieków komórek układu białokrwinkowego (brak komórek olbrzymich) (0 – 5 pkt.)	4	3	4	4	4	3	3,7
6.	Brak makrofagów (0 – 1 pkt.)	0	0	0	1	1	0	0,3
7.	Brak limfocytów (0 – 1 pkt.)	1	1	1	1	0	0	0,7
8.	Brak granulocytów (0 – 1 pkt.)	0	0	0	0	0	0	0
9.	Obecność szpiku (0 – 3 pkt.)	2	2	2	2	2	2	2
10.	Angiogeneza w tkankach przyległych (0 – 3 pkt.)	2	1	1	2	2	2	1,7
11.	Brak waskularyzacji/angiogenezy w obrębie ubytku chrząstki stawowej (0 – 2 pkt.)	1	2	1	1	1	2	1,3
12.	Rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.)	1	1	2	2	1	2	1,5
13.	Zaawansowanie procesów przebudowy (0 – 1 pkt.)	0	1	0	0	0	1	0,3
14.	Ocena ogólna (0 – 2 pkt.)	1	1	1	1	1	1	1
	SUMA (maks. 34,0 pkt.)	24	25	26	26	24	25	25

6.3.4 Grupa IV badanych zwierząt – mezenchymalne komórki macierzyste

W grupie IV (komórki BM-MSCs) obraz morfologiczny wykazywał szereg cech wspólnych, jednakże występowały tam również cechy istotnie różnicujące obie techniki. Przede wszystkim, nowopowstała tkanka łączna łączyła się bezpośrednio z tkanką kostną budującą beleczki kostne. Powierzchnia stawowa i tkanki ją wspierające były znacznie cieńsze, a wewnątrz było wypełnione przez tkankę tłuszczową (ryc. 33.2, 33.4). W grupie tej nie występowały nacieki makrofagowe, natomiast w znacznie mniejszym stopniu wytworzyła się tutaj tkanka kostna i chrzęstna (zarówno w obszarze około powierzchni stawowej jak i w obszarach wewnątrz kości). Wnętrze blizny było wypełnione tkanką tłuszczową, co na radiogramach może przedstawiać się jako cysta (ryc 34.3).



Ryc. 33. Grupa IV badanych zwierząt. 1 – zaktywowane chondrocyty w chrząstce stawowej (strzałka). Barwienie Alcian blue, pow. 100x. 2 – obszar otworu krytycznego. Widoczna wypełniająca wewnątrz otworu tkanka łączna wraz z naczyniami krwionośnymi oraz wyspami tkanki tłuszczowej. Obraz ten o różnym stopniu nasilenia jest charakterystyczny dla tej grupy eksperymentalnej. Barwienie HiE, pow. 40x. 3 – pozostałości po wykonaniu ubytku w tkance kostnej przyległej do otworu (strzałka). Barwienie HiE, pow. 200x. 4 – procesy przebudowy tkanki kostnej. Widoczne liczne osteoblasty syntetyzujące macierz kostną. W świetle widoczne są nowopowstałe naczynia krwionośne. Barwienie HiE, pow. 200x. Ct – tkanka łączna, Ad – adipocyty, B – kość, Ob – osteoblasty



Ryc. 34. Szpik kostny oraz przestrzenie pomiędzy beleczkami w badanych grupach w strefach przyległych do ubytku krytycznego (strzałka). 1 – grupa kontrolna. Barwienie HiE, pow. 40x. 2 – grupa III (MVs). Barwienie HiE, pow. 100x. 3 – grupa IV (BM-MSCs). Barwienie HiE, pow. 40x. W grupie III widoczne są liczne pozostałości po wykonaniu ubytku chrzęstno-kostnego.

Tabela 4. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie IV badanych zwierząt – BM-MSCs

Lp.	Cecha	Uśredniona nota dla poszczególnych zwierząt w danej grupie eksperymentalnej						Średnia punktacja
1.	Odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej (0 – 5 pkt.)	5	5	5	4	5	4	4,7
2.	Wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.)	4	4	3	2	4	3	3,3
3.	Ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.)	0	0	2	1	1	1	0,8
4.	Odbudowanie kości/tkanek podpierających chrząstkę (0 – 2 pkt.)	0	0	0	1	1	1	0,5
5.	Niewywieranie lokalnych stanów zapalnych, nacieków komórek układu białokrwinkowego (brak komórek olbrzymich) (0 – 5 pkt.)	4	5	4	4	4	5	4,3
6.	Brak makrofagów (0 – 1 pkt.)	1	1	1	1	0	1	0,8
7.	Brak limfocytów (0 – 1 pkt.)	1	1	1	1	1	1	1
8.	Brak granulocytów (0 – 1 pkt.)	1	1	1	1	1	1	1
9.	Obecność szpiku (0 – 3 pkt.)	1	2	0	0	1	1	0,8
10.	Angiogeneza w tkankach przyległych (0 – 3 pkt.)	2	2	1	2	2	1	1,7
11.	Brak waskularyzacji/angiogenezy w obrębie ubytku chrząstki stawowej (0 – 2 pkt.)	1	1	2	1	1	2	1,3
12.	Rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.)	1	1	0	0	0	1	0,5
13.	Zaawansowanie procesów przebudowy (0 – 1 pkt.)	0	0	0	0	0	0	0
14.	Ocena ogólna (0 – 2 pkt.)	1	0	1	1	1	0	0,7
	SUMA (maks. 34,0 pkt.)	22	23	21	19	22	22	21,5

Analiza statystyczna wyników 14-punktowej oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego wykazała istotne

($p \leq 0,05$) różnice między grupą III (MVs) i grupą IV (BM-MSCs), pod względem pięciu ocenianych cech (tabela 5).

Tabela 5. Wyniki analizy statycznej 14-punktowej zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej dla wszystkich badanych zwierząt w grupach II, III i IV

Lp.	Oceniana cecha	Grupa II – kontrola poz.*	Grupa III – MVs	Grupa IV – MSCs
1.	Odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej (0 – 5 pkt.)	0,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	4,67 ± 0,52
2.	Wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.)**	0,50 ± 0,71	4,50 ± 0,55 ^b	3,33 ± 0,82 ^a
3.	Ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.)**	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,63 ^b	0,83 ± 0,75 ^a
4.	Odbudowanie kości/tkanek podpierających chrząstkę (0 – 2 pkt.)	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,50 ± 0,55
5.	Niewywieranie lokalnych stanów zapalnych, nacieków komórek układu białokrwinkowego (brak komórek olbrzymich) (0 – 5 pkt.)	3,50 ± 0,71	3,67 ± 0,52	4,33 ± 0,52
6.	Brak makrofagów (0 – 1 pkt.)	1,00 ± 0,00	0,33 ± 0,52	0,83 ± 0,41
7.	Brak limfocytów (0 – 1 pkt.)	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,52	1,00 ± 0,00
8.	Brak granulocytów (0 – 1 pkt.)	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^b
9.	Obecność szpiku (0 – 3 pkt.)	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00 ^b	0,83 ± 0,75 ^a
10.	Angiogeneza w tkankach przyległych (0 – 3 pkt.)	1,50 ± 0,71	1,67 ± 0,52	1,67 ± 0,52
11.	Brak waskularyzacji / angiogenezy w obrębie ubytku chrząstki stawowej (0 – 2 pkt.)	0,00 ± 0,00	1,33 ± 0,52	1,33 ± 0,52
12.	Rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.)	1,50 ± 0,71	1,50 ± 0,55 ^b	0,50 ± 0,55 ^a
13.	Zaawansowanie procesów przebudowy (0 – 1 pkt.)	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,52	0,00 ± 0,00
14.	Ocena ogólna (0 – 2 pkt.)	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,52
	SUMA (maks. 34,0 pkt.)**	10,50 ± 0,71	25,00 ± 0,89 ^b	21,50 ± 1,38 ^a

średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe ($n=6$), Manna-Whitney'a

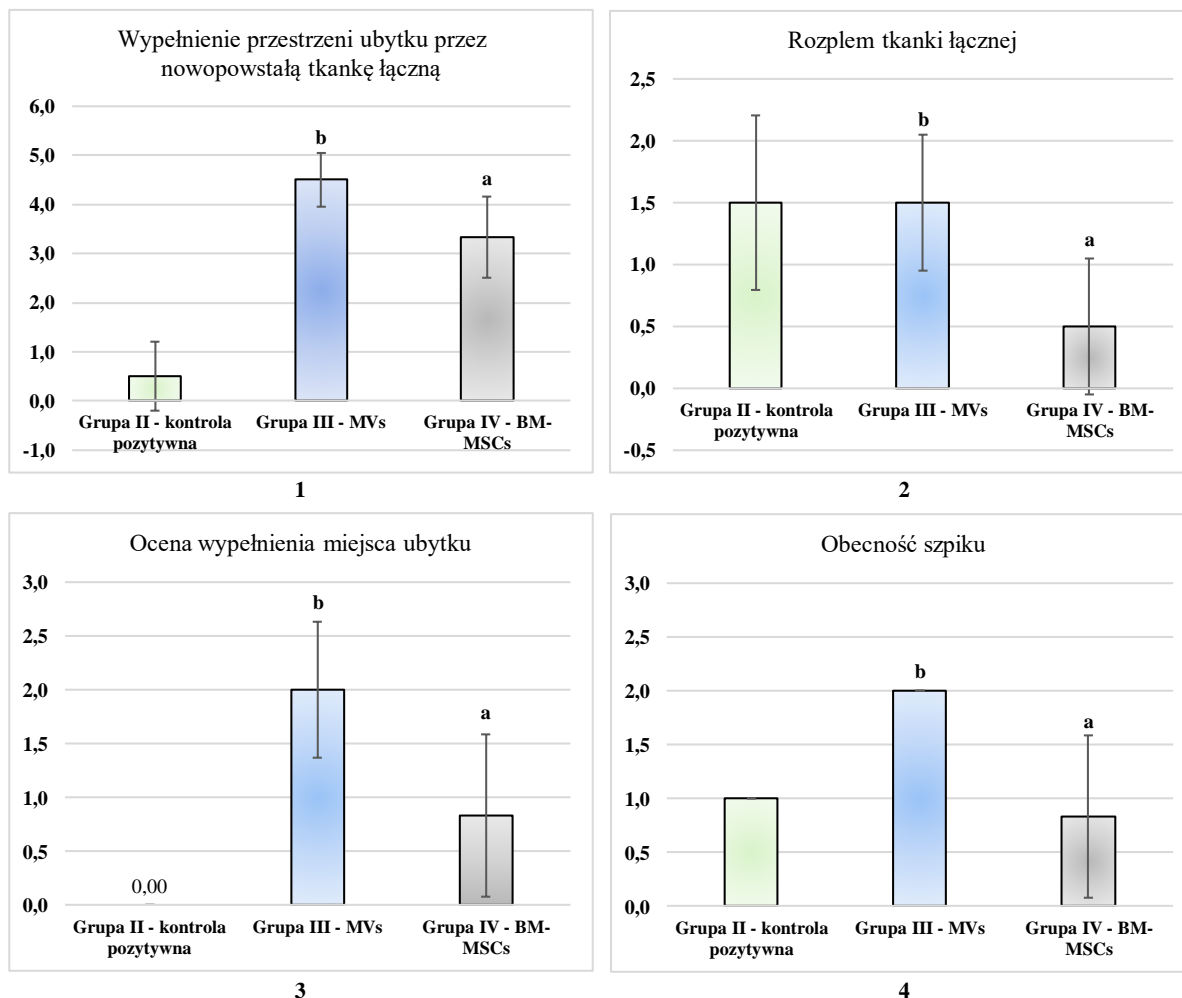
* – grupa II (kontrola pozytywna) nie została uwzględniona w analizie statystycznej, ze względu na niewystarczającą liczbę obserwacji ($n=2$)

** - test t-Studenta

a-b – wartości średnie ± SD ($n=6$) w tym samym wierszu oznaczone różnymi literami różniące się istotnie ($p \leq 0,05$)

Grupa doświadczalna III (MVs) charakteryzowała się istotnie wyższym wypełnieniem miejsca ubytku ($2,00 \pm 0,63$) (ryc. 38.3), lepszym wypełnieniem przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną ($4,50 \pm 0,55$) (38.1), a także istotnie wyższym rozplemem tkanki łącznej ($1,50 \pm 0,55$) (ryc. 38.2) w porównaniu z grupą IV (BM-MSCs) badanych zwierząt – odpowiednio $0,83 \pm 0,75$; $3,33 \pm 0,82$ i $0,50 \pm 0,55$. W ocenie mikroskopowej wykazano również istotnie wyższą obecność szpiku (ryc. 38.4) w grupie III – ($2,00 \pm 0,00$), niż w grupie IV –

($0,83 \pm 0,75$), w odróżnieniu od granulocytów, których obecności w grupie doświadczalnej IV (BM-MSCs) – nie stwierdzono wcale (tabela 5).



Ryc. 35. Porównanie wyników zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej w poszczególnych grupach badanych zwierząt (grupa II, III i IV). 1 – wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.); 2 – rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.); 3 – ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.); 4 – obecność szpiku (0 – 3 pkt.)

wartości średnie \pm odchylenie standardowe ($n=6$)

$a-b$ – wartości średnie w słupkach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$), test Manna-Whitney'a (1, 3 i 4); test t-Studenta (2)

6.4 Badania morfologiczne i biochemiczne krwi

Krew obwodową do przesiewowych badań morfologicznych i biochemicznych pobrano od wszystkich zwierząt z II, III i IV grupy eksperymentalnej. Próbkę krwi pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej w dniu planowanego zabiegu, a także w 3, 6 i 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, a uzyskane wyniki badań przedstawiono kolejno w tabelach 6 – 9.

Badania morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej przeprowadzone w dniu operacji (dzień 0) przedstawiono w tabeli 6.

Parametry morfologiczne krwi (tj. liczba leukocytów, erytrocytów i trombocytów) u wszystkich badanych zwierząt mieściły się w granicach wartości referencyjnych i wynosiły odpowiednio od $4,79 \pm 1,01$ [G/l] do $7,13 \pm 1,66$ [G/l] dla WBC, od $8,23 \pm 1,54$ [T/l] do $8,42 \pm 1,51$ [T/l] dla RBC oraz od $316,00 \pm 18,03$ [G/l] do $376,00 \pm 15,56$ [G/l] dla PLT. Nie stwierdzono istotnych statystycznie ($p \leq 0,05$) różnic w tych parametrach w badanych grupach owiec.

Tabela 6. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w dniu operacji (krew pobrana po farmakologicznym uspokojeniu zwierząt) – dzień 0

Parametr	Norma ¹	Grupa II [kontrola poz.]*	Grupa III [MVs]	Grupa IV [BM-MSCs]
WBC [G/l]	4,0-13,0	$5,45 \pm 0,35$	$4,79 \pm 1,01$	$7,13 \pm 1,66$
RBC [T/l]	8,0-13,0	$8,42 \pm 1,51$	$8,23 \pm 1,54$	$8,24 \pm 0,77$
PLT [G/l] **	170-530	$376,00 \pm 15,56$	$316,00 \pm 18,03$	$356,75 \pm 93,44$
AspAT [U/l]	40-96	$113,50 \pm 24,75$	$190,65 \pm 72,34$ ^b	$90,73 \pm 13,29$ ^a
AlAT [U/l]	5,0-17,0	$34,00 \pm 1,41$	$20,53 \pm 1,30$	$21,00 \pm 8,12$
ALP [U/l]	50-229	$101,00 \pm 32,53$	$116,00 \pm 38,67$	$105,68 \pm 47,45$
Mocznik [mmol/l]	4,15-7,47	$4,70 \pm 0,99$	$6,55 \pm 0,98$	$6,80 \pm 0,47$
Kreatynina [μmol/l]	79,6-161	$54,00 \pm 8,49$	$81,55 \pm 7,27$ ^b	$56,03 \pm 11,45$ ^a
TP [g/l]	65-79	$54,50 \pm 3,54$	$63,25 \pm 4,56$	$58,30 \pm 2,15$
Albuminy [g/l]	33-48	$36,50 \pm 2,12$	$30,55 \pm 0,77$ ^a	$36,05 \pm 1,51$ ^b

średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n=6), test t-Studenta

* – grupa II (kontrola pozytywna) nie została uwzględniona w analizie statystycznej, ze względu na niewystarczającą liczbę obserwacji (n=2)

** – test Manna-Whitney'a

^{a-b} – wartości średnie ± SD (n=6) w tym samym wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$)

¹ – Winnicka, 2021

Badania biochemiczne krwi obwodowej wykazały podwyższoną aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginowej, odpowiednio od $20,53 \pm 1,30$ U/l do $34,00 \pm 1,41$ U/l (dla AlAT) i od $113,50 \pm 24,75$ U/l do $190,65 \pm 72,34$ U/l (dla AspAT), przy czym istotnie ($p \leq 0,05$) najwyższą aktywność AspAT odnotowano w grupie III-MVs, w której parametr ten przekroczył wartości referencyjne ponad 2-krotnie. Spośród badanych enzymów wątrobowych, jedynie aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) mieściła się w granicach wartości referencyjnych i wynosiła średnio $108,87 \pm 37,51$ U/l u wszystkich badanych zwierząt.

Stężenie mocznika w surowicy krwi mieściło się w granicach wartości referencyjnych u wszystkich badanych zwierząt (od $4,70 \pm 0,99$ mmol/l do $6,80 \pm 0,47$ mmol/l), w odróżnieniu od stężenia kreatyniny, której zbyt niski poziom stwierdzono w grupie II ($54,00 \pm 8,49$ μ mol/l) oraz w grupie IV-BM-MSCs ($56,03 \pm 11,45$ μ mol/l).

U wszystkich owiec stwierdzono nieznaczne obniżenie stężenia białka całkowitego w surowicy krwi (od $54,50 \pm 3,54$ g/l do $63,25 \pm 4,56$ g/l) w porównaniu do wartości referencyjnych dla tego parametru (65-79 g/l), przy czym stężenie albumin, stanowiących główną frakcję wszystkich białek osocza, znajdowało się poniżej wartości referencyjnych dla tego parametru jedynie w grupie III-MVs ($30,55 \pm 0,77$ g/l).

W tabeli 7 przedstawiono wyniki badań morfologicznych i biochemicznych krwi obwodowej przeprowadzone w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej. Wszystkie parametry morfologiczne krwi mieściły się w zakresach wartości referencyjnych, nie stwierdzono również istotnych ($p \leq 0,05$) różnic w obrazie morfologicznym krwi owiec.

Badania biochemiczne krwi wykazały znacznie podwyższoną aktywność enzymów wątrobowych, tj. aminotransferazy alaninowej (od $34,50 \pm 4,21$ U/l do $40,75 \pm 3,18$ U/l) i asparaginowej (od $149,00 \pm 16,97$ U/l do $184,73 \pm 47,07$ U/l) u wszystkich zwierząt doświadczalnych, obserwowaną również w dniu 0 (tabela 6), przy czym aktywność AlAT wzrosła o 20% w grupie II-kontrolnej i aż o 64% i 74%, odpowiednio w grupach IV-MSCs i III-MVs, w porównaniu do wartości tych parametrów notowanych w dniu przeprowadzenia procedury chirurgicznej. Również aktywność AspAT uległa znacznemu podwyższeniu w grupie II-kontrolnej oraz w grupie IV-MSCs, odpowiednio o 31% i 64% (w porównaniu do dnia 0). Nie stwierdzono natomiast wzrostu aktywności tego enzymu w grupie III-MVs. W porównaniu do wyników badań uzyskanych w dniu przeprowadzenia zabiegu, w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej stwierdzono nieznaczne obniżenie aktywności ALP (średnio o ok. 7,5%) u wszystkich zwierząt doświadczalnych. Średnia aktywność tego enzymu wyniosła $99,50 \pm 13,54$ U/l i (podobnie jak w dniu 0), mieściła się w zakresie wartości referencyjnych dla tego parametru surowicy krwi.

Tabela 7. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej

Parametr	Norma ¹	Grupa II [kontrola poz.]*	Grupa III [MVs]	Grupa IV [MSCs]
WBC [G/l]	4,0-13,0	5,70 ± 0,14	7,40 ± 0,99	8,44 ± 1,79
RBC [T/l]	8,0-13,0	9,22 ± 1,57	10,25 ± 0,30	9,62 ± 0,72
PLT [G/l]	170-530	380,00 ± 7,07	313,50 ± 3,64	366,80 ± 114,08
AspAT [U/l]	40-96	149,00 ± 16,97	184,73 ± 47,07	149,80 ± 5,93
AlAT [U/l]	5,0-17,0	40,75 ± 3,18	35,65 ± 5,74	34,50 ± 4,21
ALP [U/l]	50-229	93,50 ± 33,23	115,00 ± 9,25	90,00 ± 32,72
Mocznik [mmol/l]**	4,15-7,47	5,91 ± 0,83	5,35 ± 0,47 ^a	6,76 ± 1,34 ^b
Kreatynina [μmol/l]	79,6-161	46,00 ± 2,83	82,03 ± 4,80 ^b	51,20 ± 12,03 ^a
TP [g/l]	65-79	56,00 ± 4,24	66,75 ± 3,03 ^b	58,00 ± 1,58 ^a
Albuminy [g/l]	33-48	35,00 ± 1,41	31,10 ± 0,82 ^a	34,60 ± 1,52 ^b

średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n=6), test t-Studenta

* – grupa II (kontrola pozytywna) nie została uwzględniona w analizie statystycznej, ze względu na niewystarczającą liczbę obserwacji (n=2)

** – test Manna-Whitney'a

^{a-b} – wartości średnie ± SD (n=6) w tym samym wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (p≤0,05)

¹ – Winnicka, 2021

W przypadku stężenia mocznika, w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, wzrost tego parametru stwierdzono w grupie II (o ok. 25,7%), natomiast jego obniżenie (o ok. 18,3%) w grupie III-MVs, przy czym wartości te mieściły się w normach dla tego parametru.

Stężenie kreatyniny uległo obniżeniu w grupie II (o ok. 14,8%) i w grupie IV-MSCs (o ok. 9,0%), pozostając na niezmiennym poziomie w grupie III-MVs, przy czym u zwierząt z tej grupy, podobnie jak w dniu 0, osiągnęło ono istotnie najwyższe wartości 82,03±4,80 μmol/l.

W porównaniu do wyników badań biochemicznych krwi uzyskanych w dniu przeprowadzenia zabiegu (tabela 6), nie stwierdzono większych zmian w stężeniu białka całkowitego (TP) oraz albumin w surowicy krwi. Średnio, stężenie tych składników wyniosło 60,25±5,72 g/l (TP) i 33,57±2,15 g/l (albuminy) w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, przy czym nadal utrzymywał się trend istotnie (p≤0,05) wyższego stężenia TP (66,75±3,03 g/l) i istotnie (p≤0,05) niższego stężenia albumin (31,10±0,82 g/l) w grupie III-MVs w porównaniu do grupy IV-MSCs (odpowiednio 58,00±1,58 g/l i 34,60±1,52 g/l).

Badania morfologiczne krwi obwodowej przeprowadzone w 6 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej (tabela 8) wykazały znaczny wzrost zawartości płytek krwi u wszystkich badanych zwierząt, przy czym najwyższą ilość PLT odnotowano w grupie IV-

MSCs (659,00±207,01 G/l), najniższą zaś w grupie III-MVs (478,50±50,98 G/l). Pozostałe analizowane parametry morfologiczne, tj. WBC i RBC nadal pozostawały w granicach wartości referencyjnych.

Tabela 8. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 6 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej

Parametr	Norma ¹	Grupa II [kontrola poz.]*	Grupa III [MVs]	Grupa IV [MSCs]
WBC [G/l]	4,0-13,0	5,95 ± 0,64	6,96 ± 0,058	6,34 ± 1,33
RBC [T/l]	8,0-13,0	8,83 ± 1,73	9,77 ± 0,34	9,01 ± 0,71
PLT [G/l]	170-530	633,50 ± 242,54	478,50 ± 50,98	659,00 ± 207,01
AspAT [U/l]	40-96	90,00 ± 1,41	112,35 ± 23,12	93,20 ± 11,17
AlAT [U/l]	5,0-17,0	30,00 ± 1,41	23,78 ± 4,84	20,00 ± 6,04
ALP [U/l]	50-229	123,00 ± 53,74	109,75 ± 25,21	78,80 ± 39,39
Mocznik [mmol/l]**	4,15-7,47	6,95 ± 1,48	4,80 ± 0,37 ^a	6,58 ± 1,50 ^b
Kreatynina [μmol/l]	79,6-161	63,00 ± 24,04	74,20 ± 6,00 ^b	51,60 ± 9,02 ^a
TP [g/l]	65-79	54,00 ± 4,24	66,08 ± 2,59 ^b	56,40 ± 3,21 ^a
Albuminy [g/l]	33-48	34,00 ± 1,41	31,93 ± 1,31	34,40 ± 2,30

Średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n=6), test t-Studenta

* – grupa II (kontrola pozytywna) nie została uwzględniona w analizie statystycznej, ze względu na niewystarczającą liczbę obserwacji (n=2)

** – test Manna-Whitney'a

^{a-b} – wartości średnie ± SD (n=6) w tym samym wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (p≤0,05)

¹ – Winnicka, 2021

Począwszy od 6 doby po zakończonej procedurze chirurgicznej, w badaniach biochemicznych krwi można było stwierdzić wyraźną poprawę parametrów wątrobowych. Wysoka aktywność aminotransferazy alaninowej (średnio 36,97±3,33 U/l) i asparaginowej (średnio 161,18±20,40 U/l), notowana w 3 dobie od zakończonej procedury chirurgicznej, uległa wyraźnemu obniżeniu, odpowiednio do 24,59±5,05 U/l i 98,52±12,09 U/l, średnio dla wszystkich badanych owiec w doświadczeniu. W przypadku AlAT, aktywność tego enzymu uległa obniżeniu o ok. 26,4% w grupie II-kontrolnej, o ok. 33,3% w grupie III-MVs i aż o ok. 52,7% w grupie IV-MSCs, natomiast w przypadku AspAT, obniżyła się o ok. 39,6% i 39,2%, odpowiednio w grupie II i III, natomiast w grupie IV o ok. 37,8%.

Analizując zmiany aktywności enzymów wątrobowych przebiegające w czasie, począwszy od 6 doby po zabiegu operacyjnym widoczny był wyraźny spadek, zbliżający aktywność AlAT do wartości referencyjnych lub nawet, pozwalający na ich osiągnięcie, co miało miejsce w przypadku AspAT (w grupach II-kontrolnej i IV-MSCs). Średnia aktywność

ALP nie ulegała tak dużym zmianom i utrzymywała się na względnie stałym poziomie, wynoszącym w 6 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej średnio $103,85 \pm 22,68$ U/l u wszystkich zwierząt.

W przypadku stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy krwi, w grupie II-kontrolnej odnotowano wzrost tych parametrów (odpowiednio o ok. 17,6% i ok. 36,9%), natomiast w grupie III- MVs ich spadek (odpowiednio o ok. 10,3% i o ok. 9,5%), w porównaniu do wartości uzyskanych w badaniach przeprowadzonych w 3 dobie po zabiegu operacyjnym. Na każdym z dotychczas przeprowadzonych etapów badań biochemicznych krwi stwierdzono istotnie ($p \leq 0,05$) wyższe stężenie mocznika w grupie IV-MSCs niż w grupie III-MVs, w odróżnieniu od kreatyniny, której stężenie każdorazowo było istotnie ($p \leq 0,05$) wyższe w grupie III-MVs aniżeli w grupie IV-MSCs zwierząt doświadczalnych.

Stężenie TP oraz albumin w surowicy krwi nie ulegało wyraźnym zmianom w 6 dobie po zabiegu operacyjnym, z wyjątkiem grupy IV-MSCs, w której odnotowano wzrost wartości tego parametru o ok. 17,0% (w porównaniu do wyników badań uzyskanych w 3 dobie). Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic dla tego parametru, podobnie jak dla głównej frakcji białek osoczkowych (albumin), których stężenie było bardzo zbliżone we wszystkich grupach zwierząt doświadczalnych i wynosiło średnio $34,93 \pm 1,10$ g/l.

Badania morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej owiec wykonano także w 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 9.

Wszystkie parametry morfologiczne krwi, tj. ilość białych i czerwonych krwinek, a także płytek krwi mieściły się w zakresach wartości referencyjnych u wszystkich zwierząt, z wyjątkiem PLT w grupie III-MVs owiec, u których ilość tych elementów morfotycznych nieznacznie przekroczyła górny zakres wartości referencyjnych, osiągając $552,40 \pm 126,39$ G/l.

Odnosnie wyników badań biochemicznych krwi, warto podkreślić utrzymującą się tendencję do spadku aktywności enzymów wątrobowych, zarówno w przypadku AspAT, AlAT, jak również ALP, których wartości uległy obniżeniu odpowiednio o ok. 17,6%, 14,2% i 12,5% (w porównaniu do wyników badań biochemicznych krwi przeprowadzonych w 6 dobie), i prawie dwukrotnie (w przypadku AspAT, AlAT) w stosunku do ich aktywności w 3 dobie po przeprowadzeniu procedury chirurgicznej, osiągając tym samym (u zdecydowanej większości badanych zwierząt) wartości referencyjne dla tych parametrów biochemicznych krwi.

W 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej, stężenie mocznika w surowicy krwi osiągnęło bardzo zbliżone wartości u wszystkich badanych zwierząt (średnio $6,71 \pm 0,36$ mmol/l) i mieściły się one w granicach wartości referencyjnych (4,15-7,47 mmol/l). Zbliżone

wartości odnotowano także w przypadku stężenia kreatyniny (średnio $53,63 \pm 1,91 \mu\text{mol/l}$), niemniej jednak były to wartości poniżej granicy wartości referencyjnych dla tego parametru biochemicznego krwi.

Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic w stężeniu białka całkowitego (TP) oraz albumin w surowicy krwi. Grupy III-MVs i IV-MSCs, charakteryzowały się jednakowym stężeniem TP, mieszczącym się w zakresie wartości referencyjnych dla tego parametru, w odróżnieniu od grupy II-kontrolnej, dla której odnotowano o ok. 15,4% niższe stężenie TP w porównaniu do pozostałych zwierząt doświadczalnych, przy czym dodatkowo stężenie białka całkowitego było w tej grupie poniżej zakresu wartości referencyjnych. Także stężenie głównej frakcji białek osoczowych (albumin) było na bardzo zbliżonym poziomie u wszystkich zwierząt doświadczalnych (średnio $34,93 \pm 1,10 \text{ g/l}$), mieszcząc się w granicach wartości referencyjnych (33-48 g/l) dla tego parametru.

Tabela 9. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej

Parametr	Norma ¹	Grupa II [kontrola poz.]*	Grupa III [MVs]	Grupa IV [MSCs]
WBC [G/l]	4,0-13,0	$5,50 \pm 0,71$	$5,78 \pm 0,61$	$6,42 \pm 0,51$
RBC [T/l]	8,0-13,0	$8,98 \pm 2,09$	$8,67 \pm 0,48$	$8,56 \pm 0,24$
PLT [G/l]	170-530	$528,00 \pm 159,81$	$552,40 \pm 126,39$	$440,00 \pm 210,36$
AspAT [U/l]	40-96	$82,00 \pm 2,83$	$84,40 \pm 14,03$	$77,20 \pm 11,50$
AlAT [U/l]	5,0-17,0	$26,00 \pm 1,41$	$21,00 \pm 3,94$	$16,30 \pm 4,21$
ALP [U/l]	50-229	$115,00 \pm 35,36$	$78,10 \pm 20,03$	$79,60 \pm 53,85$
Mocznik [mmol/l]	4,15-7,47	$6,50 \pm 1,27$	$7,12 \pm 0,73$	$6,50 \pm 0,52$
Kreatynina [$\mu\text{mol/l}$]	79,6-161	$51,50 \pm 0,71$	$55,20 \pm 5,40$	$54,20 \pm 9,86$
TP [g/l]	65-79	$56,00 \pm 5,66$	$66,40 \pm 1,82$	$66,00 \pm 3,00$
Albuminy [g/l]	33-48	$36,00 \pm 1,41$	$33,80 \pm 1,84$	$35,00 \pm 1,58$

średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe ($n=6$), test t-Studenta

* – grupa II (kontrola pozytywna) nie została uwzględniona w analizie statystycznej, ze względu na niewystarczającą liczbę obserwacji ($n=2$)

¹ – Winnicka, 2021

7. Dyskusja i omówienie wyników

DJD jest bolesną i powodującą kalectwo chorobą, która stanowi coraz większy problem zarówno w populacji człowieka, jak i zwierząt [137,138]. Obecnie, znaczna liczba młodych pacjentów, zarówno w medycynie człowieka i weterynaryjnej jest konsultowana ze względu na odczuwany dyskomfort związany ze schorzeniami stawów. Uboga macierz komórkowa chrząstki stawowej oraz brak penetrujących do niej naczyń krwionośnych, limfatycznych czy nerwów nie sprzyjają procesom regeneracji jej uszkodzeń [71,139,140]. Ta naprawa jest możliwa tylko na wczesnych etapach rozwoju organizmu. Wygojony ubytek zlokalizowany w powierzchni chrząstki jest zwykle wypełniony chrząstką włóknistą, która ma gorsze właściwości biomechaniczne. DJD stawów rozwija się i postępuje wraz z wiekiem i objawia się stanem zapalnym oraz sukcesywną degeneracją chrząstki i kości podchrząstnej, co skutkuje utratą pełnej funkcjonalności stawu. Często podczas ruchu, zwłaszcza u zwierząt biorących czynny udział w sporcie, tkanka ta poddawana jest znacznym obciążeniom powodującym jej mikrourazy. Kulawizna spowodowana zmianami zwyrodnieniowymi jest dość częstą przypadłością koni wyścigowych, prowadzącą do ich całkowitego wykluczenia ze sportu. Odgrywa to istotną rolę ekonomiczną dla właścicieli tych zwierząt [89,141]. Choroba ta towarzyszy też często różnym etapom dysplazji stawów łokciowych i biodrowych u psów i kotów.

Medycyna regeneracyjna i zastosowanie produktów inżynierii tkankowej (w tym MSCs) cieszy się obecnie bardzo dużą popularnością w świecie nauki, metody te są wykorzystywane w terapii doświadczalnej i klinicznej jako alternatywa dla inwazyjnego leczenia chirurgicznego schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Naukowcy i klinicyści z całego świata pracują cały czas nad powstaniem bezpiecznych i skutecznych protokołów postępowania w terapii OA z wykorzystaniem preparatów komórkowych i/lub ich biopochodnych. Wielokrotnie w badaniach udowodniono skuteczność zastosowanych medykamentów, polepszenie stanu klinicznego pacjenta, a także ich długoterminowe pozytywne efekty terapeutyczne. Pozytywne wyniki tych badań zachęcają do dalszych poszukiwań jeszcze to lepszych i efektywniejszych metod w medycynie regeneracyjnej.

Odkrycie i opracowanie sposobów uzyskiwania MSCs dorosłego organizmu pozwoliło na ich kliniczne wykorzystanie zarówno u ludzi jak i u zwierząt [70,142]. Jednym z problematycznych tematów dotyczących terapii komórkowej jest optymalne źródło, z którego można izolować materiał. Wykorzystywane w większości badań MSCs w terapii DJD

pochodziły z tkanki tłuszczowej (AD-MSCs) lub ze szpiku kostnego (BM-MSCs). Procedury pobrania materiału i izolacji poszczególnych linii komórkowych z tych tkanek są obecnie dopracowane, natomiast niewykluczone, że istnieje w dalszym ciągu lepsze, jeszcze nieodkryte źródło i metody izolacji MSCs z tkanek dawcy. Niestety do tej pory nie udało się też ustalić standardowych protokołów postępowania dotyczących efektywnej dawki komórek, częstotliwości ich aplikacji czy sposobu podania w określonej jednostce chorobowej. Konieczne jest też zwrócenie uwagi na takie czynniki jak wiek dawcy, jego płeć czy przebyte choroby. Czynniki te mogą mieć znaczący wpływ na jakość i ilość izolowanych MSCs w materiale pobranym z danego źródła.

Innym aspektem o problematyce etycznej w dalszym ciągu jest zastosowanie komórek auto- i allogenicznych. Przyjęło się, że wykorzystanie preparatów zawierających autologiczne MSCs jest bezpieczniejsze, ale ich pozyskanie i izolacja jest bardziej skomplikowana, wydłużona w czasie i droższa w odczuciu dla opiekuna zwierzęcia. Alternatywą pozostają komórki allogeniczne, pochodzące od innego osobnika tego samego gatunku. Niestety w dalszym ciągu pozostaje wiele niewiadomych dotyczących użycia tych komórek, jak ich immunogenność czy potencjał do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej w organizmie biorcy.

W ostatnich latach MSCs były wielokrotnie wykorzystywane jako alternatywna terapia lecznicza u psów i koni. HA, PRP lub inne preparaty lecznicze były często stosowane w tym samym czasie wraz z MSCs. We wszystkich przypadkach wyselekcjonowane komórki podawano bezpośrednio jako iniekcję dostawową, wstrzyknięcia punktowe przy akupunkturze lub dożylnie. Rzetelna ocena działania MSCs i ich skuteczności w leczeniu DJD jest możliwa tylko wtedy, gdy wyniki można porównać z grupą kontrolną. Jednak na podstawie dostępnej literatury wydaje się, że nie zawsze jest to możliwe, głównie w przypadku prezentacji badań klinicznych na pacjentach [71,143–145]. Badania z równoległą grupą kontrolną pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków z przeprowadzanego eksperymentu i prawidłową ocenę wdrożonego leczenia u pacjentów klinicznych. Randomizowane badanie kliniczne z wykorzystaniem placebo dotyczące skuteczności terapii MSCs u psów z OA stawów biodrowych wykazało, że wstrzyknięcie AD-MSCs do stawu prowadzi do znacznej poprawy jego funkcjonalności, która objawia się mniejszą kulawizną, zmniejszeniem odczuwanego bólu i większym zakresem ruchu w porównaniu z grupą kontrolną [146]. Inne podobne badania wykazały, że w wyniku stosowania AD-MSCs i osocza bogatego w czynniki wzrostu (ang. plasma rich in growth factors – PRGF) obserwowano poprawę sprawności fizycznej

i zmniejszenie odczuwanego bólu u psów. Jednocześnie w odniesieniu do poziomu podstawowego każdego badanego parametru u pacjentów z DJD stawu biodrowego, MSCs wykazały lepsze wyniki po 6 miesiącach trwania obserwacji [112]. Potwierdzają to również badania na psach z zastosowaniem AD-MSCs połączonych z PRGF, gdzie wykazano poprawę w zakresie funkcjonalności i mniejszy dyskomfort związany z odczuwaniem bólu wywołanego przez DJD stawu biodrowego [114]. Skuteczność MSCs w leczeniu DJD u psów oceniano również w przypadku DJD stawu łokciowego i kolanowego [71,139,143,147,148]. W leczeniu doświadczalnie wywołanej OA stawu kolanowego u psów, grupa badanych zwierząt, u których stosowano jednocześnie AD-MSCs wraz z PRP uzyskała korzystniejsze rezultaty w porównaniu z grupą kontrolną (PBS), w której zastosowano pojedyncze iniekcje PRP lub AD-MSCs. Stwierdzono korzystne działanie preparatów leczniczych, świadczące o ich stymulacji do syntezy ECM i proliferacji chondrocytów. Preparaty te hamowały również reakcję zapalną w obrębie stawu [147]. Dostawowe iniekcje AD-MSCs podczas leczenia psów z DJD stawów ramiennych skutkowały znaczną poprawą w porównaniu z wcześniej stosowaną terapią farmakologiczną. Cechy UC-MSCs w leczeniu DJD badano zarówno eksperymentalnie [148], jak i u pacjentów klinicznych [139]. Badania na psach wykazały znacznie większą poprawę w reparacji chrząstki stawu kolanowego w grupie leczonej (UC-MSCs) w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna). W grupie leczonej zmniejszyła się objętość płynu stawowego i odpowiedź zapalna [148]. Podobnie nie zaobserwowano działań niepożądanych związanych z UC-MSCs stosowanych u pacjentów klinicznych z DJD stawu łokciowego. Dodatkowo na podstawie 6-miesięcznej obserwacji zaobserwowano poprawę kliniczną u psów po wstrzyknięciu dostawowym UC-MSCs w porównaniu z psami z grupy kontrolnej, którym wstrzyknięto sól fizjologiczną [139]. Zbadano również możliwości wykorzystania MSCs w leczeniu koni z DJD, zarówno w układzie auto-, jak i allogenicznym [89,149,150]. Badania kliniczne oceniające możliwość zastosowania produktu weterynaryjnego składającego się z allogenicznych, chondrogenie indukowanych MSCs z pochodzącym od koni allogenicznym osoczem wykazały wyższą skuteczność w porównaniu z grupą kontrolną (sól fizjologiczna). Poprawę kliniczną zaobserwowano nawet rok po podaniu preparatu, przy czym znacznie więcej koni pracowało na swoim poprzednim poziomie lub na poziomie wytrenowania w danym momencie, w porównaniu z grupą kontrolną, w której zastosowano placebo [149]. Magri i wsp. [89] porównali skuteczność i bezpieczeństwo pojedynczych i powtarzanych dostawowych iniekcji allogenicznych MSCs w leczeniu zapalenia kości i stawów śródrečno-palcowych u koni. Ich wyniki wykazały, że nie ma widocznych korzyści klinicznych z wielokrotnego dostawowego podawania MSCs w odstępie 1-miesiąca u koni z zaawansowaną DJD stawu

śródręczno-palcowego w porównaniu z efektem pojedynczej iniekcji. Co ciekawe, jedno z badań oceniało skuteczność leczenia przy podawaniu autologicznych BM-MSCs z HA w porównaniu z iniekcją tylko HA do stawu kolanowego z eksperymentalnie wykonanym ubytkiem w chrząstce stawowej kłykcia przyśrodkowego kości udowej u koni. Cytowani autorzy nie wykazali znaczących różnic klinicznych ani histologicznych w obu grupach badanych zwierząt. Jednakże ich wyniki potwierdzają, że dostawowe stosowanie BM-MSCs poprawia jakość reparacji chrząstki dzięki zwiększonej zawartości agrekanu i jędrności nowopowstałej tkanki [150]. W badaniach własnych, do gojenia ubytku chrząstki stawowej u owiec wykorzystano taką samą ilość autologicznych BM-MSCs, tj. 20×10^6 komórek/zwierzę, jak w przeprowadzonym doświadczeniu przez McIlwraith i wsp.. Pozostałe różnice w porównywanych doświadczeniach dotyczyły braku jednoczesnej podaży HA do operowanego stawu kolanowego u owiec, a także techniki implantacji preparatu komórkowego – nasączenie skafoldu kolagenowego podczas artrotomii stawu kolanowego. W efekcie na podstawie oceny makroskopowej tkanek stawu kolanowego można wnioskować, że zastosowana technika nie miała wpływu na upośledzenie biomechaniki operowanych stawów po zakończonym 180-dniowym okresie obserwacji. Dopiero w trakcie oceny mikroskopowej, można było zauważyć istotne różnice pomiędzy grupą II (sól fizjologiczna), a grupą IV (BM-MSCs) w waskularyzacji obszaru tkanek przyległych i łoża ubytku, a także jakości wypełnienia samego ubytku i odtworzenia ciągłości chrząstki stawowej, na korzyść owiec z grupy IV badanych zwierząt – uzyskanych 32,36% więcej punktów. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i analizy wyników zmodyfikowanej skali ICRS można stwierdzić, że wykorzystanie BM-MSCs umożliwia szybszą reparację ubytku powierzchni chrzęstnej stawowej. Przedstawione powyżej godne uwagi prace z zakresu schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego są potwierdzeniem tego, że terapia komórkowa może być z powodzeniem stosowana jako alternatywa dla klasycznych metod leczenia ubytków chrząstki stawowej.

Na przestrzeni ostatnich lat znacznie wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem MSCs w leczeniu DJD. Niektóre z doniesień naukowych sugerują, że za pozytywny efekt terapii komórkowej stosowanej w OA odpowiedzialne są aktywne biopochodne wydzielane przez MSCs – EVs, Exo i MVs [151]. Przewlekłe wydzielanie cytokin prozapalnych, będących nieodłączną składową stanu zapalnego, wpływa na metabolizm chondrocytów poprzez wydzielanie mediatorów zapalnych i enzymów katabolicznych, które w efekcie skutkują zniszczeniem macierzy chrzęstnej i zaostrzeniem choroby degeneracyjnej stawu. Współcześnie leczenie DJD opiera się w głównej mierze na kontroli stanu zapalnego i wygaszaniu objawów

klinicznych towarzyszących postępującej w różnym tempie chorobie. Wielokrotnie w celu przyspieszenia procesów reparacji chrząstki stawowej były podejmowane próby wykorzystania bardziej zaawansowanych technik inżynierii tkankowej, gdzie bezpośrednio w ubytek powierzchni chrzęstnej implantowano produkty komórkowe osadzone na rusztowaniu skafoldu [152]. Udowodniono, że MSCs wydzielają do swojego mikrośrodowiska szereg cytokin i czynników wzrostu, które w sąsiadujących komórkach są odpowiedzialne za regulację wewnętrznych szlaków sygnałowych, inicjują angiogenezę, promują napływ nowych MSCs i/lub komórek progenitorowych z otoczenia, a także mogą oddziaływać immunomodulująco. W rezultacie aplikacja do stawu manifestującego stan zapalny pożywki zawierającej BM-MSCs lub AD-MSCs może powodować hamowanie produkcji czynników prozapalnych i katabolicznych [128].

W raportowanych w dostępnej literaturze z zakresu regeneracyjnej medycyny weterynaryjnej przypadkach uzyskane preparaty zawierające pochodne MSCs – EVs, Exo i MVs – były aplikowane wyłącznie na drodze iniekcji dostawowej u żywych zwierząt. Dla porównania w zaplanowanym doświadczeniu własnym gojenia ubytku powierzchni chrzęstnej u owcy, w eksperymentalnie wytworzony ubytek bloczka kości udowej był implantowany skafold kolagenowy, który następnie został nasączony produktami inżynierii tkankowej – BM-MSCs i MVs. We wszystkich opublikowanych dotychczas pracach posłużono się wyłącznie małym modelem zwierzęcym – mysz, szczur lub królik. Bardzo skromna ilość badań dotyczących wykorzystania MVs i innych biopochodnych MSCs w leczeniu DJD i/lub reparacji ubytku powierzchni chrzęstnej na żywym modelu zwierzęcym znacznie utrudnia porównanie w stosunku do otrzymanych wyników doświadczenia własnego. Niemniej badania Zhang'a i wsp. [153] wykazały, że Exo pozyskane z ludzkich embrionalnych komórek mezenchymalnych (HuES9) w porównaniu do grupy kontrolnej (PBS) są zdolne do reparacji doświadczalnie utworzonego ubytku chrzęstno-kostnego w bloczku kości udowej u szczura. W trakcie innych badań wykorzystano Exo pozyskane z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych błony maziowej (ang. synovial mesenchymal stem cells – SMSCs) do leczenia OA stawu kolanowego u szczurów. Wyniki doświadczenia wyrażały pozytywny potencjał SMSC-140-Exos w zapobieganiu OA u szczurów [154]. Sabry i wsp. [155] wykazali, że jednorazowe podanie MVs do stawu, w którym sztucznie wytworzono powierzchowny ubytek powierzchni chrzęstnej w kłykciu kości udowej u psa obserwuje się funkcjonalną poprawę w trakcie ruchu. W obrazie histologicznym zauważalna była wyraźna reparacja chrząstki i odtworzenie obrazu histomorfologicznego jej struktury w porównaniu do grupy kontrolnej

(PBS). Z kolei Platas i wsp. w badaniach własnych obserwowali przeciwzapalny i protekcyjny wpływ pożywki kondycjonowanej pozyskanej z AD-MSCs ludzkich, która została wykorzystana w leczeniu *in vitro* OA chondrocytów pochodzących ze stawu kolanowego [156,157]. Dotychczas tylko 3 prace badawcze raportują wykorzystanie biopochodnych izolowanych z BM-MSCs, dodatkowo wszystkie zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Qi i wsp. [158] wyizolowali Exo z króliczych BM-MSCs, a następnie badali ich wpływ na pobudzone przez IL-1 β chondrocyty w warunkach *in vitro*. Po zastosowaniu IL-1 β obserwowano zmniejszenie żywotności i apoptozę aktywowanych chondrocytów ze zmianą ich potencjału błony mitochondrialnej. Wszystkie zaburzenia aktywności chondrocytów zostały zahamowane w momencie zastosowania Exo. Przeprowadzone badania wykazały, że Exo izolowane z BM-MSCs hamują apoptozę indukowaną przez mitochondria w odpowiedzi na IL-1 β , co może sugerować nową, innowacyjną, bezkomórkową terapię OA. Z kolei w badaniach własnych Mao i wsp. [159] analizowali wpływ mechanizmu molekularnego egzosomalnego miR-92a-3P i białka WNT5A na proces chondrogenyzy i degeneracji chrząstki stawowej. Ekspresję miR-92a-3p oceniono na modelu normalnych i pierwotnych ludzkich chondrocytów z DJD (ang. primary human chondrocyte – PHC). W efekcie cytowani autorzy wykazali, że egzosomalny miR-92a-3p reguluje homeostazę chrząstki i jej rozwój poprzez bezpośrednie oddziaływanie na białko WNT5A. Sugeruje to, że miR-92a-3p może oddziaływać jako inhibitor białek Wnt i wykazywać pozytywny potencjał na przebieg DJD. W innych badaniach Cosenza i wsp. [160] na modelu OA chondrocytów mysich wykorzystali izolowane z BM-MSCs egzosomy i mikropęcherzyki. Autorzy wykazali, że biopochodne MSCs mogą ponownie indukować ekspresję markerów chondrocytów, jednocześnie hamując ich markery kataboliczne i prozapalne. Stwierdzono również, że w zaplanowanym doświadczeniu użyte biologiczne pochodne wykazywały efekt chondroprotekcyny i hamujący aktywację makrofagów. Podsumowując Exo i MVs wywierały podobny efekt terapeutyczny, jak komórki, z których zostały wyizolowane – BM-MSCs. W raportowanym powyżej badaniu własnym *in vivo* u owiec zauważono bardzo podobny efekt, tj. w ocenie wyników zmodyfikowanej skali ICRS, grupa III badanych zwierząt (MVs) otrzymała zbliżony wynik punktowy (średnia 25,0 punktów) w porównaniu do grupy doświadczalnej IV (BM-MSCs) – średnia w grupie 21,5 punktów. W obu badanych grupach obserwowano wzmożoną angiogenezę okolicy ubytku chrząstki stawowej i sukcesywne jego wypełnienie nowo powstałą tkanką łączną z odtworzeniem ciągłości chrząstki na powierzchni stawowej. Wynik ten sugeruje, że biopochodne komórek macierzystych pochodzenia szpikowego wykorzystane w obu przypadkach mają istotny wpływ na proces gojenia i przyspieszają reparację ubytków

powierzchni chrzęstnej. W przytoczonych powyżej pracach badawczych z zakresu medycyny regeneracyjnej, można zauważyć też pozytywny wpływ biopochodnych izolowanych z BM-MSCs na proces chondrogenyzy i/lub chodroprotekcji.

Z uwagi na zasadę 3R, której wytycznymi jest redukcja liczby zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach, celem zastąpienia w opisywanym powyżej badaniu własnym wybrano gatunek zwierząt pozwalający na wykorzystanie osobników o najniższym stopniu rozwoju ewolucyjnego – owca domowa (łac. *Ovis aries*). Wybór gatunku zwierzęcia podyktowany był wielkością eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego (średnica 6,5 mm i głębokość 10 mm), analogiczną pod względem biomechaniki stawu kolanowego i budowy histologicznej kośćca owcy do kośćca człowieka. Pośród podobieństw wymienić można też zbliżoną grubość warstwy chrzęstnej stawu kolanowego, rozmiar kośćca owcy i dorosłego człowieka, oś długą kończyny, obecność więzadeł krzyżowych i niesymetrycznie ułożonych więzadeł pobocznych, łąkotek stawowych czy budowy dalszej nasady kości udowej [161].

Celem ograniczenia, ustalono minimalną liczebność grup eksperymentalnych, konieczną do przeprowadzenia doświadczenia: grupa I – 2 owce (kontrola negatywna); grupa II – 2 owce (kontrola pozytywna, 0,9% NaCl); grupa III – 6 owiec (MVs); grupa IV – 6 owiec (BM-MSCs). Monitoring dużej ilości parametrów i postępu gojenia się tkanek u pojedynczego zwierzęcia nie był w stanie dostarczyć rzetelnych i wyczerpujących informacji na temat badanych zjawisk w okresie rekonwalescencji pooperacyjnej. Okres obserwacji podyktowany był długą reparacją tkanki chrzęstnej, która została poddana ocenie.

Celem udoskonalenia, ból i stres związany z przeprowadzeniem doświadczenia ograniczony został przez utrzymanie zwierząt w stanie znieczulenia ogólnego podczas wykonywanych procedur operacyjnych. Zwierzęta były stopniowo przyzwyczajane i przygotowywane do kontaktu z człowiekiem, a warunki ich bytowania były starannie dopasowane do potrzeb gatunku. Kontrolne badania kliniczne prowadzone były z dbałością o minimalizację stresu u owiec, a stan ich zdrowia był regularnie kontrolowany przez opiekującego się nimi lekarza weterynarii.

W trakcie oględzin makroskopowych operowanych stawów kolanowych u wszystkich zwierząt – grupa II, III i IV – nie stwierdzono cech późnego odczynu zapalnego, mogącego mieć wpływ na proces gojenia wytworzonych w warunkach eksperymentalnych ubytków chrzęstno-kostnych. Obserwowane makroskopowo różnice dotyczyły różnego stopnia reparacji ubytku powstałego w bloczku kości udowej. W grupie III badanych zwierząt, w porównaniu do

grupy II i IV stwierdzono najlepsze wypełnienie łoża ubytku nowo powstałą tkanką o charakterze łącznotkankowym.

Na podstawie przeprowadzonej wielopunktowej oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego u owiec w grupie II nie stwierdzono nagromadzenia komórek stanu zapalnego, tj. makrofagów, limfocytów i granulocytów, które mogą mieć bezpośredni wpływ na proces gojenia tkanek i angiogenezę w obszarze łoża ubytku. W porównaniu do grupy doświadczalnej III i IV w preparatach mikroskopowych obserwowano znacznie gorszą odbudowę ubytku, jego słabsze wypełnienie za pomocą nowopowstałej tkanki łącznej i brak odtworzenia ciągłości chrząstki stawowej. Wynik zmodyfikowanej skali ICRS – średnia 10,5/34,0 punkty – sugeruje najgorszy efekt terapeutyczny zastosowanego protokołu leczenia ubytku powierzchni chrzęstnej spośród wszystkich grup badanych zwierząt.

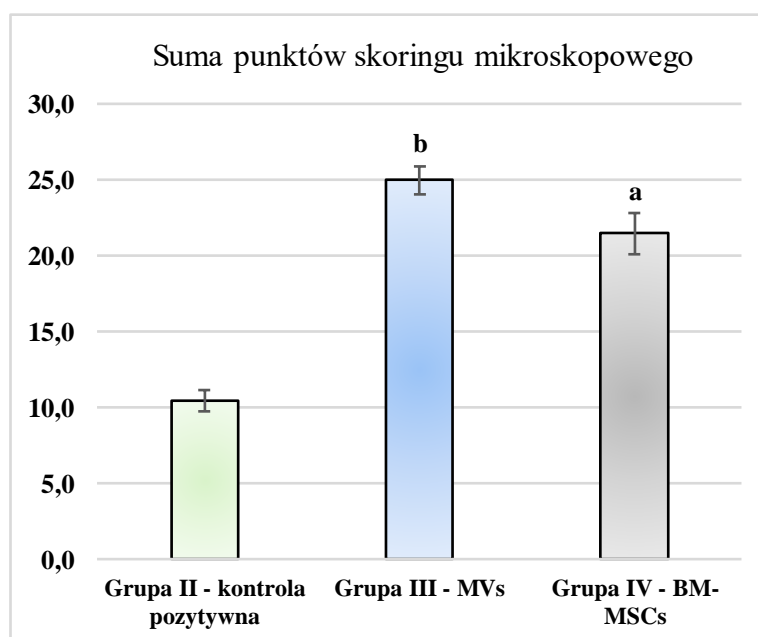
Z kolei wynik oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego u owiec w grupie III wykazał w porównaniu do grupy doświadczalnej II i IV najlepszy efekt terapeutyczny zastosowanego leczenia – średnia 25,0/34,0 uzyskanych punktów. Pomimo niewielkiej obecności komórek stanu zapalnego (makrofagi, limfocyty) we wszystkich preparatach mikroskopowych w grupie III wykazano wzmoczoną angiogenezę okolicznych tkanek i jamy powstałego ubytku. W odniesieniu do grupy II i IV badanych zwierząt na uwagę zasługuje stosunkowo obfita obecność szpiku kostnego i odbudowa tkanek podpierających chrząstkę, co miało bezpośredni wpływ na wypełnienie przestrzeni ubytku nowopowstałą tkanką łączną i całkowite odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej.

Półjakościowa ocena mikroskopowa powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego u owiec w grupie IV wykazała w odniesieniu do grupy II i III badanych zwierząt stosunkowo dobrą odbudowę macierzy ubytku i powierzchniowe odtworzenie ciągłości chrząstki stawowej. Średnia ocena punktowa w tej grupie wynosiła 21,5/34,0 punkty. W preparatach mikroskopowych obserwowano brak obecności komórek stanu zapalnego (makrofagów, limfocytów, granulocytów). Pomimo wzmoczonej waskularyzacji okolicznych tkanek i łoża ubytku nie doszło do prawidłowej odbudowy tkanek podpierających chrząstkę, co skutkowało gorszym wypełnieniem przestrzeni ubytku nowopowstałą tkanką łączną w porównaniu do grupy III (MVs).

W barwieniu błękitem Alcjanu, w obu grupach (III i IV) stwierdzono wzrost intensywności reakcji co świadczy o nasilonej syntezie proteoglikanów wchodzących w skład macierzy chrzęstnej.

Podsumowując ocenę mikroskopową należy podkreślić, że tkanka wypełniająca przestrzenie międzybeleczkowe u owiec jest silnie stłuszczona, co jest cechą gatunkową, dlatego obecności komórek tłuszczowych nie należy tłumaczyć jako zjawiska metaplastji u tego gatunku zwierząt, ale powrotem do stanu wyjściowego (czyli przed wytworzeniem ubytku). Różnice pomiędzy zastosowanymi technikami sprowadzają się do braku lub nieobecności makrofagów oraz zróżnicowanej intensywności nadbudowy nowej tkanki łącznej, w tym chrząstki i kości. Biorąc pod uwagę fakt obecności makrofagów w grupie II, ich obecność w grupie III nie musi być przyczynkiem do indukowania procesów zapalnych, tylko świadectwem toczących się tutaj procesów żernych, będących kontynuacją procesów związanych z wytworzeniem ubytku krytycznego. Ślady te są obecne we wszystkich grupach badanych zwierząt (II, III i IV). Na podstawie obserwacji mikroskopowych i wyników zmodyfikowanej skali ICRS można wysunąć ostrożny wniosek, że zastosowanie MVs (grupa III) pozwala na lepsze wypełnienie otworu krytycznego, szybszym zastąpieniu tkanek pierwotnych tkankami ostatecznymi i powrotem do pełnej funkcjonalności powierzchni chrzęstnej.

Warto podkreślić, że uzyskana suma punktów oceny mikroskopowej (ryc. 36) w grupie eksperymentalnej III i IV istotnie różniła się ($p \leq 0,05$), przy czym istotnie wyższe noty otrzymała grupa III (MVs) ($25,00 \pm 0,89$) w porównaniu z grupą IV (BM-MSCs) ($21,50 \pm 1,38$), co wskazuje na korzystniejszy wpływ mikropecherzyków (MVs) na reparację wytworzonego eksperymentalnie ubytku chrzęstno-kostnego w boczku kości udowej u owcy i jego wypełnienie za pomocą nowopowstałej tkanki łącznej.



Ryc. 36. Porównanie sumy uzyskanych punktów oceny mikroskopowej u owiec z grupy II, III i IV badanych zwierząt

wartości średnie \pm odchylenie standardowe ($n=6$)

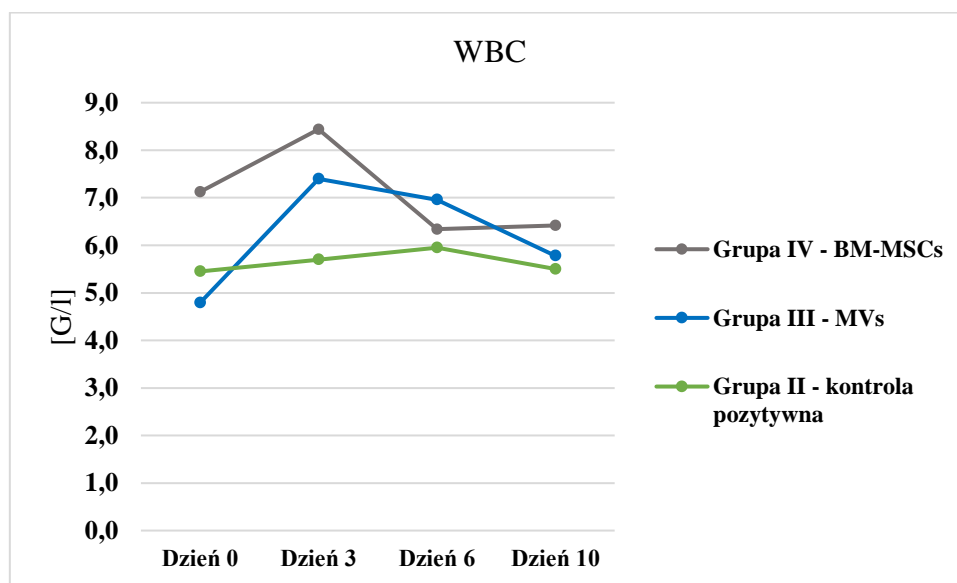
$a-b$ – wartości średnie w słupkach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$), test *t*-Studenta

W ocenie ogólnej reakcji organizmu u operowanych zwierząt zwrócono szczególną uwagę na wybrane i kluczowe dla określenia przebiegu procesu zapalnego, parametry morfologiczne, tj. liczba białych krwinek (ryc. 37) i płytek krwi (ryc. 38) oraz biochemiczne krwi, tj. stężenie białka całkowitego (ryc. 39) i albumin (ryc. 40) w osoczu krwi owiec z grupy II-kontrolnej, III-MVs i IV-MSCs.

Porównując liczbę białych krwinek (ryc. 37) można było stwierdzić, że w 3 dobie od zakończenia procedury chirurgicznej nastąpił znaczny wzrost WBC, szczególnie wyraźny w grupie III-MVs i IV-MSCs, co mogło świadczyć o trwającym stanie zapalnym będącym odpowiedzią na eksperymentalne wytworzenie ubytku w blozku kości udowej stawu kolanowego. W 6 dobie od zakończenia zabiegu operacyjnego, w grupie II-kontrolnej nadal obserwowano nieznaczny wzrost liczby białych krwinek, natomiast w pozostałych grupach, wyraźny ich spadek, przy czym w grupie IV-MSCs nastąpiło gwałtowne obniżenie ilości WBC (do wartości niższych niż w dniu przeprowadzenia procedury chirurgicznej), natomiast w grupie III-MVs spadek ten był o wiele łagodniejszy. Najmniejsze wahania w ilości WBC notowano w grupie II-kontrolnej, w której również począwszy od 6 doby stwierdzono tendencję spadkową. Efekt obniżenia wartości WBC był najprawdopodobniej spowodowany poprzez

stosowanie w okresie pooperacyjnym leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych (meloksikam, metamizol).

Ostatecznie, liczba białych krwinek w 10 dniu od zakończenia procedury chirurgicznej była zbliżona i wynosiła średnio $5,90 \pm 0,47$ G/l u wszystkich zwierząt doświadczalnych, pozostając przy tym w granicach wartości referencyjnych dla tego parametru morfologicznego krwi.

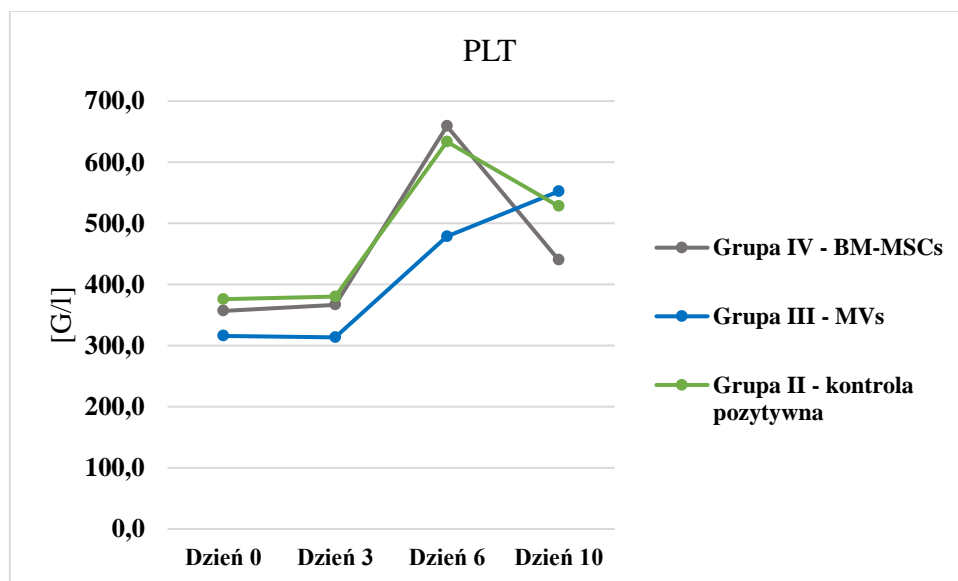


Ryc. 37. Porównanie liczby leukocytów (WBC) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie

W przypadku PLT (ryc. 38) nie stwierdzono istotnych ($p \leq 0,05$) różnic pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt doświadczalnych w dniu 0, tj. w dniu przeprowadzenia operacji, ani też w 3 dobie po zakończeniu procedury chirurgicznej. Ilość płytek krwi w dniu operacji mieściła się w przedziale od $316,00 \pm 18,03$ G/l (w grupie III-MVs) do $376,00 \pm 15,56$ [G/l] (w grupie II-kontrolnej), natomiast w 3 dobie po zakończeniu procedury chirurgicznej, w przedziale od $313,50 \pm 3,64$ G/l w grupie III-MVS do $380,00 \pm 7,07$ G/l w grupie II-kontrolnej. Ilości PLT mieściły się również w granicach wartości referencyjnych (170-530 G/l) dla tego parametru morfologicznego krwi. W porównaniu do wyników badań morfologicznych krwi uzyskanych w dniu przeprowadzenia procedury chirurgicznej oraz w 3 dobie po jej zakończeniu, zawartość płytek krwi w 6 dobie wzrosła o ok. 52% w grupie III-MVs, 68% w grupie II-kontrolnej i aż o 82% w grupie IV-MSCs, co najprawdopodobniej wynikało z reakcji obronnej organizmu na przeprowadzony zabieg operacyjny. Warto jednak podkreślić, że w 10 dobie po operacji, w przypadku grupy II-kontrolnej oraz grupy IV-MSCs nastąpiło

wyraźne obniżenie ilości PLT (odpowiednio o ok. 16,6% i aż o 33,2% %) w porównaniu z 6 dniem po zabiegu operacyjnym, w przeciwieństwie do grupy III-MVs, u której wydawała się utrzymywać nadal tendencja wzrostowa w odniesieniu do tych elementów morfotycznych krwi.

Ostatecznie, ilość płytek krwi w 10 dniu od zakończenia procedury chirurgicznej mieściła się w zakresach wartości referencyjnych u zwierząt w grupie II-kontrolnej oraz IV-MSCs, natomiast nieznacznie przekraczała górny zakres wartości referencyjnych u zwierząt w grupie III-MVs, osiągając u nich wartości $552,40 \pm 126,39$ G/l.

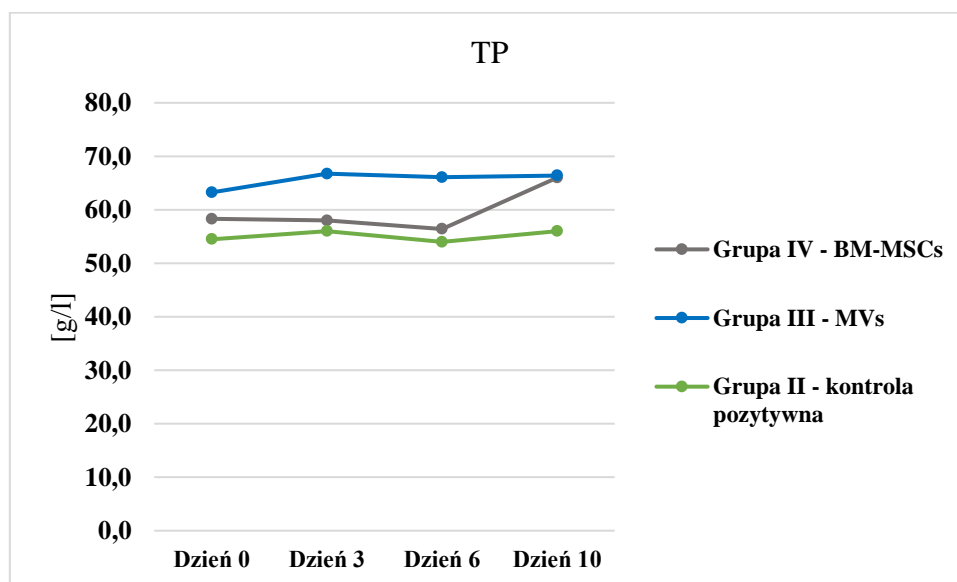


Ryc. 38. Porównanie liczby płytek krwi (PLT) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie

Relatywnie najmniejszym wahaniom w czasie podlegało stężenie białka ogólnego w surowicy krwi owiec (ryc. 39). Zarówno w grupie II-kontrolnej, jak też w grupie III-MVs stężenie TP nie ulegało w zasadzie żadnym zmianom i średnio wynosiło w tych grupach odpowiednio $55,13 \pm 1,03$ g/l i $65,62 \pm 1,60$ g/l (0-10 doba), natomiast w przypadku grupy IV-MSCs, stężenie TP było na bardzo zbliżonym poziomie (średnio $57,57 \pm 1,02$ g/l) w okresie od dnia 0 do 10 dnia po przeprowadzeniu operacji, w którym to stwierdzono gwałtowny wzrost jego stężenia (do wartości $66,00 \pm 3,00$ g/l.).

W tym miejscu należałoby nadmienić, że w dniu 0, tj. w dniu przeprowadzania operacji, w przypadku wszystkich zwierząt stwierdzono nieznaczne obniżenie stężenia białka całkowitego w surowicy krwi poniżej dolnej granicy wartości referencyjnych dla tego

parametru (65-79 g/l). W grupie II-kontrolnej poziom białka poniżej normy utrzymywał się przez cały okres prowadzonych badań biochemicznych krwi. W przypadku grupy IV-MSCs osiągnął on dolną granicę normy dopiero w 10 dniu od zakończenia procedury chirurgicznej. Prawidłowe stężenie białka całkowitego wykazywała w zasadzie jedynie grupa III-MVs zwierząt doświadczalnych, począwszy od 3 na 10 dobie po operacji kończąc, w której stężenie TP wynosiło w tym okresie średnio $66,41 \pm 0,34$ g/l.



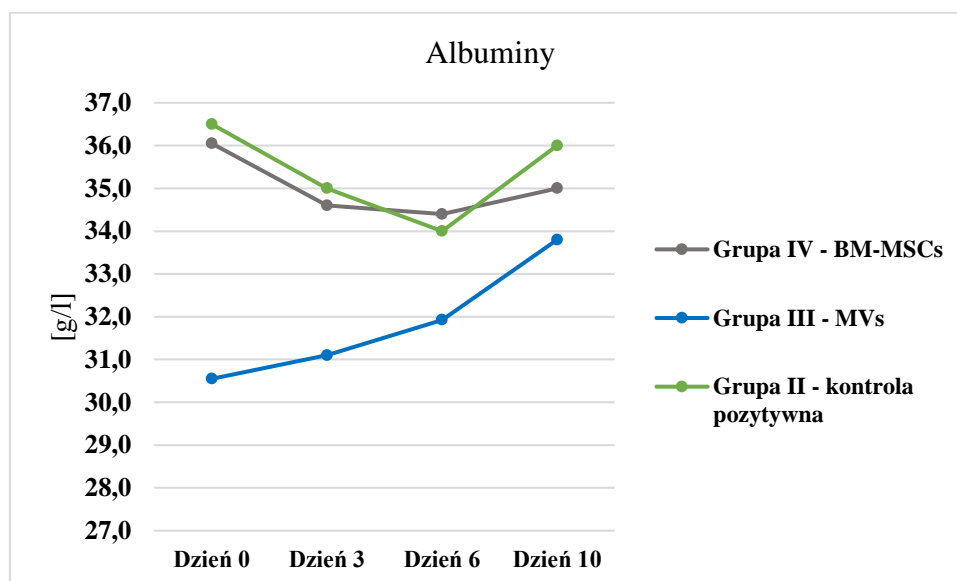
Ryc. 39. Porównanie stężenia białka całkowitego (TP) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie

W odróżnieniu od stężenia TP, stężenie głównej frakcji białek osoczowych (albumin) w surowicy krwi ulegało dużym wahaniom w czasie (ryc. 40).

W grupie II-kontrolnej oraz w IV-MSCs notowano obniżenie wartości dla tego parametru, zarówno po 3, jak również po 6 dobach od zakończenia procedury chirurgicznej. Dopiero w 10 dobie stwierdzono wzrost stężenia albumin w tych grupach, niemniej jednak nie osiągnęły one jeszcze poziomu uzyskanego w badaniu przeprowadzonym w dniu zabiegów chirurgicznych. Zupełnie inaczej przedstawiały się zmiany stężenia albumin w surowicy krwi owiec z grupy III-MVs. U zwierząt tych stwierdzono istotnie ($p \leq 0,05$) najniższy poziom albumin w dniu przeprowadzonej operacji, a następnie systematyczny wzrost zawartości tych białek w surowicy w kolejnych dniach.

Pomimo zmian w stężeniu albumin we krwi owiec w czasie, stężenia tych białek w surowicy krwi zwierząt z grupy II-kontrolnej oraz z grupy IV-MSCs oscylował w granicach wartości referencyjnych dla tego parametru krwi, w odróżnieniu od grupy III-MVs, w której

dopiero w 10 dniu od zakończonej procedury chirurgicznej poziom albumin osiągnął dolną granicę wartości referencyjnych.



Ryc. 40. Porównanie stężenia albumin u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie

Medycyna regeneracyjna stanowi alternatywną możliwość dla dotychczas wykorzystywanych metod leczenia, nie tylko schorzeń w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego, ale także chorób narządowych czy urazów skóry. Mimo licznych odkryć i pozytywnych efektów leczniczych w dalszym ciągu potrzebne są dalsze badania, które umożliwią standaryzację protokołów i możliwość zastosowania MSCs i/lub ich biopochodnych – w tym MVs – w terapii danej jednostki chorobowej. Na przestrzeni ostatnich lat terapia komórkowa powoli staje się złotym standardem w leczeniu schorzeń ortopedycznych. Dowodem na to są liczne prace badawcze, ale również pacjenci kliniczni, u których z zadowalającym efektem przeprowadzono terapię leczniczą. Coraz większa dostępność wyników w bazie danych medycyny weterynaryjnej umożliwia też translację protokołów terapeutycznych do medycyny człowieka. Nowością, która prawdopodobnie zrewolucjonizuje medycynę regeneracyjną są produkty inżynierii tkankowej w postaci biopochodnych izolowanych z MSCs – MVs. Produkty te na podstawie badań własnych można uznać za bezpieczne w leczeniu doświadczalnego ubytku chrząstko-kostnego. Jednocześnie konieczne są dalsze badania doświadczalne i kliniczne w celu dokładnej oceny właściwości MVs, możliwości ich zastosowania i optymalizacji terapii z ich udziałem.

8. Wnioski

1. Zastosowanie autologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) i mikropęcherzyków (MVs) w leczeniu doświadczalnie wykonanego krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego zwiększa odbudowę tkanki łącznej wypełniającej ubytek. Spośród nich najbardziej korzystny wpływ wykazują MVs.
2. Doświadczalnie wykonanie krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego na powierzchni błoczka kości udowej nie powoduje rozwoju zmian zapalno-zwyrodnieniowych dostrzegalnych w badaniu tomografem komputerowym i makroskopowym.
3. Zastosowanie kolagenowego skafoldu nasączonego autologicznymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) i mikropęcherzykami (MVs) w leczeniu doświadczalnie wykonanego krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego nie skutkuje zwiększoną odpowiedzią zapalną organizmu odzwierciedloną w parametrach morfologicznych krwi.
4. Zastosowanie dostawowe mikropęcherzyków (MVs) jest bezpieczne i nie powoduje negatywnej reakcji miejscowej i ogólnej organizmu biorecy.

9. Streszczenie w języku polskim

Słowa klucz: mezenchymalne komórki macierzyste, mikropęcherzyki, inżynieria tkankowa, medycyna regeneracyjna, reparacja ubytku chrzęstno-kostnego, choroba zwyrodnieniowa stawów, osteoartroza

W doświadczeniu własnym oceniono wpływ mikropęcherzyków pochodzących z autologicznych BM-MSCs na reakcję ogólną organizmu i gojenie się eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego w bloczku kości udowej u owiec. W badaniu podzielonym na 2 etapy – 1) prefabrykacja BM-MSCs i MVs, 2) wszczepienie implantów – wykorzystano 16 zwierząt, gatunku owca domowa (łac. *Ovis aries*), samic, rasy Merynos polski, w wieku od 2 do 4 lat, o masie ciała od 43 do 66 kg. W celu badawczym zwierzęta podzielono na 4 grupy: grupa I (2 owce, kontrola negatywna), grupa II (2 owce, kontrola pozytywna 0,9% NaCl), grupa III (6 owiec, MVs), grupa IV (6 owiec, BM-MSCs). W pierwszym etapie doświadczenia w celu izolacji i ekspansji autologicznych BM-MSCs i MVs śródoperacyjnie pobrano szpik kostny z bliższej nasady kości ramiennej. Następnie w drugim etapie badania u każdej owcy z grupy II, III i IV w trakcie artrotomii prawego stawu kolanowego wykonano ubytek chrzęstno-kostny o średnicy 6,5 mm i głębokości 10 mm w bloczku kości udowej. Ubytki wypełniono skafoldem kolagenowym, a następnie nasączono go odpowiednio 0,9% NaCl, MVs lub BM-MSCs.

Obserwacja u operowanych zwierząt trwała 180 dni. Bezpośrednio po zabiegach operacyjnych, a także w 90 i 180 dniu obserwacji wykonano kontrolne badanie tomografii komputerowej stawów kolanowych. Pośmiertnie u zwierząt przeprowadzono analizę makroskopową i mikroskopową okolicy ubytku chrzęstno-kostnego zlokalizowanego na powierzchni bloczka kości udowej. Do oceny ogólnej organizmu posłużono się badaniami morfologicznymi i biochemicznymi krwi wykonanymi bezpośrednio przed zabiegiem, a także w 3, 6 i 10 dobie po zabiegu operacyjnym.

W badaniach przesiewowych krwi obserwowano klasyczne dla stanu zapalnego związane z zabiegiem chirurgicznym podwyższenie liczby WBC i PLT we krwi obwodowej. Na podstawie wyników oceny mikroskopowej można stwierdzić pozytywny wpływ MVs i BM-MSCs na gojenie się i wypełnienie łoża ubytku nowo powstałą tkanką łączną w porównaniu do grupy II – kontrola pozytywna. Analiza statystyczna wyników oceny mikroskopowej wykazała istotne ($p \leq 0,05$) różnice między grupą III (MVs) i grupą IV (BM-MSCs), pod względem czterech ocenianych cech na korzyść grupy doświadczalnej III.

10. Abstract

Key words: mesenchymal stem cells, microvesicles, tissue engineering, regenerative medicine, regeneration of osteochondral defect, degenerative joint disease, osteoarthritis

In planned experiment, the effect of microvesicles from autologous BM-MSCs on the overall reaction of the body and the healing of an experimentally created an osteochondral defect in the trochlear groove in sheep was conducted and assessed. The study was divided into two stages: 1) prefabrication of BM-MSCs and MVs, 2) implantation - 16 animals of the domestic sheep (*Ovis aries*), females of the Polish Merino breed, aged 2 to 4 years, body weight from 43 to 66 kg. For the research purpose, the animals were divided into four groups: group I (2 sheep – negative control), group II (2 sheep – positive control, 0.9% NaCl), group III (6 sheep – MVs), group IV (6 sheep – BM-MSCs). In the first stage of the experiment, to isolate and expand autologous BM-MSCs and MVs, bone marrow was collected intraoperatively from the proximal epiphysis of the humerus. Then, in the second stage of the study, each sheep from groups II, III and IV had an osteochondral defect 6.5 mm wide and 10 mm deep in the trochlear groove during arthrotomy of the right knee joint. The cavities were filled with a collagen scaffold and then impregnated with 0.9% NaCl, MVs or BM-MSCs, respectively.

Observation in operated animals lasted 180 days. Immediately after the surgical procedures, and on the 90th and 180th day of observation, a control computed tomography examination of the knee joints was performed. Post-mortem, macroscopic, and microscopic analysis of the area of the osteochondral defect located on the surface of the femoral trochlea was performed in the animals. The general assessment of the body was based on morphological and biochemical blood tests performed immediately before the surgery, as well as on the 3rd, 6th, and 10th day after the surgery.

In blood screening tests, elevations of peripheral WBC and PLT counts, typical of surgical-related inflammation, were observed. Based on the results of microscopic scoring, it can be stated that MVs and BM-MSCs have a positive effect on regeneration and filling the defect with newly formed connective tissue compared to group II – positive control. Statistical analysis of the results of the microscopy scoring showed significant ($p \leq 0.05$) differences between group III (MVs) and group IV (BM-MSCs), in terms of four assessed features in favor of experimental group III.

11. Piśmiennictwo

1. Zhang, R.; Ma, J.; Han, J.; Zhang, W.; Ma, J. Mesenchymal Stem Cell Related Therapies for Cartilage Lesions and Osteoarthritis. *American Journal of Translational Research* **2019**, *11*, 6275.
2. Gao, S.G.; Li, K.H.; Zeng, K.B.; Tu, M.; Xu, M.; Lei, G.H. Elevated Osteopontin Level of Synovial Fluid and Articular Cartilage Is Associated with Disease Severity in Knee Osteoarthritis Patients. *Osteoarthritis and Cartilage* **2010**, *18*, 82–87, doi:10.1016/j.joca.2009.07.009.
3. Wittenauer, R.; Smith, L.; Aden, K. Priority Medicines for Europe and the World “A Public Health Approach to Innovation.” *World Health Organization Report* **2013**, 31.
4. Abramson, S.B.; Attur, M. Developments in the Scientific Understanding of Osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **2009**, *11*, 227, doi:10.1186/ar2655.
5. Kolasinski, S.L.; Neogi, T.; Hochberg, M.C.; Oatis, C.; Guyatt, G.; Block, J.; Callahan, L.; Copenhaver, C.; Dodge, C.; Felson, D.; et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis & Rheumatology* **2020**, *72*, 220–233, doi:10.1002/art.41142.
6. Rychel, J.K. Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine* **2010**, *25*, 20–25, doi:10.1053/j.tcam.2009.10.005.
7. Mobasher, A.; Henrotin, Y. Identification, Validation and Qualification of Biomarkers for Osteoarthritis in Humans and Companion Animals: Mission for the next Decade. *Veterinary Journal* **2010**, *185*, 95–97, doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.026.
8. Glyn-Jones, S.; Palmer, A.J.R.; Agricola, R.; Price, A.J.; Vincent, T.L.; Weinans, H.; Carr, A.J. Osteoarthritis. *The Lancet* **2015**, *386*, 376–387, doi:10.1016/S0140-6736(14)60802-3.
9. Fossum T.W. *Chirurgia Małych Zwierząt*; wyd. II polskie.; **2014**; Vol. 3; ISBN 978-83-7609-972-9.
10. Brown, D.C. What Can We Learn from Osteoarthritis Pain in Companion Animals. *Clinical and Experimental Rheumatology* **2017**, *35*, 53–58.
11. Arden, N.K.; Leyland, K. Osteoarthritis Year 2013 in Review: Clinical. *Osteoarthritis and Cartilage* **2013**, *21*, 1409–1413.
12. Ferreira, E.; Porter, R.M. Harnessing Extracellular Vesicles to Direct Endochondral Repair of Large Bone Defects. *Bone & Joint Research* **2018**, *7*, 263–273, doi:10.1302/2046-3758.74.BJR-2018-0006.
13. Prządka, P.; Buczak, K.; Frejlich, E.; Gąsior, L.; Suliga, K.; Kiełbowicz, Z. The Role of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Veterinary Medicine and Their Use in Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1141, doi:10.3390/biom11081141.
14. Voga, M.; Adamic, N.; Vengust, M.; Majdic, G. Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. *Frontiers in Veterinary Science* **2020**, *7*, 278.
15. Mocchi, M.; Dotti, S.; Del Bue, M.; Villa, R.; Bari, E.; Perteghella, S.; Torre, M.L.; Grolli, S. Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? *Cells* **2020**, *9*, 1453, doi:10.3390/cells9061453.
16. Ude, C.C.; Shamsul, B.S.; Ng, M.H.; Chen, H.C.; Ohnmar, H.; Amaramalar, S.N.; Rizal, A.R.; Johan, A.; Norhamdan, M.Y.; Azizi, M.; et al. Long-Term Evaluation of Osteoarthritis Sheep Knee, Treated with TGF-B3 and BMP-6 Induced Multipotent Stem Cells. *Experimental Gerontology* **2018**, *104*, 43–51, doi:10.1016/j.exger.2018.01.020.
17. Lv, X.; He, J.; Zhang, X.; Luo, X.; He, N.; Sun, Z.; Xia, H.; Liu, V.; Zhang, L.; Lin, X.; et al. Comparative Efficacy of Autologous Stromal Vascular Fraction and Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined With Hyaluronic Acid for the Treatment of Sheep Osteoarthritis. *Cell Transplantation* **2018**, *27*, 1111–1125, doi:10.1177/0963689718773333.

18. Music, E.; Futrega, K.; Doran, M.R. Sheep as a Model for Evaluating Mesenchymal Stem/Stromal Cell (MSC)-Based Chondral Defect Repair. *Osteoarthritis Cartilage* **2018**, *26*, 730–740, doi:10.1016/j.joca.2018.03.006.
19. Mescher, A.L. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*; 15e ed.; McGraw-Hill Education, **2018**; ISBN 978-1-260-02617-7.
20. Zarzycki, J.; Kuryszko, J. *Histologia Zwierząt*; PWRiL, **2000**;
21. Ciszek, B. Morfologia i funkcja chrząstki stawowej. *Acta Clinica* **2001**, 10–15.
22. Bora Jr, F.W.; Miller, G. Joint Physiology, Cartilage Metabolism, and the Etiology of Osteoarthritis. *Hand Clinics* **1987**, *3*, 325–336.
23. Malejczyk, J. Budowa i immunologia tkanki chrzęstnej. *Acta Clinica* **2001**, *1*, 15–22.
24. Johnston, S.A. Osteoarthritis. Joint Anatomy, Physiology, and Pathobiology. *Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice* **1997**, *27*, 699–723, doi:10.1016/s0195-5616(97)50076-3.
25. Sharma, A.; Wood, L.D.; Richardson, J.B.; Roberts, S.; Kuiper, N.J. Glycosaminoglycan Profiles of Repair Tissue Formed Following Autologous Chondrocyte Implantation Differ from Control Cartilage. *Arthritis Research & Therapy* **2007**, *9*, R79, doi:10.1186/ar2278.
26. Şenol, M.S.; Özer, H. Chapter 7 - Architecture of Cartilage Tissue and Its Adaptation to Pathological Conditions. In *Comparative Kinesiology of the Human Body*; Angin, S., Şimşek, I.E., Eds.; Academic Press, **2020**; pp. 91–100 ISBN 978-0-12-812162-7.
27. Boyanich, R. I.; Wu, J. p.; Kirk, T. b. The Fibrillar Network of the Lamina Splendens of Articular Cartilage. *Orthopaedic Proceedings* **2018**, *100-B*, 22–22, doi:10.1302/1358-992X.2018.15.022.
28. Zhang, L.; Hu, J.; Athanasiou, K.A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **2009**, *37*, 1–57.
29. Buckwalter, J.A. Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* **1998**, *28*, 192–202.
30. Hunziker, E.B. Articular Cartilage Repair: Are the Intrinsic Biological Constraints Undermining This Process Insuperable? *Osteoarthritis and Cartilage* **1999**, *7*, 15–28.
31. Laurencin, C.T.; Ambrosio, A.; Borden, M.; Cooper Jr, J. Tissue Engineering: Orthopedic Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **1999**, *1*, 19–46.
32. Shapiro, F.; Koide, S.; Glimcher, M.J. Cell Origin and Differentiation in the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *Journal of Bone & Joint Surgery* **1993**, *75*, 532–553, doi:10.2106/00004623-199304000-00009.
33. Buckwalter, J. Articular Cartilage; Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair. *Articular Cartilage and Knee Joint Function; Basic Science and Arthroscopy* **1990**, 19–56.
34. Caplan, A.I.; Elyaderani, M.; Mochizuki, Y.; Wakitani, S.; Goldberg, V.M. Principles of Cartilage Repair and Regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1997**, 254–269.
35. Deweese, M.D.; Brown, D.C.; Hayashi, K.; Blake, C.; Anglin, E.; Morris, K.; Agnello, K.A. Observer Variability of Arthroscopic Cartilage Grading Using the Modified Outerbridge Classification System in the Dog. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* **2019**, *32*, 126–132.
36. Outerbridge, R.E. The Etiology of Chondromalacia Patellae. *Journal of Bone & Joint Surgery* **1961**, *43-B*, 752–757, doi:10.1302/0301-620X.43B4.752.
37. Kemp, J.L.; Makdissi, M.; Schache, A.G.; Pritchard, M.G.; Pollard, T.C.; Crossley, K.M. Hip Chondropathy at Arthroscopy: Prevalence and Relationship to Labral Pathology, Femoroacetabular Impingement and Patient-Reported Outcomes. *British Journal of Sports Medicine* **2014**, *48*, 1102–1107.
38. Bateman, D.K.; Black, E.M.; Lazarus, M.D.; Abboud, J.A. Outcomes Following Arthroscopic Repair of Posterior Labral Tears in Patients Older than 35 Years. *Orthopedics* **2017**, *40*, e305–e311.

39. Curl, W.W.; Krome, J.; Gordon, E.S.; Rushing, J.; Smith, B.P.; Poehling, G.G. Cartilage Injuries: A Review of 31,516 Knee Arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* **1997**, *13*, 456–460.
40. Farrell, M.; Heller, J.; Solano, M.; Fitzpatrick, N.; Sparrow, T.; Kowaleski, M. Does Radiographic Arthrosis Correlate with Cartilage Pathology in Labrador Retrievers Affected by Medial Coronoid Process Disease? *Veterinary Surgery* **2014**, *43*, 155–165.
41. Johnson, J.A.; Austin, C.; Breur, G.J. Incidence of Canine Appendicular Musculoskeletal Disorders in 16 Veterinary Teaching Hospitals from 1980 through 1989. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* **1994**, *7*, 56–69.
42. Bohndorf, K. Imaging of Acute Injuries of the Articular Surfaces (Chondral, Osteochondral and Subchondral Fractures). *Skeletal radiology* **1999**, *28*, 545–560.
43. Blackburn Jr, W.D.; Chivers, S.; Bernreuter, W. Cartilage Imaging in Osteoarthritis.; Elsevier, **1996**; Vol. 25, pp. 273–281.
44. Biezynski, J.; Skrzypczak, P.; Piatek, A.; Kosciolk, N.; Drozdzyńska, M. Assessments of Treatment of Osteochondrosis Dissecans (OCD) of Shoulder Joint in Dogs-the Result of Two Years of Experience. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **2012**, *15*.
45. Gielen, I.; Van Ryssen, B.; van Bree, H. Computerized Tomography Compared with Radiography in the Diagnosis of Lateral Trochlear Ridge Talar Osteochondritis Dissecans in Dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* **2005**, *18*, 77–81.
46. Kok, A.; Terra, M.; Muller, S.; Askeland, C.; Van Dijk, C.; Kerkhoffs, G.; Tuijthof, G. Feasibility of Ultrasound Imaging of Osteochondral Defects in the Ankle: A Clinical Pilot Study. *Ultrasound in Medicine & Biology* **2014**, *40*, 2530–2536.
47. Grassi, W.; Salaffi, F.; Filippucci, E. Ultrasound in Rheumatology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **2005**, *19*, 467–485.
48. Lee, K.I. Correlations of Linear and Nonlinear Ultrasound Parameters with Density and Microarchitectural Parameters in Trabecular Bone. *The Journal of the Acoustical Society of America* **2013**, *134*, EL381–EL386.
49. O’Loughlin, P.F.; Heyworth, B.E.; Kennedy, J.G. Current Concepts in the Diagnosis and Treatment of Osteochondral Lesions of the Ankle. *The American Journal of Sports Medicine* **2010**, *38*, 392–404.
50. Elser, F.; Dewing, C.B.; Millett, P.J. Chondral and Osteochondral Lesions of the Humerus: Diagnosis and Management. *Operative Techniques in Sports Medicine* **2008**, *16*, 178–186.
51. Schmid, M.; Pfirrmann, C.; Hodler, J.; Vienne, P.; Zanetti, M. Cartilage Lesions in the Ankle Joint: Comparison of MR Arthrography and CT Arthrography. *Skeletal Radiology* **2003**, *32*, 259–265.
52. van Bergen, C.J.; Gerards, R.M.; Opdam, K.T.; Terra, M.P.; Kerkhoffs, G.M. Diagnosing, Planning and Evaluating Osteochondral Ankle Defects with Imaging Modalities. *World Journal of Orthopedics* **2015**, *6*, 944.
53. Crema, M.D.; Roemer, F.W.; Marra, M.D.; Burstein, D.; Gold, G.E.; Eckstein, F.; Baum, T.; Mosher, T.J.; Carrino, J.A.; Guermazi, A. Articular Cartilage in the Knee: Current MR Imaging Techniques and Applications in Clinical Practice and Research. *Radiographics* **2011**, *31*, 37–61.
54. Wall, C.R.; Cook, C.R.; Cook, J.L. Diagnostic Sensitivity of Radiography, Ultrasonography, and Magnetic Resonance Imaging for Detecting Shoulder Osteochondrosis/Osteochondritis Dissecans in Dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound* **2015**, *56*, 3–11.
55. Beale, B.S.; Hulse, D.A. Arthroscopy versus Arthrotomy for Surgical Treatment. *Advances in the Canine Cranial Cruciate Ligament* **2010**, 145–158.
56. Wang, Y.; Yuan, M.; Guo, Q.; Lu, S.; Peng, J. Mesenchymal Stem Cells for Treating Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. *Cell Transplantation* **2015**, *24*, 1661–1678.

57. Pye, C.; Bruniges, N.; Peffers, M.; Comerford, E. Advances in the Pharmaceutical Treatment Options for Canine Osteoarthritis. *Journal of Small Animal Practice* **2022**.
58. Corral, M.J.; Moyaert, H.; Fernandes, T.; Escalada, M.; Tena, J.K.S.; Walters, R.R.; Stegemann, M.R. A Prospective, Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Multisite Clinical Study of Bedinvetmab, a Canine Monoclonal Antibody Targeting Nerve Growth Factor, in Dogs with Osteoarthritis. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* **2021**, *48*, 943–955.
59. Swieszkowski, W.; Tuan, B.H.S.; Kurzydowski, K.J.; Hutmacher, D.W. Repair and Regeneration of Osteochondral Defects in the Articular Joints. *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 489–495.
60. Zhou, L.; Gjvm, V.O.; Malda, J.; Stoddart, M.J.; Lai, Y.; Richards, R.G.; Ki-wai Ho, K.; Qin, L. Innovative Tissue-Engineered Strategies for Osteochondral Defect Repair and Regeneration: Current Progress and Challenges. *Advanced Healthcare Materials* **2020**, *9*, 2001008.
61. Janicek, J.C.; Cook, J.L.; Wilson, D.A.; Ketzner, K.M. Multiple Osteochondral Autografts for Treatment of a Medial Trochlear Ridge Subchondral Cystic Lesion in the Equine Tarsus. *Veterinary Surgery* **2010**, *39*, 95–100.
62. Bodo, G.; Hangody, L.; Modis, L.; Hurtig, M. Autologous Osteochondral Grafting (Mosaic Arthroplasty) for Treatment of Subchondral Cystic Lesions in the Equine Stifle and Fetlock Joints. *Veterinary Surgery* **2004**, *33*, 588–596.
63. Cook, J.L.; Hudson, C.C.; Kuroki, K. Autogenous Osteochondral Grafting for Treatment of Stifle Osteochondrosis in Dogs. *Veterinary Surgery* **2008**, *37*, 311–321.
64. Fitzpatrick, N.; Yeadon, R.; Smith, T.J. Early Clinical Experience with Osteochondral Autograft Transfer for Treatment of Osteochondritis Dissecans of the Medial Humeral Condyle in Dogs. *Veterinary Surgery* **2009**, *38*, 246–260.
65. Ronga, M.; Grassi, F.; Montoli, C.; Bulgheroni, P.; Genovese, E.; Cherubino, P. Treatment of Deep Cartilage Defects of the Ankle with Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI). *Foot and Ankle Surgery* **2005**, *11*, 29–33.
66. Buckwalter, J.; Marsh, J.; Brown, T.; Amendola, A.; Martin, J. Articular Cartilage Injury. In *Principles of Tissue Engineering*; Elsevier, **2014**; pp. 1253–1266.
67. Frassica, M.T.; Grunlan, M.A. Perspectives on Synthetic Materials to Guide Tissue Regeneration for Osteochondral Defect Repair. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2020**, *6*, 4324–4336.
68. Peck, J.N.; Marcellin-Little, D.J. *Advances in Small Animal Total Joint Replacement*; John Wiley & Sons, **2012**; Vol. 4; ISBN 0-470-95961-4.
69. Klimczak, A.; Kozłowska, U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells International* **2016**, *2016*.
70. Emadedin, M.; Aghdami, N.; Taghiyar, L.; Fazeli, R.; Moghadasali, R.; Jahangir, S.; Farjad, R.; Eslaminejad, M.B. Intra-Articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Six Patients with Knee Osteoarthritis. *Archives of Iranian Medicine* **2012**, *15*, 0–0.
71. 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 Biology International* **2012**, *36*, 189–194.
72. Kode, J.A.; Mukherjee, S.; Joglekar, M.V.; Hardikar, A.A. Mesenchymal Stem Cells: Immunobiology and Role in Immunomodulation and Tissue Regeneration. *Cytotherapy* **2009**, *11*, 377–391.
73. Barussi, F.C.; Bastos, F.Z.; Leite, L.M.; Fragoso, F.Y.; Senegaglia, A.C.; Brofman, P.R.; Nishiyama, A.; Pimpão, C.T.; Michelotto Jr, P.V. Intratracheal Therapy with Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Reduces Airway Inflammation in Horses with Recurrent Airway Obstruction. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **2016**, *232*, 35–42.

74. Quimby, J.M.; Webb, T.L.; Gibbons, D.S.; Dow, S.W. Evaluation of Intrarenal Mesenchymal Stem Cell Injection for Treatment of Chronic Kidney Disease in Cats: A Pilot Study. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **2011**, *13*, 418–426.
75. Quimby, J.M.; Webb, T.L.; Habenicht, L.M.; Dow, S.W. Safety and Efficacy of Intravenous Infusion of Allogeneic Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Chronic Kidney Disease in Cats: Results of Three Sequential Pilot Studies. *Stem Cell Research & Therapy* **2013**, *4*, 1–12.
76. Kim, S.-J.; Park, K.C.; Lee, J.U.; Kim, K.-J.; Kim, D.-G. Therapeutic Potential of Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Liver Failure According to the Transplantation Routes. *Journal of the Korean Surgical Society* **2011**, *81*, 176–186.
77. Pascual-Miguelañez, I.; Salinas-Gomez, J.; Fernandez-Luengas, D.; Villar-Zarra, K.; Clemente, L.V.; Garcia-Arranz, M.; Olmo, D.G. Systemic Treatment of Acute Liver Failure with Adipose Derived Stem Cells. *Journal of Investigative Surgery* **2015**, *28*, 120–126.
78. Jung, D.-I.; Ha, J.; Kang, B.-T.; Kim, J.-W.; Quan, F.-S.; Lee, J.-H.; Woo, E.-J.; Park, H.-M. A Comparison of Autologous and Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Canine Spinal Cord Injury. *Journal of the Neurological Sciences* **2009**, *285*, 67–77.
79. Ryu, H.-H.; Kang, B.-J.; Park, S.-S.; Kim, Y.; Sung, G.-J.; Woo, H.-M.; Kim, W.H.; Kweon, O.-K. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton’s Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **2012**, 12–0065.
80. Strasser, H.; Berjukow, S.; Marksteiner, R.; Margreiter, E.; Hering, S.; Bartsch, G.; Hering, S. Stem Cell Therapy for Urinary Stress Incontinence. *The Journal of Urology* **2006**, *175*, 1801–1801.
81. El-Menoufy, H.; Aly, L.; Aziz, M.; Atta, H.; Roshdy, N.; Rashed, L.; Sabry, D. The Role of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Treating Formocresol Induced Oral Ulcers in Dogs. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **2010**, *39*, 281–289.
82. Nitahara-Kasahara, Y.; Hayashita-Kinoh, H.; Ohshima-Hosoyama, S.; Okada, H.; Wada-Maeda, M.; Nakamura, A.; Okada, T.; Takeda, S. Long-Term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs with Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* **2012**, *20*, 168–177.
83. Bigham-Sadegh, A.; Mirshokraei, P.; Karimi, I.; Oryan, A.; Aparviz, A.; Shafiei-Sarvestani, Z. Effects of Adipose Tissue Stem Cell Concurrent with Greater Omentum on Experimental Long-Bone Healing in Dog. *Connective Tissue Research* **2012**, *53*, 334–342.
84. Min, B.-H.; Woo, J.-I.; Kim, W.H.; Kweon, O.-K.; Triffitt, J.T.; Choi, B.H.; Park, S.R. The Fate of Implanted Autologous Chondrocytes in Regenerated Articular Cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* **2007**, *221*, 461–465.
85. Zhu, S.; Lu, Y.; Zhu, J.; Xu, J.; Huang, H.; Zhu, M.; Chen, Y.; Zhou, Y.; Fan, X.; Wang, Z. Effects of Intrahepatic Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells Autotransplantation on the Diabetic Beagle Dogs. *Journal of Surgical Research* **2011**, *168*, 213–223.
86. Kirkby Shaw, K.; Alvarez, L.; Foster, S.A.; Tomlinson, J.E.; Shaw, A.J.; Pozzi, A. Fundamental Principles of Rehabilitation and Musculoskeletal Tissue Healing. *Veterinary Surgery* **2020**, *49*, 22–32.
87. Lascelles, B.; Brown, D.; Conzemius, M.; Gill, M.; Oshinsky, M.; Sharkey, M. Measurement of Chronic Pain in Companion Animals: Discussions from the Pain in Animals Workshop (PAW) 2017. *The Veterinary Journal* **2019**, *250*, 71–78.
88. Anderson, A. Treatment of Hip Dysplasia. *Journal of Small Animal Practice* **2011**, *52*, 182–189.

89. Magri, C.; Schramme, M.; Febre, M.; Cauvin, E.; Labadie, F.; Saulnier, N.; François, I.; Lechartier, A.; Aebischer, D.; Moncelet, A.-S. Comparison of Efficacy and Safety of Single versus Repeated Intra-Articular Injection of Allogeneic Neonatal Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Osteoarthritis of the Metacarpophalangeal/Metatarsophalangeal Joint in Horses: A Clinical Pilot Study. *PLoS One* **2019**, *14*, e0221317.
90. Krampera, M.; Franchini, M.; Pizzolo, G.; Aprili, G. Mesenchymal Stem Cells: From Biology to Clinical Use. *Blood Transfusion* **2007**, *5*, 120.
91. Chopra, H.; Hans, M.K.; Shetty, S. Stem Cells-the Hidden Treasure: A Strategic Review. *Dental Research Journal* **2013**, *10*, 421.
92. Cegielski, M.; Dziewiszek, W.; Zabel, M.; DZIĘGIEL, P.; Kuryszko, J.; IŻYKOWSKA, I.; Zatoński, M.; Bochnia, M. Experimental Xenotransplantation of Antlerogenic Cells into Mandibular Bone Lesions in Rabbits: Two-Year Follow-Up. *In Vivo* **2010**, *24*, 165–172.
93. Cegielski, M.; Kalisiak, O. Stem Cells Therapy - A Hope For the Treatment of Tendons in Horses. *Życie Weterynaryjne* **2008**, *83*, 754–756.
94. Prządka, P.; Kielbowicz, Z.; Osiński, B.; Dzimira, S.; Madej, J.A.; Nowacki, W.; Kubiak, K.; Reichert, P.; Cegielski, M. Reconstruction of Cranial Cruciate Ligament in Rabbits Using Polyester Implants Saturated with PRP, Antlerogenic Stem Cells MIC-1 and Their Homogenate. *Connective Tissue Research* **2017**, *58*, 464–478, doi:10.1080/03008207.2016.1251911.
95. Feng, M.; Lu, A.; Gao, H.; Qian, C.; Zhang, J.; Lin, T.; Zhao, Y. Safety of Allogeneic Umbilical Cord Blood Stem Cells Therapy in Patients with Severe Cerebral Palsy: A Retrospective Study. *Stem Cells International* **2015**, *2015*, e325652, doi:10.1155/2015/325652.
96. Sullivan, M.J. Banking on Cord Blood Stem Cells. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 555–563, doi:10.1038/nrc2418.
97. Bertoni, L.; Branly, T.; Jacquet, S.; Desance, M.; Desquilbet, L.; Pascaline, R.; Hartmann, D.-J.; Denoix, J.-M.; Audigie, F.; Galera, P.; et al. Intra-Articular Injection of 2 Different Dosages of Autologous and Allogeneic Bone Marrow- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Triggers a Variable Inflammatory Response of the Fetlock Joint on 12 Sound Experimental Horses. *Stem Cells International* **2019**.
98. Lin, C.-S.; Lin, G.; Lue, T.F. Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Immunocompetent Recipients without Immunosuppressants. *Stem Cells and Development* **2012**, *21*, 2770–2778.
99. Ding, D.-C.; Shyu, W.-C.; Lin, S.-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation* **2011**, *20*, 5–14.
100. Bearden, R.N.; Huggins, S.S.; Cummings, K.J.; Smith, R.; Gregory, C.A.; Saunders, W.B. In-Vitro Characterization of Canine Multipotent Stromal Cells Isolated from Synovium, Bone Marrow, and Adipose Tissue: A Donor-Matched Comparative Study. *Stem Cell Research & Therapy* **2017**, *8*, 1–22.
101. Orbay, H.; Tobita, M.; Mizuno, H. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells International* **2012**, *2012*.
102. Godwin, E.; Young, N.; Dudhia, J.; Beamish, I.; Smith, R. Implantation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Demonstrates Improved Outcome in Horses with Overstrain Injury of the Superficial Digital Flexor Tendon. *Equine Veterinary Journal* **2012**, *44*, 25–32.
103. Jung, D.-I.; Ha, J.-I.; Kim, J.-W.; Kang, B.-T.; Yoo, J.-H.; Park, C.; Lee, J.-H.; Park, H.-M. Canine Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow: Isolation, Characterization, Multidifferentiation, and Neurotrophic Factor Expression in Vitro. *Journal of Veterinary Clinics* **2008**, *25*, 458–465.

104. Peters, A.E.; Watts, A.E. Biopsy Needle Advancement during Bone Marrow Aspiration Increases Mesenchymal Stem Cell Concentration. *Frontiers in veterinary science* **2016**, *3*, 23.
105. Jacobs, R.; Kociba, G.; Ruoff, W. Monoclonal Gammopathy in a Horse with Defective Hemostasis. *Veterinary Pathology* **1983**, *20*, 643–647.
106. Durando, M.; Zarucco, L.; Schaer, T.; Ross, M.; Reef, V. Pneumopericardium in a Horse Secondary to Sternal Bone Marrow Aspiration. *Equine Veterinary Education* **2006**, *18*, 75–79.
107. Désévaux, C.; Laverty, S.; Doizé, B. Sternal Bone Biopsy in Standing Horses. *Veterinary Surgery* **2000**, *29*, 303–308.
108. Kasashima, Y.; Ueno, T.; Tomita, A.; Goodship, A.; Smith, R. Optimisation of Bone Marrow Aspiration from the Equine Sternum for the Safe Recovery of Mesenchymal Stem Cells. *Equine Veterinary Journal* **2011**, *43*, 288–294.
109. Purwaningrum, M.; Jamilah, N.S.; Purbantoro, S.D.; Sawangmake, C.; Nantavisai, S. Comparative Characteristic Study from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Veterinary Science* **2021**, *22*.
110. Rebelatto, C.; Aguiar, A.; Moretao, M.; Senegaglia, A.; Hansen, P.; Barchiki, F.; Oliveira, J.; Martins, J.; Kuligovski, C.; Mansur, F. Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. *Experimental Biology and Medicine* **2008**, *233*, 901–913.
111. Webb, T.L.; Quimby, J.M.; Dow, S.W. In Vitro Comparison of Feline Bone Marrow-Derived and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **2012**, *14*, 165–168.
112. Cuervo, B.; Rubio, M.; Sopena, J.; Dominguez, J.M.; Vilar, J.; Morales, M.; Cugat, R.; Carrillo, J.M. Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15*, 13437–13460, doi:10.3390/ijms150813437.
113. Nicpon, J.; Marycz, K.; Grzesiak, J. Therapeutic Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Injection in Horses Suffering from Bone Spavin. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **2013**, *16*.
114. Vilar, J.M.; Morales, M.; Santana, A.; Spinella, G.; Rubio, M.; Cuervo, B.; Cugat, R.; Carrillo, J.M. Controlled, Blinded Force Platform Analysis of the Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Associated to PRGF-Endoret in Osteoarthritic Dogs. *BMC Veterinary Research* **2013**, *9*, 131, doi:10.1186/1746-6148-9-131.
115. Kuznetsov, S.A.; Mankani, M.H.; Gronthos, S.; Satomura, K.; Bianco, P.; Robey, P.G. Circulating Skeletal Stem Cells. *Journal of Cell Biology* **2001**, *153*, 1133–1140, doi:10.1083/jcb.153.5.1133.
116. Koerner, J.; Nestic, D.; Romero, J.D.; Brehm, W.; Grogan, S.P. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow - Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1613–1619.
117. Dhar, M.; Neilsen, N.; Beatty, K.; Eaker, S.; Adair, H.; Geiser, D. Equine Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Identification, Trilineage Differentiation and Effect of Hyperbaric Oxygen Treatment. *Equine Veterinary Journal* **2012**, *44*, 600–605, doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00536.x.
118. Spaas, J.H.; De Schauwer, C.; Cornillie, P.; Meyer, E.; Van Soom, A.; Van de Walle, G.R. Culture and Characterisation of Equine Peripheral Blood Mesenchymal Stromal Cells. *The Veterinary Journal* **2013**, *195*, 107–113.
119. Bieback, K.; Kern, S.; Klüter, H.; Eichler, H. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* **2004**, *22*, 625–634.

120. In't Anker, P.S.; Scherjon, S.A.; Kleijburg-van der Keur, C.; de Groot-Swings, G.M.; Claas, F.H.; Fibbe, W.E.; Kanhai, H.H. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1338–1345.
121. In't Anker, P.S.; Scherjon, S.A.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W.A.; Claas, F.H.J.; Willemze, R.; Fibbe, W.E.; Kanhai, H.H.H. Amniotic Fluid as a Novel Source of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Transplantation. *Blood* **2003**, *102*, 1548–1549, doi:10.1182/blood-2003-04-1291.
122. Chen, M.-Y.; Lie, P.-C.; Li, Z.-L.; Wei, X. Endothelial Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Hematology* **2009**, *37*, 629–640, doi:10.1016/j.exphem.2009.02.003.
123. Li, X.; Zhou, S. g.; Imreh, M.P.; Ährlund-Richter, L.; Allen, W. r. Horse Embryonic Stem Cell Lines from the Proliferation of Inner Cell Mass Cells. *Stem Cells and Development* **2006**, *15*, 523–531, doi:10.1089/scd.2006.15.523.
124. Hoynowski, S.M.; Fry, M.M.; Gardner, B.M.; Leming, M.T.; Tucker, J.R.; Black, L.; Sand, T.; Mitchell, K.E. Characterization and Differentiation of Equine Umbilical Cord-Derived Matrix Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *362*, 347–353, doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.182.
125. Passeri, S.; Nocchi, F.; Lamanna, R.; Lapi, S.; Miragliotta, V.; Giannessi, E.; Abramo, F.; Stornelli, M.R.; Matarazzo, M.; Plenteda, D.; et al. Isolation and Expansion of Equine Umbilical Cord-Derived Matrix Cells (EUCMCs). *Cell Biology International* **2009**, *33*, 100–105, doi:10.1016/j.cellbi.2008.10.012.
126. Klimczak, A. Mesenchymal Stem/Progenitor Cells and Their Derivates in Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 6652.
127. Doyle, L.M.; Wang, M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **2019**, *8*, 727.
128. Tofiño-Vian, M.; Guillén, M.I.; Del Caz, M.D.P.; Silvestre, A.; Alcaraz, M.J. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2018**, *47*, 11–25.
129. Tofiño-Vian, M.; Guillén, M.I.; Pérez del Caz, M.D.; Castejón, M.A.; Alcaraz, M.J. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, *2017*.
130. Krawczenko, A.; Bielawska-Pohl, A.; Paprocka, M.; Kraskiewicz, H.; Szyposzynska, A.; Wojdat, E.; Klimczak, A. Microvesicles from Human Immortalized Cell Lines of Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem/Stromal Cells of Adipose Tissue Origin as Carriers of Bioactive Factors Facilitating Angiogenesis. *Stem Cells International* **2020**, *2020*.
131. Tricarico, C.; Clancy, J.; D'Souza-Schorey, C. Biology and Biogenesis of Shed Microvesicles. *Small GTPases* **2017**, *8*, 220–232.
132. Nigro, A.; Finardi, A.; Ferraro, M.M.; Manno, D.E.; Quattrini, A.; Furlan, R.; Romano, A. Selective Loss of Microvesicles Is a Major Issue of the Differential Centrifugation Isolation Protocols. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 1–10.
133. Yu, H.; Huang, Y.; Yang, L. Research Progress in the Use of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes in the Treatment of Osteoarthritis. *Ageing Research Reviews* **2022**, *101684*.
134. Gromolak, S.; Krawczenko, A.; Antończyk, A.; Buczak, K.; Kielbowicz, Z.; Klimczak, A. Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 9726.

135. Allen, M.J.; Houlton, J.E.; ADAMS, S.B.; Rushton, N. The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. *Veterinary Surgery* **1998**, *27*, 596–605.
136. Winnicka, A. *Wartości Referencyjne Podstawowych Badań Laboratoryjnych w Weterynarii*; VII.; Wydawnictwo SGGW, **2021**;
137. Malek, S.; Sample, S.J.; Schwartz, Z.; Nemke, B.; Jacobson, P.B.; Cozzi, E.M.; Schaefer, S.L.; Bleedorn, J.A.; Holzman, G.; Muir, P. Effect of Analgesic Therapy on Clinical Outcome Measures in a Randomized Controlled Trial Using Client-Owned Dogs with Hip Osteoarthritis. *BMC Veterinary Research* **2012**, *8*, 1–17.
138. Rychel, J.K. Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine* **2010**, *25*, 20–25.
139. Kim, S.E.; Pozzi, A.; Yeh, J.; Lopez-Velazquez, M.; Au Yong, J.A.; Townsend, S.; Dunlap, A.E.; Christopher, S.A.; Lewis, D.D.; Johnson, M.D. Intra-Articular Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy for Chronic Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Double-Blinded, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Frontiers in Veterinary Science* **2019**, *6*, 474.
140. Sasaki, A.; Mizuno, M.; Mochizuki, M.; Sekiya, I. Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration in Dogs. *World Journal of Stem Cells* **2019**, *11*, 254.
141. Clegg, P.; Booth, T. Drugs Used to Treat Osteoarthritis in the Horse. *In Practice* **2000**, *22*, 594–603.
142. Frisbie, D.; Smith, R. Clinical Update on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Equine Orthopaedics. *Equine Veterinary Journal* **2010**, *42*, 86–89.
143. Black, L.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. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine* **2008**, *9*, 192–200.
144. Marx, C.; Silveira, M.D.; Selbach, I.; da Silva, A.S.; Braga, L.M.G. de M.; Camassola, M.; Nardi, N.B. Acupoint Injection of Autologous Stromal Vascular Fraction and Allogeneic Adipose-Derived Stem Cells to Treat Hip Dysplasia in Dogs. *Stem Cells International* **2014**, *2014*.
145. Broeckx, S.; Suls, M.; Beerts, C.; Vandenberghe, A.; Seys, B.; Wuertz-Kozak, K.; Duchateau, L.; H Spaas, J. Allogenic Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Equine Degenerative Joint Disease: A Pilot Study. *Current Stem Cell Research & Therapy* **2014**, *9*, 497–503.
146. Black, L.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. *Veterinary Therapeutics* **2007**, *8*, 272.
147. Yun, S.; Ku, S.-K.; Kwon, Y.-S. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Synergistically Ameliorate the Surgical-Induced Osteoarthritis in Beagle Dogs. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2016**, *11*, 1–12.
148. Zhang, B.; Wang, B.; Li, S.; Luo, D.; Zhan, X.; Chen, S.; Chen, Z.; Liu, C.; Ji, H.; Bai, Y. Evaluation of the Curative Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Knee Arthritis in Dogs Using Imaging Technology. *Stem Cells International* **2018**, *2018*.
149. Broeckx, S.Y.; Seys, B.; Suls, M.; Vandenberghe, A.; Mariën, T.; Adriaensen, E.; Declercq, J.; Van Hecke, L.; Braun, G.; Hellmann, K. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem Cells and Development* **2019**, *28*, 410–422.
150. McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Rodkey, W.G.; Kisiday, J.D.; Werpy, N.M.; Kawcak, C.E.; Steadman, J.R. Evaluation of Intra-Articular Mesenchymal Stem Cells to Augment Healing of Microfractured Chondral Defects. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* **2011**, *27*, 1552–1561.

151. Harrell, C.R.; Fellabaum, C.; Jovicic, N.; Djonov, V.; Arsenijevic, N.; Volarevic, V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* **2019**, *8*, 467.
152. Pers, Y.-M.; Ruiz, M.; Noël, D.; Jorgensen, C. Mesenchymal Stem Cells for the Management of Inflammation in Osteoarthritis: State of the Art and Perspectives. *Osteoarthritis and Cartilage* **2015**, *23*, 2027–2035.
153. Zhang, S.; Chu, W.; Lai, R.; Lim, S.; Hui, J.; Toh, W. Exosomes Derived from Human Embryonic Mesenchymal Stem Cells Promote Osteochondral Regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage* **2016**, *24*, 2135–2140.
154. Tao, S.-C.; Yuan, T.; Zhang, Y.-L.; Yin, W.-J.; Guo, S.-C.; Zhang, C.-Q. Exosomes Derived from MiR-140-5p-Overexpressing Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Enhance Cartilage Tissue Regeneration and Prevent Osteoarthritis of the Knee in a Rat Model. *Theranostics* **2017**, *7*, 180.
155. Sabry, D.; Shamaa, A.; Amer, M.; El-Tookhy, O.; Abdallah, A.; Abd El Hassib, D.M.; Amer, E.; Elamir, A. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Derived Microvesicles in Repair of Femoral Chondral Defects in Dogs. *Journal of Musculoskeletal Research* **2018**, *21*, 1850006.
156. Platas, J.; Guillén, M.I.; Del Caz, M.D.P.; Gomar, F.; Castejón, M.A.; Mirabet, V.; Alcaraz, M.J. Paracrine Effects of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Inflammatory Stress-Induced Senescence Features of Osteoarthritic Chondrocytes. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 1703.
157. Platas, J.; Guillén, M.I.; del Caz, M.D.P.; Gomar, F.; Mirabet, V.; Alcaraz, M.J. Conditioned Media from Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Degradative Mediators Induced by Interleukin-1 β in Osteoarthritic Chondrocytes. *Mediators of Inflammation* **2013**, *2013*.
158. Qi, H.; Liu, D.-P.; Xiao, D.-W.; Tian, D.-C.; Su, Y.-W.; Jin, S.-F. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Inhibit Mitochondrial Dysfunction-Induced Apoptosis of Chondrocytes via P38, ERK, and Akt Pathways. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **2019**, *55*, 203–210.
159. Mao, G.; Zhang, Z.; Hu, S.; Zhang, Z.; Chang, Z.; Huang, Z.; Liao, W.; Kang, Y. Exosomes Derived from MiR-92a-3p-Overexpressing Human Mesenchymal Stem Cells Enhance Chondrogenesis and Suppress Cartilage Degradation via Targeting WNT5A. *Stem Cell Research & Therapy* **2018**, *9*, 1–13.
160. Cosenza, S.; Ruiz, M.; Toupet, K.; Jorgensen, C.; Noël, D. Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes and Microparticles Protect Cartilage and Bone from Degradation in Osteoarthritis. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 16214.
161. Orth, P.; Meyer, H.; Goebel, L.; Eldracher, M.; Ong, M.F.; Cucchiari, M.; Madry, H. Improved Repair of Chondral and Osteochondral Defects in the Ovine Trochlea Compared with the Medial Condyle. *Journal of Orthopaedic Research* **2013**, *31*, 1772–1779.

12. Spis tabel i rycin

Tabele

Tabela 1. Grupy badanych zwierząt. OW – owca.....	38
Tabela 2. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie II – skafold kolagenowy nasączony 0,9% NaCl.....	70
Tabela 3. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie III badanych zwierząt - MVs.....	74
Tabela 4. Wyniki zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu ubytku chrzęstno-kostnego powstałego u owiec w grupie IV badanych zwierząt – BM-MSCs.....	77
Tabela 5. Wyniki analizy statycznej 14-punktowej zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej dla wszystkich badanych zwierząt w grupach II, III i IV.....	78
Tabela 6. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w dniu operacji (krew pobrana po farmakologicznym uspokojeniu zwierząt) – dzień 0.....	80
Tabela 7. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 3 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej.....	82
Tabela 8. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 6 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej.....	83
Tabela 9. Parametry morfologiczne i biochemiczne krwi obwodowej pobranej od owiec w 10 dobie po zakończonej procedurze chirurgicznej.....	85

Ryciny

Ryc. 1. Schemat przedstawiający uszkodzenie chrząstki stawowej w oparciu o zmodyfikowaną skalę MOS. Na rycinie nie uwzględniono stopnia 0 – prawidłowej powierzchni chrząstki stawowej. 1 – chondromalacja (rozmiękanie i obrzęk chrząstki stawowej; 2 – fibrylacja chrząstki i uraz jej powierzchni nie sięgający warstwy podchrzęstnej kości; 3 – szczelina o pełnej głębokości penetrująca do warstwy podchrzęstnej; 4 – erozja chrząstki stawowej pełnej głębokości penetrująca do warstwy podchrzęstnej. Rycina własna.....	19
Ryc. 2. Pobranie szpiku kostnego z bliższej nasady kości ramiennej. Igła biopsyjna wprowadzona do bliższej nasady kości ramiennej.....	41
Ryc. 3. Aspiracja szpiku kostnego z bliższej nasady kości ramiennej u owcy.....	41
Ryc. 4. Przygotowanie pola operacyjnego do artrotomii bocznej prawego stawu kolanowego.....	43
Ryc. 5. Rana skóry w trakcie artrotomii bocznej prawego stawu kolanowego.....	44
Ryc. 6. Rana skóry z odsłoniętą powierzchnią powięzi szerokiej uda w linii cięcia.....	44
Ryc. 7. Przecięcie torebki stawowej na całej grubości i poszerzenie dostępu operacyjnego do bloczka kości udowej.....	45
Ryc. 8. Śródoperacyjny obraz powierzchni chrząstki stawowej bloczka kości udowej.....	46
Ryc. 9. Trepan wykorzystywany do przeszczepów chrzęstno-kostnych (OATS).....	46
Ryc. 10. Wyznaczenie miejsca do wykonania ubytku i przyłożenie trepanu na powierzchni chrzęstnej bloczka kości udowej.....	47
Ryc. 11. Wytworzenie ubytku o głębokości 10 mm na powierzchni chrzęstnej stawowej bloczka kości udowej.....	48

Ryc. 12. Ubytki w powierzchni chrzęstnej stawowej bloczka kości udowej penetrujące do warstwy kości podchrzęstnej	48
Ryc. 13. Usunięty cylindryczny ubytek chrzęstno-kostny o rozmiarach 6,5 x 10 mm	49
Ryc. 14. Wypełnienie ubytku chrzęstno-kostnego skafoldem kolagenowym.....	49
Ryc. 15. Nasączenie skafoldów kolagenowych za pomocą 0,9% NaCl, BM-MSCs lub MVs	50
Ryc. 16. Radiogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy prawy staw kolanowy owcy. A) zdjęcie w projekcji przyśrodkowo-bocznej, B) zdjęcie w projekcji doczaszkowo-dooonowej	51
Ryc. 17. Tomogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy prawy staw kolanowy owcy w rekonstrukcji 3D. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego: zdjęcie A i B – RadiAnt DICOM Viewer, Medixant, ver. 2022.1.1; C i D – Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	52
Ryc. 18. Tomogramy przedoperacyjne przedstawiające prawidłowy staw kolanowy owcy w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (ang. multiplanar reconstruction – MPR). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	53
Ryc. 19. Tomogramy przedstawiające staw kolanowy owcy w rekonstrukcji 3D bezpośrednio po zabiegu operacyjnym. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego: zdjęcie A i B – RadiAnt DICOM Viewer, Medixant, ver. 2022.1.1; C i D – Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	54
Ryc. 20. Tomogramy przedstawiające staw kolanowy owcy w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej bezpośrednio po zabiegu operacyjnym (MPR). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	55
Ryc. 21. Porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji 3D. Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	60
Ryc. 22. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna poprzeczna (ang. transverse plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	61
Ryc. 23. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna strzałkowa (ang. sagittal plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	62
Ryc. 24. Tomogramy przedstawiające porównanie gojenia się ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej w rekonstrukcji wielopłaszczyznowej (MPR) – płaszczyzna czołowa (ang. frontal plane). Zdjęcia poddane obróbce graficznej za pomocą programu komputerowego Syngo.via Client, Siemens Healthineers ver. 8.3.....	63
Ryc. 25. Zdjęcie prawidłowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z I grupy badanych zwierząt – kontrola negatywna.....	64
Ryc. 26. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z II grupy badanych zwierząt – kontrola pozytywna. Zapadnięta powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została pokryta w całości białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym	65
Ryc. 27. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z III grupy badanych zwierząt – MVs. Powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została szczelnie wypełniona w całości białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym	66
Ryc. 28. Przykładowe zdjęcie bloczka kości udowej pozyskanego pośmiertnie od owcy z IV grupy badanych zwierząt – BM-MSCs. Cała powierzchnia śródoperacyjnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego została wypełniona białawą tkanką o charakterze łącznotkankowym	67

Ryc. 29. Prawidłowa chrząstka stawowa u owcy z grupy I badanych zwierząt – kontrola negatywna. Barwienie HiE, pow. 100x	68
Ryc. 30. Porównanie charakteru stanu miejsca po wykonanym ubytku krytycznym w poszczególnych grupach. 1 – grupa I (kontrola negatywna); 2 – grupa II (kontrola pozytywna); 3 – grupa III (MVs); i 4 – grupa IV (BM-MSCs). Barwienie: 1, 2, 4 – HiE; 3 – wg. Mallorego. Powiększenie – 100x. C – chrząstka stawowa, O – ubytek krytyczny, B – kość	69
Ryc. 31. Obraz morfologiczny obszaru bloczka kości udowej po wykonaniu ubytku krytycznego w grupie III. 1 – część centralna czopu. Widoczne liczne skupiska tkanki tłuszczowej (strzałka), której towarzyszą naczynia krwionośne. Barwienie HiE, pow. 100x. 2 – obszar brzeżny – widoczna przebudowa tkanki kostnej grubowłóknistej w kość wtórną. Barwienie HiE, pow. 200x. 3 i 4 – obszar pod chrząstka stawową – widoczna struktura tkanki typowa dla blizny kostnej zawierająca tkanki o różnym stopniu zaawansowania rozwoju w tym pozostałości po wykonaniu ubytku (strzałka). Barwienie HiE, pow 200x. Ct – tkanka łączna, Ob. – osteoblasty, B – kość	72
Ryc. 32. Różnice w mechanizmie zamykania otworu po wykonanym ubytku. 1, 2, 3 – grupa II, 4 – grupa III. 1, 2 (powiększenie obrazu 1) – widoczna cienka błona tworząca torebkę ograniczającą od wewnątrz otwór krytyczny, od pozostałych tkanek, z obecnymi makrofagami na powierzchni powstała z tkanki łącznej przyległej do otworu, pod którą leżą komórki tłuszczowe. Barwienie HiE, pow. 40x i 100x. 3 – charakterystyczne zmniejszenie grubości chrząstki stawowej przemieszczającej się poprzez działanie mechaniczne do wnętrza otworu (strzałka). Barwienie HiE, pow. 40x. 4 – widoczne połączenie nowopowstałej tkanki tworzącej czop z chrząstką stawową (strzałka). W tym przypadku, chrząstka stawowa nie jest „wciskana” do wnętrza otworu. Barwienie Alcian Blue, pow. 40x.....	73
Ryc. 33. Grupa IV badanych zwierząt. 1 – zaktywowane chondrocyty w chrząstce stawowej (strzałka). Barwienie Alcian blue, pow. 100x. 2 – obszar otworu krytycznego. Widoczna wypełniająca wnętrze otworu tkanka łączna wraz z naczyniami krwionośnymi oraz wyspami tkanki tłuszczowej. Obraz ten o różnym stopniu nasilenia jest charakterystyczny dla tej grupy eksperymentalnej. Barwienie HiE, pow. 40x. 3 – pozostałości po wykonaniu ubytku w tkance kostnej przyległej do otworu (strzałka). Barwienie HiE, pow. 200x. 4 – procesy przebudowy tkanki kostnej. Widoczne liczne osteoblasty syntetyzujące macierz kostną. W świetle widoczne są nowopowstałe naczynia krwionośne. Barwienie HiE, pow. 200x. Ct – tkanka łączna, Ad – adipocyty, B – kość, Ob – osteoblasty	75
Ryc. 34. Szpik kostny oraz przestrzenie pomiędzy beleczkami w badanych grupach w strefach przyległych do ubytku krytycznego (strzałka). 1 – grupa kontrolna. Barwienie HiE, pow. 40x. 2 – grupa III (MVs). Barwienie HiE, pow. 100x. 3 – grupa IV (BM-MSCs). Barwienie HiE, pow. 40x. W grupie III widoczne są liczne pozostałości po wykonaniu ubytku chrzęstno-kostnego.	76
Ryc. 35. Porównanie wyników zmodyfikowanej skali ICRS oceny mikroskopowej w poszczególnych grupach badanych zwierząt (grupa II, III i IV). 1 – wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną (0 – 5 pkt.); 2 – rozplem tkanki łącznej (0 – 2 pkt.); 3 – ocena wypełnienia miejsca ubytku (0 – 3 pkt.); 4 – obecność szpiku (0 – 3 pkt.)	79
Ryc. 36. Porównanie sumy uzyskanych punktów oceny mikroskopowej u owiec z grupy II, III i IV badanych zwierząt	95
Ryc. 37. Porównanie liczby leukocytów (WBC) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie	96
Ryc. 38. Porównanie liczby płytek krwi (PLT) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie	97
Ryc. 39. Porównanie stężenia białka całkowitego (TP) u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie	98
Ryc. 40. Porównanie stężenia albumin u owiec z grupy II, III IV badanych zwierząt w czasie.....	99