



UDC 636.22/.28:611.018.46:637.513:57.086.83

Bone marrow of cattle after slaughtering is a perspective source of stem cells

Iu. O. Kharkevych, R. R. Bokotko, A. Y. Mazurkevych, V. V. Kovpak, M. O. Maliuk, A. V. Gryschnik

The National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 02.02.2020

Received in revised form
10.03.2020

Accepted
20.05.2020

The National University of
Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Kyiv,
Ukraine,
E-mail:
rectorat@nubip.edu.ua

Kharkevych, Iu. O., Bokotko, R. R., Mazurkevych, A. Y., Kovpak, V. V., Maliuk, M. O., & Gryschnik, A. V. (2020). Bone marrow of cattle after slaughtering is a perspective source of stem cells. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 5, 206-210. DOI: 10.31890/vttp.2020.05.36

The development of modern methods of cryopreservation of animal cells has promoted to introduce the concept of creating of stem cell banks for their future use, to avoid problems with donor shortages. Large-scale cryopreservation of stem cells began in the 1990s with the establishment of human cord blood banks. The issue of long-term storage of stem cells is also acute in veterinary medicine. To obtain of cellular material, is needed a source suitable for cell isolation. As such a source it is advisable to consider a slaughter material from productive animals. The **purpose** of this study is to establish the possibility of cattle bone marrow use after slaughter as source of stem cells, on the basis of the proliferation index and the viability of the cultured cells to determine the suitability of this biological material for the obtaining of stem cells 72 hours after slaughter of the animal. **Materials and methods.** The bone marrow was obtained from the femur of a cow, 3 years old, who was slaughtered in a slaughterhouse. The bone marrow was collected with sterile tweezer into a sterile tube, filled with 0.25% trypsin solution (ratio of bone marrow volume to trypsin solution – 10: 1) and placed in a refrigerator ($t + 4^{\circ}\text{C}$) for 24 hours for enzymatic disaggregation. After bone marrow disaggregation, cultivation of cells was performed in a CO_2 -incubator using of disposable plastic Petri dishes ($d = 30 \text{ mm}$) according to the standard procedure by periodically passaging them after forming a monolayer by 95–100%. **Results.** Cultivation of a suspension of cells, derived from the post-mortem bone marrow of a cow, revealed that colonies of cells began to emerge 6–7 days after sowing. Passaging the cells with 0,25% trypsin-Versen solution and sowing them in new cultural plates contributed to increase the mass of cells that actively proliferated. It was established that stem cells, isolated from the post-mortem bone marrow of cattle, have significant proliferative potential, as evidenced by proliferation indices from I to III passages and high viability of cells. Thus, the post-mortem bone marrow of the cattle can be used as an alternative source of stem cells. This biological material is suitable for the isolation of stem cells, even 72 hours after slaughtering the animal, which opens the prospects of its transportation over long distances.

Key words: post-mortem bone marrow, biological material, stem cells, proliferative potential, proliferation index.

Послеубойный костный мозг крупного рогатого скота – перспективный источник стволовых клеток

Ю. А. Харкевич, Р. Р. Бокотько, А. И. Мазуркевич, В. В. Ковпак, Н. А. Малюк, А. В. Грищук

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

Разработка методов современной технологии криоконсервации клеток животных способствовала внедрению концепции создания банков стволовых клеток для их дальнейшего использования, чтобы избежать проблем с нехваткой доноров. Масштабное криоконсервирование стволовых клеток началось в 90-х годах прошлого века с создания банков пуповинной крови человека. Вопрос длительного хранения стволовых клеток остро стоит и в ветеринарной медицине. Чтобы выделить клеточный материал нужно иметь источник, пригодный для выделения клеток. В качестве такого источника целесообразно рассматривать и убойный материал от продуктивных животных. **Цель** данного исследования - установить возможность использования послеубойного костного мозга крупного рогатого скота в качестве источника стволовых клеток, на основе индекса

пролиферации и жизнеспособности культивируемых клеток определить пригодность данного биологического материала для выделения из него стволовых клеток через 72 часа после забоя животного. **Материалы и методы исследований.** Костный мозг получали из бедренной кости коровы возрастом 3 года, которая была подвергнута забоя в условиях убойного пункта мясоперерабатывающего предприятия. Костный мозг отбирали с помощью стерильного пинцета в стерильную пробирку, заполненную 0,25 % раствором трипсина (соотношение объема костного мозга к раствору трипсина – 10:1), и ставили на 24 часа в холодильник ($t +4^{\circ}\text{C}$) с целью осуществления ферментативной дезагрегации. После дезагрегации костного мозга культивирование клеток осуществляли в CO_2 -инкубаторе с использованием одноразовых пластиковых чашек Петри ($d = 30 \text{ мм}$) по стандартной методике путем периодического их пассирования после формирования монослоя на 95–100 %. **Результаты исследований.** При культивировании суспензии клеток, полученных из послеубойного костного мозга коровы, установлено, что колонии клеток начали появляться на 6–7 сутки после посева. Пассирование клеток с помощью 0,25 % раствора трипсина-Версена и посева их в новые культуральные чашки способствовало наращиванию массы клеток, которые активно пролиферовали. Установлено, что стволовые клетки, выделенные из послеубойного костного мозга крупного рогатого скота, обладают значительным пролиферативным потенциалом, о чем свидетельствуют показатели индекса пролиферации с I по III пассажи, и высокой жизнеспособностью. Таким образом, послеубойный мозг крупного рогатого скота может быть использован в качестве альтернативного источника стволовых клеток. Данный биологический материал пригоден для выделения из него стволовых клеток даже через 72 часа после убоя животного, что открывает перспективы его транспортировки на большие расстояния.

Ключевые слова: послеубойный костный мозг, биологический материал, стволовые клетки, пролиферативный потенциал, индекс пролиферации.

Післязабійний кістковий мозок великої рогатої худоби – перспективне джерело стовбурових клітин

Ю. О. Харкевич, Р. Р. Бокотько, А. Й. Мазуркевич, В. В. Ковпак,
М. О. Малюк, А. В. Грищук

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

Розробка методів сучасної технології кріоконсервації клітин тварин сприяла впровадженню концепції створення банків стовбурових клітин для їх подальшого використання, щоб уникнути проблем із нестачею донорів. Масштабне кріоконсервування стовбурових клітин почалося у 90-х роках минулого століття із створення банків пуповинної крові людини. Питання тривалого зберігання стовбурових клітин гостро стоять і у ветеринарній медицині. Щоб виділити клітинний матеріал потрібно мати джерело, придатне для виділення клітин. У якості такого джерела доцільно розглядати і забійний матеріал від продуктивних тварин. **Мета** даного дослідження - встановити можливість використання післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби у якості джерела стовбурових клітин, на основі індексу проліферації та життєздатності культивованих клітин визначити придатність даного біологічного матеріалу для виділення з нього стовбурових клітин через 72 години після забоя тварини. **Матеріали і методи досліджень.** Кістковий мозок отримували із стегнаної кістки корови, віком 3 роки, яка була піддана забоя в умовах забійного пункту м'ясопереробного підприємства. Кістковий мозок відбирали за допомогою стерильного пинцета у стерильну пробірку, заповнену 0,25 % розчином трипсину (співвідношення об'єму кісткового мозку до розчину трипсину – 10:1), та ставили на 24 години у холодильник ($t +4^{\circ}\text{C}$) з метою здійснення ферментативної дезагрегації. Після дезагрегації кісткового мозку культивування клітин здійснювали в CO_2 -інкубаторі у одноразових пластикових чашках Петрі ($d = 30 \text{ мм}$) за стандартною методикою шляхом періодичного їх пасажування після формування моношару на 95–100 %. **Результати досліджень.** Під час культивування суспензії клітин, отриманих із післязабійного кісткового мозку корови, встановлено, що колонії клітин почали з'являтися на 6–7 добу після висівання. Пасажування клітин за допомогою 0,25 % розчину трипсину-Версену та висівання їх у нові культуральні чашки сприяло нарощуванню маси клітин, які активно проліферували. Встановлено, що стовбурові клітини, виділені із післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби, володіють значним проліферативним потенціалом, про що свідчать показники індексу проліферації з I по III пасажи, та високою життєздатністю. Таким чином, післязабійний кістковий мозок великої рогатої худоби може бути використаний у якості альтернативного джерела стовбурових клітин. Даний біологічний матеріал придатний для виділення з нього стовбурових клітин навіть через 72 години після забоя тварини, що відкриває перспективи його транспортування на великі відстані.

Ключові слова: післязабійний кістковий мозок, біологічний матеріал, стовбурові клітини, проліферативний потенціал, індекс проліферації.

Вступ

Актуальність теми. Стовбурові клітини виявлені в усіх багатоклітинних організмів і визначаються як клітини, які здатні адгезуватися до культурального пластику, активно проліферувати та диференціюватися в спеціалізовані типи зрілих клітин (Ali Gholamrezanezhad, 2011; Chagastelles, & Nardi, 2011; Vieira et al., 2010). Для клінічних та дослідницьких застосувань стовбурові клітини зазвичай отримують із кісткового мозку та пуповинної крові, жирової тканини (Brignier, & Gewirtz, 2010; Miana, & Gonzalez, 2018; Reimann, Creutzig, & Kögler, 2009; Kasashima, Ueno,

Tomita, Goodship, & Smith, 2011; Barberini et al., 2014). Ці місця містять велику кількість стовбурових клітин, легко доступні та економічні для їх виділення (Presnell, Petersen, & Heidarani, 2002; Barberini, et al., 2014). Оскільки саме кістковий мозок є основним джерелом стовбурових клітин, вибір місця відбору кісткового мозку є основою біотехнологічних підходів їх отримання (Eslaminejad, Nazarian, Falahi, Taghiyar, & Daneshzadeh, 2009; Igna, Tănăsie, Schuszler, & Şere, 2008).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Розробка методів сучасної технології кріоконсервації клітин тварин сприяла впровадженню концепції

створення банків стовбурових клітин для їх подальшого використання, щоб уникнути проблем із нестачею донорів. Великомасштабне кріоконсервування стовбурових клітин почалося у 90-х роках минулого століття із створення банків пуповинної крові людини (Kurtzberg, 2017). Функціонування кріобанків поступово розширилося, оскільки з'явилися технології кріоконсервації тканин пуповини та, нарешті, жирової тканини (Shu, Gao, & Lee, 2015; Arutyunyan, Fatkhudinov, & Sukhikh, 2018). Кріоконсервовані аlogenні стовбурові клітини використовуються не тільки для досліджень, але й, зазвичай, для клінічних застосувань, що включають трансплантацію та регенеративну медицину.

Питання тривалого зберігання стовбурових клітин гостро стоять і у ветеринарній медицині. Саме зараз вдосконалюються методики виділення та кріоконсервування стовбурових клітин тварин (Delling et al., 2012; Adams et al., 2013). Разом з тим, щоб виділити клітинний матеріал потрібно мати джерело, придатне для виділення клітин. У якості такого джерела доцільно розглядати і забійний матеріал від продуктивних тварин, оскільки давно відомо, що у деяких тканинах, зокрема м'язах та кістковому мозку, стовбурові клітини можуть зберігатися досить тривалий час після смерті (Latil et al., 2012; Blazar et al., 1986; Kapelushnik, Aker, Pugatsch, Samuel, & Slavin, 1998).

Питання матеріального забезпечення процедури виділення кісткового мозку від тварин стоїть не менш гостро, ніж тривалого зберігання стовбурових клітин. В Україні фактично відсутні спеціалізовані лабораторії, які володіють технікою роботи з джерелами стовбурових клітин тварин та безпосередньо із самими стовбуровими клітинами. У більшості випадків відбір кісткового мозку відбувається за межами відповідної лабораторії на великій відстані від останньої. Це вимагає транспортування відібраного матеріалу до місця його обробки, що часто в силу певних причин не вдається зробити відразу після відбору. З огляду на це, виникає питання: скільки часу від моменту відбору від тварини або її забою до моменту доставки у лабораторію кістковий мозок може бути придатний для отримання з нього стовбурових клітин? З огляду на це, актуальним у цьому відношенні є дослідження перспектив використання у якості матеріалу для отримання стовбурових клітин кісткового мозку кісток, отриманих після забою тварин, а також визначення часу, протягом якого у біологічному матеріалі ці клітини зберігають свою життєздатність та є придатними для культивування.

Мета дослідження – встановити можливість використання післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби у якості джерела стовбурових клітин, на основі індексу проліферації та життєздатності культивованих клітин визначити придатність даного біологічного матеріалу для виділення з нього стовбурових клітин через 72 години після забою тварини.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводилися в умовах ННЛ «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» факультету ветеринарної медицини НУБіП України. Кістковий мозок отримували із стегнової кістки корови, віком 3 роки, яка була піддана забою в умовах забійного пункту м'ясопереробного підприємства. Стегнову кістку в лабораторію транспортували у поліетиленовому пакеті. З метою асептики, поверхню кістки перед відбором кісткового мозку обробили 70 % розчином спирту. Кістку у ділянці проксимального епіфізу розрізали за допомогою стрічкової пилки, також попередньо обробленої 70 % розчином спирту. Після

отримання доступу до кістковомозкової порожнини, кістковий мозок відбирали за допомогою стерильного пінцета у стерильну пробірку, заповнену 0,25 % розчином трипсину (співвідношення об'єму кісткового мозку до розчину трипсину – 10:1), та ставили на 24 години у холодильник ($t +4^{\circ}\text{C}$) з метою здійснення ферментативної дезагрегації.

Після дезагрегації кісткового мозку, отриману суспензію клітин механічно дезагрегували протягом 5 хвилин на магнітній мішалці, фільтрували крізь 4 шари стерильної марлевої серветки у стерильні центрифужні пробірки об'ємом 15 см^3 та центрифугували при 300 g протягом 10 хв. Осад клітин ресуспензовували у необхідній кількості стандартного поживного середовища та ставили на культивування у CO_2 -інкубатор за стандартних умов. Від моменту забору кістки від корови після її забою до моменту висівання клітин кісткового мозку пройшло близько 72 годин.

Культивування клітин здійснювали в CO_2 -інкубаторі в одноразових пластикових чашках Петрі ($d = 30\text{ мм}$) за стандартною методикою шляхом періодичного їх пасажування після формування моношару на 95–100 %.

Підрахунок кількості клітин проводили під мікроскопом при збільшенні у 200 разів в усіх квадратах сітки Горяєва та розраховували за формулою:

$$X=A \times 1000/0,9,$$

де X – число клітин в 1 см^3 ;

A – число клітин у всіх квадратах;

1000 – кількість мм^3 в см^3 ;

0,9 – об'єм камери Горяєва в мм^3 .

Дослідження проліферативної активності стовбурових клітин здійснювали з I по III пасажи, висіваючи їх у чашки Петрі ($d = 60\text{ мм}$) з розрахунку 250 тис клітин/чашку. Індекс проліферації клітин визначали через 24 години після висівання за формулою:

$$\text{ІП}=\text{ПП}/\text{ПК},$$

де ІП – індекс проліферації;

ПП – кількість клітин після пасажування;

ПК – посадкова кількість клітин.

Життєздатність клітин визначали за допомогою 0,5 % вітального барвника трипанового синього.

Візуальну оцінку та фотографування здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу Axiovert 40 (Carl Zeiss). При статистичній обробці отриманих результатів використовували пакет комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

Як свідчать результати досліджень, післязабійний кістковий мозок великої рогатої худоби може бути використаний у якості джерела стовбурових клітин. При цьому відпадає необхідність проводити прижиттєвий забір кісткового мозку від тварини, уникаючи таким чином потенційних ризиків післяопераційних ускладнень. Крім того, виділення стовбурових клітин із післязабійного матеріалу дешевше, у порівнянні з необхідністю проведення даної процедури з живими тваринами, оскільки не витрачаються кошти на дорогі медичні засоби, паприклад, для наркотизування тварини, та інструменти.

При культивуванні суспензії клітин, отриманих із післязабійного кісткового мозку корови, встановлено, що колонії клітин почали з'являтися на 6–7 добу після висівання (рис. 1). Колонії формувалися переважно клітинами у кількості 30–50 шт, які згодом розросталися та зливалися з іншими колоніями, утворюючи суцільний моношар (рис. 2, а).



Рис. 1. Мікрофотографія колонії стовбурових клітин, виділених із післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби. 7 доба після висівання. Нативний препарат. x300

При цьому клітини рівномірно прикріплювалися по дну чашок Петрі, мали характерну фібробластоподібну морфологію та активно проліферували, формуючи в чашках Петрі на 24 добу після висівання моношар, конфлуентністю близько 90 % (рис. 2, б).

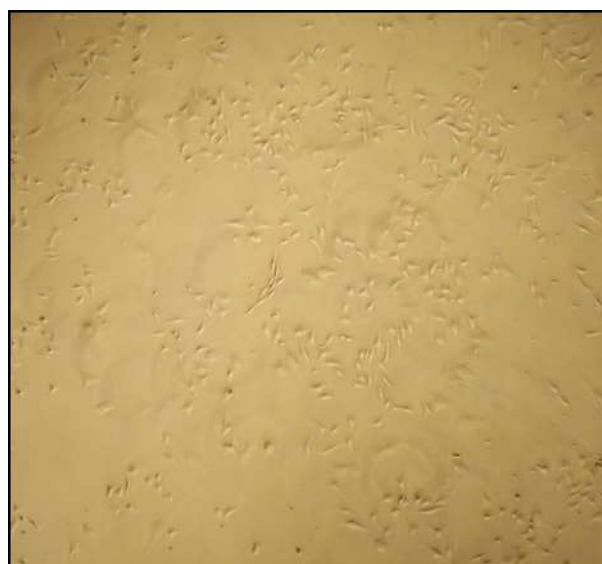


Рис. 2. Мікрофотографії стовбурових клітин, виділених із післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби: а – 16 доба після висівання; б – 24 доба після висівання. Нативний препарат. x200

Пасажування клітин за допомогою 0,25 % розчину трипсину-Версену та висівання їх у нові культуральні чашки сприяло нарощуванню маси клітин, які активно проліферували.

Нами встановлено, що стовбурові клітини, виділені із післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби, володіють значним проліферативним потенціалом, про що свідчать показники індексу проліферації з I по III пасажі, та високою життєздатністю (табл. 1). Разом з тим, показники індексу проліферації не варіювалися залежно від пасажу, а знаходилися практично на одному рівні. Життєздатність культивованих клітин зростала від 86 % на I пасажі до 94 % – на III пасажі, що є результатом зниження гетерогенності культури.

Таблиця 1
Проліферативна активність та життєздатність МСК ВРХ залежно від пасажу (n=3, M±m)

Номер пасажу	Кількість клітин, тис	Індекс проліферації	Життєздатність, %
I	335,80 ± 2,96	1,34	86
II	336,97 ± 3,06	1,35	91
III	338,13 ± 2,57	1,35	94

Таким чином, післязабійний кістковий мозок великої рогатої худоби може бути використаний у якості альтернативного джерела стовбурових клітин. Даний біологічний матеріал придатний для виділення з нього стовбурових клітин навіть через 72 години після забою тварини, що відкриває перспективи його транспортування на великі відстані.

Висновки

1. Післязабійний кістковий мозок великої рогатої худоби може бути використаний у якості альтернативного джерела стовбурових клітин через 72 години після забою тварини.

2. Показники індексу проліферації та життєздатності мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із післязабійного кісткового мозку великої рогатої худоби, були у межах 1,34–1,35 та 86–94 % відповідно.

Перспективи подальших досліджень. Майбутні дослідження у даному напрямі стосуватимуться вивчення можливості виділення мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини тварин після тривалого її зберігання за низьких температур.

References

- Adams, M. K., Goodrich, L. R., Rao, S., Olea-Popelka, F., Phillips, N., Kisiday, J. D., & Mcllwraith, C.W. (2013). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences? *Equine Veterinary Journal*, 45 (3), 372 – 375. DOI: [10.1111/j.2042-3306.2012.00646.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00646.x)
- Arutyunyan, I., Fatkhudinov, T., & Sukhikh, G. (2018). Umbilical cord tissue cryopreservation: A short review. *Stem Cell Research & Therapy*, 9 (1). DOI: [10.1186/s13287-018-0992-0](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0992-0)
- Barberini, D. J., Freitas, N. P., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., ... Amorim, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther*, 5. DOI: [10.1186/s13287-014-0414-4](https://doi.org/10.1186/s13287-014-0414-4)
- Barberini, D.J., Freitas, N.P.P., Magnoni, M.S., Leandro, M., Listoni, A., Heckler, M. ... Rogerio, A. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* 5, 25. DOI: [10.1186/s13287-014-0414-4](https://doi.org/10.1186/s13287-014-0414-4)
- Blazar, B. R., Lasky, L. C., Perentesis, J. P., Watson, K. V., Steinberg, S. E., Filipovich, A. H., Orr, H. T., & Ramsay, N. K. (1986). Successful donor cell engraftment in a recipient of bone marrow from a cadaveric donor. *Blood*, 67(6), 1655–1660. DOI: [10.1182/blood.V67.6.1655.bloodjournal6761655](https://doi.org/10.1182/blood.V67.6.1655.bloodjournal6761655)
- Brignier, A. C., & Gewirtz, A. M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *J. Allergy Clin. Immunol*, 125 (2), 336–344. DOI: [10.1016/j.jaci.2009.09.032](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.032)
- Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. DOI: [10.1038/kisup.2011.15](https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15)
- Delling, U., Lindner, K., Ribitsch, I., Jülke, H. & Brehm, W. (2012). Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can. J. Vet. Res.*, 76 (1), 52–56.
- Eslaminejad, M. B., Nazarian, H., Falahi, F., Taghiyar, L. & Daneshzadeh, M. T. (2009). Ex vivo Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Goat Bone Marrow. *Irani Journal of Basic Medical Sciences*, 12 (2), 70–79. DOI: [10.22038/ijbms.2009.5146](https://doi.org/10.22038/ijbms.2009.5146)
- Gholamrezanezhad, A. (Ed.). (2011). *Stem Cells in Clinic and Research*. London: IntechOpen. DOI: [10.5772/740](https://doi.org/10.5772/740)
- Igna C., Tănăsie, G., Schuszler, L. & Şere, M. (2008). Techniques for dog bone marrow stromal cells sampling, culturing, differentiation and loading scaffolds. *Buletin USAMV-CN*, 65 (1–2), 177–181.
- Kapelushnik, J., Aker, M., Pugatsch, T., Samuel, S., & Slavin, S. (1998). Bone marrow transplantation from a cadaveric donor. *Bone Marrow Transplant.*, 21, 857–858. DOI: [10.1038/sj.bmt.1701165](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701165)
- Kasashima, Y., Ueno, T., Tomita, A., Goodship, A. E., & Smith, R. K. (2011). Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet. J.*, 43 (3), 288–94. DOI: [10.1111/j.2042-3306.2010.00215.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00215.x)
- Kurtzberg, J. (2017). A History of Cord Blood Banking and Transplantation. *Stem Cells Translational Medicine*, 6 (5), 1309–1311. DOI: [10.1002/sctm.17-0075](https://doi.org/10.1002/sctm.17-0075)
- Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S. & Chrétien, F. (2012). Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nature Communications*, 3. DOI: [10.1038/ncomms1890](https://doi.org/10.1038/ncomms1890)
- Miana, V.V. & Gonzalez, E. A. P. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*, 12. DOI: [10.3332/ecancer.2018.822](https://doi.org/10.3332/ecancer.2018.822)
- Presnell, S. C., Petersen, B. & Heidarani, M. A. (2002). Stem cells in adult tissue. *Develop. Biol.*, 13, 69–376. DOI: [10.1016/S1084952102000939](https://doi.org/10.1016/S1084952102000939)
- Reimann, V., Creutzig, U., & Kögler, G. (2009). Stem Cells Derived From Cord Blood in Transplantation and Regenerative Medicine. *Dtsch Arztebl Int*, 106 (50), 831–836. DOI: [10.3238/arztebl.2009.0831](https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0831)
- Shu, Z., Gao, D., & Lee, L.Q. (2015). Update on Cryopreservation of Adipose Tissue and Adipose-derived Stem Cells. *Clin. Plastic Surg.*, 42 (2), 209–218. DOI: [10.1016/j.cps.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cps.2014.12.001)
- Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Secco, M., Strauss, B. E., & Zatz, M. (2010). Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Transplantation*, 19, 279–289. DOI: [10.3727/096368909X481764](https://doi.org/10.3727/096368909X481764)