

Toepassingen van mesenchymale stamcellen bij het paard: huidige stand van zaken

Current clinical applications of equine mesenchymal stem cells: update

¹C. De Schauwer, ²E. Meyer, ³G. Van de Walle, ¹A. Van Soom

¹Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde,

²Vakgroep Vergelijkende Fysiologie en Biometrie

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium.

³Baker Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Hungerford Hill Road, Ithaca NY 14853, VSA

catharina.deschauwer@Ugent.be

SAMENVATTING

Mesenchymale stamcellen (MSC) zijn adulte stamcellen met een beperkte differentiatiecapaciteit. Deze cellen kunnen therapeutisch aangewend worden om weefselregeneratie te stimuleren, vorming van littekenweefsel te voorkomen, immuunresponsen te moduleren en ontstekingsprocessen te reguleren.

Binnen de diergeneeskunde worden MSC bij het paard voornamelijk gebruikt voor orthopedische toepassingen, hoewel ze ook een rol zouden kunnen spelen in de behandeling van verschillende niet-orthopedische letsels, zoals allerhande immuungemedieerde, ischemische, inflammatoire en neurologische aandoeningen. De efficiëntie van MSC-therapie kan beïnvloed worden door de gebruikte dosis en de manier en het tijdstip van toedienen. Tevens zijn er voor- en nadelen verbonden aan het gebruik van autologe ten opzichte van allogene MSC.

Het gebruik van MSC bij paarden biedt immens veel mogelijkheden maar meer fundamenteel onderzoek en goed opgebouwde klinische trials zijn nodig zodat het potentieel van equine MSC ten volle kan geëvalueerd worden en equine MSC-gebaseerde therapieën kunnen geoptimaliseerd worden.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are adult stem cells, which are capable of self-renewal and restricted differentiation into multiple organ-specific cell types. The significant therapeutic potential of MSC arises from their ability to promote tissue regeneration, prevent pathological scar formation, modulate immune responses and regulate inflammation.

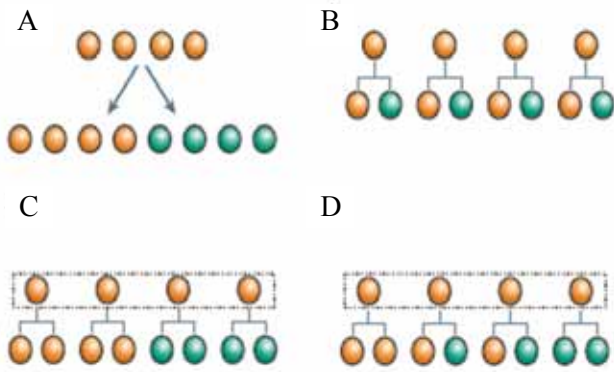
At present, MSC are mainly used in veterinary medicine to treat musculoskeletal injuries. Nevertheless, they may as well play a role in the treatment of several non-orthopedic diseases, such as immune-mediated, ischemic, inflammatory and neurological diseases. The treatment efficiency of MSC therapy can be influenced by the number of MSC which is used to treat the horse, the way the MSC are administered and the timing of the treatment. Moreover, there are advantages as well as disadvantages correlated to the use of autologous versus allogeneic MSC.

The use of MSC in the treatment of equine injury has exciting potential. However, more fundamental research and well-designed clinical trials remain mandatory in order to safeguard the optimal routine clinical use of these valuable equine MSC at the patients' benefit.

DEFINITIE EN CLASSIFICATIE VAN STAMCELLEN

Een stamcel wordt gedefinieerd aan de hand van drie criteria: ze moet in staat zijn om (1) dochtercellen voort te brengen met identieke stamceleigenschappen, 'self-renewal' genaamd, (2) te differentiëren naar

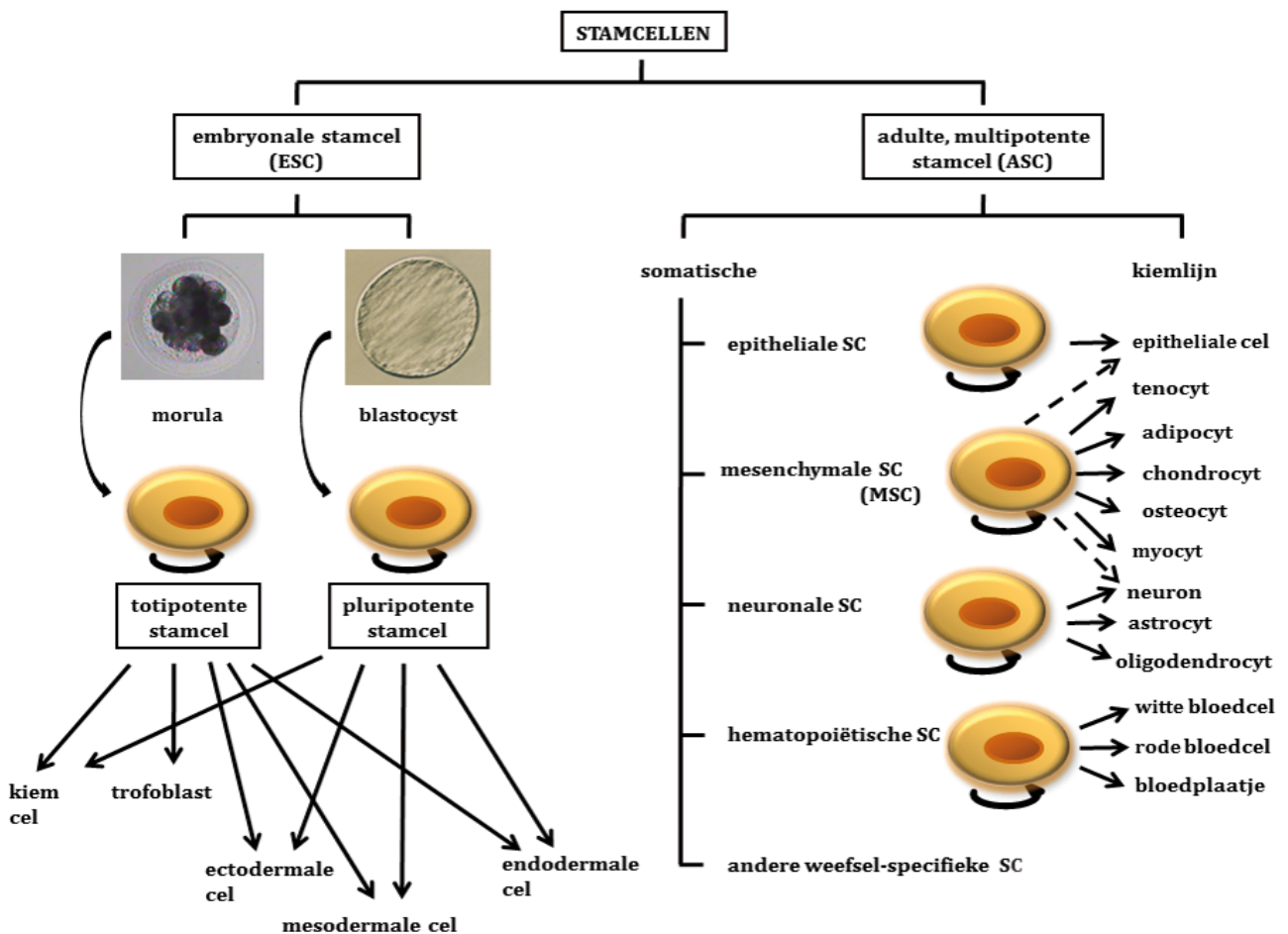
verschillende celtypen en (3) in vivo een bepaald weefsel opnieuw aan te leggen (Lakshmipathy en Verfaillie, 2005; Van Haver et al., 2008). Het proces van 'self-renewal' impliceert dat een cel enerzijds symmetrische delingen kan ondergaan, waarbij dochtercellen gevormd worden die dezelfde



Figuur 1. Mogelijke celdelingen van stamcellen. A. Stamcellen (in het geel weergegeven) zijn in staat tot ‘self-renewal’ maar kunnen ook aanleiding geven tot gedifferentieerde cellen (in het blauw weergegeven). **B, C, D.** Verschillende strategieën waardoor stamcellen het evenwicht bewaren tussen stamcellen en gedifferentieerde dochtercellen. **B.** Asymmetrische celdeling: elke stamcel geeft aanleiding tot één ongedifferentieerde stamcel en één dochtercel die begint te differentiëren **C.** Symmetrische celdeling: elke stamcel deelt ofwel in twee ongedifferentieerde stamcellen ofwel in twee gedifferentieerde dochtercellen. **D.** Combinatie van beide mogelijkheden: elke stamcel kan ofwel een symmetrische ofwel een asymmetrische celdeling ondergaan (naar Morrison en Kimble, 2006).

stamceleigenschappen als de moedercel vertonen, waardoor de stamcelpopulatie behouden blijft. Anderzijds kan een stamcel ook een asymmetrische celdeling ondergaan waarbij één dochtercel een stamcel blijft en de andere dochtercel begint te differentiëren (Ulloa-Montoya et al., 2005) (Figuur 1).

Algemeen worden stamcellen onderverdeeld in embryonale en adulte stamcellen, afhankelijk van het ontwikkelingsstadium waaruit ze worden geïsoleerd (Fortier, 2005) (Figuur 2). Cellen afkomstig uit de bevruchte eicel of zygoot zijn tot aan het 8-cellig morula stadium niet alleen in staat om de geslachtscellen en cellen van het ecto-, meso- en endoderm te vormen, maar ook de trofoblast die vereist is voor de overleving van het zich ontwikkelende embryo (Lakshmiathy en Verfaillie, 2005). Dergelijke stamcellen worden totipotent genoemd (Lakshmiathy en Verfaillie, 2005). Pluripotente stamcellen worden geïsoleerd uit de ‘inner cell mass’ van de blastocyst en kunnen differentiëren naar geslachtscellen en cellen van het ecto-, meso- en endoderm, maar niet meer naar de extra-embryonale weefsels. Cellen die geïsoleerd worden uit diverse adulte weefsels en in staat zijn tot ‘self-renewal’ en een gelimiteerde differentiatiecapaciteit naar enkele orgaanspecifieke celtypen, worden multipotente adulte stamcellen genoemd (Lakshmiathy en Verfaillie, 2005).



Figuur 2. De classificatie van stamcellen (De Schauwer et al., 2011).

Adulte stamcellen dienen om de orgaanmassa te behouden en de afgestorven cellen van een orgaan te vervangen door nieuwe gedifferentieerde cellen (Fortier, 2005). Voorbeelden van adulte stamcellen zijn de hematopoietische stamcellen die kunnen differentiëren naar de verschillende hematopoietische cellen, de neurale stamcellen die aanleiding geven tot neuronen, astrocyten en oligodendrocyten, en de mesenchymale stamcellen (MSC) die differentiëren naar fibroblasten, osteoblasten, chondroblasten, adipocyten en spiercellen (Verfaillie et al., 2002). Recente studies hebben echter aangetoond dat adulte stamcellen ook in staat zijn om te differentiëren naar celtypen van cellijnen verschillend van deze waaruit ze afkomstig zijn, hetgeen stamcelplasticiteit genoemd wordt (De Schauwer et al., 2011). Zo kunnen hematopoietische stamcellen bijvoorbeeld differentiëren naar levercellen en neurale stamcellen naar vroeg-hematopoietische precursoren (Lakshmipathy en Verfaillie, 2005).

THERAPEUTISCH POTENTIEEL VAN MSC: HOE FUNCTIONEREN MSC OMEEN WEEFSEL TE HERSTELLEN?

Het significante therapeutische voordeel van MSC komt voort uit hun vermogen om weefselregeneratie te stimuleren, littekenweefselvorming te voorkomen, immuunresponsen te moduleren en ontstekingsprocessen te reguleren (Borjesson en Peroni, 2011).

Aanvankelijk werden MSC aangewend om weefselregeneratie te bekomen vanuit de kennis dat ze in staat zijn te differentiëren naar verschillende weefseltypen (Stewart en Stewart, 2011). Hierdoor zou de regeneratie van beschadigde weefsels op een directe manier gestimuleerd worden omdat de geïnjecteerde MSC de plaats van het letsel zouden koloniseren, vervolgens differentiëren naar het gepaste mesenchymale weefseltype en zo herstel kunnen induceren (Stewart en Stewart, 2011). Toch bestaat er onenigheid over het feit of MSC direct bijdragen tot het weefselherstel door in het beschadigde weefsel te integreren, of indirect door de secretie van immunomodulerende en bioactieve trofische factoren (Borjesson en Peroni, 2011; Fortier en Travis, 2011). Ten eerste worden de invitrodifferentiatiecapaciteiten van MSC bevestigd door bepaalde kwalitatieve aspecten van weefselvorming te beoordelen met behulp van weefselspecifieke histologische kleuringen. Echter, de complexe in vivo weefselstructuur van bijvoorbeeld gemineraliseerd been of gewrichtskraakbeen wordt in vitro helemaal niet gerealiseerd (Stewart en Stewart, 2011). Het feit dat MSC in vitro kunnen differentiëren, garandeert bijgevolg niet dat deze in vivo voor klinische toepassingen kunnen aangewend worden (Stewart en Stewart, 2011). Verder is er wetenschappelijk bewijs dat MSC na injectie niet op de plaats van het letsel blijven (Stewart en Stewart, 2011). In een studie van Quintavalla et al. (2002) werd beschreven hoe fluorescentgelabelde MSC op een gelatinedrager ingebracht werden in kraakbeenletsels bij geiten.

Veertien dagen later werd nagegaan waar deze cellen zich bevonden. Fluorescentgelabelde cellen werden gedetecteerd in dieper gelegen gebieden van het letsel alsook in het subchondrale bot, hetgeen wijst op een migratie van de geïnjecteerde MSC. Anderzijds wordt er echter ook gerapporteerd dat MSC door chemokinen juist aangetrokken worden naar de plaats van het letsel en dus migreren naar plaatsen met weefselbeschadiging. Het exacte werkingsmechanisme hiervan is echter nog steeds onbekend (Kode et al., 2009). In een studie van Guest et al. (2008) werd aangetoond dat geïnjecteerde fluorescentgelabelde MSC in de oppervlakkige buigpees hoofdzakelijk gelokaliseerd blijven binnen het letsel en slechts enkele cellen in het gezonde peesweefsel rond het peesletsel gevonden worden.

TOEPASSINGEN VAN EQUINE MSC IN DE DIERGENEESKUNDE

Algemene opmerkingen in verband met stamceltherapie bij het paard

Het therapeutisch gebruik van MSC voor orthopedische letsels bij het paard werd voor het eerst beschreven in 2003. Op dat moment waren er amper enkele peer-reviewed onderzoeksartikelen gepubliceerd (Borjesson en Peroni, 2011). Sindsdien is het klinische gebruik van MSC immens toegenomen. Duidende paarden over de hele wereld werden ondertussen met MSC behandeld. Ook het fundamentele onderzoek naar deze MSC is toegenomen, hoewel het duidelijk achterop hinkt wanneer men de snelle productontwikkeling en de klinische experimentele behandelingen met MSC in beschouwing neemt (Borjesson en Peroni, 2011). Verder dient opgemerkt te worden dat er aan de meeste letsels waarvoor MSC-therapie ideaal lijkt te zijn, reeds een lange geschiedenis is voorafgegaan van revolutionaire therapieën die ofwel niet doeltreffend bleken te zijn, ofwel zelfs nadelig bleken te werken voor het herstel van de patiënt (Clegg en Pinchbeck, 2011).

De doeltreffendheid van MSC-therapie is moeilijk te beoordelen aangezien in de meeste studies geen gepaste controlegroepen worden gebruikt en de MSC-behandeling vaak gecombineerd wordt met andere biologische factoren, zoals beenmerg (BM) supernatans, autoloog serum, 'platelet-rich plasma', etc. (Koch et al., 2009). Hoe dan ook zou men zich binnen de diergeneeskunde van het paard als gezamenlijk doel moeten stellen om de eigenlijke doeltreffendheid van deze MSC aan te tonen met behulp van klinische trials waarin een voldoende aantal gelijkaardige gevallen worden opgenomen zodat deze objectief en gestandaardiseerd beoordeeld en opgevolgd kunnen worden (Stewart, 2011). Zo kunnen MRI, radiologie en echografie gebruikt worden om het herstel van pezen, ligamenten, bot- en gewrichtsletsels te beoordelen. Bovendien kunnen drukplaatanalyses kwantitatieve data van functioneel

herstel leveren die de diagnostische bevindingen van de clinicus en de 'return-to-competition'-resultaten kunnen bevestigen (Stewart, 2011). De huidige wetenschappelijke literatuur over het klinisch gebruik van MSC is vaak gebaseerd op studies waarvan het ontwerp niet beantwoordt aan de gouden standaard van 'evidence-based' (dier)geneeskunde, i.e. geblindeerde, gerandomiseerde en gecontroleerde experimenten. Dergelijke studies zijn moeilijk uit te voeren in de paardendiergeneeskunde door de hoge kosten die ze met zich meebrengen (Clegg en Pinchbeck, 2011). Niettegenstaande verschillende recente studies reeds met controlegroepen werden uitgevoerd, ontbreekt de experimentele waarde van deze studies vaak omwille van het beperkte aantal paarden die gebruikt werden en de inherente variatie in pathologische condities tussen de dieren onderling (Clegg en Pinchbeck, 2011).

Wat betreft de veiligheid van MSC-therapie, zowel op korte als op lange termijn, is nog niet veel bekend aangezien er geen enkele officiële instantie is die het huidige empirische gebruik van equine MSC controleert (Koch et al., 2009). In enkele studies werd nagegaan of er al dan niet neveneffecten kunnen worden waargenomen na het toedienen van MSC. In 2003 rapporteerde Smith et al. de eerste MSC-therapie waarbij autologe MSC uit BM na in-vitro-expansie geïnjecteerd werden in spontaan voorkomende, centrale letsels van de oppervlakkige buigpees. Gedurende een periode van tien dagen tot zes weken na het toedienen van de MSC werden geen neveneffecten, zoals lokale opzetting of het onderbreken van de peesvezels, waargenomen (Smith et al., 2003). Bij één paard van de meer dan 1500 behandelde paarden werd een peritendineuze mineralisatie vastgesteld na het behandelen met MSC uit BM (Alves et al., 2011).

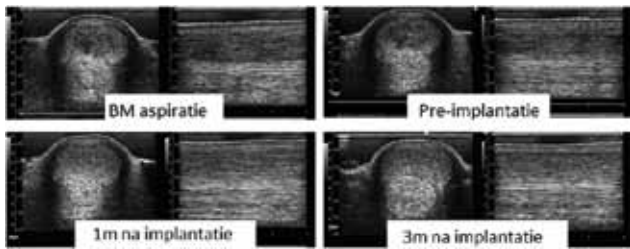
In de meeste klinische studies wordt het gebruik van MSC uit BM bij het paard beschreven die in vitro geëxpandeerd werden alvorens in vivo te gebruiken, waardoor men een zekere graad van kwaliteitscontrole bereikt en verwacht wordt dat het effect na behandeling ook effectief veroorzaakt wordt door de MSC (Koch et al., 2009). Celsuspensies die een mengeling van cellen bevatten, kunnen daarentegen onmiddellijk toegediend worden zonder de noodzakelijke in-vitro-expansiestap, wat op zich tijdbesparend werkt en de in-vitroselectiedruk op de cellen vermindert (Koch et al., 2009). Momenteel is het nog niet bekend hoeveel MSC dergelijke niet-geëxpandeerde celsuspensies bevatten, noch of er een minimum aantal MSC nodig is om regeneratie te bekomen (Berg et al., 2009). Tot nu toe zijn er zo goed als geen dose-responsestudies uitgevoerd (Fortier en Travis, 2011). Men kan besluiten dat er nog veel fundamentele vragen moeten beantwoord worden inzake de doeltreffendheid van MSC-therapie, de dosis, de weefselbron, de manier van toedienen, het al dan niet gebruik maken van draagstructuren of 'scaffolds', het tijdstip van toedienen, autologe

of allogene MSC, etc. (Borjesson en Peroni, 2011; Fortier en Travis, 2011).

Autoloog versus allogene gebruik van MSC

Tot op heden wordt bij de meerderheid van de stamceltherapieën gebruik gemaakt van autologe MSC, hoewel een allogene MSC-bron een 'off-the-shelf'-product zou kunnen worden, dat op een meer gestandaardiseerde manier gewonnen wordt en onmiddellijk beschikbaar is zonder de inherente cultuurperiode die nodig is bij de isolatie en expansie van autologe MSC (Alves et al., 2011). Indien allogene MSC worden gebruikt, zijn er bijkomende kosten voor de bewaring van deze cellen en moet men zeker zijn dat er geen infectieuze ziekten overgedragen worden (Fortier en Travis, 2011). In enkele preliminaire studies wordt gesuggereerd dat allogene MSC bij het paard kunnen gebruikt worden zonder een uitgesproken celgemedieerde immuunrespons uit te lokken. In een studie van Guest et al. (2008) werden drie letsels in de oppervlakkige buiger gecreëerd waarbij na zeven dagen ofwel BM-supernatans alleen, ofwel autologe BM-MSC of allogene BM-MSC werden toegediend. Deze BM-MSC werden getransfecteerd met een groen fluorescent eiwit, waardoor men de MSC na injectie kon traceren. De paarden werden vervolgens geëuthanaseerd op respectievelijk tien en 34 dagen na behandeling. Wanneer de MSC gevisualiseerd werden met een antilichaam tegen het groen fluorescent eiwit, werd bevestigd dat het merendeel gelokaliseerd bleef in het letsel hoewel enkele gelabelde cellen geobserveerd werden in het omringende gezonde peesweefsel, hetgeen indicatief is voor een zekere graad van migratie. Deze cellen vertoonden echter ook een typische tenocytmorfologie en waren ook goed geïntegreerd in het peesvezelpatroon. Verder werd ook opgemerkt dat het injecteren van allogene BM-MSC geen duidelijke celgemedieerde immuunrespons van de gastheer veroorzaakte. Zo waren er geen uitwendige symptomen van ontsteking waar te nemen, noch werden er histologische verschillen in densiteit van leukocyten aangetoond tussen de autologe en allogene injectieplaatsen (Guest et al., 2008).

Om eventuele acute afstotingsreacties of overgevoeligheidsreacties van het vertraagde type te evalueren, werden er in een studie van Carrade et al. (2011a) allogene equine MSC afkomstig uit navelstrengweefsel, intradermaal geïnjecteerd bij zes paarden. Een milde, zelflimiterende reactie op de injectie van zowel autologe als allogene MSC werd waargenomen, hetgeen zich bij de negatieve controlegroep waarbij een fysiologische oplossing geïnjecteerd werd, niet voordeed (Carrade et al., 2011a). In een andere studie van Carrade et al. (2011b) werden de effecten beoordeeld na intra-articulaire injectie van ofwel autologe, ofwel gerelateerde allogene of niet-gerelateerde allogene MSC, in gezonde gewrichten van paarden. Hoewel één enkele intra-articulaire injectie met MSC wel degelijk een ont-



Figuur 3. Echografische beelden van een letsel in de oppervlakkige buiger dat behandeld werd met BM-MSC op verschillende tijdstippen na BM-MSC-behandeling. De evolutie van het letsel wordt beschreven vanaf het moment van de BM-aspiratie en de injectie van de geïsoleerde MSC zeven dagen later (pre-implantatie) tot drie maanden na de behandeling. Het peesletsel wordt snel opgevuld terwijl geen duidelijke neveneffecten waar te nemen zijn. (naar Godwin et al., 2012).

stekingsreactie uitlokte in het gezonde gewricht, werd er geen significant verschil waargenomen in het type of de graad van ontsteking na injectie met autologe, gerelateerde of niet-gerelateerde allogene MSC. Hieruit kan men besluiten dat allogene MSC veilig gebruikt kunnen worden en een praktische behandeling voor orthopedische letsels bij het paard kunnen betekenen (Carrade et al., 2011b).

Desondanks moet er opgemerkt worden dat deze studies gebaseerd zijn op slechts een beperkt aantal paarden en ze enkel gedurende een korte periode opgevolgd werden. Daarom zijn er grotere, gecontroleerde, klinische studies nodig waarin patiënten gedurende een langere termijn opgevolgd worden zodat men kan verzekeren dat allogene MSC veilig en doeltreffend zijn (Koch et al., 2009).

KLINISCHE TOEPASSINGEN VAN EQUINE MSC

Orthopedische letsels

Het vermogen van MSC om te differentiëren naar diverse weefsels van mesodermale oorsprong biedt vele toepassingsmogelijkheden voor het herstel en de regeneratie van pezen, kraakbeen en bot (Taylor et al., 2007).

Pees

Letsels aan de palmar gelegen pezen komen vaak voor bij intensief getrainde sportpaarden door de cumulatieve, degeneratieve schade aan de pezen die reeds op de grens van hun functionele vermogen belast worden (Richardson et al., 2007). De standaard conservatieve behandeling voor peesblessures bestaat uit een verlengde periode van stalrust en het gecontroleerd bewegen gedurende één jaar na de blessure (Guest et al., 2008). Deze conventionele therapie is echter weinig succesvol, waardoor men op zoek gaat naar nieuwe behandelingen met als doel de functionaliteit te herstellen en een weefsel te

regenereren dat zo dicht mogelijk aansluit bij normaal peesweefsel (Richardson et al., 2007). Het lokaal injecteren van MSC in een peesletsel bij paarden met tendinitis kan de intrinsieke heling stimuleren, de initiële ontstekingsreactie en littekenvorming verminderen en het uiteindelijke percentage recidieven verlagen (Gutierrez-Nibeyro, 2011) (Figuur 3).

Aangezien de aanwezigheid van fibreus weefsel in de pees de implantatie van MSC kan hinderen en zo de voordelen van MSC-therapie kan reduceren, worden chronische, recurrenente peesletsels niet beschouwd als ideale kandidaten voor MSC-therapie (Richardson et al., 2007). Er wordt aangeraden om MSC-therapie toe te passen binnen de maand na de blessure (Richardson et al., 2007; Godwin et al., 2012). In een studie van Godwin et al. (2012) werden de behandelde paarden in drie groepen onderverdeeld: het interval letsel-MSC-therapie was 1. kleiner dan vijf weken, 2. bevond zich tussen zes en acht weken en 3. bedroeg meer dan negen weken. In de eerste groep herviel 20,8% van de paarden terwijl dit percentage steeg naar 35% in de laatste groep, hetgeen bevestigt dat MSC beter in een vroeg stadium gebruikt worden. Er moet echter opgemerkt worden dat deze verschillen niet significant zijn gezien het beperkte aantal waarnemingen. Er zijn ook studies die aangeven dat men het beste effect op lange termijn bekomt wanneer de behandeling één maand na de diagnose ingesteld wordt (Ferris et al., 2009; Frisbie en Smith, 2010). Deze onderzoekers beweren dat een zekere graad van verbindweefseling moet aanwezig zijn om effect te zien van MSC-therapie aangezien MSC zouden aangetrokken worden naar beschadigde cellen (Frisbie en Smith, 2010).

In zowel experimentele als klinische studies wordt een positief therapeutisch effect van MSC voor de behandeling van peesletsels gesuggereerd (Alves et al., 2011; Spaas et al., 2011). In verscheidene experimentele studies waarin tendinitis geïnduceerd werd met behulp van collagenase, zag men histologisch een duidelijke verbetering na MSC-therapie in vergelijking met een negatieve controlegroep waarbij een fosfaatgebufferde zoutoplossing geïnjecteerd werd (Nixon et al., 2008; Schnabel et al., 2009). Ongeacht het moment waarop de MSC-therapie gestart werd, was het percentage paarden dat herviel, veel lager in de groep behandeld met MSC (24%) dan in de conservatief behandelde groep (56%) (Frisbie en Smith, 2010; Godwin et al., 2012). Ook in een klinische studie van Pacini et al. (2007) waarbij het niet-geïnduceerde, natuurlijk voorkomende peesletsels van de oppervlakkige buiger betrof, vertoonden negen van de elf paarden die behandeld werden met autologe BM-MSC, correct parallel georiënteerde peesvezels op echografie drie tot zes maanden na de behandeling. De paarden keerden terug naar hun oorspronkelijk competitieniveau met even goede of soms zelfs betere resultaten dan voorheen. Na meer dan twee jaar follow-up waren deze paarden nog steeds actief als sportpaard (Pacini et al., 2007). In de controlegroep daarentegen,

die conservatief behandeld werd, vertoonden de meeste paarden op het echografisch onderzoek fibrose gedurende het helingsproces. Ze hervielen binnen de vier tot twaalf maanden na behandeling (Pacini et al., 2007). Er is geen verdere informatie beschikbaar over het moment waarop de MSC-therapie werd toegepast.

Kraakbeen

Dankzij het hypocellulaire en avasculaire karakter van gewrichtskraakbeen is het vermogen om effectief herstel te bekomen, gelimiteerd (Frisbie en Stewart, 2011). Kraakbeendefecten over de volledige dikte helen bij paarden met de vorming van fibreus weefsel dat fibrocartilagineus kraakbeen kan worden met inferieure biomechanische eigenschappen, wat bij hyalien gewrichtskraakbeen niet het geval is (Taylor et al., 2007). Hoewel de chondrogene differentiatie van MSC in vitro is aangetoond, wordt de in-vivotoepassing van een dergelijke MSC-therapie gehinderd door de druk die door het gewicht van het dier op de geïnjecteerde MSC en eventuele 'scaffolds' wordt uitgeoefend (Koch et al., 2009). In een gecontroleerde studie van Wilke et al. (2007) werden equine BM-MSCs geïmplant in 15-mm chirurgisch gecreëerde kraakbeendefecten in de laterale trochleakam van de distale femur. De heling werd in een vroeg stadium, i.e. op dertig dagen na de behandeling artroschopisch beoordeeld en leek beter dan bij de negatieve controlegroep. Er werden echter geen significante verschillen meer gezien tussen de MSC-behandelde groep en de negatieve controlegroep op langere termijn, i.e. na acht maanden (Wilke et al., 2007).

Gewoonlijk wordt bij het paard de microfractuurtechniek toegepast om het herstel van kraakbeen te stimuleren (Taylor et al., 2007; Frisbie en Stewart, 2011). Hierdoor kunnen chondrogene progenitorcellen en groeifactoren uit het subchondrale BM-compartiment toegang krijgen tot de basis van het kraakbeendefect (Taylor et al., 2007; Frisbie en Stewart, 2011). Het resultaat van deze chirurgische techniek zou aanzienlijk kunnen verbeterd worden wanneer ook MSC toegevend worden in de gewrichtsruimte (Frisbie en Stewart, 2011). In een studie van McIlwraith et al. (2011) werd de toepassing van de microfractuurtechniek alleen vergeleken met de microfractuurtechniek in combinatie met intra-articulair toegediende BM-MSCs, met als doel te beoordelen in hoeverre BM-MSCs in staat zijn om de heling van kraakbeendefecten over de volledige dikte te stimuleren. Noch klinisch noch histologisch werden significante verbeteringen waargenomen hoewel er wel een statistisch significante verbetering in het aggregaandaal gezien werd in de groep waarbij de microfractuurtechniek in combinatie met BM-MSCs werd toegepast, hetgeen voordelig kan zijn voor de duurzaamheid en kwaliteit van het herstelweefsel en zijn vermogen om compressie te weerstaan (McIlwraith et al., 2011). Het klinische belang van deze bevindingen moet in de toekomst nog bevestigd worden.

De behandeling van osteoarthritis door ofwel conventionele therapie of door celgebaseerde therapie is zelfs nog een grotere uitdaging dan het herstellen van focale kraakbeendefecten, aangezien de schade aan het gewrichtskraakbeen bij osteoarthritis vaak meer diffuus is en niet alleen beide corresponderende gewrichtsoppervlakken betreft maar ook vaak de peri-artculaire weefsels (Frisbie en Stewart, 2011). In een gecontroleerde studie van Frisbie et al. (2009) werden MSC uit zowel BM als vetweefsel gebruikt in een bekend carpaal-osteochondraal fragmentmodel, waarbij osteoarthritis wordt geïnduceerd door bot en kraakbeendebrijs met slechts een verwaarloosbare destabilisatie van het gewricht. Een lichte verbetering van de klinische symptomen werd waargenomen in de groep behandeld met BM-MSCs, terwijl een up-regulatie van pro-inflammatoire cytokinen in het synoviale vocht werd aangetoond in de groep van MSC afkomstig uit vetweefsel (Frisbie et al., 2009).

Het gebruik van MSC blijkt aangewezen wanneer er een verlies is van zachte weefselstructuren die tot instabiliteit leiden, bijvoorbeeld wanneer schade aan de menisci vastgesteld wordt (Frisbie en Smith, 2010; Spaas et al., 2012). In 2009 werd door Ferris et al. een uitgebreid onderzoek opgestart met patiënten die matig tot erg aangetast waren en waarbij de diagnose chirurgisch bevestigd werd en routinebehandelingen gefaald hadden (Ferris et al., 2009). Autologe BM-MSCs werden intra-articulair toegediend waarna de paarden tot gemiddeld 21 maanden na de behandeling werden opgevolgd (Ferris et al., 2009). Elf van de 39 paarden keerden gedurende deze follow-upperiode niet terug naar de sport, terwijl 38% terugkeerde naar een lager niveau en 38% naar hun oorspronkelijk of zelfs naar een hoger niveau (Frisbie en Smith, 2010).

Been

In tegenstelling tot pees- en kraakbeenweefsel herstellen botfracturen meestal met behoud van hun biochemische en biomechanische eigenschappen (Taylor et al., 2007). Bij de regeneratie van grote hoeveelheden bot kan het echter wel nodig zijn om het natuurlijke helingsproces te stimuleren (Kraus en Kirker-Head, 2006). Voorbeelden waarbij een dergelijke ondersteuning kan vereist zijn, zijn onder andere een aanzienlijk verlies van bot ten gevolge van trauma of tumorresectie, bij artrodese, fracturen die niet of vertraagd helen, cysteachtige, beenderige letsels, metabole stoornissen, of bij onvoldoende helingscapaciteit van de gastheer door ouderdom of lokale of systemische ziekte (Kraus en Kirker-Head, 2006; Taylor et al., 2007).

Tot dus ver zijn er nog geen gecontroleerde klinische studies bij het paard beschreven waarin MSC aangewend worden om botregeneratie te bekomen. Brehm et al. (2012) beschreven wel enkele preliminaire experimenten waarbij artrodese van de kogel ondersteund werd door de toediening van MSC in combinatie met een botvervangend

materiaal, hetgeen resulteerde in een adequate fusie van het botweefsel.

Niet-orthopedische letsels

Momenteel worden MSC in de diergeneeskunde hoofdzakelijk gebruikt om musculoskeletale aandoeningen te behandelen, hetgeen in schril contrast staat met de humane geneeskunde waar MSC-therapie voornamelijk gefocust is op immuungemedieerde en ischemische ziekten (Borjesson en Peroni, 2011).

Immuungemedieerde en inflammatoire aandoeningen

Naast hun anti-inflammatoir modulerend vermogen rekruteren MSC in beschadigde weefsels ook lokale autologe stamcellen om het overleven van de cellen en het weefselherstel te ondersteunen (Stewart en Stewart, 2011). Omwille van deze eigenschappen kunnen MSC nuttig zijn bij orgaantransplantaties, inflammatoire en auto-immune aandoeningen (Sensebe en Bourin, 2009). Equine recurrenente uveïtis is een orgaanspecifieke, T-celgemedieerde, auto-immune ziekte die bij 10% van de paarden voorkomt en waarvoor MSC-therapie interessant kan zijn (Deeg et al., 2008; Koch et al., 2009). Deze ziekte wordt gekenmerkt door episoden van actieve oogontsteking die gevolgd worden door perioden van minimale inflammatie (Deeg et al., 2008; Gilger en Deeg, 2011). Aangezien het paard de enige diersoort is waarbij deze ziekte voorkomt met gelijkaardige klinische en immuno-pathologische aspecten als bij auto-immune uveïtis bij de mens, kan equine recurrenente uveïtis ook dienst doen als een betrouwbaar model om de histopathologische veranderingen te bestuderen en meer kennis te vergaren over de oorzaak van deze aandoening bij de mens (Deeg et al., 2002).

Ischemische aandoeningen

Gebaseerd op bevindingen bij andere diersoorten kan stamceltherapie ook gebruikt worden om ischemische aandoeningen te behandelen die zuurstofdeprivatie, celbeschadiging en gerelateerde orgaanfunctie veroorzaken (Chen et al., 2006). Hoewel ischemische letsels meestal lokaal zijn, zijn ze vaak een onderdeel van een algemene aandoening met een complexe pathofysiologie die gepaard gaat met diverse biochemische veranderingen in verschillende cel- en weefseltypen (Lange et al., 2005). Het functionele herstel van beschadigd weefsel kan ondersteund worden door circulerende stamcellen aangezien deze specifiek naar ischemische plaatsen blijken te migreren (Chen et al., 2006). Zo werden bij ratten met ischemisch acuut nierfalen BM-MSC intraveneus toegediend. Men stelde vast dat het herstel van de nierfunctie verbeterde en de proliferatie-index steeg terwijl de apoptose-index daalde (Lange et al., 2005). Ook wanneer men intraveneus MSC toedient bij ratten na een myocardinfarct, stelt men vast dat

deze MSC migreren naar de geïnfarcteerde regio en als dusdanig de ventriculaire functie verbeteren (Chen et al., 2005). Indien deze MSC aan ratten toegediend worden die geen myocardinfarct ondergingen, dan migreren de MSC naar het BM (Saito et al., 2002).

Hoefbevangenheid is een multifactoriële aandoening bij paarden met verschillende uitlokkende oorzaken waaronder ook lokale ischemie (Engiles, 2010), waarbij MSC-therapie zou kunnen bijdragen tot de verbetering van de huidige behandelingsmogelijkheden (Koch et al., 2009). Ook bij het perinatale asfyxië-syndroom dat voorkomt bij veulens, zouden MSC een rol in de behandeling kunnen spelen aangezien het syndroom ontstaat uit een combinatie van ischemie en hypoxie en verschillende organen treft (Galvin en Collins, 2004).

Wondheling

Bij paarden komen traumatische wonden veel voor en de behandeling ervan is vaak arbeidsintensief en duur. In dergelijke gevallen kunnen MSC in de wondheling een belangrijke rol spelen gezien hun vermogen om de heling van huiddefecten te verbeteren (Sensebe en Bourin, 2009; Theoret, 2009). In een retrospectieve studie met 422 paarden met traumatische wonden werd aangetoond dat slechts in 24% van de gevallen primaire heling werd bekomen (Wilmink et al., 2002). Historisch is een autologe huidtransplantatie de gouden standaard om verloren gegane huid te vervangen. Jammer genoeg faalt deze transplantatie vaak bij het paard door de aanwezigheid van infectie, ontsteking of vocht-opstapeling onder de getransplanteerde huid, en door beweging (Theoret, 2009). Daarenboven kan men 'full-thickness' autologe huidtransplantaties enkel uitvoeren bij kleine wonden aangezien het paard over weinig overtollige huid beschikt (Theoret, 2009). Recent werd aangetoond dat intraveneus toegediende MSC in staat zijn zich te verzamelen op de plaats van het letsel en te differentiëren naar verschillende huidceltypen, zoals keratinocyten, endotheelcellen en pericyten (Sasaki et al., 2008). In een preliminaire studie van Badiavas en Falanga (2003) werden autologe BM-MSC gebruikt om humane, chronische wonden te behandelen die ouder waren dan één jaar en op geen enkele therapie reageerden. Een volledige sluiting en het heropbouwen van de dermis werden geobserveerd bij de drie betrokken patiënten. In de diergeneeskunde is er één studie bij het paard waarin beschreven wordt hoe MSC gebruikt worden bij het chirurgisch sluiten van een defect aan het zachte gehemelte (Carstansen et al., 2006). Gelabelde autologe BM-MSC werden ingeplant in het chirurgisch gecorrigeerde defect op het ogenblik van de ingreep waarna het paard 14 dagen later geëuthanaseerd werd. Microscopisch zag men dat de MSC onder het epitheel georiënteerd en geïntegreerd waren volgens de lengterichting van de spiercellen, hetgeen indicatief is voor een succesvolle transplantatie (Carstansen et al., 2006). Uit deze preliminaire gegevens kan men besluiten dat MSC in-

derdaad een bijdrage kunnen leveren tot het wondhelingsproces.

Oftalmologie

Ook in de veterinaire oftalmologie is er één studie bekend bij het paard waarin MSC gebruikt werden voor de behandeling van vier chronische gevallen van cornea ulcers en één geval van retinalosclering, waarbij conventionele behandelingsmethoden niet meteen verbetering boden (Marfe et al., 2012). Drie maanden na de MSC-therapie, die bestond uit zowel lokale als systemische injecties, vertoonden de vier patiënten een duidelijke verbetering van de ontstekingsreactie en een herstel van het epitheel van de cornea (Marfe et al., 2012). In een studie van Ma et al. (2006) werd aangetoond dat het therapeutisch effect van de MSC eerder geassocieerd leek te zijn met het remmen van de ontsteking en het bevorderen van de angiogenese dan met de epitheliale differentiatie van de getransplanteerde MSC.

Neurologische aandoeningen

Aangezien MSC kunnen differentiëren naar neuronale progenitorcellen en in vitro specifiek neuronale markers tot expressie brengen, werd ook de mogelijke doeltreffendheid van MSC voor het functionele herstel van zenuwweefsel bestudeerd (Jamnig en Lepperdinger, 2012). In een studie van Jung et al. (2009) werden honden met een ruggenmergletsel behandeld met een intrathecale injectie van BM-MSC waarna men een verbeterde neurologische functie in hun achterpoten vaststelde in vergelijking met de onbehandelde honden. Er werd reeds aangetoond dat exogeen getransplanteerde MSC migreren naar het ruggenmergletsel en een geschikt milieu creëren voor het neuronale herstel door middel van hun immunosuppressieve, anti-inflammatoire en trofische effecten (Jung et al., 2009).

Aangezien bij neurodegeneratieve aandoeningen verschillende pathologische processen een rol spelen, kan een specifiek therapeutisch agens zoals MSC de symptomen van verschillende neurodegeneratieve aandoeningen verbeteren op basis van hun vermogen om beschadigde cellen te vervangen en trofische factoren en immunomodulerende cytokinen te secreteren (Sadan et al., 2009). Equine myelofalopathie en 'equine motor neuron disease' zijn voorbeelden van neurodegeneratieve aandoeningen waarvoor MSC-therapie potentieel interessant kan zijn. Ook bij laryngeale hemiplegie, veroorzaakt door een progressieve paralyse van de intrinsieke larynxspieren (Kim en Xie, 2009), zouden MSC een bijdrage kunnen leveren tot het herstel van deze aandoening. Het moet echter nog aangetoond worden of MSC ook in vivo voldoende neuronale differentiatievermogen vertonen en of ze goed overleven na transplantatie (Jamnig en Lepperdinger, 2012).

BESLUIT

Het gebruik van MSC in de behandeling van letsels bij paarden biedt immens veel mogelijkheden en kan uitgebreid worden van enkel orthopedische letsels naar de behandeling van allerhande ischemische, inflammatoire en neurologische aandoeningen (Borjesson en Peroni, 2011). Meer fundamenteel onderzoek en goed opgebouwde klinische trials zijn echter nog nodig zodat het potentieel van equine MSC ten volle kan begrepen worden en equine MSC-gebaseerde therapieën kunnen geoptimaliseerd worden.

REFERENTIES

- Alves AG, Stewart AA, Dudhia J, Kasashima Y, Goodship AE, Smith RK (2011). Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 315-333.
- Badiavas EV, Falanga V (2003). Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Archives of Dermatology* 139(4), 510-516.
- Berg L, Koch T, Heerkens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D (2009). Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 22(5), 363-370.
- Borjesson DL, Peroni JF (2011). The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 31(1), 109-123.
- Brehm W, Burk J, Delling U, Gittel C, Ribitsch I (2012). Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell Tissue Research* 347, 677-688.
- Carrade DD, Affolter VK, Outerbridge CA, Walson JL, Galuppo LD, Buerchler S, Kumar V, Walker NJ, Borjesson DL (2011a). Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 13(10), 1180-1192.
- Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL (2011b). Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placental derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 13(4), 419-430.
- Carstansen B, Desbois C, Hekmati M, Behr L (2006). Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Canadian Journal of Veterinary Research* 70(2), 143-147.
- Chen CP, Lee YJ, Chiu ST, Shyu WC, Lee MY, Huang SP, Li H (2006). The application of stem cells in the treatment of ischemic diseases. *Histology and Histopathology* 21, 1209-1216.
- Clegg PD, Pinchbeck GL (2011). Evidence-based medicine and stem cell therapy: how do we know such technologies are safe and efficacious? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27(2), 373-382.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B (2002). Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Experimental Eye Research* 75, 127-133.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalzl T, Stangassinger M, Ueffing M (2008).

- Equine recurrent uveitis – a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Research* 40, 151-153.
- De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75, 1431-1443.
- Engiles JB (2010). Pathology of the distal phalanx in equine laminitis: more than just a skin deep. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 26(1), 155-165.
- Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Watkins JJ, Kawcak CE, Goodrich LR (2009). Clinical follow-up of horses treated with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal lesions. *American Association of Equine Practitioners Proceedings* 55, 59-60.
- Fortier LA (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery* 34(5), 415-423.
- Fortier LA, Travis AJ (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research and Therapy* 2, 9.
- Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 27(12), 1675-1680.
- Frisbie DD, Smith RK (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal* 42(1), 86-89.
- Frisbie DD, Stewart MC (2011). Cell-based therapies for equine joint disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27(2), 335-349.
- Galvin N, Collins D (2004). Perinatal asphyxia syndrome in the foal: review and a case report. *Irish Veterinary Journal* 57, 707-714.
- Gilber BC, Deeg CA (2011). Equine Recurrent Uveitis. In: *Equine Ophthalmology*. Second Ed., Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 317-349.
- Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK (2012). Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal* 44(1), 25-32.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR (2008). Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Veterinary Journal* 40(2), 178-181.
- Gutierrez-Nibeyro SD (2011). Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27(2), 363-371.
- Jamnick A, Lepperdinger G (2012). From tendon to nerve: an MSC for all seasons. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 90(3), 295-306.
- Jung D-I, Ha J, Wang B-T, Kim J-W, Quan F-S, Lee J-H, Woo E-J, Park H-M (2009). A comparison of autologous and allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences* 285, 67-77.
- Kim MS, Xie H (2009). Use of electroacupuncture to treat laryngeal hemiplegia in horses. *Veterinary Record* 165(20), 602-604.
- Koch TG, Berg LC, Betts DH (2009). Current and future regenerative medicine – principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Canadian Veterinary Journal* 50, 155-165.
- Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11(4), 377-391.
- Kraus KH, Kirker-Head C (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary Surgery* 35(3), 232-242.
- Lakshminpathy U, Verfaillie C (2005). Stem cell plasticity. *Blood Reviews* 19, 29-38.
- Lange C, Tögel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C. (2005). Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney International* 68, 1613-1617.
- Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 315-321.
- Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V, Poletini M, Gambacurta A (2012). Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *Journal of Cellular Physiology* 227(3), 1250-1256.
- McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27(11), 1552-1561.
- Morrison SJ, Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research* 69(7), 928-937.
- Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering* 13, 2949-2955.
- Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC (2002). Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23(1), 109-119.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R (2007). Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology* 25, 409-416.
- Sadan O, Melamed E, Offen D (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9(12), 1487-1497.
- Saito T., Kuang J., Bittira B., Al-Khalidi A., Chiu RCJ (2002). Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *The Annals of Thoracic Surgery* 74, 19-24.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell types. *The Journal of Immunology* 180, 2581-2587.
- Schnabel LV, Lynch ME, van de rMeulen MC, Yeager AE, Kornatowski MA, Nixon AJ (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of

- healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research* (10), 1392-1398.
- Sensebe L, Bourin P (2009). Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation* 87, 49-53.
- Smith RKW, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal* 35, 99.
- Spaas JH, Gambacurta A, Poletini M, Broeckx S, Van Hoeck F, De Schauwer C, Van de Walle GR, Van Soom A (2011). Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 80, 129-135.
- Spaas JH, Oosterlinck M, Broeckx S, Dumoulin M, Saunders J, Van Soom A, Pille F, Van de Walle GR (2012). Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a case report. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 81, 11-15.
- Stewart MC (2011). Cell-based therapies: current issues and future directions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27(2), 393-399.
- Stewart MC, Stewart AA (2011). Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, mechanisms of action. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27(2), 243-261.
- Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD (2007). Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Veterinary Journal* 39, 172-180.
- Theoret C (2009). Tissue engineering in wound repair: the three "R"s-repair, replace, regenerate. *Veterinary Surgery* 38(8), 905-913.
- Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W-S (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 12-27.
- Van Haver E, De Schauwer C, Rijsselaere T, Meyer E, Van Soom A (2008). Toepassingsmogelijkheden van stamcellen in de diergeneeskunde. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77, 219-225.
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM (2002). Stem cells: hype and reality. *Education Program of the American Society of Hematology*, 369-391.
- Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research* 25(7), 913-925.
- Wilmink JM, van Herten J, van Weeren PR, Barneveld A (2002). Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Veterinary Journal* 34(3), 270-273.



**Wij serveren uw advertenties,
mediagericht, ook in 2014!**

133768BT1351

© SHUTTERSTOCK

Mediaservice  
gericht adverteren