



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Mesenkymala stamceller som behandling vid osteoartrit och tendinit på häst

Treatment with mesenchymal stemcells in horses with osteoarthritis and tendinitis



Caroline Frisch

*Uppsala
2020*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Mesenkymala stamceller som behandling vid osteoartrit och tendinit på häst

Treatment with mesenchymal stem cells in horses with osteoarthritis and tendinitis

Caroline Frisch

Handledare: Ove Wattle, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Karl Ljungvall, Institutionen kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Omslagsillustration: Fotografi taget av Bo Bennergård

Nyckelord: mesenkymala stamceller, MSC, osteoartrit, tendinit

Key words: mesenchymal stemcells, MSC, osteoarthritis, tendinitis

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Hälta är den vanligaste orsaken till nedsatt prestation, tränings- och tävlingsbortfall hos häst i Sverige. De vanligaste orsakerna till hälta på häst är skador på leder, senor och ligament. Inget idag registrerat preparat eller läkemedel har visat sig kunna reversera eller stoppa utvecklingen vid ledsjukdom som osteoartrit (OA) så behandling av skador på led har främst fokuserats på att minska inflammation och smärta. Vid behandling av senskador ligger fokus på att få en läkning med samma struktur som ursprungsvävnaden. Flera olika preparat har testats, som t.ex. hyaluronsyra (HA), polysulfaterade glukosaminoglykaner (PSGAGs) samt PRP. Både för behandling av OA och senskador har stamceller föreslagits som alternativ för att återställa vävnaden och minska inflammation. Under de sista åren har intresset vänts mot mesenkymala stamceller (MSC), som antas kunna ha både antiinflammatoriska och regenerativa egenskaper. Dessutom anses MSC vara immunprivilegerade, då de saknar uttryck av MHC II molekyler.

Studien gjordes som en retrospektiv journalstudie, där 137 hästar som behandlats med allogena MSC på en klinik i Stockholm inkluderades. Både hästar som tidigare behandlats med andra preparat samt hästar som inte fått någon annan behandling inkluderades, liksom hästar med mer än en hältutlösande faktor. Hästarna prestationsnivå varierade från inget arbete/lätt träning till tävling på högsta nivå. Behandlingen bestod i allogena MSC utvunna från postmortalt samlad benmärg från hästar som av olika orsaker ändå skulle avlivas.

Av 137 MSC behandlade hästar följdes 125 upp kliniskt. 112 av dessa bedömdes vid klinisk uppföljning som ohalta och av dessa kom 90 hästar tillbaka till träning/tävling. 60 hästar var fortfarande i träning minst 6 månader efter att de bedömts som friska/ohalta. 3 hästar uppvisade biverkningar i form av ökad hälta, värme och svullnad vid injektionsplatsen 0-6 dagar efter behandling, som minskade inom 24 timmar efter behandling med antiinflammatoriskt läkemedel. Resultatet i denna studie indikerar att behandling med MSC vid OA och tendinit tycks vara patientsäkert och kan potentiellt, i tidigt skede, stoppa eller hämma utvecklingen av OA alternativt lindra de kliniska symtomen hos drabbade hästar.

SUMMARY

Lameness is the most common cause of impaired performance among horses in Sweden, and injuries to joints, tendons and ligaments are often the reason for lameness. Treatment of joints has mainly been focused on reducing inflammation and pain, but no drug has shown to be able to reverse, or stop the development of joint disease such as osteoarthritis (OA). When treating tendon injuries, the focus is on getting a healing with the same structure as the original tissue. Several different drugs have been tested, such as hyaluronic acid (HA), polysulfated glucosaminoglycans (PSGAG) and PRP. Stem cells have been proposed as an alternative for treating both injured tendons and joints, as they are thought to have capacity to both restore tissue and reduce inflammation. In recent years, interest has been directed toward mesenchymal stem cells (MSC), which are believed to have both anti-inflammatory and regenerative properties. In addition, MSC are considered to be immunoprivileged as they lack expression of MHC II molecules.

The study was made as a retrospective journal study, which included 137 horses treated with allogenic MSC at a clinic in Stockholm. Horses previously treated with other drugs, as well as horses that had not received any other treatment prior were included. Also horses with more than one triggering factor, i.e. pain from more than one structure, were included. The performance level varied from no work/light training to competition at the highest level. The treatment consisted of allogenic MSC derived from bone marrow euthanized from various reasons.

Out of 137 MSC treated horses, 125 were followed up clinically. 112 were considered as sound at clinical follow-up, and 90 of these horses returned to training/competition. 60 horses were still in training at least 6 months after being assessed as sound. Three horses showed adverse reactions to the treatment in form of increased lameness, heat and swelling at the injection site 0-6 days post treatment. The reaction subsided within 24 hours after treatment with anti-inflammatory drugs. The results of this study indicate that treatment with MSC in horses with OA appears to be patientsafe and can potentially, at an early stage, stop or inhibit the development of OA or alleviate the clinical symptoms of affected horses.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Osteoartrit (OA)	2
Medicinska alternativ för ledbehandling	2
<i>NSAID</i>	2
<i>Kortikosteroider</i>	2
<i>Hyaluronsyra</i>	3
<i>Polysulfaterade glukosaminoglukaner (PSGAGs)</i>	3
<i>Interleukin 1 receptor antagonist protein (IRAP) = Autologt konditionerat serum (ACS)</i>	3
Senor och senskador	4
Mesenkymala stamceller (MSC)	4
<i>Behandling med allogena MSC</i>	5
MATERIAL OCH METOD	6
RESULTAT	8
DISKUSSION	10
Konklusion	13
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	14
TACK	15
REFERENSER	16

INLEDNING

Hälta är den vanligaste orsaken till nedsatt prestation, tränings- och tävlingsbortfall hos häst i Sverige (Penell *et al.*, 2005). De vanligaste orsakerna till hälta hos häst är skador på leder, i form av osteoartrit (OA), senor och ligament (Hill *et al.*, 2017). Behandlingen mot OA har under de senaste decennierna inriktats på att minska inflammation och smärta och de mest använda preparaten för detta har varit olika typer av kortikosterioder, NSAID-preparat, hyaluronsyra (HA) och polysulfaterade glukosaminoglukaner (PSGAG) (Goodrich & Nixon, 2006). På senare år har även Autologt konditionerat serum (ACS, eller ”IRAP”) använts för behandling av OA (Textor, 2011). Det senaste föreslagna tillskottet till behandlingsarsenalen för OA och senskador är mesenkymala stamceller (MSC).

Syftet med arbetet är att via en litteraturstudie se om det finns något stöd för att behandling med MSC kan förbättra prognosen hos hästar med OA och/eller tendinit. Samt, att utifrån utförda behandlingar med MSC på en hästklinik få en indikation på om det föreligger någon risk för biverkningar vid injektion av MSC på hästar i klinisk praktik och om behandlingsresultaten tydde på att denna produkt är värd att utvärdera vidare som ett alternativ för behandling vid OA och tendinit.

Hypotesen var att MSC behandling av OA och tendinit på häst är patientsäkert.

LITTERATURÖVERSIKT

Osteoartrit (OA)

OA är oftast en lågradig inflammatorisk sjukdom som över tid utvecklas och leder till kronisk hälta (McIlwraith *et al.*, 2015). OA innebär en destruktion av ledbrösk och scleros av det subchondrala benet, med eller utan mikrofrakturer. Etiologin kan delas in i två grundorsaker, antingen en onormal belastning på en normal led, eller en normal belastning på en onormal led. OA uppstår i någon av ledens strukturer; synovialmembranet, ledkapseln, det subchondrala benet, ligament eller ledbrösk, alternativt i en kombination av två eller flera av dessa (McIlwraith *et al.*, 2012). Vid OA och ledinflammation frisätts proinflammatoriska cytokiner, som IL-1 α , IL-1 β och TNF α från synovialmembran och ledbrösk. Dessa startar en kaskad där vävnadsnedbrytande enzymer som matrix metalloproteaser (MMPs), aggreganser (främst ADAMTS-4 och ADAMTS-5) och prostaglandin E₂ (PGE₂) bildas (McIlwraith *et al.*, 2015).

Medicinska alternativ för ledbehandling

NSAID

Icke steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID) är den idag mest använda preparatgruppen vid behandling av OA. Alla levande kroppsceller innehåller omega-6-fettsyra, i sina cellmembran (Goodrich & Nixon, 2006) och den kan omvandlas till arakidonsyra när cellmembranet skadas. Arakidonsyran bryts ner av enzymerna cyklooxygenas (COX) 1 och 2 samt lipoxigenaserna 5, 12 och 15 varvid prostaglandin (PGH₂) bildas. PGH₂ är ett substrat för prostaglandinsyntaser som i sin tur kan bilda både livsviktiga som skadliga prostaglandiner. Framförallt är det prostaglandin E₂, som bildats vid COX 2 nedbrytning av arakidonsyra, som har den största inverkan på inflammation. PGE₂ kan inducera aktivitet hos ovan nämnda vävnadsnedbrytande enzymer. NSAID bromsar inflammationsfasen då de hämmar aktiviteten hos COX enzymerna. NSAID används framförallt vid akuta ledsador, men biverkningar på mag-tarmkanalen, som behöver prostaglandiner till slemhinnans normalfunktion, samt njurar, vars mikrocirkulation är beroende av prostaglandiner, gör att man alltid skall vara extra vaksam vid användande av NSAID under längre tid (Läkemedelsverket, 2010).

Kortikosteroider

Den cellulära effekten av kortikosteroider är en minskning av proinflammatoriska cytokiner som t.ex. IL-1, IL-6, IL-8 och TNF α , samt en ökning av antiinflammatoriska cytokiner som IL-10 (Läkemedelsverket, 2010). Kortikosteroider kan utöva effekt genom att ta sig in i cellen och binda till intracellulära glukokortikoidreceptorer och bilda ett komplex som i sin tur tar sig till cellkärnan och binder till DNA, s.k. "genomic effects". Detta leder till ökning eller minskning av genuttryck. Komplexet minskar bildandet av proinflammatoriska cytokiner genom att hämma transkriptionsfaktorer. Kortikosteroider kan genom direkt stimulering av membranbundna receptorer, eller via direkt aktivering av kinaser, även utöva antiinflammatorisk och immunhämmande effekt utan inkoppling av genreglering. En av de viktigaste vägarna är syntes och frisättning av proteinet annexin 1, som interfererar med en intracellulär signalering och därigenom inhiberar fosfolipas A₂, vilket i sin tur leder till minskad produktion av eicosanoider. De mest använda kortikosteroidpreparaten i Sverige är triamcinolon (Kenacort®) och betame-

tason (Celeston bifas®). Lokala biverkningar av kortikosteroider på ledbrösket kan vara minskning av chondrocyternas storlek och glukosaminoglukan (GAG) nedbrytning (Goodrich & Nixon, 2006). Även produktionen av GAG minskar vid kortisongiva (Goodrich & Nixon, 2006). Kortisonets biverkningar tycks vara dosberoende, enligt Richardson och Dodge (2003) kan triamcinolon, givet i lägre dos, ha en chondroprotektiv effekt.

Hyaluronsyra

Hyaluronsyra (HA) är en glukosaminoglukan, uppbyggd av 10 000-12 000 disackaridenheter, som finns i synovia och ledbrösk. HA produceras av typ B synoviocyter i synovialmembran och av chondrocyter i ledbrösk. I synovian gör HA ledvätskan viskös och bidrar med stötdämpande funktioner i leden. I ledbrösket spelar HA en viktig funktion i det extracellulära matrixet (ECM), då HA ihop med aggregan och kollagen typ II ger ledbrösket elasticitet och draghållfasthet. (Läkemedelsverket, 2010). Den exakta verkningsmekanismen av HA som behandling är inte helt klarlagd, men troligen modulerar HA synovialmembranets kemotaktiska respons genom minskad cellmigration och diffusion. Man har sett att exogen HA inhiberar makrofagers kemotaxi, och HA tycks hindra frisättning av prostaglandiner från makrofager (Goodrich & Nixon, 2006). Positiva resultat har setts vid behandling med en kombination av HA och triamcinolon i led (McIlWraith *et al.*, (2015).

Polysulfaterade glukosaminoglukaner (PSGAGs)

PSGAGs är halvsyntetiska beredningar utvunna från trachea hos nöt, och består främst av kondroitinsulfat. Verkningsmekanismen hos PSGAGs är inte helt klarlagd, men sulfatgrupperna hos PSGAGs tycks kunna interagera med och därmed inhibera brosknedbrytande enzymer som t.ex. MMP. PSGAGs anses också ha en antiinflammatorisk effekt genom att hämma leukocytmigration, inhibera prostaglandinsyntes, stimulera syntes av broskmatrix och öka hyaluronsyrasyntesen, vilket setts i in vitro studier (Läkemedelsverket, 2010). Enligt vissa studier har PSGAGs chondroprotectiva egenskaper, genom att verka för att bibehålla, eller främja chondrocyternas metabola aktivitet, samt inhibera nedbrytande effekter av cytokiner och prostaglandiner på ledbrösk. PSGAGs klassas därför som ett läkemedel som kan modifiera OA (Goodrich & Nixon, 2006).

Interleukin 1 receptor antagonist protein (IRAP) = Autologt konditionerat serum (ACS)

Interleukin 1 receptor antagonist protein (IRAP) är ett biologiskt preparat som utvinns från hästen egnet blod. Blod tas aseptiskt med en spruta från den individ som ska behandlas. Sprutan som innehåller kulor av medicinskt borosilicateglas, som ska öka nivån av framförallt interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), inkuberas under ett dygn i 37°C. IL-1 anses vara en avgörande proinflammatorisk cytokin vid ledinflammation hos häst och hämning av IL-1 har visats hämma utveckling av OA (Textor, 2011). Innehållet av olika cytokiner, i den IRAP man får efter det att man dagen efter centrifugerat innehåller i sprutan, kan skilja mellan olika framställningsmetoder (Hraha *et al.*, 2011). Intraartikulär behandling med IRAP anses kunna minska håltgraden och fibrillering av brosk jämfört med placebo (McIlWraith *et al.* 2015).

Senor och senskador

Senor och ligaments specialiserade fibroblaster, tenocyter, bygger upp en tät, fibrös, bindväv i ett kollagenrikt extracellulärt matrix (ECM). ECM innehåller främst typ I kollagen men även typ III kollagen samt proteoglykaner och glykoproteiner (Patterson-Kane *et al.*, 2012). En liten del av ECM utgörs också av elastin, som ger vävnaden elasticitet. Balansen mellan anabola och katabola processer i ECM regleras av MMP och deras vävnads-/aktivitets inhibitorer (TIMPs). Orsaker till senskador på häst är oftast någon form av överbelastning, där skador på ECM uppstår snabbare än de hinner repareras. En senskada läker, liksom vanliga sårskador i tre faser, en akut inflammationsfas, följt av proliferationsfas och till sist remodeleringsfas. Behandling av senskador behöver därför anpassas till vilken fas skadan befinner sig i (Dahlgren, 2007). I ett tidigt stadie, inom 24 timmar, kan allmänbehandling med kortidsverkande kortikosteroider vara till nytta, då dessa minskar den akuta inflammation som skulle kunna skada närliggande, frisk vävnad. Injektion av kortison, direkt in i skadan, eller allmänbehandling efter 48 timmar har däremot visat sig ha skadliga effekter. Användning av NSAID är omdiskuterat, och används primärt för den smärtlindrande effekten (Dowling *et al.*, 2000).

Behandling med HA direkt i senskadan eller peritendinöst har gett motsägelsefulla resultat. Initialt tycks senor som behandlats lokalt med HA uppvisa en förbättrad läkning, baserat på ultraljudsundersökningar (Dowling *et al.*, 2000). Däremot kunde ingen skillnad i recidivfrekvens ses mellan hästar som bara behandlats konservativt och de som fått lokal behandling med HA eller PSGAGs (Dyson, 1997). Användningen av PSGAGs för senskador grundas på att PSGAGs hämmar makrofagaktivering, kollagenaser och MMP aktivitet, vilket talar för att det skulle kunna vara användbart i det akuta stadiet av en tendinit (Dowling *et al.*, 2000).

Ett biologiskt preparat som används vid senskador är PRP, vilket är blodplasma med hög koncentration av blodplättar. Den bakomliggande idén till PRP är att blodplättar innehåller höga halter av tillväxtfaktorer som blodplättderiverad tillväxtfaktor (PDGF), transformerande tillväxtfaktor β (TGF β) och vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF) som visat sig öka senvävnadens regeneration i både in vitro- och in vivo (Fortier & Smith, 2008).

Mesenkymala stamceller (MSC)

MSC har föreslagits som behandling av led- och senskador eftersom dessa celler antas kunna inducera en regenerativ process och kan differentiera till flera olika typer av vävnad. Tidigare ansågs att stamcellerna själva kunde reparera skadad vävnad genom att integrera med denna och differentiera till exempelvis brosk- eller senvävnad. Nu tror man att MSC kan stimulera läkning genom parakrin signalering och cell-cell kontakt stimulering. Potentiellt kan de även stimulera broskregeneration och på så sätt underlätta läkning vid OA (Broeckx *et al.*, 2019b). In vitro studier har visat att närvaro av MSC kan minska mängden proinflammatoriska cytokiner som IL-1 β , MMP 1 och MMP 13, samt ge ökad produktion av IL-1ra (van Buul *et al.*, 2012).

Definitionen för MSC på människa är att cellen både ska kunna adherera (fästa) till plast och kunna differentiera till osteoblast, chondrocyt eller adipocyt. Vidare ska cellerna uttrycka ytmolekylerna, CD73, CD90 och CD105. MSC ska inte uttrycka någon av ytmolekylerna CD14, CD34 och CD45 (Ullah *et al.*, 2015). Idag saknas ett enhetligt begrepp för hur MSC på häst ska

karaktäriseras (Schauwer *et al.*, 2012). MSC kan utvinnas från fett, blod, benmärg och navelsträng, dock verkar det som att MSC utvunnen från fettvävnad är mindre effektiv än den som kan fås från benmärg (Frisbie & Smith 2010).

De stamceller som används på häst kan vara antingen autologa, där MSC utvinns från samma individ som de sedan planteras in i, eller allogena, där MSC utvinns från en annan individ än den som skall behandlas (Guest *et al.*, 2008). Initialt studerades behandling med autologa MSC men under senare tid har även allogena MSC undersökts. Detta för att snabbare kunna sätta in behandling vid en skada samt för att eliminera riskerna förenade med att samla benmärg från en skadad individ (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). Dessutom kan man samla från yngre hästar som har mer aktiv benmärg än äldre dito (Schnabel *et al.*, 2014). Vid användning av allogena MSC uppkommer frågan om det är säkert för mottagarindividens och om resultatet av behandlingen kan påverkas av huruvida stamcellerna är allogena eller autologa (Guest *et al.*, 2008)? Hill *et al.* (2017) menar att allogena stamceller blir mer pålitliga och förutsägbara i sin verkan. Detta då en standardiserad samling från en väldefinierad grupp av individer torde ge en produkt som varierar mindre i innehåll jämfört med autologa MSC.

Effekten av lokal injektion av autologa och allogena MSC har jämförts, med avseende på lymfocytens immunrespons hos mottagardjur, på två hästar där ett framben/häst hade tre inducerade skador på ytliga böjsenan. Ingen skillnad kunde ses i den cellmedierade immunresponsen vid kontroll post mortem efter 10 respektive 34 dagar. Då studietiden var för kort kunde inga slutsatser dras om huruvida cellerna kunde differentiera till tenocyter, eller om behandlingen förbättrade läkningen (Guest *et al.*, 2008).

Schnabel *et al.* (2014) såg en stor variation mellan individer i hur mycket MHC II som uttrycks på MSC samlad från benmärg. De visade också att odlade MSC som var MHC II positiva gav upphov till en immunologisk reaktion hos leukocyter. Vidare visades att MHC II negativa MSC kunde uppreglera MHC II vid stimulering med IFN- γ . I en annan in vitro studie, där benmärgsderiverade MSC från connemaronnyer blandades med immunologiskt aktiverat blod från fullblod stimulerade allogena MSC inte till någon avstöttningsreaktion, varför allogena MSC bedömdes vara ett säkert behandlingsalternativ (Ranera *et al.*, 2015). In vivo verkade dock inte uttrycket av MHC II spela någon större roll för risken att få en reaktion vid första behandlingen med allogena MSC på häst. Dock sågs en ledreaktion på cellnivå i form av ökat totalantal kärnförande celler i synovia och skillnad i effekt av behandling, i form av ej minskad håltgrad, vid upprepad behandling med allogena MSC (Joswig *et al.*, 2017).

Behandling med allogena MSC

Nyligen har ett allogent läkemedel, baserat på MSC från perifert blod, blivit godkänt för ledbehandling av häst med OA i Europa. Godkännandet baseras bland annat på en studie där broskskador inducerades i en kotled på totalt 12 hästar och hos de behandlade 6 hästarna sågs en minskad grad av hälta och förbättrad läkning av ledbrosket jämfört med kontrollgruppen. Dessa MSC beskrevs som "chondrogen inducerande" (Broeckx *et al.*, (2019a), men det har inte definierats vad denna induktion innebär. Broeckx *et al.* (2019b) undersökte 75 patienthästar med hälta från kotled och tidiga tecken på OA. 50 hästar behandlades med allogena MSC, och 25 hästar behandlades med placebo (steril NaCl). I samband med ledbehandling gavs samtliga

hästar samtidigt en allmänbehandling med en engångsdos Ketoprofen. Dosen MSC var 2 miljoner/led i behandlingsgruppen. Hästar behandlade med MSC uppvisade minskad hältgrad, ledsvullnad och böjprovsreaktion jämfört med placebogruppen. 18 veckor efter behandling var 42 % av hästar ingående i behandlingsgruppen åter i träning emedan ingen häst i kontrollgruppen åter var i träning. Reaktion på behandlingen sågs hos en häst i form av ökad hälta och ledsvullnad 2 dagar efter behandling.

Senskador har behandlats lokalt med autologa MSC och då främst skador på ytliga böjsenan. Inga negativa effekter som lokal reaktion eller bildande av ektopisk vävnad har kunnat ses vid kontroll med ultraljud och scintigrafi (Smith, 2008; Godwin *et al.*, 2011). Behandlingsresultatet var i båda studierna bättre med avseende på recidiv, 18 % av 242 hästar respektive 27,4 % av 113 hästar, än vad som rapporterades av Dyson (2004), 42,5 - 44,4 %, då 50 hästar i varje grupp behandlades konservativt, med HA eller PSGAG i lesionen

Vid lokal behandling av senskador med allogena MSC deriverade från navelsträng kom 77 % (40/52 hästar) tillbaka på samma nivå som innan, och recidiv sågs i 24 % av fallen (van Loon *et al.*, 2014). Behandlingsresultat har även jämförts mellan allogena MSC från amnion (AMSC), 51 hästar, och autologa MSC från benmärg (BM-MS), 44 hästar. Ingen negativ effekt sågs vid endera behandling, men det sågs en ökad frekvens recidiv hos hästar som behandlats med BM-MS, 23 %, jämfört de som behandlats med AMSC, 4 % (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). Försök med vad som sades vara ”tenocytinducerade” allogena MSC har gjorts på en gaffelbandsskadad häst, där skadan inte läkt med konventionell behandling. Hästen behandlades med MSC och PRP vid två tillfällen och en gradvis förbättring sågs vid samtliga uppföljningstillfällen, fram till 32 veckor efter behandling, då hästen åter var i full träning. 1 år efter första behandlingen var hästen fortfarande i träning (Vandenbergh *et al.*, 2015) (tabell 1).

Tabell 1. Sammanställning av tidigare studier av senskador behandlade med MSC samt recidivfrekvens

Studie	Typ av MSC	Antal hästar	Recidiv %
Smith (2008)	Autologa benmärg	242	18
Goodwin <i>et al.</i> (2011)	Autologa benmärg	113	27,4
Lange-Consiglio <i>et al.</i> (2013)	Autologa benmärg	44	23
Lange-Consiglio <i>et al.</i> (2013)	Allogena amnion	51	4
Van Loon <i>et al.</i> (2014)	Allogena navelsträng	52	24

MATERIAL OCH METOD

Retrospektivt har journaler över 137 hästar behandlade med allogena MSC, vid Scandinavian Equine Clinics (SEC) i Stockholm, under en tidsperiod av ett år, gått genom. I de fall röntgen- och ultraljudsbilder funnits att tillgå har dessas tolkningar inkluderats. På grund av att SEC inte längre existerar var möjligheten att följa alla ingående hästars hälsostatus över tid begränsad. Hästarnas prestationsnivå varierande från inget arbete/lättare promenadridning/inridning till

högsta nivå inom respektive gren (tabell 2 och 3). Vissa hästar var verksamma inom flera grenar, s.k. ”allround”. Könsfördelningen var 46 ston, 87 valacker och 4 hingstar.

Tabell 2. Nivå träning/tävling innan behandling

Nivå arbete	Inget arbete	Lätt träning	Lätt klass	Medelsvår klass	Svår klass	Elit	Okänt
Antal	5	47	37	34	9	1	4

Tabell 3. Grenfördelning hästar behandlade med MSC

Gren	Dressyr	Hopp	Fälttävlan	Allround	Trav	Galopp	Western	Islandshäst
Antal	50	50	1	18	8	4	1	5

Både hästar som tidigare behandlats med andra preparat (Celeston bifas, Kenacort, Pentosan, HA, IRAP etc.) samt hästar som inte fått någon annan behandling inkluderades liksom hästar med mer än en misstänkt hältutlösande faktor, det vill säga hälsymtom från flera ben/leder. Hur länge inkluderade hästar varit halta varierade från under 2 veckor till över 6 månader (tabell 4). Gradering av hälta gjordes på en linjär skala från 0-5 där grad 5 representerade blockhälta. Hästar som diagnosticerats med skador med traditionellt god prognos liksom hästar som behandlats under lång tid utan resultat och som ”dömts ut” på andra kliniker inkluderades.

Tabell 4. Duration av hälta innan behandling med MSC

Duration hälta	<2 v	2v-1mån	1-3 mån	3-6 mån	>6 mån
Antal hästar	6	43	49	24	15

MSC behandlingen bestod av MSC utvunna ur benmärg från femur och humerus på hästar som av olika orsaker ändå skulle avlivas. Med tillstånd från djurägaren togs benmärg ut post mortem. Enligt besked från Jordbruksverket kunde behandlingen med MSC ske på behandlande veterinärs ansvar utan något ytterligare tillstånd. Vid behandling i led kombinerades en dos med 10 miljoner MSC med 2,5 ml HA (Synvet®, 20 mg/ml). I knäled dubblerades dosen till 20 miljoner MSC och 5 ml HA. Vid behandling i sena eller ligament var dosen 10 miljoner MSC. Vid intravenös behandling gavs 300 mljoner MSC. I samband med behandling med MSC gavs alla hästar en intravenös dos Flunixin® (50mg/ml), 1,1 mg flunixin/kg uppskattad kroppsvikt.

Skadehistorik och svar på eventuell tidigare behandling av den hälta/skada som sedan behandlades med MSC inkluderades i dataanalysen, samt tid till eventuellt recidiv. Denna information jämfördes med behandlingssvar på MSC, inklusive tid till hältans försvinnande och återgång till arbete. Som positivt behandlingssvar bedömdes att hästen blev diagnosticerad som ohalt alternativt rapporterades ha kommit tillbaka till arbete.

RESULTAT

Hältan hos de behandlade hästarna graderades vid första behandlingstillfället till mellan 0,5 - 3 grader på rakt spår i trav utan provokationstester (tabell 5).

Tabell 5. Grad av hälta innan MSC behandling

Grad av hälta	0,5	1	2	3
Antal hästar	16	70	38	13

Av de 137 hästar som behandlades med MSC hade 75.1% (103/137) tidigare fått någon annan typ av behandling för samma skada. Ungefär 50 % (52/103) hade inte svarat på den tidigare behandlingen med annat/andra preparat och 49,5% (51/103) hade svarat helt eller delvis med minskad hältgrad. Av de 51 som svarat helt eller delvis på behandling med andra preparat hade 30 hästar, 29 % av alla tidigare behandlade, kommit tillbaka till någon form av arbete/tävling i 1-6 månader innan de åter blev halta från samma område som innan (tabell 6 och 7).

Tabell 6. Hästar som fått annan behandling samt behandlingssvar vid annan behandling

Ej fått annan behandling	Fått annan behandling	Svarat helt på annan behandling	Delvis svarat på annan behandling	Ej svarat på annan behandling	Åter i arbete
34	103	25	26	52	30

Tabell 7. Tid till recidiv efter annan behandling än MSC

	Åter i arbete efter annan behandling än MSC	Recidiv >1 månad efter åter i arbete	Recidiv 1-3 månader efter åter i arbete	Recidiv 3-6 månader efter åter i arbete
Antal	30	2	20	8

Av de 137 MSC behandlade hästarna svarade 7 inte på behandling och förblev halta. 12 hästar blev ej kliniskt uppföljda på kliniken och har inte heller tävlat efter behandlingen, således saknas information om behandlingens utfall i dessa fall. 81 % (112/137) av samtliga behandlade hästar, det vill säga 89,6 % (112/125) av de hästar som följdes upp kliniskt, bedömdes som friska (ohalta) efter behandling med MSC. 103 av hästarna bedömdes som kliniskt friska inom 6 månader efter behandling och 9 hästar efter 6 månader. 72 % av uppföljda hästar (90/125) kom tillbaka till arbete och tävling emedan 22 användes till annat. 67 % (60/90) av de behandlade hästarna var fortfarande i arbete minst 6 månader efter att de bedömts som kliniskt friska/ohalta (tabell 8).

Tabell 8. *Behandlingsresultat konventionell behandling och MSC behandling samt tid till ev. recidiv av hälsa. >6 mån innebär att hästen fortfarande var i arbete när journalgenomgången gjordes*

Tid	Recidiv på annan behandling	Frisk efter behandling enligt journal	MSC enligt MSC Behandling	Åter i arbete efter MSC behandling	Tid som frisk efter MSC behandling
Ej frisk	74	13	20	7	
<1 mån	2	22	6	0	
1-3 mån	20	53	26	5	
3-6 mån	8	28	31	25	
>6 mån,	0	9	27	60	
Ej uppföljd	0	12	27	40	
N:	103	137	137	137	

42 % (58/137) hästar behandlades för skada både på led och sena/ligament. I denna grupp bedömdes 84 % som ohälsa vid uppföljning. Bland hästar som behandlats enbart för skada/inflammation i led var motsvarande siffra 71 % (40/56). För hästar som enbart behandlats för sen- eller ligamentskada var positivt behandlingssvar 61 % (tabell 9).

Tabell 9. *Antal hästar inom varje grupp*

Typ av skada	Skada/inflammation i led	Skada i sena/ligament	Kombination skada i led och sena/ligament
Antal hästar	56	23	58
Antal som bedömts som kliniskt friska vid uppföljning	40	14	49

Enligt journaler bedömdes 13 hästar ha kraftig OA utifrån radiologiska fynd. Av dessa svarade 77 % (10/13) positivt på behandling och återgick till arbete.

På 60 hästar behandlades totalt 65 sen- eller ligamentstrukturer. Gaffelband var överrepresenterade (54 %), följt av ligament (35 %). I kategorin "ligament" inkluderades synovialleders sidoligament samt patellarligament. 11 % var böjsenor, där positivt utfall av behandling var 43 %. För gaffelband var motsvarande siffra 74 % (26/35) och 87 % (20/23) för ligament.

35 hästar behandlades en upprepad gång med MSC, av dessa kom 25 (71 %) tillbaka till arbete. 16 av dessa behandlades för ledinflammation/ledskada, 5 behandlades för senskada/ligamentskada och 14 hästar behandlades för både led- och sen-/ligamentskada. I respektive grupp var positivt utfall där 69 % (11/16), 80 % (4/5) och 64 % (9/14).

2,2 % (3/137) uppvisade reaktion på behandling med MSC i form av ökad hältgrad, svullnad och ömhet på injektionsplatsen inom 0-6 dagar efter behandling. I samtliga fall minskade reaktionen inom 24 timmar efter behandling med antiinflammatoriskt läkemedel. En av hästarna uppvisade reaktion efter lokal behandling 6 dagar efter behandlingstillfället. Samma häst behandlades vid ett senare tillfälle lokalt på annan plats utan reaktion. En annan häst reagerade efter upprepad lokal behandling i led. Denna häst uppvisade ingen reaktion i samband med behandling vid de två första tillfällena, men uppvisade svullnad, värme och ökad hältgrad inom 24 timmar efter tredje behandlingstillfället. Den tredje hästen reagerade direkt i anslutning till behandlingen vid tillförsel av MSC intravenöst. Behandling med Dexametason (Dexadreson®, 2 mg/ ml), 0,06 mg/kg uppskattad kroppsvikt, sattes in direkt och inga ytterligare komplikationer tillstötte.

DISKUSSION

Teoretiskt finns det en risk att stamceller kan utvecklas till olika typer av celler och dela sig okontrollerat med ökad risk för tumöromvandling som följd. Ingen av de 137 behandlade hästarna i studien visade några för djurägaren eller den behandlande veterinären uppenbara tecken på formation av ektopisk vävnad vid vare sig lokal eller systemisk behandling. Smith (2008) samt Godwin *et al.* (2012) såg inte heller, under ett kort tidsperspektiv, någon risk för vare sig ektopisk vävnad eller teratogena effekter vid behandling med MSC. Långsiktigt har hästar följts i över 5 år efter MSC behandling utan att visa tecken på långsiktiga negativa effekter (Fortier & Smith, 2008). Således tycks risken för okontrollerad tillväxt av injicerade MSC vara liten.

En fråga som uppstår vid behandling med allogena MSC, är huruvida det finns risk för avstöttningsreaktioner. MSC har ansetts vara immunopriviligerade, då de inte uttrycker MHC II molekyler (Guest *et al.*, (2008). In vitro studier visar motstridiga resultat. Schnabel *et al.* (2014) menar att det kan finnas risk för immunrespons vid behandling med allogena MSC. Ranera *et al.* (2015), visar å andra sidan att allogena MSC kan vara ett säkert alternativ. Trots att MSC inte skall uttrycka MHC II tycks detta ändå förekomma hos ett fåtal individer på MSC utvunnen från benmärg. För hästar som behandlas första gången med MSC anses det vara säkert, oavsett förekomst av MHC II molekyler eller ej, emedan det kan finnas en risk för reaktion eller åtminstone sämre behandlingsresultat, vid upprepad behandling (Joswig *et al.*, 2017). Van Loon (2014) menar att MSC är säkra då MSC är hypoimmunogena och oftast inte uttrycker MHC II molekyler, vidare kan MSC förhindra T-cell responsen både indirekt genom modulering av dendritiska celler, och direkt genom att störa T-cellernas funktion. Dessutom verkar MSC kunna hämma immunförsvaret lokalt genom produktion av prostaglandiner och IL-10 (van Loon *et al.*, 2014).

Bland de hästar som behandlades vid SEC var förekomsten av biverkningar efter MSC behandling låg, bara 3 av 137 uppvisade någon form av reaktion. Men siffran är ändå något högre jämfört med Broeckx *et al.* (2019b) resultat där endast 1 av 75 hästar uppvisade tecken på biverkningar. Skillnaden mellan dessa studier är att de MSC som användes vid SEC var utvunna från benmärg där förekomst av MHC II tycks vara högre jämfört med MSC utvunna från perifert blod (Schnabel *et al.*, 2014) vilket användes av Broeckx's *et al.* (2019b). Om så är fallet borde fler hästar uppvisa reaktioner efter behandling med allogena, benmärgsderiverade MSC. Det finns en risk att vissa, mindre biverkningar kan ha missats på hästar behandlade vid SEC

eftersom behandlade hästar gick hem samma dag och därför möjligen inte var under så noggrann uppsikt som i klinisk miljö. En mindre värmeökning/svullnad eller ömhet kan eventuellt ha missats när bedömningen överläts till djurägaren.

103 av hästarna hade tidigare behandlats med andra preparat och med ett positivt resultat på ca 50 %. Erfarenhetsmässigt var, enligt chefsveterinären på SEC, detta behandlingssvar sämre än normalt varför MSC behandling rekommenderades efter samråd med djurägarna. Den tidigare behandlingen kan ha påverkat resultatet av MSC-behandlingen i både positivt och negativ riktning. Mest sannolikt är nog att de hästar som inte svarade på annan behandling hade sämre möjlighet att få ett positivt behandlingssvar till följd av mer kronisk OA eller sen-/ligament-skada. En svaghet i studien är det retrospektiva upplägget med avsaknad av ett strikt försöksprotokoll/program för både behandling, eftervård och uppföljning. Dessutom har inklusionskriterier för hästar, bedömningen av hältgrad och behandlingssvar skett subjektivt och av bara en och samma veterinär. Det senare, plus faktumet att denna veterinär också varit aktiv i framtagandet av den använda allogena MSC-produkten, medför en risk för bias baserat på önskat/förväntat behandlingsresultat. Både hästar med långvarig hälsa och långt gången OA inkluderades, liksom hästar med lågradiga diffusa problem. Rehabilitering har anpassats efter skadans natur och djurägares möjligheter till rehabilitering. Djurägaransvaret under rehabiliteringsperioden har också inneburit en risk för eftergivenhet i djurägarens bedömning av behandlingsresultat och eventuella biverkningar. Den heterogena försöksgruppen och ovan uppräknade fallgröpar gör att resultaten blir något svårbedömda, men att behandlingen med allogent MSC trots allt inte verkar vara skadlig kan däremot sägas bestämt. Det hade varit optimalt att genomföra en prospektiv, dubbelblindad studie med en kontrollgrupp för att utvärdera eventuell nytta av MSC-behandling. Tyvärr är ett sådant upplägg svårt att genomföra på ett stort material av patienthästar (Fortier & Smith, 2008). Inte minst då många djurägare vill undvika risken att just deras häst, beroende på vilken behandlingsstrategi som studeras, hamnar i kontroll- eller behandlingsgruppen vid exempelvis en senskada. Det breda spektrumet med olika typer av led- och senskador gör att tiden till att hästen åter är i arbete skiljer sig stort mellan behandlade individer. Exempelvis har akuta ledinflammationer kortare rehabilitering jämfört med akuta senskador.

I studien av Broeckx *et al.* (2019b) gavs NSAID (ketoprofen) allmänt i samband med lokal injektion av MSC och de ansåg inte att ketoprofenet påverkade studiens slutresultat. Att hästarna på SEC behandlades med NSAID intravenöst, parallellt med MSC behandling, torde därför inte påverka slutresultatet nämnvärt. Dock finns en möjlighet att akuta mindre reaktioner kopplade till MSC behandlingen maskerats i och med detta. I led injicerades MSC ihop med HA, detta då HA ska förlänga livslängden och öka den chondrogena potentialen hos MSC (Murphy *et al.*, 2003; McIlwraith *et al.*, 2015). Frågan är om HA potentiellt kan utöva någon positiv effekt vid behandling utöver effekten hos MSC, samt om dessa två preparat kan utöva synergistiska effekter?

Verkningsmekanismen hos MSC är fortfarande inte helt klarlagt. Men det verkar råda enighet om att det inte är stamcellerna i sig själva som utvecklas till sen- eller broskvävnad efter injektion i en skadad sena eller led, utan att de snarare verkar genom parakrin signalering och cell-cell kontakter (Broeckx *et al.*, 2019b). Detta är ett område som behöver undersökas vidare. Det borde vara av stor vikt att veta vilka delar/molekyler i ”cellsoppan” som faktiskt kan ha positiva

effekter och om MSC bäst samlas från en frisk individ, eller om det är mer lämpligt att använda ”triggade MSC” från en häst med liknande typ av skada, för att uppnå eventuell och önskad effekt av behandlingen. Genom att vidare undersöka olika ämnen ingående i MSC och deras eventuella verkningsmekanism kan möjlighet för en än mer riktad/specificerad behandling vid olika typer av skador ges. Detta kanske också kan leda till att eventuella oönskade delar i produkten, som skulle kunna ge negativa effekter, kan uteslutas.

Enligt Murphy *et al.* (2003) och Broeckx *et al.* (2019a) tycks MSC ha en positiv effekt på inducerade broskskador, vilket kan indikera att behandling med MSC skulle kunna stoppa, eller åtminstone fördröja, utvecklingen av OA i ett tidigt skede. För behandling av senskador har MSC varit intressanta under än längre tid, då senskador ofta läker med ärrvävnad vilket ökar risken för att senan skadas igen vid full belastning (Godwin *et al.*, 2012). Graden av återfall efter senskador rapporteras vara mellan 44,4 % (Dyson, 2005) och 56 % (Smith, 2008). Återfall efter behandling med MSC ligger betydligt lägre, från 4-27 % (Smith, 2008; Godwin *et al.*, 2012; Lange-Consiglio *et al.*, 2013), där 4 % är en grupp som behandlats med allogena MSC från anmion (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). Dessa siffror indikerar att senskador, även om MSC inte verkar få läkningen att gå snabbare, läker bättre om de behandlas med MSC. Bäst resultat har uppnåtts vid snabbt insatt behandling, eftersom att ju längre tid som passerar, desto mer ärrvävnad hinner bildas (Lange-Consiglio *et al.*, 2013). Snabbt insatt behandling med MSC är endast möjligt med allogena stamceller då processen för odling är tidskrävande och tar ca 4 veckor för autologa MSC.

I denna studie bedömdes 81 % av samtliga behandlade hästar som kliniskt friska efter behandling, enligt journalanteckningar. Positivt utfall på behandling tycks vara något lägre för hästar som radiologiskt bedömts ha en kraftig OA, där resultatet var 77 %. Detta kan jämföras med 94 % tillfrisknande bland 49 patienthästar som varit halta mindre än en månad och 49 % hos 85 patienthästar som varit halta > 2 månader när de behandlades intrartikulärt med Orgotein (Palosein®) av Ahlengård *et al.* (1978). Andelen tillfrisknade var 87,8 % bland hästar med OA som behandlades med triamcinolon (TA) och 64,1 % av hästar behandlades med TA i kombination med HA (de Grauw *et al.*, 2016). För behandling av OA med metylprednisolon acetat (MPA) verkar positivt behandlingssvar ligga mellan 46 % (Kristiansen & Kodd, 2007), och 67 % (Labens *et al.* 2007). Behandling med polysulfaterade glukosaminoglukaner (PSGAGs) tycks ge positivt behandlingssvar i ca 67 % av fallen (Kristiansen & Kodd, 2007). 66 % av hästarna som behandlades med MSC i studien kom tillbaka till arbete, vilket kan jämföras med 50 % för både hästar behandlade med TA och en kombination av TA+HA (de Grauw *et al.*, 2016). Resultatet av behandling med MSC, TA och HA tycks inte avvika stort från varandra när dessa siffror jämförs mellan studier. Dock hade en stor del av hästarna i denna studie inte svarat på behandling med HA och kortisonpreparat, alternativt svarat delvis och/eller åter blivit haltare, vilket sannolikt borde ha minskat chansen till positivt behandlingssvar vid behandling med MSC om det senare preparatet varit likvärdigt. Men, uppföljning över tid har inte varit möjligt i denna retrospektiva studie.

Konklusion

Behandling med MSC vid OA tycks vara patientsäkert och kan potentiellt i tidigt skede stoppa eller hämma utvecklingen av OA alternativt lindra de kliniska symtomen hos drabbade hästar. För behandling av senskador verkar både allogena och autologa MSC vara patientsäkert och tidigt insatt behandling tycks minska risken för recidiv. För att snabbare kunna sätta in behandling är allogena MSC ett mer lättillgängligt och för mottagarhästen mindre invasivt behandlingsalternativ än autologa MSC. Fler studier behöver dock göras inom området, med fördel prospektiva blindade studier där även de direkta verkningsmekanismerna på cellnivå undersöks.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Hälta är den vanligaste orsaken till veterinärbesök hos svenska hästar. Oftast orsakas hältan av ledinflammationer, ”osteoartrit”, eller skador på senor och ligament. Ledinflammationer uppstår när leden belastas på ett onormalt sätt, genom upprepad överbelastning på en normal led eller vid normal belastning av en onormal led. Detta leder ofta till en låggradig inflammation som över tid utvecklas och så småningom leder till en kronisk hälta. Ledinflammationer behandlas ofta med kortison eller hyaluronsyra, alternativt med en kombination av dessa två. Två andra vanliga behandlingsmetoder vid ledinflammation är polysulfaterade glukosaminoglykaner som t.ex. Pentosan, och IRAP. I samband med ledbehandlingar kan hältutlösande inflammation också behandlas med icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel, s.k. NSAIDs, som t.ex. Metacam, Flunixin och Fenylbutazon. Av alla dessa läkemedel och preparat är det ingen som effektivt stoppar de nedbrytande processer som sker i leden vid en kronisk ledinflammation. Dessutom finns risk för biverkningar kopplade till bl.a. flera upprepade behandlingar med kortison och långvarig behandling med NSAIDs. Under de senare åren har därför intresset för biologiska läkemedel och preparat för behandling av ledinflammationer ökat. Ett område som väckt stort intresse är stamceller, och framför allt mesenkymala stamceller. Stamceller kan utvinnas från benmärg, fett, blod, navelsträng och fosterhinnor och kan sedan utvecklas till flera olika typer av celler som brosk-, ben-, fett- och senceller. Senskador, som liksom ledinflammationer är en vanlig orsak till hälta på häst, kan uppstå vid trauma som t.ex. när en häst trasslar in sig i tråd, eller blir sparkad av en annan häst. En vanligare orsak till senskador på sporthästar är någon form av överbelastning, där skador på senans vävnad uppstår snabbare än de hinner repareras naturligt. Senskador kan liknas vid sårskador när det kommer till läkning mensenor och ligament läker inte lika snabbt, eller bra, som resten av kroppens vävnader. Ofta läker dessa skador med ärrvävnad istället för normal senvävnad, vilket ökar risken för skador på andra delar av aktuell sena och ligament när hästen börjar tränas. Både senor och ligament behöver lång tid och kontrollerad belastning som successivt ökas. Senskador har historiskt behandlats endast med kyla och vila, samt NSAIDs för att minska smärta. Behandling av senskador med hyaluronsyra och polysulfaterade glukosaminoglykaner har långsiktigt inte gett bättre resultat. Senor kan också behandlas med PRP, som utvinns från hästens blod och är rikt på blodplättar. Liksom ledinflammationer har intresse för behandling med stamceller av sen- och ligamentskador väckts, då stamceller teoretiskt skulle kunna ge en bättre läkning utan ärrvävnad.

Stamceller kan tas både från samma häst som sedan ska behandlas, s.k. ”autologa” stamceller. De kan också tas från en annan häst än den som är skadad, s.k. ”allogena” stamceller. Fördelarna med allogena stamceller är att de kan lagras och användas direkt vid behov, till skillnad från autologa stamceller, som måste tas från hästen och odlas under 3-4 veckors tid, vilket fördröjer tiden innan behandling, något som gör både rehabilitering längre, och riskerar att försämra prognosen för tillfrisknande i vissa fall.

I denna studie gjordes en genomgång av journaler från 137 hästar som behandlats med allogena stamceller på en hästklinik i Stockholm. Hästarna hade behandlats, för hälta, antingen i en led, sena, eller fått systemisk behandling intravenöst (i blodet). Av dessa 137 hästar var det 7 hästar som inte blev bättre och förblev hälta och 12 hästar kunde inte följas upp efter behandling. 103 hästar blev friska inom 6 månader efter behandlingen, medan 9 hästar var friska först efter 6

månader. 90 hästar kom tillbaka i full träning efter behandling med stamceller, och 60 av dessa hästar var fortfarande i full träning/tävlandes minst 6 månader efter att de friskförklarats efter stamcellsbehandlingen. Av de 137 behandlade hästarna var det endast 3 hästar som uppvisade någon biverkning på behandlingen. Dessa 3 hästar blev bättre inom ett dygn

Resultatet av denna studie tyder på att behandling med stamceller från en donatorhäst är säkert för mottagarhästen och att stamceller teoretiskt kan vara ett alternativ för behandling av ledinflammation och sen-/ligamentskador på häst, dock behöver ytterligare studier göras.

TACK

Till Ove Wattle, för gott handledarskap, stöttning och förstklassig hjälp i skrivprocessen och databearbetningen. Christopher Johnston, för vänskap, mentorskap men framför allt ovärderlig kunskap och inspiration.

REFERENSER

- Ahlengård, S., Tufvesson, G., Pettersson, H. & Andersson, T. (1978). Treatment of traumatic arthritis in the horse with intra-articular Orgotein (Palosein®). *Equine Veterinary Journal*, vol. 10 (2), ss. 122-124. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1978.tb02235.x
- Broeckx, S.Y., Seys, B., Suls, M., Vandenberghe, A., Mariën, T., Adriaensen, E., Declercq, J., Van Hecke, L., Braun, G., Hellman, K. & Spaas J.H. (2019). Equine allogenic chondrogenic induced mesenchymal stem cells are an effective treatment for degenerative joint disease in horses. *Stem Cells and Development*, vol. 28 (6), ss. 410-422. DOI: 10:1089/scd.2018.0061.
- Broeckx, S.Y., Martens, A.M., Bertone, A.L. van Brantegem, L., Duchateau, L., van Hecke, L., Duolin, M., Oosterlinck, M., Chiers, K., Hussein, H., Pille, F. & Spaas J.H. (2019). The use of equine chondrogenic induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Equine Veterinary Journal*, ISSN 0425-1644, ss. 1-7. DOI: 10.1111/evj.13089.
- Dahlgren, L.A. (2007). Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, vol 6, ss. 168-173. DOI: 10.1053/j.ctep.2007.08.002.
- De Grauw, J.C., Visser-Meijer, M.C., Lashley, F., Meeus, P. & van Weeren, P.R. (2016). Intra-articular treatment with triamcinolone compared with triamcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. *Equine Veterinary Journal*, vol. 48 (2), ss. 152-158. DOI: 10.1111/evj.12383
- Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R. & Smith, R.K.W. (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, vol. 32 (5), ss. 369-378. DOI: 10.2746/04251640077591138.
- Dyson, S.J. (1997). Treatment of superficial digital flexor tendinitis: A comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, vol. 43, ss. 297-300.
- Dyson, S.J. (2004). Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-200). *Equine Veterinary Journal*, vol. 36, ss. 415-419. DOI: 10.2746/0425164044868422.
- Fortier, L.A. & Smith, R.K.W. (2008). Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, vol. 24, ss. 191-201. DOI: 10.1016/c.jcveq.2007.11.002
- Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., Kacak, C.E., Werpy N.M. & McIlwraith C.W. (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, ss. 1675-1680. DOI: 10.1002/jor.20933.
- Frisbie, D.D. & Smith, R.K.W., (2010). Clinical update of the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, vol. 42 (1), ss. 86-89. DOI: 10.2746/042516409X477263.
- Godwin, E.E., Young N.J., Dudhia, J., Beamish, I.C. & Smith, R.K.W. (2012). Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with over-strain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, ss. 25-32. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00363x.
- Goodrich L.A. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal*, vol. 171, ss. 51-69. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.07.008.

- Guest, D.J., Smith, M.R.W. & Allen, W.R. (2008). Monitoring the fate of autologous and allogenic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine Veterinary Journal*, vol. 40 (2), ss. 178-181. DOI: 10.2746/042516408X276942.
- Hill, J.A., Cassano, J.M., Goodale, M.B. & Fortier, L.A. (2017). Antigenicity of mesenchymal stem cells in an inflamed joint environment. *American Journal Veterinary Research*, vol. 78 (7), ss. 867-875. DOI: 10.2746/0425164044868422.
- Hraha, T.H., Doremus, K.M., McIlwraith, C.W. & Frisbie, D.D. (2011). Autologous conditioned serum: The comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine Veterinary Journal* vol. 43(5), ss. 516-521.
- Joswig, A.J., Mitchell, A., Cummings, K.J., Lewine, G.J., Gregory, C.A., Smith III, R. & Watts, A.E. (2017). Repeated intra-articular injection of allogenic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 8, art. 42. DOI: 10.1186/s13287-017-0503-8.
- Kristiansen, K.K. & Kold, S.E. (2007) Multivariable analysis of factors influencing outcome of 2 treatment protocols in 128 cases of horses responding positively to intra-articular analgesia of the distal interphalangeal joint. *Equine Veterinary Journal*, vol. 39 (2), ss. 150-156. DOI: 10.2746/042516407X170094.
- Labens, R., Mellor, D.J. & Voûte, L.C. (2007). Retrospective study of the effect of intra-articular treatment of osteoarthritis of the distal tarsal joints in 51 horses. *Veterinary Record*, vol. 161, ss. 611-616. DOI: 11.1136/vr.161.18.611.
- Lange-Consiglio, A., Tassan, S., Corradetti, B., Meucci, A., Perego, R., Bizzaro, D. & Cremonesi, F. (2013). Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. *International Society for Cellular Therapy*, vol. 15, ss. 1011-1020. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.002
- Läkemedelsverket (2010). *Information från läkemedelsverket supplement 1:2010*. Uppsala: Läkemedelsverket. ss. 5-10; 18-20; 22-26; 28-35.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D. & Kawcak, C.E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone and Joint Research*, 1(11), ss. 297-309.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E. & van Weeren, R. (2015). *Joint Disease in the Horse*. 2nd ed. Saunders, Elsevier Health Sciences.
- Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B. & Barry F.P. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, vol 48, art. 12, ss. 3464-3474. DOI 10.1002/art.11365.
- Patterson-Kane, J.C., Becker, D.L. & Rich, T. (2012). The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research. *Journal of Comparative Pathology*, vol. 147(2-3), ss. 227-247.
- Penell, J.C., Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *The Veterinary Record*, vol. 157, ss. 470-477. DOI: 10.1136/vr.157.16.470.
- Ranera, B., Antczak, D., Miller, D., Doroschenkova T., Ryan, A., McIlwraith, C.W. & Barry, F. (2016). Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes. *Equine Veterinary Journal*, vol. 48, ss. 253-260. DOI: 10.1111/evj.12414.

- Richardson, D.W. & Dodge, G.R., (2003). Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflammation Research*, vol. 52, ss. 39-49. DOI: 10.1007/s000110300012.
- Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Bevilaqua Felipe, M.J. & Fortier, L. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MCH class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 5, art. 3. DOI: <http://stemcellres.com/content/5/1/13>.
- Skiöldebrand, E. (2004). *Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria 176.
- Smith, R.K.W. (2008). Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and Rehabilitation*, vol. 30 (20-22), ss. 1752-1758. DOI: 10.1080/09638280701788241.
- Textor, J. (2011). Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol. 27 (2), ss. 275-298. DOI: 10.1016/j.cveq.2011.05.001.
- Ullah, I., Raghavendra B.S. & Jin Rho, G. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, vol. 35, art. 191. DOI: 10.1042/BSR20150025.
- Van Buul, G.M., Villafuertes, E., Bos, P.K., Waarsing, J.H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J.A.N., Bernsen, M.R. & van Osch, G.J.V.M. (2012). Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 2, ss. 1186-1196. DOI: 10.1016/j.joca.2012.06.003.
- Van Loon, V.J.F., Scheffer, C.J.W., Genn, H.J., Hoogendoorn A.C. & Greve J.W. (2014) Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. *Veterinary Quarterly*, vol. 34:2, ss. 92-97, DOI: 10.1080/01652176.2014.949390
- Vandenberghe, A., Broeckx, S.Y., Beerts, C., Seys, B., Zimmerman, M., Verweire, I., Suls, M. & Spaas J.H. (2015). Tenogenically induced allogenic mesenchymal stem cells for the treatment of proximal suspensory ligament in a horse. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 2, art. 49, ss. 1-7. DOI: 10.3389/fvets.2015.00049.