

Eigenschappen en toekomstperspectieven van mesenchymale stamcellen bij honden

Characteristics of and future perspectives on mesenchymal stem cells in dogs

¹ F. Combes, ² E. de Bakker, ³ C. De Schauwer, ⁴ E. Meyer

¹Vakgroep Farmacologie, Toxicologie en Biochemie

²Vakgroep Medische Beeldvorming van de Huisdieren en Orthopedie van de Kleine Huisdieren

³Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde

⁴Vakgroep Farmacologie, Toxicologie en Biochemie

Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

Francis.Combes@UGent.be

SAMENVATTING

Het therapeutisch gebruik van caniene mesenchymale stamcellen (cMSC) kent de laatste jaren een sterke toename binnen de diergeneeskunde. MSC zijn stromale cellen die in vitro multipotente stamceleigenschappen vertonen. Endogeen bezitten ze trofische, immunoregulerende, antimicrobiële en hematopoïese-ondersteunende functies. Exogeen toegediende MSC vertonen bovendien een opmerkelijk migrerend vermogen naar hypoxische en inflammatoire regio's. Er zijn in stijgende mate indicaties dat MSC ook uit pericyten kunnen ontstaan. Zowel de verschillende invloeden die het micromilieu uitoefent op deze adulte stamcellen, als het gebruik van niet-gestandaardiseerde methoden voor isolatie en expansie leiden tot heterogene celpopulaties. Bijkomend onderzoek is nodig om deze beloftevolle therapieën in de toekomst zonder voorbehoud toegepast kunnen worden bij de hond.

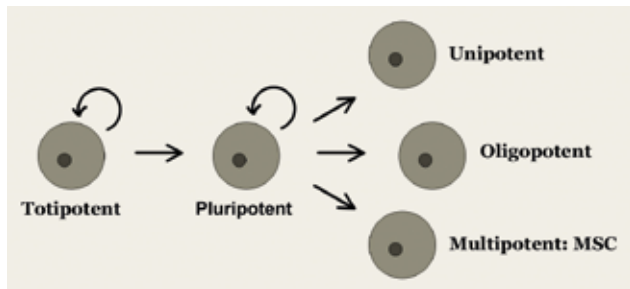
ABSTRACT

The therapeutic use of canine mesenchymal stem cells (cMSC) is rapidly expanding. MSC are stromal cells, which show multipotent stem cell properties in vitro. They possess trophic, immunoregulatory, antimicrobial and hematopoiesis-supportive properties. Moreover, injected MSC are able to migrate to sites of hypoxia and inflammation. Recently, more evidence has become available showing that MSC may originate from pericytes. Different microenvironments as well as non-standardized methods for their isolation and expansion lead to heterogeneous cell populations. Further research is essential in order to use these promising therapies without restrictions in dogs.

INLEIDING

In de jaren '60 van de vorige eeuw beschreven Friedenstein et al. voor het eerst de aanwezigheid van MSC in het beenmerg bij de muis (Friedenstein et al., 1966). Over de jaren heen zijn er veel interessante functies toegeschreven aan deze adulte stamcellen. Dit heeft recent ook geleid tot het succesvol inzetten van caniene mesenchymale stamcellen (cMSC) in klinische studies bij de hond. Hoewel in deze studies veelbelovende resultaten bekomen worden, zijn ze vaak onvoldoende onderbouwd om eenduidig te worden geïnterpreteerd (de Bakker et al., 2014). In de humane geneeskunde bestaan criteria waaraan een stamcel moet voldoen om als humane MSC (hMSC) te worden beschouwd. Deze zijn duidelijk gedefinieerd maar weinig specifiek. Bovendien kan er

in de diergeneeskunde als gevolg van een tekort aan gevalideerde antistoffen niet aan alle criteria van MSC worden voldaan. De huidige onduidelijke definitie van cMSC leidt bijgevolg tot een zeer heterogene celpopulatie. Naast endogene verschillen tussen deze stamcellen zorgen de cultuuromstandigheden van in-vitro-expansie voor bijkomende veranderingen in de morfologie en de eigenschappen van cMSC (Wagner et al., 2010). Ook bestaan er nog veel onopgeloste vragen omtrent de werking en het gebruik van cMSC. Tot op heden wordt het inzetten van therapeutische stamcellen dan ook nog steeds als alternatief beschouwd voor de klassieke therapie. In dit overzichtsartikel worden de algemene eigenschappen en methoden besproken voor de karakterisering van MSC binnen een diergeneeskundige context, met de klemtoon op de hond. Daarbij wordt eveneens een



Figuur 1. Stamcellen worden onderverdeeld op basis van hun potentie om verschillende cellijnen aan te maken.

kritische kijk geleverd op de onopgeloste vragen binnen dit domein. Tot slot wordt het klinisch gebruik van MSC aangehaald.

STAMCELLEN EN MSC

Stamcellen worden gedefinieerd op basis van drie criteria: (1) de mogelijkheid bezitten om in het organisme een bepaald weefsel aan te leggen, (2) na celdeling dochtercellen vormen die identieke eigenschappen bezitten als de moederstamcel (dit proces wordt "self-renewal" genoemd) en (3) uit andere dochtercellen progenitorcellen kunnen vormen die in staat zijn zich verder te differentiëren naar meer gespecialiseerde celtypes (Lakshmiathy en Verfaillie, 2005; Wagers en Weissman, 2004). Kortom, een stamcel vormt een onuitputtelijke bron van nieuwe cellen voor een weefsel.

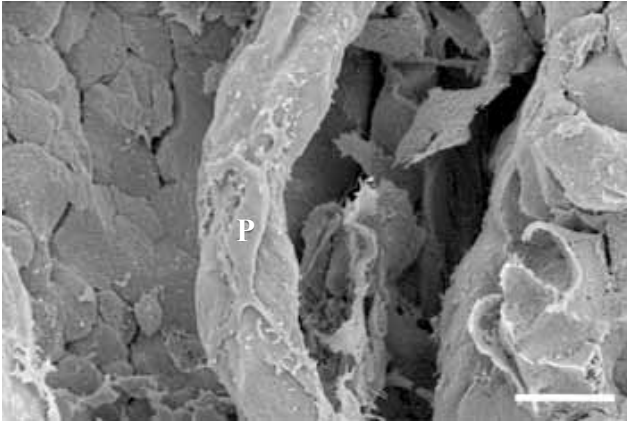
Er bestaan veel soorten stamcellen. Deze worden naargelang het ontwikkelingsstadium onderverdeeld in embryonale stamcellen (ESC, prenataal) en adulte stamcellen (ASC, postnataal). Deze laatste hebben een cruciale functie in de normale turn-over van een weefsel (Fortier, 2005). Een verdere onderverdeling van deze cellen kan gebeuren op basis van het vermogen om dochtercellen te produceren die zich op hun beurt kunnen ontwikkelen naar andere celtypes, de potentie van een stamcel genoemd (Figuur 1). Totipotente stamcellen zijn in staat om een volledig nieuw organisme te produceren. Deze cellen kunnen enkel bekomen worden uit de zygote tot en met de 8-cellige morula. Eenmaal de morula zich verder ontwikkelt tot een blastocyst, bestaande uit de "inner cell mass" (ICM) die later voornamelijk het embryo vormt en de trofoblast die later de vruchtvliezen vormt, worden pluripotente stamcellen uit de ICM geïsoleerd. Deze kunnen geen vruchtvliezen meer vormen. Multipotente cellen daarentegen zijn stamcellen die in volgroeide weefsels te vinden zijn en in staat zijn tot self-renewal en differentiatie naar een beperkt aantal andere celtypes (Lakshmiathy en Verfaillie, 2005). Voorbeelden van multipotente ASC zijn hematopoïetische stamcel-

len in het beenmerg en MSC (Wagers en Weissman, 2004). Oligopotente stamcellen zijn nog steeds in staat om enkele verschillende cellijnen te produceren, maar dus minder dan multipotente stamcellen. Tot slot zijn unipotente stamcellen slechts in staat om één type van cellijn te produceren (Wagers en Weissman, 2004).

MSC werden initieel geassocieerd met het ontstaan van mesenchymale weefsels tijdens de embryogenese en in vitro konden deze cellen differentiëren naar meerdere cellijnen. Daarom werden ze bestempeld als mesenchymale stamcellen (Caplan, 1991). Ze fungeren echter niet exclusief als stamcellen in het lichaam, maar oefenen in vivo vooral trofische, antimicrobiële en immunomodulerende functies uit (Murphy et al., 2013). Omwille van hun geringe in-vivo-differentiatie wordt er soms aan gerefereerd met de term multipotente stromale cellen. Geïsoleerde MSC vormen onder de correcte cultuuromstandigheden in een plastic recipiënt verschillende kolonies van vastgehechte, spoelvormige, op fibroblast lijkende cellen. Bijgevolg worden MSC, maar ook andere cellen met deze eigenschap, soms aangeduid als "colony forming units-fibroblastic" (CFU-F) (Friedenstein et al., 1970). Het is noodzakelijk om de beste methodologie te hanteren om uit deze CFU-F specifiek de gewenste MSC-populatie te isoleren en te karakteriseren alvorens deze cellen therapeutisch in te zetten aangezien MSC in vivo een heterogene groep van cellen vormen, gaande van ongedifferentieerde MSC tot alle daaruit volgende types van progenitorcellen, precursors en gedifferentieerde cellen (Baksh et al., 2004; Ylostalo et al., 2008; Castro-Malaspina en Gay, 1980).

OORSPRONG VAN MSC

Meer en meer studies tonen de laatste jaren aan dat MSC waarschijnlijk kunnen ontstaan uit een subpopulatie van perivasculaire pericyten die rond microbloedvaten gelegen zijn (Crisan et al., 2008) (Figuur 2). Ook cellen uit de tunica adventitia van grotere bloedvaten zouden voorlopers van MSC zijn (Murray et al., 2014). Er bestaat nog onduidelijkheid of alle pericyten MSC zijn, dan wel MSC een subpopulatie van pericyten zijn, waarbij deze laatste een reservoir vormen voor weefselspecifieke progenitorcellen (Bianco et al., 2008). Bij de bepaling van celoppervlaktemarkers met behulp van flowcytometrie is vastgesteld dat pericyten en MSC een zeer gelijkaardig immunofenotype bezitten (Murray et al., 2014). Zo konden Crisan et al. (2008) bij humane pericyten ($CD146^+$, α -SMA $^+$, NG2 $^+$, PDGF-R β^+ , alkalische fosfatase $^+$ en negatief voor endotheliale, hematopoïetische en myogene merkers) die een lange tijd op cultuur gezet werden, expressie van typische MSC-merkers vaststellen (Crisan et al., 2008). Daarenboven differentieerden de pericyten ook naar adipo-, chondro- en osteogene cellijnen (Covas et al., 2008). De recente hypothese dat MSC hun oorsprong hebben in



Figuur 2. “Scanning electron” microscopisch beeld van een pericyt. Pericyten (P) liggen rondom bloedvaten en vormen er uitlopers rond (Jindatip et al., 2012). Bar: 1 μ m.

pericyten wordt verder ondersteund door hun aanwezigheid in vrijwel alle weefsels en door een correlatie van de hoeveelheid geïsoleerde MSC per weefsel met de dichtheid van bloedvaten in dat weefsel (Murphy et al., 2013).

KARAKTERISERING VAN MSC

De International Society for Cellular Therapy (ISCT) stelde in 2006 drie criteria op om hMSC onduidelijk te karakteriseren: (1) plastic-adherentie in standaard cultuuromstandigheden, (2) expressie van celmembranmerkers CD73, CD90 en CD105, maar geen expressie van CD11b of CD14, CD19, CD29a, CD34, CD45, HLA-DR en (3) de mogelijkheid tot differentiatie naar osteocyten, chondrocyten en adipocyten (Dominici et al., 2006). Deze criteria zijn echter enkel van toepassing op in vitro geëxpandeerde hMSC en houden weinig rekening met de inherente verschillen tussen hMSC onderling (Dominici et al., 2006; Murphy et al., 2013). Immers, subsets van MSC vertonen veel heterogeniteit in de expressie van hun oppervlakte-antigenen. Deze verschillen zijn waarschijnlijk het gevolg van invloeden van het perivasculaire micromilieu in de diverse weefsels (Murphy et al., 2013).

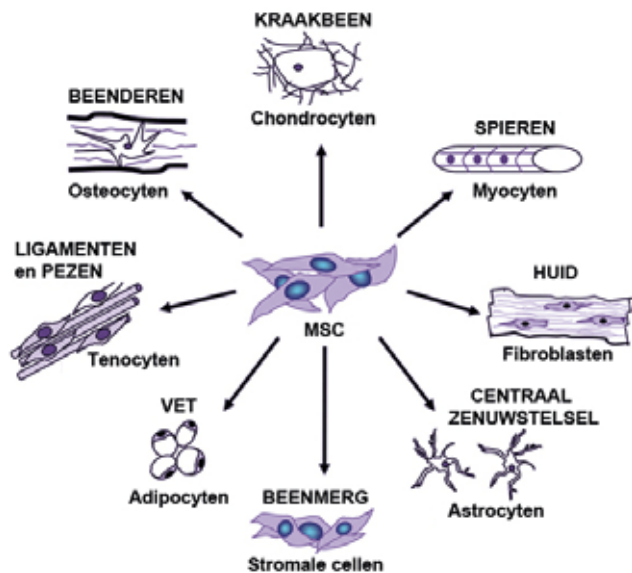
Behalve de ongelijkheid tussen MSC in vivo, vormen niet-gestandaardiseerde methoden van isolatie en expansie van MSC in vitro een bijkomende bron van heterogeniteit. Dit wordt weerspiegeld in grote verschillen van MSC tussen laboratoria (Ho et al., 2008). Zo wordt de hoeveelheid MSC beïnvloed door de prelevatieplaats, de donorleeftijd en de aanwezigheid van comorbiditeiten (DiMarino et al., 2013). Verschillen in species, lot, cultuurtechniek en MSC-densiteit in initiële passages kunnen daarentegen leiden tot variabele proliferatiesnelheden (Spencer, 2012; Tocci en Forte, 2003). Tijdens opeenvolgende passages worden de telomeren van MSC progressief korter,

waardoor de MSC geleidelijk aan proliferatiecapaciteit verliezen tot ze cellulaire senescentie bereiken (Bernardo, et al., 2007). MSC uit vroege passages bezitten dus een groter actief vermogen en potentieel voor therapeutisch gebruik (Spencer, 2012). Na in-vivotransplantatie van langdurige geëxpandeerde hMSC naar muizen werden echter geen indicaties van tumorvorming noch chromosomale abnormaliteiten aangetoond (Bernardo et al., 2007).

In de diergeneeskunde zijn de eerder vermelde ISCT-minimumcriteria nog niet opgesteld aangezien er meestal weinig speciespecifieke, monoklonale antistoffen beschikbaar zijn voor de immunofenotypering van de MSC (Screven et al., 2014). Dit heeft als gevolg dat vaak gebruik wordt gemaakt van niet-gevalideerde kruisreagerende antistoffen van andere species, zoals die van de muis of van de mens, waardoor nog geen consistente lijst van celmembranmerkers voor de karakterisering van veterinaire MSC werd samengesteld (Screven et al., 2014; de Bakker et al., 2014, De Schauwer C., 2011).

ALGEMENE EIGENSCHAPPEN EN FUNCTIES VAN MSC

Aanvankelijk werd aan MSC een belangrijke rol toegekend als organisator van niches van hematopoëtische stamcellen (Mendez-Ferrer et al., 2010). Later werd duidelijk dat de functies van MSC zich niet limiteren tot een rol binnen het beenmerg. MSC reageren actief op weefselstress of -schade op een manier die sterk lijkt op de wijze waarop cellen van het immuunsysteem reageren op contact met antigenen. Wanneer MSC exogeen worden toegediend, kunnen ze migreren ("homen") naar plaatsen waar weefsel-schade is opgetreden en bijgevolg waar ontstoken en beschadigde bloedvaten aanwezig zijn (DiMarino et al., 2013). Eenmaal ter plaatse kunnen de MSC reageren op de omgeving en naargelang het micromilieu waarin ze zich bevinden een hoeveelheid mediators vrijstellen. Deze stimuleren vervolgens angiogenese, regeneratie en weefselremodellering. MSC kunnen ook andere cellen rekruteren en het immuunsysteem zowel onderdrukken als activeren (DiMarino et al., 2013). Tenslotte kunnen ze ook antibacteriële functies uitoefenen (DiMarino et al., 2013). Endogene MSC oefenen in het lichaam vooral een lokale functie uit, waarbij pericyten worden geactiveerd tot MSC die na het uitoefenen van helende effecten op hun beurt terug naar pericyten worden omgezet (Murphy et al., 2013). De functie van deze pericyten, meer specifiek MSC, kan verschillen naargelang de locatie waar ze zich bevinden. Dit wordt weerspiegeld in zowel een verschil van expressie van cellulaire merkers, als in een verschil van differentiatiepotentieel (DiMarino et al., 2013). Wanneer bijgevolg MSC geïsoleerd worden uit verschillende weefsels, dan worden ongelijke subpopulaties bekomen. Bovendien kunnen MSC



Figuur 3. MSC hebben, zoals alle multipotente stamcellen, de eigenschap om te differentiëren naar verschillende celtypes. Klassiek wordt het differentiatievermogen naar adipocyten, osteoblasten en chondroblasten opgenomen in de criteria die MSC definiëren. MSC kunnen echter ook naar andere celtypes differentiëren (bron: www.sci-therapies.info).

verder geactiveerd worden via interactie met beschadigde cellen of het micromilieu, zodat ze een extra hoog gehalte aan therapeutische factoren vrijstellen (Lee et al., 2011).

MSC zijn dus in staat om een plaats van weefsel schade te herkennen en deze terug te helpen transformeren naar gezond functioneel weefsel (Fernández Vallone et al., 2013). Daarnaast kunnen deze stamcellen ook in vitro transdifferentiëren naar celtypes met morfologische, fenotypische en functionele eigenschappen van zowel endo-, ecto- als mesodermale oorsprong (Figuur 3). Voorbeelden hiervan zijn neuronen, hepatocyten, renale en myoblastceltypes (Fernández Vallone et al., 2013; Vieira et al., 2010; Kamishina et al., 2006). Deze inzichten verruimen zowel de potentiële werkingsmechanismen als de therapeutische doeleinden van cMSC.

Hematopoïetische functie van MSC

Aanvankelijk werd gedacht dat MSC hematopoïese-ondersteunende cellen waren. Na isolatie en transplantatie van MSC worden onder invloed van deze donorcellen immers hematopoïetische stamcellen van de gastheer aangetrokken en aangezet tot de vorming van bloedcellen (Friedenstein et al., 1974). Zo resulteerde een simultane transplantatie van deze stamcellen met hMSC in een sneller hematopoïetisch herstel bij muizen met beenmergsuppressie (Bensidhoum et al., 2004). Eveneens vervullen MSC een rol in de preventie van “graft-versus-host”reacties na transplantatie van hematopoïetische stamcellen (Maijenburg et

al., 2012). Hoewel de wijze waarop hematopoïetische ondersteuning gebeurt, nog niet helemaal bekend is (Van Overstraeten-Schlogel et al., 2006), wordt toch algemeen aanvaard dat MSC in vivo een belangrijke rol vervullen als organisatoren van de hematopoïetische stamcelniche (Mendez-Ferrer et al., 2010).

Trofische functie van MSC

MSC functioneren in het lichaam voornamelijk via de productie van een waaier van cytokinen, chemokinen en groeifactoren (Gnecchi et al., 2008) (Figuur 4). In dat opzicht wordt aan MSC gerefereerd als 'de endogene apotheken voor beschadigd weefsel' (Caplan en Correa, 2011). Ze zijn niet alleen in staat om te differentiëren in meerdere richtingen (multipotentie), een eigenschap die vooral in vitro wordt gezien, maar ze gaan ook apoptose tegen (Murphy et al., 2013), remmen de vorming van littekenweefsel en stimuleren de weefselregeneratie via secretie van paracrine factoren, zoals mitogene factoren (“transforming growth factor-alpha” (TGF- α), TGF- β , “hepatocyte growth factor” (HGF), “epithelial growth factor” (EGF), “basic fibroblast growth factor” (FGF-2) en “insulin-like growth factor-1” (IGF-1)) en angiogenetische factoren, zoals “vascular endothelial growth factor” (VEGF), IGF-1 en angiopoiëtin-1 (Murph et al., 2013). Angiogenese, mitogene invloeden, anti-apoptose en remming van littekenweefselvorming worden samen trofische effecten genoemd. Daarenboven kunnen MSC ook immunoresponsen moduleren en vertonen ze anti-inflammatoire eigenschappen (Borjesson en Peroni, 2011).

Immunomodulerende functies van MSC

MSC ontsnappen aan T-celherkenning, helpen het immuunsysteem om te schakelen naar een betere balans tussen T-helper 1- (Th1) en Th2- cellen en zorgen eveneens voor een grotere aanwezigheid van regulatorische T-cellen (Bai et al., 2009). Naast de T- en B-cellen worden ook de antigeen presenterende cellen en “natural-killer”cellen beïnvloed (Tyndall et al., 2007). Extrapolatie van deze eigenschappen naar andere diersoorten moet met voorzichtigheid gebeuren, aangezien reeds werd aangetoond dat deze niet identiek zijn voor verschillende species (Yi en Song, 2012). Het ontsnappen aan het immuunsysteem is een gevolg van een weinig tot niet tot expressie brengen van HLA-I, HLA-II (cf. MHC-I en -II) en costimulatoire moleculen (CD40, CD40L, CD80, CD86). Dit noemt men samen de immunogeprivilegieerde eigenschap van MSC (Figuroa et al., 2012) en deze heeft als gevolg dat ze kunnen worden ingezet in allogene therapieën (Dominici et al., 2006; Chamberlain et al., 2007). Bijkomend wordt de immunomodulerende functie van MSC niet gemedieerd via HLA maar via de secretie van mediators. Dit maakt de noodzaak

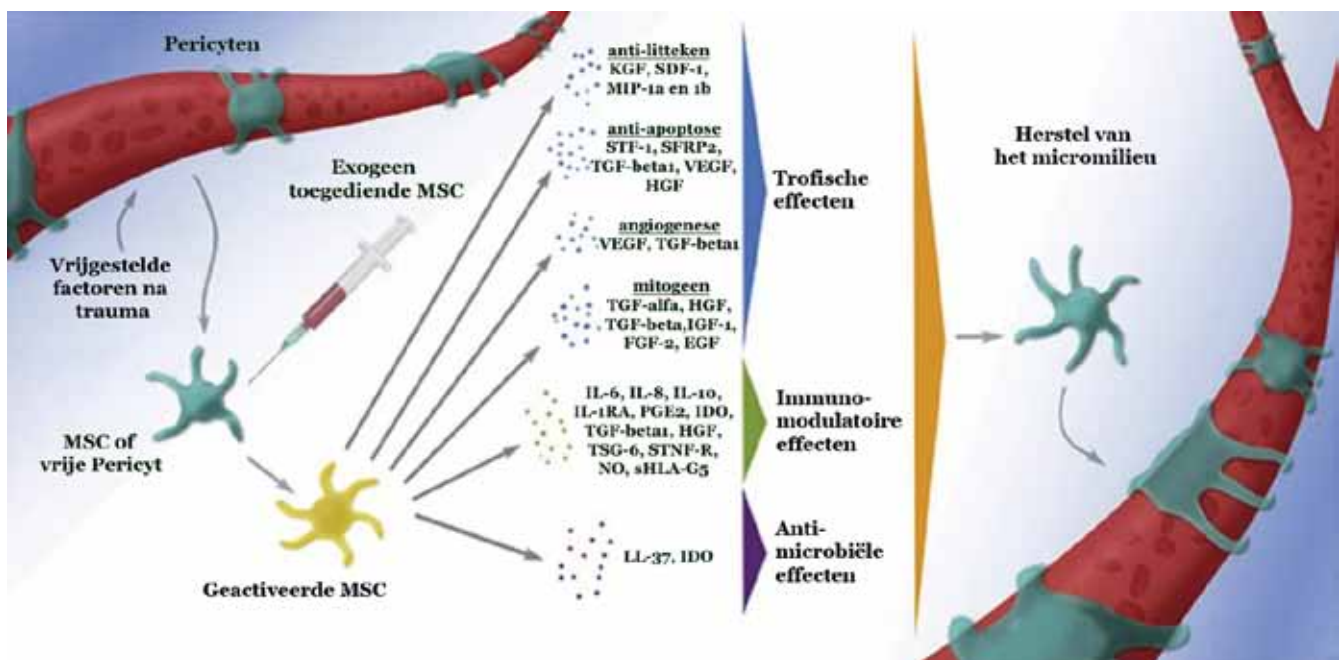
van het matchen van donoren met gastheren in het geval van allogene therapieën overbodig (Figuroa et al., 2012).

De immunogeprivilegieerde eigenschap van MSC werd klinisch al vaak bevestigd, hoewel MSC-afstoting ook al gerapporteerd werd (Eliopoulos et al., 2005). In dat laatste verband kan de vraag gesteld worden of allogene MSC in vivo differentiëren, wat hun HLA-expressie eventueel kan veranderen, waardoor ze toch een immuunreactie uitlokken (Murphy et al., 2013). Dit laatste fenomeen werd reeds aangetoond in modellen waarbij de HLA-II-expressie werd opge-reguleerd in een inflammatoir milieu en bijgevolg de MSC toch werden herkend door het immuunsysteem van de gastheer (Matthay, 2010). Tenslotte werd onlangs vastgesteld dat MSC antimicrobiële effecten bezitten door secretie van cathelicidine (LL-37). Dit eiwit wordt normaal gesecreteerd door epitheelcellen en fagocyterende macrofagen en werkt antimicrobieel tegen zowel grampositieve als gramnegatieve bacteriën (Nijnik en Hancock, 2009).

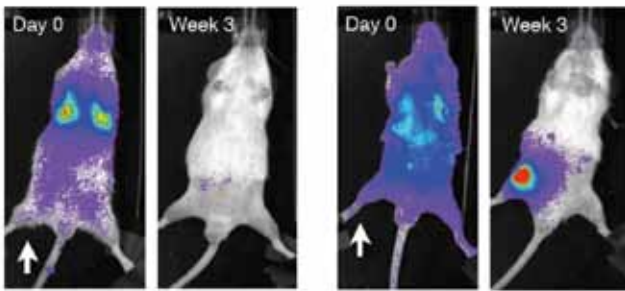
Migratiefunctie van MSC

Een bijzondere eigenschap van MSC is hun migratievermogen. Hoewel MSC vooral een lokale functie uitoefenen (Maloney et al., 1985), werd reeds aangetoond dat exogeen toegediende MSC in staat zijn om naar plaatsen van inflammatie of weefselschade te "homen". Dit kan betekenen dat MSC intrinsiek de eigenschap bezitten om over een langere afstand te worden gerekruteerd. Zo werd beschreven hoe MSC chemotactisch worden aangetrokken naar ontste-

kingshaarden (Kode et al., 2009), beschadigde cellen (Frisbie en Smith, 2010), ischemische regio's (Chen et al., 2006), neoplasieën en hun metastasen (Spaeth et al., 2008). Dit wordt bevestigd door de aanwezigheid van verschillende chemokinen, zoals "stromal cell-derived factor 1" (SDF-1), "monocyte chemotactic protein 3" (MCP-3), chemokine (C-X-C motief) ligand 9 (CXCL9), CXCL16, chemokine (C-C motief) ligand 20 (CCL20), CCL25 en "hepatocyte growth factor" (HGF), die zowel lokaal als systemisch in staat zijn om MSC te laten migreren (Kitaori et al., 2009; Schenk et al., 2007; Chamberlain et al., 2011; Iwasaki et al., 2011). De migratie van exogeen toegediende MSC verloopt op een manier die sterk lijkt op de migratie van leukocyten. MSC brengen gelijkaardige leukocytenmigratiemerkers tot expressie, zoals groeihormoonreceptoren, chemo- en cytokinereceptoren, adhesiemoleculen en "toll-like" receptoren (TLR) (Karp en Leng Teo, 2009). In vitro kan de migratie-capaciteit van hMSC gestimuleerd worden door groeifactoren (PDGF-BB, EGF en SDF-1 α) (Nakamizo et al., 2005). In vivo worden MSC vooral aangetrokken naar hypoxische en inflammatoire zones, zoals het tumorale micromilieu (Dvorak, 1986). Deze tumorale micromilieus hebben een zeer heterogeen karakter, waardoor de vrijstelling van chemotactische factoren per tumor verschilt. Analoog aan leukocyten kunnen MSC na extravasatie migreren naar de tumor door middel van gradiënten in groeifactoren, chemokinen en andere chemotactische moleculen (Nakamizo et al., 2005). Het exacte mechanisme van dit migrerend karakter is nog niet opgehelderd. Wel heeft men kunnen vaststellen dat het aantal in-vitropassages en de duur van de cultuur een duidelijke negatieve impact



Figuur 4. Pericyten worden geactiveerd tot MSC door groeifactoren en chemokinen in oplossing. Deze geactiveerde MSC reageren vervolgens op het micromilieu door middel van de secretie van trofische, immunomodulatoire of antimicrobiële factoren. Eenmaal het micromilieu in zijn oorspronkelijke staat hersteld is, keren MSC terug naar hun initiële vorm als pericyten (vertaald uit Murphy et al., 2013).



Figuur 5. Intraveneus (IV) versus intra-arterieel (IA) toegediende MSC-injecties in muizen waarvan in de rechterfemur inflammatie werd geïnduceerd via radiatie (witte pijl). De toegediende MSC werden getransfecteerd met luciferase om ze traceerbaar te maken via bioluminescentie. IV toegediende MSC (links) blijven aanwezig ter hoogte van de longen en zijn na één week al verdwenen uit het lichaam. IA toegediende MSC daarentegen (rechts) zijn na drie weken nog steeds aanwezig en zijn geconcentreerd ter hoogte van de inflammatiezone (uit: Kean et al., 2013).

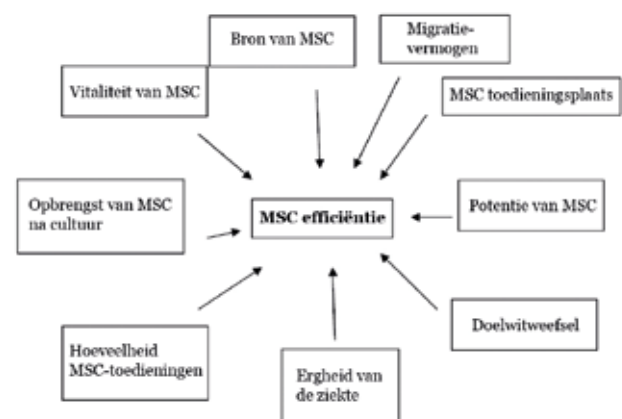
hebben op de migratie-eigenschappen en morfologie van MSC, alsook de differentiatiecapaciteit en vitaliteit van de cellen (Wagner et al., 2010). Dit wordt eveneens bevestigd door verschillende onderzoekers die vastgesteld hebben dat vers geïsoleerde MSC superieure “homing”capaciteiten vertonen ten opzichte van in vitro geëxpandeerde MSC (Fischer et al., 2009; Rombouts en Ploemacher, 2003). Daarenboven verhoogt in-vitrovoorbehandeling van geïsoleerde MSC met pro-inflammatoire cytokinen, zoals “tumor necrosis factor- α ” (TNF- α), de migratie- en adhesiecapaciteit van MSC (Nakamizo et al., 2005). De toevoeging van RNA aan het cultuurmedium wordt door TLR3 op de MSC herkend en leidt eveneens tot deze effecten (Nakamizo et al., 2005). Er zijn echter nog maar weinig gegevens over hoe MSC kunnen migreren vanuit lokale weefsels naar de systemische circulatie, hetgeen een cruciaal proces is indien deze MSC vanuit verafgelegen weefsels gerekruteerd moeten worden (Kean et al., 2013).

KLINISCH GEBRUIK VAN MSC

Van alle adulte stamcellen worden MSC het frequentst ingezet in de regeneratieve (dier)geneeskunde (Chanda et al., 2010), gaande van orthopedische toepassingen bij pees-, been- en kraakbeenletsels tot niet-orthopedische toepassingen, zoals wondheling, ischemische, immuungemedieerde en inflammatoire aandoeningen (de Bakker et al., 2014). Aangezien er vaak gebruik wordt gemaakt van combinatie-therapieën, er te weinig controlegroepen aanwezig zijn en er geen statistische significantie wordt bereikt wegens te kleine steekproeven, zijn de overwegend positieve resultaten in de meeste gevallen echter moeilijk ondubbelzinnig te interpreteren (De Schauwer et al., 2013). Hoewel de klinische studies geen

grote complicaties aan het licht brengen, wordt toch het beste voorzichtig omgegaan met deze therapieën daar geen informatie bekend is over de gevolgen ervan op lange termijn. De meeste studies uit de humane geneeskunde worden uitgevoerd met autologe MSC uit beenmerg (BM-MS) of vetweefsel (AD-MS). Daarnaast worden allogene therapieën ook meer en meer toegepast (Fernández Vallone et al., 2013). In de studie van Spencer et al. (2012) werden BM-MS en AD-MS vergeleken (Spencer, 2012). Daarin werd aangetoond dat AD-MS afkomstig uit het infrapatellaire vetkussen een vergelijkbaar differentiatievermogen en een gelijkaardige tot zelfs grotere expansiecapaciteit vertoonden dan BM-MS. Ook de proliferatie- en differentiatiecapaciteit na cryopreservatie van beide bronnen was gelijklopend. Verse caniene AD-MS uit het infrapatellaire vetkussen vormen dus een goed alternatief voor BM-MS (Spencer, 2012).

Verder moet er een onderscheid worden gemaakt tussen enerzijds in vitro geëxpandeerde, opgezuiverde producten, zoals BM-MS en AD-MS, en anderzijds niet-geëxpandeerde producten, zoals BM-concentraat en de “stromal vascular fraction” (SVF) uit vetweefsel (Borjesson en Peroni, 2011). Zhang et al. (2012) vergeleken het effect van in vitro geëxpandeerde BM-MS en niet-geëxpandeerde gekernde cellen uit het BM in een collageen II-gel (“scaffold”) op de heling van “full-thickness” kraakbeendefecten. Beide therapieën vertoonden een sterk verbeterde histologische heling ten opzichte van de negatieve controle en “scaffold” alleen. Aangezien het effect van beide celpopulaties statistisch niet significant verschillend was, leek een “point-of-care” toepassing, waarbij het BM-aspiraats of de SVF tijdens dezelfde chirurgische ingreep werd gebruikt, zeker klinisch haalbaar (Zhang et al., 2012). Autoloog “point-of-care”gebruik is ideaal aangezien dit problemen



Figuur 6. De efficiëntie van MSC is afhankelijk van vele parameters. Niet enkel de bron, de toedieningsmethode en de kwaliteit van de MSC spelen een rol, maar ook de respons van de gastheer beïnvloedt de therapeutische werking ervan (aangepast en vertaald uit DiMarino et al., 2013).

vermijdt met “cross-matching”, in-vitrocontaminatie en potentiële omvorming tot maligne cellen. Het BM-aspiraats of de SVF uit vetweefsel wordt in één chirurgische ingreep gepreleveerd en terug ingebracht zonder de risico's, kosten, tijd en negatieve effecten die in-vitro-expansie van MSC met zich meebrengt (Murphy et al., 2013). Limiterende factoren zijn echter de beperkte hoeveelheid MSC die men kan extraheren uit een patiënt wanneer geen in-vitro-expansie volgt, en MSC-deficiënties die kunnen optreden ten gevolge van directe of indirecte effecten van de ziekte zelf. Deze problemen worden omzeild wanneer gebruik wordt gemaakt van allogene MSC, maar afweerreacties en het verlies in functionaliteit ten gevolge van langdurige culturen kunnen een probleem vormen (DiMarino et al., 2013; Eliopoulos et al., 2005; Wagner et al., 2010).

Er bestaan twee manieren om exogene MSC toe te dienen: lokaal en systemisch. Lokale toediening kan al dan niet met behulp van een “scaffold” gebeuren. Systemische toediening kan ofwel intraveneus (IV), ofwel intra-arterieel (IA) (Kean et al., 2013) gebeuren (Figuur 5). Hoewel IV-toediening klinisch gemakkelijker uit te voeren is, worden veel van de toegediende MSC ter hoogte van de longen gesekwestreerd, hetgeen het pulmonaire “first-pass” effect genoemd wordt (Fischer et al., 2009). Bij IA-toediening wordt de dosis verminderd en verkleint het risico op pulmonaire embolie ten gevolge van de snellere verdunning (Kean et al., 2013). De optimale manier om MSC toe te dienen is echter nog niet voldoende bekend (DiMarino et al., 2013).

Bij honden werden nog maar enkele studies gepubliceerd over het therapeutisch gebruik van MSC en behandelen meestal been-enkraakbeenpathologieën (de Bakker et al., 2014). In andere studies staat de hond model voor bepaalde pathologieën bij de mens. Voorbeelden hiervan zijn het gebruik van cMSC in de preventie van tussenwervelschijfdegeneratie (Serigano et al., 2010) en hun helende effecten op geïnduceerde myocardischemie (Stamm et al., 2003). In overeenstemming met studies uit de humane geneeskunde is de efficiëntie van cMSC-therapie eveneens moeilijk eenduidig te interpreteren (De Schauwer et al., 2013). Elke donor, autoloog of allogeen, is immers verschillend. Zo werd aangetoond dat de secretie van bioactieve moleculen door MSC een tienvoud kan verschillen tussen donoren van dezelfde leeftijd en hetzelfde geslacht (Cook et al., 2012). Vele factoren hebben een invloed op de efficiëntie van de toegediende MSC (Figuur 6). De ideale toe te dienen dosis is daarom nog niet bekend en varieert naargelang het ziekteproces waartegen de MSC worden ingezet, de potentie en de efficaciteit van het toegediende MSC-preparaat (DiMarino et al., 2013). In de humane geneeskunde worden vaak 1 tot 5 miljoen cellen per kg IV of lokaal toegediend (Wagner et al., 2009). Om deze hoeveelheid cellen te bekomen, is meestal een in-vitro-expansie vereist (Kisiel et al., 2012). Daarnaast zijn de hoeveelheid

verkregen cellen per gram donorweefsel, de optimale weefselbron per klinische toepassing, de ideale route en timing van toediening, het al dan niet gebruiken van “scaffolds” en het gebruik van autologe versus allogene MSC nog steeds niet bekend (Fortier en Travis, 2011; Kisiel et al., 2012). Tenslotte is ook nog maar weinig bekend over de veiligheid van deze aanpak op lange termijn (de Bakker et al., 2014). De effecten van therapeutisch toegediende cellen kunnen immers niet zomaar worden uitgeschakeld.

DISCUSSIE

Het ontbreken van een duidelijke regelgeving omtrent het klinisch gebruik van MSC heeft geleid tot het therapeutisch inzetten van deze stamcellen terwijl nog veel fundamentele vragen over MSC moeten beantwoord worden (de Bakker et al., 2014). Een van de grote uitdagingen voor de regeneratieve geneeskunde is de correcte karakterisering van MSC (Spencer, 2012). Zowel voor allogene, als autologe MSC is er immers een in-vitro-expansie van de gepreleveerde MSC vereist om tot een hoeveelheid cellen te komen die therapeutisch inzetbaar is. Humane MSC worden gedefinieerd via drie in vitro vastgestelde minimumcriteria: hun immunofenotypisch profiel, hun eigenschap tot plastic-adherentie en hun differentiatievermogen naar adipo-, chondro- en osteogene cellijnen (Dominici et al., 2006). Bijkomende methoden van karakterisering, zoals het opstellen van een mRNA-profiel, kunnen als alternatief worden gebruikt (Screven et al., 2014). Deze criteria dienen in de eerste plaats om MSC te onderscheiden van hematopoëtische, endotheliale, epitheliale en myogene cellen, maar houden weinig rekening met de inherente heterogeniteit in deze stamcelpopulatie (De Schauwer, 2011; Dominici et al., 2006). De verschillen tussen MSC onderling zijn het gevolg van variërende micromilieus, anatomische locaties, ouderdom en genotype van de donor (Murphy et al., 2013). Bijgevolg zorgen niet-gestandaardiseerde manieren van staalname, isolatie en expansie voor bijkomende invloeden die de vergelijking van MSC bemoeilijken (Wagner et al., 2010). Ook de expansie zelf heeft een invloed op het immunofenotype van de MSC (Wagner et al., 2008). Toekomstige studies moeten daarom gericht zijn op de specifieke karakterisering van MSC en hun subpopulaties (Murphy et al., 2013).

Door een relatief gebrek aan speciesspecifieke, monoklonale antistoffen kan er in de diergeneeskunde moeilijker voldaan worden aan de minimumcriteria die voor hMSC gelden, wat tot een grotere onduidelijkheid over de exacte identiteit van deze stamcellen leidt (Screven et al., 2014). Daarom wordt er vaak gebruik gemaakt van niet-gevalideerde, kruisreagerende antistoffen, zoals die van de muis of de mens, waardoor tot op heden geen consistente lijst van celmembranmerkers voor de karakterisering van veterinaire MSC kan samengesteld worden (Screven et al.,

2014). Voor de hond heeft Screven et al. (2014) een lijst met gevalideerde, monoklonale antistoffen opgesteld. Er dient wel te worden opgemerkt dat deze lijst nog hiaten bevat, waardoor de tegemoetkoming aan de humane minimumcriteria niet volledig is (Screven et al., 2014).

Cruciaal voor het maximaal therapeutisch inzetten van MSC is ook het ophelderen van de fundamentele vragen over hun werking (de Bakker et al., 2014; Di-Marino et al., 2013). Bovendien zullen de reeds vastgestelde resultaten moeten worden onderbouwd met studies die voldoende controlegroepen en steekproefgrootte bezitten zodat statistische significantie wordt bereikt (de Bakker et al., 2014). Behalve de klassieke methoden om MSC te oogsten uit het beenmerg of uit het vetweefsel, is er recent een nieuwe, veelbelovende methode beschreven om cMSC te winnen uit caniene dermale fibroblasten. Daarbij worden dermale fibroblasten geherprogrammeerd tot "canine induced pluripotent stem cells" (ciPSC) om dan verder te worden omgezet naar cMSC (Whitworth et al., 2014). In een studie van Whitworth et al. (2014) vertoonden de verworven ciPSC-MSC een hoge proliferatiecapaciteit die niet afnam naarmate het aantal in-vitropassages steeg, wat een groot nadeel bij klassieke MSC vormt. Deze benadering zou potentieel een antwoord kunnen bieden op de ongemakken die klassieke prelevatie met zich meebrengt, alsook een uitweg kunnen vormen voor de problematiek rond heterogeniteit en in-vitroverlies van eigenschappen van MSC. De veiligheid ervan zal echter nog uitvoerig moeten worden bestudeerd vooraleer ze een klinische realiteit kan vormen.

CONCLUSIE

Bijzonder interessante eigenschappen worden toegeschreven aan (c)MSC. Dit maakt deze cellen uitzonderlijk aantrekkelijk voor therapeutische toepassingen. Er zijn echter nog steeds veel onopgeloste vragen omtrent hun exacte werkingsmechanismen, alsook rond de optimale manier van prelevatie, karakterisering en toediening. Eveneens zullen de invloed en haalbaarheid van de isolatiemethoden moeten worden vergeleken per klinische toepassing. Hiertoe zou een gestandaardiseerd protocol opgesteld moeten worden dat bij voorkeur gebruik maakt van commerciële reagentia en exact gedefinieerde cellulaire en moleculaire MSC-merkers zodat bijkomende onduidelijkheden omtrent de identificatie van MSC vermeden kan worden (Ho et al., 2008). De ontwikkeling van cultuurmedia die geïsoleerde cMSC samen laten differentiëren naar een homogene celpopulatie met de gewenste eigenschappen, vormt eveneens een optie. Bijkomend moet men zich in de toekomst ook focussen op het micromilieu, omdat dit de heterogeniteit van MSC zowel tijdens hun in-vitro-expansie als na hun therapeutische toediening beïnvloedt. In de diergeneeskunde moet de ontwikkeling van gevalideerde, commercieel

beschikbare, monoklonale antistoffen als prioritair worden beschouwd. Bijkomend innovatief onderzoek en het creëren van een transparant wettelijk kader zullen de vereiste verduidelijking moeten bieden zodat deze beloftevolle therapieën in de toekomst in de geneeskunde van de kleine huisdieren zonder voorbehoud toegepast kunnen worden.

REFERENTIES

- Ahn, J., Lee, H., Seo, K., Kang, S., Ra, J., Youn, H. (2013). Anti-tumor effect of adipose tissue derived-mesenchymal stem cells expressing interferon- β and treatment with cisplatin in a xenograft mouse model for canine melanoma. *PLoS ONE* 8(9), 1-11.
- Amara, I., Touati, W., Beaune, P., de Waziers, I. (2014). Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors. *Biochimie*, 1-8.
- Bai, L., Lennon, D. P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A., Miller, S. D. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 57, 1192-1203.
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, 301-316.
- Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-Samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., Büscher, D., Fibbe, W., Foussat, A., Kwa, M., Lantz, O., Mačiulaitis, R., Palomäki, T., Schneider, C.K., Sensebé, L., Tachdjian, G., Tarte, K., Tosca, L., Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies. Bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy* 15, 753-759.
- Bensidhoum, M., Chapel, A., Francois, S. (2004). Homing of in vitro expanded Stro-1⁻ or Stro-1⁺ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103(9), 3313-3319.
- Bernardo, M. E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A. M., Avanzini, M. A., Moretta, A., . . . Locatelli, F. (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research* 67, 9142-9149.
- Bianco, P., Robey, P. G., Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2(4), 313-319.
- Borjesson, D., Peroni, J. (2011). The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 31(1), 109-123.
- Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9, 641-650.
- Caplan, A., Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9, 11-15.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56(2), 289-301.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749.

- Chamberlain, G., Smith, H., Rainger, G. E., Middleton, J. (2011). Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear. *PLoS ONE* 6(9).
- Chanda, D., Kumar, S., Ponnazhagan, S. (2010). Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *Journal of Cellular Biochemistry* 111, 249-257.
- Chen, C., Lee, Y., Chiu, S., Shyu, W., Lee, M., Huang, S., Li, H. (2006). The application of stem cells in the treatment of ischemic diseases. *Histology and Histopathology* 21, 1209-1216.
- Cook, M. M., Futrega, K., Osiecki, M., Kabiri, M., Kul, B., Rice, A. (2012). Micromarrow? 3D co-culture of haematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18, 319-28.
- Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology* 36, 642-654.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3), 301-313.
- de Bakker, E., Van Ryssen, B., De Schauwer, C., Meyer, E. (2014). Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspective as therapy for dogs and as a model for man. *Veterinary Quarterly* 33(4), 225-233.
- De Schauwer, C. (2011). Optimization of the isolation, culture, and characterization of equine umbilical cord blood mesenchymal stromal cells. *Tissue Engineering: Part C*, 17(11), 1061-1070.
- De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G., Van Soom, A. (2013). Current clinical applications of equine mesenchymal stem cells: update. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 83, 327-336.
- DiMarino, A. M., Caplan, A. I., Bonfield, T. L. (2013). Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Frontiers in Immunology* 4, 1-9.
- Dominici, M., Le, B. K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine* 315(26), 1650-1659.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., Galipeau, J. (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106, 4057-4065.
- Fernández Vallone, V. B., Romaniuk, M. A., Choi, H., Labovsky, V., Otaegui, J., Chasseing, N. A. (2013). Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* 85, 1-10.
- Figuroa, F. E., Carrión, F., Villanueva, S., Khoury, M. (2012). Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biological Research* 45, 269-277.
- Fischer, U. M., Harting, M. T., Jimenez, F. (2009). Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells and Development* 18(5), 683-691.
- Fortier, L. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery* 34, 415-423.
- Fortier, L., Travis, A. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research and Therapy* 2, 9.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics* 3(4), 393-403.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17(4), 331-340.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16, 381-390.
- Frisbie, D., Smith, R. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal* 42, 86-89.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research* 103, 1204-1219.
- Ho, A. D., Wagner, W., Franke, W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10, 320-330.
- Iwasaki, M., Koyanagi, M., Kossmann, H. (2011). Hepatocyte growth factor mobilizes non-bone marrow-derived circulating mesoangioblasts. *European Heart Journal* 32(5), 627-636.
- Jindatip, D., Fujiwara, K., Kouki, T., Yashiro, T. (2012). Transmission and scanning electron microscopy study of the characteristics and morphology of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells before and after castration in rat anterior pituitary gland. *Anatomical Science International* 87(3), 165-173.
- Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J. A., Clemmons, R. M. (2006). Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research* 67, 1921-1928.
- Karp, J. M., Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4, 206-216.
- Kean, T. J., Lin, P., Caplan, A. I., Dennis, J. E. (2013). MSCs: delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells International*, 1-13.
- Kisiel, A. H., McDuffee, L. A., Masaoud, E., Bailey, T. R., Esparza Gonzalez, B. P., Nino-Fong, R. (2012). Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research* 73, 1305-1317.
- Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E. M. (2009). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis and Rheumatism* 60(3), 813-823.
- Kode, J., Mukherjee, S., Joglekar, M., Hardikar, A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11(4), 377-391.
- Lakshminpathy, U., Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood Reviews* 19, 29-38.
- Lee, R. H., Oh, J. Y., Choi, H., Bazhanov, N. (2011). Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells

- and tissue repair. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 3073–3078.
- Maijenburg, M. W., van der Schoot, C. E., Voermans, C. (2012). Mesenchymal stromal cell migration: possibilities to improve cellular therapy. *Stem Cells and Development* 21, 19–29.
- Maloney, M. A., Lamela, R. A., Patt, H. M. (1985). The question of bone marrow stromal fibroblast traffic. *Annals of the New York Academy of Sciences* 459, 190–197.
- Matthay, M. A. (2010). Advances and challenges in translating stem cell therapies for clinical diseases. *Translational Research* 156, 107–111.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and Molecular Medicine*, 45, 1–16.
- Murray, I. R., West, C. C., Hardy, W. R., James, A. W., Park, T. S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., Péault, B. (2014). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 1353–1374.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research* 65, 3307–3318.
- Nijnik, A., Hancock, R. E. (2009). The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Current Opinion in Hematology* 16, 41–47.
- Rombouts, W. J., Ploemacher, R. E. (2003). Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 17(1), 160–170.
- Schenk, S., Mal, N., Finan, A. (2007). Monocyte chemoattractant protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 25(1), 245–251.
- Screven, R., Kenyon, E., Myers, M. J., Yancy, H. F., Skasko, M., Boxer, L., Bigley, E.C. 3rd, Borjesson, D.L., Zhu, M. (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 161, 21–31.
- Serigano, K., Sakai, D., Hiyama, A., Tamura, F., Tanaka, M., Mochida, J. (2010). Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *Journal of Orthopaedic Research* 28, 1267–1275.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Therapy* 15, 730–738.
- Spencer, N. D. (2012). In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *The Veterinary Journal* 191, 231–239.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schümichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M., Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45–46.
- Sun, Z., Wang, S., Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology* 7, 1–10.
- Tocci, A., Forte, L. (2003). Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *The Hematology Journal* 4, 92–96.
- Tyndall, A., Walker, U. A., Cope, A., Dazzi, F., De Bari, C., Fibbe, W., Guiducci, S., Jones, S., Jorgensen, C., Le Blanc, K., Luyten, F., McGonagle, D., Martin, I., Bocelli-Tyndall, C., Pennesi, G., Pistoia, V., Pitzalis, C., Uccelli, A., Wulffraat, N., Feldmann, M. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Research & Therapy* 9(1), 301.
- Van Overstraeten-Schlogel, N., Beguin, Y., Gothot, A. (2006). Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *European Journal of Haematology* 76, 488–493.
- 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.
- Wagers, A. J., Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639–648.
- Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J. E., Caplan, A. I. (2009). Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 531–536.
- Wagner, W., Ho, A. D., Zenke, M. (2010). Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part B Reviews* 16(4), 445–453.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Ho, A. D. (2008). Replecative senescence of mesenchymal stem cells - a continuous and organized process. *PloS ONE*, 5.
- Whitworth, D. J., Frith, J. E., Frith, T. J., Ovchinnikov, D. A., Cooper-White, J. J., Wolvetang, E. J. (2014). Derivation of mesenchymal stromal cells from canine induced pluripotent stem cells by inhibition of the TGFbeta/activin signaling pathway. *Stem Cells and Development*, 1–13.
- Yi, T., Song, S. U. (2012). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Archives of Pharmacal Research* 35, 213–221.
- Ylostalo, J., Bazhanov, N., Prockop, D. J. (2008). Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Experimental Hematology*, 36, 1390–1402.
- Zhang, Y., Wang, F., Chen, J., Ning, Z., Yang, L. (2012). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects. *International Orthopaedics*, 36, 1079–1086.