

Vekstfaktorer frigitt fra mesenchymale stamceller og sårtilheling

Av Karoline Haugen Lie og Camilla Heyerdahl Arnesen



Lånt av Øystein Runde, Gyldendal 2017

Veiledere: Cecilie Gjerde og Salwa Suliman

Masteroppgave ved institutt for klinisk odontologi

UNIVERSITETET I BERGEN



Sammendrag

Bakgrunn: Aktuell forskning har antydnet at den største delen av stamcellers effekt på sårtilheling kan skyldes utskillelsen av vekstfaktorer. Mekanismene og effekten som kondisjonert medium fra Mesenchymale stamceller (MSC) har på sårtilheling er grundig studert hos de beinmargsderiverete MSC. Flere studier er nødvendige på dette området for å kunne få en større forståelse av effekten av vekstfaktorer fra MSC fra forskjellige kilder.

Mål: I dette forsøket ville vi sammenligne effekten av kondisjonert medium (CM) med humane MSC fra beinmarg (hBMSC-CM) og fra fettvev (hAMSC-CM) på sårtilheling av et beincellelag der det ble påført en skade.

Material og metode: Et *in vitro* eksperiment ble designet som et scratch-wound assay for å undersøke om hBMSC-CM og hAMSC-CM fra samme donor ga ulik effekt på sårtilheling. Et cellelag med en osteosarkom cellelinje (Saos-2) ble skrapet med en steril pipette slik at det resulterte i et sår, eller et område uten celler. Videre observerte vi området for å se om cellene migrerte inn i området uten celler slik at såret lukket seg. Det ble tilsatt kondisjonert medium fra hMSC fra fett og beinmarg, og disse ble sammenlignet med en positiv kontroll.

Resultat: Vi fant en tydelig lukking av skrapet laget i Saos-2-cellene som var tilsatt positiv kontroll. Det var en liten tendens til lukking av skrapene med hBMSC-CM og en større lukking av skrapene tilsatt hAMSC-CM. Forskjellen mellom lukkingsgrad av hBMSC-CM og hAMSC-CM var signifikant ved 12 timer, og på grafen ser vi en generell tendens som antyder at skrapene med hAMSC-CM har lukket seg noe mer enn hBMSC-CM.

Konklusjon: Kondisjonert medium samlet fra hAD-MSC har en økt effect på sårtilheling sammenlignet med kondisjonert medium samlet fra hBM-MSC.

Summary

Background: In light of current research, it may seem that the biggest part of stem cells effect on wound healing is because of the growth factors the stem cells secretes. The mechanisms and effects conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSC) have on wound healing are extensively studied on bone marrow derived MSC. More studies on this area are necessary to get a greater understanding of the effect of growth factor from MSC from different sources.

Aim: This study was aimed to compare the effect of conditioned medium from MSC from bone marrow (hBMSC-CM) or adipose tissue (hAMSC-CM) from the same donor on wound healing in a damaged bone cell layer.

Material and methods: An experimental *in vitro* design for scratch-wound assay was used to study the aim. A cell layer with osteosarcoma cell line (Saos-2) was scraped with a sterile pipette which resulted in an area without cells. Furthermore, we observed this area to see if the cells migrated into the field and thus closed the wound after adding conditioned medium from MSC with different sources compared to a positive control.

Results: In this experiment we found that there was a significant closure of the scratch-wound area in the Saos-2 cells that were in the positive control. There was a small tendency for closure of the scratch-wound with hBMSC-CM and a slightly bigger closure with the scratch-wound with hAMSC-CM. The difference in closure between hBMSC-CM and hAMSC-CM was significant at 12 hours, and in the graph we can see a general tendency which implies that the scratches with hAMSC-CM have closed more than the scratches with hBMSC-CM.

Conclusion: Conditioned medium collected from hAD-MSC has a superior effect on wound healing compared to the condition medium collected from hBM-MSC.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Stamceller	1
1.1.1	Definisjon av Mesenchymale stamceller (MSC)	4
1.1.2	Karakterisering av MSC	5
1.1.3	Forskjellige kilder til MSC	6
1.2	Stamcelleterapi	7
1.3	MSC-sekret og terapi uten bruk av transplanterte stamceller	9
1.4	Kondisjonert medium	10
1.5	Sårtilheling	10
1.6	Bakgrunn	12
1.7	Hovedmål	13
2	Material og metode	14
2.1	Cellekulturene	14
2.2	Fremstilling av kondisjonert medium	15
2.3	Forberedelser før scratch-wound assay	15
2.4	Scratch-wound assay	16
2.5	Analyse av lukking av skrap	17
2.6	Statistisk analyse	18
3	Resultat	19
3.1	Cellemorfologi	19
3.2	Resultatet av scratch-wound assay	20
4	Diskusjon	24
6	Konklusjon	27
7	Fremtidig perspektiv	28
	Kilder	29

1 Introduksjon

1.1 Stamceller

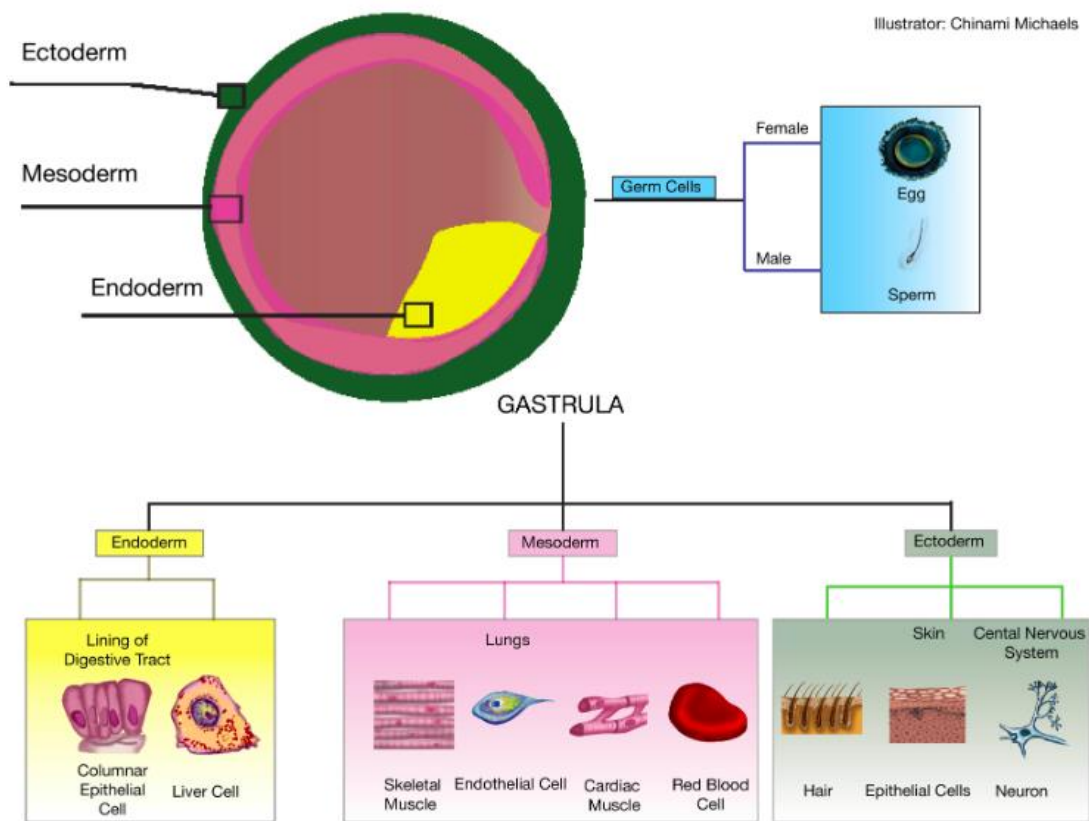
Stamceller finnes i alle mennesker. Disse er uspesialiserte celler som kan utvikle seg til nye stamceller, eller differensiere til spesialiserte celler (1). Vi skiller mellom ulike typer stamceller; Totipotente, pluripotente, multipotente og unipotente (2).

Kroppen vår er et komplekst maskineri og alt den består av er bygget opp av celler. Alle disse cellene stammer fra en og samme grunn celle. Denne cellen kalles en zygote og dannes når en eggcelle blir befruktet av en sædcelle (3, 4). I zygoten finner vi totipotente stamceller. Disse stamcellene kan dele seg og danne alle celler som gir opphav til en organisme, inkludert morkake og navlestreng, som er nødvendig for at et foster skal kunne overleve. Så vidt en vet er det kun de åtte første cellene i en zygote som er totipotente, og disse cellene er derfor svært sjeldne (4).

Når zygoten starter celledeling, danner den en blastocyst. Dette skjer rundt embryoets 5-6 dag. Disse cellene har enda ikke begynt å utvikle seg til spesialiserte celler, og kan i prinsippet bli til å bli alle celletyper i det voksne mennesket, med unntak av morkake og navlestreng. Hentes stamcellene ut på et senere tidspunkt, vil cellene ha startet differensiering (4). Vi kaller disse cellene pluripotente embryonale stamceller. Disse stamcellene kan kun hentes ut fra et embryo (2). Dette betyr at de må hentes ut fra et abortert foster eller en befruktet eggcelle. De er derfor omstridt brukt i forskning, da bruken av disse reiser en rekke etiske spørsmål (3).

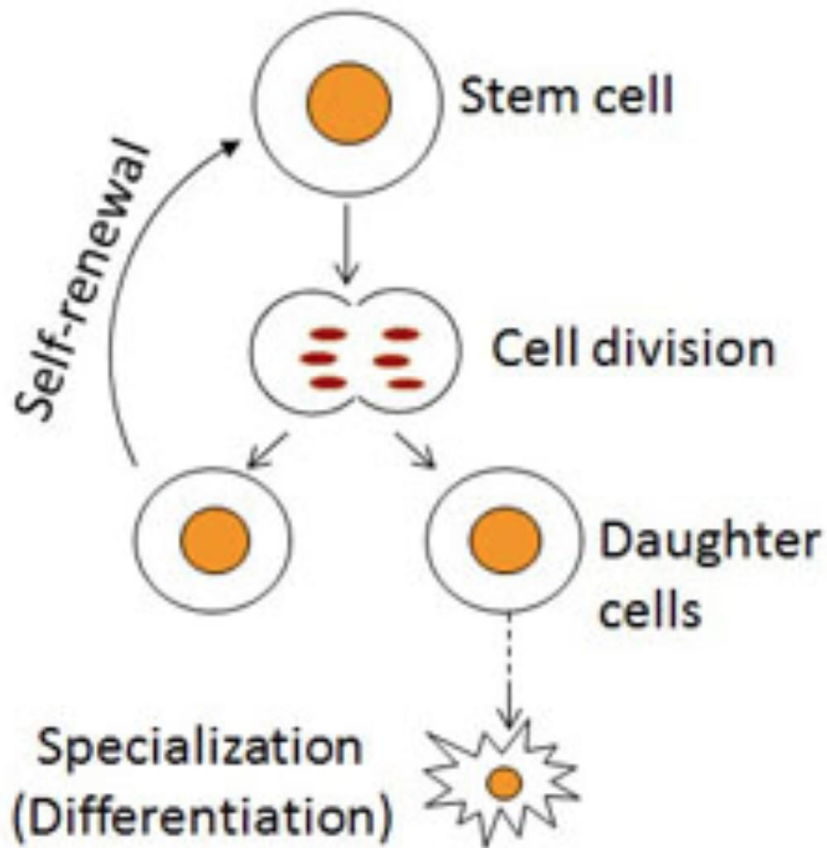
Under fosterutviklingen deles cellene og danner etterhvert tre cellelinjer. Cellelinjer er inndelinger på grunnlag av hvilken del av fosteret cellene oppstår fra (5) og er delt inn i

- 1) Ektoderm, som utvikles til nervesystem og epidermis
- 2) Endoderm, som utvikles til lever, bukspyttkjertel og lunge, og
- 3) Mesoderm, som utvikler seg til gjenstående vev, inkludert blod, beinmarg, fettvev og bindevev (3) (figur 1).



Figur 1. Kimlag i fosteret: ektoderm, mesoderm og endoderm.
 (<http://history.archives.mbl.edu/exploring/exhibits/edmund-beecher-wilson/narrative/germ-layers-cells>)

Voksne stamceller er stamceller som kan reproducere seg selv og gi opphav til nye celler fra samme cellelinje. Når en slik stamcelle deler seg, kan den danne to identiske stamceller, eller en ny og spesialisert celle som blir kalt en progenitorcelle (4) (figur. 2).



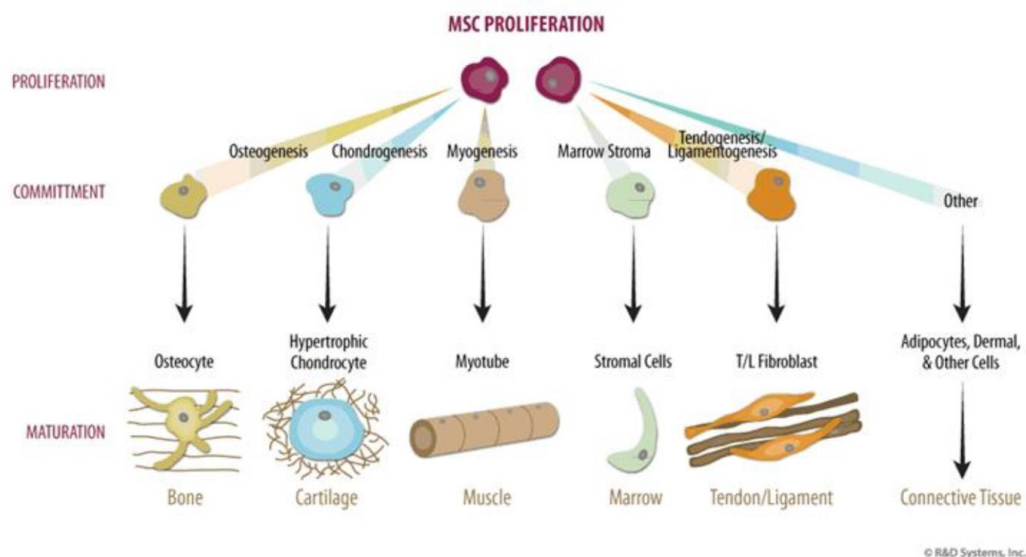
Figur 2. Stamcelledeling. (<http://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/stem-cell-basics>)

De voksne stamcellene gir opphav til multipotente og unipotente stamceller, og kan deles inn i undergrupper basert på hvilken del av kroppen cellene differensierer til. De unipotente stamcellene kan kun differensiere til én bestemt cellelinje, mens de multipotente stamcellene kan differensiere til alle celletyper innenfor en spesifikk cellelinje (2, 6).

De multipotente cellene deles inn i hematopoetiske stamceller (HSC) og mesenchymale stamceller (MSC). HSC gir opphav til alle blodlegemene, både de myelogene og lymfogene slektlinjene som danner de hvite blodcellene, samt røde blodceller og blodplater. MSC blir beskrevet i egne avsnitt under (2).

1.1.1 Definisjon av Mesenchymale stamceller (MSC)

Voksne mesenchymale stamceller (MSC) fra beinmarg ble oppdaget i 1968 av Friedenstein et.al. De beskrev en fibroblastlignende populasjon som skilte ut vekstfaktorer og cytokiner som påvirket hematopoiesen og andre prosesser (7). Voksne multipotente stamceller er celler som kan differensiere og bli til celletyper fra den mesodermale cellelinjen (figur 3). Dette inkluderer blant annet chondrocytter som gir opphav til bruskvev, adipocytter som gir opphav til fettceller og osteocytter som gir opphav til beinceller (2, 8). Nyere forskning har også antydnet at MSC i tillegg til mesodermal differensiering, kan differensiere til celler fra ektodermal og endodermal opprinnelse, slik som nevrocytter som gir opphav til nerveceller og cardiomyocytter som gir opphav til hjertemuskulatur (8, 9).

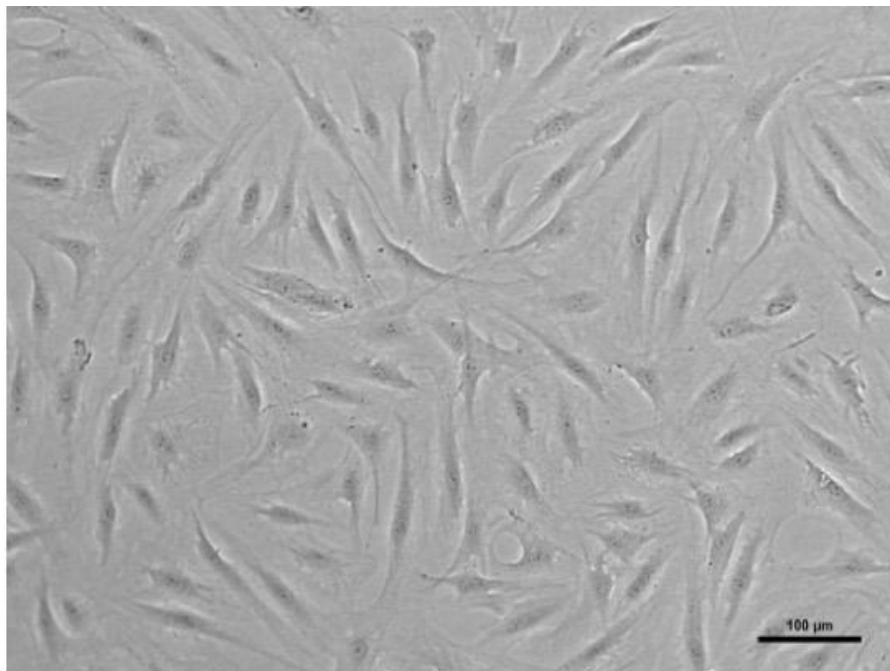


Figur 3: Eksempler på differensiering av MSC. Kilde: Improved Expansion of MSC Without Loss of Differentiation Potential, Anissa S.H. Chan, Electra Coucouvanis, Susan Tousey, Marnelle D. Andersen and Jessie H.T. Ni

1.1.2 Karakterisering av MSC

MSC er lange og tynne celler med et spindellignende utseende og utstrekke fra cellekroppen som kan se ut som armer, og de ligner derfor en del på fibroblastceller (figur 4).

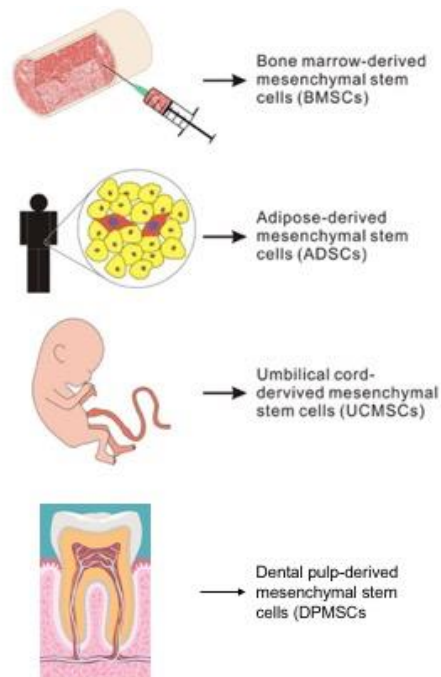
For å kunne kalles en MSC har det blitt opprettet forskjellige kriterier som må oppfylles. Disse kriteriene ble utviklet av “International Society for Cellular Therapy”. Det første kriteriet er at cellene må kunne feste seg til plastikk, som for eksempel en petriskål. Det andre kriteriet er at cellene må uttrykke visse markører på celleoverflaten (CD73+ CD90+ CD105+), og ikke uttrykke andre markører (CD34- CD45- CD11b- CD14- CD19-CD79a- HLA-DR-), og siste kriteriet er at cellene må ha potensial til å differensiere til chondrocytter, adipocytter og osteocytter (8).



Figur 4: Morfologi av MSC som tydelig viser spindellignende utseende.

1.1.3 Forskjellige kilder til MSC

Forskning har vist at MSC kan hentes ut fra veldig mange vev, men de vanligste er beinmarg, fettvev, navlestreng, morkake (10, 11) og dental pulpa (12) (figur 5).



Figur 5: Ulike kilder til MSC. Utarbeidet fra "Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine".

I vår oppgave har vi fokusert på de mesenchymale stamcellene isolert fra beinmarg og fettvev, og vil derfor ikke gå nærmere inn på de andre kildene til MSC.

Beinmarg var den første kilden der man påviste MSC (1), og fram til i dag har mye av forskningen hatt fokus på MSC isolert fra beinmarg (BM-MS) (13).

Beinmarg finnes i hulrommet som er inne i de store knoklene, og er delt inn i en hematopoetisk del og en ikke-hematopoetisk del. BM-MS hentes ut fra den ikke-hematopoetiske delen (3).

Ulemper ved bruken av BM-MS er smertene som kan påføres pasienten ved uthenting av celler, samt ofte lavt utbytte og mulighet for permanent skade på donorstedet. Dette har gjort at man har undersøkt andre vev for MSC. Mesenchymale stamceller isolert fra fettvev (AD-MS) har blitt mer attraktive for forskere, da disse hentes ut fra fettvevet til mennesket og er lettere tilgjengelig (1).

Fettvev består av fettceller, bindevev og blodkar, og AD-MSC er lokalisert i bindevevet som ligger rundt de små blodårene i vevet (3).

Bruk av stamceller i behandling har de siste årene vokst fram som et alternativ i regenerasjon og reparasjon av organer og vev som har blitt skadet av sykdommer, og på grunn av deres egenskaper har MSC stått i fokus (13).

1.2 Stamcelleterapi

Det er registrert om lag 800 kliniske studier som omhandler MSC (14). Det har også blitt forsket en del på de embryonale stamcellene, men som tidligere nevnt vil det på grunn av begrensninger i genetisk manipulasjon og etiske problemstillinger rundt høsting av disse, gjøre at cellene sjelden blir tatt i bruk i forskning (13).

I motsetning til de pluripotente embryonale stamcellene er ikke de voksne stamcellene like begrenset av etikk eller tilgjengelighet, noe som gjør at de er godt egnet til bruk i forskning og eventuell stamcelleterapi. Av de forskjellige typene voksne stamceller som blir beskrevet i litteraturen, er det særlig AD-MSC og BM-MSC som har stått i fokus når det kommer til stamcelleterapi (1).

Ved å sammenligne AD-MSC med BM-MSC, har man funnet ut at de har lignende morfologi, differensieringspotensiale og uttrykker mange av de samme cellemarkørene (13). Stamceller isolert fra fettvev er å foretrekke på grunn av det store omfanget av celler som kan hentes ut, og lavere fare for permanent skade på donorstedet. Utbyttet er 500 ganger større sammenlignet med samme mengde vev fra beinmarg, og AD-MSC fra fettvev kan fryses ned i opptil seks måneder som garanterer at de er tilgjengelige for terapeutisk bruk i framtiden. Det er også gjort funn som viser at forskjellige faktorer som frigis fra ASC kan ha kosmetisk effekt i tillegg til fysiologiske effekter, men dette går vi ikke videre inn på i denne oppgaven (13).

Det har vært gjort mye forskning på MSC i senere tid, og da særlig til bruk i sårtilheling. Det er blant annet vist at MSC gir bedre tilheling i flere typer sår. I tillegg til dette har det blitt observert flere mekanismer som øker sårtilheling ved hjelp av MSC, gjennom økt dannelse av blodkar og reduksjon av inflammatoriske prosesser i vevet (15).

Både BM-MSC og AD-MSC har blitt brukt i flere kliniske forsøk:

I 1999 ble det brukt allogent BM-MSK til å øke mineralinnholdet i bein hos barn med Osteogenesis Imperfecta (16).

I 2006 ble det gitt BM-MSK til pasienter med akutt hjerteinfarkt, hvor pasientene opplevde bedret hjertefunksjon i opptil 1 år (17).

AD-MSK har blitt brukt i kliniske forsøk i behandling av Crohn's, som er en autoimmun sykdom og fører til inflammasjoner i tarmsystemet. Resultatene fra de kliniske studier viste signifikant forbedring etter behandling (18).

Det har også blitt gjort prekliniske studier som kan tyde på at MSK kan ha en terapeutisk effekt på multippel sklerose (MS). Studiene er fremdeles i preklinisk fase, så det er foreløpig ikke funnet noen behandling som har vist seg å fungere på denne sykdommen (19).

I de fleste vev i kroppen finner vi MSK, men til tross for dette er den totale andelen celler i kroppen lav. Dersom en skal bruke stamcellene i behandlingen ved transplantasjon, er en avhengig av å ha et svært stort antall celler. Antall stamceller man får ut ved høsting er blant annet avhengig av pasientens alder. Når man høster disse cellene må man i tillegg ekspandere cellene i opptil ti uker før de er klar for klinisk bruk, noe som er både omfattende, dyrt og tidkrevende. Mindre enn 0,1% av cellene som høstes er MSK (20, 21).

I tillegg til dette har studier vist at tiden cellene er i kroppen er for kort til å ha en effektiv effekt, dette på grunn av at nesten ingen av cellene overlever lenger enn en uke. Effekten en får ved bruken av MSK kan derfor antas å kunne skyldes faktorer som skilles ut fra MSK, også kalt cellesekret, og man har i den forbindelse rettet fokuset mot disse faktorene til bruk i behandling (21).

Flere studier som omhandler faktorene som utskilles fra stamcellene har vist at disse alene kan medføre tilheling av vev. Det betyr at man ikke trenger å bruke selve cellene i behandlingen, noe som medfører at man heller ikke trenger å finne en passende donor til hver mottaker (22).

1.3 MSC-sekret og terapi uten bruk av transplanterte stamceller

Som nevnt ovenfor finnes det noen ulemper ved å benytte transplanterte stamceller i terapi, og det har derfor vokst fram en ny type behandling som tar sikte på å benytte seg av kommunikasjonen mellom celler ved hjelp av cellesekretet som skilles ut fra stamcellene (21, 23).

Metodene cellene bruker for å kommunisere med hverandre kalles parakrin- eller autokrin signalisering, og er avhengig av hvilken metode som blir benyttet av den respektive cellen. Parakrin signalisering er kommunikasjon med celler som ligger i nærhet til hverandre, mens autokrin signalisering er en type kommunikasjon hvor cellen fremkaller en reaksjon i seg selv ved å skille ut sekret som festes til reseptorer på celleoverflaten (24).

Cellesekretet består av ulike faktorer som blant annet vekstfaktorer, cytokiner, kjemokiner og andre molekyler som er viktige for å påvirke miljøet rundt. Dette er faktorer som kan aktivere eller dempe signalproteiner i cellene, og forteller cellene når de skal vokse eller slutte å vokse, eller om de skal differensiere til spesielle celletyper (4). Disse vil bli nærmere omtalt senere i oppgaven.

I regenerative behandlingsformer vil stamcellene være svært sårbare for iskemi, noe som kan føre til at det blir dårligere parakrinsekresjon og funksjon (25). Studier tyder på at den parakrine effekten av MSC-sekretet er en veldig viktig faktor i vevsreparasjon og tilheling (26, 27). MSC-sekret inneholder trofiske og immunmodulerende faktorer. Et eksempel på disse er ekstracellulære proteiner, vekstfaktorer, cytokiner, kjemokiner og andre molekyler som påvirker det omliggende vev (28, 29).

Positive mekanismer som har blitt rapportert fra MSC-sekret, viser at de har både antiinflammatorisk- (30), og anti-apoptotisk aktivitet (31), samt at de hjelper til i sårtilheling (32) og i vevsregenerasjon (33). De kan også regulere angiogenesen (34), og har både antitumor- (31), og antimikrobiell effekt (33). Vi går ikke spesifikt inn på hver av disse egenskapene.

Ved å benytte seg av MSC-sekret håper man at man vil kunne redusere noen av ulempene som kan oppstå ved bruk av transplanterte stamceller, slik som dannelse av tumor, dannelse av embolier og risikoen for overførbare infeksjoner. Det er i tillegg en enklere måte for farmasøyter å kunne evaluere dose, styrke og sikkerhet i forbindelse med bruken av disse, og å ha mulighet til å masseprodusere spesifikke cellelinjer under kontrollerte forhold.

Det er heller ingen tvil om at både kostnader og tid vil kunne bli redusert (21).

Ved å ta vare på MSC-sekretet, vil man samle opp signalmolekylene fra stamcellene, som man antar har en parakrin effekt. Man tror dette vil være en mer økonomisk og mindre invasiv metode (21, 35).

1.4 Kondisjonert medium

MSC har en stor evne til å skille ut mengder signaler som vekstfaktorer, kjemokiner og cytokiner. Cytokiner er proteiner som er med på å regulere immunsystemet, og er derfor viktige for å kunne gjenkjenne og bekjempe mikrober (36), mens vekstfaktorene er viktige fordi de aktiverer eller demper signalproteiner i cellene (4). Kjemokinenes rolle er å skille ut signalproteiner, og deltar i den første responsen ved en skade ved å starte den inflammatoriske fasen (37). *In vitro* forsøk har vist at når man dyrker MSC, vil en finne store mengder av disse elementene i selve mediumet som stamcellene har vokst i. Dette mediumet kalles derfor for kondisjonert medium (CM) (38).

Det gjøres mye forskning på effekten av CM i sårtilheling. Blant annet har en studie fra vår gruppe vist gunstig effekt av pulpa-stamcelle CM på beintilheling ved beinforlenging. I samme forsøk ble det også vist at CM, har en gunstig effekt over kontrollgruppen på dannelsen av endotelceller *in vitro*. I tillegg ser det ut som at CM, promoterer sårtilheling av endotelceller *in vitro* i et såkalt wound-healing assay forsøk (39).

CM fungerer nå som en ny regenerativ behandlingsform, og har gitt vellykkede resultater som har oppmuntret forskere til å bruke kondisjonert medium i sårtilheling uten at stamcellene er tilstede i såret (38).

1.5 Sårtilheling

Helt siden oppdagelsen av MSC og etableringen av cellelinjer, har mye av forskningen gått ut på å finne ut hvilken effekt MSC har på sårtilheling, da tidligere arbeid har vist at MSC spiller en viktig rolle i sårtilhelingsprosessen (1, 13).

Da vår oppgave har fokusert på osteoblastlignende celler, vil vi i dette avsnittet referere til frakturtilheling.

Selve sårtilhelingen består av fire faser; hemostase, inflammasjon, proliferasjon og remodellering (1, 13).

Hemostase er fasen som starter umiddelbart etter at en skade har oppstått og varer i noen timer. Blodårene som har blitt skadet vil trekke seg sammen i respons fra blodplater slik at blodtapet reduseres, og det dannes et koagel bestående av cytokiner og vekstfaktorer (40).

Koagelet som produseres inneholder forskjellige molekyler som er med i dannelse av en midlertidig matriks, og fungerer som et stillas for migrering av celler.

I tillegg til å danne koagelet, vil blodplatene påvirke infiltrasjon av leukocytter ved hjelp av kjemokiner (40).

I inflammasjonsfasen vil makrofager strømme til skadestedet som en reaksjon på nedbrytning av blodplater og biprodukter fra bakterier, og de vil spise opp alt celleavfallet samtidig som de skiller ut vekstfaktorer, kjemokiner og cytokiner. Disse faktorene hjelper til å aktivere den neste fasen, som er proliferasjonsfasen.

Proliferasjonsfasen har i oppgave å danne en overflate på såret, granulasjonsvev og å gjenopprette karsystemet via en prosess som kalles angiogenese, og alt dette finner sted 3-10 dager etter skaden oppstod.

Siste fase i sårtilhelingsprosessen kalles remodelleringsfasen og skjer fra dag 21, og kan holde på i opp til ett år etter at skaden oppstod. Vi får da en sammentrekning av vevet slik at arret blir så lite som mulig, og blodstrømmen fra såret reduseres (40).

For å få en tilfredsstillende tilheling må alle disse fasene finne sted til riktig tid og rekkefølge. Dersom det oppstår en svikt i en av disse mekanismene kan man få dårlig tilheling som blant annet kan føre til kroniske sår (13).

Tilheling av bein omfatter inflammasjons-, proliferasjons- og remodelleringsfasen som beskrevet ovenfor. Selve tilhelingsprosessen er komplisert og avhenger også av samspillet mellom osteogenese, som er dannelsen av bein, og angiogenese, som er dannelse av blodkar. Rekruttering av BM-MSK til bruddstedet er nødvendig da disse cellene spiller en viktig rolle i beintilhelingen, og skjer ved hjelp av signaler fra kjemokiner. Det er også gjort studier som viser at MSC kan øke beintilheling ved å stimulere angiogenese (41).

Det har blitt vist at AD-MSK kan initiere vevsregenerasjon ved to ulike mekanismer, enten ved differensiering til spesialiserte celler, eller ved sekresjon av parakrine faktorer som kan sette i gang sårtilhelingen ved en nedregulering av inflammasjonsresponsen. Det er også vist at AD-MSK har potensiale til å fremme angiogenese, utskille vekstfaktorer og differensiere til flere cellelinjer dersom de blir stimulert (13).

For å prøve å påvirke tilhelingsprosessen var den vanligste metoden tidligere å tilføre MSC direkte inn i det ødelagte vevet, slik at cellene kunne feste seg og differensierer til spesialiserte celler. Det har blitt vist at kun en liten del av cellene integreres og forskere har derfor kommet fram til at mekanismen til stamcellenes deltakelse i vevstilheling i stor grad kan skyldes deres vekstfaktorer (38).

Flere studier har beskrevet at regenerering av skadet vev kan skyldes tilstedeværelsen av vekstfaktorer i MSC-CM (21, 41, 42).

1.6 Bakgrunn

Det har blitt vist at MSC har positiv effekt på sårtilheling gjennom blant annet økt dannelse av blodkar og antiinflammatoriske egenskaper (15). Det har også blitt antydnet at den gunstige effekten på sårtilheling kan være grunnet faktorene som utskilles fra stamcellene (22), og at cellene i seg selv ikke overlever lenge i kroppen (21), og effekten av cellene blir ofte dårligere på grunn av iskemi (25). Den positive effekten av cellesekretet har medført økt forskning på sekretomene som utskilles fra MSC, som blant annet inneholder vekstfaktorer (4).

Det er gjort mye forskning på BM-MSK og det er begynt å gjøres en del forskning på AD-MSK, men det er ingen som har sammenlignet effekten av fettvev- og beinmargstamceller fra samme donor.

Ved å benytte et kondisjonert medium, det vil si et medium som inneholder MSC-sekret, kan man potensielt redusere behandlingskostnader og forhåpentligvis redusere tid på sårtilheling (21). Dette vil være en mye mer økonomisk og mindre invasiv metode enn ved celletransplantasjon (21, 35).

Det er gjort mye forskning på BM-MSK og det er begynt å gjøres en del forskning på AD-MSK, men vi har ikke funnet litteratur som har sammenlignet effekten av fettvev- og beinmargstamceller fra samme donor. Vi ønsket å undersøke effekten av kondisjonert medium fra fettvev og beinmarg fra samme donor på sårtilheling ved hjelp av et scratch-wound assay.

1.7 Hovedmål

Det overordnede målet for denne oppgaven er å undersøke effekten av CM fremstilt av MSC fra både beinmarg (hBMSC-CM) og fettvev (hAMSC-CM) har på sårtilheling i et beincelleligdende-lag. Vi vil også undersøke om vi finner en forskjell i effekt på sårtilheling mellom hBMSC-CM og hAMSC-CM.

2 Material og metode

2.1 Cellekulturene

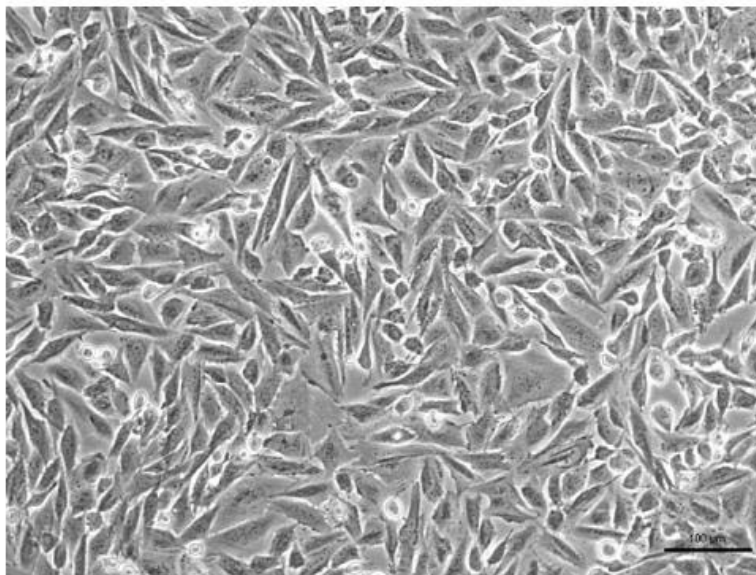
I dette forsøket har vi brukt kommersielt tilgjengelig Osteosarcoma cellelinje Saos-2 (ATCC, Manassas, Virginia, United States) og humane stamceller hentet fra beinmarg (hBM-MSc) og fra fettvev (hAD-MSc) fra samme donor.

Uthenting av MSc fra donor ble godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) i Norge (2013/1248/REK sør-øst C). Etter informert samtykke fra foresatte ble det tatt menneskelig fettvev- og beinmargsprøver fra en pasient mellom 7-12 år som hadde hatt inngrep i hoften grunnet behandling for leppe/kjeve/gane-spalte på avdeling for plastikk-kirurgi, Haukeland Universitetssykehus, Bergen, Norge.

Humane BM-MSc og hAD-MSc ble karakterisert ved hjelp av Flow Cytometry og >90% av cellene utrykte CD29, CD44, CD105 og CD166, og de manglet uttrykk for CD14, CD34 og CD45.

Humane BM-MSc og hAD-MSc ble dyrket i T175 vevskulturflaske (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) med 3000-5000 celler/cm² i (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) medium med 10% Fetal Bovine Serum (FBS) og 1% Penicillin streptomycin (P/S) (HyClone, GE Healthcare, Illinois, USA) i en inkubator med 5% CO₂ i 37°C. Medium ble byttet ca. hver tredje dag.

Saos-2 ble dyrket i T175 vevskulturflaske (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) med 50000 celler/cm² i (McCoy's 5A Medium Modified, Thermo Fisher Scientific) 15%FBS 1% P/S i inkubator ved 5% CO₂ i 37°C. Saos-2 cellelinje er rapportert å være en god representasjon av primære ustimulerte osteoblaster (43).



Figur 6. Saos-2 før skrapet ble gjort. Cellene er her 100% konfluente.

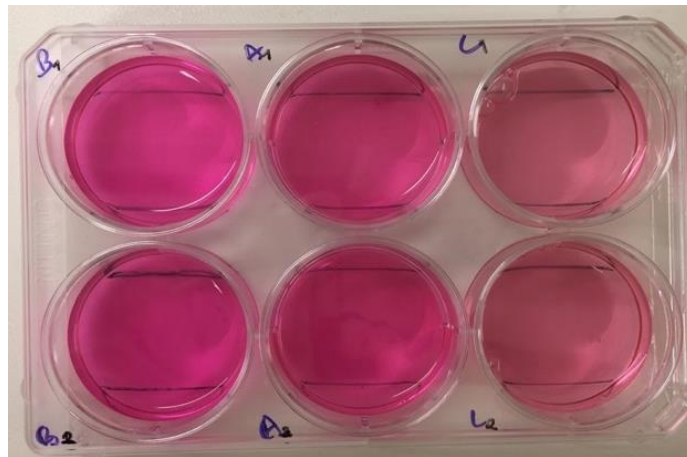
2.2 Fremstilling av kondisjonert medium

Når stamcellene under “passage 4” var 70-80% konfluente startet vi sultingen av stamcellene, for at de skulle produsere sine egne vekstfaktorer slik at vi kunne hente faktorene ut i kondisjonert medium. Først ble kulturmediumet fjernet og cellelaget ble vasket med Phosphate-Buffered Saline (PBS) tre ganger. Mediumet ble deretter byttet til (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) medium med 0%FBS. Etter å ha sultet stamcellene i 1,5 dager i inkubator ble medium med vekstfaktorer ekstrahert, sentrifugert på 1200g i 10 min to ganger, filtrert gjennom 0.2 μm filter og deretter fryst ned i -20°C i påvente av forsøket.

2.3 Forberedelser før scratch-wound assay

Da Saos-2 cellene var konfluente ble de splittet ved hjelp av trypsin. Mediumet ble fjernet og cellene ble vasket med PBS for å eliminere all FBS. Deretter ble cellene tilsatt trypsin og cellene ble inkubert i 5 minutter. Etter denne tiden observerte vi cellene i mikroskop for å se at cellene hadde løsnet fra underlaget og fra hverandre. Deretter tilsatte vi like mye medium med 15% FBS for å stoppe reaksjonen. Deretter tok vi ut blandingen med trypsin, medium og

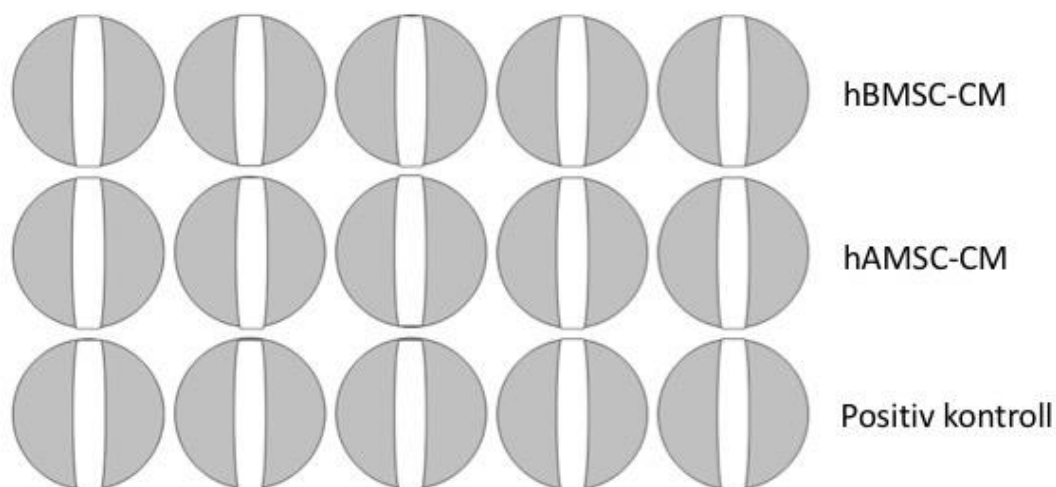
celler, og fordelte dette i sterile engangs sentrifugeringstuber. Blandingen ble sentrifugert på 1200g x 5 min for å samle cellene i en pellet i bunnen av tubene. Blandingen av trypsin og medium ble fjernet og pelleten ble deretter løst opp og blandet med nytt medium. Deretter telte vi hvor mange celler vi hadde og fordelte cellene i 6-brønns plater med McCoy's, medium i inkubator. Det ble dyrket ca. 500 000 celler i hver brønn. Disse brønnene var på forhånd markert ved hjelp av en steril pipette som linjal og en sprittusj. Markeringen var en rett linje i øvre del av brønnene og en i nedre del (figur 7).



Figur 7. Brønnene med linjer tegnet i øvre del og nedre del.

2.4 Scratch-wound assay

Etter 1,5 dager i inkubator var cellene omtrent 100% konfluente. Medium ble fjernet fra brønnene. Ved hjelp av en 200 μ l pipette ble det laget et skrap vertikalt i midten av alle brønnene (se figur 7). Cellene ble deretter vasket med PBS for å fjerne gammelt medium og løse celler. Deretter ble det tilsatt DMEM medium 0% FBS kondisjonert med vekstfaktorer fra hAD-MSC (hAMSC-CM) til 5 brønner, DMEM medium 0% FBS kondisjonert med vekstfaktorer fra hBM-MSC til 5 brønner (hBMSC-CM) og McCoy's med 15% FBS og 1% P/S til 7 brønner (positiv kontroll). (figur 8)



Figur 8. Forsøksdesign. 5 brønner med hBMSC-CM, 5 brønner med hAMSC-CM og 5 brønner med positiv kontroll.

2.5 Analyse av lukking av skrap

Observasjon av sårtilhelingen ble gjort på den måten at det ble tatt bilder på samme sted i alle brønnene i et forhåndsbestemt intervall. For å standardisere bildetakingen tok vi bildene av skrapene tett opp til den øverste linjen og tett ned mot den nederste linjen som vi tegnet på hver brønn. Dette gjorde at områdene hvor vi tok et bilde var det samme området vi tok bilde på ved neste tidspunkt. Bildene ble tatt med kamera Nikon TS100 Tokyo, Japan, med 4x objektlinse. Det ble tatt et bilde ved kryssingen mellom den øvre linjen i brønnen og skrapet og et ved den nedre linjen i brønnen og skrapet. Dette ble gjort på samtlige brønner bortsett fra de hvor det var områdene hvor skrapet ikke var tydelige, eller det av andre grunner ikke var mulig å få et godt bilde. Her ble bildene tatt andre plasseringer, men på samme plass hver gang. Dette medførte 10 bilder av gruppe hAMSC-CM, 10 bilder av gruppe hBMSC-CM og 10 bilder av den positive kontrollgruppen grunnet områder i noen brønner hvor det ikke var mulig å ta bilder. Det ble tatt bilder ved 1t, 3t, 6t, 12t, 24t og 48t.

Programvare NIS-ELEMENTS ble brukt for å måle avstanden på skrape. Dette ble gjort ved at begrensningene av såret ble identifisert med to vertikale linjer. Deretter ble avstanden mellom disse linjene målt med tre horisontale linjer. De horisontale linjene ble plassert slik at de delte de vertikale linjene i tre relativt like deler.

2.6 Statistisk analyse

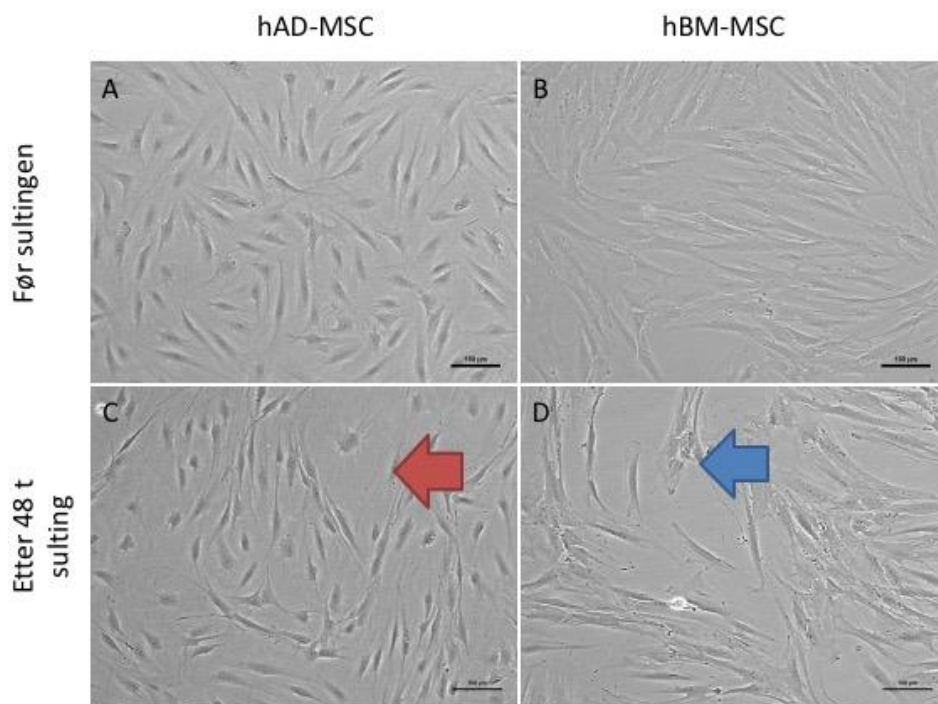
Verdiene av linjene ble overført til Microsoft Excel 15.40. Her ble det gjort utregninger en gjennomsnittsverdi av de tre horisontale linjene. Det ble også utført utregninger på gjennomsnittsverdiene ved hjelp av Stata/IC 15.0. Her fant vi standardavviket for hver verdi og 95% konfidensintervall. Disse verdiene ble gjort om til en graf ved hjelp av programmet. For å undersøke om det var signifikant forskjell i resultatene av hBMSC-CM og hAMSC-CM utførte vi en t-test ved hjelp av Stata/IC 15.0.

Videre ble alle disse verdiene presentert som gjennomsnitt overført til programvaren SPSS 23. Verdiene ble testet for outliers, og disse verdiene ble deretter fjernet. SPSS regnet også ut standardfeil for hver gruppe og 95% konfidensintervall. Signifikant forskjell mellom gruppene og tidspunktene ble testet ved hjelp av One-Way ANOVA etterfulgt av en mangfoldig sammenlignende Tukey Test. Signifikansen ble satt til $P < 0.05$.

3 Resultat

3.1 Cellemorfologi

Etter å ha dyrket hAD-MSK og hBM-MSK kunne vi tydelig se karakteristiske tegn på MSC (figur 9).



Figur 9. Morfologi av MSC fra ulike kilder før og etter sulting. Bilde A og C er fra AD-MSK og B og D er fra BM-MSK. Bilde A og B er fra før sulting og C og D er fra etter sulting. Den røde pilen peker på en stamcelle som har blåst seg opp. Den blå pilen peker på en celle som mister sin klassiske morfologi.

Vi ser lange og tynne celler med et spindellignende utseende og utstrekke fra cellekroppen som kan se ut som armer. ASC vokste fortere, dette ser vi fordi de har mindre cellekropper. Etter at cellene har blitt sultet ser vi at noen av cellene har blåst seg opp. Dette er et tegn på at cellene holder på å dø og at de er stresset uten serum.

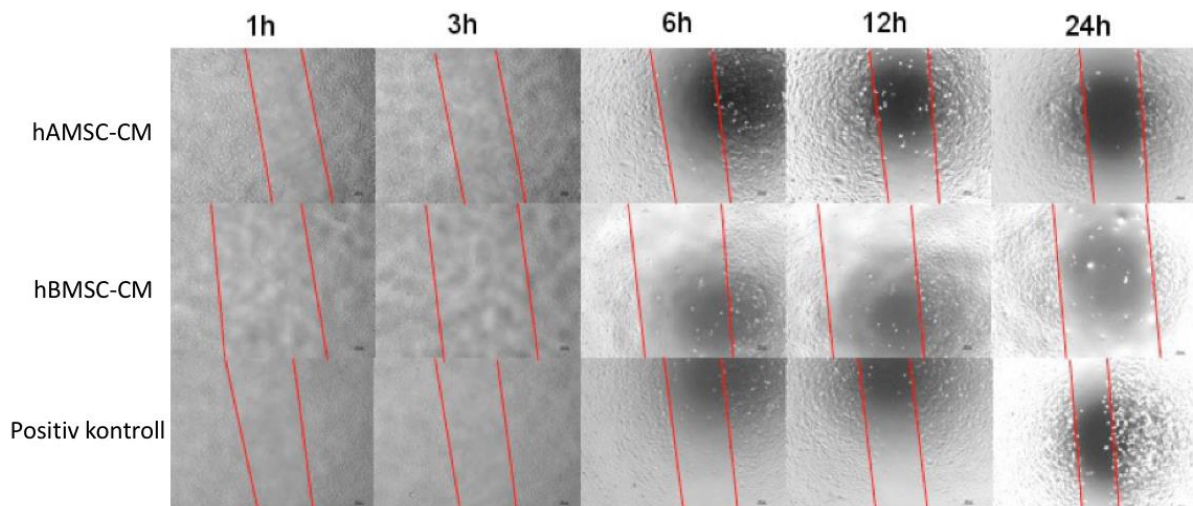
3.2 Resultatet av scratch-wound assay

Tabell 1: Gjennomsnittlig bredde på skrap.

	1h	3h	6h	12h	24h
hBMSC-CM	699,12	704,96	693,54	628,22	624,89
hASC-CM	762,79	801,69	795,02	745,64	771,46
Pos-ctrl	686,05	668,89	645,77	551,48	444,77

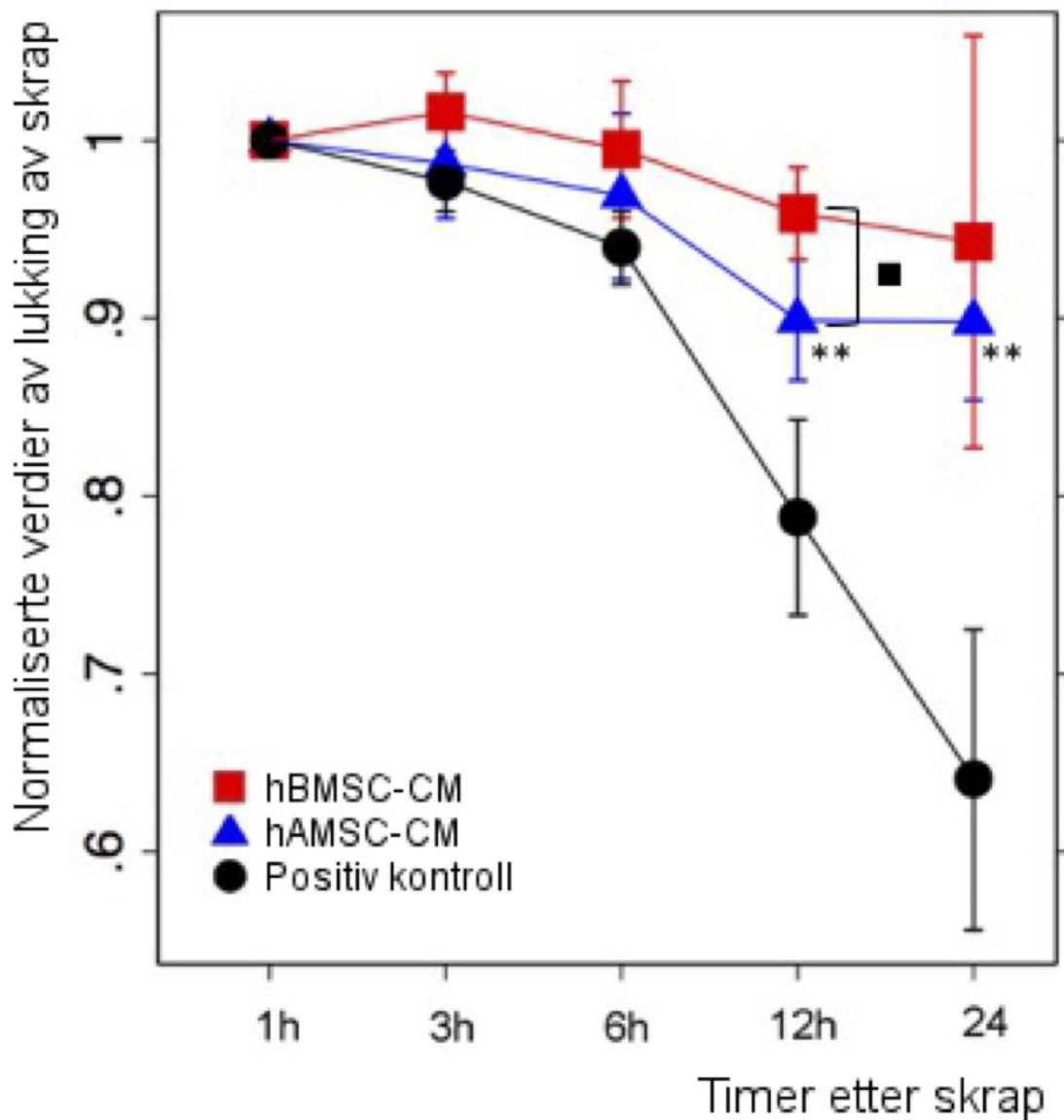
Tabell 2: Normaliserte tall

	1h	3h	6h	12h	24h
hASC-CM	1	0.987	0.969	0.899	0.894
hBMSC-CM	1	1.016	0.995	0.960	0.943
Pos-ctrl	1	0.978	0.940	0.788	0.641



Figur 10. Bilder av skrapene i hver gruppe til hvert tidspunkt. Øverste rekken med 5 bilder er AMSC-CM. Andre rekken med 5 bilder er BMSC-CM og nederste rekken er det positiv kontroll. De røde linjene markerer cellebegrensningene i skrapene.

I brønnene som inneholdt osteoblaster tilsatt ikke-kondisjonert medium (positiv kontroll) ble gjennomsnittlig bredde på skrapet målt til 686,05 etter 1 time i inkubator med 5% CO₂ i 37°C. Videre begynner cellene å migrere inn i området uten celler. Etter 3 timer er avstanden 668,89 og etter 6 timer er den 645,77. Etter 12 timer har gjennomsnittsavstanden fra osteoblastene på ene siden av skrape til den andre siden minket til 515,14. Når det hadde gått 24 timer etter at skrapet ble dannet var gjennomsnittsavstanden mellom begrensningene på 444,77. Etter normalisering av verdiene gikk lukningsgraden av såret fra verdi 1, etter 1 time til 0.641 etter 24 timer.



Figur 11. Graf av verdiene fra scratch-wound assay. Svart firkant markerer at det er signifikant forskjell mellom gruppen med BMSC-CM og ASC-CM ved 12 timer. Stjernene marker at det er signifikant forskjell (med $P < 0.01$ mellom ASC-CM ved 12 og 24 timer i forhold til 1, 3 og 6 timer).

Hos Saos-2 som ble skrapet og deretter tilsatt medium kondisjonert av humane stamceller fra beinmarg (hBMSC-CM) ble gjennomsnittsavstanden etter 1 time i inkubator målt til å være 749,53. Etter 3 timer har gjennomsnittsavstanden ikke minket, men økt til 752,92. Deretter er gjennomsnittsmålingen av bredden på skrapet 747,58 etter 6 timer. Etter 12 timer i inkubator er avstanden mellom begrensningene 708,79, som er den lavest målte gjennomsnittsavstanden på skrapet for denne gruppen. Etter 24 timer er gjennomsnittsavstanden 771,46. Dette er en grad av lukking på 0.943.

Gruppen med Saos-2 og medium kondisjonert av humane stamceller fra fettvev(hAMSC-CM) ser ut til å ha gjort det noe bedre enn gruppen med medium kondisjonert med (hBMSC-CM). Etter 1 time i inkubator var gjennomsnittsavstanden fra cellebegrensning til cellebegrensning på 699,12. Ved 3 timers tidspunktet var gjennomsnittlig bredde på 703,91. 6 timer etter skrapet ble utført var gjennomsnittsavstanden 660,72. Etter 12 timer har cellene migrert slik at gjennomsnittlig avstand har minket til 628,22. Ved siste måling, etter 24 timer, er gjennomsnittsavstanden mellom cellebegrensningene på 624,89. Etter normalisering av verdiene ser vi at graden av lukking av skrapet går fra verdi 1, etter 1 time til 0.894, etter 24 timer.

Av grafen ser vi at konfidensintervallene i gruppe hAMSC-CM og hBMSC-CM overlapper ved samtlige tidspunkt. Dette gjelder også dersom man sammenligner de to gruppene med kontroll-gruppen ved alle tidspunkt bortsett fra etter 12 og 24 timer.

Etter å ha gjort en One-Way ANOVA, Tukey test i SPSS 23 fant vi signifikant forskjell mellom bredden på skrapene i gruppen med hAMSC-CM mellom tidspunktene 6 timer og 12 og 24 timer (som er vist med ** i figur 10). Dette gjør at vi med sikkerhet kan si at det blir en lukking i skrapene i gruppe hAMSC-CM. Dette kan vi ikke si for gruppen med hBMSC-CM. Ved 12 timer kan vi derimot si at det er signifikant forskjell mellom bredden på skrapene til hBMSC-CM og hAMSC-CM (markert med firkant på figur 11).

4 Diskusjon

Det vi fant i dette forsøket var en tydelig lukking av skrapet laget i Saos-2-cellene som ble tilsatt ikke-kondisjonert medium. Det var en liten tendens til lukking av skrapene med hBMSC-CM og en større tendens til lukking av skrapene tilsatt hAMSC-CM. Forskjellen mellom lukkingsgrad av hBMSC-CM og hAMSC-CM var signifikant ved 12 timer, og på grafen ser vi en generell tendens som antyder at skrapene med hAMSC-CM har lukket seg noe mer enn hBMSC-CM. Dette kan også støttes ved at vi statistisk har en signifikant lukking av skrapene tilsatt hAMSC-CM fra tidspunkt 1 time til 12 timer og 24 timer, men ikke en signifikant lukking av skrapene tilsatt hBMSC-CM på noe tidspunkt sammenlignet med dens startpunkt.

Som nevnt tidligere i denne oppgaven er det flere ulemper ved bruke stamceller i terapi (38). I tillegg har forskning tydet på at den største delen av stamcellers effekt på sårtilheling er ved utskillelse av vekstfaktorer. Det har derfor vokst fram en ny type behandling som tar sikte på å benytte seg av kommunikasjonen mellom celler ved hjelp av faktorene de skiller ut, også kalt cellesekretet (21, 23).

Med denne nye typen behandling kommer et håp om å redusere tid på sårtilheling og redusere behandlingskostnader (21).

Dannelsen av et kondisjonert medium med MSC-sekretet vil være en mye mindre invasiv metode, mindre kostbar og mindre tidkrevende (21, 35). Ved å benytte dette MSC-sekretet vil man også kunne redusere ulempene som kan oppstå ved bruk av transplanterte stamceller (21).

På bakgrunn av dette ønsket vi å gjøre et forsøk hvor vi undersøkte effekten av vekstfaktor og andre faktorer fra to ulike MSC-typer, hAD-MSC og hBM-MSC i form av CM.

Før dette forsøket utførte vi en pilotstudie. Da brukte vi L929 fibroblaster istedenfor Saos-2. Selve skrapene ble utført med et 2mm bredt metallinstrument i tillegg til en 200µl pipette. Der vi brukte metallinstrumentet for å fremstille skrapet ble det celleløse området for stort for det digitale kameraet på mikroskopet, slik at vi ikke fikk med begge begrensningene av skrapet i bildet. I tillegg ble det riper i bunnen av brønnen som vi tydelig kunne se i mikroskop. Vi så også at fibroblastene var ganske store celler som ga oss en noe ujevn cellebegrensning på skrapet. Pilotforsøket ga oss derfor informasjon som gjorde at vi valgte å bruke Saos-2 istedenfor L929 fibroblaster og at vi utførte selve skrapet med en 200 µl pipette

istedenfor et annet instrument. I tillegg til at Saos-2 har vist seg å være lik osteoblaster (43), ville vi gjerne bruke disse da vi er interessert i å se på effekten av CM på beintilheling.

Ved dyrking av hBM-MSK og hAD-MSK observerte vi at hAD-MSK vokste fortere og ble raskere konfluente enn hBM-MSK. Til og med etter sultingen var hAD-MSK flere enn hBM-MSK. Dette kan bety at vi fikk flere vekstfaktorer fra hAD-MSK under sulting, sammenlignet med hBM-MSK. Dette kan forklare forskjellen i ulik lukkingsgrad mellom hAMSC-CM og hBMSC-CM, og hvorfor det ser ut som at skrapet med hAMSC-CM lukker seg raskere.

Vi vet at det har vært gjort lignende studier hvor det har blitt vist forskjell mellom lukkingsrate av sår i mono-cellelag som har blitt tilsatt CM fra stamceller (44).

Det har også blitt fullført noen kliniske forsøk som omhandler bruken av cellesektret fra MSC. En studie som brukte allogent hAMSC-CM tilsatt på et solskadet hudområde etter det var behandlet med laser, ga bedre sårtilheling (45).

I dette forsøket brukte vi MSC fra beinmarg og fra fettvev høstet fra samme donor. Dette gir oss en styrke da vi ikke har usikkerhet mellom individuelle variasjoner mellom donorer. På en annen side så forteller resultatene våre utelukkende om hvordan CM fremstilt av MSC fra kun denne donoren virker på vevstilheling, uten at vi kan si noe om hvordan effekten av CM fremstilt fra MSC fra andre donorer er.

At den positive kontrollen har mye høyere lukkingsrate enn de to gruppene med CM kan forklares med at Saos-2 i positive kontroll var i McCoy's 5a Medium Modified med 15% FBS. Dette betyr at Saos-2 i den positive kontrollen hadde næring, samt bedre levevilkår enn Saos-2 i CM. Det kan derfor tenkes at flere av cellene har begynt å proliferere og dermed lukke skrapet på denne måten. Saos-2 i CM var i DMEM medium med 0% FBS. Dette betyr at det både var en annen type medium for denne typen celler og at de ikke hadde tilgang på næring. Det var et poeng i dette forsøket at Saos-2 ikke skulle proliferere ut i skrapet, men bare migrere mot hverandre fra begge sider av skrapet.

Det ble en nylig publisert en studie på proteiner for å sammenligne vekstfaktorer frigitt fra CM av MSC fremstilt fra fettvev, beinmarg og dentalt pulpavev. Denne studien viste at det er sannsynlig at disse faktorene er tett forbundet med angiogenese, migrasjon, inflammasjon og vevsregenerasjon. I tillegg viste studien sammenhengen til flere kjente terapeutiske effekter av MSC, nemlig ossifisering, vaskularisering og organoverlevelse (46).

Som tidligere nevnt i denne oppgaven har også en studie fra vår gruppe om CM effekt på beintilheling ved beinforlenging vist en gunstig effekt fra CM (39).

Disse studiene viser en gunstig effekt av CM på sårtilheling og beintilheling. Vi fant ingen studier som sammenligner forskjellen mellom hAMSC-CM og hBMSC-CM fra samme donor. Dersom flere studier viser at hAMSC-CM har like god klinisk effekt som hBMSC-CM, kan dette medføre at vi i fremtiden heller kan velge å høste MSC fra fettvev istedenfor fra beinmarg. Dette vil medføre at fremtidige pasienter kan gjennomgå en mye mer skånsom uthenting av MSC.

Som nevnt tidligere i oppgaven er det flere studier som tyder på at den parakrine effekten av MSC-sekret er en veldig viktig faktor i sårtilheling (26, 27). Vi vet at MSC-sekret inneholder blant annet vekstfaktorer, cytokiner og kjemokiner. Lukkingen av skrapene tilsatt CM kan dermed forklares av tilstedeværelsen av disse faktorene (28, 29).

En usikkerhet ved dette forsøket er hvor nøyaktig målingene av bredden på sårene er. Grensen mellom sår og cellelaget ble bestemt av oss for hvert enkelt bilde og en liten forskyvning av grensene på hver side vil utgjøre en forskjell på resultatet. Der det var spesielt vanskelig å se cellebegrensningene tydelig på bildet har vi valgt å ikke ta med verdiene i tabellen.

Det er også en usikkerhet knyttet til hvordan skrapet ble utført. Skrapet ble utført med en pipettetupp, da dette ble utført av oss kan vi ikke med sikkerhet si at det er lik bredde på alle skrapene ved starttidspunktet. For å kunne sammenligne de ulike skrapene i de forskjellige gruppene valgte vi derfor å normalisere resultatene våre. Dette medfører at vi kan sammenligne tallene fra hver gruppe med hverandre, og at vi kan lage en graf.

Ideelt sett burde vi hatt et bilde ved tidspunkt 0 i hver brønn for å ha en fast nullverdi for alle skrapene.

Den innsamlede data fra bildene ville vært mer presis dersom det hadde blitt brukt time-laps teknikk.

6 Konklusjon

Av dette forsøket finner vi en signifikant forskjell i lukking av bredden på sår mellom gruppene hAMSC-CM og hBMSC-CM ved tidspunkt 12 timer. I tillegg til dette ser vi en signifikant reduksjon av bredden i skrapet tilsatt hAMSC-CM ved tidspunkt 12 og 24 timer i forhold til 1 time. Vi ser også på grafen at det er en tendens til at det er mer lukking av skrapene tilsatt hAMSC-CM i forhold til hBMSC-CM. Utfra dette forsøket vil vi derfor foreslå at hAMSC-CM har lik, eller bedre effekt enn hBMSC-CM.

7 Fremtidig perspektiv

Det bør gjøres studier som går i dybden på hvilken rolle de forskjellige faktorene i CM har og hva disse kan brukes til. Det er fremdeles mye usikkerhet rundt de spesifikke mekanismene CM har på sårtilheling, og videre forskning på dette feltet er nødvendig.

Dersom man i fremtiden kan finne en måte å fremstille CM som medikament vil dette muligens kunne påvirke enkeltskjebner og potensielt spare samfunnet for store kostnader ved sykdomsbehandling og rehabilitering.

Kilder

1. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int.* 2015;2015:831095.
2. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-37.
3. Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent mouse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken).* 2014;297(1):98-110.
4. Goldstein L, Schneider M. *Stem Cells for Dummies.* Indianapolis, Indiana: Wiley Publishing; 2010.
5. Poh YC, Chen J, Hong Y, Yi H, Zhang S, Chen J, et al. Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nat Commun.* 2014;5:4000.
6. Sobhani A KNea. Multipotent Stem Cell and Current Application. 2017;55(1):6-23.
7. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.
8. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med.* 2013;28(4):387-402.
9. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res.* 2012;8:150.
10. Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis.* 2016;3(1):56-71.
11. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2011;112(4):1206-18.
12. Didilescu AC, Rusu MC, Nini G. Dental pulp as a stem cell reservoir. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(3):473-8.
13. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(3):313-25.
14. Medicine UNLo. ClinicalTrials.gov 2017 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=meseenchymal%20stem%20cells&cntry=&state=&city=&dist=>.
15. Motegi SI, Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci.* 2017;86(2):83-9.
16. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5(3):309-13.
17. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of

- enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(10):973-9.
18. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79-86.
 19. Bonad MM, Yazdanbakhsh S, Lofti J, Alimoghaddom K, Talebian F, Hooshmand F, et al. Does Mesenchymal Stem Cell Therapy Help Multiple Sclerosis Patients? Report of a Pilot Study. 2007;4(1):50-7.
 20. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):462-71.
 21. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
 22. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014;2014:965849.
 23. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Ann Transl Med.* 2017;5(7):170.
 24. Mosby's medical, nursing, & allied health dictionary. 2002. Mosby's medical, nursing, & allied health dictionary.
 25. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(5):907-21.
 26. Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, Fujio M, Shohara R, Hibi H, et al. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. 2013;61:82-90.
 27. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(6):H1888-97.
 28. Tran C, Damaser MS. Stem Cells as Drug Delivery Methods: Application of Stem Cell Secretome for Regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82-83:1-11.
 29. Jarmalaviciute A, Tunaitis V, Pivoraite U, Venalis A, Pivoriunas A. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy.* 2015;17(7):932-9.
 30. Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, Trohatou O, Pappa KI, Kapelouzou A, et al. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut.* 2012;61(6):894-906.
 31. Eiro N, Sendon-Lago J, Seoane S, Bermudez MA, Lamelas ML, Garcia-Caballero T, et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget.* 2014;5(21):10692-708.
 32. Stastna M, Van Eyk JE. Investigating the secretome: lessons about the cells that comprise the heart. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(1):o8-o18.
 33. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Trevino M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(2):983-92.

34. Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, Lin WS, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(8):e72604.
35. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(13-14):1479-89.
36. Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(12):2243-54.
37. Su Y, Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(11):631-40.
38. Bich NT, Khanh BTV, Huyen TL, Thao CT, Anh BV, Thang ND, et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cell from Wharton's Jelly of Human Umbilical Cord for Application in Wound Healing. 2016;32(1):153-60.
39. Fujio M, Xing Z, Sharabi N, Xue Y, Yamamoto A, Hibi H, et al. Conditioned media from hypoxic-cultured human dental pulp cells promotes bone healing during distraction osteogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(7):2116-26.
40. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):35-43.
41. Lin W, Xu L, Zwingenberger S, Gibon E, Goodman S, Li G. Mesenchymal Stem Cells Homing to Improve Bone Healing. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2017;9:19-27.
42. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22(4):862-72.
43. Saino E, Maliardi V, Quartarone E, Fassina L, Benedetti L, De Angelis MG, et al. In vitro enhancement of SAOS-2 cell calcified matrix deposition onto radio frequency magnetron sputtered bioglass-coated titanium scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(3):995-1008.
44. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*. 2010;316(7):1271-81.
45. Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Biomed Res Int*. 2013;2013:519126.
46. Tachida Y, Sakurai H, Okutsu J, Suda K, Sugita R, Yaginuma Y, et al. Proteomic Comparison of the Secreted Factors of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Dental Pulp. 2015;8(12):266-73.