



Stamcellsbaserad behandling

”Den vanligaste orsaken till avulsion av plexus brachialis är trafikolyckor, framför allt med motorcykel, men även till exempel fall från hög höjd och svår förlossning då barnet behöver dras ut kan orsaka skada på plexus brachialis.”



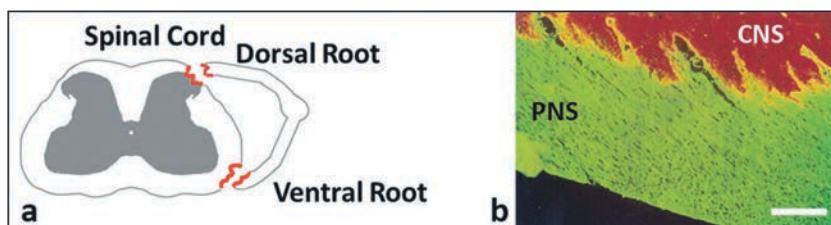
Att återskapa förlorade funktioner efter en skada på ryggmärgen är en stor utmaning för vården. Många bär förhoppningen att transplantation av stamceller ska kunna vara en behandlingsmöjlighet. I denna artikel beskriver **Elena Kozlova**, docent vid Uppsala universitet, hur hennes forskargrupp lyckats uppnå en återkomst av sensoriska funktioner med stamcellstransplantation i djurmodeller.

av ryggmärgsskada

Förbättrat medicinskt omhändertagande och förbättrad rehabilitering har lett till en ökad livslängd och bättre livskvalitet hos patienter med ryggmärgsskada, men återskapande av förlorade sensomotoriska funktioner är alltjämt en stor utmaning. Transplantation av stamceller ses av många som en lovande möjlighet att återge förlorade funktioner efter ryggmärgsskada och begränsade inledande kliniska försök med sådan behandling pågår.¹ I denna artikel diskuteras möjligheter med stamcellsbaserad behandling av ryggmärgsskada i en experimentell modell av avulsion av ryggmärgens sensoriska bakrötter, en modell som är kliniskt relevant då den motsvarar den sensoriska komponenten i spinal rotavulsion. Vi har i våra experiment uppnått långsiktig partiell återkomst av sensoriska funktioner i denna modell av bakrotsavulsion efter transplantation av neurala progenitorer (förstadier) producerade från humana embryonala stamceller.

SPINAL ROTAVULSION

Spinal rotavulsion innebär avslitning av en eller flera nervrötter från ryggmär-



Figur 1. Bakrotens övergångszon. Infärgning med antikroppar mot GFAP (röd) och laminin (grön) visar övergångszonen ("dorsal root transitional zone", DRTZ) mellan den perifera och centralnervösa delen av bakroten. Centralnervös vävnad skjuter ut perifert i form av "central tissue projections" (CTP). Bild b tidigare publicerad i Brain Research Reviews.¹⁰ Skalstreck=50 µm.

gen (Figur 1a), oftast drabbas plexus brachialis. Eftersom skadan inte bara drabbar de avslitna rötterna utan också angränsande områden i ryggmärgen, betraktas rotavulsion som en longitudinell ryggmärgsskada.² Studier av patofysiologiska mekanismer och behandlingsmöjligheter vid spinal rotavulsion har därför direkt relevans för ryggmärgsskada i allmänhet. Den vanligaste orsaken till avulsion av plexus brachialis är trafikolyckor, framför allt med mo-

torcykel, men även till exempel fall från hög höjd och svår förlossning då barnet behöver dras ut kan orsaka skada på plexus brachialis. Symtomen och deras omfattning beror på vilka rötter och hur många rötter som slitits av. Vid avulsion av plexus brachialis drabbas patienten av förlamning i hela eller delar av övre extremitetens muskler, känselbortfall inom motsvarande områden och oftast svårbehandlad kronisk smärta av neuropatisk karaktär.

REPARATION AV AVSLITNA FRAMRÖTTER

Förutsättningarna för att återge motoriska och sensoriska funktioner efter rotavulsion är fundamentalt olika. Att återskapa motoriska funktioner innebär framför allt att skydda de skadade motorneuronen från att degenerera och dö, samt att få deras axoner exponerade för den nervtillväxtstimulerande miljö som finns i framrotens perifera nervmiljö. Detta sker dock inte spontant. Kirurgisk implantation i ryggmärgen av de proximala avslitna framrotsstumparna kan emellertid göra det möjligt för skadade motoriska axoner i ryggmärgen att finna en väg in i den implanterade vävnaden och inleda sin regeneration distalt mot denerverade muskler – en process som då är identisk med den som sker efter en perifer nervskada. Denna kirurgiska procedur överfördes från omfattande experimentella studier till klinisk tillämpning av den svenske kirurgen Tomas Carlstedt.² Ingreppet är emellertid begränsat till vissa fall: Återkomst av muskelfunktion är med få undantag begränsad till skulder- och armbågsmuskulatur och återskapande av känsel-funktioner är alltså ett olöst problem.

BAKROTENS ÖVERGÅNGSZON

Till skillnad från skadade motorneuron, vars axoner har möjlighet att växa ut från ryggmärgens nervväxthämmande omgivning till den nervväxtstimulerande miljön i perifera nervsystemet, måste avslitna sensoriska axoner i bakroten växa i motsatt riktning. De behöver med andra ord ta sig förbi den nervväxthämmande miljö som snabbt utvecklas efter bakrotsavulsion i övergången mellan perifera och centrala nervsystemet och därefter fortsätta sin tillväxt i ryggmärgens nervväxthämmande miljö. Tidigt under individens utveckling etableras i ryggmärgens rötter en väldefinierad gräns mellan perifera och centrala nervsystemet, bakrotens övergångszon ("dorsal root transitional zone", DRTZ). Dess proximala del innehåller centralnervös vävnad, som skjuter ut i bakroten i form av centrala vävnadsutskott ("central tissue projections") (Figur 1b). Dessa möter de Schwannska cellerna och deras basalmembran i den perifera delen av bakroten. Gränsen mellan perifer och central nervvävnad kan tydligt

demonstreras genom infärgning med antikroppar mot det astrocytspecifika intermediärfilamentprotein GFAP ("glial fibrillary acidic protein") och basalmembranets laminin (Figur 1b). Myeliniserade axoner som löper från bakroten in i ryggmärgen har en Ranviersk nod vid DRTZ ("övergångsnoden"); myelinet bildas av Schwannska celler perifert och av oligodendrocyter centralt om denna nod.

"Till skillnad från skadade motorneuron, vars axoner har möjlighet att växa ut från ryggmärgens nervväxthämmande omgivning till den nervväxtstimulerande miljön i perifera nervsystemet, måste avslitna sensoriska axoner i bakroten växa i motsatt riktning."

CELLREAKTIONER EFTER BAKROTS-AVULSION

Avulsionsskadan och den Wallerska degenerationen av de avbrutna axonerna leder till omfattande reaktiva och degenerativa cellulära effekter i de skadade bakrötterna och angränsande del av ryggmärgen. Astrocyter i DRTZ och i ryggmärgen prolifererar, hypertrofierar och bildar tillsammans med så kallade NG2-gliaceller nervväxthämmande proteoglykaner³ och det kalciumbindande proteinet S100A4,⁴ som medverkar i bildandet av ett gliaärr. Molekyler i CNS-myelin, såsom Nogo, myelin-associerat glykoprotein (MAG) och oligodendrocytmyelin glykoprotein (OMGP), bidrar ytterligare till den nervväxthämmande miljön i DRTZ och ryggmärgen.³ Mikrogliaceller prolifererar kraftigt och frisätter cytokiner som stimule-

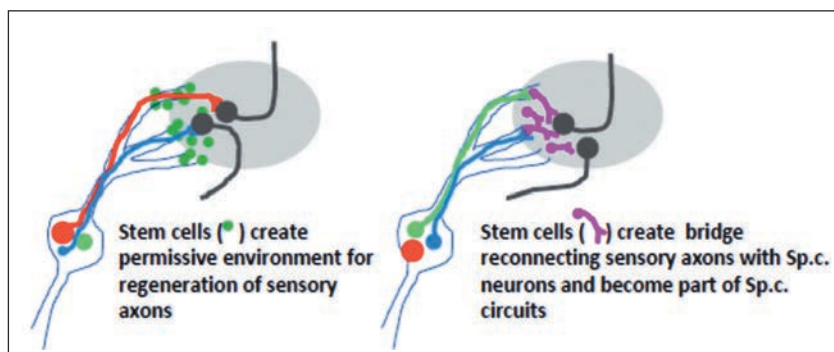
rar astrocythypertrofi och skapar, tillsammans med invaderande hematogena celler, en inflammatorisk miljö som negativt påverkar axonväxt, plasticitet och neuronöverlevnad.⁵ Experimentella studier har visat på omfattande bortfall av nervceller i bak- och framhorn efter rotavulsion,⁶ något som ytterligare försvårar förutsättningarna för återskapande av känsel-funktioner och kan leda till dysfunktionell plasticitet med uppkomst av kronisk neuropatisk smärta.

REGENERATION AV BAKROTSAXONER

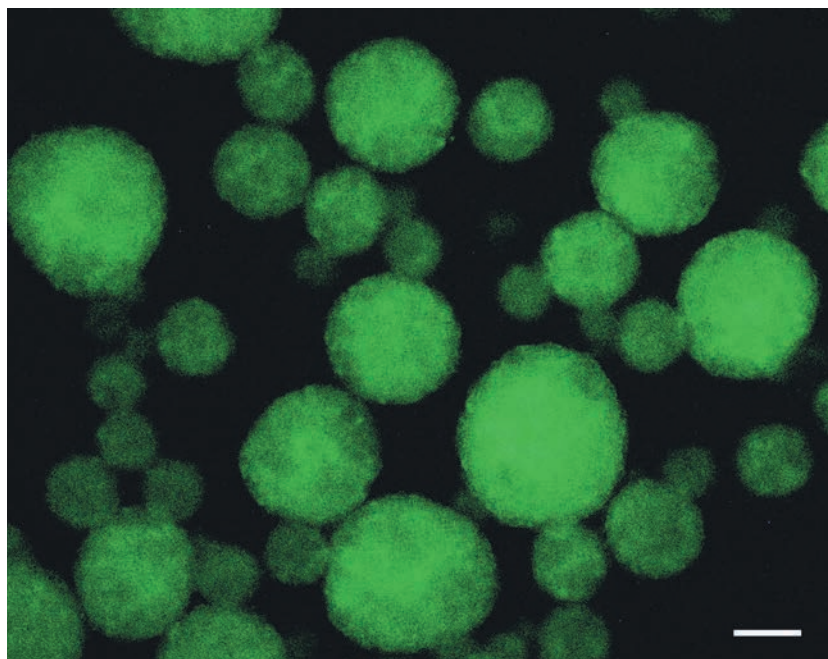
Tidigare studier har undersökt olika möjligheter att åstadkomma regeneration av skadade bakrotsaxoner in i ryggmärgen. Enzymatisk nedbrytning av proteoglykaner,³ intratekal eller systemisk administration av tillväxtfaktorer,⁷ eller implantation av nervväxstödande gliaceller från luktslemhinnan⁸ har visats bidra till växt av skadade sensoriska axoner in i ryggmärgen. Dessa studier har emellertid utförts i djurmodeller där bakrötter klämts eller klippts av utanför ryggmärgen, det vill säga på ett sätt som inte avspeglar den omfattande skada som drabbar ryggmärgen vid rotavulsion. I våra studier har vi därför använt en nyligen utvecklad experimentell modell där bakrötter slits från ryggmärgen,⁶ liknande den situation som sker vid klinisk rotavulsion.

STAMCELLER FÖR RYGGMÄRGSSKADA

Stamceller för transplantation till nervsystemet kan tjäna flera syften: i) minska cell- och vävnadsskada genom att motverka frisättning av skadliga ämnen; ii) understödja axonväxt och plasticitet genom frisättning av tillväxtfaktorer och/eller genom att skapa ett axonväxstödande substrat; iii) ersätta förlorade neurala celler och därigenom återskapa funktionalitet, till exempel remyelinisera demyeliniserade axoner eller reparera skadade neurala nätverk. För att återskapa funktion efter bakrotsavulsion med stamceller kan dessa tänkas fungera som en "brygga" som möjliggör för mottagarens bakrotsaxoner att växa in i ryggmärgen. Alternativt kan stamceller som differentierat till neuron i transplantatet sända axoner in i ryggmärgen och själva fungera som relä för information från kontaktande sensoriska axoner i mottagarens bakrot (Figur 2).



Figur 2. Möjligheter för transplanterade stamceller att bidra till funktionsåterkomst efter bakrotsavulsion. Vänstra bilden: Stamceller (mörkgröna) fungerar som guide för regenererande sensoriska axoner (blå, röda, ljusgröna). Högra bilden: Stamceller (rosa) fungerar som synaptiskt relä mellan regenererande sensoriska axoner och neuron i ryggmärgen och/eller som ersättning för förlorade neuron i ryggmärgen.



Figur 3. Sfärer av humana embryonala stamceller ("embryoid bodies"=neurosfärer) som uttrycker grönt fluorescerande protein (GFP) och predifferentierats till spinala neurala progenitorer (förstadier). Sfärerna transplanteras till avslitna bakrötter på "nakna" möss och kan lätt identifieras in vivo tack vare förekomsten av GFP. Skallstreck=200 µm.

Ett flertal källor för stamceller kan, beroende på syfte, komma ifråga för transplantation vid ryggmärgsskada. I våra nyligen genomförda studier har vi undersökt möjligheterna att utnyttja humana embryonala stamceller (ES-celler) för att reparera avslitna bakrötter.⁹ Dessa celler kan ge upphov till alla typer av neurala celler och kan också vara en källa för produktion av molekyler som skydd av skadad vävnad och axonregeneration. Dessutom uttrycker

dessa neurala progenitorer grönt fluorescerande protein, vilket gör det möjligt att lätt identifiera dem efter transplantation. Eftersom transplantation av odifferentierade ES-celler medför avsevärd risk för teratomutveckling, differentieras ES-cellerna därför till neurala progenitorer (förstadier till mogna neuron) i odling före transplantation. Under odlingsproceduren bildar differentierande ES-celler så kallade neurosfärer, några hundra mikrometer stora sam-

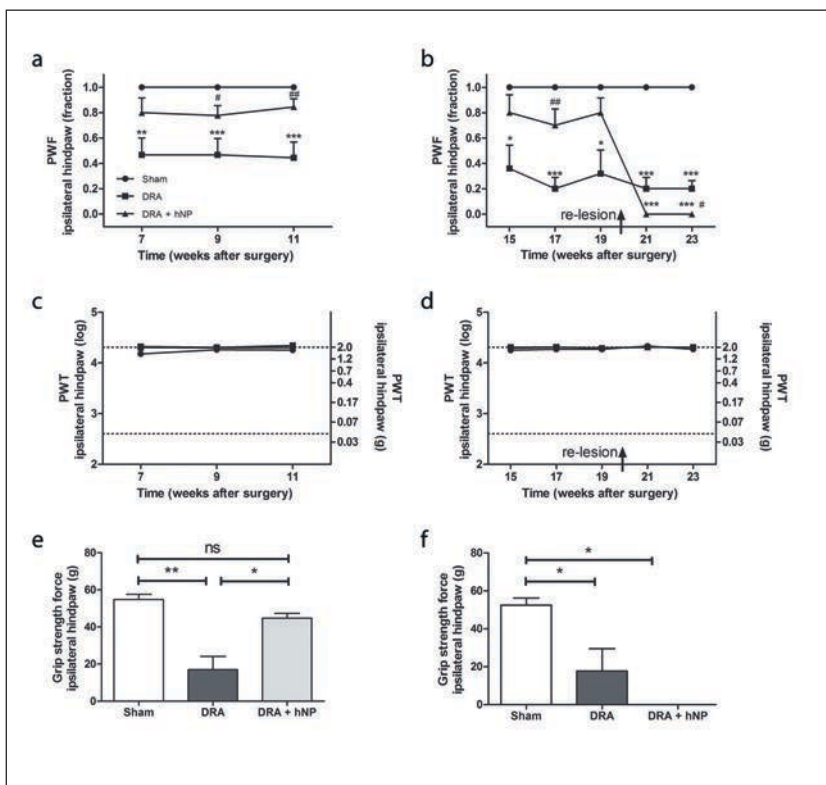
lingar av ett stort antal humana neurala progenitorer (hNPs) (Figur 3).

STAMCELLSTRANSPLANTAT FÖRMEDLAR FUNKTIONELL ÅTERKOMST

Våra djurförsök utfördes på så kallade nakna möss som saknar kompetenta T-celler och därför inte stöter bort främmande transplantat. Dorsalrötter på ena sidan i nedre ländryggmärgen (källor till ischiasnerven) exponerades och rycktes bort från ryggmärgen, neurosfärer med hNP placerades på avslitningsplatserna, varefter de avslitna rötterna placerades ovanpå neurosfärerna och adapterades till ryggmärgens yta. Djuren undersöktes före operation och regelbundet därefter med avseende på sensoriska och motoriska funktioner i upp till fem månader. Dessa undersökningar visade att möss som fått transplantat återfick avsevärd mekanisk smärtskänslighet och gripkraft i baktassen på den opererade sidan, vilket innebär att transplantaten förmedlade partiell återkomst av sensomotoriska funktioner (Figur 4). Viktigt att notera att detta skedde utan några tecken på hypersensitivitet eller allodyni, vilket tyder på att transplantaten inte åstadkom onormal neural kommunikation som skulle kunna leda till symtom hos försöksdjuren som brukar tolkas som tecken på neuropatisk smärta.

STAMCELLSTRANSPLANTAT FUNGERAR SOM BRYGGA

För att utreda underlaget för de positiva funktionella effekterna av transplantationerna "märktes" mottagardjurens sensoriska axoner med hjälp av kolera-toxinets bindande subenhet (CTB) före försökens avslutande. En liten mängd CTB injicerades i ischiasnerven på den opererade sidan. Under de följande dagarna transporterades CTB i retrograd riktning i ischiasnervens axoner till de nedre lumbala bakrotsganglierna, och därifrån i anterograd riktning i bakrötternas axoner mot ryggmärgen. Dessa försök visade rikligt med CTB-färgning i ipsilaterala bakhornet endast hos djur som fått hNP-transplantat, tydande på att sensoriska axoner i mottagardjuret växt in i ryggmärgen och där etablerat funktionella kontakter (Figur 5). Denna slutsats verifierades i parallella försök som resulterade i fullständig



Figur 4. Transplantat av humana neurala progenitorer (hNP) förmedlar partiell återkomst av sensomotoriska funktioner hos möss med bakrotsavulsion. (a) Bakrotsavulsion (DRA) leder till kraftigt nedsatt smärtekänslighet i ipsilaterala baktassen som påtagligt förbättras efter hNP-transplantation. (b) Förnyad skada på de reparerade bakrötterna fem månader efter transplantation eliminerade den återkomna smärtekänsligheten fullständigt. * = signifikant skillnad jämfört med skenoperation (sham), # = signifikant skillnad jämfört med DRA. (c+d) Varken obehandlad DRA eller hNP-behandlad DRA uppvisade mekanisk allodyni. (e) Före förnyad skada på reparerade bakrötter, uppvisade transplanterade försöksdjur signifikant förbättring av greppstyrka i ipsilaterala baktassen jämfört med icke-transplanterade (DRA) individer. (f) Efter förnyad skada på reparerade bakrötter har den förbättrade greppstyrkan fullständigt eliminerats. PWF = "paw withdrawal frequency"; PWT = "paw withdrawal threshold". Data i a-f är medelvärden+SEM. Asterisker markerar statistisk signifikansnivå enligt analys med envägs-ANOVA och Tukey's multipla jämförelser (*, #, *p<0.5, ##, **p<0.01, ***p<0.001). Tidigare publicerad i Scientific Reports.⁹

elimination av återkomna funktioner efter avklippning av de reparerade bakrötterna intill ryggmärgen. Dessutom förelåg inga tecken på växt av axoner från transplantaten in i ryggmärgen. Sammantaget stöder dessa observationer slutsatsen att hNP-transplantat skapat en "brygga" som möjliggör för mottagardjurets sensoriska axoner att ta sig igenom den nervväxthämmande miljön i övergångszonen och återbilda en väg för känselinformation från periferin till ryggmärgen.

STAMCELLER ÖPPNAR EN "GRIND" IN TILL RYGGMÄRGEN

Transplantaten överlevde framgångsrikt och integrerades i mottagardjuret i alla

försök. Våra undersökningar av transplantaten efter avslutade försök visade att vissa neurala progenitorer differentierats till astrocyter och vissa till neuron (huvudsakligen med inhibitorisk fenotyp), medan en betydande andel förblev i ett omoget stadium. Noggranna analyser visade inga tecken på förekomst av tumorigena celler, tydande på att neurala progenitorer som producerats från humana ES-cell utgör en säker källa för celltransplantation med avseende på risk för teratombildning eller annan aberrant växt.

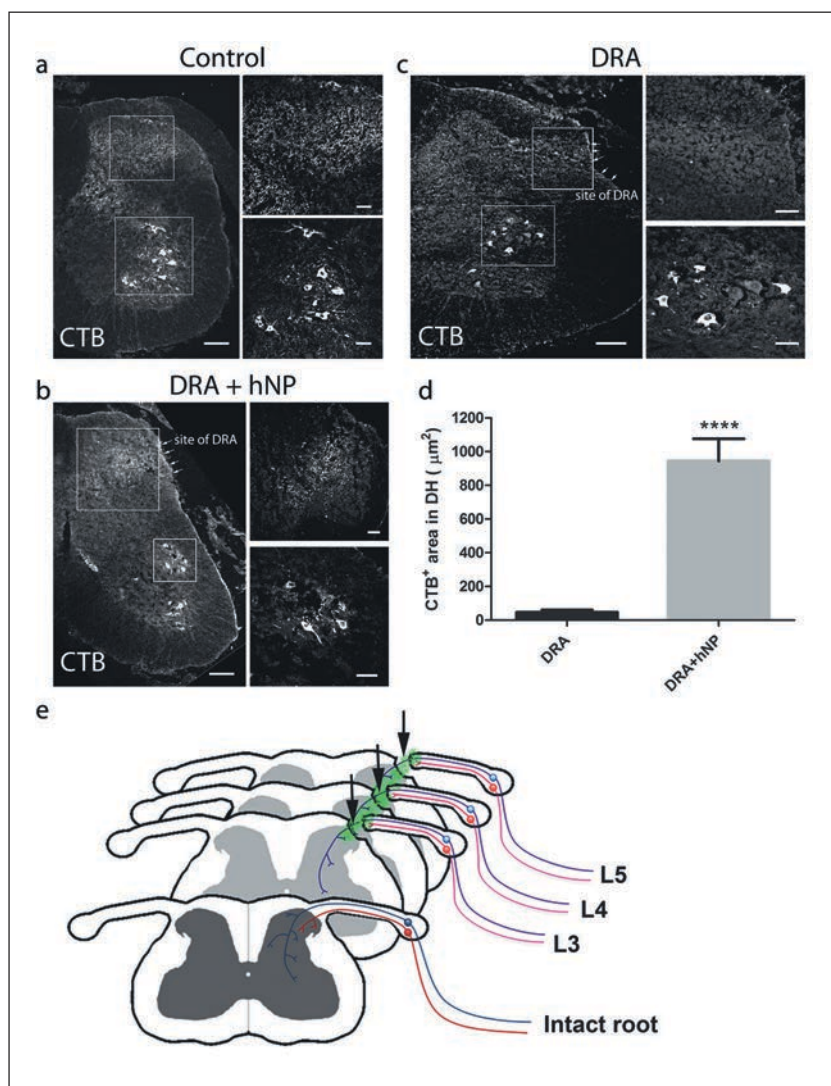
Transplantaten uppvisade högst intressanta egenskaper i interaktionen med mottagardjurets celler. Axoner hos mottagardjuret föreföll växa längs hNP-

celler och i gränsområdet mellan perifer och central nervvävnad upptog sådana celler områden där det nästan helt saknades GFAP- och NG2-positiva celler, det vill säga de komponenter som framför allt anses ligga bakom barriären som hindrar skadade sensoriska axoner att växa in i ryggmärgen. Denna observation tyder på att transplanterade hNP-celler öppnar en "grind" in i ryggmärgen för mottagardjurets sensoriska axoner.

"Ytterligare forskning på denna försöksmodell kan också bidra till att överföra stamcellsbase-rad behandling till det bredare ryggmärgsskadeområdet."

FRAMTIDSPERSPEKTIV

Resultaten av våra studier visar att stamcellsbase-rad intervention kan vara en lovande väg för förbättrad läkning vid vissa ryggmärgsskador. Även om rotavulsion inte är en vanlig skada, kan den orsaka allvarlig funktionsnedsättning och betydande försämring av livskvalitet hos de oftast unga patienterna. Bakrotsavulsion kan anses ha vissa fördelaktiga aspekter för stamcellstransplantation ur experimentell och translationell synvinkel, genom de relativt väldefinierade anatomiska skadeförhållandena och funktionsrubbingarna, den förhållandevis lättillgängliga transplantationsplatsen och möjligheterna för detaljerade funktionsanalyser efter ingreppet. Ytterligare forskning på denna försöksmodell kan också bidra till att överföra stamcellsbase-rad behandling till det bredare ryggmärgsskadeområdet. Denna forskning behöver innefatta utveckling av pre- och posttransplanterade celler och deras axonväxtstödande egenskaper, och kan leda till identifiering av stamcellsfakto-



Figur 5. Spårning av axoner med koleratoxinets bindande fragment (CTB). (a) CTB injicerat i ischiasnerven i kontrolldjur transporteras via mottagardjurets sensoriska axoner in i ryggmärgens bakhorn (DH) och in i motorneurongrupperna i framhornet. (b) Försöksdjur som fått hNP-transplantat till platsen för bakrotsavulsion (DRA) uppvisar CTB-märkta sensoriska axoner i bakhornet (DH). (c) Försöksdjur med bakrotsavulsion och utan hNP-transplantat uppvisar ingen CTB-märkning i bakhornet (DH), men väl märkta motorneuron i framhornet. Skalstreck = 100 µm i bilder som visar den ipsilaterala sidan av ryggmärgen; 50 µm för konfokalbilder av områden i fram- och bakhorn. (d) CTB-märkning i ipsilaterala bakhornet (DH) observerades efter bakrotsavulsion endast hos försöksdjur som fått hNP-transplantat. Y-axeln visar area av CTB+ i ipsilaterala bakhornet DH (medelvärden ± SEM från tre försöksdjur/experimentgrupp); asterisker visar statistisk signifikansnivå enligt Student's t-test (**** $p < 0.0001$). (e) Lokalisation av hNP-transplantat och förlopp av sensoriska axoner i avulsionsområdet i olika experimentgrupper. I den intakta roten löper myeliniserade (blå) och omyeliniserade (röd) sensoriska axoner från bakrotsganglier via bakrötterna in i ryggmärgens bakhorn. Efter hNP-transplantation (grön; pilar) passerar myeliniserade axoner transplantaten och in i ryggmärgens ytliga och djupa delar, medan omyeliniserade axoner växer in i transplantatet och stannar där. Tidigare publicerade i Scientific Reports.⁹

rer som i slutändan kan utnyttjas kliniskt utan behov av stamcellerna själva.

Vår pågående forskning inriktas dels på att klargöra mekanismer som ligger till grund för de positiva effekterna av stamcellstransplantat vid rotavulsion,

dels på att utveckla möjligheter till behandling av dessa skador med fördröjd transplantation. Båda dessa aspekter kan bidra till utveckling av förbättrad behandling av kliniska rotavulsionsskador.

REFERENSER

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=spinal+cord+injury+AND+stem+cell&search=Search>
- Carlstedt T, Havton L. The longitudinal spinal cord injury: lessons from intraspinal plexus, cauda equina and medullary conus lesions. *Handbook Clin Neurol* 2012; 109:337-54. doi:10.1016/B978-0-444-52137-8.00021-8. Review.
- Fawcett JW, Schwab ME, Montani L, Brazda N, Müller HW. Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components. *Handbook Clin Neurol* 2012; 109:503-22. doi:10.1016/B978-0-444-52137-8.00031-0. Review.
- Fang Z, Forslund N, Takenaga K, Lukanidin E, Kozlova EN. Sensory neurite outgrowth on white matter astrocytes is influenced by intracellular and extracellular S100A4 protein. *J Neurosci Res* 2006; 83(4):619-26.
- Aldskogius H, Kozlova EN. Dorsal root injury for the study of spinal cord injury repair. In: *Animal Models of Spinal Cord Repair*. Springer Protocols, Neuromethods, vol. 76; 2012, pp. 109-129. DOI: 10.1007/978-1-62703-197-4_5
- Chew DJ, Carlstedt T, Shortland PJ. A comparative histological analysis of two models of nerve root avulsion injury in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37(6):613-32. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01176.x.
- Smith GM, Falone AE, Frank E. Sensory axon regeneration: rebuilding functional connections in the spinal cord. *Trends Neurosci* 2012; 35(3):156-63. doi: 10.1016/j.tins.2011.10.006. Epub 2011 Nov 30. Review.
- Kachramanoglou C, Li D, Andrews P, East C, Carlstedt T, Raisman G, Choi D. Novel strategies in brachial plexus repair after traumatic avulsion. *Br J Neurosurg* 2011; 25(1):16-27. doi: 10.3109/02688697.2010.522744. Epub 2010 Oct 27. Review.
- Hoeber J, Trolle C, König N, Du Z, Gallo A, Hermans E, Aldskogius H, Shortland P, Zhang SC, Deumens R, Kozlova EN. Human embryonic stem cell-derived progenitors assist functional sensory axon regeneration after dorsal root avulsion injury. *Sci Rep* 2015; 5:10666. doi:10.1038/srep10666.
- Aldskogius H, Kozlova EN. Strategies for repair of the deafferented spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 40(1-3):301-8. Review.



ELENA N. KOZLOVA
Docent, Institutionen för neurovetenskap, Regenerativ neurobiologi, Biomedicinsk centrum, Uppsala universitet
elena.kozlova@neuro.uu.se